

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zum Freisetzungsmechanismus neuartiger, auf
Phosphatidylglycerin-basierender sowie pegylierter, Lysolipid-haltiger
thermosensitiver Liposomen und deren Schicksal in Zellkultur

Annabel H. S. Alig

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Bergwelt

Untersuchungen zum Freisetzungsmechanismus neuartiger, auf
Phosphatidylglycerin-basierender sowie pegylierter, Lysolipid-haltiger
thermosensitiver Liposomen und deren Schicksal in Zellkultur

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Annabel H. S. Alig

aus Aschaffenburg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Lars Lindner

Mitberichterstatter: Prof Dr. Ines Golly

PD Dr. Fabian Hauck

Mitbetreuung durch
promovierten Mitarbeiter: Dr. Martin Hossann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Liposomen.....	7
1.2	Thermosensitive Liposomen	8
1.3	Freisetzungsmechanismen - Hypothesenvorstellung.....	9
1.3.1	Durchlässigkeit einer Membran in Abhängigkeit ihres Phasenzustands... ..	9
1.3.2	Porenbildung.....	11
1.4	Extra- und intrazelluläre Freisetzung.....	14
1.5	Einflüsse auf das Freisetzungsverhalten	14
2	Zielsetzung	16
3	Materialien.....	18
3.1	Lipide.....	18
3.2	Fluoreszenzfarbstoffe	19
3.3	Chemikalien und Lösungsmittel.....	19
3.4	Puffer, Lösungen und Reagenzien	21
3.5	Kultivierungslösungen für Zellkultur.....	22
3.6	Verbrauchsmaterial	23
3.7	Geräte	24
3.8	Software	26
3.9	Hergestellte und verwendete TSL	26
4	Methoden	28
4.1	Liposomenherstellung	28
4.1.1	Lipidfilmherstellung	28
4.1.2	Hydratisierung.....	28
4.1.3	Extrusion.....	28
4.1.4	Säulenchromatographische Umpufferung	29

4.2	Substrateinschluss	29
4.2.1	CF-Einschluss.....	29
4.2.2	FITC-Dextran-Einschluss.....	29
4.3	Liposomencharakterisierung	30
4.3.1	Phosphatbestimmung	30
4.3.2	Dünnschichtchromatographie	30
4.3.3	Zeta-Potential	31
4.3.4	Bestimmung der Liposomengröße und des Polydispersionsindex.....	31
4.4	Temperaturabhängige Öffnungsprofile.....	31
4.5	Entwicklung der in vitro Öffnungskinetik von TSL.....	32
4.6	Zellkultur.....	33
4.6.1	Kultivierung	33
4.6.2	Passagieren der Zellen.....	34
4.6.3	Zellzahlbestimmung.....	34
4.6.4	Einfrieren/Auftauen von Zellen.....	34
4.6.5	Mykoplasmentest.....	35
4.7	Mikroskopieren	35
4.7.1	Auflichtfluoreszenzmikroskopie.....	35
4.7.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	35
4.7.3	Liposomenhaftversuch.....	36
4.7.4	TSL-Endozytose-Versuch.....	37
5	Ergebnisse	39
5.1	Analyse von FITC-Dextran	39
5.2	Temperaturentwicklung innerhalb der Küvetten	40
5.3	Einflüsse auf das Fluoreszenzverhalten von CF und FITC-Dextran.....	40
5.4	Einflüsse von Proteinen auf die Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran..	41

5.5	Temperaturabhängige Öffnungsprofile von CF-beladenen TSL.....	42
5.6	In vitro Öffnungskinetiken.....	44
5.6.1	DPPG ₂ -TSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer	44
5.6.2	LTSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer.....	45
5.6.3	DPPC-TSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer.....	48
5.6.4	Vergleich der CF- und FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer.....	49
5.7	In vitro Öffnungskinetiken von FITC-Dextran-beladenen TSL in verschiedenen Puffern	51
5.7.1	HSA-Verdünnungen.....	52
5.7.2	IgG-Verdünnungen	55
5.7.3	HePC-Verdünnungen	57
5.7.4	P-Lyso-PC-Verdünnungen.....	61
5.8	Zellkulturexperimente	66
5.8.1	TSL-Anhaftungsversuch	66
5.8.2	TSL-Aufnahme-Versuch	68
6	Diskussion.....	72
6.1	In vitro Öffnungskinetiken.....	72
6.1.1	Interpretation der Daten.....	72
6.1.2	DPPC-TSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer.....	74
6.1.3	DPPG ₂ -TSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer	75
6.1.4	LTSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer	75
6.1.5	FITC-Dextran - und CF - Freisetzung im Vergleich.....	76
6.1.6	Freisetzungsmechanismen.....	76
6.1.7	„Früher Peak“.....	79
6.2	Freisetzung von FITC-Dextran aus TSL in differierenden Pufferlösungen	80
6.2.1	FITC-Dextran Freisetzung in HSA	80

6.2.2	FITC-Dextran in IgG	82
6.2.3	FITC-Dextran Freisetzung in den Mizellenbildner HePC und P-Lyso-PC	84
6.3	Zellkulturexperimente	85
6.3.1	Anhaftung von TSL an BN175	86
6.3.2	Endozytose der TSL	87
7	Zusammenfassung.....	91
8	Anhang.....	93
8.1	Abkürzungsverzeichnis	93
8.2	Tabellenverzeichnis.....	95
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	95
9	Literaturverzeichnis	97

1 Einleitung

1.1 Liposomen

Liposomen sind sphärische Strukturen, die von amphiphilen Molekülen - vornehmlich Phospholipiden - gebildet und in der Medizin als Nanotransport-System verwendet werden (Cattel et al. 2004).

Phospholipide bilden je nach Lipidstruktur in wässriges Milieu gebracht spontan charakteristische Strukturen aus: Mizellen oder lamellare Strukturen (vgl. Abbildung 1). So können sich spontan Vesikel bilden (Rassow 2012). Wenn dies durch artifizielle Vorgänge geschieht, so nennt man diese Vesikel Liposomen.

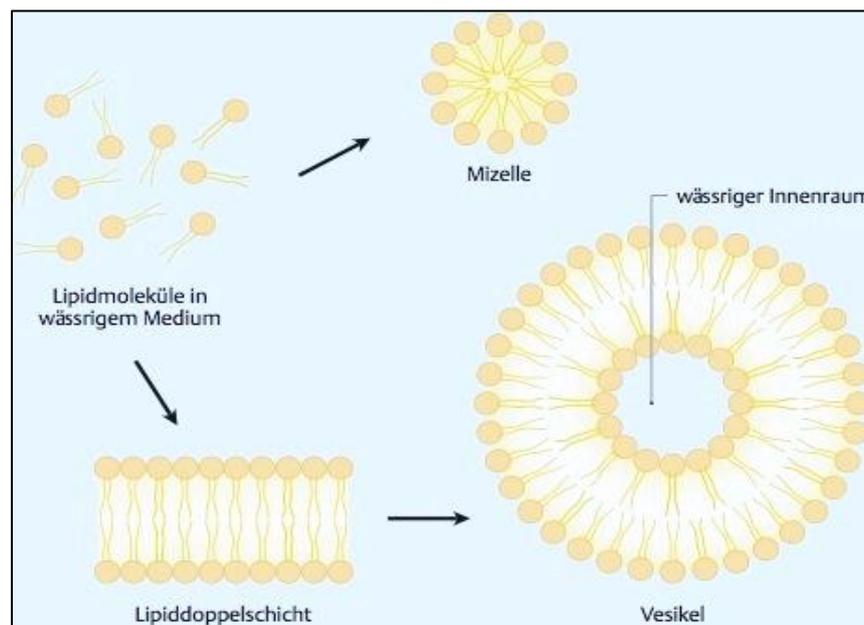


Abbildung 1: Spontane Zusammenlagerung von Lipidmolekülen in wässrigem Medium (aus Rassow 2012)

Seit ihrer Erstbeschreibung (Bangham et al. 1965) gewinnen Liposomen insbesondere in den Gebieten Gentransfer und Krebstherapie als Form des „drug targeting“ an Stellenwert (Torchilin 2005).

Liposomen haben den Vorteil nicht-immunogen und biologisch abbaubar zu sein. Des Weiteren bieten sie die Möglichkeit diverse Substanzen einzuschließen (Deshpande et al. 2013). Hydrophile Stoffe werden im Vesikelinneren, lipophile Moleküle innerhalb

der Doppelmembran eingeschlossen (Torchilin 2005). So können selbst hydrophobe Substanzen in Lösung gebracht werden.

Durch gezielte Freisetzung können bei gleichbleibendem bis verstärktem lokalen Effekt systemische Nebenwirkungen von z.B. Zytostatika wie Doxorubicin gemindert werden (Berry et al. 1998; Xing et al. 2015).

Durch Alterierung der verwendeten Lipide lassen sich die Eigenschaften der Nanotransporter verändern (Torchilin 2006): So wird durch PEGylierte (Polyethylenglycol) Phospholipide eine schnelle Elimination der Liposomen durch das Retikuloendotheliale System (RES) verhindert. Dadurch erhöht sich ihre Zirkulationsdauer und die Verfügbarkeit der eingeschlossenen Substrate (Allen et al. 1991). Die Verwendung von 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphodiglycerin (DPPG₂) als Membranbestandteil verbessert die Substanzfreisetzung ohne zu einem ungewünschten Stabilitätsverlust zu führen (Hossann et al. 2007).

Durch Veränderungen der Liposomenoberfläche kann ferner die Stabilität, die Substanzfreisetzung und die Freisetzungsrates variiert werden (Charrois und Allen 2004).

In Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung können körpereigene, krankheitsspezifische Trigger wie ein sinkender pH-Wert (Boomer et al. 2009), eine veränderte Enzymaktivität (Banerjee et al. 2009; Kaasgaard et al. 2009), ein verändertes Redoxpotential (Ong et al. 2008) oder auch exogen applizierte, lokal wirksame Stimuli, wie z.B. künstlich erzeugte Wärme (Yatvin et al. 1978) als Trigger für eine Medikamentenfreisetzung fungieren.

1.2 Thermosensitive Liposomen

Einen Subtyp der Liposomen stellen die thermosensitiven Liposomen (TSL) dar, die erstmalig 1978 durch Yatvin et al. beschrieben wurden.

Bei TSL kommt es im Bereich der sog. Phasenumwandlungstemperatur (T_m) zu einer Verminderung der Membranintegrität und einer hieraus resultierenden erhöhten Substratfreigabe (Ponce et al. 2006). Die T_m wiederum hängt entscheidend von den verwendeten Lipiden und deren Zusammensetzung ab (Lindner et al. 2004; Paasonen

et al. 2007; Hossann et al. 2007). Für den Einsatz am Patienten wird eine klinisch gut erreichbare T_m von 39-42°C angestrebt (Kneidl et al. 2014).

Die hierfür benötigte Temperatur wird durch lokale Gewebserhitzung - d.h. durch milde Hyperthermie (Needham et al. 2000; Lindner et al. 2004; Hauck et al. 2006), Ultraschall (Dromi et al. 2007; Schroeder et al. 2009) oder Laser (Paasonen et al. 2007; Wu et al. 2008; Volodkin et al. 2009) - erreicht. Dies soll eine lokale Wirkstofffreisetzung gewährleisten.

Der Einsatz von regionaler Hyperthermie (RHT) in der Onkologie bietet mehrere Vorteile: Medikamentenwirkungen werden verstärkt, die applizierte milde Hyperthermie resultiert in einer unmittelbaren thermalen Toxizität und es wird eine immunologische Antwort gegen den Tumor initiiert (Issels 2008). Eine randomisierte Phase-III-Studie zur Behandlung von Weichteilsarkomen zeigte eine signifikante Überlegenheit von anthrazyklinhaltiger Chemotherapie in Kombination mit RHT gegenüber alleiniger Doxorubicin-basierter Chemotherapie bezüglich des krankheitsfreien Überlebens (Issels et al. 2010).

Der etablierte Einsatz von RHT bei der Therapie von Weichteilsarkomen macht den klinischen Einsatz von mit Doxorubicin-beladenen TSL insbesondere hierfür interessant. Eine Pilotstudie zum Einsatz beim sporadischen feline Weichteilsarkom zeigte bereits erfolgversprechende Ergebnisse (Zimmermann et al. 2016).

1.3 Freisetzungsmechanismen - Hypothesenvorstellung

Der Mechanismus, der zur Freisetzung eingeschlossener Substanzen aus den verschiedenen TSL führt, ist noch nicht abschließend bekannt. Es existieren je nach verwendeter Lipidzusammensetzung mehrere Hypothesen.

1.3.1 Durchlässigkeit einer Membran in Abhängigkeit ihres Phasenzustands

Der Integritätsverlust der TSL-Membran um die T_m herum lässt sich wie folgt erklären: Innerhalb einer Doppelmembran können vier Regionen unterschieden werden, die eine Diffusion von hydrophilen Stoffen in unterschiedlichem Maße behindern (Marrink und Berendsen 1993). Während die Regionen 1 und 2 kaum einen Widerstand darstellen, bilden die Regionen 3 und 4 die entscheidende Barriere für passive

Diffusion (Xiang und Anderson 2006). Denn in den Regionen 3 und 4 sind der Wasseranteil und die elektrostatischen Wechselwirkungen, die die hydrophilen Substanzen stabilisieren könnten, am geringsten.

Die Permeabilität dieser Barriere wird maßgeblich von ihrer temperaturabhängigen Phase beeinflusst. Aufgrund der Packungsdichte, des Ordnungsgrades, der seitlichen Diffusion, der Alkylkettenlänge und der Sättigung der Kohlenstoffketten der Lipide lassen sich drei Phasen unterscheiden.

Die solide Phase (L_{β}) zeichnet sich durch eine hohe Ordnung und Packungsdichte aus. Die Lipide diffundieren hierin langsam seitwärts. In der flüssig-kristallinen oder auch flüssig-ungeordneten Phase (L_{α}) hingegen herrschen eine schnelle translationale Diffusion, eine geringe Ordnung und eine vergleichsweise geringe Packungsdichte. Umso höher der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in den Lipiden ist, desto eher tritt die flüssig-kristalline Gelphase auf. Bei cholesterinhaltigen Liposomen kann eine weitere Phase, die flüssig-geordnete Gelphase (L_o), existieren. Diese ist durch einen hohen Ordnungsgrad, aber schnelle seitliche Lipiddiffusion gekennzeichnet. (van Meer et al. 2008)

Während der Temperaturerhöhung, z.B. mittels RHT, wechselt im Bereich der T_m die Membranphase von L_{β} in L_{α} , sodass vorübergehend beide Phasen nebeneinander existieren (van Meer et al. 2008) bis sich alle Lipide in L_{α} befinden. Hierzwischen bilden sich durchlässige Grenzflächen, sogenannte „micrograin boundaries“ (Mouritsen, O. G. et al. 1976; Corvera et al. 1992; Mouritsen und Zuckermann 1987).

Im Bereich der T_m tritt somit das Ordnungsminimum in Membranen auf, was dem Zeitpunkt der maximalen Anzahl an „micrograin boundaries“ entspricht und mit dem Zeitpunkt der höchsten Freisetzungsrates einhergeht (Cruzeiro-Hansson und Mouritsen 1988). Dieser Effekt wird noch verstärkt, wenn die Membran aus mehreren Lipiden oder lipidähnlichen Molekülen besteht (Mills und Needham 2005).

Eine andere Hypothese besagt, dass sich durch Dichteunterschiede zwischen den Phasen Lücken zwischen den Kopfgruppen der Lipide bilden. Hierdurch können Ionen erst in die Membran und dann hindurch treten (Nagle und Scott 1978).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die Membrandurchlässigkeit bei steigenden Temperaturen jenseits der T_m weiter erhöht (Papahadjopoulos et al. 1973; Shimanouchi et al. 2009; Kim und Kim 2007).

1.3.2 Porenbildung

Neben der oben beschriebenen gesteigerten Membrandurchlässigkeit scheint bei dem Einbau von speziellen Lipiden in die Liposomenmembran noch ein weiterer Effekt zur Freisetzung von eingeschlossenen Molekülen zu führen: die Porenbildung.

Einkettige Phospholipide (1-Acyl-sn-glycero-phospholipide, Lysolipide) können in einem geringen molaren Anteil (<10-15%) in Membranen eingebaut werden (Mills und Needham 2005). Durch Einbau dieser bzw. allgemein von Detergenzien können sich Poren in Doppelmembranen in L_o ausbilden (Bangham und Lea 1978). Bei Liposomen mit einem Lysolipidanteil von ca. 10mol% im Vergleich zu TSL ohne Lysolipidanteil sinkt die T_m und die vollständige Substratfreisetzung kann innerhalb weniger Sekunden als „Burst Release“ ablaufen (Mills und Needham 2005; Needham et al. 2000; Anyarambhatla und Needham 1999).

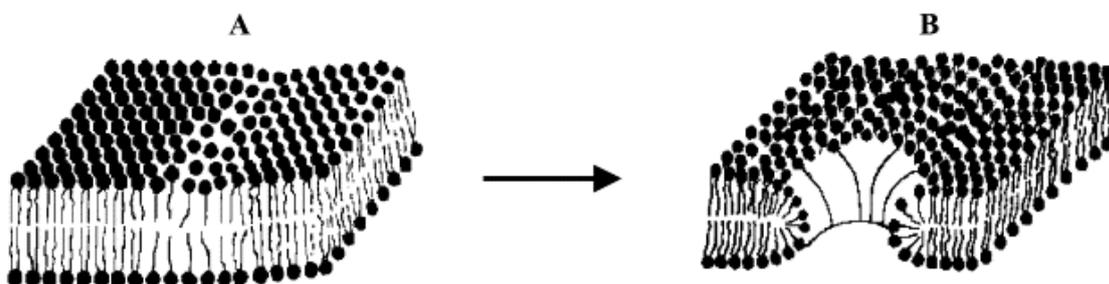


Abbildung 2: Veränderungen einer Lipiddoppelmembran bei Erwärmung
A: Akkumulation von Lysolipiden an „grain boundaries“
B: Ausbildung von Poren durch Lysolipide bei Erreichen der T_m
(aus Ickenstein et al. 2003)

Der Krümmungsradius spontan ausbildender Mizellen ist in etwa so groß wie die Dicke einer Doppelschichtmembran (Landon et al. 2011). Zusammen mit der annähernd konischen Form der Lysolipide (Israelachvili 1992) wäre daher nach Ickenstein et al. auch eine Porenbildung und Porenstabilisierung an den „grain boundaries“ durch die Kopfgruppen der Lysolipide möglich (vgl. Abbildung 2, Abbildung 3). Eine solche Porenbildung durch Lysolipide würde die deutlich schnellere Freisetzung und die

erhöhte Permeabilität nach Überschreiten der T_m aus solchen Liposomen erklären (Mills und Needham 2005; Ickenstein et al. 2003).

Bisher konnte diese Hypothese jedoch nicht bewiesen werden.

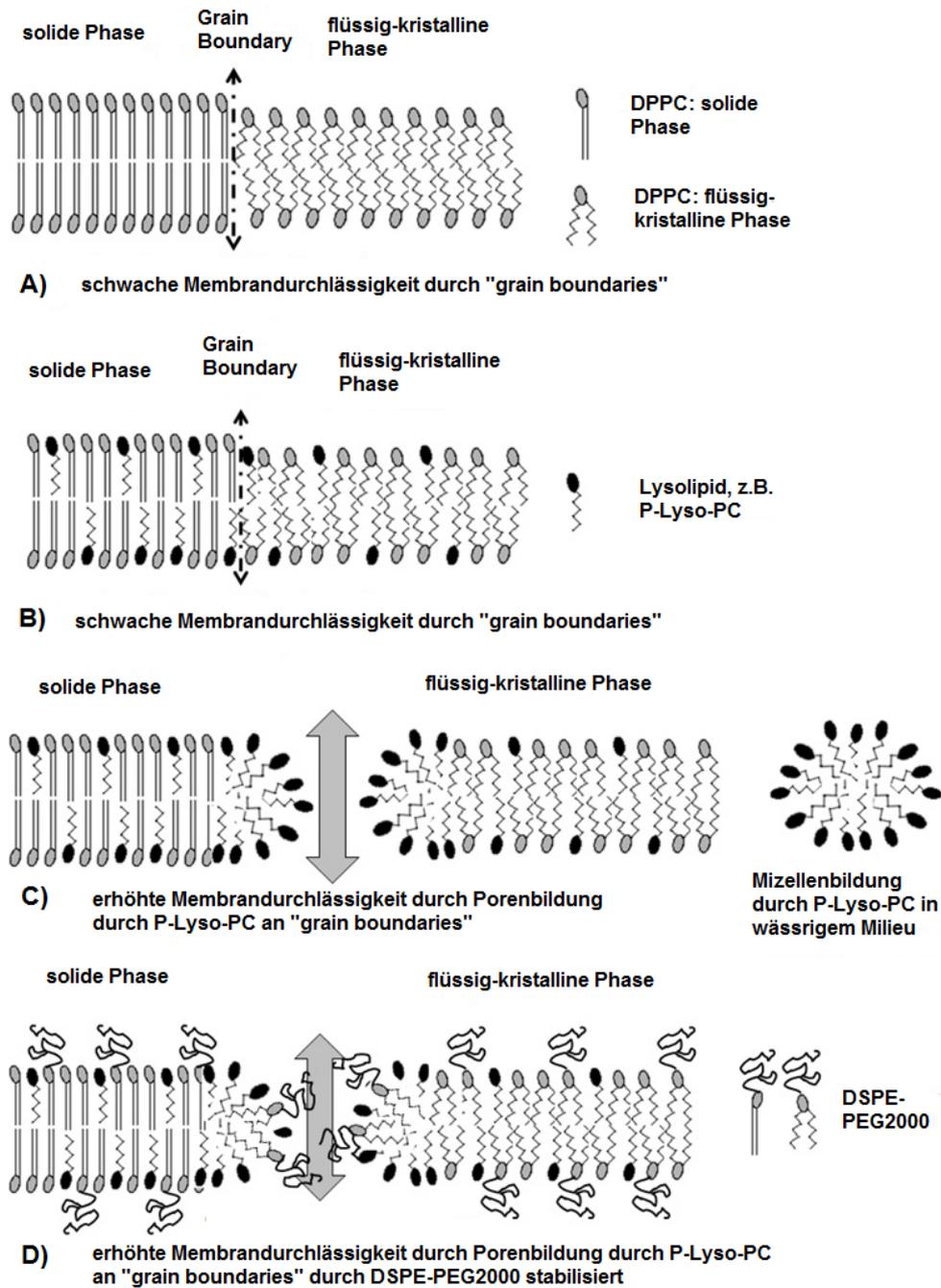


Abbildung 3: Darstellung der verschiedenen Freisetzungshypothesen unter Verwendung verschiedener Lipide

A) Ausbildung von „grain boundaries“ in Membran aus DPPC

B) Ausbildung von „grain boundaries“ in Doppelschichtmembran aus Phospho- und Lysolipiden, hier anhand von DPPC und P-Lyso-PC

C) Porenbildung durch Lysolipide, dadurch erhöhte Membrandurchlässigkeit

D) Ausbildung von Poren durch P-Lyso-PC durch DSPE-PEG₂₀₀₀ stabilisiert, dadurch erhöhte Permeabilität

(Darstellung aus Landon et al. 2011, modifizierte Beschriftung)

1.4 Extra- und intrazelluläre Freisetzung

Je nach Liposomenformulierung unterscheidet man zwischen einer extra- und einer intrazellulären Substratfreisetzung. Die extrazelluläre Freisetzung lässt sich wiederum in eine zielferne und zielnahe Freisetzung unterteilen.

Bei der zielfernen Freisetzung werden Liposomen z.B. vom RES in Milz und Leber abgebaut. Dabei freigesetzte Substrate gelangen über den Körperkreislauf zum Zielort. Im Gegensatz dazu wird der Wirkstoff bei der zielnahen Freisetzung intravaskulär in unmittelbarer Nähe der Zielzellmembran freigesetzt. Caelyx® reichert sich z.B. nach dem Permeabilitäts- und Retentions-Effekt (EPR-Effekt) im Tumorgewebe an (Bertrand et al. 2014). Das Medikament kann anschließend über Mikropinozytose oder Diffusion in die Zielzelle aufgenommen werden. (Lindner und Hossann 2010; Black C. D. V. et al. 1990)

Bei der intrazellulären Substratfreisetzung gelangen die Liposomen mittels spezifischer oder unspezifischer Endozytose in die Zielzellen (Hillaireau und Couvreur 2009). So kann durch die Bindung von Antikörper oder Liganden an die Liposomenmembran eine spezifische Aufnahme erreicht werden (Torchilin 2005; Saad et al. 2008; ElBayoumi und Torchilin 2009).

Bei der Endozytose werden Liposomen durch Abschnüren der Zellmembran in sog. Endosomen (Endozytosevesikel) aufgenommen. Diese verschmelzen mit primären zu reifen sekundären Lysosomen. Durch den darin entstehenden sauren pH-Wert werden die Liposomen und Lipide abgebaut. Allerdings können z.B. pH-sensitive Liposomen eine Destabilisierung der Endozytosevesikel mit anschließender Medikamentenfreisetzung in das Zytoplasma erreichen (Momekova et al. 2007; Auguste et al. 2008).

1.5 Einflüsse auf das Freisetzungverhalten

In vitro Freisetzungsraten weichen unter Umständen von denen in vivo ab, da in Anwesenheit von Serum die Medikamentenfreisetzung aus TSL verstärkt wird (Hosokawa et al. 2003; Gaber et al. 1995). Die größten Serumproteine sind Albumin und Immunglobulin G, die zusammen ca. 88% der Proteine im Blut ausmachen. Die

Membranintegrität von Liposomen kann durch das Eindringen und die Anlagerung von Proteinen gestört werden, was ihre Stabilität verringert (Sabín et al. 2009). Je nach Ladung, Größe und Lipidzusammensetzung der TSL variieren die Einflüsse der Serumproteine (Weissmann et al. 1974; Hossann et al. 2012). So beeinflusst IgG nur anionische Liposomenformulierungen, während HSA die Permeabilität bei allen in dieser Arbeit verwendeten TSL erhöht (Hossann et al. 2012). Daher ist es wichtig die Einflüsse der Serumproteine auf die jeweilige TSL-Formulierung zu kennen.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurden Freisetzungsmechanismen aus neuartigen, auf Phosphatidylglycerin-basierenden thermosensitiven Liposomen mit pegylierten, Lysolipid-haltigen TSL (z.B. Thermodox®, Celsion Corp., USA) untersucht und verglichen. Bei der Formulierung aus DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG₂₀₀₀ handelte es sich um eine eigens hergestellte Thermodox®-artige Formulierung.

In Anlehnung an Mills und Needham 2005 wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass TSL bestehend aus DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (LTSL) während der T_m durch P-Lyso-PC gebildete und durch DSPE-PEG₂₀₀₀ stabilisierte Poren ausbilden (Mills und Needham 2005; Mouritsen, O. G. et al. 1995; Landon et al. 2011; Ickenstein et al. 2003).

Im Gegensatz hierzu wurde bei den TSL bestehend aus DPPC/DSPC/DPPG₂ (DPPG₂-TSL) postuliert, dass hydrophile Substrate über durchlässige Grenzflächen am Rande von „grain boundaries“ während der T_m freigesetzt werden (Mouritsen, O. G. et al. 1995; Marsh et al. 1976; Corvera et al. 1992; Mouritsen und Zuckermann 1987).

Ziel der Arbeit war es, ein System zu entwickeln, durch welches man eine Porenbildung von einer erhöhten Permeabilität über „micrograin boundaries“ unterscheiden kann und näheres über den jeweiligen Freisetzungsmechanismus der TSL-Formulierungen in Erfahrung zu bringen.

Aufgrund seiner Größe und Fluoreszenzeigenschaften eignet sich FITC-Dextran dazu, eine mögliche Freisetzung über derartige Poren aus den TSL festzustellen (Moumaris et al. 2015).

Darüber hinaus wurden, um möglichst anwendungsnahe Bedingungen zu simulieren, die Einflüsse der zwei größten Serumproteinkomponenten Immunglobulin G (IgG) und humanes Serumalbumin (HSA) auf die Substratfreigabe und deren Mechanismus untersucht. Dies ist vor Initiierung einer klinischen Studie am Menschen entscheidend und von außerordentlichem Interesse.

