

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin  
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main,  
medizinische Klinik II, Schwerpunkt: Pneumologie / Allergologie  
(Direktor: Prof. Dr. Prof. Dr. W. Caspary)

Sind Nanopartikel als Trägersystem für  
den Gentransfer in Bronchialepithelzellen geeignet?:  
Untersuchungen in der Zellkultur

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Martin Dariusz Brzoska  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2002

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. T.O.F. Wagner

Koreferent: Prof. Dr. R. Busse

Tag der mündlichen Prüfung: Donnerstag, 04. März 2004

---

## **Vorwort**

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis Mai 2001 am Institut für Pneumologie und Allergologie der medizinischen Klinik II der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Verantwortung von Herrn Prof. Dr. T.O.F. Wagner angefertigt.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. T.O.F. Wagner für die Auswahl und Überlassung des Themas, für wertvolle konstruktive Kritik, Diskussionen und Anregungen und ferner auch für die Unterstützung meiner Kongressbeiträge.

Herrn Dr. Christian von Mallinckrodt als meinem Betreuer möchte ich in besonderer Weise für die Einarbeitung in die Methoden, Diskussionen und Anregungen, für die kollegiale Zusammenarbeit und das in mich gesetzte Vertrauen danken.

Großer Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Klaus Langer vom Institut für pharmazeutische Technologie am Biozentrum der Johann Wolfgang Goethe-Universität (Institutsleiter Prof. Dr. J. Kreuter) für die Nanopartikelherstellung, die Arbeit am konfokalen Laserrastermikroskop, die Hilfe bei der Literaturrecherche und nicht zuletzt für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Genauso möchte ich Herrn Conrad Coester für die Nanopartikelherstellung und insbesondere Frau Stephanie Reiss für die Zusammenarbeit bei verschiedenen Transfektionsexperimenten danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Zegelman, Herrn Prof. Dr. Altmannsberger und Herrn Dr. Dörmer vom Nordwestkrankenhaus in Frankfurt am Main für die Möglichkeit, primäre Bronchialepithelzellen zu gewinnen.

---

Weiter gilt mein Dank Frau Bärbel Aulbach für die freundschaftliche Zusammenarbeit und für ihre Mithilfe bei zahlreichen Interleukin-8-Bestimmungen.

Ich danke Herrn Stefan Loitsch und Frau Christiane Franke für Diskussionen, kollegiale Zusammenarbeit und den Austausch von Erfahrungen und Ergebnissen.

Schließlich gilt mein besonderer Dank der Theodor-Stern-Stiftung, die die Nanopartikelforschung an der Johann Wolfgang Goethe-Universität durch Ihre finanzielle Unterstützung gefördert hat.

Martin Brzoska  
Frankfurt am Main, April 2002

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Gentherapie – das Heilmittel für die Mukoviszidose?</b> .....	<b>10</b>
1.1.1	Die Anfänge der Gentherapie – erste Konzepte .....	11
1.1.2	Verschiedene Strategien der Gentherapie .....	12
1.1.3	Die Domänen der Gentherapie .....	13
1.1.3.1	Die Lunge als Ziel der Gentherapie .....	14
1.1.3.2	Mukoviszidose .....	14
1.1.4	Die Zielzellen für die Therapie der Lunge bei Mukoviszidose .....	17
<b>1.2</b>	<b>Die Trägersysteme für die Gentherapie – Viren, Liposomen und Nanopartikel</b> .....	<b>18</b>
1.2.1	Virale Vektoren .....	20
1.2.1.1	Retrovirale Vektoren .....	20
1.2.1.2	Adenovirale Vektoren .....	21
1.2.1.3	Adeno-Assoziierte-Viren .....	21
1.2.2	Kolloidale Trägersysteme.....	22
1.2.2.1	Liposomen .....	22
1.2.2.2	Nanopartikel .....	23
1.2.2.2.1	Die Herstellung von Nanopartikeln .....	23
1.2.2.2.1.1	Polyalkylcyanoakrylate.....	24
1.2.2.2.1.2	Nanopartikel aus Albumin – Albuminnanopartikel.....	25
1.2.2.2.1.3	Nanopartikel aus Gelatine – Gelatinenanopartikel.....	25
1.2.2.2.2	Die Eigenschaften von Nanopartikeln .....	26
1.2.2.2.3	Das Drug-Targeting mit Nanopartikeln .....	27
1.2.2.2.4	Die Mechanismen der zellulären Aufnahme der Nanopartikel .....	29
1.2.2.2.5	Die Bindung von Wirkstoffen an Nanopartikel .....	30
1.2.2.2.6	Der Gentransfer mit Nanopartikeln.....	32
<b>1.3</b>	<b>Die Gentherapie – status quo</b> .....	<b>32</b>
<b>1.4</b>	<b>Hintergrund und Zielsetzung</b> .....	<b>33</b>

---

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>35</b>
2.1.1	Die Nanopartikel	35
2.1.1.1	Die Präparation der Polyalkylcyanoakrylatnanopartikel	35
2.1.1.2	Die Präparation der Gelatinenanopartikel	35
2.1.1.3	Die Präparation der Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA)	36
2.1.1.4	Die Bestimmung der Nanopartikelgröße und -konzentration	37
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Substratlösungen	38
2.1.3	Fluoreszenzmarker	39
2.1.4	Antikörper	40
2.1.5	Medien, Pufferlösungen und Zusätze	40
2.1.6	Die Modifikationen der Medien und Pufferlösungen für den Einsatz in der Zellkultur	41
2.1.6.1	Das Medium zur Kultivierung der Zelllinie 16HBE14o	41
2.1.6.2	Das Medium zur Kultivierung primärer humaner Bronchialepithelzellen	41
2.1.6.3	Der Beschichtungspuffer mit Beschichtungsantikörpern für die Durchführung der IL-8-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	42
2.1.6.4	Das Diluent für die Durchführung der IL-8-ELISA	42
2.1.7	Kulturgefäße und Verbrauchsmaterialien	42
2.1.8	Die Zellen	43
2.1.8.1	Die primären humanen Bronchialepithelzellen	43
2.1.8.2	Die Zelllinie 16HBE14o	45
2.1.9	Geräte	46
2.1.10	Software	47
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>47</b>
2.2.1	Die Zellkultur	47
2.2.1.1	Die Routinemethoden zur Handhabung der Zellen	47

---

2.2.1.2	Die Herstellung von Zellkulturbehältnissen mit Kollagenbeschichtung.....	47
2.2.1.3	Die Gewinnung primärer humaner Bronchialepithelzellen .....	48
2.2.1.4	Die Kultur primärer humaner Bronchialepithelzellen.....	49
2.2.2	Die Kultur der Zelllinie 16HBE14o.....	50
2.2.3	Statistische Methoden.....	51
2.2.3.1	Parametrische Testverfahren .....	51
2.2.3.2	Nichtparametrische Testverfahren.....	51
2.2.3.2.1	Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.....	52
2.2.3.2.2	Berechnung des Stichprobenumfangs .....	53
2.2.4	Die Zytotoxizitätstests .....	54
2.2.4.1	Der direkte Vergleich der Zytotoxizität der verschiedenen Nanopartikel .....	55
2.2.4.2	Die Kinetik der Zytotoxizität .....	56
2.2.5	Die Untersuchungen zur Nanopartikelaufnahme in Bronchialepithelzellen .....	56
2.2.5.1	Das Grundlegendes Prinzip der Untersuchungen zur Nanopartikelaufnahme.....	57
2.2.5.2	Die Messungen mit dem konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM) .....	57
2.2.5.2.1	Die Versuchsanordnung zur qualitativen Beurteilung der Nanopartikelaufnahme mit dem konfokalen Laserrastermikroskop.....	58
2.2.5.2.2	Die Auswertung der Bilder des konfokalen Laserrastermikroskops .....	59
2.2.5.3	Die Untersuchungen mit Hilfe des Durchflußzytometers .....	60
2.2.5.3.1	Die Versuchsanordnung zur Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme in Bronchialepithelzellen.....	62
2.2.5.3.1.1	Die Versuche mit suspendierten Zellen .....	63
2.2.5.3.1.2	Die Versuche mit adhärennten Zellen.....	63
2.2.5.3.2	Die Auswertung der Daten aus der Durchflußzytometrie ..	64

---

2.2.6	Die quantitative Interleukin-8-Bestimmung.....	64
2.2.6.1	Interleukin 8 .....	64
2.2.6.2	IL-8 Bestimmung mittels eines ELISA.....	65
2.2.6.3	Die Versuchsanordnung der IL-8 ELISA.....	67
2.2.6.3.1	Das Beschichten der Mikrotiterplatte.....	67
2.2.6.3.2	Die Herstellung des Standards.....	68
2.2.6.3.3	Die Behandlung der Proben .....	68
2.2.6.3.4	Die Messung der Proben.....	69
2.2.6.4	Die Auswertung der Ergebnisse der IL-8-ELISA.....	69
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Zytotoxizitätstests .....</b>	<b>70</b>
3.1.1	Der direkte Vergleich der Zytotoxizität der verschiedenen Nanopartikel.....	70
3.1.1.1	Der zytotoxische Effekt der verschiedenen Nanopartikel auf primäre humane Bronchialepithelzellen.....	70
3.1.1.2	Der zytotoxische Effekt auf die Zelllinie 16HBE14o .....	76
3.1.2	Die Kinetik der Zytotoxizität – Prüfung auf Späteffekte .....	82
3.1.2.1	Die Ergebnisse mit primären Bronchialepithelzellen.....	82
3.1.2.2	Die Ergebnisse mit 16HBE14o-Zellen .....	87
<b>3.2</b>	<b>Der qualitative Nachweis der Nanopartikelaufnahme in Bronchialepithelzellen mit Hilfe des konfokalen Laserrastermikroskops.....</b>	<b>91</b>
3.2.1	Die Ergebnisse mit 16HBE14o-Zellen.....	91
3.2.2	Die Ergebnisse mit primären Bronchialepithelzellen .....	91
<b>3.3</b>	<b>Die Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme mit Hilfe des Durchflußzytometers.....</b>	<b>98</b>
3.3.1	Die Ergebnisse mit primären humanen Bronchialepithelzellen .....	98
3.3.2	Die Ergebnisse mit 16HBE14o-Zellen.....	106
3.3.2.1	Die Versuche mit suspendierten Zellen .....	106
3.3.2.2	Die Versuche mit Zellrasen.....	107



---

<b>3.4 Die Quantitative IL-8 Bestimmung zur Untersuchung des inflammatorischen Potenzials von Nanopartikeln.....</b>	<b>110</b>
3.4.1 Die Ergebnisse mit primären Bronchialepithelzellen .....	110
3.4.2 Die Ergebnisse mit 16HBE14o-Zellen.....	112
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>114</b>
<b>4.1 Zytotoxizität von Nanopartikeln auf Bronchialepithelzellen.....</b>	<b>114</b>
<b>4.2 Beurteilung der intrazellulären Verteilung von Nanopartikeln in Bronchialepithelzellen mit Hilfe des konfokalen Laserrastermikroskops.....</b>	<b>115</b>
<b>4.3 Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme unter Zuhilfenahme des Durchflußzytometers.....</b>	<b>117</b>
<b>4.4 IL-8-ELISA zur Untersuchung der von Nanopartikeln hervorgerufenen Inflammation.....</b>	<b>118</b>
<b>4.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>119</b>
<b>5 Zusammenfassungen.....</b>	<b>122</b>
5.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache .....	122
5.2 Zusammenfassung in englischer Sprache.....	123
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>141</b>
7.1 Verzeichnis der Abkürzungen .....	141
7.2 Kongressbeiträge.....	144
7.3 Tabellarischer Lebenslauf .....	145
7.4 Ehrenwörtliche Erklärung.....	149

---

# 1 Einleitung

## ***1.1 Die Gentherapie – das Heilmittel für die Mukoviszidose?***

Die Gentherapie ist die Behandlung von Pathologien mit genetischem Material. Das medizinische Potenzial dieses Konzeptes ist gewaltig: Die Gentherapie stellt eine Reihe von bedeutenden Therapiemöglichkeiten in Aussicht wie die Ausschaltung von Erbkrankheiten und eine effektivere Behandlung von Tumoren. Abgesehen von der Heilung solcher Krankheiten verspricht die Gentherapie sogar die Möglichkeit der Prävention vieler Störungen durch den Einsatz schützender Gene (Verma und Somia 1997).

Die praktische Machbarkeit der Gentherapie wurde gezeigt, kurz nachdem der genetische Defekt der Mukoviszidose (Synonym: Zystische Fibrose, engl.: cystic fibrosis, CF) geklont werden konnte (Rommens et al. 1989; Riordan et al. 1989; Kerem et al. 1989). Es gelang, den Chloridtransport von Bronchialepithelzellen mit einem defekten CFTR-Ionenkanal (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) in der Zellkultur durch Transfektion mit dem Wildtyp des CFTR-Kanals zu normalisieren (Rich et al. 1990). Gleiches glückte zur selben Zeit am Beispiel der Pankreasadenokarzinom-Zelllinie CFPAC-1 (Drumm et al. 1990). Da ein Defekt im Chloridtransport wesentlich an der Pathogenese der Mukoviszidose beteiligt ist (Pilewski und Frizzell 1999), ließ dies die Gentherapie zu diesem Zeitpunkt möglich erscheinen (vgl. Kapitel 1.1.3.2).

---

### 1.1.1 Die Anfänge der Gentherapie – erste Konzepte

Die Idee für die Gentherapie entstand ursprünglich aus den Konzepten für die Genmanipulation (engl.: genetic engineering). Der entscheidende Schritt, der zur Entstehung der Gentherapie führte, war die gedankliche Übertragung der Genmanipulation auf den Menschen. Die ersten wissenschaftlich begründeten Konzepte für die Gentherapie am Menschen wurden am 26. Mai 1966 auf einem Symposium des Columbia University College in New York veröffentlicht. Auf diesem Symposium namens „Reflections on Research and the Future of Medicine“ stellte Tatum erstmals Konzepte für die Gentherapie am Menschen vor, wobei er Viren als mögliche Trägersysteme nannte (Tatum 1966).

Ein Jahr später, am 11. August 1967, wurden erstmals auch die sozialen und ethischen Konsequenzen dieses Konzepts öffentlich diskutiert. Nirenberg schrieb dazu in einem Leitartikel:

(...) man may be able to program his own cells with synthetic information long before he will be able to assess adequately the long-term consequences of such alterations. (...) when man becomes capable of instructing his own cells, he must refrain from doing so until he has sufficient wisdom to use this knowledge for the benefit of mankind.

(freie Übersetzung: der Mensch könnte in der Lage sein, seine eigenen Zellen künstlich zu steuern, bevor er in adäquater Weise die Konsequenzen dieser Manipulation einzuschätzen weiß. Wenn der Mensch in der Lage ist, seine eigenen Zellen zu steuern, so muss er davon absehen, bis er weise genug geworden ist, dieses Wissen zum Wohle der Menschheit einzusetzen.)

Damit wies er erstmals auf die Verantwortung hin, die eine Genmanipulation von Zellen in sich birgt. Allerdings war man zu dieser Zeit noch nicht in der Lage diese Konzepte in die Tat umzusetzen. Dies änderte sich als Cohen und Boyer

---

1973 das molekulare Klonen erstmalig beschrieben und in der Lage waren rekombinante DNA zu erzeugen (Cohen et al. 1973). Sowohl Wissenschaftler als auch Politiker äußerten ihre Bedenken vor den möglichen Gefahren. Vor allem wurde die Weltöffentlichkeit auf diese neue Technologie und ihre Gefahren aufmerksam. So kam es 1976 zur Verfassung von Richtlinien zur Forschung auf dem Gebiet rekombinanter DNA. In dieser Zeit fanden massive Protestaktionen statt, und erst gegen Ende der 70er Jahre begann die Angst vor dem Entweichen von „Killerbakterien“ aus den Labors der Wissenschaftler wieder zu sinken. Seitdem dauert die Diskussion über die Anwendung rekombinanter DNA am Menschen bis heute an (Anderson 1997).

### **1.1.2 Verschiedene Strategien der Gentherapie**

Die Keimzell-Gentherapie führt durch die Veränderung des Genoms einer Keimzelle zur Entstehung von Lebewesen, deren Zellen in ihrer Gesamtheit verändert sind und die dieses veränderte Genom an ihre Nachkommen weitergeben. Allerdings wird diese Strategie der Gentherapie aus verschiedenen Gründen, vor allem der Möglichkeit des Missbrauchs zur „Menschenzüchtung“, abgelehnt.

Im Gegensatz zur Keimzell-Gentherapie beschränkt sich die somatische Gentherapie auf die Behandlung der Gewebe des Erkrankten, die für den pathophysiologischen Zustand verantwortlich sind. Hierbei wird nur eine Auswahl von Zellen des gesamten Organismus verändert, wobei vor allem die Keimzellen und damit das an Nachkommen weitergegebene Genom unangetastet bleiben (Bargon und Buhl 1996).

Ein ethisches Dilemma entsteht, wenn die Grenzen zwischen somatischer und Keimzell-Gentherapie verwaschen sind, d.h. wenn auch eine somatische Gentherapie als Nebenwirkung zur „Korrektur“ der Keimzellen führt. Oben genannter Grund für die Ablehnung der Keimzell-Gentherapie ist gegen die Möglichkeit abzuwägen, einem Kranken eine effektive Therapie anzubieten (Mohr 2000).

---

Wenn die somatische Gentherapie den Zweck hat, pathophysiologische Zustände durch genetische Veränderung von Geweben zu heilen, so muss man feststellen, dass der selbe Effekt auch durch Transplantation von Geweben erzielt werden kann, die das gewünschte Merkmal bereits besitzen. Mangels Erfahrung mit der Gentherapie als Behandlungsmethode steht noch nicht fest, ob eine somatische Gentherapie vorteilhafter für den Patienten ist als eine Organtransplantation. Beispielsweise könnte auch eine Gentherapie durch den Transfer neuer Gene zu immunologischen Reaktion gegen die behandelten Organe führen.

Weiterhin besteht neben dem Einsatz menschlicher Gene auch die Möglichkeit des Einsatzes solcher, die sich ausschließlich bei Tieren, Mikroorganismen oder Pflanzen finden. Der Einsatz letzterer beim Menschen verursacht ethische Konflikte durch die Schaffung transgener Menschen.

Schließlich muss die genetische Behandlung der Zellen eines Individuums nicht in situ erfolgen, denn es gibt Überlegungen die Zellen vor der Gentherapie zu extrahieren, und in der Kultur zu behandeln. Erfolgreich behandelte Zellen könnten sodann herausgefiltert, vermehrt und dem Patienten wieder zurückgegeben werden (Tatum 1966). Diese Vorgehensweise wird „ex vivo gene therapy“ genannt (Verma und Somia 1997).

### **1.1.3 Die Domänen der Gentherapie**

Besonders geeignet für die Gentherapie sind nach dem aktuellen Wissensstand Erbkrankheiten, bei denen die Erkrankung auf den Defekt eines einzelnen bekannten Gens zurückzuführen ist. Zu dieser Gruppe gehören die Haemophilie, die familiäre Hypercholesterinämie, die Mukoviszidose, verschiedene Haemoglobinopathien wie die Thalassämie und die Sichelzellanämie, die Glukozerebrosidose Gaucher und der  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel (Verma und Somia 1997; Walther und Stein 2000).

Gentherapeutische Behandlungsansätze beschränken sich nicht ausschließlich auf Erbkrankheiten, sondern ziehen auch erworbene und degenerative Störungen in Betracht. Hierzu zählen der Morbus Parkinson, der Morbus

---

Alzheimer, die Arteriosklerose, virale Infektionen wie AIDS und Hepatitis B und maligne Tumoren (Verma und Somia 1997; Walther und Stein 2000).

Neuerdings wird auch eine genetische Hyposensibilisierungstherapie bei Allergien diskutiert. Hierbei sollen anstatt der Allergene selbst, deren geklonte Gene verabreicht werden, deren Expression den Hyposensibilisierungseffekt hervorrufen soll (Moffatt und Cookson 1999; Roy et al. 1999).

#### 1.1.3.1 Die Lunge als Ziel der Gentherapie

Die Lunge erweist sich aus verschiedenen Gründen als besonders geeignet:

1. Für eine Reihe an Erkrankungen der Lungen konnte die Ursache auf den Defekt von einzelnen bekannten Genen zurückgeführt werden. Diese Erkrankungen sind die Mukoviszidose und der  $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel.
2. Diese Krankheiten sind relativ häufig.
3. Auch für Lungenkrebs sucht man nach einem genetischen Heilmittel, da die konventionelle Therapie relativ ineffektiv ist.
4. Die Atemwege bieten einen direkten Zugang sowohl zu den Atemwegen der Lunge selbst als auch zum Lungenparenchym, was theoretisch eine in vivo Gentherapie vereinfacht.

#### 1.1.3.2 Mukoviszidose

Als Beispiel hierfür ist die unter Kaukasiern mit einer Inzidenz von 1:2500 (Leutz und Sybrecht 1999) auftretende Zystische Fibrose zu nennen, als deren Ursache 1989 ein Defekt des CFTR-Gens (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) ausgemacht wurde. Das auf dem langen Arm des Chromosoms 7 gelegene CFTR-Gen besteht aus 250 kB und kodiert ein Protein aus 1480 Aminosäuren (Rommens et al. 1989; Riordan et al. 1989; Kerem et al. 1989).

CFTR ist ein ATP-abhängiger und durch cAMP regulierter Chloridkanal, der wiederum die Leitfähigkeit anderer Kanäle, wie zum Beispiel epithelialer Natriumkanäle und Chloridkanäle reguliert (Sheppard und Welsh 1999). Die Störung dieses Kanals führt zu einer Eindickung des von den exokrinen Drüsen

---

des Körpers produzierten Sekrets, was zur Obstruktion der Ausführungsgänge und zum sekundären zystischen und fibrotischen Umbau der betroffenen Organe führt. Betroffen sind insbesondere die Lunge durch die Fehlfunktion der seromukösen Drüsen der Bronchialschleimhaut und die Bauchspeicheldrüse. Diese Störungen gehen einher mit einer pathologischen Steigerung des Natrium und Chloridgehalts im Schweiß (Leutz und Sybrecht 1999).

Bis 1999 konnten über 700 Mutationen des CFTR-Gens mit dem Phänotyp der Mukoviszidose assoziiert werden (Pilewski und Frizzell 1999). Diese Mutationen werden in fünf Klassen eingeteilt, je nachdem welcher Mechanismus für die verringerte Funktion des CFTR-Kanals verantwortlich ist (Welsh und Smith 1993; Pilewski und Frizzell 1999).

Obwohl die Mukoviszidose eine Multiorganerkrankung ist, spielen die respiratorischen Störungen die Hauptrolle, da sie in über 90 % der Fälle für die frühe Mortalität verantwortlich sind (Bargon et al. 1995). Somit ist die Lunge das Zielgewebe für eine somatische Gentherapie der Zystischen Fibrose. Therapeutisch wirksames Agens im Sinne einer Gentherapie ist hierbei der Klon des CFTR-Wildtyps (Caplen 1995a).

Klasse	Art des Defekts
1	Rasterschub-Mutationen oder Stop Kodons führen zu einer verfrühten <b>Beendigung der Translation</b> von CFTR-mRNA. Beispiel sind die Mutationen an Position G542X und R553X.
2	<b>Fehler im Reifeprozess</b> des CFTR-Proteins mit Abbau des korrekt translatierten Proteins bevor es im rauen endoplasmatischen Retikulum weiterverarbeitet werden kann. Die bei der Mukoviszidose am häufigsten vorkommende Mutation an Position F508 gehört in diese Kategorie. Dieser Defekt ist temperatursensitiv, so dass bei 27°C wesentlich mehr funktionierende CFTR-Kanäle die Zellmembran erreichen, als bei 37°C. Weitere Beispiele sind N1202K und ΔI507.
3	Punktmutationen oder Deletionen von einzelnen Aminosäuren führen zur Expression eines CFTR-Proteins, das in seiner <b>Regulation gestört</b> ist und nicht aktiviert werden kann. Ein Beispiel ist die Mutation G551D.
4	Ebenfalls eine Störung der Regulation des Ionenkanals, bei der eine Aktivierung zwar möglich ist, jedoch die <b>Leitfähigkeit für Chlorid</b> auch in aktiviertem Zustand sehr gering ist. R117H, R347P und R334W sind solche Mutationen.
5	Mutationen, die das „ <b>splicing</b> “ der mRNA stören, führen zu einer verminderten Anzahl funktionierender CFTR-Kanäle an der Zelloberfläche.

*Tabelle 1: Klasseneinteilung der Mutationen des CFTR-Gens (Welsh und Smith 1993) (Pilewski und Frizzell 1999)*



---

#### 1.1.4 Die Zielzellen für die Therapie der Lunge bei Mukoviszidose

Die konduktiven Atemwege sind in den oberen Abschnitten mit einem mehrreihigen Flimmerepithel versehen. Dieses enthält viele Bronchialdrüsen, die ein seromuköses Sekret produzieren, und zahlreiche Becherzellen. Die Drüsen bilden einen Schleimfilm, in dem die Kinozilien der apikalen Bronchialepithelzellen schlagen, und so den Schleim zusammen mit Staubpartikeln aus dem Bronchialsystem heraustransportieren. Diesen Reinigungsvorgang nennt man mukozilliäre Clearance. In den Bronchioli wird das Epithel einschichtig, Becherzellen werden seltener und Bronchialdrüsen fehlen vollständig (Duncker 1994).

Als Zielzellen für eine Gentherapie kommen neben Bronchialdrüsenzellen die Bronchialepithelzellen des Respirationstraktes in Frage, denn beide exprimieren bei der Zystischen Fibrose einen defekten CFTR-Ionenkanal. Welche dieser beiden Zellarten letztendlich die größere Bedeutung für die Entstehung dieser Erkrankung besitzt, lässt sich nicht mit entgeltlicher Sicherheit sagen (Boucher 1999).

Die Physiologie dieser Zielzellen ist weiterhin von Bedeutung, da sie ein Hindernis für gentherapeutische Ansätze darstellt. Das Bronchialepithel ist die wichtigste physikalische Barriere für den Schutz des darunter liegenden Gewebes und reinigt über die mukozilliäre Clearance die Atemwege von Staubpartikeln (Duncker 1994). Zu dieser Schutzfunktion gehört ebenfalls die Regulation von Entzündungsprozessen, was bei Bronchialepithelzellen über die Sekretion der Zytokine TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), INF- $\gamma$  (Interferon gamma), GM-CSF (granulocyte-makrophage-colony-stimulating-factor), Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 8 (IL-8), sowie über die Freisetzung von Eicosanoiden wie Prostaglandinen, Leukotrienen und PAF (platelet activating factor) geschieht (Cromwell et al. 1992; Martin et al. 1997). Auch der pulmonale Surfactant nimmt eine Barrierefunktion wahr. So konnte in vitro gezeigt werden, dass die Gentherapie mit Liposomen durch die Bestandteile des Surfactant behindert wird (Duncan et al. 1997).

