

Untersuchung der biologischen Aktivität von Nanopartikeln in Tumorschnittkulturen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

ingereicht von:

Lea Maria Merz

geboren am 11.11.1992 in Rastatt

angefertigt an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Institut für Anatomie sowie am

Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Klinische Pharmakologie

Betreuer:

Prof. Dr. med. Ingo Bechmann, Prof. Dr.-Ing. Achim Aigner

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.12.2019

Inhalt

Inhalt	2
Bibliographische Beschreibung	3
1 Einleitung	5
1.1 Der Einsatz der RNA-Interferenz (RNA-i) und von Nanopartikeln in der Medizin	5
1.2 Die RNA-Interferenz	6
1.2.1 Der Prozess der RNA-Interferenz	6
1.2.2 Vor- und Nachteile der RNA-Interferenz	9
1.3 Nanopartikel als Transportsysteme der siRNA: Polyethylenimine	10
1.4 Die Transportfähigkeit von Polyethyleniminen und ihre Optimierung	12
1.5 Anwendung der Polyethylenimine in in-vivo-Systemen	14
1.6 Präklinische Tumormodelle	15
1.6.1 Zellkulturen	15
1.6.2 Xenograft-Modelle und Gewebeschnittkulturen	16
2 Fragestellung	18
3 Literatur	19
4 Publikationen	24
5 Anlagen	32
6 Zusammenfassung und Ausblick	33

Bibliographische Beschreibung

Merz, Lea Maria

Untersuchung der biologischen Aktivität von Nanopartikeln in Tumorschnittkulturen

Universität Leipzig, Dissertation

42 Seiten, 91 Literaturangaben, 1 Publikation

Referat:

Die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNA-i) als ein natürlicher Prozess der Genregulation sorgte auf Grund des möglichen Einsatzes für therapeutische Zwecke für großes Interesse. Probleme beim Transport der RNA-i-induzierenden kleinen RNA-Moleküle (siRNAs) traten vor allem hinsichtlich Ladungsverhältnissen, Instabilität und Molekulargewicht auf. Um diese Probleme zu lösen, wurden zunehmend Transportsysteme aus Nanopartikeln untersucht. Die verwendeten Polyethylenimine (PEIs) sind positiv geladene, verzweigt oder linear aufgebaute Polymere, welche mit RNAs (siRNA, miRNA) Komplexe bilden. Modifikationen der PEI-Komplexe können zu einem effektiveren Transport der RNA, zu veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften und zu einer verbesserten Biokompatibilität führen. Der Erfolg dieser therapeutischen Nanopartikel ist insbesondere von der effizienten zellulären Aufnahme, der Fähigkeit der Gewebepenetration und vom Erreichen der Zielzellen abhängig. Der Großteil der bisherigen Untersuchungen von PEIs wurde an Zellkulturen durchgeführt. Die hier erzielten Ergebnisse lassen sich jedoch nur schwer auf komplexe in-vivo-Systeme übertragen.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Anwendung der PEIs an Tumorschnittkulturen untersucht. Dafür wurde zuerst die Kultivierung von 350 µm durchmessenden Dünnschicht-Präparaten von Xenotransplantat-Tumoren aus PC3 und U87 Zelllinien etabliert. Eine erfolgreiche Kultivierung konnte über 14 Tage durchgeführt werden. An bestimmten Zeitpunkten nach Kultivierungsbeginn (Tag 1, 3, 5, 7 und 14) wurden die Morphologie und die Vitalität (Apoptose, Proliferation) durch eine HE- oder immunhistochemische Färbung bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Morphologie der Tumorzellen sowie die Proliferation und Apoptose über den gesamten Kultivierungszeitraum erhalten blieben.

Im nächsten Schritt wurde sowohl der Transport der siRNA von nicht-modifizierten und modifizierten PEIs als auch der Transport durch deren Lipopolyplex-Derivate (PEI-siRNA-Komplexe mit Liposomenhülle) analysiert. Für die Visualisierung der Komplexe wurde fluoreszenzmarkierte siRNA verwendet. Die PEI-siRNA-Komplexe wurden auf die Schnittkulturen gegeben und über 24 Stunden kultiviert. In der mikroskopischen Analyse und ihrer Quantifizierung erfolgte die erste Einschätzung der Gewebepenetration. Es zeigten sich Unterschiede in der Gewebepenetration der verschiedenen Nanopartikel, abhängig von deren Oberflächenladung.

Um die biologische Aktivität der Nanopartikel in lebenden Zellen besser evaluieren zu können, wurde im dritten Schritt der Knockdown eines endogenen Genproduktes untersucht. Zielgen

war hier das Onkogen Survivin, welches ein wichtiger endogener Überlebensfaktor der Tumorzellen darstellt. Es gelang der Nachweis eines durch PEI-siRNA-Komplexe vermittelten Knockdowns des Survivin-Gens.

Insgesamt konnten somit Gewebeschnittkulturen als Grundlage für die ex-vivo Untersuchung von Nanopartikeln etabliert werden. Es konnten nicht nur Aussagen über die Gewebepenetration der Nanopartikel, sondern auch über ihre biologischen Aktivitäten in einer intakten Gewebestruktur getroffen werden.

1 Einleitung

1.1 Der Einsatz der RNA-Interferenz (RNA-i) und von Nanopartikeln in der Medizin

Seit einigen Jahren ist das Prinzip sowohl des Gen-Knockouts als auch des Gen-Knockdowns ein sehr wichtiges Thema der medizinischen Forschung. Im Vordergrund steht hierbei der therapeutische Einsatz dieser Prinzipien und dessen Weiterentwicklung. Unter einem Gen-Knockdown versteht man die Reduktion der Genexpression eines oder mehrerer Gene eines Organismus. Bei einem Gen-Knockout kommt es hingegen zu einem vollständigen Abschalten eines Gens im Genom eines Organismus.

Die RNA-i als natürlicher Mechanismus des Gen-Knockdowns hat in den letzten Jahren an großer Bedeutung gewonnen. Ihr Prinzip beruht auf Wechselwirkungen von nicht kodierenden, kurzen RNA-Molekülen (small interfering RNA = siRNA, micro RNA = miRNA) und einer Ziel-mRNA (messenger RNA). Ein durch diese Wechselwirkungen erzielt Stilllegen von Genen war ein bedeutender Wendepunkt in der molekularen Medizin. Die Entdeckung der RNA-i löste eine Fülle an Studien aus, da sie verschiedenste Therapien revolutionieren kann [1]. Theoretisch sollte jede Krankheit, die auf der Überexpression von Genen basiert, durch RNA-Interferenz therapiert werden können. Beispiele dafür sind Tumore, bestimmte Autoimmunkrankheiten, virale Infektionen oder genetische Erbkrankheiten [1]. Einige Studien haben gezeigt, dass auch Einzelnukleotid-Polymorphismen in mutierten Allelen Ziel der RNA-Interferenz sein können. Folglich könnte sogar ein krankes Allel, welches sich vom gesunden Allel nur durch einzelne Nukleotide unterscheidet (z.B. einige Onkogene), herunterreguliert werden [2, 3]. Darüber hinaus kann die RNA-Interferenz die Wirkung von einigen traditionellen Chemotherapeutika verstärken. Studien zeigten diesen Effekt beispielsweise in Experimenten mit dem MDR1-Gen (Multidrug resistance gene) als Zielstruktur. Es zeigte sich einerseits eine Resensibilisierung für die Chemotherapie und andererseits gelang die Ausschaltung doppelsträngiger Reparaturenzyme [4, 5].

Auf Grund der Instabilität, des Molekulargewichts und der Ladung der zur Induktion der RNA-i verwendeten kleinen RNA-Moleküle werden Transportsysteme benötigt. Hierbei können sowohl virale als auch nicht-virale Systeme eingesetzt werden. Aus der Gruppe der nicht-viralen Transportsysteme werden vermehrt Modifikationen von Nanopartikeln untersucht. Diese können den zielgerichteten Transport der RNA, ihren Schutz, die zelluläre Aufnahme oder die intrazelluläre Freisetzung vermitteln. Eine wichtige Gruppe dieser Nanopartikel sind polymere Nanopartikel, welche auf PEIs basieren. PEIs sind positiv geladene, linear oder verzweigt aufgebaute Polymere, welche nanostrukturierte Komplexe mit der zu transportierenden RNA bilden.

Das Prinzip der RNA-i und die transportierenden Nanopartikel sind in vitro in den vergangenen Jahren gut untersucht worden und bereits etabliert. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung der RNA-i in Zellkulturen. Die damit erzielten Ergebnisse lassen sich jedoch auf die in vivo Situation nur ansatzweise übertragen. Eine andere Möglichkeit ist die Durchführung der in vivo Studien an lebenden Organismen, zum Beispiel in Mäusen. Die Untersuchung der Transportsysteme

wird allerdings durch die komplexe Pharmakokinetik eines ganzen Organismus erschwert. Folglich sind präklinische ex vivo Tumormodelle als Zwischenschritt hin zur klinischen Anwendung eine gute Alternative.

1.2 Die RNA-Interferenz

1.2.1 Der Prozess der RNA-Interferenz

Die RNA-i ist ein natürlicher Prozess, der in einem Großteil der eukaryontischen Zellen stattfindet und für therapeutische Zwecke genutzt werden kann [6, 7]. Sie ist eine Form der Genregulation, bei der eine Sequenz einer Ziel-RNA mittels einer kurzen komplementären RNA erst gespalten und anschließend abgebaut wird. Das Prinzip der RNA-i wurde erstmalig im Jahre 1990 auf Grund einer zufälligen Entdeckung beschrieben. Damals versuchte man, durch Transfektion von DNA eine Intensivierung der Farben von Petunien zu erreichen. Man erzielte jedoch den gegenteiligen Prozess, eine Farbreduktion. Dieses unerwartete Ergebnis wurde durch einen posttranskriptionellen Knockdown oder als Ko-Suppression von Genen interpretiert [8]. Der nächste Schritt der Erforschung der RNA-i stellte eine Inhibition der Genexpression durch doppelsträngige antisense-RNA in *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) dar. So entstand der Begriff der RNA-i [9] und es folgte ihre Erprobung in mammalian Zellen [10].

Die RNA-i kann mit siRNA oder mit miRNA ablaufen. Für beide gibt es sowohl einen unterschiedlichen Entstehungsprozess als auch Unterschiede in der Funktion. Die siRNA entsteht, indem größere doppelsträngige RNA-Moleküle (mehrere 100 bis 1000 Nukleotide) durch einen Enzymkomplex, genannt Dicer, in kürzere Stücke zerlegt werden. Der Enzymkomplex hat die Funktion einer RNase-III-Endonuklease und katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phosphodiesterasebindungen in doppelsträngigen RNA-Ketten. Diese Spaltung findet innerhalb der Kette statt [11]. Bei der siRNA handelt es sich um eine doppelsträngige RNA, bestehend aus circa 21 Basenpaaren. Ein weiteres Strukturmerkmal ist ein charakteristischer Überhang von zwei Basenpaaren am jeweiligen 3'-Ende eines Stranges [12].

Die miRNA entsteht im Gegensatz zur siRNA aus genomischer DNA und wurde erst im Jahr 2000 entdeckt. Sie spielt eine entscheidende Rolle in der Genaktivität, folglich auch in der Tumorentstehung. Beispielsweise können miRNAs sowohl als Onkogene als auch als Tumorsuppressorgene agieren [13]. Zusätzlich kann die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Zytostatika oder Strahlentherapie deutlich beeinflusst werden. Einige miRNAs, welche relevant in der Tumorentstehung sind, konnten bereits identifiziert werden. Außerdem wurden Zielgene dieser miRNA-Sequenzen bestimmt, welche für die Tumorentstehung, das Wachstum und die Metastasierung wichtig sind [14].

Die miRNA befindet sich in nicht proteinkodierenden Abschnitten und entsteht aus einem langen Primärtranskript (500-3000 Nukleotide). Im ersten Schritt wird mit Hilfe der RNA-Polymerase II durch Transkription die pri-miRNA gebildet. Diese faltet sich zu einer charakteristischen Sekundärstruktur. Im nächsten Schritt wird die pri-miRNA in eine haarnadelförmige pre-

miRNA (65-70 Nukleotide) umgewandelt. Diese Umwandlung wird mit Hilfe eines Mikroprozessor-Komplexes (Drosha- DGCR8) noch im Zellkern katalysiert [15, 16]. Anschließend werden die entstandenen Nukleotide durch Exportin 5 vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert, und das Enzym Dicer (RNase-III-Enzym) schneidet die endgültigen ds-miRNAs (17–24 Nukleotide), welche auch als reife miRNAs bezeichnet werden [14].