Des Weiteren lagen keine Erkenntnisse vor, ob es zu einer Interaktion von DPPG₂-TSL mit den potenziellen Zielzellen gibt oder es sogar zu einer Aufnahme in die

Tumorzellen kommt. Dies wurde im zweiten Teil dieser Arbeit anhand von Zellkulturexperimenten untersucht: Zunächst wurde ermittelt, ob es zu einer Interaktion zwischen Zellen und beider TSL-Formulierungen kommt. Bei Bestätigung, dass die DPPG₂-TSL in Interaktion mit den Tumorzellen treten und keine Anzeichen einer Porenbildung aufweisen, sollte ihre Interaktion mit den Zellen, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche zelluläre Aufnahme, näher beleuchtet werden.

3 Materialien

3.1 Lipide

Tabelle 1: verwendete Lipide

Lipide	Abkürzung	Molare Masse [g/mol]	Bezugsquelle
1,2- Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DPPC	734,06	Genzyme Pharmaceuticals, Schweiz-Liestal
1,2- Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphodiglycerin	DPPG ₂	819,04	CordonPharma, Liestal, Schweiz
1,2- Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DSPC	790,17	Genzyme Pharmaceuticals, Schweiz-Liestal
1,2- Dipalmitoyl- <i>sn</i> -gzero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-amino(polyethylen-glycol)-2000]	DSPE-PEG ₂₀₀₀	2805,54	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA
1- Palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	P-Lyso-PC	495,64	Genzyme Pharmaceuticals, Schweiz-Liestal
Hexadecylphosphocholin, Miltefosin	HePC	407,57	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA

3.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 2: verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitationswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]	Bezugsquelle
CF; Carboxyfluorescein	492	516	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DAPI; 4'6-Diamidin-2-phenylindol	358	515	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DiD; 1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindodicarbocyanine	647	677	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
FITC-Dextran; Fluorescein isothiocyanate-Dextran	493	516	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Rh-PE; 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)	572	590	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabasta, Alabama, USA

3.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Tabelle 3: verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien und Lösungsmitteln	Bezugsquelle	Gebrauch
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland	DC
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	Phosphatbestimmung, DC
Bidestilliertes Wasser (aus Reinstwasseranlage)	Firma Millipore, Darmstadt, Deutschland	Phosphatbestimmung, DC

Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland	DC, Lipidfilmlösung
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland	Mykoplasmentest, Zellkulturexperimente
Dinatriumhydrogen- phosphat, wasserfrei	Merck, Darmstadt, Deutschland	Mykoplasmentest
Ethansäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt, Deutschland	DC
HEPES	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	Pufferherstellung
Methanol	Roth, Buchenau, Deutschland	DC, Lipidfilmlösung, Mykoplasmentest
Molybdän-Pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Färbemittel, Molybdänspray DC
Molybdäntrioxid MoO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Färbemittel, Molybdänspray DC
Natriumchlorid, NaCl	Roth, Buchenau, Deutschland	Pufferherstellung, Liposomenherstellung und -charakterisierung
Perchlorsäure HClO ₄ 70%	Merck, Darmstadt, Deutschland	Phosphatbestimmung
Schwefelsäure H ₂ SO ₄ , 96%	Merck, Darmstadt, Deutschland	Färbemittel, Molybdänspray DC
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Umpuffern der Liposomen
Sephadex G-75	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Umpuffern der Liposomen
Stickstoff, N ₂	Campus Großhadern, Klinikum der LMU, München, Deutschland	Extrusion

Triton X-100	Roth, Buchenau, Deutschland	Phosphatbestimmung, Öffnungskinetik
α -Glycerophosphocholin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	DC

3.4 Puffer, Lösungen und Reagenzien

Tabelle 4: verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

Puffer, Lösungen und Reagenzien	Zusammensetzung	Gebrauch
Carboxyfluorescein (CF) - Stammlösung	796,6mg CF; Aqua bidest ad 20ml; pH 7,2	CF-Einschluss
Histidin-Puffer pH 6,4	20 mM L-Histidin; 150 mM NaCl; Aqua bidest ad 1000ml	Charakterisierung der Liposomen
HN-Puffer pH 7,4	20 mM Hepes; 150 mM NaCl; Aqua bidest ad 1000ml	Herstellung und Charakterisierung der Liposomen
HN-Puffer pH 7,8	20 mM Hepes; 150 mM NaCl; Aqua bidest ad 1000ml	Herstellung und Charakterisierung der Liposomen
Isopropanol 70%	B. Braun AG; Melsungen, Deutschland	Desinfektion
Laufmittel	Chloroform 100ml; Methanol 60ml; Ethansäure 10ml; Aqua bidest 5ml	DC
Lösung I Molybdänspray	Molybdäntrioxid 40,11g ad 1,0l 25NH ₂ SO ₄	DC
Lösung II Molybdänspray	Molybdänpulver 1,78g in 500ml Lösung I	DC
Molybdänspray	150ml Lösung I; 150ml Lösung II; 600ml Aqua bidest	DC
Natriumchloridlösung 0,9%	Natriumchlorid 4,5g; Aqua bidest ad 500ml	Phosphatbestimmung, CF-Einschluss

Natronlauge 0,1N bzw. 1N	Roth, Buchenau, Deutschland	Pufferherstellung, Neutralisierung, Mykoplasmentest
Phosphatbestimmung Lösung I	H ₂ SO ₄ 35,3g; bidest. Wasser ad 100ml	Phosphatbestimmung
Phosphatbestimmung Lösung II	Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat 3g; 10% Triton X-100 120µl; Aqua bidest ad 100ml	Phosphatbestimmung
Phosphat-Standard, 1000mg/l Phosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland	Phosphatbestimmung
Phosphor ICP Standard, 1000mg/l Phosphor	Merck, Darmstadt, Deutschland	Phosphatbestimmung
Salzsäure 0,1N bzw. 1N	Roth, Buchenau, Deutschland	Pufferherstellung, Neutralisierung
Sephadex G-50/75	10 g Sephadex® G-50/75; 0,9% NaCl-Lösung ad 150 ml	Umpuffern

3.5 Kultivierungslösungen für Zellkultur

Tabelle 5: verwendete Lösungen zur Zellkultivierung

Zellkultur: Lösungen	Bezugsquelle	Gebrauch
Fetales Kalbsserum, FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	Zellkulturexperimente
PBS Dulbecco, ohne Puffer	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	Zellkulturexperimente
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml / 10000 µg/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	Zusatz Medium
RPMI 1640 Medium, NaHCO ₃ gepuffert, mit stabilem Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	Zellkulturexperimente
Trypsin/EDTA Lösung 0,5%/0,2%	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	Ablösen adhärenter Zellen

3.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 6: verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle	Gebrauch
DC-Kieselgel 60	Merck, Darmstadt, Deutschland	DC
Einmal-Plastikpipetten	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland	Zellkulturexperimente
Eppendorf Reaktionsgefäße mit Deckel „Eppis“, 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Bei allen Experimenten
Falcon Reaktionsgefäß (15 bzw. 50ml)	Erembodegem, Belgien	Zellkultur, Zentrifugation
Gewebekulturflaschen; 175cm ² + 75cm ²	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland	Zellkultivierung
Glaswolle	Assistent, Sondheim, Deutschland	Umpuffern der TSL
Microtest™ TC Plates, 96 Well, Flachboden	BD, Heidelberg, Deutschland	Zellkulturexperimente
Nunc™ Lab-Tek™ Kammerdeckgläser	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Zellkulturexperimente
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim, Deutschland	DC, Extrusion, Umpuffern
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GMBH + CO KG, Deutschland	Zellkulturexperimente
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Bei allen Experimenten
Polycarbonatfilter (200nm)	Whatmann, Dassel, Deutschland	Extrusion
Zellkulturschalen 60x15mm	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland	Mykoplasmentest

3.7 Geräte

Tabelle 7: verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Bezugsquelle	Gebrauch
Cary Eclipse Fluoreszenz-spektr-photometer	Varian, Palo Alto, USA	Öffnungskinetik
CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland	Brutschrank
Cryo Freezing Container, Nalgene™	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	Einfrieren der Zellen
Digitaler Vakuumregler Vac Control Automatic RS	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland	Lipidfilmherstellung
Digitalkamera Power Shot G9	Canon, Krefeld, Deutschland	Dokumentation
Extruder Lipex	Northern Lipids Inc., Burnaby, Kanada	Extrusion
Feinwaage, Precisa 250A, SCS	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz	Lipidfilmherstellung
Heizblock Typ 53 LS 6301	Liebisch GmbH & Co.KG Labortechnik, Bielefeld, Deutschland	Phosphatbestimmung
Konfokales Mikroskop, Leica TCS SP5 II	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland	Zellkulturexperimente
Magnetrührer mit Heizplatte, VMS-A	VMR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	Pufferherstellung
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland	Lipidfilmherstellung
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena, Deutschland	TSL-Anhaftungsversuch
pH-Elektrode SenTix 81	WTW, Weilheim, Deutschland	Pufferherstellung, Neutralisierung, Fluoreszenzherstellung
pH-Meter Inolab pH 720	WTW, Weilheim, Deutschland	Pufferherstellung, Neutralisierung, Fluoreszenzherstellung
Pierce Reacti-Therm™ Heizblock	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	DC

Pierce Reacti-Therm™ Bedampfungseinheit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	DC
Pipetboy Comfort	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland	Zellkulturexperimente
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland	Lipidfilmherstellung, Zellkultur
Rotationsverdampfer Laborota 4001	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland	Lipidfilmherstellung
Scanner: HP Scanjet 3800	HP, Palo Alto, USA	DC
Spectrophotometer Beckmann DU® 640	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	Phosphatbestimmung
Sterilwerkbank Glaire BSB 4, ICN Flow,	Eggenstein, Deutschland	Zellkulturexperimente
Stickstoffflasche	Linde GmbH	Extrusion
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Phosphatbestimmung, Öffnungskinetik, DC
Vakuum-Exsikkator	Nalgene, New York, USA	Lipidfilmherstellung
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA	Lipidfilmherstellung, Phosphatbestimmung, Öffnungskinetik
Waage, Precisa BJ6100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz	Pufferherstellung, Neutralisation, DC
Wärmebad, Pharmacia LKB-Multitemp II	Pharmacia, Freiburg, Deutschland	Extrusion
Zählkammer Neubauer Improved	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Deutschland	Zellkulturexperimente
Zentrifuge Labofuge 400 R	Haereus, Hanau, Deutschland	Zellkulturexperimente
Zentrifuge ZK 380	Hermle Labortechnik, Wehingen, Deutschland	DC
Zetasizer Nano series	Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien	Bestimmung der Größe, des PDI und des Zeta- Potentials der Liposomen

3.8 Software

Tabelle 8: verwendete Software

Software	Anwendung
Axion Vision, Zeiss	Bildverarbeitung
Citavi 4	Literaturverwaltung
Pubmed	Literaturrecherche
Word & Excel 2013	Text-/Datenverarbeitung
Zetasizer Nano series software	Bestimmung der Größe, des Zetapotentials und des PDIs der Liposomen

3.9 Hergestellte und verwendete TSL

Tabelle 9: Charakterisierung der hergestellten und verwendeten TSL

Chargennummer	Formulierung (mol/mol)	C _{Fluoreszenzfarbstoff} (mM)	pH-Wert	Größe (Z-average in nm)	PDI	ζ-Potential (mV)
21-04 C	DPPC/DSPC/DPPG ₂ /RhPE 50/20/30/0,64	5,3	7,2	146	0,07	20,8
21-04 C2	DPPC/DSPC/DPPG ₂ /RhPE 50/20/30/0,64	3,3	7,2	161	0,06	-22,2
21-05 C	DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /RhPE 90/10/4/0,64	3,4	7,2	114 118	0,11 0,13	-3,2
21-05 C2	DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /RhPE 90/10/4/0,64	2,0	7,2	119 126	0,09 0,15	-2,6 -2,7
21-10 F	DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50/20/30	6,9	7,4	142	0,07	-20,6
21-10 F2	DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50/20/30	7,8	7,4	122	0,08	-19,7

21-11 F	DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 90/10/4	6,9	7,4	126	0,11	0,2
21-11 F2	DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 90/10/4	7,8	7,4	87	0,49	-0,9
21-16 F	DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 90/10/4	15,6	7,4	119 123	0,06 0,07	-0,9 0,5
21-22 F	DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50/20/30	14,8	7,4	120 123	0,09 0,09	-28,1 -24,8
22-02 F	DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 90/10/4	15,1	7,4	116	0,08	-4,1
22-05 F	DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50/20/30	13,6	7,4	129	0,09	-21,8
22-06 F	DPPC	13,6	7,4	245	0,79	-0,1
22-07 F	DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 90/10/4	13,6	7,4	113	0,10	0,4
22-14 F	DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50/20/30	12,5	7,8	91,6	0,08	-25,9
22-15 F	DPPC	13,0	7,8	86,2	0,50	-1,81
22-16 F	DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 90/10/4	13,0	7,8	62,3	0,10	-2,76
22-17 F	DPPC	13,0	7,8	230	0,54	-1,53
22-19 F	DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50/20/30	13,0	7,8	76,6	0,14	-24,8
22-20 F	DPPC/DSPC/DPPG ₂ /RhPE 50/20/30/0,64	7,0	7,8	80,9	0,20	-25,4
27-23 F	DPPC/DSPC/DPPG ₂ /RhPE 50/20/30/0,64	13,0	7,8	123,4	0,10	-21,9

4 Methoden

4.1 Liposomenherstellung

Die verwendeten Liposomen wurden mittels der Lipidfilm- und Extrusionsmethode hergestellt (Hossann et al. 2007).

4.1.1 Lipidfilmherstellung

Die eingewogenen Lipide für die Liposomen der Formulierung DPPC/DSPC/DPPG₂ (Verhältnis in mol%: 50/20/30; DPPG₂-TSL) und DPPC 100mol% (DPPC-TSL) wurden in Chloroform, die der Formulierung DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (Verhältnis in mol%: 90/10/4; LTSL) in Chloroform und Methanol im Verhältnis 9:1 (vol:vol) gelöst. Für die Zugabe von Rh-PE (0,64mol%) wird Rh-PE in Chloroform gelöst.

Die Lipidmengen wurden in einen Glasrundkolben überführt und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer bei 40°C und 350mbar entfernt. Anschließend wurde der Lipidfilm bei 60°C zunächst für ≥ 20 Minuten bei 150mbar, nach Entfernen des Destillats für ≥ 90 Minuten bei 40mbar getrocknet, um Spuren des Lösungsmittels zu entfernen. Lichtgeschützt konnte der Lipidfilm mindestens eine Woche in einem Exsikkator unter Vakuum gelagert werden.

4.1.2 Hydratisierung

Die Bildung multilamellärer Liposomen erfolgte durch Zugabe des jeweiligen Puffers (siehe Kapitel 4.2) zum Lipidfilm über ≥ 30 Minuten im Rotationsverdampfer bei 60°C.

4.1.3 Extrusion

Um unilamelläre Vesikel herzustellen wurde nach der Hydratisierung die Dispersion in den 60°C heißen Extruder überführt. Es erfolgte eine N₂-Gasdruckextrusion über zwei 200nm Polycarbonatfilter in 10 Einzeldurchgängen bei 5-20bar. Während des Extrusionsvorgangs wurde die Phasenumwandlungstemperatur zur Vermeidung der Bildung unerwünschter Strukturen nicht unterschritten.

4.1.4 Säulenchromatographische Umpufferung

Die Umpufferung erfolgte über mit Glaswolle gestopfte Glaspasteurpipetten. Als Säulenmaterial wurde Sephadex[®] G50 bzw. G75 und als Elutionsmittel 0,9%ige NaCl-Lösung oder HN-Puffer pH 7,4 bzw. pH 7,8 verwendet (siehe Kapitel 4.2). Es wurde darauf geachtet, dass das Säulenmaterial zu keinem Zeitpunkt trocken lief. Nach Aufgeben der Dispersion wurde erneut mit dem verwendeten Elutionsmittel gespült. Sobald sich die Tropfen trübten, wurde die Liposomensuspension in Eppendorfgefäße aufgefangen, in ein Falconröhrchen überführt und gevortext. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

4.2 Substrateinschluss

In dieser Arbeit wurden die hydrophilen Substrate passiv eingeschlossen. Hierfür wurden die Substrate bei der Hydratisierung zugesetzt, so bildeten sich die Liposomenmembranen direkt um den Wirkstoff herum.

4.2.1 CF-Einschluss

Für den Einschluss des Fluoreszenzfarbstoffes CF wurde eine 100mM Stammlösung pH 7,2 bei der Hydratisierung verwendet. Die Extrusion und Säulenchromatographie erfolgten wie unter Kapitel 4.1.3 und 4.1.4 beschrieben. Als Elutionsmittel diente 0,9% NaCl.

4.2.2 FITC-Dextran-Einschluss

Für die Durchführung der Zellkulturexperimente wurde eine FITC-Dextran-Konzentration von 25mg/ml (0,8mM), für die Freisetzungsexperimente von 50mg/ml (1,3mM) festgelegt. Die Zielkonzentrationen wurden über eine Verdünnungsreihe (VR) ermittelt (siehe Abbildung 4). Das Lösen von FITC-Dextran erfolgte in HN-Puffer pH 7,4 bzw. pH 7,8.

Die Verwendung der unterschiedlichen Konzentrationen war notwendig, damit in den Freisetzungsexperimenten eine FITC-Dextran-Freisetzung aufgrund der Aufhebung des Quenchens durch Verdünnung im extraliposomalem Medium sichtbar wurde. Die Konzentration von FITC-Dextran in den Zellkulturexperimenten innerhalb der TSL

sollte im nicht-quencheden Bereich liegen, um die TSL mittels Fluoreszenzmikroskopie detektieren zu können.

Der Einschluss erfolgte in Korrelation zum CF-Einschluss passiv beim Hydratisieren eines nach Protokoll hergestellten Lipidfilms. Die Extrusion und Säulenchromatographie wurden analog Kapitel 4.1.3 und 4.1.4 durchgeführt. Die Säulenchromatographie erfolgte unter Verwendung des Säulenmaterials Sephadex G-75 und als Elutionsmittel HN-Puffer pH 7,4 bzw. 7,8.

4.3 Liposomencharakterisierung

Um eine einheitliche Qualität der TSL nachzuweisen, wurden nach Herstellung die im Folgenden erläuterten Untersuchungen durchgeführt:

4.3.1 Phosphatbestimmung

Die Bestimmung des Phospholipidgehalts beruht auf der von Eibl und Lands 1969 publizierten Methode. Hiernach korreliert der molare Phosphatgehalt direkt mit dem Phospholipidgehalt in einer Probe. Durch Überführen der Phospholipide mittels Schwefels und Perchlorsäure zu anorganischem Phosphat und durch Komplexbildung der Phosphatgruppen mit Molybdänverbindungen, kann so indirekt der Phosphatgehalt im Vergleich zu einem Standard photometrisch ermittelt werden.

4.3.2 Dünnschichtchromatographie

Durch ein physikalisch-chemisches Trennverfahren wurde durch Zugabe von Lösungsmittel (Methanol, Chloroform) in verschiedenem Verhältnis (1:1; 1:3; 0:1) und anschließender Zentrifugation (zehnminütig, 4200r/min) nacheinander die organische Phase inkl. Phospholipiden isoliert. Nach Entfernung des Lösungsmittels mittels N₂, werden die Lipide mittels 100µl Methanol:Chloroform (1:9) gelöst. Nach Auftragen der gelösten Lipide neben einen Standard auf eine DC-Kieselgel-60-Platte, werden die Lipide durch Kapillarkräfte über die Zeit in einer mit Laufmittel equilibrierten Kammer getrennt. Nach Anfärben der Lipide durch Molybdänlösung wurde mit Hilfe eines Computerprogramms die Anteile der einzelnen Phospholipide densitometrisch bestimmt. Dies diente der Sicherstellung, dass das angestrebte Phospholipidverhältnis

eingehalten wurde und keine unerwünschten Lysolipide vorhanden waren. (Hossann et al. 2007)

4.3.3 Zeta-Potential

Mit Hilfe des Zetasizers Nano von Malvern Instruments wurden sowohl das Zeta-Potential (ζ -Potential, Oberflächenladung), die Größe sowie der Polydispersionsindex (PDI) der TSL bestimmt.

Das ζ -Potential beschreibt das elektrische Potential interpartikularer Abstoßungskräfte in einem Medium. Das Zetapotential wurde in Verdünnung mit 0,9% NaCl-Lösung bestimmt. Umso neutraler das Zeta-Potential ist, desto wahrscheinlicher ist eine Aggregation und desto langsamer bewegen sich Partikel bei einer definierten angelegten Spannung. (Bergmann et al. 2006)

4.3.4 Bestimmung der Liposomengröße und des Polydispersionsindex

In der Messkammer des Zetasizers Nano von Malvern Instruments wurden die mit bidestilliertem Wasser verdünnten Liposomen (1:50) mit einem Laser bestrahlt. Durch das Interferenzmuster, das durch die Unterbrechung des Lichtes durch die Partikelbewegung im Sinne der Brown'schen Molekularbewegung auf einem Detektorfenster entsteht, kann die Liposomengröße und der PDI berechnet werden.

Der PDI liegt zwischen 0 und 1. Je größer der Wert ist desto breiter ist die Größenverteilung (Keck und Müller 2009).

4.4 Temperaturabhängige Öffnungsprofile

Mit Hilfe eines Spektrofluorometers wurde die temperaturabhängige Freisetzung von CF aus TSL bestimmt. Hierfür wurde eine mehrfache Reihenbestimmung der Fluoreszenzintensität von TSL in Verdünnung mit 0,9% NaCl bzw. mit fetalem Kalbsserum („fetal calf serum“, FCS) nach Erwärmung auf verschiedene Temperaturen (20°C=RT, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) durchgeführt. Hierfür wurden 20 μ l der jeweiligen Verdünnungen bei den entsprechenden Temperaturen für 5 Minuten bzw. für 60 Minuten bei 37°C und 42°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei der vollständigen CF-Freisetzung diente der „Tritonwert“. Hierfür wurde eine TSL-NaCl-Lösung mit 10% Triton-X 100 versetzt und für 15 Minuten bei 45°C im Thermomixer inkubiert. Dies gewährleistet eine vollständige CF-Freisetzung durch Zerstörung der TSL.

Zur Beendigung der Freisetzung wurde nach der entsprechenden Zeit 1000µl gekühltes NaCl-Tris-Gemisch zu den TSL-Verdünnungen gegeben.

Durch Messung der Fluoreszenzintensität nach Kühlung mit Hilfe des Spektrofluorometers ($\lambda_{Em}=516nm$; $\lambda_{Ex}=492nm$) konnte die prozentuale CF-Freisetzung bei der jeweiligen Temperatur bestimmt werden:

$$X_{Temp} = \frac{(\bar{I}_{Temp} - \bar{I}_{RT}) \times 100}{\bar{I}_{Triton} - \bar{I}_{RT}}$$

\bar{I}_{Temp} = Mittelwert der Fluoreszenzintensität von CF der einzelnen Temperaturen (37°C – 45°C)

\bar{I}_{RT} = Mittelwert der Fluoreszenzintensität von CF bei RT

\bar{I}_{Triton} = Mittelwert der "Tritonwerte"

X_{Temp} = prozentuale Freisetzung von CF bei der jeweiligen Temperatur (37°C – 45°C)

4.5 Entwicklung der in vitro Öffnungskinetik von TSL

Durch das Quenching des Fluoreszenzsignals im Inneren der TSL kann man die temperatur- und zeitabhängige Freisetzung durch Intensitätszunahme im Spektrofluorometer messen. Die anzulegende Verstärkung musste - wie auch für die temperaturabhängigen Öffnungsprofile - für jede TSL-Charge neu bestimmt werden, da sich die Chargen in ihrer maximalen Fluoreszenzintensität unterschieden.

Als Verdünnungsmedium wurde zunächst HN-Puffer pH 7,4 verwendet. Um die Fluoreszenzeigenschaften von FITC-Dextran optimal zu nutzen, wurde im Verlauf HN-Puffer pH 7,8 herangezogen. Bei pH 7,8 ist bei gleicher Verdünnung und angelegter Spannung das Intensitätsmaximum stärker ausgeprägt. Um das Risiko zu vermindern, dass das freigesetzte FITC-Dextran im vorhandenen Grundrauschen untergeht, wurde im Verlauf HN-Puffer pH 7,8 verwendet.

Der Heizblock wurde vor Beginn auf die in der Küvette zu erreichende Zieltemperatur ($T_z=30^\circ C$, $37^\circ C$ oder $45^\circ C$) ausgehend von $4^\circ C$ eingestellt. Einzelne Liposomen-

Chargen wurden zusätzlich noch auf die Temperaturen 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C und 44°C erhitzt. Eine Erwärmung auf nur 42°C im Vergleich zu 45°C zeigte keine abweichenden Kurvenverläufe.

Außerhalb des Geräts wurde in die Einmal-Küvetten jeweils ein Rührstäbchen und zügig 20µl der jeweiligen TSL-Charge je nach Grundfluoreszenz zusammen mit 3000µl des Puffers gegeben. Alle Lösungen waren dabei 4°C kühl. Sofort wurden die Küvetten in das Messgerät gestellt und die Messung begonnen. Alle 20 Sekunden wurde pro Küvetten die Fluoreszenzintensität gemessen. Im Messgerät konnte eine Vierfachbestimmung pro Durchgang durchgeführt werden. Der Messzeitraum betrug mindestens 30 Minuten.

2-5 Minuten vor dem Endpunkt der Messung wurden pro Küvette 20 µl des Detergenz 10% Triton X-100 pipettiert. Dies diente als Kontrollwert und repräsentierte die 100%ige FITC-Dextran-Freisetzung.

Vor einem erneuten Durchlauf wurden die Rührstäbchen gewaschen und mit Aceton getrocknet. Die so ermittelten Daten wurden in ein Excel-Diagramm übertragen und wie in den Kapiteln 5.2 bis 5.7 beschrieben qualitativ ausgewertet.

4.6 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden für die Zellkulturexperimente die permanente Zelllinie BN175 eines Weichteilsarkoms der Ratte verwendet (Marquet et al. 1983). Die Zellen wachsen adhärent, die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, einer Atmosphäre von 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Jeder Arbeitsschritt erfolgte unter der Sterilwerkbank.

4.6.1 Kultivierung

Das in dieser Arbeit verwendete Medium war RPMI 1640 mit NaHCO₃ gepuffert und mit stabilem Glutamin versetzt. Zusätzlich wurde dem Medium 10% FCS, zudem prophylaktisch je 100U/ml Penicillin und Streptomycin zugeführt.

4.6.2 Passagieren der Zellen

Wenn die Zellen zu ca. 80% konfluent waren, wurden sie passagiert. Hierbei wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt, die Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung („phosphate buffered saline“, PBS) gewaschen, anschließend Trypsin-EDTA-Lösung (1:9, vol:vol) zugegeben und bis zum Ablösen der Zellen von der Oberfläche im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde mit Medium abgestoppt. Die Dispersion wurde in ein Falconröhrchen überführt und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Zuletzt wurde ein Teil der Zellsuspension in eine mit Medium gefüllte Zellkulturflasche übertragen und inkubiert.

4.6.3 Zellzahlbestimmung

Mittels der Zählkammer „Neubauer improved“ kann eine gewünschte Zellzahl/ml bestimmt werden.

Hierfür wurde ein Tropfen Zellsuspension auf die Kante der Zählkammer aufgebracht. Über Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit in die Zählkammer gesaugt. Im Lichtmikroskop wurde anschließend die Zellen in den Eckquadranten in festgelegter Reihenfolge gezählt. Da die Neubauer Zählkammer über ein definiertes Volumen von 0,1µl verfügt, konnte so die Zellzahl pro ml der Zellsuspension berechnet werden:

$$\text{Gezählte Zellzahl} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

4.6.4 Einfrieren/Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurde mit den Zellen zuerst wie beim Passagieren verfahren. Nach der Zentrifugation wurden sie gezählt und die Zielmenge in Einfriermedium (FCS/DMSO, 9:1, vol:vol) resuspendiert. Die Zielzellzahl pro Kryoröhrchen lag bei $1,5 \times 10^6$ pro ml Einfriermedium. Für die ersten 24h wurden die Kryoröhrchen im Kryokontainer bei -80°C gelagert. Danach erfolgte die Langzeitlagerung bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 36°C aufgetaut und in ein Falconröhrchen mit Medium überführt. Die Zellsuspension wurde in eine mit Medium befüllte Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank inkubiert.