---

## **1.2 Die Trägersysteme für die Gentherapie – Viren, Liposomen und Nanopartikel**

Um die Gentherapie überhaupt erst möglich zu machen, muss ein Weg gefunden werden, um die therapeutisch wirksame Nukleinsäure intakt in die Zelle und in deren Zellkern zu befördern, weil nur dort durch Transkription die für die Proteinbiosynthese notwendige mRNA entstehen kann (Lehninger et al. 1994; Dreyfuss et al. 1996). Im Idealfall soll diese Einschleusung hochselektiv nur in die vom Gendefekt betroffenen Zellen erfolgen und weiterhin mit einer hohen Transkriptions- und Translationsrate der transportierten Nukleinsäure einhergehen. Diese Bedingungen sind an die Wahl eines geeigneten Trägersystems gebunden, welches den Abbau der Nukleinsäure durch Endonukleasen verhindert, die erfolgreiche Adhäsion an die Zielzelle vermittelt und die anschließende Aufnahme in die Zelle ermöglichen soll. Durch die Auswahl des Trägersystems kann ferner ein Tropismus für bestimmte Gewebe vermittelt werden.

Für die Gentherapie im Bereich des Respirationstraktes wurden in der Vergangenheit hauptsächlich virale Vektoren und Liposomen diskutiert. Nanopartikel sind ein neuer, alternativer Ansatz, der immer mehr an Bedeutung gewinnt, da bei der Etablierung der beiden oben genannten Systeme erhebliche Hindernisse aufgetreten sind, die im folgenden erläutert werden (vgl. Kapitel 1.2.2.1, 1.2.1).

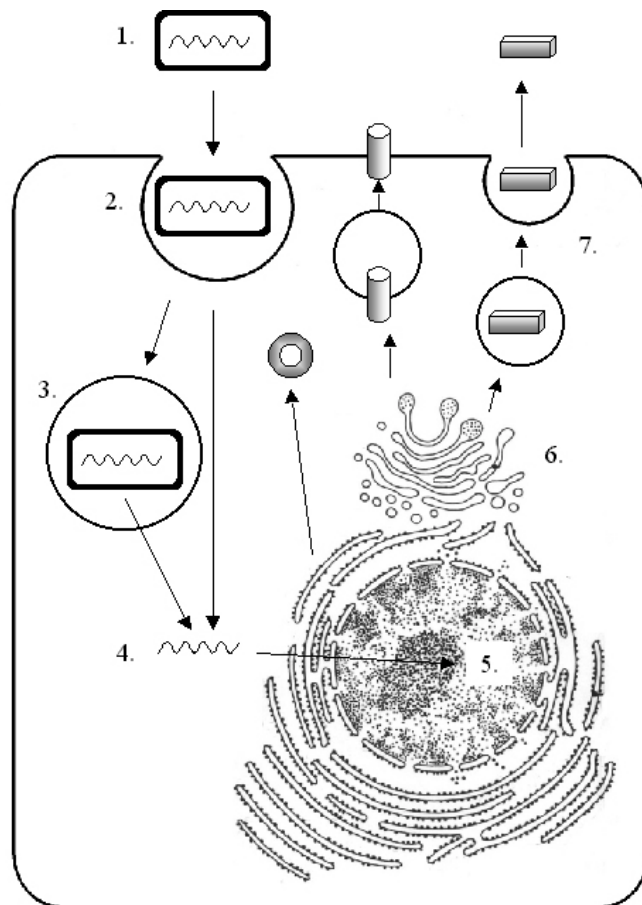


Abbildung 1: Darstellung der wichtigsten Stationen der Gentherapie: 1. Bestückung eines geeigneten Vektors mit der gewünschten Nukleinsäure und dessen Transport zur Zielzelle. 2. Adhäsion des Vektors und Einschleusung in die Zielzelle. 3. Lysosomale Verdauung des Vektors und Freisetzung der Nukleinsäure. 4. Aufnahme der Nukleinsäure in den Kern. 5. Transkription im Zellkern und Translation im RER. 6. Modifikation des entstandenen Proteins im Golgi-Apparat. 7. Transport an den jeweiligen Zielort des Proteins, d.h. Zytoplasma, Plasmamembran oder Extrazellulärraum (nach Bargon und Buhl 1996, modifiziert).

---

## 1.2.1 Virale Vektoren

Bislang wurden viele verschiedene Virusfamilien auf ihre Tauglichkeit für Gentransferzwecke untersucht (Walther und Stein 2000).

### 1.2.1.1 Retrovirale Vektoren

Retroviren sind eine Gruppe von RNA Viren, deren Genom in der infizierten Zelle durch das Enzym Reverse Transkriptase in DNA umgewandelt und in das Genom des Wirtes integriert wird. Das Genom dieser Viren enthält drei Gene, die gag, env und pol genannt werden. Diese sind wiederum umgeben von sogenannten long terminal repeats (LTRs), Sequenzen, die für die Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom zuständig sind. Die viralen Gene können ersetzt werden, zum Beispiel mit dem Wildtyp des CFTR-Gens (vgl. Kapitel 1.1.3.2). Somit bieten die Retroviren die Möglichkeit, ein manipuliertes Genom dauerhaft in das Genom der infizierten Zelle zu integrieren. Mit einem solchen retroviralen Vektor wurde 1990 die Machbarkeit der Gentherapie der zystischen Fibrose in vitro gezeigt (Drumm et al. 1990).

Da die Mehrzahl der Retroviren Zellen nur während der Zellteilung infizieren kann, ist die Domäne der Retroviren die „ex vivo gene therapy“, ein Verfahren bei dem aus einem Organismus extrahierte Zellen in vitro behandelt und vermehrt werden, um sie dann zurück zu verpflanzen.

Eine Ausnahme stellen die Lentiviren dar, eine Gruppe von Retroviren, die sowohl teilende wie auch nicht-teilende Zellen infizieren kann. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Human Immunodeficiency Virus (HIV). Mit Lentiviren lässt sich die bisher dauerhafteste Expression von Transgenen erreichen, nämlich in striatalen und hippocampalen Neuronen der Ratte (Verma und Somia 1997; Blömer et al. 1997). Allerdings infizieren Lentiviren keine Bronchialepithelzellen.

Klinische Studien mit Retroviren liegen zur Zeit nicht vor.

---

### 1.2.1.2 Adenovirale Vektoren

Wegen ihres natürlichen Tropismus für Atemwegsepithelien, scheinen sich Adenoviren für die Gentherapie des Respirationstraktes zu eignen. Außerdem sind sie in der Lage, auch differenzierte, nicht proliferierende Zellen zu infizieren.

Bisherige in vivo Studien mit adenoviralen Vektoren haben gezeigt, dass die Expression des fremden Gens in den transfizierten Zellen nur für kurze Zeit anhält (Zabner et al. 1996; Albelda et al. 2000). Verantwortlich hierfür ist sowohl die zelluläre Immunreaktion von zytotoxischen T-Lymphozyten (Kass-Eisler et al. 1994; Yang et al. 1995) als auch eine sich entwickelnde humorale Immunität, welche die Wirkung des Vektors bei wiederholter Gabe zunehmend einschränkt (Brody et al. 1994; Yei et al. 1994; Dai et al. 1995; McCoy et al. 1995; Yang et al. 1995; Zabner et al. 1996).

Weiterhin scheiterte eine effiziente Therapie der zystischen Fibrose mittels Adenoviren bei Menschen und bei Tieren an der mangelnden Transfereffizienz, so dass eine echte Korrektur des defekten Chloridtransports bisher nicht gelang (Engelhardt et al. 1993; Zabner et al. 1993; Crystal et al. 1994; Hay et al. 1995; Knowles et al. 1995; Zabner et al. 1996; Zabner et al. 1997; Bellon et al. 1997; Zuckerman et al. 1999).

### 1.2.1.3 Adeno-Assoziierte-Viren

Das Adeno-Assoziierte-Virus (AAV) ist ein nicht pathogenes, Einzelstrang-DNA-Virus, das verschiedene Zelltypen infizieren kann. Es benötigt Fremdgene zur Replikation, die gemeinhin durch Helferviren wie Adenoviren oder Herpesviren bereitgestellt werden. Als besonders geeignet für den Gentransfer erscheint AAV, da dieser Vektor virale DNA in das menschliche Genom integrieren kann, hauptsächlich auf Chromosom 19. Aus diesem Grund kann eine Langzeitexpression von eingeschleusten Genen erzielt werden, was präklinische Studien experimentell belegen konnten (Flotte und Carter 1997; Rubenstein et al. 1997). Allerdings bereitet AAV Probleme bei der Transfektion von

---

differenziertem Bronchialepithel (Halbert et al. 1995). Eine erste klinische Studie mit AAV wurde bereits veröffentlicht, die Ergebnisse wiesen jedoch ähnlich geringe Transfereffizienzen auf wie bei Studien mit Adenoviren (Wagner et al. 1998a; Wagner et al. 1998b).

## **1.2.2 Kolloidale Trägersysteme**

Zur Veränderung der Eigenschaften eines Wirkstoffes oder einer Substanz in eine gewünschte Richtung, besteht die Möglichkeit, diese an kolloidale Arzneistoffträger zu binden. Dies sind kolloidale Partikel, deren Teilchengröße sich im Nanometerbereich bewegt. In diese Gruppe gehören die hier beschriebenen Nanopartikel und Liposomen. Beide können mit verschiedenen Methoden und Materialien hergestellt werden und bieten ein Spektrum an Eigenschaften, die sich zur Verbesserung der an diese Strukturen gebundenen Substanzen nutzen lassen. Durch die Kopplung eines Arzneistoffs an einen kolloidalen Träger kann beispielsweise die Stabilität dieses Arzneistoffs verbessert, die Wirkstofffreisetzung kontrolliert (Retardierung) oder eine gewebespezifische Substanzanreicherung erzielt werden (vgl. Kapitel 1.2.2.2.3). Diese Eigenschaften der kolloidalen Arzneistoffträger sollen im Sinne der Gentherapie auf Nukleinsäuren als Arzneistoffe Anwendung finden.

### **1.2.2.1 Liposomen**

Es handelt sich bei Liposomen um künstlich hergestellte, uni- oder multilaminare Vesikel mit einem Durchmesser von 20 nm bis 10 µm deren Membran sich aus Lipiden oder Phospholipiden zusammensetzt (Kahl 1995; Schuber 1998). Sie werden wie die Nanopartikel zu den kolloidalen Trägersystemen gerechnet. Wichtig für eine Anwendung zum Gentransfer sind insbesondere kationische Liposomen wie zum Beispiel DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid), da die positive Oberflächenladung dieser Liposomen mit der negativen Zellmembran interagiert. Außerdem können sie im Gegensatz zu nicht-kationischen Liposomen die Nukleinsäuren nicht nur in ihrem hydrophilen Kern inkorporieren, sondern diese

---

auch durch ionische Wechselwirkungen an der Oberfläche ihrer Membran binden. Mit Nukleinsäuren beladene Liposomen verschmelzen mit der zellulären Lipidmembran, wodurch die Nukleinsäuren in das Zytoplasma entlassen werden.

Ein großer Vorteil von Liposomen ist, dass sie vor allem bei wiederholter Gabe nicht in dem Umfang wie Viren zur Ausbildung einer Entzündung oder Immunreaktion führen (vgl. Kapitel 1.2.1). Allerdings gibt es im Gegensatz zu viralen Vektoren hier keinen Mechanismus, der die Nukleinsäuren in den Zellkern befördert, so dass ein großer Teil den Zellkern nicht erreicht. Dies beeinträchtigt die Effizienz dieses Vektors, was klinische Studien inzwischen gezeigt haben (Bertling et al. 1991; Caplen et al. 1995b; Bargon und Buhl 1996; Gill et al. 1997; Porteous et al. 1997; Albelda et al. 2000).

#### 1.2.2.2 Nanopartikel

Nanopartikel sind aus makromolekularen natürlichen Polymeren, wie zum Beispiel Gelatine und Albumin, und aus Kunststoffen wie Polyalkylcyanoakrylaten und Polymilchsäure hergestellte kolloidale Strukturen, die sich in einem Größenbereich von etwa 15 nm bis 1 µm bewegen (Speiser 1999).

Wichtig für die Auswahl eines geeigneten Materials sind folgende Faktoren:

- Die Möglichkeit des Abbaus dieser Substanz durch zelluläre Enzyme zur Freisetzung des Wirkstoffs,
- eine geeignete Stabilität, die eine Lagerung und das Vordringen zu den Zielzellen ermöglicht und
- eine geringe Toxizität.

##### 1.2.2.2.1 Die Herstellung von Nanopartikeln

Für die Herstellung dieser partikulären Strukturen stehen eine Reihe von etablierten Methoden zur Verfügung, wobei es grundsätzlich zwei unterschiedliche Herstellungsmethoden gibt. Die Nanopartikel werden entweder durch Polymerisation aus dispergierten Monomeren oder durch Dispersion

---

entsprechender Polymere hergestellt (Kreuter 1983a). Durch Polymerisation von Monomeren werden beispielsweise Nanopartikel aus Polyakrylamid, Polyalkylmetakrylaten, Polyalkylcyanoakrylaten oder Polyglutaraldehyd hergestellt. Gelatine- und Albuminnanopartikel hingegen entstehen durch Dispersion entsprechender Makromoleküle. Zur Dispersion eignen sich auch Polymilchsäure und Cellulose-Derivate.

#### 1.2.2.2.1.1 Polyalkylcyanoakrylate

Die Herstellung von Nanopartikeln aus Alkylcyanoakrylaten erfolgt durch eine als anionisch-initiierte Emulsionspolymerisation bezeichnete Methode. Hierzu wird das entsprechende Monomer unter Rühren und Zusatz von Stabilisatoren (nicht-ionischen Emulgatoren, Salzen oder Makromolekülen) in einem wässrigen, sauren Medium dispergiert. Der Polymerisationsprozess (Kettenreaktion) wird gestartet durch die im Wasser vorhandenen Hydroxylionen; die dann entstehenden Oligomer- bzw. Polymerketten besitzen eine verminderte Wasserlöslichkeit und lagern sich schließlich zu Partikeln zusammen. Dementsprechend ermöglicht die Variation des pH-Wertes des Polymerisationsmediums eine Steuerung der Reaktionsgeschwindigkeit und damit auch der Eigenschaften der resultierenden Zubereitungen; dies gilt insbesondere für die Größenverteilung der Nanopartikel (Kreuter 1983a).

Bei der Herstellung der Cyanoakrylate besteht die Möglichkeit, Monomere mit unterschiedlich langen Alkylresten zu verwenden. Dies hat insbesondere Einfluss auf die Biodegradation und Toxizität der Abbauprodukte der Cyanoakrylate und wird im Rahmen dieser Arbeit an Cyanoakrylaten mit Butylseitenketten, sogenannten Polybutylcyanoakrylaten (PBCA), und mit Hexylseitenketten, den Polyhexylcyanoakrylaten (PHCA), untersucht.



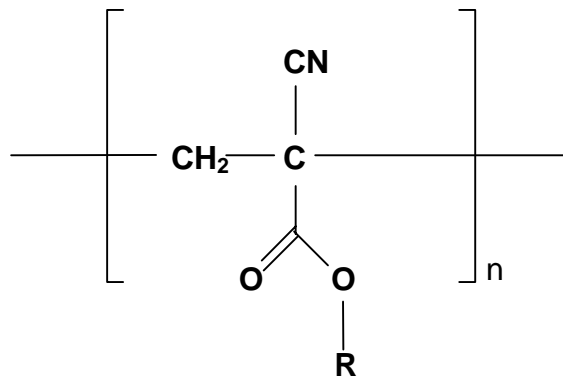


Abbildung 2: Strukturformel der Cyanoakrylate. R kennzeichnet den Alkylrest.

Cyanoakrylate sind in der Medizin als Gewebeklebstoffe bekannt und zur Verwendung beim Menschen zugelassen.

#### 1.2.2.2.1.2 Nanopartikel aus Albumin – Albuminnanopartikel

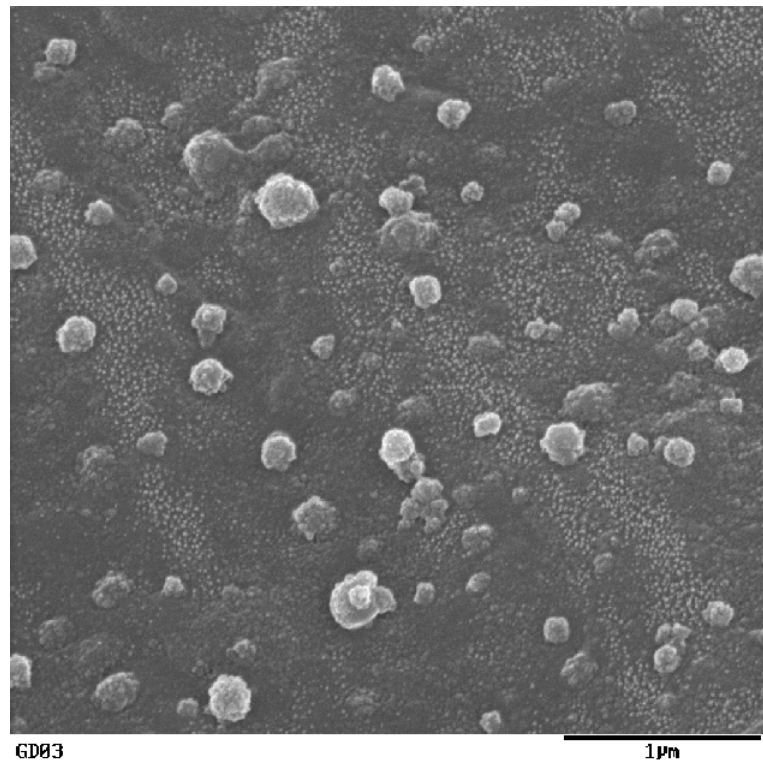
Nanopartikel aus Albumin können durch verschiedene Verfahren hergestellt werden. Hierbei werden Albumine unterschiedlicher biologischer Herkunft verwendet, insbesondere Albumin aus humanem oder bovinem Serum. Ein Verfahren basiert auf der Desolvatisierung des gelösten Proteins und anschließender Quervernetzung. Hierzu wird das in Wasser gelöste Albumin durch tropfenweise Zugabe von Ethanol oder bestimmten Salzlösungen unter Rühren „ausgefällt“. Es kommt dabei zum sogenannten „Aufrollen“ der Proteinketten, wobei sich Partikel ausbilden, deren Struktur dann mit Glutaraldehyd fixiert werden kann (Kreuter 1983a; Weber et al. 2000a; Weber et al. 2000b).

#### 1.2.2.2.1.3 Nanopartikel aus Gelatine – Gelatinenanopartikel

Die Herstellung von Gelatinenanopartikeln geschieht durch Desolvatisierung des gelösten Proteins mittels Azeton und anschließender Quervernetzung unter Verwendung von Glutaraldehyd und wurde erstmals 1978 von Marty beschrieben (Marty et al. 1978). Die Eigenschaften der so hergestellten Partikel

---

beruhen sowohl auf der Art der Herstellung als auch auf der Herkunft der Gelatine. Die in dieser Arbeit untersuchten Partikel wurden nach einem von Coester modifizierten Protokoll hergestellt, das zwei getrennte Desolvatisierungsschritte beinhaltet, um so die Bildung von sekundären Nanopartikelaggregaten zu reduzieren (Coester et al. 2000).



*Abbildung 3: Gelatinenanopartikel unter dem Elektronenmikroskop, 25.000fache Vergrößerung (Langer 1999)*

#### 1.2.2.2.2 Die Eigenschaften von Nanopartikeln

Nanopartikel zeichnen sich durch gute Stabilitätseigenschaften aus und durch ein weites Spektrum an verwendbaren Materialien und Herstellungstechniken. Sie bieten die Möglichkeit einer kontrollierten Arzneistofffreisetzung. So konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel die Depotwirkung nach subkutaner Applikation erhöhen (Kreuter 1983b). Beispielsweise können so Substanzen wie Insulin kontinuierlich aus ihrer Arzneiform freigegeben werden (Langer

---

1999). Weiterhin sind sie in der Lage, Substanzen, die über eine unzureichende physiologische Stabilität verfügen, zu stabilisieren. So wird durch die Bindung von Nukleinsäuren an Nanopartikel eine Verbesserung der Stabilität der Nukleinsäuren gegen Nukleasen erzielt. Es wurde im Vergleich zu viralen und liposomalen Trägersystemen gezeigt, dass Nanopartikel einen Schutz gegen DNase I und eine gute Bindungskapazität für Nukleinsäuren bieten (Bertling et al. 1991). Auch die Antigenität von Nanopartikeln wurde ansatzweise untersucht: Am Beispiel von Albuminmikrosphären, einer den Albuminnanopartikeln verwandten Zubereitung, konnte gezeigt werden, dass ein Jahr nach intravenöser Gabe keine erhöhten Antikörpertiter gegen Albuminmikrosphären nachweisbar sind (Barnhart et al. 1991). Schließlich verbessern Nanopartikel als Trägersystem für Arzneistoffe auch deren Penetration durch die Cornea des Auges zur Behandlung des Glaukoms (Zimmer et al. 1991; Zimmer et al. 1994; Calvo et al. 1996).

#### 1.2.2.2.3 Das Drug-Targeting mit Nanopartikeln

Als Drug-Targeting wird das gezielte Heranbringen eines Wirkstoffs an den gewünschten Wirkort bezeichnet. Der Begriff umfasst unterschiedliche Systeme bzw. Verfahren zur Beeinflussung der Arzneistoffverteilung im Organismus und die damit verbundene selektive Anreicherung in bestimmten Geweben. Dies soll die Steigerung der Wirksamkeit einer Substanz und die Minderung ihrer Toxizität bewirken (Mutschler und Schäfer-Korting 1997).

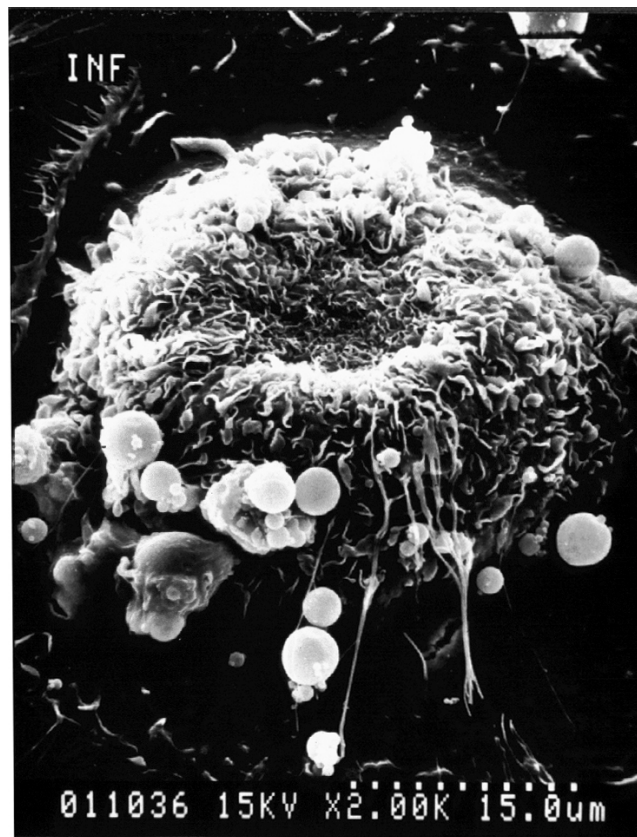
Um ein Drug-Targeting zu erreichen sind, viele verschiedene Verfahren denkbar. Eine einfache Methode ist die örtliche Gabe des Wirkstoffs, wie beispielsweise bei der Lokalanästhesie, wobei man zur Vermeidung der systemischen Ausbreitung Adrenalin zur Durchblutungshemmung mitverabreicht. Andere Möglichkeiten sind zum Beispiel die Kopplung des Wirkstoffes an Antikörper des Typs IgA, um einen Tropismus für Schleimhäute zu erreichen, die Oberflächenmodifikation mit bestimmten Liganden, die auf Rezeptoren der Zielzellen passen, der Einschluss in Körperzellen wie Erythrozyten, virale Vektoren und die Verwendung von Prodrugs, biologisch

---

zunächst inaktiven Substanzen, die erst im Zielgewebe durch nur dort vorhandene Enzyme in die aktive Form biotransformiert werden. Dies sind Verfahren, die auch nach systemischer Gabe eine gerichtete Wirkstoffanreicherung bewirken sollen.

Nanopartikel sind potenziell geeignet als Mediatoren eines Drug-Targeting, da sie beispielsweise von Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) aktiv aufgenommen werden. Nach systemischer Applikation von Nanopartikeln reichern sich diese zu 60-90 % in den Gewebsmakrophagen der Leber, zu 3-10 % in denen der Lunge und der Milz und zu einem geringen Prozentsatz auch im Knochenmark an (Kreuter 1983b). Auf diese Weise konnte die ED50 (Maß für die Wirksamkeitsgrenze, Dosis bei der 50% der Versuchsobjekte die erwartete Wirkung zeigen) des Proteaseninhibitors Saquinavir durch Bindung an Nanopartikel gesenkt werden (Bender et al. 1996). Gleiches gilt für Primaquin bei der in vitro Behandlung der Leishmaniose (Gaspar et al. 1992). So profitieren gerade schlecht zellmembrangängige Substanzen wie Saquinavir von der Bindung an Nanopartikel, gleiches gilt für schlecht zellgängige antivirale Antisense-Oligonukleotide, deren Aufnahme in die Zellen des mononukleären Phagozytensystems durch die Bindung an Nanopartikel verbessert wurde (Bodner 1991; Chavany et al. 1992). Hierbei handelt es sich allerdings nicht um aktives, sondern um passives Drug-Targeting, das auf einer unspezifischen Interaktion zwischen dem Zielgewebe und dem Trägersystem beruht, denn das mononukleäre Phagozytensystem spielt eine große Rolle bei der Entfernung von Fremdkörpern aus dem Blutkreislauf (Allémann et al. 1993).

Ein echtes Drug-Targeting durch Nanopartikel ist theoretisch insbesondere durch Oberflächenmodifikation mit kovalent gebundenen Oberflächenantigenen möglich (Douglas et al. 1987). Eine Veränderung der oben genannten Organverteilung wurde bereits durch das Überziehen der Nanopartikel mit oberflächenaktiven Substanzen am Beispiel von Ratten gezeigt (Tröster et al. 1990).



*Abbildung 4: Die Phagozytose von Albuminnanopartikeln durch einen Gewebsmakrophagen, eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, 2.000fache Vergrößerung (Schäfer 1993).*

#### 1.2.2.2.4 Die Mechanismen der zellulären Aufnahme der Nanopartikel

Als besonders erfolgversprechend für die Verbesserung des Gentransfers hat sich die Nutzung einer rezeptorvermittelten Endozytose durch die Bindung von physiologischen Liganden wie Transferrin erwiesen (Lehninger et al. 1994). Die Realisierbarkeit konnte bereits von einer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Truong-Le et al. 1998). Diese Methode vermittelt zwar keinen Organotropismus, begünstigt allerdings die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen. Ähnliche Effekte verspricht die Beschichtung der Nanopartikel mit bioadhäsiven Materialien wie Fibrinogen, Fibronectin und Lipofectin (Labhasetwar et al. 1998) oder die Herstellung der Nanopartikel aus den

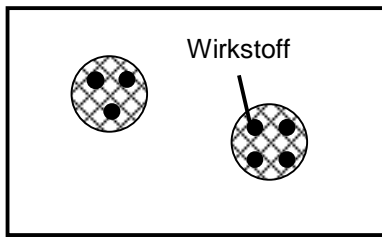
---

bioadhäsiven Cyanoakrylaten (vgl. Kapitel 1.2.2.2.1.1). Solche unspezifischen Adhäsionseffekte zur Begünstigung der Nanopartikelaufnahme werden allerdings im Rahmen der Entwicklung zellspezifischer, gerichteter Aufnahmemechanismen vermieden.

