

**Formulierung von therapeutischen Oligonukleotiden mit
PAMAM-Dendrimeren zur Aktivierung von *Pattern Recognition*
Rezeptoren des angeborenen Immunsystems**

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anna Morlin Schwickart-Halbe

aus Engelskirchen

Bonn 2018

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

1. Gutachter:	Herr Prof. Dr. med. Gunther Hartmann
2. Gutachter:	Herr Prof. Dr. rer. nat. Alf Lamprecht
Tag der Promotion:	26.02.2019
Erscheinungsjahr:	2019

Meinen Eltern in Liebe gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	5
2	Einleitung.....	6
2.1	Das Immunsystem.....	6
2.2	Die <i>Pattern Recognition Rezeptors</i> des angeborenen Immunsystems.....	7
2.2.1	Die Toll – like Rezeptoren (TLRs).....	8
2.2.1.1	Expressionsmuster und Liganden der TLRs.....	9
2.2.1.2	Signalkaskade und Effektormechanismen der RNA-detektierenden Rezeptoren TLR7 und TLR8.....	10
2.2.1.3	Die Liganden der RNA-detektierenden Rezeptoren TLR7 und TLR8.....	11
2.2.2	Die zytosolischen <i>RIG-like</i> Rezeptoren (RIG-I, MDA-5, LGP2).....	12
2.2.2.1	Aktivierung von RIG-I durch virale oder synthetische Liganden.....	13
2.3	Antivirale und antitumorale Effekte durch TLR7, TLR8 und RIG-I-Liganden.....	14
2.3.1	TLR7, TLR8 und RIG-I-Liganden induzieren antivirale Zytokine.....	14
2.3.2	RIG-I induzierte Apoptose von Tumorzellen.....	15
2.4	Oligonukleotide als potentielle Arzneistoffe.....	16
2.5	Zelluläre Aufnahmemechanismen.....	18
2.5.1	Endozytose.....	18
2.5.1.1	Phagozytose.....	19
2.5.1.2	Pinozytose.....	19
2.6	Transfersysteme für Nukleinsäuren.....	21
2.6.1	Angewandte Transfersysteme.....	21
2.6.1.1	Virale Transfervektoren.....	21
2.6.1.2	Nicht-virale Transfervektoren.....	23
2.6.2	Oligonukleotid-Transfersysteme für den therapeutischen Einsatz.....	38
3	Ziel der Arbeit.....	41
4	Material und Methoden.....	42
4.1	Material.....	42
4.1.1	Allgemeine Laborgeräte.....	42
4.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	43
4.1.3	Labor- und Verbrauchsmaterialien.....	46
4.1.4	Pufferlösungen und Kulturmedien.....	48
4.1.5	Kits, Enzyme, Antikörper.....	50
4.1.6	MACS Kits und Materialien.....	51
4.1.7	Transfektionsreagenzien.....	51
4.1.8	Nukleinsäuren.....	51
4.1.9	Zellen / Zelllinien.....	51
4.1.10	FACS-Antikörper.....	52
4.1.11	Primer.....	53

4.1.12	Mauslinien	53
4.2	Methoden.....	53
4.2.1	Zellbiologische Methoden	53
4.2.1.1	Kultivierung von Zellen	53
4.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl	53
4.2.1.3	Einfrieren von Zellen	54
4.2.1.4	Isolation von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	54
4.2.1.5	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus Frischblut von Mäusen.....	55
4.2.1.6	Isolation von humanen Monozyten.....	56
4.2.1.7	Isolation von humanen myeloiden dendritischen Zellen (mDCs).....	56
4.2.1.8	Isolation von humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC)	57
4.2.1.9	Isolation von murinen Knochenmarkszellen und Differenzierung zu mDCs oder pDCs	58
4.2.1.10	Isolation von murinen Knochenmarkszellen und Differenzierung zu BMDM	58
4.2.1.11	Generierung von L929-Zellkulturüberstand	59
4.2.2	Transfektionsmethoden	59
4.2.2.1	Herstellung verschiedener Transfektionsansätze für die Stimulation von Zellen.....	59
4.2.2.2	Stimulation von Zellen	61
4.2.3	Analytische Bestimmungsmethoden.....	61
4.2.3.1	Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen mittels ELISA.....	61
4.2.3.2	Bestimmung der Zellvitalität	62
4.2.3.3	Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie	63
4.2.4	Molekularbiologische Methoden	63
4.2.4.1	<i>In vitro</i> - Transkription.....	63
4.2.4.2	Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	64
4.2.4.3	RNA Extraktion.....	64
4.2.4.4	Spektralphotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	65
4.2.4.5	Quantitative PCR (qPCR).....	66
4.2.5	Pharmazeutisch-technologische Methoden	67
4.2.5.1	Partikelgrößenmessung	67
4.2.5.2	Bestimmung des Zetapotentials	68
4.2.6	<i>In vivo</i> Versuche	69
4.2.6.1	Blutabnahme	69
4.2.6.2	Inokulation von Tumorzellen.....	70
4.2.6.3	Organentnahme zur histopathologischen Analyse	71
4.2.6.4	Applikation eines Therapieansatzes.....	71
4.3	Statistik	72
5	Ergebnisse	73
5.1	PAMAM-Dendrimere als Transfersystem zur endosomalen und zytosolischen Transfektion von Oligonukleotiden <i>in vitro</i>	73

5.1.1	Die Formulierung von PAMAM-Dendrimern mit TLR7-, TLR8- oder RIG-I Liganden ermöglicht eine effektive Rezeptoraktivierung.....	74
5.1.2	Das Transfektionsmedium beeinflusst die physikalisch-chemischen Eigenschaften der gebildeten Dendriplexe	76
5.1.3	Die Größe der Dendriplexe beeinflusst die Aufnahme durch verschiedene Zellpopulationen	81
5.1.3.1	Nano-Dendriplexe führen zu einer zytosolischen Aktivierung durch den RIG-I Liganden 3pRNA in humanen pDCs	83
5.1.3.2	Die Verwendung von 5%iger Glucose führt zu kleineren Partikelformationen.....	83
5.1.4	PAMAM Dendrimere stellen im Vergleich zu etablierten Substanzen ein effektiveres Transfektionsreagenz für den Transport von 3pRNA <i>in vitro</i> dar.....	84
5.1.5	3p-Dendriplexe führen auch im murinen System zur Aktivierung von RIG-I <i>in vitro</i>	87
5.1.6	3p-Dendriplexe führen in humanen und murinen Tumorzellen zur Initiation von RIG-I vermittelten Signalwegen.....	88
5.2	Evaluierung der Anwendbarkeit von 3p-Dendriplexen <i>in vivo</i>	92
5.2.1	Systemische Applikation von 3p-Dendriplexen.....	92
5.2.1.1	3p-Dendriplexe führen zu einer dosisabhängigen Immunantwort nach intravenöser Gabe	92
5.2.1.2	Leber und Lunge sind Hauptdistributionsorgane der 3p-Dendriplexe nach systemischer Applikation.....	94
5.2.2	Intravenöse Anwendung von 3p-Dendriplexen zur antitumoralen Therapie	95
5.2.2.1	Intravenöse Therapie mit 3p-Dendriplexen führt zur Regression des Tumorwachstums im murinen orthotopen HCC Modell	95
5.2.2.2	Im B16 Lungenmetastasen Modell bewirkt die intravenöse Applikation von 3p-Dendriplexen eine Verminderung der Lungenmetastasen	97
5.2.2.3	3p-Dendriplexe als intravenöse Therapie im subkutanen B16-Melanom-Modell...	100
5.2.3	Intratumorale Applikation von 3p-Dendriplexen zur Behandlung von subkutanen Tumoren.....	103
5.2.3.1	3p-Dendriplexe führen zur lokalen Zytokin-Induktion	103
5.2.3.2	3p-Dendriplexe führen als intratumorale Therapie zur Regression von B16 Melanomen.....	104
5.2.3.1	Die Behandlung mit 3p-Dendriplexen schützt vor erneuter Tumorbildung im B16 Melanom	106
5.2.3.2	Im nicht-orthotopen Hepatozellulären Karzinom führt eine 3p-Dendriplex Behandlung zur Tumorregression und zum Schutz vor Tumorneubildung.....	107
5.3	Evaluation der PAMAM bedingten Toxizitätserscheinungen	108
5.3.1	Die <i>in vitro</i> Stimulation von nicht-malignen Zellen mit 3p-Dendriplexen führt zu einer geringeren Toxizität als die Stimulation mit 3p-Polyplexen.....	108
5.3.2	Bei der intratumoralen Therapie führen 3p-Polyplexe nicht aber 3p-Dendriplexe zu einer Ulzeration des Tumors	110
5.3.3	Eine subkutane Behandlung mit 3p-Dendriplexen führt nur an der Injektionsstelle zu mikroskopische Auffälligkeiten	111
5.4	Evaluierung einer maschinellen Produktion von 3p-Dendriplexen.....	113

5.4.1	Die Verwendung von pulsationsfreien Niederdruckpumpen ermöglicht eine kontrollierte maschinelle Formulierung von 3p-Dendriplexen	113
5.4.2	Glucose bewirkt eine Stabilisierung der hergestellten Komplexe	117
6	Diskussion.....	118
6.1	PAMAM-Dendrimere als potentielle nicht-virale Transfektionsvektoren für Oligonukleotide zur effektiven Aktivierung endosomaler Toll-like-Rezeptoren und des zytosolischen Rezeptors RIG-I. ...	118
6.2	Definierte Formulierungsbedingungen sind essentiell für eine effektive Stimulation der endosomalen und zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren TLR7, TLR8 und RIG-I	120
6.3	Die Größe der Dendriplexe beeinflusst dessen Aufnahme in unterschiedliche Immunzellsubtypen...	124
6.4	Nano-3p-Dendriplexe aktivieren RIG-I in humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen	125
6.5	Im humanen wie auch im murinen System stellen PAMAM-Dendrimere ein hochpotentes Vektorsystem dar.....	126
6.6	3p-Dendriplexe inhibieren das Tumorwachstum im murinen Melanom- und hepatozellulären Karzinom Modell.....	128
6.7	Die subkutane Applikation von 3p-Dendriplexen führt nur am Injektionsgebiet zu mikroskopischen Auffälligkeiten	131
6.8	3p-Dendriplexe: Potentieller Kandidat für die klinische Anwendung?	132
7	Anhang.....	137
7.1	Sequenzen verwendeter Oligonukleotide	137
7.2	Abkürzungsverzeichnis	137
7.3	Abbildungsverzeichnis	140
7.4	Tabellenverzeichnis	142
7.5	Literaturverzeichnis.....	143
8	Online-Literaturverzeichnis	175
9	Danksagung.....	176
10	Eidesstattliche Erklärung.....	177

1 Zusammenfassung

Der ubiquitär exprimierte Immunrezeptor *Retinoic Acid inducible Gene-1*, kurz RIG-I, ist eine zytosolisch lokalisierte Helikase, die zur Detektion von pathogenen RNA-Viren befähigt ist. Als synthetischer Ligand konnte eine 5'-triphosphorylierte, doppelsträngige RNA (3pRNA) identifiziert werden, die wie auch die RNA der Viren an den Rezeptor bindet und nach dessen Aktivierung einer Reihe verschiedener Signalwege anstößt. So kommt es zur hauptsächlich zur Induktion und Sekretion von Typ-I Interferonen (IFN α/β) und dem davon abhängigen C-X-C Motiv Chemokin 10 (CXCL-10). Durch diese ausgeschütteten molekularen Signale wird eine anti-virale Immunantwort eingeleitet, die durch die Aktivierung und Rekrutierung weiterer Immunzellen neben der innatem auch die adaptive Immunantwort auslöst. Daneben führt die Aktivierung von RIG-I in Tumorzellen auch zur Einleitung eines proapoptischen Signalwegs, der bedingt, dass die Zelle in den programmierten Zelltod geführt wird. Um diese immunologisch wertvollen Eigenschaften auch im Rahmen einer therapeutischen Anwendung nutzen zu können, muss die synthetisch hergestellte RNA jedoch gut verpackt werden. Denn einerseits bedingen äußere Einflüsse (RNasen) den Abbau der RNA-Moleküle, andererseits besitzt die RNA alleine aufgrund ihrer hohen negativen Ladung nicht die Möglichkeit in die Zelle und schon gar nicht bis ins Zytosol zu gelangen, wo der Rezeptor lokalisiert ist. Diese Verpackung ermöglichen virale aber auch nicht-virale Vektorsysteme, die die RNA schützen und auf verschiedensten Wegen die Aufnahme in die Zelle vermitteln.

Ein vielversprechendes nicht-virales Vektorsystem stellen PAMAM-Dendrimere dar. Diese hochdefinierten, sphärische polymere Strukturen besitzen eine Größe von 1 bis 10 Nanometern und sind in der Lage aufgrund einzigartigen Struktur RNA an sich zu binden, aber auch in sich aufzunehmen. Aufgrund ihrer guten Biokompatibilität, ihrer geringen Toxizität und auch aufgrund ihrer modifizierbaren Oberfläche, werden sie besonders oft für den Einschuss toxischer Arzneimittel verwendet, um dessen Effektivität und Spezifität von erhöhen und die Nebenwirkungen der Therapie zu reduzieren.

In dieser Arbeit wurden PAMAM-Dendrimere als Vektorsysteme für 3pRNA zur Aktivierung von RIG-I, aber auch für Liganden der endosomal lokalisierte Nukleinsäure-bindenden Rezeptoren Toll-like Rezeptor 7 und 8 (TLR7 / 8) evaluiert. Es stellte sich heraus, dass die so hergestellten Dendriplexe neben einer hohen Transfektionseffizienz *in vitro* auch *in vivo* ein hohes Transferpotential besitzen. Diese *in vivo* Anwendbarkeit machte einen therapeutischen Einsatz der 3p-Dendriplexe im murinen hepatozellulären Karzinom, sowie im murinen Melanommodell möglich und führte sowohl intravenös als auch intratumoral verabreicht zu einer starken Tumorrogression und zu einem verlängerten Überleben der Tiere. Zudem zeigte sich in Reprovokationsstudien an tumorfreien Tieren, dass die Behandlung einen immunologischen Schutz bewirkt, der das Anwachsen neuer Tumore verhindert.

Durch die Herleitung einer maschinellen Herstellungsmethode war es am Ende möglich durch einen hochdefinierten und kontrollierbaren Prozess stabile 3p-Dendriplexe zu produzieren. Diese Methode bietet eine solide erste Grundlage die Herstellung von 3p-Dendriplexen als direkt applikationsfähige Arzneiform auch im Großmaßstab unter GMP zu ermöglichen.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist in seiner Umwelt einer Vielzahl von eindringenden, körperfremden Substanzen und Lebewesen ausgesetzt. Es ist die Aufgabe des Immunsystems den Organismus vor Toxinen, Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten zu schützen, aber auch entartete körpereigene Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Um dies effektiv zu bewerkstelligen, besteht das Immunsystem aus einem komplexen Netzwerk an Zellen und Signalmolekülen, welches in einen angeborenen und einen adaptiven Teil unterteilt werden kann. Wie der Name schon impliziert ist das angeborene, oder auch innate Immunsystem, schon ab der Geburt vorhanden und stellt die erste Verteidigung gegen Eindringlinge dar. Den Beginn machen mechanische Barrieren wie die Haut oder Schleimhäute, die zudem noch antimikrobielle Wirkstoffe enthalten (z.B. Lysozym im Speichel) und eine erste biologische Abwehr darstellen. Werden diese überwunden und gelangt der Fremdstoff in das Blut, so wird er zunächst mit den dort zirkulierenden Proteinen konfrontiert, die allesamt das Komplementsystem beschreiben. Unter den mehr als 30 verschiedenen Plasmaproteinen des Komplementsystems stellen die Zymogene einen sehr großen Teil dar. Im Falle einer Infektion werden diese aktiviert und stoßen eine Aktivierungskaskade weiterer Proteine an, die letztendlich zu einer Opsonierung des Erregers führt. Diese Opsonierung erleichtert die Aufnahme und das anschließende Abtöten des Erregers durch phagozytierende Zellen (Makrophagen / neutrophile Granulozyten).

Wie auch die Makrophagen, so haben auch Monozyten und dendritische Zellen phagozytäre Eigenschaften. Diese, auch bekannt als antigen-präsentierende (APCs) Zellen, besitzen die Fähigkeit körperfremde Moleküle aufgrund von strukturellen Merkmalen als körperfremd zu erkennen. Diese pathogen-assoziierten molekularen Muster, kurz PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), können zum Beispiel Komponenten der bakteriellen Zellwand sein, Peptide oder Nukleinsäuren, oder auch eine bestimmte Anordnung von Zuckermolekülen. Erkannt werden diese Muster von hochkonservierten, keimbahnkodierten Rezeptoren, den sogenannten *Pattern-recognition receptors* (PRRs), die in den meisten Fällen an der Zellmembran gebunden sind, aber sich auch im Inneren der APC befinden. Diese Erkennung induziert die Aktivierung der APC und je nach PRR die Ausschüttung von unterschiedlichen Signalproteinen (Zytokine, Chemokine), um anderen Zellen zu signalisieren, dass ein eingedrungenes Pathogen detektiert worden ist. Neben der Erkennung sind die APCs aber auch in der Lage den Erreger über Makropinozytose in sich aufzunehmen, die enthaltenen Proteine in Peptide zu zerlegen und diese als Antigene über *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Da diese Antigene nun von T- und B-Zellen erkannt werden können, insbesondere, wenn zeitgleich ein PRR aktiviert worden ist und die Detektion eines Pathogens signalisiert, besteht genau an dieser Stelle die Verbindung zu dem adaptiven Immunsystem.

Der größte Teil aller Infektionen kann somit von dem angeborenen Immunsystem abgewehrt und bekämpft werden, jedoch kann erst durch das Zusammenspiel mit dem adaptiven Immunsystem ein dauerhafter immunologischer Schutz gewährleistet werden. Zwar reagiert das erworbene

System im Vergleich zum angeborenen Immunsystem zeitlich verzögert, jedoch ist es auf Grund der somatischen Rekombination der T- und B-Zell-Rezeptorgene, und der damit einhergehenden hohen Diversität von antigenspezifischen Effektorzellen, auch deutlich spezifischer^{2,3}. Das adaptive Immunsystem lässt sich weiter in zwei Unterbereiche aufteilen: die humorale und die zelluläre Immunantwort. Die humorale Immunantwort wird durch die Aktivierung von B-Lymphozyten, die zelluläre Immunantwort hingegen durch T-Lymphozyten vermittelt. Durch die Präsentation von Erregerantigenen über die MHC-II-Moleküle der APCs, in Verbindung mit der PRR abhängigen Aufregulation von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86, wird eine T-Zelle aktiviert. Es folgt eine Differenzierung der naiven CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, zu den entsprechenden CD4⁺ sowie CD8⁺ Effektorzellen. Die CD8⁺ Effektorzelle, die auch als zytotoxische T-Zelle (T_c-Zelle; CTL) bezeichnet wird, ist nun befähigt alle Zellen mit dem identischen Antigen zu sichten, zu binden und durch zytolytische Effektormechanismen zu zerstören. Im weiteren Verlauf differenziert sich die T-Zelle zu einer T-Gedächtniszelle, die in der Lage ist, den Körper vor einer erneuten Infektion zu schützen^{4,5}. Die CD4⁺-Lymphozyten hingegen führen zu einer Aktivierung von B-Lymphozyten, wobei sich diese dann in einer Antikörper-sezernierende B-Zelle umwandelt, sobald auch hier ein Kontakt mit einem Antigen erfolgt ist. Diese Antikörper-gekoppelten Antigene, sowie auch die aktivierte B-Zelle, sind in der Lage phagozytierende Zellen zu aktivieren, die diese Komplexe dann aufnehmen und zerstören können⁶.

2.2 Die *Pattern Recognition Rezeptors* des angeborenen Immunsystems

Um eindringende Pathogene erkennen zu können, hat das angeborene Immunsystem im Laufe der Evolution ein Repertoire an Rezeptoren entwickelt, die als *pattern recognition receptors* (PRR) zusammengefasst werden können. Diese keimbahnkodierte Rezeptoren, deren Prinzip 1989 von Janeway zum ersten Mal beschrieben worden ist⁷, sind besonders auf Immunzellen exprimiert und ermöglichen dem Immunsystem zwischen „fremd“ und „eigen“ zu unterscheiden⁸. Dies geschieht über molekulare Strukturen, die nicht im humanen System aber in den Pathogenen vorkommen (z.B. unmethylierte CpG DNA) oder die im Rahmen einer Infektion in einer Lokalisation vorkommen, die im humanen System nicht vorgesehen ist (z.B. DNA im Zytosol und nicht im Kern von Zellen)^{9,10}. Diese molekularen Strukturen, die von PRRs detektiert werden können, werden auch als *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) bezeichnet.

Zu den PRR zählen sieben verschiedene Gruppen von Rezeptoren, die sich in Aufbau und Spezifität unterscheiden. Da sie zudem auch unterschiedliche Lokalisationen besitzen, werden alle Rezeptorgruppen drei Hauptgruppen untergeordnet:

1. Lösliche PRRs
 - ⇒ Mannosebindendes Lektin (MBL)
2. Oberflächen / Membranassoziierte PRRs
 - ⇒ Toll-like Rezeptoren (TLRs)
 - ⇒ Scavenger Rezeptoren
 - ⇒ C-Typ Lektin Rezeptoren
 - ⇒ G-Protein gekoppelte Rezeptoren

3. Intrazelluläre PRRs

- ⇒ RIG-I-ähnliche Proteine (RLRs)
- ⇒ NOD-like Rezeptoren

Lösliche PRRs, zu denen auch das mannosebindende Lektin (MBL) gehört, sind freie, im Blutplasma vorkommende Proteine. Aufgrund spezieller Kohlenhydraterkennungsdomänen sind sie in der Lage an bakterielle Membranoberflächen zu binden, die eine ganz spezifische Verteilung und Orientierung von Mannose- und Fucoseresten aufweisen. Diese Bindung löst den Lektinweg der Komplementaktivierung aus, die eine Phagozytose der gebundenen Erreger ermöglicht¹¹.

Die wohl bekanntesten Vertreter der membranassoziierten PRRs sind die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), die sowohl auf der Zelloberfläche als auch auf der endosomalen Membran zu finden sind, und eine sehr breite Spezifität besitzen. Auch die membran-assoziierten Scavenger-Rezeptoren, die anionische Polymere und acetylierte LDL-Partikel detektieren¹²⁻¹⁴, sowie die C-Typ Lektin Rezeptoren, die calciumabhängig typische bakterielle und virale Zuckerverbindungen (z.B. Mannose, N-Acetylglucosamin und Fucose) erkennen und binden¹⁵, sind dieser Gruppe zuzuordnen. G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die sowohl auf der Membran von Epithel- und Endothelzellen, als auch auf Neutrophilen und Makrophagen exprimiert sind, können bakterielle Peptide mit *N*-Formylmethionin erkennen¹⁶.

Die Untergruppe der intrazellulären PRRs umfasst die NOD-like Rezeptoren (NLR), die Nukleinsäuren, anorganische und organische Kristalle detektieren^{17,18}, und die RIG-I-like Rezeptoren (RLR)¹⁹⁻²¹, die RNA-Strukturen im Zytosol erkennen und binden. Daneben existieren auch zytosolische Rezeptoren für die Detektion von viraler und bakterieller DNA, von denen aber wohl der cGAS-STING Signalweg der bedeutendste und wissenschaftlich am intensivsten untersuchte ist²².

2.2.1 Die Toll – like Rezeptoren (TLRs)

Die Familie der Toll-like Rezeptoren umfasst im humanen System bis heute 11 Mitglieder und gehört zu dem evolutionär ältesten Erkennungssystem, das jedoch erst Mitte der 90iger Jahre im Rahmen von Experimenten an der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) entdeckt und benannt worden ist²³. Da die humanen Rezeptorproteine dem Toll-Protein aus *Drosophila* ähneln, wurde der Name „toll ähnlich“ für diese Rezeptorklasse verwendet.

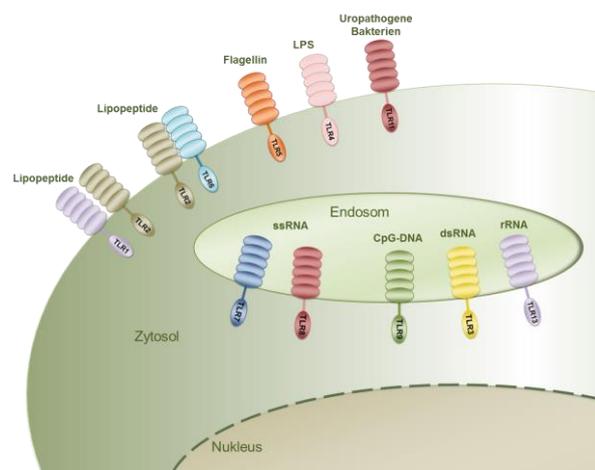


Abbildung 2-1: Übersicht aller Toll-like Rezeptoren.

2.2.1.1 Expressionsmuster und Liganden der TLRs

Jedes der elf exprimierten TLR-Gene ist in der Lage ein anders molekulares Muster zu erkennen, das charakteristisch für pathogene Mikroorganismen ist und somit ein PAMP darstellt.

Tabelle 2-1: TLRs und ihre Liganden

TLR-Rezeptor	Ligand (PAMPs)	Lokalisation	Spezies	Quelle
TLR1 / TLR2 TLR2 / TLR6	Di- oder Triacylierte Lipopeptide Proteoglykane Lipoarabinomannan Zymosan Pam ₃ CSK ₄	Zelloberfläche	human / murin	24,25
TLR3	dsDNA polyI:C	Endosom	human / murin	26
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS) (gram-) Lipoteichonsäuren (gram+)	Zelloberfläche	human / murin	27
TLR5	Flagellin	Zelloberfläche	human / murin	28
TLR7	ssRNA dsRNA Imiquimod(R837) Resiquimod (R848)	Endosom	human / murin	29-32
TLR8	ssRNA Resiquimod (R848)	Endosom	human / murin	29,30,32
TLR9	CpG-DNA	Endosom	human / murin	33-35
TLR10	Nicht bekannt	Zelloberfläche	human	36
TLR11	Uropathogene Bakterien Taxoplasma gondii	Zelloberfläche	murin	37,38
TLR11 / TLR12	Taxoplasma gondii profilin Protein	Zelloberfläche	murin	39,40
TLR13	Bakterielle ribosomale RNA	Endosom	murin	41,42

Man erkennt, dass die TLRs der Zelloberfläche allesamt hauptsächlich zur Detektion von bakteriellen und parasitären Bestandteilen von potentiellen Erregern befähigt sind (Tabelle 2-1). So erkennen TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 lipidbasierte Strukturen und TLR5 und TLR11 werden durch Proteinliganden aktiviert^{38,43}. Die endosomal lokalisierten TLRs haben sich auf die Erkennung von Nukleinsäure Fragmenten spezialisiert, die durch Endo- oder Makropinozytose ins Zellinnere aufgenommen werden. Diese Nukleinsäuren können sowohl bakterieller, als auch viraler Herkunft sein^{35,44}. Von den endosomal TLRs ist TLR9 und sein Ligand (CpG-DNA) wohl bisher am intensivsten untersucht worden^{33,34,45}. Allerdings gelangten auch der TLR7 und TLR8-Rezeptor in den letzten Jahren näher in den Fokus. TLRs, einschließlich TLR7 und TLR8, werden nicht ubiquitär exprimiert, sondern kommen auf spezialisierten Immunzellen vor⁴⁶. Darüber hinaus zeigten die TLRs, besonders TLR7 und TLR8, ein spezies-spezifisches Expressionsmuster (Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: Übersicht der Expressionsverteilung der Toll like Rezeptoren im humanen und murinen System.

+++ = hoch exprimiert; ++ = exprimiert, + = gering exprimiert, (+) = induzierbar; - = nicht exprimiert ^{47, 46,48-50}

Zelltyp	TLR7 Expression		TLR8 Expression	
	human	murin	human	murin
pDC	+++	+++	-	-
mDC	-	-	++	++
Monozyt	-	+++	+++	-
B-Zelle	++	+	-	-
Makrophage	+	++	++	++
NK Zelle	-	-	-	-
Mastzelle	+	+	-	-
Int. Epithelzelle	-	++	-	++

Im humanen System ist der TLR7-Rezeptor hauptsächlich auf den plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) und auf B-Zellen exprimiert, wohingegen im murinen System auch andere Immunzelltypen TLR7 exprimieren. Im Gegensatz dazu ist TLR8 vorwiegend auf humanen Monozyten und Makrophagen exprimiert, während die Expression im murinen System zwar vorhanden ist, jedoch hier die Funktion von TLR8 nicht mit der im humanen System vergleichbar ist³⁰. Da die Aktivierung von TLR8 durch seinen Liganden allein im murinen System nicht zu der erwarteten Immunantwort führte, nahm man zunächst an, dass TLR8 im murinen System nicht funktionell sei. Jedoch konnte mittlerweile gezeigt werden, dass eine Kombination eines TLR8 Liganden mit dem TLR7/8 Stimulus poly(dT) die erwartete Immunantwort induzierte^{51,52}. Auch scheinen die Funktionen von TLR7 und TLR8 im murinen System enger zusammen zu hängen und sich teilweise sogar zu komplementieren. So kommt es zum Beispiel bei einer Deletion von TLR8 in der Maus zu einer Überexpression des TLR7 Rezeptors und somit zu einer schnelleren und stärkeren NF-κB Aktivierung nach Stimulation mit dessen Liganden⁵³. Zudem führt eine Deletion von TLR8 in Lupus erkrankten Mäusen zu einer verstärkten TLR7 Antwort und somit zu einer gesteigerten Autoimmunität⁵⁴. Die somit regulierende Rolle des murinen TLR8 Rezeptors scheint eine wichtige Funktion darzustellen, jedoch sind die Erkenntnisse aus dem murinen System nicht auf die Funktion des humanen TLR8 zu übertragen.

2.2.1.2 Signalkaskade und Effektormechanismen der RNA-detektierenden Rezeptoren TLR7 und TLR8

Allen Toll-like-Rezeptoren ist gemein, dass eine Domäne des Rezeptors im Zytosol der Zelle lokalisiert ist. Da sich TLR7 und TLR8 jedoch im Endosom der Zelle befinden, und hier an der endosomalen Membran verankert sind, ragt die zweite Rezeptordomäne bei diesen TLRs nicht wie bei den zellmembranständigen TLRs in den Extrazellularraum, sondern in das endosomale

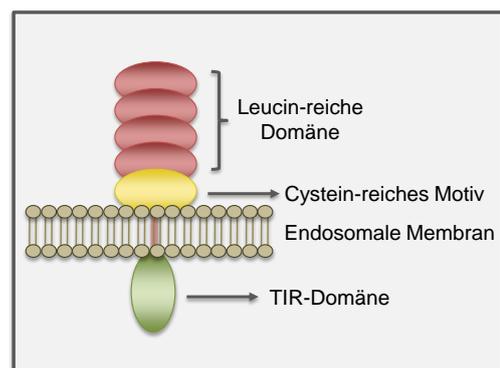


Abbildung 2-2: Aufbau eines TLR-Rezeptors.

Lumen. Die zytosolische Domäne wird aufgrund seiner Ähnlichkeiten zum Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) auch als Toll/IL-1R-Domäne, kurz TIR-Domäne bezeichnet (Abbildung 2-2). Über eine Verbindung, die durch die endosomale Membran ragt, folgt der endosomale Teil des Rezeptors. Dieser weist ein Cystein-reiches Motiv auf, welches an eine Leucin-reiche Sequenz grenzt, über die der Rezeptor den Liganden bindet. Passiert dieses, und kommt es zur Aktivierung der Rezeptoren TLR7 bzw. TLR8, wird zunächst das Adaptermolekül MyD88 an die zytosolische TIR-Domäne rekrutiert³¹. MyD88 besitzt eine „Death“- Domäne am N-Terminus und eine TIR-Domäne, mit der MyD88 an den aktivierten TLR Rezeptor bindet. Der N-Terminus von MyD88 ist dann in der Lage Interaktionen mit Signalmolekülen einzugehen und dadurch verschiedene Signalkaskaden zu

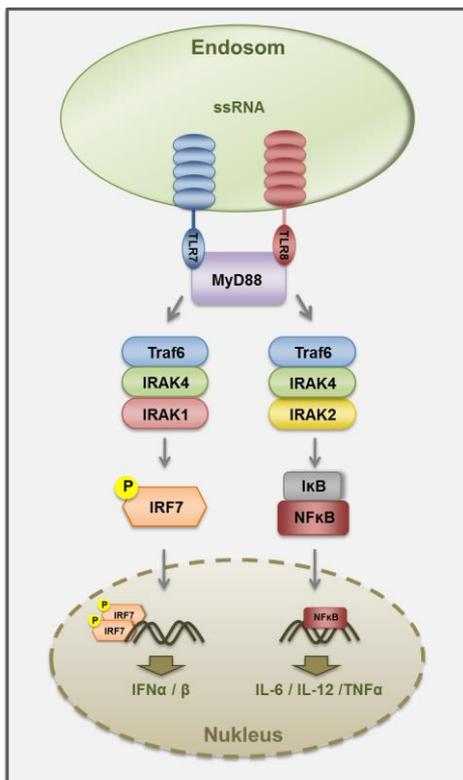


Abbildung 2-3: Signalkaskaden der TLR-Rezeptoren 7 und 8. Erklärung siehe Text.

initiiieren. Im Falle einer Aktivierung von TLR7 beginnt die Signalkaskade mit der Rekrutierung von IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase 4 (IRAK4), die IRAK1 aktiviert und dadurch in der Lage ist den TNFR-(Tumor Nekrose Faktor Rezeptor) -assoziierten Faktor 6 (TRAF6) zu mobilisieren. Dadurch wird eine phosphorylierungsabhängige Dimerisierung des Interferon regulierendem Faktor 7 (IRF7) eingeleitet, der dann in den Nucleus transloziert und dort die Expression von Typ-I Interferonen initiieren kann (Abbildung 2-3).

Im Falle der Aktivierung von TLR8 wird nach der Bindung von MyD88 ebenfalls IRAK 4 rekrutiert. Dann erfolgt hier jedoch die Phosphorylierung von IRAK2, was wiederum die Aktivierung von TRAF6 auslöst⁵⁵. Folglich kommt es zur Phosphorylierung und damit Inhibierung der IκB Kinase (IKK), was zur Freisetzung von NF-κB führt. NF-κB transloziert in den Zellkern und reguliert dort die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12p70, IL-6 und TNFα.

2.2.1.3 Die Liganden der RNA-detektierenden Rezeptoren TLR7 und TLR8

Die endosomale Lokalisation von TLR7 und TLR8 macht es den Rezeptoren zunächst schwer virale RNA im Rahmen einer Infektion zu erkennen, denn das Virus ist nach der Aufnahme in das Endosom noch vollkommen intakt. Die aber dann eintretende Ansäuerung des Endosoms im Zuge der endosomalen Reifung bewirkt, dass die Zellwände des Virus zersetzt werden und so die RNA für die endosomalen TLRs detektierbar wird. Dieser Mechanismus ermöglicht dann im Rahmen von Infektionen oder Autoimmunerkrankungen die Aktivierung von TLR7 bzw. TLR8^{44,56}.

TLR7 und TLR8 können neben dieser natürlichen, viralen RNA auch durch synthetisch hergestellte Verbindungen aktiviert werden. Imidazoquinoline und Guanosinderivate, virale Nukleosid-Analoga, waren die ersten identifizierten Liganden des TLR7- und 8 Rezeptors, wobei erst später Imiquimod

(R-837) als selektiver TLR7 Ligand und 3M-002 als selektiver TLR8 Ligand beschrieben wurden³². Die Erkenntnis, dass Einzelstrang RNA (ssRNA) viraler Herkunft ein natürlicher Aktivator der beiden endosomalen Rezeptoren darstellt, führte zur synthetischen Herstellung von Oligoribonukleotiden, die von TLR7 und TLR8 detektiert werden können. Es stellte sich heraus, dass Sequenzen, die keine Uridin-Basen enthalten auch zu keinerlei Aktivierung der Rezeptoren führen, wohingegen aber RNA-Sequenzen mit einem hohen Guanosin-Uridin-Gehalt (GU) eine starke immunstimulatorische Aktivität besitzen³⁰. Daneben konnte auch gezeigt werden, dass sogar Oligoribonukleotide, die nur aus Uridin-Basen bestehen und eine Länge von 21 Nukleotiden haben, eine selektive Aktivierung des TLR7 bewirken können⁵⁷. 2005 konnte dann im Rahmen einer Forschung mit *small interfering RNA* (siRNA) die Sequenz näher beschrieben werden, die für eine Immunstimulation verantwortlich ist. Demnach ist eine minimale Länge von 19 Basen und eine definierte Basensequenz am 3'-Ende (5'-GUCCUCAA-3') für eine selektive Aktivierung von TLR7 unerlässlich⁵⁸. Auch Sequenzen zur spezifischen Aktivierung von TLR8 konnten identifiziert werden. So wird beschrieben, dass beispielweise Adenosin-Uridin reiche Oligoribonukleotide (*AU-rich ssRNA*) ohne Guanosin-Anteil selektiv an TLR8 binden sollen und zu einer Produktion von IL-6, TNF α und IL-12p70 führen, ohne die Induktion von IFN α über TLR7 zu induzieren⁵². Aber auch RNA-Modifikationen beeinflussen die Erkennung durch die beiden TLRs. So führt eine spezifische Methylierung der 2'-O-Ribose innerhalb einer rRNA dazu, dass ein TLR7/TLR8-Ligand zu einem selektiven TLR8-Liganden konvertiert wird⁵⁹. Aber den wohl größten Schritt hin zum tatsächlichen TLR7 Motiv war die Erkenntnis, dass Einzelstrang-RNA (ssRNA) einer bestimmten Sequenz spontan Sekundärstrukturen ausbildet⁶⁰. Die auf diesem Wege entstehende Guanosin:Uridin Wobble-Basenpaarung führt zu kurzen doppelsträngigen Bereichen, die hoch spezifisch nur von TLR7, aber nicht von TLR8 erkannt werden können (Dissertation V. Wimmenauer). Einen tatsächlich selektiven Agonisten für TLR7 definiert zu haben, bietet viele neue Möglichkeiten als potentielle Immuntherapie, denn durch die alleinige Produktion von Typ-I Interferon in pDCs ohne zeitgleiche Induktion von IL-12p70, könnte beispielweise eine ungewollte Th1-Antwort unterbunden werden.

2.2.2 Die zytosolischen *RIG-like* Rezeptoren (RIG-I, MDA-5, LGP2)

Die Familie der RIG-like Rezeptoren (RLR) setzt sich aus den drei Helikasen RIG-I (*retinoic-acid inducible gene 1*), MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) und LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) zusammen, die allesamt als RLHs (*RIG-I like helicases*) bezeichnet werden und im Gegensatz zu den TLR nicht nur in spezialisierten Immunzellen, sondern ubiquitär exprimiert sind. Neben den Nucleinsäuren detektierenden TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9, erkennen auch die RLHs Nucleinsäure. Diese

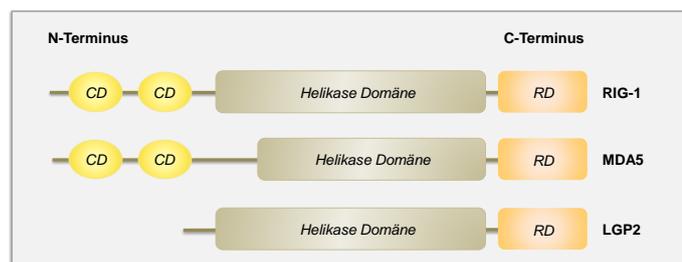


Abbildung 2-4: Aufbau der RIG-I-like Helikasen.

Erkennung findet jedoch aufgrund ihrer Lokalisation nicht im Endosom, sondern im Zytosol der Zelle statt⁶¹. Da auch die Replikation vieler Viren im Zytosol der Zelle vollzogen wird, scheint die Lokalisation der RLHs im Zytosol folgerichtig. Während sich die Rezeptorstruktur von RIG-I und MDA5 sehr ähnlich ist, weicht die von LGP2 deutlich ab. RIG-I und MDA5 besitzen im Gegensatz zu LGP2 zwei N-terminale CARD-Domänen (*caspase-recruiting-domain*), die essentiell für die Initiation der Signalkaskade sind. Die sich anschließende DExH/D-Box Helikase Domäne kommt bei allen drei RLHs vor, jedoch mit unklarer Relevanz für die Signaltransduktion⁶². Am C-Terminus schließen dann alle drei RLHs mit einer regulatorischen Domäne ab (RD), die eine Cystein-reiche Region beinhaltet und die den Rezeptor vor einer Autoaktivierung schützt^{63,64}. Zusätzlich dazu besitzt die RD-Domäne aber auch eine essentielle Tasche für den zu bindenden Liganden. Somit ist sie für die RNA-Spezifität, die Bindung und auch für die ATPase Aktivierung verantwortlich^{63,65,66}. Das Fehlen der essentiellen CARD-Domänen bei LGP2 führt dazu, dass über diesen Rezeptor keine Signaltransduktion durchgeführt werden kann. Jedoch wird vermutet, dass LGP2 die Fähigkeit besitzt mit seiner RD Domäne die RD Domäne von RIG-I zu binden und zu inhibieren, um darüber eine Autoaktivierung zu verhindern⁶⁷.

2.2.2.1 Aktivierung von RIG-I durch virale oder synthetische Liganden

2005 konnte gezeigt werden, dass sowohl RIG-I als auch MDA5 virale RNA detektieren, die jedoch in ihrer Herkunft variieren⁶⁸. So ist RIG-I besonders für die Erkennung von negativ-RNA Einzelstrang Viren verantwortlich und detektiert somit zum Beispiel das Sendai-Virus und das Newcastle Disease Virus (NCV) aus der Gruppe der Paramyxoviren, sowie das Influenza-A Virus oder auch das Vesicular-Stomatitis Virus^{19,69,70}. MDA5 erkennt hingegen Infektionen mit Picornaviren¹⁹. Während für den MDA5 Rezeptor das genaue RNA-Motiv, welches erkannt wird, noch nicht definiert ist, konnte in den letzten Jahren die essentielle Struktur zur Aktivierung von RIG-I identifiziert werden. RIG-I detektiert pathogene Doppelstrang RNA, die am 5'-Ende ein blunt-end sowie ein Triphosphat aufweist. Dieses Triphosphatmotiv, auch kurz als „3p“ oder „ppp“ bezeichnet, konnte so als essentielles Strukturelement für die RIG-I Aktivierung identifiziert werden^{71,72}.

Endogene RNA besitzt dieses Motiv grundsätzlich auch, jedoch wird diese nicht über RIG-I erkannt, da hier die 5'-3p-Gruppe während der Maturation verloren geht, bzw. mit einem 5'-Methyguanosin-Cap versehen wird, was die Erkennung durch RIG-I verhindert⁷³. Ein Ligand für den RIG-I Rezeptor kann über *in vitro* Transkription durch ein virales System hergestellt werden⁷². Gelangt der so hergestellte Ligand, oder auch die virale RNA in das Zytosol der Zelle, wird sie an die RD-Domäne des RIG-I Rezeptors gebunden und es kommt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Dadurch wird die Bindung der CARD-Domänen an das mitochondrial assoziierte Adapterprotein MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*; auch bekannt unter IPS-1, VISA oder Cardif) initiiert. Zusammen mit TRAF3, TRADD (*tumor necrosis factor receptor type-1 associated death domain protein*) und NAP1 vermittelt MAVS dann die Aktivierung von TBK1 und IKKi. Diese phosphorylieren und aktivieren wiederum IRF3 und IRF7, die daraufhin in den Nukleus translozieren und dort zur Expression von Typ-I Interferonen führen.

Daneben kann MAVS auch zu einer Aktivierung des TRADD-FADD-Caspase 8/10 vermittelten Signalweges führen, was in einer Translokation von NF- κ B in den Nukleus führt. Dieser Signalweg endet dann in Transkription von Genen, die für proinflammatorischen Zytokine kodieren.

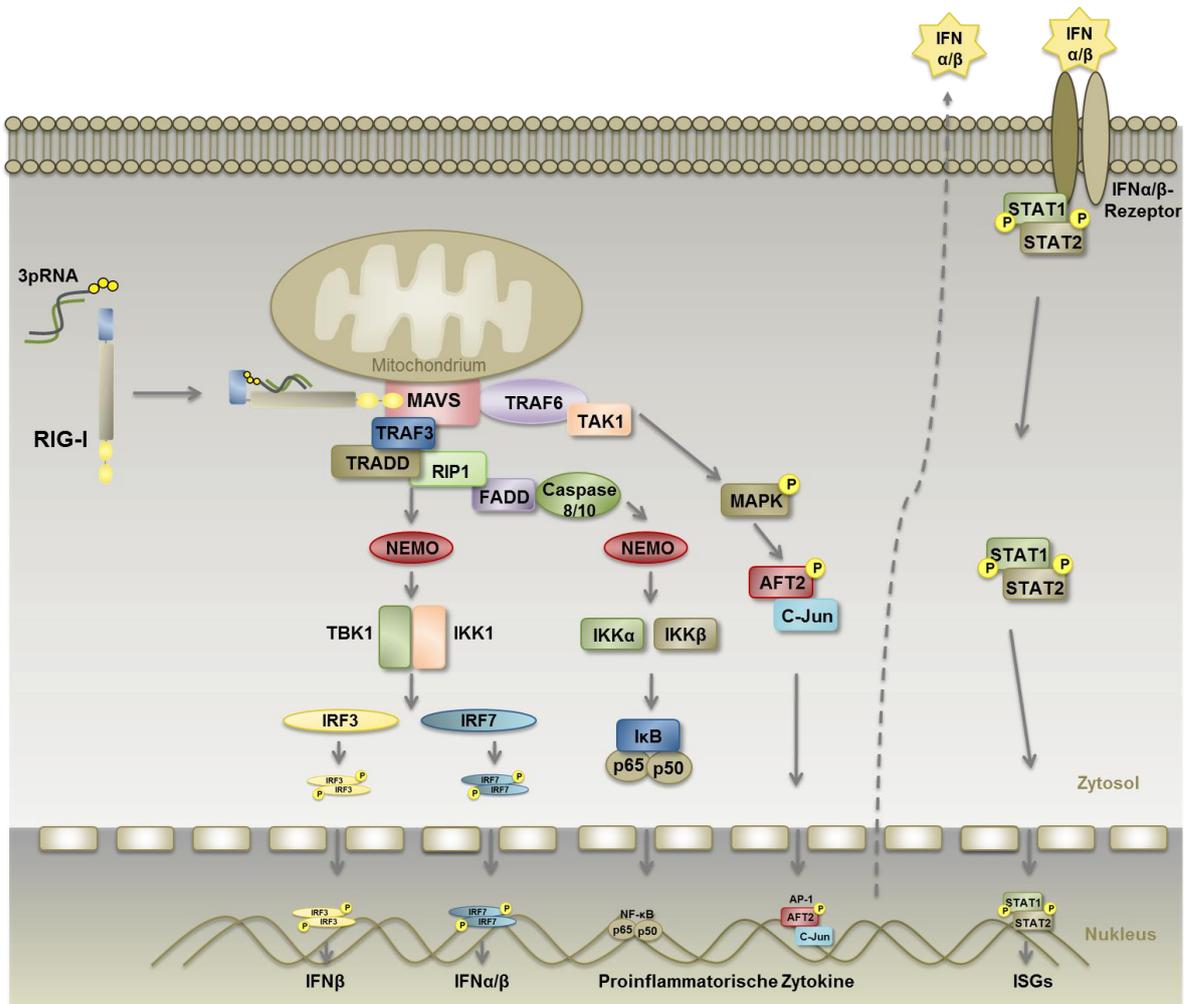


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des RIG-I Signalweges.

Die Aktivierung von RIG-I über 3pRNA führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zu einer Interaktion zwischen der CARD-Domäne und dem mitochondrialen Adaptermolekül MAVS. Die dann darauffolgenden Signalwege verlaufen entweder über TBK1/IKKi, IKK α / β oder über die MAPKs. So kann die Translokation von IRF3, IRF7, NF κ -B oder auch AP-1 in den Nukleus eingeleitet werden, was zur Transkription von IFN α / β oder proinflammatorischer Gene führt.

2.3 Antivirale und antitumorale Effekte durch TLR7, TLR8 und RIG-I-Liganden

2.3.1 TLR7, TLR8 und RIG-I-Liganden induzieren antivirale Zytokine

Durch die Aktivierung von TLR7 oder RIG-I wird insbesondere die Expression von Typ-I-Interferonen (IFN α / β) induziert^{29,72}. Dagegen führt eine Aktivierung des TLR8 Rezeptors zur Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12p70 oder TNF α ²⁹.

IFN α und IFN β binden an den IFN α/β -Rezeptor (IFNAR), wodurch die Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) induziert wird (Abbildung 2-5). Das ausgeschüttete Typ I IFN wirkt nicht nur auf die infizierte bzw. stimulierte Zelle, sondern sorgt auch dafür, dass in benachbarten Zellen ISGs exprimiert werden. Durch diese autokrine und parakrine IFN-Aktivität, wird ein antiviraler Status verbreitet⁷⁴. Dieser antivirale Status äußert sich in vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen. So wird nicht nur die Virusreplikation in der „Virus-infizierten“-Zelle unterdrückt⁷⁵, sondern es kommt auch zur Aufregulation der Protein Kinase R (PKR), welche über die Hemmung der Proteinsynthese die Expression viraler Gene verhindert⁷⁶. Daneben führt eine Wirkungsverstärkung von p53 und auch die Aktivierung von Natürlichen-Killerzellen (NK-Zellen) zusätzlich zur Apoptoseinduktion der infizierten Zelle⁷⁷. Auch auf die Expression von MHC-Klasse I Molekülen hat IFN α einen starken Einfluss. Das Vorhandensein dieser Moleküle auf der Oberfläche von virusinfizierten Zellen trägt dazu bei, dass virale Proteine effektiv T-Zellen präsentiert werden können^{78,79}. Dazu führt das neben IFN α ausgeschüttete Chemokin CXCL-10 (*Interferon gamma-induced protein 10*; IP-10) zur Attraktion von T-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen.

Die Stimulation des TLR8 Rezeptors in myeloiden Zellen führt zur Expression von IL-12p70 und TNF α ⁸⁰. IL-12 gehört zur Klasse der proinflammatorischen Zytokine. Diese Zytokine sind in der Lage die adaptive Immunantwort zu aktivieren bzw. zu modulieren⁵². Die bioaktive Form des IL-12 ist das IL-12p70, welches als Heterodimer aus zwei kovalenten Untereinheiten besteht: p40 und p35. Die Produktion von IL-12p70 findet fast ausschließlich in den myeloiden Zellen, wie Monozyten oder Makrophagen statt, die durch die Ausschüttung die Entwicklung einer Th1-Antwort unterstützen. Außerdem kommt es in T-Zellen und in NK-Zellen zu einer Produktion von IFN γ , wohingegen eine IL-4 Produktion verhindert wird^{81,82}. Auch B-Zellen werden durch eine Stimulation mit IL-12p70 zur Proliferation und Differenzierung angeregt⁸³.

Auch TNF α wird nach einer Stimulation mit TLR8 Liganden von Monozyten oder aktivierten Makrophagen ausgeschüttet. TNF α begünstigt die Entwicklung der CD4-T-Zellen und damit eine Th1-Antwort. Daneben werden neutrophile Granulozyten zur Produktion von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid angeregt, was eine lokale Inflammation entstehen lässt. Auch aktivieren sie Endothelzellen und fördern hier die Expression von Oberflächen-Adhäsionsmoleküle, wodurch eine Interaktion mit Leukozyten eintreten kann, die die Entzündungsreaktion kontrolliert^{84,85}.

2.3.2 RIG-I induzierte Apoptose von Tumorzellen

Nach Aktivierung durch 3pRNA bindet RIG-I über die CARD-Domäne an MAVS, welches dann in Anwesenheit von TRAF2,3,6 und TBK-1 IRF3 phosphoryliert. Über eine BH3-like Domäne kann IRF3 dann an BAX binden und es aktivieren. Daraufhin transloziert BAX zum Mitochondrium und leitet durch die Freisetzung von Cytochrom c den intrinsischen Apoptosesignalweg ein. Cytochrom c bindet an Apaf-1 und veranlasst die Bildung eines Apoptosoms. Dieser Proteinkomplex bewirkt folglich die Aktivierung der Caspase-9, welche wiederum weitere Effektorcaspasen aktiviert, die letztendlich zur Initiation der Apoptose führen (Abbildung 2-6)^{86,87}.

Diese 3pRNA-induzierte und p53-unabhängige Apoptose kann in malignen aber auch nicht-

malignen Zellen ausgelöst werden.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass maligne Zellen deutlich sensibler reagieren als nicht-maligne Zellen. Im Melanom ist die Ursache hierfür, dass im Gegensatz zu nicht-malignen Zellen in malignen Zellen die erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-xl die Apoptose verhindert⁸⁸.

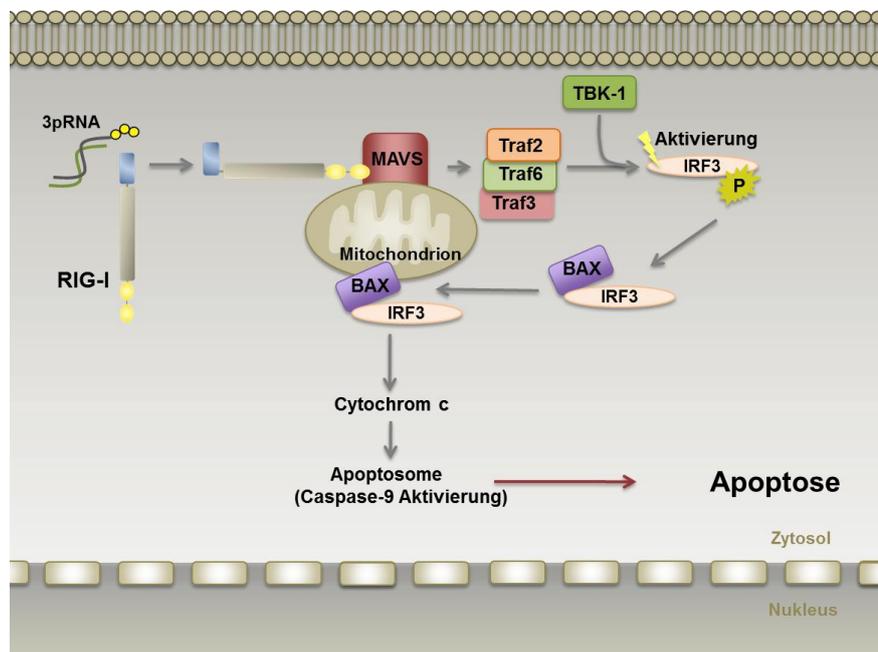


Abbildung 2-6: Signalweg der Apoptoseinduktion durch die Stimulation von RIG-I. Erklärung siehe Test.

2.4 Oligonukleotide als potentielle Arzneistoffe

Therapeutische Oligonukleotide besitzen ein vielfältiges Wirkspektrum. Zum einen führen sie über unterschiedliche Mechanismen zur Inhibition von RNA / DNA Molekülen und darüber zur gezielten Inhibition der Proteinexpression. Zu ihnen zählen die Gapmere, die Antagomire, die *small interfering RNAs* (siRNA), die *Anti-mirco-RNA* (Anti-miRNAs) und die *mirco-RNA mimics* (miRNA mimics). Daneben können immunstimulatorische RNAs/DNAs (isRNA/isDNA) an Immunrezeptoren binden und eine gezielte Immunantwort auslösen. Darüber hinaus sind Aptamere relevant, die vorwiegend eine Protein-Interaktion eingehen und so Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen.

Obwohl in den letzten 30 Jahre etliche dieser Ansätze auch den Eintritt in die klinische Entwicklung geschafft haben, ist die Anzahl an klinischen Studien und besonders die Zahl der zugelassenen Medikamente in diesem Bereich eher gering. Etwa 120 Ansätze befinden sich derzeit in der klinischen Entwicklung und nur fünf von ihnen haben es bisher zu einer Zulassung geschafft. Tabelle 2-3 zeigt eine Übersicht von Oligonukleotid-basierten Therapieansätzen, die sich derzeit in der späteren klinischen Entwicklungsphase befinden, oder schon zugelassen wurden.

Gründe für diese recht langsame klinische Entwicklung sind verschiedene Eigenschaften der Nukleinsäure-basierten Ansätze. Generell ist RNA als Arzneistoff, im Gegensatz z.B. zu kleinen Molekülen („*small molecules*“), mit einigen Schwierigkeiten verbunden. RNA besitzt einen hohen

Überschuss an negativer Ladung, was zu einer hohen Polarität des Moleküls führt und dadurch eine schlechtere Bioverfügbarkeit zur Folge hat.

Tabelle 2-3: Übersicht von zugelassenen und Spät-Phase Oligonukleotid-basierten Therapieansätzen

Oligonukleotid-Klasse	Wirkstoff (Handelsname)	Beschreibung	Status der Entwicklung
Antisense-ON (ssDNA / ssRNA)	Fomivirsen (<i>Vitravene</i> [®])	Bindung an MIE-mRNA und Hemmung der Translation	Zulassung 1998
	Mipomersen (<i>Kynamro</i> [®])	Bindung an Apolipoprotein B-100 und Hemmung der Synthese	Zulassung 2013
	Eteplirsen (<i>Exondys 51</i> TM)	Fördert die Entfernung von Exon 51 während des pre-mRNA Spleißens	Zulassung 2016
	Nusinersen (<i>Spinraza</i> [®])	Modulierung des Spleißens des SMN2-Gens	Zulassung 2016
	Alicaforsen	Bindung der ICAM-1 mRNA und Hemmung der Protein Synthese	Phase III
	Aganirsen	Bindung der IRS-1 mRNA und Hemmung der Protein Synthese	Phase III
	Mongersen	Bindung der Smad7 mRNA und Hemmung der Proteinsynthese	Phase III
Aptamer (ssDNA / ssRNA)	Pegaptanib (<i>Macugen</i> [®])	Bindung und Inaktivierung der Isoform des VEGF ₁₆₅ Proteins	Zulassung 2004
	Pegpleranib	Bindung und Inaktivierung des PDGF Proteins	Phase III
Anti-micro-RNA (AntimiRs / ssRNA)	Miravirsen	Bindung und Neutralisierung von miRNA-122	Phase II
siRNA (dsRNA)	Patisiran	Transthyretin mRNA-spezifische siRNA	Phase III
	QPI-1002	Temporäre Inhibierung der Expression des p53-Gens	Phase III
	QPI-1007	Caspase 2 mRNA spezifische siRNA	Phase II/III

Relevanter ist aber wohl die enorme chemische Instabilität, die bei RNA noch um ein Vielfaches höher ist als bei DNA. Dies liegt in der 2'-OH-Gruppe der Ribose begründet, die zu einer Destabilisierung der 3'-5'-Diesterbindung führt. Um die Stabilität und damit auch die Bioverfügbarkeit zu erhöhen, wurde versucht RNA durch diverse chemische Modifikationen zu stabilisieren. So wurden beispielweise einige Phosphatdiesterbindungen durch deutlich stabilere Phosphothioat-Gruppen ausgetauscht. Auch die Modifikation der 2'-OH-Gruppe in eine 2'-O-Methyl- oder 2'-O-Methoxyethylgruppe, das Einfügen eines Morpholino- oder eines Peptidrückgrades (PNA) oder die „Blockierung“ der RNA (LNA = locked Nucleic acid) sind weitere Beispiele für eine chemische Stabilisierung und Verbesserung der Bioverfügbarkeit⁸⁹⁻⁹¹.

Aber die wahrscheinlich größte Herausforderung all dieser RNA- und auch vieler DNA-Therapieansätze ist wohl das Erreichen des biologischen Ziels. Auch wenn dieses Ziel je nach therapeutischem Ansatz das Endosom, das Zytosol oder auch der Nukleus sein kann, ist allen aber gemein, dass sie in das Innere der Zelle gelangen müssen. Dem entgegen steht die negative

Ladung der RNA, die es ihr unmöglich macht an die ebenfalls anionischen Proteoglykane der Plasmamembran zu binden und in die Zelle aufgenommen zu werden. Aus diesem Grunde spielen Transfersysteme, welche die RNA in das Innere der Zelle bringen sollen, eine wichtige Rolle, um der therapeutischen Anwendung von Nukleinsäuren näher zu kommen.

2.5 Zelluläre Aufnahmemechanismen

Eine Zelle besitzt durch ihre Plasmamembran die Fähigkeit den Eintritt von Molekülen und Substanzen in ihr Inneres weitestgehend zu kontrollieren und so ein spezifisches Zellmilieu aufzubauen und aufrecht zu erhalten. Nur sehr kleine, ungeladene Moleküle können die aus Phospholipiden bestehende Membran durch passive Diffusion überwinden. Für alle anderen Stoffe ist ein spezieller Transportmechanismus erforderlich.

Zu diesen transmembranen Transportmechanismen zählen die Carrier-vermittelte Diffusion und der energieabhängige, aktive Transport durch Membranpumpen. Daneben existieren auch membranverlagernde Transportmechanismen, wie Endo-, Exo- und Transzytose.

2.5.1 Endozytose

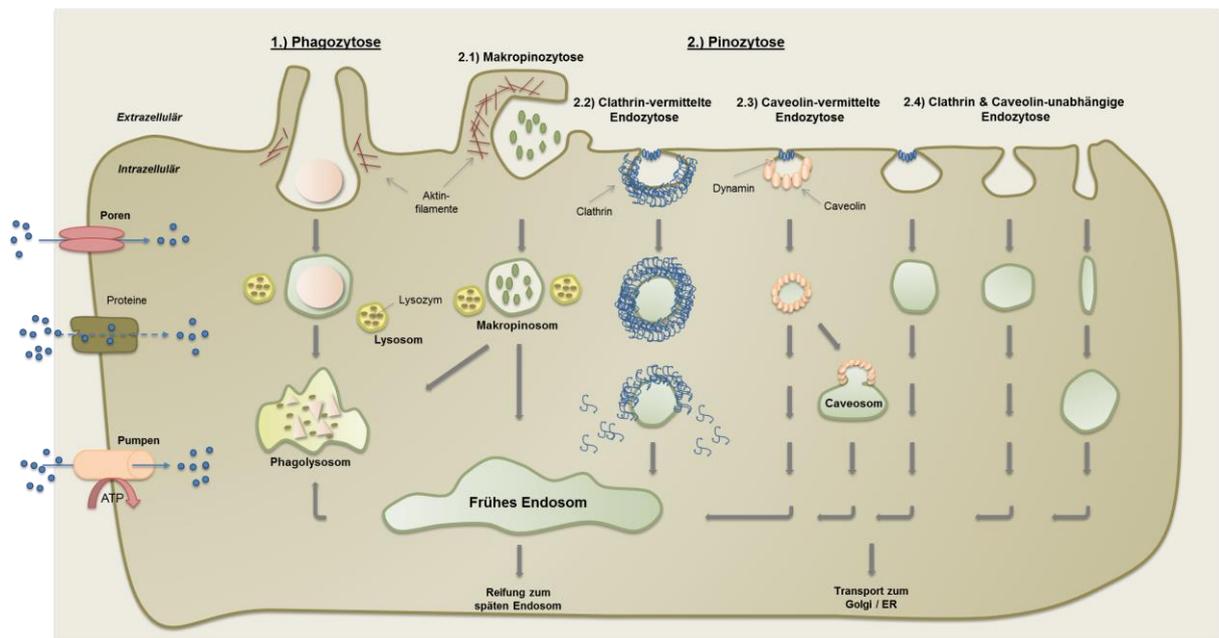


Abbildung 2-7: Übersicht der verschiedenen Formen der Endozytose (Abbildung wurde modifiziert nach Mayor und Pagano¹)

Unter Endozytose versteht man die kontrollierte und selektive Internalisierung von extrazellulären Substanzen (Moleküle, Makromoleküle, Zellbestandteile u.a.) in die Zelle (Abbildung 2-7). Dadurch spielt sie eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Zellen und Geweben, aber auch bei der Signaltransduktion und Kommunikation zwischen Zellen sowie bei der Immunantwort. Auch wenn die Zellmembran prinzipiell eine wirksame Barriere für Mikroorganismen darstellt, kann der Weg in die Zelle über Endozytose auch von Viren und pathogenen Mikroorganismen genutzt werden.

Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Formen der Endozytose: Phagozytose und Pinozytose.

2.5.1.1 Phagozytose

Der Begriff der Phagozytose, auch „*cell eating*“ genannt, beschreibt die Aufnahme von festen Substanzen mit einer Größe über 0,5 µm. Während dieser Mechanismus bei Protozoen primär der Nahrungsaufnahme dient, stellt die Phagozytose bei eukaryotischen Zellen die erste Verteidigungslinie der zellulären Immunabwehr gegen Mikroorganismen dar und ist für eine gezielte Entsorgung toter Zellen oder extrazellulärer Ablagerungen unerlässlich. Die zur Phagozytose befähigten Zellen werden in zwei Phagozyten-Hauptfamilien unterteilt: die Makrophagen (Monozyten) und die neutrophilen Zellen. Eine Phagozytose durch diese Zellen wird erst dann eingeleitet, wenn sich Fremdmaterial an den Phagozyten angelagert hat. Dies kann zum einen durch unspezifische Bindungskräfte erfolgen, oder aber auch unter Beteiligung von spezifischen Rezeptormolekülen, die sich auf der Plasmamembran von Phagozyten befinden (Opsonine). Zu diesen spezifischen Rezeptoren gehören die CD14 Rezeptoren zur Erkennung von LPS, die Fc-Rezeptoren zur Erkennung von Immunglobulin G, sowie die Rezeptoren für die dritte Komplementkomponente C3b. Des Weiteren zählen auch Fibronectin-Rezeptoren, Rezeptoren für das C-reaktive Protein, Scavenger-Rezeptoren sowie Glucan- und Mannoserezeptoren zu den Zelloberflächenrezeptoren der Phagozyten, mit denen fremdartige Partikel erkannt und gebunden werden können. Die dadurch in Gang gesetzte Signalkaskade führt zu einer lokalen Aktin-Polymerisation was wiederum zur Ausbildung von Zellmembran-Extensionen führt, welche die Fremdpartikel umschließen (*Engulfment*)⁹². Die anschließende Internalisierung des Partikels lässt eine endozytotische Vakuole, das Phagosom, entstehen, welches sich von der Zellmembran löst und ins Zellinnere bewegt. Hier trifft das Phagosom auf so genannte Lysosomen (in neutrophilen Granulozyten Granula genannt) und verschmilzt mit diesen zu einem Phagolysosom. Durch diese Fusionierung wird der Inhalt der Lysosomen (Lysozyme) in das Phagolysosom freigesetzt. Eine darin enthaltene Mischung aus Proteinen, Enzymen und Peptiden führt dann zu einem effektiven Angriff und einer Zersetzung des Mikroorganismus. Entstandene Spaltprodukte können nun mittels MHC-Klasse-I-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert und hier den Immunzellen (Lymphozyten) präsentiert werden, die daraufhin eine spezifische Immunabwehr in Gang setzen können.

2.5.1.2 Pinozytose

Die Pinozytose, die in nahezu allen Zellen kontinuierlich stattfindet, beschreibt die Aufnahme von extrazellulärer Flüssigkeit und wird daher auch als „*cell drinking*“ bezeichnet. Hierbei internalisiert die Zelle ein Vielfaches ihres eigenen Volumens an extrazellulärer Flüssigkeit und der darin gelösten Stoffe und Membrankomponenten.

Die Pinozytose lässt sich in vier verschiedene Formen unterteilen:

- Makropinozytose
- Clathrin - abhängige Endozytose (CME)
- Caveolin - abhängige Endozytose
- Clathrin-/Caveolin - unabhängige Endozytose

Bei der Makropinozytose kommt es zu aktinhaltigen Membranextensionen, die mit der

Plasmamembran fusionieren und dabei extrazelluläre Flüssigkeit und die darin enthaltenen Nährstoffe und Makromolekülen einschließen. Durch diesen Prozess werden wie auch bei der Phagozytose intrazellulär Vesikel gebildet, die sich Makropinosomen nennen, und die mit einer Größe von 1-5 µm auch der Größe von Phagosomen entsprechen. In den meisten Zelltypen verschmelzen die Makropinosomen wie auch die Phagosomen mit den Lysosomen und die hier enthaltenen Lysozyme fördern den Verdau der Fremdpartikel.

Die Clathrin-abhängige Endozytose stellt eine selektive Aufnahme von extrazellulärem Material dar. 1964 identifizierten Roth und Porter die dafür verantwortlichen Abschnitte auf der Plasmamembran und bezeichneten sie als „*Clathrin-coated pits*“⁹³. Diese Bereiche stülpen sich leicht (bis zu 150nm) in die Zelle hinein und sind an ihrer intrazellulären Seite dicht mit dem wasserlöslichen Protein Clathrin ausgestattet⁹⁴. Nach dieser Deformation kommt es unter Einwirkung von Dynamin, einer GTPase, zur Abschnürung dieses Plasmamembranbereiches und zur Formierung von Clathrin-beschichteten Vesikeln, den *Clathrin-coated vesicles*^{95,96}. Diese werden weiter ins Zytoplasma transportiert, wobei sie ihre Hülle aus Clathrin und Adaptermolekülen verlieren (*Uncoating*) und nun mit dem Endosom als Zielorganelle verschmelzen. Die Clathrin-abhängige Endozytose beschreibt wohl die wichtigste Art der Endozytose, da durch diesen Mechanismus die kontinuierliche Aufnahme von essentiellen Substanzen gewährleistet werden kann. So wird u.a. auch das lebenswichtige Eisentransportprotein Transferrin an Transferrin-Rezeptoren gebunden und internalisiert, sowie Insulin und LDL über diesen Weg aufgenommen. Zudem wird über die Clathrin-abhängige Endozytose die Signaltransduktion reguliert, in dem die Expression von Oberflächenrezeptoren kontrolliert wird, aber auch die zelluläre Homöostase aufrecht erhalten^{97,98}. Viele Viren nutzen die Clathrin-abhängige Endozytose um in ihre Wirtszelle zu gelangen und sich dort zu vermehren.

Über das Cholesterin bindende Protein Caveolin wird die so genannte Caveolin-abhängige Endozytose vermittelt. Im Gegensatz zum Clathrin, welches sich dynamisch an die Zellmembran anlagern kann, ist das Caveolin durch seine Bindung an Cholesterin stabil mit der Plasmamembran assoziiert. Aber auch diese Caveolin-reiche Invagination der Membran bildet eine Transportplattform, die sich flaschenförmig einstülpt und schließlich zur Abschnürung des betroffenen Plasmabereichs führt. Dieser Prozess ist gänzlich Clathrin unabhängig, jedoch Dynamin-abhängig. Die so entstandenen nur 50-60nm großen Vesikel, auch Caveosomen oder Caveolae genannt, sind hauptsächlich in Adipozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten zu finden, in denen sie für die Aufnahme von wichtigen Frachtproteinen wie β -Integrine und Albumin verantwortlich sind^{99,100}. Zudem sind sie essentiell an der Aufrechterhaltung der intrazellulären Cholesterin-Homöostase und der Signaltransduktion beteiligt¹⁰¹.

Neben der Caveolin-abhängigen Endozytose existieren aber auch noch weitere Endozytoseformen, die auch Clathrin- und Caveolin-unabhängig verlaufen¹⁰². Diese Form der Endozytose ist bisher wenig charakterisiert, scheint aber überwiegend in neuroendokrinen Zellen und in Neuronen zu existieren, wo sie an der Wiederaufnahme von Proteinen in die Plasmamembran befähigt sind. Auch der Interleukin 2-Rezeptor und der Diphtherie-Toxin-Rezeptor werden über diesen Aufnahmemechanismus internalisiert^{103,104}

2.6 Transfersysteme für Nucleinsäuren

Die Eigenschaften eines idealen Vektorsystems für den Transfer von Nucleinsäuren können wie folgt beschrieben werden:

- Effiziente Bindung / Verkapselung der RNA / DNA
- Effizienter Transport der RNA / DNA in die Zielzelle
- Freisetzung der RNA / DNA am gewünschten Wirkort (Endosom, Zyotosol, Nucleus)
- Schutz der RNA / DNA vor Degradation
- Keine / geringe Zytotoxizität
- Keine / geringe Immunogenität
- Biodegradierbarkeit

Bisher werden dazu Transfersysteme verwendet, die in zwei Vektorklassen unterteilt werden können: die viralen und die nicht-viralen Transfersysteme.

2.6.1 Angewandte Transfersysteme

2.6.1.1 Virale Transfervektoren

Die Eigenschaft von Viren, ihre Gene in eine Wirtszelle einbringen zu können, war der Auslöser für den Einsatz von Viren als Transfervektoren. Die eingesetzten Viren werden durch rekombinante Techniken so verändert, dass sie ihre Pathogenität und auch ihre Replikationsfähigkeit verlieren. Alle Fähigkeiten, die das Virus benötigt, um an die Wirtszelle zu binden und Genmaterial, also Nucleinsäuren, in diese einzuschleusen, bleiben erhalten. Ein Teil des viralen Genoms wird aber durch therapeutische Nucleinsäure ersetzt. Diese äußerst effektive virale Methode zum Einbringen genetischer Information in die Zelle wird auch als Transduktion bezeichnet. So konnte 2001 eine Gruppe um Seisenberger beispielweise zeigen, dass ein Viruspartikel ausreicht, um eine Zelle zu infizieren¹⁰⁵.