4.6.5 Mykoplasmentest

Zum Ausschluss einer latenten Mykoplasmen-Kontamination wurde regelmäßig ein entsprechender Test durchgeführt. Hierfür wurde eine definierte Zellzahl auf einer Petrischale ausgesät und für 24-28h inkubiert. Nach Anwachsen der Zellen wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums und zweimaliger Waschung mit PBS-Puffer durch DMSO fixiert. Anschließend wurden sie mit 5µl 4'6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Stammlösung und 5ml McIlvaines Puffer 1:1000 angefärbt. Nach einer zehnmütigen Einwirkzeit wurden die Zellen unter fließendem Wasser für 30 Minuten gewaschen. Unter einem Fluoreszenzmikroskop mit DAPI-Filter wäre eine Kontamination mit Mykoplasmen dadurch aufgefallen, dass neben dem Zellkern das Zytoplasma ebenfalls angefärbt worden wäre.

4.7 Mikroskopieren

4.7.1 Auflichtfluoreszenzmikroskopie

Durch austauschbare Filter des Fluoreszenzmikroskops können verschiedene Spektralbereiche angeregt bzw. detektiert werden. So können nacheinander unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe in einer Probe nachgewiesen werden. Voraussetzung hierfür ist, dass sich die Exzitations- und Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe nicht überschneiden.

4.7.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop handelt es sich um ein Lichtmikroskop, bei dem durch Verwendung eines Lasers und einer Lochblende jeweils nur ein kleiner Bruchteil des zu betrachtenden Präparates erfasst wird. So sind die Fluoreszenzsignale einer bestimmten Schicht zuzuordnen. Durch Zusammensetzen der einzelnen Informationen mittels Computer ist die Erstellung eines Gesamtbildes mit einer hohen Ortsauflösung sowie eines dreidimensionalen Modells möglich.

4.7.3 Liposomenhaftversuch

4.7.3.1 Versuchsentwicklung und Aufbau

Um Hinweise darauf zu erlangen, ob die TSL in Interaktion mit Zellen in Zellkultur treten, wurde der im Folgenden beschriebene Versuchsaufbau verwendet:

Zur Detektion der TSL-Membran wurden TSL mit Rh-PE und zur Markierung des Vesikelinneren mit CF beladene TSL hergestellt. Die Zellgrenzen wurden in diesem Versuch durch Durchlichtaufnahmen ermittelt.

Die Zellen wurden für eine Stunde mit den L_{DPPG_2} -TSL bzw. L_{LTSL} im Brutschrank inkubiert (vgl. Tabelle 10). Die hierbei verwendeten TSL waren mit Rh-PE und CF beladen. Es wurden TSL-Verdünnungen von 1,7mM in Medium verwendet. Die Konzentration wurde zuvor in einer VR ermittelt.

Tabelle 10: verwendete TSL-Lösungen im TSL-Anhaftungsversuch

L_{DPPG_2} -TSL:	9.600µl Medium	+	400µl 21-04 C ($DPPG_2$ -TSL/Rh-PE)
L_{LTSL} :	9.500µl Medium	+	500µl 21-05 C (LTSL/Rh-PE)

Der Versuch umfasste drei Tage. Einen Tag vor Beginn wurden 10.000 Zellen pro 100µl Medium pro Well in 96-Wellplatten (96-WP) ausgesät und anschließend für 24h inkubiert.

An Tag 1 wurde das Medium entfernt und eine zweimalige Waschung mit PBS-Puffer durchgeführt. Im Anschluss wurden die TSL-Lösungen mit 100µl pro Well (siehe Tabelle 10) aufgebracht. Es folgte eine einstündige Inkubation im Brutschrank. Nach Entfernung der Lösungen und erneutem zweimaligen Waschen mittels PBS wurden die Zellen unter dem Rhodamin- bzw. dem CF-Filter des Fluoreszenz-Lichtmikroskops mikroskopiert, fotografiert und die Ergebnisse protokolliert. Es folgten zwei weitere Inkubationen für 24h bzw. 48h mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie mit Dokumentation.

4.7.4 TSL-Endozytose-Versuch

4.7.4.1 Färbemodell

Um eine Aufnahme von intakten Liposomen in Tumorzellen zu untersuchen, wurden DPPG₂-TSL mit Rh-PE und mit FITC-Dextran beladen (Rh-PE/FITC-Dextran-TSL). Intakte Liposomen würden eine ko-lokalisierte Fluoreszenz von Rh-PE und FITC-Dextran aufweisen, da diese TSL in den untersuchten Öffnungskinetiken keine sichtbare Freisetzung bei 37°C zeigten.

Tabelle 11: Fluoreszenzfarbstoffe und ihr angefärbtes Kompartiment

Fluoreszenzfarbstoff	Kompartiment
Liposomales Rh-PE	TSL-Membran
Liposomales FITC-Dextran	Vesikelinnere
DAPI	Zellkern
DiD	Zellmembran

Das Anfärben der Zellmembran dienten dazu den Extra- vom Intrazellularraum abzugrenzen und um ein mögliches Anheften der TSL dokumentieren zu können.

4.7.4.2 Versuchsaufbau und Durchführung

Die Versuchsdurchführung umfasste zwei Tage. 24h vor Beginn wurden 10.000 Zellen pro 300µl Medium je Chamberslide ausgesät und bei 37°C inkubiert.

An Tag 1 wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und 300µl L_{Rh-PE/FITC-Dextran-TSL} pro Kammer zugegeben. Es folgte eine Inkubation der Zellen über 18h bei 37°C. Nach Ablauf der 18h wurde die L_{Rh-PE/FITC-Dextran-TSL} entfernt und die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen.

Tabelle 12: verwendete Färbelösungen im TSL-Endozytose-Versuch

L_{Rh-PE/FITC-Dextran-TSL}:	400µl Rh-PE/FITC-Dextran-TSL	+ 10ml Medium	
L_{Färbung}:	20µl DAPI	+ 300µl V _{DID}	+ 10ml Medium
V_{DID}:	250µl DID	+ 50µl DMSO	+ 5ml PBS

Anschließend wurde L_{Färbung} auf die Zellen gegeben und für 30min inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mittels PBS und Zugabe von 300µl Medium je Kammer wurden die Zellen unter dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop untersucht und die Ergebnisse dokumentiert.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse von FITC-Dextran

Das Pulver wurde in HN-Puffer gelöst und anschließend über einen Filter mit Porengröße 200nm gefiltert. FITC-Dextran wird konzentrationsabhängig gequencht (siehe Abbildung 4).

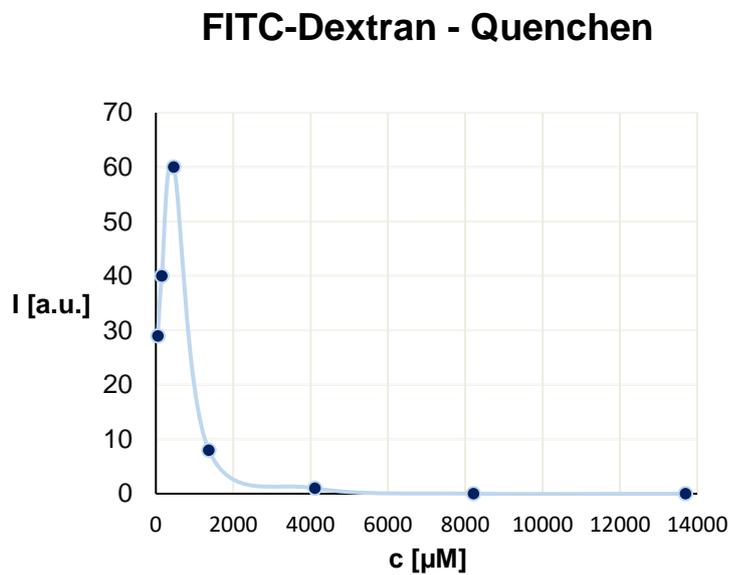


Abbildung 4: Quenchen von FITC-Dextran in HN-Puffer

Es wurde eine Größenbestimmung analog Abschnitt 4.3.4 durchgeführt, hier zeigten sich zwei Peaks (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Größenverteilung von FITC-Dextran in HN-Puffer pH 7,8

	Größe (nm)	Intensität (%)	Streubreite (nm)
Peak 1	759,9	61,7	415,2
Peak 2	4,247	38,3	1,175

5.2 Temperaturentwicklung innerhalb der Küvetten

Für die Auswertung und Sicherstellung der Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurde die Temperaturentwicklung in den Küvetten bei konstanten Volumina und identischer Rührgeschwindigkeit gemessen. Temperaturmessungen innerhalb der einzelnen Küvetten zeigten, dass ausgehend von 4°C kalter Flüssigkeit die T_z von 45°C nach ca. zehn Minuten erreicht und anschließend beibehalten wurde. In der zweiten Minute wurden 37°C erreicht, nach drei Minuten die 40°C überschritten. Zwischen den Minuten 3 bis 5 lagen die erreichten Temperaturen zwischen 40-43°C.

Die einzelnen Küvetten zeigten in den verschiedenen Messungen geringe Abweichungen im Vergleich untereinander und mit weiteren Messungen in derselben Küvette. Eine genauere Temperatur-Zeit-Korrelation ist daher nicht möglich.

5.3 Einflüsse auf das Fluoreszenzverhalten von CF und FITC-Dextran

Da eine Temperaturabhängigkeit von CF und FITC-Dextran bekannt ist, wurde das Verhalten der Fluoreszenzintensität beider Fluoreszenzfarbstoffe in HN-Puffer pH 7,8 bei Erwärmung von 4 auf 45°C untersucht. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse hiervon dargestellt. Es zeigt sich ein Abfall beider Fluoreszenzintensitäten in der Erwärmungsphase. Nach Erreichen der 45°C bleibt die jeweilige Intensität unverändert.

Das Erwärmen der Fluoreszenzfarbstoffe in HN-Puffer pH 7,4 zeigte denselben Intensitätsverlauf (Daten nicht gezeigt).

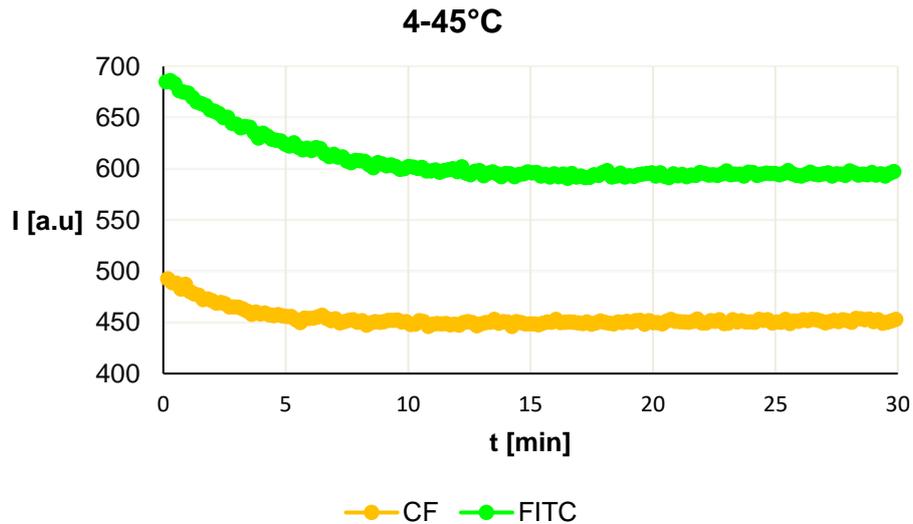


Abbildung 5: Fluoreszenzintensität von CF bzw. FITC-Dextran bei $T_z=45^\circ\text{C}$ in Abhängigkeit der Zeit

5.4 Einflüsse von Proteinen auf die Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran

In Abbildung 6 ist exemplarisch der Einfluss von IgG und HSA auf das Fluoreszenzverhalten von FITC-Dextran bei der Erwärmung von 4 auf 45°C dargestellt. Dies soll mögliche Interferenzen zwischen FITC-Dextran und HSA bzw. IgG untersuchen.

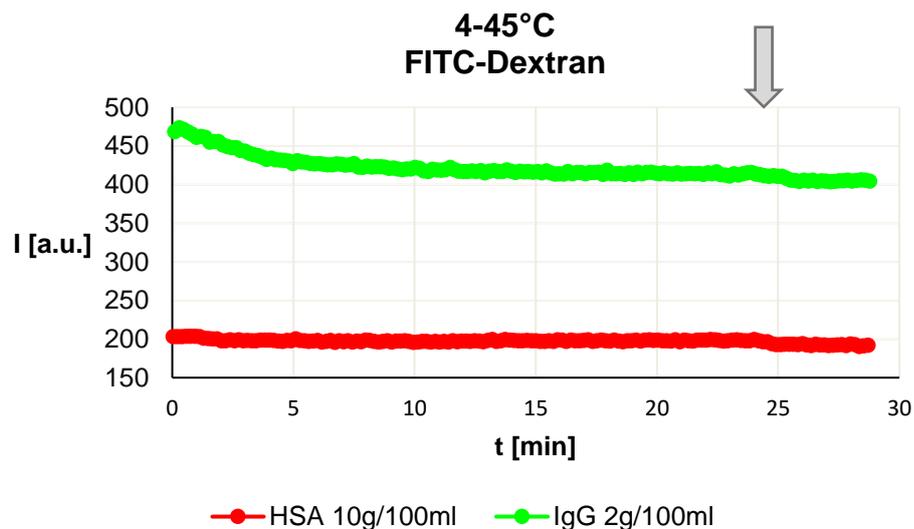


Abbildung 6: Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran in HSA bzw. IgG bei $T_z=45^\circ$ in Abh. der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Betrachtet man nun die Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran in HSA-Verdünnung, zeigt sich keine Temperaturabhängigkeit. Die Tritonzugabe führt erneut durch die Verdünnung zu einem dezenten Absinken der Fluoreszenzintensität.

Der Kurvenverlauf der Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran in IgG-Verdünnung weicht nicht von dem in HN-Puffer ab. Die Fluoreszenzintensität sinkt weiterhin in den ersten zehn Minuten temperaturbedingt ab. Die probatorische Zugabe von Triton (vgl. Pfeil in Abbildung 6) löst eine minimale Intensitätsabnahme durch Verdünnung aus.

5.5 Temperaturabhängige Öffnungsprofile von CF-beladenen TSL

In folgendem Abschnitt werden die Ergebnisse der temperaturabhängigen Öffnungsprofile von mit CF-beladene DPPG₂-TSL und LTSL beschrieben. Dies dient zur Etablierung der Freisetzungsrates der beiden TSL-Formulierungen des kleinen CFs und zur Verifizierung der T_m . In der Diskussion bildet dies zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.6.4 die Grundlage zum Vergleich der unterschiedlichen Freisetzungsmechanismen der in dieser Arbeit betrachteten TSL.

Derselbe Versuchsaufbau wurde mit FITC-Dextran-beladenen TSL durchgeführt, lieferte aber keine einheitlichen und verwertbaren Ergebnisse. Die Tritonwerte als Referenzwerte lagen bei dieser Versuchsdurchführung mehrfach unter den Freisetzungswerten. Auch die Freisetzungswerte der einzelnen Temperaturen unterlagen einer großen Schwankungsbreite und ließen keinen Trend erkennen.

Das in Abbildung 7 exemplarisch dargestellte Temperaturöffnungsprofil von DPPG₂-TSL zeigt, dass die maximale CF-Freisetzung zwischen 41-45°C liegt und die Freisetzung in FCS über 5 Minuten nahezu 90% beträgt, in 0,9% NaCl dagegen knapp unter 20%. Dies deckt sich mit bereits bekannten Daten für andere TSL-Formulierungen (vgl. Gaber et al. 1995; Hosokawa et al. 2003) und DPPG₂-TSL (Lindner et al. 2004).

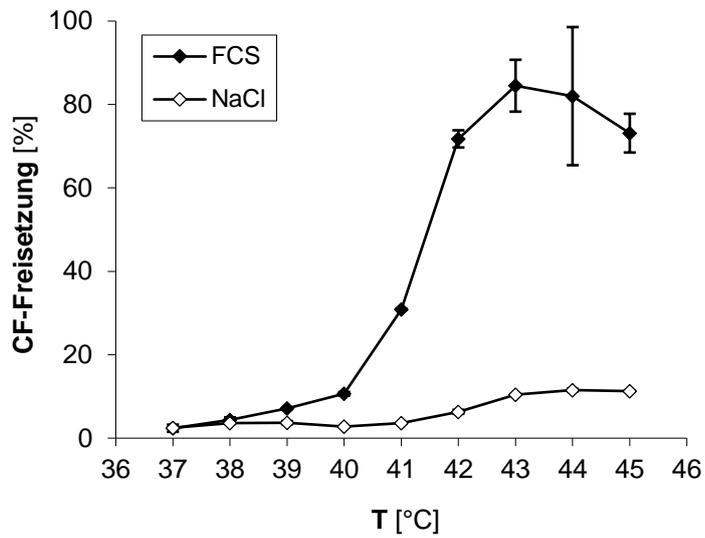


Abbildung 7: Prozentuale Freisetzung von CF aus DPPG₂-TSL in Abhängigkeit der Temperatur in FCS bzw. 0,9% NaCl

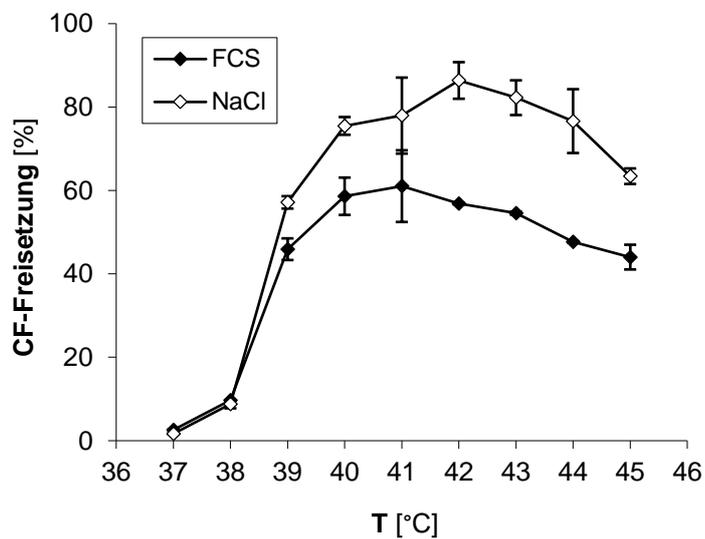


Abbildung 8: Prozentuale Freisetzung von CF aus LTSL in Abhängigkeit der Temperatur in FCS bzw. 0,9% NaCl

5.6 In vitro Öffnungskinetiken

Kenntnisse über die Kurvenverläufe der TSL-Formulierungen bei Erwärmung sind notwendig, um eine temperaturabhängige Freisetzung von FITC-Dextran und äußere Einflüsse hierauf untersuchen zu können. So muss zur Erfüllung der Temperaturabhängigkeit sichergestellt werden, dass bei Temperaturen unterhalb der T_m keine Freisetzung stattfindet. Um Einflüsse von Zusätzen zum Puffer prüfen zu können, wurden Öffnungskinetiken mit T_z von 30°C, 37°C und 45°C durchgeführt. Wobei $T_z=30^\circ\text{C}$ als Negativkontrolle dienen soll, da eine temperaturabhängige Freisetzung auch durch Zusätze nicht auftreten sollte. $T_z=45^\circ\text{C}$ wurde gewählt, damit im Falle eines als FITC-Dextran-Freisetzung zu wertenden Fluoreszenzanstiegs dessen Detektion auch bei ggf. bestehenden Schwankungen der Temperatur in den Küvetten gewährleistet ist. $T_z=37^\circ\text{C}$ soll als Grundlage zur Überprüfung der Einflüsse von Pufferzusätzen auf die FITC-Dextran-Freisetzung dienen. Hierdurch kann festgestellt werden, ob die Zugabe von Zusätzen die T_m heruntersetzt.

5.6.1 DPPG₂-TSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer

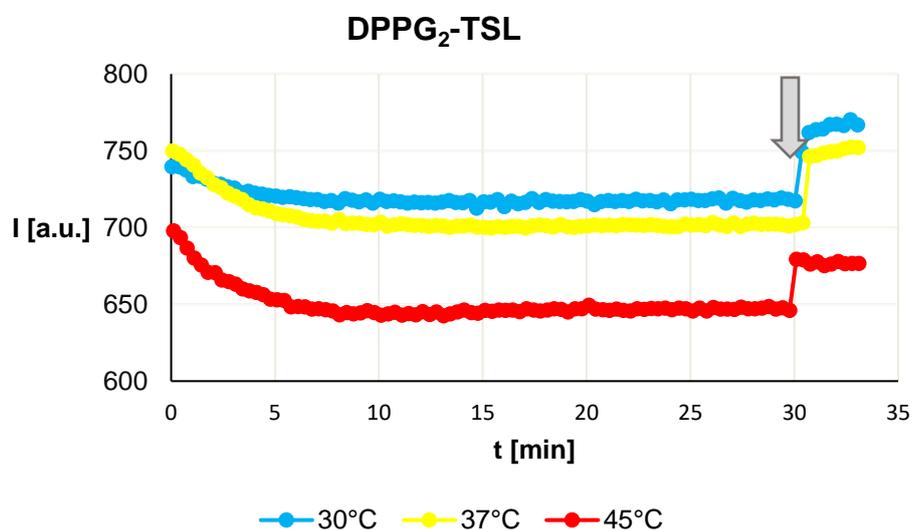


Abbildung 9: Intensitätsverlaufskurven der DPPG₂-TSL in HN-Puffer bei unterschiedlichen T_z (30°C, 37°C, 45°C) in Abhängigkeit der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Bei der Erwärmung von mit FITC-Dextran beladenen DPPG₂-TSL von 4°C auf variable T_z (30°C, 37°C, 45°C) in Abhängigkeit der Zeit (siehe Abbildung 9), können keine Unterschiede im Vergleich zu der Verlaufskurve von reinem FITC-Dextran in HN-Puffer (vgl. Abbildung 5) festgestellt werden. So sinkt in den ersten Minuten die Fluoreszenzintensität temperaturbedingt ab und bleibt nach Erreichen der T_z konstant. Die Zugabe von Triton löst jeweils eine Freisetzung aus.

5.6.2 LTSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer

Beim Erhitzen der LTSL auf unterschiedliche T_z zeigten sich Unterschiede in den FITC-Dextran-Freisetzungsverläufen (vgl. Abbildung 10). Im Folgenden werden zunächst nur die Kurvenverläufe nach der zweiten Minute betrachtet:

Für die T_z von 30°C und 37°C gleichen die Kurvenverläufe denen von reinem FITC-Dextran bei Erwärmung auf diese Temperaturen. Hier ergaben sich keine Hinweise auf eine Freisetzung (siehe Abbildung 10).

Bei der T_z von 45°C zeigt sich eine Fluoreszenzintensitätszunahme zwischen der 6. und 8. Minute.

Dieser Kurvenverlauf konnte für T_z zwischen 39°C und 45°C reproduziert werden. Bei zwei Chargen der LTSL (22-07 F; 22-11 F) fiel außerdem auf, dass die Tritonzugabe nur noch eine vergleichsweise geringe Intensitätssteigerung hervorrief.

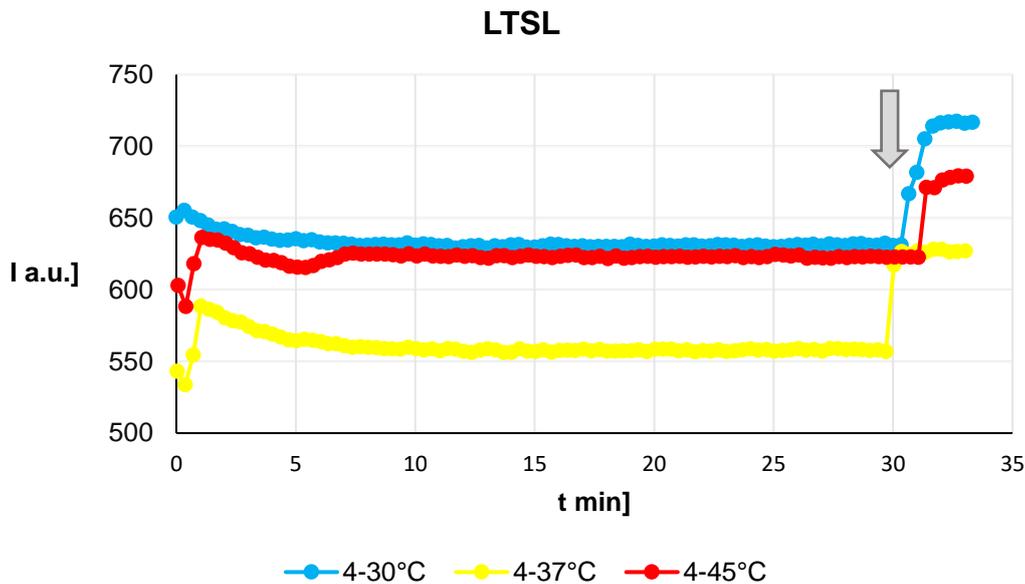


Abbildung 10: Intensitätsverlaufskurven der LTSL in HN-Puffer bei unterschiedlichen T_z (30°C, 37°C, 45°C) in Abhängigkeit der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Im folgenden Abschnitt werden die ersten beiden Minuten des Kurvenverlaufs näher betrachtet. Unabhängig von der eingestellten T_z trat nach >24h nach Herstellung während den ersten beiden Minuten eine reproduzierbare Intensitätszunahme auf. Dieses Phänomen trat in allen Experimenten der in vitro Öffnungskinetik mit FITC-Dextran unabhängig der TSL-Formulierung auf. Nach Auftreten dieses „frühen Peaks“ zeigten sich keine Abweichungen in erneut durchgeführten Größenbestimmungen oder DC-Ergebnissen außerhalb der normalen Schwankungsbreite.

Um Lagerungseinflüsse auf den „frühen Peak“ zu untersuchen, wurde direkt nach Herstellung von LTSL Öffnungskinetiken durchgeführt und ein weiterer Teil der hergestellten TSL bei -20°C eingefroren. 48h später wurden Öffnungskinetiken mit den zuvor eingefrorenen TSL durchgeführt. Es wurde dieselbe TSL-Verdünnung gewählt.

In Abbildung 11 wird das Fluoreszenzintensitätsverhalten der frisch hergestellten und der aufgetauten TSL bei einer T_z von 45°C gegenübergestellt. Bei beiden Kinetiken findet eine Intensitätszunahme nach 4 Minuten statt, während bei den aufgetauten TSL zusätzlich eine Steigerung innerhalb der ersten beiden Minuten zu verzeichnen ist.