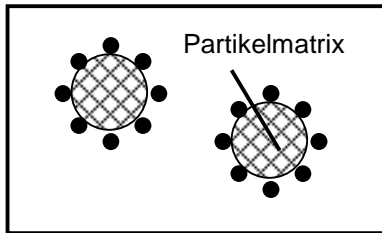
#### 1.2.2.2.5 Die Bindung von Wirkstoffen an Nanopartikel

Zur Bindung einer Substanz an die Nanopartikel gibt es verschiedene Verfahren. Zum einen besteht die Möglichkeit, den Wirkstoff in den Herstellungsprozess der Nanopartikel einzubeziehen, so dass ein Einschluss im Inneren der Nanopartikel erfolgt. Andere Möglichkeiten sind die Adsorption, die kovalente Bindung an die Oberfläche der Nanopartikel und die Ausnutzung ionischer Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeloberfläche und der jeweiligen Substanz (Allémann et al. 1993; Langer 1999). Von Langer wurde kürzlich eine neue Methode beschrieben, bei der die Wirkstoffbindung durch die Komplexbildung von Avidin und Biotin vermittelt ist: Avidinbeschichtete peptidische Nanopartikel sollen biotinylierte Nukleinsäuren binden (Langer et al. 2000; Coester et al. 2000). Dementsprechend erfolgt die Bindung von Wirkstoffen während oder aber nach der Herstellung der Nanopartikel. Von den hier beschriebenen Bindungsarten sind die kovalente Bindung und die Bindung über den Biotin-Avidin-Komplex die stabilsten. Die durch Adsorption oder Einschluss in das Nanopartikelinnere gebundenen Substanzen können einer Verdrängung durch Serumkomponenten unterliegen (vgl. Abbildung 5).

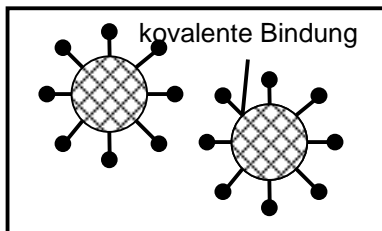
Die oberflächliche Bindung des Wirkstoffes ist insbesondere sinnvoll, da Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Teilchengröße eine große spezifische Oberfläche aufweisen. Umfang und Stabilität der Wirkstoffbindung können hierbei sehr unterschiedlich sein, deshalb ist es wichtig, diese Größe zu kontrollieren. Eine Arbeitsgruppe um Bertling hat die Bindungskapazität von Nanopartikeln für DNA untersucht, wobei Nanopartikel insgesamt eine gute Bindungskapazität gezeigt haben (Bertling et al. 1991).



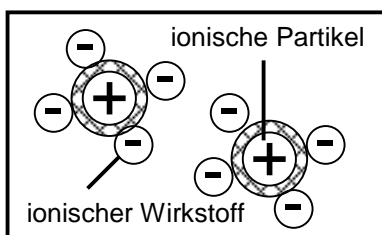
**Einschluss des Wirkstoffes im Nanopartikelinneren** durch Einbeziehung des Wirkstoffs in den Herstellungsprozess der Nanopartikel



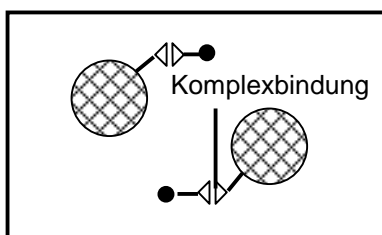
Bindung des Wirkstoffs durch **Adsorption**



**Kovalente Bindung** des Wirkstoffs an die Nanopartikeloberfläche



Bindung des Wirkstoffs unter Ausnutzung **ionischer Wechselwirkungen**



Über **Komplexbildner** vermittelte Bindung des Wirkstoffs an die Nanopartikel durch **Biotinylierung** des Wirkstoffs und Oberflächenbeschichtung der Nanopartikel mit **Avidin**

*Abbildung 5: Bindung von Wirkstoffen an Nanopartikel nach Langer, modifiziert (Langer 1999).*

---

#### 1.2.2.2.6 Der Gentransfer mit Nanopartikeln

Nanopartikel sind erst viel später als Liposomen und Viren als Trägersystem für den Gentransfer aufgegriffen worden. Sie eignen sich als Trägersystem wegen ihrer guten Bindungskapazität für Nukleinsäuren bei geringer Antigenität und ihrer stabilisierenden Wirkung auf Nukleinsäuren (vgl. 1.2.2.2.2). Inzwischen lieferten einige Arbeiten Hinweise darauf, dass eine nanopartikelvermittelte Transfektion von Zellen mit Transgenen möglich ist. So wurde beispielsweise an der Maus eine orale Desensibilisierung bei Erdnuss Allergie durchgeführt unter Verwendung an Chitosannanopartikel gebundener Allergen-DNA (Moffatt und Cookson 1999; Roy et al. 1999).

### **1.3 Die Gentherapie – status quo**

Die Entwicklung der Gentherapie für die zystische Fibrose befindet sich immer noch in einem sehr frühen Stadium. Das aktuelle Hauptproblem ist der ineffiziente Gentransfer, für den weder virale Vektoren und Liposomen noch Nanopartikel bis dato eine Lösung bieten (vgl. Kapitel 1.2.2.2.6, 1.2.2.1 und 1.2.1). Lösungsansätze sind zum einen die Ausschaltung von Barrieren wie den Bronchialschleim, um den Zugang von Viren zu den Zielzellen zu verbessern, die sogenannte „modification of the host“. Der wichtigere zweite Lösungsansatz ist die Verbesserung des Trägersystems, wobei noch nicht gesagt werden kann, welches der bekannten Trägersysteme – Viren, Liposomen oder auch Nanopartikel – das geeignetste ist (Boucher 1999; Albelda et al. 2000).

In der Öffentlichkeit wird die Gentherapie zunehmend kritisch diskutiert. Nachdem ein 18-Jähriger, der US-Amerikaner Jesse Gelsinger, während eines an ihm durchgeführten Gentherapie-Experimentes im Herbst 1999 verstorben ist, wurde bekannt, dass diese Studie Mängel im Bereich der Patientenaufklärung und -einwilligung, der Studienüberwachung und der Veröffentlichung von Nebenwirkungen aufwies. Hunderte von in anderen Studien aufgetretenen Nebenwirkungen wurden daraufhin nachträglich bekannt



---

gegeben, und es entbrannte eine Diskussion über die Bedeutung der Einhaltung ethischer Prinzipien in Gentherapie-Studien (N.N. 2000; Friedmann 2000; Greenberg 2000; Rosenberg und Schlechter 2000).

Darüber hinaus werden die bisherigen Erfolge von Gentherapie-Studien kritisch betrachtet. Rosenberg schreibt beispielsweise, dass auf diesem Gebiet im Moment zu viel Versprochen werde, ohne diese Versprechungen wirklich einzuhalten. Dies schade dem Vertrauen in diese Experimente und der Unterstützung durch die Öffentlichkeit (Rosenberg und Schlechter 2000).

Die Gentherapie ist ein potenzieller Lösungsansatz bei der Bekämpfung von Erbkrankheiten und den malignen Tumoren. Somit ist sie gleichzeitig ein faszinierendes Thema und ein lohnendes Ziel.

#### ***1.4 Hintergrund und Zielsetzung***

Am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Klaus Langer verschiedene Nanopartikel-Zubereitungen entwickelt, die als mögliche Trägersysteme für einen Gentransfer Anwendung finden können. Ausgehend von den oben beschriebenen Problemen bei der Trägersystemfindung für die somatische Gentherapie der zystischen Fibrose wird untersucht, ob Nanopartikel die Voraussetzungen für den Einsatz als Trägersystem für den Gentransfer in Bronchialepithelzellen in der Zellkultur erfüllen und somit eine Alternative zu anderen Trägersystemen und viralen Vektoren darstellen.

Es wird hierzu die Zytotoxizität dieser Nanopartikel-Zubereitungen auf primäre humane Bronchialepithelzellen und die Zelllinie 16HBE14o untersucht.

Zusätzlich werden Untersuchungen zur Nanopartikelaufnahme in diese Zellen mit Methoden am Durchflußzytometer und am konfokalen Laserrastermikroskop durchgeführt.

Die Rolle des Entzündungsreizes, der durch das Gentransfer-Trägersystem hervorgerufen wird, beispielsweise auf die Transfektionseffizienz oder die Verträglichkeit kann bis zur Entwicklung effizienterer Trägersysteme nicht

---

genau eingeschätzt werden (Boucher 1999). Trotzdem spielt er eine große Rolle bei Abstoßungsreaktion gentherapierter Zellen, weshalb zusätzlich mittels einer IL-8-ELISA-Methode (Interleukin 8; enzyme linked immunosorbent assay) Untersuchungen zur Inflammation der Bronchialepithelzellen auf einen Reiz mit Nanopartikeln durchgeführt werden.

---

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Die Nanopartikel**

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität und wurde dort von Dr. Klaus Langer und Dr. Conrad Coester durchgeführt.

##### **2.1.1.1 Die Präparation der Polyalkylcyanoakrylatnanopartikel**

Die Herstellung der Cyanoakrylatnanopartikel erfolgte nach bereits in den 80er Jahren veröffentlichten Methoden (Kreuter 1983a). 500 µl des Alkyl-2-Cyanoakrylatmonomers wurden tropfenweise zu 50 ml einer wässrigen sauren Lösung (0,01 N HCl) mit Dextran 70.000 oder Poloxamer 188 (Pluronic F68™) als Stabilisatoren in einer Konzentration von 1 % (m/v) gegeben. Als Monomer diente Butylcyanoakrylat und Hexylcyanoakrylat. Die Lösungen wurden vier Stunden bei Raumtemperatur mittels eines Magnetrührers bei 400 Umdrehungen pro Minute gerührt. Nach der Neutralisation der Lösung mit 0,1 N NaOH wurde eine weitere Stunde gerührt, gefolgt von einer Filtration durch einen Glasfilter.

##### **2.1.1.2 Die Präparation der Gelatinenanopartikel**

Das Verfahren zur Herstellung der Gelatinenanopartikel entsprach einer Methode von Coester, die zwei getrennte Desolvatisierungsschritte beinhaltet

---

(Coester et al. 2000). 1,25 g Gelatine Typ A aus Schweineschwarte (175 Bloom) wurden in 25 ml Wasser unter Erwärmung gelöst. Zum Erreichen der Desolvatisierung und einer schnellen Sedimentation der Gelatine, erfolgte die Zugabe von 25 ml Azeton zu dieser Lösung. Der Überstand bestand aus wenig desolvatisierter Gelatine und Gelatine in Lösung und wurde verworfen. Das verbleibende Sediment wurde in 25 ml Wasser unter Erwärmung gelöst und der pH-Wert wurde auf 2,5 eingestellt. Durch tropfenweise Zugabe von 50 ml Azeton erfolgte eine erneute Desolvatisierung der Gelatine. Nach zehnmütigem Rühren wurden 500 µl Glutaraldehyd (8 %) hinzugegeben, um die Quervernetzung der Nanopartikel zu bewirken. Nach 24-stündigem Rühren folgte schließlich eine Reinigung der so erhaltenen Nanopartikel durch fünfmalige Zentrifugation, acht Minuten bei 20.000\*g, und Redispersion in Wasser durch Ultraschallbehandlung.

Die Fluoreszenzmarkierung geschah durch Beimengung von 70 mg Fluoreszeinamin 30 Minuten nach Zugabe des Quervernetzers, um die verbleibenden freien Aldehydgruppen des bifunktionalen Glutaraldehyds zu sättigen. Nach einer Reaktionszeit von zwölf Stunden erfolgte oben beschriebener Reinigungsprozess.

#### 2.1.1.3 Die Präparation der Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA)

Die Abluminnanopartikel wurden nach einer Desolvatisierungsmethode hergestellt, die einer von Marty beschriebenen Methode zur Herstellung von Gelatinenanopartikeln abgeleitet ist (Marty et al. 1978; Weber et al. 2000a; Weber et al. 2000b). Humanes Serumalbumin (200 mg) wurde in 2 ml gereinigtem Wasser gelöst gefolgt von der Desolvatisierung dieser 10 %igen Proteinlösung durch tropfenweise Zugabe von 6 ml Ethanol. Die Zugabe von 235 µl einer wässrigen Glutaraldehydlösung diente zur Stabilisation der Nanopartikel, um die Quervernetzung der Nanopartikel zu erreichen. Nach 24-stündigem Rühren wurden die so erhaltenen Nanopartikel durch fünfmalige Zentrifugation, acht Minuten bei 20.000\*g, und Redispersion in Wasser durch Ultraschallbehandlung gereinigt.

---

Für die Fluoreszenzmarkierung wurde 4 mg Fluoreszeinamin 30 Minuten nach Zugabe des Quervernetzers beigefügt, um die verbleibenden freien Aldehydgruppen des bifunktionalen Glutaraldehyds zu sättigen, gefolgt von der oben beschriebenen Reinigung nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden.

#### 2.1.1.4 Die Bestimmung der Nanopartikelgröße und -konzentration

Zur Bestimmung der Nanopartikelgröße diente die Photonenkorrelations-spektroskopie; hierzu stand ein BI-200 SM Goniometer Version 2 zur Verfügung. Die Proben wurden 1:400 mit gereinigtem Wasser verdünnt und bei einer Temperatur von 25°C und einem Streuwinkel von 90° gemessen.

Die Bestimmung der Nanopartikelkonzentration erfolgte durch Wägung. Ein Aliquot (1 ml) einer Nanopartikelsuspension und der Überstand eines Aliquots nach 30-minütiger Zentrifugation bei 13.200\*g wurden bis zur Trockenheit verdunstet. Der Nanopartikelgehalt errechnete sich als Differenz zwischen der Trockenmasse der Nanopartikelsuspension und der Trockenmasse des Überstandes.

Gruppe	Nanopartikelart	Größe [nm]
<b>Peptid-Nanopartikel</b>	Gelatinenanoartikel	338,2
	Albuminnanoartikel	235,7
<b>Cyanoakrylat-Nanopartikel</b>	<u>Polybutylcyanoakrylate</u> (PBCA):	
	Pluronic F68 als Stabilisator	142
	Dextran 70.000 als Stabilisator	209
	<u>Polyhexylcyanoakrylate</u> (PHCA):	
	Pluronic F68 als Stabilisator	113
	Dextran 70.000 als Stabilisator	239

*Tabelle 2: Untersuchte Nanopartikel-Präparationen und ihre physiochemischen Eigenschaften*

### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Substratlösungen

Azeton (Merck, Darmstadt, Deutschland);

Bovines Serumalbumin, 1 % (Sigma, München, Deutschland);

Butylcyanoakrylat – Sicomet 6.000<sup>®</sup> - Cyanoakrylatklebstoff (Henkel, Sichel-Werke GmbH, Hannover, Deutschland);

CytoTox 96<sup>™</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, Vereinigte Staaten von Amerika); Komponenten: Substratmischung (lyophilisierte Diaphorase, Laktat und NAD<sup>+</sup>), Pufferlösung (PBS mit 1 % FKS, mit Tetrazoliumchlorid und Triton<sup>™</sup> X-100), LDH-Positivkontrolle (LDH aus Rinderherzen), Lyselösung (Triton<sup>™</sup> X-100, 9 %ig), Stop-Lösung (1 M Essigsäure);

DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]Oktan) (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland);

DAKO<sup>®</sup> TMB One-Step Substrate System (DAKO Corporation, Carpinteria, Vereinigte Staaten von Amerika);

---

DMSO (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland);  
Gelatine Typ A, 175 Bloom (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland);  
Glutaraldehyd, 8 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland);  
Glyzerin (87 %) (Merck, Darmstadt, Deutschland);  
HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland);  
Hexylcyanoakrylat – Sicomet<sup>®</sup> (Auftragssynthese für das Institut für  
Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main) (Henkel, Sichel-Werke GmbH, Hannover,  
Deutschland);  
IL-8, human, rekombinant (R&D System, Wiesbaden, Deutschland);  
Kollagen Typ I (0,1 %) (Promocell, Heidelberg, Deutschland);  
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland);  
Mowiol<sup>®</sup> 488 (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland);  
NaCl, 150 mM (Merck, Darmstadt, Deutschland);  
NaHCO<sub>2</sub>;NaCO<sub>3</sub>; 50 mM; pH9,6 (Merck, Darmstadt, Deutschland);  
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, 500 U/ml (Boehringer, Mannheim,  
Deutschland);  
TNF- $\alpha$  von der Maus, rekombinant, exprimiert von Escherichia coli (Sigma,  
Saint Louis, Vereinigte Staaten von Amerika);  
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-amino-methan) Ultrapure (USB United States  
Chemicals, Cleveland, OH, Vereinigte Staaten von Amerika);  
Trizma Base, 20 mM (Sigma, München, Deutschland);  
Trypanblau in physiologischer Kochsalzlösung (Biochrom KG, Berlin,  
Deutschland);  
Trypsin-EDTA-Lösung (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Schottland);  
Tween 20, 0,05 % (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland);

### **2.1.3 Fluoreszenzmarker**

tetramethylrhodaminmarkiertes Concanavalin A (Molecular Probes, Eugene,  
Oregon, Vereinigte Staaten von Amerika / Leiden, Niederlande);  
Fluoresceinamin (Fluka, Buchs, Schweiz);

---

#### **2.1.4 Antikörper**

Beschichtungsantikörper: Mouse anti-IL-8 Antikörper, monoklonal, 500 µg (R&D System, Wiesbaden, Deutschland)

Detektionsantikörper: anti-human IL-8, biotinyliert, polyklonal, 50 µg (R&D System, Wiesbaden, Deutschland);

#### **2.1.5 Medien, Pufferlösungen und Zusätze**

Adrenalin (Promocell, Heidelberg, Deutschland);

Amphotericin B (Biochrom KG; Berlin, Deutschland);

Bronchial Epithelial Cell Growth Medium™ mit 28 mM Hepes (Promocell, Heidelberg, Deutschland);

Dulbeco's PBS ohne Calcium, Magnesium und Bicarbonatpuffer (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland);

Dulbeco's minimal essential medium (DMEM) Nut's Mix (F12) mit L-Glutamin 15 mM Hepes und Pyridoxin (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland);

EGF (Promocell, Heidelberg, Deutschland);

EGF, lyophilisiert (Cell Concepts, Umkirch, Deutschland);

Epiphysenextract vom Rind (Promocell, Heidelberg, Deutschland);

FACSFlow™ Hüllflüssigkeit für die Durchflußzytometrie (Becton and Dickinson, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika);

FACSRinse™ Spülflüssigkeit für die Durchflußzytometrie (Becton and Dickinson, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika);

FACSafe™ Desinfektionslösung für die Durchflußzytometrie (Becton and Dickinson, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika);

FKS (Boehringer Ingelheim, Heidelberg);

Gentamycin (Sigma-Aldrich, Irvine, Großbritannien);

Hank's Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich, Irvine, Großbritannien);

Hydrokortison (Promocell, Heidelberg, Deutschland);

Insulin (Promocell, Heidelberg, Deutschland);



---

KGF, lyophilisiert (Cell Concepts, Umkirch, Deutschland);  
Optimem 1 mit L-Alanyl-L-Glutamin (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland);  
Penicillin/Streptomycin (Biochrom KG, Berlin, Deutschland);  
Retinolsäure (Promocell, Heidelberg, Deutschland);  
Transferrin (Promocell, Heidelberg, Deutschland);  
Trijodthyronin (Promocell, Heidelberg, Deutschland);

## **2.1.6 Die Modifikationen der Medien und Pufferlösungen für den Einsatz in der Zellkultur**

### 2.1.6.1 Das Medium zur Kultivierung der Zelllinie 16HBE14o

Dulbeco's MEM	500 ml
FKS	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

### 2.1.6.2 Das Medium zur Kultivierung primärer humaner Bronchialepithelzellen

Bronchial Epithelial Cell Growth Medium™	500 ml
Zusätze:	
Adrenalin	0,5 µg/ml
Amphotericin B	50 ng/ml
EGF	10 ng/ml
Epiphysenextrakt vom Rind	0,4 µg Protein/ml
Gentamycin	50 µg/ml
KGF	10 ng/ml
Hydrokortison	0,5 µg/ml
Insulin	5 µg/ml
Retinolsäure	100 pg/ml
Transferrin	10 µg/ml

---

Trijodthyronin	6,5 pg/ml
----------------	-----------

#### 2.1.6.3 Der Beschichtungspuffer mit Beschichtungsantikörpern für die Durchführung der IL-8-ELISA

NaHCO <sub>3</sub>	50 mM
Beschichtungsantikörper (2.1.4)	4 µg/ml
mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> eingestellt auf	pH 9,6

#### 2.1.6.4 Das Diluent für die Durchführung der IL-8-ELISA

Trizma Base	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05 %
Bovines Serumalbumin	1 %
Mit HCl eingestellt auf	pH 7,4

### 2.1.7 Kulturgefäße und Verbrauchsmaterialien

BLUE MAX™ 50 ml Polypropylenröhrchen - „Falconröhrchen“ (Becton Dickinson Labware; Meylan Cedex, Frankreich);

Cupaprox LS Interdentalebürsten (Curaden AG, Teningen, Deutschland);

Einmalpipetten, steril, 5 bzw. 10 ml (Greiner, Nürtingen, Deutschland);

Einsätze für Multischalen - Transwell-Clear™ tissue culture treated Polyester Membraneinsätze (Corning Costar, Cambridge, Vereinigte Staaten von Amerika), 12 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße, mit Gewebekultur vorbehandelt;

Eppendorfreaktionsgefäße (Eppendorf, Köln, Deutschland);

Glasfilter (G3, Schott, Deutschland);

Mikrotiterplatten, TC Mikrowell 96F mit NUNCLON™ Delta Oberflächenbeschichtung (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark);

Multischalenplatten, verschiedene Formate (Corning Costar, Cambridge, Vereinigte Staaten von Amerika);

---

Objektträger mit Zellkulturkammern - Chamber slide™, borosilicated coverglass, LAB-Tek™ II (Nalge Nunc international, Roskilde, Denmark);  
Polystyren Reagenzgläser mit Rundboden ohne Verschluss, 12 \* 75 mm (Becton Dickinson Labware, New Jersey, Vereinigte Staaten von Amerika);  
Pipetten, serologische (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland);  
PP-Röhrchen, 15 ml (Greiner Labortechnik, Nürtingen, Deutschland);  
Zellkulturflaschen, verschiedene Größen, NUNCLON™ Delta Oberflächenbeschichtung (Nalge Nunc international, Roskilde, Denmark)

## **2.1.8 Die Zellen**

### 2.1.8.1 Die primären humanen Bronchialepithelzellen

Als Zielzellen für die Gentherapie der Mukoviszidose beschäftigt sich diese Arbeit vor allem mit der Interaktion von Nanopartikeln mit den primären Bronchialepithelzellen. Diese wurden nach der unter Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode kultiviert.

Ein großes Problem bei der Verwendung von Zellkulturen ist die Frage, ob die gewählten Zellen und das Zellkulturverfahren für die Situation in vivo repräsentativ sind. So spielt bei dem Versuch, die in vivo Bedingungen in der Zellkultur zu imitieren, der Differenzierungsgrad der Zellen eine Rolle, der durch geeignete Verfahren verbessert werden kann.

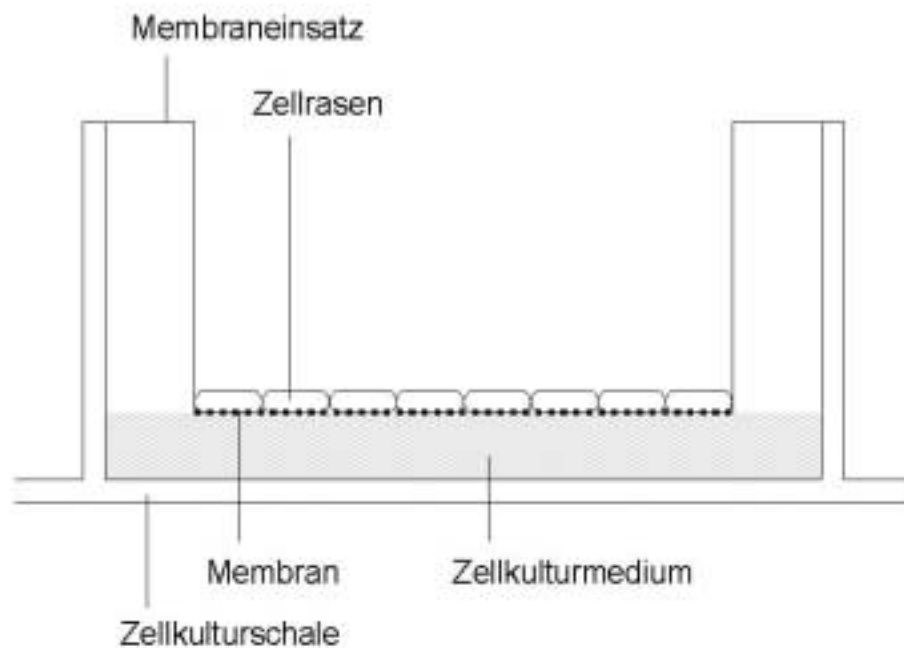
Zu den differenzierten Eigenschaften eines Bronchialepithels gehören Zilien, die Synthese und Sekretion von Surfactant und die Präsenz von spezifischen elektrophysiologischen Eigenschaften (Jorissen et al. 1991). Primäre humane Bronchialepithelzellen wurden unter Verwendung eines für die Kultur von Bronchialepithelzellen speziell hergestellten Mediums der Firma Promocell kultiviert. Dieses Medium ist serumfrei, da Serum das Wachstum hemmt und eine Metaplasie zu Plattenepithel fördert (Jorissen et al. 1991; Yamaya et al. 1992). Verschiedene zugesetzte Faktoren wie Hydrocortison, Insulin, EGF (epithelial growth factor), KGF (keratinocyte growth factor) und Transferrin

---

fördern das Zellwachstum. Vitamin A fördert die Expression von Keratinen, die einen Einfluss auf die Zellmorphologie und somit die Differenzierung haben (Wu und Wu 1986; Edmondson et al. 1990). Zur Erlangung der Differenzierungsmerkmale trägt Retinolsäure ebenfalls durch Erhöhung der Expression des Surfactant in Bronchialepithelzellen bei (Bogue et al. 1999).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Ausdifferenzierung spezifischer elektrophysiologischer Eigenschaften ist die Verwendung von Membraneinsätzen (Yamaya et al. 1992). Sie erlauben die Zellkultur in Kontakt mit dem Medium Luft, wobei die Versorgung der Zellen mit Medium durch eine Membran von unten her erfolgt. Physiologische Verhältnisse werden auf diese Weise imitiert. Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung dieses Verfahrens, wobei die herkömmliche Technik, die eine vollständige Umspülung der Zellen mit Medium vorsieht, hierbei verlassen wird. Die hier angewandten Membraneinsätze (Transwell-Clear, Costar) sind weiterhin mit einer Gewebekultur vorbehandelt worden. Diese Vorbehandlung hinterlässt eine Extrazellulärmatrix, die hauptsächlich aus Kollagen Typ III, IV und V, Glykoproteinen und Proteoglykanen und auch Fibronectin und Laminin besteht. Diese extrazelluläre Matrix begünstigt ebenfalls die Zilienbildung, verlängert das Leben der Zellen in der Kultur und dient als Anheftungsfaktor (Wiesel et al. 1983; Lindl und Bauer 2000b). Die in vitro mit den hier geschilderten Methoden am einfachsten zu erzielenden Differenzierungsmerkmale sind die elektrophysiologischen Eigenschaften, die mittels des transepithelialen Potentials gemessen werden (Jorissen et al. 1991).