Als virale Vektoren werden bevorzugt retrovirale Vektoren, lentivirale Vektoren, adenovirale oder auch adenoassoziierte Vektoren eingesetzt.

Retroviren

Bei den Retroviren handelt es sich um RNA-Viren mit einem Genom von ungefähr 10kB Größe und der Besonderheit, dass ihr Kapsid von einer Membranhülle umgeben ist. Für den Gentransfer können bis zu 8kB mit therapeutischer Fremd-DNA ersetzt werden. Wenn ein solches Retrovirus eine Zelle infiziert hat, wird die einzelsträngige RNA durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. So kann diese dann in das Chromosom des Wirtes eingebaut und auch während Zellteilungsprozessen auf die Tochterzellen weitergegeben werden. Auch wenn diese Eigenschaft besonders im therapeutischen Einsatzgebiet von chronischen Erkrankungen einen enormen Vorteil darstellt, liegt hier auch die große Gefahr begründet, durch den zufälligen Einbau in das Genom gefährliche Mutationen hervorzurufen. Eine solche Mutation führte bei der Behandlung von Kindern mit einer seltenen Form des X-chromosomalen schweren Immundefektes (X-SCID) im Jahre 2002 zur Entstehung von Leukämie¹⁰⁶. Ein weiterer Nachteil der

Retroviren ist die Fähigkeit nur sich teilende Zellen infizieren zu können, was den Einsatz *in vivo* schwierig macht¹⁰⁷. Hier kommt dann eine Untergruppe der Retroviren ins Spiel: Die Lentiviren. Diese Viren, zu denen auch das HI-Virus gehört (HIV), können auch sich nicht-teilende Zellen infizieren¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Auch wenn mehrere Studien schon den Versuch unternommen haben Retroviren als Transfersysteme zu verwenden, stoßen diese aufgrund von Nebenwirkungen oder der begrenzten Kapazität von ca. 8kB auf Grenzen in der Anwendung¹¹¹.

Adenoviren

Adenoviren sind lineare, doppelsträngige DNA-Viren ohne Membranhülle die für grippale Infekte und gutartige Atemwegserkrankungen verantwortlich sind. Ihr Vorteil gegenüber den Retroviren ist, dass sie in der Lage sind sowohl ruhende Zellen als auch proliferierende Zellen zu infizieren, was eine hohe Transfereffizienz in den verschiedensten Geweben möglich macht¹¹². Zudem replizieren sich Adenoviren episomal und werden somit nicht in das Wirtsgenom integriert. Diese Eigenschaft verhindert das Entstehen einer insertionellen Onkogenese, macht aber auf der anderen Seite auch nur eine transiente Expression möglich. Das Adenovirus-Genom ist mit 35kB deutlich größer als das von Retroviren und enthält acht transkriptionelle Gene, die in frühe (E = *early*), mittlere (I = *intermediate*) und späte (L = *late*) Einheiten eingeteilt werden können. Mittlerweile existieren drei Generationen von Adenoviren. Bei den Vektoren der ersten Generation sind die frühen Einheiten E1 (onkogen) und E3 deletiert wodurch die Aufnahmekapazität von Fremd-DNA bei 8kB liegt. Da die Virusvermehrung abhängig von der E1 Expression ist, sind solche Adenoviren nicht mehr vermehrungsfähig. Ein großes Problem dieses Vektorentyps ist aber, dass während der Produktion des Vektors in 293A Zellen durch homologe Rekombination wieder vermehrungsfähige E1-positive Adenoviren entstehen können. Bei Vektoren der zweiten Generation werden auch essentielle frühe Genregionen entfernt (E1, E2, E4 und teilweise auch E3), wodurch eine verlängerte Genexpression, eine geringere Toxizität und auch eine geringere Immunogenität erreicht werden konnte. Die dritte Generation von adenoviralen Vektoren, auch pseudo-adenovirale Vektoren oder *Gutless*-Vektoren genannt, enthalten gar keine viralen, kodierenden DNA-Sequenzen mehr, sondern nur noch den viralen Replikationsursprung und das Verpackungssignal¹¹³. Diese neuen Vektoren werden mit einem E1-defekten Helfervirus auch in 293A Zellen produziert, welches in der Lage ist, die E1-Funktion dann zu transkomplementieren. Dadurch ist es möglich diese Viren in größeren Mengen zu produzieren. Das Fehlen jeglicher viralen Gene und eine nahezu unbeschränkte Fremdenkapazität machen diese dritte Generation von adenoviralen Vektoren hoch interessant. Jedoch stehen diesen Vorteilen auch viele Nachteile gegenüber: Zum einen ist die Expression des Transgens nur transient, da die therapeutische DNA nicht chromosomal integriert wird. Zudem kodieren viele der eingesetzten adenoviralen Vektoren auch für virale Proteine, die dann auch von der transduzierten Zellen gebildet werden können, wodurch es dann wiederum zu einer CD4- und CD8-abhängige Immunantwort kommen kann. Da Adenoviren weit verbreitete humane Pathogene darstellen liegt ein weiterer großer Nachteil in der natürlichen humanen Immunogenität gegen eine Vielzahl adenoviraler Subtypen, was eine *in vivo* Anwendung am Patienten erschwert und eine wiederholte Applikation quasi unmöglich macht.

2.6.1.2 Nicht-virale Transfervektoren

Unter dem Begriff der Transfektion versteht man im Allgemeinen das Einbringen von genetischer Information in Eukaryonten. Anders als bei der Transduktion basiert die Transfektion auf einer nicht-viralen Methode. Das Ziel der Transfektion ist die kurzzeitige Überwindung der Zellmembranbarriere, um den Weg für meist hydrophile Substanzen in das Innere der Zelle zu ermöglichen.

Die Transfektion kann anhand verschiedenster physikalischer (invasive Techniken) oder auch biochemischer Methoden (nicht-invasive Techniken) erzielt werden¹¹⁴. In dieser Arbeit liegt der Fokus speziell auf der Transfektion von RNA und DNA.

2.6.1.2.1 Biochemische Transfektion

Bei der biochemischen Transfektion wird die DNA oder RNA zunächst mit Hilfe eines Transfektionsreagenz komplexiert. Diese Komplexbildung bewirkt über verschiedenste Methoden die Abschirmung der negativen Eigenladung der Nukleinsäuren, wodurch die zelluläre Aufnahme über Endozytose erfolgen kann.

Calciumphosphat (CaPO₄)

CaPO₄ ist eines der ältesten Mittel, welches zur chemischen Transfektion eingesetzt wird. 1973 beschrieben Graham und van der Eb die Prozedur, bei der sich aus einer DNA/ Calciumchlorid Mischung nach tropfenweiser Zugabe von Phosphatpuffer bei pH 7,05 ein feines Präzipitat bildet¹¹⁵. Hier basiert die Transfektion auf dem Prinzip der Endozytose und kann durch eine anschließende Behandlung der Zellen mit Glycerol oder auch DMSO noch gesteigert werden. Calcium-Ionen (Ca²⁺) steigern zusätzlich die Aufnahme in die Zellen, wobei der zugrundeliegende Mechanismus aber noch unbekannt ist.

Die Transfektionseffizienz ist jedoch mit 20% recht gering, die Komplexbildung stark pH und Phosphat abhängig und auch die deutliche Toxizität von CaPO₄ auf Zellen ist von großem Nachteil.

DEAE-Dextran

1968 publizierte McCutchan die Transfektion mittels Diethylammonioethyl-dextran (DEAE-Dextran)¹¹⁶. Aufgrund seiner positiven Eigenladung kann DEAE-Dextran sowohl das Phosphat des DNA-Rückgrats binden, als auch die anionischen Proteoglykane der Zellmembran. Auch hier kann so die Einschleusung des Komplexes über Endozytose stattfinden und die zelluläre Ausschleusung aus dem Endosom durch die Zugabe von DMSO oder Glycerol beschleunigt werden. Diese Methode kann jedoch nur für geringe Mengen zu transfizierender Nukleinsäure angewendet werden und selbst hier beträgt die Transfektionseffizienz lediglich ca. 20%.

Lipid-basierte Transfektion (Lipofektion)

Als „Lipofektion“ beschrieb P.L. Felgner 1987 eine liposomale Transfektionsmethode, bei der exogene genetische Information mit Hilfe von kationischen Lipiden in eukaryotische Zellen transportiert wird¹¹⁷. Nach seiner Definition ist allen kationischen Lipiden gemein, dass sie einen unpolaren lipophilen Schwanz besitzen, der aus zwei aliphatischen Ketten mit jeweils 12-18

Kohlenstoffatomen (gesättigt oder auch ungesättigt) besteht. Über einem Lipidanker, auch *Spacer* genannt (z.B. Propylrest), ist dieser lipophile Teil mit einer polaren, positiv geladenen Kopfgruppe verbunden (schematisch dargestellt Abbildung 2-8). Somit stellt ein kationisches Lipid aufgrund seiner hydro- und lipophilen Eigenschaften ein amphiphiles Molekül dar. Dabei kann der lipophile Teil dieser kationischen Lipide auf Ether-Lipiden basieren, wie es zum Beispiel bei DOTMA und DOSPA der Fall ist. Daneben existieren aber auch Cholesterol-Derivate (z.B. DC-Chol) oder auch Lipide mit Aminopropan- (DOSPER) oder Glycerinanker, der bei dem kationischen Lipid DOTAP eingesetzt wurde. Charakterisiert man die Lipide aufgrund ihrer hydrophilen Kopfgruppe, so kann man zwei Hauptgruppen definieren: Monovalente und polyvalente kationische Lipide. Zu den monovalenten kationischen Lipiden zählt zum einen die quartäre Ammoniumverbindung CTAB, ein Ammoniumsalz mit nur einer aliphatischen Kette. Jedoch wird es aufgrund seiner schlechten Ausbildung zu Liposomen und hoher Toxizität nur selten verwendet. Auch DOTMA und das analoge DOTAP gehören zu den monovalenten kationischen Lipiden, die aber auch noch recht hohe toxische Eigenschaften besitzen. Der Vorteil von DOTAP gegenüber DOTMA sind dessen Esterstrukturen, die sich durch Esterasen leicht abspalten lassen, wodurch eine schnellere Metabolisierung erfolgen kann¹¹⁸.

Zu den polyvalenten kationischen Lipiden, die eine multivalente Kopfgruppe besitzen, zählt zum Beispiel DOGS, DOSPER und Sp-Chol. Als Baustein der polaren Kopfgruppe wird hierbei oft das biogene, polykationische Polyamin Spermin verwendet, welches aufgrund hoher Affinität zu Nukleotiden sehr stabile Lipoplexe mit RNA und DNA ausbildet.

Neben den kationischen Lipiden werden auch neutrale Lipide für die Transfektion verschiedener Substanzen, unter anderem auch für die Transfektion von Nukleinsäuren verwendet. Allerdings sind diese aufgrund ihrer neutralen Eigenschaften nicht selbst transfizierend und werden somit oft nur als sogenannte „Helferlipide“ verwendet. Denn durch die Zugabe der neutralen Lipide wird die Toxizität deutlich verringert und auch der strukturelle Aufbau der Lipoplexe verbessert, was eine Verbesserung der Transfektionsrate zur Folge hat¹¹⁹. So ist zum Beispiel das natürlich vorkommende neutrale Lipid DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) in der Lage zusammen mit kationischen Lipiden invers hexagonale Mizellen auszubilden. Wahrscheinlich stellt das DOPE dann eine Art Zwischenbaustein dar, der eine Fusion zwischen dem Lipoplex und der endosomalen Membran ermöglicht^{120,121}. Diese Fusion führt dann zu einer Destabilisierung der Membran und zu einer vereinfachten Freisetzung der transfizierten Substanz in das Zytosol der Zelle. Auch andere natürlich vorkommende Substanzen, die oft auch Bestandteile von biologischen Membranen sind wie zum Beispiel Cholesterol, Lecithine oder Sphingomyeline, eignen sich gut als solche Helferlipide.

Tabelle 2-4: Bezeichnungen und chemische Strukturen wichtiger neutraler und kationischer Lipide

Abkürzung	Chemische Bezeichnung	Strukturformel
DOTMA	<i>N</i> -[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammoniumchlorid)	

DOSPA	2,3-Dioleoyloxy- <i>N</i> -[2-(Spermincarboxamido)ethyl]- <i>N,N</i> -Dimethyl-1-propanaminium	
DC-Chol	3[<i>N</i> -(<i>N,N'</i> -Dimethylethylendiamin)-carbamoyl]cholesterol	
DOSPER	2-(6-carboxyspermyl)-1,3-dioleoyloxypropylamid	
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan	
CTAB	Cetyltrimethylammonium	
DOGS	Diocetadecylamidoglycylspermin	
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin	
DDA	Dimethyldioctadecylammonium	
Lipofectamine™	<i>N</i> -[<i>N</i> -(5-carboxyspermyl)aminoethyl]- <i>N,N</i> -dimethyl-2,3-bis(9-octadecenyloxy)-1-propaneammonium tetra(trifluoroacetat)	

Die charakteristische Struktur dieser aliphatischen Moleküle ermöglicht es, so genannte Lipid-Doppelschichten auszubilden, die eine hohe Ähnlichkeit zur Doppelschicht-Struktur (*Bilayer*-Struktur) von biologischen Zellmembranen aufweisen. In wässrigem Medium kommt es dann zur spontanen Bildung von konzentrischen, vielschichtigen Vesikeln, so genannten Liposomen. Die Liposomenhülle besteht aus einer (oder mehreren) wasserunlöslichen quellbaren Lipid-Doppelschicht, die einen wässrigen Kern umschließt. Durch diese Eigenschaft stellen Liposomen hervorragende Träger für eine Vielzahl von Arzneistoffen dar, denn sie ermöglichen den Einschluss von hydrophilen Wirkstoffen in den wässrigen Innen- und Zwischenräumen aber auch die Inkorporation von lipophilen Wirkstoffen in die Lipidschichten der Membranen. Man unterscheidet zwischen unilamellaren Liposomen, die nur eine Doppelschicht besitzen, und oligo- oder multilamellaren Liposomen, die wenige oder mehrere konzentrisch angeordneten Lipidschichten besitzen.

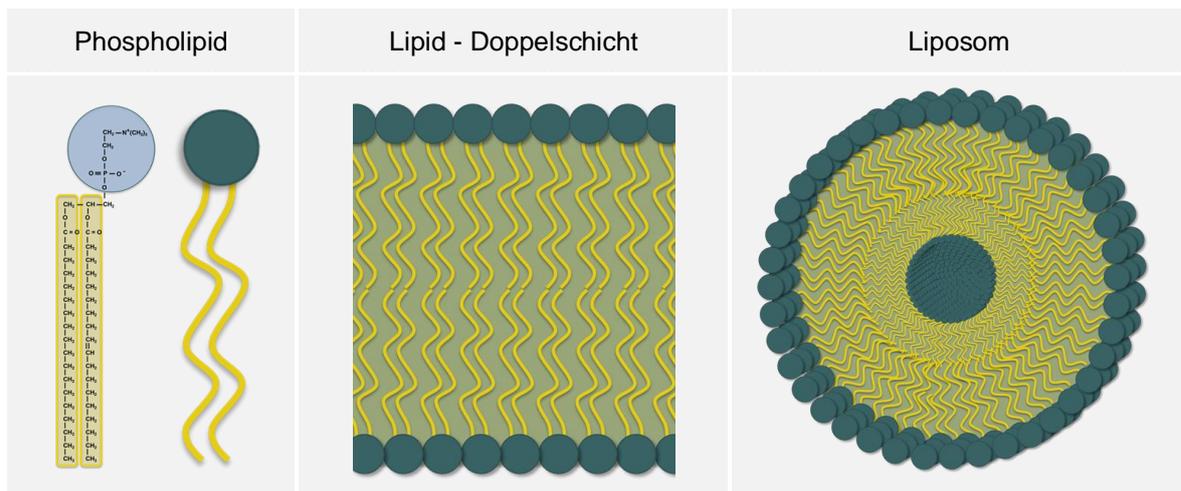


Abbildung 2-8: Darstellung von verschiedenen liposomalen Strukturdimensionen.

Inkubiert man nun DNA oder auch RNA mit liposomalen Transfektionsreagenzien, so entsteht durch die Kombination der beiden Substanzen ein Komplex, der als „Lipoplex“ bezeichnet wird. Ausschlaggebend für die Entstehung eines solchen Lipoplexes sind die negativ geladenen Phosphatreste der Nucleinsäuren, die starke hydrophile Eigenschaften besitzen. Dadurch kann die Nucleinsäure entweder an die liposomale Formulierung (Mizellen, Vesikel oder Liposomen) gebunden (Adsorption) oder auch in diese eingebracht werden (Einschlussimmobilisierung).

Die auf der Adsorption basierenden liposomalen Formulierungen bestehen aus kationischen Lipiden die somit eine Komplexierung zu den anionischen Nucleinsäuren gewährleisten können. Nucleinsäuren die hingegen mit ungeladenen Lipiden transfiziert werden sollen, müssen ins Innere der Liposomen oder Vesikel eingeschleust werden. Auch wenn dieses Verfahren weitaus aufwendiger ist als die simple Adsorption an die Liposomen, können durch die Einschleusung jedoch auch Flüssigkeiten oder nur gering negativ geladene Moleküle effizient transportiert werden. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind in Tabelle 2-4 dargestellt.

Polymer basierte Transfektion

Polymere, die zur Transfektion eingesetzt werden können, benötigen die Eigenschaft ionische Ladungen zu tragen, denn nur so kann eine elektrostatische Wechselwirkung mit der negativ geladenen RNA oder DNA eingegangen werden. Polymere, die eine solche ionische Gruppe besitzen, werden auch als Polyelektrolyte bezeichnet. Es existiert eine ganze Anzahl dieser Polyelektrolyte, die sowohl natürlichen Ursprungs sein können (Polysaccharide), oder aber auch synthetisch hergestellt werden können (Polyacrylsäure, Polystyrolsulfonat u.v.a).

1. Poly (ethylenimin)

Das schon lange in der Papierindustrie oder zur Abwasserreinigung eingesetzte Polyethylenimin (PEI) hat sich in den letzten Jahrzehnten als eine Art Goldstandard im Bereich des nicht-viralen Gentransfers entwickelt. Die Synthese von PEI basiert auf einer Ringöffnungspolymerisation von Ethylenimin (Aziridin), die unter Säurekatalyse mit kationischen Initiatoren verläuft. Das resultierende Produkt ist ein Gemisch hochverzweigter Polymere (*branched* PEI; bPEI), die in

einem Verhältnis von 1:2:1 primäre, sekundäre und tertiäre Amine besitzen. Daneben können auch lineare Polyethylenimine (LPEI) hergestellt werden. Hier dient ein Poly(2-ethyl-2-Oxazolin) als Ausgangsprodukt, welches zunächst einer Ringöffnungspolymerisation unterliegt und anschließend über eine saure Hydrolyse in das lineare PEI überführt wird¹²² (Abbildung 2-9).

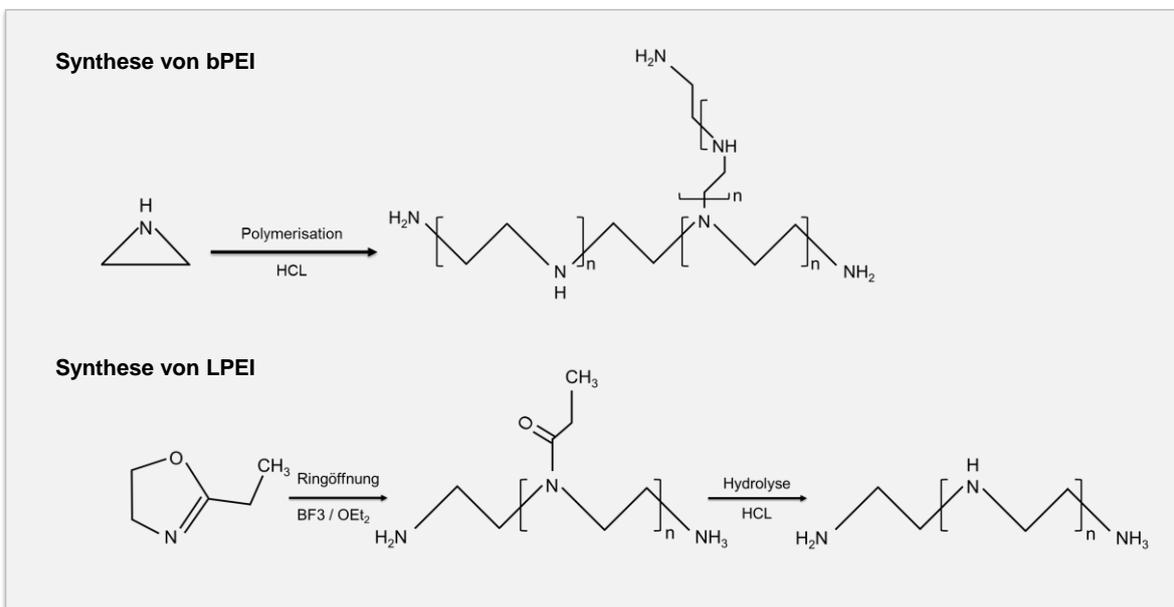


Abbildung 2-9: Synthese von verzweigtem und linearem Polyethylenimin.

Auch wenn die Kombination von Nukleinsäure und den hochverzweigten Polyethyleniminen eine Formation von kleinen und enzymatisch hoch stabilen Polyplexen begünstigt, führen diese jedoch zu höheren zytotoxischen Effekten und einer geringeren Hemokompatibilität¹²³. Das lineare Polyethylenimin zeigt zwar eine weniger effektive Kondensation von RNA und DNA, jedoch auch eine bessere Transfektionseffizienz mit deutlich geringerer Toxizität¹²⁴. Aus diesem Grunde wird für die Transfektion hauptsächlich das lineare Produkt verwendet. Neben den unterschiedlichen Verzweigungsarten unterscheiden sich Polyethylenimine außerdem auch in den Molekulargewichten, die von <1 kDa bis zu 1600 kDa variieren können, wobei aber eine Größe zwischen 5 kDa und 25 kDa als ideal für den Gentransfer angesehen wird¹²⁵. Polyethylenimine höherer Molekulargewichte führen vermutlich zu einer Aggregation der Polymere an der äußeren Zellmembran, was zur Nekrose der Zelle führt¹²⁶.

1995 erkannten Boussif und seine Arbeitsgruppe, das Polyethylenimin als kationisches Polymer in der Lage ist, mit den negativ geladenen Nukleinsäuren elektrostatische Komplexe zu bilden¹²⁷. Diese später als „Polyplexe“ bezeichneten positiv geladenen Nanopartikel sind in der Lage, mit den anionischen Proteoglykanen oder Glykoproteinen der Zellmembran zu interagieren, woraufhin dann eine Internalisierung der Polyplexe über eine Adsorptions-vermittelte Endozytose erfolgt. In diesen frühen Endosomen herrscht ein nahezu physiologischer pH-Wert von 7,2, bei dem nur ein Drittel der Stickstoffatome des PEIs protoniert vorliegt. Während der endosomalen Reifung zum Endolysosom bzw. Lysosom fällt der endosomale pH-Wert stark auf ca. 5,5 ab. Der dann folgende

„Protonenschwamm Effekt“ (*Proton-Sponge-Effect*) beruht auf der vieldiskutierten Hypothese, dass PEI als kationischer Polyelektrolyt in der Lage ist, diese Ansäuerung des pH-Wertes durch eine Protonierung stark abzupuffern. Diese Eigenschaft bewirkt, dass die Zelle immer mehr Protonen in das Endosom pumpt, gefolgt von Chlorid-Ionen und Wasser. Dadurch steigt der osmotische Druck, was zu einem Anschwellen und letztendlich zum Platzen des Endosoms führt¹²⁸. Dadurch wird der endosomale Inhalt, und damit auch der darin enthaltene Polyplex, in das Zytosol der Zelle entlassen und somit verfügbar zur Bindung an zytosolische Rezeptoren wie zum Beispiel von RIG-I (Abbildung 2-10).

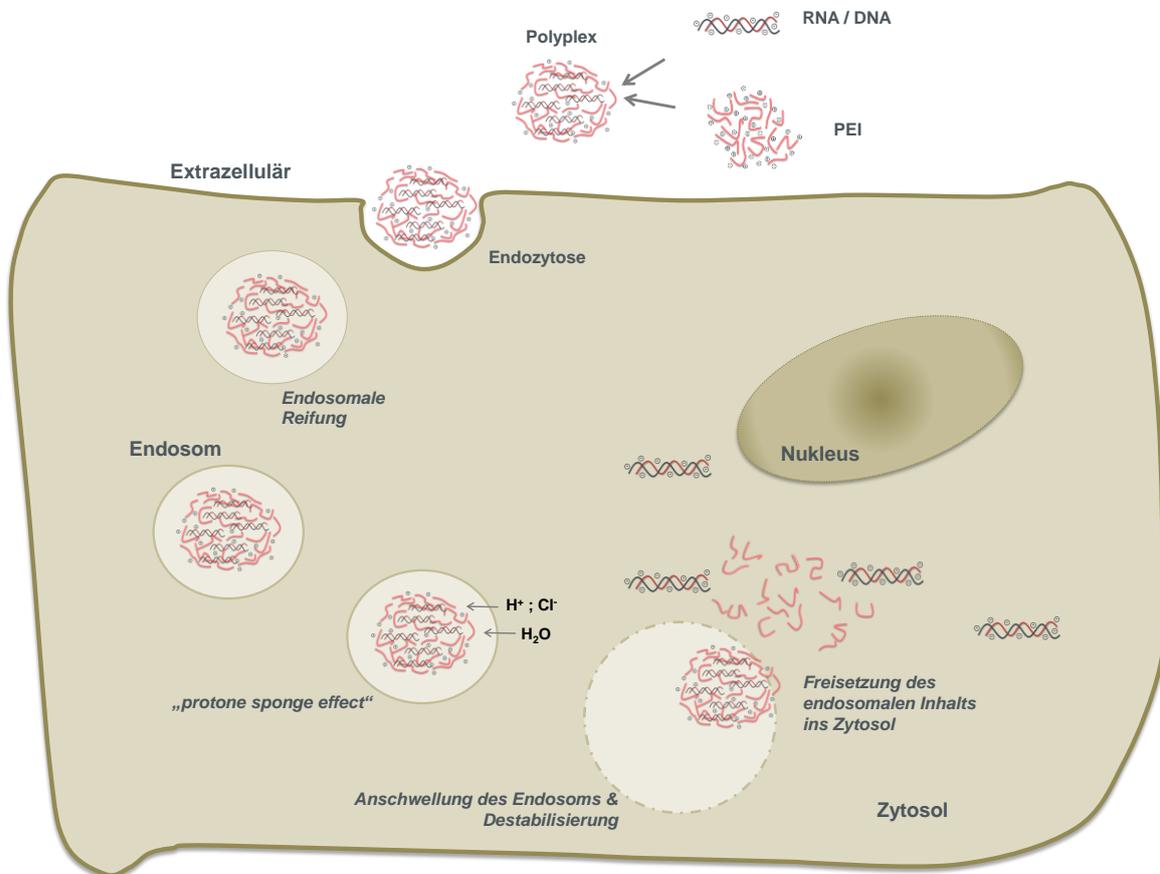


Abbildung 2-10: Schematische Darstellung des Protonenschwamm-Effektes

Auch wenn diese Hypothese von vielen Publikationen unterstützt wird, existieren aber auch Ergebnisse, die diese Theorie in Frage stellen. So konnte Godbey und seine Gruppe zeigen, dass sich der pH Wert der Lysosomen nach der Stimulation von PEI-basierten Ansätzen nicht erhöht, was einen Protonenschwamm-Effekt unmöglich machen würde¹²⁹. Da dieses Ergebnis auch von anderen Gruppen bestätigt werden konnte¹³⁰, und auch andere Studien die Theorie des Protonenschwamm-Effektes anzweifeln^{131,132}, bleibt der Aufnahmemechanismus von Polyplexen letztlich noch ungeklärt.

Es existieren zahlreiche Studien, die lineares Polyethylenimin nutzen, um genetisches Material *in vivo* zu transfizieren. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass intravenös verabreichtes lineares PEI in der Lage ist, siRNA und DNA effizient zu transportieren, ohne selber eine Immunreaktion auszulösen¹³³. Da auch gezeigt werden konnte, dass die Leber gefolgt von der

Lunge die beiden Hauptbiodistributionsorgane nach intravenöser Applikation darstellen, bietet die systemische Gabe von linearem PEI eine effektive pulmonale und hepatische Therapiemöglichkeit¹³⁴⁻¹³⁶. Daneben zeigt auch die intratumorale Behandlung von PEI-basierten Transfektionssystemen vielversprechende Erfolge¹³⁷. Um aber über die systemische Applikation auch andere Organe zu erreichen und somit weitere Indikationen mit PEI-basierten Therapien behandeln zu können, wurden zahlreiche Modifikationen entwickelt. Diese sollen über verschiedenste Substituenten eine Gewebespezifität erreichen, um die Aufnahme an einem bestimmten Ort zu gewährleisten bzw. zu verbessern (Tabelle 2-5).

Tabelle 2-5: Möglichkeiten von zielgerichteten PEI-Modifikationsstrategien

Zielzelle	Ziel-Rezeptor	Modifikation	Quelle
Tumorzelle	Transferrin-Rezeptor	Transferrin	138-140
Tumorzelle	EGF-Rezeptor	EGF	141,142
Tumorzelle	Folat-Rezeptor	Folat	143-145
Mamma-Karzinom	Humane epidermale GFR-2	Anti-HER-2 Antikörper	146
Ovarial-Karzinom	OA3	Anti-OV-TL16 Fab-Antikörper	147
Lymphozyten	CD3	Anti-CD3 Antikörper	148
Epithelzellen	Integrin Rezeptor	RGD Peptid	149
Dendritische Zellen	Mannose Rezeptor	Mannose	150,151
Hepatozyten	Gal/GalNAc Rezeptor	Galactose	152,153

Aus patentrechtlichen Gründen hat bisher nur die französische Firma *PolyPlus Transfection* ein lineares Polyethylenimin (MW: 25 kDa) unter GMP-Bedingungen (*Good Manufacturing Practice*) herstellen können. Unter dem Namen *in vivo-jetPEI™* wird es schon in mehreren präklinischen und klinischen Studien erfolgreich eingesetzt^{154,155}.

2. Chitosan

Poly-D-Glucosamin, besser bekannt unter dem Namen Chitosan, ist ein natürlich vorkommendes, lineares Polyaminosaccharid, welches sich von Chitin ableitet. Da Chitin im Zytoskelett von Krustentieren sowie in den Zellwänden von Pilzen zu finden ist, ist es nach Cellulose das zweithäufigste, natürlich vorkommende Polysaccharid der Erde¹⁵⁶. Chitosan setzt sich aus N-Glucosamin- und N-Acetylglucosamin-Einheiten zusammen, die durch die partielle Deacetylierung des Chitins gewonnen werden. Diese Deacetylierung kann zum einen enzymatisch oder auch durch die Behandlung mit Natronlauge erfolgen. In beiden Fällen kann eine vollständige oder auch eine unvollständige Deacetylierung durchgeführt werden, wodurch auch der Anteil an deacetylierten Bereichen variiert werden kann (Abbildung 2-11).

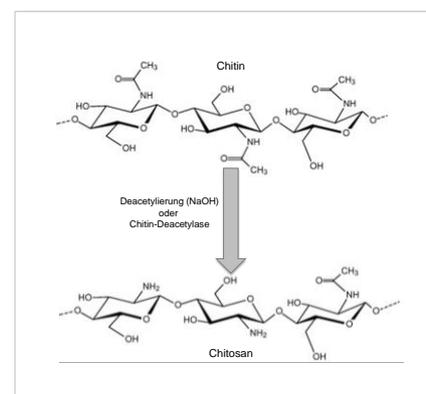


Abbildung 2-11: Synthese von Chitosan aus dem Polysaccharid Chitin.

Die geringe Toxizität, die gute Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit haben das Interesse an Chitosan als potentiell Transfektionssystem geweckt. Die Herstellung von Chitosan Nanopartikeln ist einfach, kostengünstig und hoch reproduzierbar. Chitosan kommt in einer Reihe von Anwendungen zum Einsatz. Die mukoadhäsive Eigenschaft dieses Polymers begründet die hauptsächliche Verwendung als orale und nasale Applikationsform. Darüber hinaus existieren immer mehr Studien, die den Einsatz von Chitosan als parenteralen Hilfsstoff verwenden¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Die Formulierung von Chitosan Nanopartikeln kann über viele unterschiedliche Methoden erfolgen. Die ionische Gelierung ist seit ihrer Erfindung im Jahr 1997 die aber wohl am häufigste angewandte Methode¹⁶⁰. Hierzu wird Chitosan zunächst in Essigsäure gelöst und unter Rühren tropfenweise mit einer Tripolyphosphat-Pentanatrium-Lösung (TPP) versetzt. Als biologischer Stabilisator kann Mannitol, Trehalose oder auch Polyethylenglycol hinzugegeben werden, wodurch eine Aggregation der resultieren Partikel vermieden und zudem eine finale Lyophilisation der Nanopartikel ermöglicht wird. Durch diese leicht-sauren Bedingungen werden die Glukoamin Einheiten des Chitosans (pK_s 6,2-7) vollständig protoniert und sind bereit für die Komplexierung mit der polyanionischen Komponente (DNA, RNA o.a), die durch tropfenweise Zugabe unter Rühren die Bildung der Chitosan Nanopartikeln ermöglicht¹⁶¹.

Synthetische Polymere wie Polyethylenimin (PEI) oder Poly-L-Lysin (PLL) zeigen im direkten Vergleich zu Chitosan eine höhere Ladungsdichte, was auf der einen Seite die bessere Transfektionseffizienz begründet, aber auch für die hohe Zelltoxizität verantwortlich ist¹⁶². Jedoch bietet Chitosan viele Modifikationsmöglichkeiten, die entweder die Transfektionseffizienz erhöhen oder auch den spezifischen Transport zu gewünschten Zielzellen ermöglichen¹⁶³. Eine weitere besondere Eigenschaft von Chitosan ist die Fähigkeit nicht nur Nukleinsäuren komplexieren zu können, sondern auch viele Arzneistoffe in Nanopartikel zu verkapseln (Tabelle 2-6).

Tabelle 2-6: Beispiele von Arzneistoff-geladenen Chitosan-Nanopartikeln

Arzneistoff	Indikation	Vorteile & Wirkung	Quelle
Sumatriptan	Migräne	Steigerung des therapeutischen Effekts Reduzierung der Dosierung	164
Tamoxifen	Mamma-Karzinom	Steigerung des therapeutischen Effekts	165
Rivastigmin	Alzheimer	Steigerung des therapeutischen Effekts i.n. Applikation möglich Verbesserung die Bioverfügbarkeit	166
Bromocriptin	Parkinson	Steigerung des therapeutischen Effekts i.n. Applikation möglich	167
Leucin-Enkephalin	Schmerztherapie	Erhöhung der antinozizeptiven Wirkung i.n. Applikation möglich	168
Didanosin	HIV/AIDS	Steigerung des therapeutischen Effekts i.n. Applikation möglich	169
Venaflaxin	Depression	Steigerung des therapeutischen Effekts i.n. Applikation möglich	170
Methotrexat	Hirntumor	Steigerung des therapeutischen Effekts Verringerung der Nebenwirkungen i.n. Applikation möglich	171
Estradiol	Neuroprotektion	Steigerung der Bioverfügbarkeit im CNS	172

Dabei fällt auf, dass besonders viele Studien zeigen konnten, dass Chitosan-Nanopartikel es

ermöglichen über die nasale Applikation das Gehirn zu erreichen. Dieses sogenannte „nose-to-brain delivery“ bewirkt einen Transport des Arzneimittels durch die olfaktorische Region. Da dieser Bereich im Gehirn seinen Ursprung hat, und sich bis in die Nasenhöhle zieht, liegt hier eine enge Verbindung zwischen der äußeren Umgebung und der Zerebrospinalflüssigkeit (ZSF). Da Chitosan aufgrund seiner mukoadhäsiven Eigenschaft die Fähigkeit besitzt, auch in diesem Nasenbereich die Mukosa zu überwinden, ist es möglich, auch in die ZSF zu gelangen. Dort angekommen kann der Arzneistoff in die intestinale Flüssigkeit entlassen werden und ins Gehirnparenchym penetrieren.

Der wohl größte Vorteil, den diese Applikationsart bietet, ist die Umgehung der Bluthirnschranke (BHS). Diese Endothelmembran separiert die systemische Zirkulation von der zentralen interstitiellen Flüssigkeit und macht besonders hydrophilen und hochmolekularen Molekülen die Passage unmöglich¹⁷³. Intravenös verabreicht können Makromoleküle wie Peptide oder Proteine die BHS nicht passieren. Auch wenn noch nicht sicher geklärt ist, ob die Nanopartikel durch die olfaktorischen Epithelzellen selber aufgenommen werden, oder ob nicht vielleicht der Inhalt der Nanopartikel in der Nähe der apikalen Oberfläche der olfaktorischen Zellen ausgeschüttet wird, stellt Chitosan dennoch das vielversprechendste Polymer für eine solche Applikationsvariante dar.

3. Dendrimere

Dendrimere sind hochdefinierte, sphärische polymere Strukturen, die eine Größe von 1 bis 10 Nanometern aufweisen. Wie die namensgebende Komponente „Dendron“ (griechisch: Baum) schon impliziert, besitzen Dendrimere einen inneren Kern, von welchem baumartig repetitive Aststrukturen, sogenannte Dendrone, ausgehen.

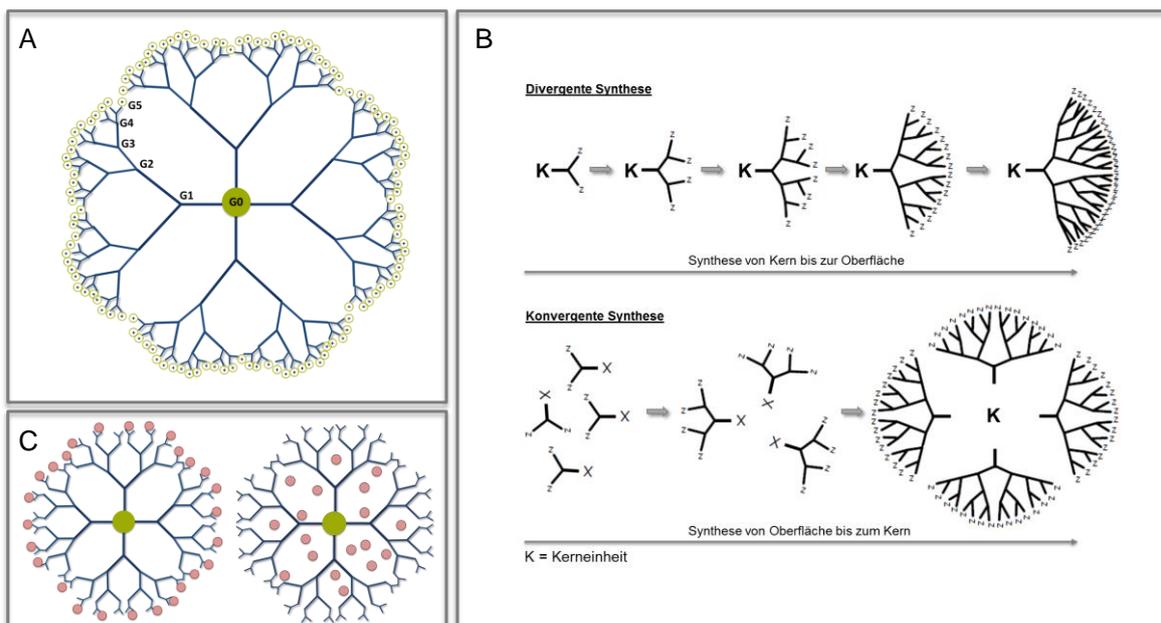


Abbildung 2-12: Struktur und Synthese von Dendrimeren

Je nach Anzahl von Verknüpfungen teilt man die Dendrimere in unterschiedliche Generationen ein. Die pure Kerneinheit stellt die 0. Generation dar. Jedes dazu kommende Dendron erweitert das Molekül dann um eine Generation (Abbildung 2-12 Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden

werden.A). Dieser Molekülaufbau verleiht den Dendrimern eine hochdefinierte Struktur mit hoher Monodispersität. Durch diese besonderen Eigenschaften werden die Dendrimere in die Klasse der Kaskadenpolymere eingegliedert, die sich deutlich von anderen Polymeren unterscheiden. Die erste Beschreibung dieser neuen Klasse verzweigter Moleküle wurde 1974 von einem Team um den deutschen Chemiker Fritz Vögtle publiziert, die ihre hergestellten Dendrimere aufgrund ihrer Struktur erst noch als „*Octopus molecules*“ bezeichneten¹⁷⁴. Erst 1985 erschien der Begriff „Dendrimer“ in einer Publikation von Donald Tomalia und seiner Arbeitsgruppe¹⁷⁵. Diese Gruppe beschrieb dann auch ein Jahr später das divergente Syntheseverfahren als eine der zwei bisher bekannten Methoden zur Herstellung von Dendrimern¹⁷⁶. Dieses Verfahren beginnt mit einer initialen multifunktionalen Kerneinheit, die durch mehrfache Polymerisationsreaktionen mit den Monomeren verknüpft wird (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**B oben). Da bei jedem Reaktionsschritt eine neue Monomerschicht auf die Kerneinheit gebracht wird, wächst nach und nach auch die Größe des Moleküls und der Verzweigungsgrad der Dendron-Arme. Letzteres beschreibt einen gewissen Nachteil dieses Syntheseverfahrens. So kommt es bei der Synthese von höheren Dendrimer-Generationen zu einer Art Überlastung der endständigen funktionalen Gruppen und damit zu einem Verlust ihres Reaktionsvermögens. Um dieses Problem zu beheben beschrieben Hawker und Fréchet einige Jahre später die konvergente Synthese von Dendrimern¹⁷⁷. Hierbei werden in einem ersten Reaktionsschritt einzelne hochverzweigte Dendrone hergestellt, die dann am Ende der Synthese erst durch eine multifunktionale Kerneinheit miteinander verknüpft werden (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**B unten). Dieses einfachere und besser kontrollierbare Syntheseverfahren ermöglicht die Produktion hochreiner Dendrimer-Moleküle. Da man bei beiden Syntheseverfahren in der Lage ist Kerneinheit, Dendron-Einheiten und auch die funktionellen Gruppen der Dendrimer-Oberfläche zu variieren, existiert quasi eine unbegrenzte Anzahl an unterschiedlichen Dendrimer-Typen^{178,179}. Da auch die Anzahl der finalen Dendrimer-Generation bestimmbar ist, ist auch die Form der Moleküle beeinflussbar, die bei geringen Generation eine ellipsenförmige, und bei höheren Generationen eine sphärische Konformation einnimmt. Während Dendrimere mit elliptischer Form eher elektrostatische Interaktionen oder kovalente Bindungen mit anderen Molekülen eingehen, kommt es bei den sphärischen Dendrimern zur Bildung von hydrophoben Zwischenräumen, die eine Verkapselung von Stoffen im Inneren der Dendrimere möglich macht¹⁸⁰⁻¹⁸² (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**C). Diese hydrophoben Eigenschaften ermöglichen eine Interaktion und somit eine Verkapselung von schlechtlöslichen Arzneistoffen¹⁸³.

- **PAMAM-Dendrimere**

Die Poly(amidoamin)-Dendrimere, kurz PAMAM-Dendrimere, gehören zu den wichtigsten Vertretern der Dendrimere. Neben den Polypropylenimin-(PPI)- Dendrimern sind sie kommerziell erhältlich und für biologische Anwendung geeignet. Sie besitzen meist eine vierwertige Ethylendiamin-Kerneinheit, die über das divergente Syntheseverfahren mit Monomer-Einheiten (Methylacrylaten (a)) durch eine erschöpfende Michael-Addition verknüpft werden. Die anschließende Amidierung mit einem weiteren Ethylendiamin (b) lässt so die Generation 0 des

PAMAM-Dendrimere entstehen (Abbildung 2-13)

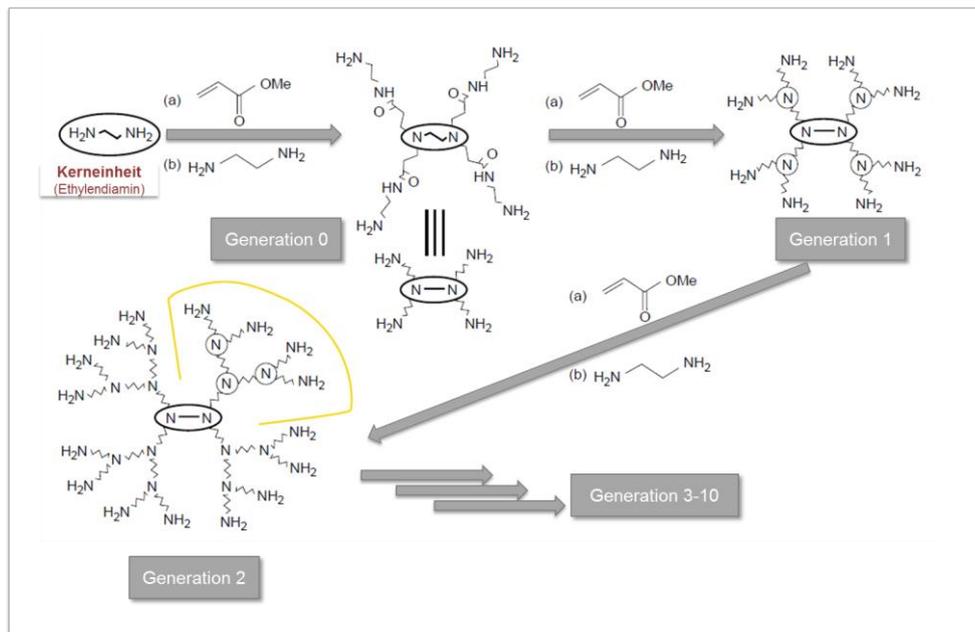


Abbildung 2-13: Synthese des tetra-funktionellen Poly(amidoamin) Dendrimers.

Eine Ethylendiamin-Kerneinheit wird an dessen Aminogruppen über erschöpfende Michael Addition mit Methylacrylaten verbunden und anschließend eine Amidierung der entstehenden Ester mit Ethylendiamine durchgeführt.

Diese zwei-Stufen-Reaktion kann dann bis zur gewünschten Generation fortgesetzt werden, da die entstandene Oberfläche aktiviert wird und bereit für eine weitere Reaktion mit Monomereinheiten ist. Diese Art der Reaktion verleiht den entstandenen Molekülen die typische dendritische, hochmonodisperse und gut definierte Struktur. PAMAM-Dendrimere besitzen somit primäre und tertiäre Aminogruppen, die unterschiedliche pK_s -Werte besitzen. Die primären Aminogruppen der Oberfläche besitzen einen pK_s von 6-7, wobei die inneren tertiären Amine einen pK_s Wert von 3-4 tragen. Bei einem physiologischen pH-Wert bedeutet das, dass die terminalen Amine in protonierter Form vorliegen und somit bei einer Komplexierung mit negativ geladenen Nucleinsäuren eine effektive Bindung der DNA/RNA ermöglichen. Erst im Zuge der endosomal Reifung und der damit einhergehenden Verringerung des pH-Wertes werden auch die tertiären Amine protoniert. Der Versuch der Zelle das Endosom weiter anzusäuern, wird durch die Pufferkapazität der PAMAM-Dendrimere verhindert. Dadurch hält der Einstrom der Protonen und der damit verbundene Einstrom von Chlorid-Ionen und Wasser an, was den osmotischen Druck im Endosom stark erhöht und zum Anschwellen und zum Platzen des Endosoms führt (*Proton-sponge Effect* / Abbildung 2-10).

Dass PAMAM-Dendrimere für biologische Applikationen verwendet werden, liegt in ihrer Biokompatibilität begründet. So konnte gezeigt werden, dass nicht-substituierte Dendrimere aufgrund ihrer polyaminischen und damit polykationischen Eigenschaft eine starke Wechselwirkung mit der negativ geladenen Zellmembran eingehen, was zu zytotoxischen Effekten führt¹⁸⁴. Jedoch kann durch die Generation des eingesetzten Dendrimers, sowie durch dessen Struktur dieser toxische Effekt beeinflusst werden. So konnten mehrere Studien zeigen, dass höhere Generationen^{162,185,186}, sowie auch Dendrimere mit polyaromatischen Charakter¹⁸⁷ eher zu

Toxizitäten führen. Letztendlich konnte Haensler und seine Arbeitsgruppe zeigen, dass PAMAM-Dendrimere die am wenigsten toxischen Vertreter ihrer Klasse darstellen¹⁸⁸. Eine weitere Derivatisierung der PAMAM-Oberfläche bewirkt sogar eine weitere Reduzierung der Zytotoxizität. Denn durch eine Derivatisierung der terminalen Amine entstehen multimere Strukturen von sekundären und tertiären Aminen, die deutlich weniger toxisch sind, als multimere primäre Amine¹⁶².

Tabelle 2-7: Therapeutische Verwendung von PAMAM-Dendrimern

Arzneistoff	Administration	Indikation / Ziel	Interaktion	Quelle
Propranolol	oral	Arterielle Hypertonie / Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit	Konjugation	189
Ketoprofen	oral	Analgetika bei rheumatoider Arthritis / Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit	Elektrostatische Interaktion	190
Tamsulosin	transdermal	Benigne Prostatahyperplasie/ Verbesserung des transdermalen Transportes	Verkapselung	191
Pilocarpin	okular	Miotikum	Verkapselung	192
Cisplatin	intravenös	Chemotherapeutika / Verlängerung der Wirkdauer & Verringerung der Toxizität	Konjugation	193
5-Fluorouracil	Intravenös	Chemotherapeutika / Verlängerung der Wirkdauer & Verringerung der Toxizität	Konjugation	194
Doxorubicin	intravenös	Chemotherapeutika / Verlängerung der Wirkdauer & Verringerung der Toxizität	Konjugation	195,196
Flurbiprofen	intravenös	Antirheumatika (NSAR) / Verbesserung der entzündungshemmenden Wirkung	Elektrostatische Interaktion	197
Methotrexate	intravenös	Chemotherapeutika / Gezielte Therapie (Folat konjugiert) Verringerung der Nebenwirkungen	Konjugation	198
DNA	intraperitoneal	gezielte Tumorbehandlung	Elektrostatische Interaktion	199
DNA	intratumoral	Verbesserung der antitumoralen Wirkung	Elektrostatische Interaktion	200

All diese Vorteile der PAMAM-Dendrimere gegenüber anderen Dendrimer Verbindungen, aber auch besonders gegenüber anderen polymeren Strukturen, begründen die häufige Anwendung dieser Polymerverbindungen in einer ganzen Reihe von therapeutischen Applikationsansätzen. In Tabelle 2-7 sind einige Beispiele aufgeführt, bei denen PAMAM-Dendrimere als Vektor verwendet werden, oder auch als Mittel dienen, die Wirkung von schon therapeutisch etablierten Arzneistoffen zu optimieren oder dessen Nebenwirkungen zu reduzieren.

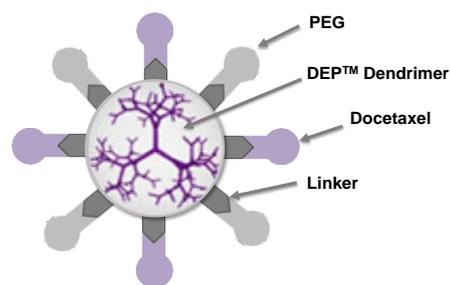


Abbildung 2-14: Schematische Darstellung des DEP™ Transfektionssystems.

Den Weg vom Labor in die Klinik haben die Dendrimere schon erfolgreich bewältigt. Als VivaGel[®] setzt die australische Firma Starpharma ihre pegylierten Polylysin-Dendrimere in einem Gel ein, um antimikrobieller Wirkstoffe zu verpacken. Dieses Gel dient auch auf beschichteten Kondomen zur Prävention von HIV, Herpes, HPV, bakterieller Vaginose und anderen sexuell übertragbaren Infektionen. Weiterhin befindet sich die gleiche Firma mit ihrem DEP[™] Transfektionssystem in der klinischen Phase. Hierbei dient ein Polylysin-Dendrimer basiertes System (DEP[™] *Drug delivery*) als Transportsystem für Arzneistoffe (Abbildung 2-14). Als DEP[™]-Doxetaxel angewandt konnte eine Wirkungsverbesserung und eine Reduzierung der potentiellen Nebenwirkungen gezeigt werden²⁰¹.

Zellpenetrierende Peptide

Peptide, die in der Lage sind, Zellmembranen zu durchdringen, werden auch als zellpenetrierende Peptide, kurz CPPs („*cell penetrating peptides*“) bezeichnet. Diese Fähigkeit kann ausgenutzt werden, um den Zelleintritt für verschiedenste Moleküle zu erleichtern, indem diese an die CPPs gebunden werden. Dieses auch als Proteintransduktion bekannte Phänomen wurde 1988 im Rahmen der HIV-Forschung entdeckt. Hier konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das für den Replikationszyklus verantwortliche TAT-Protein (*transcription-activating protein*) von den unterschiedlichsten Zellen aufgenommen werden konnte^{202,203}. Einige Jahre später wurde auch die Translokation eines weiteren Proteins, des *Drosophila Antennapedia* Transkriptionsfaktors, nachgewiesen²⁰⁴. Durch diese zwei Entdeckungen entstanden die wohl wichtigsten Vertreter der CCPs: TAT und Penetratin.

Nach und nach wurden weitere CPPs entdeckt, die in der Regel aus bis zu 40 Aminosäuren bestehen und aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften dem kationischen, dem hydrophoben oder dem amphipathischen Typ zugeordnet werden können^{205,206}. Die Bindung und Internalisierung von Peptiden, Proteinen, Oligonukleotiden, Adenoviren, Plasmiden oder auch Nanopartikeln machen die CPPs zu hoch effektiven Transfersystemen. Vertreter dieser Gruppe, die besonders im Transport von Oligonukleotiden Einsatz finden, werden im Folgenden näher beschrieben.

1. Poly-L-Lysin und Poly-L-Arginin

Poly-L-Lysin (PLL) und Poly-L-Arginin (PLA) (<30 Aminosäuren) sind in der Lage eine kovalente oder auch nicht-kovalente Bindung mit verschiedensten Molekülen (u.a. Nukleinsäuren) einzugehen, und deren zelluläre Aufnahme zu ermöglichen. Auch wenn der zelluläre Aufnahmeweg noch nicht vollständig geklärt ist, scheint aber die Makropinozytose die wahrscheinlichste Ausnahmeform der CPPs darzustellen^{207,208}. Allen CPPs ist gemein, dass sie eine Aminosäure-Komponente besitzen, die im Falle von Lysin oder auch Arginin eine stark positive Ladung trägt. Diese ermöglicht die Bindung an die negativ geladenen Rezeptoren der Zelloberfläche

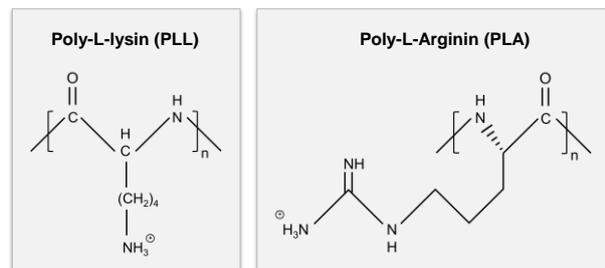


Abbildung 2-15: Strukturformel von Poly-L-Lysin und Poly-L-Arginin.

(Sialinsäure; Heparansulfat), worauf dann eine Internalisierung in die Zelle erfolgen kann.

PLL wird durch Polymerisation am ϵ -Carbon der Aminosäure Lysin gewonnen und gehört damit zu einer Reihe von Lysin-Homopolymeren. Da es bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 eine positiv geladene hydrophile Aminogruppe trägt, stellt Poly-L-Lysin eine weitere Transfektionsmöglichkeit für Nukleinsäuren dar. PLL wurde zwar in vielen Studien schon als alleiniger Vektor besonders für die Transfektion von Oligonukleotiden verwendet, bietet aber auch als Modifikationszusatz für andere Vektoren die Möglichkeit die Effizienz zu erhöhen²⁰⁹.

Wie L-Lysin wird auch L-Arginin der Gruppe der basischen Aminosäuren zugeordnet. Demnach existiert auch hier eine basische Gruppe, die bei einem physiologischen pH-Wert protoniert vorliegt (Abbildung 2-15). Auch zu PLA existieren etliche Studien, welche die hohe Effizienz dieses CPPs als Transfektionsreagenz für Nukleinsäuren zeigen^{210,211} oder PLA als Modifikation zur Verbesserung der Transfektion anderer Systeme verwenden^{212,213}. Jedoch besitzen auch die CPPs eine nicht unbedenkliche Zytotoxizität²¹⁴.

2. Protamin

Biochemisch betrachtet stellt Protamin ein Stoffgemisch aus mehreren stark basischen Peptiden mit einer Größe von 4.000 – 6.000 Dalton dar. Gewonnen aus dem Sperma oder Rogen von vielen Lachsarten ist Protamin schon seit vielen Jahren in der Medizin bekannt und von der FDA (*Food & Drug Administration*) für die Anwendung am Menschen zugelassen. Die wohl bedeutendste Eigenschaft von Protamin ist die Fähigkeit zur Inaktivierung von Heparin. Es wird daher als Antidot von Heparin eingesetzt, um Blutungen unter Heparin zu unterbinden. So wie mit Heparin, kann Protamin auch mit Insulin eine Verbindung eingehen, was eine längere Wirkdauer des Insulins ermöglicht, da die Freisetzung und damit der Wirkungseintritt durch die Verbindung verzögert wird. Zudem besitzt Protamin ein weiteres Charakteristikum, welches für die biochemische Transfektion von Oligonukleotiden eine wichtige Rolle spielt. Denn Protamin besitzt eine positive Eigenladung, die es ermöglicht, über elektrostatische Wechselwirkungen einen Komplex mit den negativ geladenen Oligonukleotiden einzugehen. Die resultierenden Nanopartikel, die auch „Proticles“ genannt werden, wurden schon in zahlreichen Publikationen angewandt, besonders zur Transfektion von Antisense ODNs und PTOs CpG-DNA ^{210,215-218}.

2.6.1.2.2 Physikalische Transfektion

Neben den biochemischen Transfektionsverfahren existieren auch zahlreiche physikalische Transfektionsmethoden. Die 1982 von Neumann entwickelte **Elektroporation** ermöglicht eine Transfektion vieler Zellen in kürzester Zeit. Bei diesem Verfahren werden die Zellen zum einen mit der zu transfizierenden Substanz (DNA) versetzt, und gleichzeitig einem elektrischen Impuls ausgesetzt. Dadurch werden in der Zellmembran kurzzeitig Poren erzeugt, über die dann die umgebene Substanz aufgenommen werden kann²¹⁹. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass bei einer effektiven Transfektionsrate auch bis zu 50% der Zellen absterben. Ein dieser Methode recht ähnliches Verfahren beschreibt die **Sonoporation**, bei der die kurzfristige Permeabilität der

Zellmembran mit Hilfe von Ultraschall-Frequenzen erzeugt wird^{220,221}. Die einige Jahre späte beschriebene **Immunoporation** macht sich kleine Kügelchen zu Nutze, die mit spezifischen Antikörpern beschichtet sind. Auch diese Methode reißt kleine Löcher in die Zellmembran, zeigt allerdings eine deutlich geringere Zytotoxizität als die Elektroporation²²².

Bei der **Mikroinjektion** wird mit Hilfe einer Mikrokapillare wenige Nanoliter einer DNA-Lösung direkt in das Zytoplasma oder auch direkt in den Zellkern injiziert. Bei diesem Verfahren liegt die Transfektionseffizienz zwar bei nahezu 100%, jedoch ist die Durchführung dieser Methode hoch aufwendig und auch mit einer Geschwindigkeit von 60 – 200 transfizierten Zellen pro Stunde sehr zeitaufwendig.

Ähnlich aufwendig ist auch das 1987 erfundene „**Particle Gun**“ Verfahren (**Genkanone**)²²³. Hier dienen Gold- oder auch Wolframpartikel als Mikroprojekte, die erst mit einem Polyamin (z.B. Spermidin) beschichtet werden, um dann eine effektive Adsorption von DNA zu ermöglichen. Diese beschichteten Partikel werden dann in einen Fixateur eingespannt und mit komprimierten Gas auf die Zellen geschossen. Erst in der Zelle selber werden die Partikel abgebremst, die DNA von dem Trägerpartikel abgelöst und in das Zytosol der Zelle freigesetzt. Allerdings wird auch hier zur Verbesserung der Transfektionseffizienz nach der Beschichtung mit der DNA eine zusätzliche Beschichtung mit einem kationischen Polymer vorgenommen. Bei dieser Methode stehen der hohen Effektivität und guten Reproduzierbarkeit der extrem hohe Aufwand und die hohen Materialkosten entgegen.

Eine weitere physikalische Transfektionsmethode bietet die **Magnetofektion**. Bei diesem Verfahren dienen magnetische Nanopartikel als Träger, die zunächst mit kationischen Polymeren oder Lipiden beschichtet werden^{224,225}. So ist dann die einzuschleusende, negativ geladene Nukleinsäure in der Lage, an die Partikel zu binden²²⁶. Durch das anschließende Anlegen eines magnetischen Feldes kann dann die Adsorption an die Zielzelle erfolgen, wodurch eine folgende zelluläre Aufnahme verstärkt wird.

Daneben gibt es weitere Verfahren zur Transfektion von RNA und DNA, die zum Teil auch schon ihren Weg in die klinische Anwendung gefunden haben, aber auf die in dieser Arbeit nicht im Detail eingegangen wird. Eine Zusammenfassung von vielversprechenden Ansätzen liefert Tabelle 2-8.

Tabelle 2-8: Übersicht weiterer Oligonukleotid-Transfervverfahren

Bezeichnung	Hersteller	Formulierung	Quelle
Antikörper-Konjugate (ADC)	Mersana	Modifikation des Oligonukleotids mit tumorspezifischen monoklonalen Antikörpern	227
Peptid-Maskierung	Bioscience Arisgen	Kovalente Bindung von Peptiden an den siRNA/RNA Antisense Strang (5' Ende)	228
GalNac-LNPs	Alnylam Dicerna	Modifizierung mit N-Acetylgalactosamin für gezielte hepatische Aufnahme	229-231
siRNAs-Technologie (short interfering ribonucleic neutrals)	Solstice Biologics	Modifikation der RNA mit neutralen Phosphodiestergruppen	232

Eudragit®	Evonik	Kationische Co-Polymere	233,234
-----------	--------	-------------------------	---------

2.6.2 Oligonukleotid-Transfersysteme für den therapeutischen Einsatz

Obwohl unzählige mechanische, biologische und chemische Ansätze existieren, die es ermöglichen, ein Oligonukleotid zu stabilisieren, vor Abbau durch Nukleasen zu schützen und auch in die Zelle zu transportieren, scheint dennoch das Transfersystem die größte Hürde in der klinischen Entwicklung der Oligonukleotide zu sein. Denn Oligonukleotide, bei denen aufgrund ihrer lokalen Applikation (meist ins Auge) kein Transfersystem notwendig ist, sind als Arzneimittel für den Markt schon zugelassen (siehe Tabelle 2-3). Da die meisten Indikationen aber subkutane, orale, inhalative und besonders intravenöse Applikationen bedingen, müssen Transfersysteme hier eingesetzt werden, um die Wirkung der DNA/RNA zu ermöglichen. Die Verwendung von lipid-basierten Nanopartikeln (LNP) als Vektorsysteme für DNA/RNA ist sowohl in der Forschung, als auch in der klinischen Entwicklung wohl am weitesten vorgeschritten. Neben der effektiven Bindung und Verkapselung der Nukleinsäure sind die LNPs der neueren Generation selbst mit geringem Anteil an kationischen Lipiden in der Lage, einen effektiven Transport der DNA/RNA in die Zelle zu gewährleisten. Erreicht werden konnte dies durch den Zusatz von Cholesterol, welches durch das Auffüllen der Lücken zwischen den kationischen Lipiden eine Stabilisierung der LNPs, und somit eine Erhöhung der Transfektion bewirkt^{235,236}. Auch die recht hohe Immunogenität der LNPs konnte durch die Modifikation mit Polyethylenglycol (PEG) deutlich verringert werden. Denn durch die PEGylierung steigt die kolloidale Stabilität der LNPs und die starke Oberflächenladung wird abgeschirmt²³⁷. Auch wenn noch keine Marktzulassung erreicht wurde, befinden sich aber viele LNP-Oligonukleotide derzeit in der klinischen Entwicklung^{238,239}. Zum Beispiel befindet sich Patisiran, eine in SNALPs verpackte siRNA, die intravenös bei der Transthyretin vermittelten Amyloidose eingesetzt wird, momentan in der klinischen Phase III und somit sehr nah an der Zulassung des vielleicht ersten LNP-Oligonukleotids^{240,241}.

Neben den „typischen“ LNPs und den schon lange bekannten SNALPs existieren auch andere Lipid-basierte Transfersysteme (Tabelle 2-9), die für den Transport von Oligonukleotiden eingesetzt werden und die sich zum Teil auch schon in der klinischen Entwicklung befinden²⁴²⁻²⁴⁴.

Tabelle 2-9: Übersicht Lipid-basierter Transfersysteme in der klinischen Entwicklung

Bezeichnung	Hersteller	Formulierung	Quelle
LNPs (Lipid-Nanoparticle)	Arbutus Acuitas Alnylam	Lipid-Nanopartikel bestehend aus unterschiedlichen Kationischen Lipiden, Helferlipiden und zielgebende Modifikationen	240,245
SNALPs (Stable Nucleic Acid Lipid Particles)	Tekmira	Umhüllung der RNA mit einer Lipid-Doppelschicht, bestehend aus kationischen und fusogenen Lipiden, modifiziert mit PEG	246-248
TheraSilence®	Celsion	mPEG modifiziertes Staramin	249,250
Smarticles®	Marina Biotech	Verkapselung von Oligonukleotiden in amphotere Liposomen	243,244,251,252

SAMiRNA® (Self assembled Micelle inhibitory RNA)	Bioneer	Konjugation der RNA mit Lipid/PEG-bi-konjugierten Nanopartikeln	253
AtuPLEX, DACC, HepaPLEX	Silence	Unterschiedliche Kombinationen aus kationischen Lipiden, Helferlipiden und PEGylierten Lipiden für zielgerichteten RNA-Transfer	238,239,254

Im Vergleich zu den Lipid-basierten Transfersystemen, befinden sich die Polymer-basierten Systeme zur Oligonukleotid-Transfektion noch in den frühen Phasen der klinischen Entwicklung. Das synthetisch hergestellte lineare Polyethylenimin (PEI), das eine hocheffiziente Transfektionseffizienz von Nukleinsäuren besitzt, befindet sich derzeit gleich in mehreren Ansätzen in klinischen Studien^{154,255,256}. Aufgrund von toxikologischen Bedenken entstanden aber in den letzten Jahren viele neue Polymer-basierte Ansätze, mit dem Ziel, die Biokompatibilität und die Transfektionseffizienz zu verbessern (Tabelle 2-10). Diese Ansätze basieren meist auf einer Modifikation des Polyethylenimins mit gewebespezifischen oder biodegradierbaren Substanzen^{138,139,147,257}, Quervernetzung von niedermolekularen PEI—Einheiten durch degradierbare Linker²⁵⁸⁻²⁶⁰, oder auch auf einer Verkapselung von PEI-RNA Komplexen in biodegradierbare Mikrosphären^{150,261,262}. Obwohl auch natürliche Polymere, wie die Polysaccharide Chitosan und Cyclodextrin, effektive RNA-Transfersysteme darstellen, werden sie in der klinischen Entwicklung bisher mehr als biodegradierbare PEI-Modifikationen eingesetzt^{257,263}. Das in der Klinik wohl am weitesten fortgeschrittene Oligonukleotid-transfizierende Polymer ist der Poly(lactid-co-glycoild) (PLGA) basierte *Local Drug Eluter* (LODER®). Dieser 0,8x5,5mm kleine polymerische Systemkomplex wird in das Tumorgewebe implantiert und sorgt so für eine verzögerte und kontinuierliche Freisetzung einer siRNA. Momentan befindet sich dieser Ansatz in Phase II der klinischen Entwicklung^{264,265}.

Tabelle 2-10: Übersicht Polymer-basierter Transfersysteme in der klinischen Entwicklung

Bezeichnung	Hersteller	Formulierung	Quelle
<i>In vivo</i> -jetPEI™	PolyPlus	Lineares Polyethylenimine (25kDa)	154,255,256
RONDEL®	Calando	PEGylierte Cyclodextrin-Polymer-Verbindungen	257,263
TheraPlas®	Celsion	Modifizierte LMW-Polyethylenimine	266,267
Solvamax® Proteosol® Captisol®	Ligand Biocydex	Bindung der RNA / DNA an polykationische modifizierte Cyclodextrin-Verbindungen	263,268
CriPec® (Core-crosslinked polymers)	Cristal	PEGylierte Polymere, die mit speziellen Linker-Substanzen an das zu transfizierende Agens gebunden werden	260,269-272
DPC™ (Dynamic polyconjugates)	Arrowhead	PEGylierte, amphiphile Polymere mit zielgebenden Modifikationen	271,273-275
NDC (nanoparticle-drug- conjugates)	Cerulean	Konjugation von Wirkstoff und Polymer durch Linkersystem	272

LODER® (Local Drug Eluter)	Silenseed	PLGA-basierter polymerischer Systemkomplex zur verzögerten Freigabe von RNA	264,265
-------------------------------	-----------	---	---------

Eine klinische Anwendung von Oligonukleotiden, die mit einem PAMAM-Dendrimer basierendem Transfersystem verabreicht werden, gibt es derzeit noch nicht. Durch die spezielle, stufenweise Synthesemethode besitzen die Dendrimere jedoch viele besondere Charaktereigenschaften. Nicht nur die einzigartige hochdefinierbare, sphärische Struktur, sondern auch die Möglichkeit der Oberflächensubstitution durch funktionelle Gruppen, machen PAMAM-Dendrimere als Oligonukleotid-Transfersystem hochinteressant. Der gezielte Einsatz von PAMAM-Dendrimern für den zytosolischen Transfer eines RIG-I Liganden zur Immunstimulation würde damit neue Perspektiven erschließen.

3 Ziel der Arbeit

Die wohl größte Herausforderung im Rahmen einer Oligonukleotid-basierten Therapie stellt der Transport zur und in die Zielzelle dar. Denn aufgrund der Instabilität der RNA oder DNA Moleküle aber besonders auch wegen ihrer hohen negativen Eigenladung, sind sie generell nicht in der Lage den physiologischen Gegebenheiten standzuhalten oder gar in die Zelle und so zum angestrebten Rezeptor zu gelangen. Der Einsatz von viralen oder nicht-viralen Transfervektoren ist demnach essentiell um den therapeutischen Effekt auszulösen. Demnach muss auch eine 5'-triphosphorylierte doppelsträngige RNA (3pRNA), die einen Liganden der zytosolisch lokalisierten Helikase RIG-I definiert, an ein solches Transfersystem gebunden werden um eine Aktivierung bewirken zu können.

Vor dieser Arbeit war ausschließlich das lineare Polyethylenimin (PEI) für den Transfer von 3pRNA im *in vivo* basierten System verwendet worden, allerdings ohne nähere Charakterisierung. Zudem herrschte Unklarheit über mögliche alternative Transfektionsmöglichkeiten.

Das Ziel dieser Arbeit war es demnach die Anwendung von PEI für den Transfer von 3pRNA näher zu charakterisieren und PAMAM-Dendrimere als ein potentiell, alternatives Transfersystem im Rahmen eines endosomalen und zytosolischen Transports *in vitro* zu evaluieren und *in vivo* zu bestätigen. Da die vielfältigen, durch RIG-I induzierbaren Eigenschaften, wie die Produktion von Typ-I Interferon oder auch die Initiation von Apoptose auf Tumorzellen, einen hoch interessanten therapeutischen Ansatz liefern, sollte ein besonderes Augenmerk auf der Anwendung der 3p-Dendriplexe im Rahmen einer antitumoralen Behandlung verschiedener Tumorentitäten gelegt werden.