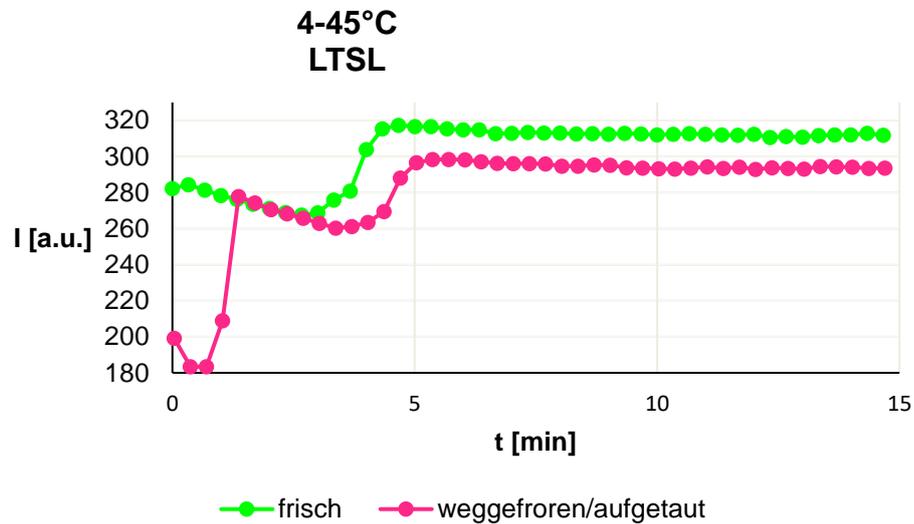


Abbildung 11: „früher Peak“: Intensitätsverlaufskurven der LTSL bei $T_z=45^\circ\text{C}$ in Abh. der Zeit frisch nach Herstellung bzw. nach dem Auftauen
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

5.6.3 DPPC-TSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer

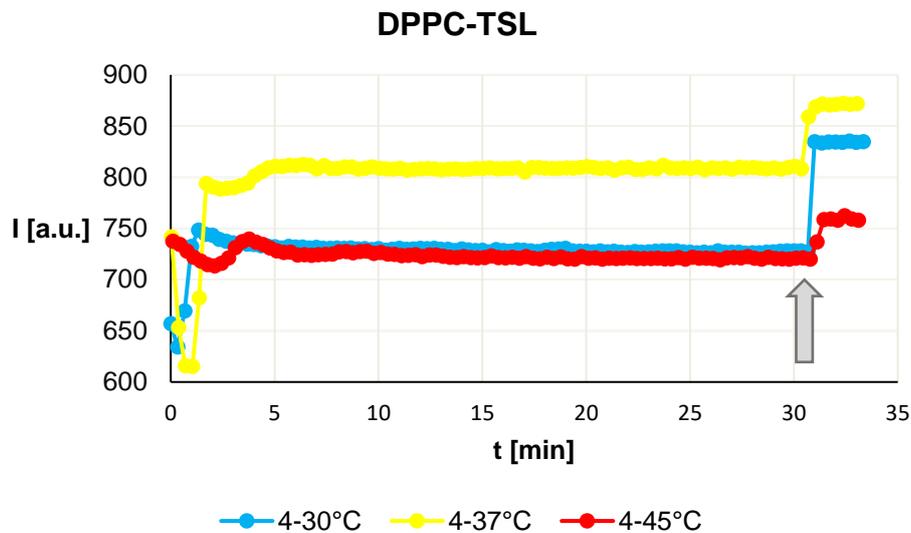


Abbildung 12: Intensitätsverlaufskurven von DPPC-TSL in HN-Puffer bei T_z (30°C, 37°C, 45°C) in Abhängigkeit der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Die Erwärmung von DPPC-TSL sollte als „Negativkontrolle“ des gesamten Versuchsaufbaus dienen, da hier keine Porenbildung zu erwarten ist. Hierbei ergaben sich stark inhomogene Ergebnisse:

Temperaturunabhängig trat in den Öffnungskinetiken der oben beschriebene frühe Peak auf (siehe Abschnitt 6.1.7). Hiervon abgesehen ließ die Intensität zunächst bei allen eingestellten Temperaturen in einer, im Vergleich zur Erwärmung reinen FITC-Dextran in HN-Puffer, flachen Kurve nach.

Andererseits zeigte sich ein Fluoreszenzintensitätsanstieg zwischen der 3.-5. Minute (vgl. Abbildung 12, exemplarisch bei T_z 37°C und 45°C). Vergleichbare Verläufe konnten schon bei einer T_z von 30°C festgehalten werden. Allerdings ergaben sich keine erkennbaren oder reproduzierbaren Muster, zu welchem Zeitpunkt oder bei welchen äußeren Bedingungen (Alter der TSL, eingestellte T_z) die Intensitätszunahme stattfand.

Auffällig war eine starke Größenvarianz bei der Größenanalyse via Intensitätsprofil der DPPC-TSL:

Tabelle 14: Größenanalyse von mit FITC-Dextran beladenen DPPC-TSL; Charge 22-15F

	Größe (r.nm)	Intensität (%)	Streubreite (r.nm)
Peak 1	66,64	79,3	24,25
Peak 2	416,1	18,4	118,4
Peak 3	2708	2,4	148,6

Bei Analyse der Größenverteilung DPPG₂-TSL und LTSL zeigte sich hingegen nur ein Peak. Der PDI ist im Mittel bei den DPPC-TSL deutlich größer (0,61) als bei den zwei anderen verwendeten Formulierungen (je 0,1) (vgl. Tabelle 9).

5.6.4 Vergleich der CF- und FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer

Das kleine CF wird aus DPPG₂-TSL und LTSL freigesetzt (vgl. Kapitel 5.5). Die CF-Freisetzung über die Zeit bei Erwärmung soll als Positivkontrolle zu der Freisetzung von FITC-Dextran dienen. Im folgenden Abschnitt werden die Intensitätsverläufe von mit CF-beladenen bzw. FITC-Dextran-beladenen DPPG₂-TSL und LTSL während der Erwärmung von 4°C auf 45°C verglichen. HN-Puffer pH 7,4 diente als Puffer. Dies ist in einem Versuchsaufbau möglich, da beide Fluoreszenzfarbstoffe annähernd dieselben Emissions- und Exzitationswellen besitzen (vgl. Tabelle 2).

5.6.4.1 Vergleich der CF- und FITC-Dextran-Freisetzung aus LTSL

In Abbildung 13 ist die Erwärmung von mit FITC-Dextran bzw. mit CF beladenen LTSL von 4 auf 45°C dargestellt. Die Fluoreszenzintensität sinkt bei mit FITC-Dextran beladenen LTSL temperaturbedingt in den ersten Minuten ab. In der dritten bis vierten Minute steigt die Intensität an ($\Delta I=12$ a.u., $I_{\min}=134$ a.u., $I_{\max}=146$ a.u.). Hiernach sinkt sie minimal bis zur 10. Minute ab. Bis zur Detergenzienzugabe steigt die Intensität nach Erreichen der T_z allenfalls minimal an ($\Delta I=2$ a.u.). Nach Tritonzugabe nimmt die Fluoreszenzintensität abschließend erneut sprunghaft zu. Bei der in Abbildung 13 angelegten Verstärkung lässt sich dies nicht deutlich zeigen, daher wird an dieser Stelle auf Abbildung 10 verwiesen.

Insgesamt handelt es sich hierbei um geringe Veränderungen.

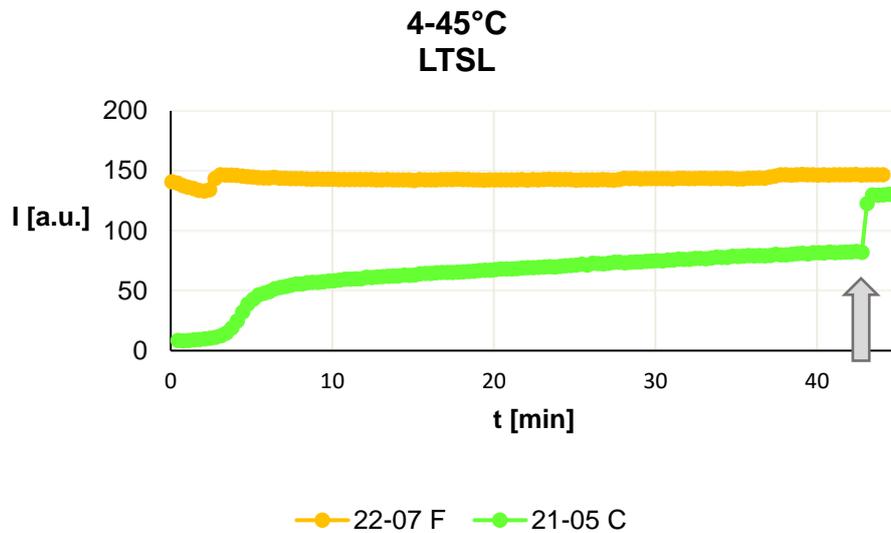


Abbildung 13: Intensitätsverlaufskurven von LTSL beladen mit FITC-Dextran (22-07 F) bzw. CF (21-05 C) bei $T_z=45^\circ\text{C}$ in Abhängigkeit der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Bei Erwärmung von mit CF-beladenen LTSL lässt sich kein temperaturbedingter Abfall erkennen. Im Gegensatz zu dem sprunghaften Intensitätsanstieg der FITC-Dextran-Freisetzung findet ab der 2. Minute eine andauernde CF-Freisetzung statt, deren Maximum zwischen der 3. und 5. Minute liegt und nach der Tritonzugabe endet.

5.6.4.2 Vergleich der CF- und FITC-Dextran-Freisetzung aus DPPG₂-TSL

In folgendem werden mit CF bzw. FITC-Dextran beladene DPPG₂-TSL bei Erwärmung von 4 auf 45°C betrachtet.

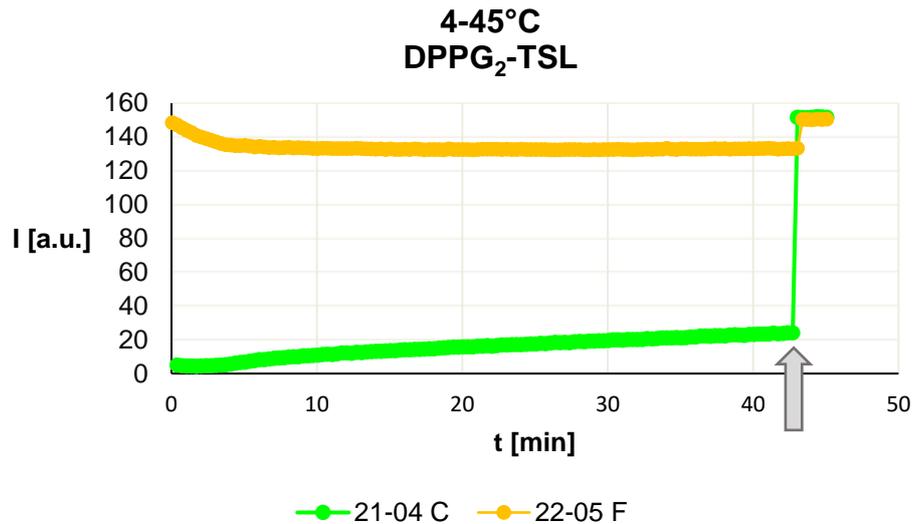


Abbildung 14: Intensitätsverlaufskurven von DPPG₂-TSL beladen mit CF (21-04 C) bzw. FITC-Dextran (22-05 F) bei T_Z=45°C in Abhängigkeit der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Bei der in Abbildung 14 dargestellten Erwärmung von mit CF beladenen DPPG₂-TSL, zeigt sich eine andauernde Fluoreszenzintensitätszunahme ab der 3. Minute bis zur Tritonzugabe. Dieser Anstieg fällt im Vergleich zu der CF-Freisetzung aus LTSL deutlich geringer aus. Der größte Teil der CF-Freisetzung aus DPPG₂-TSL findet durch die Detergenzienzugabe statt.

Die Fluoreszenzintensität nimmt bei Erwärmung von mit FITC-Dextran beladenen DPPG₂-TSL in den ersten 8 Minuten temperaturbedingt ab und bleibt anschließend bis zur Tritonzugabe in Minute 42 konstant.

5.7 In vitro Öffnungskinetiken von FITC-Dextran-beladenen TSL in verschiedenen Puffern

Um weitere Einflussgrößen auf die Freisetzung in vitro nachzuvollziehen, wurden Zusätze den TSL-Verdünnungen beigefügt. So könnte die Zugabe von Mizellenbildnern (P-Lyso-PC, HePC) zu einer Porenbildung (vgl. Hays et al. 2001; Mills und Needham 2005) und damit zu einer (vermehrten) Freisetzung von FITC-Dextran aus den Liposomen führen.

Die Zugabe von HSA und IgG sollte die Einflüsse der Serumproteine auf die Liposomenstabilität bei Anwendung in vivo simulieren. Diese interagieren in bekannter Weise mit TSL (Hosokawa et al. 2003; Weissmann et al. 1974; Kneidl et al. 2014; Hossann et al. 2012). Im Serum finden sich bei einem Erwachsenen durchschnittlich 0,35 bis 0,55 g/100ml Albumin und 0,7 bis 1,6 g/100ml IgG. In den Experimenten wurden Verdünnungen gewählt, die der Proteinkonzentration im Serum entsprechen, bzw. stärker und schwächer konzentriert sind.

Die stärksten Effekte konnten bei den durchgeführten Experimenten bei der Erwärmung von 4°C auf 45°C gezeigt werden, weshalb im Folgenden nur die entsprechenden Diagramme dargestellt werden.

5.7.1 HSA-Verdünnungen

5.7.1.1 DPPG₂-TSL in HSA

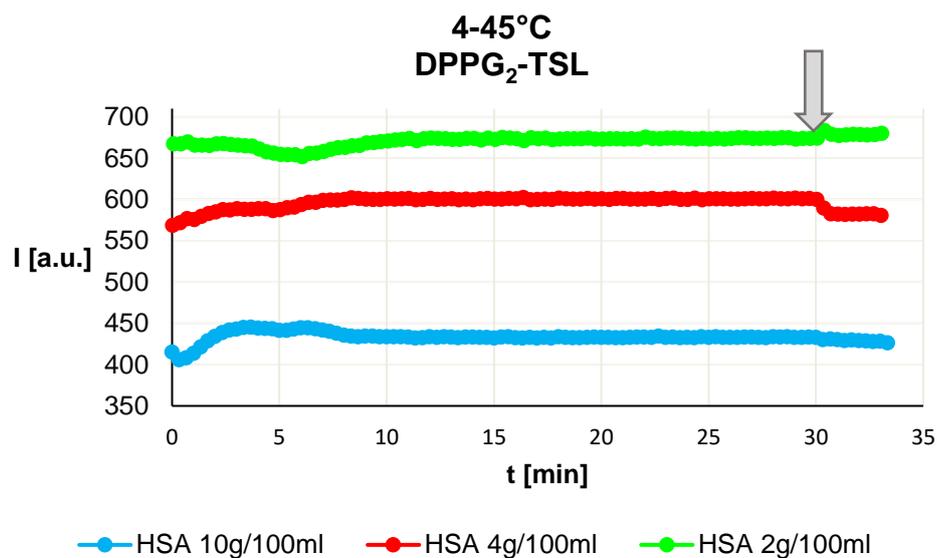


Abbildung 15: Intensitätsverlaufskurven der DPPG₂-TSL in HSA-Verdünnungen bei T_Z=45°C in Abhängigkeit der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Die Fluoreszenzintensitätsverlaufskurven bei Erwärmung von DPPG₂-TSL auf 45°C änderten sich in HSA-Verdünnungen (10 g/100ml, 4 g/100ml, 2 g/100ml in HN-Puffer) im Vergleich zu der Erwärmung in HN-Puffer (vgl. Abbildung 15 mit Abbildung 9):

In den exemplarisch in Abbildung 15 dargestellten Verläufen zeigt sich eine Zunahme der FITC-Dextran-Fluoreszenzintensität innerhalb der ersten 10 Minuten. Dieser Anstieg beginnt in der ersten Minute nach Versuchsstart.

Im Falle der 10 g/100ml HSA-Konzentration fällt die Kurve nach einer Intensitätszunahme in den ersten drei Minuten noch bis zur 10. Minute minimal ab.

Die Intensitätszunahme in der HSA-Verdünnung 2 g/100ml findet in der 6.-9. Minute nach einem kurzen annähernd stabilen Niveau und einer Fluoreszenzintensitätsabnahme statt.

Der Verlauf der DPPG₂-TSL in HSA 4 g/100ml zeigt keinen temperaturabhängigen Intensitätsverlust, sondern eine Fluoreszenzintensitätszunahme in den ersten 10 Minuten, der von annähernd konstanten Plateaus unterbrochen wird. Auffällig ist, dass die Zugabe von Triton in den HSA-Verdünnungen 10 g/100ml und 4 g/100ml zu keinerlei Intensitätszunahme bzw. zu einer Intensitätsabnahme führt.

In der HSA-Verdünnung 2 g/100ml nimmt die Fluoreszenzintensität nach Tritonzugabe minimal zu. Diese Intensitätszunahme nach Detergenzienzugabe konnte lediglich in diesem einen Kurvenverlauf gezeigt werden. Am ehesten handelt es sich dabei um ein kurzzeitiges mischbedingtes Artefakt.

5.7.1.2 LTSL in HSA

Bei Erwärmung der LTSL in HSA-Verdünnungen (siehe Abbildung 16) fällt eine steilere Intensitätszunahme im Vergleich mit DPPG₂-TSL auf, sie ist größer als in HN-Puffer (vgl. Abbildung 10), entspricht jedoch am ehesten dem „frühen Peak“ (vgl. Abschnitt 6.1.7).

Bei der Erwärmung von 4°C auf 45°C und einer HSA-Konzentration von 10 g/100 ml fällt die Kurve nach dem initialen steilen Anstieg wieder leicht ab und bleibt danach bei 338 ± 2 a.u. konstant.

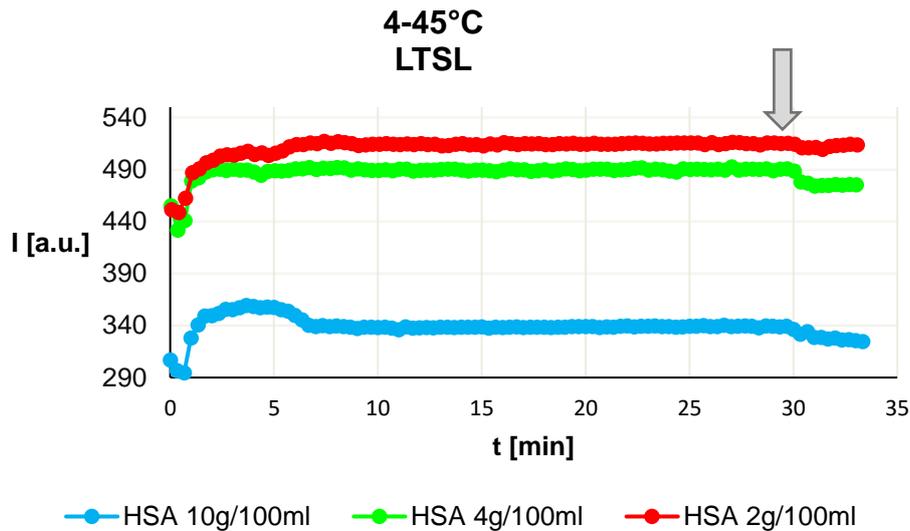


Abbildung 16: Intensitätsverlaufskurven von LTSL in HSA-Verdünnungen bei $T_z=45^\circ\text{C}$ in Abhängigkeit der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Im dargestellten Kurvenverlauf der TSL in den Verdünnungen mit HSA 2 g/100ml kann man zwei Anstiege erkennen. Der erste Intensitätszuwachs findet in der ersten Minute statt und ist als „früher Peak“ einzuordnen (vgl. Abschnitt 6.1.7). Das zweite Mal steigt die Intensität in der 6. Minute an und ist geringer ausgeprägt als der erste.

Nach dem „frühen Peak“ bleibt die Fluoreszenzintensität der LTSL in HSA 4 g/100ml bis zur Tritonzugabe annähernd stabil.

Die Tritonzugabe löst in allen Verdünnungen eine Intensitätsabnahme aus. Umso höher die Proteinkonzentration ist, desto tiefer sinkt die Intensität durch Triton ab.

5.7.2 IgG-Verdünnungen

5.7.2.1 DPPG₂-TSL in IgG

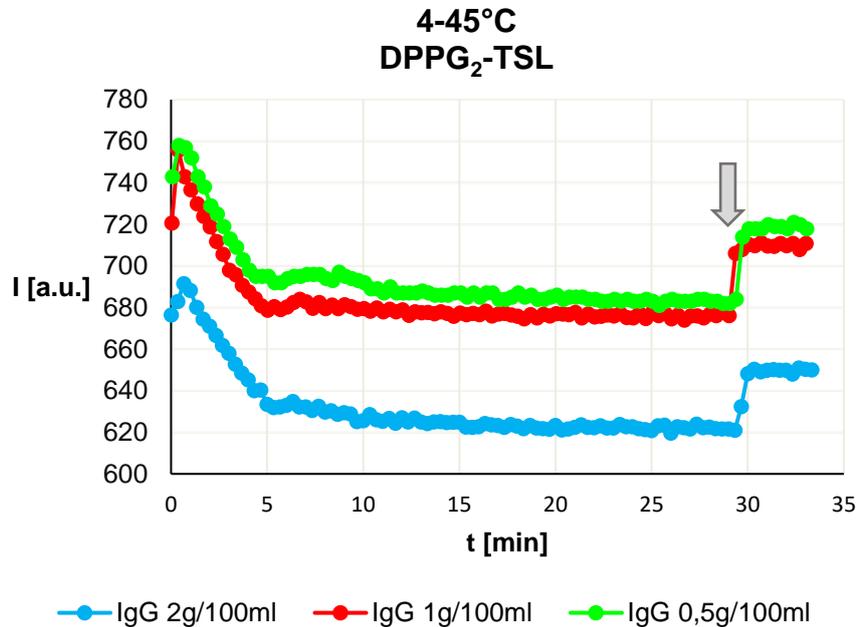


Abbildung 17: Intensitätsverlaufskurven von DPPG₂-TSL in IgG-Verdünnungen bei $T_z=45^\circ\text{C}$ in Abh. der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Die DPPG₂-TSL verhalten sich in den verwendeten IgG-Lösungen weitestgehend wie die der zugehörigen Kinetiken in HN-Puffer (siehe Abbildung 17). In den IgG-Verdünnungen zeigen sich ein steilerer initialer Abfall und eine vorübergehende minimale Intensitätszunahme zwischen der fünften und zehnten Minute.

Die initiale Intensitätsschwankung wird in Abschnitt 6.1.7 diskutiert. Zwischen der siebten Minute und der Tritonzugabe lässt sich eine minimale Intensitätsabnahme (<1%) in den IgG-Verdünnungen erkennen.

5.7.2.2 LTSL in IgG

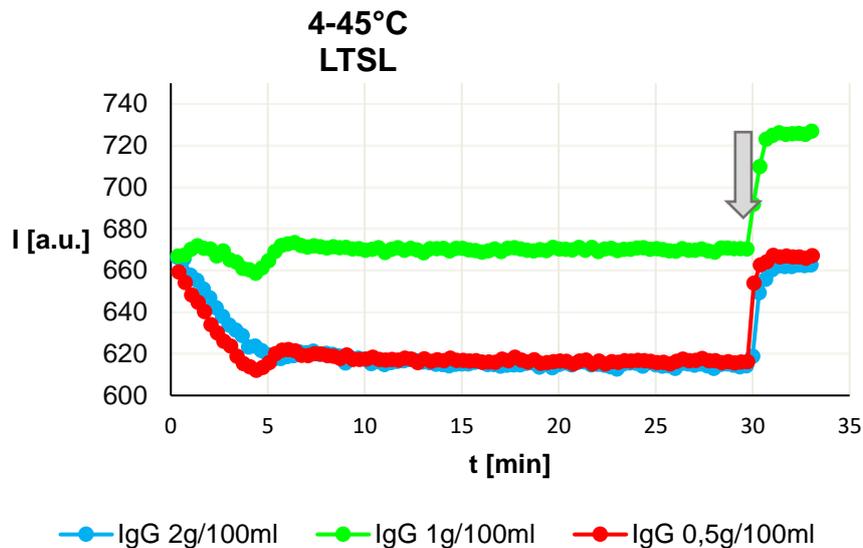


Abbildung 18: Intensitätsverlaufskurven von LTSL in IgG-Verdünnungen bei $T_z=45^\circ\text{C}$ in Abh. der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Bei Erwärmung der LTSL in IgG-Verdünnungen (2 g/100ml, 1 g/100ml, 0,5 g/100ml) auf 45°C zeigen sich die in Abbildung 18 exemplarisch abgebildeten Verläufe.

Die temporäre Fluoreszenzintensitätszunahme in den ersten zwei Minuten in IgG 1g/100ml ist auf ein dokumentiertes Mischproblem mit den Rührstäbchen zurückzuführen.

Bei allen IgG-Verdünnungen findet sich ein Fluoreszenzintensitätsabfall in den ersten 5 Minuten. Die Fluoreszenzintensitätsverläufe weichen anschließend in Abhängigkeit der IgG-Konzentration minimal voneinander ab: Der Intensitätszuwachs in den IgG-Verdünnungen 0,5 g/100ml und 1 g/100ml findet fast eine Minute eher als in HN-Puffer statt (vgl. Abbildung 10). In der IgG-Konzentration von 2 g/100ml zeigt sich ein marginaler Intensitätsanstieg in etwa zu derselben Zeit wie in HN-Puffer (vgl. Abbildung 10). Alle Intensitätsverläufe bleiben nach diesen Anstiegen konstant und zeigen nach Zugabe von Triton erneut einen Intensitätsanstieg in ähnlicher Größe ($\Delta I=52\pm 3\text{a.u.}$). Im Falle der Verdünnung 0,5 g/100ml und 1 g/100ml erfolgt die Intensitätszunahme von demselben konstanten Wert ($616\pm 2\text{a.u.}$) aus auf dasselbe Endniveau ($666\pm 2\text{a.u.}$).

5.7.3 HePC-Verdünnungen

5.7.3.1 DPPG₂-TSL in HePC

Die Lysolipid-Konzentration bezieht sich in folgenden Abschnitten auf den jeweiligen Phospholipidgehalt der verwendeten TSL. Die Intensitätsverlaufskurven bei Erwärmung der DPPG₂-TSL in HePC-Verdünnungen zeigen zum Teil gegenüber denen in HN-Puffer Abweichungen. Die abweichenden Verläufe werden im Folgenden beschrieben:

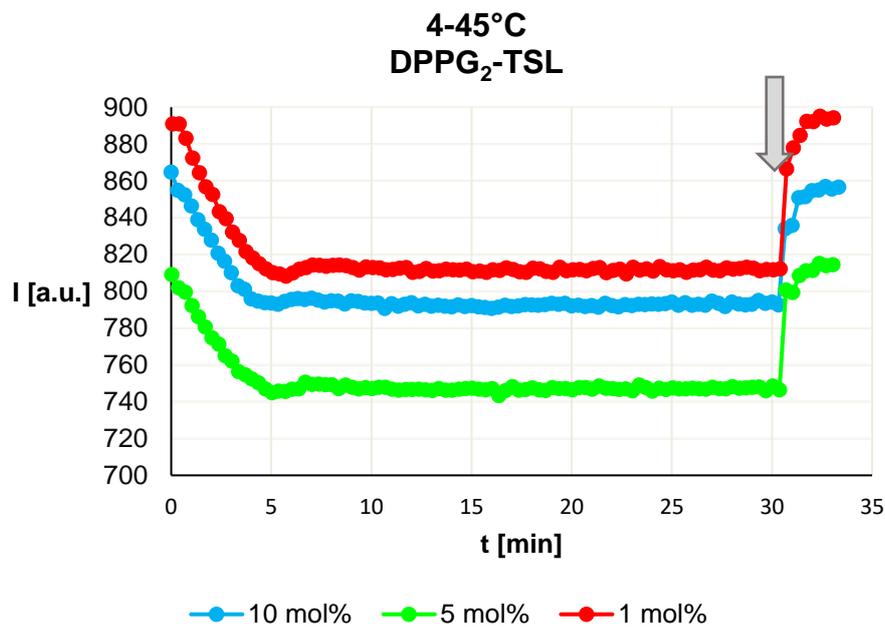


Abbildung 19: Intensitätsverlaufskurven von DPPG₂- in HePC-Verdünnungen bei T_Z=45°C in Abh. der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Bei der Erwärmung von DPPG₂-TSL von 4°C auf 45°C fällt auf, dass nach einem initial temperaturbedingten Intensitätsabfall die Fluoreszenzintensität der TSL in den HePC-Verdünnungen früher einen konstanten Wert erreicht als in HN-Puffer pH 7,8 (vgl. Abbildung 9). Die Intensität der Liposomen in HePC 10 mol% und in HePC 5 mol% erreicht in der 5. Minute ihr Minimum. In HePC 1 mol% wird es in der 6. Minute erreicht. Es folgt eine marginale Intensitätszunahme ($\Delta I=5a.u.$) in allen HePC-Verdünnungen.

Nach Tritonzugabe steigt die Fluoreszenzintensität deutlich an. Der Effekt der Tritonzugabe ist in der 10 mol% Verdünnung am geringsten ausgeprägt ($\Delta I=64a.u.$).

Bei den T_z 30°C und 37°C zeigten sich in den HePC-Verdünnungen im Vergleich zu denen in HN-Puffer (vgl. Abbildung 9) keine abweichenden Kurvenverläufe (exemplarisch die Kinetiken für 37°C, siehe Abbildung 20).