Leider haben primäre Bronchialepithelzellen auch unter optimalen Kulturbedingungen eine Lebensdauer von maximal fünf Passagen (Jorissen et al. 1991). Dies ist einer Zellerung, ungenügenden Kulturbedingungen oder einer terminalen Differenzierung der Zellen zuzuschreiben.



*Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kultur von primären Bronchialepithelzellen auf Membraneinsätzen für Zellkulturschalen. Modifiziert aus einer Broschüre der Firma Costar®.*

#### 2.1.8.2 Die Zelllinie 16HBE14o

Die Verwendung von Zelllinien bietet den Vorteil, dass man mit einer einheitlichen Zellpopulation arbeiten kann. Außerdem sind primäre Bronchialepithelzellen in der Zellkultur äußerst kurzlebig. Deshalb kam die Zelllinie 16HBE14o zum Einsatz. Sie behält auch nach zahlreichen Passagen (>20) noch viele Eigenschaften der primären Zellen. So sind beispielsweise tight junctions nachgewiesen worden, es besteht ein gerichteter transepithelialer Ionentransport und das CFTR-Protein wird in hohem Maße exprimiert (Cozens et al. 1994). Diese Zelllinie wurde von D. C. Gruenert vom Cardiovascular Research Institute der University of San Francisco zur Verfügung gestellt.

---

## 2.1.9 Geräte

Brutschrank:	CO <sub>2</sub> -AUTO-ZERO (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland);
Durchflußzytometer:	FACScalibur mit einem 488 nm Argon-Ionen-Laser (Becton and Dickinson, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika);
Goniometer:	BI-200 SM Goniometer Version 2 (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, New York, Vereinigte Staaten von Amerika);
konfokales Laserrastermikroskop:	TCS True Confocal Scanner (TCS 4D, Leica, Heidelberg, Deutschland), ausgestattet mit einem Krypton-Argon Laser und einem Mikroskop der Firma Leitz (Leitz DM IRB, Wetzlar, Deutschland);
Mikroskope:	Axiovert 25 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland);
Photometer:	Easyreader EAR 340 AT (SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland);
Pipetierhilfen:	Automatic-Sarpette <sup>®</sup> (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland);
Pipetten:	Eppendorf Reference <sup>®</sup> , verschiedene Volumina (Eppendorf, Köln, Deutschland); Mehrfachpipette (Treff Lab, Degersheim, Schweiz);
sterile Werkbank:	Herasafe (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland);
Zentrifugen:	Megafuge 1.0R (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland); TJ-6R Tabletop Centrifuge (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, Californien, Vereinigte Staaten von Amerika);

---

### **2.1.10 Software**

Cell Quest (Ver 3.1f),  
IMARIS (Ver. 2.4.3),  
SAS (Ver. 6.12),  
Scanware TCS (Ver 5.1) und  
WinnMDI (Ver. 2.8).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Die Zellkultur**

#### 2.2.1.1 Die Routinemethoden zur Handhabung der Zellen

Die Handhabung der Zellkulturen, insbesondere der Mediumwechsel und die Subkultivierung entsprechen den von Lindl und Bauer beschriebenen Verfahren (Lindl und Bauer 2000a). Besonderheiten bei der Handhabung der Zellen werden im folgenden erläutert.

#### 2.2.1.2 Die Herstellung von Zellkulturbehältnissen mit Kollagenbeschichtung

Für adhärente Zellen in serumfreier Kultur ist die Beschichtung der Kulturbehältnisse mit Anheftungsfaktoren, um die Anheftung der Zellen an die Plastikunterlage zu begünstigen, empfohlen (Lindl und Bauer 2000b). Aus diesem Grunde erfolgte die Beschichtung der Zellkulturbehältnisse für die Kultur von primären humanen Bronchialepithelzellen mit Kollagen Typ IV.

Nach Verdünnung von Kollagen Typ I einer Konzentration von 0,1 % mit sterilem PBS auf eine Konzentration von 0,01 % wurden Zellkulturflaschen (140 ml), Schalen und Membraneinsätze so mit dieser Lösung gefüllt, dass eine vollständige Benetzung des Bodens erfolgt ist. Die Entfernung der Kollagenlösung aus den Kulturbehältern erfolgte nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % Kohlendioxid. Danach wurden diese mit PBS

---

gewaschen und für 1 Stunde zum Trocknen in den Brutschrank gestellt. Die so präparierten Behälter wurden innerhalb von 24 Stunden eingesetzt, da das Kollagen Keimen als Substrat dienen konnte.

#### 2.2.1.3 Die Gewinnung primärer humaner Bronchialepithelzellen

Die primären humanen Bronchialepithelzellen stammen aus Lungenresektaten von Patienten des Nordwest-Krankenhauses in Frankfurt am Main oder von Patienten des Uniklinikums Frankfurt am Main, die dort wegen eines Bronchialkarzinoms lobektomiert wurden. Nachdem der Schleim aus den Bronchien dieser Resektate mit einem Tuch oder einer Bürste entfernt worden ist, erfolgte die Bürstung der luminalen Oberfläche dieser Bronchien mit Interdentalbürsten unter Vermeidung der Bürstung des Tumors. Nach fünf bis zehn Reibebewegungen der Bürste wurde das am Bürstenkopf hängende Material in kühlem DMEM mit 10 % hitzedeaktiviertem fetalem Kälberserum, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) aufgelöst. Die Auffüllung mehrerer Falconröhrchen mit Zellen erfolgte unter Wiederholung dieses Arbeitsgangs, um reichlich Material zu erhalten. Die so gewonnenen Zellen kamen schnellstmöglich im Zellkulturlabor zur Weiterverarbeitung. Dort wurde das Material bei 1200 U/min 10 min lang zentrifugiert und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen, um den restlichen Schleim zu entfernen.

Die nach dieser Methode gewonnenen Zellen stellen eine unselektierte Population bestehend aus allen im epithelialen Verband der Bronchien vorhandenen Zelltypen dar. So finden sich neben Flimmerzellen, Basal- und Intermediärzellen auch Drüsenzellen, Becherzellen, endokrine Zellen und Clara-Zellen. Allerdings verschwinden Becherzellen nach der Ausplattierung (Wu et al. 1985), und da Clara-Zellen nur in Bronchiolen vorkommen, die nicht mit dieser Methode gebürstet werden können, ist deren Vorhandensein unwahrscheinlich. Trotzdem können grundsätzlich alle hier beschriebenen Zellarten vorhanden sein, wobei der Großteil aus Drüsenzellen, Basal- und Intermediärzellen und Flimmerzellen besteht. Letztere finden sich in großer Zahl



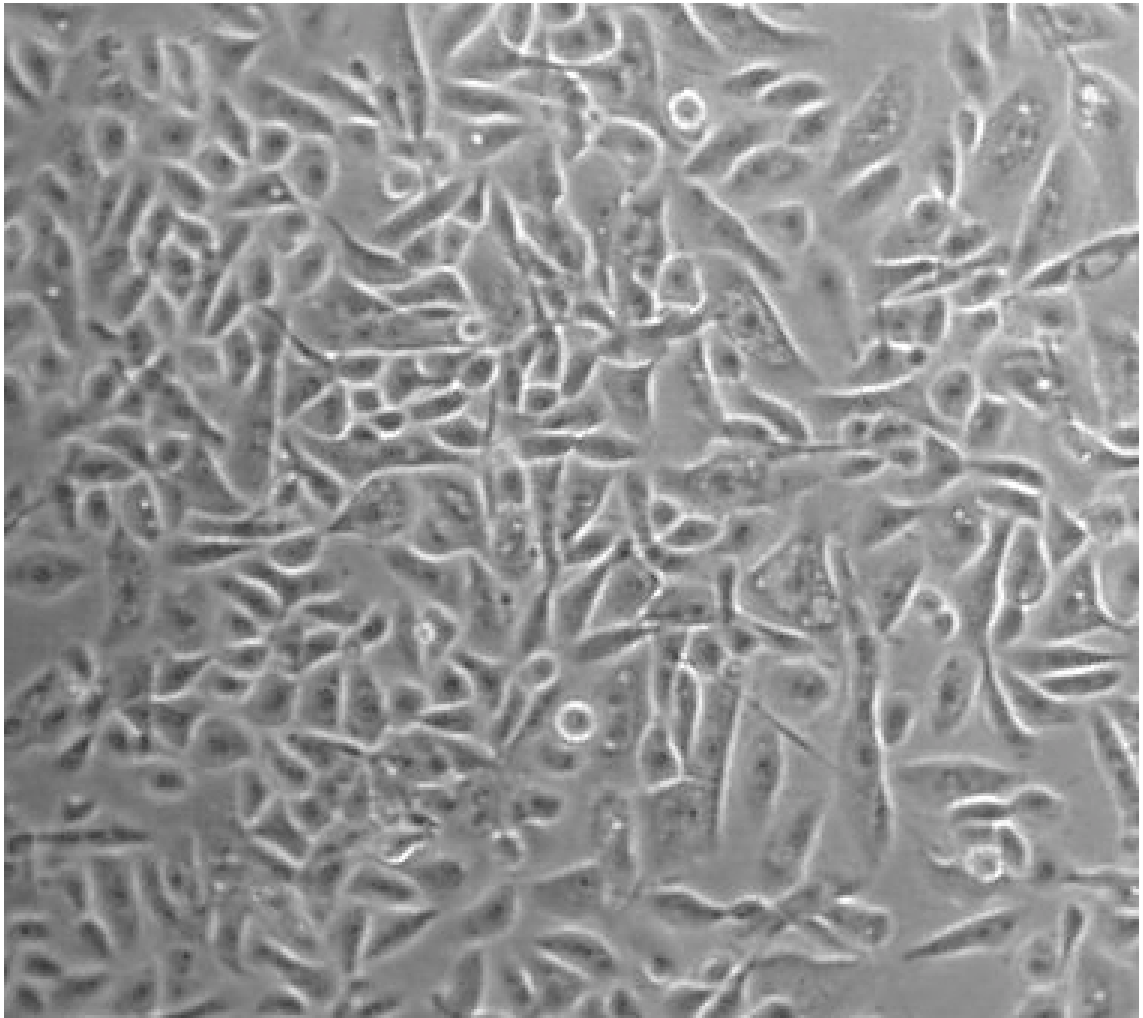
---

und sind unter dem Phasenkontrastmikroskop aufgrund der ständigen Bewegung ihrer Kinozilien besonders auffällig.

#### 2.2.1.4 Die Kultur primärer humaner Bronchialepithelzellen

Die primären Bronchialepithelzellen wurden unselektiert auf kollagenbeschichtete Kulturbehälter ausplattiert (vgl. Kapitel 2.2.1.2). Als Zellkulturmedium diente das Bronchial Epithelial Cell Growth Medium™ (vgl. Kapitel 2.1.6.2) mit Zusätzen der Firma Promocell. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 5 kPa. Die Zellen wurden zur Begünstigung der Adhäsion innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden nach Ausplattierung nicht bewegt. Nach erfolgter Adhäsion folgte die Kultivierung der Zellen bis zu einer Zellzahl von ca. 5\*10<sup>6</sup> Zellen pro Flasche, um diese danach für Versuche in entsprechende Behälter zu passagieren.

Für die Untersuchungen zur Nanopartikelaufnahme, beschrieben unter Kapitel 2.2.5, wurden die primären Bronchialepithelzellen auf herkömmliche Multischalenplatten, auf Objektträger mit Zellkulturkammern und auf Multischalenplatten mit Membraneinsätzen passagiert. Es kamen hierbei mit einer Gewebekultur vorbehandelte Membraneinsätze mit der Porengröße 0,4 µm zum Einsatz deren Funktion in Kapitel 2.1.8.1 erörtert wird.



*Abbildung 7: Subkonfluenter Zellrasen von primären Bronchialepithelzellen in Kultur auf einer mit Kollagen beschichteten Plastikoberfläche.*

### **2.2.2 Die Kultur der Zelllinie 16HBE14o**

Die Zelllinie 16HBE14o wurde in DMEM mit 10 % hitzedeaktiviertem fetalem Kälberserum, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert (2.1.6.1). Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und einem Kohlendioxid-Partialdruck von 5 kPa. Als Behälter für die Zellvermehrung dienten Zellkulturflaschen (140 ml) in denen die Zellen bis zu einer Zellzahl von  $10 \cdot 10^6$  vermehrt wurden. Für die Versuche zur Nanopartikelaufnahme in

---

Zellrasen wurden die Zellen auf vorher nicht kollagenbeschichtete Multischalenplatten passagiert. Die Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Versuche zwischen der 40. und 60. Passage.

### **2.2.3 Statistische Methoden**

#### 2.2.3.1 Parametrische Testverfahren

Für parametrische Testverfahren wie den t-Test von W. S. Gosset (Pseudonym: Student) ist die Berechnung von Maßzahlen, wie der Standardabweichung und des Mittelwertes vonnöten. Solche Maßzahlen nennt man Parameter, wobei es sich bei den aus der Stichprobe errechneten Zahlenwerten um Schätzwerte von Parametern handelt, die sich auf die Grundgesamtheit beziehen. Beim Zweistichproben-t-Test wird weiterhin vorausgesetzt, dass die Stichproben aus eingipflig-symmetrischen Gauß-Verteilungen entstammen und gleiche Varianzen haben. Die Varianzgleichheit wird mit dem F-Test (benannt nach Fischer) und die Verteilungsform mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test oder dem Test nach Shapiro und Wilk untersucht.

Insbesondere Laborwerte erfüllen die Kriterien für die Durchführung eines parametrischen Testverfahrens wie den t-Test nicht, da diese als Konzentrationen nach unten durch „0“ begrenzt sind. Durch den in dieser Arbeit verwandten ELISA-Reader sind die Werte außerdem durch einen Messbereich zwischen einer Extinktion von 0 und 3 beschränkt. Beides führt dazu, dass sich Werte im Grenzbereich häufen, was „schiefe“ Verteilungsformen entstehen lässt. Bei den Daten aus der Durchflußzytometrie handelt es sich weiterhin um ordinalskalierte Merkmale, so dass Standardabweichung und Mittelwert nicht zu bestimmen sind (Sachs 1996; Ackermann 1997).

#### 2.2.3.2 Nichtparametrische Testverfahren

Nichtparametrische (verteilungsfreie) Testverfahren wurden entwickelt, um mit Stichproben aus Grundgesamtheiten arbeiten zu können, deren Verteilung nicht

---

bekannt ist oder nicht bestimmt werden kann. Nichtparametrisch bedeutet, dass diese Verfahren keine Aussagen über Parameter wie den Mittelwert und die Standardabweichung machen. Allerdings zählt man die Bestimmung eines Konfidenzintervalls oder Tests des Medians oder eines Quartils einer beliebigen Verteilung ebenfalls zu nichtparametrischen Methoden. Solche Fragestellungen werden gemeinhin durch die Einteilung der Stichprobenwerte in Ränge behandelt, so dass sogar ordinalskalierte Stichproben mit solchen Testverfahren verglichen werden können, wie sie aus Messungen mit dem Durchflußzytometer hervorgehen (vgl. Kapitel 2.2.5.3) (Watson 1992; Bosch 1993; Sachs 1996; Ackermann 1997).

#### 2.2.3.2.1 Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Der nichtparametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test ist neben dem Zweistichprobentest nach Kolmogoroff und Smirnow, dem Van-der-Waerden-Test und einigen anderen das verteilungsunabhängige Gegenstück zum parametrischen t-Test nach Student. Voraussetzung für die Durchführung eines solchen Tests sind zwei unabhängige Zufallsstichproben von Messwerten oder zumindest von Rangdaten aus Grundgesamtheiten mit ähnlicher bis gleicher Verteilungsform. Für  $n_1=n_2$  ist der Test robust gegenüber Streuungsunterschieden. Weder Parameter noch ihre Schätzwerte sind zur Berechnung der Prüfgröße U notwendig. Als Nachteil zum t-Test nach Student ist die geringere Trennschärfe (Synonym: Power, Teststärke) dieses Verfahrens zu nennen (Watson 1992; Sachs 1996; Ackermann 1997).

Zur Berechnung der Prüfgröße U werden die  $(m+n)$  Stichprobenwerte in eine gemeinsame aufsteigende Rangfolge gebracht, wobei zu jeder Rangzahl vermerkt wird, aus welcher der beiden Stichproben der zugehörige Wert stammt. Die Summe der auf Stichprobe 1 entfallenen Rangzahlen sei  $R_1$ , die Summe der auf Stichprobe 2 entfallenen Rangzahlen sei  $R_2$ . Die gesuchte Prüfgröße ist die kleinere der beiden folgenden Größen  $U_1$  und  $U_2$  (Bosch 1993; Sachs 1996).

---


$$U = \min \left[ U_1 = m \cdot n + \frac{m(m+1)}{2} - R_1; U_2 = m \cdot n + \frac{n(n+1)}{2} - R_2 \right]$$

Gleichung 1: Die Prüfgröße des Tests nach Wilcoxon, Mann und Whitney

Dieses Verfahren wurde 1947 von Mann und Whitney veröffentlicht, nachdem Wilcoxon im Jahre 1945 das Problem der Verteilungsabhängigkeit bisheriger Stichprobentests angesprochen hatte (Sachs 1996). Alle in dieser Arbeit erhobenen Stichproben wurden mittels dieses Tests auf Gleichheit überprüft. Zur Durchführung der Berechnungen diente die Prozedur „npar1way“ des Statistikprogramms SAS.

#### 2.2.3.2.2 Berechnung des Stichprobenumfangs

Die Berechnung des Stichprobenumfangs für die Auswertung mit dem Wilcoxon-Test erfolgte nach der Methode von Noether (Noether 1987). Hierzu verwendet man den Mann-Whitney-Schätzer  $p=P(X_1 < X_2)$ , der die geschätzte bzw. gewünschte Wahrscheinlichkeit angibt, dass ein Wert aus Population 1 einen kleineren Wert aufweist als ein Wert aus Population 2. Der Wert  $p$  kann aus Vorstudien ermittelt werden. Folgende Formel gilt für die zweiseitige Fragestellung, wobei  $u$  als Quantil der Gauß-Verteilung definiert ist:

$$n_1 = n_2 = \frac{(u_{1-\alpha} + u_{1-2\beta})^2}{6 \cdot (p - 0,5)^2}$$

Gleichung 2: Die Formel zur Fallzahlberechnung für die Durchführung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (Ackermann 1997)

Im Falle der Zytotoxizitätstestungen und der ELISA-Messungen (siehe unten) war die Stichprobengröße durch die Anforderungen des Versuchsaufbaus und die Zahl der zur Verfügung stehenden Zellen beschränkt, insbesondere was die Versuche mit primären Zellen angeht. Verschiedene Konzentrationen an

---

Nanopartikeln mussten auf identischen Zellchargen gemessen werden, wobei die stark eingeschränkte Passagenzahl primärer Zellen (vgl. 2.1.8.1) und die dadurch begrenzte Vermehrbarkeit sich hierbei als limitierender Faktor herausstellte.

Für die Messungen mit dem Durchflußzytometer wurde eine Stichprobengröße von 10.000 Zellen gewählt. In Vorversuchen ergaben sich für den Mann-Whitney-Schätzer  $p$  Schätzwerte zwischen 0,96 und 0,6, so dass eine Stichprobengröße von 10.000 für ein Signifikanzniveau von 0,95 eine ausreichende Größe aufweist.

#### **2.2.4 Die Zytotoxizitätstests**

Die Toxizitätsprüfungen wurden mittels eines LDH-Tests (Laktatdehydrogenase-Tests) der Firma Promega (Non-Radioactive Cytotoxicity Assay) durchgeführt. Zytosolische Laktatdehydrogenase (LDH) wird beim Zelltod durch Auflösung der äußeren Zellmembran in das Zellkulturmedium freigesetzt und kann dort bestimmt werden. Da nur der Überstand für die Messung der LDH gebraucht wird, müssen die Zellen zur Messung der Zytotoxizität nicht abgetötet werden, sondern können weiterkultiviert werden. Der Test basiert auf einer Reaktion, bei der die LDH die Reaktion von Laktat zu Pyruvat unter Bildung von  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  (Nikotinsäureamidadeninindinukleotid, reduziert) katalysiert. Dieses  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  dient der Herstellung des roten Farbstoffes Formazan aus Tetrazoliumsalz, enzymatisch katalysiert durch Diaphorase. Die Konzentration des Farbstoffes Formazan lässt sich gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz photometrisch bei 490 nm bestimmen. Die gemessene Extinktion ist proportional der LDH-Menge in der Lösung. Da auch eine Zellpopulation, die keinen toxischen Reizen ausgesetzt ist, einen gewissen LDH-Spiegel im Überstand hervorruft, wurden die Stichproben zusammen mit entsprechenden Kontrollen für die spontane, und maximale LDH-Ausschüttung gemessen, wobei letztere durch Lyse der Zellen mit Triton X-100 hervorgerufen worden ist. Die Zytotoxizität errechnet sich aus den gemessenen Extinktionswerten wie folgt:

---

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Stichprobe} - \text{Spontanwert}}{\text{Maximalwert} - \text{Spontanwert}} \cdot 100\%$$

Gleichung 3: Die Formel zur Berechnung der Zytotoxizität

Durch die Einführung dieser normierten Größe waren auch nicht gemeinsam gemessene Stichproben miteinander vergleichbar.

#### 2.2.4.1 Der direkte Vergleich der Zytotoxizität der verschiedenen Nanopartikel

Für diesen Versuch wurden die Zellen auf Mikrotiterplatten passagiert und dann bis zur Konfluenz des Zellrasens kultiviert. Hierzu erfolgte eine Aussaat der Zellen auf diese Mikrotiterplatten in einer Konzentration von etwa 40.000 Zellen pro Schale. Nach drei Tagen bildeten die Zellen einen konfluenten Zellrasen aus und konnten zu diesem Zeitpunkt für den Versuch genutzt werden. Es erfolgte eine sechsstündige Inkubation der Zellen mit definierten Konzentrationen von Nanopartikeln, nämlich 50 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml. Dazu wurden die am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in der Arbeitsgruppe von Dr. Klaus Langer hergestellten Nanopartikel-Stammlösungen in dem für die Zellkultur vorgesehenem Medium auf die Zielkonzentrationen verdünnt. Die Testung aller unter Kapitel 2.1.1 genannten Nanopartikel in den hier genannten Konzentrationen erfolgte parallel. Als Kontrolle dienten ausschließlich mit reinem Medium bestückte Schalen.

Nach dieser sechsstündigen Inkubation wurden alle Schalen entleert, zweimal mit PBS (phosphate buffer solution) gewaschen und dann mit einem definierten Volumen von 100 µl frischem Medium gefüllt. Daraufhin begann eine zwölfstündige Wartezeit, die eine Kumulation der freiwerdenden LDH erlaubte mit anschließender Messung der Überstände.

---

#### 2.2.4.2 Die Kinetik der Zytotoxizität

Zur Erkennung nicht nur kurzfristiger toxischer Zelluntergänge, sondern auch spät einsetzender apoptotischer Zelluntergänge, wurde eine langfristige Zytotoxizitätsmessung durchgeführt. Diese Prüfung auf Späteffekte erfolgte analog der unter 2.2.4.1 beschriebenen Versuchsanordnung mit allen Nanopartikeln in den Konzentrationen 50 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml und zusätzlichen Kontrollen. Der Unterschied war, dass die Inkubationszeit mit Nanopartikeln sowohl sechs Stunden als auch zwölf Stunden betrug und dass nach der ersten Messung weitere nach 48 Stunden und nach 96 Stunden vorgenommen wurden.

Wie oben beschrieben erfolgte nach der Inkubationszeit ein Mediumwechsel mit Entfernung der Überstände, zweimaliger Waschung mit PBS, Füllung der Schalen mit 100 µl frischem Medium und Messung der LDH nach zwölfstündiger Wartezeit. Die Zellen wurden nach der ersten Messung der Überstände mit frischem Medium versorgt, um nach weiteren 48 Stunden eine wiederholte Messung anzustellen. Zur Einhaltung der LDH-Kumulationszeit erfolgte zwölf Stunden vor der wiederholten Messung erneut ein Mediumwechsel. Die gleiche Prozedur wurde nochmals vorgenommen, um auch nach 96 Stunden messen zu können.

#### **2.2.5 Die Untersuchungen zur Nanopartikelaufnahme in Bronchialepithelzellen**

Zur qualitativen wie auch quantitativen Erfassung der Nanopartikelaufnahme in Bronchialepithelzellen, wurden Messungen mit dem konfokalen Laserrastermikroskop und dem Durchflußzytometer vorgenommen. Diese Verfahren basieren auf ähnlichen technischen Prinzipien und sollen hier vorgestellt werden.



---

### 2.2.5.1 Das Grundlegendes Prinzip der Untersuchungen zur Nanopartikelaufnahme

Die Erfassung der Nanopartikelaufnahme wurde durch die Kopplung des Fluorochroms Fluoreszeinamin als Fluoreszenzmarker an Gelatine- und Albuminnanopartikel bewerkstelligt (vgl. Kapitel 2.1.1). Fluoreszeinamin hat ein Molekulargewicht von 389 Da und ein Absorptionsmaximum bei 488 nm. Die Erregung mit Licht dieser Wellenlänge, entsprechend dem Laser des Durchflußzytometers und des Laserrastermikroskops, führt zu einem Fluoreszenzemissionsmaximum zwischen 515 und 535 nm.

Als Gegenfärbung der Zellen erfolgte eine Lektinfärbung mit tetramethylrhodaminmarkiertem Concanavalin A. Lektine sind nichtenzymatische Proteine, die hochspezifisch Mono- und Oligosaccharide binden. Es existieren verschiedene Lektine, die sich bezüglich ihrer kohlenhydratbindenden Domänen unterscheiden und somit für unterschiedliche Kohlenhydrate spezifisch sind. Concanavalin A bindet an  $\alpha$ -Manose und  $\alpha$ -Glucose (Mohan 2000).

Das Fluorochrom Tetramethylrhodaminisothiozyanat (TRITC) hat ein Molekulargewicht von 444 Da, ein Absorptionsmaximum bei 547 nm und ein Emissionsmaximum bei 572 nm. Die Gegenfärbung diente zur Fokussierung des Laserrastermikroskops und zur Identifizierung der Zellpopulation bei Messungen im Durchflußzytometer. Weiterhin ließ sich mit dieser Membranfärbung bei Messungen mit dem konfokalen Laserrastermikroskop eine Unterscheidung zwischen Intra- und Extrazellulärraum und somit eine Lokalisation der Nanopartikel vornehmen.