Letztendlich galt es, diesen neuartigen Ansatz mit den bestehenden Formulierungen auf verschiedenen Ebenen zu vergleichen und einen automatisierten Herstellungsprozess zu entwickeln, der die Produktion der 3p-Dendriplexe gewährleistet und den Weg ebnet für die Herstellung eines applikationsfähigen, therapeutischen Arzneimittels.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Midisart 2000	Sartorius AG (Göttingen)
Analysenwaage TE 601	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav Typ VX-150	Systemec (Wettenberg)
Bechergläser	Schott (Mainz)
Eismaschine AF-20	Scotsman Ice Systems (Mailand; Italien)
Elektronische Pipetten eLine	Biohit (Rosbach v.d. Höhe)
ELISA - Reader Apollo LB912	Berthold (Bergisch Gladbach)
ELISA Waschapparatur Vacupette	VWR (Darmstadt)
En Vision 2104 Multilabel Reader	PerkinElmer (Rodgau)
Erlenmeyerkolben	Schott (Mainz)
Falkonständer	Carl Roth (Karlsruhe)
Fast Real-Time PCR System 7900HT	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Gefrierschrank -20°C	AEG-Elektrolux (Nürnberg)
Gefrierschrank -80°C	Hettich (Tuttlingen)
Gefriertruhe -150°C	Sanyo (San Diego; Kalifornien)
Gelelektrophorese (horizontal)	Peqlab (Erlangen)
Gelelektrophorese (vertikal)	CBS-Scientific (Del Mar; Kalifornien)
Geldokumentation	Peqlab (Erlangen)
Gel Imaging System (Odyssey FC)	LI-COR (Bad-Homburg)
Gelkammer mit Elektroschlitten	Peqlab (Erlangen)
Gewindflaschen	Schott (Mainz)
Heizschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Horizontalschüttler POS-300	Grant-bio (London; England)
Kolbenhubpipetten (Research)	Eppendorf (Hamburg)
Kolbenhubpipetten (Pipet Lite)	Rainin Mettler Toledo (Gießen)
Kühlschrank	AEG-Electrolux (Nürnberg)
LC480 Lightcycler	Roche (Mannheim)
LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences (Heidelberg)
MACS Multistand	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Magnetplatte mit Rührfunktion	VWR (Darmstadt)
Magnetrührer VWR	VWR (Darmstadt)
Mehrkanalpipette	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Mehrkanalpipette Ergonomic	VWR (Darmstadt)
Messzylinder 50ml / 100ml / 500ml / 1000ml	Schott (Mainz)

Mikroskop Eclipse TS100	Nikon (Düsseldorf)
Mr. Frosty Cryo freezing container	Nalgene (Roskilde; Dänemark)
Neugebauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
PCR - Tube Ständer	Carl Roth (Karlsruhe)
pH Meter HI 8424	HANNA Instruments (Kehl am Rhein)
Pipetboy Pipettierhilfe acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Präparierbesteck	Labotec Labor-Technik (Göttingen)
Precellys Homogenisator	VWR (Darmstadt)
Purelab Reinstwasseranlage Classic	ELGA (Celle)
Quadro MACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Restrainer (Fixiereinheit für Mäuse)	Biomedical Instruments (Zoellnitz)
Rollenmischer (Serie SRT)	Stuart (Staffordshire; UK)
Rotationsschüttler Tube Rotator H5600	VWR (Darmstadt)
Rotationsverdampferkolben, rund	Rettberg (Göttingen)
Spannungsquelle für Gelelektrophorese	Labnet (New York; USA)
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab (Erlangen)
Sterilbank HSC-Advance (Laminar Airflow)	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
TC20 Cell counter	BioRad (München)
Thermalcycler FlexCycler	Analytik Jena (Jena)
Trichter	Schott (Mainz)
Ultraschallblock	Hielscher (Bonn)
Ultrazentrifuge Beckman Coulter L-80	Beckman Coulter (Krefeld)
UV-Leuchttisch 60-ETX	VWR (Darmstadt)
Wasserbad Julabo TW 20	Julabo (Seelbach)
Wärmelampe	Tschibo (Bonn)
Vortex Reagenzglasschüttler	VELP Scientifica (Usmatelitalien)
Zellkulturinkubator Heracell 240/Herasafe	Heraeus Instruments (Hanau)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5430R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Galaxy mini	VWR (Darmstadt)
Zetasizer NanoS	Malvern Instruments (Herrenberg)

4.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ammoniumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Aqua Spüllösung	Braun (Melsungen)

Aqua Lonza	BioWhittaker (Verviers; Belgien)
Biocoll	Biochrom AG (Berlin)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Buffer RW1 Wash buffer / 220ml	Qiagen (Hilden)
Buffer RLT Lysis buffer / 220ml	Qiagen (Hilden)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth (Karlsruhe)
Chloroform (CHCl ₃)	Carl Roth (Karlsruhe)
Chloroquine diphosphate salt	Sigma Aldrich (Steinheim)
Citrat-Monohydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Diethylenpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H ₂ O)	Invitrogen (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ (HPO ₄))	Carl Roth (Karlsruhe)
DNA-Hybridisierungspuffer 10x	New England Biolabs (Ipswich; GB)
DreamTaq™ Green Buffer 10x	Fermentas (St. Leon-Rot)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Karlsruhe)
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Gibco (Karlsruhe)
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol (C ₂ H ₆ O) 99%	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol (C ₂ H ₆ O) 96% vergällt	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol (C ₂ H ₆ O) 70%	Otto Fischar (Saarbrücken)
Ethanol-Amin	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0.5M	PAA Laboratories (Pasching)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) / > 99%	Carl Roth (Karlsruhe)
FastDigest Puffer 10x	Fermentas (St. Leon-Rot)
Formaldehyd 37%	Carl Roth (Karlsruhe)
Formamid	Carl Roth (Karlsruhe)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco (Karlsruhe)
Gelatine	Sigma Aldrich (Steinheim)
Gene Ruler DNA Ladder (100bp/1kb)	New England Biolabs (Ipswich; GB)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe)
Glucose 10% (C ₆ H ₁₂ O ₆)	PolyPlus (Illkirch; Frankreich)
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Gylkolat	Sigma Aldrich (Steinheim)
Herarin-Natrium 25000	Ratiopharm (Ulm)
HEPES (Sulfonsäure) (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Carl Roth (Karlsruhe)
HEPES (Sulfonsäure) (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Imidazol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Isofluran	Abbot (Wiesbaden)
Isopropanol (C ₃ H ₈ O) absolut	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol (C ₃ H ₈ O) 70%	Otto Fischar (Saarbrücken)

L-(+)-Laktat	Sigma Aldrich (Steinheim)
L-Glutamin	Cambrex BioWhittaker (New Jersey; USA)
Lysis Buffer / BD Pharm Lyse	BD Bioscience (Heidelberg)
MEM NEAA (Aminosäuren;nicht-essentiell)	Gibco (Karlsruhe)
MEM Natrium-Pyruvat	Gibco (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol 99%	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma Aldrich (Steinheim)
MTT Substrate 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	Sigma Aldrich (Steinheim)
Natriumacetat (C ₂ H ₃ O ₂ x Na)	Merck (Darmstadt)
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl) 0.9%	Braun (Melsungen)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat (NaHPO ₄)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Nickel II chlorid Hexahydrat	Sigma Aldrich (Steinheim)
Optimem	Gibco (Karlsruhe)
Penicillin / Streptomycin	Cambrex BioWhittaker (New Jersey; USA)
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Phenol	Fluka Biochemica
RNA Wash buffer / 24ml	Zymo Research (Freiburg)
Rotiphorese® Gel 30 (Bisacrylamid)	Carl Roth (Karlsruhe)
Roti-Histofix 4%	Carl Roth (Karlsruhe)
RPMI 1640	Gibco (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl 2N)	Merck (Darmstadt)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 95%	Carl Roth (Karlsruhe)
Sodium Alginate	Sigma Aldrich (Steinheim)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
SYBR® Safe DNA Gel Stain	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq Puffer 5x	Promega (Madison; USA)
TBE Electrophoresis Buffer 10x	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
TBE Electrophoresis Buffer 10x	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
TMB Substrat Reagenz Set	BD Bioscience (Heidelberg)
Trehalose 0.5M	Sigma Aldrich (Steinheim)
TRIS	AppliChem GmbH (Darmstadt)
TRIS-Acetat-EDTA (TAE) 50x	Carl Roth (Karlsruhe)

TRIS-HCL pH 7.5 1M	Sigma Aldrich (Steinheim)
Trypanblau (C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin EDTA	Gibco (Karlsruhe)
Trizol	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)
Urea (CH ₄ N ₂ O)	Carl Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth (Karlsruhe)

4.1.3 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Aqua Ecotainer® / 1000ml	Braun (Melsungen)
BD Discardit TM II Syringe 2ml	BD Bioscience (Heidelberg)
BD Discardit TM II Syringe 5ml	BD Bioscience (Heidelberg)
BD Discardit TM II Syringe 10ml	BD Bioscience (Heidelberg)
BD Discardit TM II Syringe 20ml	BD Bioscience (Heidelberg)
BD Mirco-Fine + U40 Insulinspritze (1ml)	BD Bioscience (Heidelberg)
BD Microlance TM 3	BD Bioscience (Heidelberg)
BD Mircotainer SST Serumröhrchen mit Trenngel	BD Bioscience (Heidelberg)
Cell Scraper 39cm	VWR (Darmstadt)
Cellstar® tubes 15ml graduated / conical bottom	Greiner Bio-One (Solingen)
Cellstar® tubes 50ml graduated / conical bottom	Greiner Bio-One (Solingen)
Cell Strainer 70µm Nylon	Corning Lifescience (New York; USA)
Cluster tubes / 1,2ml / Polypropylene	Corning Lifescience (New York; USA)
Deckgläschen	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Einmal-Kanülen Sterican (vers. Größen)	Braun (Melsungen)
ELISA Platte (groß well Format)	Greiner Bio-One (Solingen)
ELISA Platte (klein well Format)	Corning Lifescience (New York; USA)
FACS-Röhrchen (Glas/groß)	Sarstedt (Nürnbrecht)
FACS-Röhrchen (klein)	Corning Lifescience (New York; USA)
Feather Disposable Scalpel / N°11 / spitz	Feather (Osaka; Japan)
Feather Disposable Scalpel / N°11 / rund	Feather (Osaka; Japan)
Glaspasteurpipette	Brand (Wertheim)
Inject® 100 / 5ml	Braun (Melsungen)
Inject® F / 1ml /Tuberkulin	Braun (Melsungen)
Kryoröhrchen (2ml)	Greiner Bio-One (Solingen)
Low Temperature Freezer Vials / 1.2ml	VWR (Darmstadt)
MACS-Nylonfilter (30µm)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACS-Separationssäule (MS/LD/LS)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

Mikroplatte 96well / PS Flatbottom	Greiner Bio-One (Solingen)
Mikroplatte 96 well / PS U-bottom	Greiner Bio-One (Solingen)
Microvette® CB 300 LH	Sarstedt (Nürnberg)
Mini Quick DNA Spin Columns	Roche (Mannheim)
Multiwell 48 well	Corning Lifescience (New York; USA)
Parafilm	Bemis (Meckenheim)
Pasteurpipetten aus Glas 150mm	Brand (Wertheim)
PCR SingleCap 8er-SoftStrips / 0.1ml / farblos	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)
PCR tubes 0.2ml / thinwall / flat cap	Axygen / Fisher (Schwerte)
pH-Fix 4.5 – 10.0	Carl Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen (vers. Größen)	Greiner Bio-One (Solingen)
Pipettenspitzen (vers. Größen) mit Filter (Aerosol)	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)
Petrischale	Greiner Bio-One (Solingen)
Plastikpipetten (2ml/5ml/10ml/25ml)	Corning Lifescience (New York; USA)
Reagenzreservoirs 60ml	Brand (Wertheim)
Reagiergefäß 0,5ml / no safelog	Sarstedt (Nürnberg)
Reagiergefäß 1,5ml / no safelog	Sarstedt (Nürnberg)
Reagiergefäß 2ml / no safelog	Sarstedt (Nürnberg)
Seripettor 10ml max	Brand (Wertheim)
Serologische Pipette 25ml (Costar® Stripette)	Corning Lifescience (New York; USA)
Serologische Pipette 10ml (Cellstar®)	Greiner Bio-One (Solingen)
Serologische Pipette 25ml (Costar® Stripette)	Corning Lifescience (New York; USA)
Spin Columns for DNA Extraction CB-C250	Centic Biotec (Heidelberg)
Spitzenfilter	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Sterican® 20G / 0.9 x 40mm	Braun (Melsungen)
Sterilfilter (0,2µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Tissue Culture Flask, T175, Stand. Bel. K	Sarstedt (Nürnberg)
Tissue Culture Flask, T75, Stand. Bel. K	Sarstedt (Nürnberg)
Tissue Culture Flask, T25, Stand. Bel. K	Sarstedt (Nürnberg)
Tissue Culture Schale, 100, Standard	Sarstedt (Nürnberg)
Tubes for Cell Cytometry / 5ml / 75 x 12 mm	Sarstedt (Nürnberg)
U-40 Insulinspritzen (0.3 x 13mm)	BD Bioscience (Heidelberg)
UV-Küvette mikro / 70µl / 12,5 x 12,5 x 45mm	Brand (Wertheim)
Venofix® Safety / 0.8 x 19mm / Luer Lock / 21G	Braun (Melsungen)
Zellkulturttestplatte 6 well	Techno Plastic Products (Trasadingen; Schweiz)
Zellkulturttestplatte 12 well	Techno Plastic Products (Trasadingen; Schweiz)
Zellkulturttestplatte 24 well	Techno Plastic Products (Trasadingen; Schweiz)
Zellkulturttestplatte 96 well / Flatbottom	Techno Plastic Products (Trasadingen; Schweiz)

Zellkulturttestplatte 96 well / U-bottom	Techno Plastic Products (Trasadingen; Schweiz)
Zellkulturschalen	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellsieb (40µm)	BD Bioscience (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One (Solingen)
Zymo-Spin TM IIIC / 250 pack	Zymo Research (Freiburg)

4.1.4 Pufferlösungen und Kulturmedien

Puffersysteme	Zusammensetzung
ELISA-Assaypuffer	
IL-1β; IL-6; IL-12p70; IL-12p40; TNFα (human & murin)	1 x PBS 10% (v/v) FCS pH 7.0
IFNα (human)	1x PBS 1% (v/v) BSA 0.05% Tween 20 pH 7.0
IFNα (murin)	1x PBS 10% (v/v) FCS 0.05% (v/v) Tween 20 (0.05% (v/v) Natriumazid bei Langzeitinkubation)
IP-10 / CXCL-10 (human)	1 x PBS 10% (v/v) FCS pH 7.0
IP-10 / CXCL-10 (murin)	1x PBS 1% (v/v) BSA pH 7.2 – 7.4 steril filtriert (0,2µm)
ELISA-Beschichtungspuffer	
IL-1β; IL-6; TNFα (human & murin) IL-12p70; IL-12p40 (human)	0.1M Natriumcarbonat; pH 9.5 bestehend aus: 7.13g NaHCO ₃ 1.59g Na ₂ CO ₃ ad 1L H ₂ O mit NaOH auf pH 9.5 einstellen
IL-12p40 (murin)	0.2M Natriumphosphat; pH 6.5 bestehend aus: 11.8g Na ₂ HPO ₄ 16.1g NaH ₂ PO ₄ ad 1L H ₂ O mit NaOH auf pH 6.5 einstellen
IFNα (human)	1x PBS
IFNα (murin)	0.2M Natriumphosphat; pH 6.5 bestehend aus: 11.8g Na ₂ HPO ₄ 16.1g NaH ₂ PO ₄ ad 1L H ₂ O mit NaOH auf pH 6.5 einstellen
IP-10 / CXCL-10 (human)	0.1M Natriumcarbonat; pH 9.5 bestehend aus: 7.13g NaHCO ₃

	1.59g Na ₂ CO ₃ ad 1L H ₂ O mit NaOH auf pH 9.5 einstellen
IP-10 / CXCL-10 (murin)	1x PBS
ELISA-Wasch-Puffer	
Für alle ELISA Systeme anwendbar	1x PBS 0.05% (v/v) Tween 20 pH 7.2 – 7.4
Andere Puffersysteme / Lösungen	
DNase Lösung zur RNA Extraktion	6,25% DNase I 10% 10x DNase Reaktionspuffer 3,75% DNase/RNase freies Wasser 80% RNase Wash Puffer
Erylyse Lösung	BD Pharm Lyse Buffer 1:10 In Aqua Spüllösung
FACS Puffer	1x PBS 2% (v/v) FCS
MACS Puffer	1x PBS 2% (v/v) FCS 2mM EDTA pH 7,2 - 7,4
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE-Puffer)	40mM Tris 20mM Essigsäure 1mM EDTA
Tris-EDTA Puffer (TE-Puffer)	10mM Tris-HCl 1mM EDTA pH 8,0
Kulturmedien	
Zusammensetzung	
DMEM Medium Kulturmedium für A549 Zellen	DMEM 10% FCS 2mM L-Glutamin 0,1mM MEM NEAA (nicht-essentielle AS) 1mM MEM Natrium-Pyruvat 1% Penicillin / Streptomycin
Einfriermedium	90% (v/v) FCS 10% (v/v) DMSO
mDC und pDC Kulturmedium 1 (murin)	RPMI 1640 10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin / Streptomycin 1% MEM Natrium – Pyruvat 1% MEM NEAA (nicht-essentielle AS)
pDC Kulturmedium 2 (murin)	RPMI 1640 10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin / Streptomycin 1% MEM Natrium – Pyruvat 1% MEM NEAA (nicht-essentielle AS) 3% <i>Fms-related tyrosine kinase 3 Ligand</i> (FLT3L)
mDC Kulturmedium (murin)	RPMI 1640 10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin / Streptomycin

	1% MEM Natrium – Pyruvat 1% MEM NEAA (nicht-essentielle AS) 3% <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (GM-CSF)
RPMI Medium Kulturmedium für: humane Primärzellen (z.B.PBMC) humane THP-1 Zellen murine B16 / HcMel12 Melanomzellen	RPMI 1640 10% FCS 2mM L-Glutamin 1% Penicillin / Streptomycin

Das in vielen Puffersysteme und Kulturmedien verwendete FCS (Fötale Kälberserum; *fetal calf serum*) wurde vor dessen Zugabe 30 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert. Bei diesem Vorgang werden ganz allgemein störende Einflüsse des Serums beseitigt und zusätzlich auch die Komplementbindungskapazität inaktiviert.

4.1.5 Kits, Enzyme, Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
DNase I	Roche (Mannheim)
Donkey Anti-Rabbit F(ab) 2-Peroxidase	Sigma Aldrich (Steinheim)
DreamTaq™ DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
FastAP™ Thermosensitive alk. Phosphatase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Human IFN α Module Set	Bender MedSystems (Wien; Österreich)
Human IFN β Module Set	R&D Systems (Minneapolis; USA)
Human IFN γ Module Set	R&D Systems (Minneapolis; USA)
Human IL-1 β Module Set	BD Bioscience (Heidelberg)
Human IL-6 Module Set	R&D Systems (Minneapolis; USA)
Human IL-12p70 Module Set	BD Bioscience (Heidelberg)
Human IP-10 (CXCL-10) Module Set	BD Bioscience (Heidelberg)
Human TNF α Module Set	BD Bioscience (Heidelberg)
Mouse IFN α Module Set	PBL Biomedical Laboratories (New Jersey; USA)
Mouse IFN γ Module Set	BD Bioscience (Heidelberg)
Mouse IL-1 β Module Set	BD Bioscience (Heidelberg)
Mouse IL-6 Module Set	BD Bioscience (Heidelberg)
Mouse IL-12p40 Module Set	BD Bioscience (Heidelberg)
Mouse IP-10 (CXCL-10) Module Set	R&D Systems (Minneapolis; USA)
Mouse TNF α Module Set	BD Bioscience (Heidelberg)
SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Taq DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific (Bonn)

4.1.6 MACS Kits und Materialien

Produkt	Hersteller
CD14 MircoBeads (human)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CD305 (BDCA-4 / Neuropilin-1)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACS-Separationssäulen (MS, LS, LD)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

4.1.7 Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenz	Hersteller
Dotap	Carl Roth (Karlsruhe)
<i>In vivo</i> jetPEI™	PolyPlus (Illkirch; Frankreich)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
PAMAM dendrimer, Generation 5	Sigma Aldrich (Steinheim)
Poly-L-Arginin P4663	Sigma Aldrich (Steinheim)
Protamin Valeant	Valeant (Berlin)

4.1.8 Nukleinsäuren

Interne Bezeichnung	Hersteller
polyA	Biomers (Ulm)
polyCA	Biomers (Ulm)
polyAC	Biomers (Ulm)
9.2s	Biomers (Ulm)
R3011 - R3026	Biospring (Frankfurt a.M)
R2189 - R2199	Biospring (Frankfurt a.M)
CpG 2006 ODN	Metabion (Planegg)
IVT4 fwd 5' Promoter	Metabion (Planegg)
IVT4 rev 3' Antisense	Metabion (Planegg)
3p-select-24	Bonn (hauseigene Synthese)

Alle lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt und stets unter DNase/RNase freien Konditionen gehalten. Die genauen Sequenzen der einzelnen Oligonukleotide befinden sich im Anhang dieser Dissertation.

4.1.9 Zellen / Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
Zelllinien (Mensch; homo sapiens)	
A549	Humane Lungenkarzinomzelllinie

D04mel	Humane Melanomzelllinie
PBMC (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)	Isolation aus Buffy Coats von gesunden Spendern (Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn)
THP-1	Humane monozytäre leukämische Zellen

Zelllinien (Maus; *mus musculus*)

B16F10	Murine Melanomzelllinie
HCmel12	Murine Melanomzelllinie
Hepatoma 129 (Hepa129)	Murine Hepatomzelllinie
L929 Zellen	Murine Fibrosarkom-Zelllinie
129 WT Makrophagen	Makrophagen-Zelllinie gewonnen aus 129/SV Wildtyp-Mäusen
Primärzellen <i>Plasmacytoid dendritic cells (pDC)</i> <i>Bone marrow dendritic cells (bmDC)</i> <i>peripheral blood mononuclear cells (PBMC)</i>	Isoliert aus Blut bzw. Knochenmark von Wildtyp Mäusen oder transgenen Mäusen

4.1.10 FACS-Antikörper

FACS – Antikörper	Hersteller
B220 (PerCp / Cy5.5)	BD Bioscience (Heidelberg)
CD3 (APC)	BD Bioscience (Heidelberg)
CD4 (APC / Cy7)	BD Bioscience (Heidelberg)
CD8 (PerCp / Cy5.5)	BD Bioscience (Heidelberg)
CD11b (FITC)	BD Bioscience (Heidelberg)
CD11c (APC)	BD Bioscience (Heidelberg)
CD27 (PerCp / Cy5.5)	BD Bioscience (Heidelberg)
CD49 (Pacific Blue)	BD Bioscience (Heidelberg)
CD69 (PAC Orange / EF605NC)	BD Bioscience (Heidelberg)
CD107a	BD Bioscience (Heidelberg)
CD137 (FITC)	BD Bioscience (Heidelberg)
CD154 (PE)	BD Bioscience (Heidelberg)
Hoechst	Hoechst (Frankfurt)
NK 1.1 (PE)	BD Bioscience (Heidelberg)
Sca1 (APC / Cy7)	BD Bioscience (Heidelberg)
YoPro	BD Bioscience (Heidelberg)

4.1.11 Primer

Zielprotein	Primer fwd (5' – 3')	Primer rev (5' – 3')	Effizienz
Human β -Aktin	CCACCGATCCACACAGAGTA	GGATGCAGAAGGAGATTACTGC	2,121
Human RIG-I	GAAAGACTTCTTCAGCAATGTCC	GTTCTGCAGCTTTTCTTCAA	2,013
Human IP-10	GAAAGCAGTTAGCAAGGAAGGT	GACATATACTCCATGTAGGGAAGTGA	2,005
Human IFN β	CTTTGCTATTTTCAGACAA GATTCA	GCCAGGAGGTTCTCAACAAT	2,034
Murin β -Aktin	CAGCCAACCTTACGCCTAGC	GGGCCACGAGTGTCTAC	2,085
Murin RIG-I	GAAGATTCTGGACCCCACTA	TGAATGTACTGCACCTCCTCA	2,056
Murin IP-10	GAAAGACTTCTTCAGCAATGTCC	CTTTCTAGTTCCTGCAGCTTTTCT	2,013
Murin IFN β	TCCAGAATGTCTTTCTTGCTTCA	GACGTACAACAATAGTCTCATTCCA	2,012

4.1.12 Mauslinien

Mauslinie	Herkunft
C57BL/6j Mäuse	Janvier
C3H/HEN Mäuse	Charles River
RIG-I ^{-/-}	RIG-I defiziente Mauslinie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. W. Barchet)

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

4.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle von mir verwendeten primären Zellen und Zelllinien wurden in Brautschänken kultiviert, die mit Kohlenstoffdioxid begast wurden (5% CO₂ (v/v)), eine konstante Temperatur von 37°C und eine Luftfeuchtigkeit von 95% besaßen.

4.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Manuelle Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer

Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt, wobei zuvor die nicht-vitalen Zellen mit einer Trypanblau-Färbung farblich kenntlich gemacht wurden. Trypanblau kann durch seine sauren Eigenschaften nur von toten, nicht-vitalen Zellen aufgenommen werden, da diese eine defekte Zellmembran besitzen. Innerhalb der Zelle kann das Trypanblau dann an Zellproteine binden, die dann dafür sorgen, dass diese toten Zellen blau eingefärbt werden, was unter dem Mikroskop deutlich sichtbar ist.

Zur Ermittlung der vitalen Zellen wurden 50µl Zellsuspension mit 50µl einer 0.04% Trypanblau-Lösung (1:10 Verdünnung der 0.4% Stocklösung mit PBS) gut vermengt und 10µl dieser 1:1 Mischung dann in die Neubauer-Kammer gefüllt. Bei vielen Zellsuspensionen musste aber aufgrund der hohen Zelldichte stärker mit Trypanblau verdünnt werden (bis zur 1:20 Verdünnung). Bei einer 10-fachen Vergrößerung zählt man dann unter dem Mikroskop die Zellen, die sich in einem großen Quadrat der Neubauer-Kammer befinden (entsprechen 4x4 kleine Quadrate) und berechnet dann die Gesamtzellzahl der Zellsuspension mit der folgenden Formel:

$$Z [\text{Zellen/ml}] = N \times f \times 10^4$$

mit:

Z = Gesamtzellzahl

N = vitale Zellen in einem Großquadrat

f = Verdünnungsfaktor

Automatisierte Zellzahlbestimmung mittels dem *TC20 Cell Counter*

Neben der Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Kammer habe ich die Zellzahl auch automatisch bestimmen lassen. Bei dieser Methode wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau vorsichtig vermengt. 10µl dieser 1:1 Mischung wurden dann in eine für das Gerät spezielle Zählkammer (*TC20™ counting slide*) pipettiert. Dann wurde die Zählkammer in den TC Cell Counter geschoben. Mit Hilfe eines angezeigten Histogramms war man in der Lage auch den Größenbereich der Zellen auszuwählen, die gezählt werden sollten. Am Ende der Messung wurde dann immer die Gesamtzellzahl und die Lebendzellzahl in der Einheit [Zellen/ml] angegeben.

4.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Für die Kryokonservierung von Zellen wurde zunächst ein Einfriermedium hergestellt, welches zu 90% aus FCS und zu 10% aus DMSO (v/v) bestand. Dann wurden die Zellen (XX max Menge) in 0,5ml Zellmedium aufgenommen und tropfenweise 0,5ml Einfriermedium hinzugegeben und gut vermengt. Dieser Ansatz wurde in Kryoröhrchen überführt und in einen speziellen Einfrierbehälter gestellt. Dieser Einfrierbehälter (Mr.Frosty) wurde zuvor mit 4°C kaltem Isopropanol befüllt und dann mit den Kryoröhrchen bei -80°C mindestens 24 Stunden lang gelagert. Anschließend wurden die Zellen in einer -150°C Gefriertruhe aufbewahrt.

4.2.1.4 Isolation von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Zu den humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes zählen alle einkernigen Blutzellen, die einen runden Zellkern besitzen. Da die Lymphozyten, die Monozyten, dendritische Zellen und Makrophagen zu dieser Art von Zellen zählen, spielt diese Zellfraktion für das Immunsystem und somit auch in der immunologischen Forschung eine sehr wichtige Rolle.

Die Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen aus den sogenannten *Buffy Coats* beruht auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Da sich die verschiedenen Blutbestandteile in ihrer Dichte unterscheiden ist es möglich mit Hilfe eines Dichtegradienten die verschiedenen Zellen auch in unterschiedliche Phasen aufzuteilen. Durch die Verwendung von einem isotonischen, hydrophilen Polysaccharid (Biocoll) mit einer Dichte von 1,077g/ml bildet sich eine obere Schicht

mit Zellen und Komponenten, die eine Dichte kleiner als 1,077g/ml besitzen, wie z.B. den Thrombozyten, aber auch Zytokine, Hormone und Elektrolyte. In der unteren Schicht befinden sich alle Zellen und Komponenten, mit einer Dichte größer als 1,077g/ml. In dieser Schicht sind die Erythrozyten und polymorphkerige Zellen (eosinophile und neutrophile Granulozyten) zu finden. Die mononukleären Zellen befinden sich in der mittleren weißlichen Schicht, dessen Bestandteile dann genau die Dichte von 1,077g/ml besitzen.

Um diese Schicht zu erhalten wurde zunächst das Blut von gesunden Spendern in einem 50ml Zentrifugenröhrchen mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0.9%) in einem Verhältnis von 1:2 vermengt. 35ml diese verdünnten Blut-Mischung wurden dann ganz langsam auf 15ml vorgelegtes Biocoll (Lymphozytenseparationsmedium) pipettiert. Diese dann insgesamt 50ml wurden dann 20 Minuten bei 800g (RT / Bremse = 0) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen vorsichtig aus der Zentrifuge entnommen und mit einer 10ml serologischen Pipette die mittlere, weißliche Interphase isoliert. Diese Interphase, die die gewünschten PBMC beinhaltete, wurde dann in ein frisches 50ml Zentrifugengefäß überführt und auf 50ml mit NaCl 0.9% aufgefüllt und bei 400g und RT weitere sieben Minuten zentrifugiert. Das dadurch entstandene Zellsediment wurde dann in 5ml Erylyse-lösung aufgenommen und fünf bis zehn Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert um die noch vorhandenen Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde wieder mit NaCl 0.9% auf 50ml aufgefüllt und bei 400g und RT sieben Minuten zentrifugiert um die PBMC zu waschen. Das dann finale Zellsediment wurde dann in 20ml RPMI Kulturmedium aufgenommen und auf Eis gehalten. Die PBMC wurden dann gezählt und für Standard-Stimulationsexperimente 4×10^5 Zellen in 50µl pro Vertiefung einer 96-Lochflachbodenplatte ausgesät.

4.2.1.5 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus Frischblut von Mäusen

Die Isolation von PBMC verschiedener Spezies wurde aus Frischblut vorgenommen. Um möglichst viele Zellen in möglichst guter Qualität zu erhalten, war es wichtig das Blut nach der Abnahme so schnell wie möglich (innerhalb vier bis sechs Stunden) zu verarbeiten.

Um die PBMC aus Frischblut zu isolieren wurde eine minimale Menge von etwa 20ml Blut benötigt. Das bedeutete, dass im Falle der Maus für diese Menge das gewonnene Blut von mehreren Spendern gepoolt werden musste. Um genügend murine PBMC für ein Experiment zu isolieren wurden 30 C57BL/6 Mäuse retroorbital die maximale Menge Blut entnommen (ca. 0,7 – 1,5 ml) und die Mäuse anschließend geopfert. Diese 30 Blutproben wurden dann gepoolt.

Dieses Blut wurde dann pur ohne vorherige Verdünnung langsam auf das Lymphozytenseparationsmedium (Biocoll) geschichtet, bei 800g (RT) 20 Minuten lang gefugt und dann auch hier die weißliche Interphase mit einer serologischen Pipette abgenommen. In einem 50ml Zentrifugenröhrchen wurde dann diese Interphase mit PBS auf 50ml aufgefüllt, ein weiteres Mal bei 400g sieben Minuten lang bei RT gefugt und anschließend einer zehn minütigen Erylyse im Brutschrank (37°C) unterzogen. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden dann die isolierten PBMC gezählt, mit Einfriermedium versehen und dann bei -80°C eingefroren (langsam runterkühlen mittels einem speziellen Einfriercontainer / Mr. Frosty).

4.2.1.6 Isolation von humanen Monozyten

Aus humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) können mit Hilfe eines indirekten magnetischen Markierungssystems (Monocyte Isolation Kit II / Miltenyi Biotec) die darin enthaltenen Monozyten aufgereinigt werden. Dieses Verfahren basiert auf der sogenannten „Negativselektion“. Danach werden alle in den PBMC befindlichen Zelltypen außer den Monozyten mit Biotin-konjugierten Antikörpern (Monoklonale Antikörper gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und Glykophorin A) markiert. Diese Zelltypen sind alle Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen), die dendritischen Zellen (DCs) und basophile Granulozyten. Anti-Biotin MicroBeads binden dann an die Antikörper und sorgen dafür, dass die markierten Zellen in einer magnetischen Säule zurückgehalten werden und nur die nicht markierten Monozyten die Säule passieren und aufgefangen werden können.

Für die Isolation von humanen Monozyten wurden demnach zunächst humane PBMC aus Buffy Coats gewonnen und deren Lebendzellzahl bestimmt. Nach kurzem zentrifugieren bei 4°C (10min / 300g) wurden die Zellen in wenig, kalten MACS Puffer aufgenommen (10µl Puffer pro 10⁷ Zellen), resuspendiert und anschließend das FcR Blocking Reagenz (10µl pro 10⁷ Zellen) und der Biotin-Antikörper Cocktail (10µl für 10⁷ Zellen) hinzugegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4-8 °C wurden dann die Anti-Biotin MicroBeads zugefügt (20µl pro 10⁷ Zellen), gut vermengt und weitere 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit MACS Puffer werden die Zellen dann in 3ml MACS-Puffer aufgenommen und über einen 40µm Nylon-Filter auf eine LD-Säule gegeben, die in einen Standmagneten (MACS-Separator) eingespannt war. Dieser Magnet hielt dann die markierten Zellen zurück, wohingegen die nicht markierten Monozyten die Säule durchfließen konnten. Unter der Säule befand sich dann ein auf Eis gehaltenes Zentrifugenröhrchen (15ml), welches dann die Monozytenfraktion auffing. Nach dreimaligem Waschen der Säule wurden die erhaltenen Monozyten dann gefugt, mit NaCl 0.9% gewaschen und zuletzt gezählt. Für anschließende Stimulationsversuche werden die Zellen in RPMI Kulturmedium aufgenommen und jeweils 2x10⁵ Monozyten pro Vertiefung in einer 96-Lochflachbodenplatte ausgesät.

4.2.1.7 Isolation von humanen myeloiden dendritischen Zellen (mDCs)

Um aus humanen PBMCs myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) zu isolieren macht man sich auch hier das Prinzip der magnetischen Separation zu Nutze. Mit Hilfe des *CD1c (BDCA-1)⁺ Dendritic Cell Isolation Kit* von Miltenyi Biotec ist es möglich die BDCA-1⁺ dendritischen Zellen über ein zweistufiges, magnetisches Verfahren zu gewinnen.

Nach der Isolation der PBMCs wurden diese in MACS Puffer aufgenommen (200µl pro 10⁸ Zellen) und mit FcR Blocking Reagenz versetzt (100µl pro 10⁸ Zellen). Im diesem ersten Schritt folgte dann die magnetische Markierung der BDCA-1-exprimierenden B-Zellen mit CD19 MicroBeads und die Zugabe von CD1c (BDCA-1)-Biotin. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 4-8°C wurden die Zellen gewaschen, gefugt und mit 500µl MACS Puffer aufgenommen. Dieser Ansatz wurde dann über einen 40µm Nylonfilter auf eine LD-Säule gegeben, die an einem Standmagneten befestigt war. So wurden alle CD19⁺ BDCA-1-exprimierenden B-Zellen in der Säule zurückgehalten,

während alle unmarkierten Zellen diese passierten und durch ein zweimaliges Waschen mit 1ml MACS Puffer aus der Säule herausgespült und mit einem auf Eis gelagerten Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurden. Diese nun CD19⁺ depletierte Fraktion wurde dann gefugt (300g/4°C/10min), mit MACS Puffer resuspendiert, 100µl Anti-Biotin MicroBeads hinzugegeben und weitere 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert. Nach Zugabe von 10ml MACS Puffer und Zentrifugation bei 300g für 10 Minuten wurde das Zellsediment in 500µl MACS Puffer aufgenommen und über einen 40µm Nylonfilter auf eine MS-Säule gegeben, die auch zuvor an einem magnetischen MACS-Seperator eingespannt war. In diesem zweiten Schritt wurden dann die BDCA-1⁺ myeloiden dendritischen Zellen in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierte Fraktion die Säule passierte. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 500µl MACS Puffer konnte dann die unmarkierte Fraktion vollständig aus der Säule ausgewaschen und verworfen werden. Mit Hilfe eines Säulenstempels und 1ml MACS Puffer wurden dann die an der Säule gebundenen BDCA-1⁺ mDCs aus der Säule eluiert. Um die Reinheit der BDCA-1⁺ Zellen zu erhöhen wurde die magnetische Separation unter Verwendung einer zweiten MS-Säule wiederholt und die nun isolierten mDCs in RPMI Zellkulturmedium aufgenommen und gezählt. Für Stimulationsversuche wurden 1x10⁵ Zellen pro Vertiefung in einer 96-Lochflachbodenplatte ausgebracht.

4.2.1.8 Isolation von humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC)

In den isolierten humanen PBMCs befinden sich neben den Lymphozyten (70-90%), Monozyten (10-30%) und Makrophagen nur ca. 1-2% plasmazytoide dendritische Zellen (pDC). Um diese aus den PBMCs zu isolieren macht man sich auch hier das Prinzip der magnetischen Zellaufreinigung (*magnetic cell sorting / MACS*) zu Nutze. BDCA-4 (*blood dendritic cell antigen-4*) wird speziell nur auf pDCs exprimiert und wird daher im CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MircoBeads Kit (Miltenyi Biotec) für die selektive Separation dieses Zelltyps aus humanen PBMCs ausgenutzt.

Dazu wurden humane PBMCs wie zuvor beschrieben aus Buffy Coats isoliert und dessen Zellzahl bestimmt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 300g wurde das Zellsediment in MACS Puffer aufgenommen (300µl pro 10⁸ Zellen) und FcR Blocking Reagenz (100µl pro 10⁸ Zellen) hinzugegeben. Das Blocking Reagenz verhindert die unspezifischen Bindungen des CD304 Antikörpers an die FC-Rezeptoren. Dann folgte die Zugabe der CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MircoBeads (100µl pro 10⁸ Zellen). Nach Inkubation für 15 Minuten bei 4-8°C wurde 10ml MACS Puffer zugefügt, erneut zentrifugiert (300g/10min) und dann das Zellsediment mit 500µl MACS Puffer aufgenommen. Dieser Ansatz wurde dann auch über einen 40µm Nylonfilter auf eine LS-Säule gegeben, die zuvor an einem Standmagneten angebracht wurde und mit 3ml MACS Puffer durchgespült wurde. All die Zellen, die CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MircoBeads gebunden hatten, wurden somit an der magnetischen Säule zurückgehalten und alle CD304 negativen Zellen durch die Säule gespült. Mit einem Säulenstempel wurden dann die gebundenen CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1)⁺ Zellen in ein vorgelegtes Zentrifugenröhrchen gedrückt. Um die Reinheit und somit die Qualität dieser Zellen zu erhöhen wurde der Vorgang nochmal mit einer MS-Säule wiederholt. Die dann durch die MS-Säule gedrückte Fraktion wurde mit RPMI Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für Stimulationsversuche wurden 2x10⁵ Zellen pro Vertiefung in einer

96-Lochflachbodenplatte ausgesät.

4.2.1.9 Isolation von murinen Knochenmarkszellen und Differenzierung zu mDCs oder pDCs

Für die Gewinnung von murinen myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) oder plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) aus dem Knochenmark von Mäusen, wurden die Mäuse zunächst durch einen Genickbruch getötet. Die Vorder- und Hinterläufe der Maus wurden dann abgetrennt und die Knochen freigelegt und ins PBS aufbewahrt. Mit einer Spritze pDC-Kulturmedium 1 aufgezogen, die Knochenstücke an den Gelenken vorsichtig aufgeschnitten, so dass der Knochenkanal frei lag und anschließend mit einer Spritze das Knochenmark langsam aus den Knochen gespült, welches in einem 50ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt (1500rpm / 5 min / RT) wurde das Zellpelett dann in 10ml Erylyse-Puffer aufgenommen. Während einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die störenden Erythrozyten vollständig lysiert. Anschließend wurde auf 50ml mit PBS aufgefüllt, erneut zentrifugiert (1500rpm / 5 min / RT) und die Zellen nach Aufnahme in DC-Kulturmedium 1 gezählt. Um diese Knochenmarkszellen dann zu pDCs differenzieren zu lassen wurden die gesamten Zellen einer Maus in vier Vertiefungen einer 6-Lochflachbodenplatte gleichmäßig verteilt. Jeder Vertiefung erhielt zudem noch 3ml pDC-Kulturmedium 2 (inklusive 3%FLT3L). Dieser Ansatz wurde dann sieben Tage ohne Mediumwechsel im Brutschrank bei 37°C und 5% CO² inkubiert, was die Proliferation der Zellen begünstigt. Nach dieser Inkubationszeit wurden die adhärennten Zellen unter Verwendung einer 0.5M EDTA Lösung sehr vorsichtig vom Plattenboden abgelöst und gesammelt. Mittels der MACS-Separation Methode konnten die B220⁺ pDCs sauber isoliert werden. Für eine qualitative Kontrolle wurden die Zellen auch noch einer FACS-Analyse unterzogen, bei der die Zellen mit CD11b, CD11c und B220 markiert wurden. pDC sollten CD11b und CD11c negativ und B220 positive Zellen darstellen. Für Stimulationsversuche wurden jeweils 4x10⁴ pDCs pro Vertiefung einer 96-Lochflachbodenplatte ausgesät.

Um die Differenzierung zu mDCs zu erreichen, wurden 2x10⁵ Knochenmarkszellen in jeweils eine Vertiefung einer 6-Lochflachbodenplatte gegeben und mit 3ml mDC-Kulturmedium (inklusive GM-CSF). Auch hier wurden die Zellen sieben Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert, anschließend mit 0.5M EDTA-Lösung vorsichtig abgelöst und gezählt. Hier wurden für Stimulationsversuche 2x10⁵ mDCs in eine Vertiefung einer 96-Lochbodenplatte gegeben.

4.2.1.10 Isolation von murinen Knochenmarkszellen und Differenzierung zu BMDM

Für die Generierung von murinen Makrophagen (BMDM = bone marrow derived macrophages) wurden C57BL/6 Mäuse durch einen Genickbruch getötet, die Vorder- und Hinterläufe abgetrennt und diese dann mit Hilfe einer Spritze mit feiner Kanüle durchgespült. Die Knochenmarkszellen wurden zunächst in PBS gesammelt und die Zellzahl bestimmt. 1x10⁷ Zellen wurden anschließend in 15ml DMEM, supplementiert mit 30% L929-Zellkulturüberstand als Quelle des Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CFS) aufgenommen, in einer 10cm Zellkulturschale ausgebracht und bei 37°C / 5% CO₂ gehalten. Nach 7 Tagen wurde der Überstand der Zellen verworfen und die adhärennten Zellen mit PBS /EDTA 2mM 10min bei 37°C inkubiert, um diese abzulösen. Für

Stimulationsexperimente wurden jeweils 1×10^5 Zellen in 100 μ l DMEM-Medium pro Vertiefung einer 96-Lochflachbodenplatte ausgesät.

4.2.1.1 Generierung von L929-Zellkulturüberstand

2×10^6 L929-Zellen wurden in 100ml DMEM-Komplettmedium aufgenommen und in einer T175-Zellkulturflasche ausgebracht. Nach 10 Tagen Inkubation bei 37°C / 5% CO_2 wurden der Überstand der Zellen abgenommen und mittels einem $0,22\mu\text{m}$ Filter sterile filtriert.

4.2.2 Transfektionsmethoden

4.2.2.1 Herstellung verschiedener Transfektionsansätze für die Stimulation von Zellen

Transfektion mit Dotap

Durch die Fähigkeit negativ geladene RNA oder auch DNA an sich binden zu können, ist das kationische Lipid Dotap zur Herstellung von Lipoplexen befähigt. Diese dann vorwiegend positiv geladenen Partikel können somit von Zellen über Endozytose aufgenommen werden und die RNA oder DNA im Inneren der Zelle an ihren Zielrezeptor gelangen.

Dazu wird zunächst 200ng RNA oder DNA in 25 μ l Transfektionsmedium (PBS oder NaCl) pipettiert. Parallel dazu werden auch 25 μ l des gleichen Transfektionsmediums in ein zweites Reagenzgefäß angesetzt und in diese 1-2 μ l Dotap pipettiert. Die Menge richtet sich hierbei nach der zu transfizieren RNA oder DNA. Nukleotid- Ansätze sowie auch der Dotap Ansatz werden bei Raumtemperatur 2-5min stehengelassen, bevor dann der Dotap-Ansatz auf den RNA/DNA Ansatz pipettiert wird. Darauf folgt dann ein kurzes Mixen auf dem Vortexer und eine anschließende Inkubation von 15min, um eine vollständige Komplexierung der RNA/DNA und des kationischen Lipides zu gewährleisten.

Transfektion mit Lipofectamine® 2000

Bei dem auch kationischen Lipid Lipofectamine 2000 werden durch die Komplexierung an die negativ geladene RNA oder DNA auch stabile Lipoplexe hergestellt, die dann wie auch bei Dotap-Ansätzen über das Prinzip der Lipofektion passiv in die Zelle aufgenommen werden können.

Für eine Stimulation von Zellen in einer 96-well Zellkulturplatte wird wie folgt der Lipoplex-Ansatz vorbereitet. Zunächst werden 25 μ l Opti-mem in einem Reaktionsgefäß vorgelegt in die dann eine 0,5 μ l an Lipofectamine 2000 hinzu pipettiert wird. Diese Verdünnung wird dann mindestens 5min bei Raumtemperatur stehengelassen. Zeitgleich werden auch 200ng RNA oder DNA in 25 μ l Opti-mem verdünnt. Die Lipofectamine-Verdünnung wird anschließend auf die RNA/DNA Verdünnung pipettiert, kurz gevortext und einer 10-15-minütigen Inkubation unterzogen, um auch hier die komplette Verbindung der beiden Komponenten vollständig zu gewährleisten.

Transfektion mit *in vivo*-jetPEI™

Das lineare Polymer *in vivo*-jetPEI™ besitzt als kationischen Polymer auch eine starke positive Eigenladung, die es diesem Transfektionsreagenz auch ermöglicht eine Bindung zu der negativ geladenen RNA/DNA einzugehen. Diese dann auch positiv geladenen Polyplexe werden dann passiv von der Zelle aufgenommen und über den endosomalen Weg ins Zytosol befördert.

Die Herstellung der Polyplexe erfolgte in dieser Arbeit, wenn nicht anderes beschrieben, immer bei einem N/P Verhältnis von 6. Das N/P Verhältnis stellt den Anteil der Stickstoffe (N) des Polymers den Phosphaten des Oligonukleotids (P) gegenüber. Ein höheres N/P Verhältnis bedeutet demnach auch immer eine höhere Konzentration des Polymers.

Für die Berechnung die Menge, die bei einem N/P Verhältnis von 8 verwendet werden muss gilt die folgende Berechnung:

$$\mu\text{l } in\ vivo\ jetPEI^{\text{TM}} = \frac{(\mu\text{g RNA/DNA} \times 3) \times 8}{150}$$

Die berechnete Menge an Polymer wird dann in 25µl eines bestimmten Transfektionsmediums gegeben, wobei es sich in dieser Arbeit und entweder NaCl 0.9%, PBS oder eine 5%ige Glucose-Lösung handelte. Für 200ng RNA/DNA wären dies ein Volumen von 0,032µl *in vivo* jetPEI. Parallel dazu werden 200ng RNA/DNA auch in 25µl Transfektionsmedium verdünnt, wobei hier auch das gleiche Medium verwendet wird, als bei dem Polymer-Ansatz. Anschließend die Polymer-Verdünnung zügig zum Oligonukleotid-Ansatz pipettiert, was die spontane Bildung von Polyplexen innerhalb einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur ermöglicht.

Transfektion mit Polyamidoamin-Dendrimeren (PAMAM-Dendrimeren)

Durch die Verwendung von PAMAM Dendrimeren der 5. Generation, lassen sich mit RNA oder DNA sogenannte Dendriplexe bilden. Die RNA/DNA wird aber nicht nur an die Oberfläche der PAMAM-Dendrimere über elektrostatische Interaktionen gebunden, sondern werden auch aufgrund von vorhandenen Innenräume in die PAMAM-Moleküle aufgenommen. Auch hier dann eine passive Internalisierung in die Zelle passieren und die Dendriplexe dann über das Endosom auch ins Zytosol gelangen. Da auch hier zur Komplexbildung das N/P Verhältnis eine entscheidende Rolle spielt und in dieser Arbeit ein N/P Verhältnis von N/P = 8 als das idealste herausgestellt hat, lautet die Herstellungsanweisung hierfür wie folgt. 200ng RNA oder DNA werden in 25µl PBS, NaCl 0.9% oder 5%iger Glucose-Lösung verdünnt. Zeitgleich werden 0,044µl PAMAM in 25µl des gleichen Mediums gegeben und 5min stehengelassen. Dieser PAMAM-Ansatz wird dann auf den RNA Ansatz pipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um einer vollständige Formation der Dendriplexe zu ermöglichen.

Transfektion mit poly-L-Arginin und mit Protamin

Auch kationische Peptide wie poly-L-Arginin oder Protamin können zur endosomalen Transfektion verwendet werden, und auch hier kommt es zur Formation von positiven RNA/Peptid-Komplexen, die über Endozytose passiv aufgenommen werden.

Für die Komplexbildung mit poly-L-Arginin werden 200ng RNA in 25µl kaltem PBS vorgelegt und 180nl einer 2µg/µl poly-L-Arginin Lösung in einem zweiten Reagenzgefäß angesetzt, welches auch zuvor mit 25µl kaltem PBS befüllt wurde. Dann wird die Arginin-Lösung auf die RNA Lösung gegeben und die Ansätze sofort zur Transfektion verwendet.

Für die Protamin basierten Komplexe gilt die gleiche Herstellungsanweisung, jedoch wird hier nur 0,5µl einer 1:1000 verdünnten Protamin verwendet.

4.2.2.2 Stimulation von Zellen

In dieser Arbeit wurde die Stimulation von Zellen ausschließlich in 96-well-Flachbodenplatten durchgeführt. Dafür wurde eine stimmt Anzahl von Zellen in 15ml Medium aufgenommen und 150µl davon pro well pipettiert. In dem Fall, dass es sich um die Stimulation von adhärennten Zellen gehandelt hat, wurden die Zellen über Nacht oder für mindestens 5h bei 37°C inkubiert bevor die Stimulation durchgeführt wurde. Dann wurden die hergestellten 50µl Transfektionsansatz pro well auf die Zellen gegeben und diese im Brutschank bei 37°C stimuliert. Für die Analyse von Zytokinen oder Chemokinen im Überstand wurden die die Zellen 20-24h stimuliert und anschließend die Überstände isoliert. Handelte es sich um die Untersuchung der Apoptose, so wurden die Zellen 48h stimuliert und die Zellen dann für weitere Analysen isoliert.

4.2.3 Analytische Bestimmungsmethoden

4.2.3.1 Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen mittels ELISA

Mit Hilfe des „Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay“, kurz ELISA, lässt dich ein bestimmtes Protein in einer Lösung identifizieren und quantifizieren. Diese Methode wurde in dieser Arbeit angewandt um Zytokine oder Chemokine im Überstand von Zellen nach einer Stimulationsperiode nachzuweisen.

Bei diesem Test werden zwei Antikörper verwendet, die unterschiedliche Epitope des nachzuweisenden Proteins erkennen. Da der ELISA-Assay dem Prinzip des „Sandwich-ELISA“ folgt, wird zunächst eine 96-well-Flachboden-ELISA Platte mit einem der beiden Antikörper, der sich auch als *Coating*-Antikörper bezeichnet, beschichtet. Pipettiert man nun die zu analysierende Lösung in die beschichteten Vertiefungen der Platte, so kann das gewünschte Protein an den Antikörper binden. Ein anschließender Waschschrift beseitigt dann alle nicht-gebundenen Proteine. Danach folgt die Zugabe des zweiten Antikörpers (*Detection*-Antikörper), der an ein anderes Epitop des schon gebundenen Proteins bindet. Da an diesen Antikörper ein Enzym gebunden ist (Peroxidase), welches in der Lage ist ein Farbstoffsubstrat umzusetzen, kann durch eine Zugabe eines solchen Farbstoffes eine blaue Farbe erzeugt werden, die umso intensiver ist, desto mehr Proteine gebunden werden konnten. Diese Farbreaktion kann dann durch die Zugabe von H₂SO₄ abgestoppt werden, wodurch die blaue Farbe in eine gelbe umschlägt. Mit Hilfe eines ELISA-Readers kann die Farbintensität jeder Probe gemessen werden und mit Hilfe eines Standards die Werte in absolute Quantitäten umgerechnet werden.

Für den Nachweis von humanem IFN α wurde der *Coating*-Antikörper zunächst in PBS verdünnt und 50µl dieser Verdünnung in jeder Vertiefung einer 96er ELISA-Platte pipettiert. Es folgte eine

Inkubation bei 4°C über Nacht (mind. 16h) gefolgt von zwei Waschschritten. Die Vertiefungen wurden dann 1h mit einem Assay Puffer (PBS/FCS10%) beschichtet um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurden 50µl der Probenlösung aufgetragen, die aber zuvor im Assay-Puffer verdünnt wurden (meist 1:4). Auch eine IFN α -Standardreihe wurde (Faktor 2 verdünnt / 8-stufig) wurde auf die Platte gegeben. Ohne Zeitabstand folgte dann die Zusage des Zweitantikörpers (25µl/well) und eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur unter ständigem leichtem Schütteln. Nach einer weiteren dreimaligen Wascheinheit mit Assay-Puffer wurden dann 50µl eines TMB-Substrates (Farbsubstrat) auf die Proben gegeben und die entstandene Farbreaktion nach 20 – 30 Minuten mit Schwefelsäure abgestoppt.

Da in dieser Arbeit auch ELISA-Kits für andere humane oder auch murine Zytokine oder Chemokine verwendet wurden, musste stets auf die Herstellerangaben geachtet werden. Diese Variierten in den folgenden Punkten von der gerade beschriebenen humanen IFN α Detektion:

1.) Puffer-Systeme:

ELISA System		Waschschritte nach	
		Beschichtungspuffer	Assay-Puffer
Human	IL-6, CXCL-10, TNF α , IL-12p70	0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5	PBS / 10% FCS
	IFN α	PBS	PBS / 1% BSA
Murin	TNF α , IL-6, IL-12p40	0,2 M Natriumphosphat pH 6,5	PBS / 10% FCS
	CXCL-10	PBS	PBS / 1% BSA
	IFN α	0,2 M Natriumphosphat pH 6,5	PBS / 10% FCS / 0.05% Tween

2.) Waschschritte:

ELISA System		Waschschritte nach		
		Coating-Antikörper	Probenzugabe	Detection-Antikörper
Human	CXCL-10, IL-6, IL-12p70, TNF α	3x	5x	7x
Murin	CXCL-10, IL-6, IL-12p70, TNF α	3x	5x	7x

4.2.3.2 Bestimmung der Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde in dieser Arbeit der MTT-Assay angewandt, welcher basierend auf einer kolorimetrischen Grundlage eine Aussage über die zelluläre Proliferation und die Lebensfähigkeit der Zellen geben kann.

Dazu werden die Zellen, die sich in 100µl Kulturmedium befinden 5µl MTT-Reagenz (5mg/ml) ausgesetzt (3-(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid). Dieses gelbe Tetrazoliumsalz kann nur von vitalen Zellen in wasserunlösliche, blaue Formazankristalle gespalten werden, da nur in diesen Zellen das Enzym Succinat-Dehydrogenase funktionsfähig ist. Nach mind. 2 stündiger Inkubation bei 37°C erfolgt dann eine Lyse der Zellen mit 100µl einer 10%igen SDS-Lösung, der wieder einer Inkubation bei 37°C über Nacht folgt. Die Absorption des gebildeten Formazans wurde dann bei 570nm photometrisch bestimmt und die gemessenen Werte

mit der Zahl von stoffwechselaktiven Zellen korreliert.

4.2.3.3 Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen aufgrund bestimmter Moleküle, die sie auf Ihre Oberfläche oder auch in Ihrem Inneren tragen, quali- und quantifiziert werden. Das Prinzip basiert auf der Tatsache, dass diese spezifischen Moleküle durch fluoreszierende Antikörper gebunden, die dann bei einer Passage durch Laserstrahlen optische Signale aussenden, die dann im Durchflusszytometer detektiert und wiedergegeben werden können.

In dieser Arbeit wurden die zu analysierenden Zellen dafür zunächst isoliert und gewaschen. Anschließend folgte eine Färbung mit dem spezifischen Antikörper, der in FACS-Puffer (PBS / 2% FCS) 1:200 verdünnt wurde. Nach der Zugabe der Antikörper auf die Zellen erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf im Dunkeln bei 4°C. Durch ein anschließendes Waschen werden ungebundene Antikörper entfernt und die Zellen können durchflusszytometrisch analysiert werden. Im Falle einer NK-Zell Analyse wurden in dieser Arbeit Antikörper verwendet, die spezifisch für NK 1.1, CD69, CD3, CD4 und CD8 sind.

Leicht abweichend verläuft die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose von Zellen. Hierzu werden die Zellen auch gewaschen und im Falle von adhärenen Zellen mit 0,5% EDTA abgelöst. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS folgte die Zugabe des Farbstoffes. Hierzu wurde der grün fluoreszierende Farbstoff Yo-Pro-1 verwendet, der nur in apoptotische Zellen eindringen kann. Dieser wurde für 30 Minuten auf Eis und in kompletter Dunkelheit auf die Zellen gegeben und erneut 2x mit PBS gewaschen. Kurz vor der Analyse mit der Durchflusszytometer wurde ein weiterer Farbstoff auf die Zellen pipettiert. Dieser leben-tod-Farbstoff Hoechst33258 (5µg/ml) ist zusätzlich in der Lage zwischen Apoptose und Nekrose zu diskriminieren. Die Zellen wurden nun im Durchflusszytometer analysiert, wobei Yo-Pro-1⁺/Hoechst⁺ und Yo-Pro-1⁻/Hoechst⁺ Zellen als apoptotische Zellen, und Yo-Pro-1⁻/Hoechst⁻ Zellen als nekrotische Zellen bezeichnet werden können.

4.2.4 Molekularbiologische Methoden

4.2.4.1 *In vitro* - Transkription

Zur Herstellung einer am 5'-Ende triphosphorylierten RNA (3pRNA) bedient man sich der Methode der *in vitro* - Transkription. Bei dieser Methode wird mit Hilfe einer T7-RNA-Polymerase die RNA beginnend von 5'-Ende in Richtung 3'-Ende synthetisiert. Hierzu benötigt die Polymerase eine DNA-Vorlage (*DNA-Template*), welche die komplementäre Sequenz der zu synthetisierenden RNA besitzt und außerdem einen doppelsträngigen T7-Polymerase-Promotor.

Zu Herstellung des DNA-Template benötigte man zwei Oligonukleotide (76mer ODN). Das initiale Nukleotid der RNA sollte ein Guanosin darstellen, da dieses die Ausbeute der DNA erhöht. 2µl beider ODNs (Antisense 3' / Promotor 5' / Konz: 100µM / Invitrogen) wurden dann mit 10x Hybridisierungspuffer und Wasser vermengt und für 5min bei 90°C im Heizblock inkubiert und dadurch hybridisiert. Die Temperatur wurde dann nach den 5 Minuten auf 90°C pro Minute um einen Grad heruntergefahren bis 45°C erreicht waren. Das dann fertige DNA-Template wurde dann

für die RNA-Synthese verwendet.

Die Synthese der RNA wurde mit Hilfe des *TranskriptAid™ T7 High Yield Transcription Kit* von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Nach Vorgabe im Herstellerprotokoll wurden DEPC-behandeltes Wasser, TranscriptAid™ Reaktionspuffer, die einzelnen Nukleotide (ATP/CTP/GTP/UTP), das hergestellte DNA-Template und TranscriptAid™ Enzyme Mix miteinander vermischt und anschließend für 6-7 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler (300rpm) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit, in der die RNA vollständig synthetisiert wurde, fügte man RNase freie DNase I zu dem Ansatz hinzu, um das noch enthaltene DNA-Template vollständig zu verdauen. Im folgenden Schritt ließ man dann den Ansatz über Mini Quick Spin Säulen laufen, um Verunreinigungen wie Salze oder einzelne Nukleotide zu entfernen. Diese Mini Quick Spin Säulen werden zunächst durch eine zwei minütige Zentrifugation bei 1000g (RT) wurde die in den Säulen befindliche Flüssigkeit zunächst herausgewaschen. Die RNA-Lösung wurde nun auf die Säulen gegeben (max. 50µl pro Säule) und weitere 4 Minuten bei 1000g (RT) zentrifugiert. Nun erhielt man die reine RNA im Durchfluss, wohingegen unerwünschte Verunreinigungen in der Säule verblieben. Abschließend konnten dann die Konzentration und die Qualität der RNA, die wir auch 3pRNA oder IVT4 nennen, am Photometer (NanoDrop) bestimmt werden.

4.2.4.2 Polyacrylamid Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet, um RNA zum einen anhand ihrer Länge zu detektieren, aber auch, um eine vollständige Verkapselung durch das Transfektionsreagenz sicher stellen zu können.

Dazu wurde ein Gel an dem folgenden Ansatz hergestellt:

Substanz	Menge
Acrylamid	7,5 ml
10x TBE	1,5 ml
Wasser (Ampuwa)	5,85 ml
10% APS	150 µl
TEMED	16 µl

Nach dem Start der Polymerisation durch die Zugabe des TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) wurde die Gellösung unverzüglich in die Kammer gegossen, den Taschenkamm eingefügt und 15 Minuten erkalten lassen. Die Taschen wurden mit 1x TBE-Lösung gespült, die Proben in die Taschen gefüllt und das Gel 1,5h bei einer Spannung von 200V unter Kühlung laufen lassen. Durch eine anschließende Sybr-Färbung konnte die Nukleinsäure dann sichtbar gemacht werden und mittels der ImageJ Software auch quantitativ bestimmt werden.

4.2.4.3 RNA Extraktion

RNA Extraktion aus Zellen

Um Gesamt-RNA aus bestimmten Zielzellen zu isolieren wurden mindestens 6×10^5 Zellen, maximal 4×10^6 Zellen in 350µl RLT-Puffer (Hersteller: Quiagen) aufgenommen. Wurden mehr als 4×10^6 Zellen verwendet, wurde die RLT-Puffer Menge verdoppelt. Nachdem die Zellen für mindestens 30min bei -80°C gelagert wurden, wurden sie mit 350µl bzw. 700µl 70% Ethanol versetzt, gut

resuspendiert und anschließend maximal 800µl des Zelllysats auf eine RNA-Säule (Zymo IIC Säule; Zymo Research) gegeben, die zuvor beschriftet wurden. Diese RNA-Säulen wurden dann in 2ml-Eppendorfgefäße gestellt und bei Raumtemperatur eine Minute bei 10.000rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, die Säulen auf neue, saubere 2ml-Eppendorfgefäße gesteckt und mit 350µl Quiagen RW1 Waschpuffer befüllt. Das Lysat wurde erneut zentrifugiert (10.000rpm/RT/1min), anschließend mit 350µl Zymo RNA Wasch Puffer (Hersteller: Zymo Research) versetzt und durch einen wiederholten Zentrifugationsschritt (10.000rpm/RT/1min) vom restlichen Ethanol befreit. Um eventuell vorhandene DNA-Fragmente aus der Gesamt-RNA zu entfernen, wurde das Lysat einem DNaseI-Verdau unterzogen. Hierzu wurde ein DNaseI Ansatzes nach Herstelleranweisung (Fermentas) hergestellt:

Substanz	Hersteller	Menge pro Probe
DNaseI	Fermentas	5U (= 5µl)
10x DNase Reaktionspuffer	Fermentas	8µl
DNase / RNase freies Wasser	Fermentas	3µl
Zymo RNA Wasch Puffer	Zymo Research	64µl
Gesamt:		80µl

Nach einer 30-minütigen Inkubation mit 80µl dieses DNaseI Ansatzes wurden die Proben erneut zentrifugiert (10.000rpm/RT/30sec) und mit 700µl Zymo RNA Wasch Puffer gewaschen. Dann folgte die Elution der RNA aus der Säule mittels einer kurzen (2min) Inkubation mit DNase / RNase freiem Wasser. Die gewonnene RNA wurde dann mit einem Spektralphotometer quantitativ bestimmt.

RNA Extraktion aus Gewebematerial

In dieser Arbeit wurde oft auch die Gesamt-RNA aus Gewebematerial benötigt. Hauptsächlich wurde die RNA aus verschiedenen Organen (Lunge, Leber, Niere, Milz, Gehirn) oder aus Tumorgewebe extrahiert. Dazu musste das aus dem Tier (Maus) gewonnene Organ bzw. Gewebematerial unverzüglich in Kryogefäßen verschlossen auf Trockeneis gelegt werden. 20 - 30mg dieses Probenmaterials wurde dann mit einem Skalpell abgetrennt, in ein mit Zirkonium Beads befülltes 1,5ml-Reagenzgefäß gegeben und sofort mit 350µl RLT/β-Mercaptoethanol-Puffer versetzt. Dieser Probenansatz wurde dann zweimal für 30 Sekunden homogenisiert (Precellys Homogenisator) und anschließend mit 350µl 70%igem Ethanol resuspendiert. Das dann anschließende Verfahren ist identisch mit dem RNA Extraktion Verfahren aus Zellen.

4.2.4.4 Spektralphotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Um die Konzentration von Nukleinsäuren spektralphotometrisch zu bestimmen wurde die Dichte bei $\lambda = 260\text{nm}$ (OD_{260}) gemessen, welches das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren darstellt. Da eine $OD_{260} = 1$ 47µg/ml DNA, bzw. 40µg/ml RNA entspricht, ergeben sich hieraus die Extinktionskoeffizienten $[\epsilon]$ von 47 für DNA bzw. 40 für RNA. Mit Hilfe der Lambert-Beerschen Formel konnte dann die Konzentration $[c]$ folgendermaßen berechnet werden:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \times \epsilon \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Da aber auch die Reinheit der Nukleinsäuren von entscheidender Bedeutung ist, wurde auch die Konzentration von Proteinen in der Lösung bestimmt. Hierzu wurde die Absorption bei $\lambda = 280\text{nm}$ (OD_{280}) gemessen, welches das Absorptionsmaximum von Proteinen darstellt.

Setzt man nun die beiden Absorptionsmaxima in Bezug zueinander ($\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$) so erhält man eine Aussage über den Grad der an kontaminierenden Proteinen in der analysierten Probe. Als reine DNA Probe bezeichnet man Lösungen mit einem Verhältnis ($\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$) = 1,8. Reine RNA Probe sollten ein ($\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$) Verhältnis von 2,0 ausweisen.

Für die Konzentrationsmessung meiner Proben wurde ca. $1\mu\text{l}$ Nukleinsäurematerial auf die Detektionslinse des Spektralphotometers pipettiert, vorsichtig verschlossen und die Absorptionsmessung bei OD_{260} und OD_{280} gestartet. Das Gerät gab dann zeitgleich die ermittelte Konzentration in $\text{ng}/\mu\text{l}$ an, sowie auch die Reinheit in Form des Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} .

4.2.4.5 Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative Polymerasekettenreaktion, kurz qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) ist eine vielfältig einsetzbare Methode, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, es aber zusätzlich ermöglicht, die Menge an produzierter mRNA für ein ganz bestimmtes Zielprotein quantitativ zu ermitteln. Um das zu ermöglichen wird nach jedem Amplifikationszyklus mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes die Menge an vorhandenem DNA-Doppelstrang bestimmt.

Zur Durchführung einer qPCR wird zunächst die DNA benötigt, die den zu vervielfältigenden Bereich, das sogenannte DNA-Template, enthält. Um auf beiden Einzelsträngen dieser DNA den Startpunkt für die DNA-Synthese zu definieren und somit das DNA-Template einzugrenzen, werden synthetisch hergestellte einzelsträngige Oligonukleotide, sogenannte „Primer“, benötigt. Der weitere Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase und einzubauender ODNs ermöglicht dann die gezielte Replikation des gewünschten DNA-Fragment, welche durch mehrfache Zyklus-Wiederholungen exponentiell verläuft. Der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff (hier: Sybr Green I) besitzt die Eigenschaft mit dsDNA zu interkalieren und auch dann erst zu einer starken Fluoreszenzemission zu führen. Frei in Lösung oder nur unter Anwesenheit von ssDNA ist diese Fluoreszenz-Emission nur äußerst schwach ausgeprägt. Das bedeutet, dass proportional mit der Menge der neu synthetisierten dsDNA PCR-Produkte, auch die Fluoreszenzintensität stark zunimmt. So kann am Ende eines Laufs anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen werden.

Zur Bestimmung der mRNA Expression wurde zunächst die gesamte RNA aus den Zielzellen oder aus Gewebematerial extrahiert (siehe Beschreibung oben). Zur Durchführung einer reversen Transkription, bei der die gewonnene RNA von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in DNA umgeschrieben wird, wurde das SuperScript VILO cDNA Synthese-Kit der Firma Fermentas verwendet und das Protokoll nach Herstellerangaben befolgt

Die fertige cDNA wurde dann 1:5 mit RNase/DNase freiem Wasser verdünnt, bevor sie dann im Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System quantifiziert wurde. Alle Quantifizierungen wurden in einem 96 Plattenformat durchgeführt und immer relativ zu einem unbeteiligten

Zellprotein (*housekeeping gene*; meist β Actin oder TBP) gesetzt. Für eine 96-well Platte galten pro well die folgenden Mengenangaben und da pPCR Laufprotokoll:

Substanz	Menge	Schritt	Temperatur	Zeit
Primer (fwd)	0,15 μ l	Denaturierung	95°C	10min
Primer (rev)	0,15 μ l	Amplifikation (40x)	95°C	15sec
Sybr	5 μ l		60°C	20sec
RNase freies Wasser	2,7 μ l		72°C	20sec
Gesamt:	8μl	Abkühlung	4°C	5min

Die Auswahl und das Design der von mir verwendeten Primer wurde mit Hilfe des Online Forums *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* der Firma Roche durchgeführt. Die Effizienzkorrektur der jeweils verwendeten Primerpaare wurde vor dessen Einsatz experimentell ermittelt und in die Auswertung mit einbezogen. Die Quantifizierung der gesuchten Genexpression im Verhältnis zum eingesetzten Referenzgen wurde erfolgte schließlich anhand des Auswerteformates qgene96 unter Verwendung der folgenden Formel (Formel 1).

Formel 1: Berechnung der relativen Expression (A) und des Standardfehlers (B):

Berechnung der relativen Expression MNE (mean normalized expression):

$$\text{MNE} = \frac{\frac{(E_{\text{target}})^{\text{CT}_{\text{target, well1}}}}{(E_{\text{ref}})^{\text{CT}_{\text{ref, well1}}}} + \frac{(E_{\text{target}})^{\text{CT}_{\text{target, well2}}}}{(E_{\text{ref}})^{\text{CT}_{\text{ref, well2}}}} + \frac{(E_{\text{target}})^{\text{CT}_{\text{target, well3}}}}{(E_{\text{ref}})^{\text{CT}_{\text{ref, well3}}}}}{3}$$

Berechnung des Standardfehlers (Δx):

$$\Delta x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n-1)}}$$

4.2.5 Pharmazeutisch-technologische Methoden

4.2.5.1 Partikelgrößenmessung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine wichtige Methode um Nanopartikel ihrer Größe nach zu charakterisieren und wurde mit dem Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, UK) durchgeführt. Hierbei wird ein Laserstrahl auf die kolloid-dispersen Nanopartikel gehalten, der, wenn er auf ein Teilchen trifft, in alle Richtungen gestreut wird. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung sind Partikel in ständiger Bewegung, wodurch es zu konstruktiven und destruktiven Interferenzen des

Streulichts kommt. Das wiederum führt zu Fluktuationen in der Streuintensität, da sich durch die Bewegungen der Partikel ja auch die Abstände der Streuzentren ständig ändern. Größere Partikel zeigen nur langsame Bewegungen und Positionsänderungen, was demnach auch nur eine niedrige Frequenz verursacht. Kleine Partikel hingegen bewegen sich recht schnell und bewirken demnach auch schnelle Variationen der Streuintensität und eine hohe Frequenz. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung kann diese Diffusionsgeschwindigkeit unter Berücksichtigung der Korrelation zwischen Zeit und Streuintensität berechnet werden und sich so der der Radius von kolloid-dispersen Partikeln ermitteln lassen:

- D = Diffusionskoeffizient
- k = Boltzmannkonstante
- T = absolute Temperatur
- η = dynamische Viskosität des Dispersionsmittels
- R_h = Hydrodynamischer Radius

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R_h}$$

Zusammen mit der Partikelgrößenmessung wird auch der Polydispersitätsindex (PDI) bestimmt. Der PDI beschreibt die Größenverteilung der kolloidalen Partikel und besitzt einen Wert zwischen 0, für hoch monodisperse und 1, für hoch polydisperse Größenverteilungen. Dieser wird über eine Methode bestimmt, bei der die Verteilung der Partikelgröße von dem Abfall der konstanten Streuung auch auf Basis der Stokes-Einstein-Beziehung abgeleitet wird.