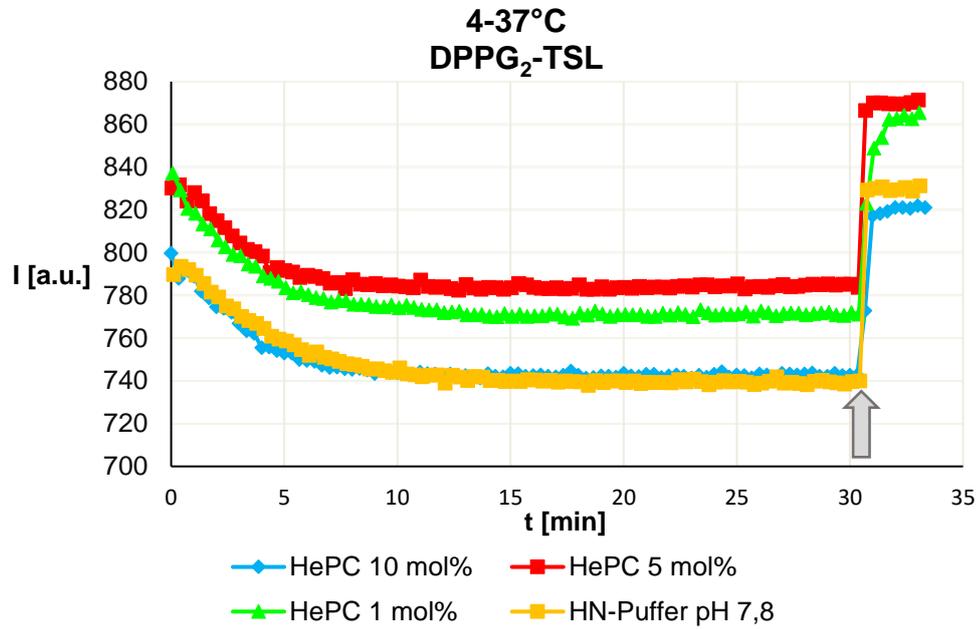


Abbildung 20: Intensitätsverlaufskurven von DPPG₂-TSL in HePC-Verdünnungen bei $T_z=37^\circ\text{C}$ in Abh. der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

5.7.3.2 LTSL in HePC

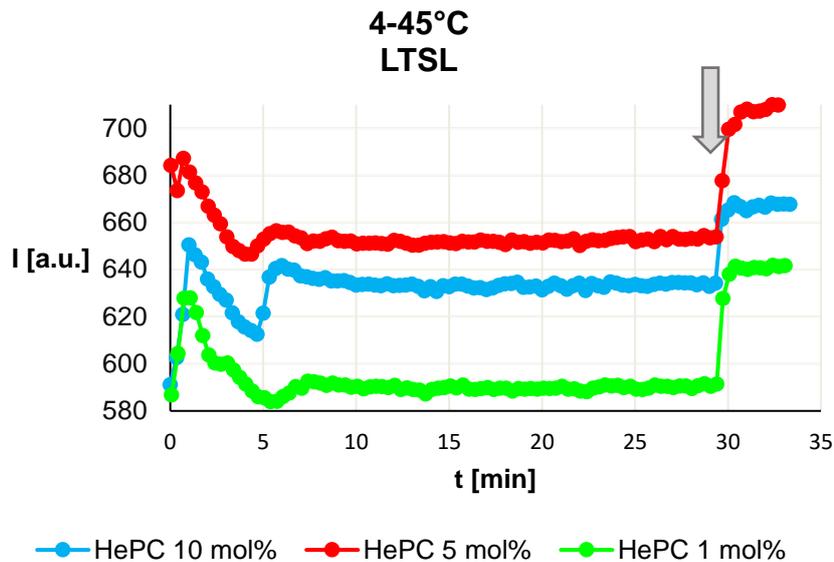


Abbildung 21: Intensitätsverlaufskurven von LTSL in HePC-Verdünnungen bei $T_z=45^\circ\text{C}$ in Abh. der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Bei der Erwärmung von 4°C auf 45°C weichen die Kinetiken je nach Konzentration des HePC-Gehalts von denen in HN-Puffer (vgl. Abbildung 10) ab. Bei allen Kurven ist in den ersten 7 Minuten eine Intensitätszunahme nach einem initialen Intensitätsabfall zu verzeichnen. Zum Fluoreszenzintensitätsanstieg in der ersten Minute siehe Abschnitt 6.1.7.

In HePC 1 mol% und in 5 mol% steigt die Intensität schon in der 6. bzw. der 5. Minute (in HN-Puffer in der 7. Minute, vgl. Abbildung 10). Die Intensität nimmt in HePC 10mol% in der 5. Minute am stärksten zu ($\Delta I=24\text{a.u.}$). Die Tritonzugabe löst in jeder Verdünnung einen Zuwachs aus. Die Intensitätsveränderung aufgrund der Tritonzugabe fällt in der HePC-Verdünnung von 10mol% am geringsten aus ($\Delta I=45\text{a.u.}$).

Die Intensitätsverlaufskurven der LTSL in den HePC-Verdünnungen unterscheiden sich im Vergleich bei Erwärmung auf 30°C und 37°C abgesehen vom frühen Peak nicht von denen in HN-Puffer (exemplarisch 4-30°C siehe Abbildung 22, vgl. Abbildung 10).

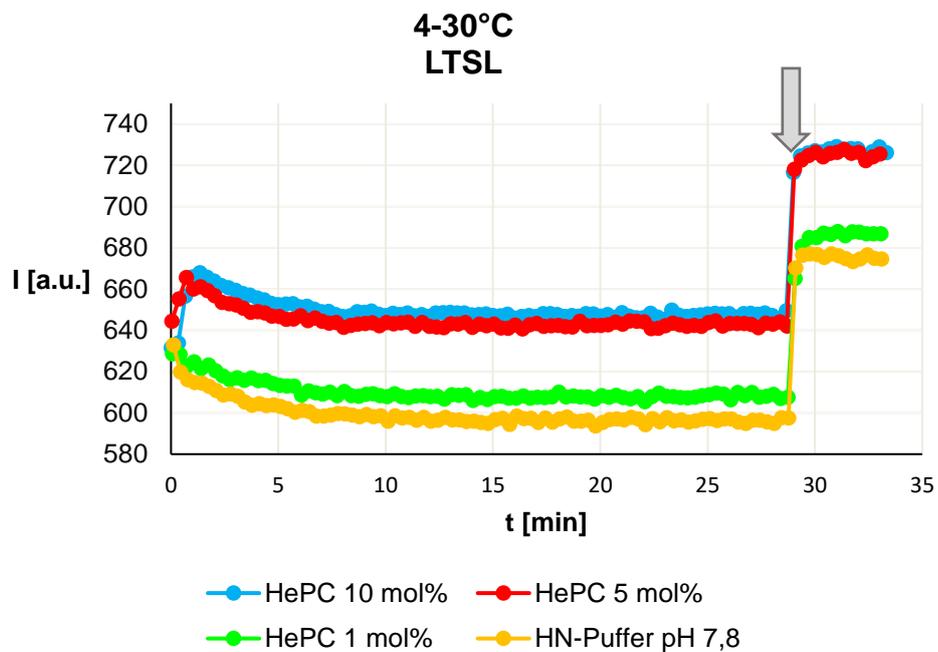


Abbildung 22: Intensitätsverlaufskurven von LTSL in HePC-Verdünnungen bei $T_z=30^\circ\text{C}$ in Abh. der Zeit
 Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

5.7.4 P-Lyso-PC-Verdünnungen

5.7.4.1 DPPG₂-TSL in P-Lyso-PC

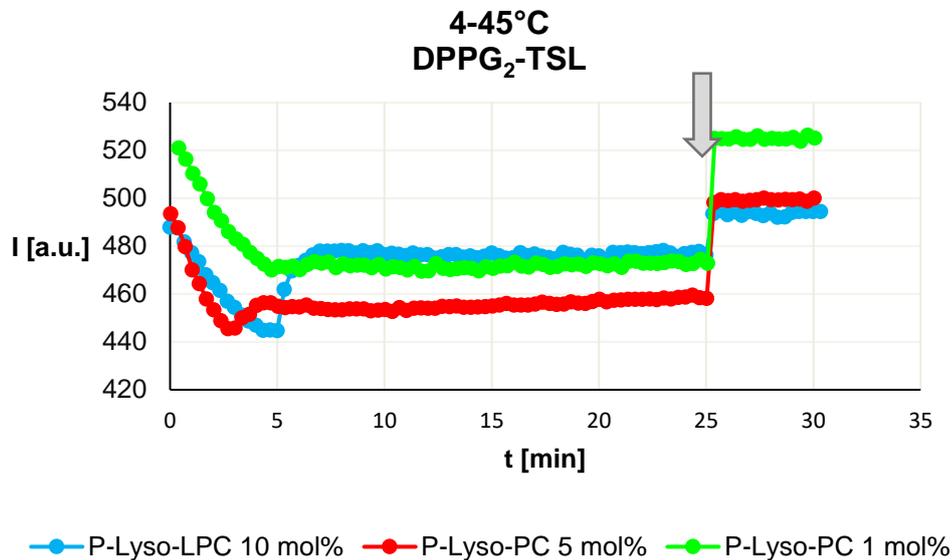


Abbildung 23: Intensitätsverlaufskurven von DPPG₂-TSL in P-Lyso-PC-Verdünnungen bei T_Z=45° in Abh. der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Bis auf einzelne Ausnahmen wichen bei Erwärmung auf 45°C von DPPG₂-TSL die FITC-Dextran-Freisetzungskurven in den P-Lyso-PC-Konzentrationen 10 mol% und 5 mol% von denen in HN-Puffer (vgl. Abbildung 9) ab. In Abbildung 23 ist ein solches Beispiel dargestellt: Alle dargestellten Kurvenverläufe zeigen initial einen temperaturbedingten Intensitätsabfall. Daran anschließend kann man einen Anstieg erkennen. Dieser fällt bei 10 mol% P-Lyso-PC mit einem $\Delta I = 33 \text{ a.u.}$ deutlicher aus als bei 5 mol% P-Lyso-PC ($\Delta I = 10 \text{ a.u.}$). Anschließend bleibt die Intensität bis zur Zugabe von Triton weitestgehend konstant.

Für die P-Lyso-PC-Verdünnung 1 mol% fallen diese Veränderungen geringer aus, außerdem variieren die Ergebnisse häufiger. Teilweise lässt sich bei dieser P-Lyso-PC-Konzentration kein abweichender Kurvenverlauf von dem in HN-Puffer darstellen.

Zusätzlich lässt sich festhalten, dass der Intensitätsverlauf der TSL in der 10 mol% P-Lyso-PC-Konzentration nach Tritonzugabe nur eine verhältnismäßig geringe

Zunahme ($\Delta I = 15$ a.u.) aufweist, ausgehend von einer konstanten Intensität von 477 ± 2 a.u.

Dadurch, dass die Endfluoreszenzintensität I_{End} zwischen der TSL-Probe in 10 mol% P-Lyso-PC ($I_{\text{End}} = 492 \pm 2$ a.u.) und der in dem mitgelaufenen HN-Puffer ($I_{\text{End}} = 488 \pm 1$ a.u.) zufällig fast identisch war, lassen sich auch die Intensitätsveränderungen der beiden Proben vergleichen (vgl. Abbildung 24). Die Änderung der Intensitätszunahme in HN-Puffer in der 26. Minute betrug hierbei $\Delta I = 48$ a.u., die in der Probe in 10 mol% P-Lyso-PC insgesamt 49 a.u. ($I_{8.\text{Min}} = 32$ a.u.; $I_{26.\text{Min}} = 17$ a.u.).

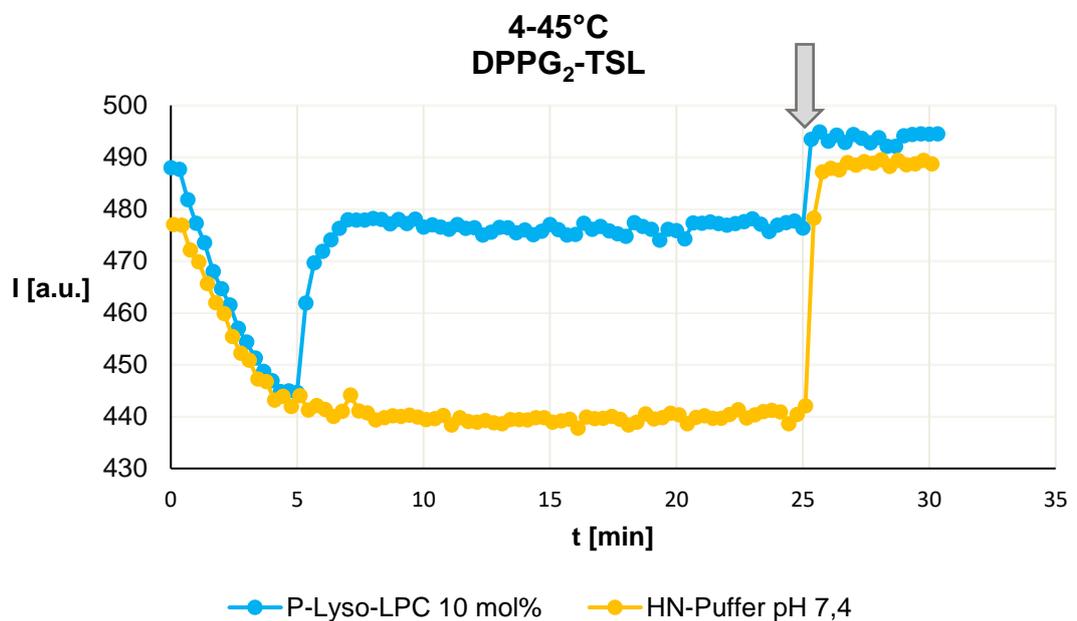


Abbildung 24: Intensitätsverlaufskurven von DPPG₂-TSL in P-Lyso-PC -Verdünnung und in HN-Puffer pH 7,4 bei $T_z = 45^\circ\text{C}$ in Abh. der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Erwärmt man dagegen die DPPG₂-TSL in den P-Lyso-PC-Verdünnungen auf die T_z 30°C (nicht gezeigt) und 37°C ergeben sich keine Abweichungen (siehe exemplarisch Abbildung 25) zu denen in HN-Puffer (vgl. Abbildung 9).

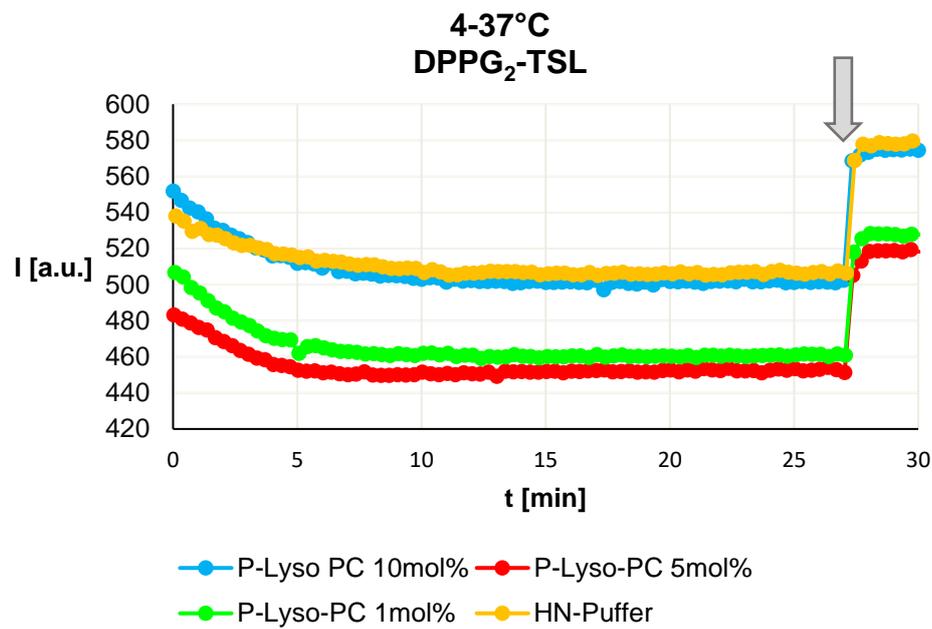


Abbildung 25: Intensitätsverlaufskurven von DPPG₂-TSL in P-Lyso-PC-Verdünnungen bzw. HN-Puffer pH 7,8 bei T_Z=37°C in Abhängigkeit der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

5.7.4.2 LTSL in P-Lyso-PC

Eine Erwärmung von LTSL von 4°C auf 45°C in den o.g. P-Lyso-PC-Verdünnungen ist exemplarisch in Abbildung 26 dargestellt.

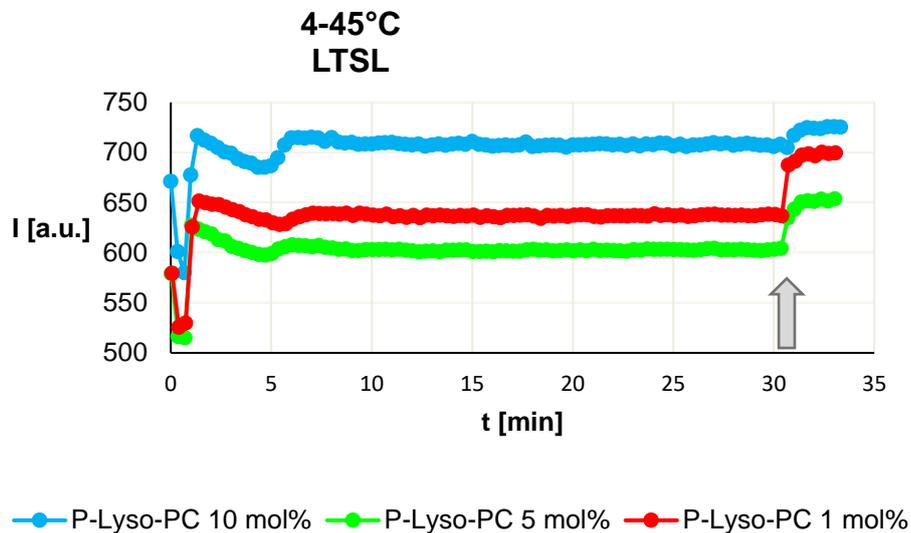


Abbildung 26: Intensitätsverlaufskurven von LTSL in P-Lyso-PC-Verdünnungen bei $T_z=45^\circ\text{C}$ in Abh. der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Es zeigt sich nach dem bereits zuvor erwähnten „frühen Peak“ eine Intensitätszunahme zwischen der 5. und 7. Minute. Die Intensitätszunahme ist im Fall der 1mol% und der 5mol% Verdünnungen ähnlich stark wie in purem HN-Puffer (vgl. Abbildung 10) ausgeprägt (jeweils $\Delta I=10\pm 2\text{a.u.}$). In der 10mol% P-Lyso-PC-Verdünnung ist der Anstieg dagegen deutlich stärker ausgeprägt ($\Delta I=40\text{a.u.}$). Nach der Zugabe von Triton zeigt sich in dieser Verdünnung ($\Delta I=33\text{a.u.}$) im Vergleich zu den anderen Verdünnungsproben ($\Delta I=47$ bzw. 60a.u.) eine verhältnismäßig schwache Intensitätszunahme.

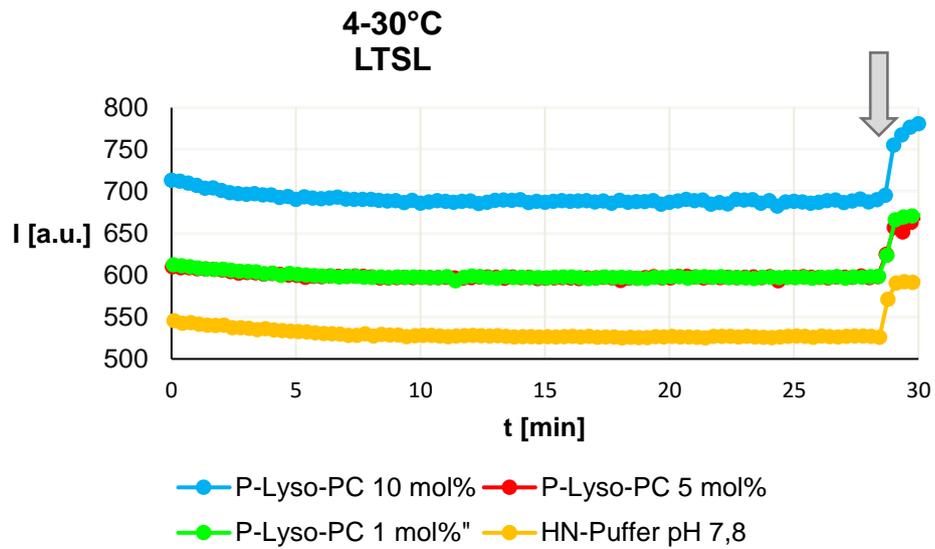


Abbildung 27: Intensitätsverlaufskurven von LTSL in P-Lyso-PC-Verdünnungen bei $T_z=30^\circ\text{C}$ in Abh. der Zeit
Pfeil: Zeitpunkt der Tritonzugabe

Bei T_z von 30°C (vgl. Abbildung 27) und 37°C zeigen sich keine Abweichungen der Intensitätsverlaufskurven in den P-Lyso-PC-Verdünnungen im Vergleich zu HN-Puffer pH 7,8 (vgl. Abbildung 10).

5.8 Zellkulturexperimente

5.8.1 TSL-Anhaftungsversuch

Nach einstündiger Inkubation mit den TSL-Lösungen zeigte sich eine deutliche punktförmige Rh-PE-Fluoreszenz im Zellbereich unabhängig der verwendeten TSL-Formulierung (exemplarisch siehe schwarzer Kreis in Abbildung 28 a und b).

Die mit $L_{DPPG2-TSL}$ behandelten Zellen weisen stärkere Fluoreszenzen auf als die, die mit der L_{TSL} bei gleicher TSL-Phospholipidkonzentration und derselben eingeschlossenen CF-Konzentration inkubiert wurden (vgl. Abbildung 28 b+e und c+f). Insbesondere die CF-Fluoreszenz ist bei ähnlichem Grundrauschen im Bereich der mit $L_{DPPG2-TSL}$ behandelten Zellen gut detektierbar (vgl. Abbildung 28 c), während bei mit L_{TSL} behandelten Zellen kaum eine Fluoreszenz unter dem CF-Filter im Zellbereich sichtbar ist (vgl. Abbildung 28 f).

Bei Zellen, die 24h und 48h inkubiert wurden, blasst Rh-PE zunehmend ab und scheint etwas gleichmäßiger verteilt zu sein. CF ist kaum mehr detektierbar. Diese Restfluoreszenz ist für die mit $L_{DPPG2-TSL}$ behandelten Zellen weiterhin stärker ausgeprägt.

In allen Wells zeigte sich nach 24h bzw. 48h weiterhin Zellwachstum.

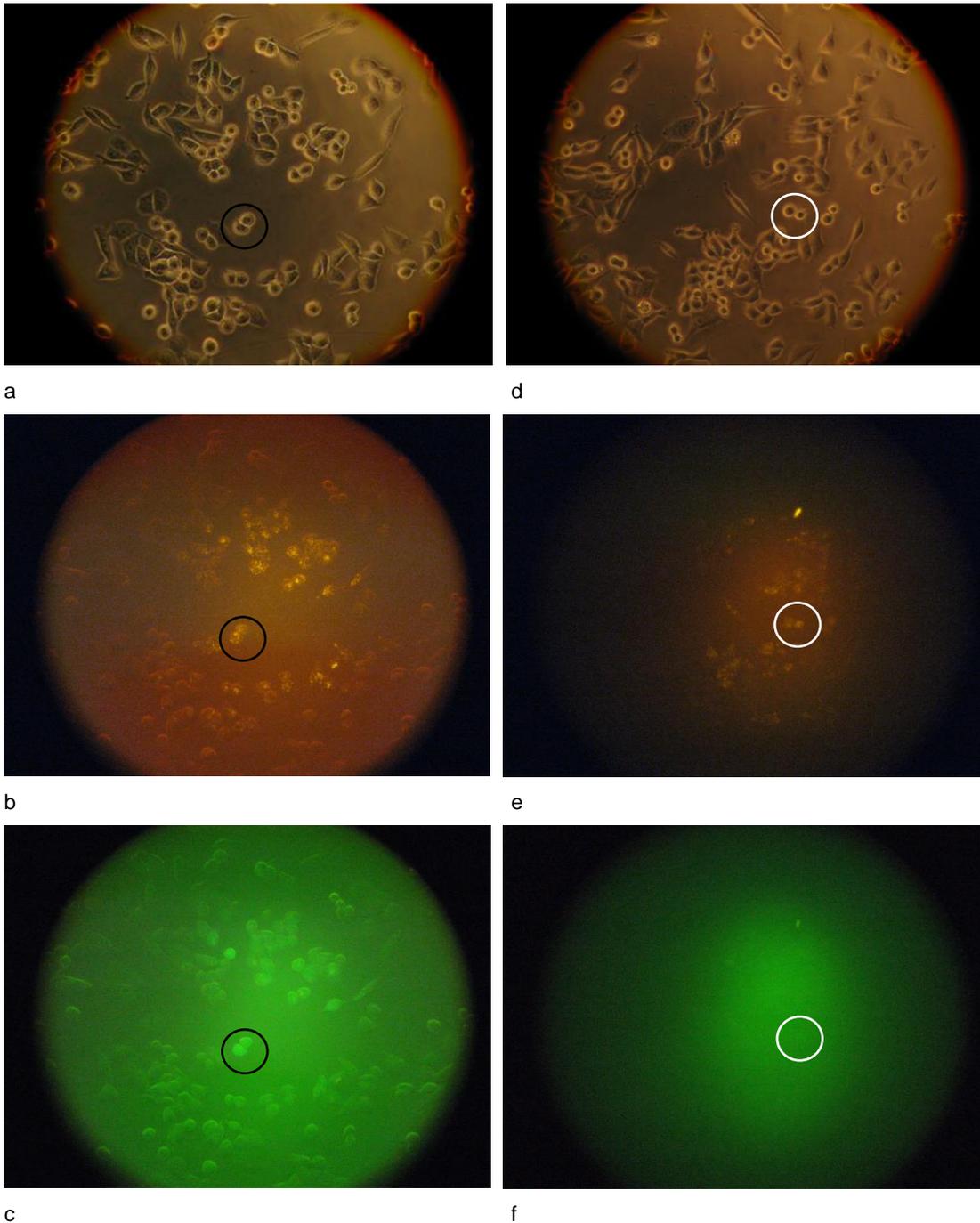


Abbildung 28: BN175 unter Durchlicht, Rh-PE- bzw. CF-Filter nach Inkubation mit TSL
a-c: BN175 über 1h mit $LDPPG_2$ -TSL inkubiert
d-f: BN175 über 1h mit $LTSL$ inkubiert
a+d: Ausschnitt eines Wells im Durchlicht
b+e: Ausschnitt eines Wells unter Rh-PE – Filter
c+f: Ausschnitt eines Wells unter CF – Filter
Kreis: Markierung derselben Zellgruppe für den betreffenden Ausschnitt

5.8.2 TSL-Aufnahme-Versuch

Der Liposomenanhaftversuch zeigte sowohl für DPPG₂-TSL als auch für LTSL durch die Konzentration des Rh-PE im Zellbereich. Hinweise auf eine Anhaftung. Jedoch ergaben sich lediglich für DPPG₂-TSL durch die CF-Fluoreszenz im Zellbereich Anhaltspunkte für eine Internalisierung der TSL. Daher wurde in dieser Arbeit das Verhalten der DPPG₂-TSL in der Zellkultur genauer betrachtet, um weitere Anhaltspunkte auf eine Endozytose dieser TSL zu erhalten.

Nach 18-stündiger Inkubation der Zellen zeigt sich Rh-PE intrazellulär (vgl. exemplarisch in Abbildung 29 a-b, wobei Rh-PE rot dargestellt ist). Teilweise ist Rh-PE mit FITC-Dextran (grün dargestellt) ko-lokalisiert (vgl. Abbildung 29 a-d, gelber Kreis). Die intrazelluläre Lokalisation ergibt sich dadurch, dass im Durchlicht die Zellgrenzen zu erkennen sind und der Kern, blau angefärbt durch DAPI, (gelber Pfeil in Abbildung 29 a-c) angeschnitten ist.

Intrazellulär zeigt sich FITC-Dextran häufiger als im Extrazellularraum, exemplarisch ist intrazelluläres FITC-Dextran in Abbildung 29 a-d im grünen Oval gezeigt. Rh-PE ist gelegentlich direkt an Zellgrenzen zu detektieren (vgl. weiße Pfeile), hierfür gelang zu keinem Zeitpunkt ein sicherer Nachweis einer korrespondierenden FITC-Dextran-Fluoreszenz und somit kein Beleg für die Anhaftung der TSL an die Zellmembran.

