

**Gerichteter nicht-viraler Gentransfer in die Leber:
Evaluation biophysikalischer Verfahren am Lebermodell**

Von Tamara Lena Möglich

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Gerichteter nicht-viraler Gentransfer in die Leber:
Evaluation biophysikalischer Verfahren am Lebermodell**

von Tamara Lena Möglich

aus Limburg/ Lahn

München 2016

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

**Arbeit angefertigt in der Abteilung Molekulare Pädiatrie des
Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München
Mentor: Dr. Søren Gersting**

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Tag der Promotion:

16. Juli 2016

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	I
2	Einleitung.....	1
2.1	Genetische Erkrankungen	1
2.2	Gentherapie.....	4
2.2.1	Virale Gentherapie	6
2.2.2	Nicht-Virale Gentherapie.....	7
2.2.2.1	Elektroporation.....	7
2.2.2.2	Mikroinjektion	10
2.2.2.3	Gene Gun.....	10
2.2.2.4	Kalzium-Phosphat Präzipitation	11
2.2.2.5	Magnetofektion.....	12
2.2.2.6	Lipofektion und Polyfektion	13
2.2.2.7	Ultraschall-assistierter Gentransfer mit Microbubbles.....	14
2.2.2.8	Nicht-virale Gentherapieverfahren: Ausblick.....	15
2.2.3	Die Leber als Zielorgan gentherapeutischer Verfahren	16
2.2.3.1	Leberaufbau.....	17
2.2.4	Gentherapie leberbasierter Erkrankungen	19
2.3	Zielsetzung.....	22
3	Material und Methoden	24
3.1	Laborgeräte	24
3.2	Verbrauchsmaterial.....	25
3.3	Mäuse.....	26
3.4	Chemikalien/Medien.....	26
3.5	Puffer.....	28
3.6	Zellkultur.....	29
3.6.1	HUVEC.....	29
3.6.2	HepG2.....	29
3.6.3	Kokultur	30
3.6.4	Lichtmikroskopie	30
3.6.5	Immunfluoreszenz.....	31
3.6.6	Konfokalmikroskopie.....	31
3.6.7	CellTiter-Glo Assay.....	32
3.6.8	Isolation primärer muriner Hepatozyten	32

3.6.9	Aussaat primärer muriner Hepatozyten.....	34
3.7	Plasmidvektor.....	35
3.8	<i>Intelligent particles</i> als Genföhren	35
3.9	Konstruktion des Halbach-Arrays.....	37
3.10	Aufbau einer Flusskammer als Lebermodell	38
3.11	Durchföh rung der Flussversuche.....	39
3.11.1	Abhängigkeit der Partikelretention von der Zeit.....	40
3.11.2	Abhängigkeit der Partikelretention von der Feldstärke	41
3.11.3	Abhängigkeit der Partikelretention von der Flussgeschwindigkeit.....	42
3.11.4	Validierung der Partikelstabilität.....	42
3.11.4.1	Abhängigkeit der Partikelstabilität von der Scherkraft	42
3.11.4.2	Abhängigkeit der Partikelstabilität von der Zeit.....	43
3.12	Programme.....	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Etablierung einer HUVEC/HepG2 Kokultur	45
4.1.1	Etablierung konfluenter Zelllayer	45
4.1.2	Medienoptimierung	46
4.1.3	Etablierung der Kokultur	49
4.2	Physikalische Charakterisierung unterschiedlicher Magnettypen und Magnetanordnungen 50	
4.3	Validierung der Partikelretention.....	53
4.3.1	Abhängigkeit der Partikelretention von der Zeit.....	53
4.3.2	Abhängigkeit der Partikelretention von der Feldstärke	57
4.3.3	Abhängigkeit der Partikelretention von der Flussgeschwindigkeit.....	60
4.3.4	Validierung der Partikelstabilität.....	62
4.3.4.1	Abhängigkeit der Partikelstabilität von der Scherkraft	62
4.3.4.2	Abhängigkeit der Partikelstabilität von der Zeit.....	64
4.4	Transfektionseffizienz.....	67
4.5	Isolation primärer muriner Hepatozyten	68
4.6	Aussaat primärer muriner Hepatozyten.....	70
5	Diskussion.....	73
5.1	Die Flusskammer als Lebermodell.....	73
5.2	Partikelretention im Magnetfeld.....	75
5.3	Partikelstabilität in der Flusskammer	77
6	Ausblick.....	80

7	Zusammenfassung.....	83
8	Summary.....	85
9	Abkürzungsverzeichnis.....	87
10	Abbildungsverzeichnis.....	91
11	Tabellenverzeichnis.....	93
12	Literaturverzeichnis.....	94
13	Danksagung.....	107

2 Einleitung

2.1 Genetische Erkrankungen

Die WHO unterscheidet bei Erkrankungen mit genetischem Hintergrund vier große Komplexe¹:

Chromosomal basierte Erkrankungen beruhen auf Veränderungen in der Anzahl oder dem Aufbau von Chromosomen. Beispiele für solche Chromosomenaberrationen sind das Down-Syndrom (Trisomie 21), das Edwards-Syndrom (Trisomie 18) oder das Klinefelter-Syndrom (Karyotyp 47, XXY statt 46, XY). Das Down-Syndrom ist die häufigste Form mentaler Retardation, verursacht durch dreifaches Vorliegen des Chromosoms 21 oder Teilen davon (Megarbane et al. 2009). Das Syndrom ist schon Tausende von Jahren bekannt, erst 1866 wurde es nach Langdon-Down benannt. Der chromosomale Hintergrund konnte erst 1959 gezeigt werden (Lejeune, Turpin et al. 1959). Erkrankte weisen mentale Retardation, Dismorphologien an Gesicht und Extremitäten, ebenso wie Anomalien des Herzens und des Gastrointestinaltrakts auf (Antonarakis, Epstein 2006). Das Edwards-Syndrom entsteht durch das komplette oder partielle dreifache Vorliegen des Chromosoms 18. Die Erkrankung führt in aller Regel zum vorzeitigen Verlust des Fötus oder Tod unmittelbar nach der Geburt (Edwards, Harnden et al. 1960). Patienten, die nicht innerhalb der ersten Lebenswochen oder -monate versterben, weisen eine reduzierte Lebenserwartung auf, die auch von der medizinischen Versorgung abhängt (Carter, Pearn et al. 1985; Janvier and Watkins 2013). Patienten mit Klinefelter-Syndrom besitzen ein zusätzliches X-Chromosom (XXY), das zu Störungen in der Ausprägung der männlichen Geschlechtsmerkmale, einer Veränderung der Körperproportionen sowie Unfruchtbarkeit führen kann (Jacobs and Strong 1959).

Den zweiten Komplex nach der Einteilung der WHO bilden die **monogenen Erkrankungen**. Definiert sind diese als Krankheitsbilder, die auf den Ausfall oder die Veränderung eines Genes zurückzuführen sind. Bekannte Beispiele solcher Erkrankungen sind Zystische Fibrose (CF, cystic fibrosis oder auch Mukoviszidose), Phenylketonurie oder Hämophilie A (Faktor VIII-Mangel).

¹ <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index.html>, abgerufen am 10.02.14

Zystische Fibrose wird autosomal rezessiv vererbt und entsteht durch den Ausfall eines epithelialen Chlorid-Ionen-Kanals, der durch das Gen *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) kodiert wird. In der Folge weisen die Sekrete aller exokrinen Drüsen einen zu geringen Wassergehalt auf. Die Folge sind unter anderem Lungenobstruktionen durch dickflüssiges Bronchialsekret, das chronische Infektionen der Lungen begünstigt und intestinale Malabsorption durch fehlende Sekretion von Verdauungsflüssigkeiten aus Pankreas und Leber (Sears, Gartman et al. 2011, Kumar et al. 2014, Sawczak et al. 2015).

Phenylketonurie beruht in ca. 98% der Fälle auf einem Defekt der Phenylalaninhydroxylase (PAH), die für die enzymatische Hydroxilierung von Phenylalanin zu Tyrosin verantwortlich ist. In 2% der Fälle liegt ein Defekt der Biosynthese von BH_4 vor, des Kofaktors der PAH. Durch den Defekt der PAH kommt es zu einem Überschuss an Phenylalanin und zu einem Mangel an Tyrosin, der eine Störung in der Synthese von Neurotransmittern wie Dopamin oder des Pigments Melanin zur Folge hat (Muntau, Beblo, Koletzko 2000). Klinisch manifestiert sich die Erkrankung ohne adäquate Therapie mit schwersten Entwicklungsstörungen und motorisch-neurologischen Defekten (Mitchell and Scriver 1993; Blau, van Spronsen et al. 2010; Harding and Blau 2010). Als molekularer Mechanismus des mutationsbedingten Defekts der PAH konnte eine Fehlfaltung des Proteins identifiziert werden (Pey et al. 2004; Gersting, Kemter et al. 2008), die Phenylketonurie konnte so als Modellerkrankung für andere Krankheitsbilder beschrieben werden, die ebenfalls auf der Fehlfaltung mit einhergehendem Funktionsverlust eines Proteins beruhen (Muntau und Gersting 2010).

Hämophilie A entsteht durch einen Ausfall des Gerinnungsfaktors VIII (Pavlovsky 1947). Die Bedeutung des Faktors VIII wurde dabei erst durch die Entdeckung der Gerinnungskaskade klar (Macfarlane 1964). In der Folge kommt es zu einer erhöhten Blutungsneigung sowie längeren Blutungszeiten bis zum Einsetzen der Blutgerinnung (Zimmerman and Valentino 2013). Die klassische Therapie beruht auf der Gabe des fehlenden Gerinnungsfaktors (Ljung 2013; Thompson 2013), gentherapeutische Ansätze werden ebenfalls verfolgt (VandenDriessche, Collen et al. 2001; Van Damme, Chuah et al. 2003; Thorrez, VandenDriessche et al. 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Transplantation von sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) zur Korrek-

tur der Hämophilie A im Mausmodell führt (Kumaran, Benten et al. 2005; Follenzi, Benten et al. 2008).

Die dritte Gruppe von Erkrankungen mit genetischem Hintergrund sind in der Einteilung der WHO nicht-übertragbare Krankheiten wie zum Beispiel Krebs, Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Asthma. Bei all diesen so verschiedenen Erkrankungen wird entweder eine genetische Ursache oder das Vorhandensein genetischer Risikofaktoren vermutet oder konnte teilweise schon nachgewiesen werden (Gluckman et al. 2009, Wang et al. 2013, Ortiz und Barnes 2015). Ziel der Forschung ist unter anderem eine Nutzung dieser Daten zur Abwägung der genetischen Disposition eines Patienten für das mögliche Auftreten einer Erkrankung, um rechtzeitig präventiv agieren zu können.

Die letzte Gruppe im Schema der WHO bilden die übertragbaren Erkrankungen wie HIV, Tuberkulose oder Malaria. Bei dieser Gruppe ist nicht zwingend ein genetischer Hintergrund wie im Fall der monogenen Erkrankungen gegeben, bei denen der Ausfall eines Genes zu einer Erkrankung führt. Als genetischer Hintergrund wird hier die Tatsache aufgefasst, dass für viele dieser Erkrankungen Therapieoptionen mit einem genetischen Bezug aufgezeigt werden konnten. Ein aktuelles Beispiel dafür ist die nicht mehr nachweisbare HIV-Infektion eines HIV-positiven Patienten nach einer Knochenmarktransplantation im Rahmen der Behandlung einer akuten myeloischen Leukämie. Die Spenderzellen besaßen eine Deletion im CCR5-Gen ($CCR5\Delta32$), das für einen Rezeptor kodiert, der vom HI-Virus als Co-Rezeptor genutzt wird. In der Folge konnten keine Viren in Geweben des Patienten nachgewiesen werden, der sogenannte Berliner Patient kann also bei aller Vorsicht nach mehrjähriger Nachverfolgung als geheilt angesehen werden (Hutter, Nowak et al. 2009). Als Konsequenz wird aktuell an einer Anwendung dieser Rezeptor-Deletion gearbeitet, um bei bereits infizierten Patienten eine Eradikation des Virus oder zumindest eine deutliche Senkung der Viruslast zu erreichen (Mitsuyasu 2013).

Bei aller Verschiedenheit und Komplexität der Krankheitsmechanismen bietet die Genetik für viele Erkrankungen Therapieoptionen, auch wenn diese nicht in jedem Fall kurativ sind, also zu einer vollständigen Korrektur des zu Grunde liegenden Defekts führen.

2.2 Gentherapie

Die Idee, Erkrankungen mittels einer Gentherapie zu korrigieren, basiert auf dem Erkenntnis, dass monogene Erkrankungen auf den Ausfall oder die Veränderung eines einzelnen Gens zurückzuführen sind. Beispiele für gentherapeutische Ansätze bei monogenen Erkrankungen sind Cystische Fibrose (Super 1992), Phenylketonurie (Eisensmith, Woo 1996) und Hämophilie A (De Brasi et al. 1996).

Die Hypothese war, dass durch die Korrektur dieses Gens monogene Erkrankungen heilbar sein könnten (Gottschalk, Chan 1998). Die erste Studie im Patienten wurde 1989 genehmigt (Ezzell 1989; Gershon 1990). Mit der Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Isolation, Analyse und Modifizierung von Nukleinsäuren waren die Grundlagen geschaffen, um diese Hypothesen *in vitro* und *in vivo* auf ihre Realisierbarkeit hin zu überprüfen (Eisensmith, Woo 1996). Als Gentherapie bezeichnet man die Veränderung von Genen oder das Einbringen neuer Gene in einen Organismus zur Behandlung einer Erkrankung². Die Deutsche Gesellschaft für Gentherapie e.V. unterscheidet dabei drei Ansätze: Die Substitutionstherapie ersetzt oder korrigiert fehlerhafte Gene im Rahmen einer monogenetischen Erkrankung. Die Additionstherapie erhöht die physiologische Genfunktion, um zum Beispiel bei einer Krebserkrankung die Aktivierung körpereigener Abwehrmechanismen zu unterstützen. Die Suppressionstherapie schließlich soll das Herunterregeln einer pathologisch erhöhten Genaktivität ermöglichen, denkbar ist hier eine Anwendung bei Trisomien, bei denen vermutet wird, dass die zu beobachtenden Krankheitsbilder auch auf einem Gendosis-Effekt beruhen (Gardiner 2004).

Das optimale Gentransfersystem sollte das therapeutische Genmaterial zu einem hohen prozentualen Anteil erkrankter Zellen transportieren können. Diese genetische Modifikation sollte möglichst dauerhaft sein. Dabei sollte die Toxizität auf den Organismus auf ein Minimum beschränkt bleiben (Brunetti-Pierri 2008).

Alle aktuellen Ansätze beschränken sich dabei in Europa und den USA auf die Korrektur in somatischen Zellen, die Veränderung von Zellen der Keimbahn wird aus ethischen Gründen abgelehnt. In Deutschland verbietet das Embryonenschutzgesetz in § 5 aus-

² <http://www.dg-gt.de/gen-therapie/was-ist-gen-therapie>, abgerufen am 05.10.15

drücklich die Veränderung des Erbgutes von menschlichen Keimbahnzellen. Außerdem verstößt die Veränderung von Keimbahnzellen gegen das im Grundgesetz garantierte Recht auf Selbstbestimmung.

Die gängige systematische Einteilung bei gentherapeutischen Ansätzen erfolgt auf Grund der Art der Übertragung der Nukleinsäure sowie dem Ort der Therapie (Felgner 1997). Bei der *in vivo* Therapie erfolgt die Korrektur im Organismus, die *in situ* Anwendung bezieht sich auf die Anwendung der Therapie im Zielgewebe. Wird *ex vivo* therapiert, geschieht dies außerhalb des Organismus, ein Beispiel ist die Entnahme von hämatopoetischen Stammzellen, deren Korrektur und anschließende Reperfusion in den Patienten. Die *in vitro* Therapie bezeichnet eine Technik, die außerhalb des Organismus, in Zellkultur stattfindet. Bei der Art der Übertragung der therapeutischen Nukleinsäuren kann grundsätzlich zwischen viralen und nicht-viralen Transfersystemen unterschieden werden.

2.2.1 Virale Gentherapie

Für die virale Gentherapie nutzt man die Fähigkeit von Viren, Nukleinsäuren mit großer Effizienz in Zellen transportieren zu können. Bei einer Vielzahl von in der Literatur als potenziell nutzbar beschriebenen Viren haben sich einige Gruppen von Viren als besonders geeignet gezeigt, um als therapeutische Genfähren eingesetzt zu werden.

Der Auswahl eines Vektorsystems geht die Frage voraus, welche Eigenschaften für eine erfolgreiche Therapie gefordert sind. Für eine transiente Therapie mit viralen Vektoren, die extra-chromosomal vorliegen, würde man sich entscheiden, wenn nur ein kurzzeitiger Effekt gewünscht ist, zum Beispiel bei einer Tumorthherapie, wo nach der Zerstörung der entarteten Zellen keine therapeutischen Konstrukte mehr benötigt werden. Für eine monogenetische Erkrankung soll das Genprodukt möglichst langfristig exprimiert werden. Bei Hämophilie A wäre also die Verwendung eines Vektors sinnvoll, der sich stabil in das Genom integriert und so Faktor VIII dauerhaft exprimiert.

Die Vorteile viraler Vektorsysteme zeigen sich vor allem in der hohen Effizienz der Transfektion (Wang, Li, Ma, Steinhoff 2013). Die größten Hürden des viralen Transfersystems ergeben sich einerseits aus methodischen Nachteilen wie einen teilweise geringen Zelltropismus. Andererseits können unerwünschte Nebenwirkungen wie Immunreaktionen des Organismus oder eine Kanzerogenität durch Insertion des therapeutischen Gens in kodierende Abschnitte des Genoms entstehen. Eine weitere Gefahr stellt eine mögliche Rekombination des therapeutischen Virus mit Wildtypviren dar (Wang, Li, Ma, Steinhoff 2013; Pathak, Patnaik, Gupta 2009). Ebenso treten virusspezifische Nachteile auf (Kamimura and Liu 2008). So erfordert die Verwendung eines retroviralen Vektors das Vorhandensein sich teilender Zellen, dem zum Beispiel eine Teilhepatektomie voraus gehen muss, um die Teilung der Hepatozyten zu fördern (Branchereau, Calise, Ferry 1994). Adenovirale Vektoren induzieren eine Immunreaktion, die zur Zerstörung der transduzierten Zellen führen kann (Marshall 1999). Dasselbe Problem tritt auch bei Adenovirus-assoziierten Vektoren auf, die zudem eine geringe Beladungskapazität aufweisen.

2.2.2 Nicht-Virale Gentherapie

Aufgrund der bestehenden Nachteile viraler Vektorsysteme, insbesondere in Bezug auf die Anwendungssicherheit, werden alternative Strategien für den Gentransfer erforscht. Sicherheitsaspekte bei Anwendung viraler Genvektoren spielen beispielsweise bei der Phenylketonurie oder der Hämophilie A eine besondere Rolle, da für diese Erkrankungen effiziente therapeutische Ansätze existieren. Hier ist das Risiko-Nutzen-Verhältnis einer viralen Gentherapie im Vergleich zur symptomatischen Therapie zu hoch.

Die Vorteile des nicht-viralen Gentransfers sind neben einer höheren relativen Sicherheit (Brunetti-Pierri 2008), die Möglichkeit, größere Gene zu transportieren und die Existenz einfacher Verfahren zur Herstellung nicht-viraler Genvektorkomplexe. Demgegenüber stehen die Nachteile nicht-viraler Vektorsysteme wie eine zumeist geringe Transfektionseffizienz und daraus folgend eine geringe Transgenexpression (Wang, Li, Ma, Steinhoff 2013; Mellott, Forrest et al. 2013), sowie eine generell geringe episodische Stabilität der therapeutischen Gene. Folglich liegt ein großer Fokus der Forschung auf der Entwicklung sicherer und effizienter Verfahren für den nicht-viralen Gentransfer.

Nicht-virale Gentransfermethoden lassen sich in zwei Kategorien unterteilen (Kamimura, Suda, Zhang, Liu 2011): Zum einen werden chemische Gentransfermethoden wie die Verwendung verschiedener kationischer Liposomen, Polymere, Proteine und synthetischer Peptide angewandt. Physikalische Methoden zum anderen bedienen sich mechanischer Drücke, elektrischer Impulse oder hydrodynamischer Kräfte, um eine transiente Permeabilität der Zellmembran zu erreichen und so das therapeutische Gen in die Zelle zu transferieren. Im Folgenden werden verschiedene nicht-virale Gentransfersysteme vorgestellt:

2.2.2.1 Elektroporation

Unter Elektroporation oder Elektropermeabilisation versteht man die Depolarisation der Zellmembran durch kurze (wenige Millisekunden dauernde) Stromstöße im Kilovoltbereich. Man unterscheidet zwischen reversibler und irreversibler Elektroporation. Bei der reversiblen Elektroporation kommt es zur Ausbildung von neuen Membran-

poren, die eine Stoffaufnahme in die Zelle ermöglichen (Sugar and Neumann 1984; Weaver 1995). Danach verschließen sich die Poren jedoch wieder. Diese Art der Elektroporation wird schon seit gut 30 Jahren *in vitro* zur Transfektion verwendet (Küvetten). Der hohen Transfektionsrate der Methode steht ein nicht unerheblicher Stress für die Zellen entgegen (Potter 1988). Mittlerweile sind allerdings auch Anwendungen *in vivo* beschrieben, die das mögliche Anwendungsspektrum deutlich erweitern. Die Verstärkung des chemotherapeutischen Effekts von Zytotoxinen im Rahmen einer kombinierten Elektrochemotherapie von Tumoren (Gehl and Mir 2000; Kis et al. 2011; Wang, Jiang et al. 2014 ; Yang, Li et al. 2014) wurde bereits mehrfach gezeigt. Dabei werden aktuell zahlreiche Ansätze beschrieben, die vor allem mit der Übertragung von DNA im Rahmen einer DNA-Vakzinierung vielversprechende Anwendungsgebiete aufzeigen (Khawaja, Buronfosse et al. 2012; Kumar, Nyakundi et al. 2013). Die reversible Elektroporation kommt in jüngster Zeit in Kombination mit bildgebender Magnetresonanztomographie zum Einsatz (Kranjc et al. 2015)(Abb.2).

Die irreversible Elektroporation (IRE) findet Anwendung in der lokalen Ablation von Tumorgewebe, da die Depolarisation der Zellmembran zum Zelltod der Tumorzellen führt, ähnlich dem natürlichen Prozess der Apoptose. Hierbei werden Nadelelektroden (Nanoknife™, AngioDynamics, New York, USA) perkutan um den Tumor platziert und dieser einer Reihe von Elektropulsen ausgesetzt (Valerioa et al. 2014; Scheffer et al. 2014)(Abb. 1). Die mögliche Reduzierung von Nebenwirkungen im Vergleich zu thermischen Verfahren (HIFU, Kryoablation) werden derzeit noch diskutiert (Wagstaff, et al. 2014).

Anstelle der Nadelelektroden wurden in Tierversuchen planare unfokussierte Schallköpfe direkt auf das Zielorgan, zum Beispiel die Leberoberfläche aufgelegt und dadurch erfolgreich Plasmide in Hepatozyten transportiert (Song et al. 2012; Noble et al. 2013).

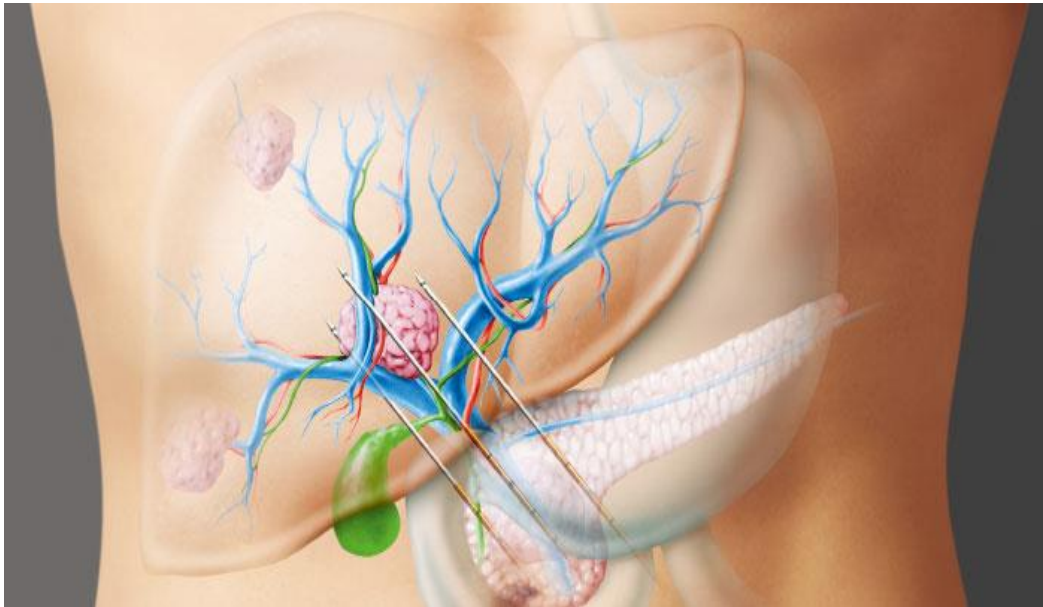


Abb. 1 Positionierung von Nadelsonden um eine von drei Lebermetastasen zur Ablation von Tumorgewebe mittels irreversibler Elektroporation (Privatklinikgruppe Hirslanden)



Abb. 2 Elektroporation mittels Nadelsonden unter CT-Kontrolle (Deutsche Akademie für Mikrotherapie-DAfMT)

2.2.2.2 Mikroinjektion

Bei der Mikroinjektion werden zum Einbringen von Nukleinsäuren oder Plasmidvektoren direkt in die Zelle Mikromanipulatoren und eine extrem dünne Glaskapillare genutzt (Abb.3). Zum Einsatz kommt das Verfahren beispielsweise bei der Generierung transgener Tiere, erstmals vor über 50 Jahren beschrieben (Lin 1966). Auch heute wird dieser Ansatz verwendet, um transgene Mäuse und inzwischen auch Schweine zu generieren (Brem et al. 1985, Wolf et al. 2010). Die Injektion kann in das Zytoplasma (Li et al. 2014) oder den Pronukleus bzw. Nukleus erfolgen (Hasegawa et al. 2014, Ohtsuka 2014). Da jedoch die Anwendung dieser Technik auf die Manipulation einzelner Zellen beschränkt ist, erfolgt diese vor allem bei Oozyten, die wiederum in der Gentherapie auf Grund der Ablehnung der Therapie von Keimbahnzellen keine Rolle spielen.

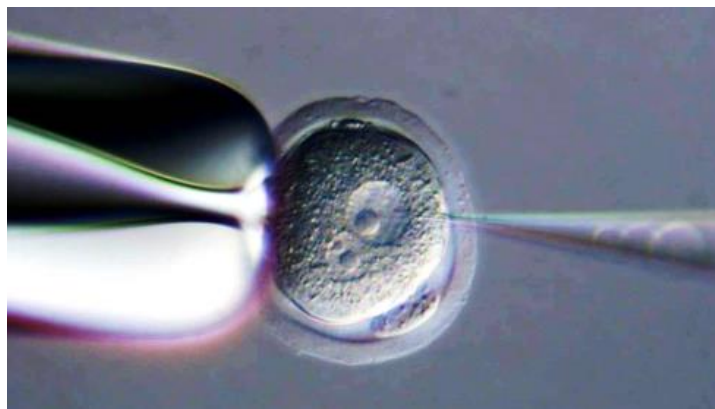


Abb. 3 *Microinjektion in den Zellkern*
http://www.med.upenn.edu/cores/transgenic_and_chimeric_mouse_facility.shtml, abgerufen am 05.10.2015

2.2.2.3 Gene Gun

Der Nukleinsäure-Transfer mittels Gene Gun (Abb.4) ist eine ballistische Methode, bei der Nanopartikel aus (Edel-)Metall als Projektil mit therapeutischer DNA beladen werden und dann in Gewebe geschossen werden (Sanford, Klein et al. 1987). Der apparative Aufwand sowie die physikalischen Begleiterscheinungen der Methode beschränken die Anwendbarkeit im klinischen Bereich weitgehend auf Ansätze in der DNA-Immunisierung (Wang and Lu 2013), es überwiegen Applikationen zum Gentransfer in Pflanzen (Davies, Deroles et al. 2013; Gao and Nielsen 2013; Vuorinen, Nieminen et al. 2013; Sparks and Jones 2014).



Abb. 4 Gene Gun, Helios[®] Gene Gun System (BIO-RAD)
<http://www.bio-rad.com/de-de/product/helios-gene-gun-system>, abgerufen am 05.10.2015

2.2.2.4 Kalzium-Phosphat Präzipitation

Die Kalzium-Phosphat Präzipitation erlaubt das instrumentell und methodisch einfache und kosteneffiziente Einbringen von DNA in kultivierte Zellen *in vitro*. Die Methode wurde bereits 1973 erstmals beschrieben und stellt damit eine der ältesten Methoden für den gerichteten Transfer von Nukleinsäuren in Zellen dar (Graham, van der Eb 1973). Die DNA komplexiert bei der Mischung mit Kalziumchlorid und Natriumphosphat mit dem ausfallenden Kalziumphosphat. Gibt man diese Lösung auf die kultivierten Zellen, wird das DNA-/ Kalziumphosphat-Präzipitat von den Zellen durch Endozytose aufgenommen (Chen, Okayama 1988; Sambrook, Russell 2006); deshalb ist die Anwendbarkeit der Technik auf adhärente Zellen beschränkt (Schenborn, Goiffon 2000). Neben der relativ geringen Transfektionseffizienz von 10-30% stellt die Zytotoxizität des Kalziumphosphats eine entscheidende Hürde bezüglich des *in vivo* Einsatzes der Kalziumphosphat Präzipitation dar, auch wenn vereinzelt *in vivo*-Ansätze beschrieben wurden (Dubensky, Campbell et al. 1984; Benvenisty, Reshef 1986).

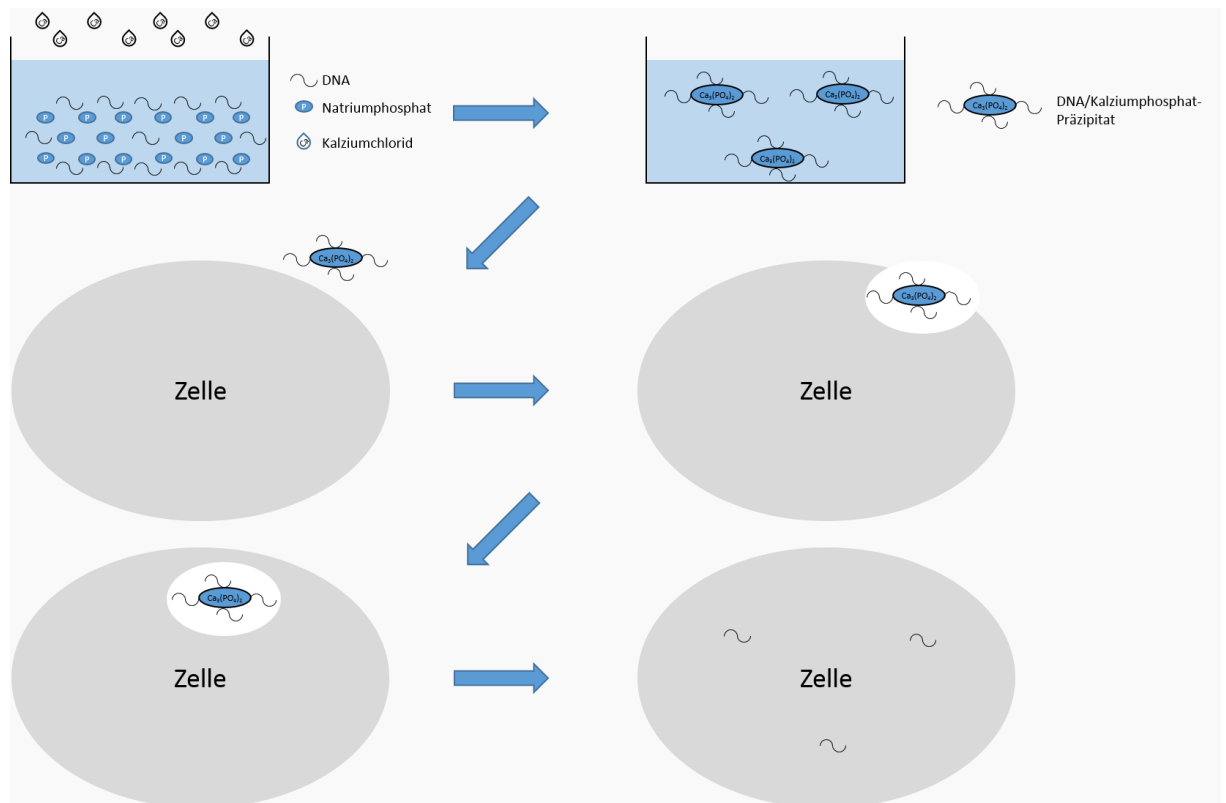


Abb. 5 Schematischer Ablauf der Kalzium-Phosphat-Transfektion

2.2.2.5 Magnetofektion

Die Magnetofektion ist eine sehr junge, aber vielversprechende Technik (Plank, Scherer, et al. 2000; Scherer, Anton et al. 2002; Plank et al. 2011). Genutzt werden dabei superparamagnetische Nanopartikel, an die Vektoren oder Nukleinsäuren gebunden sind. Meist werden Partikel aus Eisenoxid mit Polymeren wie beispielsweise Polyethylenimin konjugiert. Diese positiv geladenen Partikel können über elektrostatische Interaktion negativ geladene DNA binden. Zusätzlich ist ein weiteres Beladen mit zellspezifischen Rezeptorliganden (Blessing et al. 2001; Ogris et al. 2003; Sun et al. 2005; Lepenies et al. 2013;) oder einer schützenden und stabilisierenden Lipidhülle (Wang et al. 2013) möglich. Durch das Induzieren von Magnetfeldern können die beladenen Partikel dann *in vivo* in das Zielgewebe gesteuert werden (Krotz, de Wit et al. 2003; Plank, Scherer et al. 2003; Plank, Schillinger et al. 2003). Nach der Aufnahme der Partikel durch die Zelle mittels Endo- oder Pinozytose (Huth, Lausier et al. 2004; Meijering et al. 2009; El-Sayed and Harashima 2013; Islam et al. 2014) erfolgt die Freisetzung der DNA, die Partikel selbst werden endosomal gespeichert und in den zytosolischen Eisenstoff-

wechsel eingespeist (Gersting, Schillinger et al. 2004; Huth, Lausier et al. 2004; Laurentt, Sapet et al. 2011).