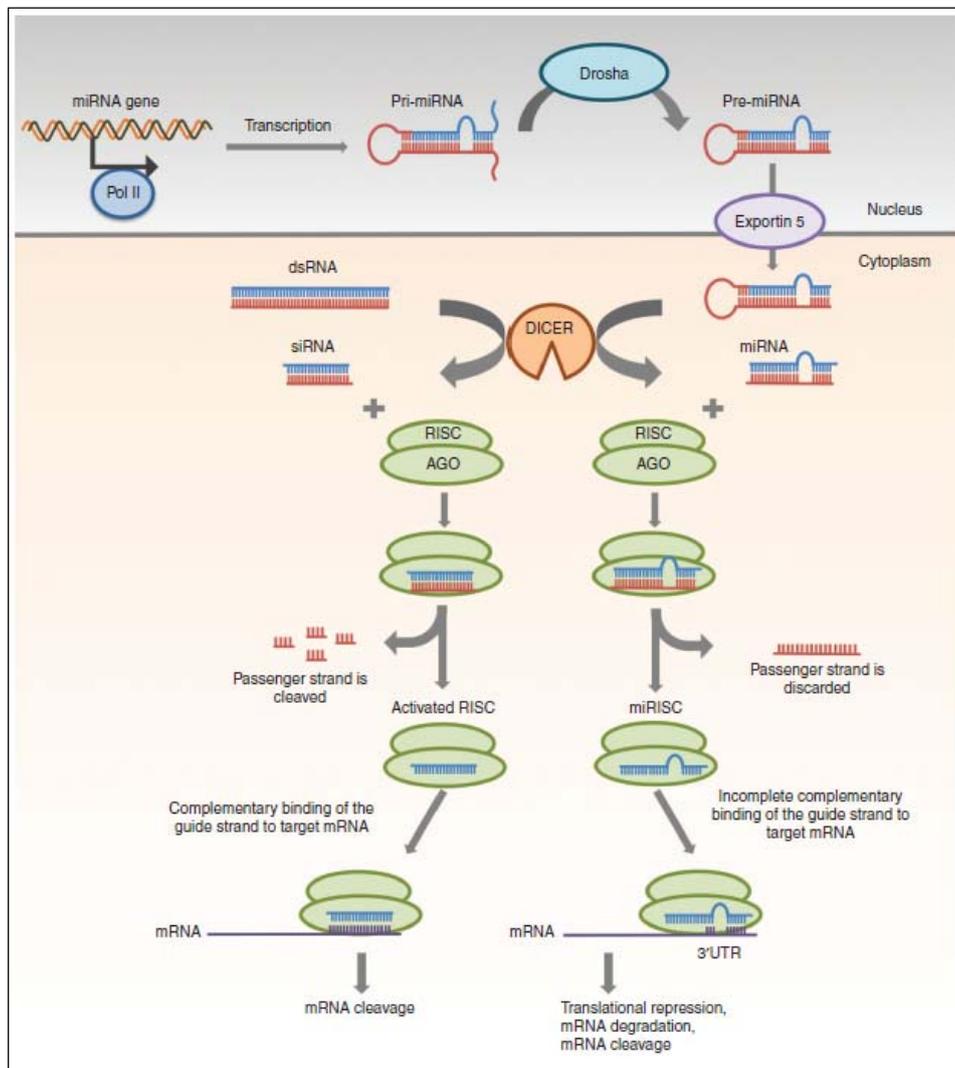


Abb. 1: Abschaltungsmechanismen von Genen durch siRNA/miRNA. *siRNA:* Doppelsträngige RNA wird durch das Dicerenzym in siRNA katalysiert und in den RISC-Komplexen transportiert. Durch das Argonaut-2 Protein wird ein Strang gespalten, es verbleibt ein Leitstrang. Die Bindung des Leitstranges an die Ziel-mRNA führt zu dessen Abbau. *miRNA:* Mithilfe der Polymerase II wird das miRNA-Gen im Nucleus transkribiert und es entsteht pri-miRNA. Diese wird in Drosha zu pre-miRNA geschnitten und durch Exportin 5 in das Zytoplasma transportiert. Es folgt die Umwandlung zu miRNA durch Dicer. Anschließend wird die miRNA in den RISC-Komplex aufgenommen. Ein Strang wird abtransportiert, während der Leitstrang mit Hilfe von partieller komplementärer Bindung miRISC an die Ziel-mRNA führt. Die Ziel-mRNA wird entweder abgebaut oder gespalten oder ihre Translation wird gehemmt. *siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing, Lam JKW et al., Molecular Therapy: Nucleic Acids, 2015 [17]*

Sowohl die siRNA als auch die miRNA werden nun in einen sogenannten RISC-Komplex (RNA-Induced Silencing Complex) eingebaut [18]. Seine Zusammensetzung unterscheidet sich je

nach Spezies. Dieser Komplex wird in einem mehrstufigen Prozess im Zytosol gebildet. Eine zentrale Rolle in der Funktion des RISC-Komplexes spielen Proteine der Argonaut Familie. Die interferierende siRNA beziehungsweise miRNA wird an ein Protein der Argonaut Familie übergeben. Anschließend werden sie durch eine aktive katalytische Domäne des Argonaut-2 Proteins gespalten [19, 20]. Es entsteht ein sogenannter Leitstrang, welcher im Komplex verbleibt, während der zweite Strang außerhalb des Komplexes abgebaut wird. Als Leitstrang wird dabei der Strang behalten, welcher an seinem 5'-Ende eine geringere thermodynamische Stabilität aufweist [21–23]. Der Leitstrang wird im nächsten Schritt, in räumlicher Nähe zum RISC-Komplex, an eine komplementäre Ziel-RNA gebunden.

Während bei der siRNA eine perfekte Komplementarität zum Leitstrang vorliegen muss, kann die miRNA auch nur partiell komplementär sein. Essenziell für eine Bindung der miRNA ist die sogenannte Seed-Region. Diese umfasst, ausgehend vom 5' Ende, 2 bis 7 Nukleotide und muss sich als perfekt komplementär zum Leitstrang erweisen. Sie ist ausschlaggebend für die Bindung und die Aktivität der miRNA. Unter der Bedingung, dass die Seed-Region perfekt komplementär ist, kann eine miRNA bis zu mehrere 100 Zielgene haben [24].

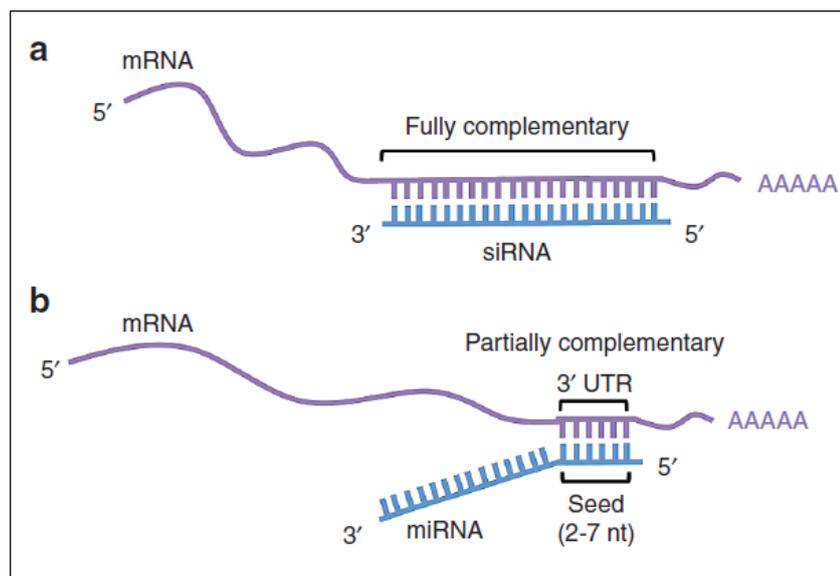


Abb. 2 Unterschied bei der Erkennung der Ziel-mRNA. a) Die siRNA ist komplett komplementär zur ihrer Ziel-mRNA. **b)** Die miRNA ist nur teilweise komplementär zur ihrer Ziel-mRNA. Es gibt eine sogenannte Seed-Region, bestehend aus den Nukleotiden 2-7 vom 5'-Ende ausgehend. Diese Seed Region bindet an das 3'-UTR (three prime untranslated region) der Ziel-mRNA. *siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing, Lam JKW et al., Molecular Therapy: Nucleic Acids, 2015 [17]*

Nach Anlagerung des Leitstrangs an die komplementäre RNA kommt es zur Spaltung der Ziel-mRNA durch das Argonaut-2 Protein, welches eine Endonukleaseaktivität aufweist. Der Schnitt erfolgt, ausgehend vom 5'-Ende der komplementären siRNA, zwischen der 10. oder 11. Base. Es folgt eine Degradation der Spaltungsprodukte durch Nukleasen und p-Bodys. Die Aktivierung des RISC-Komplexes kann alternativ auch die Translation unterdrücken oder Tran-

skripte destabilisieren. Die Funktion der miRNA beinhaltet vor allem die Hemmung der Translation [25]. Die siRNA verursacht primär die Spaltung der mRNA mit nachfolgendem Abbau, dies kann jedoch ebenfalls durch die miRNA bewirkt werden [1].

1.2.2 Vor- und Nachteile der RNA-Interferenz

Insgesamt ist die RNA-i eine sowohl sehr potente als auch spezifische Variante, um Gene kontrolliert auszuschalten. Im Vergleich zu anderen Antisense-Methoden, zum Beispiel mit DNA-Oligonukleotiden oder Ribozymen, ist sie deutlich potenter [26]. Ein großer Vorteil der RNA-i ist die theoretisch uneingeschränkte Wahl an Zielstrukturen [12].

Einer der kritischsten Punkte im Einsatz der siRNA ist der Transport zu den Zielzellen oder dem Zielgewebe. Sowohl die negative Ladung als auch die Größe behindern den natürlichen Übergang durch die Zellmembran. Dies macht die Umhüllung oder Komplexierung, z.B. durch PEIs oder auch durch Liposomen, notwendig. Da die RNA-i auf zellulärer Ebene eingreift und die eingesetzten bioaktiven Substanzen die Mechanismen des natürlichen Systems benutzen, besteht das Risiko dies zu stören. So ist für die natürliche Genregulation der miRNA der intakte Ablauf der RNA-i für die Zelle absolut essentiell. Ektope und körpereigene RNA sind somit Konkurrenten. Die siRNA ähnelt in ihrer Struktur den Vorläufern der miRNA sowohl vor als auch nach der Verarbeitung durch das Enzym Dicer. Studien haben gezeigt, dass die übermäßige Inanspruchnahme des miRNA-Pfades durch ektope RNA schwerwiegende Folgen haben kann. Die Verabreichung hochdosierter AAV kodierender shRNA (AAV = Adeno-assoziiertes-Virus, sh = small hairpin) führte in Mäusen beispielsweise zu einer vermehrten Letalität. Ungefähr die Hälfte der Mäuse entwickelte einen dosisabhängigen Leberschaden. Die Verabreichung hoher Dosen führte sogar innerhalb von 2 Monaten zu ihrem Tod. Die erhöhte Morbidität konnte mit der reduzierten Expression der körpereigenen, leberspezifischen miRNA erklärt werden [27].

Ebenfalls problematisch bei der Anwendung ektopter siRNA ist die Gefahr einer folgenden Aktivierung des Immunsystems. Vor allem längere doppelsträngige RNA (27-29 bps) neigt vermehrt dazu, sowohl Interferone als auch Toll-Like-Rezeptoren zu aktivieren. Ein Beispiel hierfür ist die Anregung des Toll-Like-Rezeptors 7 im endosomalen Teil der plasmacytoiden dendritischen Zellen und somit die Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Studien zeigten, dass die Aktivierung des Toll-Like-Rezeptors 7 durch Nukleotidsequenzen mit der Abfolge 5'-GUCCUCAA-3' erreicht wird [28]. Generell konnte eine verstärkte Stimulation der Immunreaktion und Aktivierung inflammatorischer Zytokine bei dem Einsatz von Guanin- und Uracilreichen Sequenzen beobachtet werden.

Trotz hoher Spezifität der eingesetzten ektopter siRNA kann es zum Stilllegen nicht beabsichtigter Zielstrukturen kommen [29]. Die daraus resultierende mögliche Veränderung der Genaktivität stellt ein schwer vorhersehbares Risiko dar. Beispielsweise wurde in einer in-vitro Studie nach Zugabe zufällig gewählter siRNA die Zellviabilität von einem Drittel der transfe-

rierten Zellen beeinflusst [30]. Teilweise zeigten sich sowohl toxische Einflüsse als auch ungewollte off-Target-Effekte. Letztere traten bereits beim Übereinstimmen von nur 11 Nukleotiden der ektopen siRNA und der Ziel-RNA, beziehungsweise auch einer anderen mRNA, auf [29]. In aktuelleren Untersuchungen ergaben sich bei der Mehrheit der ungewollten Knockdown-Phänomene eine Übereinstimmung von 6-7 Nukleotiden innerhalb der Seed-Region [31–34]. Erstaunlicherweise blieben jedoch auch viele Gene, welche mit der Seed-Region einer siRNA gut übereinstimmten, unbeeinflusst [32].

Auch das Transportsystem kann die Genexpression verändern. Eine Studie hat beispielsweise gezeigt, dass die Kombination aus Lipid-vermittelten Transportsystemen und siRNA sowohl zu sequenzspezifischen als auch zu klassenspezifischen Veränderungen der Genexpression führt [35]. Um ungewollte Knockdown-Phänomene zu vermeiden, können Veränderungen im Aufbau der siRNA hilfreich sein. Beispielsweise kann eine 2'-O-Methyl-Modifikation an der 2. Base zu einer signifikanten Reduktion der off-Target-Effekte führen, ohne den gewollten Effekt zu stören [36]. Daraus lässt sich folgern, dass nicht nur die Transportsysteme, sondern auch der Aufbau der siRNA weiterentwickelt werden müssen.

Im Allgemeinen beurteilen die meisten der genannten Experimente den Einfluss der unerwünschten Genexpressionen anhand der mRNA Anzahl. Der Einsatz ektopter siRNA verursacht jedoch nicht nur die Degradation und endonukleolytische Spaltung der Ziel-mRNA, sondern kann auch die Translation inhibieren. Es sollten in zukünftigen Experimenten folglich auch die Veränderung der Proteine beziehungsweise der Proteinanzahl berücksichtigt werden. Abschließend kann man sagen, dass die größten Herausforderungen der RNA-i in der Verwendung von geeigneten Zielstrukturen, dem gezielten Transport und der Minimierung der Toxizität beziehungsweise ungewollter off-Target-Effekte bestehen.

1.3 Nanopartikel als Transportsysteme der siRNA: Polyethylenimine

Die größte Herausforderung der therapeutischen Anwendung der RNA-i ist der Transport der RNA in-vivo. siRNA ist relativ instabil und leicht abbaubar. Hinzu kommt, dass sowohl die Ladung als auch das Molekulargewicht den Transport über die Zellmembran erschweren, wenn nicht sogar verhindern. Es wird ein Schutz gegenüber enzymatischem oder nicht-enzymatischem Abbau und die Freisetzung aus den Endosomen beziehungsweise Lysosomen benötigt. Pharmakokinetische Schwierigkeiten sind eine sehr kurze Halbwertszeit im Serum, die Instabilität gegenüber Serumproteinen und die schwierige Verteilung an das Zielorgan bzw. die Zielzellen. Außerdem findet eine Ausscheidung der ektopter siRNA sowohl über das renale, als auch über das retikuloendotheliale System statt.

In den letzten Jahren wurde verstärkt an Lösungsansätzen für die oben genannten Probleme gearbeitet. Ein Ansatz ist die direkte Veränderung der RNA-Struktur. Beispiele dafür sind das Prinzip der locked und unlocked Nukleinsäure sowie die Methylierung von Nukleotiden (2'-O-Methylnukleotide). Beim Prinzip der locked Nukleinsäure ist in der Ribose über eine Brücke zusätzlich der 2'Sauerstoff mit dem 4'Kohlenstoff verbunden. Dies hält die Ribose in der

3'Konformation und führt zu einer Verbesserung der Basenstapelung. Bei dem Prinzip der un-locked Nukleinsäure profitiert man von einer hohen Flexibilität. Aus diesen Modifikationen folgen eine Veränderung der Schmelztemperaturen und die Verbesserung der Spezifität und Stabilität der Bindung an die Ziel-mRNA. Somit führen diese Modifikationen zu einem potenteren Gen-Knockdown und reduzieren ungewollte off-Target-Effekte [37].