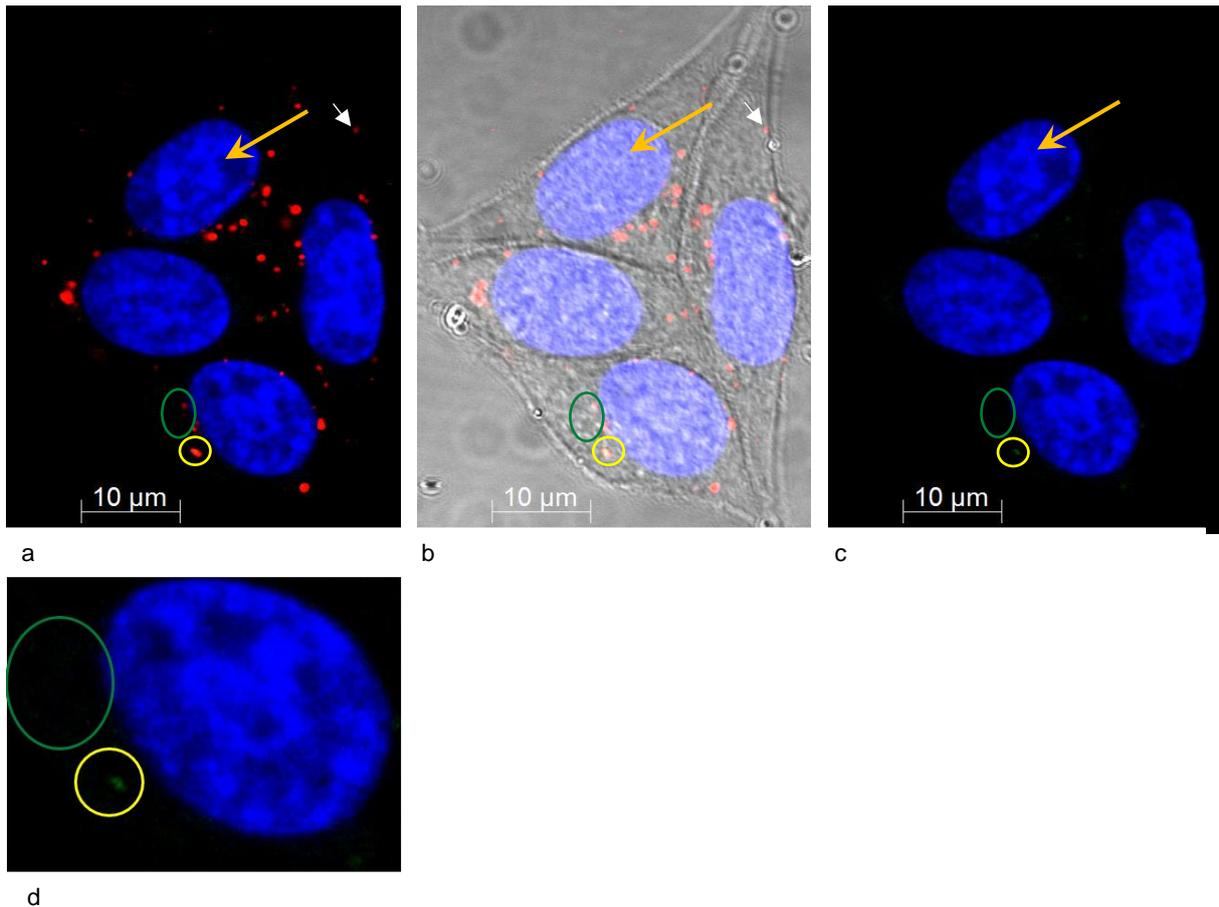
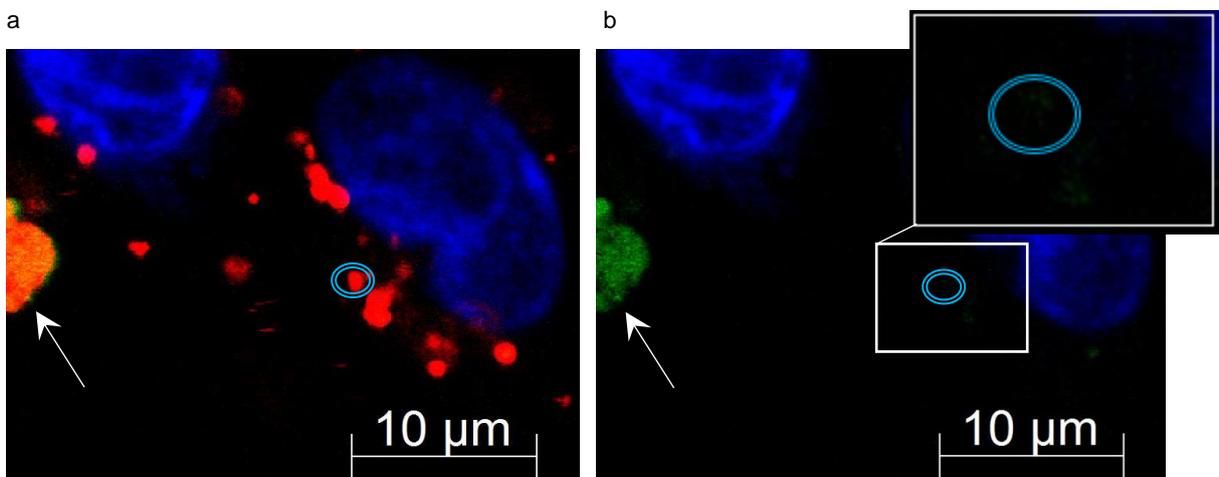
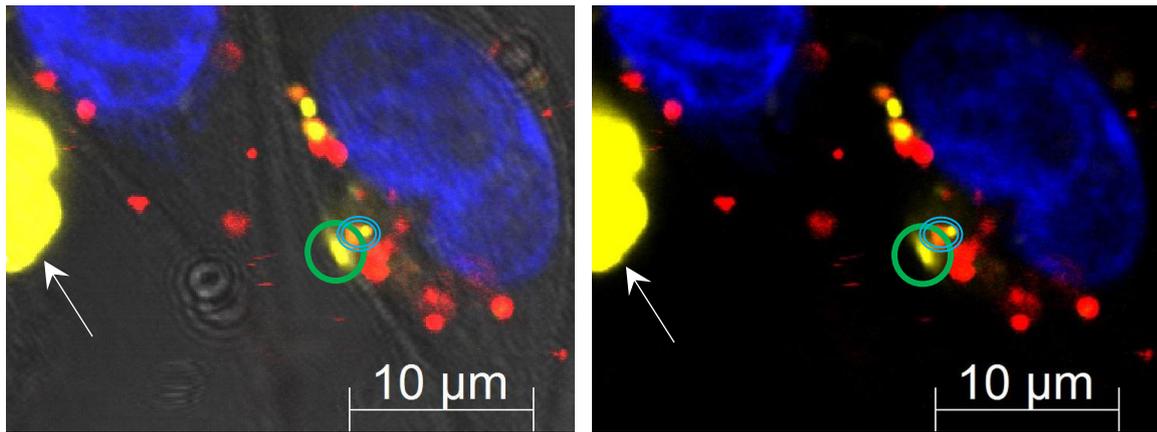


Abbildung 29: BN175 mit $L_{Rh-PE}/FITC-Dextran-TSL$ inkubiert
 Rot= Rh-PE (a+b), grün=FITC-Dextran (a-c), blau=DAPI (a-c), b wurde in Durchlicht aufgenommen. d stellt eine Vergrößerung des unteren rechten Abschnitts von c dar.
Gelber, langer Pfeil: mit DAPI angefarbter Zellkern
Weißer, kurzer Pfeil: membranständiger Nachweis von Rh-PE
Grünes Oval: intrazelluläres FITC-Dextran
Gelber Kreis: intrazelluläres Konglomerat aus Rh-PE und FITC-Dextran



a b
 c d
 Abbildung 30: BN175 mit L_{Rh-PE}/FITC-Dextran-TSL inkubiert
 Rot= Rh-PE (a-c), grün=FITC-Dextran (a-d), blau=DAPI (a-d), gelb=DiD (a+b). a wurde
 in Durchlicht aufgenommen.
Weißer Pfeil: Markierung von Konglomeraten aus FITC-Dextran, Rh-PE und DiD
Grüner Kreis: Anfärbung der Zellmembran durch DiD
Doppelter blauer Kreis: intrazelluläre ko-lokalisierte Fluoreszenz von DiD, FITC-Dextran
 und Rh-PE

Extrazellulär zeigen sich Rh-PE und FITC-Dextran sowohl einzeln, als auch überlagert.
 Es gibt auch scheinbare Aggregatbildungen (ca. 10µm im Durchmesser) beider
 Fluoreszenzfarbstoffe (vgl. weiße Pfeile in Abbildung 30).

In vorausgegangenen Versuchen, in denen lediglich DiD eingesetzt wurde, färbte DiD
 erwartungsgemäß die Zellmembranen an (Daten nicht gezeigt). Beim zusätzlichen
 Einsatz von Rh-PE färbte DiD nur zum Teil Zellmembranabschnitte an (vgl. grüner
 Kreis in Abbildung 30 a-b, wobei DiD gelb dargestellt ist). Größtenteils ist DiD mit

Rh-PE ko-lokalisiert. Besonders stark färbt es Konglomerate aus Rh-PE und FITC-Dextran an (vgl. weiße Pfeile in Abbildung 30 a-d).

Da keine gleichmäßige Färbung der Zellmembran gewährleistet werden konnte, wurde in nachfolgenden Experimenten auf die Verwendung von DiD verzichtet und zur Darstellung der Zellgrenzen Durchlicht verwendet. DiD kam gelegentlich intrazellulär mit Rh-PE und FITC-Dextran ko-lokalisiert vor (doppelter hellblauer Kreis in Abbildung 30, FITC-Dextran dabei nur in der Vergrößerung von d sichtbar). Auch bei Versuchen ohne DiD-Verwendung war Rh-PE im Zytosol lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

6 Diskussion

6.1 In vitro Öffnungskinetiken

Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsaufbau „in vitro Öffnungskinetik“ eignet sich dazu, indirekte Indizien auf eine Porenbildung zu generieren. Zur korrekten Interpretation der Ergebnisse sollen im Folgenden zunächst die Grundbedingungen, Voraussetzungen sowie die Limitationen des Systems aufgezeigt werden. Im Anschluss werden die Ergebnisse der FITC-Dextran-Öffnungskinetiken für DPPC-TSL, DPPG₂-TSL und LTSL analysiert. Durch einen Vergleich der CF- mit der FITC-Dextran-Freisetzung werden die unterschiedlichen Freisetzungsmechanismen der einzelnen Formulierungen bestimmt.

Zum Abschluss wird das Phänomen des „frühen Peaks“ genauer betrachtet und mögliche Ursachen erörtert.

6.1.1 Interpretation der Daten

Um in diesem Versuchsaufbau Freisetzungen untersuchen zu können, muss sichergestellt bzw. überprüft werden, dass das System sich hierfür eignet.

So wurde in jeder Versuchsdurchführung Triton zugegeben. Dies bewirkt die Zerstörung von TSL und hat damit eine vollständige Freisetzung des verwendeten hydrophilen Fluoreszenzfarbstoffes zur Folge. Mit Ausnahme der Versuche in HSA-Verdünnungen konnte gezeigt werden, dass der Versuchsaufbau für die Detektion einer CF- bzw. FITC-Dextran-Freisetzung geeignet ist. Der Versuchsaufbau in Hinblick auf die HSA-Verdünnungen wird separat in Kapitel 6.2.1 besprochen.

Eine korrekte Interpretation der Daten ist nur bei Kenntnis der Einschränkungen des Systems möglich. Eine Limitation des Versuchsaufbaus ergibt sich aus der Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzintensität (vgl. Abbildung 5). Die Temperaturabhängigkeit bedingt die divergierende Steilheit der fallenden Intensitätskurven in den ersten Minuten, das zum Teil frühere Eintreten des konstanten Intensitätsniveaus bei unterschiedlicher T_z und den damit unterschiedlich starken temperaturabhängigen Intensitätsabfall. So könnte eine Freisetzung während der

Erwärmungsphase durch den temperaturbedingten initialen Intensitätsverlust kaschiert werden.

Eine prozentuale Angabe über die FITC-Dextran-Freisetzung ist ebenfalls aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzfarbstoffe in dem verwendeten Versuchsaufbau nicht zu treffen. Eine Mittelung der Kinetikverläufe war aufgrund des unterschiedlichen Fluoreszenzniveaus der einzelnen TSL-Chargen, der divergierenden angelegten Spannung und der „frühen Peaks“ nicht möglich. Die Auswertung ist daher qualitativer Natur. Die Aussagekraft der Ergebnisse basiert vor allem auf ihrer Reproduzierbarkeit. Die exemplarisch dargestellten Kurvenverläufe für das Verhalten in HN-Puffer basieren dabei auf über 40 einzelnen Verläufen pro Zieltemperatur. In den jeweiligen Verdünnungen auf jeweils mindestens 10 Verläufen. Reproduzierbare Phänomene wurden daher in dieser Arbeit in einzelnen Verläufen exemplarisch dargestellt.

Die verwendeten HN-Puffer (pH 7,4 und 7,8) hatten keinen Einfluss auf die Verläufe und dienten der optimalen Ausnutzung der Fluoreszenzeigenschaften von FITC-Dextran. Die qualitativen Kurvenverläufe lassen sich demnach vergleichen, Absolutwerte einer Freisetzung hingegen sind nicht vergleichbar.

Eine weitere Einschränkung ergibt sich aus der notwendigen Reproduzierbarkeit. Durch eine zum Teil nicht gleichmäßige Wärmeentwicklung in allen vier verwendeten Küvetten und interindividuellen Abweichungen, durch beispielsweise Mischunregelmäßigkeiten der Rührstäbchen, traten minimale, nicht reproduzierbare Abweichungen der Intensitätsverläufe auf. Mischartefakte bedeuten eine kurzzeitige Intensitätsveränderung, die sich nach Beseitigung des Mischproblems zurückbildet. Daher wurden nicht reproduzierbare Einzelverläufe als nicht repräsentativ und damit als nicht relevant gewertet. Somit ist es jedoch auch möglich, dass ein tatsächlich aufgetretenes Ereignis fälschlicherweise einem zufälligen Artefakt zugeschrieben wurde.

Als Freisetzung wird nachfolgend in dieser Arbeit eine reproduzierbare Fluoreszenzintensitätserhöhung gewertet. Eine Temperaturabhängigkeit der

Freisetzung ergibt sich immer dann, wenn der Fluoreszenzintensitätsanstieg um denselben Zeitpunkt nach Messungsstart einer Öffnungskinetik eintritt. Warum der „frühe Peak“ in dieser Arbeit nicht als Freisetzung gewertet wurde und was ihn bedingt, ist unter Abschnitt 6.1.7 näher beschrieben.

Um später die durchgeführten Versuche mit unterschiedlichen Zusätzen bzw. den Vergleich zur CF-Freisetzung analysieren zu können, sollen in Folgendem zunächst das grundsätzliche Freisetungsverhalten der einzelnen Formulierungen in HN-Puffer bestimmt werden.

6.1.2 DPPC-TSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer

Die als Negativkontrolle, also als Nicht-Porenbildner gedachten Öffnungskinetiken mit DPPC-TSL, lieferten durchweg inhomogene und temperaturunabhängige Ergebnisse. Die Intensitätszunahmen und die flache Intensitätsabnahme (vgl. Abbildung 12, $T_z=37^\circ\text{C}$) könnten für eine Freisetzung von FITC-Dextran unabhängig von der T_z sprechen.

Auffällig war eine deutliche Größenvarianz der DPPC-TSL (vgl. Tabelle 14), was auf eine Aggregatbildung hinweist. Eine Aggregatbildung ist für Liposomen aus DPPC in der Literatur vorbeschrieben (Howard und Levin 2010). Dies könnte auch für die inhomogenen Ergebnisse bei der Erwärmung dieser Liposomen verantwortlich sein. Durch die Aggregatbildung könnten die Liposomenmembranen innerhalb des Aggregates verschmelzen und temperaturunabhängig größere Strukturen bilden, was zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität führen würde. Bei den Konformitätsänderungen könnte es zu einem FITC-Dextran-Verlust aus den Liposomen kommen. Dies käme zwar einer Freisetzung gleich, wäre jedoch weder zielgerichtet noch steuerbar und entspräche dadurch keiner gewünschten, temperaturabhängigen Freisetzung von FITC-Dextran, sondern einer Leckage.

Bei Erwärmung könnten diese Veränderungen aufgrund des Zustandswechsels der Lipide in den Membranen häufiger auftreten, was eine leichte Temperaturabhängigkeit zur Folge hätte. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht gesichert werden.

Eine konklusive Analyse ist aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit nicht möglich. Daher wurde auf weitere Experimente mit DPPC-TSL verzichtet.

6.1.3 DPPG₂-TSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer

Das in Abbildung 9 dargestellte Fluoreszenzintensitätsverhalten der DPPG₂-TSL in HN-Puffer glich dem von purem FITC-Dextran in HN-Puffer bei Erwärmung. Bei fehlendem Fluoreszenzintensitätsanstieg und in etwa gleichzeitigem Erreichen des Intensitätsminimums bei Erwärmung von purem FITC-Dextran und mit FITC-Dextran beladenen DPPG₂-TSL in HN-Puffer, ist das Vorliegen einer FITC-Dextran-Freisetzung unwahrscheinlich. Hätte eine relevante Freisetzung stattgefunden, hätte sich das zumindest in einer Schulter der abfallenden Kurve geäußert. Dass die Intensität des gequenchten FITC-Dextrans nicht zufällig mit der Fluoreszenzintensität nach Freisetzung des verdünnten Farbstoffes identisch war, beweisen die sprunghaften Intensitätsanstiege nach der mittels Pfeil markierten Tritonzugabe (vgl. Abbildung 9).

Aufgrund der unter 6.1.1 beschriebenen Limitationen des Versuchsaufbaus konnte eine minimale Freisetzung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

6.1.4 LTSL: FITC-Dextran-Freisetzung in HN-Puffer

Bei der Erwärmung von mit FITC-Dextran beladenen LTSL über die T_m hinaus ließ sich auf eine Intensitätszunahme im Sinne einer temperaturabhängigen FITC-Dextran-Freisetzung in der fünften bis siebten Minute schließen (vgl. Abbildung 10). Hier kann von einer FITC-Dextran-Freisetzung ausgegangen werden.

Dies wird von der Tatsache untermauert, dass die Zugabe von Triton bei den TSL mit der T_z von 30°C eine größere Zunahme auslöst. Diese Intensitätsunterschiede waren in den in Abbildung 10 aufgeführten Kurvenverläufen vergleichbar, weil bei gleichem Volumen annähernd identisch konstante Werte erreicht wurden.

Die Reproduzierbarkeit der Intensitätszunahme um die T_m gewährleistet, dass es sich um eine temperaturabhängige Freisetzung und nicht um ein Artefakt handelt.

Nach der beschriebenen Intensitätszunahme blieb die Intensität konstant bei erreichter T_z . Die Tritonzugabe führte bei einzelnen Versuchen zu keiner merklichen Intensitätszunahme, also FITC-Dextran-Freisetzung. Dies könnte durch eine

vollständige Freisetzung erklärt werden. Eine weitere Erklärung wäre, dass in diesen Einzelfällen die durch Triton ausgelöste Freisetzung so geringfügig ausfiel, dass die Fluoreszenz des freigewordenen FITC-Dextran im „Grundrauschen“ untergeht.

6.1.5 FITC-Dextran - und CF - Freisetzung im Vergleich

Die unter den Abschnitten 5.6.4.1 bis 5.6.2 beschriebenen Ergebnisse konnten bestätigen, dass DPPG₂-TSL und LTSL, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, CF temperaturabhängig über die Zeit freisetzen.

Die CF-Fluoreszenzintensitätszunahme und damit die CF-Freisetzung fand nach Erreichen der Phasenumwandlungstemperatur bis zur Tritonzugabe statt. Der Hauptanteil trat in den ersten Minuten um das Erreichen der Phasenumwandlungstemperatur ein (vgl. Abbildung 13, Abbildung 14).

Die langsamere CF-Freisetzung aus DPPG₂-TSL gegenüber der aus LTSL deckte sich mit den Ergebnissen aus den temperaturabhängigen Öffnungskinetiken der beiden Formulierungen (vgl. Abschnitt 5.6.4.1; Abbildung 7 und Abbildung 8).

Jedoch zeigten lediglich LTSL eine nennenswerte Freisetzung von FITC-Dextran im Sinne einer temperaturabhängigen Fluoreszenzintensitätszunahme bei Erreichen der T_m . DPPG₂-TSL zeigten dies nicht. Im Gegensatz zur CF-Freisetzung fand bei mit FITC-Dextran beladenen LTSL keine Intensitätszunahme nach Erreichen der T_m über die Zeit bis zur Tritonzugabe statt. Es scheint demnach keine sichtbare, andauernde Freisetzung von FITC-Dextran stattzufinden (vgl. Abbildung 13).

Bei Erwärmung beider Formulierungen in HN-Puffer pH 7,4 oder 7,8 auf $T_z < T_m$ ließ sich weder eine Freisetzung von CF noch von FITC-Dextran verzeichnen (vgl. Abbildung 7 bis 10).

6.1.6 Freisetzungsmechanismen

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse (vgl. Kapitel 5.6) weisen auf differierende, temperaturabhängige Freisetzungsverhalten und damit unterschiedliche Freisetzungsmechanismen der DPPG₂-TSL und LTSL hin:

Der Vergleich des temperaturabhängigen Freisetzungsverhaltens aus DPPG₂-TSL mit LTSL lässt den Schluss zu, dass es sich um unterschiedliche

Freisetzungsmechanismen handeln muss. Schon die CF-Freisetzung unterscheidet sich in ihrem Verlauf und Ausmaß im beobachteten Zeitraum (vgl. Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 13 und Abbildung 14). LTSL setzen im betrachteten Zeitraum einen größeren Anteil der eingeschlossenen CF-Menge frei, wobei aus beiden TSL-Formulierungen eine relevante CF-Freisetzung stattfindet.

Der entscheidende Unterschied zeigt sich in der FITC-Dextran-Freisetzung:

In HN-Puffer pH 7,4-7,8 konnte bei LTSL eine temperaturabhängige Freisetzung verzeichnet werden, während aus DPPG₂-TSL keine messbare Freisetzung erfolgte.

6.1.6.1 DPPG₂-TSL: Freisetzungsmechanismus

Zusammenfassend zeigten DPPG₂-TSL demnach eine temperaturgetriggerte Freisetzung kleiner Moleküle wie CF. Für das größere Molekül FITC-Dextran bildeten sie jedoch eine Barriere. Eine mögliche Erklärung dieses Freisetzungsmechanismus wären „grain boundaries“, die bei einer Koexistenz von Lipiden in der flüssig-ungeordneten und in der soliden Phase in der Liposomenmembran auftreten (van Meer et al. 2008). Die Phospholipide sind an diesen Stellen nicht ausreichend eng gepackt, sodass kleinste Lücken in der Membran entstehen (Mouritsen, O. G. et al. 1995; Marsh et al. 1976; Corvera et al. 1992; Mouritsen und Zuckermann 1987). Über diese können kleinste hydrophile Moleküle wie CF aus den TSL in die Umgebung übertreten (Papahadjopoulos et al. 1973), große Moleküle wie FITC-Dextran können hierüber nicht freigesetzt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sprechen daher gegen eine Porenbildung der DPPG₂-TSL in HN-Puffer.

6.1.6.2 LTSL: Freisetzungsmechanismus

Eine Erklärung des Freisetzungsmechanismus aus LTSL wäre eine Porenbildung während der T_m (Landon et al. 2011; Ickenstein et al. 2003; Mills und Needham 2005). Die Möglichkeit der Entstehung von Poren bei LTSL liegt in der Lipidzusammensetzung begründet: P-Lyso-PC ist ein Lysolipid und Mizellenbildner. Die Zugabe eines Detergenz führt zu Porenbildungen in Doppelmembranen während der flüssig-kristallinen Phase (Bangham und Lea 1978). Es wurde postuliert, dass Lysolipide durch ihre Struktur (Israelachvili 1992) und ihre Kopfgruppen zu einer

Porenbildung an „grain boundaries“ führen (Mills und Needham 2005; Landon et al. 2011). Das pegylierte Lipid DSPE-PEG₂₀₀₀ scheint die Bildung solcher Nanoporen zu verstärken und zu stabilisieren, selbst bildet es keine aus (Landon et al. 2011).

Über derartige temperaturgetriggerten Poren könnte neben CF auch das mehr als 10fach größere FITC-Dextran freigesetzt werden.

Eine anderweitig geardete rein konzentrationsabhängige Diffusion über die TSL-Membran ist unwahrscheinlich, da sie unter der T_m nicht auftritt, FITC-Dextran hydrophil und ein großes Molekül ist.

Eine Porenbildung erklärt ebenfalls die schnellere CF-Freisetzung aus LTSL als bei DPPG₂-TSL: Die Wahrscheinlichkeit, dass CF durch größere Poren aus den Vesikeln austritt, ist deutlich größer als über kleine „grain boundaries“.

Im Gegensatz zu der Öffnungskinetik der CF-Freisetzung konnte keine andauernde FITC-Dextran-Freisetzung aus LTSL gezeigt werden.

Die zeitlich begrenzte FITC-Dextran-Freisetzung erscheint zunächst widersprüchlich.

Bei der Größenmessung von FITC-Dextran wurde eine Aggregatbildung in HN-Puffer pH 7,8 gezeigt (vgl. Tabelle 13). Die großen Aggregate würden eine vollständige Freisetzung des eingeschlossenen FITC-Dextran über Poren verhindern. Nach Freisetzen des verfügbaren, nicht-aggregierten FITC-Dextran könnte das übrige aggregierte FITC-Dextran durch seine Größe am Durchtritt durch die Poren gehindert werden.

Die Fluoreszenzzunahme nach Tritonzugabe kann mit dieser Hypothese dadurch erklärt werden, dass durch die Zerstörung der TSL durch Triton das aggregierte FITC-Dextran freigesetzt würde.

Eine weitere Erklärung für die partielle Freisetzung wäre, dass die Porenbildung reversibel ist und damit das eingeschlossene FITC-Dextran nicht vollständig freigesetzt wird. So könnte die hohe laterale Diffusion der Phospholipide oberhalb der T_m eine dauerhafte Porenbildung verhindern.

Einschränkend ist festzuhalten, dass eine minimale Freisetzung über die Zeit aber durch die verwendete Methode nicht detektiert werden könnte (vgl. Abschnitt 6.1.1).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit stichhaltige Belege dafür gefunden werden, dass LTSL Poren ausbilden. DPPG₂-TSL dagegen hydrophile, eingeschlossene Substanzen am ehesten über kleine Öffnungen, z.B. über „grain boundaries“, freisetzen.

6.1.7 „Früher Peak“

Bei einigen Öffnungskinetiken zeigte sich während der ersten zwei Minuten eine kurze, temperaturunabhängige Intensitätszunahme unabhängig von der TSL-Formulierung oder des verwendeten Puffers (vgl. Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12 und Abbildung 17).

Die Intensitätszunahme dieser Peaks fällt stärker aus als die durch Triton ausgelöste, sogar bei einer T_z von 30°C.

Entweder handelt es sich bei diesem Peak um eine tatsächliche Freisetzung oder aber um eine vorübergehende Fluoreszenzintensitätszunahme aufgrund von Strukturänderung der Liposomen und/oder des Fluoreszenzfarbstoffes. Gegen eine Freisetzung sprechen die fehlende Temperaturabhängigkeit, das Ausmaß der Zunahme und die unveränderte Phospholipid-Zusammensetzung der TSL, die mittels DC überprüft wurde. Dies schließt eine Veränderung der Lipidzusammensetzung mit konsekutiver Freisetzung als Ursache aus.

Eine Veränderung der Lagerung von in flüssiger Dispersion (2-8°C) zu gefrorener Dispersion (-20°C) konnte das Auftreten des Phänomens nicht verhindern (vgl. Abbildung 11).