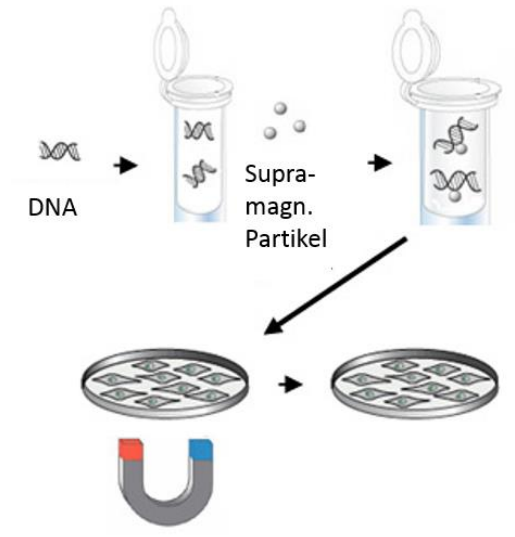


Abb. 6 Schematische Darstellung der Magnetofektion
geändert nach: <http://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/chemical-viral-based-transfection-methods>, abgerufen am 05.10.2015

Als Vorteile der Methode sind unter anderem eine hohe Transfektionseffizienz, die den Einsatz kleiner Mengen DNA erlaubt, die Anwendbarkeit in den unterschiedlichsten Zell- und Gewebetypen, die Unabhängigkeit von Serum sowie die geringe Zytotoxizität³ zu nennen.

2.2.2.6 Lipofektion und Polyfektion

Liposomen können ebenfalls für den Transfer von DNA in Zellen genutzt werden. Sie bestehen aus einer oder mehreren Lipid-Doppelmembranen, in der Regel aus Phospholipiden (Felgner et al. 1987; Koynova and Tenchov 2011). Die kationischen Vesikel besitzen einen positiven Ladungsüberschuss, wodurch sie mit negativ geladener DNA einen Komplex bilden, der Lipoplex genannt wird. Der Zelleintritt der DNA geschieht bei der Lipofektion nach der Fusion der DNA-haltigen Liposomen mit der Zellmembran (Zhdanov, Podobed et al. 2002; Sambrook and Russell 2006). Die Bildung der Vesikel im

³ <http://www.promokine.info/products/cell-transfection/magnet-assisted-transfection>, abgerufen am 06.03.14

Rahmen der Herstellung von *intelligent particles* geschieht dabei spontan als salzinduzierte Aggregation. Physikalische Grundlage der Ausbildung der Vesikel sind die Ladungsverteilung der polaren Lipide und die Minimierung der Oberflächenspannung, wodurch sich die räumliche Struktur der Vesikel ausbildet (Sessa and Weissmann 1968).

Bei Verwendung von, meist kationischen, Polymeren wird DNA zu sogenannten Polyplexen komplexiert. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Polymere, die hierbei zur Anwendung kommen. Am besten untersucht sind Poly-L-Lysin, lineare oder verzweigte Polymere aus Polyethylenimin (PEI) und sogenannte Dendrimere als globuläre Polymere aus sich wiederholenden und zentral verbundenen Monomeren (Martinho et al. 2014). In den intrazellulären Mechanismen der DNA-Aufnahme scheinen dabei Unterschiede zwischen Lipo- und Polyplexen zu bestehen (Midoux, Breuzard et al. 2008).

2.2.2.7 Ultraschall-assistierter Gentransfer mit Microbubbles

Als eine der neuesten Evolutionsstufen der nicht-viralen bzw. physikalischen Gentransfer-Methoden wurde die Verwendung von Ultraschall und Microbubbles beschrieben (Cool, Geers et al. 2013; Omata et al. 2015). Microbubbles (Mikroblasen) wurden eigentlich als Kontrastmittel in der Sonografie entwickelt. Die Mikrobläschen oszillieren durch die Ultraschallbehandlung. Ab einer spezifischen Energiemenge kollabieren die Bläschen (Kavitation). Geschieht dies in unmittelbarer Nähe einer Zellmembran, wird die Lipiddoppelschicht durch den Kavitationsdruck perforiert. Hieraus wurde eine Methode entwickelt, durch ultraschallgesteuerte Kavitation Plasmide in die Zellen zu transferieren (Miller, Pislaru et al. 2002). Im Jahr 2006 wurde ein Ansatz beschrieben, bei dem der Gentransfer eines Fluoreszenzreporters in humane Endothelzellen mit einem Kontrastmittel und Ultraschallbestrahlung, Kontrastmittel ohne Ultraschallbestrahlung und Ultraschallbestrahlung ohne Kontrastmittel verglichen wurde. Bei der Verwendung von SonoVue[®] (Bracco Imaging, Niederlande), einem Kontrastmittel für die Sonografie von Gefäßen und inneren Organen in Kombination mit einer gezielten Ultraschallbestrahlung konnte eine signifikante Erhöhung der Transfektionsrate gegenüber der Gruppe ohne SonoVue[®] beobachtet werden. Dabei war die Vitalität der verwendeten Endothelzellen nicht nachhaltig beeinträchtigt (Nie, Xu et al. 2006). Of-

fenbar zerstören die Schockwellen der zerplatzenden Bläschen die Zellen nicht, sondern perforieren lediglich temporär die Zellmembran, es wird also kein ausgeprägter Zellschaden verursacht. Immer mehr Ansätze wurden seitdem beschrieben, bei denen die nutzbaren Zell- und Gewebetypen permanent erweitert wurden, neben den bereits erwähnten Epithelzellen wurden als Zielzellen unter anderem murine Achillessehnen (Delalande, Bureau et al. 2010) oder Speicheldrüsen (Passineau, Zourelis et al. 2010) beschrieben. Ein Ansatz beschreibt den Gentransfer von humanem EGF mit Microbubbles in die murine Leber nach intrahepatischer Transplantation von Inselzellen (Shimoda, Chen et al. 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Gentransfer die Vaskularisierung der transplantierten Inselzellen signifikant verbessert. Viele Untersuchungen zu den physikalischen Rahmenbedingungen des Ultraschall-assistierten Gentransfers mit Microbubbles haben zur Verbesserung der Protokolle beigetragen (Rahim, Taylor et al. 2006 (A); Rahim, Taylor et al. 2006 (B); Zhou, Kumon et al. 2009; Wells 2010). Die Verwendung von gebündeltem Ultraschall in Verbindung mit MR-basierender Bildgebung (HIFU, high intensity focused ultrasound) erlaubte erstmals die millimetergenaue Applikation des Ultraschalls bei gleichzeitiger bildgebender Überwachung des Zielgewebes. Die ersten klinischen Anwendungen erfolgten allerdings nicht auf dem Gebiet der Gentherapie, sondern als Methode zur nicht-invasiven Entfernung von Gewebe durch Erhitzen mittels Ultraschall speziell in der Krebstherapie (Yang, Sanghvi et al. 1993). Obwohl die zu Grunde liegende Technik der Bündelung von Ultraschallwellen bereits vor mehr als einem halben Jahrhundert beschrieben wurde (Lynn, Zwemer et al. 1942), stellte erst die Kombination mit dem MRT die nötige Technik bereit, um die gebündelten Schallwellen gezielt und kontrolliert *in vivo* einzusetzen. Dazu wurde die Ultraschalltechnik in den Positionierungstisch integriert, auf dem der Patient im MRT positioniert wird. Die MRT-Technik wurde dabei genutzt, um das zu bestrahlende Gewebe zu lokalisieren, außerdem konnte das MRT genutzt werden, um die Temperatur des Zielgewebes und benachbarter Gewebeareale zu überwachen, um so eine räumliche Begrenzung des Behandlungsfeldes zu garantieren.

2.2.2.8 Nicht-virale Gentherapieverfahren: Ausblick

Viele der hier vorgestellten Techniken sind aktuell nur *ex vivo* anwendbar oder zeigen nur dort eine ausreichend hohe Transfektionseffizienz, sind nur für eine relativ geringe

Zellzahl durchführbar und/oder führen zu starkem negativem Stress für die Zellen. Diese Einschränkungen könnten kompensiert werden, indem man verschiedene Techniken kombiniert. So führte die Verwendung von Lipo- oder Polyplexen in Kombination mit superparamagnetischen Nanopartikeln zu einer Steigerung der Effizienz des Gentransfers (Gersting et al. 2004). Eine weitere Entwicklung könnte die Verwendung einer Kombination aus Ultraschall-Kontrastmitteln mit Magnetresonanztomographie und hocheffizienten nicht-viralen Genvektorkomplexen darstellen. Die Kontrastmittel bilden Mikroblasen, die durch Sonifizierung mittels eines gerichteten Ultraschallimpulses im Blutgefäß zum Platzen gebracht werden können, um so die mittels gerichteter Magnetfelder positionierten therapeutischen Nanopartikel gezielt in das gewünschte Gewebe transferieren zu können (Rahim, Taylor et al. 2006; Delalande, Postema et al. 2012; Rudd, Pichon et al. 2012; Vlaskou, Plank et al. 2013). Solche *intelligent particles* wären aus mehreren funktionalen Einheiten aufgebaut, die kombiniert appliziert werden. Dabei spielen beispielsweise Liposomen für die Stabilisierung der Partikel und den *endosomal escape* Mechanismus eine Rolle und Eisenoxid-Partikel ermöglichen eine magnetgesteuerte Akkumulation der Partikel im Zielgewebe. Eine weitere Anpassung kann das Verwenden zell- oder gewebespezifischer Rezeptorliganden auf der Partikeloberfläche sein, was zu einem zellspezifischen Gentransfer führt und damit Effizienz und Sicherheit des Therapieansatzes verbessert (Wu, et al. 1991; Lim et al. 2000; Plank et al. 1992; Ong et al. 2013). Die Applikation solcher *intelligent particles* für den nicht-viralen Gentransfer in die Leber erfordert geeignete experimentelle Systeme zur Entwicklung der Methodik bis zur Anwendung in vivo.

2.2.3 Die Leber als Zielorgan gentherapeutischer Verfahren

Die besondere Bedeutung der Leber in der Gentherapie hängt mit der zentralen Stellung des Organs zusammen. Viele Stoffwechselprozesse finden in der Leber statt oder sind leberassoziiert. Mit 1-1,5 kg stellt die Leber das größte menschliche Stoffwechselorgan dar. Als größte exokrine Drüse des Körpers bildet die Leber Gallenflüssigkeit, die wichtig für den Abbau von Nahrungsfetten ist. Vier Grundfunktionen der Leber können unterschieden werden:

Speicherfunktion: Die Leber kann unter anderem überschüssige Glukose im Blut umwandeln und in Form von Glykogen speichern. Außerdem speichert die Leber die lipophilen Vitamine A, D, E und B12 (Dancygier and Allescher 2003).

Synthesefunktion: Viele Schritte zentraler Stoffwechselwege, wie beispielsweise des Aminosäurestoffwechsels oder des Harnstoffzyklus, finden ausschließlich oder hauptsächlich in der Leber statt. Plasmaproteine wie Albumin oder Globuline werden in der Leber synthetisiert, lediglich γ -Globuline werden von Plasmazellen sezerniert. Außerdem synthetisiert die Leber Akute-Phase-Proteine, die Bestandteile des Komplementsystems, verschiedene Proteasehemmer wie α 1-Antitrypsin oder das C-reaktive Protein (CRP). Zusätzlich bildet die Leber Gerinnungsfaktoren wie den Faktor VIII sowie Antithrombin III. Darüber hinaus ist die Leber Haupt-Syntheseort für verschiedene Lipoproteine wie VLDL und HDL oder Wachstumsfaktoren wie IGF (Horn, Armbruster et al. 2009).

Biotransformation: Die Leber transformiert im Rahmen der Detoxifikation körpereigene Stoffe; dazu gehören Bilirubin als Abbauprodukt des Hämoglobins, steroidale Hormone sowie die Gallensäuren. Außerdem kann die Leber die Wirkung bzw. Wirksamkeit von Medikamenten durch Umbauvorgänge wie z.B. Reduktion, Oxidation, Hydrolyse oder Methylierung ändern (Rosenfeld and Loose 2007).

Immunregulation: Die Leber kann periphere Toleranz induzieren, indem sie Antigene so prozessiert, dass diese vom Immunsystem nicht als körperfremd erkannt werden. Dies kann durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie die hepatischen Kupffer-Zellen geschehen, die als gewebespezifische Makrophagen dienen. Andere Leberzellen wie hepatische dendritische Zellen oder sinusoidale Endothelzellen können ebenfalls T-Zellen aktivieren oder immunologische Toleranz induzieren (Bottcher, Knolle et al. 2011).

2.2.3.1 Leberaufbau

Der Anteil der jeweiligen Zellart wird im Folgenden als prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl angegeben. Etwa 60-65% des Lebervolumens entfallen auf Hepatozyten (HC), 15-20% auf leber-sinusoidale Endothelzellen (LSEC), 8-12% auf Kupffer-Zellen, 3-8% auf Ito-Zellen und unter 2% auf Pit-Zellen (Koop 2002).

Sinusoidale Endothelzellen bilden das Endothel der Lebersinusoide. Sie trennen den sinusoidalen Blutstrom von den parenchymalen Hepatozyten. Da jedoch eine Basalmembran fehlt und das sinusoidale Endothel fenestriert ist, können Hepatozyten beispielsweise mit Lymphozyten interagieren (Crispe 2011). LSEC sind immunologisch aktiv und können regulativ auf T-Zellen wirken (Knolle and Gerken 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Gerinnungsfaktor VIII in den sinusoidalen Endothelzellen der Leber gebildet wird (Kumaran, Benten et al. 2005).

Kupffer-Zellen sind leberspezifische Makrophagen. Sie wandern mit dem Blutstrom aus dem Knochenmark in die Leber, etablieren sich dort und reifen aus. Neben ihrer klassischen Funktion, der unspezifischen Abwehr über Phagozytose, sezernieren aktivierte Kupffer-Zellen im Rahmen einer Immunantwort Zytokine. Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α führt zu einer Aktivierung der Hepatozyten, die mit der massiven Produktion von Akute Phase Proteinen reagieren (Gordon and Koj 1985). Zusätzlich werden phagozytierte Erreger durch die Kupffer-Zellen prozessiert und über MHC Klasse II-Rezeptoren auf der Zelloberfläche präsentiert, wodurch sie CD4⁺ T-Zellen aktivieren können (Murphy, Travers et al. 2012).

Ito-Zellen sind im Dissé-Raum zwischen sinusoidalem Endothel und Parenchym zu finden und werden auch als hepatische Sternzellen oder *hepatic stellate cells* (HSC) bezeichnet. Neben Lipiden speichern sie auch Vitamin A. Im Rahmen eines fibrotischen Umbaus der Leber spielen HSC eine wichtige Rolle, da sie große Mengen extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagen bilden können (Bataller and Brenner 2005).

Pit-Zellen können als leberspezifische natürliche Killerzellen (NK-Zellen) andere Zellen gezielt abtöten. Sie reagieren dabei auf die verminderte Expression von MHC-Molekülen in bakteriell oder viral infizierten oder entarteten Zellen und induzieren die Apoptose dieser Zellen (Parker and Picut 2012). Pit-Zellen sind im Lumen der Sinusoide lokalisiert, wo sie Endothel und Kupffer-Zellen anhaften (Parker and Picut 2005).

Hepatozyten bilden das Parenchym der Leber. Der Großteil des Lebervolumens und ihres Gewichtes geht auf Hepatozyten zurück. Die Regenerationsfähigkeit der Leber wird ebenfalls durch die Hepatozyten getragen. Nach einer Schädigung der Leber führen die durch Kupffer-Zellen und HSCs sezernierten Zytokine zu einer zeitlich begrenzten Proliferation der Hepatozyten, die sich normalerweise im Zellzyklus-Arrest (G₀-

Phase) befinden (Fausto, Campbell et al. 2006). Unabhängig von dieser besonderen Fähigkeit werden untergehende Hepatozyten permanent ersetzt (Zimmermann 2002; Shackel 2010). Die Lebensdauer von Hepatozyten liegt bei maximal 180 Tagen, nach einem Jahr ist das Leberparenchym komplett durch neue Zellen ersetzt worden.

Dank der Variabilität der Rezeptoren und Oberflächenproteine der verschiedenen Zelltypen, die in der Leber gefunden werden können, ergeben sich diverse Möglichkeiten, nicht nur einen leber- sondern auch einen zellgerichteten Transfer von Plasmiden oder Medikamenten durch zu führen (Reddy and Couvreur 2011).

2.2.4 Gentherapie leberbasierter Erkrankungen

Für viele leberbasierte Erkrankungen konnten bereits erfolgreiche Ansätze für eine Gentherapie gezeigt werden, sowohl mit viralen als auch nicht-viralen Transfertechniken. Für die Phenylketonurie (PKU) als eine der bekanntesten angeborenen metabolischen Erkrankungen der Leber wurden bereits mehrere virale Therapieansätze etabliert, vor allem mit adenoviralen Vektoren (Fang, Eisensmith et al. 1994) oder mit Vektoren auf der Basis adenoassoziierter Viren (Mochizuki, Mizukami et al. 2004; Oh, Lee et al. 2005; Jung, Park et al. 2008; Yagi, Ogura et al. 2011). Dabei konnten auch Korrekturen des Phänotyps erreicht werden, die für mehrere Monate bis zu einem Jahr stabil waren. In der Therapie der Hämophilie A und B wurden ebenfalls erfolgreich virale Vektoren eingesetzt. Neben den adenoviralen Vektoren (Zhang, Josephs et al. 1999; Thorrez, VandenDriessche et al. 2004) konnten dabei auch mit adenoassozierten Vektoren (Arruda, Stedman et al. 2010; Markusic and Herzog 2012) oder retroviralen Konstrukten (Van Damme, Chuah et al. 2003) Therapieerfolge erzielt werden.

Jedoch liegt aus Gründen der Sicherheit gerade für Erkrankungen mit etablierten Therapieverfahren der Fokus auf der Etablierung nicht-viraler Gentherapiemethoden mit verbessertem Sicherheitsprofil. In einem Versuch an einem Rattenmodell wurde gezeigt, dass der durch polykationische Liposomen vermittelte lebergerichtete Transfer des Gens, welches für Extracelluläre Superoxid Dismutase (EC-SOD) kodiert, zu einem 55fachen Anstieg der Expression von EC-SOD führt. Die Erhöhung der Enzymfunktion konnte sowohl im Serum als auch in den Zellen nachgewiesen werden. So konnten die Hepatozyten signifikant vor akuter Schädigung, ausgelöst durch Lipopolysaccharide

und G-Galactosamin, geschützt werden (Wu et al. 2004). Ebenso wurde ein erfolgreicher rezeptorligandenvermittelter Gentransfer in einem analbuminämischen Rattenmodell gezeigt (Wu et al. 1991). Hier wurde ein Konjugat aus Asialoorosomukoid (Glykoprotein), Poly-L-Lysin und einem Plasmid für humanes Serumalbumin hergestellt. Dieses Konjugat bindet nach intravenöser Gabe an den von Hepatozyten präsentierten Asialoglykoproteinrezeptor, sodass es zu einem zellspezifischen Gentransfer kommt. Die Expression humanen Albumins konnte über 4 Wochen im Serum der Ratten nachgewiesen werden.

Eine Kombination von intravenös applizierten Genfähren mit Elektroporation *in vivo* verbessert das schlechte Penetrationsvermögen von Plasmiden durch Zellmembranen (Sakai et al. 2005). Hier konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Genexpression an den Stellen in der Leber auftrat, an denen die Stromimpulse angesetzt waren. Auch stellte sich heraus, dass die systemische Applikation des Transfektionsreagenz der lokalen Injektion in das Leberparenchym vorzuziehen ist (Kamimura and Liu 2008). Des Weiteren konnte eine Korrektur des Phänotyps in Mauslinien, die ein korrektes Abbild humaner Erkrankungen widerspiegeln, gezeigt werden. Im Jahr 2006 konnte erstmals der Transfer von cDNA für Faktor VIII durch Elektroporation *in vivo* in Mäusen durchgeführt werden und somit eine phänotypische Korrektur dieser an Hämophilie erkrankten Mäuse erzielt werden (Jaichandran et al. 2006). Als großer Nachteil dieser Methode muss die Notwendigkeit aufgeführt werden, durch chirurgische Eingriffe Nadel- oder Plattenelektroden in das Leberparenchym oder Plattenelektroden an die Leberoberfläche bringen zu müssen (Kamimura and Liu 2008).

Ultraschall-vermittelter Gentransfer, auch Sonoporation genannt, zeigte schon in den 1990er Jahren in *in vitro* Studien eine Steigerung der Effizienz des Gentransfers (Kamimura and Liu 2008). Die Übertragung der Anwendung auf *in vivo*-Studien ist im Fokus aktueller Studien (Shen et al. 2008). Durch Kombination von kationischen Liposomen und Ultraschall konnte der Transport von künstlicher miRNA für Bindegewebswachstumsfaktor (CTGF) in die Leber erfolgreich gezeigt werden. Dadurch wurde die in Ratten induzierte Leberfibrose reduziert (Yang et al. 2013). Eine Verwendung von Transposase-basiertem ultraschallassistiertem Gentransfer konnte durch Integration ins Wirtsgenom nachweislich die Dauer der Expression der transportierten Gene verlängern (Anderson et al. 2013). Im Jahr 2013 wurde in einer Versuchsreihe von Nob-

le et al. ein weiterer wichtiger Schritt getan, sich dem ultraschallassistierten Gentransfer in die Lebern humaner Patienten zu nähern. Hier wurde ein Konjugat aus Plasmid-DNA und microbubbles einer Gruppe von 10-20 kg schweren Hunden intravenös appliziert. Durch Anlegen eines speziell hierfür entwickelten planaren unfokussierten Schallkopfes konnte in wash-in/ wash-out Versuchen mit microbubbles aus Ultraschallkontrastmittel gezeigt werden, dass bedingt durch den normalen Blutfluss nur ein geringes Zeitfenster (25 sec) für das Anlegen der therapeutischen Ultraschalls (tUS) bleibt, um die Sonoporation durch zu führen. Daher wurde der tUS simultan zur Injektion des Plasmid/microbubbles-Konjugats angelegt. Es konnte in den mit Ultraschall behandelten Leberlappen im Vergleich zu unbehandelten ein signifikanter Anstieg der Genexpression des Reportergens Luciferase gezeigt werden, Serum- und histologische Untersuchungen zeigten gleichzeitig keine oder nur eine geringe Gewebeschädigung (Noble et al. 2013). Im Jahr zuvor konnte die gleiche Arbeitsgruppe ähnliche Erkenntnisse an Rattenlebern gewinnen (Song et al. 2012).

Auf Grund der bereits beschriebenen herausragenden Rolle der Leber für viele Stoffwechselprozesse oder immunologische Mechanismen ergibt sich die besondere Bedeutung der Erforschung lebergerichteter gentherapeutischer Verfahren. Durch das nachteilige Risikoprofil viraler Gentherapieverfahren besteht ein Bedarf zur Entwicklung nicht-viraler Ansätze für einen effizienten und sicheren Transfer therapeutischer Gene in Hepatozyten. Ein Problem stellt dabei das Fehlen eines adäquaten *in vitro* Systems dar. Hepatozyten sind zwar als Primärzellen gut isolierbar, allerdings ist es schwierig, sie für einen längeren Zeitraum zu kultivieren, ohne dass die Zellen dedifferenzieren und zentrale hepatozytäre Eigenschaften verlieren. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass mit geeigneten Medien sowie geeigneten Strukturen, auf denen die Hepatozyten kultiviert werden, vielversprechende Ansätze für eine Langzeit-Kultivierung von Hepatozyten verfügbar sind (Lee, Hung et al. 2007; Mizumoto, Ishihara et al. 2008; Bierwolf, Lutgehetmann et al. 2011; Bierwolf, Lutgehetmann et al. 2012; Kang, Rawat et al. 2013).

Es stehen zwar Modelle zur Verfügung, die beispielsweise Untersuchungen zu Pharmakokinetik *in vitro* ermöglichen, zum Teil sogar mit humanen Zellen, die aus Leberresektaten isoliert werden. Allerdings bilden diese Modelle wichtige physiologische Aspekte nicht ab, die bei der Erforschung neuer Ansätze zur Gentherapie in der Leber von Be-

deutung sind. Zum einen werden anatomische Bedingungen nicht berücksichtigt, wie das Vorhandensein eines Blutflusses sowie die verschiedenen Durchmesser und Verzweigungen von Blutgefäßen, die Änderungen in Flussgeschwindigkeit und Scherkraft zur Folge haben. Andererseits können weder *in vitro* an kultivierten Hepatozyten noch *in vivo* im Tiermodell die mehrschichtigen Barrieren zwischen Blutgefäßen und Hepatozyten untersucht werden.

2.3 Zielsetzung

Das langfristige über das vorliegende Projekt hinaus gehende Ziel ist die Etablierung des nicht-viralen Gentransfers in einem Therapieverfahren *in vivo*. Hierbei soll *intelligent particles* über einen venösen Zugang appliziert und dann mittels Magnet im Zielorgan Leber zurückgehalten werden (Magnetofektion). Die Partikel basieren dabei unter anderem auf Liposomen, Eisenoxid, Rezeptorliganden für ein gewebespezifisches Targeting, Polyethylenglycol (PEG) und therapeutischer DNA. Initial sollen Versuche mit beschichteten Eisenoxid-Partikeln (CombiMag, OZ BIOSCIENCES) und Liposomen (Metafectene μ , Biotex) als Transfektionsreagenzien durchgeführt werden. Um eine Stabilität der Expression des therapeutischen Plasmids über mehrere Zellgenerationen zu erreichen, soll ein Plasmid verwendet werden, das ein S/MAR-Element enthält. Die Scaffold / Matrix Attachment Region (S/MAR) erlaubt eine episomale Replikation des Plasmids und stellt so eine stabile Weitergabe des Plasmids an die Tochterzellen über viele Generationen sicher.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll ein Modell entwickelt werden, mit dem biophysikalische Methoden des nicht-viralen Gentransfers in der Leber validiert werden können. Dabei sollen verschiedene Bestandteile und Eigenschaften der *intelligent particles* unter Bedingungen untersucht werden, die eine Simulation der Verhältnisse *in vivo* darstellen.

Da eine der grundlegenden Fragen bei nicht-viralen Gentherapie-Ansätzen die Rolle des sinusoidalen Endothels für den Transfer der DNA aus den Blutgefäßen in das Leberparenchym ist (Jacobs et al. 2010), wird ein Versuchsansatz verfolgt, der dieser besonderen Rolle der sinusoidalen Gefäßwände Rechnung trägt. Durch eine Kokultivierung der Endothel-Zelllinie HUVEC mit der Leberparenchym-Zelllinie HepG2 soll ein

Modell entwickelt werden, das die Barriere zwischen sinusoidalem Endothel und dem Leberparenchym abbildet. Darüber hinaus ist der Transport applizierter gentherapeutischer Partikel im Blutfluss bisher wenig untersucht worden. Mit einer Flusskammer als Modellsystem sollen Daten zur Partikelstabilität erhoben und die Partikelretention in Abhängigkeit von Magnetfeldstärke und Flussgeschwindigkeit evaluiert werden. Die verschiedenen Flussgeschwindigkeiten repräsentieren dabei die unterschiedlichen Gefäßtypen in der Leber.

Die mit Hilfe des Modellsystems gewonnenen Erkenntnisse sollen als Grundlage für eine Weiterentwicklung im Hinblick auf die spätere Anwendung im Patienten dienen. Hier sollen sogenannte *intelligent particles*, eine Kombination superparamagnetischer Nanopartikel mit therapeutischer DNA, leberspezifischen Rezeptorliganden und Microbubbles, über einen venösen Zugang ins Blutgefäßsystem verabreicht werden, die mittels Anlegen eines gerichteten Magnetfeldes im Zielgewebe gegen den Blutstrom retiniert werden sollen. Mit Hilfe von nicht-viralen Gentransfermethoden wie Magnetofektion und Sonoporation soll das therapeutische Gen in die Zielzelle aufgenommen und dort epigenetisch stabil exprimiert werden, um eine Heilung des Patienten zu erzielen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

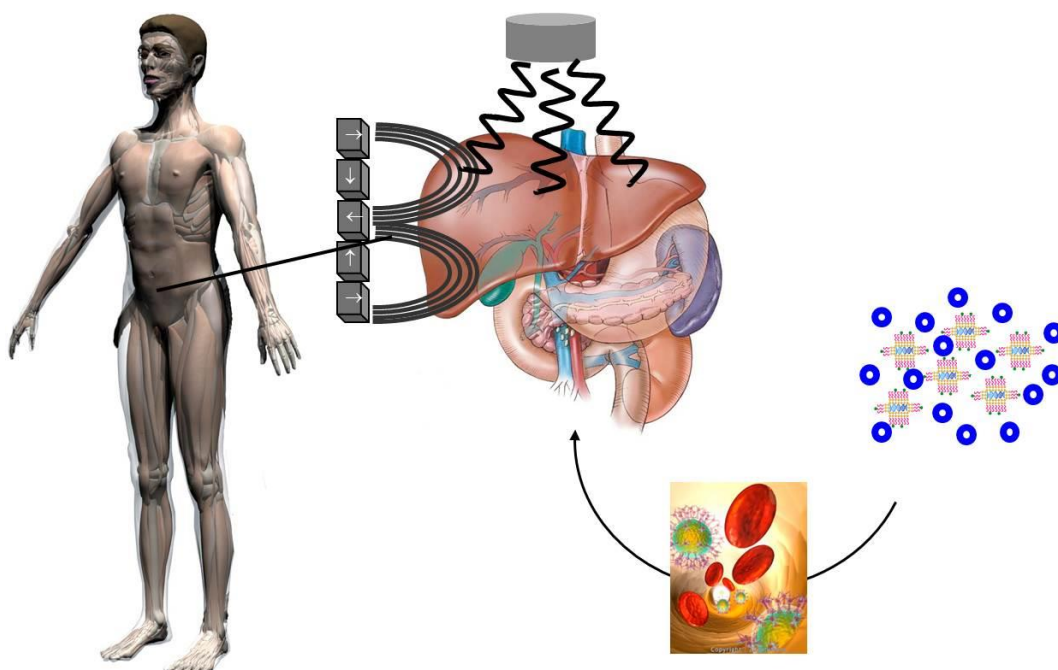


Abb. 7 Schema einer kausalen Therapie mittels *intelligent particles*, Sonoporation und Magnetofektion

3 Material und Methoden

3.1 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Inkubator HERAcell 240	Heraeus-Kendro Lab Products, Langenselbold
Konfokalmikroskop IX 81 FluoView FV 1000	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop DMIL	Leica, Wetzlar
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Perfusionspumpe	Control Company, Friendswood (TX), USA
Photometer Nanodrop	peqlab, Erlangen
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Pipetman	Gilson International, Limburg-Offheim
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus-Kendro Lab Products, Langenselbold
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe N 811 KN.18	KNF, Freiburg
Vortexer VORTEX-Genie	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wärmeplatte Typ 13800	Medax Nagel, Kiel
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserbad Typ 3014	Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

3.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
μ-Slide I, collagen coated	ibidi, Martinsried
μ-Slide VI ^{0.1} , collagen coated	ibidi, Martinsried
μ-Slide VI ^{0.4} , collagen coated	ibidi, Martinsried
96-Well-Plate, white wall, clear bottom	Thermoscientific, Waltham (MA), USA
Filtrationseinheit 0,45μm, bottle-top	Sarstedt, Nümbrecht
Hyperflask Zellkulturflasche	Corning, Tewsbury (MA), USA
Kanüle 27G	Braun, Melsungen
Neodym-Eisen-Bor-Magnet (15x4x4 mm)	Webcraft GmbH, Gottmadingen (Supermagnete.de)
Neodym-Eisen-Bor-Magnet (40x10x10 mm)	Webcraft GmbH, Gottmadingen (Supermagnete.de)
Seide „E“	Resorba, Nürnberg
serolog. Pipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritze 1, 10, 20, 30, 50 ml	Braun, Melsungen
Plastikpak Perfusor Spritze 50 ml	BD, New Jersey
Venenverweilkatheter, 27G	Braun, Melsungen
Zellfilter, 100 μm	Merck Millipore,
Zellkulturflasche T75	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber, flexible Klinge	Sarstedt, Nümbrecht

3.3 Mäuse

Für die Isolation der murinen Primärhepatozyten wurden weibliche sowie männliche Mäuse des Stammes BTBR-Pah^{enu2}/J verwendet. Diese wurden von The Jackson Laboratory, Maine bezogen.