Neben der direkten Veränderung der RNA ist die Verwendung von Transportsystemen ein weiterer Lösungsansatz. Hierbei werden zunehmend Nanopartikel eingesetzt. Zu den Nanopartikeln zählen Liposome, andere auf Lipiden basierende Systeme sowie Polymere aus Polyaminen, Cyclodextrin, Chitosan oder Kollagenen. Insgesamt besitzen kationische Polymere und Lipide die beste Transportfähigkeit. Dies erklärt sich durch elektrostatische Interaktionen, welche eine gute Komplexbildung und Kondensation der Nukleinsäuren ermöglichen.

Kationische Polymere sind in den unterschiedlichsten Kompositionen, Strukturen und Molekulargewichten verfügbar. Ihre Diversität wird durch Polymerisation und die Synthese von Kopolymeren erhöht. Schon seit Jahrzehnten werden PEIs in der Papierindustrie oder in der Trinkwasserreinigung eingesetzt. Erstmals wurden PEIs im Jahre 1995 als Reagenz für die zelluläre Transfektion von DNA beschrieben. Die erste erfolgreiche in-vivo Anwendung war die DNA-Transfektion in Gehirnen neugeborener Mäuse [38]. Seitdem wurden die PEIs für den Transport der Nukleinsäuren sowohl in-vitro als auch in-vivo untersucht [7, 38–40]. Bei PEIs handelt es sich um ein Polymerisationsprodukt eines Aziridins (auch Ethylenimin genannt). Ein Aziridin besteht aus einer Aminogruppe und zwei aliphatischen Kohlenwasserstoffgruppen. Es kann zwischen linearen und verzweigten PEIs unterschieden werden. Die linearen Polyethylenimine werden durch die Modifikation von Vorgängerpolymeren (z.B. Polyaziridinen) synthetisiert. Beispielsweise führt die Hydrolyse von Poly-2-Ethyl-2-Oxazolin zu der Entstehung eines linearen, 22 kDa schweren PEIs [41]. Die linearen PEIs tragen, bis auf eine primäre Aminogruppe am Ende des Polymers, sekundäre Aminogruppen. Im Vergleich dazu entstehen die verzweigten Polyethylenimine durch eine ring-öffnende Polymerisation von Aziridin-Monomeren [42]. Hierbei können verschiedene Verzweigungsmuster entstehen [43, 44]. Bei den verzweigten Polymeren treten primäre, sekundäre und tertiäre Aminogruppen auf. Auf Grund der großen Anzahl der protonierten Aminogruppen zeigen PEIs eine positive Ladung. Sie haben die Fähigkeit der Komplexbildung mit den negativ geladenen Nukleinsäuren. Dies bietet einen Schutz vor enzymatischem, endosomalem und lysosomalem Abbau [45–47]. Ein weiterer Vorteil der positiven Ladung ist die verbesserte Interaktion mit negativ geladenen Komponenten der Zellmembran, beispielsweise mit Heparansulfaten oder Proteoglykanen. Die zelluläre Aufnahme wird deutlich verbessert, unabhängig davon, ob sie durch das Prinzip der Endo-, Pino- oder Phagozytose definiert ist [7].

Das Molekulargewicht der PEIs kann sehr verschieden sein und liegt zwischen 0,8 und 1000 kDa. Je höher das Molekulargewicht, desto besser ist die Fähigkeit zur Komplexbildung und Kondensation, und umso kleiner und stabiler werden die Polyplexe. Dies bedeutet eine deutliche Verbesserung der Transfektion. Jedoch verstärken ein höheres Molekulargewicht und ein größerer Verzweigungsgrad die Zytotoxizität [46, 48]. Im Vergleich zu der linearen Form

haben verzweigte PEIs auf Grund der hohen Diversität an verschiedenen Aminogruppen sowohl bessere Komplexbildungsfähigkeiten, als auch höhere pH-Pufferkapazitäten [43]. Ursprünglich galten verzweigte PEIs mit 25 kDa als Goldstandard [49]. Da das hohe Molekulargewicht jedoch eine erhöhte Zytotoxizität mit sich bringt, werden vermehrt verzweigte oder lineare PEIs mit geringerem Molekulargewicht in Studien eingesetzt [50, 51]. Ein Beispiel hierfür ist das 4 bis 12 kDa schwere, verzweigte PEI F25-LMW, welches in dieser Arbeit verwendet wurde [47, 52, 53].

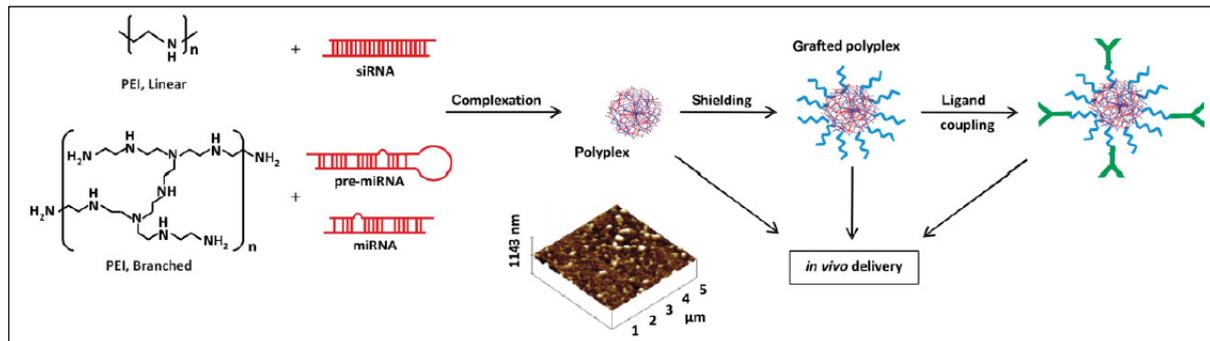


Abb. 3 Die Struktur der Polyethylenimine, ihre Komplexbildung und die chemischen Modifikationen. Sowohl lineare als auch verzweigte PEIs in verschiedenen Molekulargewichten stehen für die Komplexbildung mit kleinen RNA-Molekülen (siRNA/miRNA) zur Verfügung und es entstehen Polyplexe. PEI-Modifikationen können eine Abschirmung der Polyplexe und ihren gezielteren Transport vermitteln. Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo, Höbel S und Aigner A, Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2013 [7]

Eine wichtige Eigenschaft der PEIs ist der sogenannte Protonenschwamm-Effekt. Die an jeder dritten Position lokalisierten Aminogruppen haben die Funktion von Protonenakzeptoren und können somit niedrige pH-Werte, wie sie in Lysosomen oder Endosomen existieren, abpuffern. Bei einem physiologischen pH-Wert sind nur circa 20 % aller Aminogruppen protoniert. Im Vergleich dazu steigt die Protonierung auf 45 % bei einem pH-Wert von 5. Als Folge der Abpufferung des pH-Wertes kann die Funktion von Nukleasen reduziert werden, da diese ihr optimales Wirkspektrum in einem sauren Milieu entfalten. Dies bedeutet ein vermehrter Schutz der Nukleinsäuren vor ihrem Abbau. Des Weiteren steigt die Osmolarität im Lysosom nach PEI-Gabe auf Grund eines verstärkten Einstroms von Protonen und nachfolgend auch von Chloridionen. Es folgt ein größerer Wassereinstrom und es wird eine zunehmende Membrandurchlässigkeit beziehungsweise ein Platzen der Lysosomen vermutet. Sowohl eine verkürzte Lebenszeit der Lysosomen, als auch die vermehrte Freisetzung der transportierten RNA durch die Lysosomen können dadurch erzielt werden [54].

1.4 Die Transportfähigkeit von Polyethylenimin und ihre Optimierung

Ein effektiverer Transport der siRNA kann einerseits durch die Veränderung der siRNA und andererseits durch eine Modifikation des Transportsystems erzielt werden. Wichtig für eine

hohe Stabilität der siRNA sind strukturelle Eigenschaften [55], die Erreichbarkeit der Ziel-mRNA [56] und die thermodynamische Stabilität [22].

Obwohl PEIs aktuell zu der Gruppe der effizientesten Transportsysteme von Nukleinsäuren zählen, muss ihr Einsatz weiter optimiert werden. Ein Problem ist die mögliche Aggregation der Komplexe, vor allem unter starken ionischen Bedingungen. Die Konsequenz daraus ist die reduzierte zelluläre Aufnahme und somit auch eine verminderte Bioaktivität [57]. Weiterhin kann es zu einer Opsonisierung der PEIs kommen. Hierbei wird ihre Oberfläche mit Komplementfaktoren oder Antikörpern markiert und es folgt eine vermehrte Phagozytose, beispielsweise durch Granulozyten oder Makrophagen.

Um die Effektivität des Transportes zu verbessern werden zunehmend Modifikationen der PEIs entwickelt. Wichtige Beispiele hierfür sind die Bindung der PEIs an Lipide und Aminosäuren oder die kovalente Bindung bestimmter Antikörper. Die Moleküle werden bevorzugt durch Kopplungsreagenzien, die zum Beispiel N-Hydroxysuccinimid-Ester-Gruppen tragen, an die primäre Aminogruppe gebunden. Einige Kopplungsmoleküle weisen zusätzlich ein weiteres Strukturmerkmal auf, welches als Platzhalter zwischen den Liganden und den PEIs dient. Dies kann die Störung der Ligandenbindung durch die sperrigen Nanopartikel verhindern.

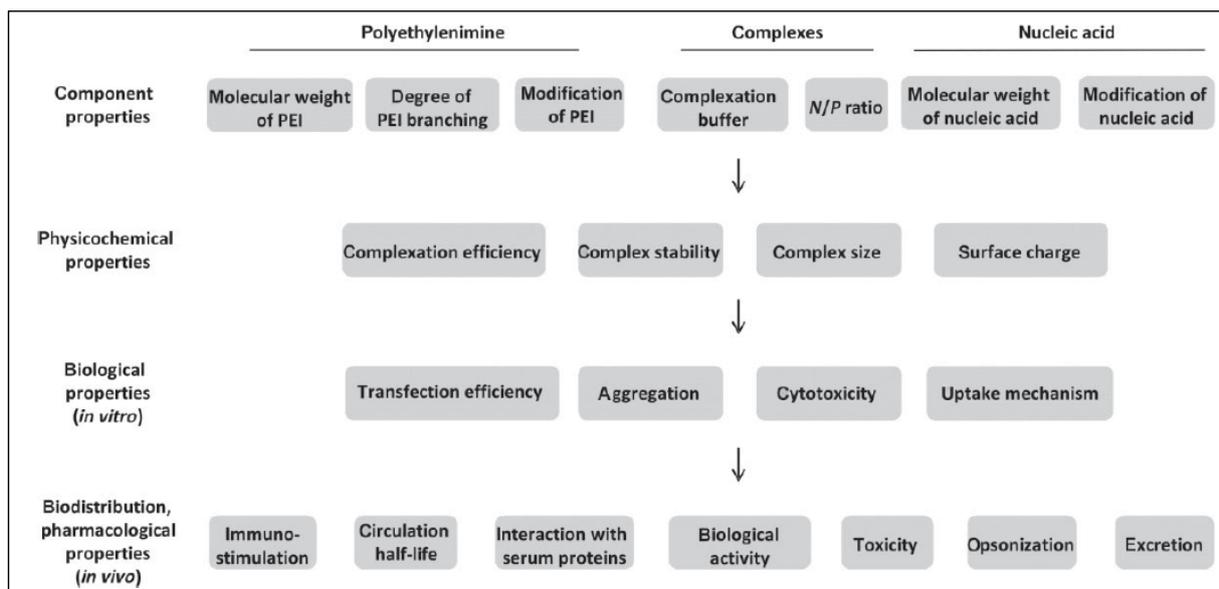


Abb. 4 Parameter mit Einfluss auf die physikalischen und biologischen Eigenschaften der auf PEI basierenden Polyplexe. Darstellung der komplexen Interaktionen zwischen den Eigenschaften der Nukleinsäuren, der einzelnen PEIs und deren Komplexe. Sowohl das Molekulargewicht und die Modifikationsformen der siRNA als auch der PEIs, wie auch der Grad ihrer Verzweigung beeinflussen die Eigenschaften der Polyplexe. Darüber hinaus spielen das PEI/ Nukleinsäure-Verhältnis und die Ionenstärke der Komplextionslösung eine große Rolle. Die Oberflächenladung, Größe und Stabilität der Polyplexe bestimmen ihre biologische Aktivität. Bei in-vivo Anwendungen sind außerdem die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften des Organismus wichtig. Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo, Höbel S und Aigner A, Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2013 [7]

Die bisher am besten untersuchte [58–60] und am häufigsten verwendete Modifikation ist die Pegylierung, die bereits in der Herstellung von Lebensmitteln, Medikamenten und Kosmetik

angewendet wird. Hierbei werden sogenannte Polyethylenglykol-Moleküle (C_2H_4O) angehängt, so dass sich kettenförmige Strukturen bilden, welche die PEIs nahezu komplett umhüllen. Die Pegylierungen können mit unterschiedlichen Molekulargewichten hergestellt werden. Abhängig von der Länge der Pegylierung, der Polymerstruktur und dem Grad an Polymerisierung zeigt sich eine unterschiedliche Transfektionseffizienz. Die Umhüllung der PEIs kann die positive Ladung abschirmen, Komplexaggregationen und nichtspezifischen Interaktionen reduzieren sowie Opsonierung vermeiden. Besonders die Abschirmung der Ladung vermeidet auf der positiven Ladung basierende Interaktionen mit der extrazellulären Matrix. Die Pegylierung verhindert einen vorzeitigen Abbau der Polyplexe im Blut und verbessert die Biodistribution und Halbwertszeit [61, 62]. Beispielsweise steigert die Pegylierung die Zirkulationszeit im Blut, und Interaktionen mit Blutkomponenten können reduziert werden [63]. Des Weiteren erhöht sie einerseits die Biokompatibilität, andererseits erniedrigt sie die biologische Aktivität der PEIs. Zum Beispiel zeigt die intratracheale Verabreichung von Komplexen aus pegyliertem PEI und siRNA eine deutlich effektivere und weniger toxische RNA-i [64].

Auf Grund dieser Vorteile ist die Pegylierung auch in unserer Studie mit einbezogen worden. Einige Studien weisen jedoch auf negative Aspekte der Pegylierung hin. Beispielsweise zeigte sich bei dem Transport durch pegylierte PEIs in der Lunge von Mäusen zwar eine verminderte Zytotoxizität, jedoch erhöhten sich sowohl die Reaktion des Immunsystems als auch die Anzahl der proinflammatorischen Effekte [65].