Die vorübergehende Sichtbarkeit des Peaks könnte in der Temperaturabhängigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes begründet sein. Da der Peak so groß ist, dass das erreichte konstante Niveau trotz eines temperaturabhängigen Intensitätsabfalls höher sein müsste, als bei Verläufen ohne Peak. Bei ansonsten einheitlichem Fluoreszenzintensitätsniveau der TSL derselben Charge mit und ohne Peak, ist es unwahrscheinlich, dass dieser Peak eine Freisetzung darstellt (exemplarisch siehe Abbildung 11). Auch dass der „frühe Peak“ ebenfalls bei 30°C auftritt, eine Freisetzung von selbst kleineren Molekülen aus den TSL ohne diesen Peak jedoch bei niedrigen Versuchstemperaturen nicht stattfindet (vgl. CF-Freisetzung unter Abschnitt 5.6.4.1),

lässt den Schluss zu, dass ein anderes Phänomen für diesen Peak verantwortlich sein muss.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich der FITC-Anteil des FITC-Dextran zwischenzeitlich in die Doppelmembran schiebt. Bei einem pH von 6,5-8,5 liegt FITC als neutrales Molekül vor, bei dem Hinweise auf eine Membranpermeabilität existieren (Cole et al. 1990). Die Zuckerkette hingegen bliebe im Vesikelinneren eingeschlossen, sodass kein Übertritt des FITC-Dextran in die extraliposomale Lösung auftreten kann. Durch die Einlagerung des FITC-Anteils in die Membran könnte eine Fluoreszenzintensitätszunahme durch eine Minderung der Fluoreszenzquenchung ausgelöst werden. Warum dieser „frühe Peak“ in etwa zu derselben Zeit auftritt, könnte wie folgt erklärt werden: solange sich die Liposomenmembran in der soliden Phase befindet, kann sich der FITC-Anteil zwischen die Lipide schieben. Wenn bei Erwärmung die laterale Diffusionsgeschwindigkeit zunimmt, wird das FITC durch die Dextrankette in der Beweglichkeit gehindert und in das Vesikelinnere zurückgedrängt.

Des Weiteren scheint der Peak nicht wie zunächst angenommen vom Alter der TSL, sondern von der Konzentration des eingeschlossenen FITC-Dextrans abzuhängen. So wurde bei TSL, die mit weniger als 50mg/ml FITC-Dextran beladen waren, zu keinem Zeitpunkt ein solcher Peak nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Daher scheint der Peak nur bei enger Packung des intravesikalen FITC-Dextrans aufzutreten, was o.g. Hypothese stützt.

6.2 Freisetzung von FITC-Dextran aus TSL in differierenden Pufferlösungen

In Folgendem werden die Einflüsse durch die unterschiedlichen Zusätze (vgl. Kapitel 5.7) auf das Freisetzungsverhalten von LTSL und DPPG₂-TSL betrachtet.

6.2.1 FITC-Dextran Freisetzung in HSA

Bei Erwärmung der TSL in HSA-Verdünnungen wichen die Fluoreszenzintensitätsverlaufskurven von reinem FITC-Dextran in HSA-Verdünnungen ab. Unabhängig der HSA-Konzentration zeigte sich bei Erwärmung der TSL-Proben eine Fluoreszenzintensitätszunahme in den ersten zehn Minuten und ein Abfall nach

Tritonzugabe. Diese Ergebnisse lassen auf den ersten Blick auf eine vollständige FITC-Dextran-Freisetzung aus beiden TSL-Formulierungen bei einer eingestellten Temperatur von 37°C und 45°C in Anwesenheit von HSA unabhängig dessen Konzentration schließen (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 16).

Nicht schlüssig ist allerdings der vermutete Beginn der Freisetzung: sowohl bei einer T_z von 37°C als auch 45°C nahm die Fluoreszenzintensität ab der ersten Minute zu. In der ersten Minute liegt die in den Küvetten erreichte Temperatur $\leq 37^\circ\text{C}$. Dennoch gibt es eine gewisse Temperaturabhängigkeit. Bei Temperaturen bis 30°C zeigten sich keine Abweichungen der Kurvenverläufe FITC-Dextran beladener TSL gegenüber freiem FITC-Dextran in den gewählten HSA-Verdünnungen. Falls die Fluoreszenzintensitätszunahme durch eine Freisetzung bedingt ist, dann wiese dies auf eine Porenbildung in Anwesenheit von HSA auch bei DPPG₂ hin und würde bei einer Temperatur weit unter der Phasenumwandlungstemperatur auftreten (zwischen 34-37°C). Falls dies zutreffen würde, würden die getesteten TSL beim Einsatz im Menschen schon bei einer physiologischen Temperatur ihren Inhalt freisetzen.

Dies widerspricht dem beschriebenen Freisetzungsverhalten für CF aus vergangenen Versuchen für beide Formulierungen in Anwesenheit von HSA. Hierbei schien HSA bei einer Temperatur von 37°C einen stabilisierenden Effekt auf die TSL zu haben. Allerdings zeigte sich in diesen Versuchen für Temperaturen um die Phasenumwandlungstemperatur dann eine erhöhte CF-Freisetzung. (Hossann et al. 2012)

Es stellt sich bei Betrachtung der in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse die Frage, ob der Versuchsaufbau, im Falle der HSA-Verdünnungen, in der Lage ist die Fragestellung aussagekräftig zu beantworten.

Auffällig ist, dass sich bei der Erwärmung reinen FITC-Dextran in HSA-Verdünnungen nicht der typische temperaturabhängige Kurvenverlauf präsentiert (vgl. Abbildung 6). Dieser zeigt sich sonst unabhängig des verwendeten Puffers. HSA scheint demnach einen unbekanntem Effekt auf die Intensität des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes und dessen Temperaturabhängigkeit zu haben. Daher kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die angenommene Interaktion zwischen HSA und FITC-Dextran einen Einfluss auf das detektierte Verhalten der TSL hat.

Bekanntermaßen kann Albumin ab 37°C die „grain boundaries“ stabilisieren und so für eine raschere Freisetzung sorgen (Hossann et al. 2012; Hosokawa et al. 2003). Wenn HSA hierfür in Membranlücken eindringt und so die „grain boundaries“ erweitert, würde so Raum für den FITC-Anteil des FITC-Dextrans in der Membran entstehen - ähnlich wie für den „frühen Peak“ beschrieben (vgl. Kapitel 6.1.7). Falls HSA auch bei niedrigeren Temperaturen zum Teil derartig in die Membran eindringen würde, könnte bereits dann eine Intensitätszunahme ohne eine tatsächliche Freisetzung entstehen. Dies wären keine stabilen Veränderungen. Aber sie könnten einen temperaturabhängigen Intensitätsabfall kaschieren, indem mit steigender Temperatur zunehmend HSA in Membranlücken eindringt und dadurch immer mehr Platz für FITC-Anteile des FITC-Dextrans in der TSL-Membran schafft. Dies würde erklären, warum keine Temperaturabhängigkeit nachweisbar ist. Wenn im Verlauf die Erwärmung fortschreitet, könnte sich ein Gleichgewicht einpendeln und so zu den stabilen Fluoreszenzintensitätswerten führen. Eine tatsächliche Freisetzung ließe sich weder von diesen Artefakten unterscheiden noch unter diesen Bedingungen nachweisen.

Dass das deutlich größere FITC-Dextran hingegen früher von den TSL freigesetzt wird als CF ist nicht plausibel. Deshalb weisen die Ergebnisse auf ein fehlerhaftes System zumindest in Hinblick auf die HSA-Verdünnungen hin. Daher konnte mit diesem Versuchsaufbau keine Aussage über den Einfluss von HSA auf eine mögliche Porenbildung getroffen werden.

6.2.2 FITC-Dextran in IgG

Wie in Abbildung 18 dargestellt zeigte sich bei der Erwärmung der LTSL auf 45°C in der IgG-Verdünnung von 0,5 g/100ml gegenüber der 2 g/100ml-Verdünnung ein früher einsetzender Intensitätsanstieg. Die Triton-Zugabe löst eine vergleichbare Intensitätszunahme ($\Delta I = 52 \pm 3 \text{ a.u.}$) ausgehend von demselben konstanten Wert ($616 \pm 2 \text{ a.u.}$) aus. Es handelt sich damit um eine gleich stark ausgeprägte Freisetzung nach Tritonzugabe.

Der Anstieg scheint bei höherer IgG-Konzentration nicht früher aufzutreten. Es ergibt sich also keine lineare Konzentrationsabhängigkeit. Es handelte sich daher am ehesten um eine zufällige Varianz, da auch in HN-Puffer die Freisetzung nicht immer genau zeitgleich auftrat. Dies liegt sowohl in der Varianz der Temperaturzunahme in

den einzelnen Küvetten als auch in der Anfälligkeit des Versuchsaufbaus für Mischungsproblemen und der damit abweichenden Wärmeverteilung begründet.

Zusammenfassend lässt sich keine sicherere Einflussnahme von IgG auf die FITC-Dextran-Freisetzung aus LTSL feststellen. Diese Schlussfolgerung deckt sich mit Ergebnissen aus früheren Untersuchungen, die ebenfalls keinen Stabilitätsverlust in Anwesenheit von IgG in Bezug auf eine CF-Freisetzung zeigen konnten (Hossann et al. 2012), wobei LTSL weitestgehend neutral geladen sind (vgl. Tabelle 9) und IgG eher mit anionischen TSL interagiert (Weissmann et al. 1974)

Der in Abbildung 17 dargestellten vorübergehende Intensitätsanstieg zwischen der 5. und 10. Minute von DPPG₂-TSL in IgG-Verdünnungen könnte eine minimale FITC-Dextran-Freisetzung verbergen. Da diese Intensitätszunahme in der Größenordnung von 1% der Gesamtfluoreszenz in weiteren Versuchen nicht reproduziert werden konnte, handelt es sich hierbei am ehesten um eine zufällige Schwankung im Rahmen der Systemlimitationen (vgl. Abschnitt 6.1.1).

Die Triton-Zugabe löst in allen IgG-Verdünnungen und in HN-Puffer einen ähnlichen Intensitätsanstieg aus. Dies spricht ebenfalls gegen eine Freisetzung. Der Zusatz von IgG scheint demnach keine Freisetzung des FITC-Dextran aus dieser Formulierung zu bewirken. In früheren Versuchen konnte hingegen ein verstärkender Effekt von IgG auf die Freisetzung des deutlich kleineren CF aus DPPG₂-TSL gezeigt werden (Hossann et al. 2012).

Zusammenfassend lässt sich in dieser Arbeit durch die Zugabe von HSA oder IgG kein verändertes Freisetzungsverhalten der TSL-Formulierungen beweisen.

HSA scheint selbst einen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften von FITC-Dextran zu haben, weshalb die Ergebnisse nicht interpretierbar sind.

Die Anwesenheit von IgG scheint die FITC-Dextran-Freisetzung aus DPPG₂-TSL und LTSL ebenfalls nicht signifikant zu beeinflussen. Dies spricht dafür, dass die durch Hossann et al. 2012 beschriebenen Interaktionen von IgG mit DPPG₂-TSL zu keinen

so großen Membrandefekten in DPPG₂-TSL führen, dass FITC-Dextran freigesetzt werden kann (vgl. Hossann et al. 2012).

6.2.3 FITC-Dextran Freisetzung in den Mizellenbildner HePC und P-Lyso-PC

Das Erhitzen von TSL in Mizellenbildner-HN-Puffer-Gemischen führte zu den temperaturabhängigen unter Abschnitten 5.7.3 und 5.7.4 beschriebenen Veränderungen im Kurvenverlauf in Abhängigkeit der HePC- bzw. P-Lyso-PC-Konzentration.

So schien die FITC-Dextran-Freisetzung aus LTSL in Anwesenheit der zugegeben Mizellenbildner früher einzusetzen und stärker auszufallen. Es zeigte sich in Abbildung 21 im dargestellten Intensitätsverlauf in HePC 10mol% eine verstärkte Freisetzung im Vergleich zu HN-Puffer.

In den Verdünnungen mit zugesetztem P-Lyso-PC fiel die FITC-Dextran-Freisetzung am deutlichsten für die höchste P-Lyso-PC-Konzentration aus (vgl. Abbildung 26).

Hieraus lässt sich schließen, dass die Zugabe von micellären P-Lyso-PC bzw. HePC konzentrationsabhängig eine Freisetzung durch vermehrte Porenbildung begünstigt. Möglich ist dies, da ein Austausch zwischen micellären Lysolipiden und den TSL stattfinden kann (Sandström et al. 2005). Die Wahrscheinlichkeit eines Überwechselns der zugesetzten Lysolipide in die Liposomenmembran steigt mit höherer zugeführter Lysolipidkonzentration.

In Anwesenheit von Lysolipiden zeigt sich bei der Erwärmung von DPPG₂-TSL über die Phasenumwandlungstemperatur hinaus ebenfalls eine Freisetzung (vgl. Abbildung 19; Abbildung 23). Dies spricht für eine Porenbildung, verursacht durch die zugegeben Lysolipide via Inkorporation in die TSL-Membran. Zudem ist es ein wichtiger und indirekter Beweis, dass Mizellenbildner notwendig für die Porenbildung und in diesem Versuchsaufbau konsekutiv für die FITC-Dextran-Freisetzung sind.

Des Weiteren widerspricht dies der Theorie, dass das Herauslösen von Lysolipiden aus der Liposomenmembran die Ursache der schnellen Freisetzung ist.

Der Effekt der Tritonzugabe ist in den exemplarisch dargestellten Kinetiken in Abbildung 19 in der 10 mol% HePC-Verdünnung am geringsten ausgeprägt

($\Delta I=64\text{a.u.}$), was für eine größere Freisetzung als in den anderen Proben ($\Delta I=77\pm 5\text{a.u.}$) sprechen könnte. Dies wäre durch o.g. Hypothese des Einbaus der Lysolipide schlüssig zu erklären. Aufgrund der eingeschränkten quantitativen Beurteilbarkeit ist eine definitive Aussage nicht möglich.

In Abbildung 24 ist exemplarisch die Erwärmung von DPPG₂-TSL in Gegenwart von exogen zugesetztem P-Lyso-PC dargestellt: die Endfluoreszenzintensität zwischen der TSL-Probe in 10 mol% P-Lyso-PC ($I_{\text{End}}=492\pm 2\text{a.u.}$) und der in dem mitgelaufenen HN-Puffer ($I_{\text{End}}=488\pm 1\text{a.u.}$) war hierbei fast identisch, sodass sich die Intensitätsveränderungen der beiden Proben vergleichen lassen. Die Intensitätszunahme in HN-Puffer betrug hierbei $\Delta I=48\text{a.u.}$, die in der Probe in 10mol% P-Lyso-PC insgesamt 49a.u. Wobei die temperaturabhängige Freisetzung in der 6. Minute $\Delta I_{\text{Temp}}=32\text{a.u.}$ ausmachte, d.h. ca. 65% betrug.

Die FITC-Dextran-Freisetzung für beide Formulierungen ist umso stärker, je höher die zugesetzte Lysolipidkonzentration ist. Insgesamt scheint der Effekt jedoch für P-Lyso-PC stärker ausgeprägt zu sein als für HePC, was auf die unterschiedliche Molekülstruktur der Lysolipide zurückzuführen sein könnte.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse die Theorie, dass Lysolipide der Schlüssel des Freisetzungsmechanismus für LTSL sind, da DPPG₂-TSL mit exogen zugesetzten Lysolipiden zur Freisetzung von FITC-Dextran bei Temperaturen über T_m gebracht werden können.

6.3 Zellkulturexperimente

In den Zellkulturexperimenten sollte die Interaktion zwischen den TSL und BN175 und das Schicksal der TSL in der Zellkultur untersucht werden. Hierfür wurden TSL hergestellt, die mit einem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff (Rh-PE) und einem hydrophilen Fluoreszenzfarbstoff (CF, FITC-Dextran) markiert wurden. Durch Färbung einzelner Zellkompartimente durch DAPI und DiD konnten die TSL in Zellkultur verfolgt werden.

6.3.1 Anhaftung von TSL an BN175

Eine nachgewiesene fleckförmige Rh-PE-Fluoreszenz im Zellbereich (vgl. Abbildung 28 b+e, Kreise) weist auf eine Interaktion der TSL mit den Zellen der Reihe BN175 hin, z.B. in Form einer Anhaftung oder sogar einer anschließenden Aufnahme. Der Nachweis von Rh-PE im Zellbereich gelang für beide TSL-Formulierungen. Die Rh-PE-Fluoreszenzintensität ist stärker ausgeprägt bei Zellen, die mit DPPG₂-TSL/Rh-PE inkubiert worden sind als mit LTSL/Rh-PE inkubierten BN175 (vgl. Abbildung 28 b+e). Da dieselbe Verdünnung der TSL und Rh-PE-Konzentration gewählt wurde, lässt sich hieraus schließen, dass eine stärkere Interaktion der DPPG₂-TSL/Rh-PE mit BN175 vorliegt. Die Ursache der unterschiedlichen Interaktion kann die differierende Liposomenformulierung sein und damit in den unterschiedlichen Lipiden begründet liegen.

So wurden PEG-ylierte TSL entwickelt, um die TSL vor einer Opsonierung und einer Aufnahme durch das RES zu schützen (Momekova et al. 2007; Woodle 1995; Woodle et al. 1994). Die PEG-ylung könnte ebenfalls eine Interaktion mit BN175 behindern, sodass DSPE-PEG₂₀₀₀ die geringere Rh-PE-Fluoreszenz und die fehlende intrazelluläre CF-Aufnahme bedingt.

Des Weiteren unterscheiden sich die Ladungen der beiden TSL-Formulierungen: DPPG₂-TSL und DPPG₂-TSL/Rh-PE sind deutlich anionischer als LTSL und LTSL/Rh-PE. Dies kann ebenso eine Erklärung für das unterschiedliche Interaktionsmaß mit BN175 sein. Zwar könnte eine Interaktion prinzipiell durch den Übertritt von Rh-PE aus der Liposomenmembran in die Zellmembran nur vorgetäuscht werden, dies ist jedoch unwahrscheinlich, da Rh-PE nicht regelhaft zwischen zwei Lipidmembranen wechselt (Chazotte 2011).

Eine CF-Fluoreszenz mit Konzentration auf den Zellbereich zeigte sich ausschließlich für die Zellen, die mit DPPG₂-TSL/Rh-PE inkubiert worden sind. Eine derartig verteilte Fluoreszenz des hydrophilen CF ohne gleichzeitige Ortskorrelation mit Rh-PE spricht für eine Anwesenheit von nicht-liposomalem CF im Zytosol.

Das könnte durch direkte Aufnahme reinen CF aufgrund eines „drug leakage“ aus TSL in die Zellen entstanden sein. Betrachtet man die temperaturabhängigen Öffnungsprofile der verwendeten TSL nach 60 Minuten bei 37°C, so finden sich

prozentuale Freisetzungsraten von <5% für DPPG₂-TSL (Daten nicht gezeigt). Damit ist ein „drug leakage“ keine schlüssige Erklärung.

Eine Interaktion zwischen TSL und Zellen könnte ebenfalls zu einer Aufnahme von CF in die Zellen führen. Da die Interaktion bei DPPG₂-TSL/Rh-PE deutlich stärker ausgeprägt ist, wäre dies eine Erklärung für die detektierbare CF-Fluoreszenzintensität bei Inkubation der Zellen mit DPPG₂-TSL/Rh-PE.

Durch die geringe Ortsauflösung des verwendeten Mikroskops kann lediglich eine Interaktion zwischen BN175 und den TSL festgehalten werden. Eine Unterscheidung zwischen einer Anhaftung und einer Endozytose, lässt sich nicht beweisen.

Eine Endozytose mit konsekutiver Freisetzung des CF wäre eine mögliche Erklärung für die beschriebene Fluoreszenzverteilung bei Inkubation mit DPPG₂/Rh-PE-TSL.

Die unter Abschnitt 5.8.1 erläuterte im Verlauf ablassende Fluoreszenzintensität von CF und Rh-PE lässt sich zum Teil durch Bleachingeffekte erklären, aber auch durch den Abbau der Fluoreszenzfarbstoffe durch die Zellen. Es zeigte sich, dass BN175 auch nach Versuchsende wuchsen. Beides spricht für die Vitalität der beobachteten Zellen und gegen eine erhebliche akute Zytotoxizität der verwendeten TSL.

6.3.2 Endozytose der TSL

Da nur eine geringe Interaktion der LTSL/Rh-PE im Sinne einer Anhaftung beobachtet wurde, bei DPPG₂-TSL/Rh-PE jedoch a.e. eine Endozytose, wurden in Folgendem nur DPPG₂-TSL/Rh-PE näher untersucht.

Die unter Abschnitt 5.8.2 beschriebenen Ergebnisse konnten eine Interaktion der DPPG₂-TSL/Rh-PE bestätigen. Eine Anhaftung intakter TSL an die Zellmembran konnte nicht bewiesen werden, da bei der dokumentierten membranständigen Rh-PE-Fluoreszenz keine FITC-Dextran-Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte (vgl. grüner Kreis in Abbildung 29 a-d). Dadurch, dass es unwahrscheinlich ist, dass Rh-PE aus den TSL in die Zellmembran wechselt, ist die wahrscheinlichste Erklärung hierfür, dass das vorhandene FITC-Dextran an dieser Stelle so gering konzentriert ist, dass es nicht nachweisbar ist.

Analog zu CF zeigt sich für FITC-Dextran eine erhöhte intrazelluläre Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz (vgl. Abbildung 29). Wie bereits für CF beschrieben, könnte dies entweder durch eine FITC-Dextran Aufnahme bei „drug leakage“ der TSL oder durch überschüssiges FITC-Dextran in der TSL-Lösung oder durch Endozytose der DPPG₂-TSL mit konsekutiver Freisetzung bedingt sein.

Gegen ungewollte Freisetzung spricht, dass für DPPG₂-TSL bei Erwärmung auf 37°C keine FITC-Dextran-Freisetzung gezeigt wurde. Auch für das deutlich kleinere CF konnte bei Erwärmung auf 37°C keine Freisetzung gezeigt werden. (vgl. Abbildung 9, Abbildung 7)

Eine nachweisbare FITC-Dextran-Aufnahme durch die Tumorzellen bei überschüssigen FITC-Dextran im Medium konnte widerlegt werden: Bei Zugabe von reinem FITC-Dextran in einer Verdünnung von 5mg/ml zu BN175 und anschließender Inkubation, zeigte sich beim Mikroskopieren kein intrazelluläres FITC-Dextran (Daten nicht gezeigt).

Auf die Färbung der Zellmembran durch DiD wurde letztendlich verzichtet, da DiD alleine eingesetzt die Zellmembran flächig anfärbte, aber bei gleichzeitigem Einsatz von Rh-PE nur teilweise die Zellmembran und zum Teil Konglomerate aus Rh-PE und FITC-Dextran anfärbte (vgl. Abbildung 30; gelber, langer Pfeil). DiD könnte daher eine höhere Affinität zu den Liposomenmembranen als zu den Zellmembranen haben.

Es zeigte sich auch intrazellulär DiD gemeinsam mit Rh-PE (vgl. Abbildung 30; doppelter, blauer Kreis). Das intrazelluläre Auftreten von DiD, könnte für eine nicht intakte Zellmembran, für eine Aufnahme angehafteter TSL nach Durchführung der Zellmembranfärbung oder als ungewünschte Anregung sprechen.

Falls DiD tatsächlich intrazellulär aufgrund von Membrandefekten und dadurch bedingter Zellschädigung auftritt, könnte das intrazelluläre Rh-PE und FITC-Dextran ein reines Artefakt sein.

Die Zellen wuchsen bei Verwendung dieser Substanzen nach Versuchsende nicht weiter, was für eine Zytotoxizität spricht. Da wie zuvor beschrieben die TSL an sich nicht zytotoxisch waren (vgl. Abschnitt 6.3.1), muss die Zytotoxizität durch DiD (Kang et al. 2014), DMSO oder DAPI entstehen. Diese drei Substanzen besitzen

bekanntermaßen zytotoxische Eigenschaften (Kang et al. 2014): DAPI färbt Doppelstrang-DNA an und durchdringt, um in den Zellkern gelangen zu können, die Zellmembran (Kapuscinski 1995; Tanious et al. 1992). DMSO kann zytotoxisch wirken, in der verwendeten Konzentration (<0,2%) sollte es jedoch zu keiner relevanten Zytotoxizität führen (Qi et al. 2008; Da Violante et al. 2002). Es kann aber als zusätzlich schädigender Einfluss nicht ausgeschlossen werden.

In einem Experiment, in dem ausschließlich mit FITC-Dextran beladenen DPPG₂-TSL/Rh-PE verwendet wurden, ließ sich weiterhin Rh-PE und FITC-Dextran intrazellulär nachweisen. Damit konnte das Vortäuschen einer Endozytose der TSL durch die Substanzen DAPI, DiD und DMSO widerlegt werden. Hierbei konnte das intrazelluläre Kompartiment durch einen Zellkernanschnitt und die im Durchlicht betrachtete Zellgrenze vom Extrazellularraum abgegrenzt werden. Die so behandelten Zellen wuchsen nach Versuchsende weiter, sodass eine relevante Membranschädigung ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend ist daher DiD in diesem Versuchsaufbau aufgrund einer Koanregung durch den Rh-PE-Filter nicht zum Anfärben der Zellmembran geeignet.

Das gleichzeitige Auftreten von Rh-PE und FITC-Dextran bzw. CF im Inneren der Zelle in Zusammenschau mit den erörterten Resultaten aller Ergebnisse sprechen dafür, dass intakte TSL via Endozytose in die Zellen aufgenommen und konsekutiv zerstört werden, was in einer intrazellulären Freisetzung von FITC-Dextran resultiert.

Einschränkend ist festzuhalten, dass Rh-PE selbst als Ligand fungieren könnte und damit das Zusetzen von Rh-PE zu der TSL-Membran das Aufnahmeverhalten der TSL beeinflussen könnte. So wurde das Fluorophor Rhodamin als Trigger einer Clathrin-vermittelten Endozytose in Verbindung gebracht (Huth et al. 2006). In einer Arbeit von Torchilin et al. (2001) fand jedoch bei Liposomen, die mit Rh-PE markiert waren, nicht zwangsläufig eine Endozytose statt. Dass Rh-PE nicht als alleiniger Ligand einer Endozytose fungierte, wird durch den unter Abschnitt 5.8.1 beschriebenen Versuch erhärtet. LTSL/Rh-PE zeigten eine geringere Interaktion mit BN175 fest. Das alleinige Zusetzen von Rh-PE scheint demnach nicht der entscheidende Faktor für eine intrazelluläre Aufnahme zu sein. Die LTSL/Rh-PE könnten insbesondere durch das DSPE-PEG₂₀₀₀ vor einer zellulären Aufnahme geschützt sein.

Ob die postulierte Endozytose spezifisch oder unspezifisch erfolgt, lässt sich durch diesen Versuch nicht ermitteln. Hierzu könnte man weiterführend z.B. die Clathrin-vermittelte Endozytose durch Eps15-Mutante GFP-E Δ 95/29 blockieren (Benmerah et al., 1999), um Hinweise auf eine Clathrin-vermittelte Endozytose überprüfen.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Freisetzungsmechanismus von DPPG₂-TSL im Vergleich zu LTSL sowie Interaktionen mit potentiellen Zielzellen näher zu untersuchen.

Erstmalig wurde hierfür hochmolekulares FITC-Dextran in DPPG₂-TSL eingeschlossen und mithilfe der in vitro Öffnungskinetik eine qualitative Analyse der FITC-Dextran-Freisetzung aus TSL in HN-Puffer angewandt.

Bei DPPG₂-TSL handelt es sich um TSL mit langer Zirkulationsdauer, die ihre Wirkstoffe ultraschnell bei Erwärmung über die $T_m=42^\circ\text{C}$ freisetzen (Kneidl et al. 2014). Der genaue Freisetzungsmechanismus aus DPPG₂-TSL ist nicht bekannt und daher vor ihrem medizinischen Einsatz im Menschen von bedeutendem Interesse. Bei den als Vergleich verwendeten LTSL wird die ultraschnelle Freisetzung hingegen über eine Porenbildung von P-Lyso-PC und Stabilisierung von DSPE-PEG₂₀₀₀ erklärt (Landon et al. 2011; Mills und Needham 2005).

Mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten in-vitro Öffnungskinetik konnte - trotz der beschriebenen Limitationen - gezeigt werden, dass DPPG₂-TSL kleine Moleküle wie CF, jedoch nicht hochmolekulare Substanzen wie FITC-Dextran im Bereich der T_m freisetzen. Damit konnte eine Freisetzung via Porenbildung widerlegt werden, eine Freisetzung über „grain boundaries“ ist damit wahrscheinlich. Die Zuführung von exogenen Lysolipiden (P-Lyso-PC) bzw. Alkylphosphocholine (HePC, Miltefosin) induzierte dagegen eine temperaturabhängige Freisetzung. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mizellenbildner die Schlüsselfunktion in der Substratfreisetzung einnehmen und Ergebnisse bestätigen, in denen der Einbau von HePC in TSL zu einer erhöhten Freisetzungsrates führte (Lindner et al. 2008).