### 2.2.5.2 Die Messungen mit dem konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM)

Bei der konfokalen Laserrastermikroskopie (konfokales Laserrastermikroskop: CLSM – confocal-laser-scan-microscope) wird das Präparat maschinengesteuert räumlich abgetastet, wobei eine spezielle Blende sicherstellt, dass nur Licht aus der Fokusebene auf den Detektor gelangt. Als Lichtquelle dient ein Laser (hier ein Krypton/Argon-Laser, der Licht der Wellenlänge 488 nm

---

erzeugt), der in der Lage ist, Fluorochrome (Fluoreszenzfarbstoffe) anzuregen. Filter stellen sicher, dass nur die Fluoreszenzemissionen auf den Detektor gelangen, welcher wiederum die Fluoreszenzintensität bestimmt. Während eines Abtastvorganges kann nur ein Fluoreszenzkanal erfasst werden, d.h. um verschiedene Fluorochrome zu erfassen, bedarf es wiederholter Messungen mit verschiedenen Filtereinstellungen. Ein Computer errechnet schließlich aus den einzelnen Messwerten der Rasterpunkte ein räumliches Bild, in dem die Fluoreszenzintensitäten und -kanäle farbverschlüsselt dargestellt sind.

Der Nachweis der zellulären Aufnahme von Nanopartikeln erfolgte mittels der konfokalen Laserrastermikroskopie. Sie erlaubt eine qualitative Beurteilung der Nanopartikelanreicherung in einzelnen Zellen. So lässt sich beispielsweise, dank des räumlichen Eindrucks, beurteilen, ob die Nanopartikel der Zellmembran nur aufliegen oder sich innerhalb dieser Membran befinden. Weiterhin kann die räumliche Verteilung der Nanopartikel in der Zelle beurteilt werden. Allerdings bietet die konfokale Laserrastermikroskopie nicht die Möglichkeit, eine große Zellpopulation in kurzer Zeit zu erfassen, wie es die Durchflußzytometrie kann. Stattdessen beschränkt sich die Anwendung dieser Methode auf einzelne ausgewählte Zellen. Zusätzlich gab ein Versuch, bei dem die Zellen bei 4°C mit Nanopartikeln inkubiert wurden, Aufschluss über die Stoffwechselabhängigkeit der Nanopartikelaufnahme. Zu diesen Untersuchungen mit dem CLSM dienten die in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen Nanopartikel und die unter 2.2.5.1 beschriebene Zellfärbung. Die Filtereinstellungen, Laserintensität, Kontrast und Schärfe wurden für diese Farbstoffe optimiert.

#### 2.2.5.2.1 Die Versuchsanordnung zur qualitativen Beurteilung der Nanopartikelaufnahme mit dem konfokalen Laserrastermikroskop

Primäre Bronchialepithelzellen wurden auf Objektträgern mit Zellkulturkammern bis zur Konfluenz kultiviert. Die sechsstündige Inkubation der Zellen bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von etwa 5 kPa erfolgte in Medium mit einer Nanopartikelkonzentration von 50 µg/ml, die Inkubation der Kontrollen in reinem

---

Medium. Parallel wurde eine Probe mit Nanopartikeln der Konzentration 50 µg/ml und eine Kontrolle mit reinem Medium bei 4°C in einem Kühlschrank auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte eine zweimalige Waschung der Zellen mit PBS und eine zweiminütige Behandlung mit tetramethylrhodaminmarkiertem Concanavalin A in einer Konzentration von 50 µg/ml. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde eine Lösung bestehend aus 10 % Mowiol® 488, 2,5 % DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]Oktan) und 25 % Glycerin in 0,2 M Tris Puffer bei pH 8,5 auf die Zellen gegeben. Nun erfolgte die Messung von Kontrollen und Proben mit dem CLSM bei identischen Filtereinstellungen.

#### 2.2.5.2.2 Die Auswertung der Bilder des konfokalen Laserrastermikroskops

Bei der Betrachtung der im Ergebnisteil dargestellten Bilder handelt es sich um Schnitte durch die abgetasteten Präparate. Die Bilder sind aufgeteilt in einen großen Quadranten in der Bildmitte und zwei balkenförmige Bereiche am unteren und rechten Bildrand. Es handelt sich um einen frontalen, einen sagittalen und einen transversalen Schnitt durch das Präparat. Die Bildebenen sind durch kleine Pfeile markiert und so angeordnet, das eine ausgesuchte Zelle in drei Ebenen angeschnitten ist, um eine genaue Betrachtung des Zellinnenraumes zu ermöglichen.

Für die Darstellung der Fluoreszenzsignale des an die Nanopartikel gebundenen Farbstoffs ist die Farbe grün gewählt worden und zur Darstellung der Signale aus der Lektinfärbung der Zellwand die Farbe rot. Diese gewählte Farbkodierung entspricht den Wellenlängenbereichen des Lichts, das diese Fluoreszenzfarbstoffe bei Anregung emittieren.

Die Auswertung der Bilder aus dem CLSM mit einem objektiven Verfahren ist erst seit kurzem, über eine neue Software, die eine objektive Auswertung der Aufnahmen über den Vergleich der Pixelintensität vornimmt, möglich geworden. Im Rahmen dieser Arbeit, wo diese Methode nicht zur Verfügung stand, ist eine subjektive Beurteilung durch Vergleich des Testobjekts mit der Negativkontrolle erfolgt. Zunächst wurde auf das Vorhandensein von Signalen innerhalb der

---

äußeren Zellmembran geachtet, um eine qualitative Aussage über die Aufnahme der Nanopartikel treffen zu können. Ferner wurde die Verteilung der Signale innerhalb der Zellen untersucht.

#### 2.2.5.3 Die Untersuchungen mit Hilfe des Durchflußzytometers

Bei der Durchflußzytometrie wird eine Probe von suspendierten Zellen mit einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom durch eine Messzelle gespült. Dort gelangen die Zellen einzeln in die Fokusebene eines Anregungslaserstrahls, hier ein Argon-Ionen-Laser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm erzeugt. Die Interaktion des Laserlichts mit den Zellen führt zu dessen Reflexion, Beugung und Brechung, so dass Streulicht entsteht. Fluoreszenzsignale werden durch das Laserlicht hervorgerufen, sofern die Zellen mit einem Fluorochrom (Fluoreszenzfarbstoff) versehen sind. Das so entstandene Lichtspektrum wird von fünf Dioden gemessen, von denen zwei für die Erfassung des Streulichtes zuständig sind. Sie messen das nach vorne und das zur Seite gestreute Licht und damit die Zellgröße und die Granularität. Diese Messgrößen werden in dieser Reihenfolge FSC (forward scatter) und SSC (sideward scatter) genannt. Die anderen drei Dioden sind für die Erfassung des Fluoreszenzspektrums verantwortlich. Ihnen sind spezielle Filter vorgeschaltet, so dass jeweils eine dieser Dioden bei 530 nm, 585 nm und >650 nm misst. Diese Kanäle werden in dieser Reihenfolge FL1 (fluorescence), FL2 und FL3 genannt. Alle hier genannten Kanäle können im Durchflußzytometer synchron gemessen werden, dies ist insbesondere notwendig, da einmal erfasste Zellen in einem Abfalltank entsorgt werden und nicht mehr für weitere Messungen zur Verfügung stehen. Jeder dieser Zellen wird zu jedem Kanal, entsprechend der Stärke des gemessenen Signals, ein Messwert in Form einer ganzen Zahl zwischen 0 und 255 zugeordnet. Somit bewegen sich die erhobenen Stichproben auf einem ordinalen Skalenniveau.

Das Gerät ist mit einem Computer verbunden, der die Modifikation bestimmter Parameter steuert, insbesondere die Empfindlichkeit der Dioden und die Eingrenzung des von den Dioden erfassten Lichtspektrums. Weiterhin

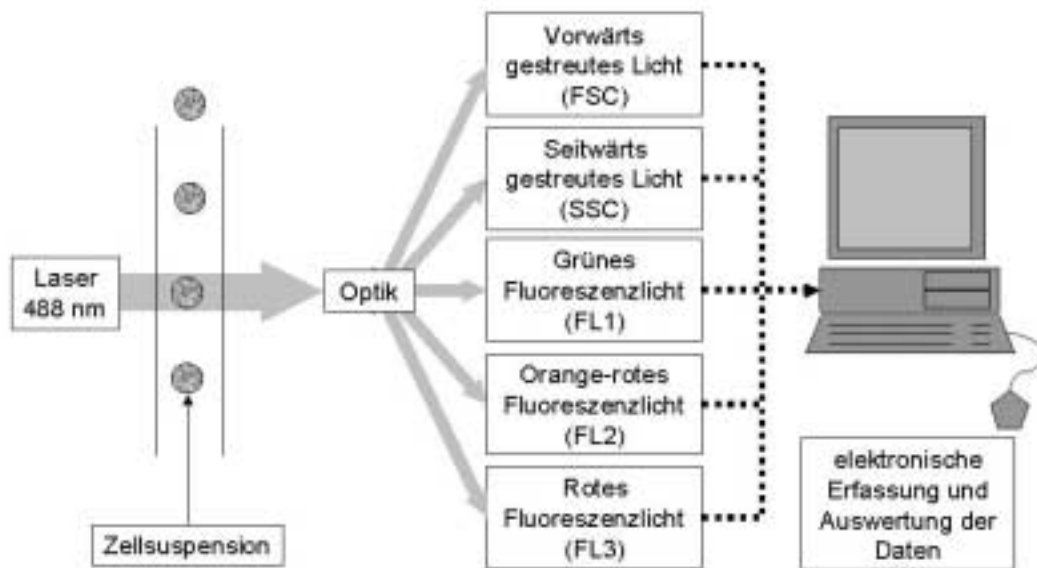
---

kontrolliert er den Stichprobenumfang, speichert die Messwerte und erlaubt die Auswertung der gewonnenen Daten (Jaroszeski und Heller 1998).

Das Durchflußzytometer wird im Jargon nach der Methode benannt, für die es ursprünglich konstruiert worden ist, nämlich dem Sortieren von Zellen nach Fluoreszenzmerkmalen. So wird das Gerät im allgemeinen als FACS (fluorescence-activated-cell-sorting) bezeichnet.

Bei den im folgenden aufgeführten durchflußzytometrischen Methoden wurden die im Kapitel 2.1.1 beschriebenen fluoreszeinaminmarkierten Nanopartikel und die im Abschnitt 2.2.5.1 beschriebene Zellfärbung verwandt. Die Interaktion dieser Nanopartikel mit den Zellen führte zu einer Zunahme der Fluoreszenzsignals im FL1-Kanal (530 nm) des Durchflußzytometers. Die Zellfärbung mit tetramethylrhodaminmarkiertem Concanavalin A wurde im FL2-Kanal (588 nm) des Durchflußzytometers gemessen. Für die Messung der auf diese Weise präparierten Zellen wurden ferner bestimmte Einstellungen vorgenommen, so wurde vor allem die Breite des als FL2 erfassten Spektrums vor jeder Messung eingeschränkt (durch die sogenannte Kompensation), da die Fluoreszeinamin-markierten Nanopartikel in diesen Kanal hineinstrahlen.

Neben der qualitativen Beurteilung der Nanopartikelaufnahme im CLSM, erlaubt diese Methode eine quantitative Beurteilung der Anreicherung der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel in Bronchialepithelzellen. Insbesondere wurde mit diesem Verfahren untersucht, wie groß der Anteil der Zellen, die Nanopartikel aufnehmen, an der Gesamtpopulation ist. Dazu wurden die Zellen mit Nanopartikeln unterschiedlicher Konzentration inkubiert. Eine Inkubation von Proben sowohl bei 37°C als auch bei 4°C erfolgte zusätzlich, um die Abhängigkeit der Nanopartikelaufnahme vom Zellstoffwechsel zu untersuchen.



*Abbildung 8: Ein Schema der wichtigsten Komponenten eines Durchflußzytometers: Die gelösten Zellen der Stichprobe werden einzeln durch einen Laserstrahl geführt. Das entstehende Lichtspektrum wird mittels einer Optik in die verschiedenen Komponenten gespalten. Messdioden erfassen die einzelnen Kanäle, wandeln also die Lichtsignale um in Informationen. Diese Informationen werden elektronisch gespeichert und ausgewertet.*

#### 2.2.5.3.1 Die Versuchsanordnung zur Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme in Bronchialepithelzellen

Zur Ergründung, ob die untersuchten Zellen prinzipiell Nanopartikel aufnehmen, wurden zunächst Untersuchungen an Zellsuspensionen angestellt. Anschließend sollte sich zeigen inwiefern auch ein konfluenter Zellrasen Nanopartikel aufnimmt und, ob der Differenzierungsgrad der Zellen die Inkorporation der Nanopartikel beeinflusst. Deshalb wurden die primären Bronchialepithelzellen außer auf herkömmlichen Plastikoberflächen auch auf Membraneinsätzen, die den Differenzierungsgrad der Zellen auf einem hohen Niveau halten, kultiviert (vgl. Kapitel 2.1.8.1).

---

#### 2.2.5.3.1.1 Die Versuche mit suspendierten Zellen

Zur Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme in suspendierte Zellen erfolgte die Herstellung von Medium der Nanopartikelkonzentration 50 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml. Die Bronchialepithelzellen wurden zu je etwa  $10^5$  Zellen in diesen Medien verteilt und in Polystyren-Reagenzgläser gegeben. Diese Proben wurden mitsamt Kontrollen für sechs Stunden bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank inkubiert. Eine zusätzliche Probe mit einer Nanopartikelkonzentration von 50 µg/ml inkubierte gleichzeitig bei 4°C in einem Kühlschrank auf Eis. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 1.200 Umdrehungen pro Minute zehn Minuten lang zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die oben beschriebene Lektinfärbung durch zweiminütige Behandlung der Zellen mit tetramethylrhodaminmarkiertem Concanavalin A in einer Konzentration von 50 µg/ml. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und anschließender Verteilung der Zellen in einem Volumen von 0,5 ml PBS wurden Proben und Kontrollen mit identischen Einstellungen im Durchflußzytometer gemessen. Jede Stichprobe umfasste zehntausend Zellen.

#### 2.2.5.3.1.2 Die Versuche mit adhärenenten Zellen

Primäre Bronchialepithelzellen wurden auf Membraneinsätzen und Multischalenplatten bis zur Konfluenz kultiviert, 16HBE14o-Zellen auf Multischalenplatten ebenfalls bis zur Konfluenz des Zellrasens. Es erfolgte die Herstellung von Medium der Nanopartikelkonzentration 50 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml, welches für eine Inkubationszeit von sechs Stunden bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank auf die Zellen gegeben worden ist. Parallel wurde eine Probe mit Nanopartikeln der Konzentration 50 µg/ml bei 4°C in einem Kühlschrank auf Eis inkubiert. Kontrollen durchliefen ebenfalls diese Prozeduren. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert, in Polystyren-Reagenzgläser überführt und bei 1.200 Umdrehungen pro Minute zehn Minuten lang zentrifugiert. Die in Kapitel 2.2.5.1 beschriebene Lektinfärbung erfolgte durch zweiminütige Behandlung der Zellen

---

mit tetramethylrhodaminmarkiertem Concanavalin A in einer Konzentration von 50 µg/ml. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und anschließender Verteilung der Zellen in einem Volumen von 0,5 ml PBS wurden Proben und Kontrollen mit identischen Einstellungen im Durchflußzytometer gemessen. Jede Stichprobe umfasste zehntausend Zellen.

#### 2.2.5.3.2 Die Auswertung der Daten aus der Durchflußzytometrie

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Darstellung der im FL1-Kanal (530 nm) erfassten Emissionen der Stichproben in Form einer Häufigkeitsverteilung. Diese Häufigkeitsverteilung stellt die absolute Häufigkeit der Einzelmesswerte (0-255) innerhalb einer Stichprobe von zehntausend Zellen dar. Durch grafische Übereinanderlegung wurden die Stichproben subjektiv miteinander verglichen. Objektiviert wurden diese Vergleiche mittels des Wilcoxon-Rangsummentests, der zur Auswertung der ordinalskalierten Daten aus dem Durchflußzytometer geeignet ist (vgl. Kapitel 2.2.3).

### 2.2.6 Die quantitative Interleukin-8-Bestimmung

Zur Untersuchung des inflammatorischen Potenzials von Nanopartikeln, erfolgte eine quantitative Interleukin-8-Bestimmung nach Inkubation der Bronchialepithelzellen mit Gelatine- und Albuminnanopartikeln.

#### 2.2.6.1 Interleukin 8

Das Zytokin Interleukin 8 (IL-8) ist ein nicht glykosyliertes Protein mit einer Molmasse von 8 kDa und einer Länge von 72 Aminosäuren. Das Gen für den Humanfaktor hat eine Länge von 5,1 kb, enthält vier Exons und ist auf Chromosom 4q12-21 lokalisiert (Ibelgaufts 1992).

Es handelt sich dabei um ein inflammatorisches Zytokin, das von primären Bronchialepithelzellen und auch von der Zelllinie 16HBE14o exprimiert und ausgeschüttet wird. IL-8 aktiviert und ist chemotaktisch für Neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten (Yoshimura et al. 1987; Larsen et al. 1989).



---

Als sekundärer Mediator steht IL-8 in der Entzündungskaskade hinter primären Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Cromwell et al. 1992). Die Expression von IL-8 wird durch Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (Nuklearfaktor Kappa B) und AP-1 (Aktivatorprotein 1) reguliert, die an ein Enhancerelement im Bereich des IL-8-Promotors binden. Die Bindung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  an ihren extrazellulären Rezeptor führt im Rahmen eines Transduktionsmechanismus zur Phosphorylierung von I- $\kappa$ B (Inhibitor von NF- $\kappa$ B), ermöglicht damit die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Kern und führt somit zur verstärkten Expression von IL-8 (Roebuck 1999). Auch die sogenannten mitogen-activated protein kinases (MAPK) spielen eine Rolle bei dessen Expression (Roebuck 1999).

Die IL-8-Expression wird bei Bronchialepithelzellen nach verschiedenen Reizen wie zum Beispiel bakteriellen Endotoxinen (Khair et al. 1996) und oxidativem Stress (DeForge et al. 1993) festgestellt. Eine Reihe von biologischen und umweltbedingten Einflüssen steigert die Entstehung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (engl.: reactive oxygen species, ROS) wie beispielsweise eine Virusinfektion oder Strahlung und verursacht somit oxidativen Stress. Reaktive Sauerstoffmetaboliten haben einen Einfluss auf zelluläre Transduktionsmechanismen durch Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration und durch Beeinflussung der Proteinphosphorylierung, insbesondere greifen sie auch in Transduktionsvorgänge an MAP-Kinasen an (Roebuck 1999).

Ein Anstieg der IL-8-Produktion wird bei der Zelllinie 16HBE14o nach hyperosmolarem Stress beobachtet, was ebenfalls auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffmetabolite zurückgeführt werden kann (Hashimoto et al. 1999; Loitsch et al. 2000).

#### 2.2.6.2 IL-8 Bestimmung mittels eines ELISA

Das Prinzip des ELISA (engl.: enzyme linked immunosorbent assay) besteht in der quantitativen Bestimmung einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion durch das Einbringen eines Markerenzym. Bei dieser immunologischen

---

Methode wird entweder das Antigen oder der entsprechende Antikörper mit diesem Enzym markiert und über die enzymatische Umsetzung des jeweiligen Substrats wird die Konzentration bestimmt. Bei dem hier beschriebenen Verfahren wurde Peroxidase als Markerenzym verwendet. Als Substrat diente 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), das nach Oxidation ein wasserlösliches blaues Reaktionsprodukt bildet. Dieses wird nach Ansäuerung gelb und hat ein Absorptionsmaximum bei 450 nm. Die Empfindlichkeit dieser Methode reicht in den Nanogrammbereich.

Man unterscheidet zwischen kompetitiven und nichtkompetitiven Methoden, wobei es sich bei der hier beschriebenen Methode um die nichtkompetitive sogenannte Sandwich-ELISA bzw. Doppelantikörpertechnik handelt. Hierbei wird der an eine feste Phase gebundene Antikörper mit Standard- bzw. Testantigen inkubiert. Nach dem Waschen wird der fixierte Immunkomplex mit einem Überschuss enzymmarkierter Antikörper behandelt und damit erfassbar gemacht. Das gemessene Enzymreaktionsprodukt ist der Antigenkonzentration direkt proportional (Friemel 1984).

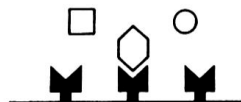
---

1. Antikörper - Bindung an feste Phase



2. waschen

3. Inkubation mit antigenhaltigen Proben



4. waschen

5. Inkubation mit Antikörper - Enzym - Konjugat



6. waschen

7. Inkubation mit Enzym - Substrat (○) und Messen des Produktes (●)

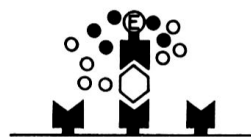


Abbildung 9: Das Schema der Sandwich-ELISA nach Friemel (Friemel 1984).

### 2.2.6.3 Die Versuchsanordnung der IL-8 ELISA

#### 2.2.6.3.1 Das Beschichten der Mikrotiterplatte

Die Beschichtung der Mikrotiterplatte erfolgte durch Verteilung von 100 µl einer Lösung aus 44 µg Beschichtungsantikörper in 11 ml Beschichtungspuffer in jede Schale. Die Platte wurde danach über Nacht bei 4°C inkubiert. Eine Nachbeschichtung der Platte nach dieser Inkubation erfolgte zur Blockierung freier Bindungsstellen. Hierzu wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit PBS gewaschen, um dann 100 µl des zweiprozentigen Gelatine-Hydrolysates in jede

---

Schale zu geben. Danach folgte eine Inkubationszeit von zwei bis drei Stunden bei 37°C.

#### 2.2.6.3.2 Die Herstellung des Standards

Der Standard aus humanem IL-8 wurde zunächst zu je 100 ng / 10 µl proportioniert. Eine dieser Portionen wurde auf eine Konzentration von 2000 pg/ml herunterverdünnt, woraus durch serielle 1:1-Verdünnung die Pipettierung einer Standardkurve von 2000 pg/ml bis 31 pg/ml erfolgte.

#### 2.2.6.3.3 Die Behandlung der Proben

Bronchialepithelzellen wurden zu je etwa 150.000 Zellen pro Schale auf eine 24-well Multischalenplatte ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz nach etwa fünf Tagen erfolgte die Verteilung von Nanopartikeln in den Konzentrationen 5, 10, 50 und 100 µg/ml auf die Schalen. Dazu erfolgte die Verdünnung der am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in der Arbeitsgruppe von Dr. Klaus Langer hergestellten Nanopartikel-Stammlösungen in dem für die Zellkultur vorgesehenem Medium auf die Zielkonzentrationen. Zur Durchführung einer Positivkontrolle bei der Zelllinie 16HBE14o diente die Herstellung eines Mediums mit erhöhter Osmolarität. Mittels einer 5 Molaren Natriumchloridlösung wurde hierzu die Osmolarität des Kulturmediums von ca. 300 mosm/l auf 500 mosm/l erhöht. Zur Durchführung der Positivkontrolle bei primären Bronchialepithelzellen diente die Inkubation mit TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 10 ng/ml. Das Endvolumen in den einzelnen Schalen lag bei 1 ml. Die anschließende Inkubationszeit beträgt 24 Stunden.

Nach der Inkubationszeit erfolgte eine sofortige Kühlung der Multischalenplatten mit Eis. Je 800 µl des Überstandes wurden abgezogen, in Eppendorfreaktionsgefäße gegeben und ebenfalls mit Eis gekühlt. Hiernach erfolgte die zehnmütige Zentrifugation dieser Überstände in der vorgekühlten Zentrifuge bei 4°C und 1200 U/min. Nun wurden 600 µl des Überstandes abgezogen und erneut unter ständiger Kühlung zentrifugiert.

---

Es erfolgte die Verdünnung der so gewonnenen Überstände 1:3 auf ein Gesamtvolumen von 400 µl. Für die Messung dienten 100 µl dieser Proben.

#### 2.2.6.3.4 Die Messung der Proben

Die Messung wurde in den beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt nach oben beschriebener Herstellung des Standards und Verdünnung der Proben. Hierzu erfolgte ein dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte und die folgende Inkubation mit Proben und Standards über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Platte entleert und dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Lösung von 220 ng biotinyliertem IL-8 Detektionsantikörper in 11 ml Diluent, um die Mikrotiterplatte mit 100 µl dieser Antikörperlösung zu beschicken und zwei Stunden bei 20°C zu inkubieren. Nun wurde die Platte geleert und zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Lösung von 3 µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat in 30 ml Diluent. Die Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl dieser Lösung beschickt und für eine Stunde bei 20°C in Dunkelheit auf einem Rüttler inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen der Platte mit PBS und Beschickung jeder Schale mit 100 µl TMB Substratlösung. Nach 15-minütiger Inkubation bei 20°C in Dunkelheit auf einem Rüttler wurde eine 3 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aus 10 ml 36 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 110 ml H<sub>2</sub>O hergestellt, um die Reaktion durch Pipettieren von 100 µl dieser Lösung in jede Schale zu stoppen. Die Messung der Farbreaktion erfolgte mit dem ELISA-Reader bei 450 nm.

#### 2.2.6.4 Die Auswertung der Ergebnisse der IL-8-ELISA

Zur Bestimmung der absoluten Konzentration des Interleukins aus den im Photometer bestimmten Extinktionswerten, wurde mit den Messwerten des Standards eine lineare Regression durchgeführt. Die so errechnete Regressionsgerade lieferte die absoluten Konzentrationen. Ferner wurden die Messwerte der einzelnen Stichproben mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests auf Gleichheit mit der Negativkontrolle überprüft.

---

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Die Zytotoxizitätstests**

#### **3.1.1 Der direkte Vergleich der Zytotoxizität der verschiedenen Nanopartikel**

Im folgenden sind die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen an primären Bronchialepithelzellen und 16HBE14o-Zellen nach Durchführung des in Abschnitt 2.2.4.1 beschriebenen Protokolls aufgeführt. Der Begriff Zytotoxizität wird dort definiert. Die Abbildungen zeigen beispielhaft eine aus dreimalig ausgeführten Versuchsansätzen ausgewählte Messung.