Eine weitere Modifikationsform ist die Umhüllung der PEI-Komplexe mit Lipiden. Die entstehenden Komplexe werden als Lipopolyplexe bezeichnet. Der an Lipopolyplexe gekoppelte DNA-Transport zeigte eine Verbesserung einiger physikochemischer und biologischer Parameter [61, 64, 66–68]. Für den Transport von siRNA wurden Lipopolyplex bestehend aus dem PEI F25 LMW und dem Phospholipid DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) eingesetzt [69, 70]. Da Phospholipide natürlicherweise auch in Zellmembranen vorkommen, weisen sie eine gute Biokompatibilität auf und sind für den Transport bestimmter Medikamente bereits etabliert [71, 72]. Darüber hinaus bedingen sie eine sehr gute Stabilität der Lipopolyplexe.

1.5 Anwendung der Polyethylenimine in in-vivo-Systemen

In der Vergangenheit wurden überwiegend in-vitro-Studien, vor allem an Zellkulturen, durchgeführt. Diese können jedoch nur begrenzte Aussagen sowohl über die Biodistribution als auch über pharmakologische Eigenschaften der PEIs treffen. Parameter wie die Immunstimulation, die Opsonisierung, die Halbwertszeit im Serum, die Interaktionen mit Serumproteinen oder die Toxizität müssen deshalb in in-vivo-Studien analysiert werden. In-vitro-Studien ermöglichen eine Vorauswahl an Therapien; in-vivo-Studien sind jedoch für den endgültigen therapeutischen Einsatz der PEIs essentiell. Beispielsweise kann die Immunstimulation außerordentlich gefährlich werden und ist aktuell noch sehr schwer einschätzbar. Neben den hauptsächlich negativen Folgen der Immunstimulation kann die Anregung des Immunsystems auch ein gewünschter Effekt von PEIs sein. Die Aufnahme von siRNA aus dendritischen Zellen des Peritoneums und ihr Transport in die Tumorregion eines Ovarialkarzinoms kann beispielsweise eine der Tumorthherapie dienende Immunantwort darstellen [73].

Es wurden bereits einige Experimente in vivo, größtenteils an Mäusen durchgeführt. Die PEI-siRNA-Komplexe wurden einerseits lokal, andererseits systemisch verabreicht. Beispielsweise wurde die direkte Injektion der PEI-siRNA-Komplexe in das Tumorgewebe untersucht. Zielstruktur war eine Splice-Variante (genannt KLF6-SV) des KLF6 (Krüppel-Like Factor 6). Bei dem Krüppel-Like Factor 6 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher als Tumorsuppressorgen agiert. Sowohl der Krüppel-Like Factor 6 als auch seine Splice-Variante spielen in der Entstehung und dem Wachstum verschiedener Magentumoren eine wichtige Rolle. Die direkte Injektion der Komplexe inhibierte erfolgreich das Wachstum, die Migration und die Invasion des subkutanen Magentumorgewebes [74]. Eine erfolgreiche lokale Anwendung von PEI-siRNA-Komplexen stellte auch die Linderung neuropathischer Schmerzen in Mäusen dar. Diese Linderung konnte sowohl durch die intrathekale als auch die perineurale Injektion induziert werden. Zielstrukturen der Komplexe waren hierbei die Chemokinrezeptoren (CCR1, CCR5) [75] und der TLR-4 (Toll-Like-4-Rezeptor) [76].

Darüber hinaus finden sich auch Beispiele für erfolgreiche systemische Injektionen. Die Überlebensrate von septischen Mäusen konnte signifikant durch die Verabreichung von PEI-siRNA-Komplexen mit den Zielstrukturen Interleukin-6 und TNF-alpha gesteigert werden [77]. Auch der Knockdown von Survivin-Genen in subkutanen xenotransplantierten Glioblastomen zeigte einen deutlichen antitumoralen Effekt. Survivin ist ein Protein, welches sowohl in die Apoptose-Inhibition als auch in die Zellteilung und das Wachstum von Glioblastomen und anderen Tumoren involviert ist [78].

Eine dritte Untersuchungsmöglichkeit der PEIs sind Experimente in Gewebeschnittkulturen. Ihre Vorteile sind die intakte Mikroumgebung der Tumorzellen und die realen biologischen Einflussfaktoren. Sie ermöglichen die direkteste Untersuchung von Gewebe und dessen Reaktion auf diverse Stimuli [79, 80]. Zum Beispiel konnte in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen eine durch Nanopartikel verstärkte zelluläre Aufnahme von RNA, welche die Telomeraseaktivität hemmt, gezeigt werden [81].

1.6 Präklinische Tumormodelle

Präklinische Tumormodelle sind in der weiteren Erforschung der RNA-i und der PEIs essentiell. Sie basieren einerseits auf Zellkulturen, andererseits auf Tumor-Xenotransplantaten. In Experimenten mit Zellkulturen wurde die Effektivität der RNA-i bereits nachgewiesen. Ein großes Problem ist jedoch nach wie vor das fehlende Verständnis über den Transport, die Verteilung und die Gewebepenetration von PEI-siRNA-Komplexen. Aus diesem Grund hat der Einsatz von Tumor-Xenotransplantaten ein großes Potential, befindet sich jedoch noch in der Etablierungsphase.

1.6.1 Zellkulturen

Die erste Grundlage von Experimenten der RNA-i mit PEI-siRNA-Komplexen war die Zellkultur. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie (immortalisierte Zellen einer bestimmten Gewebeart),

welche außerhalb des Organismus in einem Nährmedium kultiviert wird. Die Kultivierung findet in Monolayern statt. Alternativ gibt es auch sogenannte Primärkulturen. Diese werden direkt aus operativen Resektaten von Tumoren gewonnen. Mit Hilfe von Zellkulturen können praktisch unlimitierte Mengen an Zellen zur Verfügung gestellt werden. Diese Zellen haben ähnliche Geno- und Phänotypen, sind homogen und zeigen ein schnelles und unbegrenztes Wachstum [82]. Die Zellen einer Zellkultur weisen über einen langen Zeitraum vergleichbare Eigenschaften wie die ursprünglichen Tumorzellen auf [83]. Unterschiede gibt es in der Genetik, Epigenetik und Genexpression. Folglich werden Zelllinien humaner Karzinome routinemäßig für die Untersuchung der Tumoren eingesetzt.

Ein Problem der Anwendung von Zellkulturen ist, dass die Kultivierung über Jahre und Generationen eine Selektion der Zellen, welche den Kulturbedingungen besser angepasst sind, verursacht. Dies führt zu einer größeren Diskrepanz zwischen ursprünglicher Tumorzelle und Zelle in Zellkultur. Des Weiteren weisen Zellkulturen keine extrazelluläre Matrix (Kultivierung in Monolayer) auf, wodurch wichtige Signalkaskaden verloren gehen [84]. Die Zellen sind außerdem von ihrer natürlichen Tumormikroumgebung isoliert. Diese besteht aus dem Tumorstroma, welches mit der extrazellulären Matrix in Verbindung steht und verschiedene Zelltypen wie Endothelzellen, aktivierte Fibroblasten oder Zellen des Immunsystems aufweist. Damit fehlen Wachstumsfaktoren, Zytokine oder auch angiogene Faktoren, welche essentiell für Tumore sind [85]. Trotzdem stellten Zellkulturen bisher das beste Äquivalent dar, und es kann zumindest eine Vorauswahl für die Durchführung von Experimenten getroffen werden [86].

1.6.2 Xenograft-Modelle und Gewebeschnittkulturen

Bei den Xenograft-Modellen handelt es sich um Transplantationen von humanen Zelllinien in Mäuse beziehungsweise Ratten. Die ersten organotypischen Gewebeschnittkulturen wurden im Jahre 1991 aus Hippokampusgewebe neonataler Mäuse kultiviert und seither in neurobiologischen Studien angewandt [87]. Im Vergleich zu Zellkulturen bleiben hier sowohl die extrazelluläre Matrix als auch die einzelnen beteiligten Zelltypen erhalten. Das zu kultivierende Gewebe (5×10^6 PC3 beziehungsweise U87 Zellen) wird beispielsweise in die Flanken von Mäusen injiziert. Auf Grund der Speziesunterschiede kann es zu Abstoßungsreaktionen kommen. Um diese zu vermeiden werden Xenotransplantate vorzugsweise in immundefiziente athymische Nacktmäuse injiziert. Ein Nachteil bei der Verwendung dieser immundefizienten Mäuse ist jedoch das Fehlen der immunologischen Komponente. Aus diesem Grund wurden Xenograft-Transplantationen auch an syngenem Modellen durchgeführt. Beispielsweise wurden Tumore in Hirnen von Mäusen durch die Implantation von Methylcholantren erzeugt. Diese Tumoren wurden entnommen, anschließend in Zellkulturen verarbeitet und dann erneut in Hirngewebe transplantiert [88].

Nach Injektion kommt es über die folgenden circa 6 bis 8 Wochen zu einer Tumorneubildung beziehungsweise einem Tumorwachstum. Die entstandenen Tumore werden mit Hilfe eines Tissue-Choppers in ca. 350 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Membranen an einer Grenzfläche zwischen Kulturmedium und Luft kultiviert. Diese Gewebeschnittkulturen können

bis zu 14 Tage kultiviert werden. Die kultivierten „Slices“ bilden eine gute Grundlage bezüglich der Untersuchung von Zellpopulationen, Zellmatrix und des Verhaltens der PEI-siRNA-Komplexe.

Ein großer Nachteil des oben erwähnten Xenograft-Modells ist der Einsatz von Mäusen. Die Experimente können eine große Belastung für die Mäuse darstellen [89]. Im Zuge der 3R-Regel (Ersetzen, Verfeinern und Reduzieren, Russell und Burch, 1959) sollte der Ersatz von Tierversuchen angestrebt werden. Es besteht also die dringende Notwendigkeit, diese präklinischen Modelle auf humanes Gewebe zu übertragen. Humanes Gewebe ist aus ethischen Gründen limitiert, kann aber aus Tumorsektaten gewonnen werden. Die direkte Kultivierung der Resektate reduziert inter-individuelle Unterschiede und konnte bereits an Tumoren verschiedenster Entität, beispielsweise an Glioblastomen oder Kopf-Hals-Tumoren angewendet werden [79, 80, 90, 91]. Weitere Nachteile der Xenograft-Modelle sind im Vergleich zu den Zellkulturen vor allem die höheren Kosten und der größere Zeitaufwand [89]. Ein Vorteil der direkten Verwendung von Tumorsektaten ist, dass sowohl die Histologie als auch die intratumoröse Heterogenität erhalten bleiben. Allerdings zeigen sie im Vergleich zu Xenograft-Modellen aus Zelllinien eine deutlich reduzierte Wachstumsrate (Verdopplung der Zellen in einer Woche).

In der nachfolgenden Arbeit werden Xenograft-Modelle aus humanen Zelllinien (PC3-Prostatakarzinom und U87-Glioblastom) verwendet und diese in Gewebeschnittkulturen über 14 Tage kultiviert.

2 Fragestellung

Krankheiten, vor allem Tumorerkrankungen, welche durch Veränderung einer Genaktivität ausgelöst oder verstärkt werden, können trotz verschiedenster Therapieansätze und Fortschritte in der Wissenschaft oft nicht ausreichend therapiert werden. Wenn eine sichere und gezielte Anwendung der RNA-i möglich wäre, würde dies einen therapeutischen Durchbruch für viele Erkrankungen bedeuten. Dies erfordert effektive Transportsysteme. In den letzten Jahren hat sich der Einsatz von PEIs und deren Modifikationen als vielversprechend erwiesen. Grundlage für erste Untersuchungen waren einerseits in-vitro-Studien, hauptsächlich an Zellkulturen, und andererseits in-vivo-Studien an Organismen. Erstere reflektieren jedoch nur ansatzweise reale in-vivo-Systeme, und die Untersuchung von Organismen gestaltet sich aufgrund komplexer Pharmakokinetik und aufwändiger Experimente schwierig. Um die Eigenschaften der PEIs präzise zu verstehen, werden ex-vivo-Systeme benötigt, die mit den Eigenschaften von lebendem Gewebe möglichst gut übereinstimmen. In der nachfolgenden Veröffentlichung werden Tumorgewebe-Schnittkulturen als Untersuchungsbasis für PEI-siRNA Nanopartikel beschrieben.

Im Einzelnen sollte in dieser Studie untersucht werden,

- (I) ob Tumorschnittkulturen aus Xenografts der Prostatazelllinie PC3 und Glioblastomzelllinie U87 erstellt werden können,
- (II) ob die Kultivierung der Tumorschnittkulturen über 14 Tage möglich ist,
- (III) wie die Applikation der PEIs durchgeführt wird,
- (IV) ob mit Hilfe der Tumorschnittkulturen die Gewebepenetration der PEIs nach Applikation untersucht werden kann,
- (V) ob der PEI vermittelte Knockdown des endogenen Genprodukts Survivin in Tumorschnittkulturen nachweisbar ist.