3.4 Chemikalien/Medien

Bezeichnung	Hersteller
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody	Life Technologies, Darmstadt
Alexa Fluor 555 goat anti-mouse antibody	Life Technologies, Darmstadt
Anti-Anti 100X, Antibiotikum, Antimykotikum	Life Technologies, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
CombiMag	OzBiosciences, Marseille
Dexamethason	Merck KGaA, Darmstadt
D-Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Dulbecco's PBS, ohne Kalzium/Magnesium	Life Technologies, Darmstadt
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) + Supplement Mix	PromoCell, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Life Technologies, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Darmstadt
Formaldehyd 3,7 %	AppliChem, Darmstadt
FluoMag-C	OzBiosciences, Marseille
Hepatocyte Wash Medium	Life Technologies, Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Balanced salt solution (BSS)	Promocell, Heidelberg
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
ITS-Supplement A	Life Technologies, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
MEM non-essential amino acid solution (100x)	Life Technologies, Darmstadt
METAFACTENE μ	Biontex, Martinsried/Planegg
METAFACTENE μ Fluor	Biontex, Martinsried/Planegg
Mouse anti human CD31 antibody	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
murines EGF	BioVision, Milpitas (CA), USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid 0,9%, isotone Kochsalzlösung	Braun, Melsungen
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	Merck, Darmstadt
Penicilin/Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
rabbit anti human ASGPR antibody	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (TX), USA
Rat Tail Collagen I 5mg/ml	Life Technologies, Darmstadt
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, mit Phenolrot	Life Technologies, Darmstadt
TOTO-1-Iodide	Life Technologies, Darmstadt
Triton 0,1 %	Life Technologies, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Darmstadt
Trypsin-Neutralizing Solution	Promocell, Heidelberg
Vollentsalztes Wasser (VE-Wasser)	Merck, Darmstadt
Williams E Medium mit Glutamax	Life Technologies, Darmstadt

3.5 Puffer

10X Lefferts

23,83g HEPES

2,24g KCl

75,87g NaCl

1,38g NaH₂PO₄-H₂O

18,02g D-Glukose

- Chemikalien einwiegen, mit 800ml VE-Wasser auffüllen
- mit HCl/NaOH auf pH 7,2 titrieren
- auf 1000ml auffüllen, pH-Wert nochmals kontrollieren
- mit 0,45µm Filtrationseinheit steril filtrieren

10X EGTA

1,9g EGTA

- EGTA einwiegen, 100 ml Lefferts und 800ml VE-Wasser zugeben
- mit HCl/NaOH auf pH 7,2 titrieren
- mit VE-Wasser auf 1000ml auffüllen, pH-Wert nochmals kontrollieren
- mit 0,45µm Filtrationseinheit steril filtrieren

100X Kalziumchlorid

14g CaCl₂

- CaCl₂ einwiegen, mit 450ml VE-Wasser auffüllen
- mit HCl/NaOH auf pH 7,2 titrieren
- mit VE-Wasser auf 500ml auffüllen, pH-Wert nochmals kontrollieren
- mit 0,45µm Filtrationseinheit steril filtrieren

3.6 Zellkultur

Alle Arbeiten erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank der Schutzstufe 1. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Inkubator (Heraeus) bei 37°C unter Zufuhr von 5% CO₂.

3.6.1 HUVEC

Die Zelllinie wurde über Promocell (Heidelberg) bezogen. Für diese Zelllinie werden Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen isoliert (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Die Kultivierung erfolgte gemäß Herstellervorgaben mit Endothelial Cell Growth Medium + Supplements (Promocell, Heidelberg) in T75 Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen (Sarstedt). Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Das Medium wurde abgesaugt, dann erfolgte das Entfernen eventueller Mediumreste durch vorsichtiges Spülen der Zellen mit 7,5 ml HEPES-BSS (Promocell). Nach dem Absaugen des Puffers wurden die adhärenenten Zellen durch Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA (Promocell) und eine 10-minütige Inkubation (37°C, 5% CO₂) vom Flaschenboden abgelöst und vereinzelt. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden 3 ml Trypsin-Neutralizing-Solution (Promocell) zur Inhibition der Trypsin-Aktivität zugegeben. Die Zellen wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt und für 3 min bei 220g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und in eine neue T75 Zellkultur-Flasche ausgesät. Nach dem Verteilen der Zellen durch über Kreuz schwenken wurden die Zellen wieder bei 37°C unter 5% CO₂ inkubiert.

3.6.2 HepG2

Die HepG2-Zelllinie wurde über das DSMZ (Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen. Die Zelllinie wurde 1975 aus dem Tumorgewebe eines hepatozellulären Karzinoms eines 15-jährigen argentinischen Patienten etabliert. Gemäß Empfehlung des Anbieters erfolgte die Kultivierung in RPMI 1640 mit 10% FCS. Zweimal wöchentlich wurden die konfluenten Zellen gesplittet. Dazu wurde das Medium mit einer Vakuumeinheit abgesaugt, mit 5 ml PBS (Gibco) wurden letzte Mediumreste entfernt. Danach wurden 3 ml Trypsin/EDTA (Gibco) in die T75-Zellkulturflasche gegeben. Nach dreiminütiger Inkubation in einem Inkubator (37°C, 5% CO₂) hatten sich die Zellen abgelöst. Durch Zugabe von 7 ml Medium mit FCS wurde die Trypsin/EDTA-Aktivität gestoppt. 5ml der Zellsuspension wurden in eine neue T75-Zellkulturflasche überführt, in der bereits 10 ml Medium vorgelegt wurden. Um die Zellen gleichmäßig zu verteilen, wurde die Zellkulturfla-

sche mehrmals über Kreuz geschwenkt, danach wurden die Zellen in den Inkubator transferiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter 5% CO₂.

3.6.3 Kokultur

Für die Herstellung der Kokultur wurden zunächst die in 4.1.1 ermittelte optimale Zellzahl von 120.000 HepG2 in 25 µl RPMI (4,8 x 10⁶ Zellen/ ml) pro Kanal in ibidi µ-slides VI 0,4 Collagen IV-coated ausgesät. Nach einer Ruhezeit von 60 Minuten, in der den Zellen die Möglichkeit zur Sedimentation und Anhaftung gegeben wurde, wurde das Medium auf 150 µl aufgefüllt. Diese Zellschicht wurde für 24 Stunden bei 37°C unter 5% CO₂ kultiviert. Danach wurde eine Kollagenschicht aufgetragen, um die Anheftung der HUVEC zu vermitteln. Dafür wurde RPMI mittels Vakuumpumpe abgesaugt und 25 µl Kollagenmischung für 30 min zugegeben. Die Kollagenmischung bestand aus einem Teil Rat Tail Collagen (0,5mg/ml in Eisessig) in drei Teilen RPMI. Nach der 30-minütigen Inkubation wurde die Mischung abgesaugt und die Kanäle wurden mit PBS gewaschen. Nun wurde die in 4.1.1 bestimmte optimale Zellzahl von 60.000 HUVECs in 25 µl Mischmedium (50% RPMI/ 50% ECGM) auf die kollagenbeschichteten HepG2 ausgesät. Nach 60 Minuten wurden die Wells auf 150 µl aufgefüllt. Die Kokultur wurde für weitere 24 Stunden kultiviert und danach für die Durchführung der Flussversuche verwendet.

3.6.4 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie, die mit Hilfe des Lichtmikroskops DMIL der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland) durchgeführt wurde, diente zum einen der Vitalitätsbestimmung und zum anderen der Zählung der verschiedenen Zelllinien. Dafür wurden die Zellen 3 min bei 220g zentrifugiert und in ein definiertes Volumen an entsprechendem Medium resuspendiert. Wollte man die Vitalität, also die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen durchführen, gab man den Farbstoff Trypanblau in gleicher Menge zum Medium und vermischte dies. Dieser Farbstoff durchdringt defekte Zellmembranen, so dass vitale Zellen weiterhin farblos, avitale hingegen blau erscheinen. Sowohl zur Zählung als auch zur Vitalitätsbestimmung wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Nach Auszählen der Quadrate und Ermittlung des arithmetischen Mittels wurde die Zellzahl entsprechend der eingesetzten Verdünnung berechnet.

3.6.5 Immunfluoreszenz

Zur Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung von Zellen, die in ibidi Slides kultiviert wurden, wurde das Medium abgesaugt und der Kanal zweimalig mit 200 µl vorgewärmten PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen durch 10-minütige Zugabe von 100 µl 3,7% Formaldehyd in PBS pro Kanal fixiert. Dies geschah bei Raumtemperatur. Die Kanäle wurden erneut zweimalig mit 200 µl PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen wurde durch Zugabe von 100 µl 0,1%igem Triton in PBS durchgeführt, welches für 3-5 min bei Raumtemperatur auf den Zellen verblieb. Wiederum wurden die Kanäle zweimal mit 200 µl PBS gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl 1%igem BSA in PBS für mindestens 20 min bei Raumtemperatur erreichte man eine Blockung unspezifischer Bindungsstellen auf den Zellen und erniedrigte so das spätere sogenannte Hintergrundrauschen. Erneut wurde zweimal mit 200 µl PBS gewaschen. Nun wurden gleichzeitig der rabbit-anti-ASGPR-AK (1:200) und der mouse-anti-CD31-AK (1:200) aufgetragen. Beide wurden auf ihre Endkonzentration mit 1%igem BSA in PBS verdünnt. Das Gesamtvolumen dieser Lösung betrug 25 µl. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für mind. 4 h durchgeführt. Danach wurde erneut zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und es erfolgte ein zweiter Blockschritt mit BSA wie oben aufgeführt. Nun wurden die mit einem Fluorophor gekoppelten Sekundärantikörper aufgetragen. Der grün fluoreszierende Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody bindet an den anti-ASGPR-AK und wurde in einer Konzentration von 1:200 in 1% BSA in PBS aufgetragen. Zeitgleich wurde der rot fluoreszierende Alexa Fluor 555 goat anti-mouse antibody, der an den CD 31-AK bindet in der gleichen Weise aufgetragen. Die Inkubation dauerte 60 min bei RT, währenddessen die Slides vor Tageslicht geschützt werden mussten. Danach wurde ein weiteres Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Für die Anfärbung der Zellkerne beider Zelllinien wurde ein DAPI-Staining durchgeführt. Dafür wurden je Kanal 25 µl einer DAPI-Lösung (0,1 mg/ml) zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit wurde erneut mit 200 µl PBS gewaschen. Danach erfolgte die bildgebende Darstellung.

3.6.6 Konfokalmikroskopie

Um die Schichttrennung der verschiedenen Zellen in der Kokultur und die Verteilung der Partikel und deren Bestandteile visualisieren zu können, wurden nach Durchführung der Flussversuche mit Hilfe des Konfokalmikroskops IX 81 FluoView FV 1000 von Olympus (Ham-

burg, Deutschland) Schichtbilder angefertigt. Dabei wurden die Einstellungen für Belichtungsdauer und Intensität in der Bildfolge nicht verändert, um eine Vergleichbarkeit der Aufnahmen zu gewährleisten. Dafür wurde ein macro erstellt und für jede Aufnahme verwendet. Die Schichtdicke betrug 5 µm und es wurden zwischen 45 und 60 Schichten aufgenommen. Mit Hilfe von Olympus Fluoview FV1000 wurde ein dreidimensionales Bild der Ko-kultur hergestellt und dieses sagittal durch alle Ebenen geschnitten.

3.6.7 CellTiter-Glo Assay

Mittels CellTiter-Glo Assay (Promega) wurde die Vitalität der Zellen bestimmt. Bei diesem Assay wird die vorhandene Menge ATP bestimmt, das als Maß für die Vitalität der Zellen dient. Die Zahl der vorhandenen ATP-Moleküle ist dabei proportional zur Emission von Lichtsignalen, die nach Zugabe des Substrats Beetle Luciferin und dem Enzym Luciferase unter ATP-Verbrauch emittiert werden (Abb. 8). Der Assay wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.



Abb. 8 Reaktionsschema CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega)

3.6.8 Isolation primärer muriner Hepatozyten

Aussaatmedium

10 ml	FCS (Life Technologies), 10%
1 ml	Penicillin / Streptomycin (PAA), 1%
156,25 µl	Dexamethason (Merck KGaA), 4mg/ml
1 ml	ITS-Supplement A (Life Technologies), 1%
5 µg	murines EGF, rekombinant (BioVision)
ad	100 ml Williams E Medium mit Glutamax (Life Technologies)

Kultivierungsmedium

5 ml	FCS (Life Technologies), 5%
1 ml	Penicillin / Streptomycin (PAA), 1%
156,25µl	Dexamethason (Merck KGaA), 4mg/ml
1 ml	ITS-Supplement A (Life Technologies), 1%
2,5 µg	murines EGF, rekombinant (BioVision)
2,25 ml	DMSO (Millipore), 2,25%
ad	100 ml Williams E Medium mit Glutamax (Life Technologies)

Das verwendete Protokoll stellt eine Erweiterung des etablierten zweistufigen Collagenase-Perfusionsprotokoll nach Seglen (Seglen 1976) dar. Lefferts- Puffer wurde aus einem 10X-Stock durch Verdünnung mit VE-Wasser hergestellt. EGTA- und Kalziumchlorid-Puffer wurden durch verdünnen der Stocklösungen mit Lefferts- Puffer hergestellt. Alle drei Lösungen wurden anschließend mit 0,45µm Filtrationseinheiten (Sarstedt) steril filtriert und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Vor dem Befüllen des Pumpensystems wurde dieses komplett mit 80% Ethanol gespült und anschließend mit NaCl (Braun) nachgespült. Danach wurde das System mit EGTA- Puffer befüllt. 2 Petrischalen wurden mit Lefferts- Puffer gefüllt und auf Eis inkubiert. Die Wärmeplatte wurde auf 39°C eingestellt.

Die Mäuse wurden mit Isofluran (Baxter) betäubt, durch zervikale Dislokation sakrifiziert und anschließend auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte fixiert. Das Abdomen wurde weit kaudal durch einen transversalen Schnitt eröffnet, der Schnitt wurde lateral auf beiden Seiten bis zum Brustkorb erweitert. Anschließend wurde der Schnitt bis zum oberen Ende des Brustkorbs weitergeführt, nach dem Durchtrennen des Zwerchfells konnte der Brustkorb mit anhängender Bauchdecke abgenommen werden. Mit einer Pinzette wurde die *Vena cava caudalis* herznah mobilisiert, mit einer zweiten spitzen Pinzette konnte dann ein ca. 5-10 cm langes Stück Seide (Resorba) unter dem Gefäß platziert werden. Die Ligatur wurde mit einem chirurgischen Instrumentenknoten gesichert, allerdings wurde der Knoten noch nicht geschlossen. Dann wurde ein Venenverweilkatheter (27G, Braun) vorsichtig in den rechten Vorhof eingeführt und von dort in die *Vena cava caudalis* geschoben. Zur Sicherung des Katheters wurde die Ligatur geschlossen. Kaudal der Leber wurde die *Vena cava caudalis* im

unteren Bereich eröffnet und der Katheter an das auf 5 ml/min kalibrierte Pumpensystem angeschlossen. Nach dem Eröffnen der *Vena portae* wurde die Gefäßklemme benutzt, um die *Vena cava caudalis* kranial des Schnittes abzuklemmen. Nach 4-minütigem Spülen der Leber mit EGTA-Puffer wurde das Perfusionssystem auf Lefferts-Puffer umgestellt und für zwei weitere Minuten perfundiert. Der Verdau der Leber erfolgte durch 20-minütige Perfusion mit 40mg Collagenase I (Worthington), die in 100 ml CaCl₂-Puffer gelöst wurde. Nach dem Ende des Verdauschrittes wurde die Leber resektiert und in einer der beiden Schalen mit Lefferts-Puffer auf Eis überführt. Nach Abwaschen von Gewebe- und Fellresten wurde die Leber in einer zweiten Schale in eine sterile Werkbank überführt. Die Leber wurde mit einer Pinzette fixiert, um die Hepatozyten durch vorsichtiges Ausstreichen mit einem Zellschaber mit flexibler Klinge aus der Leberkapsel zu lösen. Nach Entfernen der Kapselreste und größerer Gewebestücke wurde die Zellsuspension mit einer serologischen Pipette aufgenommen und in ein konisches 50 ml Zentrifugenröhrchen (Corning) überführt. Dabei erfolgte eine Filtration über ein 100µm Zellsieb (Millipore), um die Zellen weiter zu vereinzeln und zusammenhängende Zellklumpen zurückzuhalten. Die Suspension wurde bei 4°C und 50g für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand mit den nicht-parenchymalen Leberzellen wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 30ml Hepatocyte Wash Medium (Life Technologies) resuspendiert und weitere 3 Minuten bei 4°C und 50g abzentrifugiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde mikroskopisch auf ausreichende Reinheit geprüft, gegebenenfalls wurde der Waschschrift wiederholt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Aussaatmedium resuspendiert, mittels einer Neubauer Zählkammer und Trypanblau-Färbung erfolgte die Bestimmung von Zellzahl und Vitabilität.

3.6.9 Aussaat primärer muriner Hepatozyten

Bei einer Vitalität der Hepatozyten von mindestens 75% wurden die Zellen weiter verwendet, anderenfalls erfolgte eine erneute Zellisolation. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von $2,2 \times 10^6$ Zellen/ml mit dem Aussaatmedium verdünnt. In eine Zellkulturflasche T25 wurde 1 ml der Zellsuspension eingefüllt und die Zellen durch kreuzendes Schwenken auf dem Flaschenboden verteilt. Für die Aussaat in kollagenbeschichtete µ-Slide VI^{0,4} wurde die Konzentration der Suspension auf 800.000 Zellen/ml verdünnt, sodass in 100 µl 80.000 Pri-

märhepatozyten ausgesät werden konnten. 90 min nach Aussaat der primären Hepatozyten erfolgte das Auffüllen des Mediums. Ein Mediumwechsel wurde einmal täglich durchgeführt.

3.7 Plasmidvektor

Als nicht-viraler Plasmidvektor wurde das Plasmid pEPito-eGFP verwendet, das auf dem Plasmid pEPI-1-basiert (Haase et al, 2010) und gegenüber diesem mehrere Modifikationen aufweist. Die Insertion eines S/MARS-Elementes (scaffold matrix attachment region sequence) führt zu einer episomalen Replikation des Plasmides unabhängig von einem Selektionsdruck (Jenke, Stehle et al. 2004; Hagedorn, Wong et al. 2011; Wong, Argyros et al. 2011), außerdem erhöht das Element die Transkriptionsrate und schützt die Plasmid-DNA vor epigenetischen Modifikationen. Dabei ist die Transfektionseffizienz des pEPito-Vektors signifikant höher als die des pEPI-1-Vektors (Haase, Argyros et al. 2010). Dieser Vektor wurde uns freundlicherweise von der AG Baiker (Max-von-Pettenkofer-Institut) zur Verfügung gestellt.

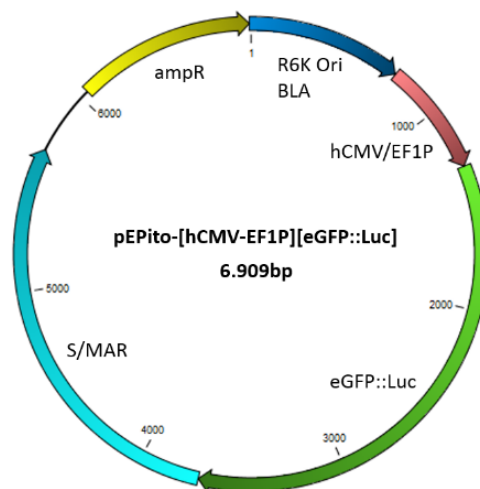


Abb. 9 Plasmidkarte des Vektors pEPito-hCMV/EF1-EGFP

3.8 *Intelligent particles* als Genfähren

In der vorliegenden Arbeit wurden für den Gentransfer im Flusskammermodell der Leber sogenannte *intelligent particles* als Genfähren verwendet. Diese *intelligent particles* enthielten neben dem Plasmidvektor mit dem Zielgen Liposomen und superparamagnetische Eisenoxidpartikel.

In Vorversuchen wurde die DNA-Menge ermittelt, die die höchste Effizienz zur Transfektion von HepG2-Zellen zeigte. Diese lag bei 1,5 µg DNA/100µl Transfektionsreagenz. Die DNA-Konzentration des Vektors wurde mittels Nanodrop (peqlab) bestimmt. Gemäß Herstellerangaben wurde ein Quotient aus DNA, Liposom und Eisenoxid von 1:1:1 verwendet.

Die intelligent particles wurden nach folgendem Protokoll hergestellt:

Für alle Flussversuche wurde ein Volumen der Reagenzien von 100 µl benötigt. Für mehrere Ansätze wurde ein Mastermix angesetzt. Die hier genannten Mengen beziehen sich jeweils auf einen Ansatz.

DNA wurde mit TOTO-1-Iodide (Life Technologies) markiert. Dafür wurde der Farbstoff 1:100 mit PBS verdünnt, 15 µl dieser Mischung wurden dann pro µg Plasmid-DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) gegeben. Das Volumen der DNA variierte dabei abhängig von der Plasmidkonzentration. Der Ansatz wurde bei 50°C für eine Dauer von 5 min im Heizblock inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit PBS auf 25 µl aufgefüllt.

Je nach Versuchsaufbau wurden CombiMag-C oder FluoMag-C (beide OzBiosciences) als Eisenoxidpartikel verwendet. Das Volumen betrug immer 1,5 µl pro Ansatz, da 1,5 µg DNA verwendet wurde. Die Lösung wurde mit 23,5 µl PBS aufgefüllt, um das gleiche Volumen wie in Punkt 1 zu erreichen.

Ansätze 1 und 2 wurden gemischt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert.

Kurz vor Ablauf der 20 min wurden 1,5 µl Liposom, je nach Versuch Metafectene µ oder Metafectene µ fluoR (OzBiosciences), in einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 23,5 µl PBS auf 25 µl aufgefüllt.

Nach Ablauf der 20-minütigen Inkubationszeit wurde die in Punkt 4 genannte Verdünnung zum in Punkt 3 genannten Ansatz gegeben und weitere 20 min ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der zweiten Inkubationszeit wurden wiederum 25 µl PBS hinzugegeben, um das benötigte Transfektionsvolumen von 100 µl zu erreichen.

Wichtig für eine erfolgreiche Durchführung war die Verwendung lichtundurchlässiger Reaktionsgefäße bei der Inkubation von lichtempfindlichen fluoreszenzmarkierten Reagenzien wie Metafectene µ FluoR oder FluoMag-C.

3.9 Konstruktion des Halbach-Arrays

Für die Durchführung der Flussversuche wurden zwei verschiedene Typen von Magneten bei Webcraft GmbH, Gottmadingen erworben. Als Einzelmagnete wurden nickelbeschichtete Magneten mit einer Größe von 40x10x10 mm einer Haftkraft von ca. 15 kg laut Herstellerangabe verwendet, die aus Neodym-Eisen-Bor (NdFeB) bestehen. Für den Halbach Array wurden Stabmagnete aus dem gleichen Material mit den Maßen 15x4x4 mm und einer Haftkraft von ca. 1,7 kg verwendet.

Für die Konstruktion des *Halbach Arrays* wurden 11 Stabmagneten mit den Maßen 15 x 4 x 4 mm in Reihe gruppiert. Die Einzelmagneten weisen im Halbach-Array eine Nordpol-Südpol-Achse auf, die im 90°-Winkel zu den Achsen der benachbarten Magneten ausgerichtet ist. Dadurch verstärken sich die Magnetfeldlinien der Einzelmagneten auf der einen Seite der Konstruktion zu einem gerichteten Magnetfeld und heben einander auf der anderen Seite annähernd auf.

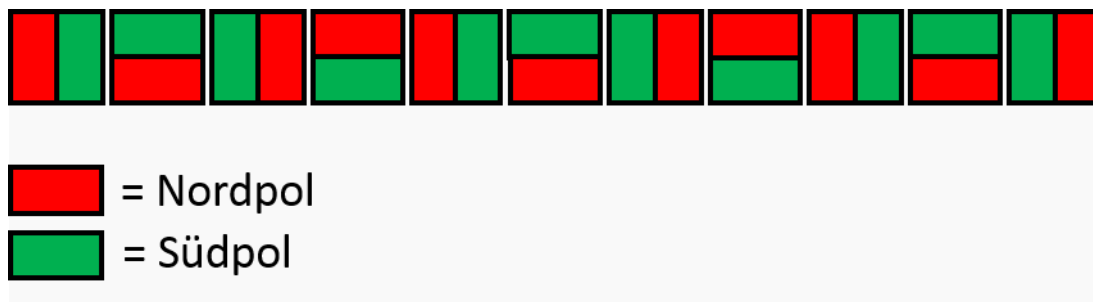


Abb. 10 Anordnung der Magnetachsen für die Konstruktion des Halbach Array

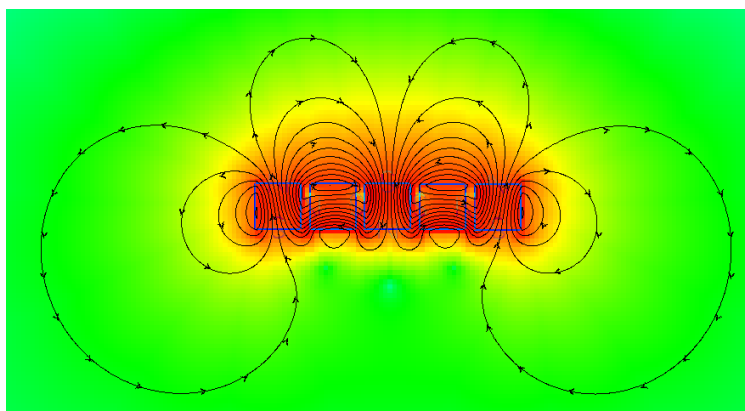


Abb. 11 Schematische Verteilung der Magnetfeldlinien eines Halbach Arrays (Copyright © 2003 Bradley University, Department of Electrical and Computer Engineering)

Dieser Effekt wurde bereits in den 1970er Jahren beschrieben (Mallinson 1973). Der Physiker Klaus Halbach erfand unabhängig davon in den 1980ern den sogenannten Halbach Array, um Partikelströme, Elektronen und Laser zu fokussieren (Halbach 1980). Je länger eine solche Anordnung ist, desto stärker ist die Amplifizierung des Magnetfeldes.

Dieses Phänomen wird beispielsweise bei Kühlschrankschrankmagneten ausgenutzt (**LIT**) und findet Verwendung in Teilchenbeschleunigern und im sogenannten Inductrack (Thome and Tarrh 1982), einer Magnetschwebbahn, die mit Hilfe von im Zug eingebauten Halbach Arrays außer zum Anschub keine externe Stromversorgung benötigt.

Die Einzelmagnete wurden mit Zwei-Komponenten-Klebstoff endfest verbunden und aus Stabilitätsgründen mit der Rückseite (abgeschwächte Magnetfelder) auf einer Plexiglasplatte fixiert, so dass eine Anordnung der Magnete mit den Maßen 50 x 4 x 4 mm entsteht.

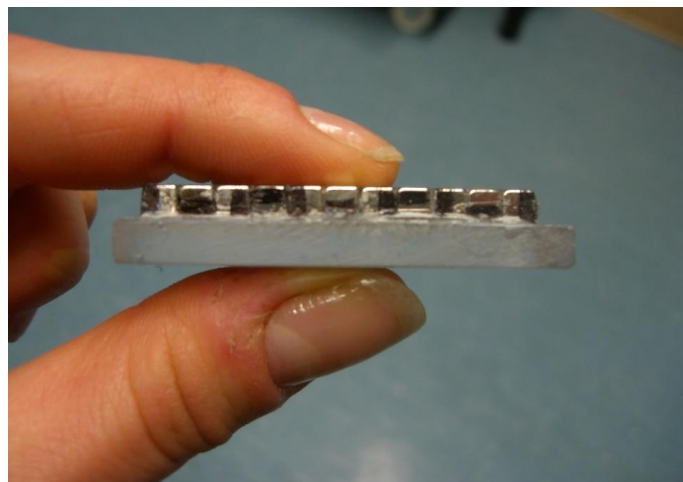


Abb. 12 Konstruktion des Halbach Arrays aus singulären kleinen Stabmagneten, aus Stabilitätsgründen auf einer Plexiglasplatte fixiert

3.10 Aufbau einer Flusskammer als Lebermodell

Als *in vitro*-Modell des Grenzbereiches zwischen Lebergefäßen und Leberparenchym wurde eine Flusskammer konstruiert. Dazu wurden eine Perfusionspumpe mit regulierbarer Flussgeschwindigkeit und eine Plastikpak Perfusor Spritze 50 ml (BD, New Jersey) verwendet, an welche ein flexibles PE-Schlauchstück mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm angeschlossen wurde. Dieser Schlauch wurde mit Hilfe eines 5-6 mm langen Teils eines 25G-Butterfly-Schlauches an einen der kurzen Schenkel eines Y-förmigen Verbindungselements angeschlossen. An den zweiten kurzen Schenkel schloss sich ebenfalls ein 8-10 cm langes PE-

Schlauchstück an. Dieser Zugang ermöglichte die Applikation der Lösung mit *intelligent particles* als Genfähren (in Abb. 13 blau angefärbt) während eines kontinuierlich angelegten definierten Flusses mit Zellkulturmedium (in Abb. 13 durch Phenolrot pink gefärbt). Zur Applikation definierter Volumina (100 μ l) wurde eine 1ml-Insulinspritze (Braun) verwendet. Der lange Schenkel des Y-Stücks wurde ebenfalls mit Hilfe eines 5-6 mm langen Teils eines 25G-Butterflyschlauchs an einen Luer-Lock-Adapter angeschlossen. Das gesamte System wurde mittels dieses Adapters an das Eingangsreservoir des ibidi μ -Slide VI^{0,1} bzw. μ -Slide VI^{0,4} angeschlossen. Mit dem Ausgangsreservoir des Slides wurde ebenfalls ein Luer-Lock-Adapter verbunden, welcher über ein 5-6 mm langen Teil eines 25G-Butterfly-Schlauches an ein 8-10 cm langen PE-Schlauch gekoppelt war. Somit konnte die abfließende Lösung aufgefangen und analysiert werden.

Alle Elemente wurden mit Zwei-Komponenten-Klebstoff endfest verbunden.



Abb. 13 Aufbau der Flusskammer (Transfektionsreagenz blau, kontinuierlicher Fluss pink dargestellt)

3.11 Durchführung der Flussversuche

In die unter 3.10 beschriebene Flusskammer wurde eine Kokultur von HepG2- und HUVEC-Zellen ausgesät wie in 3.6.3 beschrieben. Auch das Protokoll der Partikelerstellung (3.8) wurde in allen Versuchsreihen beibehalten, wobei je nach Fragestellung als Liposom entweder Metafectene μ oder Metafectene μ fluoR und als Eisenoxidpartikel entweder CombiMag bzw. FluoMag-C verwendet wurde.