4.2.5.2 Bestimmung des Zetapotentials

Das Zetapotential stellt die wichtigste Größe dar, wenn man die Stabilität eines Partikels

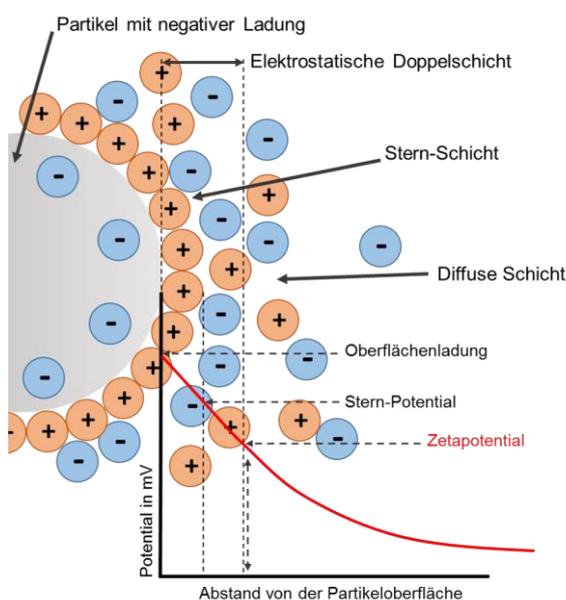


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der elektrostatischen Doppelschicht.

beschreiben möchte. Wenn sich geladene Partikel in einer Suspension befinden, dann lagern sich fest geladene Ionen in einer Sternschicht um das Partikel. An diese Schicht lagern sich dann weitere locker gebundene Ionen, was das Partikel aus weiterer Entfernung eher elektrisch neutral scheinen lässt, da alle Partikelladungen durch die Ionen in der Suspension kompensiert werden. Diese beiden Schichten bezeichnet man als elektrostatische Doppelschicht. Wenn man dieses Partikel jetzt in Bewegung setzt, dann lösen sich die locker gebundenen Ionen von der Oberfläche und es entsteht wieder ein messbares Potential. Dieses Potential an dieser Abscherschicht eines bewegten

Partikels wird als Zetapotential bezeichnet. Da es nicht möglich ist das Zetapotential direkt zu

messen, wird es über die elektroforetische Mobilität der zu untersuchenden Partikel in der Dispersion bestimmt. Dazu wird eine Messzelle verwendet, die an beiden Enden Elektroden besitzen. An diese wird eine definierte Wechselspannung angelegt, was die Partikel im elektrischen Feld bewegen lässt. Durch diese Bewegung kommt es zu einer Streuung des eingestrahlten Lichtes was aufgrund des Doppler-Effektes zu einer Frequenzänderung führt. Mit Hilfe der Henry-Gleichung kann dann das Zetapotential aus dieser elektroforetischen Mobilität berechnet werden.

EM = elektroforetische Mobilität
v = Teilchengeschwindigkeit
E = Hydrodynamischer Radius

$$EM = \frac{v [\mu\text{m} / \text{s}]}{E [\text{v} / \text{cm}]}$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Messungen des Zetapotentials mit dem Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, UK) durchgeführt. Zur Messung wurde die Probenlösung unverdünnt, oder 1:10 mit Reinstwasser verdünnt, blasenfrei mit einer Pipette in die Messküvette gefüllt und das Zetapotential der Probe jeweils durch 3 Messpunkte bestimmt.

4.2.6 *In vivo* Versuche

Alle von mir durchgeführten und hier beschriebenen *in vivo* Versuche wurden an Mäusen durchgeführt, die unter speziellen Pathogen-freien Bedingungen gehalten wurden. Diese Versuche wurden zum größten Teil im „Haus für experimentelle Therapie“ (HET), einige aber auch im Institut für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie (IMMEI) der Universität Bonn durchgeführt. Alle Experimente wurden von den zuständigen Behörden (LANUV, NRW, Deutschland) genehmigt und gemäß des Tierversuchantrages durchgeführt.

4.2.6.1 Blutabnahme

Punktion der Schwanzvene

Zur Gewinnung von kleineren Mengen (ca. 10-50µl) Blut wurde die Methode der Schwanzvenenpunktion von mir angewendet. Hierbei wurde die Maus mit Hilfe einer Fixiereinheit (*Restraîner*) ruhig gehalten. Der Schwanz wurde zunächst mit Hilfe von Ethanol hyperämisiert und anschließend das mittlere Ende des Schwanzes über den Zeigefinger gelegt, so dass durch die Stauung die Vene besser sichtbar wurde. Dann wurde entweder mit einer Lanzette leicht in die Vene eingestochen, oder auch mittels eines Skalpells leicht eingeschnitten. Die heraustretenden Blutropfen wurden dann entweder mit vorgelegten Gefäßen aufgefangen oder durch das Auflegen von Röhrchen (z.B. EDTA - beschichtete Röhrchen) unter Ausnutzung des Kapillareffektes aufgesaugt. Das so gewonnene Blut wurde dann entweder direkt analysiert (z.B. Analyse der T-Zell und NK-Zell Aktivierung), oder durch zehn minütiges zentrifugieren bei 3500rpm (21°C) dessen Serum gewonnen, welches dann auf Zytokine und Chemokine hin untersucht werden konnte.

Punktion des retrobulbären Venenplexus

Diese Methode wurde von mir an Mäusen nur dann angewendet, wenn es nötig war, in kürzester Zeit eine möglichst große Menge Blut zu gewinnen und die Gefahr der Hämolyse so gering wie möglich zu halten. Hierbei wurden die Mäuse zunächst mittels Isofluran unter Vollnarkose gesetzt. In dieser Zeit staucht man durch einen Nackengriff die Halsvene der Tiere. Eine Glaskapillare (z.B. einer Pasteurpipette; Außendurchmesser max. 0,8mm) wurde dann unter Druck und leicht drehenden Bewegungen im inneren Augenwinkel in Richtung des gegenüberliegenden Kiefergelenks durch die Bindehaut geschoben, was die Punktion des Venenplexus zu Folge hat. In den meisten Fällen musste ich unter weiterem Drehen die Kapillare wieder leicht herausziehen, damit das Blut zu fließen begann. Vor dem Entfernen der Kapillare aus dem Auge wurde der Nackengriff gelockert um die Gefahr von Blutungen im Gewebe so gering wie möglich zu halten. Das Blut wurde dann in vorgelegte Gefäße abgelassen. Diese Methode wurde von mir nur dann angewendet, wenn die Mäuse nach der Blutabnahme geopfert werden sollten.

4.2.6.2 Inokulation von Tumorzellen

Subkutane Inokulation von B16F10 und HcMel12 Tumorzellen

Zur Ausbildung eines subkutanen murinen Melanoms wurden 1×10^5 murine B16F10 bzw. HcMel12 Melanomzellen in PBS aufgenommen und subkutan in die rasierte rechte oder linke Bauchflanke der C57BL/6 Mäuse injiziert. Der gut sichtbare schwarzblaue Tumor wurde täglich beobachtet und mit Hilfe einer Schieblehre vermessen. Nach ca. fünf bis sieben Tagen wurde in der Regel eine durchschnittliche Tumorgröße von 9 – 16mm² erreicht und mit der Behandlung begonnen. Das Wachstum des Tumors wurde täglich untersucht und digitale Bilder aufgenommen und archiviert.

Subkutane Inokulation von murinen Hepatomazellen (Hepa129)

Zur Etablierung eines Nicht-orthotopen, subkutanen hepatozellulären Karzinoms wurden murine Hepatomazellen (Hepatoma129 / Hepa129) zunächst dreimal gewaschen und dann in PBS aufgenommen. Anschließend wurden C3H/HEN Mäuse durch eine leichte Isofluran Begasung narkotisiert, mit den Fingern die vorher rasierte Rückenhaut leicht angehoben und dann 1×10^6 Hepa129 Zellen subkutan injiziert. Nach ca. sechs bis neun Tagen wurde in der Regel eine durchschnittliche Tumorgröße von 16 – 25mm² erreicht und mit der Behandlung begonnen. Das Wachstum des Tumors wurde täglich mit Hilfe einer Schieblehre vermessen und digitale Bilder aufgenommen und archiviert.

Intravenöse Inokulation

Zur Ausbildung eines murinen Melanom-Lungenmetastasen Modells wurden 5×10^5 murine B16F10 bzw. HcMel12 Melanomzellen in PBS aufgenommen. Mit Hilfe einer Fixiereinheit (*Restraint*) wurde die C57BL/6 Maus zunächst fixiert. Mit etwas Ethanol wurde der Mausschwanz hyperämisiert, das mittlere Ende des Schwanzes über den Zeigefinger gelegt und anschließend die Zellen über die Schwanzvene intravenös verabreicht. Ein bis zwei Tage nach der Inokulation wurde

mit der Behandlung der Mäuse begonnen.

Intrahepatische Inokulation

Zur Etablierung eines murinen orthotopen hepatozellulären Karzinoms (HCC) wurden murine Hepatomazellen (Hepatoma129 / Hepa129) zunächst mindestens dreimal gewaschen und anschließend in PBS aufgenommen. C3H/HEN Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Gabe einer Ketamin-Rompun Lösung unter Narkose gesetzt. Eine standardisierte Zellzahl an murinen Hepatoma129 Zellen (1×10^5) wurden den C3H/HEN Mäusen dann unter operativem Eingriff subkapsulär intrahepatisch in den oberen linken Leberlappen transplantiert. Nach dem Auswachsen der Tumore, welches in der Regel sechs bis neun Tage gedauert hat, wurden die Mäuse intravenös über die Schwanzvene behandelt. Das Verhalten Mäuse wurden täglich beobachtet und zudem das Körpergewicht der Tiere engmaschig erhoben, um somit die Progression der HCC bedingten Aszites zu kontrollieren. Ab einer bestimmten Ausprägung der Aszites wurden die Mäuse geopfert.

4.2.6.3 Organentnahme zur histopathologischen Analyse

Um pathologische Veränderungen innerhalb eines Organs erkennen und beurteilen zu können, wurden die Mäuse zunächst durch einen Genickbruch getötet. Anschließend wurden die Tiere im Bauchraum durch einen Schnitt geöffnet und das Zielorgan oder auch die Injektionsstelle entnommen. Die Organe wurden dann unverzüglich gewaschen und mit einer Zinklösung über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit Ethanol einer Dehydratation unterzogen und dann in Paraffin eingebettet. Nach der Härtung wurden mit einem Mikrotom 4µm dicke Schreibe von dem Paraffin-Gewebe Block abgehobelt und mit Xylol und Ethanol behandelt. Danach folgte eine 2.5minütige Inkubation in Mayers Hämalaunlösung und anschließender Inkubation für 5 Minuten in 1% Eosin. Alle Organschnitte wurden von Dr. Lars Tharun, Pathologie Universität Köln, mittels einem Leica DMLB Immunfluoreszenzmikroskop gesichtet und bewertet.

4.2.6.4 Applikation eines Therapieansatzes

Subkutane Applikation

Zur Durchführung einer subkutanen Behandlung mit einem bestimmten therapeutischen Ansatz, wurde die Maus zunächst mit einem Nackengriff in der Hand fixiert und die zu behandelnde Stelle mit Hilfe eines Rasierers von Haaren vorsichtig befreit. Mittels Spritze mit dünnem Nadelaufsatz (\emptyset 0,3mm – 0,4mm) wurde dann der Behandlungsansatz langsam subkutan in die Maus injiziert.

Intravenöse Applikation

Zur Durchführung einer intravenösen Behandlung mit einem bestimmten therapeutischen Ansatz wurde die Maus zunächst mit Hilfe einer Fixiereinheit (*Restraîner*) fixiert. Mit etwas Ethanol wurde der Mausschwanz hyperämisiert und das mittlere Ende des Schwanzes über den Zeigefinger gelegt, so dass die bläuliche Vene gut sichtbar wurde. Anschließend konnte dann der therapeutische Ansatz mit einer Injekt[®]F-Spritze aufgezoogen werden und mit einem dünnen Nadelaufsatz (Mircolance[™] 3 / \emptyset 0,3mm – 0,4mm) versehen über die Schwanzvene intravenös

verabreicht werden.

Intratumorale Applikation

Die intratumorale Behandlung wurde in der Regel fünf bis sieben Tage (murines Melanom) bzw. sechs bis neun Tage (murines nicht-orthotopes HCC) nach der Inokulation der Tumorzellen begonnen. Hierzu wurde die Maus wie auch bei der subkutanen Injektion zunächst mit einem Nackengriff in der Hand fixiert. Da der Tumor zu diesem Zeitpunkt einen mittleren Durchmesser von ungefähr 9 – 16mm² (murines Melanom) bzw. 16 – 25mm² (murines nicht-orthotopes HCC) hatte, war dieser deutlich sichtbar. Mittels einer Injekt[®]F-Spritze und dünnem Nadelaufsatz (Mircolance[™] 3 / ø 0,3mm – 0,4mm) wurde dann der Behandlungsansatz langsam in das Tumorgewebe injiziert.

4.3 Statistik

In dieser Arbeit zeigen alle Abbildungen den Mittelwert und die Standardabweichung einer Messung, sofern nicht anders beschrieben. Statistische Analysen zweier Gruppen wurden mit einem zweiseitigen t-Test durchgeführt. Wurden mehrere Gruppen miteinander verglichen, so wurde eine one-way oder two-way ANOVA mit einem Post-hoc Test nach Bonferroni genutzt.

Überlebenskurven wurden anhand des Logrank Test (95% Konfidenzintervall) analysiert. Zur Visualisierung der Signifikanzen wurden die Symbole *, **, *** und **** verwendet, die für $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ und $p < 0,0001$ stehen.

5 Ergebnisse

5.1 PAMAM-Dendrimere als Transfersystem zur endosomalen und zytosolischen Transfektion von Oligonukleotiden *in vitro*

Um die Transfektionseffizienz von RNA Liganden für PRR des angeborenen Immunsystems durch PAMAM-Dendrimere in unterschiedliche Zellkompartimente zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit mit drei unterschiedlichen Oligonukleotiden gearbeitet. Zur Evaluierung des endosomalen Transports wurden zwei Liganden verwendet, die jeweils selektiv an TLR7 oder TLR8 binden und diese aktivieren. Basierend auf vorangegangenen Studien zur Etablierung eines solchen Liganden für TLR7 und TLR8^{58,276} wurden vor dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Prof. Winfried Barchet weitere ORNs designt, die zur selektiven Aktivierung einer der beiden Rezeptoren befähigt waren. So wurde der TLR7-Ligand ausgehend des 21 Nukleotid(nt)-langen ORNs R2173 um 9 Nukleotide verlängert, die Phosphothioate entfernt und ein 19nt langer G-Stretch eingebaut (Tabelle 5-1 grün markiert), der die Bildung von G-Tetraden ermöglicht. Dieses dann entstandene R3011 führt zu einer hocheffektiven Aktivierung von TLR7 (Barchet, Zillinger, Schwickart et al.; unpublizierte Daten) und wurde demnach in dieser Arbeit für Untersuchungen zur Stimulation des TLR7 Rezeptors verwendet.

Tabelle 5-1: Sequenzen optimierter TLR7 Liganden.

	Name	TLR7-selektive Sequenz (5' → 3')
Vorgänger	R2173	C*G*G*C*U*C*G*G*C*A*G*A*A*G*C*C*G*G*G*C*C
Testsequenz	R3011	CCUCCUCCUCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

Für die Optimierung des TLR8-Liganden diente die 20 nt lange R2152nh3 als Ausgangsequenz, in der ein „GUGCGC“- Abschnitt den aktiven Bereich darstellt, der für eine selektive TLR8-Aktivierung verantwortlich zu sein scheint (Tabelle 5-2 rot markiert). Von allen getesteten Sequenzen, zeichnete sich das ORN R2197 durch ein erhöhtes TLR8-Stimulationspotential auf humanen PBMCs aus, welches dazu in humanem Vollblut sogar den aktivsten TLR8-Liganden darstellte (Barchet, Zillinger, Schwickart et al.; unpublizierte Daten). Der Unterschied zwischen R2197 und seinem Vorgänger R2152nh3 liegt hauptsächlich in der Position zweier Nukleotide, die vom 5'-Ende an das 3'-Ende gesetzt wurden (Tabelle 5-2 grün markiert). Zusätzlich wurden zur Stabilisierung endständig Phosphothioate (*) eingefügt.

Tabelle 5-2: Sequenzen optimierter TLR8 Liganden.

	Name	TLR8-selektive Sequenz (5' → 3')
Vorgänger	R2153nh3	CGCGUGCGCAGAAGCGAGCGC
Testsequenz	R2197	G*C*CGCGUGCGCAGAAG*C*G*A*G*C

Zur Bestimmung der PAMAM-basierten Transfektionseffizienz ins Zytosol wurde in dieser Arbeit mit einer 5'triphosphorylierten doppelsträngigen RNA (3pRNA) gearbeitet, die an den Immunrezeptors RIG-I Rezeptor bindet und eine Aktivierung auslöst²⁷⁷.

5.1.1 Die Formulierung von PAMAM-Dendrimern mit TLR7-, TLR8- oder RIG-I Liganden ermöglicht eine effektive Rezeptoraktivierung

Um die idealen Bedingungen zur Herstellung der unterschiedlichen Dendriplexe zu ermitteln, wurden die drei Oligonukleotide R3011, R2197 und 3pRNA zunächst in unterschiedlichen N/P Verhältnissen (0 – 12) und in den unterschiedlichen Transfektionsmedien Natriumchlorid 0.9% (NaCl 0.9%), phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) und 5% Glucose-Lösung (Glc 5%) mit PAMAM komplexiert (Tabelle 5-3).

Tabelle 5-3: Nomenklatur der RNA-PAMAM Komplexe

Oligonukleotid	Bezeichnung der RNA/PAMAM Komplexe	Zielrezeptor
3pRNA	3p-Dendriplexe	RIG-I
R3011	R3011-Dendriplexe	TLR7
R2197	R2197-Dendriplexe	TLR8

Die so hergestellten unterschiedlichen Dendriplexe wurden anschließend für 24h zur Stimulation bei 37°C / 5% CO₂ auf humane periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells / PBMCs) gegeben. Die Aktivierung der Rezeptoren durch die spezifischen Liganden, und somit auch die erfolgreiche Transfektion durch PAMAM-Dendrimere, wurde durch die Ausschüttung von Zytokinen im Überstand der Zellen überprüft. Da die Aktivierung von TLR7 und RIG-I zu einer Produktion des Typ-I Interferons IFN α ^{30,31}, und die Aktivierung von TLR8 zu einer Produktion des Interleukins IL-12p70 führt^{30,52}, wurden diese beiden Zytokine als Indikatorzytokine bestimmt (Abbildung 5-1).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der PBMCs mit 3p-Dendriplexen eine Produktion von IFN α bewirkt (Abbildung 5-1A) und dass die detektierte Menge des messbaren IFN α deutlich mit dem N/P Verhältnis ansteigt. Bei einem N/P Verhältnis von 8 kann eine signifikant erhöhte Produktion im Vergleich zum N/P Verhältnis 6 erzielt werden, wenn als Transfektionsmedium NaCl 0.9% oder PBS verwendet wurden. Jedoch stellt sich ab einem N/P Verhältnis von 8 ein Induktions-Plateau ein und eine weitere N/P Erhöhung führt zu keiner signifikanten Steigerung des IFN α Levels. Die Verwendung einer 5%igen Glucose-Lösung führt zu einer signifikant schlechteren Transfektionseffizienz im Vergleich zu NaCl 0.9% oder PBS. Bei der Stimulation von PBMC mit R3011-Dendriplexen zur Aktivierung des TLR7 Liganden erkennt man ein genau umgekehrtes Bild (Abbildung 5-1B). Zum einen wird hier durch die weitere Erhöhung des N/P Verhältnis schon ab N/P 2 die Induktion von IFN α verschlechtert, zum anderen stellt die 5%ige Glucose-Lösung hier das ideale Transfektionsmedium dar. Im N/P Verhältnis von 2, welches sich als das ideale Verhältnis definieren lässt, führen die in 5% Glucose hergestellten R3011-Dendriplexe zu einer signifikant höheren Detektion von IFN α im Vergleich zu den in NaCl 0.9% oder PBS hergestellten Formulierungen. Bei der Stimulation der PBMCs mit R2197-Dendriplexen zur Aktivierung von TLR8 (Abbildung 5-1C) erkennt man im Vergleich zu den idealen Stimulationsbedingungen für TLR7 und RIG-I ein Mischbild. Zum einen benötigt man für eine erfolgreiche Transfektion nur ein geringes N/P Verhältnis, welches auch hier, wie schon bei R3011-Dendriplexen, wieder zu einer

Verschlechterung des Zytokinsignals führt, wenn man ein N/P Verhältnis von 2 übersteigt. Allerdings erweist sich hier nicht die 5%ige Glucose-Lösung als das ideale Transfektionsmedium für die Herstellung von R2197-Dendriplexen, sondern NaCl 0.9% oder PBS.

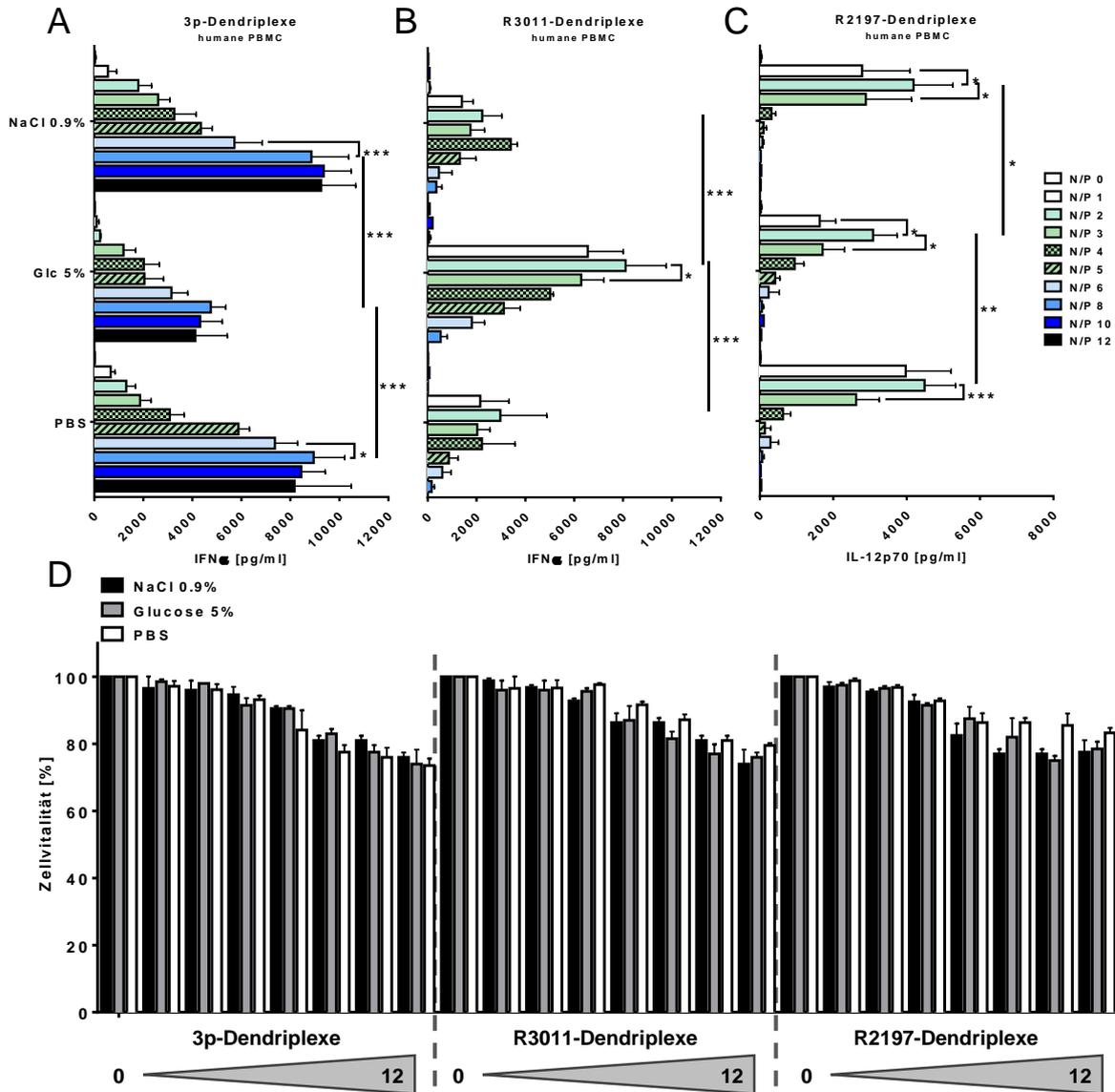


Abbildung 5-1: PAMAM-Dendrimere ermöglichen auf humanen PBMCs eine effektive Transfektion ins Endosom und ins Zytosol, die vom N/P Verhältnis und verwendetem Transfektionsmedium beeinflusst wird.

Eine konstante Menge an (A) 3pRNA, (B) R3011 oder (C) R2197 wurden mit PAMAM G5 in verschiedenen N/P Verhältnissen (N/P 0 – N/P 12) in den unterschiedlichen Medien Natriumchlorid (NaCl), Glucose (Glc) oder Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) komplexiert. Die Transfektionsansätze wurden dann zur Stimulation auf humane PBMCs gegeben (1µg/ml). 24h nach der Transfektion wurden die Überstände der Zellen abgenommen und der Gehalt an IFNα (A,B) und IL-12p70 (C) bestimmt. (D) zeigt die Zellvitalität der Zellen nach der Stimulation. Die Daten von 4 Spendern sind als Mittelwerte ± SD angegeben. *, ** und *** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$.

Als nächstes untersuchten wir den Einfluss der verschiedenen Dendriplexe auf die Zellvitalität *in vitro*. Dazu wurden die PBMCs nach der 24-stündigen Stimulation mit den verschiedenen

Dendriplexen mit MTT-Reagenz (3-(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid) behandelt. Da dieses Salz nur von vitalen Zellen in wasserunlösliche, blaue Formazankristalle gespalten werden kann, wurde im Anschluss die Absorption des gebildeten Formazans photometrisch bestimmt. Die gemessenen Werte, die mit der Zahl von stoffwechselaktiven Zellen korrelieren, zeigen, dass mit steigendem N/P Verhältnis die Zellvitalität leicht abnimmt, aber kein Unterschied durch die Verwendung der drei Medien erkennbar ist (Abbildung 5-1D).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PAMAM-Dendrimere in der Lage sind stimulatorische Oligonukleotide zu binden und sowohl in das Endosom als auch in das Zytosol zu transportieren. Dabei wird für die zytosolische Transfektion und Aktivierung des RIG-I Rezeptors ein höheres N/P Verhältnis benötigt, als für einen endosomalen Transport zu den Toll-like Rezeptoren 7 und 8. Zum anderen scheint der Einsatz von unterschiedlichen Komplexierungsmedien zur Herstellung der Dendriplexe das Aktivierungspotential zu beeinflussen. Da zu vermuten ist, dass möglicherweise das Medium die Partikelcharakteristika der Dendriplexe bestimmt, und folgedessen die Transfektionseffizienz beeinflusst wird, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Dendriplexe näher untersucht.

Insgesamt zeigte sich bei dem für die Stimulation idealen N/P Verhältnis keine bzw. nur eine gering ausgeprägte negative Auswirkung auf die Zellvitalität der PBMCs *in vitro*.

5.1.2 Das Transfektionsmedium beeinflusst die physikalisch-chemischen Eigenschaften der gebildeten Dendriplexe

Um zu verstehen, in wie weit das N/P Verhältnis und auch der Einsatz von unterschiedlichen Medien die Partikelcharakteristika beeinflussen, wurden die verschiedenen Dendriplexe auf die Verkapselungseffizienz, Partikelgröße, Polydispersität und ihr Zetapotential hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich ab einem N/P Verhältnis von 3 eine 100%ige Verkapselungseffizienz einstellte, unabhängig von der Art des Oligonukleotids (dsRNA - 3pRNA und TLR7 oder ssRNA – TLR8) und des verwendeten Mediums (Abbildung 5-2). Für die idealen N/P Verhältnisse bezogen auf die biologische Aktivität der Dendriplexe bedeutet das, dass die endosomalen Liganden R3011 und R2197 bei N/P 2 zwar noch nicht zu 100% gebunden sind, trotz allem aber die Transfektionseffizienz ihr Maximum zeigt. Der zytosolische RIG-I Ligand 3pRNA benötigt jedoch nicht nur eine vollständige Verkapselung, sondern auch einen Überschuss an Transfektionsreagenz um sein biologisches Maximum zu erreichen. Um die Partikelgröße der Dendriplexe zu bestimmen, wurden die Liganden wieder in unterschiedlichen Medien und N/P Verhältnissen komplexiert und mittels der dynamischen Lichtstreuung auf Größe und Polydispersität hin untersucht (Abbildung 5-3). Dabei zeigte sich, dass das verwendete Medium einen starken Einfluss auf die entstehende Partikelgröße aller Dendriplexe besitzt. In 0.9%igem NaCl und in PBS kommt es zur Formation von Mikropartikeln, mit einer Größe von 1 µm. Verwendet man jedoch die 5%ige Glucose-Lösung um RNA und PAMAM zu komplexieren, bleiben alle hergestellten Partikel selbst in hohen N/P Verhältnissen unter einem Durchmesser von 100 nm. Wie stark die einzelnen Messwerte von ihrem Mittelwert abweichen gibt der

Polydispersitätsindex (Pdl) wieder. Partikel mit hoher Polydispersität und somit einer starken Distribution zeigen demnach einen hohen PDI Wert von 0,25 bis 1. In Abbildung 5-3 D sind alle gemessenen Partikelgrößen auch mit dem dazugehörigen PDI dargestellt. Dabei fällt auf, dass sich eher in den geringeren N/P Verhältnissen monodispersere Partikel bilden (hellgrün markiert / Pdl < 0,25), die aber bei höherem N/P Verhältnissen stark polydispers werden. Bei 3p-Dendriplexen liegt das ideale N/P Verhältnis bezogen auf die Partikelqualität somit zwischen 2 – 12, für die R3011- und R2197-Dendriplexe eher zwischen 0,1 und 3. Damit geht das ideale N/P Verhältnis hier Hand in Hand mit dem idealen N/P Verhältnis bezogen auf die biologische Aktivität auf humanen PBMCs.

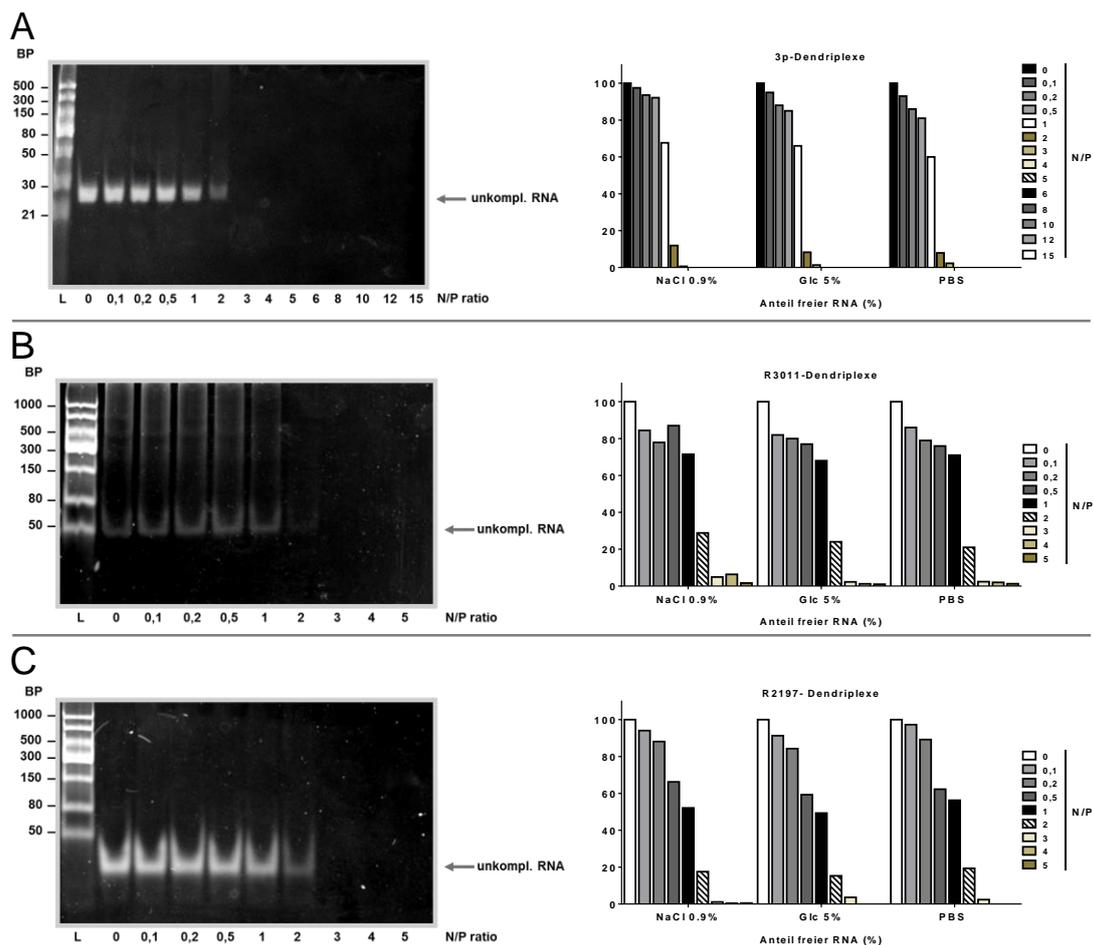


Abbildung 5-2: PAMAM Dendrimere ermöglichen eine vollständige Verkapselung von dsRNA und ssRNA ab einem N/P Verhältnis von 3.

3pRNA (A), R3011 (B) und R2197 (C) (alle 1µg/ml) wurden mit steigenden Mengen an PAMAM G5 versetzt und nach abgeschlossener Komplexierungszeit (20min) auf ein Polyacrylamid-Gel (PAGE) aufgetragen, mit SybrGreen gefärbt und die Fluoreszenz gemessen. Die Graphen (rechts) zeigen die quantitative Bestimmung der Bandenintensität bezogen auf die nicht-komplexierte RNA Kontrollband (N/P 0 / 100%).

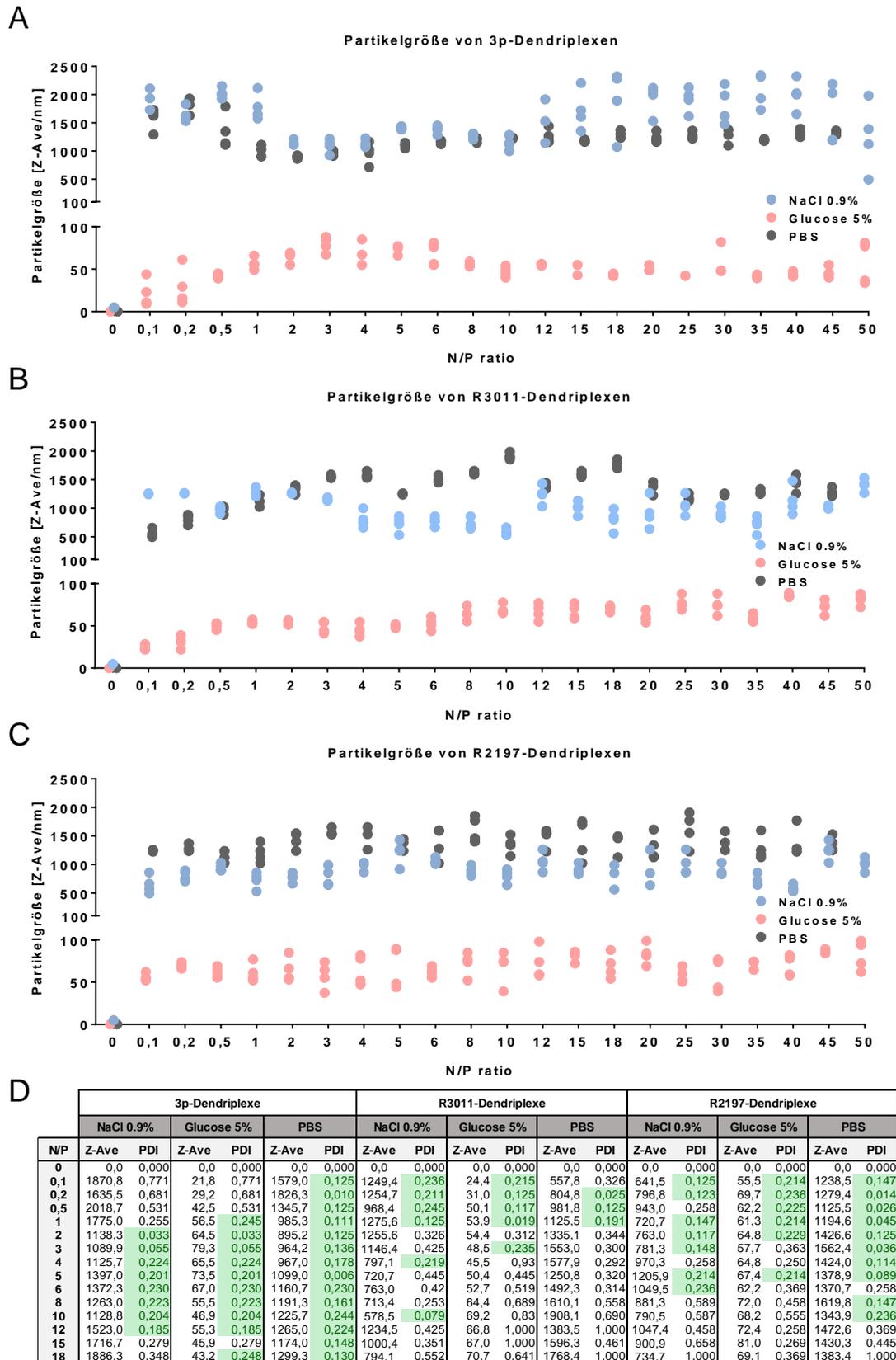


Abbildung 5-3: Die Partikelgröße von 3p- und R3011 Dendriplexen ist abhängig vom verwendeten Transfektionsmedium.

A) 3pRNA, (B) R3011 und R2197 (C) (alle 1µg/ml) wurden mit PAMAM G5 in verschiedenen N/P Verhältnissen und verschiedenen Medien (NaCl, PBS oder Glucose) komplexiert. Die Partikelgröße wurde mittels dynamischer Lichtstreuung vermessen (Zetasizer NanoS, Malvern). Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD von 4 Messwerten, die in (D) inklusive

Polydispersitätsindex (Pdl) tabellarisch aufgeführt sind. Polydispersitäten (Pdl) < 0.250 wurden grün markiert.

Das Zetapotential beschreibt das elektrische Potential der äußeren Abscherschicht eines bewegten Partikels und somit auch die Kraft, die dieses elektrische Feld besitzt, auf andere Ladungen Kraft auszuüben. Über das Zetapotential ist man demnach auch in der Lage die elektrostatische Stabilität einer Suspension zu definieren, die ab $\pm 30\text{mV}$ als elektrostatisch stabil gilt. Aus diesem Grunde wurde hier das Zetapotential aller Ansätze bestimmt, um zu untersuchen, ob die Partikelladung durch das N/P Verhältnis beeinflusst wird, und ob dies im Zusammenhang mit dem Aktivierungspotential steht. Dazu wurden 3p-, R3011- und R2197-Dendriplexe in den N/P Verhältnissen 0 – 50 hergestellt, die nach der Bestimmung des Zetapotentials auch zur Stimulation auf humane PBMCs gegeben wurden. Nach 24h wurde der Überstand der Zellen gewonnen und der Gehalt an IFN α und IL-12p70 bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bei der Transfektion von Liganden der endosomalen und zytosolischen Rezeptoren das Zetapotential mit der funktionellen Aktivierung korreliert. Durch eine Erhöhung des N/P Verhältnisses bei 3p-Dendriplexen tritt, wie in Abbildung 5-1A gezeigt, ab N/P 3 eine Induktion von IFN α ein, die bei weiterer N/P Erhöhung zunimmt und bei N/P 8 ihr Maximum erfährt. Beobachtet man den dazugehörigen Verlauf des Zetapotentials, so fällt auf, dass sich das negative Potential, welches bei N/P 2 vorherrscht, bei N/P 3 in ein stark positives Potential umwandelt. Somit tritt die Aktivierung von RIG-I erst dann ein, wenn die Partikel eine positive Oberflächenladung besitzen. Bei weiterer Erhöhung des N/P Verhältnis bleibt sowohl die Zytokininduktion als auch das Zetapotential unverändert. Eine Korrelation dieser beiden Parameter zeigt sich ebenfalls bei der Stimulation der PBMCs mit den TLR7- und TLR8-Liganden. Wie in Abbildung 5-1B und C beobachtet, führen geringere N/P Verhältnisse der R3011- bzw. R2197-Dendriplexe zu einer starken Induktion von IFN α bzw. IL12-p70. Was hier jedoch deutlich wird, ist, dass das Zetapotential in genau diesen N/P Verhältnissen ein stark negatives Potential besitzt. Genau in dem N/P Verhältnis, bei dem auch hier das Zetapotential in den positiven Wert umschlägt, nimmt auch die Induktion der Zytokine drastisch ab (Abbildung 5-4B, C). Diese Experimente zeigen, dass das Zetapotential nicht aber die Partikelgröße der Dendriplexe vom gewählten N/P Verhältnis abhängt, und dadurch ein entscheidender Einfluss auf die endosomale und zytosolische Transfektionseffizienz genommen werden kann. Im Falle der endosomalen Liganden korreliert ein negatives Zetapotential mit einer erfolgreichen Transfektion, wobei ein zytosolischer Transport positiv geladene Partikel bedingt.

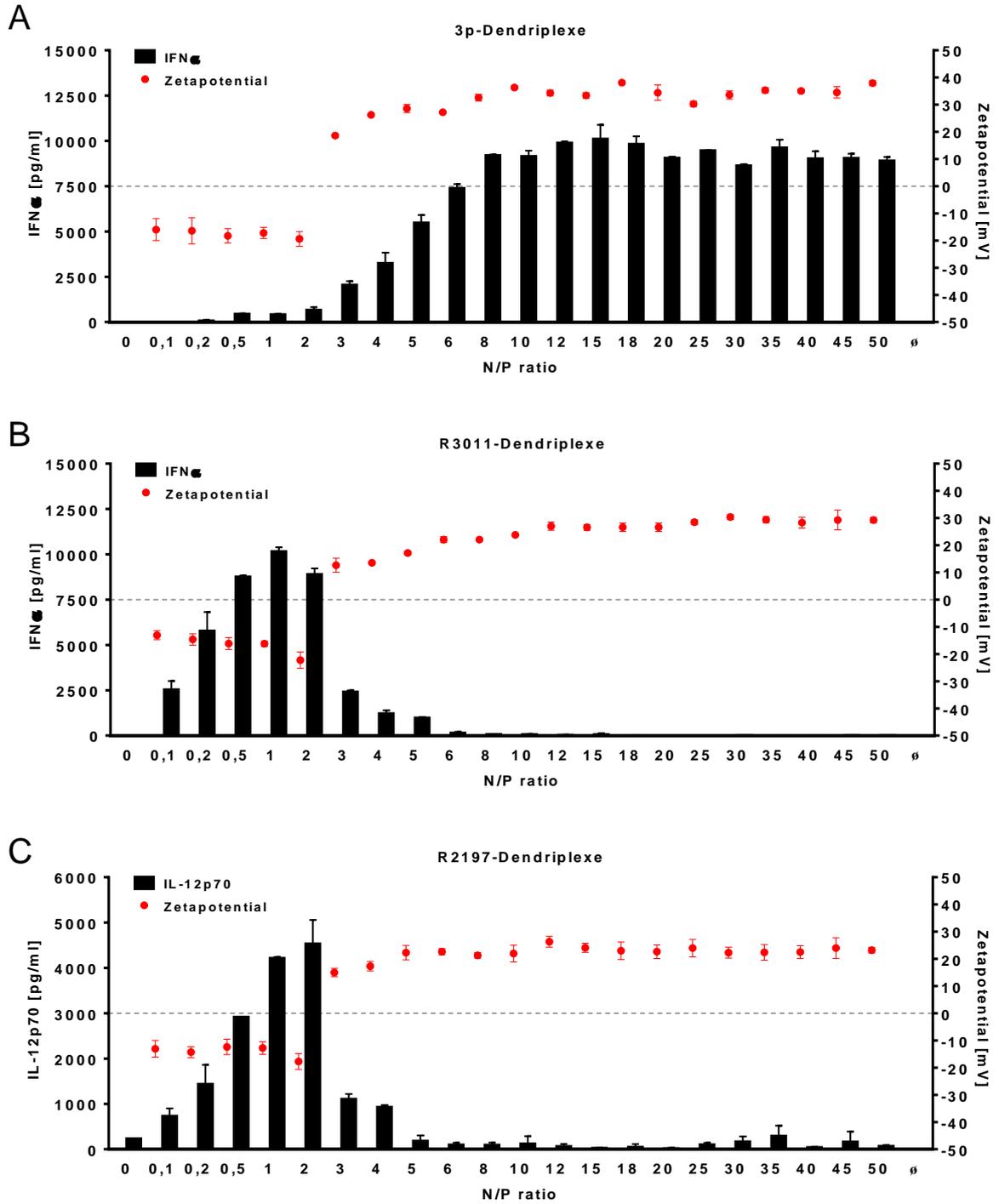


Abbildung 5-4: Das Zetapotential bestimmt das endosomale und zytosolische Aktivitätspotential.

3pRNA (A), R3011 (B) und R2197 (C) (alle 1 μ g/ml) wurden mit PAMAM G5 in verschiedenen N/P Verhältnissen komplexiert. Das Zetapotential aller Ansätze wurden bestimmt (Zetasizer NanoS, Malvern) und anschließend diese zur Stimulation auf humane PBMCs gegeben. Nach 20h Inkubation wurde der Überstand der Zellen isoliert, in dem dann der Gehalt an IFN α und IL-12p70 bestimmt wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von 5 Messwerten.

5.1.3 Die Größe der Dendriplexe beeinflusst die Aufnahme durch verschiedene Zellpopulationen

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) stellen ein Gemisch an Immunzellen dar, die einzeln betrachtet ein ganz unterschiedliches Expressionsmuster des TLR7-, TLR8- und RIG-I-Rezeptors besitzen^{48-50,278}. Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) exprimieren Toll-like Rezeptor-7 und führen nach dessen Aktivierung zu einer starken Induktion von IFN α . Monozyten dagegen exprimieren TLR8 und RIG-I. Hier bewirkt die Aktivierung von TLR8 die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12p70 und Tumornekrosefaktor- α (TNF α), während die Aktivierung von RIG-I durch 3pRNA die Induktion von TNF α und IFN α verursacht.

Tabelle 5-4: Übersicht der Expression von TLR7, TLR8 und RIG-I auf Immunzellen.

Zelltyp	Rezeptorexpression			Indikatorzytokine
	RIG-I	TLR7	TLR8	
pDC	+	+++	-	IFN α
Monozyt	+++	-	+++	TNF α / IL-12p70 (TLR8) IFN α / TNF α (RIG-I)

Die vorangegangenen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Verwendung von unterschiedlichen Medien Dendriplexe unterschiedlicher Größe entstehen lassen. Die folgende Stimulation von humanen PBMCs zeigte dann, dass diese größenunterschiedlichen Dendriplexe auch zu unterschiedlich starken Zytokininduktionen führten. Dieses Ergebnis ließ die Hypothese aufkommen, dass die Dendriplexe ihrer Größe entsprechend womöglich von verschiedenen Zellpopulationen unterschiedlich stark internalisiert werden. Durch diese dann folgende abweichend starke Aktivierung verschiedener Zellen durch den gleichen Liganden, wäre die beobachtete variierende Zytokininduktion erklärbar. Um das Aktivitätsmuster der PBMCs den einzelnen Subzellpopulationen zuzuordnen, wurden Monozyten und BDCA-4⁺ pDCs mittels der MACS[®] Zellseparationstechnik aus den PBMCs isoliert und mit den Dendriplexen stimuliert. Dabei zeigte sich nach der Stimulation der Monozyten ein identisches Bild wie es schon bei den PBMCs zu erkennen war. Die in 5%iger Glucose-Lösung hergestellten Nano-3p-Dendriplexe (<100nm) führten zu einer signifikant schlechteren Induktion von TNF α (Abbildung 5-5A) als die in NaCl oder PBS hergestellten Mikro-3p-Dendriplexe. Der TLR8 Ligand zeigte ebenfalls dieses Muster. R2197-Dendriplexe führen, wenn komplexiert in NaCl oder PBS, in Monozyten zu einer deutlich besseren Induktion von TNF α (Abbildung 5-5A) und auch von IL-12p70 (Abbildung 5-5B). Im Überstand der humanen pDCs jedoch kann bei der Verwendung der Nano-R3011-Dendriplexe die in Glucose hergestellt wurden, ein signifikant höherer Gehalt von IFN α detektiert werden im Vergleich zu den Mikropartikeln (Abbildung 5-5C).

Diese Daten belegen, dass Monozyten durch den TLR8-Liganden in Mikropartikel stärker aktiviert werden während der in pDCs enthaltene TLR7 Rezeptor stärker auf die Stimulation durch Nanopartikel reagiert.

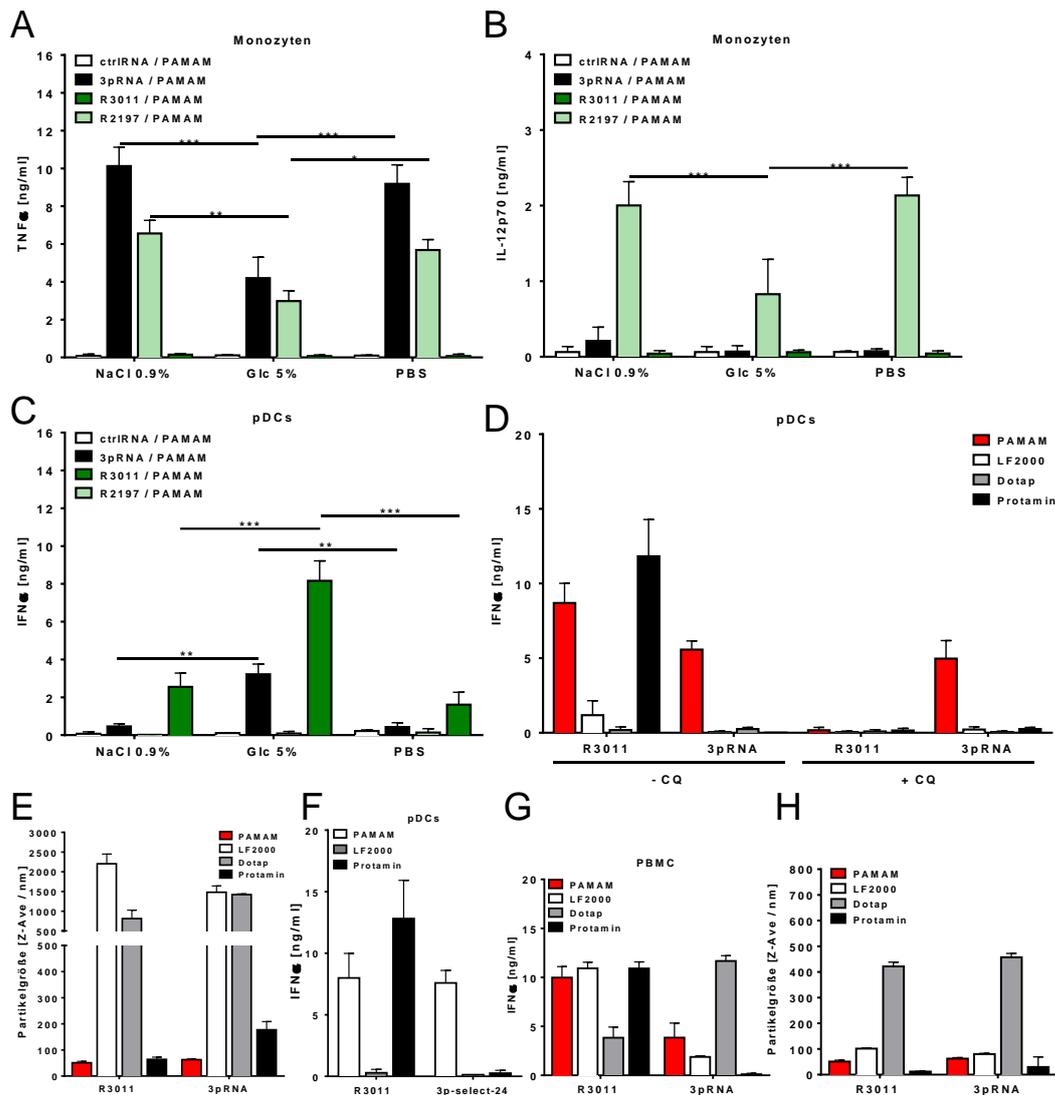


Abbildung 5-5: Die Verwendung von unterschiedlichen Transfektionsmedien für die Formulierung von Dendriplexen beeinflusst das Stimulationspotential auf humanen Monozyten und humanen pDCs.

Monozyten und pDCs wurden aus humanen PBMCs isoliert. 3pRNA, R3011, R2197 oder nicht-stimulatorische RNA (ctrIRNA) wurden mit PAMAM G5 komplexiert (N/P 8 bzw. N/P 2) und 24h zur Stimulation auf die Zellen gegeben. Im Überstand der Monozyten wurde der Gehalt an TNF α (A) und IL-12p70 (B) bestimmt. Im Überstand der pDCs wurde der Gehalt an IFN α bestimmt (C). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Daten von 4 Spendern. (D) Aus PBMCs wurden pDCs isoliert und entweder mit oder ohne Chloroquin (CQ) Zusatz ausgesät. R3011 und 3pRNA wurden in den jeweils idealen Verhältnissen mit PAMAM, Lipofectamine (LF2000), Dotap oder Protamin komplexiert und zur 24h Stimulation auf die Zellen gegeben. Als Transfektionsmedium diente Glucose für PAMAM, Optimem für LF2000 und NaCl für Dotap und Protamin. Anschließend wurde der IFN α Gehalt im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. (E) Zeigt die Partikelgrößen der Komplexe, die in (D) verwendet wurden. (F) Zeigt den gleichen Versuchsansatz wie in (C) nur wurde hier der modifizierte, RIG-I selektive Ligand 3p-select-24 verwendet. (G,H) 3pRNA und R3011 wurden in 5% Glucose als Transfektionsmedium mit LF2000, PAMAM (N/P 8 bzw. N/P 2), Protamin und mit Dotap komplexiert. (G) zeigt den gemessenen IFN α Gehalt nach 24h Stimulation im Überstand der Zellen. In (H) sind die Partikelgrößen der Komplexe gezeigt, die in (G) verwendet wurden. Gezeigt sind die Daten von 3 Spendern. *, ** und *** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$.

5.1.3.1 Nano-Dendriplexe führen zu einer zytosolischen Aktivierung durch den RIG-I Liganden 3pRNA in humanen pDCs

Daten bisheriger Literatur schreiben dem schwach exprimierten RIG-I Rezeptor in pDCs nur eine untergeordnete Rolle zu^{48,68} oder zeigen, dass eine vorangeschaltete TLR7 Aktivierung überhaupt erst zu einer Aufregulation von RIG-I in pDCs führt^{279,280}. Interessanterweise konnten wir nach Stimulation mit 3p-Dendriplexen eine Induktion von IFN α im Überstand der pDCs detektieren (Abbildung 5-5C). Dieses Signal war aber nur detektierbar, wenn 3pRNA in 5%iger Glucose-Lösung mit PAMAM komplexiert wurde und demnach kleine Partikel <100nm entstanden. Diese Aktivierung von RIG-I war mit 3p-Dendriplexen > 1000nm in keinerlei Maße zu erreichen. Um auszuschließen, dass dieses Signal nicht über eine endosomale TLR-Aktivierung ausgelöst wurde, wurden pDCs mit Chloroquin behandelt. Chloroquin ist in der Lage die Ansäuerung der Endosomen zu verhindern und damit die Funktionalität der dort lokalisierten Rezeptoren zu inhibieren. Trotz des Einsatzes dieses Reagenz waren die Nano-3p-Dendriplexe in der Lage RIG-I in den pDCs zu aktivieren, wohingegen die Induktion von IFN α durch die R3011-Formulierungen komplett unterbunden wurde (Abbildung 5-5D). Auch andere Transfektionsreagenzien wie Lipofectamine2000 oder Dotap, die oft für die Transfektion von 3pRNA verwendet werden, ergaben keine Induktion von IFN α . Interessanterweise lagen aber auch die gemessenen Partikelgrößen der 3p-Lipofectamine2000 (3p-LF2000) und auch der 3p-Dotap Komplexe bei fast 1500nm (Abbildung 5-5E). Allein die R3011-Protamin-Komplexe besaßen eine Größe von < 100nm und waren demnach in der Lage TLR7 in pDCs zu stimulieren.

Einen weiteren Beweis für die Aktivierung von RIG-I in pDCs konnte durch die Verwendung eines alternativen RIG-I Liganden erzielt werden (Abbildung 5-5F). Dieser RIG-I Ligand (3p-select-24) stellt eine am 5'-Ende triphosphorylierte doppelsträngige RNA dar, die durch interne Modifikationen eine Aktivierung von TLR7 verhindert und so eine RIG-I Selektivität besitzt⁶⁶ (unpublizierte Daten). Auch dieser RIG-I Ligand führte zu einer Produktion von Type-I Interferon, wenn er mit PAMAM in 5%iger Glucose-Lösung komplexiert wurde. Abermals war die Transfektion von 3pRNA mit Lipofectamine2000 hier nicht effektiv.

Dies deutet auf eine Aktivierung von RIG-I in pDC durch Nano-3p-Dendriplexe aber nicht durch Mikro-3p-Dendriplexe hin, was im Weiteren durch knock-out Experimente bestätigt werden sollte.

5.1.3.2 Die Verwendung von 5%iger Glucose führt zu kleineren Partikelformationen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob 5%ige Glucose nur die Größe von PAMAM-Dendriplexen minimiert, oder generell diese Fähigkeit besitzt, so dass auch bei weiteren Transfektionsreagenzien die mit Oligonukleotiden komplexiert werden, dessen Partikelgröße reduziert werden kann. Dazu wurden R3011 und 3pRNA in Glucose als Transfektionsmedium jeweils mit PAMAM, Lipofectamine2000, Dotap oder Protamin komplexiert, die Partikelgröße gemessen und anschließend die Komplexe zur Stimulation auf humane PBMCs gegeben. Bis auf die RNA-Dotap Komplexe konnten alle Partikelgrößen sehr nah an die 100nm gebracht werden (Abbildung 5-5H). Eine besonders starke Partikelgrößenreduzierung konnte bei den RNA-

Lipofectamine2000 Komplexen erzielt werden. Die in Optimem formulierten 2 µm große R3011-LF2000 Partikel wiesen in 5%iger Glucose-Lösung hergestellt nur noch eine Größe von auf ca. 120nm auf. 3pRNA-LF2000 Partikel verkleinerten sich in 5%iger Glucose-Lösung auf <100nm im Vergleich zu ca. 1500nm in Optimem (Abbildung 5-5H). Passend zu den oben beschriebenen Ergebnissen führen die neuen kleineren R3011-LF2000 Partikel dann auch auf den PBMCs zu einer verbesserten Induktion von IFN α , wohingegen die Aktivierung von RIG-I verschlechtert wird. Da die R3011- und 3pRNA-Dotap-Komplexe durch die Verwendung von Glucose weniger stark in ihrer Größe verändert werden konnten (von ca. 1200nm auf ca. 400-500nm) fiel auch das Induktionsmuster auf den PBMC weniger stark unterschiedlich aus. Jedoch zeigt dieses Ergebnis, dass für eine hoch effiziente Transfektion von TLR7 Liganden, die Partikelgröße um die 100nm oder kleiner liegen sollte.

Diese Ergebnisse belegen die initiale Hypothese, dass die Partikelgröße von RNA-Komplexen sehr stark darüber entscheidet, von welcher Zielzelle der Komplex aufgenommen wird. Größere Mikropartikel landen vermehrt in den Monozyten, in denen TLR8 und RIG-I hoch exprimiert sind und es demnach bei Aktivierung neben IFN α auch zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12p70 und TNF α kommt.

Die kleineren Nanopartikel werden bevorzugt von pDCs aufgenommen. Hauptsächlich die Aktivierung des dort hoch exprimierten Toll-like Rezeptors 7, aber auch die Aktivierung von RIG-I, führt hier zur Ausschüttung von IFN α .

5.1.4 PAMAM Dendrimere stellen im Vergleich zu etablierten Substanzen ein effektiveres Transfektionsreagenz für den Transport von 3pRNA *in vitro* dar

Aus den vorangegangenen Experimenten ließen sich folgende Komplexierungsbedingungen für die effizienteste Transfektion durch PAMAM Dendrimere und eine dadurch erfolgreiche Stimulation der endosomalen TLR7- und TLR8-Rezeptoren, sowie für den zytosolischen Rezeptor RIG-I definieren:

Tabelle 5-5: Übersicht der idealen Formulierungsbedingungen.

Rezeptor	Ligand	N/P Verhältnis	Medium	Komplexierungszeit
TLR7	R3011	2	Glucose 5%	10 – 20min
TLR8	R2197	2	NaCl / PBS	10 – 20min
RIG-I	3pRNA	8	NaCl / PBS	10 – 20min

Da in der klinischen Anwendung eine 0.9%ige Natriumchlorid-Lösung gebräuchlicher ist, als eine phosphatgepufferte Salzlösung, wurden im weiteren Verlauf ausschließlich NaCl 0.9% zur Herstellung von größeren Dendriplexen und 5% Glucose für die Formulierung kleinerer Dendriplexe verwendet.

Um die Transfektionseffizienz der PAMAM Dendrimere der von anderen oft verwendeten Transfektionsreagenzien gegenüberzustellen, wurde im Folgenden ein direkter Vergleich auf humanen PBMCs durchgeführt (Abbildung 5-6 A, B). Der endosomale Transport des TLR7

Liganden durch PAMAM Dendrimere wurde mit Protamin, poly-L-Arginin und Dotap verglichen, der zytosolische Transport des RIG-I Liganden mit Lipofectamine (LF2000) und Polyethylenimin (PEI).

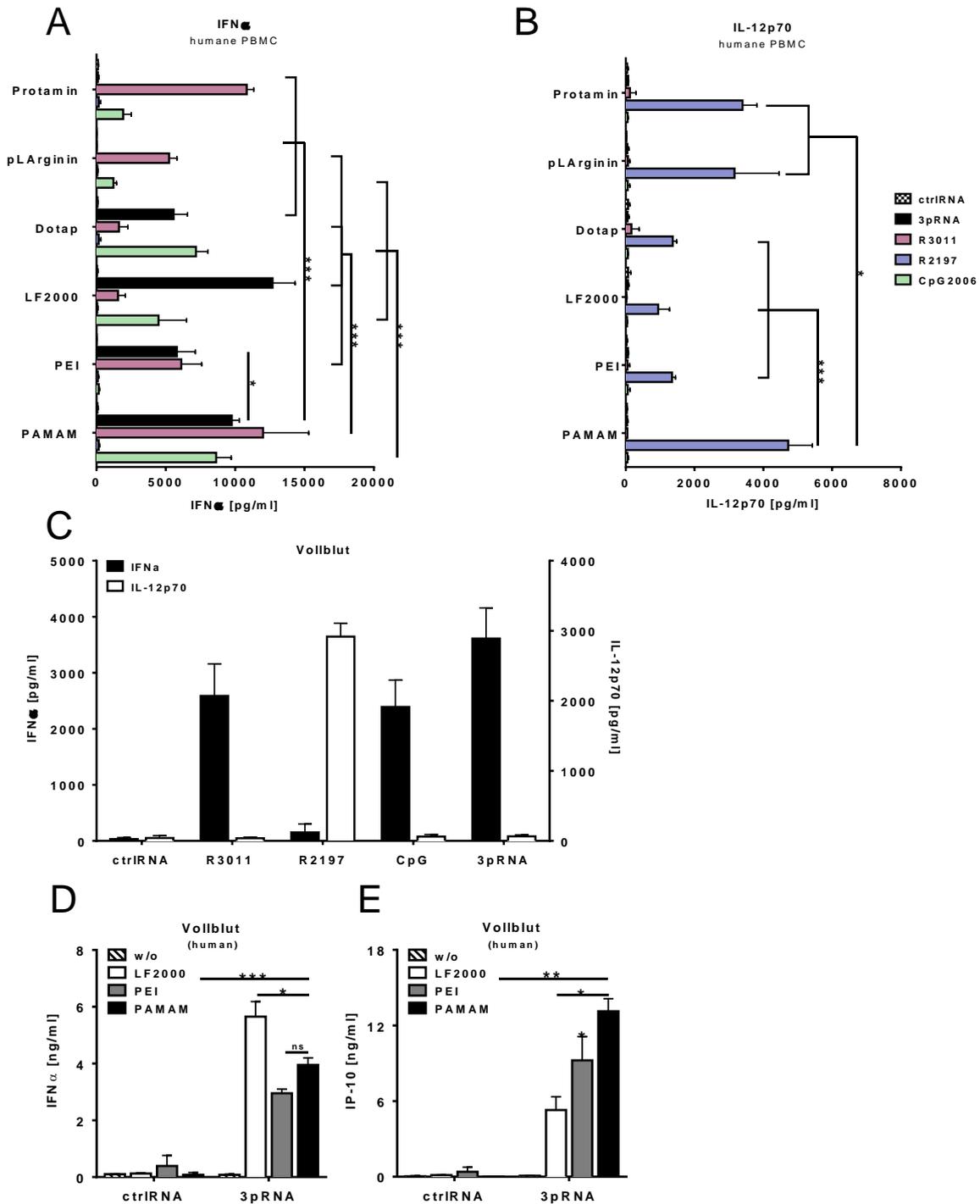


Abbildung 5-6: PAMAM G5 ermöglicht eine effiziente endosomale und zytosolische Transfektion im humanen System.

Verschiedene Oligonukleotide (1 μ g/ml) wurden mit PAMAM, Polyethylenimine (PEI), Lipofectamine (LF2000), Dotap, poly-L-Arginin oder Protamin im jeweils idealen N/P Verhältnis komplexiert und zur Stimulation auf humane PBMCs gegeben. 24h nach der Transfektion wurde der Überstand der Zellen abgenommen und der Gehalt an IFN α (A) und IL-12p70 (B) mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Daten von insgesamt 4 Spendern, die als Mittelwerte \pm SD angegeben sind. (C) Vollblut wurde von gesunden Spendern gewonnen und in Zellkulturplatten (200 μ l/well) ausgesät. 3pRNA, R3011, R2197 und CpG-ODN (alle 1 μ g/ml) wurden mit PAMAM für 20min komplexiert und auf das Vollblut gegeben. Nach 24h Inkubation

wurde das oben aufliegende Serum abgenommen und der Gehalt an IFN α (schwarz) und IL-12p70 (weiß) mittels ELISA bestimmt. (D,E) wie auch in (C) wurde humanes Vollblut mit ctrlRNA oder 3pRNA stimuliert, welche zuvor entweder mit PAMAM, PEI, Lipofectamine komplexiert wurden. Nicht stimuliertes Vollblut diente als Kontrolle (w/o). Nach 24h Inkubation bei 37°C wurde im aufliegenden Serum der Gehalt an IFN α (D) und IP-10 (E) bestimmt. *,** und *** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$.

Dotap und Lipofectamine sind kationische Lipide, die sich das Prinzip der Lipofektion zu Nutze machen um gebundene oder auch in sich eingeschlossene Stoffe in die Zelle zu transportieren. In zahlreichen publizierten Studien wurde beispielsweise Dotap als Transfektionsreagenz für TLR7/8-Liganden^{30,59,281,282} und Lipofectamine^{72,276} zur Transfektion von 3pRNA eingesetzt. Das bereits in der Klinik zugelassene Medikament Protamin und auch das poly-L-Arginin stellen kationische Peptide dar. Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass Protamin in der Lage ist mRNA²⁸³, CpG-Oligonukleotid^{217,284} oder auch TLR7/8 Liganden²¹⁰ zu komplexieren und erfolgreich endosomal zu transportieren. Auch poly-L-Arginin wurde besonders für den Einsatz von TLR7/8 Liganden verwendet²⁸⁵.

Im direkten Vergleich auf humanen PBMCs zeigte sich, dass PAMAM-Dendrimere den Vorteil besitzen als einziges Transfektionsreagenz in der Lage zu sein, Liganden hoch effektiv sowohl endosomal als auch zytosolisch zu transportieren (Abbildung 5-6 A, B). 3pRNA-Dendriplexe führen zu einer signifikant höheren Induktion von IFN α im Vergleich zu 3pRNA, die mit PEI oder Dotap komplexiert wurde. Es ist bekannt, dass kationischen Peptiden, wie Protamin oder poly-L-Arginin für eine zytosolische Transfektion von RNA/DNA nicht geeignet sind. Das konnte auch in diesen Versuchen für den Transport von 3pRNA zur Aktivierung des zytosolischen RIG-I Rezeptors bestätigt werden, denn 3pRNA-Protamin bzw. 3pRNA-poly-L-Arginin Formulierungen führen zu keinerlei Typ-I Interferon nach Stimulation der Zellen. Verglichen mit dem für den 3pRNA-Transport etablierten Lipofectamine 2000 induzieren die 3p-Dendriplexe nach Stimulation der PBMCs eine vergleichbare Menge an IFN α und stellen damit eine effektive Alternative für das kationische Lipid dar.

Auch bei der Transfektion des TLR7-Ligand R3011 sticht die Effektivität der R3011-Dendriplexe deutlich heraus. Nur zusammen mit Protamin führt R3011 zu einer vergleichbaren IFN α Induktion. Für die Transfektion des TLR9-Liganden CpG-ODN stellt PAMAM, in Bezug auf die Typ-I Interferon Antwort, sogar das beste Transfektionsreagenz dar. Selbst im Vergleich zu Dotap, welches als ideales Transfektionsreagenz für CpG-Oligonukleotide verwendet wird, führen CpG-Dendriplexe zu einer signifikant stärkeren Aktivierung von TLR9. Aber auch die Aktivierung von TLR8, bzw. die damit verbundene Induktion von IL-12p70, durch R2197-Dendriplexe ist allen gegenübergestellten R2197-Formulierungen signifikant überlegen (Abbildung 5-6B).

Interne Studien haben gezeigt, dass die Aktivität immunstimulatorischer Oligonukleotide hervorragend auf PBMCs getestet werden kann, jedoch Experimente im Vollblut eine systemische *in vivo* Applikation besser nachstellen²⁸⁶. Demnach wurden auch PAMAM-Dendrimere komplexiert mit unterschiedlichen Liganden für 24h in Vollblut gegeben, und anschließend der Überstand auf die Induktion von IFN α , IP-10 (CXCL10) und IL-12p70 hin untersucht (Abbildung 5-6C-E). Auch hier führen die R3011-, CpG- und 3p-Dendriplexe zu einer Induktion von IFN α und die R2197-

Dendriplexe zur Induktion von IL-12p70, was eine erfolgreiche Aktivierung von TLR7-, TLR8-, TLR9- und RIG-I auch in Vollblut nahelegt (Abbildung 5-6C). Im direkten Vergleich zu 3p-Lipofectamine (3p-LF2000) Komplexen fällt auf, dass die 3p-Dendriplexe zwar zu einer geringeren Induktion von IFN α , jedoch aber zu einer erhöhten Induktion des Typ-I Interferon-assoziiertem Chemokin IP-10 führt. Allerdings kann die Transfektionseffizienz, die durch 3p-Polyplexe (3p-PEI) hervorgerufen wird, durch den Einsatz von 3p-Dendriplexen deutlich übertroffen werden, was durch die signifikant erhöhte Induktion von IFN α und auch IP-10 deutlich gemacht wird.

Zusammenfassend kann man die Transfektion mittels PAMAM-Dendrimern als eine hoch effektive Methode bezeichnen, die es im Gegensatz zu anderen Transfektionsreagenzien ermöglicht, sowohl endosomal wie auch zytosolisch lokalisierte Rezeptoren zu aktivieren.