3 Literatur

- 1 *Aagaard L, Rossi JJ.* RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59 (2-3): 75–86. doi:10.1016/j.addr.2007.03.005
- 2 *Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL et al.* Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: An efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res* 2004; 32 (2): 661–668. doi:10.1093/nar/gkh208
- 3 *Miller VM, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL.* Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003 (100): 7195–7200
- 4 *Nieth C, Priebisch A, Stege A et al.* Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Letters* 2003; 545 (2-3): 144–150. doi:10.1016/S0014-5793(03)00523-4
- 5 *Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, DeWeese TL.* Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res.* 2003 (63): 1550–1554
- 6 *Almeida R, Allshire RC.* RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol* 2005; 15 (5): 251–258. doi:10.1016/j.tcb.2005.03.006
- 7 *Höbel S, Aigner A.* Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2013; 5 (5): 484–501. doi:10.1002/wnan.1228
- 8 *Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R.* Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell* 1990; 2 (4): 279. doi:10.2307/3869076
- 9 *Fire A, Xu S, Montgomery MK et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391 (6669): 806–811. doi:10.1038/35888
- 10 *Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG.* Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Nature*; 1998 (391): 806–811
- 11 *Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L et al.* Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004; 118 (1): 57–68. doi:10.1016/j.cell.2004.06.017
- 12 *Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001 (411): 494–499
- 13 *Hammond SM.* MicroRNA therapeutics: A new niche for antisense nucleic acids. *Trends Mol Med* 2006; 12 (3): 99–101. doi:10.1016/j.molmed.2006.01.004
- 14 *Aigner A.* MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: Therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs. *J Mol Med* 2011; 89 (5): 445–457. doi:10.1007/s00109-010-0716-0
- 15 *Han J, Lee Y, Yeom K et al.* Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125 (5): 887–901. doi:10.1016/j.cell.2006.03.043
- 16 *Chung K-H, Hart CC, Al-Bassam S et al.* Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res* 2006; 34 (7): e53. doi:10.1093/nar/gkl143
- 17 *Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS.* siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* 2015; 4: e252. doi:10.1038/mtna.2015.23
- 18 *Hutvagner G, Zamore PD.* A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297 (5589): 2056–2060. doi:10.1126/science.1073827
- 19 *Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A et al.* Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004; 15 (2): 185–197. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007
- 20 *Liu J, Carmell MA, Rivas FV et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004; 305 (5689): 1437–1441. doi:10.1126/science.1102513
- 21 *Tang G.* siRNA and miRNA: An insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* 2005; 30 (2): 106–114. doi:10.1016/j.tibs.2004.12.007
- 22 *Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD.* Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* 2003 (115): 199–208

- 23 *Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD.* Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 2003; 115 (2): 209–216. doi:10.1016/S0092-8674(03)00801-8
- 24 *Bagga S, Bracht J, Hunter S et al.* Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005; 122 (4): 553–563. doi:10.1016/j.cell.2005.07.031
- 25 *Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W.* Repression of protein synthesis by miRNAs: How many mechanisms? *Trends Cell Biol* 2007; 17 (3): 118–126. doi:10.1016/j.tcb.2006.12.007
- 26 *Bertrand J-R, Pottier M, Vekris A et al.* Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 296 (4): 1000–1004. doi:10.1016/S0006-291X(02)02013-2
- 27 *Grimm D, Streetz KL, Jopling CL et al.* Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006; 441 (7092): 537–541. doi:10.1038/nature04791
- 28 *Hornung V, Guenthner-Biller M, Bourquin C et al.* Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11 (3): 263–270. doi:10.1038/nm1191
- 29 *Jackson AL, Bartz SR, Schelter J et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003; 21 (6): 635–637. doi:10.1038/nbt831
- 30 *Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A et al.* Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* 2006; 12 (7): 1188–1196. doi:10.1261/rna.28106
- 31 *Jackson AL, Burchard J, Schelter J et al.* Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 2006; 12 (7): 1179–1187. doi:10.1261/rna.25706
- 32 *Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A et al.* 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 2006; 3 (3): 199–204. doi:10.1038/nmeth854
- 33 *Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005 (433): 769–773
- 34 *Lin X, Ruan X, Anderson MG et al.* siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res* 2005; 33 (14): 4527–4535. doi:10.1093/nar/gki762
- 35 *Fedorov Y, King A, Anderson E et al.* Different delivery methods-different expression profiles. *Nat Methods* 2005; 2 (4): 241. doi:10.1038/nmeth0405-241
- 36 *Jackson AL, Burchard J, Leake D et al.* Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 2006; 12 (7): 1197–1205. doi:10.1261/rna.30706
- 37 *Campbell MA, Wengel J.* Locked vs. unlocked nucleic acids (LNA vs. UNA): Contrasting structures work towards common therapeutic goals. *Chem Soc Rev* 2011; 40 (12): 5680–5689. doi:10.1039/c1cs15048k
- 38 *Boussif O, Lezoualc F, Zanta MA.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 1995 (Vol. 92): 7297–7301
- 39 *Neu M, Fischer D, Kissel T.* Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med* 2005; 7 (8): 992–1009. doi:10.1002/jgm.773
- 40 *Lai W-F.* In vivo nucleic acid delivery with PEI and its derivatives: Current status and perspectives. *Expert Rev Med Devices* 2011; 8 (2): 173–185. doi:10.1586/erd.10.83
- 41 *Brissault B, Kichler A, Guis C et al.* Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. *Bioconjug Chem* 2003; 14 (3): 581–587. doi:10.1021/bc0200529
- 42 *Zhuk DS, Gembitskii PA, Kargin VA.* Advances in the chemistry of Polyethylenimine (Polyaziridine). *Russ Chem Rev* 1965 (34): 517–527
- 43 *Kircheis R, Wightman L, Wagner E.* Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 53 (3): 341–358. doi:10.1016/S0169-409X(01)00202-2
- 44 *Jäger M, Schubert S, Ochrimenko S et al.* Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: Synthetic modification, characterization, and application. *Chem Soc Rev* 2012; 41 (13): 4755–4767. doi:10.1039/c2cs35146c

- 45 *Tang MX, Szoka FC.* The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther* 1997; 4 (8): 823–832. doi:10.1038/sj.gt.3300454
- 46 *Godbey WT, Wu KK, Mikos AG.* Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 1999 (45): 268–275
- 47 *Höbel S, Koburger I, John M et al.* Polyethylenimine/small interfering RNA-mediated knockdown of vascular endothelial growth factor in vivo exerts anti-tumor effects synergistically with Bevacizumab. *J Gene Med* 2010; 12 (3): 287–300. doi:10.1002/jgm.1431
- 48 *Breunig M, Lungwitz U, Liebl R et al.* Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (36): 14454–14459. doi:10.1073/pnas.0703882104
- 49 *Ewe A, Höbel S, Heine C et al.* *Drug Deliv Transl Res* 2017; 7 (2): 206–216. doi:10.1007/s13346-016-0306-y
- 50 *Kunath K.* Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery. Comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *Journal of Controlled Release* 2003; 89 (1): 113–125. doi:10.1016/S0168-3659(03)00076-2
- 51 *Breunig M, Lungwitz U, Liebl R et al.* Gene delivery with low molecular weight linear polyethylenimines. *J Gene Med* 2005; 7 (10): 1287–1298. doi:10.1002/jgm.775
- 52 *Werth S, Urban-Klein B, Dai L et al.* A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes. *J Control Release* 2006; 112 (2): 257–270. doi:10.1016/j.jconrel.2006.02.009
- 53 *Ibrahim AF, Weirauch U, Thomas M et al.* MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. *Cancer Res* 2011; 71 (15): 5214–5224. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4645
- 54 *Mintzer MA, Simanek EE.* Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev* 2009; 109 (2): 259–302. doi:10.1021/cr800409e
- 55 *Patzel V, Rutz S, Dietrich I et al.* Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat Biotechnol* 2005; 23 (11): 1440–1444. doi:10.1038/nbt1151
- 56 *Heale BSE, Soifer HS, Bowers C et al.* siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res* 2005; 33 (3): e30. doi:10.1093/nar/gni026
- 57 *Chollet P, Favrot MC, Hurbin A et al.* Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med* 2002; 4 (1): 84–91
- 58 *Malek A, Merkel O, Fink L et al.* In vivo pharmacokinetics, tissue distribution and underlying mechanisms of various PEI(-PEG)/siRNA complexes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 236 (1): 97–108. doi:10.1016/j.taap.2009.01.014
- 59 *Mao S, Neu M, Germershaus O et al.* Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly(ethylene imine)-graft-poly(ethylene glycol) block copolymer/SiRNA polyplexes. *Bioconjug Chem* 2006; 17 (5): 1209–1218. doi:10.1021/bc060129j
- 60 *Malek A, Czubayko F, Aigner A.* PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-induced gene targeting efficacy. *J Drug Target* 2008; 16 (2): 124–139. doi:10.1080/10611860701849058
- 61 *Hanzlíková M, Soininen P, Lampela P et al.* The role of PEI structure and size in the PEI/liposome-mediated synergism of gene transfection. *Plasmid* 2009; 61 (1): 15–21. doi:10.1016/j.plasmid.2008.08.003
- 62 *Nguyen HK, Lemieux P, Vinogradov SV et al.* Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther* 2000; 7 (2): 126–138. doi:10.1038/sj.gt.3301052
- 63 *Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, Wagner E.* PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 1999 (6): 595–605

- 64 *Pelisek J, Gaedtke L, DeRouchey J et al.* Optimized lipopolyplex formulations for gene transfer to human colon carcinoma cells under in vitro conditions. *J Gene Med* 2006; 8 (2): 186–197. doi:10.1002/jgm.836
- 65 *Beyerle A, Braun A, Merkel O et al.* Comparative in vivo study of poly(ethylene imine)/siRNA complexes for pulmonary delivery in mice. *J Control Release* 2011; 151 (1): 51–56. doi:10.1016/j.jconrel.2010.12.017
- 66 *García L, Buñuales M, Düzgüneş N et al.* Serum-resistant lipopolyplexes for gene delivery to liver tumour cells. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67 (1): 58–66. doi:10.1016/j.ejpb.2007.01.005
- 67 *Lee C-H, Ni Y-H, Chen C-C et al.* Synergistic effect of polyethylenimine and cationic liposomes in nucleic acid delivery to human cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2003; 1611 (1-2): 55–62. doi:10.1016/S0005-2736(03)00027-0
- 68 *Lampela P, Soininen P, Urtti A et al.* Synergism in gene delivery by small PEIs and three different nonviral vectors. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 270 (1-2): 175–184. doi:10.1016/j.ijpharm.2003.10.004
- 69 *Ewe A, Aigner A.* Nebulization of liposome–polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery: physicochemical properties and biological activity. *Eur J Lipid Sci Technol* 2014 (116): 1195–1204
- 70 *Ewe A, Schaper A, Barnert S et al.* Storage stability of optimal liposome-polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery. *Acta Biomater* 2014; 10 (6): 2663–2673. doi:10.1016/j.actbio.2014.02.037
- 71 *Torchilin VP.* Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4 (2): 145–160. doi:10.1038/nrd1632
- 72 *Allen TM, Cullis PR.* Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65 (1): 36–48. doi:10.1016/j.addr.2012.09.037
- 73 *Choksakulnimitr S, Masuda S, Tokuda H et al.* In vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell culture systems. *Journal of Controlled Release* 1995; 34 (3): 233–241. doi:10.1016/0168-3659(95)00007-U
- 74 *Chen H, Chen L, Sun L et al.* A small interfering RNA targeting the KLF6 splice variant, KLF6-SV1, as gene therapy for gastric cancer. *Gastric Cancer* 2011; 14 (4): 339–352. doi:10.1007/s10120-011-0049-x
- 75 *Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y et al.* Macrophage inflammatory protein-1alpha mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1beta up-regulation. *Pain* 2010; 149 (2): 305–315. doi:10.1016/j.pain.2010.02.025
- 76 *Lan LS, Ping YJ, Na WL et al.* Down-regulation of Toll-like receptor 4 gene expression by short interfering RNA attenuates bone cancer pain in a rat model. *Mol Pain* 2010; 6: 2. doi:10.1186/1744-8069-6-2
- 77 *Mostafa Anower AKM, Shim JA, Choi B et al.* Pretreatment with interleukin-6 small interfering RNA can improve the survival rate of polymicrobial cecal ligation and puncture mice by down regulating interleukin-6 production. *Eur J Pharmacol* 2012; 688 (1-3): 76–83. doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.007
- 78 *Hendruschk S, Wiedemuth R, Aigner A et al.* RNA interference targeting survivin exerts anti-tumoral effects in vitro and in established glioma xenografts in vivo. *Neuro-oncology* 2011; 13 (10): 1074–1089. doi:10.1093/neuonc/nor098
- 79 *Gerlach MM, Merz F, Wichmann G et al.* Slice cultures from head and neck squamous cell carcinoma: A novel test system for drug susceptibility and mechanisms of resistance. *Br J Cancer* 2014; 110 (2): 479–488. doi:10.1038/bjc.2013.700
- 80 *Merz F, Gaunitz F, Dehghani F et al.* Organotypic slice cultures of human glioblastoma reveal different susceptibilities to treatments. *Neuro-oncology* 2013; 15 (6): 670–681. doi:10.1093/neuonc/not003
- 81 *Dong M, Philippi C, Loretz B et al.* Tissue slice model of human lung cancer to investigate telomerase inhibition by nanoparticle delivery of antisense 2'-O-methyl-RNA. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 419 (1-2): 33–42. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.07.009

- 82 *Masters JRW*. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000 (1): 233–236
- 83 *Wistuba GL, Bryant D, Behrens C, Milchgrub S, Virmani AK, Ashfaq R, Minna JD, Gazdar AF*. Comparison of Features of Human Lung Cancer Cell Lines and Their Corresponding Tumors. *Clin. Cancer Res.* 1998 (4): 2931–2938
- 84 *van Staveren WCG, Weiss Solís DY, Hébrant A, Detours V, Dumont JE, Maenhaut C*. Signaling by the Matrix Proteoglycan Decorin Controls Inflammation and Cancer Through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci Signal* 2011 (4): 75
- 85 *Kamb A*. What's wrong with our cancer models? *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4 (2): 161–165. doi:10.1038/nrd1635
- 86 *van Staveren WCG, Solís DYW, Hébrant A et al*. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795 (2): 92–103. doi:10.1016/j.bbcan.2008.12.004
- 87 *Stoppini L, Buchs P-A, Muller D*. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods* 1991; 37 (2): 173–182. doi:10.1016/0165-0270(91)90128-M
- 88 *Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW*. Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion and progression. *Cancer*; 2000 (88): 2606–2618
- 89 *Kopetz S, Lemos R, Powis G*. The promise of patient-derived xenografts: The best laid plans of mice and men. *Clin Cancer Res* 2012; 18 (19): 5160–5162. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2408
- 90 *Sönnichsen R, Hennig L, Blaschke V et al*. Individual Susceptibility Analysis Using Patient-derived Slice Cultures of Colorectal Carcinoma. *Clin Colorectal Cancer* 2018; 17 (2): e189-e199. doi:10.1016/j.clcc.2017.11.002
- 91 *Koerfer J, Kallendrusch S, Merz F et al*. Organotypic slice cultures of human gastric and esophagogastric junction cancer. *Cancer Med* 2016; 5 (7): 1444–1453. doi:10.1002/cam4.720

4 Publikationen

Promotionspublikation:

Merz L, Höbel S, Kallendrusch S, Ewe A, Bechmann I, Franke H, Merz F, Aigner A. Tumor tissue slice cultures as a platform for analyzing tissue-penetration and biological activities of nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017; 112:45-50. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.11.013.

Weitere Publikation im Rahmen der Arbeit:

Ewe A, Höbel S, Heine C, Merz L, Kallendrusch S, Bechmann I, Merz F, Franke H, Aigner A. Optimized polyethylenimine (PEI)-based nanoparticles for siRNA delivery, analyzed in vitro and in an ex vivo tumor tissue slice culture model. *Drug Deliv Transl Res.* 2017; 7(2):206-216. doi: 10.1007/s13346-016-0306-y.



Technical note

Tumor tissue slice cultures as a platform for analyzing tissue-penetration and biological activities of nanoparticles



Lea Merz^{a,2}, Sabrina Höbel^{b,2}, Sonja Kallendrusch^a, Alexander Ewe^b, Ingo Bechmann^a, Heike Franke^c, Felicitas Merz^{a,1}, Achim Aigner^{b,*}

^a Institute of Anatomy, Medical Faculty, University of Leipzig, Germany

^b Rudolf-Boehm-Institute for Pharmacology and Toxicology, Clinical Pharmacology, Medical Faculty, University of Leipzig, Germany

^c Rudolf-Boehm-Institute for Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, University of Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2016

Revised 26 September 2016

Accepted in revised form 13 November 2016

Available online 15 November 2016

Keywords:

Tissue slices

Polymeric nanoparticles

Polyethylenimine

PEI complexes

Lipopolyplexes

PEI/siRNA gene knockdown

Tumor xenografts

ABSTRACT

The success of therapeutic nanoparticles depends, among others, on their ability to penetrate a tissue for actually reaching the target cells, and their efficient cellular uptake in the context of intact tissue and stroma. Various nanoparticle modifications have been implemented for altering physicochemical and biological properties. Their analysis, however, so far mainly relies on cell culture experiments which only poorly reflect the *in vivo* situation, or is based on *in vivo* experiments that are often complicated by whole-body pharmacokinetics and are rather tedious especially when analyzing larger nanoparticle sets. For the more precise analysis of nanoparticle properties at their desired site of action, efficient *ex vivo* systems closely mimicking *in vivo* tissue properties are needed.