Als Flussmedium wurde das in Versuchsreihen (4.1.2) etablierte Kokulturmedium verwendet. Dieses wurde auf 37° C erwärmt und in eine Plastikpak Perfusor Spritze 50 ml aufgezogen. Um einen kontinuierlichen Fluss des Mediums zu gewährleisten, wurde diese Spritze in die Perfusorpumpe eingespannt und das Schlauchsystem angeschlossen. Die Pumpe wurde auf die gewünschte Flussgeschwindigkeit eingestellt, so dass das Medium im kontinuierlichen Fluss über die Kokultur strömte. Danach wurden die Transfektionsreagenzien (3.8) auf ein oder zwei 1 ml- Spritzen (Braun) aufgeteilt und diese zum Schutz der fluoreszierenden Partikelkomponenten gegen Licht mit Alufolie umwickelt. Auch die Kanäle in den ibidi μ -slides wurden mit Alufolie abgedeckt. 100-150 μ l Transfektionsreagenz wurde unter Fluss ohne Verwendung eines Magneten ins Schlauchsystem gegeben, um den Totraum zu füllen, damit bei Applikation unter Magneteinfluss bei den jeweils ersten Versuchen keine Abweichungen des Reagenzvolumens auftraten. Die Slides wurden durch Einsetzen des Luer-Locks in ein Reservoir eines Kanals an die Flusskammer angeschlossen, wobei darauf zu achten war, dass sich keine Luftblasen im System befanden. Der Fluss wurde mit oben eingestellter Flussgeschwindigkeit gestartet. Bei Versuchen mit Magnetverwendung wurde nun der Magnet unter den untersuchenden Kanal des Slides geschoben. Danach wurden unter stetigem Druck innerhalb von 3 Sekunden 100 μ l Transfektionsreagenz in das Flusssystem injiziert. Der stetige Fluss des Mediums wurde nun für die gewünschte Dauer beibehalten und darauf geachtet, dass weder der Magnet noch die Flusskammer bewegt wurden. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde erst der Fluss unterbrochen und dann der Magnet entfernt, um ein nachträgliches, artifizielles Abschwemmen der Partikel zu vermeiden.

Direkt nach Beendigung der Versuche, ohne die Kanäle zu spülen oder eine Mediumwechsel vorzunehmen, wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Bei Kultivierungsversuchen wurde nach 24 h ein Wechsel auf das in 4.1.2 etablierte Kokulturmedium vorgenommen.

3.11.1 Abhängigkeit der Partikelretention von der Zeit

Die Versuche wurden wie in 3.11 beschrieben durchgeführt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,57 ml/min für alle Versuchsreihen. Die Dauer des Flusses betrug 5, 15, oder 30 min und vergleichend wurde die Partikelretention bei Verwendung des Halbach Array, des Stabmagneten und ohne Magnet untersucht. Die Partikel wurden wie in 3.8 beschrieben hergestellt.

Hierbei wurden zwei Markierungskombinationen verwendet (Tab. 1). In beiden Kombinationen wurde das Plasmid *pEPito-eGFP* mit TOTO-1-Jodid markiert. Für Kombination 1 wurde als Eisenoxidanteil markiertes FluoMag-C und als Liposom unmarkiertes Metafectene μ verwendet. Kombination 2 bestand aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR) und unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag). Durch die Markierung nur zweier Komponenten in zwei unterschiedlichen Kombinationen konnte eine Überlagerung von drei Fluoreszenzsignalen vermieden und trotzdem untersucht werden, ob die Partikelkomposition alle anfänglich verwendeten Komponenten enthielten.

	DNA	TOTO-1-	Eisenoxid	Liposom
Kombination 1	<i>pEPito-eGFP</i> , Jodid-markiert		<i>FluoMag-C</i>	Metafectene μ
Kombination 2	<i>pEPito-eGFP</i> , Jodid-markiert		CombiMag	Metafectene μ <i>fluoR</i>

Tab. 1 Markierungskombinationen zur Untersuchung zeitabhängiger Partikelretention

3.11.2 Abhängigkeit der Partikelretention von der Feldstärke

In dieser Versuchsreihe wurde die Retentionseffizienz in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke untersucht. Dies war wichtig, um zu evaluieren, welche Feldstärke im Zielgewebe erzeugt werden muss, um *intelligent particles* gegen den Blutfluss zurück zu halten, damit diese dann in die Zielzellen transportiert werden können. Dafür wurde der Halbach Array im Vergleich zu 2 Stabmagneten getestet. Um verschiedene Feldstärken untersuchen zu können, wurden Plexiglasplatten mit einer Dicke von 1 mm zu Schichten mit Dicken zwischen 2 und 10 mm kombiniert und die Magnetfeldstärke in Abständen von 0-10 mm zum Magneten gemessen. Diese Abstände entsprechen wie in Tab. 5 (S. 50) ersichtlich verschiedenen Magnetfeldstärken. Eine Negativkontrolle wurde ohne Anwendung eines Magneten durchgeführt.

3.11.3 Abhängigkeit der Partikelretention von der Flussgeschwindigkeit

Die Versuche wurden wie in 3.11 beschrieben in μ -Slides VI^{0.1} und μ -Slides VI^{0.4} durchgeführt, wobei *in vivo* auftretende, physiologische Flussgeschwindigkeiten untersucht wurden. Der Halbach Array diente als Magnet. Für beide Flusskammern wurde je ein Ansatz ohne Fluss (Positivkontrolle) und ohne Magnet (Negativkontrolle) durchgeführt. Die Flussgeschwindigkeiten wurden basierend auf physiologischen Blutflüssen in Venen verschiedener Durchmesser errechnet, wobei Höhe und Breite der Kanäle in die Berechnung einfließen (Tab. 2).

Vene	Flussgeschwindigkeit <i>in vivo</i> (cm/s)	<i>in</i> Flussgeschwindigkeit in der Flusskammer (ml/h)
Sinusoidale Vene	0,03	1,71
Terminale Portalvenolen	0,09	4,9
Dritter Portalvenenast	8,7	31,5
Hauptast der Portalvene	17	61,2

Tab. 2 Flussgeschwindigkeiten in Venen verschiedener Größe

3.11.4 Validierung der Partikelstabilität

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Stabilität der Partikelkompositionen von *in vivo* auftretenden Scherkräften analysiert. Zusätzlich haben wir untersucht, ob sich die Partikelstabilität in Abhängigkeit von der Flussdauer ändert. Dafür wurden Flussversuche wie in 3.11 beschrieben durchgeführt. Zwei verschiedene Partikelkompositionen wurden untersucht (Tab. 1) um zu evaluieren, wie stark die DNA sowohl an das Eisenoxid als auch an das Liposom gebunden ist. Die Flussrate betrug bei allen Versuchen 0,57 ml/ min, als Magnet wurde der Halbach Array verwendet.

3.11.4.1 Abhängigkeit der Partikelstabilität von der Scherkraft

Um den Einfluss von Scherkräften auf die Partikelstabilität zu untersuchen, wurden Experimente unter Anlegen verschiedener, *in vivo* auftretender Scherkräfte durchgeführt. Diese Scherkräfte resultieren aus Länge und Durchmesser der passierten Blutgefäße und der darin

auftretenden Flussgeschwindigkeit. Es wurden neben Flusskammern basierend auf μ -Slide VI^{0,4}, collagen coated auch Flusskammern basierend auf μ -Slide VI^{0,1} verwendet, da die Flussrate, die zur Erlangung der gewünschten hohen Scherkräfte in sinusoidalen Venen nur in Kanälen mit kleinem Volumen mit der von uns verwendeten Pumpe erreicht werden konnte. Die Flussdauer betrug 15 min, als Magnet wurde der Halbach Array verwendet. Um die in Tab. 3 angegebenen Scherkräfte zu erzielen, wurden die Flussraten angepasst.

Venentyp	Scherkraft in vivo [Dyn/cm ²]	Ibidi μ -slide, collagen coated	Flussrate [ml/h]
<i>Sinusoidale Vene</i>	6,28	μ -Slide VI ^{0,1}	3,4
<i>Terminale Portalvenole</i>	4,1	μ -Slide VI ^{0,1}	2,2
<i>Dritter Ast der Portalvene</i>	2,7	μ -Slide VI ^{0,4}	92, 4
<i>Hauptast der Portalvene</i>	2,4	μ -Slide VI ^{0,4}	81,6

Tab. 3 Venengrößen in vivo und in ihnen vorkommende Scherkräfte

3.11.4.2 Abhängigkeit der Partikelstabilität von der Zeit

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob die Komponenten der *intelligent particles* unter Flussbedingungen mit Zunahme der Zeit instabil werden und dissoziieren, wurden wie in Tab. 1 beschrieben zwei unterschiedliche Markierungsansätze der Partikel verwendet. Diese Partikel wurden dann der Flusskammer zugeführt und ein Fluss mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,57 ml/min angelegt. Die Partikelstabilität wurde als Kolo-kalisation der einzelnen Komponenten (Plasmidvektor, Eisenoxidpartikel, Liposom) zu drei verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 15 min, 30 min) untersucht. Dabei wurden jeweils der Halbach Array und der singuläre Stabmagnet verglichen.

3.12 Programme

Um die Anzahl der retinierten Partikel zu evaluieren, wurde die Software *ImageJ* (National Institutes of Health, USA) verwendet. Auch die Kollokalisierung der Partikelkomponenten wurde mit dieser Software ausgewertet. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Software *Prism* (Graphpad, USA) durchgeführt. Für die Erstellung der Konfokalbilder wurde der Fluoview-Viewer (Olympus) verwendet, die Aufnahme erfolgte mit der Software Cell* (Olympus).

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung einer HUVEC/HepG2 Kokultur

In der vorliegenden Arbeit sollte ein zellkulturbasiertes Modell der Leber etabliert werden, welches die physikalische Barriere zwischen sinusoidalem Blutstrom und hepatischem Parenchym abbildet und gleichzeitig die Simulation physiologischer Parameter im Gefäßsystem der Leber erlaubt wie Flussgeschwindigkeiten und Scherkräfte. Als erster Schritt wurde eine Kokultur bestehend aus zwei Monolayern von HepG2-Zellen und HUVEC-Zellen hergestellt. Die Anforderungen an diese Versuchsreihe waren erstens die Optimierung der jeweiligen Anzahl ausgesäter Zellen und zweitens die Generierung eines geeigneten, für beide Zelltypen adäquaten Mischmediums, um eine optimale Kultivierung der Kokultur zu ermöglichen.

4.1.1 Etablierung konfluenter Zelllayer

Um ein Modell zu generieren, das die physiologischen Verhältnisse abbildet, sollten beide Monolayer unabhängig voneinander möglichst konfluent sein. Gerade für die Funktion der Endothelzellschicht als Barriere zwischen Blutstrom und Parenchym ist der Aufbau eines geschlossenen Zellverbands unabdingbar. Zur Vorbereitung der Kokulturen aus HepG2 und HUVEC, wurden in dieser Versuchsreihe verschiedene Zellzahlen beider Zelllinien in ibidi μ -slides VI^{0,4} Collagen IV-coated ausgesät. Die Zellen wurden per Neubauer Zählkammer gezählt und so verdünnt, dass die entsprechende Zellzahl in 25 μ l Medium vorlag.

Für die Zelllinie HepG2 wurden pro μ -Slide-Kanal in 10.000er Schritten 70.000 bis 120.000 Zellen in 25 μ l RPMI ausgesät. Für die Zelllinie HUVEC wurden in 25 μ l ECGM ebenfalls in 10.000er Schritten 40.000 bis 90.000 Zellen ausgesät. Das jeweilige Medium wurde nach 60 Minuten Sedimentationszeit auf 150 μ l aufgefüllt. Nach 24 h Kultivierungsdauer wurde die Konfluenz und die Anzahl nicht-adhärenter Zellen lichtmikroskopisch beurteilt und die optimale Zellzahl bestimmt.

Die in Abb. 14 und Abb. 15 dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen von verschiedenen Zellzahlen ausgesäter HUVEC bzw. HepG2 nach 24-stündiger Kultivierung dienen der visuellen Beurteilung der Konfluenz der haftenden Zellen und des Anteils nicht sedimentierter und somit abgestorbener Zellen. Eine Aussaat von 60.000 HUVEC Zellen erwies sich als optimal, da hier eine möglichst hohe Konfluenz, gleichzeitig ein möglichst niedriger Anteil

toter nicht-adhärenter Zellen vorlag. Für die Zelllinie HepG2 lag die optimale Zellzahl bei 120.000. Mit diesen Zellzahlen wurden alle nachfolgenden Versuche durchgeführt.

Für optimale Bedingungen der Aussaat von HepG2 und HUVEC in ibidi μ -slides VI ^{0,1} Collagen IV-coated wurde das Verhältnis der Wachstumsfläche der Kanäle zu Grunde gelegt. Die Kanäle der ibidi μ -slides VI ^{0,4} haben eine Fläche von 0,6 cm², die der ibidi μ -slides VI ^{0,1} 0,17 cm².

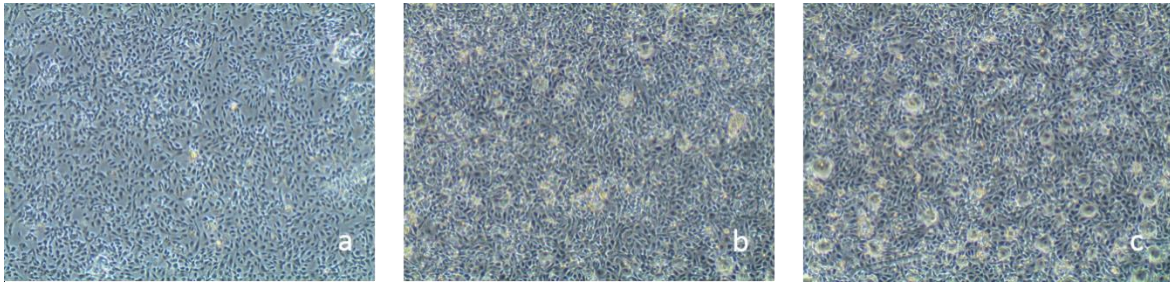


Abb. 14 Lichtmikroskopische Aufnahme HUVEC, μ -Slide VI ^{0,4} collagen coated, 24 h nach Aussaat, 4x vergrößert (a: 40.000, b: 60.000, c: 80.000 Zellen)

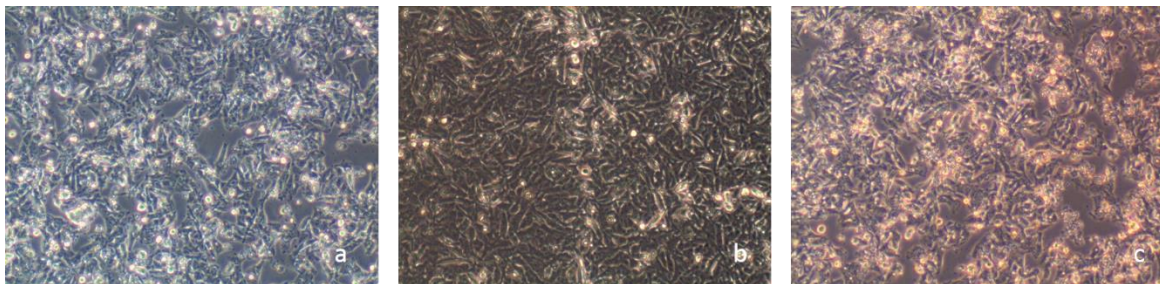


Abb. 15 Lichtmikroskopische Aufnahme HepG2, μ -Slide VI ^{0,4} collagen coated, 24 h nach Aussaat, 4x vergrößert (a: 80.000, b: 100.000, c: 120.000 Zellen)

4.1.2 Medienoptimierung

Beide Zelllinien, HUVEC und HepG2, benötigen ein zellspezifisches Medium, um unter optimalen Bedingungen kultiviert werden zu können. Um zu untersuchen, in welchem Medium die Kokultur aus HepG2 und HUVECs bei möglichst hoher Vitalität kultiviert werden kann, wurde die Vitalität beider Zelllinien bei Kultivierung in verschiedenen Medienzusammensetzungen mittels eines Viabilitätsassays untersucht. Dafür wurde eine 96-Well-Platte mit 50 μ l Rat Tail Collagen I pro Well (0,5 mg/ml, Life Technologies) befüllt und für 30 min inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Kollagen-Lösung mittels Vakuumpumpe abgesaugt und die Platte für weitere 15 min getrocknet. Nun wurden in je 48 Wells der Platte 10.000 HUVECs in 200

µl ECGM bzw. 20.000 HepG2 in 200 µl RPMI ausgesät und 24 h kultiviert. Danach wurde das Medium mittels Vakuumpumpe abgesaugt und durch 200 µl verschiedener Medienmischungen ersetzt. Mit diesen Medienkompositionen (Tab. 4) wurden die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Um die Effekte der verschiedenen Medienzusammensetzungen auf die Vitalität der Zellen zu vergleichen, wurden die Zellvitalität bei Kultivierung in 100 % RPMI als 100 % gesetzt.

RPMI [%]	ECGM [%]
100	-
75	25
50	50
25	75
-	100

Tab. 4 Zusammensetzungen des Kokulturmediums für HepG2/HUVEC

HepG2 Zellen zeigten eine höhere Vitalität (135 %) bei einer Kombination aus 75% RPMI und 25% ECGM im Vergleich zur Kultivierung in reinem RPMI (Abb. 16). Die Kombination aus 50% RPMI und 50% ECGM brachte eine Vitalität der Zellen von 131%. Dagegen wiesen in einer Zusammensetzung von 25% RPMI und 75% ECGM kultivierte HepG2 eine etwas geringere Vitalität von 119% auf. In reinem ECGM waren HepG2 zu 104% vital. Deutlich erkennbar war eine Zunahme der Vitalität der kultivierten HepG2 bei den verschiedenen Zusammensetzungen aus RPMI und ECGM im Vergleich zur Kultur in reinem RPMI.

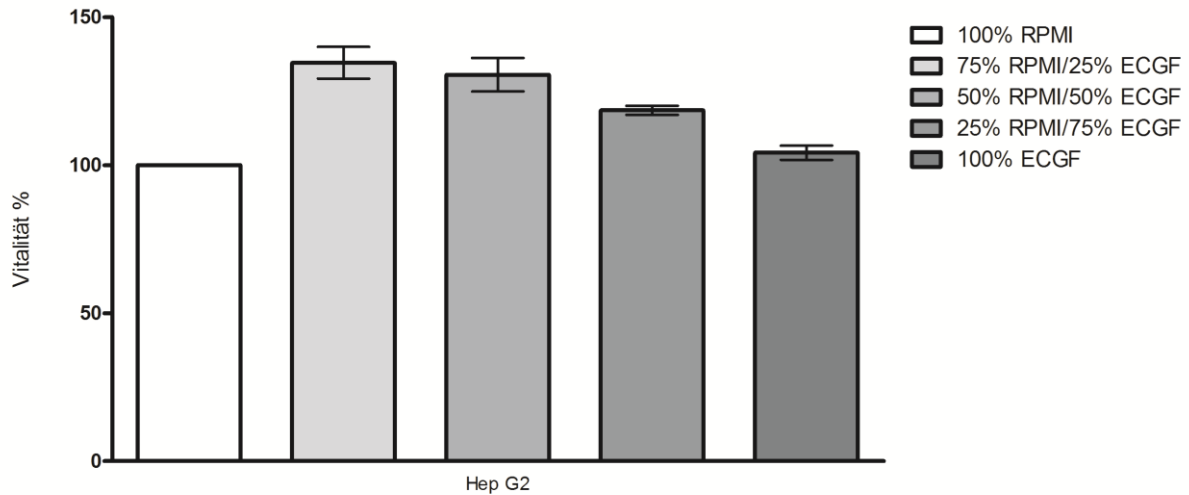


Abb. 16 Vitalität von HepG2 in % 24 h nach Aussaat abhängig von Medienzusammensetzung, die Vitalität bei 100% RPMI wurde als 100% gesetzt (Mittelwerte \pm SD, $n=12$ für 100% RPMI und 100% ECGM; $n=8$ für Mischmedien)

Nach 24-stündiger Kultivierung in einem Medium bestehend aus 75% RPMI und 25% ECGM zeigten die HUVEC eine Vitalität von 170 % im Vergleich zur Vitalität bei Kultur in 100 % RPMI (Abb. 17) und von 179 % bei Kultivierung in 50% RPMI/ 50% ECGM bzw. 176 % bei einer Zusammensetzung des Kulturmediums von 25% RPMI und 75% ECGM. In reinem ECGM waren 146% der Zellen im Vergleich zu den festgesetzten 100% bei reinem RPMI vital.

Auf Grund der Ergebnisse der Vitalitäts-Assays wurden die Kokulturen für alle folgenden Experimente mit einer Medienzusammensetzung von 50% RPMI und 50% ECGM kultiviert.

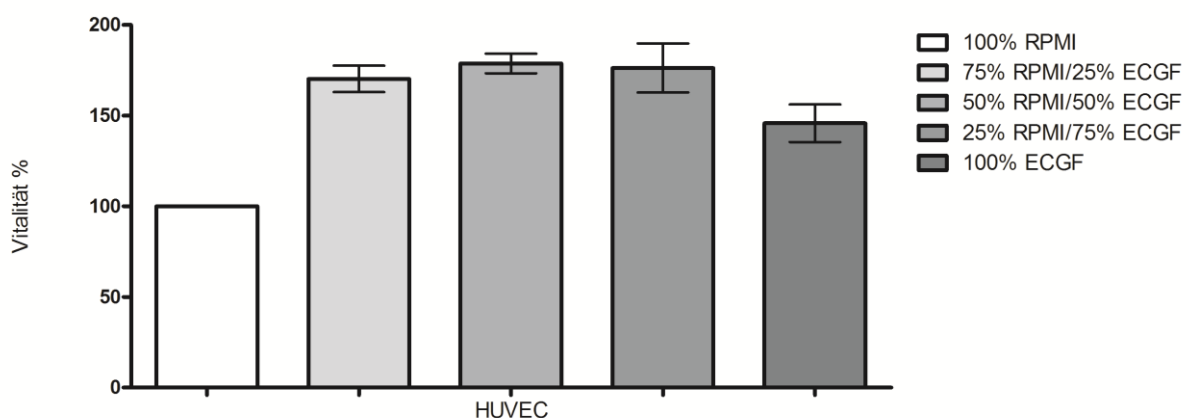


Abb. 17 Vitalität von HUVEC 24 h nach Aussaat abhängig von der Medienzusammensetzung, die Vitalität bei 100% RPMI wurde als 100% gesetzt. (Mittelwerte \pm SD, $n=12$ für 100% RPMI und 100% ECGM; $n=8$ für Mischmedien)

4.1.3 Etablierung der Kokultur

Als Modell der sinusoidalen Barriere zwischen Blutstrom und Leberparenchym sollte eine Kokultur aus HepG2 und HUVECs etabliert werden. Dafür wurden die in 4.1.1 ermittelte optimale Zellzahl von 120.000 HepG2 in ibidi μ -slides VI^{0,4} Collagen IV-coated ausgesät. Nach einer Ruhezeit von 60 Minuten, in der den Zellen die Möglichkeit zur Sedimentation und Anhaftung gegeben wurde, wurde das Medium auf 150 μ l aufgefüllt, eine Kollagenschicht aufgetragen und die in 4.1.1 bestimmte optimale Zellzahl von 60.000 HUVECs ausgesät. Die Kokultur wurde für weitere 24 Stunden kultiviert und danach für die Durchführung der Flussversuche verwendet.

Nach Durchführung der Fluoreszenzfärbung der Kokultur (3.6.5) wurden Schichtaufnahmen mittels Konfokalmikroskopie hergestellt. Auf der Aufnahme Abb. 18 ist eine Schichtung beider Zelllayer aus HepG2 und HUVEC erkennbar. Direkt am Kanalboden liegen die grün fluoreszierenden HepG2 an, aufliegend sind rot fluoreszierende HUVEC zu sehen. An wenigen Stellen ist eine Durchdringung der HepG2-Schicht durch HUVEC an der gelben Fluoreszenzüberlagerung erkennbar. Die Kokultur hat eine Gesamtdicke von ca. 245 μ m. Damit wurde das Ziel einer Kokultur mit nahezu geschlossenem Verband der endothelialen HUVEC Zellen erreicht.

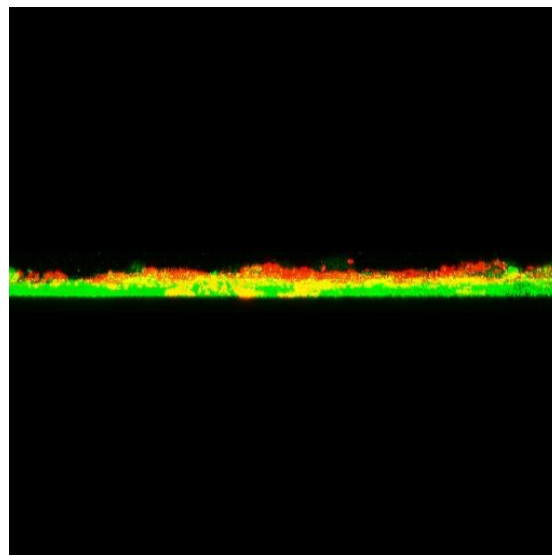


Abb. 18 konfokalmikroskopische Aufnahme der Kokultur aus HepG2 (grün) und HUVECs (rot), Sagittalschnitt, Dicke der Kokultur: 245 μ m

4.2 Physikalische Charakterisierung unterschiedlicher Magnettypen und Magnetanordnungen

Die Magnetfeldstärken und -ausdehnungen eines konstruierten Halbach Arrays, bestehend aus mehreren kleinen Stabmagneten, wurden vergleichend mit einem kleinen und einem großen Stabmagneten evaluiert. Dafür wurde die Feldstärke in verschiedenen Abständen mittels eines Teslameters mit Metallsonde (Typ Bell 640) gemessen und als Kurve aufgetragen. Diese Messungen wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn Stephan von der Firma Neue Magnetodyn GmbH in München durchgeführt.

Die Messungen der Magnetfeldstärken aller drei Magnettypen zeigten einen Abfall in Abhängigkeit vom Abstand zum Magneten (Abb. 19). Alle drei Kurven nahmen einen hyperbelähnlichen Verlauf an. Bei einem Abstand von 0 mm, also der Messung direkt auf der Magneto­berfläche, zeigte der Halbach Array eine höhere Feldstärke von 0,6 T als der große Stabmagnet mit 0,5 T. Der kleine Stabmagnet zeigte eine noch geringere Feldstärke von 0,36 T bei diesem Abstand. Der Halbach Array hatte bei einem Abstand von 1 mm mit 0,4 T eine fast identische Feldstärke wie der große Stabmagnet mit 0,43 T. Nur der singuläre kleine Stabmagnet zeigte bei diesem Abstand nur 0,25 T. Bei einem Abstand von 2 mm zum Magneten zeigten der große Stabmagnet 0,36 T, der kleine 0,16 T, der Halbach Array wurde bei 2,5 mm mit 0,23 T bestimmt. Somit war der große Stabmagnet ab diesem Abstand der stärkste der drei Magnettypen. Die Messungen bei 3 mm ergaben für den Halbach Array noch 0,2 T, für den kleinen Stabmagneten 0,12 T und für den großen Stabmagneten 0,32 T. Für die Abstände von 4 mm bzw. 5 mm existierten nur Werte für den kleinen (0,1 bzw. 0,07 T) und den großen Stabmagneten (0,22 bzw. 0,18 T).

Der weiteste gemessene Abstand in dieser Versuchsreihe war 10 mm. Hier ergaben sich Feldstärken von 0,02 T für den Halbach Array, 0,03 T für den kleinen und 0,1 T für den großen Stabmagneten. Der große Stabmagnet zeigte also bei Abständen > 1 mm die größte Magnetfeldstärke, während die Anordnung von kleinen Stabmagneten in einem Halbach Array die größere Magnetkraft bei Abständen < 1 mm entwickelte.

Abstand zum Magneten	Magnetfeldstärke [Tesla]		
	Halbach Array	kl. Stabmagnet	gr. Stabmagnet
0 mm	0,6	0,36	0,5
1 mm	0,4	0,25	0,43
2 mm		0,16	0,36
2,5 mm	0,23		
3 mm	0,2	0,12	0,32
4 mm		0,1	0,22
5 mm		0,07	0,18
10 mm	0,02	0,03	0,1

Tab. 5 Magnetfeldstärke abhängig vom Abstand zum Magneten, Vgl. Halbach Array, kleiner Stabmagnet, großer Stabmagnet

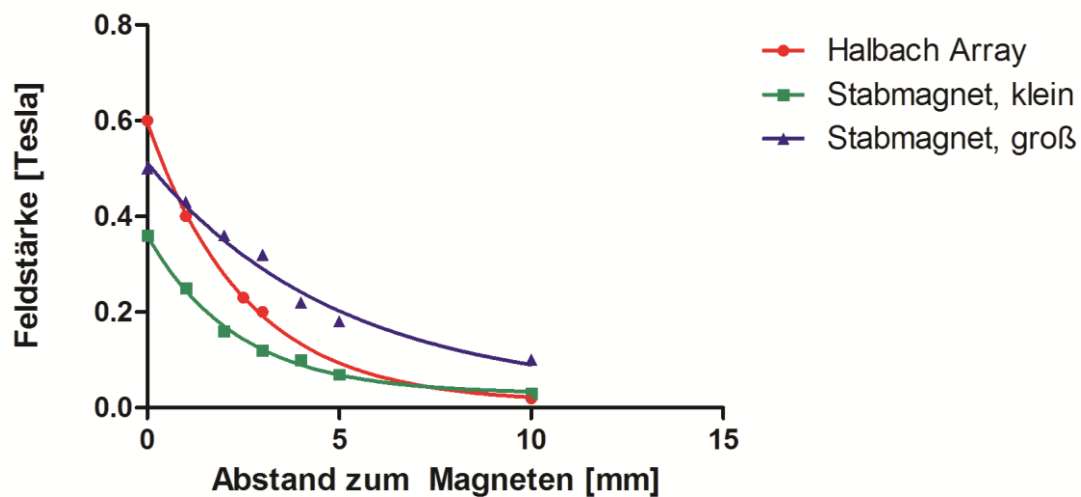


Abb. 19 Magnetfeldstärke abhängig vom Abstand zum Magneten als Kurven aufgetragen, Vgl. Halbach Array, kleiner Stabmagnet, großer Stabmagnet

Um die Ausbreitung der Magnetfeldlinien des in dieser Arbeit konstruierten Halbach Arrays sichtbar zu machen, wurde aus den Messdaten eine Simulation erstellt. Abb. 20 zeigt die computerbasierte Simulation der Stärke und Ausbreitung der Magnetfeldlinien des in dieser Arbeit erstellten und freundlicherweise von Herrn Stephan (Neue Magnetodyn GmbH, München) vermessenen Halbach Arrays. Deutlich erkennbar ist die Amplifikation der Feldstärke [T] auf der in der Simulation oben abgebildeten Seite des Magneten. Die gegenüberliegende Seite des Arrays zeigt eine Abschwächung des Magnetfeldes. Der Verlauf der Feldlinien ist somit vergleichbar zum Verlauf der Magnetfeldlinien des in

Abb. 11 schematischen Verlaufs des Halbach Arrays.

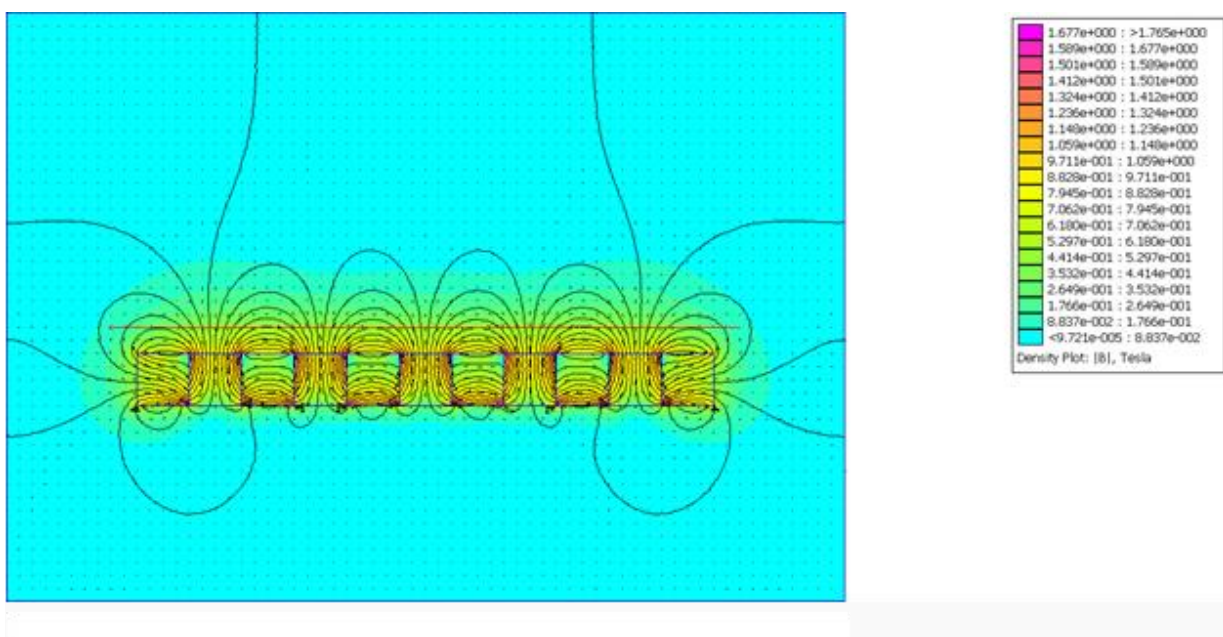


Abb. 20 Simulation der Magnetfeldausbreitung des Halbach Arrays bezogen auf die Messdaten (Magnetfeldstärke [T]), erstellt durch Hr. Stephan, Neue Magnetodyn GmbH (München)

4.3 Validierung der Partikelretention

In dieser Versuchsreihe sollten Parameter geprüft werden, die Einfluss auf die Retention und Stabilität der Partikel haben könnten. Es wurde untersucht, ob die Dauer des Flusses einen Einfluss auf die Anzahl der retinierten Partikel hat. Zusätzlich wurde ermittelt, welche Magnetfeldstärke am Zielgewebe vorherrschen muss, um die *intelligent particles* durch den Magneten gegen den Blutstrom zurück zu halten. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Flussgeschwindigkeit auf die Retentionseffizienz der Magneten untersucht. Im letzten Schritt wurde die Stabilität der *intelligent particles* in Abhängigkeit von Zeit und Scherkraftänderungen analysiert.