Des Weiteren konnte die Ausgangshypothese, dass LTSL hydrophile Substanzen via Porenbildung freisetzen, indirekt belegt werden.

Ein Einfluss von Serumproteinen auf das Freisetzungsverhalten hochmolekularer Moleküle konnte dagegen in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, HSA und IgG induzierten also selbst keine Porenbildung. Die von Hossann et al. 2012 beschriebene erhöhte Freisetzung scheint daher eher auf eine Stabilisierung der „grain boundaries“

durch HSA bzw. IgG zu beruhen. Einschränkend ist festzuhalten, dass HSA scheinbar selbst einen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften von FITC-Dextran hat, weshalb die Ergebnisse nicht abschließend interpretierbar sind.

Die ermittelten Ergebnisse liefern wichtige Informationen zum klinischen Einsatz der DPPG₂-TSL und machen weitere Untersuchungen mit HePC interessant: Kleine, hydrophile Moleküle wie Doxorubicin lassen sich freisetzen. Möchte man dagegen größere, hydrophile Moleküle aus TSL freisetzen, könnte eine Integration von HePC in die Membran der TSL eine Freisetzung ermöglichen. HePC hätte gegenüber P-Lyso-PC den Vorteil, dass es eine höhere Stabilität besitzt, selbst eine zytotoxische Wirkung besitzt und zur Behandlung bei Hautmetastasen von Brustkrebs zugelassen ist. Dies kann den klinischen Einsatz von DPPG₂-TSL in Kombination mit HePC für interessant machen. Hierzu müssten jedoch weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte eine Interaktion von TSL sowohl der Formulierung LTSL/Rh-PE als auch DPPG₂-TSL/Rh-PE mit Weichteilsarkomzellen der Ratte (Zellreihe BN175) gezeigt werden. Es konnten zudem Hinweise für eine Endozytose von DPPG₂-TSL/Rh-PE in die Weichteilsarkomzellen gesammelt werden. Um mögliche Endozytosewege zu differenzieren, könnten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
CF	Carboxyfluorescein
DAPI	4'6 - Diamidin-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DiD	1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3 -tetramethylindodicarbocyanine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPPC-TSL	TSL aus DPPC
DPPG ₂	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphodiglycerin
DPPG ₂ -TSL	TSL der Formulierung DPPC/DSPC/DPPG ₂
DPPG ₂ -TSL/Rh-PE	DPPG ₂ -TSL beladen mit Rh-PE
DSPC	1,2- Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSPE-PEG ₂₀₀₀	1,2-Dipalmitoyl-sn-gycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-amino(polyethylen-glycol)-2000]
Em	Emission
EPR-Effekt	Permeabilitäts- und Retentions-Effekt
Ex	Exzitation
FCS	Fetales Kälberserum, „fetal calf serum“

FITC-Dextran	Fluorescein isothiocyanat-Dextran
HePC	Hexadecylphosphocholin, Miltefosin
HSA	humanes Serumalbumin
IgG	Immunglobulin G
L _o	flüssig-geordnete Gelphase
LTSL	TSL der Formulierung DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG ₂₀₀₀
LTSL/Rh-PE	LTSL beladen mit Rh-PE
L _α	flüssig-kristalline Phase, flüssig-ungeordneten Phase
L _β	solide Phase
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung, „phosphate buffered saline“
PDI	Polydispersionsindex
PEG	Polyethylenglycol
P-Lyso-PC	1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
RES	Retikuloendothelialen System
Rh-PE	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N(lissamine rhodamine B sulfonyl)
RHT	regionale Hyperthermie
RT	Raumtemperatur
T _m	Phasenumwandlungstemperatur
Triton	Triton X-100

TSL	Thermosensitive Liposomen
T_z	Zieltemperatur
VR	Verdünnungsreihe
Λ	Wellenlänge

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Lipide	18
Tabelle 2: verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	19
Tabelle 3: verwendete Chemikalien und Lösungsmittel.....	19
Tabelle 4: verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	21
Tabelle 5: verwendete Lösungen zur Zellkultivierung	22
Tabelle 6: verwendetes Verbrauchsmaterial.....	23
Tabelle 7: verwendete Geräte	24
Tabelle 8: verwendete Software	26
Tabelle 9: Charakterisierung der hergestellten und verwendeten TSL	26
Tabelle 10: verwendete TSL-Lösungen im TSL-Anhaftungsversuch.....	36
Tabelle 11: Fluoreszenzfarbstoffe und ihr angefärbtes Kompartiment	37
Tabelle 12: verwendete Färbelösungen im TSL-Endozytose-Versuch	38
Tabelle 13: Größenverteilung von FITC-Dextran in HN-Puffer	39
Tabelle 14: Größenanalyse von mit FITC-Dextran beladenen DPPC-TSL.....	49

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spontane Zusammenlagerung von Lipidmolekülen	7
Abbildung 2: Veränderungen einer Lipiddoppelmembran bei Erwärmung	11
Abbildung 3: Darstellung der verschiedenen Freisetzungshypothesen	13
Abbildung 4: Quenchen von FITC-Dextran in HN-Puffer	39
Abbildung 5: Fluoreszenzintensität von CF bzw. FITC-Dextran.....	41

95

Abbildung 6:	Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran in HSA bzw. IgG	41
Abbildung 7:	Prozentuale Freisetzung von CF aus DPPG ₂ -TSL.....	43
Abbildung 8:	Prozentuale Freisetzung von CF aus LTSL	43
Abbildung 9:	DPPG ₂ -TSL in HN-Puffer, T _Z =30°C, 37°C, 45°C	44
Abbildung 10:	LTSL in HN-Puffer, T _Z =30°C, 37°C, 45°C	46
Abbildung 11:	„früher Peak“: Intensitätsverlaufskurven der LTSL, T _Z =45°C	47
Abbildung 12:	DPPC-TSL in HN-Puffer, T _Z =30°C, 37°C, 45°C	48
Abbildung 13:	LTSL beladen mit FITC-Dextran bzw. CF, T _Z =45°C	50
Abbildung 14:	DPPG ₂ -TSL beladen mit CF bzw. FITC-Dextran, T _Z =45°C.....	51
Abbildung 15:	DPPG ₂ -TSL in HSA-Verdünnungen, T _Z =45°C	52
Abbildung 16:	LTSL in HSA-Verdünnungen, T _Z =45°C	54
Abbildung 17:	DPPG ₂ -TSL in IgG-Verdünnungen, T _Z =45°C	55
Abbildung 18:	LTSL in IgG-Verdünnungen, T _Z =45°C.....	56
Abbildung 19:	DPPG ₂ - in HePC-Verdünnungen, T _Z =45°C.....	57
Abbildung 20:	DPPG ₂ -TSL in HePC-Verdünnungen, T _Z =37°C	58
Abbildung 21:	LTSL in HePC-Verdünnungen, T _Z =45°C.....	59
Abbildung 22:	LTSL in HePC-Verdünnungen, T _Z =30°C.....	60
Abbildung 23:	DPPG ₂ -TSL in P-Lyso-PC-Verdünnungen / HN-Puffer, T _Z =45° ...	61
Abbildung 24:	DPPG ₂ -TSL in P-Lyso-PC-Verdünnung / HN-Puffer, T _Z =45°C, Ausschnitt.....	62
Abbildung 25:	DPPG ₂ -TSL in P-Lyso-PC-Verdünnungen / HN-Puffer, T _Z =37°C .	63
Abbildung 26:	LTSL in P-Lyso-PC-Verdünnungen, T _Z =45°C	64
Abbildung 27:	LTSL in P-Lyso-PC-Verdünnungen, T _Z =30°C	65
Abbildung 28:	BN175 unter Durchlicht, Rh-PE- bzw. CF-Filter	67
Abbildung 29:	BN175 mit L _{Rh} -PE/FITC-Dextran-TSL inkubiert.....	69
Abbildung 30:	BN175 mit L _{Rh} -PE/FITC-Dextran-TSL inkubiert, Vergrößerung.....	70

9 Literaturverzeichnis

Allen, T. M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redemann, C.; Yau-Young, A. (1991): Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. In: *Biochimica et biophysica acta* 1066 (1), S. 29–36.

Anyarambhatla, G.; Needham, D. (1999): Enhancement of the phase transition permeability of DPPC liposomes by incorporation of MPPC: A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia. In: *Journal of Liposome Research* (9), S. 491–506.

Auguste, D. T.; Furman, K.; Wong, A.; Fuller, J.; Armes, S. P.; Deming, T. J.; Langer, R. (2008): Triggered release of siRNA from poly(ethylene glycol)-protected, pH-dependent liposomes. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 130 (3), S. 266–274. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.06.004.

Banerjee, J.; Hanson, A. J.; Gadam, B.; Elegbede, A. I.; Tobwala, S.; Ganguly, B. et al. (2009): Release of liposomal contents by cell-secreted matrix metalloproteinase-9. In: *Bioconjugate chemistry* 20 (7), S. 1332–1339. DOI: 10.1021/bc9000646.

Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. (1965): Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. In: *Journal of molecular biology* 13 (1), S. 238–252.

Bangham, J. A.; Lea, E. J. (1978): The interaction of detergents with bilayer lipid membranes. In: *Biochimica et biophysica acta* 511 (3), S. 388–396.

Bergmann, L.; Dorfmüller, T.; Kassing, R.; Kleinermanns, K.; Schaefer, C. (2006): Lehrbuch der Experimentalphysik. Zum Gebrauch bei akademischen Vorlesungen und zum Selbststudium. 2., überarb. Aufl. Berlin [u.a.]: De Gruyter (Lehrbuch der Experimentalphysik, / Bergmann; Schaefer ; Bd. 5).

Berry, G.; Billingham, M.; Alderman, E.; Richardson, P.; Torti, F.; Lum, B. et al. (1998): The use of cardiac biopsy to demonstrate reduced cardiotoxicity in AIDS Kaposi's sarcoma patients treated with pegylated liposomal doxorubicin. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 9 (7), S. 711–716.

Bertrand, N.; Wu, J.; Xu, X.; Kamaly, N.; Farokhzad, O. C. (2014): Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. In: *Advanced drug delivery reviews* 66, S. 2–25. DOI: 10.1016/j.addr.2013.11.009.

Black C.D.V.; Parker R.J.; Puri A.; Scherphof, G. L. (1990): Liposomes in biological systems. In: R.R.C. New (ed) *Liposomes: A practical approach*, S. 221–252.

Boomer, J. A.; Qualls, Marquita M.; Inerowicz, H. Dorota; Haynes, R. H.; Patri, V. Srilakshmi; Kim, J.; Thompson, D. H. (2009): Cytoplasmic delivery of liposomal contents mediated by an acid-labile cholesterol-vinyl ether-PEG conjugate. In: *Bioconjugate chemistry* 20 (1), S. 47–59. DOI: 10.1021/bc800239b.

Cattel, L.; Ceruti, M.; Dosio, F. (2004): From conventional to stealth liposomes: a new Frontier in cancer chemotherapy. In: *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 16 Suppl 4, S. 94–97. DOI: 10.1179/joc.2004.16.4.94.

Charrois, G. J. R.; Allen, T. M. (2004): Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. In: *Biochimica et biophysica acta* 1663 (1-2), S. 167–177. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.03.006.

Chazotte, B. (2011): Labeling membranes with fluorescent phosphatidylethanolamine. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2011 (5), pdb.prot5621. DOI: 10.1101/pdb.prot5621.

Cole, L.; Coleman, J.; Evans, D.; Hawes, C. (1990): Internalisation of fluorescein isothiocyanate and fluorescein isothiocyanatedextran by suspension-cultured plant cells. In: *Journal of Cell Science* (96), S. 721–730.

Corvera, E.; Mouritsen, O. G.; Singer, M. A.; Zuckermann, M. J. (1992): The permeability and the effect of acyl-chain length for phospholipid bilayers containing cholesterol: theory and experiment. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1107 (2), S. 261–270. DOI: 10.1016/0005-2736(92)90413-G.

Cruzeiro-Hansson, L.; Mouritsen, O. G. (1988): Passive ion permeability of lipid membranes modelled via lipid-domain interfacial area. In: *Biochimica et biophysica acta* 944 (1), S. 63–72.

Da Violante, G.; Zerrouk, N.; Richard, I.; Provot, G.; Chaumeil, J. C.; Arnaud, P. (2002): Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25 (12), S. 1600–1603. DOI: 10.1248/bpb.25.1600.

Deshpande, P. P.; Biswas, S.; Torchilin, V. P. (2013): Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. In: *Nanomedicine (London, England)* 8 (9), S. 1509–1528. DOI: 10.2217/nnm.13.118.

Dromi, S.; Frenkel, V.; Luk, A.; Traugher, B.; Angstadt, M.; Bur, M. et al. (2007): Pulsed-high intensity focused ultrasound and low temperature-sensitive liposomes for enhanced targeted drug delivery and antitumor effect. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (9), S. 2722–2727. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2443.

ElBayoumi, T. A.; Torchilin, V. P. (2009): Tumor-targeted nanomedicines: enhanced antitumor efficacy in vivo of doxorubicin-loaded, long-circulating liposomes modified with cancer-specific monoclonal antibody. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (6), S. 1973–1980. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2392.

Gaber, M. H.; Hong, K.; Huang, S. K.; Papahadjopoulos, D. (1995): Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma. In: *Pharmaceutical research* 12 (10), S. 1407–1416.

Hauck, M. L.; LaRue, S. M.; Petros, W. P.; Poulson, J. M.; Yu, D.; Spasojevic, I.; Amy F. et al. (2006): Phase I trial of doxorubicin-containing low temperature sensitive liposomes in spontaneous canine tumors. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (13), S. 4004–4010. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0226.

Hays, L. M.; Crowe, J. H.; Wolkers, W.; Rudenko, S. (2001): Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipid vesicles during thermotropic phase transitions. In: *Cryobiology* 42 (2), S. 88–102. DOI: 10.1006/cryo.2001.2307.

- Hillaireau, H.; Couvreur, P. (2009): Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66 (17), S. 2873–2896. DOI: 10.1007/s00018-009-0053-z.
- Hosokawa, T.; Sami, M.; Kato, Y.; Hayakawa, E. (2003): Alteration in the temperature-dependent content release property of thermosensitive liposomes in plasma. In: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 51 (11), S. 1227–1232.
- Hossann, M.; Syunyaeva, Z.; Schmidt, R.; Zengerle, A.; Eibl, H.; Issels, R. D.; Lindner, L. H. (2012): Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes. In: *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 162 (2), S. 400–406. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.032.
- Hossann, M.; Wiggenhorn, M.; Schwerdt, A.; Wachholz, K.; Teichert, N., Eibl, H.; Issels, R. D.; Lindner, L. H. (2007): In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1768 (10), S. 2491–2499. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.05.021.
- Howard, Frank B.; Levin, Ira W. (2010): Lipid vesicle aggregation induced by cooling. In: *International journal of molecular sciences* 11 (2), S. 754–761. DOI: 10.3390/ijms11020754.
- Huth, U. S.; Schubert, R.; Peschka-Süss, R. (2006): Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. In: *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 110 (3), S. 490–504. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.10.018.
- Ickenstein, L. M.; Arfvidsson, M. C.; Needham, D.; Mayer, L. D.; Edwards, K. (2003): Disc formation in cholesterol-free liposomes during phase transition. In: *Biochimica et biophysica acta* 1614 (2), S. 135–138.
- Israelachvili, J. (1992): *Intermolecular and Surface Forces*, vol. 2 Academic Press, San Diego.
- Issels, R. D. (2008): Hyperthermia adds to chemotherapy. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 44 (17), S. 2546–2554. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.07.038.

Issels, R. D.; Lindner, L. H.; Verweij, J.; Wust, P.; Reichardt, P.; Schem, B. et al. (2010): Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. In: *The Lancet. Oncology* 11 (6), S. 561–570. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70071-1.

Kaasgaard, T.; Andresen, T. L.; Jensen, S. S.; Holte, R. O.; Jensen, L. T.; Jørgensen, K. (2009): Liposomes containing alkylated methotrexate analogues for phospholipase A(2) mediated tumor targeted drug delivery. In: *Chemistry and physics of lipids* 157 (2), S. 94–103. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2008.11.005.

Kang, S.; Lee, S.; Na, J. H.; Yoon, H. I.; Lee, D.; Koo, H. et al. (2014): Cell labeling and tracking method without distorted signals by phagocytosis of macrophages. In: *Theranostics* 4 (4), S. 420–431. DOI: 10.7150/thno.7265.

Kapuscinski, J. (1995): DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. In: *Biotechnic and Histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission* 70 (5), S. 220–233.

Keck, C. M.; Müller, R. H. (2009): *Moderne pharmazeutische Technologie*. Berlin.

Khandelia, H.; Ipsen, J. H.; Mouritsen, O. G. (2008): The impact of peptides on lipid membranes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (7-8), S. 1528–1536. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.02.009.

Kim, J. H.; Kim, M. W. (2007): Temperature effect on the transport dynamics of a small molecule through a liposome bilayer. In: *The European physical journal. E, Soft matter* 23 (3), S. 313–317. DOI: 10.1140/epje/i2006-10212-0.

Kneidl, B.; Peller, M.; Winter, G.; Lindner, L. H.; Hossann, M. (2014): Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. In: *International journal of nanomedicine* 9, S. 4387–4398. DOI: 10.2147/IJN.S49297.

Landon, C. D.; Park, J.; Needham, D.; Dewhirst, M. W. (2011): Nanoscale Drug Delivery and Hyperthermia: The Materials Design and Preclinical and Clinical Testing of Low Temperature-Sensitive Liposomes Used in Combination with Mild Hyperthermia in the Treatment of Local Cancer. In: *The open nanomedicine journal* 3, S. 38–64. DOI: 10.2174/1875933501103010038.

- Lasic, D. D.; Martin, F. J.; Gabizon, A.; Huang, S. K.; Papahadjopoulos, D. (1991): Sterically stabilized liposomes. A hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. In: *Biochimica et biophysica acta* 1070 (1), S. 187–192.
- Lindner, L. H.; Eichhorn, M. E.; Eibl, H.; Teichert, N.; Schmitt-Sody, M.; Issels, R. D.; Dellian, M. (2004): Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (6), S. 2168–2178.
- Lindner, L. H.; Hossann, M. (2010): Factors affecting drug release from liposomes. In: *Current opinion in drug discovery and development* 13 (1), S. 111–123.
- Lindner, L. H.; Hossann, M.; Vogeser, M.; Teichert, N.; Wachholz, K.; Eibl, H. et al. (2008): Dual role of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in thermosensitive liposomes: active ingredient and mediator of drug release. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 125 (2), S. 112–120. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.10.009.
- Marquet, R. L.; Schellekens, H.; Westbroek, D. L.; Jeekel, J. (1983): Effect of treatment with interferon and cyclophosphamide on the growth of a spontaneous liposarcoma in rats. In: *International journal of cancer* 31 (2), S. 223–226.
- Marrink, S. J.; Berendsen, H. J. (1993): Molecular dynamics of water transport through membranes: Water from solvent to solute.
- Marsh, D.; Watts, A.; Knowles, P. F. (1976): Evidence for phase boundary lipid. Permeability of Tempo-choline into dimyristoylphosphatidylcholine vesicles at the phase transition. In: *Biochemistry* 15 (16), S. 3570–3578.
- Mills, J. K.; Needham, D. (2005): Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition. In: *Biochimica et biophysica acta* 1716 (2), S. 77–96. DOI: 10.1016/j.bbamem.2005.08.007.
- Momekova, D.; Rangelov, S.; Yanev, S.; Nikolova, E.; Konstantinov, S.; Romberg, B. et al. (2007): Long-circulating, pH-sensitive liposomes sterically stabilized by copolymers bearing short blocks of lipid-mimetic units. In: *European journal of*

pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences 32 (4-5), S. 308–317. DOI: 10.1016/j.ejps.2007.08.009.

Moumaris, M.; Rajoelya, B.; Abuafa, N. (2015): Fluorescein Isothiocyanate-Dextran can Track Apoptosis and Necrosis Induced by Heat Shock of Peripheral Blood Mononuclear Cells and HeLa Cells. In: *Open Biological Sciences Journal* 1 (1), S. 7–15. DOI: 10.2174/2352633501501010007.

Mouritsen, O. G.; Zuckermann, M. J. (1987): Model of interfacial melting. In: *Physical Review Letters* 58 (4), S. 389–392. DOI: 10.1103/PhysRevLett.58.389.

Mouritsen, O. G., Jorgensen, K., Honger, T. (1995): Permeability of lipid bilayers near the phase transition. In: *Permeability and Stability of Lipid Bilayers*, S. 137–160.

Nagle, J. F.; Scott, H. L. (1978): Lateral compressibility of lipid mono- and bilayers. Theory of membrane permeability. In: *Biochimica et biophysica acta* 513 (2), S. 236–243.

Needham, D.; Anyarambhatla, G.; Kong, G.; Dewhurst, M. W. (2000): A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. In: *Cancer research* 60 (5), S. 1197–1201.

Ong, W.; Yang, Y.; Cruciano, A. C.; McCarley, R. L. (2008): Redox-triggered contents release from liposomes. In: *Journal of the American Chemical Society* 130 (44), S. 14739–14744. DOI: 10.1021/ja8050469.

Paasonen, L.; Laaksonen, T.; Johans, C.; Yliperttula, M.; Kontturi, K.; Urtti, A. (2007): Gold nanoparticles enable selective light-induced contents release from liposomes. In: *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 122 (1), S. 86–93. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.06.009.

Papahadjopoulos, D.; Jacobson, K.; Nir, S.; Isac, T. (1973): Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. In: *Biochimica et biophysica acta* 311 (3), S. 330–348.

Ponce, A. M.; Vujaskovic, Z.; Yuan, F.; Needham, D.; Dewhurst, M. W. (2006): Hyperthermia mediated liposomal drug delivery. In: *International journal of hyperthermia: the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology*,

North American Hyperthermia Group 22 (3), S. 205–213. DOI: 10.1080/02656730600582956.

Qi, W.; Ding, D.; Salvi, R. J. (2008): Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures. In: *Hearing research* 236 (1-2), S. 52–60. DOI: 10.1016/j.heares.2007.12.002.

Rassow, J. (2012): *Biochemie*. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

Saad, M.; Garbuzenko, O. B.; Ber, E.; Chandna, P.; Khandare, J. J.; Pozharov, V. P.; Minko, T. (2008): Receptor targeted polymers, dendrimers, liposomes: which nanocarrier is the most efficient for tumor-specific treatment and imaging? In: *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 130 (2), S. 107–114. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.05.024.

Sabín, J.; Prieto, G.; Ruso, J. M.; Messina, P. V.; Salgado, F. J.; Nogueira, M. et al. (2009): Interactions between DMPC liposomes and the serum blood proteins HSA and IgG. In: *The journal of physical chemistry. B* 113 (6), S. 1655–1661. DOI: 10.1021/jp804641e.

Sandström, M. C.; Ickenstein, L. M.; Edwards, K. (2005): Effects of lipid segregation and lysolipid dissociation on drug release from thermosensitive liposomes. In: *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 107 (1), S. 131–142. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.06.001.

Schroeder, A.; Kost, J.; Barenholz, Y. (2009): Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. In: *Chemistry and physics of lipids* 162 (1-2), S. 1–16. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2009.08.003.

Shimanouchi, T.; Ishii, H.; Yoshimoto, N.; Umakoshi, H.; Kuboi, R. (2009): Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization. In: *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 73 (1), S. 156–160. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.014.

Tanious, F. A.; Veal, J. M.; Buczak, H.; Ratmeyer, L. S.; Wilson, W. D. (1992): DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove

binding at AT sites and intercalation at AU sites. In: *Biochemistry* 31 (12), S. 3103–3112.

Torchilin, V. P. (2005): Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. In: *Nature reviews. Drug discovery* 4 (2), S. 145–160. DOI: 10.1038/nrd1632.

Torchilin, V. P. (2006): Multifunctional nanocarriers. In: *Advanced drug delivery reviews* 58 (14), S. 1532–1555. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.009.

Torchilin, V. P.; Rammohan, R.; Weissig, V.; Levchenko, T. S. (2001): TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (15), S. 8786–8791. DOI: 10.1073/pnas.151247498.

van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. (2008): Membrane lipids: where they are and how they behave. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (2), S. 112–124. DOI: 10.1038/nrm2330.

Volodkin, D. V.; Skirtach, A. G.; Möhwald, H. (2009): Near-IR remote release from assemblies of liposomes and nanoparticles. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48 (10), S. 1807–1809. DOI: 10.1002/anie.200805572.

Weissmann, G.; Brand, A.; Franklin, E. C. (1974): Interaction of immunoglobulins with liposomes. In: *The Journal of clinical investigation* 53 (2), S. 536–543. DOI: 10.1172/JCI107587.

Woodle, M. C. (1995): Sterically stabilized liposome therapeutics. In: *Advanced drug delivery reviews* 16 (2-3), S. 249–265. DOI: 10.1016/0169-409X(95)00028-6.

Woodle, M. C.; Newman, M. S.; Cohen, J. A. (1994): Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. In: *Journal of drug targeting* 2 (5), S. 397–403. DOI: 10.3109/10611869408996815.

Wu, G.; Mikhailovsky, A.; Khant, H. A.; Fu, C.; Chiu, W.; Zasadzinski, J. A. (2008): Remotely triggered liposome release by near-infrared light absorption via hollow gold nanoshells. In: *Journal of the American Chemical Society* 130 (26), S. 8175–8177. DOI: 10.1021/ja802656d.

- Xiang, T.; Anderson, B. D. (2006): Liposomal drug transport: a molecular perspective from molecular dynamics simulations in lipid bilayers. In: *Advanced drug delivery reviews* 58 (12-13), S. 1357–1378. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.002.
- Xing, M.; Yan, F.; Yu, S.; Shen, P. (2015): Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. In: *PLOS ONE* 10 (7), e0133569. DOI: 10.1371/journal.pone.0133569.
- Yan, Xuedong; Scherphof, Gerrit L.; Kamps, Jan A A M (2005): Liposome opsonization. In: *Journal of liposome research* 15 (1-2), S. 109–139. DOI: 10.1081/LPR-64971.
- Yatvin, M. B.; Weinstein, J. N.; Dennis, W. H.; Blumenthal, R. (1978): Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. In: *Science (New York, N.Y.)* 202 (4374), S. 1290–1293.
- Zimmermann, K.; Hossann, M.; Hirschberger, J.; Troedson, K.; Peller, M.; Schneider, M. et al. (2016): A pilot trial of doxorubicin containing phosphatidylglycerol based thermosensitive liposomes in spontaneous feline soft tissue sarcoma. In: *International journal of hyperthermia: the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, S. 1–13. DOI: 10.1080/02656736.2016.1230233.

DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Lars Lindner und Herrn Dr. Martin Hossann: durch meine Aufnahme in die AG Liposomen und durch die spannende Aufgabenstellung haben sie mein Interesse für das Gebiet der thermosensitiven Liposomen geweckt. Für ihre Betreuung - sei es in produktiven Diskussionen oder durch ihre Anregungen - möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Dr. Hossann danke ich darüber hinaus noch für seine lückenlose Unterstützung im Labor.

Ein weiteres „Dankeschön“ gilt Anja Zengerle, MTA, die vor allem am Anfang bereitwillig ihre Zeit opferte, um mir die im Labor etablierten Methoden nahe zu bringen.

Bei Simone Limmer, meiner Mitdoktorandin, möchte ich mich insbesondere dafür bedanken, dass sie mich in das Reich der Zellkultur eingeführt hat.

Johannes Budweiser, meinem Mitdoktoranden, möchte ich für die kompetente Unterstützung bei den „DC's“ und die moralische Unterstützung während der Dissertationszeit danken.

Jeder einzelne von ihnen hat sowohl durch seine fachliche, als auch menschliche Unterstützung dafür gesorgt, dass jeder Tag im Labor äußerst angenehm und in einer konstruktiven, bereichernden Atmosphäre stattfand. Vielen Dank.

Eidesstattliche Versicherung

Alig, Annabel

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchungen zum Freisetzungsmechanismus neuartiger, auf Phosphatidylglycerin-basierender sowie pegylierter, Lysolipid-haltiger thermosensitiver Liposomen und deren Schicksal in Zellkultur

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 02. Januar 2019
Ort, Datum

Annabel Alig
Unterschrift Doktorandin