In this paper, we describe the setup of organotypic tumor tissue slice cultures for the analysis of tissue-penetrating properties and biological activities of nanoparticles. As a model system, we employ 350 μm thick slice cultures from different tumor xenograft tissues, and analyze modified or non-modified polyethylenimine (PEI) complexes as well as their lipopolyplex derivatives for siRNA delivery.

The described conditions for tissue slice preparation and culture ensure excellent tissue preservation for at least 14 days, thus allowing for prolonged experimentation and analysis. When using fluorescently labeled siRNA for complex visualization, fluorescence microscopy of cryo-sectioned tissue slices reveals different degrees of nanoparticle tissue penetration, dependent on their surface charge. More importantly, the determination of siRNA-mediated knockdown efficacies of an endogenous target gene, the oncogenic survival factor Survivin, reveals the possibility to accurately assess biological nanoparticle activities *in situ*, i.e. in living cells in their original environment.

Taken together, we establish tumor (xenograft) tissue slices for the accurate and facile *ex vivo* assessment of important biological nanoparticle properties. Beyond the quantitative analysis of nanoparticle tissue-penetration, the excellent tissue preservation and cell viability also allows for the evaluation of biological activities.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nanoparticles are extensively explored for the efficient delivery of therapeutic candidate molecules like nucleic acids. Their success

strongly depends on their potential to overcome biological barriers, to mediate tissue penetration for actually reaching their target cells and to facilitate cellular internalization (see e.g. [1] for review). While *in vitro* monolayer cell culture experiments monitor these requirements only poorly, animal models are barely suitable as a screening platform due to high cost, complicated whole-body pharmacokinetics, species differences and the evolving goal of reducing animal experiments (3R concept).

Among nanoparticles for nucleic acid delivery, polyethylenimine-based complexes have been well established for *in vitro* and *in vivo* applications [2]. For altering physicochemical and, concomitantly, biological properties, various modifications including PEGylation [3] or liposome-coating [4] have been intro-

Abbreviations: dH₂O, distilled water; PEG, polyethylene glycol; PEI, polyethylenimine; RNAi, RNA interference; siRNA, small interfering RNA.

* Corresponding author at: Rudolf-Boehm-Institute for Pharmacology and Toxicology, Clinical Pharmacology, University of Leipzig, Haertelstrasse 16 – 18, D – 04107 Leipzig, Germany.

E-mail address: achim.aigner@medizin.uni-leipzig.de (A. Aigner).

¹ Present address: GSI Helmholtz Center for Heavy Ion Research, Department of Biophysics, Darmstadt.

² These authors contributed equally to the work.

duced, with the aim of shielding the otherwise positive surface charge in order to improve efficacy, blood circulation half-life, uptake specificity and/or biocompatibility. In many cases, however, *in vivo* results considerably differ from cell culture data [5], thus emphasizing the need for powerful *ex vivo* test systems for establishing structure-function relationships.

Organotypic slice cultures derived from rodent brain are widely used in neuroscience due to their straightforward access for pharmacological intervention. This approach has recently also been extended towards tumor-derived slice cultures. Due to the possibility to study tumor cells in their intact environment including extracellular matrix and to directly apply test substances, they provide a unique tool to determine tissue responses to various stimuli [6,7]. In sharp contrast, only few studies have employed nanoparticles in tissue slice cultures so far. PLGA nanoparticles were used for the specific MMP-9 inhibition through MMP-1 delivery in hippocampal slice cultures [8] or for antisense inhibition of telomerase in human lung cancer tissue slices [9].

As analysis platform for the systematic assessment of nanoparticles and nanoparticle modifications with regard to their biological efficacies and other properties like tissue penetration, tissue slices have not been explored.

In this proof-of-principle study, we establish slice cultures from different tumor xenograft tissues as a model system for nanoparticle analysis. As representative examples, we analyze biological properties, namely tissue penetration and siRNA-mediated knock-down efficacy, of PEI-based complexes.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The tumor cell lines PC3 (prostate carcinoma) and U87 (glioblastoma) were obtained from the American type culture collection (ATCC; Manassas, VA) and cultivated under standard conditions (37 °C, 5% CO₂) in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Sigma, Taufkirchen, Germany), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Life Technologies, Darmstadt, Germany). The identities of the cell lines were authenticated by DNA (STR) profiling. The branched PEI F25-LMW (4–12 kDa) was prepared as previously described [10]. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). PEG-PEI was synthesized by PEGylation of PEI F25-LMW using MS(PEG)₂₄ as described previously [11]. Alexa647-labeled siRNA was purchased from Qiagen (Hilden, Germany), unmodified siRNAs were from Biospring (Frankfurt, Germany) or Thermo Fisher (Waltham, MA) with sequences as detailed in the [Suppl. Information](#).

2.2. Tumor cell xenografting, tissue slice preparation and cultivation

For the generation of subcutaneous tumor xenografts, 5×10^6 PC3 or U87 cells in 150 μ l PBS were injected into both flanks of 6–8 weeks old athymic nude mice (CrI:NU-Foxn1nu, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany). Animal studies were conducted according to the national regulations of animal welfare and approved by the local authorities (Landesdirektion Sachsen, Germany). When the xenografts reached $\sim 8 \times 8$ mm (length \times width) in size, mice were sacrificed, tumors were excised and directly subjected to sectioning as described previously for head and neck squamous cell carcinoma samples [6], with minor modifications. In brief, tumor tissue was cut into cubes of $\sim 5 \times 5 \times 5$ mm side length using an autoclaved standard razor blade. The cubes were placed on a pile of sterile filter membranes soaked with the preparation medium. To facilitate the cutting procedure and to obtain

appropriate slices, each cube was fixated by Histoacryl glue (Braun, Melsungen, Germany). Slices of 350 μ m thickness were prepared by a tissue chopper (McIlwain TC752, Campden Instruments, Loughborough, UK, or Saur, Reutlingen, Germany). After cutting, the slices were placed in a container with preparation medium composed of MEM (Gibco Thermo Fisher) + 1% penicillin/streptomycin. The adherent glue was removed and slices sticking together were carefully separated by using two scalpels under a stereomicroscope. Slices were placed on membrane culture inserts using the wide opening of a glass pipette with the fine tip broken off, and residual preparation medium was removed with a normal pipette. Slices were placed in groups of three per membrane and cultivated in 6-well plates, each filled with 1 ml cultivation medium. The cultivation medium was composed of MEM, 25% Hank's Balanced Salt Solution (with Ca and Mg; Gibco), 10% Normal horse serum (Gibco), 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, and 0.45% glucose. For cultivation, plates were kept in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂. The cultivation medium was replaced 24 h after preparation and then every other day.

2.3. Complex preparation and analysis

PEI/siRNA and PEG-PEI/siRNA complexes were prepared by mixing 15 μ g siRNA with 112.5 μ g PEI F25-LMW or 75 μ g PEG-PEI, each dissolved in 37.5 μ l 10 mM HEPES/150 mM NaCl, pH 7.4 and incubated for 10 min. After mixing and vortexing, the complexation was allowed to proceed for 30 min at room temperature. Lipopolyplexes were generated as described previously [4]. Briefly, DPPC liposomes were prepared by hydration of a dried lipid film in an ultrasound bath sonicator and extrusion, and then mixed with preformed PEI/siRNA complexes at a lipid/PEI mass ratio = 1.7. After vigorous pipetting, the mixture was vortexed and incubated for 60 min at room temperature prior to use.

Zeta potentials and particle sizes were determined by phase analysis light scattering (PALS) and photon correlation spectroscopy (PCS) with a Brookhaven ZetaPALS system (Brookhaven Instruments, Holtsville, USA), upon diluting the complexes to 1.5 ml in pure water. The manufacturer's software was used for data analysis, with applying a viscosity and refractive index of pure water at 25 °C. For size measurement, the complexes were analyzed in five runs with a run duration of 1 min, and results are expressed as intensity weighted mean diameter. Zeta potentials were determined in ten runs, with each run containing ten cycles, and applying the Smoluchowski model. Bars represent mean \pm SD of the individual readings.

2.4. Tissue slice treatment, tissue slice analysis and determination of tissue penetration

Slices were cultivated in the incubator as described above for 24 h prior to treatment with PEI-based complexes. 75 μ l of the complexes, i.e. approximately 3 drops per slice, were applied using a 100 μ l-pipette. The slices were then further cultivated for 24 h, unless indicated otherwise.

To obtain a time series for the evaluation of histology, the slices were fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde prior to embedding in paraffin. 7 μ m sections were dewaxed and rehydrated in decreasing alcohol series, stained with hematoxylin/eosin (H&E) and visualized with a Zeiss Axioplan 2 microscope using 20 \times and 40 \times objectives to examine the morphology of the cultivated tissue. For immunohistochemistry, the deparaffinized sections were washed 3 times for 10 min in phosphate buffered saline (PBS), treated with 1.5% Triton X-100/PBS for 10 min for permeabilization and blocked with 10% normal goat serum in 1.5% Triton X-100/PBS for at least 1 h. Primary antibodies against the proliferation marker Ki67 (rabbit, 1:100; DCS, Hamburg, Germany) or cleaved caspase-3 (rabbit, 1:400; Cell

Signaling Technology, Danvers, MA) were applied and the slides were incubated overnight at 4 °C, prior to washing. For visualization, the slides were incubated with Alexa 568-labeled goat anti-rabbit secondary antibodies. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Pictures were taken using an Olympus BX40 fluorescent microscope equipped with a 20× objective, and 36 pictures from six different sections per nanoparticle type were analyzed by manual cell counting for Ki67, caspase-3 and Hoechst 33342 positive cells. Ki67 and caspase-3 positive cells are shown as percentage of all cells, determined by Hoechst 33342 staining of cell nuclei.

For the detection of fluorescently labeled complexes, the paraformaldehyde-fixed slices were washed in phosphate buffered saline and soaked in sucrose solutions of increasing concentration (10, 20, 30%) in the dark. The slices were positioned in small plastic containers filled with Tissue-Tek (Sakura) and frozen by placing them in dry ice. Vertical 12 μm sections of the slices were prepared using a cryostat at −20 °C, washed, and nuclei were counterstained with Hoechst 33342.

From each 12 μm section, five z-stacks at 2 μm intervals were taken with a confocal microscope (Zeiss LSM 700, Objective 20×) and converted to one projection to obtain high quality pictures for analysis. Quantification of fluorescent pixels was performed using Image J, and the calculated total area was then corrected for differences in surface lengths in order to only represent diffusion lengths. For each nanoparticle type, 8 samples were analyzed:

2 12-μm sections per slice × 1 out of 3 slices per well × 2 wells per tumor × 2 tumors, resulting in a total of 40 pictures.

2.5. Determination of Survivin levels by RT-qPCR

Total RNA was isolated from tissue slices using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. 1 μg total RNA was reverse transcribed using RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Roth, Germany) and random hexamer primers. Quantitative PCR was performed using a LightCycler® 2.0 (Roche, Mannheim, Germany) and the Absolute™ QPCR SYBR® Green Capillary Mix (Thermo Scientific). Survivin-specific primers were purchased from Eurofins MWG Operon (see [Suppl. Information for sequences](#)). Quantitation of gene expression was performed by the $\Delta\Delta C_t$ method with β -actin as reference housekeeping gene.

3. Results and discussion

3.1. Tissue slice preparation and cultivation

350 μm tissue slices were prepared from pieces of different tumor xenografts. Independent of tissue texture (PC3 cells form harder xenografts than U87 cells (A. Aigner, personal observation)), all tumors could be cut properly by a tissue chopper as described

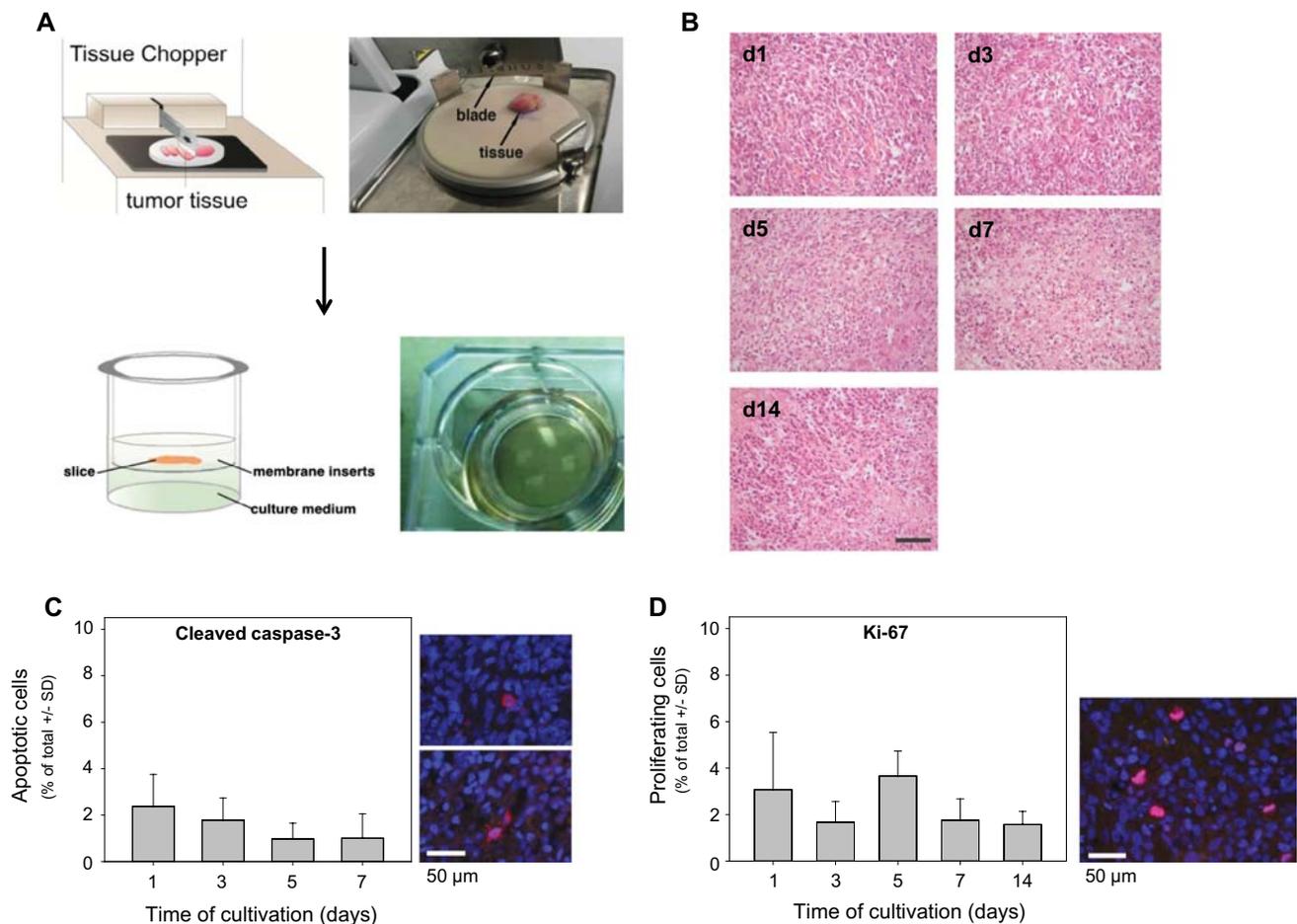


Fig. 1. (A) Scheme of tissue slice preparation and cultivation (left) and corresponding original pictures (right), modified from [6]. (B) H&E stains of representative paraffin sections from PC3 prostate carcinoma xenograft tissue slices at several time points after cultivation start. Tissue integrity and viability is well preserved. (C, D) No increase in caspase-dependent apoptosis or decrease in proliferation is observed, as indicated by cleaved-caspase-3 (C, red) or Ki-67 (D, red) staining vs. all nuclei (blue). Left panels: quantitation of multiple sections and microscopic fields (see Materials and Methods for details); right panels: representative pictures. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