5.1.5 3p-Dendriplexe führen auch im murinen System zur Aktivierung von RIG-I *in vitro*

Im weiteren Verlauf der Experimente mit PAMAM-Dendrimern sollte auch dessen Effektivität *in vivo* untersucht werden. Dazu wurde der Fokus dieser Arbeit auf den Transport von 3pRNA durch PAMAM-Dendrimere gelegt. Vor den ersten *in vivo* Studien, die im Maussystem geplant waren, sollte zunächst die Testung der 3p-Dendriplexe in Mauszellen *in vitro* erfolgen. Zu diesem Zweck wurden PBMCs aus murinem Vollblut isoliert und mit 3pRNA-Formulierungen stimuliert.

Die Bestimmung des IFN α und auch des IP-10 Gehalts im Überstand der stimulierten murinen PBMCs zeigte deutlich, dass 3p-Dendriplexe auch im murinen System in der Lage sind, RIG-I zu aktivieren (Abbildung 5-7A, B). Auch die folgende Stimulation von murinem Vollblut bestätigte diese Aussage und belegt die Übertragbarkeit der humanen Ergebnisse *in vitro* auf das murine System (Abbildung 5-7C, D). Auch hier führten die 3p-Dendriplexe im Vergleich zu den 3p-LF2000 Formulierungen wieder zu einer erhöhten Produktion des Chemokins IP-10, wohingegen die Induktion von IFN α vergleichbar oder leicht schlechter zu sein schien.

Da auch hier wieder die Frage aufkam, ob die Induktion der Zytokine bzw. Chemokine, und damit die Aktivierung der Zellen, auch vollständig einer Aktivierung von RIG-I zuzuschreiben ist, wurden im weiteren Verlauf murine Makrophagen aus dem Knochenmark von Wild-Typ (WT) und RIG-I knock-out ($^{-/-}$) Mäusen generiert (BMDM = *bone marrow derived macrophages*⁶⁸) und mit den 3p-Formulierungen stimuliert. Als Kontrolle wurde polyI:C, ein Ligand des zytosolisch lokalisierten Rezeptors MDA5, verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass 3p-Dendriplexe auch in diesen Zellen ein hohes Aktivierungspotential besitzen und in den Wildtyp Zellen zu einer signifikanten Induktion der relevanten Zyto- und Chemokine führen (Abbildung 5-7E, F). Dieser Nachweis von IFN α bzw. IP-10 durch die 3p-Dendriplexe und auch der anderen 3p-Formulierungen, konnte nahezu komplett unterbunden werden, wenn anstelle von Wildtyp-Zellen, RIG-I defiziente Zellen (RIG-I $^{-/-}$) stimuliert wurden. Dies war nicht der Fall war, wenn anstelle eines RIG-I Liganden polyI:C verwendet wurde.

Diese Ergebnisse belegen, dass Dendriplexe auch im murinen System in der Lage sind 3pRNA in das Zytosol zu transportieren um dort die Aktivierung von RIG-I zu veranlassen.

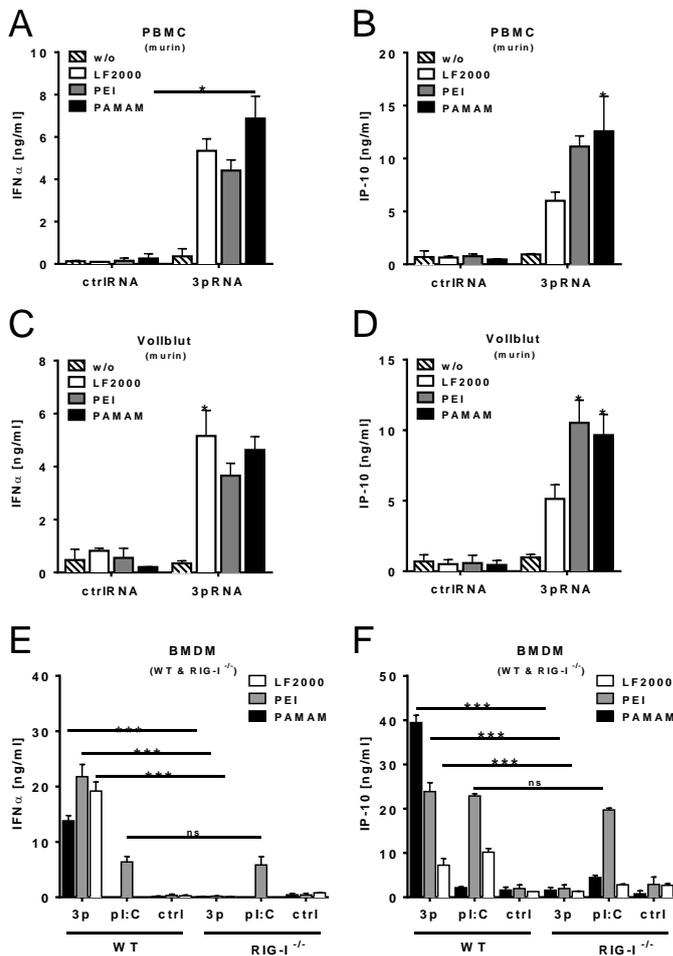


Abbildung 5-7: PAMAM Dendrimere ermöglichen auch im murinen System eine effiziente zytosolische Transfektion und führen zu einer effektiven und selektiven Aktivierung von RIG-I.

(A-D) 6 Wochen alte C57BL/6 wurden mittels Isofluran unter Narkose gelegt und einer retroorbitalen Blutentnahme unterzogen. Das Blut der Mäuse wurde gepoolt. Aus dem Vollblut wurden PBMCs gewonnen (A,B) oder das Vollblut pur ausgesät (C,D). 3pRNA oder ctrlRNA (1 μ g/ml) wurden mit PAMAM, Lipofectamine (LF2000) oder Polyethylenimin (PEI) jeweils im idealen N/P Verhältnis komplexiert und zur Stimulation auf die PBMCs bzw. das Vollblut gegeben. 24h nach der Transfektion wurde der Überstand gewonnen und in diesem der Gehalt an IFN α (A,C) und IP-10 (B,D) mittels ELISA bestimmt. Aus dem Knochenmark von C57BL/6 Wildtyp (WT)- oder RIG-I knock out (-/-) Mäusen wurden Makrophagen generiert (BMDM) (E,F) und mit 3pRNA bzw. ctrlRNA (1 μ g/ml) stimuliert, die zuvor mit PAMAM, Lipofectamine (LF2000) oder PEI komplexiert wurden. Nach 20h wurde IFN α (E) und IP-10 (F) im Überstand bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten \pm SD, wobei *, ** und *** für $p > 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$ steht.

5.1.6 3p-Dendriplexe führen in humanen und murinen Tumorzellen zur Initiation von RIG-I vermittelten Signalwegen

Im Jahr 2009 konnte gezeigt werden, dass nach einer erfolgreichen Aktivierung von RIG-I in humanen Melanomzellen neben der antiviralen Antwort auch ein proapoptotischer Signalweg initiiert wird⁸⁸. Dieser Interferon-unabhängige, jedoch IPS-1-abhängige Signalweg induziert die proapoptotischen BH-3-only Proteine NOXA und PUMA. Diese beiden Proteine scheinen in Melanomzellen relevant für die Apoptose zu sein, wohingegen der Tumorsuppressor p53 keinen Einfluss besitzt. Die Gruppe zeigte auch, dass eine RIG-I Aktivierung in nicht-malignen Zellen deutlich geringer zur Apoptose führt.

Das Potential von 3p-Dendriplexen zur Aktivierung von RIG-I in malignen Zellen und der damit einhergehenden Auslösung einer antiviralen Immunantwort, sowie der Induktion von Apoptose, wurde im Folgenden sowohl für humane als auch für murine Zellen näher untersucht. Hierfür wurden 3p-Dendriplexe, 3p-Polyplexe (3p-PEI) und 3p-Lipoplexe (3p-Lipofectamine2000) zur Stimulation zunächst auf humane monozytären leukämischen Zellen (THP-1) oder humane Melanomzellen (D04) gegeben. In beiden humanen Zelllinien konnten besonders die 3p-

Dendriplexe und 3p-Polyplexe eine starke Induktion des Typ-I Interferon-assoziiertem Chemokin IP-10 bewirken, die bei den 3p-Dendriplexen in beiden Zelllinien der Induktion durch 3p-Lipoplexe signifikant überlegen war (Abbildung 5-8A, B).

Auch in den murinen Tumorzelllinien kam es zu einer deutlich verstärkten CXCL10-Induktion nach Stimulation mit 3p-Dendri- bzw. 3p-Polyplexen. Stimuliert wurden hier die murinen Melanomzelllinien B16 (Abbildung 5-8C) und HcMel12 (Abbildung 5-8D), sowie die murine Hepatomazelllinie Hepa129 (Abbildung 5-8E).

Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass Dendriplexe in der Lage sind auch Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs effektiv mit einem RIG-I Liganden zu transfizieren und das effektiver als es Lipofectamine vermag.

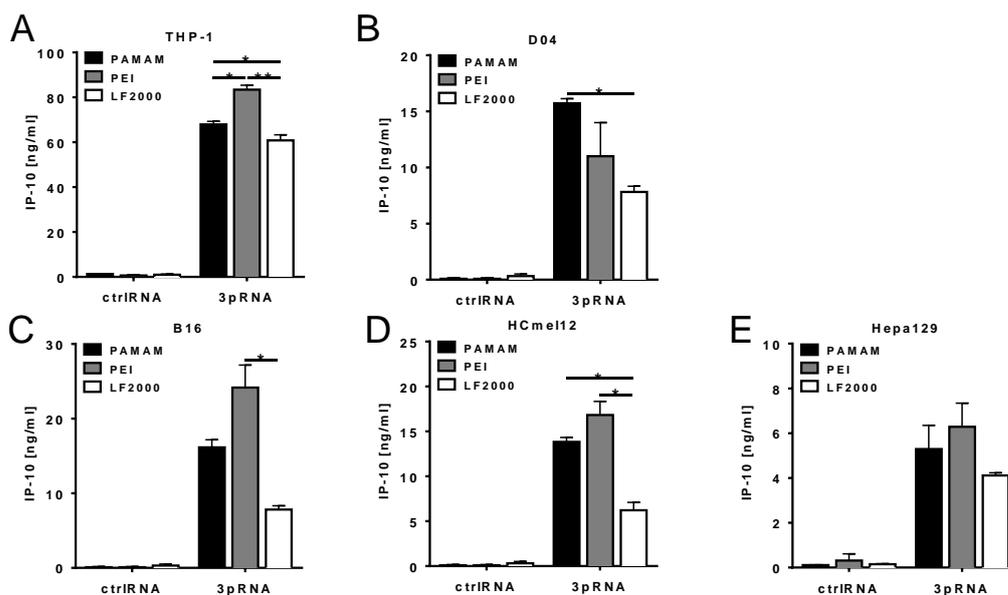


Abbildung 5-8: 3p-Dendriplexe führen auch in humanen und murinen Tumorzellen zur einer effektiven Aktivierung von RIG.

3pRNA und ctrlRNA (1µg/ml) wurden mit PAMAM, Polyethylenimine (PEI) oder Lipofectamine (LF2000) komplexiert und zur Stimulation auf humane D04 Melanomzellen (A), auf humane monozytäre THP-1 Zellen (B), auf murine Melanomzellen (B16 (C) und HcMel12 (D)) und auf murine Hepa129 Zellen (E) gegeben. 24h nach der Transfektion wurde der Überstand der Zellen abgenommen und der Gehalt an IP-10 mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Daten von insgesamt 3 Experimenten, die als Mittelwerte \pm SD angegeben sind. * und ** stehen für $p < 0,05$ und $p < 0,01$.

Das unterstreichen auch die Daten, die auch mRNA Ebene erhoben wurden (Abbildung 5-9). Hier wurden humane D04 und murine B16 Melanomzellen, sowie murine Hepa129 Zellen 6h mit einer nicht-stimulatorischen RNA (ctrlRNA) oder mit 3pRNA stimuliert, die mit PAMAM, PEI oder Lipofectamine komplexiert wurden. Die dann isolierte RNA wurde auf die mRNA Expression von IP-10 und RIG-I hin untersucht, die Aufschluss über die erfolgreiche Aktivierung von RIG-I lieferte (Abbildung 5-9A, C, E). Daneben wurde aber auch die mRNA Expression der beiden proapoptotischen Gene NOXA und PUMA untersucht, die bei Aufregulation zur Apoptose der Zelle führen (Abbildung 5-9B, D, F). Die mRNA Expression von IP-10 und auch von RIG-I spiegelte das auf Proteinebene entstandene Bild sehr präzise wieder. Es kommt durch die Stimulation mit 3p-

Dendriplexen sowohl in den humanen D04 Melanomzellen, als auch in den murinen Tumorzelllinien B16 und Hepa129 zu einer deutlichen Aufregulation von RIG-I (schwarz) und IP-10 (weiß) im Vergleich zu den nicht-stimulatorischen Dendriplexen (ctrl-Dendriplexen). Besonders in den murinen Melanomzellen ist diese 3p-Dendriplex-induzierte mRNA Expression der einen durch 3p-Lipoplex ausgelösten Expression überlegen. Betrachtet man parallel dazu die mRNA Expression der proapoptotischen Proteine NOXA (schwarz) und PUMA (weiß), konnte in allen 3 Zelllinien eine Aufregulation nach Stimulation mit 3p-Formulierungen im Vergleich zu den ctrl-Formulierungen erzielt werden. Das zeigt, dass die Initiierung der Apoptose allein durch die aktivierende Wirkung von 3pRNA, und nicht durch die Behandlung und Transfektion der Zellen per se ausgelöst wird.

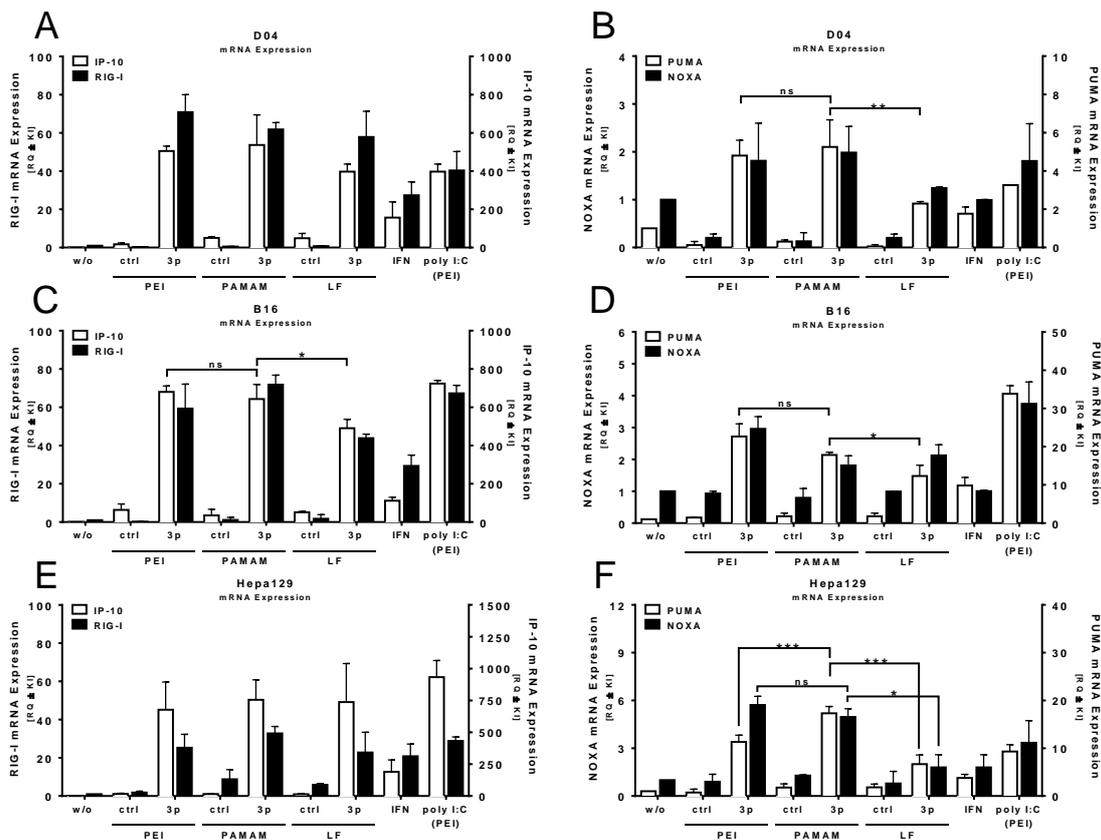


Abbildung 5-9: 3p-Dendriplexe führen in humanen und murinen Tumorzellen zu einer Aufregulation von RIG-I spezifischen und proapoptotischen Genen.

3pRNA oder ein nicht-stimulatorisches Oligonukleotid (ctrlRNA) wurden mit PAMAM, Polyethylenimine (PEI) oder Lipofectamine (LF2000) komplexiert und zur Stimulation auf humane D04 Melanomzellen (A,B), auf murine B16 Melanomzellen (C,D) und auf murine Hepa129 Hepatomazellen (E,F) gegeben. Nach 6h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und die gebildete IP-10 und RIG-I mRNA (A,C,E) bzw. die NOXA und PUMA mRNA (B,D,F) relativ über RT-qPCR bestimmt. Angegeben sind die relativen Quantitäten \pm Konfidenzintervall. *, ** und *** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$. ns steht für nicht signifikant.

Der direkte Vergleich der 3p-Formulierungen zeigt ein deutlich höheres Potential der 3p-Dendriplexe und der 3p-Polyplexe gegenüber den 3p-Lipoplexen die mRNA Expression der proapoptotischen Proteine zu erhöhen. Insbesondere die murinen Hepatomazellen scheinen nach 3p-Dendriplex Stimulation sehr effektiv mit einer Aufregulation der proapoptotischen Proteine zu

reagieren (Abbildung 5-9F). Dass diese effektive Aufregulation der proapoptotischen Gene letztendlich auch zur Apoptose der Tumorzellen führt, konnte mit dem folgenden Experiment belegt werden. Hier wurden die Tumorzellen 48h mit den verschiedenen 3pRNA- bzw. ctrlRNA-Ansätzen stimuliert, die Zellen anschließend isoliert und der entstandene Zelltod nach Apoptose und Nekrose unterteilt bestimmt (Abbildung 5-10). Es zeigte sich, in Übereinstimmung mit der Aufregulation von NOXA und PUMA, dass transfizierte 3pRNA in der Lage ist Tumorzellen in die Apoptose zu führen. Für die Behandlung von D04-Melanomzellen mit 3pRNA-Lipoplexen konnte eine effektive Apoptoseinduktion schon beschrieben werden⁸⁸. Wir konnten hier zeigen, dass auch 3p-Dendriplexe diese RIG-I vermittelte Apoptose zu initiieren vermögen, und das tendenziell besser als 3p-Lipoplexe.

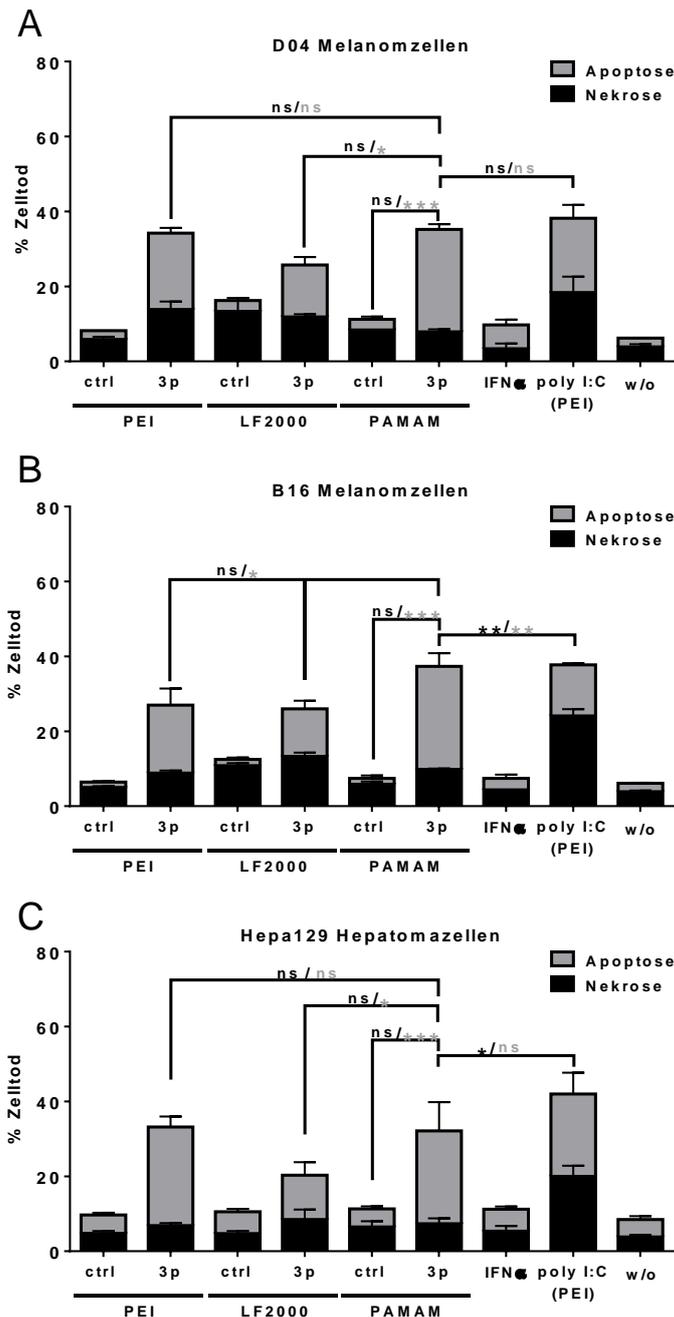


Abbildung 5-10: 3p-Dendriplexe führen in murinen Tumorzellen zu einer effektiven Apoptoseinduktion.

1µg/ml 3pRNA oder nicht-stimulatorische RNA (ctrlRNA) wurden mit PAMAM, Polyethylenimine (PEI) oder Lipofectamine (LF2000) komplexiert. Als Kontrolle wurde polyI:C (komplexiert mit PEI) und IFNα verwendet, oder die Zellen wurden nicht behandelt (w/o). Alle Ansätze wurden auf humane D04 Melanomzellen (A), murine B16 Melanomzellen (B) und murine Hepa129 Hepatomazellen (C) gegeben. 48h nach der Transfektion wurden die Tumorzellen isoliert und die Apoptoserate im Durchflusszytometer mittels YoPro/Hoechst33258 Färbung ermittelt. Gezeigt sind die Daten von insgesamt 3 Experimenten, die als Mittelwerte ± SD angegeben sind. *, ** und *** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$. ns steht für nicht signifikant. Graue Zeichen vergleichen die Apoptose; Schwarze Zeichen vergleichen die Nekrose.

Dies war nicht nur der Fall bei den humanen Melanomzellen, sondern konnte auch bei den murinen B16 Melanomzellen (Abbildung 5-10B) und auch bei den murinen Hepatomazellen (Abbildung 5-10C) beobachtet werden. Jedoch konnten die 3p-Dendriplexe im direkten Vergleich zu den 3p-Polyplexen nur in den murinen Hepatomazellen zu einer signifikant besseren Apoptoseinduktion führen. Sowohl in den humanen als auch in den murinen Melanomzellen, war kein Unterschied zwischen Dendriplexen und Polyplexen nachweisbar (Abbildung 5-10A, B). In allen Versuchen war auffällig, dass die polyI:C behandelten Zellen mit einem sehr starken Zelltod reagierten, der stärker als bei 3pRNA nekrotisch geprägt war.

Damit konnten wir *in vitro* zeigen, dass 3p-Dendriplexe in der Lage sind Tumorzellen zur Synthese von antiproliferativen Zytokinen zu stimulieren sowie Apoptose in Tumorzellen auszulösen. Im Folgenden sollte dann diese Wirksamkeit auch *in vivo* untersucht werden.

5.2 Evaluierung der Anwendbarkeit von 3p-Dendriplexen *in vivo*

5.2.1 Systemische Applikation von 3p-Dendriplexen

5.2.1.1 3p-Dendriplexe führen zu einer dosisabhängigen Immunantwort nach intravenöser Gabe

Die erste wichtige Frage die wir uns für die *in vivo* Studien stellten war, ob Dendriplexe in der Lage sind auch *in vivo* 3pRNA zum Rezeptor RIG-I zu bringen und wenn ja, ob auch hier die Partikelcharakteristika einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Dendriplexe haben. Dazu wurden wie schon für die *in vitro* Experimente 3p-Dendriplexe in unterschiedlichen Medien hergestellt, was zur Formation von kleinen (<100nm) Partikeln in 5%iger Glucose-Lösung und größeren Partikeln (>1000nm) in 0.9%iger NaCl bzw. PBS Lösung führte. Diese Ansätze wurden anschließend C57BL/6 Mäusen intravenös verabreicht. Die erfolgreiche Aktivierung von RIG-I und die damit messbare Induktion von Typ-I Interferon wurde im Blut der Mäuse an bestimmten Zeitpunkten untersucht (Abbildung 5-11A). Wohingegen die Mikro-3p-Dendriplexe (>1000nm) *in vitro* das stärkere RIG-I Aktivierungspotential zeigten, konnte nach der systemischen Gabe *in vivo* im Induktionspeak nach 4h kein signifikanter Unterschied zwischen den Formulierungen beobachtet werden. Im Gegenteil: die kleineren Dendriplexe führten hier zu einer leicht höheren Induktion von IFN α . Zudem war das Zytokinsignal im Falle der Nano-3p-Dendriplexe nach 6h noch signifikant höher als das der Mikro-3p-Dendriplexe. Aufgrund des stärkeren IFN α Signal nach i.v. Gabe wurden die Nano-3p-Dendriplexe in allen weiteren *in vivo* Experimenten verwendet. Zudem wurde die optimale Dosis der 3p-Dendriplexe gemessen an der Zytokininduktion ermittelt (Abbildung 5-11B, C). Dazu wurden 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g oder 40 μ g 3pRNA komplexiert mit PAMAM-Dendrimeren intravenös verabreicht und nach 4h der Gehalt an IFN α und IP-10 im Blut der Mäuse bestimmt. Es zeigte sich, dass eine Dosis von 20 μ g eine signifikante Steigerung der Zytokininduktion gegenüber der Kontroll-RNA bewirkte. Eine weitere Steigerung auf 40 μ g führte zu keiner weiteren Verstärkung der Zytokininduktion. Daneben zeigte die Verwendung von nicht-stimulatorischer RNA komplexiert mit PAMAM, dass selbst in sehr hohen Konzentrationen PAMAM selber kein Potential zur Induktion

dieser Zytokine besitzt. Die polymerbasierte *in vivo* Transfektion von 3pRNA mit dem linearen Polyethylenimin *in vivo*-jetPEI® wurde in einigen Studien schon publiziert^{137,286}. Aus diesem Grunde wurden in diesem Versuch die 3p-Dendriplexe mit 3p-Polyplexen verglichen. Um neben dem Typ-I Interferon auch die proinflammatorischen Zytokine nach intravenöser Applikation zu analysieren und in einen direkten Vergleich mit den Polyplexen stellen zu können, wurde eine Analyse verschiedener Zytokine durchgeführt (Abbildung 5-11D-H).

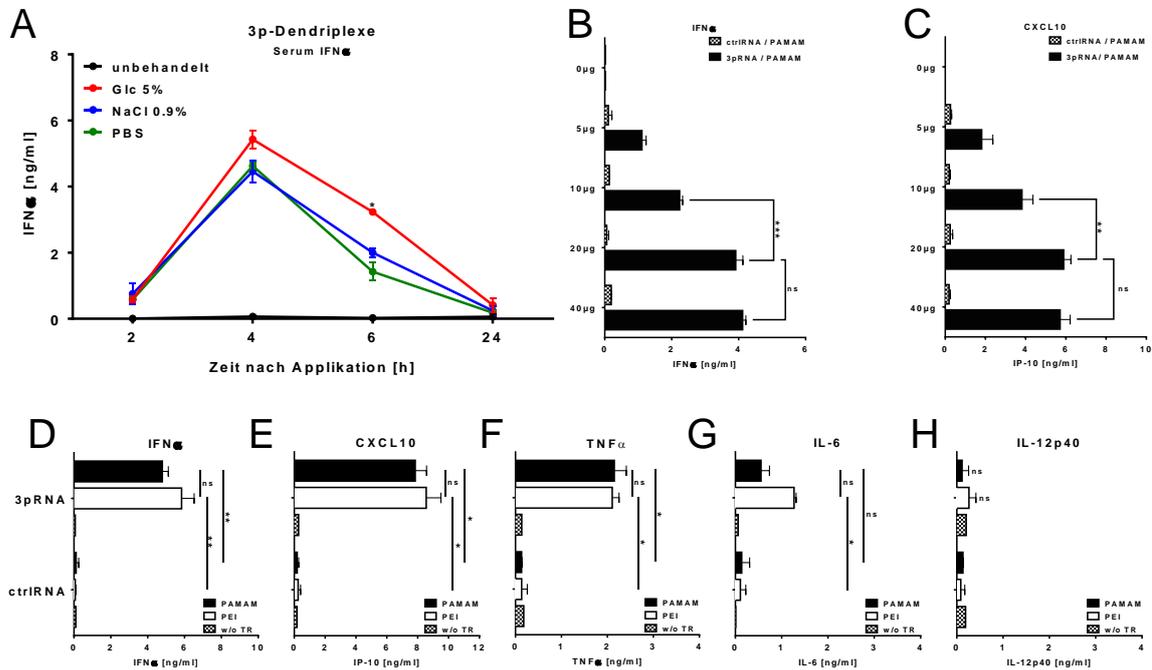


Abbildung 5-11: Die intravenöse Applikation von 3p-Dendriplexen führt zu einer dosisabhängigen Induktion von Zytokinen und Chemokinen *in vivo*.

(A) 20µg 3pRNA wurde mit PAMAM (N/P = 8) komplexiert. Als Transfektionsmedium diente 0.9% Natriumchlorid Lösung (NaCl), phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) oder 5%ige Glucose Lösung (Glc). Alle Ansätze wurden C57BL/6 Mäusen intravenös über die Schwanzvene verabreicht. Nach 2h, 4h, 6h und 24h wurden Blutproben genommen und der Gehalt an IFNα bestimmt. (B,C) 0, 5, 10, 20 oder 40µg 3p-Dendriplexe (N/P = 8 / Medium: 5% Glucose) wurden C57BL/6 Mäusen intravenös über die Schwanzvene verabreicht und nach 4h Blutproben entnommen, die dann auf IFNα (B) und CXCL-10 (C) hin untersucht wurden. (D-H) C57BL/6 Mäuse wurden mit 3pRNA oder nicht-stimulatorischer RNA (jeweils 20µg) intravenös behandelt, die zuvor mit PAMAM oder PEI komplexiert wurde. Als Kontrolle wurden die Oligonukleotide auch ohne Transfektionsreagenz (w/o TR) injiziert. 4h nach Applikation wurde im Blut der Mäuse der Gehalt an IFNα (D), CXCL-10 (E), TNFα (F), IL-6 (G) und IL-12p40 (H) bestimmt. Gezeigt sind die Daten von Triplikate, die als Mittelwerte ± SEM angegeben sind. *, ** und *** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$. ns steht für nicht signifikant.

Dabei zeigte sich eine vergleichbar hohe Induktion der antiviralen Zytokine IFNα und IP-10 (CXCL-10), aber auch von Tumornekrosefaktor α (TNFα). Die Induktion von Interleukin-6 hingegen wurde durch die 3p-Dendriplexe deutlich geringer induziert als durch die 3p-Polyplexe. Die Analyse von IL-12p40 ergab erwartungsgemäß keine signifikante Induktion durch 3pRNA unabhängig von dem verwendeten Transfektionsreagenz.

5.2.1.2 Leber und Lunge sind Hauptdistributionsorgane der 3p-Dendriplexe nach systemischer Applikation

Um das Verteilungsmuster von Dendriplexen *in vivo* analysieren zu können, wurden IFN β -Luciferase Reporter Mäuse verwendet. Bei diesen Mäusen ist ein Luciferase-Gen hinter einem IFN β -Promotor in das Genom intrigiert²⁸⁷, so dass eine Induktion von IFN β eine Expression von Luciferase bedingt. Die Intensität dieser Expression, die proportional zu der IFN β Induktion ist, kann dann durch *in vivo* Imaging über die Zeit hinweg gemessen werden. Den Mäusen wurde 3p-Dendriplexe bzw. 3p-Polyplexe in 2 unterschiedlichen Konzentrationen verabreicht und nach regelmäßigen Zeitabständen die Induktion von IFN β gemessen.

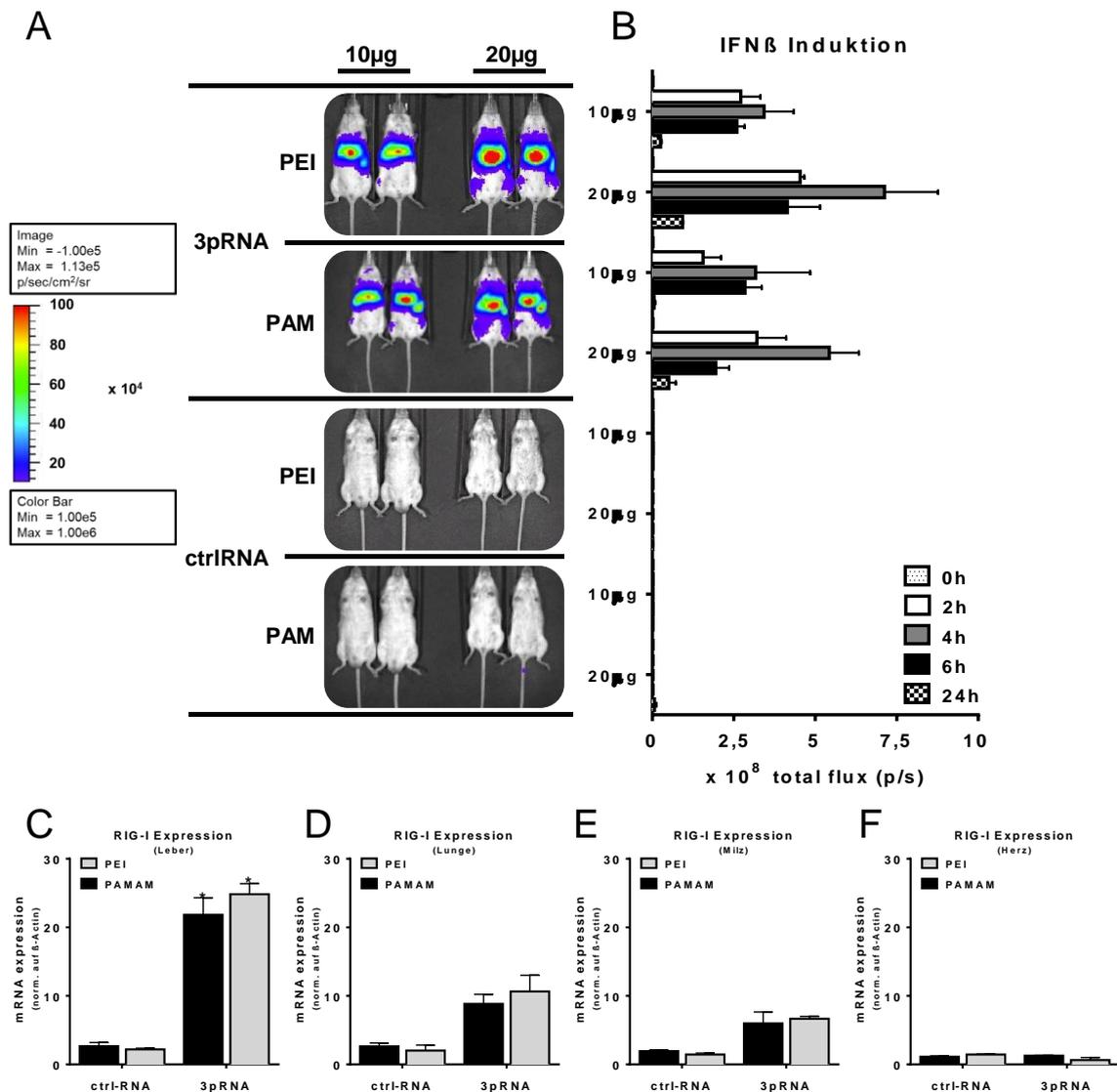


Abbildung 5-12: Nach systemischer Applikation von 3p-Dendriplexen stellen Leber, Lunge und Milz die Hauptbiobistributionsorgane dar.

(A,B) IFN β -Luciferase Reporter Mäuse wurden 10µg bzw. 20µg 3pRNA oder nicht-stimulatorische RNA (ctrlRNA), die mit PAMAM bzw. mit Polyethylenimin (PEI) komplexiert wurden (N/P Verhältnis 8 in 5% Glucose), intravenös über die Schwanzvene verabreicht. Da eine Induktion von IFN β in diesen Mäusen mit einer Luciferase Expression einhergeht, wurde diese vor Therapiebeginn (0h) und 2h, 4h, 6h und 24h nach Applikation mittels einem *in vivo* Imaging System (IVIS)

gemessen. (A) zeigt die aufgenommenen Bilder aller Tiere 4h nach Injektion. (B) zeigt die Luciferase-Aktivität (gemessen in total flux p/s) zu allen Zeitpunkten. Jeder Zeitpunkt zeigt die Daten von 2 Tieren. (C-F) C57BL/6 Mäusen wurde 20µg 3pRNA oder nicht-stimulatorische RNA (ctrlRNA), die mit PAMAM bzw. mit PEI komplexiert wurden (N/P Verhältnis 8 in 5%iger Glucose), intravenös verabreicht. 4h nach Applikation wurden die Mäuse geopfert, die Organe isoliert und sofort bei -80°C schockgefrostet. Die RIG-I mRNA Expression wurde in Gewebematerial aus Leber (C), Lunge (D), Milz (E) und Herz (F) bestimmt. Gezeigt sind die Daten von je 4 Tieren pro Gruppe, die als Mittelwerte \pm SEM angegeben sind. * steht für $p < 0,05$.

Die 3pRNA behandelten Mäuse zeigten nach 2h die ersten visuellen Zeichen einer IFN β Induktion, die auch hier, wie schon bei den vorherigen Experimenten, ein Induktionsmaximum 4h nach der Applikation zeigte und dosisabhängig verlief. Die 10µg Dosis führte nur zu einer halb so starken Luciferase Expression als die 20µg Dosis. Bei den mit nicht-stimulatorischer RNA behandelten Mäusen war keinerlei Luciferase-Aktivität messbar (Abbildung 5-12A, B). Die Bilder, die während der Messung nach 4h aufgenommen wurden (Abbildung 5-12A) lassen vermuten, dass sich die hauptsächliche Induktion des Typ-I Interferon im Brust- und oberen Bauchraum der Tiere abspielt, also vermutlich in Leber und Lunge. Auf manchen Bildern meint man auch die Induktion in der Milz lokalisieren zu können. Um die Induktion den Organen genauer zuordnen zu können, wurden in einem weiteren Experiment C57BL/6 Mäuse mit den 20µg Ansätzen behandelt und 4h nach der Applikation (Zytokinmaximum) die Mäuse geopfert. Alle Organe des oberen Brust- und Bauchraumes wurden isoliert und in diesen Gewebeproben die RIG-I mRNA Expression als Zeichen einer Typ-I Interferon Induktion (IFN abhängiges Gen) analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Aufregulation von RIG-I in der Leber, gefolgt von Lunge und Milz. Keinerlei RIG-I mRNA konnte hingegen im Herzgewebe detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nach intravenöser Gabe von 3p-Dendriplexen, aber auch von 3p-Polyplexen, die Leber das Hauptbiodistributionsorgan zu sein scheint, gefolgt von Lunge und Milz.

5.2.2 Intravenöse Anwendung von 3p-Dendriplexen zur antitumoralen Therapie

5.2.2.1 Intravenöse Therapie mit 3p-Dendriplexen führt zur Regression des Tumorwachstums im murinen orthotopen HCC Modell

Die Erkenntnis, dass die Aufnahme der 3p-Dendriplexe nach intravenöser Applikation hauptsächlich in der Leber erfolgt, legte es nahe, eine Anwendung dieser Formulierung zur Therapie eines leberständigen Tumors zu untersuchen, um so einen organspezifischen Transport zu erreichen. Die vorangegangenen *in vitro* Experimente auf murinen Hepatomazellen (Hepa129) zeigten, dass 3p-Dendriplexe in diesen Tumorzellen neben einer effektiven antiviralen Immunantwort auch eine effektive Apoptoseinduktion induzieren können.

Aus diesem Grunde schien ein durch diese Zellen induziertes hepatozelluläres Karzinom (kurz: HCC) eine potentiell aussichtsreiche Indikation für die Therapie mit 3p-Dendriplexen darzustellen. Die Arbeitsgruppe um Frau PD Dr. med. Maria Carmona-Gonzalez beschäftigt sich seit mehreren Jahren mit der DC-basierten Therapie von HCC und konnte zeigen, dass immuntherapeutische Ansätze ein erfolgversprechendes Potential besitzen²⁸⁸. In Kooperation mit dieser Arbeitsgruppe implantierten wir Hepa129 Zellen intrahepatisch subkapsulär in den oberen linken Leberlappen von

C3H/HEN Mäusen. Fünf Tage nach Inokulation wurde die intravenöse Therapie mit 3p-Dendriplexen bzw. 3p-Polyplexen begonnen, gefolgt von fünf weiteren Behandlungen (Abbildung 5-13A). Da das Tumorstadium beim HCC non-invasiv nicht beobachtet werden kann, diente die Progression des HCC bedingten Aszites als indirekter Marker für ein Fortschreiten der Krankheit. Da es bei dem Aszites zur Ansammlung seröser Flüssigkeit im Peritonealraum kommt, kann dieser anhand der einhergehenden Gewichtszunahme indirekt monitoriert werden.

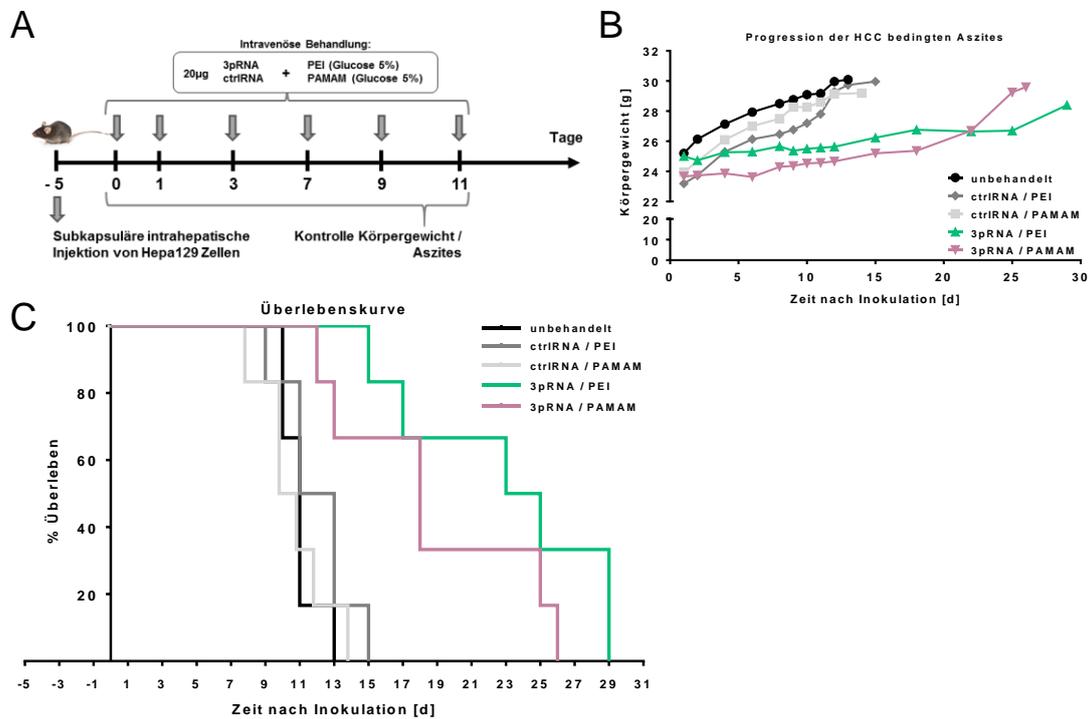


Abbildung 5-13: Im orthotopen hepatozellulären Karzinom (HCC) Model führt die intravenöse Gabe von 3p-Dendriplexen zu einer deutlichen Überlebensverlängerung.

(A) Hepa129 Zellen wurden C3H/HEN Mäusen intrahepatisch in den oberen linken Leberlappen injiziert. Nach Ausbildung des Tumors wurden die Mäuse sechs Mal innerhalb der ersten 11 Tage intravenös mit 3pRNA oder nicht-stimulatorischer RNA (ctrlRNA) komplexiert mit PAMAM oder PEI behandelt. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. (B) zeigt die Überwachung des Körpergewichts zur der indirekten Analyse der HCC bedingten Aszites-Progression. (C) Prozentuales Überleben der Tiere. Gezeigt sind die Daten von je 6 Tieren pro Gruppe.

Aus diesem Grund wurde engmaschig das Gewicht der Mäuse über die Zeit kontrolliert (Abbildung 5-13B). Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen Kontrolltiere, die zwar einer Tumortransplantation unterzogen wurden, aber nur mit nicht-stimulatorischer RNA komplexiert mit PAMAM oder PEI behandelt wurden oder unbehandelt blieben, an Gewicht zunahmten und innerhalb von 16 Tagen verstarben. Die Tiere jedoch, die mit 3p-Dendriplexen behandelt wurden, zeigten eine viel langsamere Progression des Aszites und eine damit einhergehende deutliche Verlängerung des Überlebens. Die Behandlung mit 3p-Polyplexen führte sogar zu einem noch leicht besseren Ergebnis.

5.2.2.2 Im B16 Lungenmetastasen Modell bewirkt die intravenöse Applikation von 3p-Dendriplexen eine Verminderung der Lungenmetastasen

Nach Analyse der antitumoralen Eigenschaften der 3p-Dendriplexe im orthotopen HCC-Modell sollte in einem nächsten Schritt eine weitere Tumorentität untersucht werden. Da bereits *in vivo* Daten zur Therapie des Melanoms für 3p-Polyplexe existieren¹³⁷, sollte im Folgenden auch die Behandlung mit 3p-Dendriplexen in dieser Indikation untersucht werden.

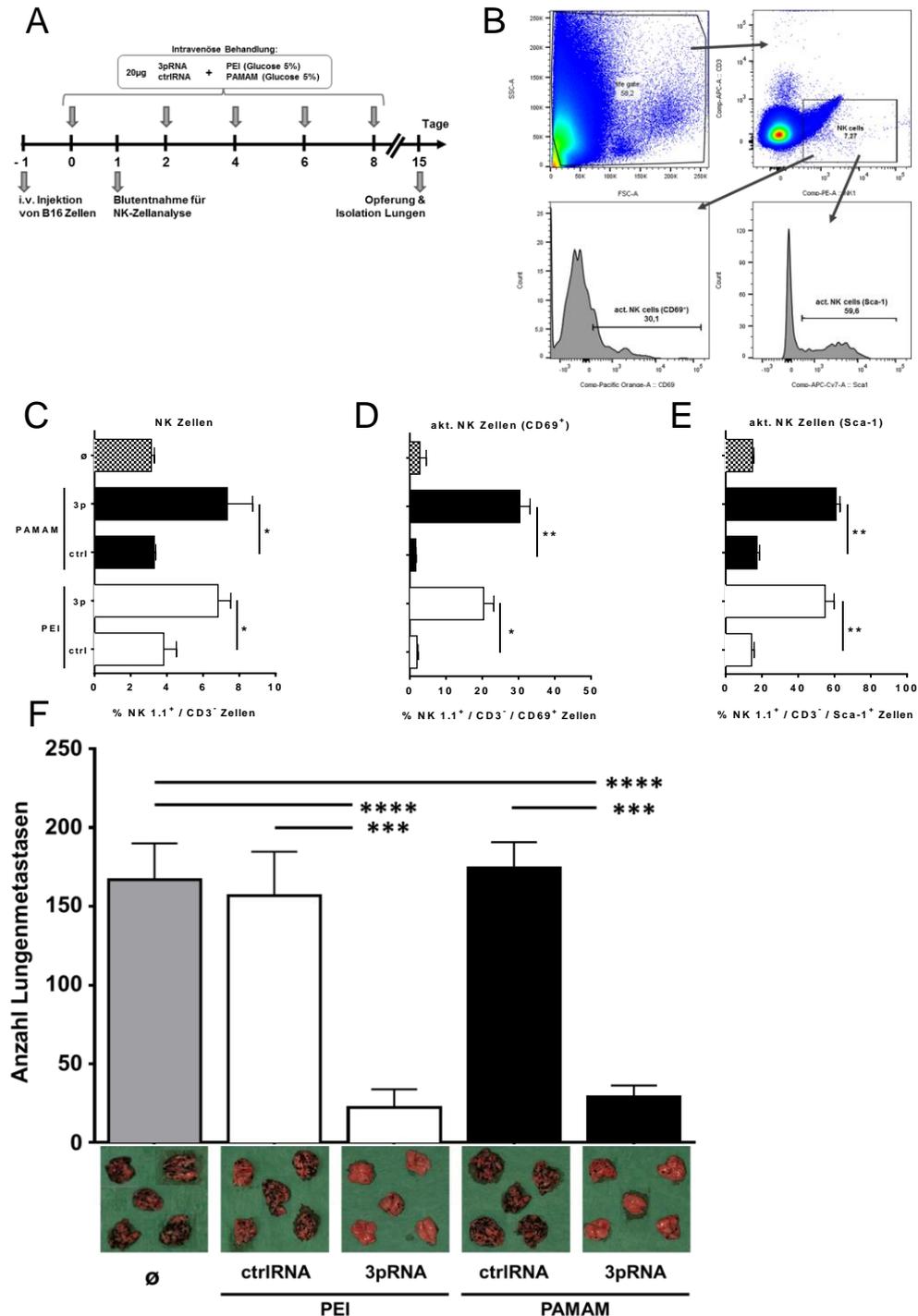


Abbildung 5-14: 3p-Dendriplexe verhindern signifikant die Bildung von B16 Lungenmetastasen und führen zu einer Aufregulation und Aktivierung von NK-Zellen.

C57BL/6 Mäusen wurden an Tag -1 intravenös mit B16 Melanomzellen injiziert. 20µg 3pRNA oder nicht-stimulatorische

RNA (ctrlRNA) wurden mit PAMAM bzw. Polyethylenimin (PEI) komplexiert (N/P 8; Glucose) und an Tag 0, 2, 4, 6 und 8 intravenös über die Schwanzvene verabreicht. Unbehandelte Mäuse dienten als Kontrolle. 24h nach der ersten Behandlung wurden Blutproben genommen, die dann mittels Durchflusszytometrie auf NK-Zellen hin untersucht wurden. (A) illustriert schematisch den Versuchsablauf. (B) zeigt die Strategie der Verifizierung von NK-Zellen innerhalb des Blutes basierend auf Oberflächenmolekülen. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde die totale Anzahl von NK Zellen (C) bestimmt, sowie auch die prozentuale Bestimmung der aktivierten CD69⁺ (D) und der Sca-1⁺ NK-Zellen (E). An Tag 15 wurden die Mäuse geopfert, die Lungen isoliert und dessen Lungenmetastasen gezählt. (F) zeigt die Anzahl der visuellen Lungenmetastasen inklusive Photographien der einzelnen Lungen. Gezeigt sind die Daten von 5 Tieren je Gruppe, die als Mittelwerte \pm SD angegeben sind. *, **, *** und **** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ und $p < 0,0001$.

Da wir in vorherigen Experimenten zeigen konnten, dass nach intravenöser Applikation der Dendriplexe neben der Leber auch die Lunge zu den Hauptdistributionsorganen zählt, wählten wir das B16-Lungenmetastasenmodell als genaues Modell aus.

Um die Bildung von Lungenmetastasen in diesem murinen Modell effektiv und homogen zu initiieren, wurden einen Tag vor Therapiebeginn C57BL/6 Mäuse intravenös mit murinen B16-Tumorzellen injiziert. Mit insgesamt fünf intravenösen Applikationen á 20 μ g der 3p-Dendriplexe bzw. der 3p-Polyplexe wurden die Mäuse anschließend innerhalb der ersten 8 Tage therapiert (Abbildung 5-14A). Die 24h nach der ersten therapeutischen Gabe entnommene Blutprobe wurde auf NK-Zellen und deren Aktivierungsgrad hin untersucht. Zwar ist bekannt, dass durch Viren oder auch die Stimulation von Toll-like Rezeptoren eine NK-Zell-Aktivierung ausgelöst werden kann, jedoch liegen nicht viele Daten vor, die dies auch nach spezifischer Aktivierung des Rezeptors RIG-I zeigen, insbesondere *in vivo*. Im Vergleich zu den Mäusen, die mit ctrlRNA-Dendriplexen behandelt wurden, zeigten die mit 3p-Dendriplexen behandelten Mäuse nicht nur einen erhöhten prozentualen Anteil von NK-Zellen im Blut (Abbildung 5-14C), sondern zudem eine signifikant erhöhte Aktivierung dieser Zellen, gemessen anhand der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und Sca-1 (Abbildung 5-14D, E). Wie 3p-Dendriplexe, führten auch 3p-Polyplexe zu einer NK-Zell Erhöhung, jedoch fiel die erzielte Aktivierung der NK-Zellen hier leicht geringer aus. 16 Tage nach der Injektion der B16-Tumorzellen wurden alle Mäuse geopfert um die Anzahl der Lungenmetastasen bestimmen zu können. In den unbehandelten oder auch ctrlRNA behandelten Tieren kam es zur intensiven Entwicklung von Lungenmetastasen. Eine 3p-basierte Therapie – unabhängig ob 3p-Dendriplexe oder 3p-Polyplexe verwendet wurden – führte zu einer deutlichen Reduktion bzw. Verhinderung der Ausbildung von Lungenmetastasen (Abbildung 5-14F).

5.2.2.2.1 Die Partikelgröße der Dendriplexe beeinflusst die antitumorale Wirkung auf Lungenmetastasen

Es konnte gezeigt werden, dass 3p-Dendriplexe, die in 5%iger Glucose hergestellt wurden und somit eine Partikelgröße unter 100nm aufweisen, zu einer leicht erhöhten Typ-I Interferon Ausschüttung nach intravenöser Gabe führen als größere Partikel (Abbildung 5-11A). Da wir auch zeigen konnten, dass die Therapie mit 3p-Dendriplexen zu einer signifikanten Reduktion von Lungenmetastasen führt, sollte im Folgenden untersucht werden, ob ein therapeutischer Unterschied in der Wirksamkeit von Nano- (<100nm) und Mikro- (>1000nm) 3p-Dendriplexen auf die Lungenmetastasen vorliegt.

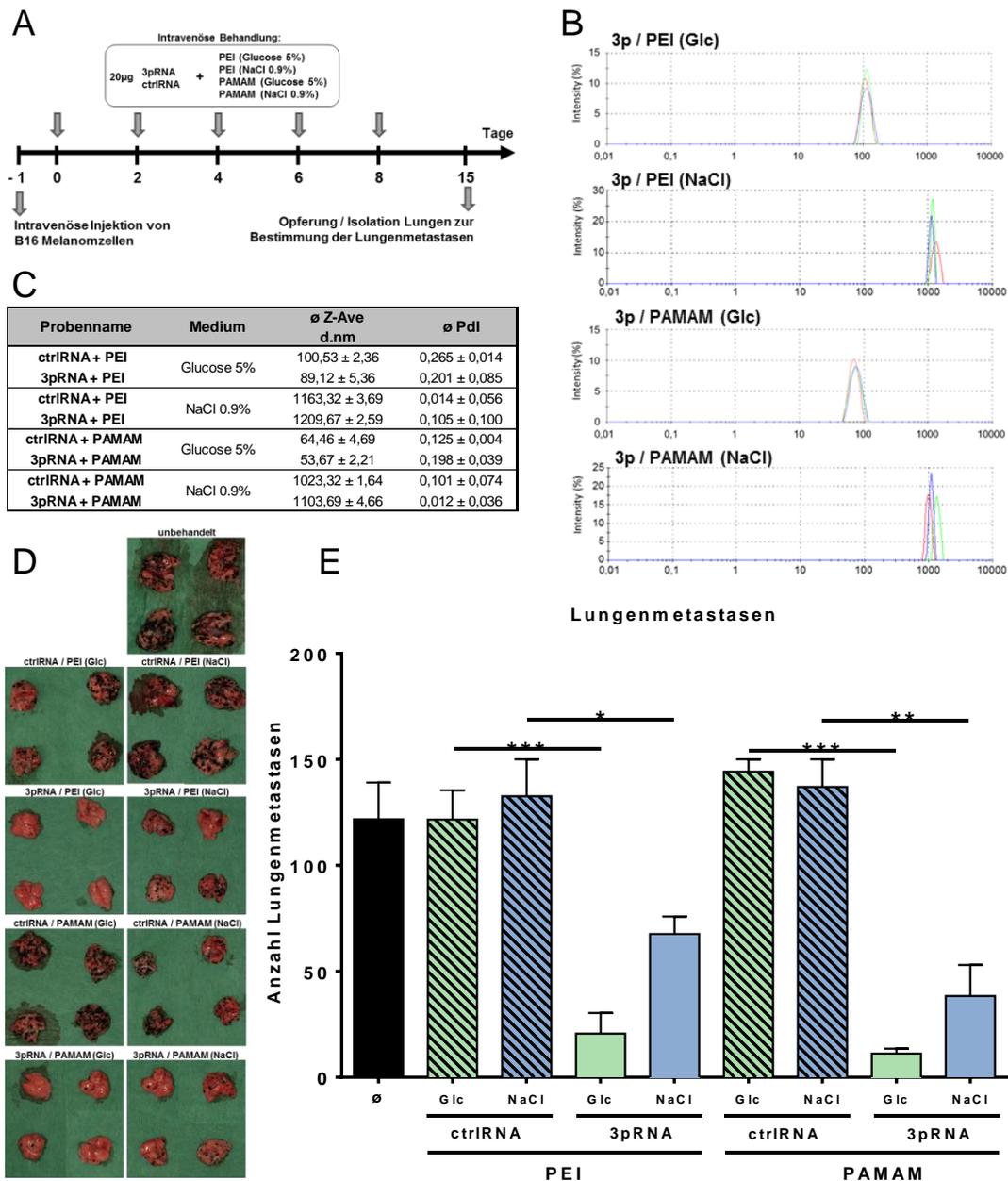


Abbildung 5-15: Die antitumorale Wirkung auf B16 Lungenmetastasen wird durch die Partikelgröße von Dendri- und Polyplexen beeinflusst.

C57BL/6 Mäusen wurden intravenös B16 Melanomzellen injiziert (Tag -1). An Tag 0, 2, 4, 6 und 8 wurde den Mäusen 20µg 3pRNA oder nicht-stimulatorische RNA (ctrRNA) verabreicht, die zuvor mit PAMAM oder Polyethylenimin (PEI) in 5% Glucose (Glc) oder 0.9% Natriumchlorid (NaCl) komplexiert wurden. Die Partikelgrößen (Z-Ave) der Proben wurden mittels dynamischer Lichtstreuung vermessen (Zetasizer NanoS). Die Ergebnisse sind in (B) graphisch und in (C) tabellarisch aufgeführt. An Tag 15 wurden die Mäuse geopfert und die Lungen zur Bestimmung der Anzahl an Lungenmetastasen isoliert. In (A) ist der Versuchsablauf schematisch illustriert. (B) zeigt Fotos der isolierten Lungen mit Lungenmetastasen an Tag 15, dessen Anzahl in (C) graphisch dargestellt ist. Gezeigt sind die Daten von 4 Mäusen je Gruppe, die als Mittelwerte ± SD angegeben sind. *, ** und *** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$.

Dazu wurden durch Verwendung von NaCl 0.9% bzw. 5%iger Glucose-Lösung Mikro- bzw.- Nano-3p-Dendriplexe hergestellt und dessen Größen mittels Partikelgrößenmessung bestimmt (Abbildung 5-15B, C). Auch die Herstellung der 3p-Polyplexe in den verschiedenen Medien lieferte

zwei unterschiedliche Partikelgrößen, die in den gleichen Größenbereich fielen, wie die 3p-Dendriplexe. Die somit 4 verschiedenen Ansätze wurden dann neben den negativ-Kontroll-RNA Ansätzen in dem B16-Lungenmetastasen-Modell getestet, das nach dem gleichen therapeutischen Schema durchgeführt wurde, wie schon im vorangegangenen Experiment (Abbildung 5-14A). Die Bestimmung der Lungenmetastasen ergab, dass sowohl die in NaCl 0.9% als auch in Glucose hergestellten 3p-Dendri- und 3p-Polyplexe im Vergleich zur ihren ctrlRNA-Formulierungen zu einer signifikant reduzierten Anzahl an Lungenmetastasen führten. Jedoch war der Unterschied bei den Nano-Formulierungen deutlich stärker ausgeprägt, als bei den Mikro-Formulierungen (Abbildung 5-15E). Zudem schien die Therapie der 3p-Dendriplexe leicht effektiver zu sein als die Behandlung mit 3p-Polyplexen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Herstellung in 5%iger Glucose-Lösung 3p-Dendriplexe entstehen lässt, die bei der intravenösen Therapie von B16-Lungenmetastasen einen effektiveren antitumoralen Effekt erzielen, als der gleiche Ansatz hergestellt in 0.9%iger NaCl Lösung.

5.2.2.3 3p-Dendriplexe als intravenöse Therapie im subkutanen B16-Melanom-Modell

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch ein peripher (subkutan) gelegener Primärtumor durch eine intravenöse 3p-Dendriplex-Behandlung in die Regression getrieben werden kann, auch wenn die Distribution der 3p-Dendriplexe wie zuvor gezeigt überwiegend in die Leber und in die Lunge erfolgt (Abbildung 5-12). Neben der Untersuchung ob eine solche Fernwirkung der 3p-Dendriplexe auf einen Tumor nachzuweisen ist, sollte in diesem Experiment wiederum der Einfluss der Partikelgröße analysiert werden. Dazu wurde in C57BL/6 Mäusen das Wachstum eines subkutanen Melanoms ausgelöst, indem eine standardisierte Anzahl von B16-Tumorzellen im oberen Bauchbereich unter die Haut injiziert wurde. Nach dem Auswachsen eines sichtbaren Tumors (ab 3x3mm) wurden die Mäuse fünfmalig intravenös mit den 3p- bzw. ctrlRNA-Dendriplexen behandelt, die entweder eine Größe von unter 100nm (<100nm) oder über 1000nm (>1000) besaßen (Abbildung 5-16B). Alle mit 3p-Dendriplex behandelten Tiere profitierten deutlich von der intravenösen Therapie. Im Vergleich zu den mit PBS oder ctrlRNA-Dendriplex behandelten Tieren, die innerhalb der ersten 25 Tage ein maximales Tumolvolumen entwickelten, kam es bei den 3p-Dendriplex Gruppen zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums und zu einem verlängerten Überleben der Tiere (Abbildung 5-16A, C). Dieser positive Effekt war jedoch bei den Nano-3p-Dendriplexen deutlicher ausgeprägt als bei den Mikro-3p-Dendriplexen über 1000nm. Die Überlebenszeit differierte um fast 20% (Abbildung 5-16C).

Zusammengefasst konnten wir also auch bei der Therapie eines peripheren soliden Tumors eine therapeutische Wirkung nach intravenöser Gabe von 3p-Dendriplexen belegen. Auch in diesem Experiment waren die Nano-3p-Dendriplexe den Mikro-3p-Dendriplexen überlegen.

Um zu untersuchen, ob diese effektivere antitumorale Wirkung der Nano-3p-Dendriplexe im Vergleich zu den Mikro-3p-Dendriplexen nach intravenöser Applikation in einem subkutanen Tumormodell auch Unterschiede auf zellulärer Ebene zeigt, sollte im folgenden Experiment näher untersucht werden. Der Versuchsstart war dem vorherigen Experiment absolut identisch. Es wurde wieder ein B16-subkutanes Melanom durch die Inokulation von B16-Melanomzellen im oberen

Bauchraum initiiert, welches dann mit fünf intravenösen Injektionen von Nano-Dendriplexen (mit „S“ gekennzeichnet) oder Mikro-Dendriplexen (mit „L“ gekennzeichnet) behandelt wurde.

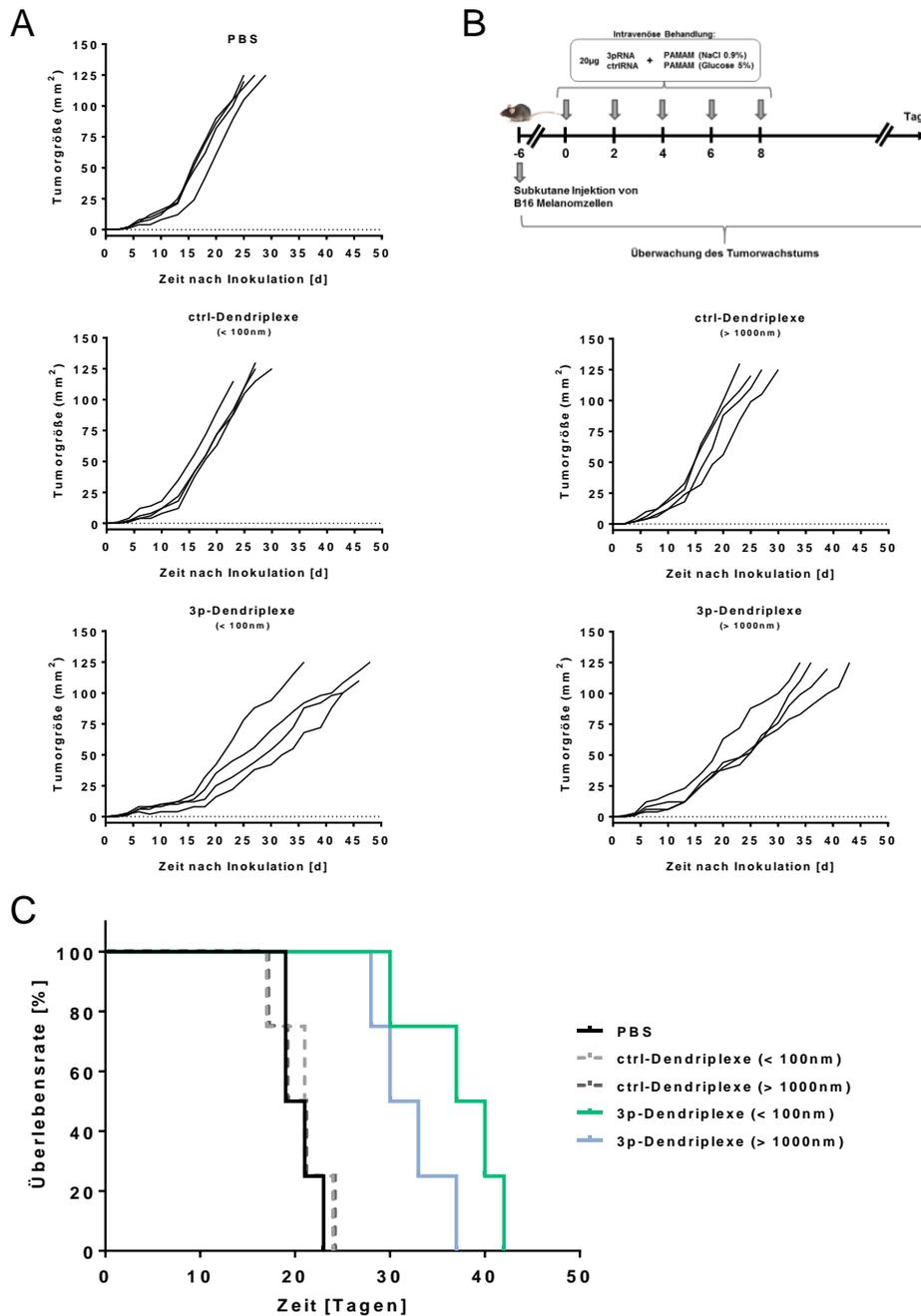


Abbildung 5-16: Intravenöse Therapie mit 3p-Dendriplexen führt zu einer Überlebensverlängerung im subkutanen B16 Modell.

Melanomzellen wurden an Tag -6 C57BL/6 Mäuse subkutan in die rechte Flanke injiziert. An Tag 0, 2, 4, 6 und 8 wurden den Mäusen 20µg 3p-Dendriplexe (in NaCl 0.9% oder in Glucose 5%) intravenös verabreicht. Nicht-stimulatorische RNA (ctrlRNA / 20µg) komplexiert mit PAMAM oder auch unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die Tumorgöße wurde kontinuierlich mit einer Schieblehre gemessen. (A) zeigt die Entwicklung der Tumorgöße über die Zeit. (B) stellt den Versuchsablauf schematisch dar. (C) zeigt das prozentuale Überleben der behandelten Tiere. Alle Graphen zeigen die Daten von je 4 Tieren pro Gruppe.

Das Tumorwachstum wurde abermals kontinuierlich überwacht und zeigte 17 Tage nach der

Inokulation ein signifikant geringes Tumorstadium, wenn die Mäuse mit den kleineren „S“-3p-Dendriplexen behandelt wurden gegenüber den größeren 3p-Dendriplex-Formulierungen.

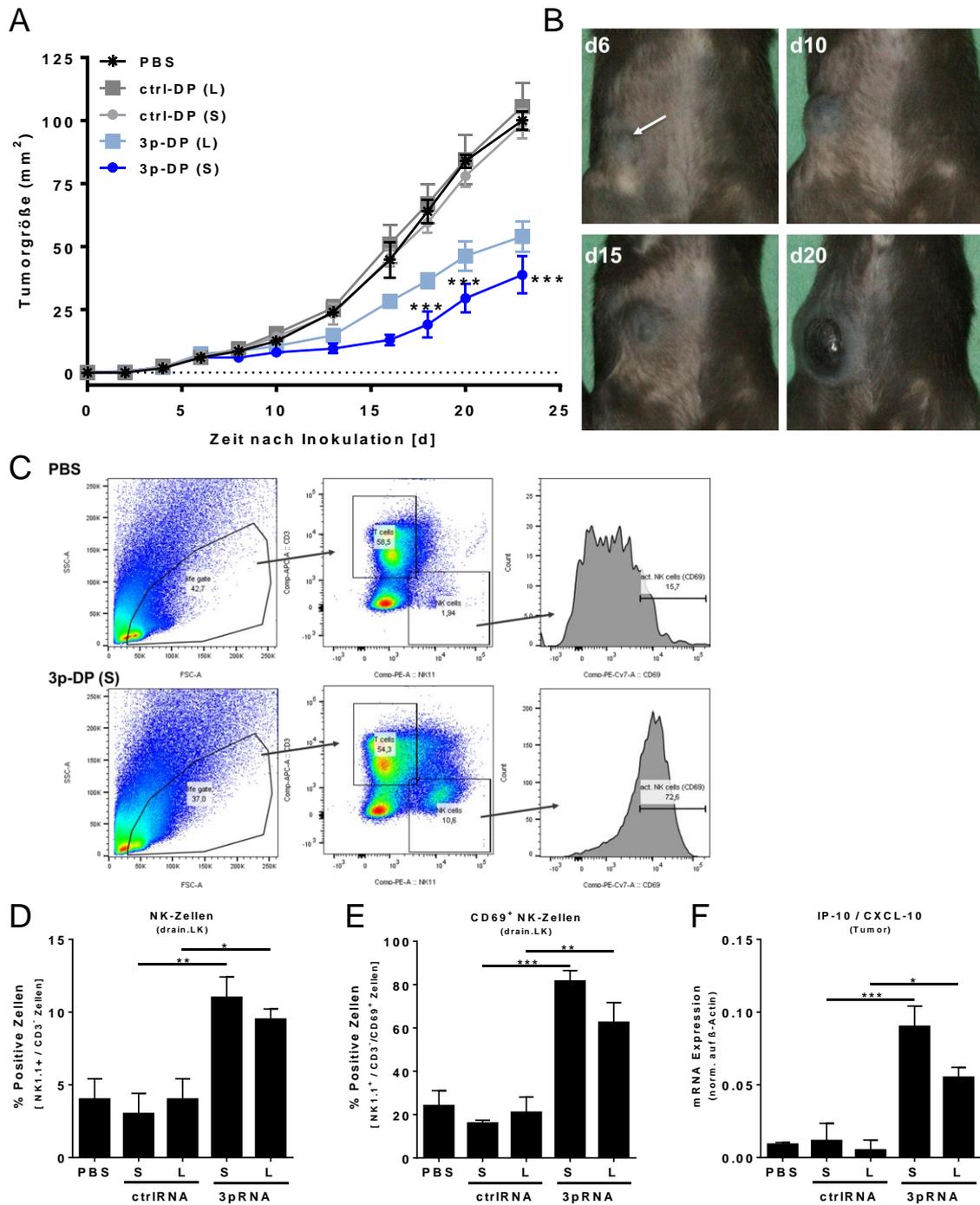


Abbildung 5-17: Nano-3p-Dendriplexe erreichen den subkutanen Tumor effektiver als Mikro-3p-Dendriplexe.