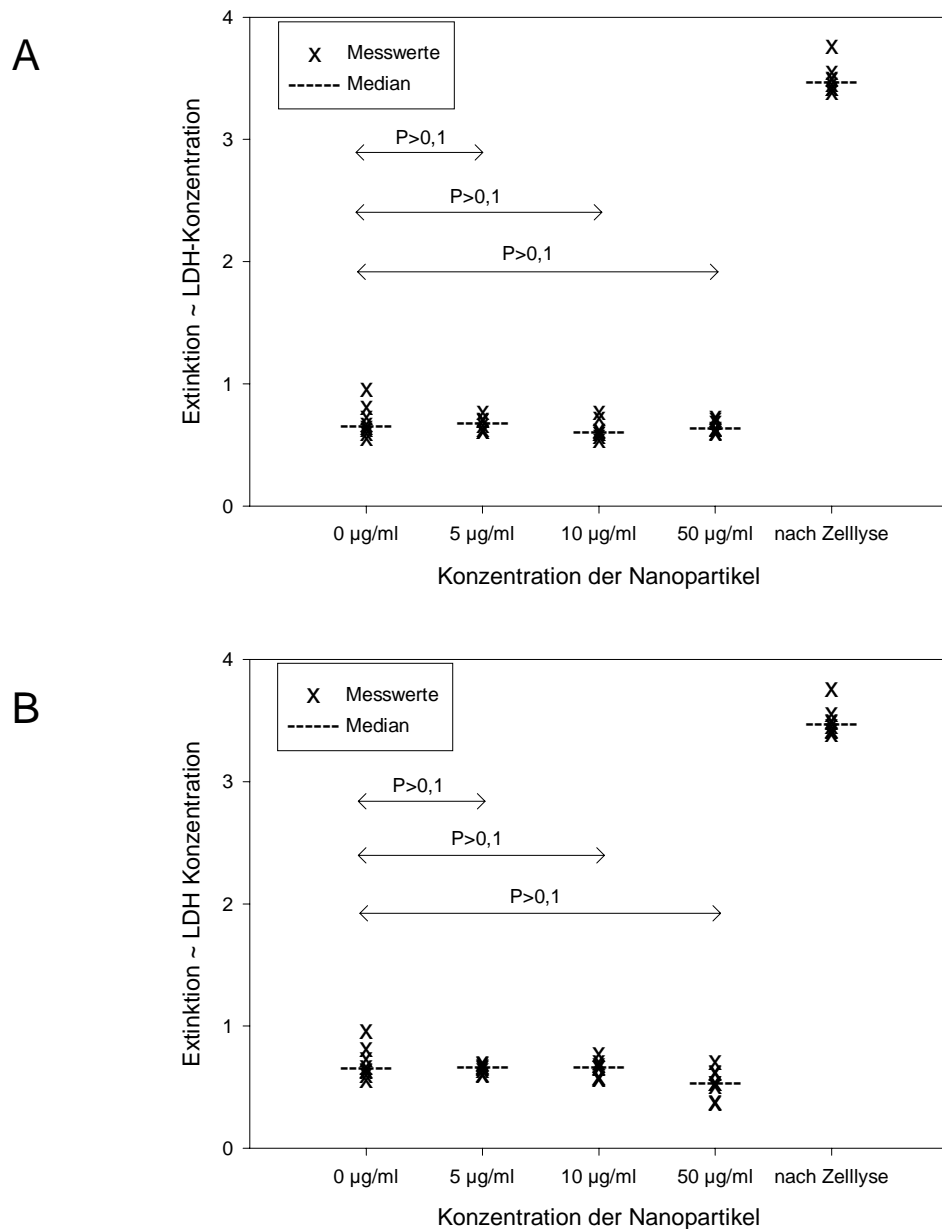
##### **3.1.1.1 Der zytotoxische Effekt der verschiedenen Nanopartikel auf primäre humane Bronchialepithelzellen**

In Abbildung 10, 12 und 13 sind die Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung mit primären humanen Bronchialepithelzellen dargestellt. Es finden sich die Messwerte, deren Mediane und die Testwerte aus dem Vergleich der Stichproben mit dem Wilcoxon-Rangsummentest. Abbildung 19 zeigt zusammenfassend die Zytotoxizität der einzelnen Nanopartikel in den getesteten Konzentrationen.

Es hat sich gezeigt, dass Gelatine- und Albuminnanopartikel in den hier verwandten Konzentrationen keinen zytotoxischen Effekt in der Zellkultur aufweisen. Die Zytotoxizität von Cyanoakrylatnanopartikeln ist abhängig von der Länge der Seitenketten, wobei PBCA-Nanopartikel mit den kurzen Butyl-Seitenketten eine höhere Zytotoxizität besitzen, als die PHCA-Nanopartikel mit

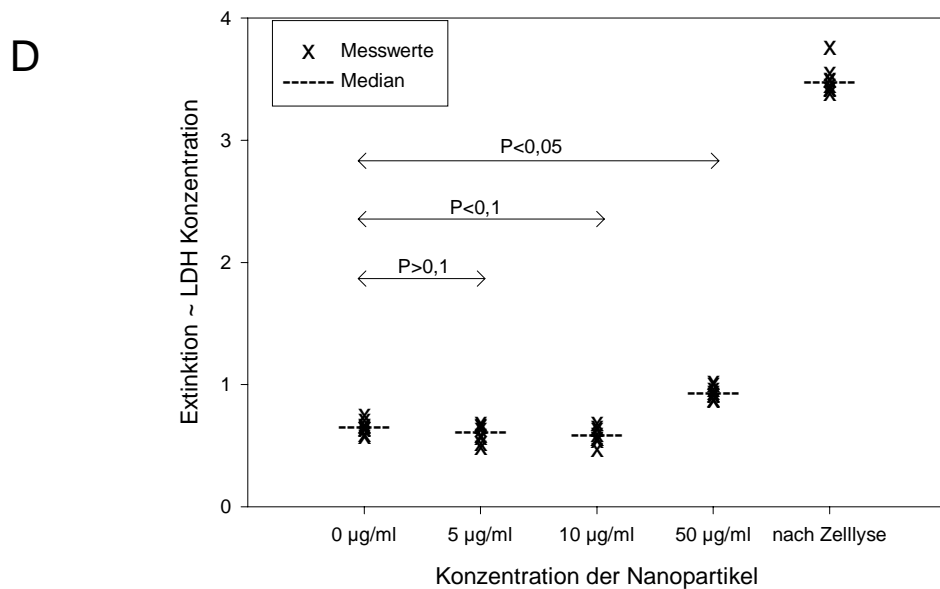
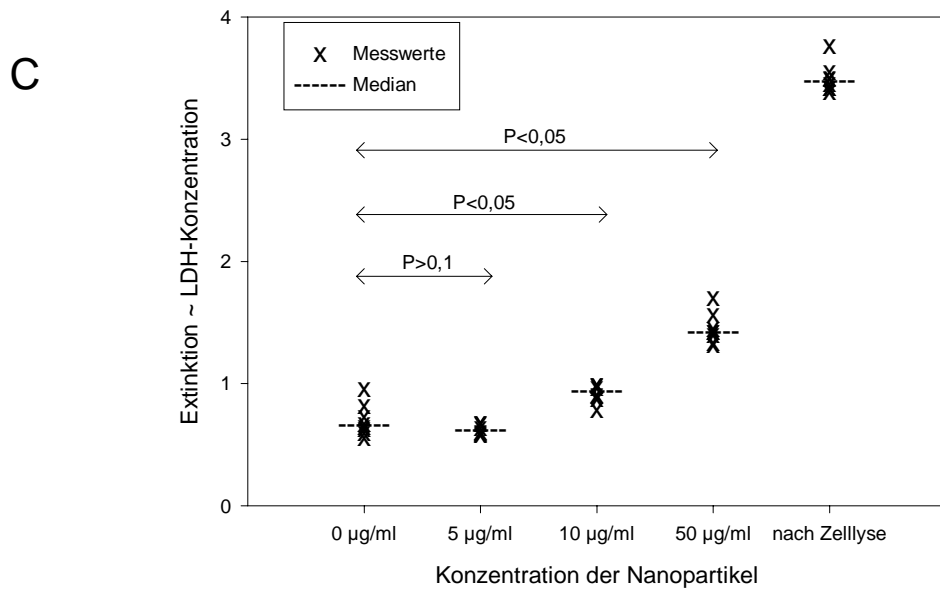
---

den längeren Hexyl-Seitenketten. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 14. dargestellt. Weiterhin ist zu sagen, dass die PHCA-Nanopartikel erst ab einer Konzentration von 50 µg/ml einen zytotoxischen Effekt auf primäre humane Bronchialepithelzellen in der Zellkultur besitzen, allerdings ist dieser Sachverhalt in Frage zu stellen, da dies nicht bei jedem Versuchsansatz reproduzierbar war. Hingegen zeigen PBCA-Nanopartikel schon bei 10 µg/ml eine zwar geringe, aber reproduzierbare Zytotoxizität. Ein Einfluss der Stabilisatoren Pluronic F68™ und Dextran konnte nicht festgestellt werden, da beide Präparationen identische Ergebnisse lieferten.

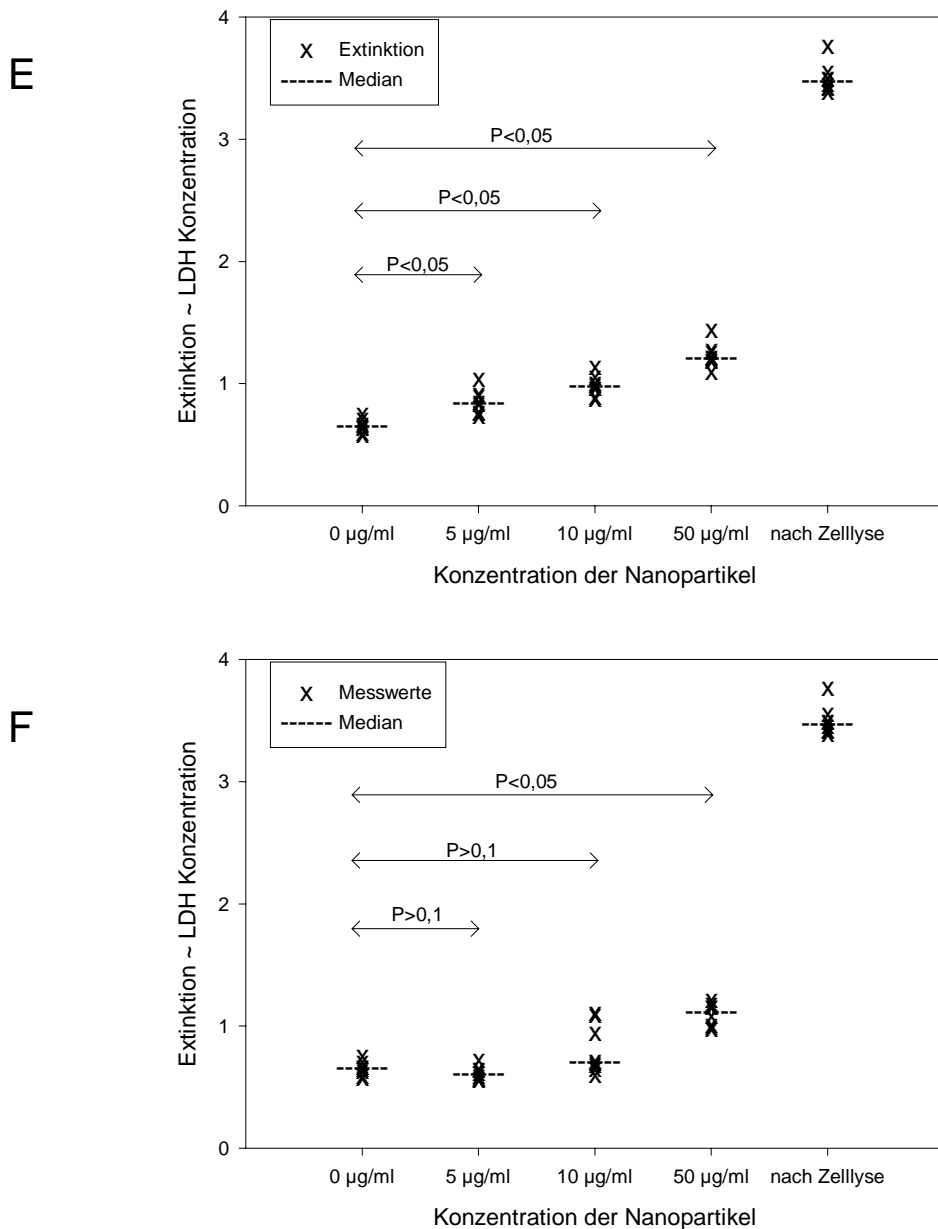


**Abbildung 10:** Die Zytotoxizität von **Gelatinenanopartikeln** (A) und **Albuminnanopartikeln** (B) auf **primäre humane Bronchialepithelzellen**. Die einzelnen Messwerte sind hier mit Median abgebildet; auf den Pfeilen sind die Testwerte aus dem Vergleich zweier Stichproben mit dem Wilcoxon-Rangsummentest aufgetragen.

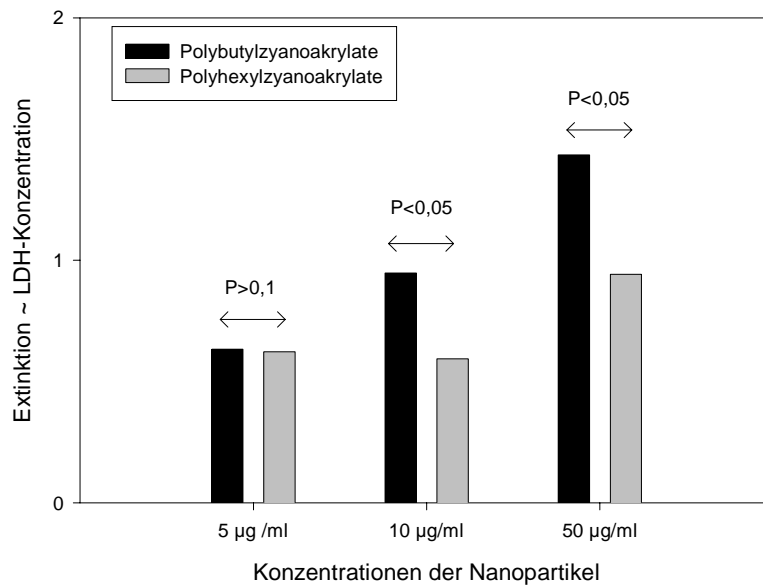




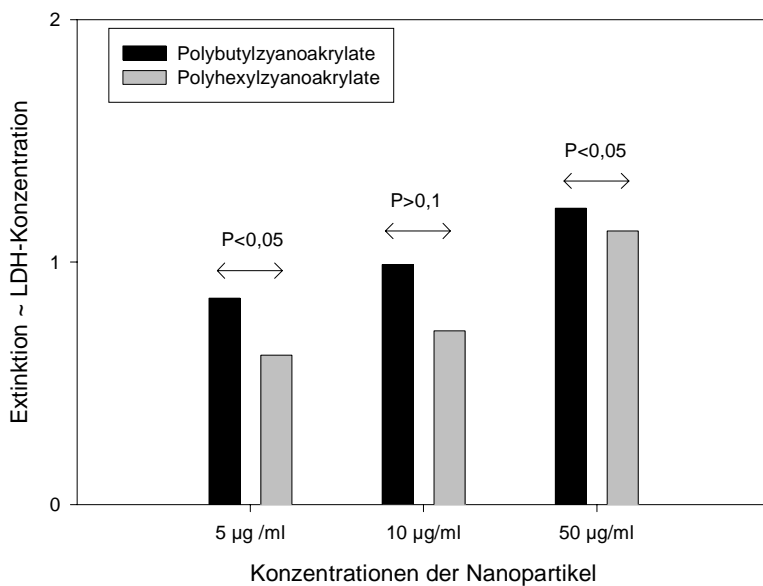
**Abbildung 11:** Die Zytotoxizität von Cyanoakrylatnanopartikeln **auf primäre humane Bronchialepithelzellen**. Oben **Polybutylcyanoakrylate** (C) und unten **Polyhexylcyanoakrylate** (D). Bei den hier dargestellten Cyanoakrylatnanopartikeln wurde **Pluronic F68™** als Stabilisator verwendet.



**Abbildung 12:** Die Zytotoxizität von Cyanoakrylatnanopartikeln auf **primäre humane Bronchialepithelzellen**. Oben **Polybutylcyanoakrylate (E)** und unten **Polyhexylcyanoakrylate (F)**. Bei den hier dargestellten Cyanoakrylatnanopartikeln wurde **Dextran 70.000** als Stabilisator verwendet.



Pluronic F-58™



Dextran 70.000

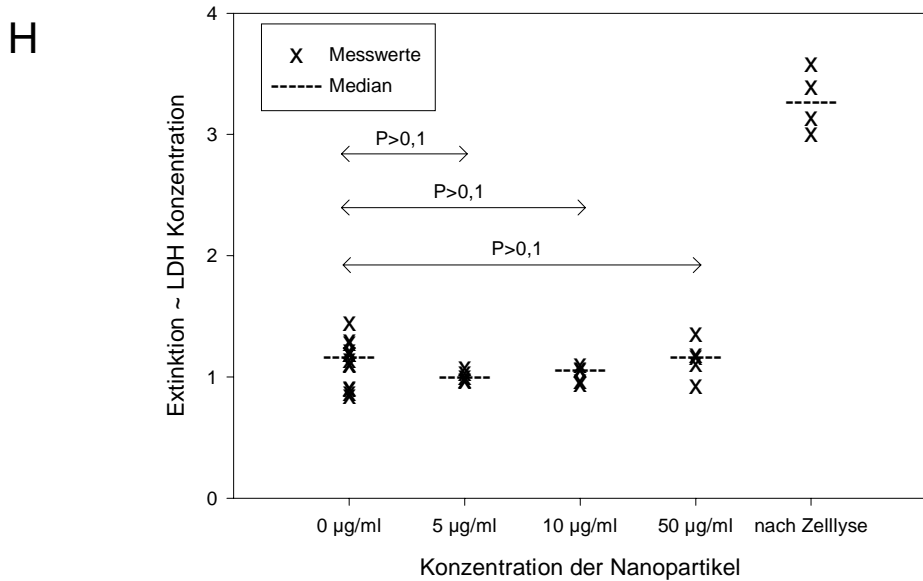
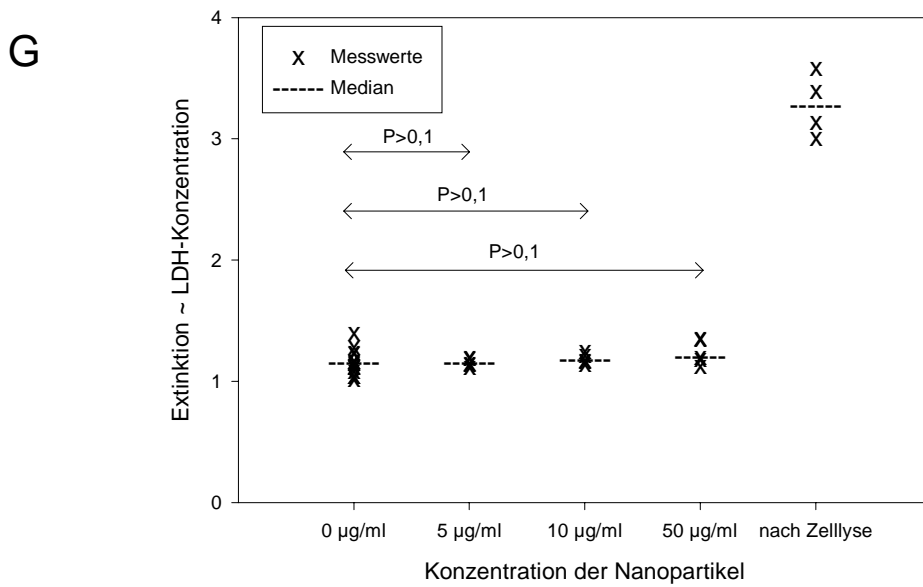
**Abbildung 13:** Der Vergleich des zytotoxischen Effekts von **Cyanoakrylat-nanopartikeln unterschiedlicher Seitenkettenlänge auf primäre Bronchial-epithelzellen**. Die Balken zeigen die Mediane der Messwerte für die jeweilige Nanopartikelart und -konzentration. Über den Pfeilen sind die Testwerte aus der statistischen Auswertung mittels des Wilcoxon-Rangsummentests aufgetragen. Oben dargestellt ist die Präparation mit Pluronic F-58™ als Stabilisator, unten die mit Dextran 70.000.

---

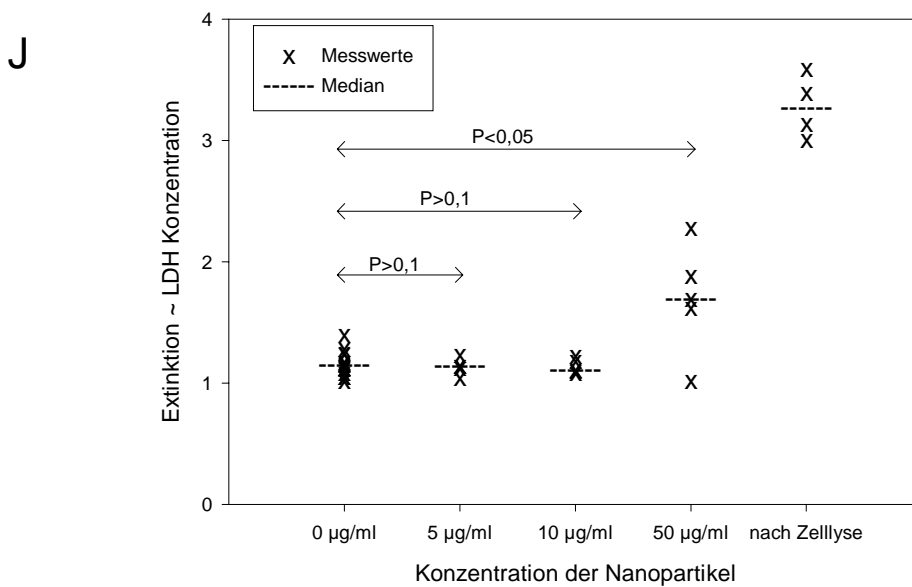
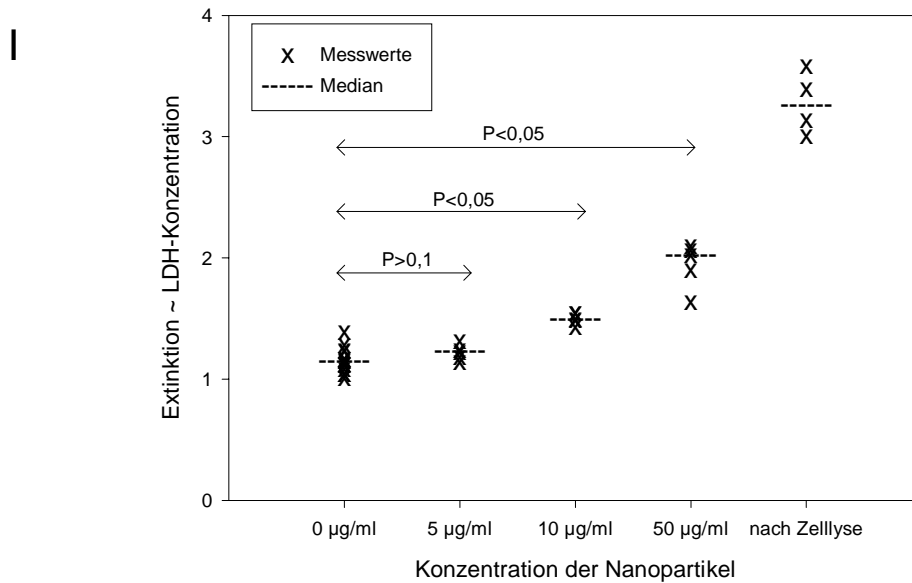
### 3.1.1.2 Der zytotoxische Effekt auf die Zelllinie 16HBE14o

In Abbildung 15, 16 und 17 sind die Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung mit 16HBE14o-Zellen dargestellt. Die Graphiken beinhalten die Messwerte, deren Mediane und die Testwerte aus dem Vergleich der Stichproben mit dem Wilcoxon-Rangsummentest. Abbildung 19 zeigt zusammenfassend die Zytotoxizität der einzelnen Nanopartikel in den getesteten Konzentrationen.

Was die Gelatine- und Albuminnanopartikel angeht sind die Ergebnisse mit 16HBE14o-Zellen vergleichbar denen mit primären Bronchialepithelzellen. So haben Gelatine- und Albuminnanopartikel in den hier erprobten Konzentrationen keinen zytotoxischen Effekt in der Zellkultur. Allerdings ließ sich hinsichtlich der Zytotoxizität von Cyanoakrylatnanopartikeln ein Einfluss der Seitenkettenlänge nicht sicher nachweisen, was in Abbildung 18 abgebildet ist. Im Gegensatz zu den primären Zellen war die Zytotoxizität von PHCA ab einer Konzentration von 50 µg/ml gut reproduzierbar, hingegen waren PBCA nicht schon ab 10 µg/ml, sondern erst ab 50 µg/ml sicher toxisch. Zusammenfassend besteht eine Zytotoxizität der getesteten Cyanoakrylatnanopartikel auf 16HBE14o-Zellen ab einer Konzentration von 50 µg/ml. Ein Einfluss der Stabilisatoren Pluronic™ und Dextran konnte nicht festgestellt werden, da beide Präparationen identische Ergebnisse lieferten.

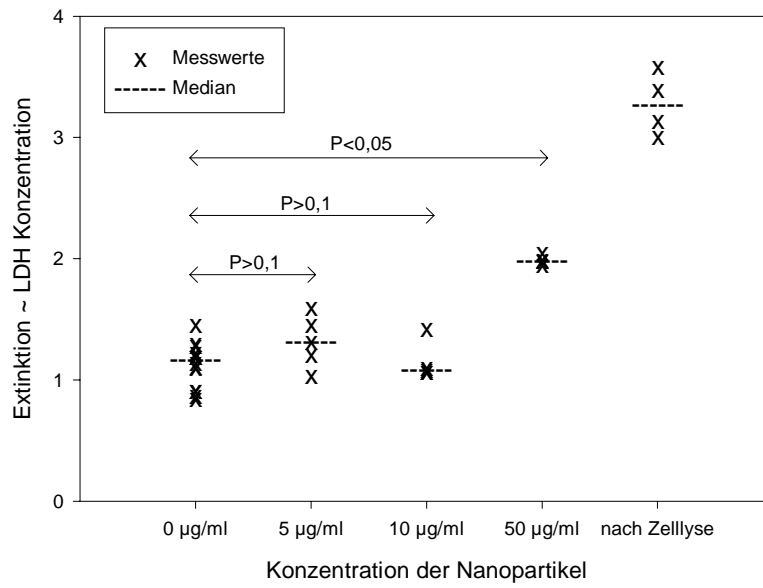


**Abbildung 14:** Die Zytotoxizität von **Gelatinenanopartikeln** (G) und **Albuminnanopartikeln** (H) auf **16HBE14o-Zellen**. Abgebildet sind die einzelnen Messwerte mit Median; auf den Pfeilen sind die Testwerte aus dem Vergleich zweier Stichproben mit dem Wilcoxon-Rangsummentest aufgetragen.

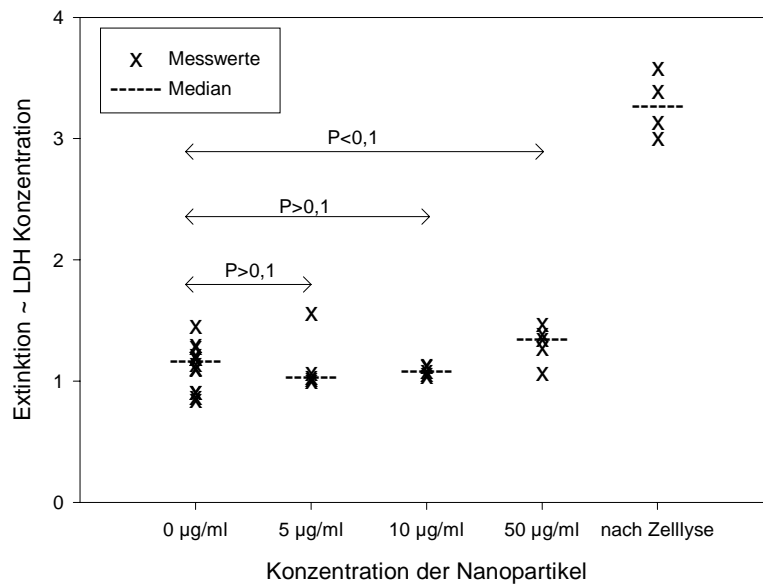


**Abbildung 15:** Die Zytotoxizität von Cyanoakrylatnanopartikeln auf **16HBE14o-Zellen**. Oben **Polybutylcyanoakrylate (I)** und unten **Polyhexylcyanoakrylate (J)**. Bei den hier dargestellten Cyanoakrylatnanopartikeln wurde **Pluronic F-58™** als Stabilisator verwendet.