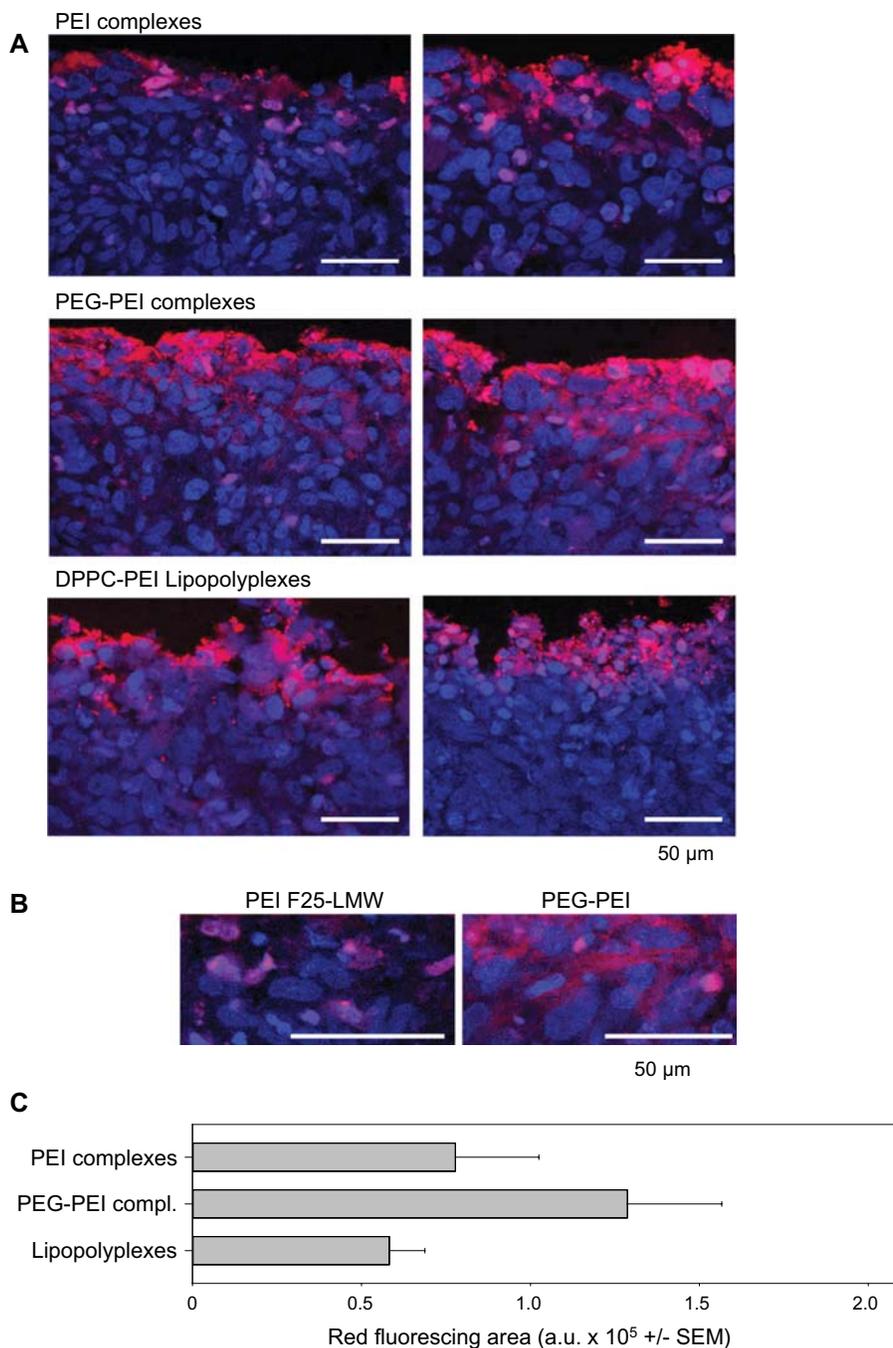


Fig. 2. (A) Tissue penetration of different PEI F25-LMW-based complexes, containing Alexa647-labeled siRNA for visualization by fluorescence microscopy. Two representative sections are shown. Complexes were applied on the upper surface of slices and vertical cryo-sections were prepared after 24 h. Blue: cell nuclei (Hoechst 33342). PEG-PEI/siRNA complexes with low zeta potential show deeper penetration into the tissue than PEI/siRNA complexes; see also (B) the segment magnifications. (C) Fluorescing areas indicating nanoparticle diffusion, quantitated as described in the Materials and Methods. A representative out of several experiments is shown, based on the quantitation of 40 pictures per nanoparticle. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

above. Slices were transferred onto membrane inserts within six-well plates for further cultivation (Fig. 1A). Morphological analysis by H&E staining on paraffin sections of the tissue slices did not reveal changes in tissue quality or integrity over the whole observation period of 14 days, and no necrotic processes were found (Fig. 1B). No gradient between the outer surface and inner tissue areas that could possibly result in cell death or other adverse effects was observed (data not shown). Initial heterogeneity of the sections, representing areas of different stroma density or invading immune cells, was maintained throughout the whole cul-

tivation period (see e.g. Fig. 1B, d14). This was true for PC3 (Fig. 1B) as well as for U87 tissue slices (Suppl. Fig. 1). Preservation of tissue viability was also confirmed by cleaved caspase-3 staining for the evaluation of apoptosis. The occurrence of apoptotic cells, here assessed by evaluating only caspase-dependent apoptosis, was low and did not increase upon cultivation, as determined by the percentage of caspase-3 positive cells (~1–2% of the whole cell population; Fig. 1C). In line with this, no changes in the number of proliferating cells (~2–3% Ki-67 positive cells in the whole cell population) were observed (Fig. 1D).

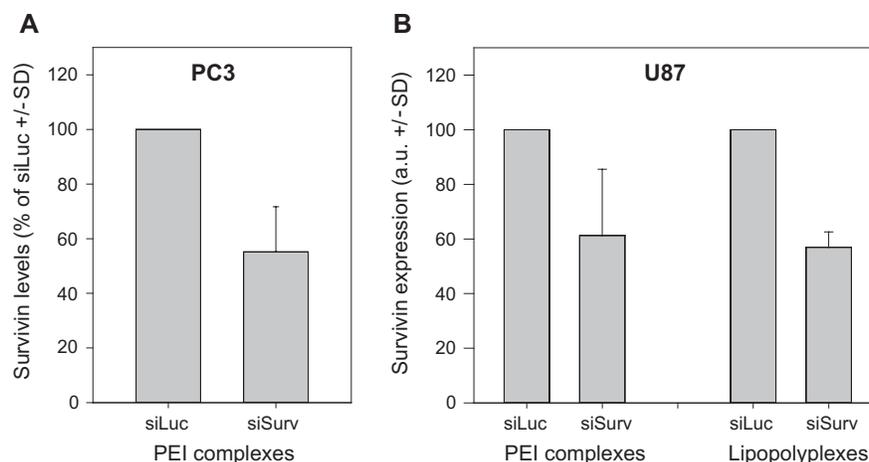


Fig. 3. Measurement of biological activities of nanoscale complexes in tissue slices. (A) Determination of mRNA levels of the oncogenic survival factor Survivin at 96 h after application of PEI/siRNA complexes onto PC3 prostate carcinoma xenograft tissue slices. The complexes containing the Survivin-specific siRNA (siSurv) mediate an almost 50% knockdown as compared to tissue slices identically treated with PEI-complexed unrelated siRNA (siLuc) as negative control. (B) Comparison of knockdown efficacies of PEI/siRNA complexes (left) and lipopolyplexes in U87 glioblastoma xenograft tissue slices. Bars represent means of 2–3 experiments with quantitation being done in duplicates.

3.2. Tissue penetration of polymer-based nanoparticles with different surface charge

Tissue penetration and cellular uptake remains a major issue in nanoparticle treatment. PEI-based complexes have been well established for the efficient delivery of nucleic acids *in vitro* and *in vivo* (see e.g. [2,10] for review). This is in part due to their positive surface charge, which allows for their interaction with negatively charged heparansulphate proteoglycans on the cell surface and mediates cell internalization. However, this strong interaction may impair tissue penetration, thus limiting nanoparticle availability in deeper tissue areas. To address this question, we compared complexes based on the low molecular weight PEI F25-LMW [10] vs. derivatives prepared by the PEGylation of the same PEI [11] or the addition of DPPC to the complex for lipopolyplex formation [4]. All nanoparticles are sufficiently stable for siRNA complexation (not shown) and comparable in size, with hydrodynamic diameters between ~200 nm (PEG-PEI complexes, lipopolyplexes) and ~250 nm (PEI complexes; Suppl. Fig. 2A). In contrast, major differences were observed in zeta potentials (Suppl. Fig. 2B). For complex visualization, Alexa647-labeled siRNA was used. At 24 h after PEI/siRNA complex application onto the surface of the tissue slices, the analysis of cross sections by fluorescence microscopy revealed initial penetration into deeper tissue areas (Fig. 2A, upper panel). Cellular uptake of complexes was observed as well. The depth of tissue penetration was independent of the density of the nuclei, but sometimes varied between different parts of the slice (see e.g. Fig. 2A, lower panel left vs. right). In contrast to their non-PEGylated counterparts, PEG-PEI/siRNA complexes penetrated deeper into the tissue (Fig. 2A, center; see also Fig. 2B for segment magnification and Fig. 2C for quantitation), despite the majority of the complexes still being located on the tissue surface, i.e. at the site of application. DAPI/Alexa647 co-localization revealed cellular uptake to a lesser extent, being in line with the lower zeta potential and poorer transfection efficacy of PEG-PEI complexes *in vitro* [3]. DPPC lipopolyplex formation, albeit largely shielding the surface charge of the PEI complexes (Suppl. Fig. 2), has been shown previously to preserve transfection efficacy *in vitro* [4], also allowing for the use of lipopolyplexes *in vivo* [12]. Indeed, tissue penetration of the lipopolyplexes was comparable to their corresponding PEI complexes (Fig. 2A; see Fig. 2C for quantitation).

3.3. Assessment of biological activities of nanoparticles in tissue slices

Beyond tissue penetration, the cellular uptake and intracellular release of the payload (here: siRNA) in the correct cell compartment are critical steps. Thus, we next asked whether the tissue slices allow for the determination of nanoparticle activity by measuring of knockdown efficacies upon siRNA delivery. An siRNA targeting the oncogenic survival factor Survivin, which is expressed in both cell lines and thus also in the xenograft tissue, was selected. 96 h after single application of PEI/siSurv onto PC3 xenograft tissue slices, an almost 50% knockdown of Survivin on the mRNA level was observed in the tissue lysates (Fig. 3A). To exclude non-specific knockdown effects, results were compared in all biological studies to tissue slices identically treated with the same nanoparticles containing a negative control siRNA against an irrelevant gene product (siLuc). Despite their relatively large size (~300 nm; see Suppl. Fig. 2), this relatively high knockdown efficacy indicates that PEI/siRNA complexes reach deeper regions since the transfection of cells only in the upper layers cannot alone account for the observed overall Survivin reduction. Since this *ex vivo* model is devoid of blood flow, this can only be achieved by rather efficient tissue penetration, probably reaching even deeper than what initially observed by fluorescence microscopy (Fig. 2). In this context, it should also be noted that rather small amounts of siRNA have been shown to be already sufficient for RNAi-mediated knockdown (<2000 copies; [13]). This suggests that fluorescence-assisted visualization may rather underestimate tissue penetrating properties and that the assessment of biological (knockdown) activities in tissue slices may be the more sensitive readout. Comparable knockdown results were obtained in U87 glioblastoma xenograft tissue slices (Fig. 3C, left). Lipopolyplexes showed similar efficacy, being in line with very good knockdown results in previous cell culture experiments [4,12]. However, it should be noted that results varied between different experiments, suggesting more detailed analyses with regard to optimal conditions for achieving reproducible knockdown results. Apart from tissue slices, sources of variability may be the choice of the target gene or the protocol for RNA preparation that will require analyses beyond the scope of this paper (Ewe, Höbel, unpublished observations).

Taken together, this study demonstrates the usefulness of organotypic tumor (xenograft) tissue slices for the assessment of

the tissue-penetrating properties of nanoparticles. Beyond nanoparticle localization by fluorescence, excellent tissue preservation and cell viability also allows for the evaluation of biological activities. This model system can thus be used in larger screening studies for establishing structure-function relationships, contribute to the 3R principle in reduction of animal experiments and precisely determine nanoparticle properties at their intended site of action *in vivo*, without the complexity of large animal studies. Our data also provide the avenue for analyses in other tissues, e.g. human primary tumors that mimic the situation in patients more closely.