B16 Melanomzellen wurden an Tag -6 C57BL/6 Mäuse subkutan in die rechte Flanke injiziert. An Tag 0, 2, 4, 6 und 8 wurden den Mäusen 20µg 3p-Dendriplexe (in NaCl 0.9% oder in Glucose 5%) intravenös verabreicht. Nicht-stimulatorische RNA (ctrlRNA / 20µg) komplexiert mit PAMAM oder auch unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die Tumorstadium wurde kontinuierlich mit einer Schieblehre gemessen und in (A) gegen die Zeit graphisch dargestellt. (B) zeigt Aufnahmen der Tumorentwicklung über die Zeit. An Tag 24 wurden die Mäuse geopfert, die drainierenden Lymphknoten und Tumorgewebeproben entnommen. (C) zeigt die Strategie der Verifizierung von NK-Zellen innerhalb des drainierenden Lymphknotens basierend auf Oberflächenmolekülen. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde die totale Anzahl von NK Zellen (D) bestimmt, sowie auch die prozentuale Bestimmung der aktivierten CD69⁺. Im Tumorgewebe wurde die mRNA

Expression von IP-10 untersucht, die in (E) normalisiert auf β -Actin dargestellt ist. Alle Graphen zeigen die Daten von je 4 Tieren pro Gruppe, die als Mittelwerte \pm SEM angegeben sind. *, ** und *** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$.

In diesem Experiment wurde allerdings nicht das Überleben der Mäuse beobachtet, sondern alle Tiere an Tag 24 geopfert und zum direkten Vergleich die drainierenden Lymphknoten und das Tumorgewebe entnommen. In den Lymphknoten wurde der prozentuale Anteil an NK-Zellen bestimmt, sowie auch deren Aktivierungsgrad mit Hilfe der Marker CD69 gemessen. Eine 3p-Behandlung führte in den drainierenden Lymphknoten zu einer signifikanten Erhöhung des NK-Zell-Anteils sowie zu einer erhöhten Expression von CD69⁺-aktivierten Zellen im Vergleich zur ctrlRNA-Behandlung (Abbildung 5-17C-E). Die zusätzliche Untersuchung des Tumorgewebes ergab, dass im Tumor eine mRNA Aufregulierung von CXCL-10 stattfand (Abbildung 5-17F). Dies belegt, dass 3p-Dendriplexe direkt oder auch indirekt zu einer Immunaktivierung im Tumor führen. Da dieser Wert der Nano-3p-Dendriplexe im Vergleich zu den ctrl-Nano-Dendriplexen deutlich höher war, als der Unterschied zwischen den größeren „L“-3p-Formulierungen zu dessen ctrlRNA-„L“-Gruppe, korreliert die Immuninduktion mit dem therapeutischen antitumoralen Effekt.

5.2.3 Intratumorale Applikation von 3p-Dendriplexen zur Behandlung von subkutanen Tumoren

5.2.3.1 3p-Dendriplexe führen zur lokalen Zytokin-Induktion

Dass durch die intravenöse Gabe der 3p-Dendriplexe eine effektive, systemische Immunantwort ausgelöst werden kann, konnte in den vorherigen Experimenten gezeigt werden. Zudem führte 3pRNA, die mit PAMAM-Dendrimeren formuliert und systemisch verabreicht wurde, zu einem therapeutischen Effekt auf verschiedenen Tumorentitäten. Daraufhin stellte sich die Frage, ob eine

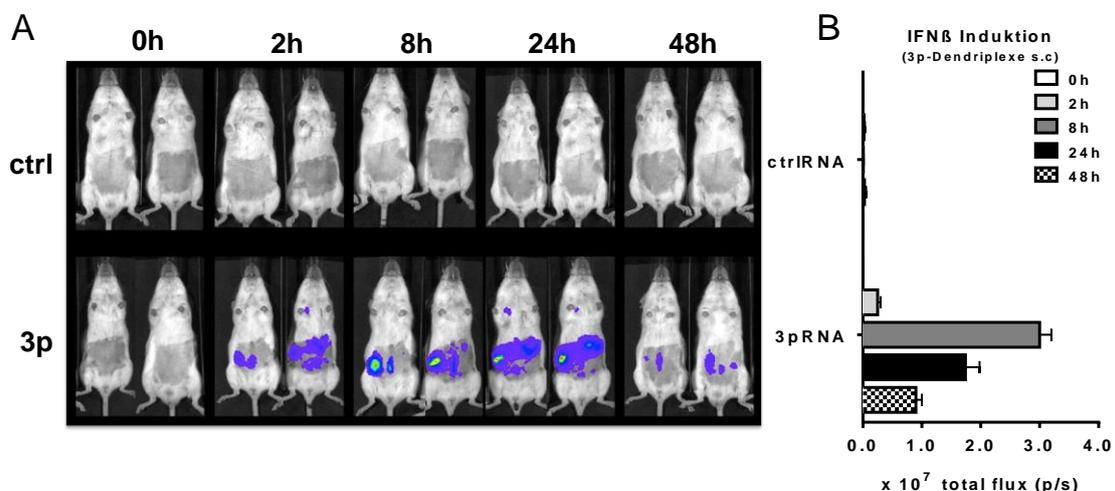


Abbildung 5-18: Eine subkutane Applikation von 3p-Dendriplexen führt zu einer 48h langen Zytokininduktion an Applikationsort.

20 μ g 3pRNA oder nicht-stimulatorische RNA (ctrlRNA) wurden mit PAMAM komplexiert und IFN β -Luciferase Reporter Mäusen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Eine IFN β -Induktion führt in diesen Mäusen zu einer Luciferase Expression. Diese Expression wurde vor Therapiebeginn (0h) und 2h, 8h, 24h und 48h nach Applikation mittels einem *in vivo* Imaging

System (IVIS) gemessen. (A) zeigt die aufgenommenen Bilder aller Tiere zu jedem Zeitpunkt der Luciferase Messung. (B) zeigt die Luciferase-Aktivität (gemessen in total flux p/s). Jeder Zeitpunkt zeigt die Daten von 2 Tieren, die als Mittelwerte \pm SEM angegeben sind.

intratumorale Gabe der 3p-Dendriplexe diesen therapeutischen Effekt spezifischer auf den behandelnden Tumor vermittelt. Um heraus zu finden, inwieweit eine lokale subkutane Gabe von 3p-Dendriplexen zu einer Immunantwort führt, machten wir uns erneut das IFN β -Luc-Reporter Modell zu Nutze. In diesem Experiment wurden die 3pRNA- bzw. ctrlRNA-Dendriplexe nicht intravenös, sondern subkutan injiziert und die Luciferase Expression vor und 2h, 4h, 8h, 24h und 48h nach der Applikation gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die lokale Injektion der 3p-Dendriplexe auch zu einer lokalen Induktion von Typ-I Interferon führt, die 8h nach Applikation ihr Induktionsmaximum erreicht (Abbildung 5-18A, B). Es zeigte sich, dass der überwiegende Teil der Zytokininduktion am Injektionsort erfolgt und auch im späteren Verlauf keine systemische Aktivierung messbar ist.

5.2.3.2 3p-Dendriplexe führen als intratumorale Therapie zur Regression von B16 Melanomen

Um die subkutane Wirkung der Dendriplexe auch als Therapieansatz zu nutzen, wurden die Formulierungen intratumoral in einem subkutanen B16-Melanommodell appliziert. Hierzu wurden zur Entwicklung eines subkutanen Tumors B16-Melanomzellen unter die Haut der Mäuse injiziert, die daraufhin innerhalb von 6-8 Tagen nach der Inokulation ein sichtbares Melanom entwickelten. Der im Durchschnitt 9-12 mm² große Tumor wurde dann intratumoral mit 3p- bzw. ctrlRNA-Dendriplexen oder aber auch mit 3p- bzw. ctrlRNA-Polyplexen fünfmal in den ersten 16 Tagen behandelt (Abbildung 5-19A). Um zu ermitteln, ob unterschiedliche 3p-Dosen auch einen dosisabhängigen antitumoralen Effekt zeigen, wurden die Dosierungen 5 μ g, 10 μ g und 20 μ g in dem Experiment appliziert. Unbehandelte sowie mit nicht-stimulatorischer RNA (ctrlRNA) behandelte Tiere zeigten eine starke Tumorprogression, die innerhalb der ersten 20 Tage zur maximalen TumorgroÙe und damit zum Tod der Mäuse führte (Abbildung 5-19B). Schon bei einer Dosis von 5 μ g 3pRNA zeigte sich sowohl bei den Dendriplex- als auch bei den Polyplex-behandelten Tieren ein deutlich verlängertes Überleben (Abbildung 5-19C). Es konnte in dieser Dosisgruppe allerdings kein tumorfreies Überleben (TFÜ) erreicht werden, denn das Tumorwachstum setzte sich nach Therapieende erneut fort. In der 10 μ g Dosisstufe kam es hingegen nicht nur zu einer Stagnation des Tumorwachstums, sondern in 2 von 5 Tieren zu einem progressionsfreien Überleben (Abbildung 5-19C). Diese Tiere waren auch nach 200 Tagen frei von einem Tumorrezidiv. Die deutlichste Regression zeigte sich bei der 20 μ g-Dosis. In 80% der Tiere konnte eine komplette Tumorregression bzw. –stagnation erzielt werden, die auch noch lange nach Behandlungsende anhielt. Nach 200 Tagen konnte in dieser Gruppe ein 40%iges TFÜ erzielt werden. Im Vergleich zu den 3p-Dendriplexen zeigten die 3p-Polyplexe einen vergleichbaren Effekt.

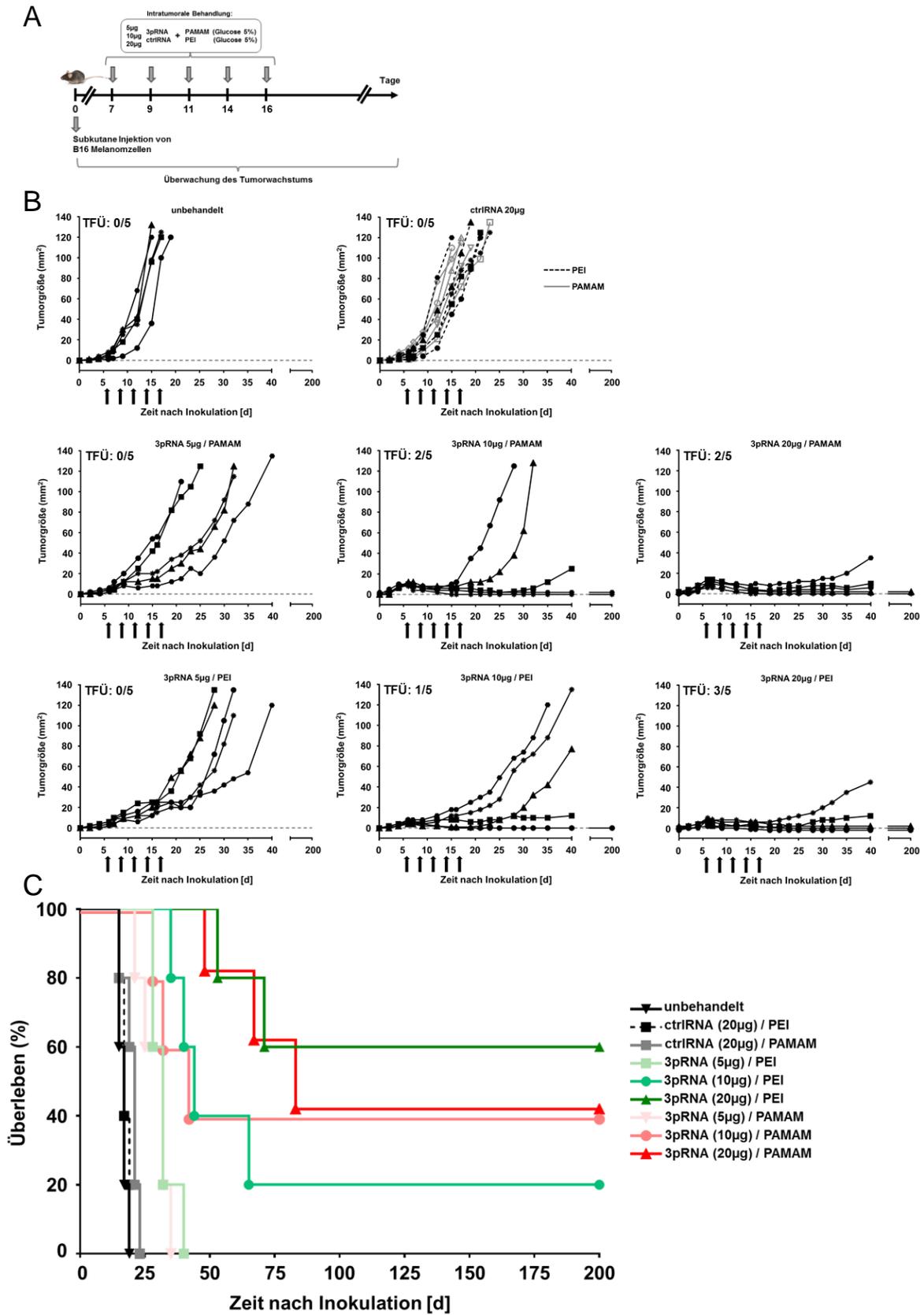


Abbildung 5-19: Intratumorale Therapie mit 3p-Dendriplexen führt zu einer dosisabhängigen Regression von B16 Melanomen.

B16 Melanomzellen wurden an Tag -7 C57BL/6 Mäusen subkutan in die rechte Flanke injiziert. An Tag 7, 9, 11, 14 und 16

wurden den Mäusen 5µg, 10µg oder 20µg 3p-Dendriplexe bzw. 3p-Polyplexe intratumoral verabreicht. Nicht-stimulatorische RNA (ctrlRNA / 20µg) komplexiert mit PAMAM oder PEI oder auch unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die TumorgroÙe wurde kontinuierlich mit einer Schieblehre gemessen. (A) zeigt schematisch den experimentellen Versuchsablauf. (B) zeigt die Entwicklung der TumorgroÙe über 200 Tage. TFÜ steht für tumorfreies Überleben. Schwarze Pfeile symbolisieren die Behandlungszeitpunkte. (C) zeigt das prozentuale Überleben der behandelten Tiere nach Inokulation über den Beobachtungszeitraum von 200 Tagen. Alle Graphen zeigen die Daten von je 5 Tieren pro Gruppe.

Das 3p-Polyplexe auch im subkutanen Tumormodell zu einer effektiven Tumorregression führen können, wurde zwar bereits beschrieben¹³⁷, allerdings ohne eine Dosisabhängigkeit dieser Therapie zu zeigen sowie ohne die Analyse von Langzeitüberlebenden. Der Effekt der Behandlung mit 3p-Dendriplexen in diesem Model wird in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt. Die Daten zeigen, dass auch die intratumorale Applikation von 3p-Dendriplexen zu einer hocheffektiven Regression eines subkutanen Melanoms führt und damit zu einer deutlichen Überlebensverlängerung. Und dieser Effekt war schon ab einer Dosis von 10µg erkennbar.

5.2.3.1 Die Behandlung mit 3p-Dendriplexen schützt vor erneuter Tumorbildung im B16 Melanom

Es stellte sich die Frage, in wie weit eine Therapie mit 3p-Dendriplexen einen Gedächtniseffekt des Immunsystems bewirken kann, so dass daraus ein langfristiger antitumoraler Effekt resultiert. Um das zu untersuchen, wurden die tumorfreien Tiere aus dem vorherigen Experiment erneut mit B16 Melanomzellen injiziert, jedoch keiner weiteren therapeutischen Behandlung unterzogen.

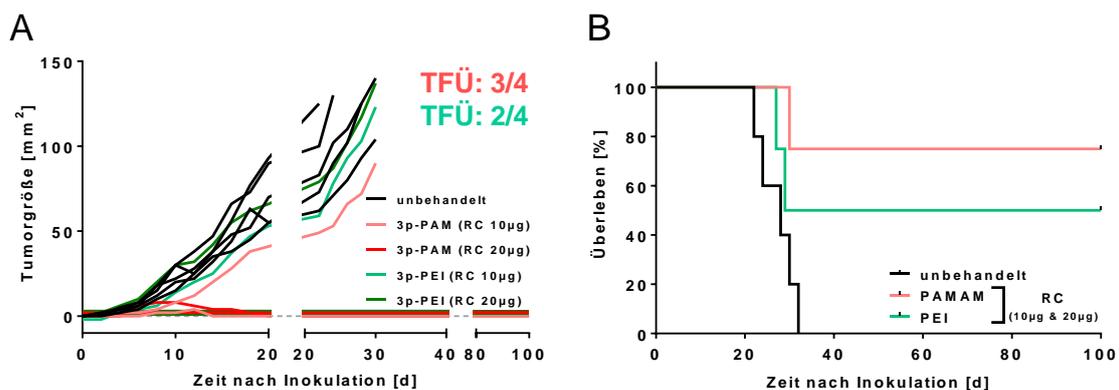


Abbildung 5-20: Die Behandlung mit 3p-Dendriplexen verhindert die Neuausbildung eines B16 Melanoms.

(A) Tiere, die aus einer 3p-Dendriplex oder 3p-Polyplex- Behandlung tumorfrei geblieben waren, wurden erneut mit B16 Zellen subkutan inokuliert ohne folgende therapeutische Behandlungen des Tumors. Das Tumorverhalten wurde über einen Zeitraum von 100 Tagen beobachtet. (B) zeigt die Überlebensrate über den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen. TFÜ steht für Tumor freies Überleben.

In therapienaiven Tieren kam es wie im Experiment zuvor in der gesamten Gruppe zu einer Tumorbildung. Von den zwei Tieren, die aus der 20µg 3p-Dendriplex-Gruppe reinokuliert wurden, bildete sich in einer Maus erst gar kein Tumor aus, wohingegen sich bei dem zweiten Tier zwar erst sichtbar ein Melanom bildete, dieses aber kurz darauf schnell in Regression ging bis eine komplette Tumorfreiheit erreicht war (Abbildung 5-20A). Auch eines der nur mit 10µg behandelten Tiere erfuhr ohne jegliche weitere Behandlung eine Tumorfreiheit. In den Tieren mit

vorangegangener Therapie mit 3p-Polyplexen kam es in 50% der Tiere zu keinem erneuten Anwachsen des Tumors (Abbildung 5-20B).

Dieses Experiment liefert erste Hinweise, dass sich durch eine 3p-Polyplex, aber besonders durch eine 3p-Dendriplex Behandlung ein Gedächtniseffekt erzielen lässt, der effektiv vor einem erneuten Tumorwachstum schützt.

5.2.3.2 Im nicht-orthotopen Hepatozellulären Karzinom führt eine 3p-Dendriplex Behandlung zur Tumorregression und zum Schutz vor Tumorneubildung

Um den antitumoralen Effekt der 3p-Dendriplexe in einer weiteren Tumorentität zu zeigen, sollte im folgenden Experiment das hepatozelluläre Karzinom (HCC) im nicht-orthotopen Modell intratumoral mit 3p-Dendriplexen behandelt werden. Dazu wurden Hepa129 Zellen in die untere Rückenpartie der Mäuse inokuliert (Tag -10). Schon nach wenigen Tagen war der subkutan-entstandene Tumor

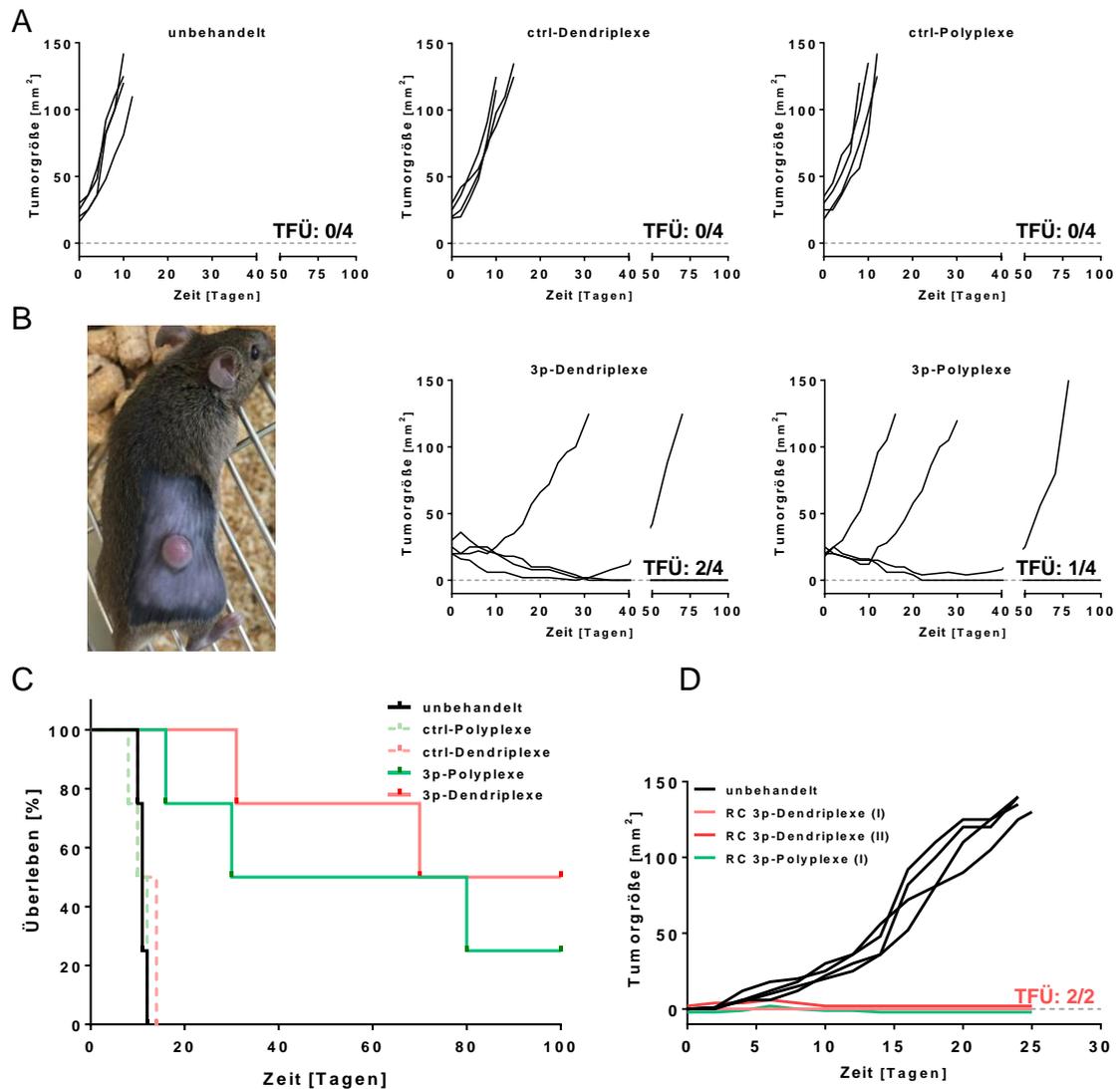


Abbildung 5-21: Eine Intratumorale Therapie mit 3p-Dendriplexen führt im nicht-orthotopen hepatozellulären Karzinom zur Tumorregression.

Hepa129 Hepatomazellen wurden an Tag -10 C3H/HEN Mäusen subkutan injiziert. An Tag 0, 2, 4, 8, 10 und 12 erfolgte eine intratumorale Therapie mit 3pRNA oder nicht-stimulatorischer RNA (ctrlRNA) komplexiert mit PAMAM oder PEI. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die Tumorgöße wurde kontinuierlich mit einer Schieblehre gemessen. (A) zeigt die Entwicklung der Tumorgöße über 100 Tage. (B) Abbildung eines subkutanen HCC zum Behandlungsstart. (C) Überlebenskurve nach Inokulation über 100 Tage. Graphen zeigen Daten von je 4 Tieren pro Gruppe. (D) Tumorfrie Tiere aus Experiment (A) wurden erneut mit Hepa129 Zellen subkutan injiziert ohne folgende Behandlung. Als Kontrolle dienten neue C3H/HEN Mäuse. TFÜ steht für tumorfreies Überleben.

deutlich sichtbar worauf er dann sechsmalig mit 3p-Dendriplexen, 3p-Polyplexen oder deren Kontroll-Formulierungen (ctrl-Polyplexen bzw. ctrl-Dendriplexen) intratumoral behandelt wurde. Dabei war in den unbehandelten sowie auch in den ctrlRNA behandelten Tieren eine Tumorprogression zu beobachten, die innerhalb der ersten 10 Tage nach Therapiebeginn zum Tod der Mäuse führte. In den 3p-Dendriplex behandelten Tieren konnte auch in diesem Tumormodell eine effektive Tumorregression initiiert werden, die zu einer Verlängerung des Überlebens und bei 50% der Tiere sogar zu einer Tumorfreiheit führte. In der 3p-Polyplex Gruppe war dies nur bei 25% der Tiere der Fall (Abbildung 5-21A). Diese Tiere blieben in der Beobachtungszeit von 100 Tagen tumorfrei (Abbildung 5-21C) und wurden anschließend in einem Reprovokationsversuch erneut mit Hepa129 Zellen inokuliert. Auch hier entwickelte sich selbst ohne eine erneute therapeutische Behandlung kein Tumor mehr aus (Abbildung 5-21D), was die im vorangegangenen Kapitel aufgestellte Hypothese einer schützenden Gedächtnisfunktion auch in diesem Tumormodell unterstützt.

5.3 Evaluation der PAMAM bedingten Toxizitätserscheinungen

5.3.1 Die *in vitro* Stimulation von nicht-malignen Zellen mit 3p-Dendriplexen führt zu einer geringeren Toxizität als die Stimulation mit 3p-Polyplexen

Auch wenn die antitumorale Therapie mit 3pRNA-Formulierungen das Ziel verfolgt bestimmte Zielzellen in die Apoptose zu führen, sollte diese „gewünschte Toxizität“ von der unerwünschten Toxizität auf nicht-Tumorzellen unterschieden werden.

Um die Toxizität der 3p-Dendriplexe auf nicht-malignen Zellen zu beurteilen und mit alternativen Transfektionsmethoden zu vergleichen, wurden aus dem Blut gesunder Spender PBMCs isoliert, diese mit 3p-Dendriplexen bzw. 3p-Polyplexen stimuliert und mittels einem MTT-Assay hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität und somit ihrer Lebensfähigkeit untersucht. Um unterscheiden zu können, ob der ermittelte Effekt der RNA oder den PAMAM-Dendrimern zuzuschreiben ist, wurde auch eine nicht-stimulatorische RNA (ctrl) mit PAMAM-Dendrimern komplexiert (Abbildung 5-22 A,B). Die Bildung von Formazankristallen, die aus diesem MTT-Salz nur in lebenden Zellen passieren kann, wurden dann photometrisch bestimmt und mit der Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen korreliert. Es zeigte sich, dass durch die Stimulation der Zellen mit 3p-Dendriplexen oder ctrl-Dendriplexen auch bei höheren N/P Verhältnissen, die Zellvitalität im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht unter 80% fällt. Vergleicht man diese Werte mit denen, die durch eine Stimulation mit 3p-Polyplexen resultieren, so ist ab einem N/P Verhältnis von N/P 4 ein

signifikanter Unterschied erkennbar, der sich bei höheren Konzentrationen des Transfektionsreagenz sogar noch verstärkt (Abbildung 5-22A). Bei einem N/P Verhältnis von NP 8, welches laut den vorhergegangenen Effektivitätsstudien das ideale Verhältnis beschreibt, zeigen die 3p-Dendriplexe somit eine deutlich geringere Toxizität als die 3p-Polyplexe.

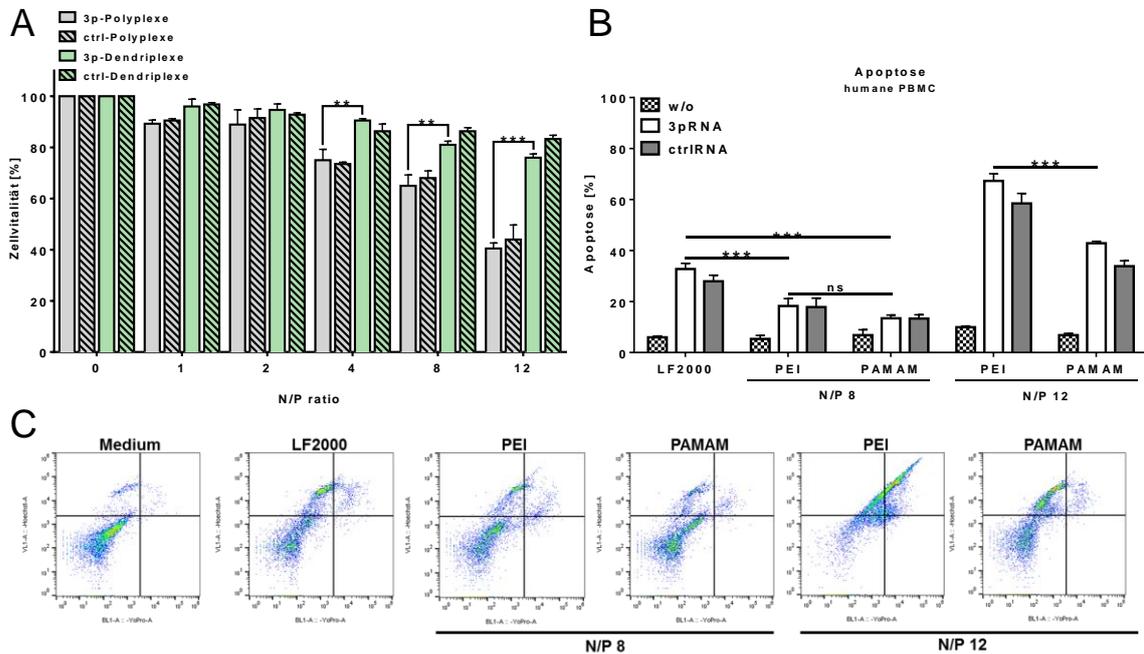


Abbildung 5-22: 3p-Dendriplexe führen *in vitro* auf nicht-malignen Zellen zu einer geringen Toxizität.

(A) 1µg/ml 3pRNA oder ctrlRNA wurden mit PAMAM oder Polyethylenimin in verschiedenen N/P Verhältnissen komplexiert. Alle Ansätze wurden auf humane PBMCs gegeben, nach 24h die Zellen mit MTT Reagenz versetzt, anschließend mit SDS behandelt und die Absorption des gebildeten Formazans bei 570nm photometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Daten von 3 gesunden Spendern, die als Mittelwerte ± SD angegeben sind. (B,C) PBMCs wurden mit 3pRNA oder einer nicht-stimulatorischen RNA (ctrlRNA) behandelt, die zuvor mit PAMAM, PEI oder Lipofectamine (LF2000) komplexiert wurden. Nach 48h wurden die Zellen isoliert und die Apoptoserate im Durchflusszytometer mittels YoPro / Hoechst33258 Färbung ermittelt. Gezeigt sind die Daten von insgesamt 3 Experimenten, die als Mittelwerte ± SD angegeben sind. *, ** und *** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$. ns steht für nicht signifikant.

Um das Ergebnis des MTT-Versuches zu bestätigen, wurden humanen PBMCs 48 Stunden mit 3p-Dendriplexen, -Polyplexen oder -Lipoplexen stimuliert und anschließend einer YoPro-Hoechst Antikörper Färbung unterzogen. Durch die dann folgende Analyse im Durchflusszytometer wurde dann die Apoptoserate bestimmt. Hier zeigte sich, dass sowohl die 3p-Dendriplexe als auch die 3p-Polyplexe in dem für die Stimulation idealen N/P Verhältnis (N/P 8) zu einer signifikant geringeren Toxizität führten, als die 3p-Lipoplexe in dessen idealer Konzentration (Abbildung 5-22B, C). Dabei führten auch die 3p-Dendrimere zu einer, wenn auch nicht signifikanten, geringeren Apoptoseinduktion als die 3p-Polyplexe. Dieser Unterschied wurde abermals bei höherer Konzentration der Transfektionsreagenzien vergrößert. Bei einem N/P Verhältnis von 12 führten die Polyplexe zu einer nahezu 50% höheren Apoptoseinduktion als die Dendriplexe. Da nicht nur das immunstimulatorische Oligonukleotid (3pRNA), sondern auch eine nicht-stimulatorische RNA (ctrlRNA) komplexiert mit den verschiedenen Transfektionsreagenzien zu einem vergleichbaren Zelltod führt, wird die auf den nicht-malignen Zellen ermittelte Toxizität durch die

Transfektionsreagenzien hervorgerufen und nicht durch die 3pRNA.

5.3.2 Bei der intratumoralen Therapie führen 3p-Polyplexe nicht aber 3p-Dendriplexe zu einer Ulzeration des Tumors

Während der vorangegangenen subkutanen bzw. intratumoralen *in vivo* Versuche, fiel auf, dass die Tiere, die eine Behandlung mit Dendriplexen erfuhren, im Vergleich zu denen, die mit Polyplexen behandelt wurden, deutlich weniger Auffälligkeiten an der Injektionsstelle aufwiesen. Bei allen durchgeführten subkutanen Tumormodell-Versuchen wurde nach dem Anwachsen der Tumore eine mehrmalige intratumorale Therapie vollzogen. Nach dieser Behandlungszeit, konnte in den Polyplex-Gruppen in fast allen Tieren eine leichte Ulzeration festgestellt werden auf die danach eine Verkrustung des Tumorareals folgte. In Abbildung 5-23 sind diese Auffälligkeiten photographisch festgehalten worden und die Ulzeration und Entzündungsanzeichen durch weiße Pfeile markiert. Diese Beobachtungen konnten in den Dendriplex-Behandlungsgruppen nicht gemacht werden.

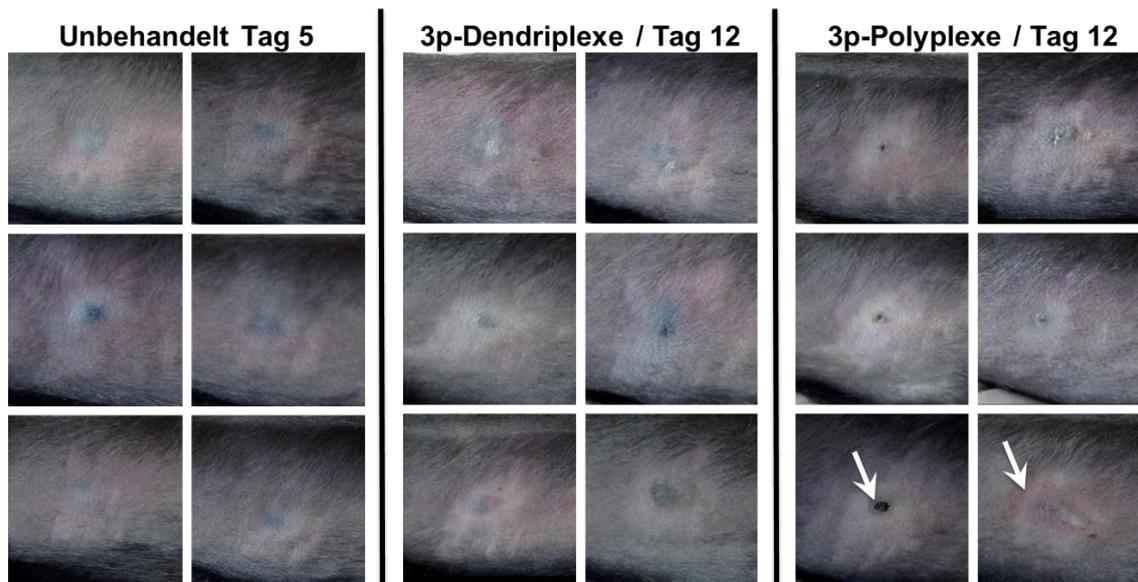


Abbildung 5-23: Die intratumorale Behandlung mit 3p-Dendriplexen führt im Vergleich zu 3p-Polyplexen nicht zu einer Ulzeration des behandelten Tumors.

C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 mit B16 Melanomzellen injiziert. An Tag 5, 7, 9 und 12 erfolgte jeweils eine intratumorale Behandlung mit 20µg 3p-Dendriplexen bzw. 3p-Polyplexen. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die Abbildung zeigt Fotografien der Injektionsstelle der unbehandelten Mäuse zum Therapiestart an Tag 5 (links), sowie der 3p-Dendriplex-behandelten (Mitte) und der 3p-Polyplex-behandelten (rechts) Tiere 4 Tage nach der letzten Applikation. Gezeigt sind die Daten von insgesamt 6 Tieren pro Gruppe.

Die Langzeit-Überlebensexperimente boten dazu die Möglichkeit diese Auffälligkeiten an den Polyplex-behandelten Tieren längerfristig zu beobachten. Dabei zeigte sich, dass die Ulzeration und auch die dann folgende Verkrustung sich in allen Fällen wieder zurückbildete oder abfiel und sich keine dieser Stellen weiter infizierte. Allerdings bleibt bei den betroffenen Mäusen eine Narbe an dieser Stelle zurück.

5.3.3 Eine subkutane Behandlung mit 3p-Dendriplexen führt nur an der Injektionsstelle zu mikroskopische Auffälligkeiten

Um zum einen die lokale Toxizität an der Injektionsstelle intensiver zu untersuchen, aber auch um die systemische Toxizität zu evaluieren, wurde nach einer subkutanen Injektion von Dendriplexen eine histopathologische Untersuchung der Haut sowie der inneren Organe durchgeführt. Hierzu wurden die Mäuse nach dem oben durchgeführten Behandlungsregime subkutan mit Dendriplexen und zur Kontrolle auch mit Polyplexen injiziert und 2 Tage nach der letzten Injektion geopfert. Da das Körpergewicht einen der wichtigsten Parameter darstellt, um das Befinden der Mäuse und somit auch deren Gesundheitszustand zu beurteilen, wurde dieser vor, während und nach der Behandlung der Tiere täglich gemessen. Das anfängliche durchschnittliche Gewicht der Mäuse und auch ihr Verhalten änderte sich innerhalb einer Gruppe durch die Behandlung nicht, was auf eine generell gute Therapieverträglichkeit hindeutet. Neben der Isolation von Lunge, Leber, Milz, Herz und Nieren, wurde auch das Injektionsareal präpariert. Die Gewebeproben wurden fixiert, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (Abbildung 5-24A). Alle Schnitte wurden anschließend von dem Pathologen Dr. med. Lars Tharun (Institut der Pathologie und Neuropathologie; Universitätsklinikum Köln) untersucht und je nach ermittelter Toxizität in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt. Die Definition der Schweregrade reichte von einer absolut histopathologisch-unauffälligen Bewertung (Schweregrad = 0) bis hin zu hochgradig schwerwiegenden Toxizitätserscheinungen, die ein Organversagen zur Folge haben (Schweregrad = 10). Die Analyse von Herz, Niere und Milz zeigte keinerlei pathologische Auffälligkeiten und wurden demnach mit einem Toxizitätswert von 0 beurteilt. In der Lunge fanden sich in den 3pRNA behandelten Tieren eine geringe Anzahl neutrophiler Granulozyten als Zeichen eines minimalen Infektes oder einer chemischen Alveolarzell-Schädigung (Pneumonitis). Diese Beobachtung wurde mit einem Toxizitätsgrad von 1 eingestuft. Die nicht-stimulatorische RNA, die mit Polyethylenimin transfiziert wurde, zeigte ein zum Teil interstitielles lymphozytäres Infiltrat mit vereinzelt neutrophile Granulozyten, was entweder aus einem pneumonisch oder einem pneumonitisch (chemisch) bedingten länger andauernder Reizzustand resultiert. Auf diesen Zustand können reversible Lungenfunktionsstörungen folgen, oder möglicherweise auch die Entwicklung einer interstitieller Fibrose, die dann irreversible verläuft (Abbildung 5-24C).

In der Leber zeigte sich in allen Gruppen, auch in der unbehandelten Gruppe, fokale Einzelzellnekrosen, die einen toxischen oder auch physiologischen Untergang einzelner Hepatozyten anzeigen. Aufgrund der nicht schwerwiegenden Relevanz und der kompletten Reversibilität wurden diese Beobachtungen nur mit einem Toxizitätswert von 1 beurteilt. In den 3pRNA behandelten Tieren war dieser Effekt leicht, aber nicht signifikant erhöht. Hier traten neben den Einzelzellnekrosen auch einige Gruppenzellnekrosen auf (Abbildung 5-24D). Die Analyse der Injektionsstelle ergab aufgrund der physiologisch dünneren Haut der Maus im Vergleich zum Menschen schon bei der Injektion von Mediumlösung die Bildung von leichten, intramuskulären Fibrosen oder eines bandförmigen gemischten Entzündungsinfiltrats im subkutanen Fettgewebe. Dieses gemischte lymphoplasmazelluläres und neutrophil-granulozytäres Entzündungsinfiltrat konnte in allen therapeutisch behandelten Tieren mit einer leicht stärkeren Intensität beobachtet

werden, wobei aber keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen gefunden werden konnte. Diese Anzeichen sind vereinbar mit einem chemischen Reiz, der mit Zelluntergang und chemotaktischer Entzündungszell-Rekrutierung einhergeht. Im Falle einer ausbleibenden Abszess-Bildung wäre dieser Zustand aber ohne Narbenausbildung reversibel.

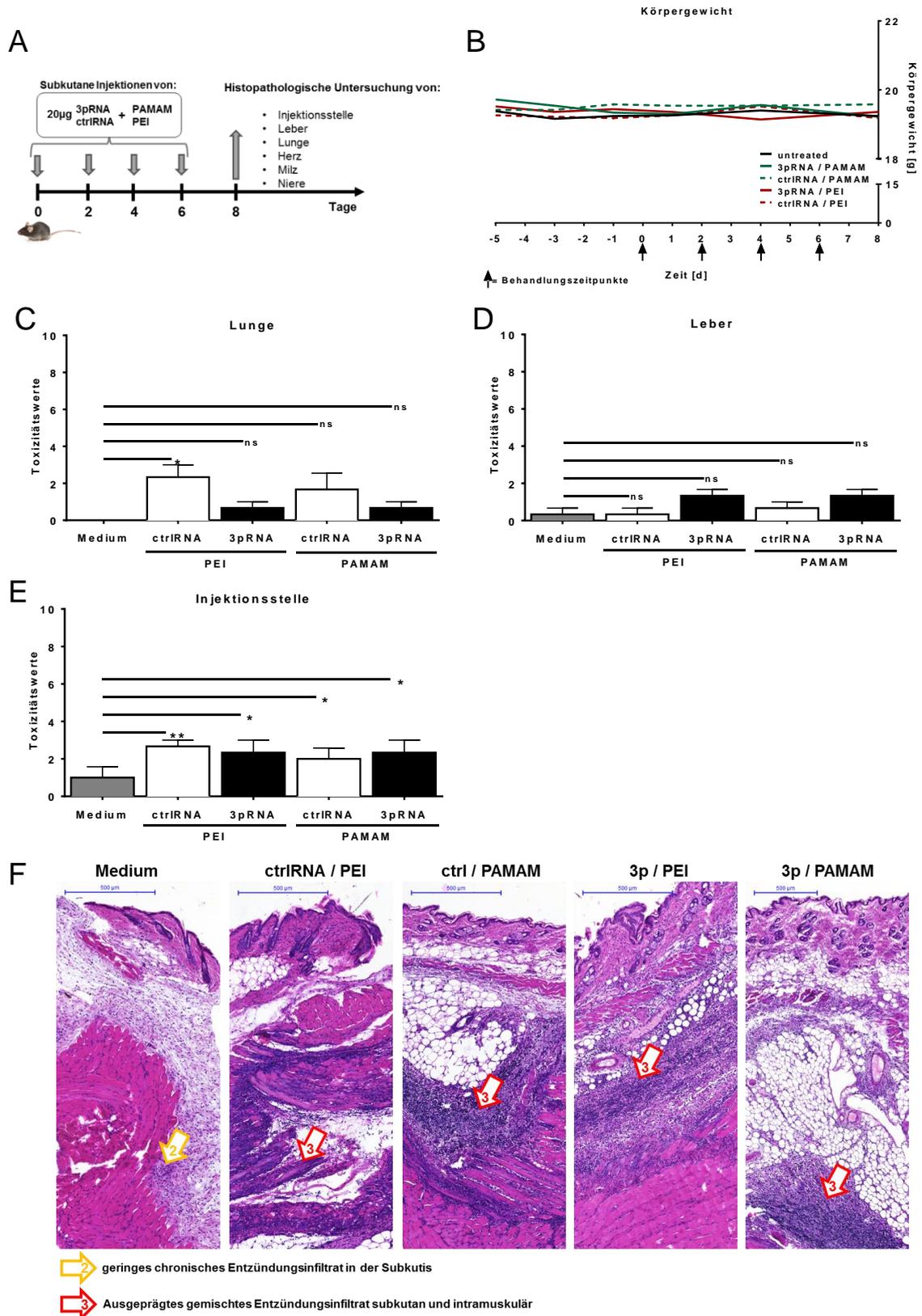


Abbildung 5-24: Die subkutane Behandlung mit 3p-Dendriplexen führt nur an der Injektionsstelle zu leichten Toxizitätserscheinungen.

C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 mit 20µg 3p-Dendriplexe bzw. 3p-Polyplexe intratumoral verabreicht. Nicht-stimulatorische RNA (ctrlRNA / 20µg) komplexiert mit PAMAM oder PEI oder auch unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die Mäuse wurden 2 Tage nach der letzten Injektion geopfert und Lunge, Leber, Milz, Herz und Niere entnommen und der Bereich der Injektionsstelle herausgeschnitten. (A) zeigt schematisch den Versuchsverlauf. Das Gewicht der Mäuse wurde täglich gemessen und gegen die Zeit aufgetragen (B). Die Organe wurden histopathologisch untersucht und die Beobachtungen nach ihrer Intensität her bewertet. Diese Toxizitätswerte sind für die Lunge (C), die Leber (D) und die Injektionsstelle (E) dargestellt. (E) HE-gefärbte Bilder der Injektionsstellen. Gezeigt sind die Daten von insgesamt 3 Tieren pro Gruppe, die als Mittelwerte \pm SD angegeben sind. *, ** und *** steht für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$. ns steht für nicht signifikant.

5.4 Evaluierung einer maschinellen Produktion von 3p-Dendriplexen

5.4.1 Die Verwendung von pulsationsfreien Niederdruckpumpen ermöglicht eine kontrollierte maschinelle Formulierung von 3p-Dendriplexen

Alle bisher hergestellten 3p-Dendriplex-Formulierungen wurden auf manuelle Weise hergestellt. Hierzu wird die gewünschte Menge an 3pRNA zunächst in 5% Glucose gegeben und vermengt. Parallel dazu wird auch die für ein N/P Verhältnis von 8 benötigte Menge an PAMAM berechnet und separat in 5%iger Glucose-Lösung verdünnt. Anschließend wird der PAMAM Ansatz in die RNA Lösung pipettiert, kurz durch vortexen gemischt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Komplexierung zu gewährleisten. Der so hergestellte Ansatz kann dann für *in vitro* oder *in vivo* Versuche verwendet werden (Abbildung 5-25A).

Diese oft angewendete manuelle Herstellung von Dendriplexen stellt eine sehr simple praktische Umsetzung der Formulierungsstrategie dar. So einfach diese Herstellungsmethode auch für den Laboralltag ist, desto komplizierter ist jedoch dessen klinische Umsetzung. Eine Möglichkeit, die einer manuellen Herstellungsstrategie sehr nahekommt, wäre die sogenannte „*Beside*“ Formulierung (Abbildung 5-25B). Hierbei würde die RNA als Lyophilisat vorliegen, die dann durch eine standardisierte PAMAM-Lösung gelöst und gleichzeitig komplexiert werden würde. Nach einer bestimmten Komplexierungszeit wäre diese Lösung dann bereit für die Applikation. Jedoch treten schon bei diesen wenigen Formulierungsschritten viele Bedenken auf. Die erste Frage, die sich hier stellt wäre, welche Person zu einer solchen Komplexierung überhaupt befugt wäre. Sollte nämlich in einem solchen Fall das PAMAM-Dendrimer nicht als Hilfsstoffe, sondern als wirksame Arzneistoff-Komponente angesehen werden, dann wäre eine Zusammenfügung der beiden Komponenten ein Herstellungsprozess, den ausschließlich ein Apotheker durchführen dürfte. In einer Klinik wäre das vielleicht noch möglich, jedoch wäre eine solche Voraussetzung für eine ambulante Behandlung nicht geeignet. Des Weiteren stellt sich die Frage nach der richtigen Inkubationszeit für eine vollständige Komplexierung von RNA und Dendrimer. Diese könnte zwar zuvor genau ermittelt und angegeben werden, allerdings sind solche Prozeduren in der Klinik nur schwer realisierbar, was zu einer starken Einschränkung der *Compliance* führen würde.

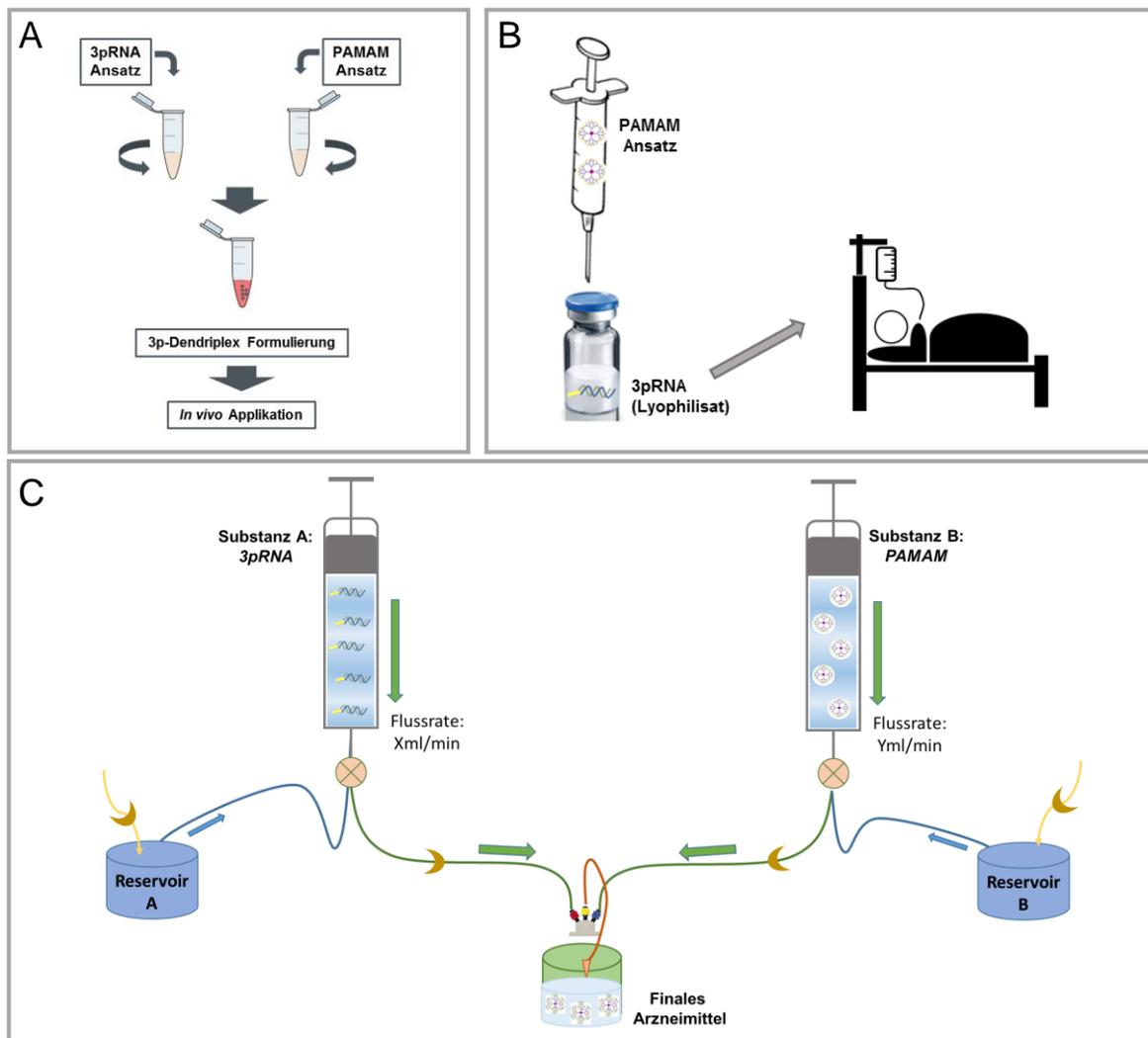


Abbildung 5-25: Manuelle und maschinelle Herstellungsmethoden für 3p-Dendriplexe.

Alleine für eine solche Umsetzung müssten präklinisch kostspielige und zeitintensive Kompatibilitätsstudien durchgeführt werden, die diese Art der Formulierung absichern. Ein weiterer sehr großer Nachteil wäre die fehlende Charakterisierung des finalen Produktes, was letztendlich dem Patienten verabreicht wird. Auch wenn durch die präklinischen Kompatibilitäts- und Formulierungsstudien verschiedene Parameter definiert und getestet werden können, kann nicht festgestellt werden, ob diese Parameter nicht durch die unterschiedliche Handhabung bei der Herstellung außerhalb der vorgegebenen Spezifikationen liegen. Somit beschreibt diese „*Bedside*“-Formulierung eine nicht ideale Herstellungsmethode, da seine Standardisierung von Verfahren und resultierendem Produkt äußerst schwer umzusetzen ist.

Um dieser Komplexität zu entgehen, sollte ein finales, applikationsfertiges Dendriplex-Produkt hergestellt werden, welches keiner weiteren Komplexierung oder Aufarbeitung bedarf. Dazu haben wir uns die neMESYS Niederdruckpumpe (Firma: Cetoni, Korbußen) zu Nutze gemacht. Diese Präzisions-Spritzenpumpe ist in der Lage nanolitergenau gleichmäßige und pulsationsfreie Fluidströme zu generieren. Da dieses System mit Spritzmodulen arbeitet, die parallel mit jeweils

unterschiedlichen Lösungen befüllt werden können, ermöglicht dieses Verfahren auch eine separate Handhabung der 3pRNA- sowie auch der Dendrimer-Lösung. In dieses System wurde eine V-Mischkammer integriert, die es ermöglicht beide Flüssigkeiten in einem mm-kleinen Bereich zu vereinen, und dieses Gemisch durch ein drittes Ventil wieder aus der Kammer herauszulassen (siehe Modell Abbildung 5-26).

Für initiale Versuche wurde 3pRNA entweder in einer 5%igen Glucose-Lösung, PBS oder in NaCl 0.9% angesetzt und eine der beiden Spritzenmodule damit befüllt. Die zweite Spritze wurde mit dem gleichen Volumen PAMAM-Lösung versetzt, die auch entweder 5% Glucose-Lösung, PBS oder aber NaCl 0.9% basiert war (Abbildung 5-25C). Unter Einstellung verschiedener Flussraten, durch die die befüllten Spritzen pro Zeiteinheit ein ganz bestimmtes Volumen herausdrücken, wurden 3pRNA und PAMAM miteinander komplexiert und die erhaltene Formulierung analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Komplexierung mit geringen Flussraten zur größeren

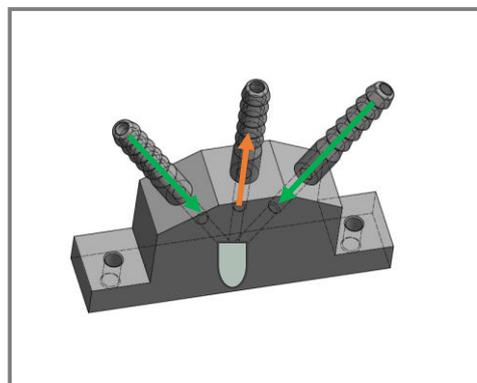


Abbildung 5-26: Modell einer V-Mischkammer.

Partikeln, und die Verwendung von höheren Flussraten zu kleineren Partikeln führte. Besonders deutlich war dies bei der Verwendung von NaCl 0.9% oder auch PBS als Transfektionsmedium zu erkennen. Hier konnten durch die Verwendung von geringen Flussraten die μm -Größen generiert werden, die auch durch die manuelle Komplexierung erhalten wurden. Erhöhte man hier jedoch die Flussrate, konnten die Partikel auf ca. 200nm gebracht werden, was nur noch ein Viertel der Partikelausgangsgröße ausmacht. Auffällig war auch, dass die Verwendung von PBS zu hochmonodispersen Partikelformationen führte, die auch in allen verwendeten Flussraten erhalten blieb. Ein weniger drastisches Bild zeigte sich bei der Variation der Flussraten von Glucose basierten 3p-Dendriplexen. Die ja schon auf manuellem Wege herstellbaren Nanopartikel mit etwa 80nm Größe, wurden durch die maschinelle Produktion und einer Flussratenerhöhung auf ca. 50nm weiter verkleinert, was einer 50%igen Volumen Verkleinerung entspricht (Abbildung 5-27C). In beiden Fällen konnte auch organoleptisch eine Veränderung des Aussehens der Produktansätze beobachtet werden. Der fast milchige 3p-Dendriplex Ansatz, der bei geringen Flussraten und unter Verwendung von PBS generiert wurde, konnte durch höhere Flussraten in eine opalenzente Lösungen verändert werden (Abbildung 5-27A). Der schon opalenzente Glucose basierte 3p-Dendriplex Ansatz wurde bei einer Flussrate von 40 ml/min nahezu klar (Abbildung 5-27B).

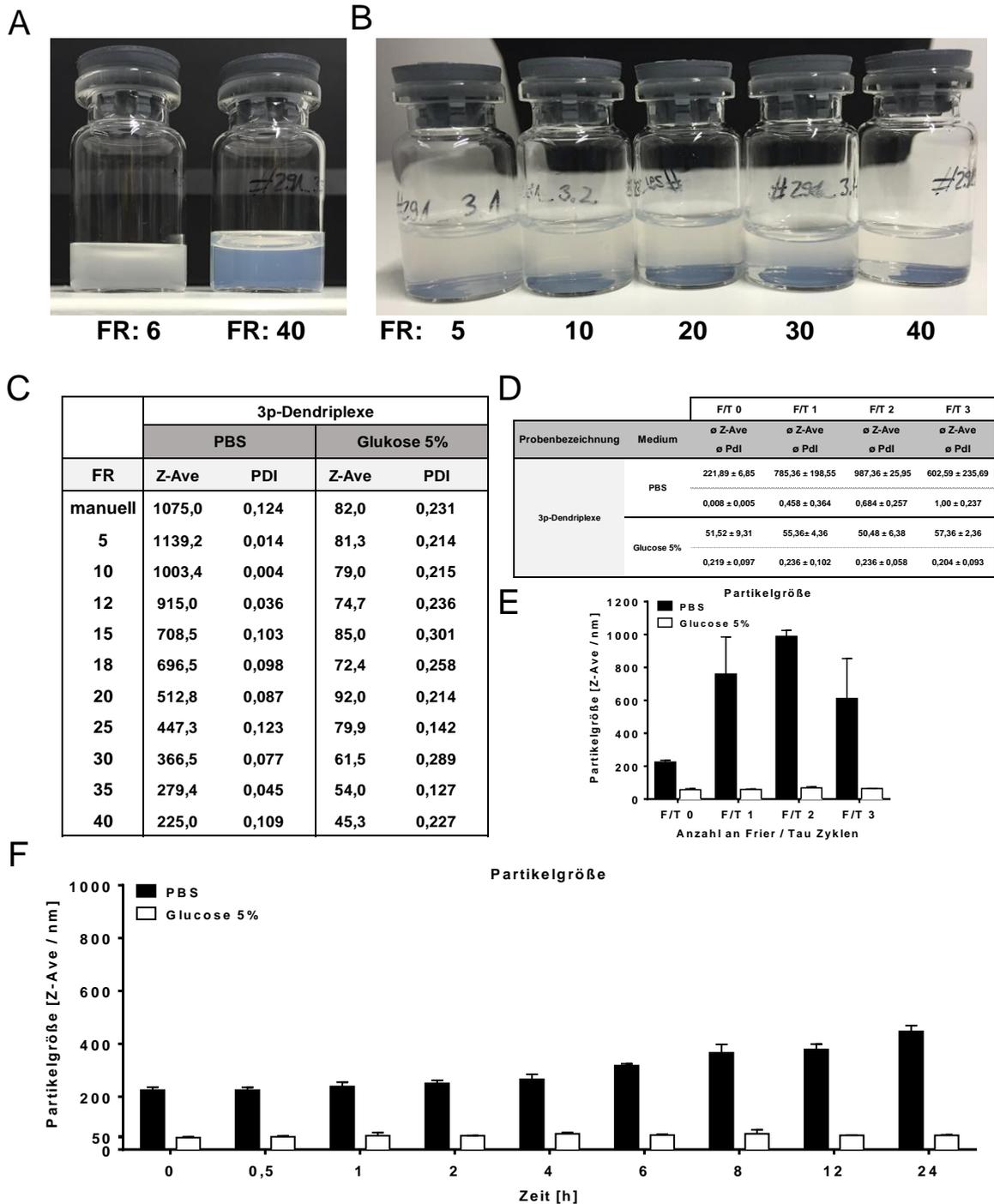


Abbildung 5-27: Die Flussrate bestimmt die resultierende Partikelgröße.

3pRNA (0,4mg/ml) und PAMAM wurden jeweils in 5%iger Glucose, 0,9% Natriumchlorid (NaCl) oder phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) verdünnt und separat in jeweils eine Spritze des neMESYS Moduls gefüllt. Mit unterschiedlichen Flussraten wurden dann 3p-Dendriplexe generiert. (A) zeigt Photographien der mit zwei unterschiedlichen Flussraten (FR) in PBS hergestellten Formulierungen. (B) zeigt Photographien der mit unterschiedlichen Flussraten (FR) in 5% Glucose-Lösung hergestellten Formulierungen. In (C) sind die Partikelgrößen dargestellt, die 30min nach Produktion bei unterschiedlichen Flussraten gemessen wurden. Die Partikelgrößen nach Frier/Tau (F/T) Zyklen sind in (D) tabellarisch und in (E) graphisch dargestellt. (F) zeigt die Partikelgröße der PBS bzw. Glucose basierten Formulierungen in einem Zeitraum von 24h.

5.4.2 Glucose bewirkt eine Stabilisierung der hergestellten Komplexe

Die maschinelle Produktion mittels pulsationsfreien Niederdruckpumpen bietet somit die Möglichkeit über eine hoch akkurate und kontrollierbare Mechanik einen finalen Komplex herzustellen, welcher keiner weiterer Verarbeitung bedarf. Jedoch stellte sich nun die Frage wie ein solches Produkt gelagert werden muss, um diese initialen Produkt-Charakteristika auch beizubehalten. Demnach war für uns nicht nur die Partikelgröße entscheidend, die die Komplexe kurz nach Produktion aufwies, sondern auch, wie sich diese Partikel über die Zeit oder auch in Stresssituationen entwickelten. Da die Partikelgröße eines der wichtigsten und auch sensibelsten Partikel Charakteristika beschreibt, war diese hier von besonderer Bedeutung um Aussagen über die Stabilität der hergestellten Formulierungen treffen zu können. Zunächst wurden 3p-Dendriplex-Formulierungen in PBS oder in 5% Glucose-Lösung hergestellt und dessen Partikelgröße vermessen. Erneut lagen die Glucose-basierten 3p-Dendriplexe bei ca. 50nm und die PBS-basierten Nanopartikel bei ca. 220nm. Beide Formulierungen wurden dann über 24h kontinuierlich größentechnisch vermessen (Abbildung 5-27F). Hier zeigte sich, dass die in Glucose hergestellten 3p-Dendriplexe über die komplette Beobachtungszeit hinweg ihre Partikelgröße nahezu beibehielten und auch der Polydispersitätsindex immer unter einem Wert von 0,25 lag. Die PBS-basierten Dendriplexe zeigten jedoch eine Partikelvergrößerung über die Zeit. Nach 24h Lagerung bei Raumtemperatur konnte hier eine Verdopplung der Größe detektiert werden, die aber bei jeder Messung einen Polydispersitätsindex von unter 0,15 verzeichnete und somit als hoch monodispers angesehen werden kann. Da sich hier die Partikelgröße erst nach 3-4h signifikant änderte, stellte sich die Frage, ob durch einen Einfrierprozess diese Partikelvergrößerung unterbunden werden kann oder ob eine solche Stresssituation die Partikel zusätzlich verändert. Dazu wurden beide Formulierungen mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen (F/T) unterzogen. Um auch ein vollständiges Durchfrieren der Formulierungen zu gewährleisten wurden diese bei -20°C für 24h eingefroren, dann aufgetaut und erneut dessen Größe und Polydispersität bestimmt (Abbildung 5-27D). Dabei zeigte sich, dass durch einen Einfrierprozess die in Glucose hergestellten Partikel keine signifikante Veränderung ihrer Größe erfuhren und diese auch bei weiteren Einfrier-Auftau-Zyklen (F/T) nicht beeinträchtigt wurde. Bei den in PBS hergestellten Partikel nahm schon nach einem Einfrier-Auftau-Zyklus die gemessene Partikelgröße drastisch zu und auch die hohe Monodispersität der Partikel ging verloren.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass im Gegensatz zu PBS eine 5%ige Glucose-Lösung die Partikelformation stabilisieren kann. Mit diesem Glucose-basierten System und durch die Herstellung mittels einer pulsationsfreien Niederdruck-Spritzenpumpe haben wir für die Formulierung der 3p-Dendriplexe einen „*Ready-to-use*“ Therapieansatz etabliert.

6 Diskussion

6.1 PAMAM-Dendrimere als potentielle nicht-virale Transfektionsvektoren für Oligonukleotide zur effektiven Aktivierung endosomaler Toll-like-Rezeptoren und des zytosolischen Rezeptors RIG-I.

Mit der Identifikation des zytosolischen Immunrezeptors RIG-I und der Identifikation von 5'-triphosphorylierter dsRNA (3pRNA) als dessen Ligand, wurde die Möglichkeit geschaffen, einen interessanten und potentiell therapeutisch nutzbaren Signalweg intensiver zu erforschen. Seitdem wuchsen zum einen die wissenschaftlichen Erkenntnisse bezogen auf die RIG-I-basierte Detektion vieler RNA-Viren^{19,20,69,70}, zum anderen scheint der RIG-I Rezeptor und sein Ligand aber auch im Rahmen einer therapeutischen Anwendung eine bedeutende Rolle spielen zu können. Denn durch die Aktivierung von RIG-I werden endogene Effekte erzielt, die einen ganz neuen therapeutischen Ansatz liefern. Die Anwendung von 3pRNA als Immuntherapeutikum besitzt ein bisher einzigartiges, facettenreiches Wirkprinzip: die direkte Aktivierung von Immunzellen, die Induktion des immunogenen Zelltods in Tumorzellen und die dadurch eintretende Generation von Tumorantigenen zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems, Veränderung des Tumor-Mikromilieus, so dass eine antitumorale Immunantwort erleichtert werden kann und die Ausschüttung von immunaktivierenden Exosomen, die eine NK-Zell vermittelte tumorspezifische Zytotoxizität fördern^{88,137,289,290}. Für eine Anwendung dieses Oligonukleotids *in vivo* und auch für die spätere Translation in die Klinik muss allerdings die Stabilität auch in biologischen Flüssigkeiten und der effektive zytosolische Transport gewährleistet werden. Unter den dafür bisher bekannten Transfektionssystemen, die für den viralen und auch nicht-viralen Transfer von Nukleinsäuren eingesetzt werden, sind besonders zwei Systeme in der Vergangenheit schon zusammen mit 3pRNA verwendet worden. Kationische Lipide, die insbesondere bei *in vitro* basierten Versuchen eingesetzt wurden,^{72,73,277,291} zeigen eine hoch effektive Aktivierung von RIG-I *in vitro*, besitzen jedoch einige entscheidende Nachteile im Rahmen der Zellspezifität²⁹² und der nicht gewünschten Effekte und vermittelten Toxizitäten²⁹³⁻²⁹⁷. Die Verwendung von kationischen Lipiden für die Transfektion von 3pRNA *in vivo* wurde bisher noch nicht beschrieben. Hier existieren bisher nur einige wenige Publikationen, die das lineare, kationische Polymer Polyethylenimin (*in vivo* jetPEI™) als Vektorsystem für 3pRNA in *in vivo* Studien verwenden^{137,298}. Allerdings wurde vor dieser Arbeit weder die Partikelcharakteristika der 3pRNA-Polyplexe untersucht, noch die Analyse des optimalen N/P Verhältnisses oder der optimalen *in vitro* und *in vivo* Dosis-Wirkungsbeziehungen analysiert. PAMAM-Dendrimere der unterschiedlichen Generationen sind in der Lage DNA, RNA oder siRNA ins Zytosol verschiedener Zellen zu transportieren²⁹⁹⁻³⁰¹, allerdings war vor dieser Arbeit unklar, in wie weit sie gezielt Liganden zum zytosolisch lokalisierten Immunrezeptor RIG-I transportieren können und ob auch ein endosomaler Transport zu den Toll-like Rezeptoren TLR7 und TLR8 möglich ist. In dieser Arbeit wurde demnach die Verwendung von PAMAM-Dendrimern als neuer Transfektionsvektor für 3pRNA *in vitro* und *in vivo* evaluiert. Eine erfolgreiche Aktivierung von RIG-I konnten wir anhand der Produktion des Leitzytokins IFN α belegen. Um das Potential der PAMAM-Dendrimere als Nanotransporter für 3pRNA zu evaluieren, wurden demnach zunächst 3p-

Dendriplexe in unterschiedlichen N/P Verhältnissen hergestellt und humane PBMC mit diesen stimuliert. Dabei zeigte sich, dass PAMAM-Dendrimere die Fähigkeit besitzen 3pRNA effektiv zum zytosolischen RIG-I Rezeptor zu transportieren und dass dieser Effekt deutlich vom eingesetzten N/P Verhältnis abhängig ist. Die Steigerung der Konzentration und die damit verbundene Erhöhung der Stickstoffanteile (N) des PAMAM-Dendrimers im Verhältnis zu den Phosphatanteilen (P) des Oligonukleotids führte auch zu einer erhöhten IFN α Produktion. Bei einem N/P Verhältnis von 8 zeichnete sich allerdings der Start einer Plateau-Phase ab, ab der sich die IFN α Induktion, und damit auch die Aktivierung von RIG-I nicht signifikant steigern ließ (Abbildung 5-1A). Somit konnte das N/P 8 als das ideale Verhältnis zwischen PAMAM-Dendrimern und 3pRNA definiert werden, welches auch in den folgenden *in vivo* Experimenten bestätigt werden konnte (Abbildung 5-11A).

Die Nukleinsäure erkennenden Toll-like Rezeptoren TLR7 und TLR8 befinden sich in den endosomalen Kompartimenten bestimmter Immunzellen. Um diese Rezeptoren zu aktivieren, muss das Oligonukleotid (ORNs) zwar nicht den ganzen Weg über das Endosom/Lysosom bis ins Zytosol gehen, allerdings ist auch hier eine effektive, endozytotische Aufnahme in die Zelle Voraussetzung für eine erfolgreiche Stimulation. Diese Stimulation äußert sich bei TLR7 in der Sezernierung hoher Mengen IFN α ^{30,31,281}, wobei die Aktivierung von TLR8 die Produktion von IL-12p70 und TNF α bewirkt^{30,52,80}.

Durch die Komplexierung der ORNs R3011 und R2197 mit PAMAM-Dendrimern konnten Dendriplexe formuliert werden, die im Endosom der stimulierten Zellen eine spezifische Aktivierung von TLR7 bzw. von TLR8 erzielten. So zeigte sich nach einer definierten Stimulationsperiode von humanen PBMCs mit R3011-Dendriplexen bzw. mit R2197-Dendriplexen eine Induktion von IFN α bzw. IL-12p70. Wie auch schon bei den 3p-Dendriplexen war der Transfektionseffekt deutlich vom eingesetzten N/P Verhältnis anhängig. Jedoch zeigte sich hier, dass ein deutlich geringerer Stickstoffanteil (N) des Dendrimers im Verhältnis zu dem Phosphatanteil (P) des Oligonukleotids von Nöten war, was ein ideales N/P Verhältnis von N/P 2 für eine endosomale Transfektion entspricht (Abbildung 5-1B, C). Zudem führte eine weitere Erhöhung der Dendrimer Konzentration nicht wie bei den 3p-Dendriplexen in eine Plateau-Phase der Zytokin-Produktion, sondern zu einem kompletten Verlust des Zytokinsignals. Dass dieser Transfektionsverlust mit einem Untergang der Zellen verbunden sein könnte, konnte durch eine parallel durchgeführte Vitalitätsuntersuchung ausgeschlossen werden (Abbildung 5-1D). Da zudem die Transfektionseffizienz der TLR-Liganden ab einem N/P Verhältnis von 2 abnimmt, wohingegen die des RIG-I Liganden zu wachsen beginnt, liegt die Vermutung nahe, dass für den zytosolischen Transport eine höhere Dendrimerkonzentration und somit eine größere Anzahl protonierbarer Amine von Nöten ist, als für eine endosomale Transfektion.