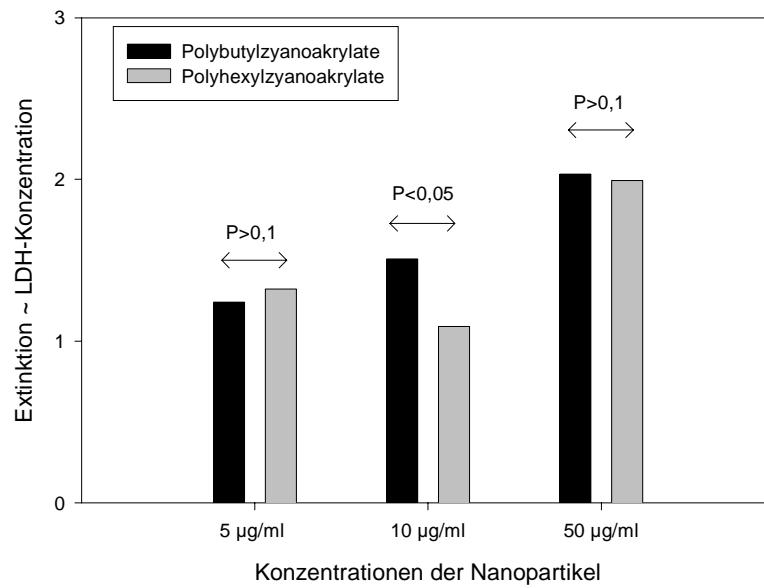
K



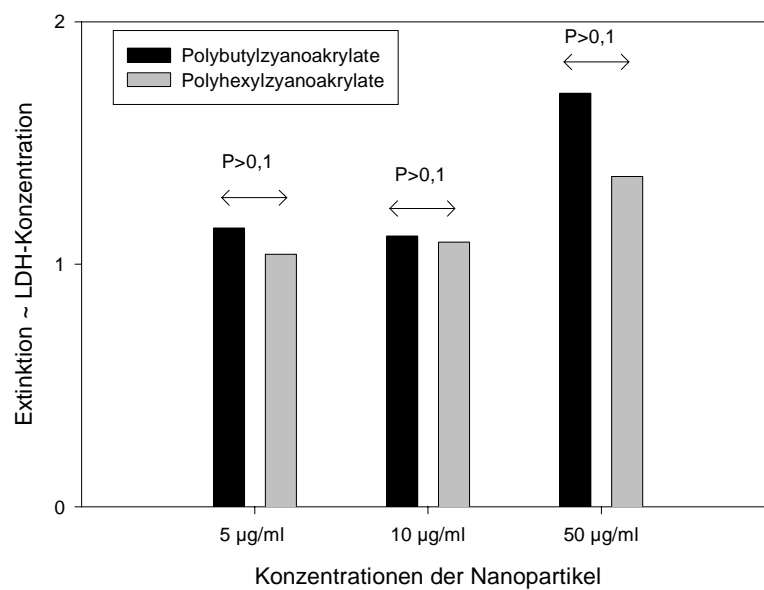
L



**Abbildung 16:** Die Zytotoxizität von Cyanoakrylatnanopartikeln auf **16HBE14o-Zellen**. Oben **Polybutylcyanoakrylate (K)** und unten **Polyhexylcyanoakrylate (L)**. Bei den hier dargestellten Cyanoakrylatnanopartikeln wurde **Dextran 70.000** als Stabilisator verwendet.



Pluronic F-58™

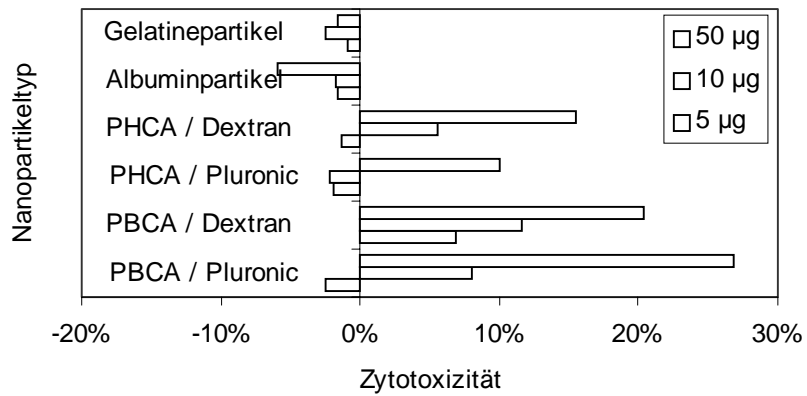


Dextran 70.000

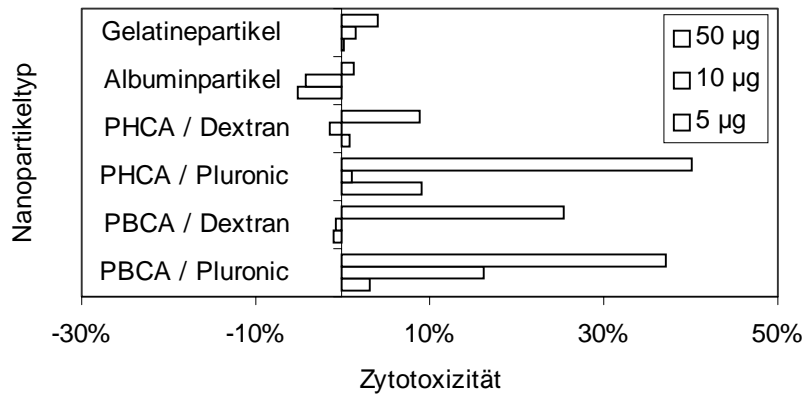
**Abbildung 17:** Hier der Vergleich des zytotoxischen Effekts von **Cyanoakrylatnanopartikeln unterschiedlicher Seitenkettenlänge auf 16HBE14o-Zellen**. Die Balken zeigen die Mediane der Messwerte für die jeweilige Nanopartikelart und -konzentration. Über den Pfeilen sind die Testwerte aus der statistischen Auswertung mittels des Wilcoxon-Rangsummentests aufgetragen.



Zytotoxizität von Nanopartikeln auf primäres Bronchialepithel



Zytotoxizität von Nanopartikeln auf 16HBE14o-Zellen



**Abbildung 18:** Die Zytotoxizität der einzelnen Nanopartikel in den Konzentrationen 5, 10 und 50 µg/ml im Überblick, oben bei primären Bronchialepithelzellen und unten bei 16HBE14o-Zellen. Die Berechnung der Größe „Zytotoxizität“ erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben.

---

### 3.1.2 Die Kinetik der Zytotoxizität – Prüfung auf Späteffekte

Die folgenden Ergebnisse beschreiben das Verhalten der Zytotoxizität innerhalb eines Zeitraumes von fünf Tagen. Sie dienen zur Aufklärung von spät einsetzenden Zelluntergängen, wie beispielsweise durch Apoptose. Dazu wurde eine Versuchsanordnung mit primären Bronchialepithelzellen und 16HBE14o-Zellen laut dem Protokoll unter 2.2.4.2 gewählt.

Bei der Durchführung dieser Kinetik hat sich gezeigt, dass sich ein zytotoxischer Effekt auf die Zellen auf zweierlei Weise erkennen lässt. So zeigt sich die Zytotoxizität nicht nur an einem LDH-Überschuss im Überstand, sondern auch an LDH-Spiegeln, die unter dem spontanen LDH-Niveau liegen. In diesem Fall liegt eine Reduktion der Zellzahl vor, die auf vorangegangene Zelluntergänge schließen lässt. Im Falle einer Zytotoxizität folgt also auf eine kurze LDH-Spitze eine Phase in der sich der LDH-Spiegel unter den Werten der Kontrolle bewegt.

#### 3.1.2.1 Die Ergebnisse mit primären Bronchialepithelzellen

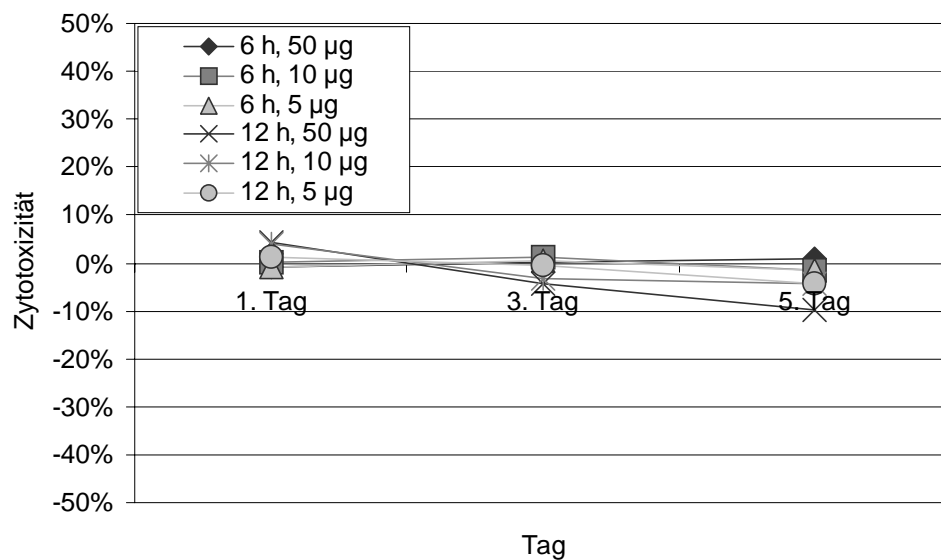
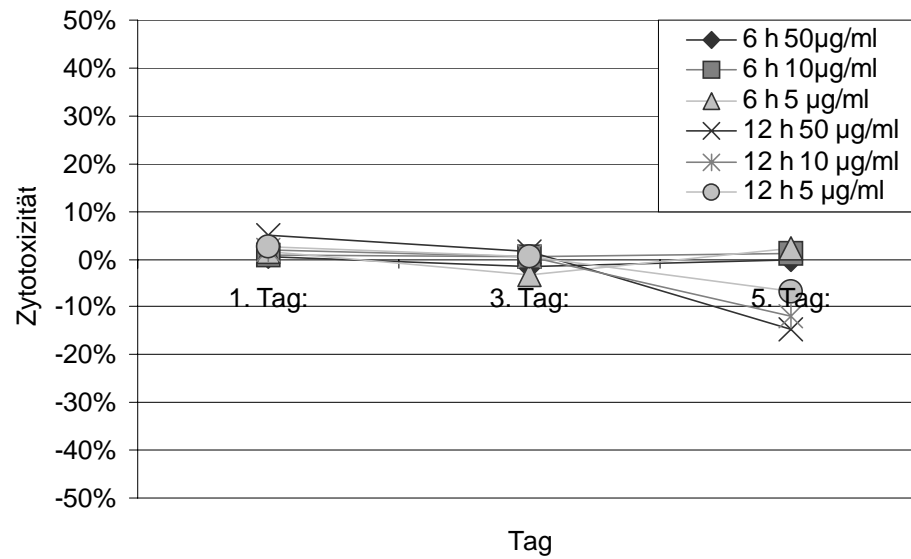
Zum einen werden die unter 3.1.1.1 beschriebenen Ergebnisse mit Gelatine- und Albuminnanopartikeln hier belegt, denn es zeigte sich sogar nach zwölfstündiger Inkubation keine kurzfristige Zytotoxizität dieser Nanopartikelarten auf primäre Bronchialepithelzellen. Späteffekte sind bei Gelatinenanopartikeln zu erkennen. Diese erzeugten am fünften Tag nach zwölfstündiger Inkubation und einer Konzentration von 50, 10 und 5 µg/ml einen geringfügigen Abfall der LDH-Ausschüttung. Dies ist auf einen Abfall der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle zurückzuführen und kann seinen Ursprung in einem spät einsetzendem zytotoxischen Effekt haben.

Weiterhin bestätigte sich die Annahme, dass PBCA als toxisch einzustufen sind. Sie führten gerade in hohen Konzentrationen sowohl zu kurzfristigen LDH-Spitzen am ersten Tag als auch zu einem massiven Abfall der LDH-Konzentration an den folgenden Tagen. Dieser Abfall ist, wie oben beschrieben, auf eine als Folge der Zytotoxizität verminderte Zellzahl zurückzuführen. Hier

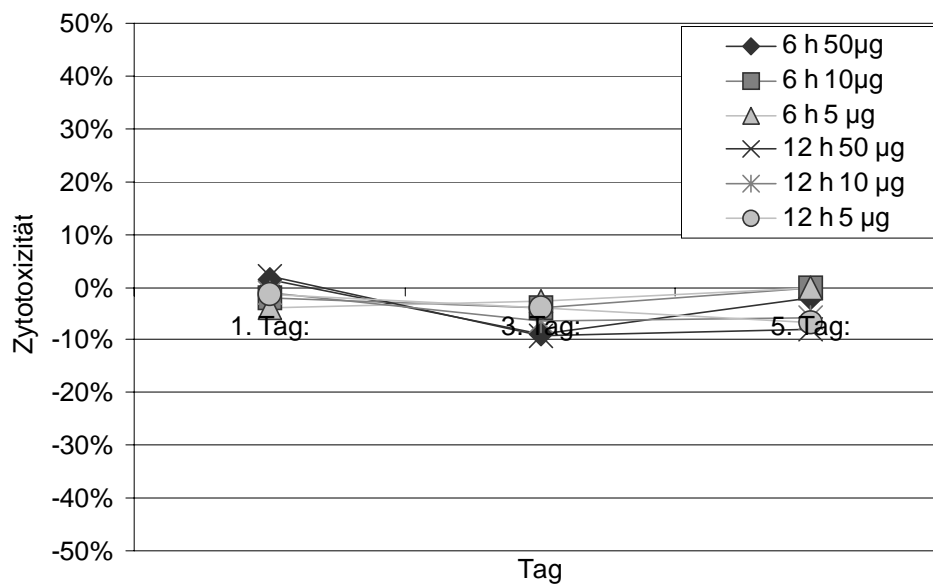
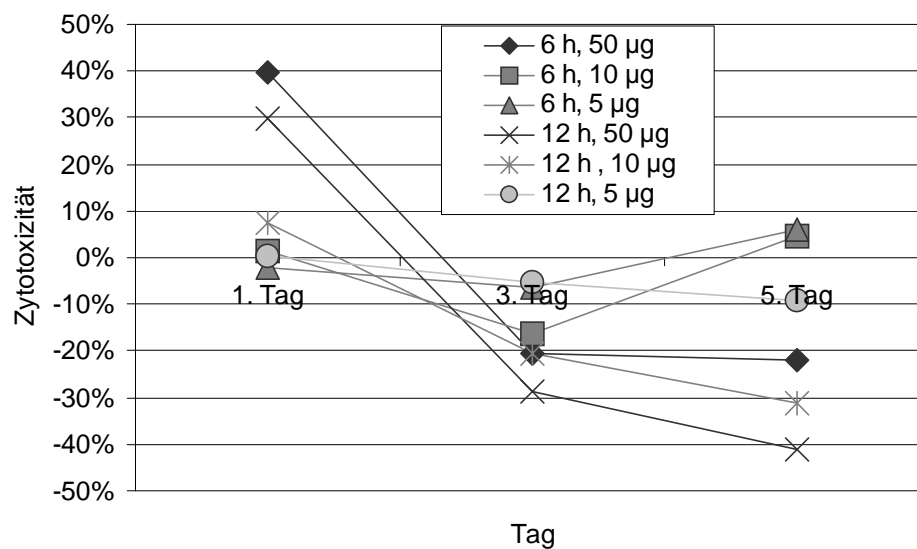
---

zeigte sich auch, dass gerade die längere Inkubationszeit zu einer stärkeren Verminderung der Zellzahl führt.

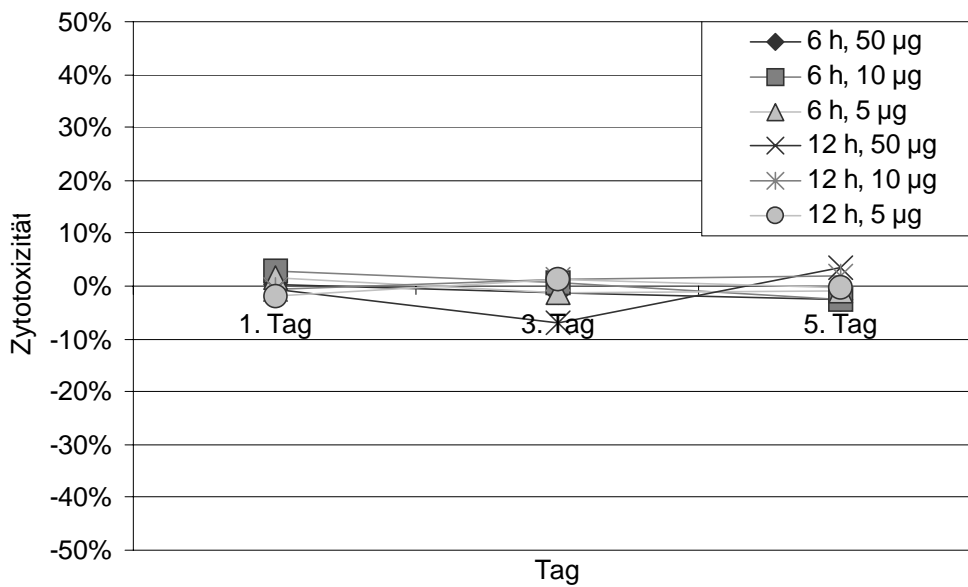
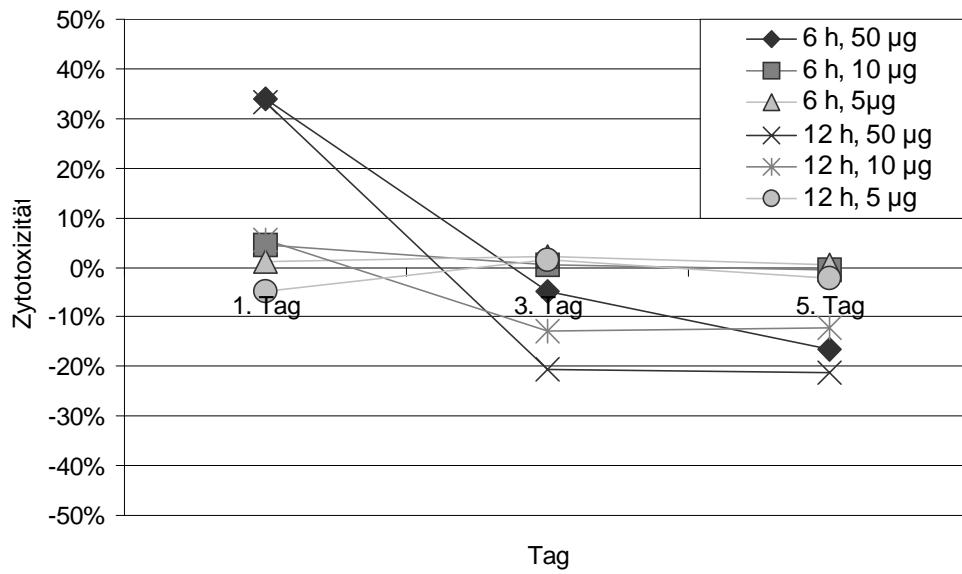
Was PHCA angeht, so konnte bei diesen Versuchen keine Zytotoxizität festgestellt werden, da es weder zu kurzfristigen LDH-Spitzen, noch zu einem späten Absinken des LDH-Spiegels kam.



**Abbildung 19:** Der Verlauf der Zytotoxizität von **Gelatinenanopartikeln** (oben) und **Albuminnanopartikeln** (unten) auf **primäre humane Bronchial-epithelzellen** über einen Zeitraum von fünf Tagen. Die unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten sind mit Symbolen gekennzeichnet.



**Abbildung 20:** Der Verlauf der Zytotoxizität von **PBCA** (oben) und **PHCA** (unten) auf **primäre humane Bronchialepithelzellen** über einen Zeitraum von fünf Tagen, hier mit **Pluronic F-58™** als Stabilisator.



**Abbildung 21:** Der Verlauf der Zytotoxizität von **PBCA** (oben) und **PHCA** (unten) auf **primäre humane Bronchialepithelzellen** über einen Zeitraum von fünf Tagen, hier mit dem Stabilisator **Dextran 70.000**.

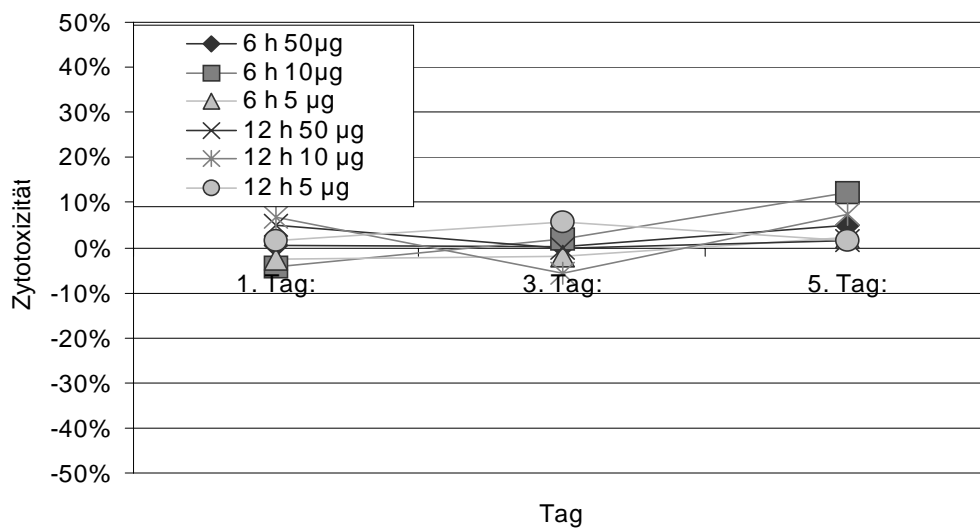
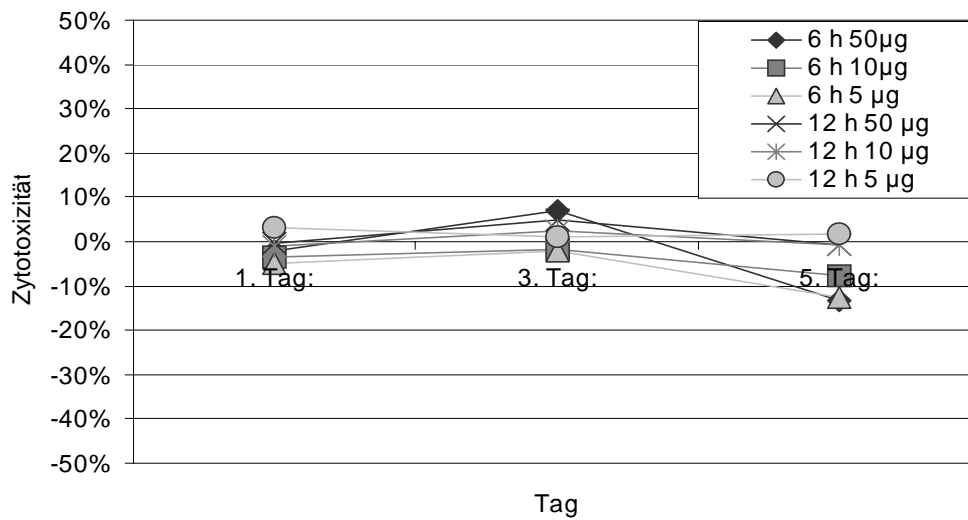
---

### 3.1.2.2 Die Ergebnisse mit 16HBE14o-Zellen

Auch hier werden die unter 3.1.1.2 beschriebenen Ergebnisse mit Gelatine- und Albuminnanopartikeln bestätigt, da eine kurzfristige Zytotoxizität dieser Nanopartikelarten auf 16HBE14o-Zellen nicht zu erkennen ist. Langfristig sind kleine Abweichungen von der gemessenen Kontrolle zu erkennen, die allerdings kein eindeutiges Muster erkennen lassen und deshalb später noch diskutiert werden.

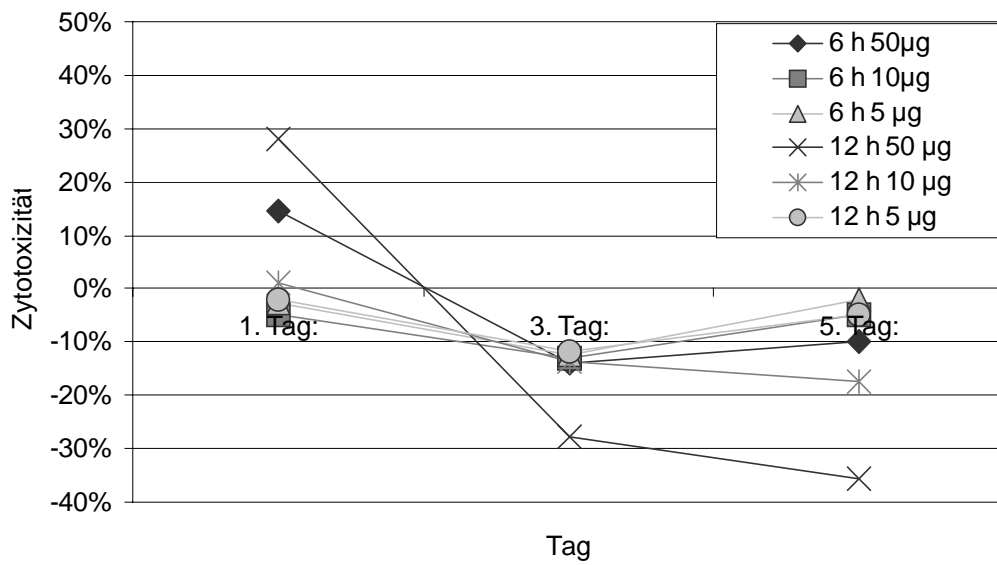
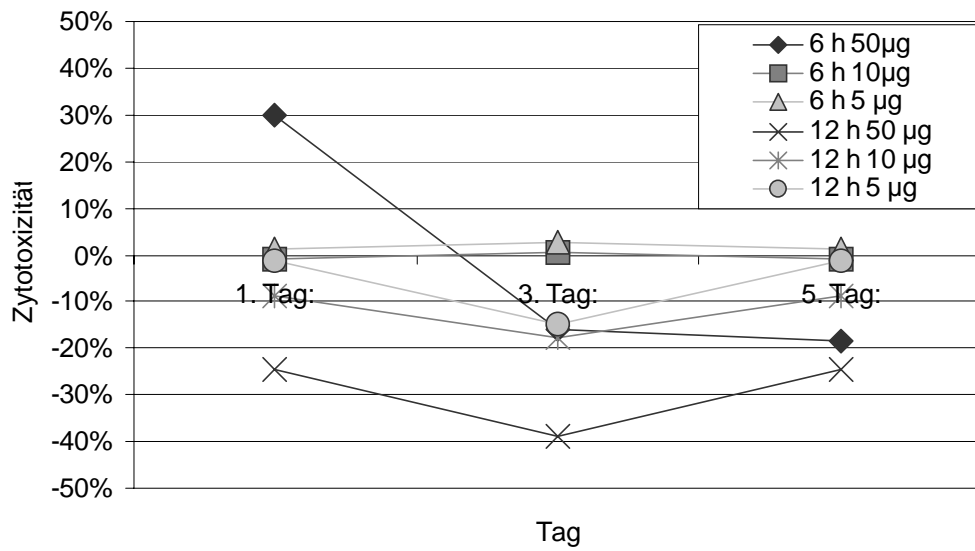
Weiterhin bestätigte sich auch hier, dass PBCA als toxisch einzustufen sind. Sie führten in hohen Konzentrationen zu LDH-Spitzen am ersten Tag und zu einem massiven Abfall der LDH-Konzentration an den folgenden Tagen. Die längere Inkubationszeit von zwölf Stunden führte zu einer stärkeren Verminderung der Zellzahl als bei sechsstündiger Inkubation. Es trat hierbei auch der Fall ein, dass bereits am ersten Tag nach zwölfstündiger Inkubation mit PBCA einer Konzentration von 50 µg/ml die LDH-Spitze überwunden und deshalb nur noch ein Absinken des LDH-Spiegels messbar war (vgl. Abbildung 24).