Dafür wurde eine Kokultur in der Flusskammer erstellt und dieser über einen permanenten Fluss zwei verschiedene Markerkombinationen der Partikel zugeführt. Für Kombination 1 wurde als Liposom unmarkiertes Metafectene μ und als Eisenoxidanteil markiertes Fluo-Mag-C verwendet, Kombination 2 bestand aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR) und unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag). Das Plasmid wurde in beiden Kombinationen markiert. Durch die Markierung nur zweier Komponenten konnte verhindert werden, dass es zu einer Überlagerung von drei Fluoreszenzsignalen kommt und trotzdem gezeigt werden, dass die *intelligent particles* alle anfänglich verwendeten Komponenten enthielten. Alle Experimente wurden wie beschrieben durchgeführt und der Einfluss der verschiedenen Parameter wie Zeit, Magnetfeldstärke und Flussgeschwindigkeit bzw. Scherkräfte auf die Retention der Partikel untersucht.

4.3.1 Abhängigkeit der Partikelretention von der Zeit

Um zu untersuchen, ob und wie stark die Dauer des angelegten Flusses einen Einfluss auf die Anzahl der retinierten Partikel in der Flusskammer hat, wurde die Retentionseffizienz bei einer Flussdauer von 5, 15 und 30 min gemessen. Damit sollte untersucht werden, ob die Partikel trotz erfolgreicher Retention nach einer längeren Flussdauer abgeschwemmt werden und damit für die Transfektion von Hepatozyten nicht mehr zur Verfügung stehen. Untersucht wurde der Halbach Array, der einfache Stabmagnet und als Negativkontrolle wurde die Retention ohne Magnet vermessen.

Für Kombination 1 wurde unmarkiertes Liposom (Metafectene μ), markiertes Eisenoxid (FluoMag-C) und markiertes Plasmid verwendet (siehe Tab. 1), es wurde also die Retention des Anteils der Eisenoxidpartikel direkt beobachtet. Bei einer Flussdauer von 5 min zeigte sich eine deutlich höhere Retentionseffizienz für den Halbach Array von 184 Partikeln im Vergleich zum Stabmagneten mit 140 Partikeln (Abb. 21). Ohne Magnet wurden 22 Partikel retiniert. Nach insgesamt 15 min wurden mit Hilfe des Halbach Arrays 169 Partikel, mit dem Stabmagneten 111 Partikel und ohne Magnet 7 Partikel retiniert. Die Anzahl der retinierten Partikel betrug nach 30 min beim Halbach Array 174, beim Stabmagneten 126 und in der Negativkontrolle 5 Partikel.

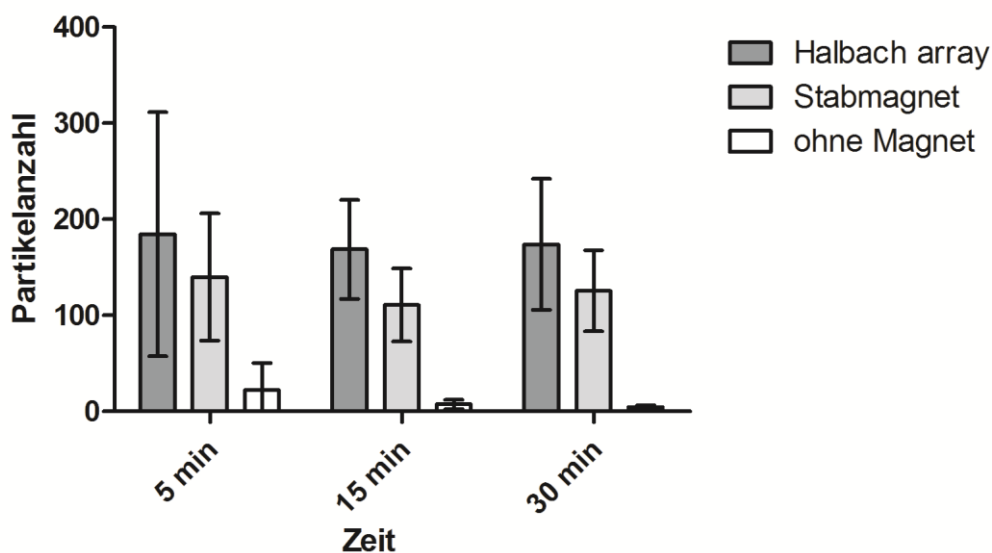


Abb. 21 Einfluss der Flussdauer auf die Anzahl der retinierten Partikel. Partikel bestehen aus unmarkiertem Liposom (Metafectene μ), markiertem Eisenoxid (FluoMag-C) und markiertem Plasmid, Vgl. Halbach Array, Stabmagnet, ohne Magnet (Mittelwerte \pm SD, n=3-4)

Für Kombination 2 (siehe Tab. 1) wurde markiertes Liposom (Metafectene μ fluoR), unmarkiertes Eisenoxid (CombiMag) und markiertes Plasmid verwendet, also die Retention des Liposomanteils beobachtet. Der Halbach Array erreichte bei einer Flussdauer von 5 min eine deutlich höhere Retentionseffizienz von 326 Partikeln im Vergleich zu 103 Partikeln beim Stabmagneten (Abb. 22). In der Negativkontrolle wurden 13 Partikel retiniert. Die Anzahl der retinierten Partikel betrug nach 15 min beim Halbach Arrays 279 Partikel, beim Stabmagneten 101 Partikel und ohne Magnet 1 Partikel. Nach 30 min wurden mittels Halbach Array 236, Stabmagneten 105 und in der Negativkontrolle 2 Partikel retiniert.

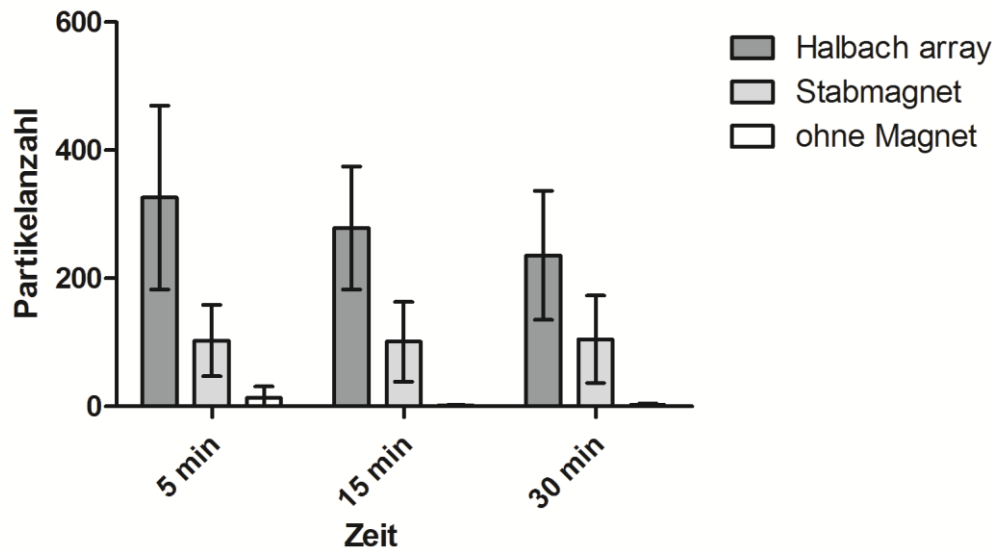


Abb. 22 Einfluss der Flussdauer auf die Anzahl der retinierten Partikel. Partikel bestehen aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR), unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag) und markiertem Plasmid, Vgl. Halbach Array, Stabmagnet, ohne Magnet (Mittelwerte \pm SD, n=2-6)

Abb. 23, Abb. 24, Abb. 25 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der *intelligent particles* bestehend aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR, rot dargestellt), unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag) und markiertem Plasmid (grün dargestellt). Die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale (gelb) zeigt eine Kolokalisation von Liposom und Plasmid und weist auf den Erhalt der ternären Komplexe hin.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Anzahl der retinierten Partikel in beiden Kombinationen in Anhängigkeit von der Flussdauer nur wenig abnimmt. Zudem wurde gezeigt, dass das Retentionsvermögen des Halbach Arrays aufgrund seines stärkeren Magnetfeldes größer ist als das des Stabmagneteten. Die Negativkontrolle zeigte so gut wie keine retinierten Partikel.

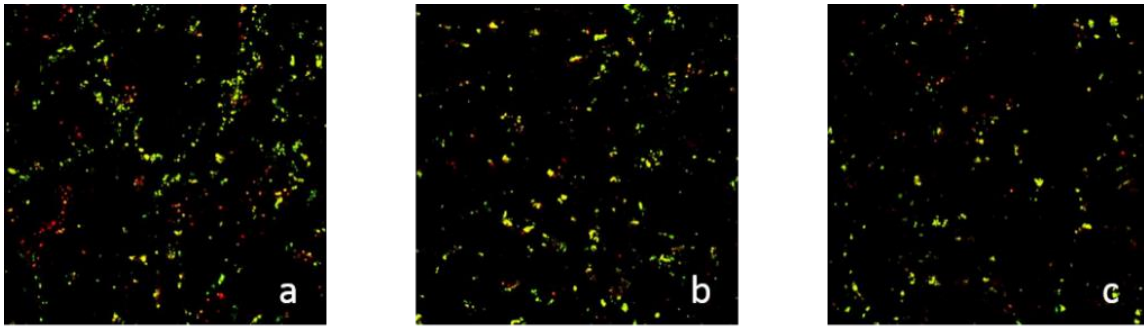


Abb. 23 Fluoreszenzaufnahme der retinierten Partikel abhängig von der Flussdauer, **Halbach Array** ($a=5$ min, $b=15$ min, $c=30$ min). Partikel bestehen aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR, rot dargestellt), unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag) und markiertem Plasmid (grün dargestellt). Überlagerungen erscheinen gelb.

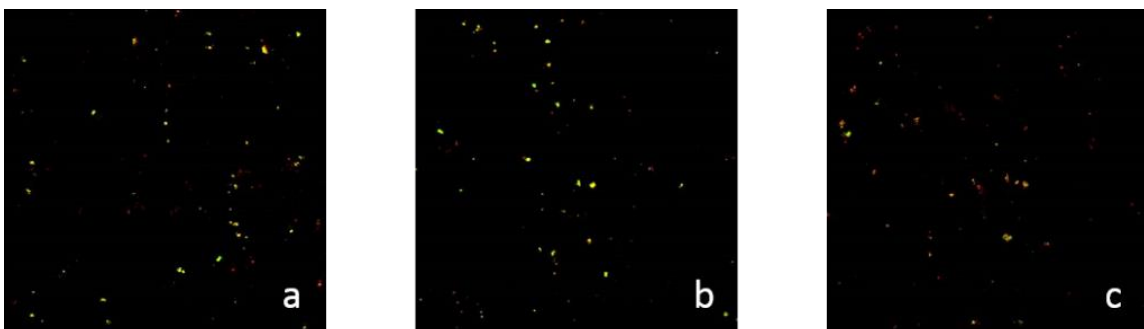


Abb. 24 Fluoreszenzaufnahme der retinierten Partikel abhängig von der Flussdauer, **Stabmagnet** ($a=5$ min, $b=15$ min, $c=30$ min). Partikel bestehen aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR, rot dargestellt), unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag) und markiertem Plasmid (grün dargestellt). Überlagerungen erscheinen gelb.

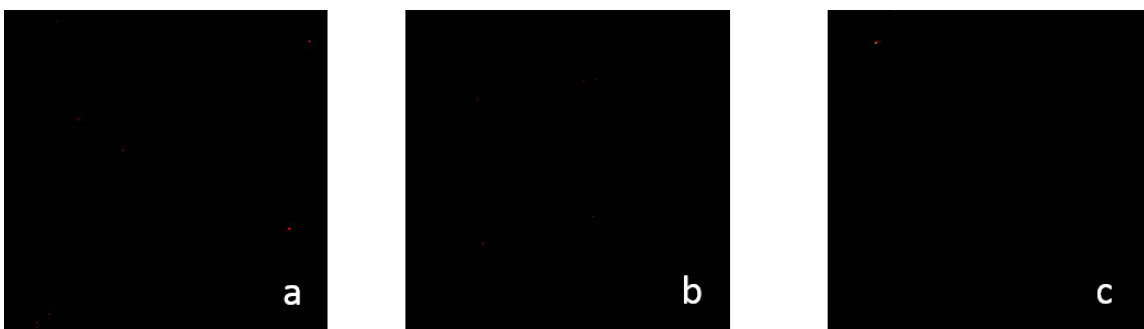


Abb. 25 Fluoreszenzaufnahme der retinierten Partikel abhängig von der Flussdauer, **ohne Magnet** ($a=5$ min, $b=15$ min, $c=30$ min). Partikel bestehen aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR, rot dargestellt), unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag) und markiertem Plasmid (grün dargestellt). Überlagerungen erscheinen gelb.

4.3.2 Abhängigkeit der Partikelretention von der Feldstärke

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss der Magnetfeldstärke auf die Retentionseffizienz der Magneten untersucht. Dadurch sollte evaluiert werden, welche Feldstärke am Zielorgan vorherrschen müsste, um eine ausreichende Menge an *intelligent particles* für einen erfolgreichen Gentransfer zu retinieren. Wie in Tab. 5 beschrieben werden die verschiedenen Magnetfeldstärken in verschiedenen Abständen der Flusskammer zum Magneten untersucht.

Der Halbach Array zeigte bei einem Abstand von 0 mm, also direkt auf der Magnetoberfläche eine Retention von 173 Partikeln im Vergleich zum kleinen Stabmagneten, der nur 78 Partikel retinierte (Abb. 26-29). Erhöhte man den Abstand der Flusskammer zum Magneten auf 2 mm, wurden vom Halbach Array 69 Partikel retiniert, vom Stabmagneten 56. Bei 4 mm Abstand verringerte sich die Anzahl retinierter Partikel beim Halbach Array auf 26 im Vergleich zu 21 beim Stabmagneten. Erst bei einem Abstand von 6 mm war die Retention des Stabmagneten mit 16 Partikeln größer als die des Halbach Arrays mit 11 Partikeln. Bei einem Abstand von 10 mm zeigten sich die geringsten Werte, die Partikelanzahl betrug für den Halbach Array lediglich 1 und für den Stabmagneten 3 Partikel. Ohne Magnet wurden in keinem der Versuche Partikel retiniert.

Der Halbach Array zeigte somit eine bessere Partikelretention als der Stabmagnet und die Anzahl der retinierten Partikel stieg mit zunehmendem Abstand zwischen Zellen und Magnet, also abnehmender Feldstärke. Für den Abstand 0mm ist die Partikelretention des Halbach Arrays signifikant höher, für alle anderen Werte wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen.

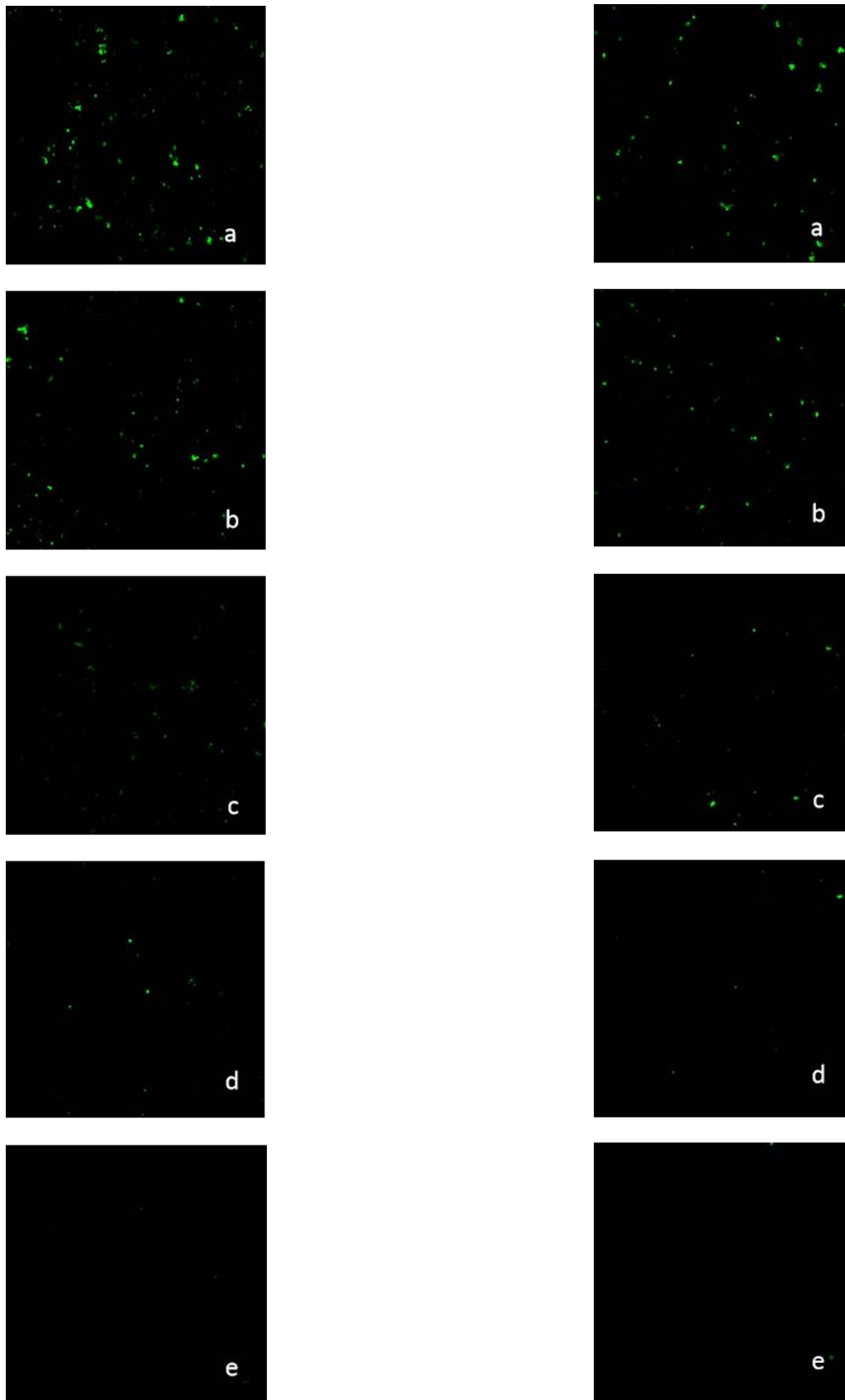


Abb. 26 Fluoreszenzaufnahme der retinierten Partikel (Plasmid grün dargestellt) in Abhängigkeit von der Feldstärke des **Halbach Arrays** (links) und des **großen Stabmagneten** (rechts). (a: 0 mm, b: 2 mm, c: 4 mm, d: 6 mm, e: 10 mm)

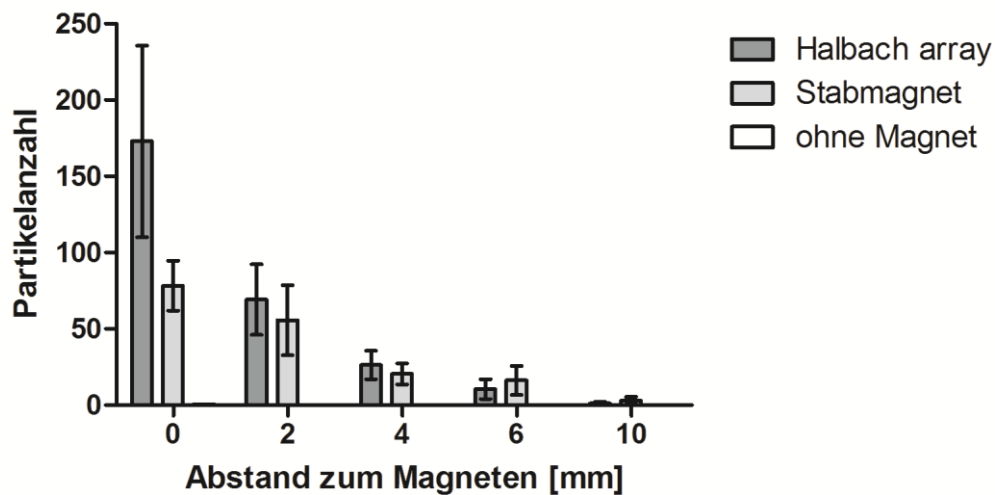


Abb. 27 Partikelretention abhängig vom Abstand zum Magneten, vgl. Halbach Array, Stabmagnet, ohne Magnet (Mittelwerte \pm SD, $n=5-6$)

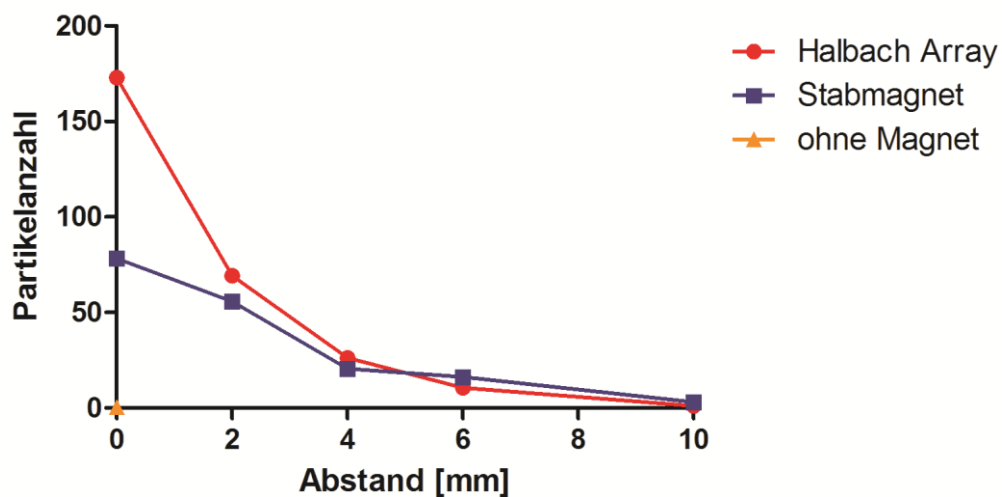


Abb. 28 Partikelretention abhängig vom Abstand zum Magneten als Kurve aufgetragen, vgl. Halbach Array, Stabmagnet, ohne Magnet (Mittelwerte \pm SD, $n=5-6$)

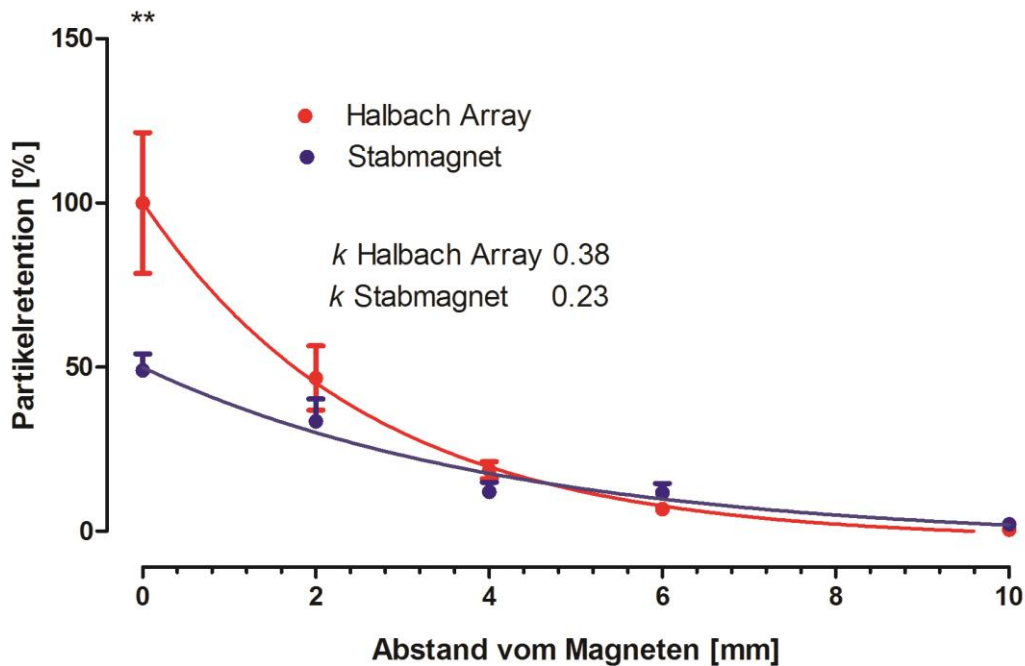


Abb. 29 Partikelretention abhängig vom Abstand zum Magneten, normalisiert

4.3.3 Abhängigkeit der Partikelretention von der Flussgeschwindigkeit

Therapeutisch wirksame Partikel sind im Patienten *in vivo* einer Vielzahl unterschiedlicher Flussgeschwindigkeiten ausgesetzt. Die unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten im Gefäßsystem des Menschen resultieren aus der Entfernung zum Herzen, dem Verzweigungsgrad des Gefäßsystems, der Elastizität der Gefäßwand und dem Durchmesser des durchflossenen Blutgefäßes. In dieser Versuchsreihe wurde also untersucht, inwieweit die Geschwindigkeit des angelegten Flusses die Retentionseffizienz der Magneten beeinflusst, ob also die Anzahl retinierter Partikel bei steigender Flussgeschwindigkeit abnimmt.

Im μ -Slide VI^{0,4} wurden ohne Anlegen eines Flusses als Positivkontrolle 988 Partikel retiniert. Bei Anlegen von 0,03 cm/sec entsprechend den Bedingungen einer sinusoidalen Vene, lag die Retention bei 503 Partikeln, erhöhte man den Fluss auf 0,09 cm/sec, entsprechend einer terminalen Portalvenole, wurden noch 395 Partikel zurück gehalten. Die Negativkontrolle für diesen Ansatz zeigte eine Retention von 3 Partikeln.

Der zweite Ansatz wurde in einem μ -Slides VI^{0,1} durchgeführt, um die Bedingungen in den großen Lebergefäßen zu simulieren. Hier zeigte sich in der Positivkontrolle ohne Fluss eine Retention von 104 Partikeln. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 8,7 cm/sec (entsprechend

dem dritten Portalvenenast) verringerte sich die Anzahl retinierter Partikel auf 37, 22 Partikel wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 17 cm/sec entsprechend der Flussgeschwindigkeit der Portalvene zurück gehalten. Ohne Verwendung des Magneten lag die Partikelanzahl bei 6.

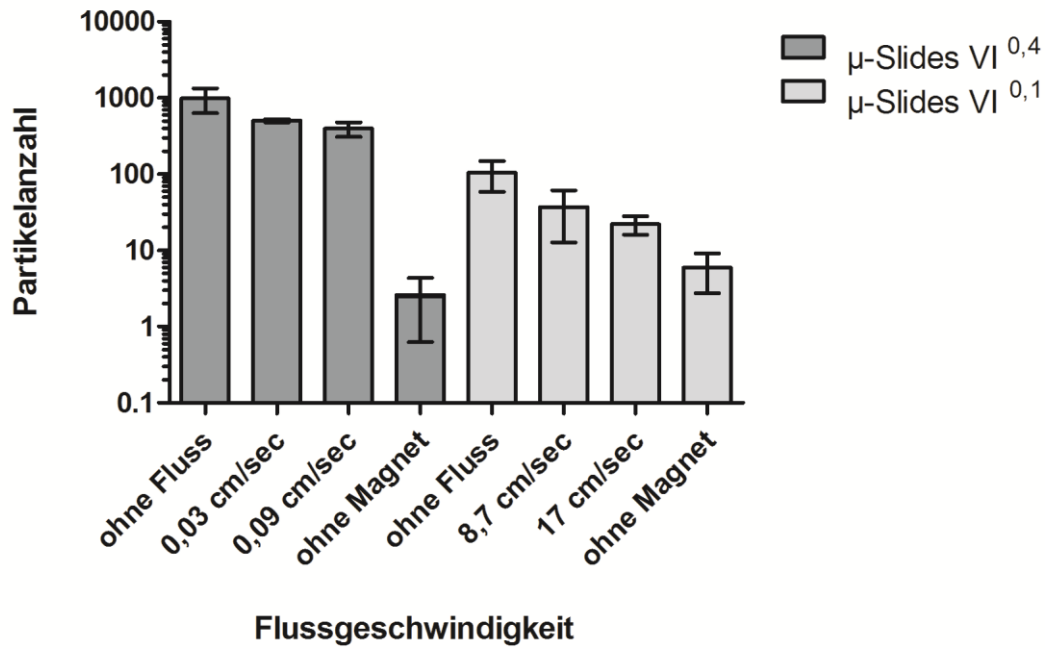


Abb. 30 Partikelretention abhängig von der Flussgeschwindigkeit (Mittelwerte \pm SD, n=6)

4.3.4 Validierung der Partikelstabilität

In vorangegangenen Versuchen wurde die Anzahl der retinierten Partikel evaluiert, jedoch ohne die Stabilität der ternären Transfektionspartikel zu betrachten. Um diese zu untersuchen, wurden zwei Versuchsansätze gewählt. Zum einen wurde untersucht, ob die Partikelkomponenten durch veränderliche Scherkräfte dissoziieren. Zum anderen wurde der Einfluss der Dauer des angelegten Flusses auf die Stabilität der *intelligent particles* evaluiert.

4.3.4.1 Abhängigkeit der Partikelstabilität von der Scherkraft

Die *intelligent particles* wurden wie in 3.8 beschrieben hergestellt. Dabei wurden zwei Markierungsansätze verwendet, um die Stabilität sowohl zwischen Eisenoxid und Plasmid als auch zwischen Liposom und Plasmid zu untersuchen, ohne dass es zu einer Überlagerung von drei Fluoreszenzsignalen kommt. Die Stabilität wurde in Prozent der Kollokalisation der Fluoreszenzsignale angegeben.

Für *Kombination 1* wurde markiertes Eisenoxid (FluoMag-C), unmarkiertes Liposom (Metafectene μ) und markiertes Plasmid verwendet. Durch diese Kombination wurde die Stabilität der Bindung zwischen Plasmid und Eisenoxidanteil untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse (Abb. 32) zeigen, dass bei Untersuchung markierter Eisenoxidpartikel und markiertem Plasmid die Kollokalisation bei einer Scherkraft von $2,4 \text{ dyn/cm}^2$ bei 53% lag und bei $2,7 \text{ dyn/cm}^2$ zeigte sich eine Kollokalisation von 56%. Bei Steigerung der Scherkräfte auf $4,1 \text{ dyn/cm}^2$ bzw. $6,18 \text{ dyn/cm}^2$ nahm die Kollokalisation beider Partikelkomponenten auf Werte von 39% bzw. 45% ab.