In vielen Studien wird oft ein bestimmter Transfektionsvektor für eine bestimmte Rezeptoraktivierung verwendet. So wird Lipofectamine meist als *in vitro*-, und PEI als *in vivo* Transfektionsreagenz für 3pRNA zur Aktivierung von RIG-I eingesetzt¹³⁷, poly-L-Arginin oder Protamin zur Stimulation von TLR7 oder TLR8^{58,276} und Dotap zur Aktivierung des endosomalen TLR9^{282,302}.

In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass PAMAM-Dendrimere die Fähigkeit besitzen, unter bestimmten Formulierungsbedingungen all diese Rezeptoren zu adressieren und das zum Teil deutlich effizienter als die Standard-Transfektionsverfahren. Im direkten Vergleich mit Dotap und poly-L-Arginin stellt PAMAM zum Beispiel das effektivste Transfektionsreagenz für CpG-DNA zur Aktivierung von TLR9, und auch für R2197 zur Aktivierung von TLR8 dar. Die Aktivierung von TLR7 durch seinen Liganden R3011 erfährt ihr Maximum unter PAMAM oder Protamin als Transfektionsvektor, die beide poly-L-Arginin und besonders Lipofectamine, Dotap und PEI überlegen sind. Und auch für 3pRNA zeichnet sich in dieser Arbeit PAMAM zusammen mit Lipofectamine als das effektivste Vektorsystem für den gezielten zytosolischen RIG-I Transport ab. Diese rezeptorübergreifende Transfektionseffizienz konnte im PBMC-basierten System beobachtet werden und bleibt auch im Vollblut-basierten System erhalten.

Da diese Arbeit den Fokus auf eine 3pRNA basierte PAMAM-Dendrimer Therapie setzt, wurden die 3p-Dendriplexe in den direkten Vergleich mit 3p-Polyplexen (3p/PEI) und 3p-Lipoplexen (3p/Lipofectamine) gesetzt. Die leichte Überlegenheit, die die 3p-Lipoplexe zu den 3p-Dendriplexen im humanen zellbasierten System aufwiesen, konnte im murinen System, auf humanen PBMCs und auch im murinen Vollblut nicht mehr bestätigt werden. Hier erzielten die 3p-Lipoplexe vergleichbare Zytokininduktionen, oder waren den 3p-Dendriplexen sogar unterlegen. Auch die RIG-I Selektivität der 3pRNA Therapie konnte durch die Verwendung von Wildtyp und RIG-I-Knock-out Knochenmarksmakrophagen bewiesen werden.

6.2 Definierte Formulierungsbedingungen sind essentiell für eine effektive Stimulation der endosomalen und zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren TLR7, TLR8 und RIG-I

Dass das N/P Verhältnis im allgemeinen einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz besitzt, ist bekannt und wurde auch für RNA/PAMAM-Dendrimer Formulierungen schon publiziert^{299,303}. Allerdings zeigte der direkte Vergleich der endosomalen und zytosolischen Transfektionseffizienz durch PAMAM-Formulierungen in dieser Arbeit, dass das N/P Verhältnis nicht nur einen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme des Nanopartikels hat, sondern auch die finale Freisetzung am Wirkort bestimmt. Denn es konnte festgestellt werden, dass bei allen RNA-Liganden, die mit PAMAM-Dendrimeren formuliert wurden, ab einem N/P Verhältnis von 3 eine 100%ige Verkapselung der RNA in die PAMAM-Dendrimere eintritt (Abbildung 5-2). Bei dem zuvor definierten idealen N/P Verhältnis von 8 für die Herstellung der 3p-Dendriplexe, liegt die 3pRNA demnach zu 100% an PAMAM gebunden vor und es herrscht zudem noch ein Überschuss an PAMAM. Bei einem N/P Verhältnis von 2 allerdings, bei dem der effektivste endosomale Transfektion zu beobachten war, liegen noch ca. 20% der R3011 bzw. R2197 RNA ungebunden vor. Diese Resultate zeigen auf der einen Seite, dass das Bindungsvermögen von PAMAM unter den RNAs nicht variiert, jedoch scheint die komplette Verkapselung der RNA im Rahmen einer endosomalen Transfektion nicht entscheidend für den Transport in das Endosom bzw. für eine erfolgreiche Aktivierung der Rezeptoren dort zu sein.

Da es sich bei PAMAM-Dendrimeren um kationische Polymerverbindungen handelt, lag die

Annahme nahe, dass sich mit einer Veränderung des N/P Verhältnisses auch die Oberflächenladung der Dendriplexe ändern würde. Mit der Messung des Zetapotentials, welches das elektrische Potential der äußeren Abscherschicht eines bewegten Partikels beschreibt, kann neben der Oberflächenladung auch die elektrostatische Stabilität einer Suspension definiert werden, die ab $\pm 30\text{mV}$ als elektrostatisch stabil gilt. Das Zetapotential, welches nach der Herstellung der verschiedenen Dendriplexe in unterschiedlichen N/P Verhältnissen bestimmt wurde, zeigt bei den 3p-Dendriplexen einen typischen Verlauf der mit der zuvor bestimmten Verkapselungseffizienz einhergeht. Denn bei einem N/P Verhältnis, bei dem die anionische RNA noch im Überschuss vorliegt ($\text{N/P} < 3$), konnte ein negatives Zetapotential von ca. -20mV gemessen werden (Abbildung 5-2A). Bei einer Erhöhung des N/P Verhältnisses kommt es allerdings nicht langsam zum Anstieg des Potentials, sondern zu einem sprunghaften Übergang vom negativen in ein positives Potential bei N/P 3. Ab genau diesem N/P Verhältnis wurde auch die vollständige Verkapselung erreicht und ab genau diesem Punkt erkennt man eine anfängliche IFN α Produktion auf humanen PBMCs mit 3p-Dendriplexen. Eine weitere Konzentrationserhöhung des Dendrimers bewirkt noch eine weitere Erhöhung von $+20\text{mV}$ auf ca. $+40\text{mV}$ was die Aktivität der 3p-Dendriplexe weiter erhöht. Eine effektive zytosolische Transfektion und eine somit verbundene erfolgreiche Aktivierung von RIG-I, wird demnach durch die Verwendung von positiv geladenen 3p-Dendriplexen bedingt, die sich ab einem $\text{N/P} > 3$ bilden und bei N/P 8 aufgrund des stärkeren Oberflächenpotentials die maximale Effizienz besitzen.

Der Verlauf des Zetapotentials der R3011- und der R2197-Dendriplexe verläuft identisch, allerdings tritt hier am Potential-Umschlagspunkt bei N/P 3 der komplette Verlust der endosomalen Transfektionseffizienz ein, was sich in einer drastischen Verringerung der IFN α bzw. IL12p70 Induktion äußert (Abbildung 5-4B, C). Demzufolge wird eine effektive endosomale Transfektion und eine somit verbundene erfolgreiche Aktivierung von TLR7 und TLR8, durch die Verwendung von negativ geladenen Dendriplexen bedingt, die sich zwischen N/P 0,1 und 2 bilden.

Es ist zu erwähnen, dass mit einer Erhöhung des N/P Verhältnisses und der damit einhergehenden Konzentrationserhöhung der PAMAM-Dendrimere, auch die Anzahl der protonierbaren Amine steigt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass besonders die tertiären Amine, die sich im Inneren der Dendrimere befinden und einen pKs Wert von 3-4 besitzen, eine wichtige Rolle spielen. Denn sollte die viel diskutierte Hypothese des Protonen-Schwamm-Effektes (*Proton-sponge-effect*) stimmen, wird dieser besonders von den tertiären Aminen der PAMAM-Dendrimere bedingt. Diese liefern den PAMAM-Dendrimern eine hohe Pufferkapazität und bewirken, dass der von der Zelle initiierte Protoneneinstrom ins Endosom im Rahmen der endosomalen Reifung nicht die erwünschte Ansäuerung auslöst. Der dadurch kontinuierliche Einstrom von weiteren Protonen in das Endosom wird von einem gleichzeitigen Influx von Chlorid-Ionen und Wasser begleitet, was zur Steigerung des osmotischen Druckes innerhalb des Endosoms führt. Zusätzlich kommt es durch die Protonierung der Amine des Dendrimers zu einem Abstoßungsverhalten der positiv geladenen Aminogruppen, was zu einem Anschwellen des Dendrimers selber führt (*Umbrella-Effect*)³⁰⁴. Dadurch entsteht ein sehr hoher Druck, der zu einem enormen Anschwellen des Endosoms führt und letztendlich die endosomale Membran reißen lässt. Durch diesen Effekt

könnte dann der endosomale Inhalt in das Zytosol gelangen und somit auch die 3pRNA den hier lokalisierten RIG-I-Rezeptor erreichen und aktivieren. Für den Transport von 3pRNA scheint demnach der Einsatz höherer PAMAM-Konzentrationen vorteilhaft.

Bei Verwendung geringerer Konzentrationen der PAMAM-Dendrimere, die sich zur Komplexbildung der R3011 und R2197 Oligonukleotide als vorteilhaft herausgestellt haben, wären weniger tertiäre Amine vorhanden und somit auch die Pufferkapazität reduziert. Es ist zu vermuten, dass dadurch weniger Protonen in das Endosom gepumpt werden müssen um dessen Ansäuerung zu erzielen, und auch, dass die Abstoßungskräfte der protonierten Aminogruppen schwächer sind. Die somit ausbleibende Anschwellung würde dann auch nicht zum Platzen des Endosoms führen. Zwar wäre dadurch eine zytosolische Freisetzung unmöglich, jedoch für eine Transfektion von R3011 und R2197, die endosomale Zielrezeptoren haben, vorteilhaft. Hier ist zwar die endosomale Aufnahme der Dendriplexe erforderlich, jedoch könnte der Protonen-Schwamm-Effekt sich nachteilig auf die endosomale TLR-Aktivierung ausüben. Denn durch die Zerstörung des Endosoms würden auch die dort lokalisierten Rezeptoren zerstört und die transfizierten Oligonukleotide aus dem Endosom ins Zytoplasma freigesetzt werden, wo sie endosomalen TLRs zur Aktivierung nicht mehr zur Verfügung stehen.

Das würde erklären, warum ein geringes N/P Verhältnis von PAMAM-Dendrimern und RNA ausreicht um die endosomalen Rezeptoren zu erreichen, es aber nicht zur endosomalen Freisetzung kommt. Da das aber ein Erreichen der zytosolischen Rezeptoren voraussetzt, ist für die Transfektion von 3pRNA durch PAMAM-Dendrimere zur Aktivierung von RIG-I ein höheres N/P Verhältnis notwendig.

Zwar konnte zu Beginn dieser Arbeit gezeigt werden, dass PAMAM Dendrimere einen effektiven endosomalen und zytosolischen Transport verschiedener RNA Oligonukleotide ermöglichen, allerdings schien neben dem N/P Verhältnis auch die Verwendung unterschiedlicher Transfektionsmedien einen starken Einfluss auf die erzielte Effektivität der Dendriplexe zu haben. Im Hinblick auf eine potentielle spätere Anwendung der Dendriplexe *in vivo*, wurden verschiedene Infusions- und Pufferlösungen für die Herstellung der Dendriplexe verwendet. Natriumchlorid 0.9% (NaCl) ist eine isotonische Kochsalzlösung, dessen Osmolarität der des Blutplasmas entspricht. Sie dient als Ersatz für Wasser, Natrium und Chlorid und kann somit einerseits als Flüssigkeits- und Elektrolytersatz oder auch als Trägersubstanz für Arzneistoffe eingesetzt werden. Aufgrund ihrer Natrium- und Chlorid-Ionen-Konzentration von je 154mmol/l beschreibt NaCl 0.9% eine Elektrolytlösung. Als solche kann auch die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) bezeichnet werden, wobei PBS neben 137mM NaCl auch noch 2,78mM Kaliumchlorid und 12mM Gesamtphosphat (HPO_4^{2-} und H_2PO_4^-) enthält. PBS stellt damit auch eine isotonische Salzlösung dar, besitzt aber zusätzlich noch die Eigenschaft einer Pufferlösung im pH-Bereich von 7,4. Eine 5%ige Glucose-Lösung wird auch als Infusionslösung verwendet, jedoch nicht zur Zufuhr von Elektrolyten, sondern nur von Wasser und geringen Energiemengen. Bei der Herstellung von 3p-Dendriplexen in einer NaCl oder PBS-Lösung, erhält man Formulierungen, die hoch effektiv eine Stimulation von RIG-I bewirken. Tauscht man allerdings die Lösungen gegen eine 5%ige Glucose-

Lösung aus, so erzielen diese Nanopartikel eine geringere Induktion von IFN α und schlussfolgernd daraus auch eine ineffektivere Stimulation von RIG-I. Identisch dazu verläuft die Stimulation mit R2197-Dendriplexen zur Aktivierung von TLR8. Genau das umgekehrte Bild ist bei den Formulierungen der TLR7-Liganden der Fall. Hier ist die 5%ige Glucose das Medium der Wahl für die Formulierung der effektivsten R3011-Dendriplexe zur Stimulation von TLR7. Da gerade die Verwendung der Glucose-Lösung zu anderen Ergebnissen führte als NaCl oder PBS, konnte vermutet werden, dass die in der Transfektionslösung enthaltenen Elektrolyte einen Einfluss auf die Partikelbildung und damit auch auf die resultierende Effektivität dieser haben. Die Evaluation der Partikelgröße zeigte, dass nahezu unabhängig vom N/P Verhältnis und auch unabhängig von der eingesetzten RNA, sich unter Verwendung von NaCl oder PBS sehr große „Mikro“-Partikel bildeten (ca. 900 – 1500nm), wohingegen die in Glucose formulierten Partikel mit ca. 50-100nm deutlich kleiner waren (Abbildung 5-3). Diese Beobachtung in einer solchen kolloidalen Suspension ließe sich durch die DLVO-Theorie erklären, die die attraktiven sowie die repulsiven Wechselwirkungen der dispergierten Partikel getrennt betrachtet und dann eine Gesamtwechselwirkung berechnet. Durch die Oberflächenladung der Partikel bildet sich eine starre Schicht (Stern-Schicht) direkt um das Partikel aus, welche das Nernstpotential definiert. Durch die in der Lösung frei beweglichen Gegenionen, schließt sich an diese starre Schicht eine diffuse Doppelschicht an, die exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche abnimmt. Nähert sich demnach ein Partikel einem Anderen, so erfährt dieses im sekundären Minimum zunächst schwache Anziehungskräfte und die Doppelschichten der Partikel überlagern sich. Dadurch bildet sich eine Art Barriere aus, die eine weitere Anziehung verhindert (Abbildung 6-1). Diese Doppelschichtdicke, und damit die Barriere, kann durch die Zugabe von Elektrolyten jedoch vermindert werden und dadurch auch die elektrostatische Abstoßung der beiden Partikel. Diese Tatsache führt zur Anlagerung einzelner Partikeln, die dann als größere Partikel detektiert werden, was sich auch der Bildung leicht trüber Ansätze zeigte. Eine Agglomeration oder sogar Flockung der Suspension wurde aber nicht

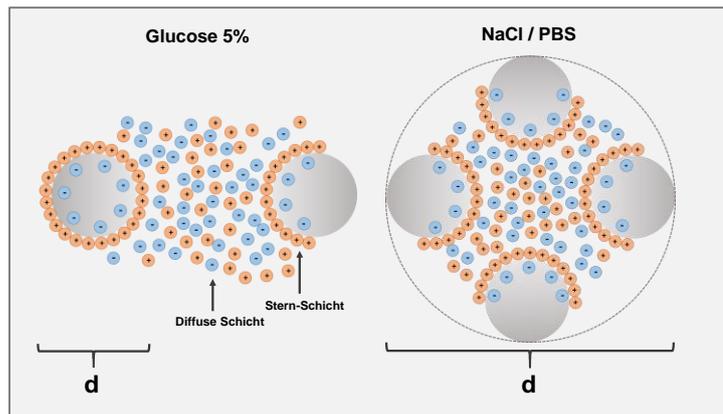


Abbildung 6-1: Partikelverhalten in unterschiedlichen Medien nach der DLVO-Theorie

festgestellt. Das wurde auch durch die Bestimmung der Polydispersität (Pdl) bestätigt, die die Breite der Größenverteilung beschreibt und bei monodispersen Verteilungen einen Wert von $< 0,25$ besitzt. Alle RNA-Dendriplexe, die in NaCl und besonders in PBS hergestellt wurden, wiesen zwar μm -Größen auf, besaßen aber mit einem Pdl, der meistens unter 0,1 lag, einen hochmonodispersen Charakter. Demnach scheinen sich die einzelnen Dendriplex-Partikel homogen zu größeren Partikeln zusammen zu lagern. Erst in höheren N/P Verhältnissen ging diese Monodispersität verloren und es kam teilweise auch zu einer sichtbaren Agglomeration. Die

RNA-Dendriplexe, die in einer Glucose-Lösung formuliert wurden, waren mit ihren Partikelgrößen < 100nm zwar deutlich kleiner, besaßen aber auch leicht schlechtere Polydispersitäten um die 0,25 lagen.

Die Analyse der Partikel ergab demnach, dass man durch den Einsatz verschiedener Medien die Möglichkeit besitzt Dendriplexe verschiedener Größen herzustellen, die in ihren effektivsten N/P Verhältnissen (3pRNA N/P=8 und R3011/R2197 N/P=2) einen monodispersen Charakter besitzen. Durch den Einsatz der unterschiedlichen Medien konnte zudem gezeigt werden, dass „große“ 3p-Dendriplexe und „kleine“ R3011-Dendriplexe zu der effektivsten Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren führten, was bedeutet, dass die Komplexgröße mit der TLR7 bzw. RIG-I Aktivierung korreliert.

6.3 Die Größe der Dendriplexe beeinflusst dessen Aufnahme in unterschiedliche Immunzellsubtypen

Nachdem auch die Analyse der mRNA Expression nach Stimulation humaner PBMCs den Einfluss der Partikelgröße auf die Stimulationseffizienz bestätigte, stellte sich die Frage, ob eventuell die einzelnen Zellsubpopulationen innerhalb der PBMCs die Aufnahme unterschiedlicher Größen favorisieren und damit auch zu einer unterschiedlichen Zytokin-Expression führen. Denn da die Aktivierung des endosomalen TLR8-Rezeptors auch durch die Verwendung der Makro-R2197-Dendriplexe effektiver war, schien es hier nicht die Lokalisation des Rezeptors innerhalb der Zelle zu sein, die hier die entscheidende Rolle spielt.

PBMCs stellen die Gesamtheit aller einkernigen Zellen des Bluts dar und bestehen demnach aus ungefähr 70-90% Lymphozyten (T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen), 10-30% Monozyten und nur etwa 0,5 – 1% dendritischer Zellen. Von all diesen Zellen exprimieren nur pDCs und B-Zellen TLR7, wobei TLR8 in Monozyten, Makrophagen und mDCs zu finden ist^{305,306}. RIG-I ist zwar ubiquitär exprimiert, scheint aber in pDCs eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit dem *Newcastle disease* Virus, dessen RNA ein hochpotenter RIG-I Ligand ist, pDCs nicht die Hauptquelle der IFN α Produktion sind³⁰⁷.

Da eine Aktivierung von TLR7 in pDCs zur Produktion großer Mengen IFN α führt^{30,31,281} und Monozyten und Makrophagen nach einer TLR8 bzw. RIG-I Aktivierung mit einer Produktion von TNF α (TLR8 & RIG-I), IL12p70 (TLR8)

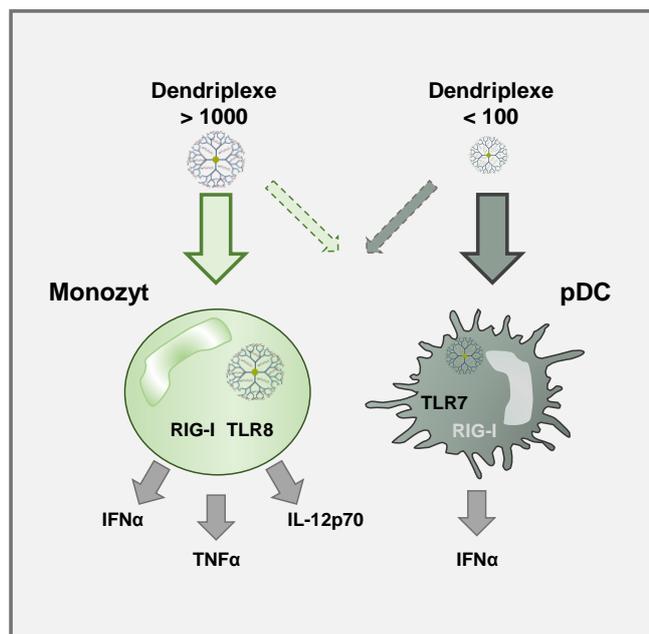


Abbildung 6-2: Schematische Darstellung der Dendriplex-Aufnahme durch Monozyten und pDCs.

und IFN α (RIG-I) antworten^{30,52}, wurden diese Zellpopulationen auf ihre Vorlieben für Makro- bzw. Nano-Dendriplexe hin untersucht. Es zeichnete sich bei den Monozyten ein ähnliches Bild ab, wie auch schon bei den PBMCs. Im Falle von 3p- und den R2197-Dendriplexen führten die größeren Partikel zu einer höheren Produktion von TNF α , und im Falle von TLR8 auch von IL-12p70, und somit auch zu einer stärkeren Aktivierung von RIG-I und TLR8 im Gegensatz zu den kleineren Dendriplexen. Da im Falle der Aktivierung der pDCs durch die TLR7-Liganden das genau umgekehrte Bild entstand, da hier die kleinen in Glucose hergestellten Nano-Dendriplexe die effektivste IFN α Produktion bewirkten, lässt sich daraus vermuten, dass Monozyten größere Partikel im Größenbereich von 1000nm und pDCs Nanopartikel <100nm bevorzugt aufnehmen (Abbildung 6-2).

Durch die Erkenntnisse, dass Glucose als Transfektionsmedium die Bildung kleinerer Partikel ermöglicht als andere oft verwendete Elektrolytlösungen wie NaCl oder PBS, ergab sich die Frage, ob nicht auch andere Transfektionsreagenzien in einer 5%igen Glucose-Lösung zur Bildung kleinerer Partikel befähigt sind. Dazu wurden 3pRNA oder R3011 in Glucose mit Lipofectamine, Dotap, Protamin oder PAMAM komplexiert. Es zeigte sich, dass die Partikelgröße der Komplexe im Falle von Lipofectamine von 1500-2000nm (Abbildung 5-5E) auf ca. 100nm reduziert werden konnte. Mit dieser Größe war auch Lipofectamine in der Lage den TLR7 Liganden R3011 zu transfizieren, was zuvor unmöglich war. Und auch hier zeigte sich, wie auch schon bei den Dendriplexen, dass die Verwendung der kleineren 3p-Partikel die Transfektionseffizienz im Rahmen einer RIG-I Aktivierung verschlechterte. Auch die mit Dotap hergestellten Komplexe nahmen deutlich an Größe ab, jedoch von ca. 1200-1000nm nur bis zu einer Partikelgröße von ca. 400-500nm. Interessanterweise zeigten aber auch diese Komplexe eine schlechte Aktivierung von TLR7 und eine bessere Aktivierung von RIG-I. Folglich bedeutet das, dass die Partikelgröße, ab der pDC effektiver aktiviert werden, unter einer Größe von 400-500nm liegt.

Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit nur durch die Verwendung verschiedener Transfektionsmedien unterschiedliche Komplexgrößen zu generieren und damit bestimmte Zellen und Rezeptoren gezielt aktivieren zu können.

6.4 Nano-3p-Dendriplexe aktivieren RIG-I in humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen

Bei der Stimulation der humanen pDCs zeigte sich neben der hohen Induktion von IFN α durch die R3011-Nano-Dendriplexe auch ein Zytokin-Signal, wenn die Zellen mit den in Glucose hergestellten 3p-Dendriplexen stimuliert wurden. Auch wenn dieses Signal deutlich schwächer war, als das der R3011-Dendriplexe, zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Makro-3p-Dendriplexen. Studien postulieren, dass RIG-I in pDCs eher eine untergeordnete Rolle spielt³⁰⁷ und nach einer TLR-Vorstimulation überhaupt erst hochreguliert wird²⁷⁹. Das Ergebnis dieser Arbeit lässt vermuten, dass in diesen Studien ein Transfektionsartefakt die Ergebnisse verzerren könnte und vielmehr die verwendete Größe der Transfektionskomplexe die entscheidende Rolle spielt, ob mit einem Oligonukleotid-Liganden für RIG-I eine Aktivierung in

pDCs ausgelöst werden kann, als dass der Signalweg per se in diesen Zellen nicht aktiv wäre. Auch andere Transfektionsreagenzien wie die kationischen Lipide Lipofectamine2000 (LF2000) oder Dotap haben in Studien schon eine effektive 3pRNA-Transfektion zeigen können^{72,291}. In dieser Arbeit konnte aber im direkten Vergleich mit den Nano-3p-Dendriplexen gezeigt werden, dass diese alternativen Transfektionsmethoden nach Stimulation der humane pDCs keine Induktion von IFN α und somit auch keine Aktivierung von RIG-I bewirken. Nach Bestimmung der Partikelgröße zeigte sich aber, dass diese 3p-Lipoplexe auch Größen von über 1500nm aufwiesen, was zu unserer Hypothese passen würden, dass diese Partikel auch nicht favorisiert von pDCs aufgenommen werden.

Dass der stimulatorische Effekt der Nano-3p-Dendriplexe in pDCs auch wirklich RIG-I vermittelt ist, konnte durch die Anwendung von Chloroquin und einem selektiven RIG-I Liganden bewiesen werden. Denn durch die Behandlung der Zellen mit Chloroquin kommt es zu einer Hemmung der endosomalen Ansäuerung und damit zu einer Unterdrückung der endosomalen Rezeptorfunktionalität³⁰⁸. Da die IFN α Induktion auch bei den Chloroquin-behandelten pDCs zu detektieren war, kann eine TLR7 Beteiligung ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnte die Verwendung eines selektiven RIG-I Liganden (3p-select-24) diese Beobachtung bestätigen. Diese 3p-dsRNA, besitzt einen hochmodifizierten sense Strang, der eine Erkennung über die Toll-like Rezeptoren 7 und 8 gänzlich verhindert (unpublizierte Daten). Letztendlich sprechen auch unsere erhobenen N/P Verhältnis-Experimente dagegen, die eine Stimulation von endosomalen Rezeptoren bei N/P 8 hergestellten Dendriplexen gar nicht erlauben.

Die Möglichkeit, mit diesen 3p- Nano-Dendriplexen RIG-I auch pDCs stimulieren zu können, bietet einen hohen immunologischen Vorteil. Denn durch die Stimulation von dendritischen Zellen kommt es zu einer schnellen Zytokin-vermittelten Translokation der DCs in die drainierenden Lymphknoten, wo sie als antigen-präsentierende Zellen in der Lage sind Kontakt zu antigen-spezifischen T-Lymphozyten aufzunehmen und somit eine adaptive Immunantwort auszulösen^{309,310}. Damit wäre man in der Lage mit 3p-Dendriplexen sowohl Monozyten als auch pDCs zu stimulieren, was gegenüber einer reinen Monozytenstimulation einen therapeutischen Vorteil bedeuten könnte.

6.5 Im humanen wie auch im murinen System stellen PAMAM-Dendrimere ein hochpotentes Vektorsystem dar

Im Hinblick auf die Applikation der Dendriplexe *in vivo* wurde in dieser Arbeit auch ein Stimulationsversuch von humanem und murinem Vollblut durchgeführt, der eine hoch-präzise Prognose über die Zytokin-Induktion nach systemischer Applikation liefert²⁸⁶. Im humanen Vollblut konnten durch die Verwendung von PAMAM-Dendrimern sowohl die Liganden der endosomalen Rezeptoren TLR7, TLR8 und TLR9 als auch 3pRNA zur Stimulation des zytosolischen Rezeptor RIG-I transfiziert werden, was durch die Zytokindetektion im Überstand des Vollbluts nachweisbar war (Abbildung 5-6C). Diese Daten zeigen, dass die rezeptorübergreifende Wirkung der PAMAM - Dendrimere als Vektorsystem verschiedener RNA und DNA Liganden höchstwahrscheinlich auch *in*

in vivo nicht verloren geht. Daneben zeigte auch der direkte Vergleich mit 3p-Polyplexen und 3p-Lipoplexen, dass 3p-Dendriplexe zu einer signifikant höheren Induktion von CXCL-10 (IP-10) führen, jedoch die 3p-Lipoplexe in der Induktion von IFN α dominieren. Dieses gegenläufige *in vitro* Zytokin-Bild zeigte sich immer wieder im Verlauf dieser Arbeit. Da CXCL-10 ein Interferon-assoziiertes Chemokin darstellt, ist es verwunderlich, dass einer so starken Induktion von CXCL-10 nicht auch eine starke Induktion von IFN α vorangeschaltet ist. Denn Interferone (Type I und III) induzieren die Produktion von CXCL-10 durch die auto- und parakrine Aktivierung von antiviralen und proinflammatorischen Signalwegen. So würde das durch die RIG-I Aktivierung ausgeschüttete IFN α an seinen Interferon-Rezeptor binden (IFNR1/IFNR2) und durch die damit einhergehende Aktivierung von Janus Kinasen und verschiedenen STAT Proteinen zur Induktion von Interferon-stimulierenden Genen (ISGs) führen, was eine Produktion von CXCL-10 einleitet. Allerdings konnte eine Studie an Hepatozyten zeigen, dass eine CXCL-10 Produktion auch IFN α -unabhängig induziert werden kann^{311,312}, was auch in dieser Arbeit die hohe CXCL-10 Produktion durch 3p-Dendriplexe erklären würde. Allerdings bleibt dann immer noch die Frage, warum diese IFN-unabhängige Stimulation durch die 3p-Lipoplexe scheinbar unterbleibt. Diese Fragestellung soll in Experimenten anschließend an diese Arbeit weiter untersucht werden.

Die dann folgende Stimulation von murinen PBMCs und murinem Vollblut zeigte zudem eine spezie-übergreifende Wirkung der 3p-Dendriplexe und durch die Verwendung von Knochenmarks-Makrophagen, die aus Wild-Typ oder RIG- knock-out Mäusen generiert wurden, konnte auch hier in diesem System die RIG-I selektive Wirkung bewiesen werden (Abbildung 5-7).

Die folgende Behandlung verschiedener humaner und muriner Tumorzellen lag in dem Wissen begründet, das RIG-I als ubiquitärer Rezeptor auch in Tumorzelllinien exprimiert ist und schon in mehreren Studien als Target für antitumorale Immuntherapien verwendet wurde^{137,298}. Diese Studien nutzen zum Teil die immunologische Wirkung der nicht-malignen Zellen zur Einleitung einer effektiven Immunantwort gegen den Tumor aus. Zum anderen aber auch die Erkenntnis, dass die Aktivierung von RIG-I einen IFN-unabhängigen proapoptotischen Signalweg initiiert, der abhängig von den BH3-only Proteinen PUMA und NOXA ist, jedoch keine Abhängigkeit zu p53 aufweist⁸⁸. Dieser proapoptotische Signalweg wird auch in nicht-malignen Zellen nach einer RIG-I Aktivierung eingeleitet, ist jedoch hier deutlich weniger sensitiv⁸⁸.

Da diese RIG-I spezifischen Fähigkeiten auch eine potentielle antitumorale Therapie mit 3p-Dendriplexen interessant erscheinen lassen, stellte sich zunächst die Frage nach der Responsivität humaner und muriner Tumorzellen auf eine PAMAM-basierte 3pRNA Stimulation. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in humanen monozytären THP-1 und D04-Melanomzellen, sowie auch in murinen Melanom- (B16/HCmel12) und Hepatomzellen (Hepa129) nach einer 3p-Dendriplex-Stimulation die mRNA-Expression von CXCL10 (IP10) und RIG-I aufreguliert wurde, und demzufolge auch eine Sezernierung von IP-10 im Überstand der Zellen detektiert werden konnte. Daneben zeigte die mRNA Expression der proapoptotischen Proteine NOXA und PUMA, dass auch die Initiation des Apoptosesignalweges durch die 3p-Dendriplexe eingeleitet werden kann. Dass diese aufregulierten Proteine tatsächlich ein Zeichen für eine eintretende Apoptose der Tumorzellen sind, konnte im nachfolgenden Experimente belegt werden, in dem nach 48h

Stimulation die Quantität an apoptotischen Zellen bestimmt wurde. Die Apoptose beschreibt den genetisch programmierten Zelltod, womit ein aktiv induziertes Absterben der Zelle verstanden werden kann, welches ohne Beeinflussung benachbarter Strukturen ausgelöst wird³¹³. Da diese Form des Zelltodes physiologisch sinnvoll ist, wird er auch streng reguliert. Die Tatsache, dass die Regulation der Apoptose von der Zelle selber gesteuert wird, verhindert eine willkürliche Zellvermehrung. Die abgestorbenen Zellen können im Anschluss sicher und schnell von phagozytosebefähigten Zellen beseitigt werden.

Im Rahmen einer immunstimulatorischen Therapie ist eine Abgrenzung der Apoptose zur passiv und unkontrolliert ablaufenden Nekrose von besonderem Interesse. Denn eine 3pRNA Therapie soll nicht auf Grund eines toxischen Einflusses des Transfektionsreagenz eine Nekrose der Tumorzelle auslösen, sondern durch Aktivierung von RIG-I den proapoptotischen Signalweg induzieren, welche die Tumorzelle in die Apoptose treibt. Die Untersuchung der verschiedenen 3p-Ansätze zeigte, dass 3p-Dendriplexe sowohl in humanen als auch in murinen Melanomzellen die effektivste Apoptoseinduktion initiieren konnte. Allein eine Behandlung mit polyI:C/PEI zur Aktivierung von MDA5 war der 3p-Dendriplex Therapie in diesem Punkt überlegen. Neben den Melanomzellen konnte diese Apoptose-Induktion durch 3p-Dendriplexe auch in murinen Hepatomazellen nachgewiesen werden. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse zusammen mit der erfolgreichen Stimulation im Vollblut-Modell vermuten, dass eine Dendrimer-basierte 3pRNA Applikation auch *in vivo* erfolgreich sein könnte und dessen Einsatz in Tumorindikationen sinnvoll erscheint.

6.6 3p-Dendriplexe inhibieren das Tumorstadium im murinen Melanom- und hepatozellulären Karzinom Modell

Um auch im *in vivo* Modell den Einfluss der verschiedenen Transfektionsmedia und der damit einhergehenden unterschiedlichen Partikelgrößen zu vergleichen, wurden in dieser Arbeit zunächst gesunden Mäusen die Nano-3p- bzw. Mikro-3p-Dendriplexe intravenös verabreicht und die Zytokininduktion nach bestimmten Zeitintervallen im Blut der Tiere bestimmt. Dabei zeigte sich kontrovers zu den *in vitro* Ergebnissen, dass die in 5% Glucose hergestellten kleineren 3p-Dendriplexe (<100nm), die effektivste Dendriplex-Formulierung darstellte. Diese Beobachtung könnte eventuell in einer höheren Stabilität der Glucose-Partikel begründet liegen, die im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigt wurde. Neben der Identifikation der Glucose basierten Konditionen als idealste *in vivo* Formulierung der 3p-Dendriplexe wurde eine Menge von 20µg RNA pro Applikation als effektivste intravenöse Dosis ermittelt. Die Behandlung gesunder Mäuse unter diesen Formulierungsbedingungen führte neben IFN α auch zur signifikanten Induktion des Chemokins CXCL-10 und Tumornekrosefaktor α (TNF α). TNF α gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen und besitzt mehrere biologische Effekte. Somit kann TNF α zur Initiation einer lokalen Entzündungsreaktion führen, einen septischen Schock auslösen oder Fieber erzeugen^{84,85,314}. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass eine Behandlung mit TNF α *in vitro* und *in vivo* eine antitumorale Wirkung besitzt^{315,316}. Interleukin 6 (IL-6) welches auch ein proinflammatorisches Zytokin darstellt, war zwar detektierbar, jedoch nur in sehr niedrigen Mengen.

Einen weiteren Beweis für eine erfolgreiche Aktivierung von RIG-I *in vivo* lieferte das daran folgende IFN β -Luciferase Experiment. Bei den hier eingesetzten IFN β -Luciferase Reporter Mäusen wurde ein Luciferase-Gen hinter den IFN β -Promotor in das Genom intrigiert²⁸⁷. Wird in diesen Mäusen die Induktion von IFN β initiiert, kommt es zeitgleich zu einer Expression von Luciferase, dessen Intensität proportional zur IFN β Produktion steht. Da das überwiegende Signal in Brust- und oberem Bauchraum der Mäuse zu detektieren war, schienen Lunge und Leber die Organe darzustellen, in die die 3p-Dendriplexe hauptsächlich distribuieren. Eine darauffolgende CXCL-10 und RIG-I mRNA Analyse von Organgewebsproben lieferte das gleiche Ergebnis. Damit stellen für eine Therapie Leber und Lunge attraktive Zielorgane dar. Denn es scheint, dass 3p-Dendriplexe auch ohne Targeting-Modifikationen effektiv ins hepatische und pulmonale Gewebe infiltrieren und dort eine Aktivierung von RIG-I bewirken können.

Das hauptsächlich durch Leberzirrhose oder Virushepatitiden verursachte hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt therapeutisch gesehen immer noch eine große Herausforderung dar. Denn die herkömmliche Zytostatika Therapie zeigte bisher keine signifikante Verbesserung der mittleren Überlebenszeit^{317,318}. Als einzig wirksame pharmakologische Behandlung hat sich bisher der Tyrosinkinasehemmer Sorafenib erwiesen^{319,320}. In den letzten Jahren zeigten immer mehr Studien, dass auch ein immuntherapeutischer Ansatz zur Behandlung des HCC sinnvoll und effektiv scheint^{288,321}. Und auch der immuntherapeutische Effekt unserer intravenös applizierten 3p-Dendriplex-Therapie im orthotopen HCC-Modell zeigte einen erfolgreichen Effekt, der sich in einer signifikanten Überlebensverlängerung äußerte. Das daran anschließende B16-Lungenmetastasen Modell sollte untersuchen, ob die 3p-Dendriplexe den gewünschten immunologischen Effekt auch in der Lunge erzielen konnten. Nach der ersten intravenösen Applikation der 3p-Dendriplexe kam es zunächst neben einer signifikanten Steigerung der NK-Zellen, auch zu deren Aktivierung. Dies war von besonderem Interesse, denn es ist bekannt, dass NK-Zellen als wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems die Fähigkeit besitzen, infizierte oder auch transformierte Zellen zu töten^{322,323}. Außerdem haben NK-Zellen speziell auf die 3pRNA induzierte antitumorale Wirkung im B16 Modell einen großen Einfluss. Denn durch die Depletion der NK-Zellen kommt es auch zu einer Verschlechterung der Tumorregression im subkutanen B16-Modell (van den Boorn et al.; unpublizierte Daten). Neben den NK-Zellen bewiesen insbesondere auch die isolierten Lungen und die darin deutlich reduzierte Anzahl an Lungenmetastasen, den hohen antitumoralen Effekt der 3p-Dendriplexe. Es zeigte sich ein Partikelgrößen-abhängiger Effekt. So zeigten die Nano-3p-Dendriplexe einen stärkeren antitumoralen Effekt als die Mikro-3p-Dendriplexe. Dieser größenabhängige Effekt konnte auch durch die Applikation unterschiedlich großer 3p-Polyplexe bestätigt werden. Daneben führte auch die intravenöse Behandlung von subkutan B16 Tumor tragenden Mäusen im Falle der Nano-3p-Dendriplexen zu einer stärkeren Tumorregression und demzufolge zu einem längeren Überleben, als die Therapie mit Mikro-3p-Dendriplexen. Es scheint, als ob die Nanopartikel ein größeres Potential besitzen sich im Tumorgewebe anzureichern und dann dort einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Dieses Phänomen der passiven Anreicherung von Nanopartikeln im Tumorgewebe ließe sich anhand des EPR-Effektes (*Enhanced Permeability and Retention*) erklären. Denn im Tumorgewebe herrscht

eine gesteigerte Vaskularisierung und erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße, was eine automatische Aufnahme von Nanopartikeln bedingt^{324,325}. Diese Hyperpermeabilität im Tumorgewebe basiert hauptsächlich auf der Tatsache, dass sich zwischen den Endothelzellen, die den Tumor umschließen, und der Gefäßwand der Tumorzellen große interzelluläre Öffnungen von mehreren hundert Nanometern ausbilden, die in normalen Gefäßwand Öffnungen nie erreicht werden³²⁶. Basierend auf dieser Theorie scheint die Aufnahme der Nano-3p-Dendriplexe ins Tumorgewebe wahrscheinlicher. Um dies näher zu untersuchen, wurde in einem folgenden Experiment der subkutane Tumor nach der Applikation von Nano-3p-Dendriplexe und Mikro-3p-Dendriplexe isoliert. Die Untersuchung des Tumorgewebes ergab, dass die mRNA Expression des RIG-I induzierten Chemokins CXCL-10 durch die kleinen Nano-3p-Dendriplexe stärker aufreguliert werden konnte als durch die Mikro-3p-Dendriplexe. Daneben zeigte auch die

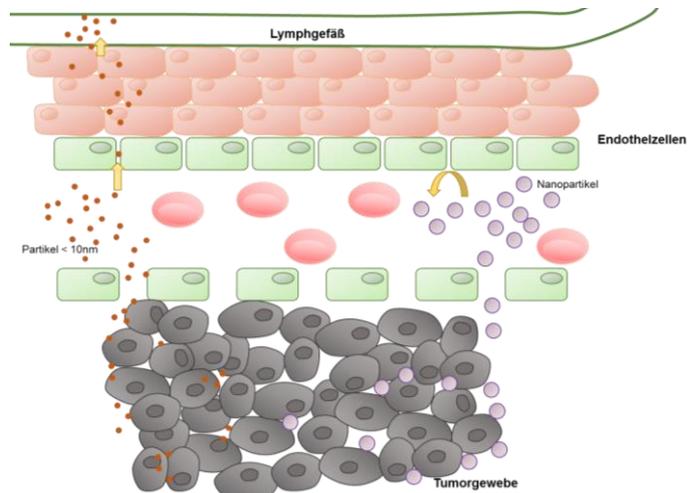


Abbildung 6-3: Schematische Darstellung des EPR-Effektes.

NK-Analyse in den drainierenden Lymphknoten, dass die Nano-3p-Partikel einerseits die Anzahl signifikanter erhöhten, aber auch die Aktivierung der NK-Zellen stärker induzierten. Der EPR-Effekt könnte diese Ergebnisse erklären, allerdings kann das wirkliche Vorhandensein der Dendriplexe im Tumorgewebe nicht bewiesen werden. Auch wenn die stärkeren phänotypischen Ergebnisse vermuten lassen, dass kleinere 3p-Dendriplexe stärker in das Tumorgebiet infiltrieren als größere, könnten die Effekte auch peripher erzielt worden sein. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Partikelgröße der Dendriplexe auch hier einen entscheidenden Einfluss auf die Immuninduktion und die antitumorale Wirkung besitzt.

Da die subkutane Applikation von 3p-Dendriplexen in IFN β -Luciferase Reporter-mäusen zu einer lokalen Zytokininduktion führte, die sich nicht systemisch ausbreitete, stellte sich die Frage, ob 3p-Dendriplexe ihren antitumoralen Effekt auch nach intratumoralen Gabe induzieren. Diese Art der therapeutischen Applikation ist im subkutanen B16-Melanom leicht durchzuführen und erhöht deutlich die im Tumor vorhandene 3pRNA Quantität, da die RNA sofort am Wirkort zur Verfügung steht. In einem intratumoralen Titrationsexperiment zeigte sich eine 3p-Dendriplex dosisabhängige Tumorregression, die in der mittleren und höchsten Dosis sogar jeweils in 40% der Mäuse zu einem tumorfreien Überleben führte. Da 80% der tumorfreien Tiere auch nach erneuter Reprovokation mit B16 Melanomzellen und ohne therapeutische Behandlung kein Rezidiv entwickelten, beweist zum einen das hohe antitumorale Potential der 3p-Dendriplexe und lässt vermuten, dass sich durch eine solche immunbasierte Tumorthherapie T-Gedächtniszellen ausbilden, die vor einer erneuten Infektion schützen.

Auch die effiziente Tumorregression durch die intratumorale Behandlung mit 3p-Dendriplexen

eines nicht-orthotopen HCC führte zu einem 50%igen tumorfreien Überleben. Hier konnten jedoch sogar 100% der reprovozierten Tiere ein erneutes Tumorwachstum verhindern, was die Hypothese der Bildung von T-Gedächtniszellen weiter unterstützt.

6.7 Die subkutane Applikation von 3p-Dendriplexen führt nur am Injektionsgebiet zu mikroskopischen Auffälligkeiten

Das 3pRNA ein enormes therapeutisches Potential als antitumorale Behandlungsform im Melanom und HCC besitzt, konnte hier in dieser Arbeit gezeigt werden, und wird durch andere Studien in weiteren Tumorentitäten bestätigt^{88,298,327}. Allerdings basiert die Effektivität der 3pRNA zu einem großen Teil auch auf der Effektivität des Transportsystems. Diese Effektivität setzt sich einerseits aus dem Schutz der RNA und dem effektiven Transport in die Zielzelle zusammen, andererseits spielt aber auch die Toxizität des Transfektionssystems eine sehr entscheidene Rolle. Denn viele Studien konnten bisher zeigen, dass im Rahmen einer RNA-basierten Therapie der Grat zwischen zu geringer Effektivität und zu hoher Toxizität eine große Herausforderung für den Transfektionsvektor darstellt^{328,329}. Da RNA alleine leicht von endogenen RNasen verdaut werden kann und aufgrund der starken negativen Eigenladung auch nicht in die Zelle und so auch nicht zu ihrem Zielrezeptor gelangen könnte, ist die Verwendung eines Nanotransporters fast essentiell geworden. Bisherige *in vivo* Studien, die sich eine RIG-I Aktivierung im Rahmen einer antitumoralen oder antiviralen Therapie zu Nutze gemacht haben, nutzten bisher nur das lineare Polyethylenimin als Trägermaterial^{137,298,330}. Da der Transport von 3pRNA durch PAMAM-Dendrimere in dieser Arbeit zu ersten Mal im Fokus stand, wurde in der Effektivität, aber auch in den Toxizitätsuntersuchungen oft der Vergleich zwischen PAMAM und PEI gezogen. Während der subkutanen und intratumoralen Behandlung fiel dabei auf, dass nach mehrmaliger Applikation die Injektionsstelle der PEI-behandelten Tiere leichte Zeichen einer Entzündung zeigten. So konnten leichte Rötungen an der injizierten Stelle festgestellt werden, die sich im Falle einer Tumorbehandlung auch zum Teil öffneten und leicht sekretierten. Auch wenn diese Entzündungen sich in keinem Fall weiter entzündeten und in allen Fällen wieder komplett verheilten, war diese Beobachtung nur nach einer 3p-Polyplex Anwendung zu sehen und nicht nach Injektionen mit 3p-Dendriplexen. Gerade im Rahmen einer antitumoralen Behandlung, wo der Zelltod der Tumorzellen eine Effektivität beschreibt, ist es von enormer Bedeutung diese beabsichtigte Effektivität von der unbeabsichtigten Toxizität zu unterscheiden. In *in vitro* Versuchen auf nicht malignen Zellen zeigte sich, dass das lineare Polymer besonders in höheren Konzentrationen eine ausgeprägte Toxizität besitzt, die sich in einer verringerten Zellvitalität und in einer erhöhten Apoptoseneigung widerspiegelt. Um die *in vivo* Relevant in diesem Punkt näher analysieren zu können, wurden verschiedene Organe und die Injektionsstelle der Mäuse entnommen, nachdem diese mehrmalig subkutan behandelt wurden. Da alle Mäuse über die gesamte Behandlungszeit nicht an Körpergewicht verloren, kann man generell von einem guten Wohlbefinden der Mäuse und von einer guten Therapieverträglichkeit sprechen. Die Analyse der Organe zeigte zudem keinerlei Auffälligkeiten in Herz, Niere und Milz. In der Lunge beider 3pRNA therapierten Tiere konnten

einige neutrophile Granulozyten beobachtet werden, die aber in diesem geringen Ausmaß als minimales und reversibles Infektzeichen (Pneumonie) definiert werden können. Dass die Transfektion mit dem linearen PEI zu leicht stärkere Auffälligkeiten führte, war in den ctrlRNA/PEI Tieren zu erkennen, die zum Teil ein interstitielles lymphozytäres Infiltrat mit vereinzelt neutrophile Granulozyten zeigten, was entweder aus einem pneumonisch oder einem pneumonitisch (chemisch) bedingten länger andauernder Reizzustand resultiert. Da durch einen solchen Zustand reversible Lungenfunktionsstörungen aber auch die Entwicklung einer irreversiblen, interstitieller Fibrose, resultieren können, beschreibt PAMAM in diesem Bereich das unbedenklichere Transfektionsmittel. Bei der Analyse der Injektionsstelle fiel auf, dass durch den Einstechvorgang alleine (Medium) schon ein geringes chronisches Entzündungsinfiltrat der Subkutis zu sehen war, welches im Falle einer therapeutischen Behandlung leicht ausgeprägter vorlag und auch intramuskulär zu finden war. Diese Anzeichen lassen auf einen mehrere Tage zurückliegenden (hier vermutlich chemischer) Reiz schließen, der mit Zelluntergang und chemotaktischer Entzündungszell-Rekrutierung einhergegangen sein könnte. Im Falle einer ausbleibenden Abszess-Bildung wäre dieser Zustand aber ohne Narbenausbildung reversibel. Diese Ergebnisse zeigen zwar leichte nicht-physiologische Veränderungen nach Applikation der beiden 3pRNA Formulierungen, stellen aber aufgrund der Reversibilität und der leichten Vorteile zu den Polyethylenimininen keine Bedenken für den Einsatz der 3p-Dendrimere für die subkutane Behandlung dar. Um auch den therapeutischen Einsatz der 3p-Dendriplexe für die intravenöse Applikation sicherzustellen, soll nach dieser Arbeit eine vergleichbare histopathologische Organanalyse nach systemischer Gabe erfolgen.

6.8 3p-Dendriplexe: Potentieller Kandidat für die klinische Anwendung?

Einen RIG-I Liganden therapeutisch einsetzen zu können, würde eine vielversprechende neue Therapieoption im Rahmen von diversen Tumorerkrankungen und Infektionskrankheiten sein. Das durch RIG-I endogen induzierte Typ-I Interferon stellt einen wichtigen Teil der RIG-I induzierten Wirkung dar. Denn IFN α wird schon lange zur Behandlung der chronischen Hepatitis-B und -C oder auch in mehreren Tumorentitäten, wie bei T-Zell-Lymphomen, dem Kaposi-Sarkom, bei Haarzelleukämie und auch im malignen Melanom erfolgreich eingesetzt³³¹⁻³³⁴. Denn durch die Applikation des Interferons kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems und dadurch zur Unterstützung bei der Bekämpfung von Viren oder entarteten Zellen. So therapeutisch wertvoll eine solche Therapie aber auch ist, zieht sie durch die meist über Monate andauernde exogene Zufuhr von Interferon eine Reihe von unerwünschten Begleiterscheinungen mit sich, die wohl hauptsächlich in der Störung des Interferonhaushaltes begründet liegen³³⁵⁻³³⁷. Die Möglichkeit hier durch den Einsatz von 3pRNA eine endogene Typ-I Interferon Induktion zu initiieren, würde diese Nebenwirkungen sehr wahrscheinlich deutlich reduzieren. Mit dem TLR9 aktivierenden Oligonukleotid CpG-ODN wurde schon versucht genau diese endogene Interferon Zufuhr therapeutisch zu nutzen. Jedoch zeigte dieser Ligand in Kombination mit Chemotherapeutika in der dritten Phase der klinischen Entwicklung keinen signifikanten Vorteil im Vergleich zu der alleinigen chemotherapeutischen Behandlung³³⁸⁻³⁴⁰. Der Grund dafür ist unklar, jedoch scheint zum einen die

nicht ubiquitäre und nicht in Tumorzellen lokalisierte Rezeptorexpression von TLR9, aber eventuell auch eine uneffektive Transfektion der „nackten“ DNA die Erklärung dafür zu sein. Letzteres erklärt, warum die Firma *Checkmate Pharmaceuticals* 2016 einen erneuten Versuch gewagt hat, den TLR9-Liganden formuliert in einem Virus-ähnlichen Partikel (*virus-like particle*) in Kombination mit dem Checkpoint Inhibitor Anti-PD-1 klinisch zu testen. Allerdings bleibt die Frage, ob die TLR9 Expression in pDCs und B-Zellen ausreicht, um die gewünschte Wirkung zu erzielen. Hier würde die Therapie mit einem 3pRNA-Liganden zur Aktivierung des ubiquitär exprimierten Rezeptors RIG-I einen möglichen Vorteil bieten.

Zudem stellt die RIG-I spezifische Induktion des programmierten Zelltodes einen weiteren interessanten Ansatzpunkt dar. Denn aufgrund der Sensitivität von Tumorzellen auf diesen RIG-I Trigger kann im Gegensatz zur Chemotherapie gezielter entartetes Gewebe adressiert werden. Kommt es zur Apoptoseinduktion durch die RIG-I Aktivierung folgt der Untergang der Tumorzelle mit anschließender Freisetzung Tumor-assoziiertes Antigene. Diese Antigene können wiederum von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen werden, um diese dann im drainierenden Lymphknoten T-Zellen zu präsentieren. Die dann aktivierten T-Zellen wären dann in der Lage in das Tumorgebiet zu rekrutieren und hier eine effektive Zerstörung der Tumorzellen zu bewirken^{341,342}. Um dieser Zerstörung auszuweichen besitzen Tumorzellen die Fähigkeit durch die Sekretion von IL-1 und IL-6 myeloide Suppressorzellen (MDSC) anzuziehen. Diese Zellen bilden reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), Stickstoffmonoxid (NO) und Arginase, die zur Unterdrückung der T-Zell Aktivität beitragen und somit ein immunsuppressives Tumor-Mikromilieu schaffen^{343,344}. Auch hier wäre der Einsatz von 3p-RNA therapeutisch nutzbar. Denn durch die Aktivierung von RIG-I in diesen myeloiden Suppressorzellen wird ebenfalls eine Induktion von IFN α bewirkt, welches einerseits die Bildung von IL-1 und IL-6 unterbindet, und zusätzlich eine Differenzierung der MDSCs in APCs einleitet. Diese dann unterstützende T-Zell Aktivierung bewirkt eine Umwandlung des eigentlich „kalten“ Tumors in ein hoch immuntolerantes Milieu³⁴⁵.

Dass eine effektive Transfektion des 3pRNA Liganden durch PAMAM-Dendrimere *in vitro* und vor allem auch *in vivo* möglich ist, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Für eine potentielle Anwendung der 3p-Dendriplexe in der Klinik stellt sich neben der Wirksamkeit aber auch die Frage nach der Sicherheit der Therapie. Im Rahmen einer intratumoralen/subkutanen Anwendung der 3p-Dendriplexe konnte in dieser Arbeit eine sehr gute Verträglichkeit der Therapie bei Mäusen gezeigt und eine PAMAM-vermittelte Toxizität durch eine histopathologische Untersuchung verschiedener Organe ausgeschlossen werden. Es ist aber noch unklar, ob die Maus eine relevante Spezies für die spätere humane Anwendung der 3p-Dendriplexe darstellt. Im weiteren Verlauf dieses Projektes soll diese Spezies durch Vergleichsstudien identifiziert werden. Eine Wiederholung des Experimentes in dieser Spezies könnte dann die gute Verträglichkeit der 3p-Dendriplexe weiter untersuchen. Zudem soll auch nach intravenöser Applikation der 3p-Dendriplexe eine histopathologische Untersuchung der Organe durchgeführt werden, um systematisch zu untersuchen, ob auch die systemische Nutzung der Therapie sicher erscheint. Allerdings zeigte die intravenöse Gabe der 3p-Dendriplexe in dieser Arbeit selbst in hohen Dosen (bis zu 40 μ g/Maus; N/P8) keinerlei Mortalitäten. Auch das Verhalten und das Aussehen der Mäuse war bei der idealen

therapeutischen Dosis von 20µg/Maus nicht verändert im Vergleich zu den Tieren der unbehandelten Gruppe. Lediglich die hoch dosierten Tiere (40µg/Maus) zeigten eine leicht reduzierte Motilität und eine Piloarreaktion (Aufstellen der Körperhaare). Allerdings verschwanden diese Auffälligkeiten binnen einiger Stunden. Da es sich vermuten lässt, dass durch die Aktivierung des Immunsystems auch grippeähnliche Symptome ausgelöst werden, könnten diese beobachteten Verhaltensauffälligkeiten bei der Maus eventuell mit einer solchen Reaktion zusammenhängen.

Um mit den 3p-Dendriplexen den Weg weiter in Richtung klinischer Anwendbarkeit gehen zu können, ist neben der Sicherheit und der Effektivität der Therapie auch die Herstellbarkeit und die Stabilität des therapeutischen Ansatzes von entscheidender Bedeutung. Die in dieser Arbeit entwickelte automatische Komplexierung von 3pRNA und PAMAM-Dendrimeren ermöglicht die Herstellung der 3p-Dendriplexe über eine maschinelle Produktion. Diese hier zum ersten Mal beschriebene Produktionsmethode ermöglicht durch standardisierte Einstellungen der Prozessparameter eine hochkontrollierbare und demnach verifizierbare Formulierung der 3p-Dendriplexe. Durch die Verwendung von größeren Spitzenpumpen könnte zudem auch der Produktionsansatz beliebig hochskaliert werden. In dieser Arbeit wurde insbesondere der Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die Partikelformation untersucht und festgestellt, dass dieser Parameter maßgeblich an der resultierenden Größe der 3p-Dendriplexe beteiligt ist. Da alle Versuche mit einem Niederdruckspritzen-System durchgeführt wurden, welches nahezu pulsationsfrei arbeitet, bleibt die Frage offen, ob auch Systeme, die Fließströme mit Pulsation generieren, auch zur Produktion der 3p-Dendriplexe angewandt werden könnten. Wäre dies der Fall und wäre demnach eine Pulsationsfreiheit nicht erforderlich, dann könnte der Prozess womöglich auf einen Quetschpumpen-Prozess überführt werden, der eine kontinuierliche und mengenunlimitierte Produktion erheblich vereinfachen würde. Beide Prozesse stellen allerdings eine GMP-taugliche Produktion sicher und könnten zur Herstellung von 3p-Dendriplexen angewandt werden, die dann für die Anwendung in klinischen Studien eingesetzt werden könnten. Neben der definierten Herstellbarkeit muss auch die Stabilität der produzierten 3p-Dendriplexe gewährleistet sein, die idealerweise auch unter Stressbedingungen bestehen bleibt. Durch die Verwendung von 5%iger Glucose-Lösung zur Formulierung der 3p-Dendriplexe konnte genau das erreicht werden. Neben anderen Zuckerverbindungen wie Saccharose, Trehalose oder Lactose stellt auch Glucose einen Kryoprotektor dar. Kryoprotektoren besitzen die Fähigkeit einen Wirkstoff während eines Einfriervorganges zu schützen. Dieser Schutzmechanismus beruht bei den Zuckerverbindungen auf einem bevorzugtem Ausschluss, der sogenannten „*Preferential Exclusion*“, die es ermöglicht, dass sich um die Partikel eine Hydrathülle ausbildet, die eine Zusammenlagerung der einzelnen Partikel verhindert³⁴⁶. Diese Eigenschaft der Glucose könnte auch hier in dieser Arbeit erklären, warum sich die Größe der 3p-Dendriplexe sowohl nach mehrmaligem Einfrieren und wieder Auftauen, als auch bei einer Lagerung über die Zeit (24h) bei Raumtemperatur nicht verändert. Damit würde eine *Shelf-life* Stabilität der 3p-Dendriplexe bei einer -20°C Lagerung ermöglicht werden.

Ein noch größerer Vorteil als die Lagerung eines gefrorenen Produktes würde eine Lagerung des

Produktes als Lyophilisat bringen. Denn durch die Gefriertrocknung wird ein fester Aggregationszustand erzeugt, der eine Mobilität und somit auch die Interaktionswahrscheinlichkeit der einzelnen Komponenten komplett verhindern könnte. Dadurch wären Handhabung und Lagerung des Produktes deutlich vereinfacht. Um diesen Vorteil auch für 3p-Dendriplexe nutzen zu können, soll in einem folgenden Projekt eine solche Lyophilisation von 3p-Dendriplexen etabliert werden.

Nachdem diese Arbeit die Formulierung und die effektive Transfektion von verschiedenen Oligonukleotiden gezeigt hat, stellt sich auch die Frage nach einer möglichen Kombinationstherapie. Denn die einzigartigen Eigenschaften der Dendrimere,

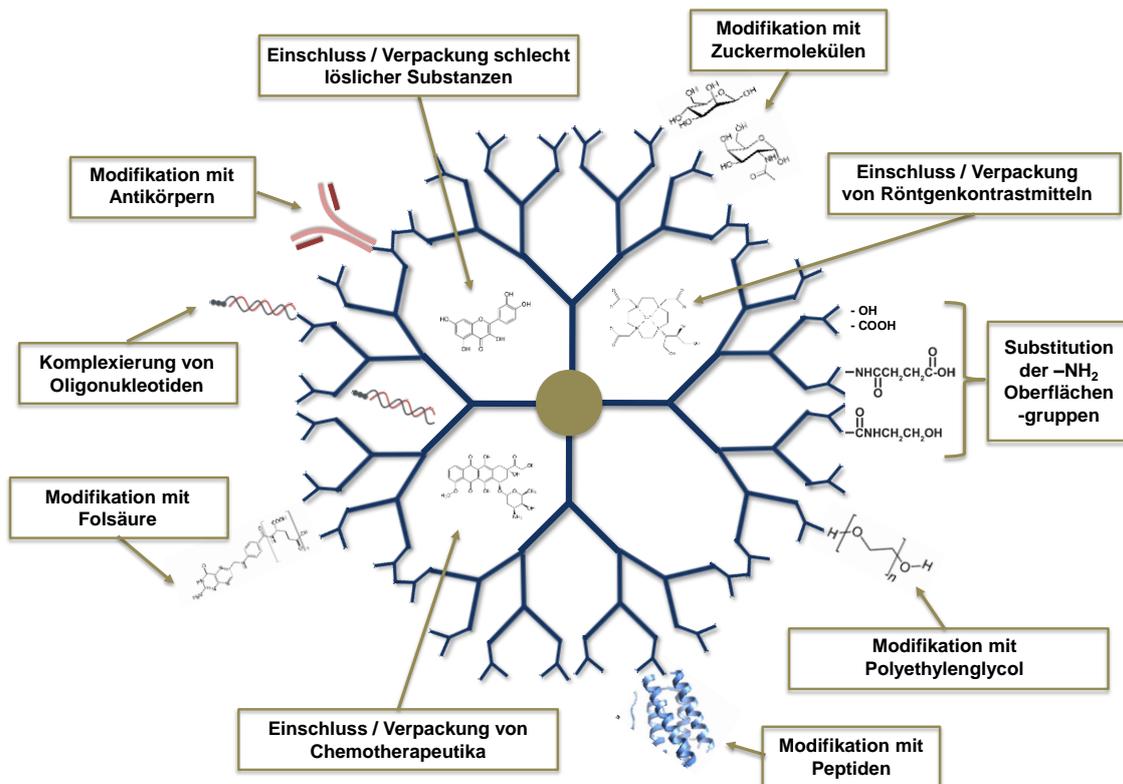


Abbildung 6-4: Dendrimere als multifunktionale Transportsysteme.

wie die hoch-definierte Struktur, der polyvalente Charakter, das definierte Molekulargewicht, die hohe Monodispersität und die hohe Anzahl an funktionellen Gruppen, machen die Dendrimere zu hocheffektiven Nanosystemen für den Transfer unterschiedlichster Substanzen³⁴⁷⁻³⁵⁰. Daneben besitzen Dendrimere auch eine hohe Löslichkeit in Wasser³⁵¹ und eine gute Biokompatibilität^{187,352}. All diese Eigenschaften der Dendrimere stellen entscheidende Vorteile zu den linearen Polymeren dar und erklären ihren multifunktionalen Einsatz (Abbildung 6-4). So können nicht nur schwer lösliche oder zytotoxische Arzneistoffe (z.B. Chemotherapeutika oder Röntgenkontrastmittel) in ihnen verpackt werden³⁵³⁻³⁵⁵, sondern auch durch die Oberflächen-Modifizierung mit zielgerichteten funktionellen Gruppen wie z.B. monoklonalen Antikörpern, Folsäure, Peptiden, Transferrin oder Zuckermolekülen (z.B. GalNAc, Mannose) eine zellspezifische Aufnahme ermöglicht werden^{194,212,356,357}.

Auch scheint eine Substitution der endständigen primären Amine der PAMAM-Dendrimere sinnvoll. Denn auch wenn diese Arbeit die Sicherheit der 3p-Dendriplexe *in vivo* zeigt, besitzen PAMAM-Dendrimere wie viele andere Vektorsysteme eine positiv geladene Oberfläche, die dazu neigt, Zellmembranen zu destabilisieren und dadurch eine Lyse der Zelle zu ermöglichen³⁵⁸. Um diese Zytotoxizität zu reduzieren können die primären terminalen Amine beispielweise durch Hydroxyl-, Carboxyl-, Acetyl- oder Acetamid-Gruppen oder auch Fettsäureketten ausgetauscht werden^{186,359-361}. Auch die Bindung von Polyethylenglycol (PEG) führt zu diesem Effekt^{362,363}. Im Falle der 3p-Dendriplexe sollte allerdings immer gewährleistet bleiben, dass ein Teil der primären Amine an der Oberfläche erhalten bleibt. Denn durch die Substitution und der damit verbundenen Eliminierung der positiven Ladung wird höchstwahrscheinlich auch die Bindungseffektivität zu der 3pRNA reduziert und somit die Transfektionseffizienz gesenkt.

Die hier beschriebenen Eigenschaften der Dendrimere zeigen die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten dieser einzigartigen Polymere und lassen zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit viele mögliche neue Ansatzmöglichkeiten der 3p-Dendriplexe entstehen. Beispielweise könnte die bisher passive Aufnahme der 3p-Dendriplexe in Tumorzellen durch die Modifikation mit rezeptorspezifischen Liganden (z.B. Transferrin, Folsäure) gesteigert werden. Zusätzlich wäre eine PEGylierung der Dendrimere denkbar, die eventuell auch die Applikation von sehr hohen Mengen an 3p-Dendriplexen erlauben würde. Auch eine Kombinationstherapie kann durch den Einsatz von PAMAM-Dendrimern Vorteile darstellen. Denn da Dendrimere in der Lage sind die zytotoxischen Nebenwirkungen von Chemotherapeutika zu reduzieren^{201,364}, könnte eine gleichzeitige Verpackung von 3pRNA und einem Chemotherapeutikum zur risikoarmen antitumoralen Behandlung verschiedener Tumorentitäten eingesetzt werden.