Acknowledgments

We are grateful to Markus Böhlmann and Anne-Kathrin Krause for expert assistance with mouse maintenance, as well as Katrin Becker and Gabriele Oehme for help with tissue slice preparation. This work was supported in part by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (HO 5448/1-1 to S.H.), the Deutsche Krebshilfe (grant 110184 to A.A.), and the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, grant to F.M. and I.B.).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.013>.

References

- [1] M. Ferrari, *Frontiers in cancer nanomedicine: directing mass transport through biological barriers*, *Trends Biotechnol.* 28 (2010) 181–188.
- [2] S. Hobel, A. Aigner, *Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo*, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 5 (5) (2013) 484–501.
- [3] A. Malek, F. Czubyko, A. Aigner, *PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-induced gene targeting efficacy*, *J. Drug Target.* 16 (2008) 124–139.
- [4] A. Ewe, A. Schaper, S. Barnert, R. Schubert, A. Temme, U. Bakowsky, A. Aigner, *Storage stability of optimal liposome-polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery*, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2663–2673.
- [5] D. Gutsch, D. Appelhans, S. Hobel, B. Voit, A. Aigner, *Biocompatibility and efficacy of oligomaltose-grafted poly(ethylene imine)s (OM-PEIs) for in vivo gene delivery*, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 4666–4675.
- [6] M.M. Gerlach, F. Merz, G. Wichmann, C. Kubick, C. Wittekind, F. Lordick, A. Dietz, I. Bechmann, *Slice cultures from head and neck squamous cell carcinoma: a novel test system for drug susceptibility and mechanisms of resistance*, *Br. J. Cancer* 110 (2014) 479–488.
- [7] F. Merz, F. Gaunitz, F. Dehghani, C. Renner, J. Meixensberger, A. Gutenberg, A. Giese, K. Schopow, C. Hellwig, M. Schafer, M. Bauer, H. Stocker, G. Taucher-Scholz, M. Durante, I. Bechmann, *Organotypic slice cultures of human glioblastoma reveal different susceptibilities to treatments*, *Neuro-oncology* 15 (2013) 670–681.
- [8] M. Chaturvedi, I. Figiel, B. Sreedhar, L. Kaczmarek, *Neuroprotection from tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and its nanoparticles*, *Neurochem. Int.* 61 (2012) 1065–1071.
- [9] M. Dong, C. Philippi, B. Loretz, N. Nafee, U.F. Schaefer, G. Friedel, S. Ammon-Treiber, E.U. Griese, C.M. Lehr, U. Klotz, T.E. Murtter, *Tissue slice model of human lung cancer to investigate telomerase inhibition by nanoparticle delivery of antisense 2'-O-methyl-RNA*, *Int. J. Pharm.* 419 (2011) 33–42.
- [10] S. Werth, B. Urban-Klein, L. Dai, S. Hobel, M. Grzelinski, U. Bakowsky, F. Czubyko, A. Aigner, *A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes*, *J. Control. Release* 112 (2006) 257–270.
- [11] S. Hobel, D. Vornicescu, M. Bauer, D. Fischer, M. Keusgen, A. Aigner, *A novel method for the assessment of targeted PEI-based nanoparticle binding based on a static surface plasmon resonance system*, *Anal. Chem.* 86 (2014) 6827–6835.
- [12] A. Ewe, O. Panchal, S.R. Pinnapireddy, U. Bakowsky, S. Przybylski, A. Temme, A. Aigner, *Liposome-polyethylenimine complexes (DPPC-PEI lipopolyplexes) for therapeutic siRNA delivery in vivo*, *Nanomedicine* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.005>, pii: S1549-9634(16)30113-7 (Epub ahead of print).
- [13] A. Wittrup, A. Ai, X. Liu, P. Hamar, R. Trifonova, K. Charisse, M. Manoharan, T. Kirchhausen, J. Lieberman, *Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown*, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 870–876.

5 Anlagen

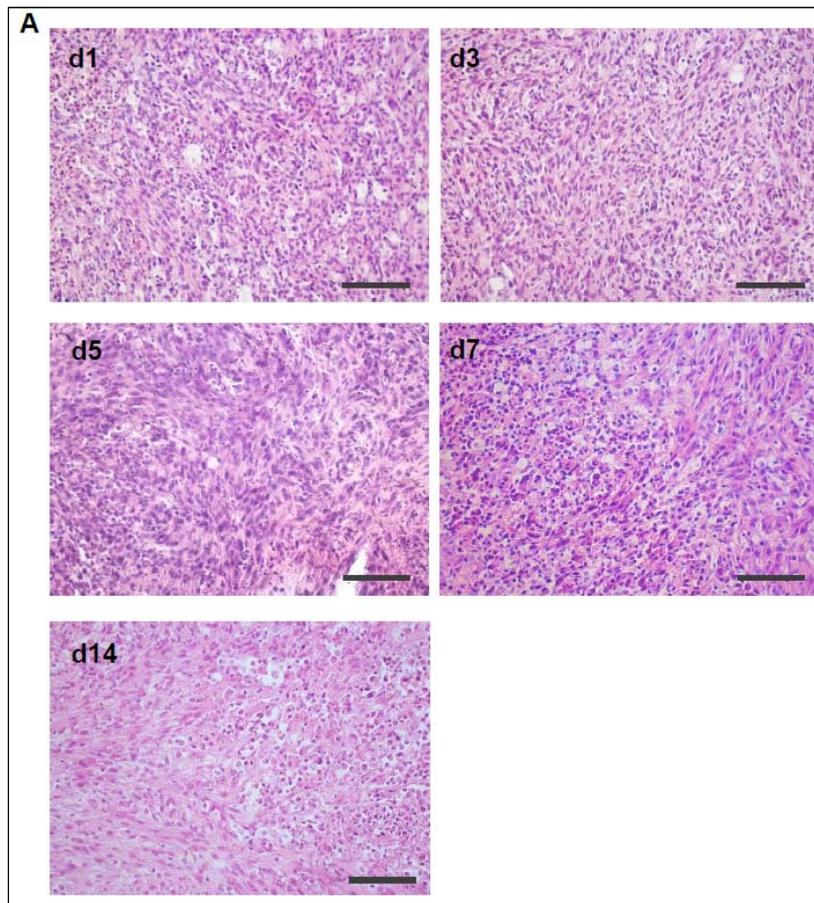


Abb. 5: Paraffinschnitte von U87 Xenograft-Modellen (H.E.-Färbung). Aufnahmen verschiedener Zeitpunkte nach Kultivierungsbeginn. Sowohl die Gewebeintegrität als auch die Viabilität ist gut erhalten.

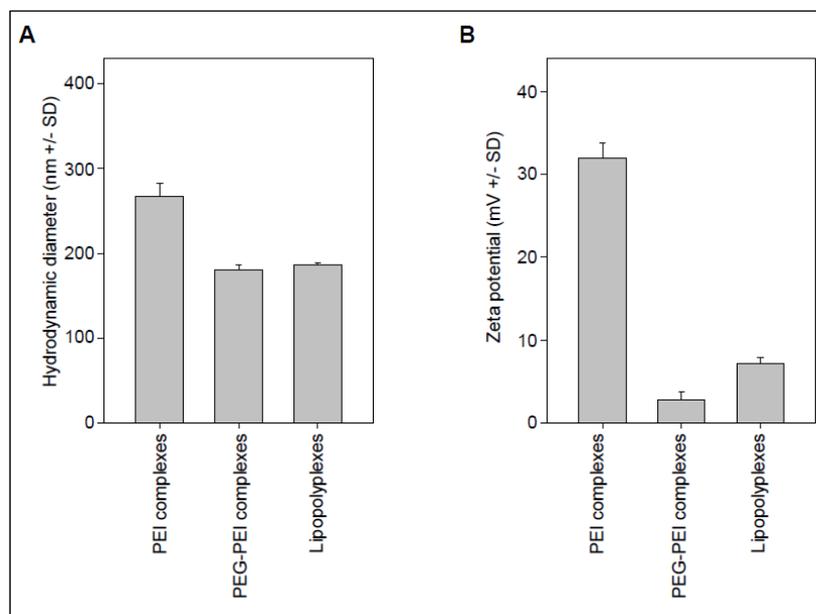


Abb. 6: Größe (A) und zeta-Potentiale (B) von auf PEI basierenden Nanopartikeln (PEI/siRNA Komplexe, PEG-PEI/siRNA Komplexe und DPPC-PEI/siRNA Lipopolyplexe), bestimmt durch Photon Correlation Spectroscopy (PCS) und Laser Doppler Anemometry (LDA).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel	Untersuchung der biologischen Aktivität von Nanopartikeln in Tumorschnittkulturen
Eingereicht von	Lea Maria Merz
Angefertigt am	Institut für Anatomie und am Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Klinische Pharmakologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
Betreuer	Herr Prof. Dr. med. Ingo Bechmann, Herr Prof. Dr.-Ing. Achim Aigner

Eingereicht im Januar 2019

Die Entdeckung der RNA-i und der Einsatz von kleinen RNA-Molekülen wie miRNA und siRNA zum gezielten Knockdown von Genen ist für ein breites Spektrum von Krankheitsbildern, einschließlich Tumor- und Infektionskrankheiten eine vielversprechende Therapiemethode. Um problematische Eigenschaften der RNA-Moleküle wie ihre Instabilität, die Ladung und das Molekulargewicht zu verbessern, werden für ihren Transport zunehmend PEIs eingesetzt. Hierbei handelt es sich um positiv geladene, linear oder verzweigte Polymere. Diese können kleine RNA-Moleküle komplexieren und schützen die RNA vor einem vorzeitigen Abbau. Außerdem kann eine Verbesserung des zellulären Transportes und der intrazellulären Freisetzung erzielt werden.

Für den möglichst effektiven Transport durch PEI-Komplexe werden zunehmend PEI-Modifikationen analysiert. Durch Modifikation können eine Veränderung der pharmakokinetischen Eigenschaften sowie eine verbesserte Biokompatibilität und Transfektionseffizienz erzielt werden. Mit Hilfe von kovalenten Bindungen, zum Beispiel von Antikörpern, kann ein gezielterer Transport erreicht werden. Der Erfolg dieser therapeutischen Nanopartikel ist insbesondere von der effizienten zellulären Aufnahme, der Fähigkeit der Gewebepenetration und vom Erreichen der Zielzellen abhängig.

Bisherige Untersuchungen wurden hauptsächlich an Zellkulturen oder an lebenden Organismen durchgeführt. Die hier erzielten Ergebnisse lassen sich jedoch nur schwer auf in-vivo-Situation übertragen. Ex-vivo-Tumormodelle wie Tumorgewebe-Schnittkulturen stellen eine

naturgetreuerer Abbildung von Tumoren dar. Für das Verstehen von Tumorbiologie, Heterogenität und das Verhalten der PEIs im Gewebe sind Gewebeschnittkulturen eine geeignete Plattform.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit der Transport und die Verteilung der PEIs an organotypischen Tumorgewebe-Schnittkulturen untersucht. Dafür wurde zuerst die Kultivierung von 350 µm durchmessenden Dünnschicht-Präparaten verschiedener Tumorgewebe (Xenotransplantat-Tumoren aus PC3 und U87 Zelllinien) etabliert. Eine erfolgreiche Kultivierung konnte über 14 Tage durchgeführt werden. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Kultivierungsbeginn (Tag 1, 3, 5, 7 und 14) wurden die Morphologie und die Vitalität (Apoptose, Proliferation) durch eine HE- oder immunhistochemische Färbung bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Morphologie der Tumorzellen sowie die Proliferation und Apoptose über den gesamten Kultivierungszeitraum erhalten blieben.

Im nächsten Schritt wurde sowohl der Transport der siRNA von nicht-modifizierten und modifizierten PEIs als auch der Transport durch deren Lipopolyplex-Derivate (PEI-siRNA-Komplexe mit Liposomenhülle) analysiert. Für die Visualisierung der Komplexe wurde fluoreszenzmarkierte siRNA verwendet. Die PEI-siRNA-Komplexe wurden auf die Gewebeschnitte aufgetragen, diese wurden anschließend über 24 Stunden kultiviert und mit Hilfe eines Kryostats geschnitten. In der mikroskopischen Analyse und ihrer Quantifizierung erfolgte die erste Einschätzung der Gewebepenetration. Es zeigten sich Unterschiede in der Gewebepenetration der verschiedenen Nanopartikel, abhängig von deren Oberflächenladung.

Um die biologische Aktivität der Nanopartikel in lebenden Zellen besser evaluieren zu können, wurde im dritten Schritt der Knockdown eines endogenen Genproduktes untersucht. Zielgen war hier das Onkogen Survivin, welches ein wichtiger endogener Überlebensfaktor der Tumorzellen darstellt. Es gelang der Nachweis eines durch PEI-siRNA-Komplexe vermittelten Knockdowns dieses Survivin Gens.

Insgesamt gelang uns die Etablierung von Gewebeschnittkulturen als Grundlage für die ex vivo Untersuchung von Nanopartikeln. Es können nicht nur Aussagen über die Gewebepenetration der Nanopartikel, sondern auch über ihre biologischen Aktivitäten in einer intakten Gewebestruktur getroffen werden.

Trotz dieser ersten erfolgreichen Untersuchung von Nanopartikeln mit Hilfe von Gewebeschnittkulturen ist in Zukunft ein besseres Verständnis der Verteilung der Komplexe auf dem Gewebe und der Gewebepenetration erforderlich. Die negative Ladung der Nanopartikel ermöglicht eine effizientere Interaktion mit Zellen und eine bessere Aufnahme, sie verhindert jedoch das Eindringen in tiefere Gewebsschichten. Im hier durchgeführten Knockdown des endogenen Genproduktes Survivin zeigte sich ein Abschalten von 50 % der Gene. Dieses Ergebnis korreliert somit nicht mit der sich histologisch darstellenden fluoreszierenden Fläche. Eine verbesserte Quantifizierung der Gewebetiefe ist somit von höchster Relevanz. Ein weiterer Ansatzpunkt für zukünftige Projekte ist die Frage nach der tatsächlichen zellulären Aufnahme und der Freisetzung der siRNA im korrekten Zellkompartiment. Ein weiterer Schritt zur Etablierung der Methode ist die Anwendung der PEI-Komplexe an humanen Tumorbiospien.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Schnittkulturen von PC3/U87 Zelllinien ein stabiles präklinisches Tumormodell darstellen. Tumormorphologie und Mikroumgebung bleiben weitestgehend erhalten. Anhand der Xenograft-Modelle kann das Verhalten der mit PEI komplexierten kleinen RNA-Moleküle detailliert untersucht werden. Es können sowohl neue Therapie-Targets als auch verschiedene Therapieformen analysiert werden. Da das Einsatzspektrum der Komplexe theoretisch alle Krankheiten umfasst, welche auf einer Veränderung von Genabschnitten beruhen, wäre ihre effiziente therapeutische Anwendung ein großer Erfolg.