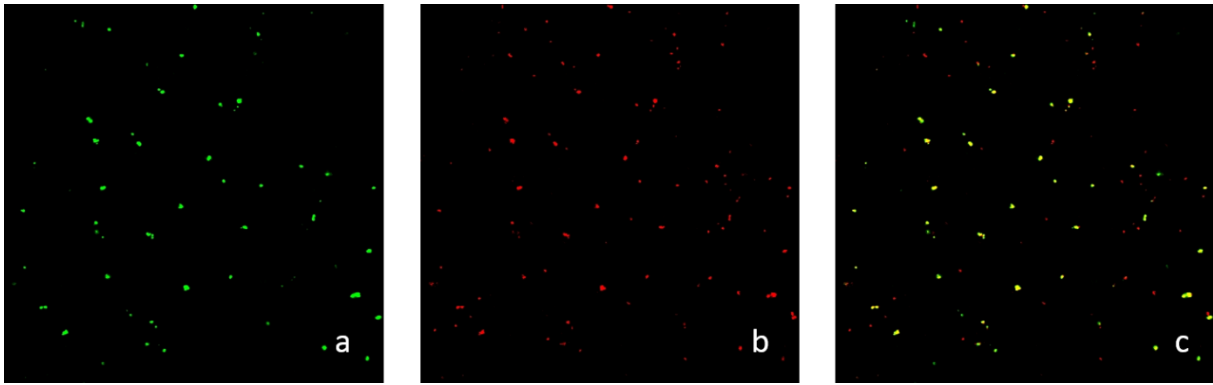


Abb. 31 Kolokalisation von Plasmid und Eisenoxid (a= Plasmid, TOTO-1-Jodid markiert, grün dargestellt; b= FluoMag-C, rot dargestellt; c= Overlay von a) und b))

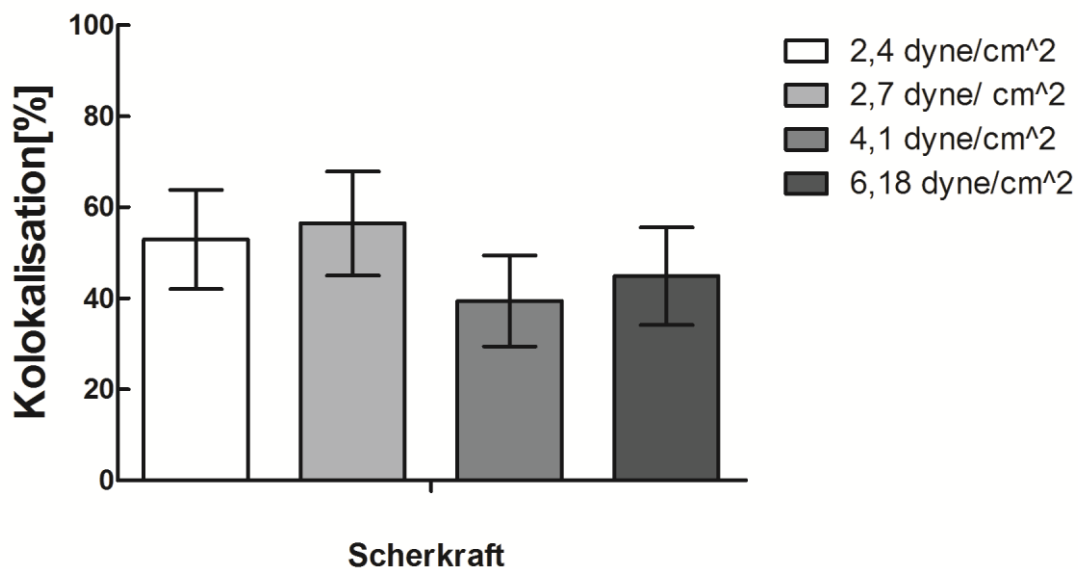


Abb. 32 Kolokalisation von Plasmid und Eisenoxid abhängig von der Scherkraft (Mittelwerte \pm SD, n=3)

Für die Untersuchung der Stabilität zwischen Plasmid und Liposom wurde in der *Kombination 2* unmarkiertes Eisenoxid (CombiMag), markiertes Liposom (Metafectene μ Fluor) und markiertes Plasmid verwendet. Bei der Untersuchung der Kombination aus markiertem Plasmid und markiertem Liposom (Abb. 34) unter verschiedenen Scherkräften, zeigte sich eine Kolokalisation von 73- 75% über den Bereich aller untersuchten Scherkräfte von 2,4- 6,18 dyn/cm².

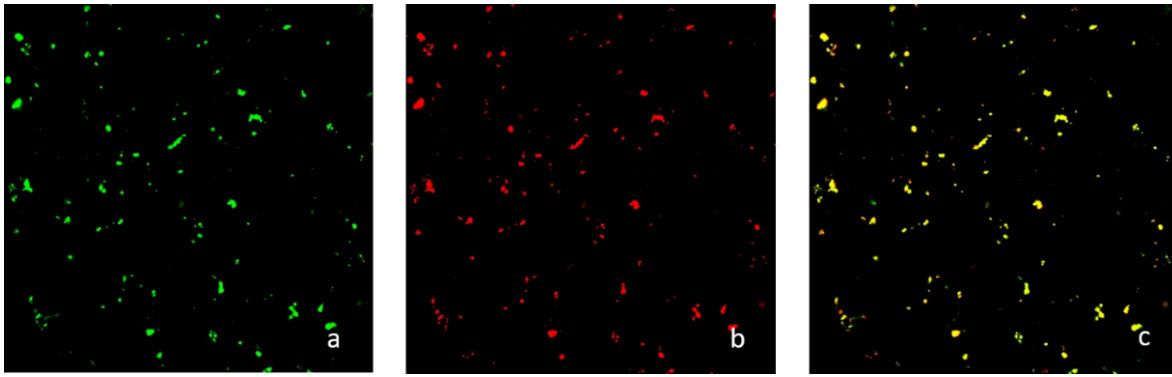


Abb. 33 Kolokalisation von Plasmid und Liposom (a= Plasmid, TOTO-1-Jodid markiert, grün dargestellt; b= Metafectene μ Fluor, rot dargestellt; c= Overlay von a) und b))

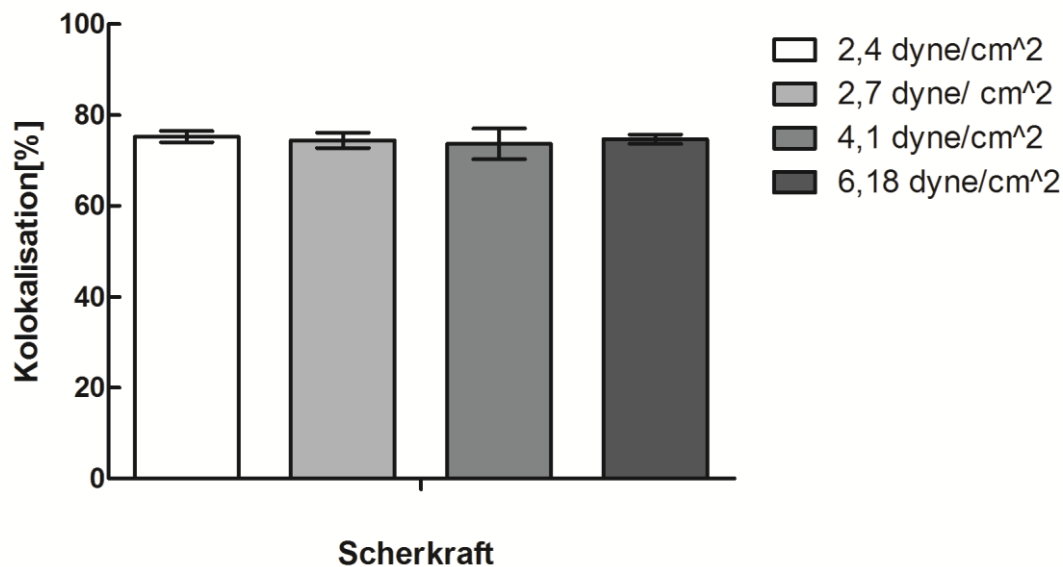


Abb. 34 Kolokalisation von Plasmid und Liposom abhängig von der Scherkraft (Mittelwerte \pm SD, n=6)

4.3.4.2 Abhängigkeit der Partikelstabilität von der Zeit

Auch bei der Fragestellung nach dem Einfluss der Flussdauer auf die Stabilität der *intelligent particles* wurden zwei Kombinationen untersucht. Ferner wurde der Halbach Array und der Stabmagnet vergleichend untersucht.

Für die erste Kombination wurden markiertes Eisenoxid (FluoMag-C), unmarkiertes Liposom und markiertes Plasmid verwendet (Tab. 6). Dadurch konnten wir die Stabilität zwischen Eisenoxid und Plasmid untersuchen. Die kürzeste untersuchte Dauer des angelegten Flusses

betrug 5 min. Hier zeigte sich eine Kolokalisation des markierten Eisenoxids und des Plasmids von 82,8 % bei Verwendung des Halbach Arrays. Der Stabmagnet zeigte einen Wert von 80,9%. Nach weiteren 10 min, also einer Gesamtflussdauer von 15 min waren die Partikel beim Halbach Array zu 80,5% kolokalisiert und beim Stabmagneten zu 81,7 %. Eine Kolokalisation von 84,1% zeigten die Partikel bei Verwendung des Halbach Arrays nach 30 min, die Versuche mit dem Stabmagneten zeigten einen Wert von 87%.

Flussdauer	Magnettyp	Kolokalisation Plasmid/Eisenoxid [%]							Mittelwert	SD
5 min	Halbach Array	77,4	81,5	85,8	82,6	81,6	87,6	82,8	3,6	
	Stabmagnet	85,3	85,1	67,6	85,3	76,9	85,1	80,9	7,3	
15 min	Halbach Array	68,3	86,8	78,9	81,8	79,7	85,2	82,9	80,5	6,1
	Stabmagnet	76,1	85,6	86	74,8	84,1	78,9	86,5	81,7	5
30 min	Halbach Array	83,1	90,2	70,2	90,5	88,1	79,9	86,7	84,1	7,2
	Stabmagnet	91,7	90,4	86,1	87,9	84,3	88,2	80,7	87	3,7

Tab. 6 Kolokalisation Plasmid und Eisenoxid in % nach 5, 15, 30 min (Mittelwerte \pm SD, n=6-7)

Zur Untersuchung von Kombination 2 wurde unmarkiertes Eisenoxid (CombiMag), markiertes Liposom (Metafectene μ Fluor) und markiertes Plasmid verwendet (Tab. 7). Damit konnten wir die Stabilität der Bindung zwischen Plasmid und Liposom evaluieren. Nach 5 min Flussdauer zeigte sich eine Kolokalisation von Liposom und Plasmid von 79,4% beim Halbach Array und 73,7% beim Stabmagneten. Wurde die Flussdauer auf 15 min erhöht, änderte sich die Kolokalisation nur wenig mit 85,9% (Halbach Array) bzw. 70,6% (Stabmagnet). Selbst bei der längsten Flussdauer von 30 min waren Liposom und DNA zu 82,8% über dem Halbach Array kolokalisiert. Beim Stabmagneten waren es nach 30 min 88% Kolokalisation.

<i>Flussdauer</i>	<i>Magnettyp</i>	<i>Kolokalisation Plasmid/Liposom [%]</i>					<i>Mittelwert</i>	<i>SD</i>
5 min	Halbach Array	75,4	82	82,1	77	80,8	79,4	3,1
	Stabmagnet	71,3	72,7	72,9	78,8	72,7	73,7	2,9
15 min	Halbach Array	82,5	85,1	88,8	86,1	87	85,9	2,3
	Stabmagnet	69,7	70,9	69,7	73,9	69	70,6	1,9
30 min	Halbach Array	84,1	82,2	82,2	83,5	82,2	82,8	0,9
	Stabmagnet	89,2	87,5	87,3	85,5	90,5	88	1,9

Tab. 7 *Kolokalisation Plasmid und Liposom in % nach 5, 15, 30 min (Mittelwerte \pm SD, n=5)*

4.4 Transfektionseffizienz

Um schließlich die Transfektionseffizienz der ternären Partikel zu untersuchen, wurden wie in 3.11 beschrieben Flussversuche durchgeführt, dabei wurden als Liposom Metafectene FluoR μ , als Eisenoxidpartikel unmarkiertes Combimag und TOTO-1-Jodid markiertes Plasmid verwendet. Nach 24 h weiterer Kultivierung wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h, also 48 h nach Beendigung des Versuchs, wurden Fluoreszenzaufnahmen der Kokultur angefertigt. Die Zellen zeigen 48 h nach Ende des Flussversuchs eine Expression von GFP (**Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.**). Dies ist erkennbar an der grünen Fluoreszenz der Hepatozyten. Einige Zellen wurden also erfolgreich transfiziert.

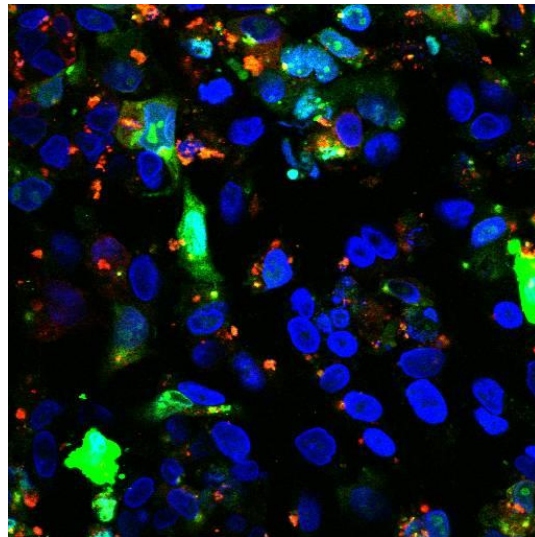


Abb. 35 *Fluoreszenzaufnahme der transfizierten Kokultur, 48 nach Flussversuch; Plasmid TOTO-1-Jodid markiert, grün dargestellt; Metafectene μ FlouR, rot dargestellt.*

4.5 Isolation primärer muriner Hepatozyten

Zur Vorbereitung der Etablierung eines Flusskammermodells der Leber mit primären Hepatozyten wurden Bedingungen zur Isolation und Kultivierung von primären murinen Hepatozyten untersucht. Um primäre Hepatozyten erfolgreich aussäen zu können, müssen diese nach Isolation eine möglichst hohe Vitalität aufweisen. Für die Isolierung der Primärhepatozyten wurden insgesamt 19 Mäuse des Stammes BTBR-Pahenu2/J verwendet. Es wurden 18 männliche und eine weibliche Maus sakrifiziert. Das Alter der Mäuse lag in Mittel bei 29,82 Wochen (SD= 8,6). Die Methodik der Isolation muriner Hepatozyten ist in Kapitel 3.6.8 ausführlich beschrieben. Insgesamt 19 Isolationsversuche wurden hinsichtlich Anzahl und Vitalität der isolierten Primärhepatozyten evaluiert. Im Mittel wurden pro Tier von $35,4 \times 10^6$ Hepatozyten isoliert (Abb. 36). Nach der Isolation der Primärzellen wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer mikroskopisch eine Anzahl isolierter Hepatozyten von $35,37 \times 10^6$ ermittelt.

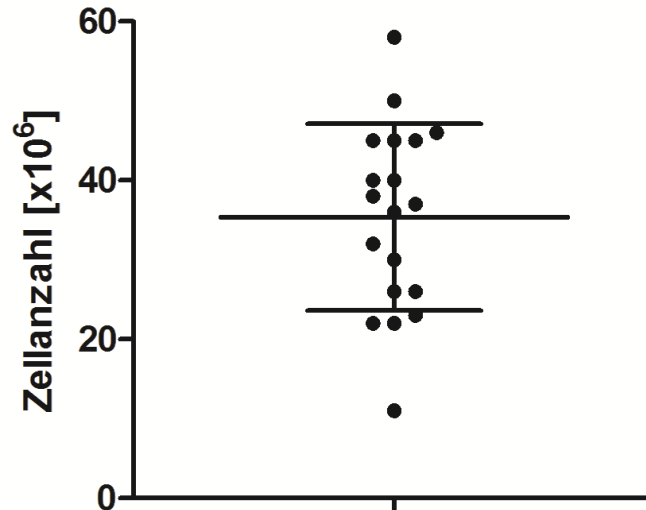


Abb. 36

Anzahl isolierter muriner Primärhepatozyten, bestimmt durch Zählung mittels Neubauer Zählkammer (Mittelwerte \pm SD, n=19)

Die Vitalität der primären Hepatozyten betrug im Mittel 83,1 % (Abb. 37). Isolationen mit Hepatozyten, die weniger als 75 % Vitalität aufwiesen, wurden für die Versuchsreihen nicht verwendet, da Vitalitäten unter diesem Wert keine befriedigenden Ergebnisse bei der Aussaat zeigten. Die höchsten Werte in Bezug auf die Vitalität der isolierten Hepatozyten lagen bei 90% (n=5)

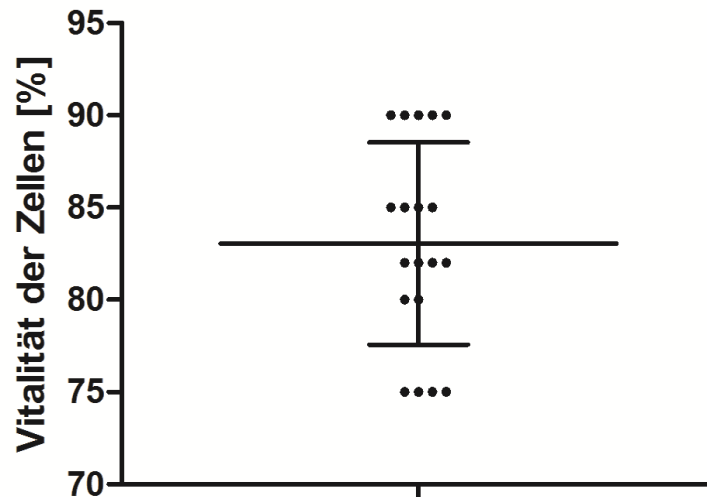


Abb.37 Vitalität isolierter muriner Primärhepatozyten, ermittelt durch Trypanblaufärbung und Lichtmikroskopie (Mittelwerte \pm SD, n=19)

4.6 Aussaat primärer muriner Hepatozyten

Die murinen Primärhepatozyten wurden, wie in 3.6.9 beschrieben, in verschiedene Kulturgefäße ausgesät. Dabei wurde das Wachstumsverhalten in Kulturgefäßen mit unterschiedlichen Grundflächen untersucht. Es kamen T25 Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² und ibidi μ - slides mit einer Wachstumsfläche von 2,5 cm² zum Einsatz. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden lichtmikroskopische Bilder in 4facher und 10facher Vergrößerung aufgenommen.

Abb. 38 zeigt Primärhepatozyten 24 h nach Aussaat in eine Zellkulturflasche T25 bei 4facher (a) bzw. 10facher Vergrößerung (b). Gut erkennbar waren der typisch hexagonale Charakter der Hepatozyten sowie eine diploide Wuchsform. Nur wenige Zellen waren nicht adhären und es war eine gute visuelle Konfluenz erkennbar. Im selben Versuchsansatz gewonnene Zellen wurden ebenfalls in ein ibidi μ -Slide I ausgesät (Abb. 39). Hier waren eine deutlich schlechtere Konfluenz sowie eine unregelmäßige Zellstruktur erkennbar. Der Anteil nicht-haftender Zellen war hier deutlich höher als in der T25-Flasche.

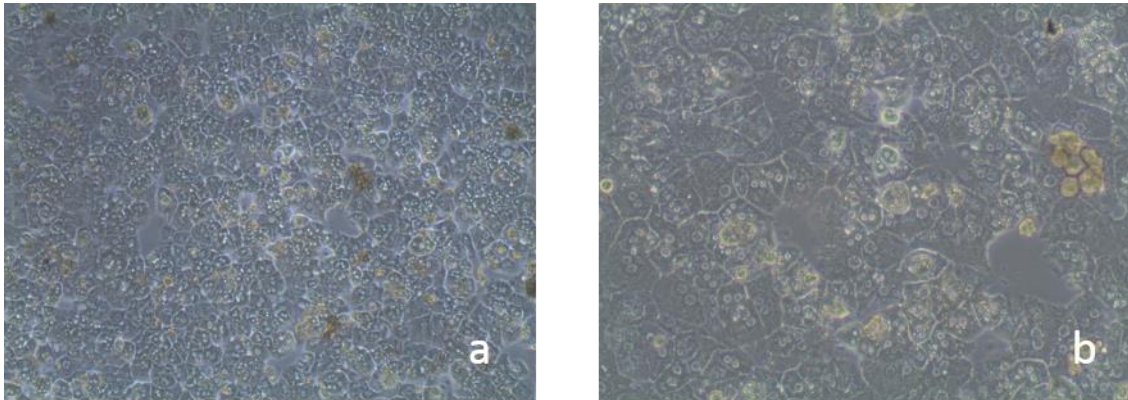


Abb. 38 $2,2 \times 10^6$ murine Hepatozyten, Vitalität 75%, 24 h nach Aussaat in T25 (a= 4fache Vergrößerung, b= 10fache Vergrößerung)

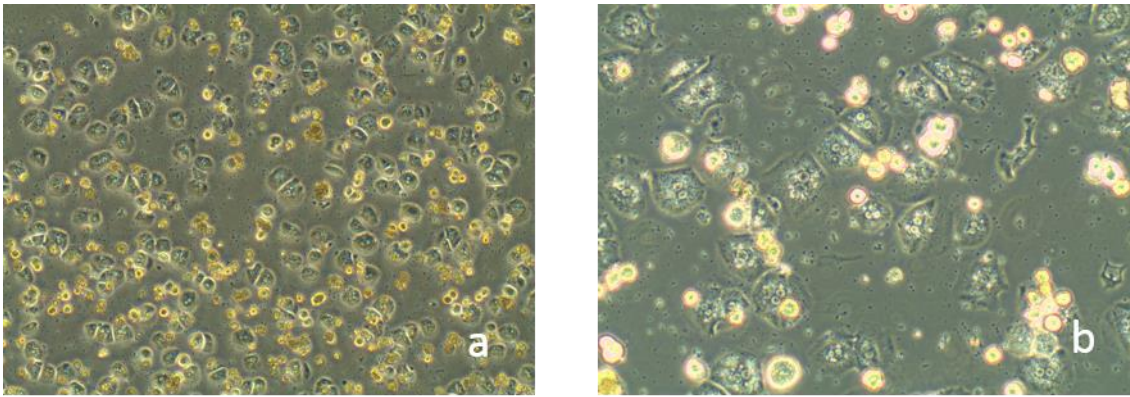


Abb. 39 **8×10^4** murine Hepatozyten, Vitalität 75 %, 24h nach Aussaat in **μ -Slide I** (a= 4fache Vergrößerung, b= 10fache Vergrößerung)

Abb. 40 und Abb. 41 zeigen ausgesäte Zellen einer weiteren Isolation primärer Hepatozyten. Hier lag die Vitalität der Zellen bei 85 %. Auch hier zeigte sich ein starker Unterschied des Kulturerfolges in Abhängigkeit vom Zellkulturgefäß. Während die Zellen in der T25-Kulturflasche eine gute Adhärenz und Konfluenz zeigten, waren beide Parameter bei Aussaat der Zellen in einen ibidi μ -Slide I schlechter. Zu bemerken ist weiterhin die größere Anzahl nicht-haftender Zellen bei Aussaat von $2,2 \times 10^6$ Hepatozyten in die Zellkulturflasche T25.

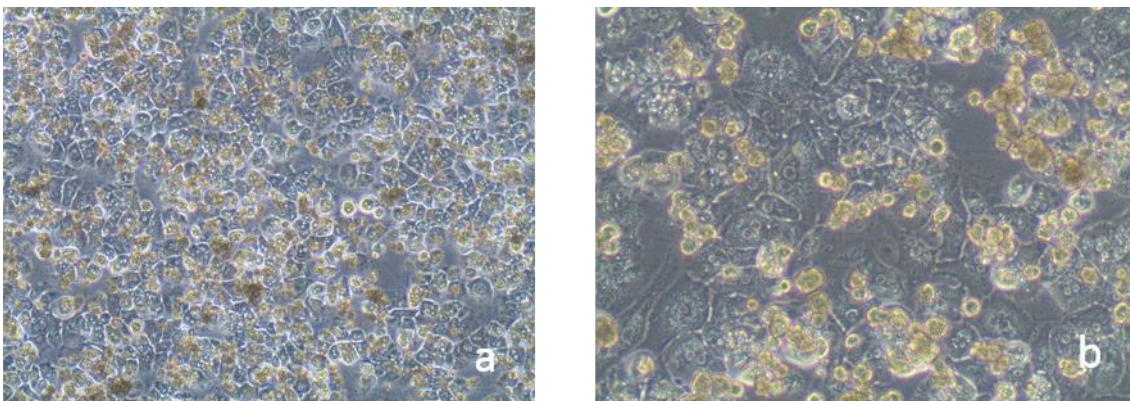


Abb. 40 **$2,2 \times 10^6$** murine Hepatozyten, Vitalität 85%, 24 h nach Aussaat in **T25** (a= 4fache Vergrößerung, b= 10fache Vergrößerung)

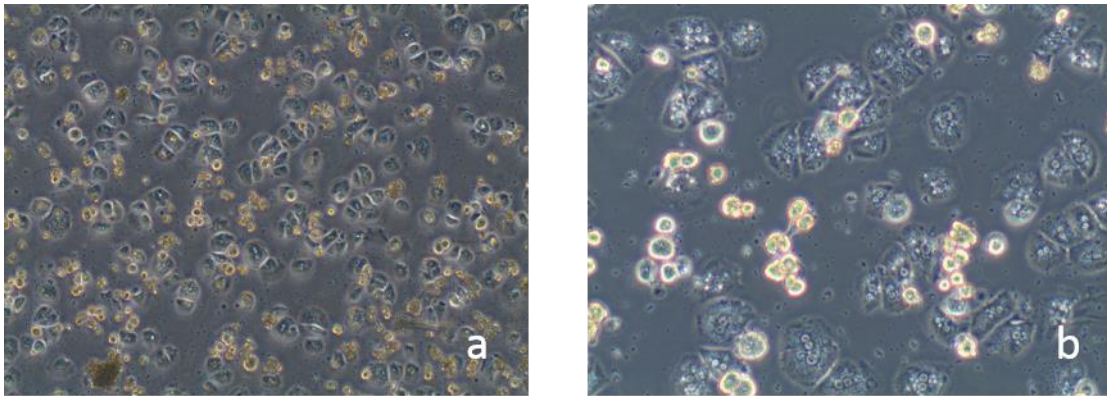


Abb. 41 8×10^4 murine Hepatozyten, Vitalität 85 %, 24h nach Aussaat in *ibidi 1* (a= 4fache Vergrößerung, b= 10fache Vergrößerung)

Die Isolation primärer Hepatozyten aus murinen Lebern war somit erfolgreich, allerdings zeigten sich bei der Aussaat der Zellen Schwierigkeiten bei der Adhäsion auf den kleineren Wachstumsflächen der *ibidi* μ - slides.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, das ein physiologisches Abbild der Parameter darstellt, die bei Verfahren zum nicht-viralen Gentransfer in die Leber eine wichtige Rolle spielen. Dabei wurden insbesondere die Barriere zwischen sinusoidalem Endothel und Parenchym sowie sich ändernde Bedingung durch variierende Flussbedingungen berücksichtigt. In den hier durchgeführten Versuchen sollten sowohl Grundlagen für erfolgreiche Gentransferverfahren als auch die Eignung des Lebermodells für einen Transfer in ein krankheitsspezifisches Modell evaluiert werden.

5.1 Die Flusskammer als Lebermodell

An dem in dieser Arbeit entwickelten Lebermodell bestehend aus einer Kokultur aus Hepatozyten und Endothelzellen sollten physikalische Verfahren zur verbesserten Überwindung der Barriere zwischen Blutgefäßsystem und Leberparenchym untersucht werden. Die dabei konstruierte Kokultur aus zwei übereinander liegenden Monolayern eignet sich sehr gut als physikalische Darstellung der Sinusoide, kann aber nicht die Leber in ihrer Gesamtheit widerspiegeln. Zum einen besteht die Leber neben den Hepatozyten selbst aus einer Vielzahl anderer Zellen wie Kupffersche Sternzellen, Itozellen, Pit-Zellen (Kang, Rawat et al. 2013), zum anderen ist sie ein dreidimensionales Organ.

Die hier verwendeten Zelllinien HepG2 und HUVECs sind etablierte, weit verbreitete und gut untersuchte Zelllinien und ermöglichen Experimente mit hoher Reproduzierbarkeit. Jedoch stehen gerade HepG2 für die Untersuchung pharmakokinetischer und biologischer Prozesse nicht zur Verfügung, da sie humane Leberkarzinomzellen sind und somit sowohl die hepatozytenspezifischen Stoffwechselforgänge als auch deren Morphologie weitestgehend verloren haben. Die Kokultur aus HepG2 und HUVEC stand somit als physikalisches Modell der Barriere zwischen sinusoidalem Blutfluss und Leberparenchym für die Evaluierung von Parametern von Gentransferverfahren zur Verfügung. Um das Lebermodell jedoch krankheitsspezifisch an eine genetische Erkrankung wie PKU oder Hämophilie A anzupassen, wurde die Möglichkeit der Verwendung von primären murinen Hepatozyten untersucht. Die bei der zweistufigen Leberperfusion gewonnenen primären Hepatozyten wurden sowohl im Standardkulturgefäß mit einer Wachstumsfläche von 25 cm^2 als auch in die Flusskammer der IBIDI slides mit einer Wachstumsfläche von $2,5 \text{ cm}^2$ ausgesät. Bei der Aussaat in die viel klei-

neren Flusskammern zeigte sich im Gegensatz zu dem Standardkulturgefäß eine deutlich verminderte Adhärenz und Vitalität der Hepatozyten. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass insbesondere Zellen mit zentraler Lage im Kanal eine schlechtere Vitalität und Adhärenz aufwiesen als peripher und somit näher am Ein- bzw. Ausgangsreservoir der Kanäle liegende Zellen. Die Aussaat und Kultivierung primärer Hepatozyten erweist sich häufig als anspruchsvoll. Probleme machen vor allem die hohe Empfindlichkeit gegenüber Druckunterschieden, z. B. bei der Zentrifugation oder dem Pipettieren, ebenso wie die morphologische und funktionelle Dedifferenzierung der Zellen (Vinken, Decrock et al. 2011). Gerade der Gasaustausch, bedingt durch die sehr hohe Stoffwechselrate der Hepatozyten, scheint eine gravierende Rolle zu spielen (Kurosawa, Yasuda et al. 2001). Die halbmondförmige Anordnung der adhärennten Hepatozyten am Ein- bzw. Ausgang der Kanäle könnte ein Hinweis auf eine zu geringe Sauerstoffversorgung und somit ein schnelleres Absterben der Zellen in der Mitte des Kanals sein. Eine andere Erklärung könnte das sehr geringe Volumen des Mediums von 30 µl im Kanal selbst sein, was dazu führen könnte, dass die Hepatozyten schon vor der Anheftung absterben. Dies wäre vor dem Hintergrund des ausgeprägten Stoffwechsels der Hepatozyten und des dadurch schnelleren Verbrauchs der Inhaltsstoffe des Mediums und andererseits der stärkeren Anhäufung von toxischen Stoffwechselprodukten gut erklärbar. In den beiden Zu- und Abflussreservoirs finden jedoch jeweils 60 µl Medium Platz, was ausreichen könnte, um die ersten 0,5 bis 1 mm des Kanals zu versorgen. Möglich ist auch eine Kombination aus beiden Hypothesen. Um erfolgreich Primärhepatozyten in die Flusskammer aussäen zu können, müsste man als nächsten Schritt versuchen, die Zellen in oxygeniertem Medium auszusäen. Alternativ wäre denkbar, die Sedimentationszeit durch Zentrifugation der frisch ausgesäten Hepatozyten erheblich zu verkürzen. Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine verlängerte Kultivierung einer Kokultur aus primären Hepatozyten und Endothelzellen bis zu 39 Tage möglich ist, sofern die Zellen jeweils auf der gegenüber liegenden Seite einer Transwell Membran ausgesät werden (Kang, Rawat et al. 2013). Eine andere Möglichkeit, Primärzellen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren, besteht in der Generierung einer dreidimensionalen Kokultur mittels Polymergerüst (Bierwolf, Lutgehetmann et al. 2011).

5.2 Partikelretention im Magnetfeld

Weiterhin wurde untersucht, ob es möglich ist, mit Eisenoxid, Liposomen und therapeutischem Plasmid beladene *intelligent particles* gegen einen angelegten Fluss zu retinieren. Damit wäre die Voraussetzung geschaffen, dieses Plasmid zielgerichtet am *target* Leber mittels weiterer bio-physikalischer Verfahren wie Sonoporation, Lipofektion und Magnetofektion in den Hepatozyten einzuschleusen. Diese Kombination nicht-viraler Gentransfermethoden wäre ein großer Gewinn für die moderne Medizin in Hinblick auf eine Erhöhung der Transfektion von Zellen bei sicherer Anwendung im Patienten.

Eine hochmoderne Anwendung von Magnetfeldern kombiniert mit Ultraschall findet sich im sogenannten MR-HIFU⁴ (auch „Magnetic Resonance imaging-guided High Intensity Focused Ultrasound“, MRgFUS) zur nichtinvasiven Therapie von z.B. Uterusmyomen. Das MRT-Gerät erzeugt dreidimensionale Aufnahmen des Myoms, welches dann mit Hilfe eines durch einen sogenannten Transducer erzeugten fokussierten und hochenergetischen Ultraschall auf Temperaturen von 60-80° erhitzt und somit eine Nekrose induziert wird. Damit ist eine hochpräzise Methode zur Tumorbekämpfung nutzbar, die das umliegende gesunde Gewebe schont.

Mit dem hier entwickelten Flusskammermodell der Leber sollte der Einfluss unterschiedlicher, in vivo relevanter Parameter auf die Retention von Partikeln in einem Magnetfeld untersucht werden.