7 Anhang

7.1 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Kontroll-Oligonukleotide	
polyA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
polyCA	CACACACACACACACACA
polyAC	CACAACAAACCAACAACCA
TLR7 Agonisten	
R2173	C*G*G*C*U*C*G*G*C*A*G*A*A*G*C*C*G*G*G*C*C
R3011	CCUCCUCCUCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
TLR8 Agonisten	
R2152nh3	CGCGUGCGCAGAAGCGAGCGC
R2153	CGGCUCGGCAGAAGCCGGGCC
R2197	G*C*CGCGUGCGCAGAAG*C*G*A*G*C
9.2s	AGCUUAACCUUGUCCUCAA
TLR9 Agonisten	
CpG2006 ODN	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
Weitere Oligonukleotide	
asGFP2	CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA
GFP2	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU
IVT4 Template	TTGTAATACGACTCACTATAGGGACGCTGACCCAGAAGATCTACTAGAA A
3p-select-24	Triphosphorilierte, modifizierte Doppelstrang RNA (genaue Sequenz darf aufgrund von Vertraulichkeit nicht genannt werden)
Erläuterungen	
A,C,G,U	RNA Basen
dA,dC,dG	DNA Basen
*	Phosphothioate

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausführlicher Name / Bezeichnung
3pRNA / 3p	5'-Triphosphat RNA
A:U	Adenosin:Uridin
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BMDC	<i>Bone marrow derived dendritic cell</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domaine</i>

Cardif	<i>CARD-adaptor inducing IFNβ</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cGAS	Cyclische GMP-AMP Synthase
CpG	<i>Cytosine-guanine oligonucleotide</i>
CTD	<i>C-terminal domain</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
ctrlRNA	Kontroll-RNA
CXCL-10	<i>Interferon-dependent lymphocyte attracting chemokine 10</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
pDC	<i>Plasmacytoid dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calve serum</i>
FDA	<i>U.S Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glu	Glucose
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
H&E	Hematoxylin und Eosin
HMGB-1	<i>High mobility group protein B1</i>
HRP	Houseradish peroxidase
i.h.	Inhalativ
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratumoral
i.v.	intravenös
IFIT-1	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
IFN	Interferon
IFN α R	Interferon α Rezeptor
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IPS-1	Interferon- β promoting stimulator
IRAK	Interleukin-1 assoziierte Kinase
IRF	<i>Interferon-regulatory factor</i>

ISG	Interferon stimulierende Gene
IVT4	<i>In vitro transcript 4</i>
I κ B	<i>Inhibitor of NFκB</i>
Jak	Janus Kinase
JNK	<i>c-Jun NH-2 terminal kinase</i>
LF2000	Lipofectamine 2000
LGP-2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LNP	<i>Lipid Nanoparticle</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic cell separation</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation associated factor 5</i>
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MDSC	<i>Myeloid derived suppressor cells</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
miRNA	<i>MicroRNA</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	<i>Non-essential amino acids</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
NLRP3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
nm	Nanometer
NOD	<i>Nucleotide binding domain</i>
N/P Ratio	<i>Nitrogen / Phosphate ratio</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
ODN	Oligodeoxynucleotide
PAMAM	Polyamidoamin
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDL-1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimine
PLGA	<i>Poly(lactid-co-glycolic acid)</i>

Poly I:C	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RIG-I	<i>retinoic acid early-inducible protein 1</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptors</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>roswell park memorial institute medium</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of mean</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
STAT	<i>Signal transducer activator of transcription</i>
TBK-1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Treg	Regulatorische T-Zellen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Übersicht aller Toll-like Rezeptoren.....	8
Abbildung 2-2: Aufbau eines TLR-Rezeptors.	10
Abbildung 2-3: Signalkaskaden der TLR-Rezeptoren 7 und 8. Erklärung siehe Text.....	11
Abbildung 2-4: Aufbau der RIG-I-like Helikasen.	12
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des RIG-I Signalweges.	14
Abbildung 2-6: Signalweg der Apoptoseinduktion durch die Stimulation von RIG-I. Erklärung siehe Test.	16
Abbildung 2-7: Übersicht der verschiedenen Formen der Endozytose (Abbildung wurde modifiziert nach Mayor und Pagano ¹).....	18
Abbildung 2-8: Darstellung von verschiedenen liposomalen Strukturdimensionen.	26
Abbildung 2-9: Synthese von verzweigtem und linearem Polyethylenimin.	27
Abbildung 2-10: Schematische Darstellung des Protonenschwamm-Effektes	28
Abbildung 2-11: Synthese von Chitosan aus dem Polysaccharid Chitin.	29

Abbildung 2-12: Struktur und Synthese von Dendrimeren	31
Abbildung 2-13: Synthese des tetra-funktionellen Poly(amidoamin) Dendrimers.....	33
Abbildung 2-14: Schematische Darstellung des DEP™ Transfektionssystems.....	34
Abbildung 2-15: Strukturformel von Poly-L-Lysin und Poly-L-Arginin.....	35
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der elektrostatischen Doppelschicht.....	68
Abbildung 5-1: PAMAM-Dendrimere ermöglichen auf humanen PBMCs eine effektive Transfektion ins Endosom und ins Zytosol, die vom N/P Verhältnis und verwendetem Transfektionsmedium beeinflusst wird.	75
Abbildung 5-2: PAMAM Dendrimere ermöglichen eine vollständige Verkapselung von dsRNA und ssRNA ab einem N/P Verhältnis von 3.....	77
Abbildung 5-3: Die Partikelgröße von 3p- und R3011 Dendriplexen ist abhängig vom verwendeten Transfektionsmedium.	78
Abbildung 5-4: Das Zetapotential bestimmt das endosomale und zytosolische Aktivitätspotential.	80
Abbildung 5-5: Die Verwendung von unterschiedlichen Transfektionsmedien für die Formulierung von Dendriplexen beeinflusst das Stimulationspotential auf humanen Monozyten und humanen pDCs.	82
Abbildung 5-6: PAMAM G5 ermöglicht eine effiziente endosomale und zytosolische Transfektion im humanen System.	85
Abbildung 5-7: PAMAM Dendrimere ermöglichen auch im murinen System eine effiziente zytosolische Transfektion und führen zu einer effektiven und selektiven Aktivierung von RIG-I.	88
Abbildung 5-8: 3p-Dendriplexe führen auch in humanen und murinen Tumorzellen zur einer effektiven Aktivierung von RIG.	89
Abbildung 5-9: 3p-Dendriplexe führen in humanen und murinen Tumorzellen zu einer Aufregulation von RIG-I spezifischen und proapoptotischen Genen.	90
Abbildung 5-10: 3p-Dendriplexe führen in murinen Tumorzellen zu einer effektiven Apoptoseinduktion.....	91
Abbildung 5-11: Die intravenöse Applikation von 3p-Dendriplexen führt zu einer dosisabhängigen Induktion von Zytokinen und Chemokinen in vivo.	93
Abbildung 5-12: Nach systemischer Applikation von 3p-Dendriplexen stellen Leber, Lunge und Milz die Hauptbiobistributionsorgane dar.....	94
Abbildung 5-13: Im orthotopen hepatozellulären Karzinom (HCC) Model führt die intravenöse Gabe von 3p-Dendriplexen zu einer deutlichen Überlebensverlängerung.	96
Abbildung 5-14: 3p-Dendriplexe verhindern signifikant die Bildung von B16 Lungenmetastasen und führen zu einer Aufregulation und Aktivierung von NK-Zellen.	97
Abbildung 5-15: Die antitumorale Wirkung auf B16 Lungenmetastasen wird durch die Partikelgröße von Dendri- und Polyplexen beeinflusst.	99
Abbildung 5-16: Intravenöse Therapie mit 3p-Dendriplexen führt zu einer Überlebensverlängerung im subkutanen B16 Modell.	101
Abbildung 5-17: Nano-3p-Dendriplexe erreichen den subkutanen Tumor effektiver als Mikro-3p-Dendriplexe.	102

Abbildung 5-18: Eine subkutane Applikation von 3p-Dendriplexen führt zu einer 48h langen Zytokininduktion an Applikationsort.	103
Abbildung 5-19: Intratumorale Therapie mit 3p-Dendriplexen führt zu einer dosisabhängigen Regression von B16 Melanomen.	105
Abbildung 5-20: Die Behandlung mit 3p-Dendriplexen verhindert die Neuausbildung eines B16 Melanoms.	106
Abbildung 5-21: Eine Intratumorale Therapie mit 3p-Dendriplexen führt im nicht-orthotopen hepatozellulären Karzinom zur Tumorregression.	107
Abbildung 5-22: 3p-Dendriplexe führen in vitro auf nicht-malignen Zellen zu einer geringen Toxizität.	109
Abbildung 5-23: Die intratumorale Behandlung mit 3p-Dendriplexen führt im Vergleich zu 3p-Polyplexen nicht zu einer Ulzeration des behandelten Tumors.	110
Abbildung 5-24: Die subkutane Behandlung mit 3p-Dendriplexen führt nur an der Injektionsstelle zu leichten Toxizitätserscheinungen.	113
Abbildung 5-25: Manuelle und maschinelle Herstellungsmethoden für 3p-Dendriplexe.	114
Abbildung 5-26: Modell einer V-Mischkammer.	115
Abbildung 5-27: Die Flussrate bestimmt die resultierende Partikelgröße.	116
Abbildung 6-1: Partikelverhalten in unterschiedlichen Medien nach der DLVO-Theorie	123
Abbildung 6-2: Schematische Darstellung der Dendriplex-Aufnahme durch Monozyten und pDCs.	124
Abbildung 6-3: Schematische Darstellung des EPR-Effektes.	130
Abbildung 6-4: Dendrimere als multifunktionale Transportsysteme.	135

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: TLRs und ihre Liganden	9
Tabelle 2-2: Übersicht der Expressionsverteilung der Toll like Rezeptoren im humanen und murinen System.	10
Tabelle 2-3: Übersicht von zugelassenen und Spät-Phase Oligonukleotid-basierten Therapieansätzen.	17
Tabelle 2-4: Bezeichnungen und chemische Strukturen wichtiger neutraler und kationischer Lipide	24
Tabelle 2-5: Möglichkeiten von zielgerichteten PEI-Modifikationsstrategien	29
Tabelle 2-6: Beispiele von Arzneistoff-geladenen Chitosan-Nanopartikeln	30
Tabelle 2-7: Therapeutische Verwendung von PAMAM-Dendrimeren	34
Tabelle 2-8: Übersicht weiterer Oligonukleotid-Transferverfahren	37
Tabelle 2-9: Übersicht Lipid-basierter Transfersysteme in der klinischen Entwicklung	38
Tabelle 2-10: Übersicht Polymer-basierter Transfersysteme in der klinischen Entwicklung	39
Tabelle 5-1: Sequenzen optimierter TLR7 Liganden.	73
Tabelle 5-2: Sequenzen optimierter TLR8 Liganden.	73

Tabelle 5-3: Nomenklatur der RNA-PAMAM Komplexe	74
Tabelle 5-4: Übersicht der Expression von TLR7, TLR8 und RIG-I auf Immunzellen.....	81
Tabelle 5-5: Übersicht der idealen Formulierungsbedingungen.....	84

7.5 Literaturverzeichnis

- 1 Mayor, S. & Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 603-612, doi:10.1038/nrm2216 (2007).
- 2 Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751-758, doi:10.1038/381751a0 (1996).
- 3 Arstila, T. P. *et al.* A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* **286**, 958-961 (1999).
- 4 Michalek, R. D. & Rathmell, J. C. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol Rev* **236**, 190-202, doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00911.x (2010).
- 5 Wherry, E. J. & Ahmed, R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* **78**, 5535-5545, doi:10.1128/JVI.78.11.5535-5545.2004 (2004).
- 6 Sallusto, F., Mackay, C. R. & Lanzavecchia, A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* **18**, 593-620, doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.593 (2000).
- 7 Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**, 1-13 (1989).
- 8 Janeway, C. A., Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**, 11-16, doi:10.1016/0167-5699(92)90198-G (1992).
- 9 Medzhitov, R. & Janeway, C., Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* **343**, 338-344, doi:10.1056/NEJM200008033430506 (2000).
- 10 Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298 (1997).
- 11 Turner, M. W. The lectin pathway of complement activation. *Res Immunol* **147**, 110-115 (1996).

- 12 Gough, P. J. & Gordon, S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* **2**, 305-311 (2000).
- 13 Pearson, A. M. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **8**, 20-28 (1996).
- 14 Peiser, L., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **14**, 123-128 (2002).
- 15 Gordon, S. The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol* **149**, 685-688 (1998).
- 16 Shpacovitch, V., Feld, M., Bunnett, N. W. & Steinhoff, M. Protease-activated receptors: novel PARtners in innate immunity. *Trends Immunol* **28**, 541-550, doi:10.1016/j.it.2007.09.001 (2007).
- 17 Athman, R. & Philpott, D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol* **7**, 25-32, doi:10.1016/j.mib.2003.12.013 (2004).
- 18 Franchi, L. *et al.* Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol* **10**, 1-8, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01059.x (2008).
- 19 Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105, doi:10.1038/nature04734 (2006).
- 20 Loo, Y. M. *et al.* Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* **82**, 335-345, doi:10.1128/JVI.01080-07 (2008).
- 21 Yoneyama, M. & Fujita, T. Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* **282**, 15315-15318, doi:10.1074/jbc.R700007200 (2007).
- 22 Herzner, A. M. *et al.* Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA. *Nat Immunol* **16**, 1025-1033, doi:10.1038/ni.3267 (2015).
- 23 Anderson, K. V., Bokla, L. & Nusslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**, 791-798 (1985).
- 24 Takeuchi, O. *et al.* TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene*

- 231**, 59-65 (1999).
- 25 Farhat, K. *et al.* Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol* **83**, 692-701, doi:10.1189/jlb.0807586 (2008).
- 26 Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738, doi:10.1038/35099560 (2001).
- 27 Fitzgerald, K. A. *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**, 1043-1055, doi:10.1084/jem.20031023 (2003).
- 28 Yoon, S. I. *et al.* Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* **335**, 859-864, doi:10.1126/science.1215584 (2012).
- 29 Gorden, K. B. *et al.* Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* **174**, 1259-1268 (2005).
- 30 Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529, doi:10.1126/science.1093620 (2004).
- 31 Hemmi, H. *et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**, 196-200, doi:10.1038/ni758 (2002).
- 32 Jurk, M. *et al.* Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* **3**, 499, doi:10.1038/ni0602-499 (2002).
- 33 Hartmann, G., Weiner, G. J. & Krieg, A. M. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9305-9310 (1999).
- 34 Krieg, A. M., Hartmann, G. & Yi, A. K. Mechanism of action of CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **247**, 1-21 (2000).
- 35 Krieg, A. M. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-549, doi:10.1038/374546a0 (1995).
- 36 Oosting, M. *et al.* Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E4478-4484, doi:10.1073/pnas.1410293111 (2014).

- 37 Hatai, H., Lepelley, A., Zeng, W., Hayden, M. S. & Ghosh, S. Toll-Like Receptor 11 (TLR11) Interacts with Flagellin and Profilin through Disparate Mechanisms. *PLoS One* **11**, e0148987, doi:10.1371/journal.pone.0148987 (2016).
- 38 Plattner, F. *et al.* Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* **3**, 77-87, doi:10.1016/j.chom.2008.01.001 (2008).
- 39 Koblansky, A. A. *et al.* Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to Toxoplasma gondii. *Immunity* **38**, 119-130, doi:10.1016/j.immuni.2012.09.016 (2013).
- 40 Andrade, W. A. *et al.* Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to Toxoplasma gondii in mice. *Cell Host Microbe* **13**, 42-53, doi:10.1016/j.chom.2012.12.003 (2013).
- 41 Hidmark, A., von Saint Paul, A. & Dalpke, A. H. Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *J Immunol* **189**, 2717-2721, doi:10.4049/jimmunol.1200898 (2012).
- 42 Li, X. D. & Chen, Z. J. Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13. *Elife* **1**, e00102, doi:10.7554/eLife.00102 (2012).
- 43 Hayashi, F. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103, doi:10.1038/35074106 (2001).
- 44 Lund, J. M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5598-5603, doi:10.1073/pnas.0400937101 (2004).
- 45 Kerkmann, M. *et al.* Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **170**, 4465-4474 (2003).
- 46 Barchet, W., Wimmenauer, V., Schlee, M. & Hartmann, G. Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. *Curr Opin Immunol* **20**, 389-395, doi:10.1016/j.coi.2008.07.007 (2008).
- 47 Cole, J. E., Georgiou, E. & Monaco, C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* **2010**, 393946, doi:10.1155/2010/393946 (2010).
- 48 Fantom. Gene Expression (2015). <http://fantom.gsc.riken.jp> (abgerufen am 14.02.2016).

- 49 BioGPS. Gene Expression TLR7 human and murine (2016). <http://biogps.org> (abgerufen am 23.02.2016).
- 50 BioGPS. Gene Expression TLR8 human and murine (2016). <http://biogps.org> (abgerufen am 23.02.2016).
- 51 Gordon, K. K., Qiu, X. X., Binsfeld, C. C., Vasilakos, J. P. & Alkan, S. S. Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazoquinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **177**, 6584-6587 (2006).
- 52 Forsbach, A. *et al.* Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J Immunol* **180**, 3729-3738 (2008).
- 53 Demaria, O. *et al.* TLR8 deficiency leads to autoimmunity in mice. *J Clin Invest* **120**, 3651-3662, doi:10.1172/JCI42081 (2010).
- 54 Tran, N. L., Manzin-Lorenzi, C. & Santiago-Raber, M. L. Toll-like receptor 8 deletion accelerates autoimmunity in a mouse model of lupus through a Toll-like receptor 7-dependent mechanism. *Immunology* **145**, 60-70, doi:10.1111/imm.12426 (2015).
- 55 Kawagoe, T. *et al.* Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* **9**, 684-691, doi:10.1038/ni.1606 (2008).
- 56 Sarvestani, S. T., Williams, B. R. & Gantier, M. P. Human Toll-like receptor 8 can be cool too: implications for foreign RNA sensing. *J Interferon Cytokine Res* **32**, 350-361, doi:10.1089/jir.2012.0014 (2012).
- 57 Diebold, S. S. *et al.* Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol* **36**, 3256-3267, doi:10.1002/eji.200636617 (2006).
- 58 Hornung, V. *et al.* Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* **11**, 263-270, doi:10.1038/nm1191 (2005).
- 59 Jung, S. *et al.* A single naturally occurring 2'-O-methylation converts a TLR7- and TLR8-activating RNA into a TLR8-specific ligand. *PLoS One* **10**, e0120498, doi:10.1371/journal.pone.0120498 (2015).
- 60 Varani, G. & McClain, W. H. The G x U wobble base pair. A fundamental building block of

- RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO Rep* **1**, 18-23, doi:10.1093/embo-reports/kvd001 (2000).
- 61 Beutler, B. *et al.* Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat Rev Immunol* **7**, 753-766, doi:10.1038/nri2174 (2007).
- 62 Bamming, D. & Horvath, C. M. Regulation of signal transduction by enzymatically inactive antiviral RNA helicase proteins MDA5, RIG-I, and LGP2. *J Biol Chem* **284**, 9700-9712, doi:10.1074/jbc.M807365200 (2009).
- 63 Cui, S. *et al.* The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell* **29**, 169-179, doi:10.1016/j.molcel.2007.10.032 (2008).
- 64 Saito, T. *et al.* Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 582-587, doi:10.1073/pnas.0606699104 (2007).
- 65 Takahasi, K. *et al.* Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* **29**, 428-440, doi:10.1016/j.molcel.2007.11.028 (2008).
- 66 Wang, Y. *et al.* Structural and functional insights into 5'-ppp RNA pattern recognition by the innate immune receptor RIG-I. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 781-787, doi:10.1038/nsmb.1863 (2010).
- 67 Rothenfusser, S. *et al.* The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* **175**, 5260-5268 (2005).
- 68 Kato, H. *et al.* Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**, 19-28, doi:10.1016/j.immuni.2005.04.010 (2005).
- 69 Furr, S. R., Moerdyk-Schauwecker, M., Grdzlishvili, V. Z. & Marriott, I. RIG-I mediates nonsegmented negative-sense RNA virus-induced inflammatory immune responses of primary human astrocytes. *Glia* **58**, 1620-1629, doi:10.1002/glia.21034 (2010).
- 70 Le Goffic, R. *et al.* Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol* **178**, 3368-3372 (2007).
- 71 Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5 '-

- phosphates. *Science* **314**, 997-1001, doi:10.1126/science.1132998 (2006).
- 72 Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997, doi:10.1126/science.1132505 (2006).
- 73 Schubert-Wagner, C. *et al.* A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'O-Methylated Self RNA. *Immunity* **43**, 41-51, doi:10.1016/j.immuni.2015.06.015 (2015).
- 74 Sen, G. C. & Ransohoff, R. M. Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* **42**, 57-102 (1993).
- 75 Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**, 258-267 (1957).
- 76 Balachandran, S. *et al.* Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* **13**, 129-141 (2000).
- 77 Takaoka, A. *et al.* Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* **424**, 516-523, doi:10.1038/nature01850 (2003).
- 78 Haller, O. & Weber, F. The interferon response circuit in antiviral host defense. *Verh K Acad Geneesk Belg* **71**, 73-86 (2009).
- 79 Ozato, K., Taylor, P. & Kubota, T. The interferon regulatory factor family in host defense: mechanism of action. *J Biol Chem* **282**, 20065-20069, doi:10.1074/jbc.R700003200 (2007).
- 80 Hornung, V., Barchet, W., Schlee, M. & Hartmann, G. RNA recognition via TLR7 and TLR8. *Handb Exp Pharmacol*, 71-86, doi:10.1007/978-3-540-72167-3_4 (2008).
- 81 Chan, S. H. *et al.* Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* **173**, 869-879 (1991).
- 82 Manetti, R. *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* **177**, 1199-1204 (1993).
- 83 Jelinek, D. F. & Braaten, J. K. Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation. *J Immunol* **154**, 1606-1613 (1995).

- 84 Flavell, R. A. The relationship of inflammation and initiation of autoimmune disease: role of TNF super family members. *Curr Top Microbiol Immunol* **266**, 1-9 (2002).
- 85 Ware, C. F. The TNF receptor super family in immune regulation. *Immunol Rev* **244**, 5-8, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01065.x (2011).
- 86 Chattopadhyay, S. *et al.* Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *EMBO J* **29**, 1762-1773, doi:10.1038/emboj.2010.50 (2010).
- 87 Chattopadhyay, S., Yamashita, M., Zhang, Y. & Sen, G. C. The IRF-3/Bax-mediated apoptotic pathway, activated by viral cytoplasmic RNA and DNA, inhibits virus replication. *J Virol* **85**, 3708-3716, doi:10.1128/JVI.02133-10 (2011).
- 88 Besch, R. *et al.* Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* **119**, 2399-2411, doi:10.1172/JCI37155 (2009).
- 89 Braasch, D. A. & Corey, D. R. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* **8**, 1-7 (2001).
- 90 Pfundheller, H. M. *et al.* Locked nucleic acid synthesis. *Methods Mol Biol* **288**, 127-146 (2005).
- 91 Hyrup, B. & Nielsen, P. E. Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem* **4**, 5-23 (1996).
- 92 Richards, D. M. & Endres, R. G. The mechanism of phagocytosis: two stages of engulfment. *Biophys J* **107**, 1542-1553, doi:10.1016/j.bpj.2014.07.070 (2014).
- 93 Roth, T. F. & Porter, K. R. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. *J Cell Biol* **20**, 313-332 (1964).
- 94 Mousavi, S. A., Malerod, L., Berg, T. & Kjekens, R. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* **377**, 1-16, doi:10.1042/BJ20031000 (2004).
- 95 McNiven, M. A. *et al.* Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* **151**, 187-198 (2000).
- 96 Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E. & Schmid, S. L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* **127**, 915-934 (1994).

- 97 Clague, M. J. & Urbe, S. The interface of receptor trafficking and signalling. *J Cell Sci* **114**, 3075-3081 (2001).
- 98 Cavalli, V., Corti, M. & Gruenberg, J. Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. *FEBS Lett* **498**, 190-196 (2001).
- 99 Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**, 857-902, doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540 (2009).
- 100 Parton, R. G. & Simons, K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 185-194, doi:10.1038/nrm2122 (2007).
- 101 Razani, B., Woodman, S. E. & Lisanti, M. P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* **54**, 431-467 (2002).
- 102 Kirkham, M. & Parton, R. G. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* **1745**, 273-286, doi:10.1016/j.bbamcr.2005.06.002 (2005).
- 103 Lamaze, C. *et al.* Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* **7**, 661-671 (2001).
- 104 Skretting, G., Torgersen, M. L., van Deurs, B. & Sandvig, K. Endocytic mechanisms responsible for uptake of GPI-linked diphtheria toxin receptor. *J Cell Sci* **112 (Pt 22)**, 3899-3909 (1999).
- 105 Seisenberger, G. *et al.* Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* **294**, 1929-1932, doi:10.1126/science.1064103 (2001).
- 106 Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **348**, 255-256, doi:10.1056/NEJM200301163480314 (2003).
- 107 Lewis, P., Hensel, M. & Emerman, M. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J* **11**, 3053-3058 (1992).
- 108 Delenda, C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S125-138, doi:10.1002/jgm.501 (2004).
- 109 Saenz, D. T. & Poeschla, E. M. FIV: from lentivirus to lentivector. *J Gene Med* **6 Suppl 1**,

- S95-104, doi:10.1002/jgm.500 (2004).
- 110 Pellinen, R. *et al.* Cancer cells as targets for lentivirus-mediated gene transfer and gene therapy. *Int J Oncol* **25**, 1753-1762 (2004).
- 111 Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **4**, 346-358, doi:10.1038/nrg1066 (2003).
- 112 Volpers, C. & Kochanek, S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S164-171, doi:10.1002/jgm.496 (2004).
- 113 Imperiale, M. J. & Kochanek, S. Adenovirus vectors: biology, design, and production. *Curr Top Microbiol Immunol* **273**, 335-357 (2004).
- 114 Mehier-Humbert, S. & Guy, R. H. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 733-753, doi:10.1016/j.addr.2004.12.007 (2005).
- 115 Graham, F. L. & van der Eb, A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467 (1973).
- 116 McCutchan, J. H. & Pagano, J. S. Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *J Natl Cancer Inst* **41**, 351-357 (1968).
- 117 Felgner, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7413-7417 (1987).
- 118 Yeeprae, W., Kawakami, S., Suzuki, S., Yamashita, F. & Hashida, M. Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of cationic liposomes. *Pharmazie* **61**, 102-105 (2006).
- 119 Chiaramoni, N. S., Speroni, L., Taira, M. C. & Alonso Sdel, V. Liposome/DNA systems: correlation between association, hydrophobicity and cell viability. *Biotechnol Lett* **29**, 1637-1644, doi:10.1007/s10529-007-9454-y (2007).
- 120 Mochizuki, S. *et al.* The role of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for DNA transfection cooperating with a cationic lipid bearing ethylenediamine. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 412-418, doi:10.1016/j.bbame.2012.10.017 (2013).
- 121 Sun, S., Wang, M., Alberti, K. A., Choy, A. & Xu, Q. DOPE facilitates quaternized lipidoids

- (QLDs) for in vitro DNA delivery. *Nanomedicine* **9**, 849-854, doi:10.1016/j.nano.2013.01.006 (2013).
- 122 Ogris, M. & Wagner, E. Synthesis of linear polyethylenimine and use in transfection. *Cold Spring Harb Protoc* **2012**, 246-250, doi:10.1101/pdb.prot067868 (2012).
- 123 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* **7**, 992-1009, doi:10.1002/jgm.773 (2005).
- 124 Wightman, L. *et al.* Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* **3**, 362-372, doi:10.1002/jgm.187 (2001).
- 125 Ahn, C. H., Chae, S. Y., Bae, Y. H. & Kim, S. W. Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *J Control Release* **80**, 273-282 (2002).
- 126 Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsasser, H. P. & Kissel, T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* **16**, 1273-1279 (1999).
- 127 Boussif, O. *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297-7301 (1995).
- 128 Singha, K., Namgung, R. & Kim, W. J. Polymers in small-interfering RNA delivery. *Nucleic Acid Ther* **21**, 133-147, doi:10.1089/nat.2011.0293 (2011).
- 129 Godbey, W. T., Barry, M. A., Saggau, P., Wu, K. K. & Mikos, A. G. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J Biomed Mater Res* **51**, 321-328 (2000).
- 130 Benjaminsen, R. V., Matthebjerg, M. A., Henriksen, J. R., Moghimi, S. M. & Andresen, T. L. The possible "proton sponge " effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Mol Ther* **21**, 149-157, doi:10.1038/mt.2012.185 (2013).
- 131 Merdan, T., Kunath, K., Fischer, D., Kopecek, J. & Kissel, T. Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm Res* **19**, 140-146 (2002).
- 132 Funhoff, A. M. *et al.* Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH. *Biomacromolecules* **5**, 32-39,

- doi:10.1021/bm034041+ (2004).
- 133 Bonnet, M. E., Erbacher, P. & Bolcato-Bellemin, A. L. Systemic delivery of DNA or siRNA mediated by linear polyethylenimine (L-PEI) does not induce an inflammatory response. *Pharm Res* **25**, 2972-2982, doi:10.1007/s11095-008-9693-1 (2008).
- 134 Gunther, M. *et al.* Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. *Eur J Pharm Biopharm* **77**, 438-449, doi:10.1016/j.ejpb.2010.11.007 (2011).
- 135 Bonnet, M. E. *et al.* Systemic delivery of sticky siRNAs targeting the cell cycle for lung tumor metastasis inhibition. *J Control Release* **170**, 183-190, doi:10.1016/j.jconrel.2013.05.015 (2013).
- 136 Stellari, F. *et al.* Monitoring inflammation and airway remodeling by fluorescence molecular tomography in a chronic asthma model. *J Transl Med* **13**, 336, doi:10.1186/s12967-015-0696-5 (2015).
- 137 Poeck, H. *et al.* 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med* **14**, 1256-1263, doi:10.1038/nm.1887 (2008).
- 138 Lee, K. M., Lee, Y. B. & Oh, I. J. Evaluation of PEG-transferrin-PEI nanocomplex as a gene delivery agent. *J Nanosci Nanotechnol* **11**, 7078-7081 (2011).
- 139 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* **6**, 595-605, doi:10.1038/sj.gt.3300900 (1999).
- 140 Xie, Y. *et al.* Targeted delivery of siRNA to activated T cells via transferrin-polyethylenimine (Tf-PEI) as a potential therapy of asthma. *J Control Release* **229**, 120-129, doi:10.1016/j.jconrel.2016.03.029 (2016).
- 141 Blessing, T., Kurs, M., Holzhauser, R., Kircheis, R. & Wagner, E. Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug Chem* **12**, 529-537 (2001).
- 142 Schaffert, D. *et al.* Poly(I:C)-mediated tumor growth suppression in EGF-receptor overexpressing tumors using EGF-polyethylene glycol-linear polyethylenimine as carrier. *Pharm Res* **28**, 731-741, doi:10.1007/s11095-010-0225-4 (2011).

- 143 Liu, L. *et al.* Efficient and Tumor Targeted siRNA Delivery by Polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-poly(ethylene glycol)-folate (PEI-PCL-PEG-Fol). *Mol Pharm* **13**, 134-143, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00575 (2016).
- 144 Bennis, J. M., Maheshwari, A., Furgeson, D. Y., Mahato, R. I. & Kim, S. W. Folate-PEG-folate-graft-polyethylenimine-based gene delivery. *J Drug Target* **9**, 123-139 (2001).
- 145 Wang, C. H. & Hsiue, G. H. Polymer-DNA hybrid nanoparticles based on folate-polyethylenimine-block-poly(L-lactide). *Bioconjug Chem* **16**, 391-396, doi:10.1021/bc049754j (2005).
- 146 Chiu, S. J., Ueno, N. T. & Lee, R. J. Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin) conjugated polyethylenimine. *J Control Release* **97**, 357-369, doi:10.1016/j.jconrel.2004.03.019 (2004).
- 147 Merdan, T. *et al.* Pegylated polyethylenimine-Fab' antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells. *Bioconjug Chem* **14**, 989-996, doi:10.1021/bc0340767 (2003).
- 148 O'Neill, M. M., Kennedy, C. A., Barton, R. W. & Tatake, R. J. Receptor-mediated gene delivery to human peripheral blood mononuclear cells using anti-CD3 antibody coupled to polyethylenimine. *Gene Ther* **8**, 362-368, doi:10.1038/sj.gt.3301407 (2001).
- 149 Kunath, K., Merdan, T., Hegener, O., Haberlein, H. & Kissel, T. Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J Gene Med* **5**, 588-599, doi:10.1002/jgm.382 (2003).
- 150 Zhou, X. *et al.* Controlled release of PEI/DNA complexes from mannose-bearing chitosan microspheres as a potent delivery system to enhance immune response to HBV DNA vaccine. *J Control Release* **121**, 200-207, doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.018 (2007).
- 151 Cheng, W. *et al.* Delivery of a granzyme B inhibitor gene using carbamate-mannose modified PEI protects against cytotoxic lymphocyte killing. *Biomaterials* **34**, 3697-3705, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.090 (2013).
- 152 Sagara, K. & Kim, S. W. A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes. *J Control Release* **79**, 271-281 (2002).
- 153 Kunath, K., von Harpe, A., Fischer, D. & Kissel, T. Galactose-PEI-DNA complexes for targeted gene delivery: degree of substitution affects complex size and transfection

- efficiency. *J Control Release* **88**, 159-172 (2003).
- 154 Buscail, L. *et al.* First-in-man phase 1 clinical trial of gene therapy for advanced pancreatic cancer: safety, biodistribution, and preliminary clinical findings. *Mol Ther* **23**, 779-789, doi:10.1038/mt.2015.1 (2015).
- 155 Sidi, A. A. *et al.* Phase I/II marker lesion study of intravesical BC-819 DNA plasmid in H19 over expressing superficial bladder cancer refractory to bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* **180**, 2379-2383, doi:10.1016/j.juro.2008.08.006 (2008).
- 156 Illum, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* **15**, 1326-1331 (1998).
- 157 Han, H. D. *et al.* Targeted gene silencing using RGD-labeled chitosan nanoparticles. *Clin Cancer Res* **16**, 3910-3922, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0005 (2010).
- 158 Pille, J. Y. *et al.* Intravenous delivery of anti-RhoA small interfering RNA loaded in nanoparticles of chitosan in mice: safety and efficacy in xenografted aggressive breast cancer. *Hum Gene Ther* **17**, 1019-1026, doi:10.1089/hum.2006.17.1019 (2006).
- 159 Zhang, C. *et al.* Biological evaluation of N-octyl-O-sulfate chitosan as a new nano-carrier of intravenous drugs. *Eur J Pharm Sci* **33**, 415-423, doi:10.1016/j.ejps.2008.01.012 (2008).
- 160 Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L. & Alonso, M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res* **14**, 1431-1436 (1997).
- 161 Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B. & Cesaro, A. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. *Int J Pharm* **455**, 219-228, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.034 (2013).
- 162 Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Kriegelstein, J. & Kissel, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **24**, 1121-1131 (2003).
- 163 Van Woensel, M. *et al.* Development of siRNA-loaded chitosan nanoparticles targeting Galectin-1 for the treatment of glioblastoma multiforme via intranasal administration. *J Control Release* **227**, 71-81, doi:10.1016/j.jconrel.2016.02.032 (2016).
- 164 Gulati, N., Nagaich, U. & Saraf, S. A. Intranasal delivery of chitosan nanoparticles for

- migraine therapy. *Sci Pharm* **81**, 843-854, doi:10.3797/scipharm.1208-18 (2013).
- 165 Agudelo, D., Sanyakamdhorn, S., Nafisi, S. & Tajmir-Riahi, H. A. Transporting antitumor drug tamoxifen and its metabolites, 4-hydroxytamoxifen and endoxifen by chitosan nanoparticles. *PLoS One* **8**, e60250, doi:10.1371/journal.pone.0060250 (2013).
- 166 Fazil, M. *et al.* Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. *Eur J Pharm Sci* **47**, 6-15, doi:10.1016/j.ejps.2012.04.013 (2012).
- 167 Md, S. *et al.* Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: pharmacodynamic, pharmacokinetic and scintigraphy study in mice model. *Eur J Pharm Sci* **48**, 393-405, doi:10.1016/j.ejps.2012.12.007 (2013).
- 168 Kumar, M. *et al.* Evaluation of neuropeptide loaded trimethyl chitosan nanoparticles for nose to brain delivery. *Int J Biol Macromol* **61**, 189-195, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.041 (2013).
- 169 Al-Ghananeem, A. M., Saeed, H., Florence, R., Yokel, R. A. & Malkawi, A. H. Intranasal drug delivery of didanosine-loaded chitosan nanoparticles for brain targeting; an attractive route against infections caused by AIDS viruses. *J Drug Target* **18**, 381-388, doi:10.3109/10611860903483396 (2010).
- 170 Haque, S. *et al.* Venlafaxine loaded chitosan NPs for brain targeting: pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Carbohydr Polym* **89**, 72-79, doi:10.1016/j.carbpol.2012.02.051 (2012).
- 171 Trapani, A. *et al.* Methotrexate-loaded chitosan- and glycol chitosan-based nanoparticles: a promising strategy for the administration of the anticancer drug to brain tumors. *AAPS PharmSciTech* **12**, 1302-1311, doi:10.1208/s12249-011-9695-x (2011).
- 172 Wang, X., Chi, N. & Tang, X. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm* **70**, 735-740, doi:10.1016/j.ejpb.2008.07.005 (2008).
- 173 Pardridge, W. M. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol* **5**, 556-569, doi:10.3109/13550289909021285 (1999).
- 174 Vögtle F., W. E. Octopus molecules. *Angew. Chem.* **13**, 814-816 (1974).
- 175 Donald A. Tomalia, H. B., J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P.

- Smith. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules *Polymer Journal* **17**, 117-132 (1985).
- 176 Donald A. Tomalia, H. B., J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* **19**, 2466-2468, doi:10.1021/ma00163a029 (1986).
- 177 Hawker C.J., F. J. M. J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new approach to dendritic macromolecules. *J. Amer. Chem. Soc.* **21**, 7638-7647 (1990).
- 178 Bosman, A. W., Janssen, H. M. & Meijer, E. W. About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chem Rev* **99**, 1665-1688 (1999).
- 179 Majoral, J. P. & Caminade, A. M. Dendrimers containing heteroatoms (si, p, B, ge, or bi). *Chem Rev* **99**, 845-880 (1999).
- 180 Cheng, Y., Li, Y., Wu, Q., Zhang, J. & Xu, T. Generation-dependent encapsulation/electrostatic attachment of phenobarbital molecules by poly(amidoamine) dendrimers: Evidence from 2D-NOESY investigations. *Eur J Med Chem* **44**, 2219-2223, doi:10.1016/j.ejmech.2008.05.031 (2009).
- 181 Fu, F., Wen, S., Zhu, J. & Shi, X. Encapsulation of doxorubicin within lactobionic acid-modified multifunctional poly(amidoamine) dendrimers for targeted therapy of liver cancer cells. *J Control Release* **213**, e31-32, doi:10.1016/j.jconrel.2015.05.049 (2015).
- 182 Haag, R. & Vogtle, F. Highly branched macromolecules at the interface of chemistry, biology, physics, and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 272-273, doi:10.1002/anie.200320082 (2004).
- 183 D'Emanuele, A. & Attwood, D. Dendrimer-drug interactions. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 2147-2162, doi:10.1016/j.addr.2005.09.012 (2005).
- 184 Rittner, K. *et al.* New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther* **5**, 104-114, doi:10.1006/mthe.2002.0523 (2002).
- 185 Roberts, J. C., Bhalgat, M. K. & Zera, R. T. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J Biomed Mater Res* **30**, 53-65, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199601)30:1<53::AID-JBM8>3.0.CO;2-Q (1996).
- 186 Jevprasesphant, R. *et al.* The influence of surface modification on the cytotoxicity of

- PAMAM dendrimers. *Int J Pharm* **252**, 263-266 (2003).
- 187 Malik, N. *et al.* Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J Control Release* **65**, 133-148 (2000).
- 188 Haensler, J. & Szoka, F. C., Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* **4**, 372-379 (1993).
- 189 D'Emanuele, A., Jevprasesphant, R., Penny, J. & Attwood, D. The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. *J Control Release* **95**, 447-453, doi:10.1016/j.jconrel.2003.12.006 (2004).
- 190 Na, M. *et al.* Dendrimers as potential drug carriers. Part II. Prolonged delivery of ketoprofen by in vitro and in vivo studies. *Eur J Med Chem* **41**, 670-674, doi:10.1016/j.ejmech.2006.01.001 (2006).
- 191 Wang, Z. *et al.* Novel transdermal drug delivery system with polyhydroxyalkanoate and starburst polyamidoamine dendrimer. *J Biosci Bioeng* **95**, 541-543 (2003).
- 192 Vandamme, T. F. & Brobeck, L. Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. *J Control Release* **102**, 23-38, doi:10.1016/j.jconrel.2004.09.015 (2005).
- 193 Malik, N., Evagorou, E. G. & Duncan, R. Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* **10**, 767-776 (1999).
- 194 Singh, P., Gupta, U., Asthana, A. & Jain, N. K. Folate and folate-PEG-PAMAM dendrimers: synthesis, characterization, and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice. *Bioconjug Chem* **19**, 2239-2252, doi:10.1021/bc800125u (2008).
- 195 Yabbarov, N. G., Posypanova, G. A., Vorontsov, E. A., Popova, O. N. & Severin, E. S. Targeted delivery of doxorubicin: drug delivery system based on PAMAM dendrimers. *Biochemistry (Mosc)* **78**, 884-894, doi:10.1134/S000629791308004X (2013).
- 196 Zhu, S. *et al.* PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugates: in vitro evaluation and in vivo tumor accumulation. *Pharm Res* **27**, 161-174, doi:10.1007/s11095-009-9992-1 (2010).
- 197 Asthana, A., Chauhan, A. S., Diwan, P. V. & Jain, N. K. Poly(amidoamine) (PAMAM)

- dendritic nanostructures for controlled site-specific delivery of acidic anti-inflammatory active ingredient. *AAPS PharmSciTech* **6**, E536-542, doi:10.1208/pt060367 (2005).
- 198 Kukowska-Latallo, J. F. *et al.* Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res* **65**, 5317-5324, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3921 (2005).
- 199 Sato, N. *et al.* Tumor targeting and imaging of intraperitoneal tumors by use of antisense oligo-DNA complexed with dendrimers and/or avidin in mice. *Clin Cancer Res* **7**, 3606-3612 (2001).
- 200 Vincent, L. *et al.* Efficacy of dendrimer-mediated angiostatin and TIMP-2 gene delivery on inhibition of tumor growth and angiogenesis: in vitro and in vivo studies. *Int J Cancer* **105**, 419-429, doi:10.1002/ijc.11105 (2003).
- 201 Al-Jamal, K. T. *et al.* Cationic poly-L-lysine dendrimer complexes doxorubicin and delays tumor growth in vitro and in vivo. *ACS Nano* **7**, 1905-1917, doi:10.1021/nn305860k (2013).
- 202 Green, M. & Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**, 1179-1188 (1988).
- 203 Frankel, A. D. & Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189-1193 (1988).
- 204 Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. & Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1864-1868 (1991).
- 205 Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A. & Langel, U. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 99-103 (2000).
- 206 Zorko, M. & Langel, U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 529-545, doi:10.1016/j.addr.2004.10.010 (2005).
- 207 Futaki, S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 547-558, doi:10.1016/j.addr.2004.10.009 (2005).
- 208 Futaki, S., Hirose, H. & Nakase, I. Arginine-rich peptides: methods of translocation through biological membranes. *Curr Pharm Des* **19**, 2863-2868 (2013).
- 209 Khan, M. A., Wu, V. M., Ghosh, S. & Uskokovic, V. Gene delivery using calcium phosphate

- nanoparticles: Optimization of the transfection process and the effects of citrate and poly(l-lysine) as additives. *J Colloid Interface Sci* **471**, 48-58, doi:10.1016/j.jcis.2016.03.007 (2016).
- 210 Herberhold, S. *et al.* Delivery with polycations extends the immunostimulant Ribomunyl into a potent antiviral Toll-like receptor 7/8 agonist. *Antivir Ther* **16**, 751-758, doi:10.3851/IMP1822 (2011).
- 211 Mo, R. H., Zaro, J. L. & Shen, W. C. Comparison of cationic and amphipathic cell penetrating peptides for siRNA delivery and efficacy. *Mol Pharm* **9**, 299-309, doi:10.1021/mp200481g (2012).
- 212 Choi, J. S. *et al.* Enhanced transfection efficiency of PAMAM dendrimer by surface modification with L-arginine. *J Control Release* **99**, 445-456, doi:10.1016/j.jconrel.2004.07.027 (2004).
- 213 Takara, K. *et al.* Size-controlled, dual-ligand modified liposomes that target the tumor vasculature show promise for use in drug-resistant cancer therapy. *J Control Release* **162**, 225-232, doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.019 (2012).
- 214 Shahana, S., Kampf, C. & Roomans, G. M. Effects of the cationic protein poly-L-arginine on airway epithelial cells in vitro. *Mediators Inflamm* **11**, 141-148, doi:10.1080/09622935020138172 (2002).
- 215 Dinauer, N. *et al.* Intracellular tracking of protamine/antisense oligonucleotide nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transactivation. *J Control Release* **96**, 497-507, doi:10.1016/j.jconrel.2004.02.020 (2004).
- 216 Junghans, M., Kreuter, J. & Zimmer, A. Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles. *Nucleic Acids Res* **28**, E45 (2000).
- 217 Kerkmann, M. *et al.* Immunostimulatory properties of CpG-oligonucleotides are enhanced by the use of protamine nanoparticles. *Oligonucleotides* **16**, 313-322, doi:10.1089/oli.2006.16.313 (2006).
- 218 Lochmann, D. *et al.* Physicochemical characterization of protamine-phosphorothioate nanoparticles. *J Microencapsul* **21**, 625-641, doi:10.1080/02652040400000504 (2004).
- 219 Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P. H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* **1**, 841-845 (1982).

- 220 Bao, S., Thrall, B. D. & Miller, D. L. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol* **23**, 953-959 (1997).
- 221 Miller, D. L., Pislaru, S. V. & Greenleaf, J. E. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somat Cell Mol Genet* **27**, 115-134 (2002).
- 222 Nateri, A. S., Tzavelas, C., Bildirici, L. & Rickwood, D. Transfection of human peripheral blood mononuclear cells using immunoporation. *J Immunoassay Immunochem* **26**, 169-177, doi:10.1081/IAS-200062469 (2005).
- 223 Johnston, S. A., Anziano, P. Q., Shark, K., Sanford, J. C. & Butow, R. A. Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* **240**, 1538-1541 (1988).
- 224 Scherer, F. *et al.* Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* **9**, 102-109, doi:10.1038/sj.gt.3301624 (2002).
- 225 Plank, C. *et al.* The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* **384**, 737-747, doi:10.1515/BC.2003.082 (2003).
- 226 Mair, L. *et al.* Size-uniform 200 nm particles: fabrication and application to magnetofection. *J Biomed Nanotechnol* **5**, 182-191 (2009).
- 227 Yurkovetskiy, A. V. *et al.* A Polymer-Based Antibody-Vinca Drug Conjugate Platform: Characterization and Preclinical Efficacy. *Cancer Res* **75**, 3365-3372, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0129 (2015).
- 228 Koehn, S. *et al.* Cell-specific RNA interference by peptide-inhibited-peptidase-activated siRNAs. *J RNAi Gene Silencing* **6**, 422-430 (2010).
- 229 Maier, M. A. *et al.* Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Mol Ther* **21**, 1570-1578, doi:10.1038/mt.2013.124 (2013).
- 230 Nair, J. K. *et al.* Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc* **136**, 16958-16961, doi:10.1021/ja505986a (2014).
- 231 Prakash, T. P. *et al.* Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Res*

- 42, 8796-8807, doi:10.1093/nar/gku531 (2014).
- 232 Meade, B. R. *et al.* Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications. *Nat Biotechnol* **32**, 1256-1261, doi:10.1038/nbt.3078 (2014).
- 233 Kanthamneni, N., Yung, B. & Lee, R. J. Effect of Eudragit on In Vitro Transfection Efficiency of PEI-DNA Complexes. *Anticancer Res* **36**, 81-85 (2016).
- 234 Momenzadeh, S., Sadeghi, A., Vatandoust, N. & Salehi, R. Evaluation of In Vivo Transfection Efficiency of Eudragit Coated Nanoparticles of Chitosan-DNA: A pH-sensitive System Prepared for Oral DNA Delivery. *Iran Red Crescent Med J* **17**, e16761, doi:10.5812/ircmj.17(4)2015.16761 (2015).
- 235 Tenchov, B. G., MacDonald, R. C. & Siegel, D. P. Cubic phases in phosphatidylcholine-cholesterol mixtures: cholesterol as membrane "fusogen". *Biophys J* **91**, 2508-2516, doi:10.1529/biophysj.106.083766 (2006).
- 236 Dabkowska, A. P. *et al.* The effect of neutral helper lipids on the structure of cationic lipid monolayers. *J R Soc Interface* **9**, 548-561, doi:10.1098/rsif.2011.0356 (2012).
- 237 Kumar, V. *et al.* Shielding of Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery: Impact on Physicochemical Properties, Cytokine Induction, and Efficacy. *Mol Ther Nucleic Acids* **3**, e210, doi:10.1038/mtna.2014.61 (2014).
- 238 Schultheis, B. *et al.* First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* **32**, 4141-4148, doi:10.1200/JCO.2013.55.0376 (2014).
- 239 Strumberg, D. *et al.* Phase I clinical development of Atu027, a siRNA formulation targeting PKN3 in patients with advanced solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther* **50**, 76-78 (2012).
- 240 Coelho, T. *et al.* Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med* **369**, 819-829, doi:10.1056/NEJMoa1208760 (2013).
- 241 Suhr, O. B. *et al.* Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study. *Orphanet J Rare Dis* **10**, 109, doi:10.1186/s13023-015-0326-6 (2015).
- 242 Beg, M. S. *et al.* Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice

- weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* **35**, 180-188, doi:10.1007/s10637-016-0407-y (2017).
- 243 Ebrahim, A. S. *et al.* PNT2258, a novel deoxyribonucleic acid inhibitor, induces cell cycle arrest and apoptosis via a distinct mechanism of action: a new class of drug for non-Hodgkin's lymphoma. *Oncotarget* **7**, 42374-42384, doi:10.18632/oncotarget.9872 (2016).
- 244 Tolcher, A. W. *et al.* A phase 1 study of the BCL2-targeted deoxyribonucleic acid inhibitor (DNAi) PNT2258 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **73**, 363-371, doi:10.1007/s00280-013-2361-0 (2014).
- 245 Ursic-Bedoya, R. *et al.* Protection against lethal Marburg virus infection mediated by lipid encapsulated small interfering RNA. *J Infect Dis* **209**, 562-570, doi:10.1093/infdis/jit465 (2014).
- 246 Di Martino, M. T. *et al.* In vivo activity of miR-34a mimics delivered by stable nucleic acid lipid particles (SNALPs) against multiple myeloma. *PLoS One* **9**, e90005, doi:10.1371/journal.pone.0090005 (2014).
- 247 Scognamiglio, I. *et al.* Transferrin-conjugated SNALPs encapsulating 2'-O-methylated miR-34a for the treatment of multiple myeloma. *Biomed Res Int* **2014**, 217365, doi:10.1155/2014/217365 (2014).
- 248 Wilner, S. E. & Levy, M. Synthesis and Characterization of Aptamer-Targeted SNALPs for the Delivery of siRNA. *Methods Mol Biol* **1380**, 211-224, doi:10.1007/978-1-4939-3197-2_18 (2016).
- 249 Polach, K. J. *et al.* Delivery of siRNA to the mouse lung via a functionalized lipopolyamine. *Mol Ther* **20**, 91-100, doi:10.1038/mt.2011.210 (2012).
- 250 Sparks, J. *et al.* Versatile cationic lipids for siRNA delivery. *J Control Release* **158**, 269-276, doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.006 (2012).
- 251 Andreakos, E. *et al.* Amphoteric liposomes enable systemic antigen-presenting cell-directed delivery of CD40 antisense and are therapeutically effective in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* **60**, 994-1005, doi:10.1002/art.24434 (2009).
- 252 Rodriguez, W. V. *et al.* Development and antitumor activity of a BCL-2 targeted single-stranded DNA oligonucleotide. *Cancer Chemother Pharmacol* **74**, 151-166, doi:10.1007/s00280-014-2476-y (2014).

- 253 Yoon, P. O. *et al.* Self-assembled Micelle Interfering RNA for Effective and Safe Targeting of Dysregulated Genes in Pulmonary Fibrosis. *J Biol Chem* **291**, 6433-6446, doi:10.1074/jbc.M115.693671 (2016).
- 254 Fehring, V. *et al.* Delivery of therapeutic siRNA to the lung endothelium via novel Lipoplex formulation DACC. *Mol Ther* **22**, 811-820, doi:10.1038/mt.2013.291 (2014).
- 255 Eichel, A., Wittig, J., Shah-Hosseini, K. & Mosges, R. A prospective, controlled study of SNS01 (ectoine nasal spray) compared to BNO-101 (phytotherapeutic dragees) in patients with acute rhinosinusitis. *Curr Med Res Opin* **29**, 739-746, doi:10.1185/03007995.2013.800474 (2013).
- 256 Lavie, O. *et al.* A phase 1/2a, dose-escalation, safety, pharmacokinetic, and preliminary efficacy study of intraperitoneal administration of BC-819 (H19-DTA) in subjects with recurrent ovarian/peritoneal cancer. *Arch Gynecol Obstet* **295**, 751-761, doi:10.1007/s00404-017-4293-0 (2017).
- 257 Heidel, J. D. Linear cyclodextrin-containing polymers and their use as delivery agents. *Expert Opin Drug Deliv* **3**, 641-646, doi:10.1517/17425247.3.5.641 (2006).
- 258 Li, S. *et al.* Biodegradable cross-linked poly(amino alcohol esters) based on LMW PEI for gene delivery. *Mol Biosyst* **7**, 1254-1262, doi:10.1039/c0mb00339e (2011).
- 259 Gosselin, M. A., Guo, W. & Lee, R. J. Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine. *Bioconjug Chem* **12**, 989-994 (2001).
- 260 Talelli, M. *et al.* Nanobody-shell functionalized thermosensitive core-crosslinked polymeric micelles for active drug targeting. *J Control Release* **151**, 183-192, doi:10.1016/j.jconrel.2011.01.015 (2011).
- 261 Siegman, S., Truong, N. F. & Segura, T. Encapsulation of PEGylated low-molecular-weight PEI polyplexes in hyaluronic acid hydrogels reduces aggregation. *Acta Biomater* **28**, 45-54, doi:10.1016/j.actbio.2015.09.020 (2015).
- 262 Ping, Y. *et al.* Chitosan-graft-(PEI-beta-cyclodextrin) copolymers and their supramolecular PEGylation for DNA and siRNA delivery. *Biomaterials* **32**, 8328-8341, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.038 (2011).
- 263 Heidel, J. D. Cyclodextrin-containing polycations for nucleic acid delivery. *Cold Spring Harb Protoc* **2011**, 1319-1322, doi:10.1101/pdb.top066639 (2011).

- 264 Golan, T. *et al.* RNAi therapy targeting KRAS in combination with chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer patients. *Oncotarget* **6**, 24560-24570, doi:10.18632/oncotarget.4183 (2015).
- 265 Zorde Khvalevsky, E. *et al.* Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 20723-20728, doi:10.1073/pnas.1314307110 (2013).
- 266 Fewell, J. G. *et al.* Synthesis and application of a non-viral gene delivery system for immunogene therapy of cancer. *J Control Release* **109**, 288-298, doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.024 (2005).
- 267 Alvarez, R. D. *et al.* A phase II trial of intraperitoneal EGEN-001, an IL-12 plasmid formulated with PEG-PEI-cholesterol lipopolymer in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* **133**, 433-438, doi:10.1016/j.ygyno.2014.03.571 (2014).
- 268 Cryan, S. A., Holohan, A., Donohue, R., Darcy, R. & O'Driscoll, C. M. Cell transfection with polycationic cyclodextrin vectors. *Eur J Pharm Sci* **21**, 625-633, doi:10.1016/j.ejps.2004.01.001 (2004).
- 269 Talelli, M. & Hennink, W. E. Thermosensitive polymeric micelles for targeted drug delivery. *Nanomedicine (Lond)* **6**, 1245-1255, doi:10.2217/nnm.11.91 (2011).
- 270 Rijcken, C. J., Soga, O., Hennink, W. E. & van Nostrum, C. F. Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity: an attractive tool for drug delivery. *J Control Release* **120**, 131-148, doi:10.1016/j.jconrel.2007.03.023 (2007).
- 271 Rozema, D. B. *et al.* Protease-triggered siRNA delivery vehicles. *J Control Release* **209**, 57-66, doi:10.1016/j.jconrel.2015.04.012 (2015).
- 272 Keefe, S. M. *et al.* Efficacy of the nanoparticle-drug conjugate CRLX101 in combination with bevacizumab in metastatic renal cell carcinoma: results of an investigator-initiated phase I-IIa clinical trial. *Ann Oncol* **27**, 1579-1585, doi:10.1093/annonc/mdw188 (2016).
- 273 Rozema, D. B. *et al.* Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12982-12987, doi:10.1073/pnas.0703778104 (2007).
- 274 Schneider, B. *et al.* Targeted siRNA Delivery and mRNA Knockdown Mediated by Bispecific Digoxigenin-binding Antibodies. *Mol Ther Nucleic Acids* **1**, e46,

- doi:10.1038/mtna.2012.39 (2012).
- 275 Wooddell, C. I. *et al.* Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Mol Ther* **21**, 973-985, doi:10.1038/mt.2013.31 (2013).
- 276 Ablasser, A. *et al.* Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes. *J Immunol* **182**, 6824-6833, doi:10.4049/jimmunol.0803001 (2009).
- 277 Schlee, M. *et al.* Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* **31**, 25-34, doi:10.1016/j.immuni.2009.05.008 (2009).
- 278 BioGPS. Gene Expression RIG-I (2016). <http://biogps.org> (abgerufen am 17.04.2016).
- 279 Szabo, A. *et al.* TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner. *Immunol Cell Biol* **92**, 671-678, doi:10.1038/icb.2014.38 (2014).
- 280 Szabo, A. & Rajnavolgyi, E. Collaboration of Toll-like and RIG-I-like receptors in human dendritic cells: tRIGgering antiviral innate immune responses. *Am J Clin Exp Immunol* **2**, 195-207 (2013).
- 281 Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531, doi:10.1126/science.1093616 (2004).
- 282 Coch, C. *et al.* Higher activation of TLR9 in plasmacytoid dendritic cells by microbial DNA compared with self-DNA based on CpG-specific recognition of phosphodiester DNA. *J Leukoc Biol* **86**, 663-670, doi:10.1189/jlb.0509314 (2009).
- 283 Scheel, B. *et al.* Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. *Eur J Immunol* **34**, 537-547, doi:10.1002/eji.200324198 (2004).
- 284 Pali-Scholl, I. *et al.* Protamine nanoparticles with CpG-oligodeoxynucleotide prevent an allergen-induced Th2-response in BALB/c mice. *Eur J Pharm Biopharm* **85**, 656-664, doi:10.1016/j.ejpb.2013.03.003 (2013).
- 285 Berger, M. *et al.* TLR8-driven IL-12-dependent reciprocal and synergistic activation of NK cells and monocytes by immunostimulatory RNA. *J Immunother* **32**, 262-271,

- doi:10.1097/CJl.0b013e318198bd2a (2009).
- 286 Coch, C. *et al.* A human in vitro whole blood assay to predict the systemic cytokine response to therapeutic oligonucleotides including siRNA. *PLoS One* **8**, e71057, doi:10.1371/journal.pone.0071057 (2013).
- 287 Lienenklaus, S. *et al.* Novel reporter mouse reveals constitutive and inflammatory expression of IFN-beta in vivo. *J Immunol* **183**, 3229-3236, doi:10.4049/jimmunol.0804277 (2009).
- 288 Gonzalez-Carmona, M. A. *et al.* CD40ligand-expressing dendritic cells induce regression of hepatocellular carcinoma by activating innate and acquired immunity in vivo. *Hepatology* **48**, 157-168, doi:10.1002/hep.22296 (2008).
- 289 Guarda, G. *et al.* Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* **34**, 213-223, doi:10.1016/j.immuni.2011.02.006 (2011).
- 290 Dassler-Plenker, J. *et al.* RIG-I activation induces the release of extracellular vesicles with antitumor activity. *Oncoimmunology* **5**, e1219827, doi:10.1080/2162402X.2016.1219827 (2016).
- 291 Hagmann, C. A. *et al.* RIG-I detects triphosphorylated RNA of *Listeria monocytogenes* during infection in non-immune cells. *PLoS One* **8**, e62872, doi:10.1371/journal.pone.0062872 (2013).
- 292 McNaughton, B. R., Cronican, J. J., Thompson, D. B. & Liu, D. R. Mammalian cell penetration, siRNA transfection, and DNA transfection by supercharged proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6111-6116, doi:10.1073/pnas.0807883106 (2009).
- 293 Man, N., Chen, Y., Zheng, F., Zhou, W. & Wen, L. P. Induction of genuine autophagy by cationic lipids in mammalian cells. *Autophagy* **6**, 449-454, doi:10.4161/auto.6.4.11612 (2010).
- 294 Mo, R. H., Zaro, J. L., Ou, J. H. & Shen, W. C. Effects of Lipofectamine 2000/siRNA complexes on autophagy in hepatoma cells. *Mol Biotechnol* **51**, 1-8, doi:10.1007/s12033-011-9422-6 (2012).
- 295 Park, J. S., Surendran, S., Kamendulis, L. M. & Morral, N. Comparative nucleic acid transfection efficacy in primary hepatocytes for gene silencing and functional studies. *BMC Res Notes* **4**, 8, doi:10.1186/1756-0500-4-8 (2011).

- 296 Tousignant, J. D. *et al.* Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum Gene Ther* **11**, 2493-2513, doi:10.1089/10430340050207984 (2000).
- 297 Tousignant, J. D. *et al.* DNA sequences in cationic lipid:pDNA-mediated systemic toxicities. *Hum Gene Ther* **14**, 203-214, doi:10.1089/10430340360535760 (2003).
- 298 Glas, M. *et al.* Targeting the cytosolic innate immune receptors RIG-I and MDA5 effectively counteracts cancer cell heterogeneity in glioblastoma. *Stem Cells* **31**, 1064-1074, doi:10.1002/stem.1350 (2013).
- 299 Zhou, J. *et al.* PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing. *Chem Commun (Camb)*, 2362-2364, doi:10.1039/b601381c (2006).
- 300 Pavan, G. M. *et al.* PAMAM dendrimers for siRNA delivery: computational and experimental insights. *Chemistry* **16**, 7781-7795, doi:10.1002/chem.200903258 (2010).
- 301 Mohri, K. *et al.* Self-assembling DNA dendrimer for effective delivery of immunostimulatory CpG DNA to immune cells. *Biomacromolecules* **16**, 1095-1101, doi:10.1021/bm501731f (2015).
- 302 Poth, J. M. *et al.* Monocyte-mediated inhibition of TLR9-dependent IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells questions bacterial DNA as the active ingredient of bacterial lysates. *J Immunol* **185**, 7367-7373, doi:10.4049/jimmunol.1001798 (2010).
- 303 Perez, A. P., Romero, E. L. & Morilla, M. J. Ethylenediamine core PAMAM dendrimers/siRNA complexes as in vitro silencing agents. *Int J Pharm* **380**, 189-200, doi:10.1016/j.ijpharm.2009.06.035 (2009).
- 304 Nel, A. E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* **8**, 543-557, doi:10.1038/nmat2442 (2009).
- 305 Hornung, V. *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**, 4531-4537 (2002).
- 306 Krug, A. *et al.* Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* **31**, 3026-3037, doi:10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3026::AID-IMMU3026>3.0.CO;2-H (2001).

- 307 Kumagai, Y. *et al.* Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* **27**, 240-252, doi:10.1016/j.immuni.2007.07.013 (2007).
- 308 Luthman, H. & Magnusson, G. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res* **11**, 1295-1308 (1983).
- 309 Bachmann, M. F., Kopf, M. & Marsland, B. J. Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol* **6**, 159-164, doi:10.1038/nri1776 (2006).
- 310 Randolph, G. J., Angeli, V. & Swartz, M. A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* **5**, 617-628, doi:10.1038/nri1670 (2005).
- 311 Brownell, J. *et al.* Direct, interferon-independent activation of the CXCL10 promoter by NF-kappaB and interferon regulatory factor 3 during hepatitis C virus infection. *J Virol* **88**, 1582-1590, doi:10.1128/JVI.02007-13 (2014).
- 312 Brownell, J. *et al.* Independent, parallel pathways to CXCL10 induction in HCV-infected hepatocytes. *J Hepatol* **59**, 701-708, doi:10.1016/j.jhep.2013.06.001 (2013).
- 313 Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257 (1972).
- 314 Fiers, W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* **285**, 199-212 (1991).
- 315 Wan, J. M., Fogt, F., Bistran, B. R. & Istan, N. W. Evaluation of antitumor effect of tumor necrosis factor in terms of protein metabolism and cell cycle kinetics. *Am J Physiol* **265**, C365-374 (1993).
- 316 Watanabe, N. *et al.* Antitumor effect of tumor necrosis factor against various primarily cultured human cancer cells. *Jpn J Cancer Res* **76**, 1115-1119 (1985).
- 317 Greten, T. F., Wang, X. W. & Korangy, F. Current concepts of immune based treatments for patients with HCC: from basic science to novel treatment approaches. *Gut* **64**, 842-848, doi:10.1136/gutjnl-2014-307990 (2015).
- 318 Rougier, P., Mitry, E. & Clavero-Fabri, M. C. Chemotherapy and medical treatment of hepatocellular carcinoma (HCC). *Hepatogastroenterology* **45 Suppl 3**, 1264-1266 (1998).

- 319 Greten, T. F., Manns, M. P. & Malek, N. [Sorafenib for the treatment of HCC--the beginning of a new era in the treatment of HCC]. *Z Gastroenterol* **47**, 55-60, doi:10.1055/s-0028-1109067 (2009).
- 320 Sanoff, H. K., Chang, Y., Lund, J. L., O'Neil, B. H. & Dusetzina, S. B. Sorafenib Effectiveness in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncologist*, doi:10.1634/theoncologist.2015-0478 (2016).
- 321 Vogt, A. *et al.* Improving immunotherapy of hepatocellular carcinoma (HCC) using dendritic cells (DC) engineered to express IL-12 in vivo. *Liver Int* **34**, 447-461, doi:10.1111/liv.12284 (2014).
- 322 Romagne, F. & Vivier, E. Natural killer cell-based therapies. *F1000 Med Rep* **3**, 9, doi:10.3410/M3-9 (2011).
- 323 Vivier, E. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**, 44-49, doi:10.1126/science.1198687 (2011).
- 324 Stylianopoulos, T. EPR-effect: utilizing size-dependent nanoparticle delivery to solid tumors. *Ther Deliv* **4**, 421-423, doi:10.4155/tde.13.8 (2013).
- 325 Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **65**, 271-284 (2000).
- 326 Maeda, H., Sawa, T. & Konno, T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J Control Release* **74**, 47-61 (2001).
- 327 Kubler, K. *et al.* Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells. *Cancer Res* **70**, 5293-5304, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0825 (2010).
- 328 Forsbach, A. *et al.* Impact of delivery systems on siRNA immune activation and RNA interference. *Immunol Lett* **141**, 169-180, doi:10.1016/j.imlet.2011.10.001 (2012).
- 329 Lee, J. M., Yoon, T. J. & Cho, Y. S. Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy. *Biomed Res Int* **2013**, 782041, doi:10.1155/2013/782041 (2013).

- 330 Hochheiser, K. *et al.* Cutting Edge: The RIG-I Ligand 3pRNA Potently Improves CTL Cross-Priming and Facilitates Antiviral Vaccination. *J Immunol* **196**, 2439-2443, doi:10.4049/jimmunol.1501958 (2016).
- 331 Mocellin, S., Lens, M. B., Pasquali, S., Pilati, P. & Chiarion Sileni, V. Interferon alpha for the adjuvant treatment of cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev* **6**, CD008955, doi:10.1002/14651858.CD008955.pub2 (2013).
- 332 Olsen, E. A. Interferon in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Ther* **16**, 311-321 (2003).
- 333 Rouanet, I., Lechiche, C., Doncesco, R., Mauboussin, J. M. & Sotto, A. Interferon therapy for Kaposi sarcoma associated with acquired immunodeficiency syndrome: still a valid treatment option? *AIDS Patient Care STDS* **27**, 537-538, doi:10.1089/apc.2013.0184 (2013).
- 334 Sabel, M. S. & Sondak, V. K. Pros and cons of adjuvant interferon in the treatment of melanoma. *Oncologist* **8**, 451-458 (2003).
- 335 Coman, H. G., Herta, D. C. & Nemes, B. Psychiatric Adverse Effects Of Interferon Therapy. *Clujul Med* **86**, 318-320 (2013).
- 336 Jankovic, S. Renal adverse effects of interferon-alpha. *Drug Saf* **28**, 647 (2005).
- 337 Teragawa, H., Hondo, T., Amano, H., Hino, F. & Ohbayashi, M. Adverse effects of interferon on the cardiovascular system in patients with chronic hepatitis C. *Jpn Heart J* **37**, 905-915 (1996).
- 338 Hirsh, V. *et al.* Randomized phase III trial of paclitaxel/carboplatin with or without PF-3512676 (Toll-like receptor 9 agonist) as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **29**, 2667-2674, doi:10.1200/JCO.2010.32.8971 (2011).
- 339 Manegold, C. *et al.* A phase III randomized study of gemcitabine and cisplatin with or without PF-3512676 (TLR9 agonist) as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* **23**, 72-77, doi:10.1093/annonc/mdr030 (2012).
- 340 Weber, J. S. *et al.* Randomized phase 2/3 trial of CpG oligodeoxynucleotide PF-3512676 alone or with dacarbazine for patients with unresectable stage III and IV melanoma. *Cancer* **115**, 3944-3954, doi:10.1002/cncr.24473 (2009).

- 341 Duewell, P. *et al.* RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8(+) T cells. *Cell Death Differ* **21**, 1825-1837, doi:10.1038/cdd.2014.96 (2014).
- 342 Ellermeier, J. *et al.* Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res* **73**, 1709-1720, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3850 (2013).
- 343 Bunt, S. K., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J. & Ostrand-Rosenberg, S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol* **176**, 284-290 (2006).
- 344 Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162-174, doi:10.1038/nri2506 (2009).
- 345 van den Boorn, J. G. & Hartmann, G. Turning tumors into vaccines: co-opting the innate immune system. *Immunity* **39**, 27-37, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.011 (2013).
- 346 Timasheff, S. N. Water as ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochemistry* **31**, 9857-9864 (1992).
- 347 Braun, C. S. *et al.* Structure/function relationships of polyamidoamine/DNA dendrimers as gene delivery vehicles. *J Pharm Sci* **94**, 423-436, doi:10.1002/jps.20251 (2005).
- 348 Esfand, R. & Tomalia, D. A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today* **6**, 427-436 (2001).
- 349 Tomalia, D. A. Interview: An architectural journey: from trees, dendrons/dendrimers to nanomedicine. Interview by Hannah Stanwix. *Nanomedicine (Lond)* **7**, 953-956, doi:10.2217/nnm.12.81 (2012).
- 350 Tomalia, D. A., Brothers, H. M., 2nd, Piehler, L. T., Durst, H. D. & Swanson, D. R. Partial shell-filled core-shell tecto(dendrimers): a strategy to surface differentiated nano-clefts and cusps. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5081-5087, doi:10.1073/pnas.062684999 (2002).
- 351 Soto-Castro, D., Cruz-Morales, J. A., Ramirez Apan, M. T. & Guadarrama, P. Solubilization and anticancer-activity enhancement of Methotrexate by novel dendrimeric nanodevices synthesized in one-step reaction. *Bioorg Chem* **41-42**, 13-21, doi:10.1016/j.bioorg.2012.01.002 (2012).

- 352 Duncan, R. & Izzo, L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 2215-2237, doi:10.1016/j.addr.2005.09.019 (2005).
- 353 Kobayashi, H. & Brechbiel, M. W. Dendrimer-based macromolecular MRI contrast agents: characteristics and application. *Mol Imaging* **2**, 1-10 (2003).
- 354 Nwe, K., Bryant, L. H., Jr. & Brechbiel, M. W. Poly(amidoamine) dendrimer based MRI contrast agents exhibiting enhanced relaxivities derived via metal preligation techniques. *Bioconjug Chem* **21**, 1014-1017, doi:10.1021/bc1000802 (2010).
- 355 Zhang, L. *et al.* RGD-modified PEG-PAMAM-DOX conjugates: in vitro and in vivo studies for glioma. *Eur J Pharm Biopharm* **79**, 232-240, doi:10.1016/j.ejpb.2011.03.025 (2011).
- 356 Han, L., Huang, R., Liu, S., Huang, S. & Jiang, C. Peptide-conjugated PAMAM for targeted doxorubicin delivery to transferrin receptor overexpressed tumors. *Mol Pharm* **7**, 2156-2165, doi:10.1021/mp100185f (2010).
- 357 Urbiola, K. *et al.* Evaluation of improved PAMAM-G5 conjugates for gene delivery targeted to the transferrin receptor. *Eur J Pharm Biopharm* **94**, 116-122, doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.007 (2015).
- 358 Mukherjee, S. P. & Byrne, H. J. Polyamidoamine dendrimer nanoparticle cytotoxicity, oxidative stress, caspase activation and inflammatory response: experimental observation and numerical simulation. *Nanomedicine* **9**, 202-211, doi:10.1016/j.nano.2012.05.002 (2013).
- 359 Kolhatkar, R. B., Kitchens, K. M., Swaan, P. W. & Ghandehari, H. Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability. *Bioconjug Chem* **18**, 2054-2060, doi:10.1021/bc0603889 (2007).
- 360 X. Shi, W. L., *et al.*, . Comprehensive Characterization of surface-functionalized poly(amidoamine) dendrimers with acetamide, hydroxyl, and carboxyl groups, A: Physicochem. Eng. Aspects *Colloids and Surfaces* **272** 139-150 doi:10.1016 (2005).
- 361 Jevprasesphant, R., Penny, J., Attwood, D., McKeown, N. B. & D'Emanuele, A. Engineering of dendrimer surfaces to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity. *Pharm Res* **20**, 1543-1550 (2003).
- 362 Fant, K. *et al.* Effects of PEGylation and acetylation of PAMAM dendrimers on DNA binding, cytotoxicity and in vitro transfection efficiency. *Mol Pharm* **7**, 1734-1746,

doi:10.1021/mp1001312 (2010).

363 Gurbuz, M. U. *et al.* Cytotoxicity and biodistribution studies on PEGylated EDA and PEG cored PAMAM dendrimers. *J Biomater Sci Polym Ed* **27**, 1645-1658, doi:10.1080/09205063.2016.1226044 (2016).

364 Kulhari, H. *et al.* Trastuzumab-grafted PAMAM dendrimers for the selective delivery of anticancer drugs to HER2-positive breast cancer. *Sci Rep* **6**, 23179, doi:10.1038/srep23179 (2016).

8 Online-Literaturverzeichnis

BioGPS. (2016). Von Gene Expression Toll-like receptor 7, 51284, Gene Atlas U133A, gcrma. abgerufen

National Nanotechnology Initiative. (2016). Von What is so special about Nanoscale?: <http://www.nano.gov/nanotech-101/special> abgerufen

9 Danksagung

Auch wenn dieser Teil am Ende meiner Doktorarbeit steht, ist er doch einer der wichtigsten Abschnitte. Denn hier habe ich die Gelegenheit ein großes DANKE auszusprechen, an all die Menschen, die mich während dieser Zeit inhaltlich und persönlich unterstützt haben.

Allen voran gilt meine größte Dankbarkeit meinem Betreuer Prof. Dr. Gunther Hartmann, der mir die Möglichkeit gegeben hat, im Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie im Bereich der Grundlagenforschung unter seiner Leitung zu arbeiten und mich weiterzuentwickeln. Seine persönliche und wissenschaftliche Förderung, sein Vertrauen in meine Arbeit und seine Begeisterungsfähigkeit haben mich sehr geprägt und mir sehr viel bedeutet. Vielen Dank.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Alf Lamprecht bedanken. Seine Ratschläge, Ideen und Hilfestellungen besonders für den pharmazeutischen Teil meiner Arbeit, haben mir sehr geholfen. Daneben hat Prof. Lamprecht auch die Begutachtung meiner Arbeit übernommen, was immer viel Zeit und Arbeit kostet. Ich weiß das sehr zu schätzen und möchte mich hierfür auch vielmals bedanken.

Aber die wahrscheinlich intensivsten Diskussionen hatte ich mit meinem Post-Doc Dr. Christoph Coch, der mich während meiner gesamten Doktorandenzeit betreut hat. Wir haben zusammen unzählige Ideen entworfen, die teilweise neue Erkenntnisse brachten oder auch zu neuen Ideen umgewandelt wurden. Ich bin sehr dankbar für seine enorme Hilfsbereitschaft, seinen Enthusiasmus und seine menschliche Persönlichkeit.

Neben den Betreuern sind es aber oft die Kollegen, die einem in schlechten Tagen zur Seite stehen und die schönen Erlebnisse (z.B. die Verfärbung einer ELISA Platte) mit einem feiern. Ich hatte das Glück so viele liebe und hilfsbereite Kollegen zu haben, die teilweise auch neben der Arbeit zu guten Freunden wurden. Ein ganz besonderer Dank gilt Christine Schuberth-Wagner, Marcel Renn, Anna-Maria Herzner, Bastian Putschli, Silke Lambing, Christina Engels, Jan Phillip Stümpel und Christopher Jakobs. Daneben möchte ich besonders Jasper van den Boorn danken, durch den ich mein komplettes tierexperimentelles Wissen erlangt habe, was mir bei den unzähligen *in vivo* Arbeiten enorm weitergeholfen hat.

Zum Schluss möchte ich noch ein großes Danke an all die lieben „Fachfremden“ aussprechen, die mir in allen erdenklichen Situationen zur Seite gestanden haben. Meinem Mann Jan danke ich besonders für sein Verständnis für meine Arbeit und das offene Ohr, auch wenn du den Inhalt wohl selten wirklich verstanden hast. Aber gerade dieser außenstehende Rat, den du mir so oft geben konntest, war so unglaublich hilfreich.

Liebe Mama, Tina, Lena und Oma: Danke für eure Hilfsbereitschaft, euren Rückhalt und besonders den Zuspruch auf dem gesamten Weg meiner Arbeit. Dass du Papa immer bei mir warst, habe ich

jederzeit gespürt. Danke.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anna Morlin Schwickart-Halbe, an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Ich erkläre zudem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Bonn, März 2018