Zunächst wurden Magnete unterschiedlicher Bauart physikalisch charakterisiert. Für die Charakterisierung der Magnettypen konstruierten wir mittels Plexiglasscheiben Abstände zum vormals vermessenen Magneten und ermittelten so die Magnetfeldstärken abhängig vom Abstand zum Magneten. Der hier konstruierte Halbach Array besteht aus einer Anordnung von mehreren Einzelmagneten und zeichnet sich durch ein verstärktes, gerichtetes Magnetfeld aus. Durch diese spezielle Anordnung ergibt sich eine besondere Verteilung der Magnetfeldlinien, vergleichbar zu einem strominduzierten Magnetfeld. Vergleichend wurden die Magnetfeldstärken von zwei unterschiedlichen singulären Stabmagneten vermessen. Der Halbach Array zeigt bis zu einem Abstand von 1 mm das stärkste Magnetfeld, über diesen

⁴ <http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Institut-fuer-Klinische-Radiologie/de/patienteninformationen/intervention/uterusmyome/behandlungsmoeglichkeiten/radiologisch-interventionell/mr-hifu/index.html>

Abstand hinaus erweist sich der große Stabmagnet als der stärkere. Für eine spätere Anwendung in vivo ist es jedoch wichtig zu evaluieren, welche Magnetfeldstärke im Zielgewebe erreicht werden muss, um eine effiziente Anzahl therapeutischer *intelligent particles* für einen erfolgreichen Gentransfer im Blutgefäß retinieren zu können. Daher wurde die Anzahl retinierter Partikel abhängig von der Feldstärke der Magneten evaluiert. Bei einem Abstand von 0 mm zum Magneten, dies entspricht einer Magnetfeldstärke von 0,6 T, war die Retention am stärksten, unabhängig von Magnettypen. Mit abnehmender Feldstärke nahm die Anzahl der retinierten Partikel sowohl beim Halbach Array als auch beim Stabmagneten ab. Jedoch zeigt sich das Retentionspotential des Halbach Arrays als noch besser als die Magnetfeldmessungen es vermuten lassen. Hier wies das gerichtete Magnetfeld des Halbach Arrays bis zu einem Abstand von 4 mm eine höhere Retentionseffizienz im Vergleich zum Stabmagneten auf. Zudem belegen die gezeigten Ergebnisse, dass bei kleinstem Abstand zwischen Halbach Array und Flusskammer die Anzahl der retinierten Partikel signifikant höher ist als beim Stabmagneten.

Mit den durchgeführten Messungen ist nicht nur der Vorteil des gerichteten Magnetfeldes eines Halbach Array deutlich gemacht worden, es können nun auch Rückschlüsse auf die Magnetfeldstärke gezogen werden, die nötig ist, eine gewisse Anzahl an Partikeln im Zielgewebe zu retinieren. Die beste Retention ergab sich bei 0,4 bis 0,6 Tesla. Diese Magnetfeldstärke wird klinisch bei Niederfeldmagnetresonanztherapiegeräten angewandt, welche mit 0,2 -0,5 Tesla arbeiten. Moderne Geräte arbeiten inzwischen mit 1-1,5 T, teilweise sogar mit Stärken bis 3 Tesla. In zukünftigen Studien sollte evaluiert werden, welche Anzahl und Konzentration an *intelligent particles* erforderlich ist, um eine therapeutisch ausreichende Anzahl an Leberzellen transfizieren zu können.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die retinierten Partikel eine ausreichend lange Zeit gegen den Blutstrom retiniert werden können, um per Endo -und Pinozytose in die Zielzellen aufgenommen werden zu können. Hier wurde die Anzahl der Partikel zu Zeitpunkten von 5 min, 15 min und 30 min untersucht. Deutlich wird vor allem die höhere Retentionseffizienz des Halbach Array gegenüber dem Stabmagneten. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Magnet durchgeführt. Hier lag die Retentionseffizienz deutlich niedriger. Aus den erzielten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Partikelanzahl kaum abnimmt, wenn die

Dauer des Flusses von 5 min auf 30 min erhöht wird. In weiteren Versuchen wäre zu ermitteln, welche Dauer der Retention, also des Kontakts zwischen *intelligent particles* und Zelloberfläche nötig ist, um eine Aufnahme in die Zelle zu ermöglichen.

Ein weiterer wichtiger Parameter, der Einfluss auf die Retentionseffizienz nehmen könnte, ist die Flussgeschwindigkeit des angelegten Flusses. Die *intelligent particles* sollen über das venöse Gefäßsystem zum Zielorgan Leber transportiert werden, um dort gegen den Blutfluss retiniert und in die Hepatozyten aufgenommen zu werden. In diesen sinusoidalen Gefäßen der Leber herrscht eine Flussgeschwindigkeit von 0,03 cm/sec. Dies ist also die Flussgeschwindigkeit, gegen die die Partikel retiniert werden müssen. Mittels des hier entwickelten Lebermodells konnten diese und weitere Flussgeschwindigkeiten und deren Einfluss auf die Retentionseffizienz der Magneten untersucht werden. Im Gesamten wurden 4 verschiedene, *in vivo* auftretende Flussgeschwindigkeiten untersucht. Es wurde je eine Positivkontrolle, also einen Versuch ohne das Anlegen eines Flusses, und eine Negativkontrolle ohne Verwendung eines Magneten durchgeführt. Deutlich wird, dass es bei einer angelegten Flussgeschwindigkeit von 0,03 cm/sec zu einer Abnahme der retinierten Partikel um nur 50 % im Vergleich zur Positivkontrolle kommt. Das bedeutet, dass es bei einer niedrigen, im Hinblick auf die Anwendung *in vivo* aber die relevanteste Flussgeschwindigkeit, möglich ist, etwa die Hälfte der applizierten und zur Leber transportierten Partikel zu retinieren.

5.3 Partikelstabilität in der Flusskammer

Die *intelligent particles*, die in den hier durchgeführten Versuchen verwendet wurden, wurden aus drei Komponenten hergestellt. Sie bestehen aus therapeutischen Plasmiden, die über elektrostatische Interaktion an kationische Liposomen gebunden werden und über kolloidale Aggregation und ebenfalls elektrostatische Interaktion gebundenen Eisenoxidpartikeln. Eine erfolgreiche Transfektion der Zielzellen kann nur erreicht werden, wenn diese Partikel unter *in vivo* auftretenden Umständen stabil bleiben. Um die Stabilität dieser Kombination mittels Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen, wurden zwei Fluoreszenzmarkierungsansätze gewählt. Zum einen wurden industriell mit roter Fluoreszenz markierte Eisenoxidpartikel verwendet und an mit grüner Fluoreszenz markiertes Plasmid gebunden. Das Liposom blieb bei diesem Ansatz unmarkiert. Dadurch konnte die Stabilität der elektrostati-

schen Bindung zwischen Plasmid und Eisenoxid dargestellt werden. In einem nächsten Ansatz wurde unmarkiertes Eisenoxid verwendet, während ein mit roter Fluoreszenz markiertes Metafectene μ als Liposom diente. Das Plasmid wurde wie vormals mit grüner Fluoreszenz markiert. So lag der Fokus bei dieser Kombination auf der Bindung zwischen Plasmid und Liposom.

Die Stabilität wurde unter zwei Gesichtspunkten untersucht. Der erste wichtige einflussnehmende Parameter ist die auf die Partikel einwirkende Scherkraft. Es wurden verschiedene Werte untersucht, die *in vivo* auf *intelligent particles* einwirken. Diese Scherkräfte resultieren aus Länge und Durchmesser der passierten Blutgefäße und der darin auftretenden Flussgeschwindigkeit.

Es zeigte sich, dass die Stabilität, dargestellt durch die Kollokalisierung der Partikelkomponenten in der konfokalen Mikroskopie, abhängig von den angewendeten Scherkräften wenig variiert. Die Ergebnisse zeigten eine Stabilität der Bindung zwischen Eisenoxid und Plasmid von 45% bis 53%, während die Bindung zwischen Liposom und Plasmid zu 75% stabil war. Das Eisenoxid ist in erster Instanz für die Retention des gesamten Partikelkomplexes im Magnetfeld verantwortlich. Die Ergebnisse der Negativkontrollen ohne Magnetfeld machen die Notwendigkeit einer Interaktion zwischen Eisenoxid und Magnetfeld deutlich. Die Ergebnisse zeigten, dass etwa 50 % der retinierten Eisenoxidpartikel stabil an das Plasmid gebunden waren. Die anderen 50 % lagen vom Plasmid dissoziiert und damit für einen Gentransfer wirkungslos vor. Die Ergebnisse der zweiten Kombination zeigten eine Stabilität der Bindung zwischen Liposom und Plasmid zu etwa 75%. Da nur eine Retention bei an Eisenoxid gebundenen Partikeln stattfindet, wie durch die Negativkontrolle bestätigt, wurde gezeigt, dass beide Komponenten der erfolgreich retinierten Partikel, also Liposom und Magnet, auch an Eisenoxid gebunden waren. Folglich lassen sich die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen mit den unterschiedlichen Markierungskombinationen so erklären, dass etwa die Hälfte des Eisenoxids an das Plasmid gebunden war, dieses wiederum eine Bindung mit dem Liposom zu etwa 75% aufwies. Insgesamt wiesen die drei Komponenten rechnerisch eine Bindung zueinander von 38,5 % auf.

Als zweiter wichtiger Parameter wurde der Einfluss der Dauer des angelegten Flusses auf die Stabilität der Partikelkomposition untersucht. Die Versuche wurden wie oben beschrieben durchgeführt und der angelegte Fluss für 5, 15 und 30 min belassen. Die Markierungskombi-

nationen blieben gleich. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Stabilität der Bindungen zwischen Plasmid und Eisenoxid bzw. Liposom mit zunehmender Flussdauer nicht änderte. Dies bedeutet, dass eine einmal stabilisierte Bindung der einzelnen Komponenten auch mit zunehmender Applikationsdauer des Flusses stabil bleibt und die Partikel somit mindestens eine Zeit von 30 min zur Verfügung haben, um in die Zellen aufgenommen und therapeutisch wirksam zu werden.

6 Ausblick

Viele genetisch basierte Krankheitsbilder wie Phenylketonurie (PKU), zystische Fibrose oder Hämophilie A können bisher nicht oder nur symptomatisch therapiert werden. Dies bedeutet meist eine lebenslange und oft unbefriedigende Behandlung des Patienten. Wünschenswert wären daher Therapiemöglichkeiten mit kausalem Ansatz, die nach einmaligem Einsatz oder niederfrequenten Therapieintervallen zur Heilung des Patienten führen. Dabei muss diese Therapie jedoch so sicher wie möglich sein. Die vorliegende Arbeit wurde mit der Zielsetzung durchgeführt, Vorarbeiten auf dem langen Weg der Entwicklung eines kausalen Therapiemodells zu leisten. Das hier formulierte Fernziel ist die Etablierung eines therapeutischen Ansatzes eines zielgerichteten Gentransfers in Gewebe, vor allem die Leber. Die Behandlung des Patienten würde die (einmalige) Applikation multifunktionaler *intelligent particles* beinhalten, die mittels gerichtetem Magnetfeld und Visualisierung, zum Beispiel mit Hilfe einer MRT-HIFU-Kombination, zum Zielgewebe transportiert und dort in die Zielzelle verbracht werden. Das therapeutische Gen soll in der Zelle episomal stabil bleiben, und somit dauerhaft den genetischen Defekt beheben.

Diese Arbeit besteht aus zwei Hauptaspekten. Zum einen wurde ein Lebermodell entwickelt, welches sich gut eignet, um die physikalische Barriere zwischen Blutfluss und Hepatozyten zu symbolisieren. Zum anderen wurden an diesem Modell die *intelligent particles* charakterisiert und die Einflussfaktoren auf deren Verhalten im Flusssystem evaluiert.

Um die Untersuchungen dieser Arbeit weiter zu führen, müssten im ersten Schritt Experimente zum weiteren Verhalten der Partikel folgen. Es wäre wichtig zu untersuchen, wie schnell und in welcher Anzahl die Partikel durch die Endothelzellschicht migrieren und von den Hepatozyten aufgenommen werden. Dafür müssten nach definierten, kurzen Zeitintervallen Konfokalaufnahmen der Partikel gemacht werden, diese Aufnahmen vermessen und mit Aufnahmen der Kokultur verglichen werden, um zu evaluieren, in welcher Zellschicht sich die Partikel zu welchem Zeitpunkt befinden.

Wichtig wäre auch, das GFP-kodierende Gen der experimentellen Plasmide durch ein therapeutisches zu ersetzen, um den Therapieerfolg untersuchen zu können. Möglich dafür wäre zum Beispiel die Aussaat nichtheptatischer Dauerzelllinien wie die embryonale Nierenzelllinie HEK-293 und die Verwendung eines Gens, das für ein auf eine bestimmte Krankheit therapeutisches Enzym kodiert. Ein Beispiel für solch ein therapeutisches Enzym wäre die Phe-

nylalaninhydroxylase (PAH) bei PKU. Den Transfektionserfolg könnte man durch Messung der PAH-Aktivität in einem Enzymaktivitätstest kontrollieren.

Physiologisch nahe liegender wäre allerdings die Verwendung primärer Hepatozyten von Mäusen mit Gendefekt. Für die PKU könnte man Primärhepatozyten homozygoter Enu2-Mäuse im Flusssystem verwenden und diese mit Partikeln behandeln, die ein PAH-kodierendes Gen enthalten. Der Anstieg der PAH-Aktivität würde wiederum mittels Enzymaktivitätstest evaluiert werden. Ein weiterer positiver Aspekt hierbei wäre, dass bei der Isolierung der primären Hepatozyten auch primäre Endothelzellen (LSEC) gewonnen werden und diese dann ebenfalls im Flusssystem verwendet werden könnten.

Um diese zweite Möglichkeit in Betracht ziehen zu können, müssten optimale Bedingungen für die Aussaat primärer Hepatozyten in die Flusskammer ermittelt werden. Dies gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht zufriedenstellend. Ein wichtiger Faktor könnte dabei die einschichtige Aussaat der Hepatozyten sein. Es wurde festgestellt, dass es für die Kultivierung von Primärhepatozyten annähernd unerlässlich ist, diesen die Möglichkeit einer dreidimensionalen Ausbreitung zu geben. Die Kultivierung konnte so auf 39 Tage verlängert werden (Kang, Rawat et al. 2013). Die dreidimensionale Aussaat der Hepatozyten wäre mit Hilfe einer Kollagenmatrix möglich, um die Voraussetzung für die Generierung eines dreidimensionalen Kokultursystems zu schaffen. Im zweiten Schritt würde man das System schließen und so aus dieser rein statischen Kokultur ein Flusssystem herstellen, an dem weitere Flussversuche durchgeführt werden könnten.

Eine wichtige Weiterentwicklung wäre die Einbindung des Ultraschall-Kontrastmittels „SonoVue“. Diese kleinen gasgefüllten Bläschen könnten als zusätzliche Komponente der *intelligent particles* mit Hilfe von ultraschallinduzierter Kavitation die Endothelschicht permeabilisieren. Als Ultraschallquelle könnte HIFU (high intensity focussed ultrasound) dienen und mittels MRT kontrolliert werden. Eine aktuelle Veröffentlichung beschäftigt sich mit dieser Möglichkeit (Choi, Kim et al. 2012). Auch die Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Noble et al. (2013) versprechen interessante Weiterentwicklungen des ultraschallassistierten Gentransfers in die Leber. Hier wurde ein Protokoll an Hunden entwickelt, welches einen erfolgreichen Gentransfer mit minimalen Gewebeschäden möglich macht. Allerdings fehlen hierzu Langzeituntersuchungen, da die Tiere bereits nach 24 Stunden euthanasiert und untersucht

wurden. Interessant wäre die Untersuchung der *intelligent particles* mit SonoVue® in unserem Flusssystem, um wiederum Stabilität und Verhalten der Partikel zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Flussbedingungen beziehen sich auf die venöse Applikation der *intelligent particles* über die Vena femoralis mit Anschluss an die Vena portae. Dieser Zugang ist ein gut untersuchter Applikationsweg für Substanzen mit Zielorgan Leber. Für einen möglichen anderen Applikationsweg müssten weitere Untersuchungen unter anderen Bedingungen durchgeführt werden.

Eine Herausforderung für zukünftige Projekte wird es sein, zu evaluieren, wie dieses Modell mit Primärzellen optimiert werden kann, um neben physikalischen auch biochemische oder pharmakokinetische Fragestellungen untersuchen zu können. Ebenfalls interessant wäre eine Kombination mit anderen biophysikalischen Methoden wie die Anwendung von Polyethylenimin-Kopolymeren, Sonoporation oder rezeptorligandvermitteltem Gentransfer. Wünschenswert wären in vivo-Untersuchungen im (Großtier-) Modell, um möglichst bald die Anwendung eines neuen, kombinierten, nicht-viralen Gentransferverfahrens zu entwickeln, mit dem angeborene Erkrankungen wie PKU oder Hämophilie A sicher, effizient und vor allem kausal therapieren zu können.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Lebermodell zur Evaluierung biophysikalischer Verfahren entwickelt, welches als Grundlage für die Anwendung nicht-viralen Gentransfers in die Leber dient. An diesem Modell wurden Flussversuche mit sogenannten *intelligent particles*, bestehend aus Plasmid, Liposom und Eisenoxid durchgeführt und gezeigt, dass diese mit Hilfe eines Magnetfeldes gegen einen angelegten Strom retiniert werden können.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, eine Kokultur aus HepG2 und HUVEC, jeweils ausgesät als Monolayer, innerhalb einer Flusskammer zu generieren, um ein Abbild der sinusoidalen Barriere zwischen Blutgefäß und Lebergewebe herzustellen.

In einem nächsten Schritt wurde ein Halbach Array erstellt, der sich durch ein gerichtetes und verstärktes Magnetfeld auszeichnet. Dieser wurde vergleichend zu einem Stabmagnet vermessen. Wir konnten zeigen, dass trotz geringerer Feldstärke der Einzelmagneten es durch diese spezielle Anordnung zu einer Amplifikation derselben kommt. Weiterhin wurde der Einfluss sowohl des Magnettypen als auch der Stärke des Magnetfelds selbst auf die Retention der Partikel untersucht und erfolgreich gezeigt, dass Partikel retiniert werden können und zwar proportional zur Magnetfeldstärke.

Der Hauptteil der Arbeit befasste sich mit der Untersuchung der beeinflussenden Parameter auf die Retention und Stabilität der Partikel. Zunächst wurde der Einfluss der Dauer des angelegten Flusses auf die Retention der Partikel untersucht. Dafür wurde der Fluss nach drei definierten Zeiträumen beendet und die Anzahl der retinierten Partikel evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Partikelretention jeweils unter Verwendung des Halbach Arrays am stärksten war und die Anzahl der Partikel mit zunehmender Flussdauer nur wenig abnahm.

Eine weitere wichtige Frage stellte sich nach der Magnetfeldstärke, die benötigt wird, um eine ausreichend starke Retention der Partikel gegen den Blutfluss am Zielorgan zu erreichen. Dafür wurde die Anzahl der retinierten Partikel abhängig von der untersuchten Feldstärke mit Hilfe des Halbach Arrays ermittelt. Es konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die Partikelanzahl proportional zur abnehmenden Feldstärke sinkt. Es wurde festgestellt, dass im Allgemeinen Werte von 0,3 bis 0,6 Tesla am Zielgewebe ausreichen, um eine effiziente Retention *in vitro* zu ermöglichen.

Auch der Einfluss der sich *in vivo* in den Blutgefäßen ergebenden Flussgeschwindigkeiten auf die Retention der *intelligent particles* wurde im Flusskammermodell untersucht. Hierbei zeigte sich, dass 50 % der applizierten Partikel bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,03 cm/sec retiniert wurden, was dem sinusoidalen Blutfluss der Leber entspricht.

Während der Versuche konnten ebenfalls Fragen nach der Partikelstabilität bezüglich der *in vivo* auftretenden Scherkräfte und der Dauer des angelegten Flusses geklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich je nach Versuchsaufbau und Bindungstyp eine Stabilität abhängig von der Scherkraft zwischen 50 und 80% ergibt und eine Flussdauer bis zu 15 min keinen Einfluss auf die Stabilität der Partikel hat.

Parallel wurde in dieser Arbeit die Isolation muriner Primärhepatozyten mittels zweistufiger Leberperfusion optimiert, um im Weiteren die verwendeten stabilen Zelllinien durch Primärzellen zu ersetzen. Die Verwendung dieser Primärhepatozyten in unserem Modell gelang nicht, da die Zellen nicht mit befriedigendem Ergebnis in die Flusskammer ausgesät werden konnten.

8 Summary

For the present paper 'directed non-viral gene transfer into the liver: evaluation of biophysical techniques using a liver model', a liver model was developed to evaluate biophysical techniques and to serve as a basis for the implementation of non-viral gene transfer into the liver. Using this model, flow tests with so-called *intelligent particles* consisting of plasmid, liposome and iron oxide were conducted and it was demonstrated that these can be retained against an applied flow by means of a magnetic field.

First it was demonstrated that it is possible to generate a co-culture of HepG2 and HUVEC inside a flow chamber, each sowed as a monolayer, to create a likeness of the sinusoidal barrier between blood vessel and liver tissue.

The next step was the preparation of a Halbach array, which features a directional augmented magnetic field. The array was measured in comparison to a bar magnet. We were able to demonstrate that the magnets were amplified by this specific array despite their low individual intensity. Furthermore, we examined the influence both of the type of magnet and the strength of the magnetic field itself on particle retention and were successful in demonstrating that particles can be retained proportionally to the strength of the magnetic field.

The main part of the research examined the parameters influencing the retention and stability of the particles. First, the influence of the duration of the applied flow on particle retention was examined. To this end, the flow was stopped after three defined periods of time and the number of retained particles was evaluated. It could be demonstrated that in each case particle retention was strongest while using the Halbach array and that the number of retained particles decreased only slightly with increased flow duration.

Another important question was that of the magnetic field strength required to achieve sufficiently strong particle retention against the blood flow at the target organ. To this end, the number of retained particles in relation to the examined field strength was determined using the Halbach array. The hypothesis that the number of particles would decrease proportionally to the decreasing field strength was confirmed. It was found that, in general, values between 0.3 to 0.6 tesla at the target tissue are sufficient to enable efficient *in vitro* retention.

The influence that the flow velocities occurring *in vivo* in the blood vessels have on retention of the therapeutic particles was also examined in the flow chamber model. It was found that

50% of the administered particles were retained at a flow speed of 0.03 cm/sec, which conforms to the sinusoidal blood flow of the liver.

The tests also answered questions about particle stability in view of the shear forces occurring *in vivo* and in view of the duration of the applied flow. It was demonstrated that for each test set-up and type of bond the resulting stability is between 50% and 80% depending on the shear force and that a current duration of up to 15 minutes has no influence on particle stability.

At the same time this research has optimised the isolation of murine primary hepatocytes by means of two-phase hepatic perfusion in order to then replace the used stable cell lines by primary cells. The usage of these primary hepatocytes in our model was not successful because the cells could not be sowed into the flow chamber with any satisfactory result.

9 Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
AAV	Adenoassoziierte Viren
Abb	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ASGPR	Asialoglykoproteinrezeptor
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine, Rinder-Serum-Albumin
CA	Kapsid
cccDNA	Covalently closed circular DNA, kovalent geschlossene zirkuläre DNA
CF	Cystic fibrosis, Zystische Fibrose
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cfu	Colony forming unit, Koloniebildende Einheit
Cm	Zentimeter
CRP	C-reaktive Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Dyn	Dyne
ECGM	Endothelial cell growth medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Endothelial growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-

	<i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
FCS	Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum
h	Stunde
hCMV	humane Cytomegalie-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2	Humane Zelllinie, aus hepatozellulärem Karzinom entwickelt
HIFU	high intensity focused ultrasound, hoch-energetischer fokussierter Ultraschall
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HSC	Hepatic stellate cells, hepatische
HSV	Herpes-simplex-Virus
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IGF	Insulin like growth factor, insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IN	Integrase
ITR	invertierter terminaler Repeat
Kb	Kilobase, 1000 Basenpaare
L	Liter
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LLV	Lentiviraler Vektor
LSEC	Lebersinusoidale Entothelzellen
MA	Virale Matrix
MEM	Minimum essential medium
mHC	Murine Hepatocyten

min	Minute
ml	Milliliter
MLV	Murine Leukämie-Virus
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Anzahl
NC	Virales Nukleokapsid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferter Salzlösung
PIC	Präimplantationskomplex
PKU	Phenylketonurie
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellmedium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
Sec	Sekunde
T	Tesla
TM	Transmembranprotein
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TP	terminales Protein
Vgl	Vergleiche
VSV	vesikulären Stomatitis-Virus

WHO

World health organisation, Weltgesundheitsorganisation

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Positionierung von Nadelsonden um eine von drei Lebermetastasen zur Ablation von Tumorgewebe mittels irreversibler Elektroporation	9
Abb. 2	Elektroporation mittels Nadelsonden unter CT-Kontrolle (Deutsche Akademie	9
Abb. 3	Microinjektion in den Zellkern http://www.med.upenn.edu/cores/transgenic_and_chimeric_mouse_facility.shtml , abgerufen am 05.10.2015	10
Abb. 4	Gene Gun, Helios [®] Gene Gun System (BIO-RAD).....	11
Abb. 5	Schematischer Ablauf der Kalzium-Phosphat-Transfektion.....	12
Abb. 6	Schematische Darstellung der Magnetofektion geändert nach: http://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/chemical-viral-based-transfection-methods , abgerufen am 05.10.2015	13
Abb. 7	Schema einer kausalen Therapie mittels intelligent particles, Sonoporation und	23
Abb. 8	Reaktionsschema CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega)	32
Abb. 9	Plasmidkarte des Vektors pEPito-hCMV/EF1-EGFP.....	35
Abb. 10	Anordnung der Magnetachsen für die Konstruktion des Halbach Array	37
Abb. 11	Schematische Verteilung der Magnetfeldlinien eines Halbach Arrays (Copyright © 2003 Bradley University, Department of Electrical and Computer Engineering).....	37
Abb. 12	Konstruktion des Halbach Arrays aus singulären kleinen Stabmagneten, aus Stabilitätsgründen auf einer Plexiglasplatte fixiert	38
Abb. 13	Aufbau der Flusskammer (Transfektionsreagenz blau, kontinuierlicher Fluss pink dargestellt)	39
Abb. 14	Lichtmikroskopische Aufnahme HUVEC, μ -Slide VI ^{0.4} collagen coated, 24 h nach Aussaat, 4x vergrößert (a: 40.000, b: 60.000, c: 80.000 Zellen)	46
Abb. 15	Lichtmikroskopische Aufnahme HepG2, μ -Slide VI ^{0.4} collagen coated, 24 h nach Aussaat, 4x vergrößert (a: 80.000, b: 100.000, c: 120.000 Zellen)	46
Abb. 16	Vitalität von HepG2 in % 24 h nach Aussaat abhängig von Medienzusammensetzung, die Vitalität bei 100% RPMI wurde als 100% gesetzt (Mittelwerte \pm SD, n=12 für 100% RPMI und 100% ECGM; n=8 für Mischmedien)	48
Abb. 17	Vitalität von HUVEC 24 h nach Aussaat abhängig von der Medienzusammensetzung, die Vitalität bei 100% RPMI wurde als 100% gesetzt. (Mittelwerte \pm SD, n=12 für 100% RPMI und 100% ECGM; n=8 für Mischmedien)	48
Abb. 18	konfokalmikroskopische Aufnahme der Kokultur aus HepG2 (grün) und HUVECs (rot), Sagittalschnitt, Dicke der Kokultur: 245 μ m.....	49
Abb. 19	Magnetfeldstärke abhängig vom Abstand zum Magneten als Kurven aufgetragen, Vgl. Halbach Array, kleiner Stabmagnet, großer Stabmagnet.....	51
Abb. 20	Simulation der Magnetfeldausbreitung des Halbach Arrays bezogen auf die Messdaten (Magnetfeldstärke [T]), erstellt durch Hr. Stephan, Neue Magnetodyn GmbH (München)	52
Abb. 21	Einfluss der Flussdauer auf die Anzahl der retinierten Partikel. Partikel bestehen aus unmarkiertem Liposom (Metafectene μ), markiertem Eisenoxid (FluoMag-C) und markiertem Plasmid, Vgl. Halbach Array, Stabmagnet, ohne Magnet (Mittelwerte \pm SD, n=3-4)	54
Abb. 22	Einfluss der Flussdauer auf die Anzahl der retinierten Partikel. Partikel bestehen aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR), unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag) und	

	markiertem Plasmid, Vgl. Halbach Array, Stabmagnet, ohne Magnet (Mittelwerte \pm SD, n=2-6)	55
Abb. 23	Fluoreszenzaufnahme der retinierten Partikel abhängig von der Flussdauer, Halbach Array (a= 5 min, b=15 min, c=30 min). Partikel bestehen aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR, rot dargestellt), unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag) und markiertem Plasmid (grün dargestellt). Überlagerungen erscheinen gelb.....	56
Abb. 24	Fluoreszenzaufnahme der retinierten Partikel abhängig von der Flussdauer, Stabmagnet (a= 5 min, b=15 min, c=30 min). Partikel bestehen aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR, rot dargestellt), unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag) und markiertem Plasmid (grün dargestellt). Überlagerungen erscheinen gelb.	56
Abb. 25	Fluoreszenzaufnahme der retinierten Partikel abhängig von der Flussdauer, ohne Magnet (a= 5 min, b=15 min, c=30 min). Partikel bestehen aus markiertem Liposom (Metafectene μ fluoR, rot dargestellt), unmarkiertem Eisenoxid (CombiMag) und markiertem Plasmid (grün dargestellt). Überlagerungen erscheinen gelb.....	56
Abb. 26	Fluoreszenzaufnahme der retinierten Partikel (Plasmid grün dargestellt) in Abhängigkeit von der Feldstärke des Halbach Arrays (links) und des großen Stabmagneten (rechts). (a: 0 mm, b: 2 mm, c: 4 mm, d: 6 mm, e: 10 mm)	58
Abb. 27	Partikelretention abhängig vom Abstand zum Magneten, vgl. Halbach Array, Stabmagnet, ohne Magnet (Mittelwerte \pm SD, n=5-6).....	59
Abb. 28	Partikelretention abhängig vom Abstand zum Magneten als Kurve aufgetragen, vgl. Halbach Array, Stabmagnet, ohne Magnet (Mittelwerte \pm SD, n=5-6)	59
Abb. 29	Partikelretention abhängig vom Abstand zum Magneten, normalisiert.....	60
Abb. 30	Partikelretention abhängig von der Flussgeschwindigkeit (Mittelwerte \pm SD, n=6).....	61
Abb. 31	Kolokalisation von Plasmid und Eisenoxid (a= Plasmid, TOTO-1-Jodid markiert, grün dargestellt; b= Fluomag-C, rot dargestellt; c= Overlay von a) und b)).....	63
Abb. 32	Kolokalisation von Plasmid und Eisenoxid abhängig von der Scherkraft (Mittelwerte \pm SD, n=3).....	63
Abb. 33	Kolokalisation von Plasmid und Liposom (a= Plasmid, TOTO-1-Jodid markiert, grün dargestellt; b= Metafectene μ FlouR, rot dargestellt; c= Overlay von a) und b))	64
Abb. 34	Kolokalisation von Plasmid und Liposom abhängig von der Scherkraft (Mittelwerte \pm SD, n=6).....	64
Abb. 35	Fluoreszenzaufnahme der transfizierten Kokultur, 48 nach Flussversuch; Plasmid TOTO-1-Jodid markiert, grün dargestellt; Metafectene μ FlouR, rot dargestellt.....	67
Abb. 36	Anzahl isolierter muriner Primärhepatozyten, bestimmt durch Zählung mittels Neubauer	68
Abb.37	Vitalität isolierter muriner Primärhepatozyten, ermittelt durch Trypanblaufärbung und Lichtmikroskopie (Mittelwerte \pm SD, n=19).....	69
Abb. 38	2,2x10⁶ murine Hepatozyten, Vitalität 75%, 24 h nach Aussaat in T25 (a= 4fache Vergrößerung, b= 10fache Vergrößerung)	70
Abb. 39	8 x10⁴ murine Hepatozyten, Vitalität 75 %, 24h nach Aussaat in μ-Slide I (a= 4fache Vergrößerung, b= 10fache Vergrößerung)	71
Abb. 40	2,2x10⁶ murine Hepatozyten, Vitalität 85%, 24 h nach Aussaat in T25 (a= 4fache Vergrößerung, b= 10fache Vergrößerung)	71
Abb. 41	8 x10⁴ murine Hepatozyten, Vitalität 85 %, 24h nach Aussaat in ibidi I (a= 4fache Vergrößerung, b= 10fache Vergrößerung)	72

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Markierungskombinationen zur Untersuchung zeitabhängiger Partikelretention	41
Tab. 2	Flussgeschwindigkeiten in Venen verschiedener Größe	42
Tab. 3	Venengrößen in vivo und in ihnen vorkommende Scherkräfte	43
Tab. 4	Zusammensetzungen des Kokulturmediums für HepG2/HUVEC.....	47
Tab. 5	Magnetfeldstärke abhängig vom Abstand zum Magneten, Vgl. Halbach Array, kleiner Stabmagnet, großer Stabmagnet	51
Tab. 6	Kolokalisation Plasmid und Eisenoxid in % nach 5, 15, 30 min (Mittelwerte \pm SD, n=6-7) ...	65
Tab. 7	Kolokalisation Plasmid und Liposom in % nach 5, 15, 30 min (Mittelwerte \pm SD, n=5)	66

12 Literaturverzeichnis

Anderson, C. D., J. Urschitz, M. Khemmani, J. B. Owens, S. Moisyadi, R. V. Shohet, C. B. Walton (2013). "Ultrasound directs a transposase system for durable hepatic gene delivery in mice." Ultrasound Med Biol **39**(12): 2351-2361.

Antonarakis, S. E. and C. J. Epstein (2006). "The challenge of Down syndrome." Trends Mol Med **12**(10): 473-479.

Arruda, V. R., H. H. Stedman, V. Haurigot, G. Buchlis, S. Baila, P. Favaro, Y. Chen, H. G. Franck, S. Zhou, J. F. Wright, L. B. Couto, H. Jiang, G. F. Pierce, D. A. Bellinger, F. Mingozi, T. C. Nichols and K. A. High (2010). "Peripheral transvenular delivery of adeno-associated viral vectors to skeletal muscle as a novel therapy for hemophilia B." Blood **115**(23): 4678-4688.

Bataller, R. and D. A. Brenner (2005). "Liver fibrosis." J Clin Invest **115**(2): 209-218.

Benvenisty, N. and L. Reshef (1986). "Direct introduction of genes into rats and expression of the genes." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(24): 9551-9555.

Bierwolf, J., M. Lutgehetmann, S. Deichmann, J. Erbes, T. Volz, M. Dandri, S. Cohen, B. Nashan and J. M. Pollok (2012). "Primary human hepatocytes from metabolic-disordered children recreate highly differentiated liver-tissue-like spheroids on alginate scaffolds." Tissue Eng Part A **18**(13-14): 1443-1453.

Bierwolf, J., M. Lutgehetmann, K. Feng, J. Erbes, S. Deichmann, E. Toronyi, C. Stieglitz, B. Nashan, P. X. Ma and J. M. Pollok (2011). "Primary rat hepatocyte culture on 3D nanofibrous polymer scaffolds for toxicology and pharmaceutical research." Biotechnol Bioeng **108**(1): 141-150.

Blau, N., F. J. van Spronsen and H. L. Levy (2010). "Phenylketonuria." Lancet **376**(9750): 1417-1427.

Blessing, T., M. Kurs, R. Holzhauser, R. Kircheis, E. Wagner (2001). "Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery." Bioconjug Chem **12**(4): 529-537.

Bottcher, J. P., P. A. Knolle and D. Stabenow (2011). "Mechanisms balancing tolerance and immunity in the liver." Dig Dis **29**(4): 384-390.

Branchereau, S., D. Calise, and N. Ferry. Factors influencing retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. Hum. Gene Ther. 5:803–808 (1994).

Brem, G., B. Brenig, H. M. Goodman, R. C. Selden, F. Graf, B. Kruff, K. Springmann, J. Hondele, J. Meyer, E. L. Winnacker und H. Kräusslich (1985). "Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei." Zuchthygiene 20, 251—252.

- Brunetti-Pierri, N. (2008). "Gene therapy for inborn errors of liver metabolism: progress towards clinical applications." Ital J Pediatr **34**(1): 2.
- Carter, P. E., J. H. Pearn, J. Bell, N. Martin and N. G. Anderson (1985). "Survival in trisomy 18. Life tables for use in genetic counselling and clinical paediatrics." Clin Genet **27**(1): 59-61.
- Chen, C. A. and H. Okayama (1988). "Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA." Biotechniques **6**(7): 632-638.
- Choi, S. Y., Y. S. Kim, Y. J. Seo, J. Yang and K. S. Choi (2012). "Gas-filled phospholipid nanoparticles conjugated with gadolinium play a role as a potential theragnostics for MR-guided HIFU ablation." PLoS One **7**(3): e34333.
- Cool, S. K., B. Geers, I. Lentacker, S. C. De Smedt and N. N. Sanders (2013). "Enhancing nucleic acid delivery with ultrasound and microbubbles." Methods Mol Biol **948**: 195-204.
- Crispe, I. N. (2011). "Liver antigen-presenting cells." J Hepatol **54**(2): 357-365.
- Danks, D. M. and R. G. Cotton (1987). "Future developments in phenylketonuria." Enzyme **38**(1-4): 296-301.
- Davies, K. M., S. C. Deroles, M. R. Boase, D. A. Hunter and K. E. Schwinn (2013). "Biolistics-based gene silencing in plants using a modified particle inflow gun." Methods Mol Biol **940**: 63-74.
- De Brasi, C. D., et al. (1996). "[Molecular genetics of hemophilia A]." Medicina (B Aires) **56**(5 Pt 1): 509-517.
- Delalande, A., M. F. Bureau, P. Midoux, A. Bouakaz and C. Pichon (2010). "Ultrasound-assisted microbubbles gene transfer in tendons for gene therapy." Ultrasonics **50**(2): 269-272.
- Delalande, A., M. Postema, N. Mignet, P. Midoux and C. Pichon (2012). "Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery: recent advances and ongoing challenges." Ther Deliv **3**(10): 1199-1215.
- Dubensky, T. W., B. A. Campbell and L. P. Villarreal (1984). "Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(23): 7529-7533.
- Edwards, J. H., D. G. Harnden, A. H. Cameron, V. M. Crosse and O. H. Wolff (1960). "A new trisomic syndrome." Lancet **1**(7128): 787-790.
- Eisensmith, R. C. and S. L. Woo (1991). "Phenylketonuria and the phenylalanine hydroxylase gene." Mol Biol Med **8**(1): 3-18.

- Eisensmith, R. C. and S. L. Woo (1996). "Gene therapy for phenylketonuria." Eur J Pediatr **155 Suppl 1**: S16-19.
- El-Sayed, A. and H. Harashima (2013). "Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis." Mol Ther **21**(6): 1118-1130.
- Ezzel, C. (1989). "NIH gives the go-ahead on genetic experiment." Nature **337**(6205): 294.
- Fang, B., R. C. Eisensmith, X. H. Li, M. J. Finegold, A. Shedlovsky, W. Dove and S. L. Woo (1994). "Gene therapy for phenylketonuria: phenotypic correction in a genetically deficient mouse model by adenovirus-mediated hepatic gene transfer." Gene Ther **1**(4): 247-254.
- Fausto, N., J. S. Campbell and K. J. Riehle (2006). "Liver regeneration." Hepatology **43**(2 Suppl 1): S45-53.
- Felgner, P. L. (1997). Nonviral strategies for gene therapy. Sci Am **276**, 102-106.
- Felgner, P. L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold and M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7417
- Follenzi, A., D. Benten, P. Novikoff, L. Faulkner, S. Raut and S. Gupta (2008). "Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice." J Clin Invest **118**(3): 935-945.
- Gao, C. and K. K. Nielsen (2013). "Comparison between Agrobacterium-mediated and direct gene transfer using the gene gun." Methods Mol Biol **940**: 3-16.
- Gardiner, K. (2004). "Gene-dosage effects in Down syndrome and trisomic mouse models." Genome Biol **5**(10): 244.
- Gehl, J. and L. M. Mir (2000). "Electroporation of muscle tissue in vivo." Methods Mol Med **37**: 271-276.
- Gershon, D. (1990). "Human gene therapy. First experiment approved." Nature **346**(6283): 402.
- Gersting, S. W., K. F. Kemter, M. Staudigl, D. D. Messing, M. K. Danecka, F. B. Lagler, C. P. Sommerhoff, A. A. Roscher and A. C. Muntau (2008). "Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability." Am J Hum Genet **83**(1): 5-17.
- Gersting, S. W., U. Schillinger, J. Lausier, P. Nicklaus, C. Rudolph, C. Plank, D. Reinhardt and J. Rosenecker (2004). "Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection." J Gene Med **6**(8): 913-922.

Gluckman, P. D., et al. (2009). "Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases." Nat Rev Endocrinol **5**(7): 401-408.

Gordon, A. H. and A. Koj (1985). The Acute-phase response to injury and infection : the roles of interleukin I and other mediators. Amsterdam ; New York, NY, USA, Elsevier ; Sole distributors for the USA and Canada, Elsevier Science Pub. Co.

Gottschalk, U. and S. Chan (1998). "Somatic gene therapy. Present situation and future perspective." Arzneimittelforschung **48**(11): 1111-1120.

Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." Virology **52**(2): 456-467.

Haase, R., O. Argyros, S. P. Wong, R. P. Harbottle, H. J. Lipps, M. Ogris, T. Magnusson, M. G. Vizoso Pinto, J. Haas and A. Baiker (2010). "pEPito: a significantly improved non-viral episomal expression vector for mammalian cells." BMC Biotechnol **10**: 20.

Hagedorn, C., S. P. Wong, R. Harbottle and H. J. Lipps (2011). "Scaffold/matrix attached region-based nonviral episomal vectors." Hum Gene Ther **22**(8): 915-923.

Halbach, K. (1980). "Design of Permanent Multipole Magnets with Oriented Rare Earth Cobalt Material." Nucl.Instrum.Meth. **169**: 1.

Harding, C. O. and N. Blau (2010). "Advances and challenges in phenylketonuria." J Inherit Metab Dis **33**(6): 645-648.

Horn, F., M. Armbruster and A. Dospil (2009). Biochemie des Menschen : das Lehrbuch für das Medizinstudium. Stuttgart [u.a.], Thieme.

Huth, S., J. Lausier, S. W. Gersting, C. Rudolph, C. Plank, U. Welsch and J. Rosenecker (2004). "Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer." J Gene Med **6**(8): 923-936.

Hutter, G., D. Nowak, M. Mossner, S. Ganepola, A. Mussig, K. Allers, T. Schneider, J. Hofmann, C. Kucherer, O. Blau, I. W. Blau, W. K. Hofmann and E. Thiel (2009). "Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation." N Engl J Med **360**(7): 692-698.

Islam, M. A., J. Firdous, Y. J. Choi, C. H. Yun, C. S. Cho (2014). "Regulation of endocytosis by non-viral vectors for efficient gene activity." J Biomed Nanotechnol **10**(1): 67-80.

Jacobs, P. A. and J. A. Strong (1959). "A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism." Nature **183**(4657): 302-303.

Jacobs, F., E. Wisse, B. De Geest (2010). "The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer." Am J Pathol **176**(1): 14-21.

- Jaichandran, S., S. T. Yap, A. B. Khoo, L. P. Ho, S. L. Tien and O. L. Kon (2006). "In vivo liver electroporation: optimization and demonstration of therapeutic efficacy." Hum Gene Ther **17**(3): 362-375.
- Janvier, A. and A. Watkins (2013). "Medical interventions for children with trisomy 13 and 18: what is the value of a short disabled life?" Acta Paediatr.
- Jenke, A. C., I. M. Stehle, F. Herrmann, T. Eisenberger, A. Baiker, J. Bode, F. O. Fackelmayer and H. J. Lipps (2004). "Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11322-11327.
- Jung, S. C., J. W. Park, H. J. Oh, J. O. Choi, K. I. Seo, E. S. Park and H. Y. Park (2008). "Protective effect of recombinant adeno-associated virus 2/8-mediated gene therapy from the maternal hyperphenylalaninemia in offsprings of a mouse model of phenylketonuria." J Korean Med Sci **23**(5): 877-883.
- Kamimura, K. and D. Liu (2008). "Physical approaches for nucleic acid delivery to liver." AAPS J **10**(4): 589-595.
- Kamimura, K., T. Suda, G. Zhang, D. Liu (2011). "Advances in Gene Delivery Systems." Pharmaceut Med **25** (5): 293-306
- Kang, Y. B., S. Rawat, J. Cirillo, M. Bouchard and H. M. Noh (2013). "Layered long-term co-culture of hepatocytes and endothelial cells on a transwell membrane: toward engineering the liver sinusoid." Biofabrication **5**(4): 045008.
- Khawaja, G., T. Buronfosse, C. Jamard, F. Abdul, S. Guerret, F. Zoulim, A. Luxembourg, D. Hannaman, C. F. Evans, D. Hartmann and L. Cova (2012). "In vivo electroporation improves therapeutic potency of a DNA vaccine targeting hepadnaviral proteins." Virology **433**(1): 192-202.
- Knolle, P. A. and G. Gerken (2000). "Local control of the immune response in the liver." Immunol Rev **174**: 21-34.
- Koop, I. (2002). Gastroenterologie compact, 2. Aufl.; Stuttgart, Thieme Verlag.
- Koynova, R. and B. Tenchov (2011). "Recent patents in cationic lipid carriers for delivery of nucleic acids." Recent Pat DNA Gene Seq **5**(1): 8-27
- Krotz, F., C. de Wit, H. Y. Sohn, S. Zahler, T. Gloe, U. Pohl and C. Plank (2003). "Magnetofection--a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo." Mol Ther **7**(5 Pt 1): 700-710.

Kumar, R., R. Nyakundi, T. Kariuki, H. Ozwara, O. Nyamongo, G. Mlambo, B. Ellefsen, D. Hannaman and N. Kumar (2013). "Functional evaluation of malaria Pfs25 DNA vaccine by in vivo electroporation in olive baboons." Vaccine **31**(31): 3140-3147.

Kumar, S., A. Tana, A. Shankar (2014). "Cystic fibrosis -What are the prospects for a cure?" Eur J Intern Med **25**(9): 803-807.

Kumaran, V., D. Benten, A. Follenzi, B. Joseph, R. Sarkar and S. Gupta (2005). "Transplantation of endothelial cells corrects the phenotype in hemophilia A mice." J Thromb Haemost **3**(9): 2022-2031.

Kurosawa, H., R. Yasuda, Y. K. Osano and Y. Amano (2001). "Adult rat hepatocytes cultured on an oxygen-permeable film increases the activity of albumin secretion." Cytotechnology **36**(1-3): 85-92.

Laurentt, N., C. Sapet, L. Le Gourrierc, E. Bertosio and O. Zelphati (2011). "Nucleic acid delivery using magnetic nanoparticles: the Magnetofection technology." Ther Deliv **2**(4): 471-482.

Lee, P. J., P. J. Hung and L. P. Lee (2007). "An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture." Biotechnol Bioeng **97**(5): 1340-1346.

Lejeune, J., R. Turpin and M. Gautier (1959). "[Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)]." Bull Acad Natl Med **143**(11-12): 256-265.

Lim, D. W., Y. L. Yeom, T. G. Park (2000). "Poly(DMAEMA-NVP)-b-PEG-galactose as gene delivery vector for hepatocytes." Bioconjug Chem **11**(5): 688-695.

Lin, T. P. (1966). "Microinjection of mouse eggs." Science **151**(3708): 333-337.

Ljung, R. (2013). "Hemophilia and prophylaxis." Pediatr Blood Cancer **60 Suppl 1**: S23-26.

Lynn, J. G., R. L. Zwemer, A. J. Chick and A. E. Miller (1942). "A New Method for the Generation and Use of Focused Ultrasound in Experimental Biology." J Gen Physiol **26**(2): 179-193.

Macfarlane, R. G. (1964). "An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier." Nature **202**: 498-499.

Mallinson, J. C. (1973). "One-sided fluxes --A magnetic curiosity?" Magnetics, IEEE Transactions on **9**(4): 678-682.

Markusic, D. M. and R. W. Herzog (2012). "Liver-Directed Adeno-Associated Viral Gene Therapy for Hemophilia." J Genet Syndr Gene Ther **1**: 1-9.

- Marshall, E. (1999) Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. Science. **286**:2244–2245.
- Martinho, N., H. Florindo, L. Silva, S. Brocchini, M. Zloh, T. Barata (2014). "Molecular Modeling to Study Dendrimers for Biomedical Applications." Molecules **19**(12): 20424-20467.
- Megarbane, A., A. Ravel, C. Mircher, F. Sturtz, Y. Grattau, M.O. Rethore, J.M. Delabar, W.C. Mobley (2009). "The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: the past, present, and future of research and treatment of Down syndrome." Genet Med **11**(9): 611-616.
- Meijering, B. D., L.J. Juffermans, A. van Wamel, R.H. Henning, I.S. Zuhorn, M. Emmer, A. M. Versteilen, W.J. Paulus, W. H. van Gilst, K. Kooiman, N. de Jong, R. J. Musters, L. E. Deelman, O. Kamp (2009). "Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation." Circ Res **104**(5): 679-687.
- Mellott, A. J., M. L. Forrest and M. S. Detamore (2013). "Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering." Ann Biomed Eng **41**(3): 446-468.
- Midoux, P., G. Breuzard, J. P. Gomez and C. Pichon (2008). "Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes." Curr Gene Ther **8**(5): 335-352.
- Miller, D. L., S. V. Pislaru and J. E. Greenleaf (2002). "Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation." Somat Cell Mol Genet **27**(1-6): 115-134.
- Mitchell, J. J. and C. R. Scriver (1993). Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. GeneReviews. R. A. Pagon, T. D. Bird, C. R. Dolan and K. Stephens. Seattle (WA).
- Mitsuyasu, R. (2013). "Curing HIV: lessons from cancer therapy." Curr Opin HIV AIDS **8**(3): 224-229.
- Mizumoto, H., K. Ishihara, K. Nakazawa, H. Ijima, K. Funatsu and T. Kajiwara (2008). "A new culture technique for hepatocyte organoid formation and long-term maintenance of liver-specific functions." Tissue Eng Part C Methods **14**(2): 167-175.
- Mochizuki, S., H. Mizukami, T. Ogura, S. Kure, A. Ichinohe, K. Kojima, Y. Matsubara, E. Kobayahi, T. Okada, A. Hoshika, K. Ozawa and A. Kume (2004). "Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice." Gene Ther **11**(13): 1081-1086.
- Muntau, A.C., S. Beblo, B. Koletzko, "Hyperphenylalaninämie und Phenylketonurie", Monatsschr Kinderheilkd **2000** **148**: 179–193

Muntau, A. C. and S. W. Gersting (2010). "Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism." J Inherit Metab Dis **33**(6): 649-658.

Murphy, K., P. Travers, M. Walport and C. Janeway (2012). Janeway's immunobiology. New York, Garland Science.

Noble, M. L., C. S. Kuhr, S. S. Graves, K. R. Loeb, S. S. Sun, G. W. Keilman, K. P. Morrison, M. Paun, R. F. Storb, C. H. Miao (2013). "Ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated gene delivery into canine livers." Mol Ther **21**(9): 1687-1694.

Nie, F., H. X. Xu, Q. Tang and M. D. Lu (2006). "Microbubble-enhanced ultrasound exposure improves gene transfer in vascular endothelial cells." World J Gastroenterol **12**(46): 7508-7513.

Ogris, M., G. Walker, T. Blessing, R. Kircheis, M. Wolschek, E. Wagner (2003). "Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes." J Control Release **91**(1-2): 173-181.

Oh, H. J., H. Lee, J. W. Park, H. Rhee, S. K. Koo, S. Kang, I. Jo and S. C. Jung (2005). "Reversal of gene expression profile in the phenylketonuria mouse model after adeno-associated virus vector-mediated gene therapy." Mol Genet Metab **86 Suppl 1**: S124-132.

Omata, D., Y. Negishi, R. Suzuki, Y. Oda, Y. Endo-Takahashi, K. Maruyama (2015). "Nonviral gene delivery systems by the combination of bubble liposomes and ultrasound." Adv Genet **89**: 25-48.

Ong, Z. Y., C. Yang, S. J. Gao, X. Y. Ke, J. L. Hedrick, Y. Yan Yang (2013). "Galactose-functionalized cationic polycarbonate diblock copolymer for targeted gene delivery to hepatocytes." Macromol Rapid Commun **34**(21): 1714-1720.

Ortiz, R. A. and K. C. Barnes (2015). "Genetics of Allergic Diseases." Immunol Allergy Clin North Am **35**(1): 19-44.

Parker, G. A. and C. A. Picut (2005). "Liver immunobiology." Toxicol Pathol **33**(1): 52-62.

Parker, G. A. and C. A. Picut (2012). "Immune functioning in non lymphoid organs: the liver." Toxicol Pathol **40**(2): 237-247.

Passineau, M. J., L. Zourelias, L. Machen, P. C. Edwards and R. L. Benza (2010). "Ultrasound-assisted non-viral gene transfer to the salivary glands." Gene Ther **17**(11): 1318-1324.

Pathak, A., et al. (2009). "Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery." Biotechnol J **4**(11): 1559-1572.

Pavlovsky, A. (1947). "Contribution to the pathogenesis of hemophilia." Blood **2**(2): 185-191.

- Pey, A. L., B. Perez, L. R. Desviat, M. A. Martinez, C. Aguado, H. Erlandsen, A. Gamez, R. C. Stevens, M. Thorolfsson, M. Ugarte, A. Martinez (2004). "Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations." Hum Mutat **24**(5): 388-399.
- Plank, C., F. Scherer, U. Schillinger, and M. Anton (2000). "Magnetofection: enhancement and localization of gene delivery with magnetic particles under the influence of a magnetic field." J Gene Med **2**, 24
- Plank, C., F. Scherer, U. Schillinger, C. Bergemann and M. Anton (2003). "Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields." J Liposome Res **13**(1): 29-32.
- Plank, C., U. Schillinger, F. Scherer, C. Bergemann, J. S. Remy, F. Krotz, M. Anton, J. Lausier and J. Rosenecker (2003). "The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery." Biol Chem **384**(5): 737-747.
- Plank, C., K. Zatloukal, M. Cotten, K. Mechtler, E. Wagner (1992). "Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand." Bioconjug Chem **3**(6): 533-539.
- Potter, H. (1988). "Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation." Anal Biochem **174**(2): 361-373.
- Rahim, A. A., S. L. Taylor, N. L. Bush, G. R. ter Haar, J. C. Bamber and C. D. Porter (2006). "Physical parameters affecting ultrasound/microbubble-mediated gene delivery efficiency in vitro." Ultrasound Med Biol **32**(8): 1269-1279. (A)
- Rahim, A. A., S. L. Taylor, N. L. Bush, G. R. ter Haar, J. C. Bamber and C. D. Porter (2006). "Spatial and acoustic pressure dependence of microbubble-mediated gene delivery targeted using focused ultrasound." J Gene Med **8**(11): 1347-1357. (B)
- Reddy, L. H. and P. Couvreur (2011). "Nanotechnology for therapy and imaging of liver diseases." J Hepatol **55**(6): 1461-1466.
- Rosenfeld, G. C. and D. S. Loose (2007). Pharmacology. Baltimore, MD, Lippincott Williams & Wilkins.
- Rudd, L., C. Pichon and A. Delalande (2012). "Ultrasound and microbubbles assisted-gene transfer: what is next?" Ultraschall Med **33**(4): 391-393.
- Sakai, M., M. Nishikawa, O. Thanaketpaisarn, F. Yamashita, M. Hashida (2005). "Hepatocyte-targeted gene transfer by combination of vascularly delivered plasmid DNA and in vivo electroporation." Gene Ther **12**(7): 607-616.

- Sambrook, J. and D. W. Russell (2006). "Calcium-phosphate-mediated Transfection of Eukaryotic Cells with Plasmid DNAs." CSH Protoc **2006**(1).
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2006). "DNA transfection mediated by lipofection." CSH Protoc **2006**(1).
- Sanford, J. C., T. M. Klein, E. D. Wolf and N. Allen (1987). "DELIVERY OF SUBSTANCES INTO CELLS AND TISSUES USING A PARTICLE BOMBARDMENT PROCESS." Particulate Science and Technology **5**(1): 27-37.
- Sawczak, V., P. Getsy, A. Zaidi, F. Sun, K. Zaman, B. Gaston (2015). "Novel Approaches for Potential Therapy of Cystic Fibrosis." Curr Drug Targets.
- Schenborn, E. T. and V. Goiffon (2000). "Calcium phosphate transfection of mammalian cultured cells." Methods Mol Biol **130**: 135-145.
- Scherer, F., M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Kruger, B. Gansbacher and C. Plank (2002). "Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo." Gene Ther **9**(2): 102-109.
- Sears, E. H., E. J. Gartman and B. P. Casserly (2011). "Treatment options for cystic fibrosis: state of the art and future perspectives." Rev Recent Clin Trials **6**(2): 94-107.
- Seglen, P. O. (1976). "Preparation of isolated rat liver cells." Methods Cell Biol **13**: 29-83.
- Sessa, G. and G. Weissmann (1968). "Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes." J Lipid Res **9**(3): 310-318.
- Shackel, N. A. (2010). "The balancing act of hepatocyte apoptosis." Hepatology **52**(6): 2231-2233.
- Shimoda, M., S. Chen, H. Noguchi, S. Matsumoto and P. A. Grayburn (2010). "In vivo non-viral gene delivery of human vascular endothelial growth factor improves revascularisation and restoration of euglycaemia after human islet transplantation into mouse liver." Diabetologia **53**(8): 1669-1679.
- Song, S., M. Noble, S. Sun, L. Chen, A. A. Brayman, C. H. Miao (2012). "Efficient microbubble- and ultrasound-mediated plasmid DNA delivery into a specific rat liver lobe via a targeted injection and acoustic exposure using a novel ultrasound system." Mol Pharm **9**(8): 2187-2196.
- Sparks, C. A. and H. D. Jones (2014). "Genetic transformation of wheat via particle bombardment." Methods Mol Biol **1099**: 201-218.

- Sugar, I. P. and E. Neumann (1984). "Stochastic model for electric field-induced membrane pores. Electroporation." Biophys Chem **19**(3): 211-225.
- Super, M. (1992). "Milestones in cystic fibrosis." Br Med Bull **48**(4): 717-737.
- Thome, R. J. and J. M. Tarrh (1982). MHD and fusion magnets: field and force design concepts. New York, Wiley.
- Thompson, C. A. (2013). "Recombinant coagulation factor approved for hemophilia B prophylaxis." Am J Health Syst Pharm **70**(15): 1266.
- Thorrez, L., T. VandenDriessche, D. Collen and M. K. Chuah (2004). "Preclinical gene therapy studies for hemophilia using adenoviral vectors." Semin Thromb Hemost **30**(2): 173-183.
- Van Damme, A., M. K. Chuah, F. Dell'accio, C. De Bari, F. Luyten, D. Collen and T. VandenDriessche (2003). "Bone marrow mesenchymal cells for haemophilia A gene therapy using retroviral vectors with modified long-terminal repeats." Haemophilia **9**(1): 94-103.
- VandenDriessche, T., D. Collen and M. K. Chuah (2001). "Viral vector-mediated gene therapy for hemophilia." Curr Gene Ther **1**(3): 301-315.
- Vinken, M., E. Decrock, T. Doktorova, E. Ramboer, E. De Vuyst, T. Vanhaecke, L. Leybaert and V. Rogiers (2011). "Characterization of spontaneous cell death in monolayer cultures of primary hepatocytes." Arch Toxicol.
- Vlaskou, D., C. Plank and O. Mykhaylyk (2013). "Magnetic and acoustically active microbubbles loaded with nucleic acids for gene delivery." Methods Mol Biol **948**: 205-241.
- Vuorinen, A. L., A. Nieminen, V. Gaba, S. Sikorskaite and J. P. Valkonen (2013). "Biolistic DNA delivery to leaf tissue of plants with the non-vacuum gene gun (HandyGun)." Methods Mol Biol **940**: 45-51.
- Wagstaff, P. G., et al. (2014). "Irreversible electroporation of the porcine kidney: Temperature development and distribution." Urol Oncol.
- Wang, Q., W. Jiang, Y. Chen, P. Liu, C. Sheng, S. Chen, H. Zhang, C. Pan, S. Gao and W. Huang (2014). "In vivo electroporation of minicircle DNA as a novel method of vaccine delivery to enhance HIV-1-specific immune responses." J Virol **88**(4): 1924-1934.
- Wang, W., W. Li, N. Ma, G. Steinhoff (2013). "Non-viral gene delivery methods." Curr Pharm Biotechnol **14**(1): 46-60.
- Wang, G., S.O. Walker, X. Hong, T.R. Bartell, X. Wang (2013). "Epigenetics and early life origins of chronic noncommunicable diseases." J Adolesc Health **52**(2 Suppl 2): S14-21.

- Wang, S. and S. Lu (2013). "DNA immunization." Curr Protoc Microbiol **31**: 18 13 11-18 13 24.
- Weaver, J. C. (1995). "Electroporation theory. Concepts and mechanisms." Methods Mol Biol **47**: 1-26.
- Wells, D. J. (2010). "Electroporation and ultrasound enhanced non-viral gene delivery in vitro and in vivo." Cell Biol Toxicol **26**(1): 21-28.
- Wolf, E., W. Scherthaner, V. Zakhartchenko, K. Prella, M. Stojkovic, G. Brem (2000). "Transgenic technology in farm animals--progress and perspectives." Exp Physiol **85**(6): 615-625.
- Wong, S. P., O. Argyros, C. Coutelle and R. P. Harbottle (2011). "Non-viral S/MAR vectors replicate episomally in vivo when provided with a selective advantage." Gene Ther **18**(1): 82-87.
- Wu, J., L. Liu, R. D. Yen, A. Catana, M. H. Nantz, M. A. Zern (2004). "Liposome-mediated extracellular superoxide dismutase gene delivery protects against acute liver injury in mice." Hepatology **40**(1): 195-204.
- Wu, G. Y., J. M. Wilson, F. Shalaby, M. Grossman, D. A. Shafritz, C. H. Wu (1991). "Receptor-mediated gene delivery in vivo. Partial correction of genetic analbuminemia in Nagase rats." J Biol Chem **266**(22): 14338-14342.
- Yagi, H., T. Ogura, H. Mizukami, M. Urabe, H. Hamada, H. Yoshikawa, K. Ozawa and A. Kume (2011). "Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector." J Gene Med **13**(2): 114-122.
- Yang, D., Y. H. Gao, K. B. Tan, Z. X. Zuo, W. X. Yang, X. Hua, P. J. Li, Y. Zhang, G. Wang (2013). "Inhibition of hepatic fibrosis with artificial microRNA using ultrasound and cationic liposome-bearing microbubbles." Gene Ther **20**(12): 1140-1148.
- Yang, C. Q., X. Y. Li, Q. Li, S. L. Fu, H. Li, Z. K. Guo, J. T. Lin and S. T. Zhao (2014). "Evaluation of three different promoters driving gene expression in developing chicken embryo by using in vivo electroporation." Genet Mol Res **13**(1): 1270-1277.
- Yang, R., N. T. Sanghvi, F. J. Rescorla, K. K. Kopecky and J. L. Grosfeld (1993). "Liver cancer ablation with extracorporeal high-intensity focused ultrasound." Eur Urol **23 Suppl 1**: 17-22.
- Zhang, W. W., S. F. Josephs, J. Zhou, X. Fang, R. Alemany, C. Balague, Y. Dai, D. Ayares, E. Prokopenko, Y. C. Lou, E. Sethi, D. Hubert-Leslie, M. Kennedy, L. Ruiz and S. Rockow-Magnone (1999). "Development and application of a minimal-adenoviral vector system for gene therapy of hemophilia A." Thromb Haemost **82**(2): 562-571.
- Zhdanov, R. I., O. V. Podobed and V. V. Vlassov (2002). "Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy." Bioelectrochemistry **58**(1): 53-64.

Zhou, Y., R. E. Kumon, J. Cui and C. X. Deng (2009). "The size of sonoporation pores on the cell membrane." Ultrasound Med Biol **35**(10): 1756-1760.

Zimmerman, B. and L. A. Valentino (2013). "Hemophilia: in review." Pediatr Rev **34**(7): 289-294; quiz 295.

Zimmermann, A. (2002). "Liver regeneration: the emergence of new pathways." Med Sci Monit **8**(3): RA53-63.

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Søren W. Gersting für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Molekulare Pädiatrie, die Bereitstellung des Themas sowie seiner Zeit, die konstruktive Kritik und das beständige Interesse.

Des Weiteren danke ich besonders Frau Prof. Dr. Ania C. Muntau für die Möglichkeit, diese Dissertation am Dr. von Haunerschen Kinderspital erstellen zu können.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. Eckhard Wolf für seine Geduld, die Begutachtung und die Bereitschaft, diese Arbeit an der Tiermedizinischen Fakultät einzureichen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei:

- Julia Borsch für die gute fachliche Zusammenarbeit an diesem Projekt,
- Dem gesamten lieben Laborteam der Molekularen Pädiatrie des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, darunter vor allem Duni, Marta und Anna Mouse,
- Herrn Dr. Michael Warlich vom UKE Hamburg für seine unermüdliche Geduld mit mir als „Nicht-Wissenschaftlerin“, seine Einführung in das Thema der Leberperfusion und für die Durchsicht meiner Arbeit,
- Herrn Dr. Manuel Deutsch für die geduldige und hochkompetente Einführung in die Welt der Konfokalmikroskopie und das Zur-Seite-Stehen, falls es mal nicht klappte,
- Herrn Heribert Stephan von der Firma Neue Magnetodyn GmbH in München für die fachliche Beratung und die Vermessung des konstruierten Halbach Arrays,
- Meinem Freund Christopher für die Geduld, die Bereitschaft, sich um alles andere zu kümmern und nicht zuletzt für seine Liebe,
- Meiner Freundin Maike für den regen Erfahrungsaustausch und die dabei warm telefonierten Ohren,
- Meinem Bruder Simon für die kompetente Hilfe bei Übersetzungsfragen,
- Meiner Familie, allen voran meiner Mutter, ohne die ich jemand ganz anderes wäre.