Im Gegensatz zu den Versuchen mit primären Bronchialepithelzellen ließ sich für PHCA Zytotoxizität nachweisen. Auch hier wirkte eine Verlängerung der Inkubationszeit verstärkend auf den zytotoxischen Effekt.

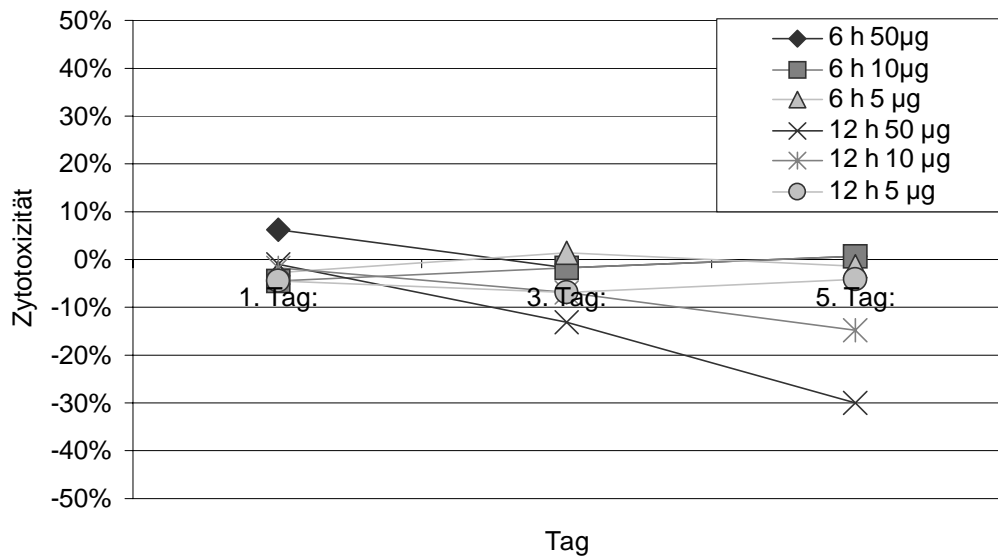
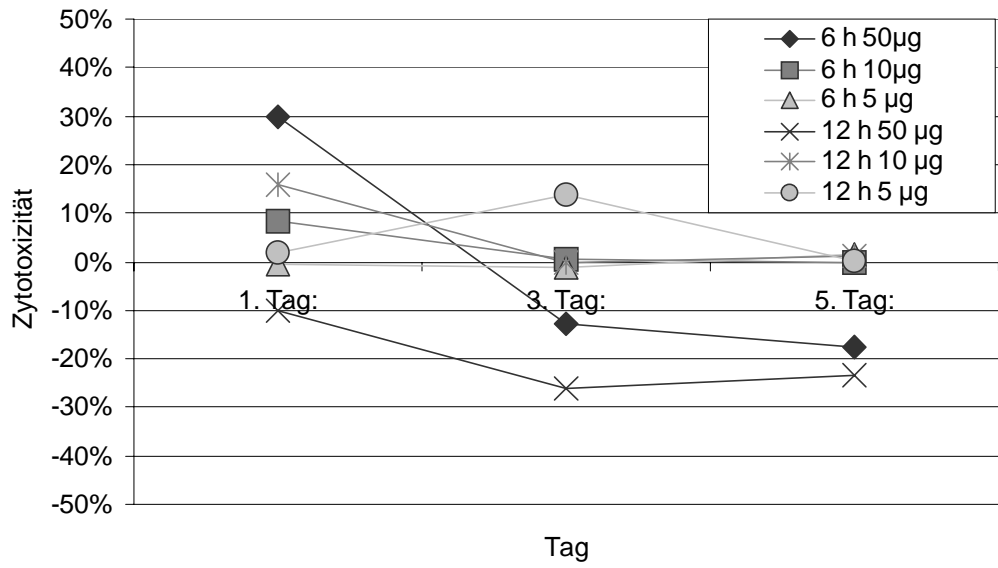


**Abbildung 22:** Der Verlauf der Zytotoxizität von **Gelatinenanopartikeln** (oben) und **Albuminnanopartikeln** (unten) auf 16HBE14o-Zellen im Verlauf von fünf Tagen. Die verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten sind gekennzeichnet mit Symbolen.





**Abbildung 23:** Der Verlauf der Zytotoxizität von **PBCA** (oben) und **PHCA** (unten) auf 16HBE14o-Zellen im Verlauf von fünf Tagen. Hier mit **Pluronic™** als Stabilisator.



**Abbildung 24:** Der Verlauf der Zytotoxizität von **PBCA** (oben) und **PHCA** (unten) auf 16HBE14o-Zellen im Verlauf von fünf Tagen. Hier mit **Dextran<sup>TM</sup>** als Stabilisator.

---

### **3.2 *Der qualitative Nachweis der Nanopartikelaufnahme in Bronchialepithelzellen mit Hilfe des konfokalen Laserrastermikroskops***

Die Untersuchungen mit Hilfe des CLSM dienten zur Erbringung des qualitativen Nachweises der Nanopartikelaufnahme in die Zellen und zur Beurteilung der Nanopartikelverteilung nach der Aufnahme. Die Experimente mit Bronchialepithelzellen nach dem Protokoll unter 2.2.5.2.1 führten zu folgenden Ergebnissen.

#### **3.2.1 Die Ergebnisse mit 16HBE14o-Zellen**

Vorversuche mit dem Durchflußzytometer haben gezeigt, dass ein konfluenter Zellrasen von 16HBE14o-Zellen keine Nanopartikelaufnahme zeigt.

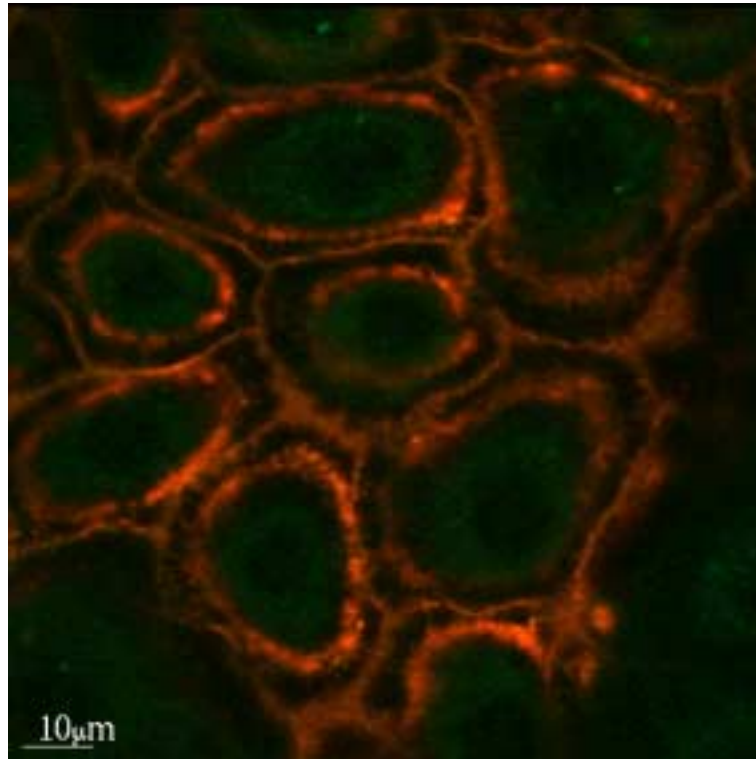
#### **3.2.2 Die Ergebnisse mit primären Bronchialepithelzellen**

Zunächst wurde festgestellt, dass die Negativkontrolle keine unerwünschte Fluoreszenzintensität aufwies.

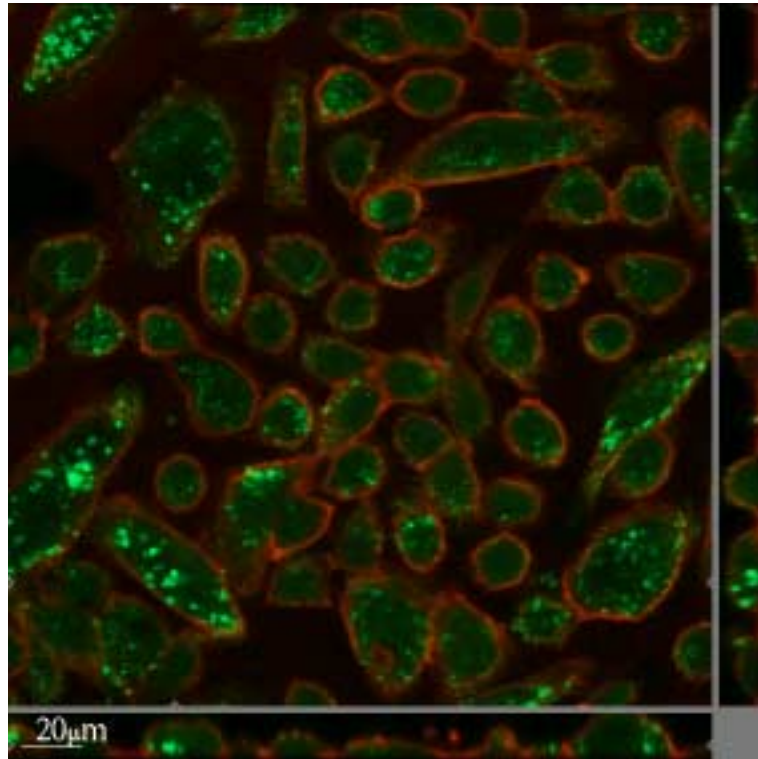
Die Betrachtung der Testobjekte zeigte eine Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffes innerhalb der Zellen nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Gelatine- und Albuminnanopartikeln bei 37°C. Beide Nanopartikelarten konnten in den Zellen nachgewiesen werden. Die Verteilung der Fluoreszenzsignale war bei beiden Nanopartikelarten ähnlich. Es kam zur Ausbildung verschiedengroßer Aggregate („Klumpen“), wobei Albuminnanopartikel wesentlich größere Aggregate ausbildeten. Ein besonderes Verteilungsmuster ließ sich nicht festmachen. Allerdings war oft eine Aussparung des Zentrums der Zellen zu erkennen, ungefähr an der erwartungsgemäßen Position des Zellkerns. Die Lage des Zellkerns ließ sich mangels Darstellung dieser Struktur mit dieser Methode nicht mit Sicherheit bestimmen.

---

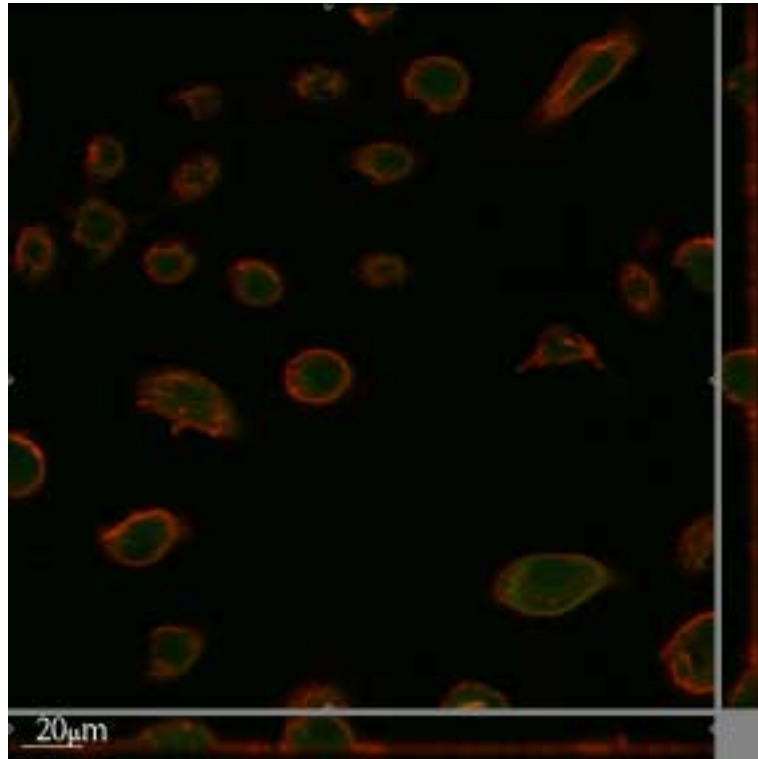
Nach Inkubation bei nur 4°C zeigte sich ein anderes Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale. Die markierten Gelatinenanopartikel führten kaum zu erkennbaren Signalen im Bereich des Intra- oder Extrazellulärraums, was für eine komplette Entfernung der Gelatinenanopartikel durch den Waschvorgang nach der Inkubation spricht. Die Inkubation mit Albuminnanopartikeln hingegen brachte auch nach Inkubation bei 4°C deutliche Signale hervor, so dass wiederum Aggregate zu erkennen waren. Die Verteilung dieser Aggregate beschränkte sich allerdings ausschließlich auf den Extrazellulärraum in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran. Die folgenden Bilder zeigen beispielhaft diese Ergebnisse.



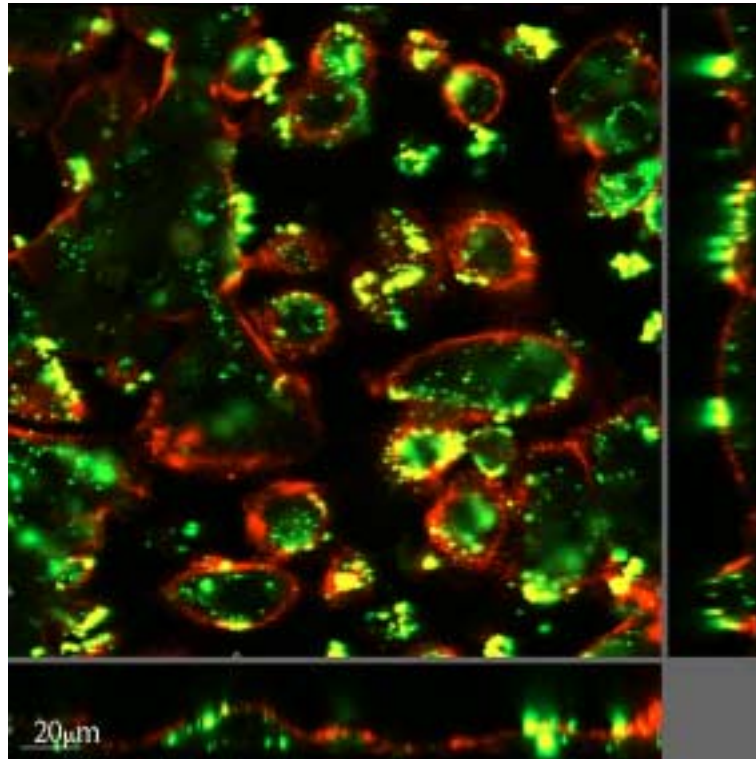
*Abbildung 25: Die Negativkontrolle nach Färbung der Zellmembran von primären Bronchialepithelzellen mit tetramethylrhodaminmarkiertem Concanavalin A. Das TRITC Signal bei 588 nm wird in diesem Bild in Rot dargestellt. Signale im Bereich von 530 nm, hier liegt das Emissionsspektrum der mit Fluoreszeinamin markierten Nanopartikel, werden grün farbkodiert. Es ist eine schwache Autofluoreszenz des Zytoplasma im Emissionsbereich von Fluoreszeinamin zu sehen, die den Versuch nicht stört und toleriert wird.*



*Abbildung 26: Ein Bild nach sechsstündiger Inkubation primärer Bronchialepithelzellen mit fluoreszenzmarkierten Gelatinenanopartikeln bei 37°C. Die Zellmembranfärbung mit tetramethylrhodaminmarkiertem Concanavalin A ist rot farbkodiert, die Fluoresceinaminfärbung der Gelatinenanopartikel grün. Diese Darstellung eines Schnittes durch eine Zelle in drei Ebenen erlaubt die Beurteilung der intrazellulären Verteilung von Nanopartikeln. Kleine Pfeile an den Bildrändern markieren die Schnittebenen.*



*Abbildung 27: Ein Bild nach sechsstündiger Inkubation primärer Bronchialepithelzellen mit fluoreszenzmarkierten Gelatinenopartikeln bei 4°C. Die Zellmembranfärbung mit tetramethylrhodaminmarkiertem Concanavalin A ist rot farbkodiert, die Fluoreszeinaminfärbung der Gelatinenopartikel grün. Im Vergleich zu dem Bild nach Inkubation bei 37°C sind deutliche grüne Signale nicht zu erkennen.*



*Abbildung 28: Eine Aufnahme nach sechsstündiger Inkubation primärer Bronchialepithelzellen mit fluoreszenzmarkierten Albuminnanopartikeln bei 37°C. Die Zellmembranfärbung mit tetramethylrhodaminmarkiertem Concanavalin A ist rot farbkodiert, die Fluoreszeinaminfärbung der Albuminnanopartikel grün. Kleine Pfeile an den Bildrändern markieren die Schnittebenen.*



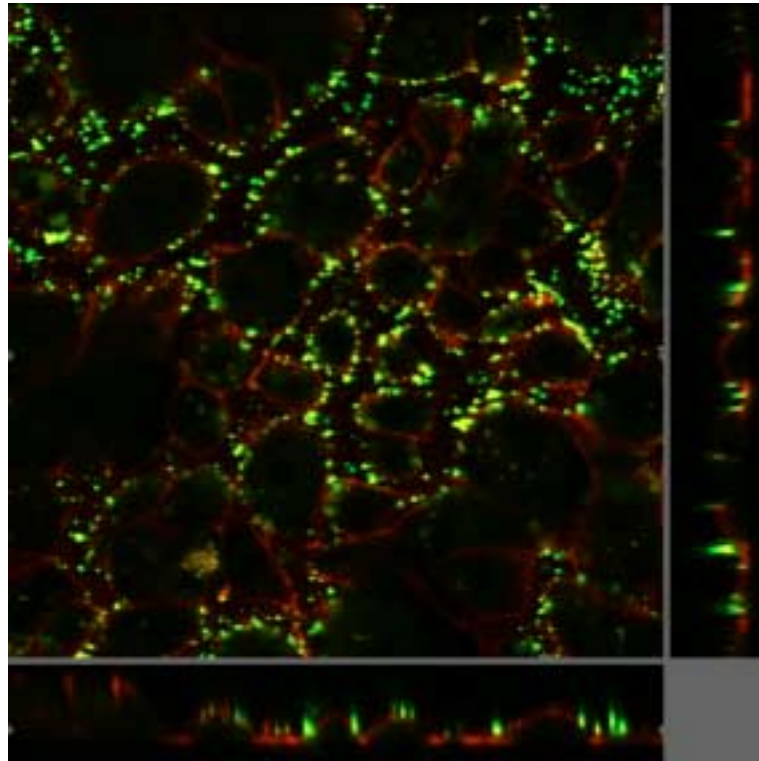


Abbildung 29: Eine Aufnahme nach sechsstündiger Inkubation primärer Bronchialepithelzellen mit fluoreszenzmarkierten Albuminnanopartikeln bei 4°C. Die Zellmembranfärbung mit Concanavalin-A-TRITC ist rot farbkodiert, die Fluoreszeinaminfärbung der Albuminnanopartikel grün. Die Anreicherung grüner Signale beschränkt sich im Vergleich zu dem Bild nach Inkubation bei 37°C auf den Extrazellulärraum in unmittelbarer Nähe zu den Zellmembranen. Die Dichte der grünen Signale hat deutlich abgenommen. Intrazellulär finden sich keine grünen Signale.

---

### **3.3 Die Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme mit Hilfe des Durchflußzytometers**

Mit Hilfe des Durchflußzytometers erfolgte die Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme in die Zellen. Ferner wurde die Abhängigkeit der Nanopartikelaufnahme von der Nanopartikelkonzentration und von der Inkubationstemperatur untersucht. Zunächst ermittelte ein Vorversuch, dass die Messung einer Nanopartikelsuspension, sowohl von Gelatine- wie auch von Albuminnanopartikeln, im Durchflußzytometer bei Einstellungen, die später auch für die Messung der Zellen verwandt werden sollten, keinerlei Signale erzeugt. Somit wurde das Auftreten von Störsignalen durch frei in der Zellsuspension schwimmende Nanopartikel kontrolliert und ausgeschlossen.

#### **3.3.1 Die Ergebnisse mit primären humanen Bronchialepithelzellen**

Die Versuche zur Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme in primäre Bronchialepithelzellen wurde nach den Protokollen unter Abschnitt 2.2.5.3.1 mit suspendierten Zellen und adhärenen Zellen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen fand wie in Kapitel 2.1.8.1 beschrieben auf speziellen Membraneinsätzen statt, um die Zelldifferenzierung zu fördern und somit näher an die physiologische Situation zu gelangen.

Da die gewonnenen Daten sich ausschließlich auf Ordinalskalenniveau bewegen ist eine absolute Mengenangabe hinsichtlich der aufgenommenen Nanopartikel nicht zulässig, so dass hier semiquantitative Aussagen über die Nanopartikelaufnahme getroffen werden.

Es hat sich bei der Durchführung gezeigt, dass die Konzentration der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel mit der Fluoreszenzintensität der mit diesen Nanopartikeln inkubierten Zellen im Zusammenhang steht. So verursachte eine höhere Nanopartikelkonzentration eine höhere zelluläre Fluoreszenzintensität,

---

und umgekehrt bewirkte die niedrigere Konzentration eine geringere zelluläre Fluoreszenzintensität.

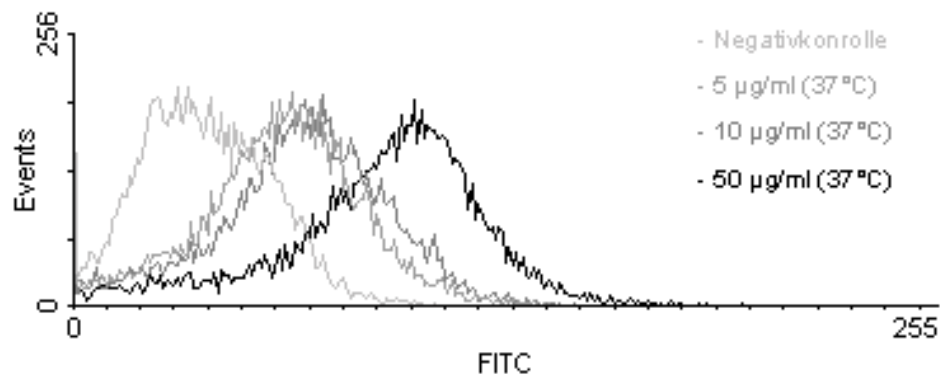
Weiterhin hat auch die Inkubationstemperatur einen Einfluss auf die Fluoreszenzanreicherung in den Zellen. Die bei 4°C inkubierten Proben wiesen im Vergleich zur Probe nach Inkubation bei 37°C eine deutlich erniedrigte intrazelluläre Fluoreszenzintensität auf. Hierbei ist insbesondere darauf hinzuweisen, dass die 4°C-Kontrolle im Falle von Gelatinenanopartikeln praktisch deckungsgleich mit der Negativkontrolle ist. Die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Albuminnanopartikeln führt jedoch auch bei 4°C zu einer deutlich erkennbaren Verschiebung der Häufigkeitsverteilung auf der Fluoreszenzachse, was auf den Abbildungen 32, 34 und 36 zu erkennen ist.

Die Frage nach dem Anteil der Zellen, die Nanopartikel aufnehmen, an der gesamten Zellpopulation ist damit zu beantworten, dass alle inkubierten Zellen eine Aufnahme zeigen. Die Inkubation mit Nanopartikeln verursacht, wie auf den Abbildungen 31, 32, 33 und 34 zu sehen ist, eine Verschiebung der gesamten Zellpopulation auf der Fluoreszenzachse.

Diese Zusammenhänge sind sowohl bei suspendierten Zellen (Abbildung 31 und 32), wie auch bei auf Plastikoberflächen kultivierten adhären Zellen (Abbildung 33 und 34) und bei Zellen auf Membraneinsätzen (Abbildung 35 und 36) zu beobachten.

---

### Gelatinenanoartikel



### Albuminnanopartikel

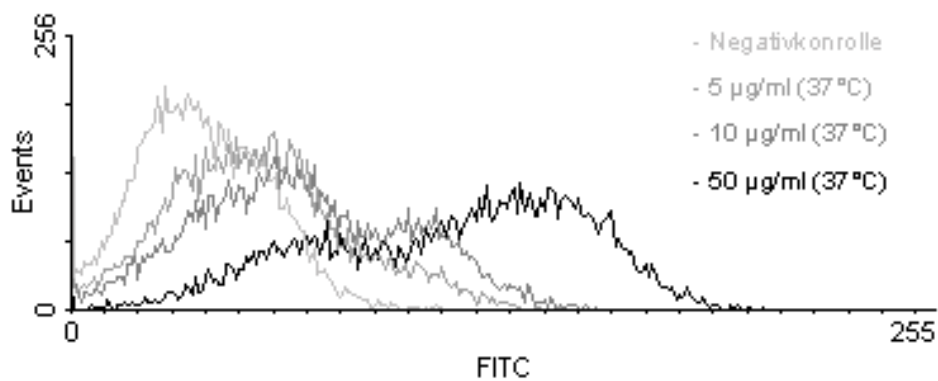


Abbildung 30: Die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität (Abszisse) von **primären humanen Bronchialepithelzellen** nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Gelatine- und Albuminnanopartikeln in **unterschiedlicher Konzentration**. Hier die Ergebnisse mit **suspendierten Zellen**. Mit steigender Konzentration der Nanopartikel nimmt die Intensität des von den Zellen ausgesandten Fluoreszenzlichtes zu. Die hier dargestellten Häufigkeitsverteilungen sind statistisch auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  als ungleich zu betrachten.

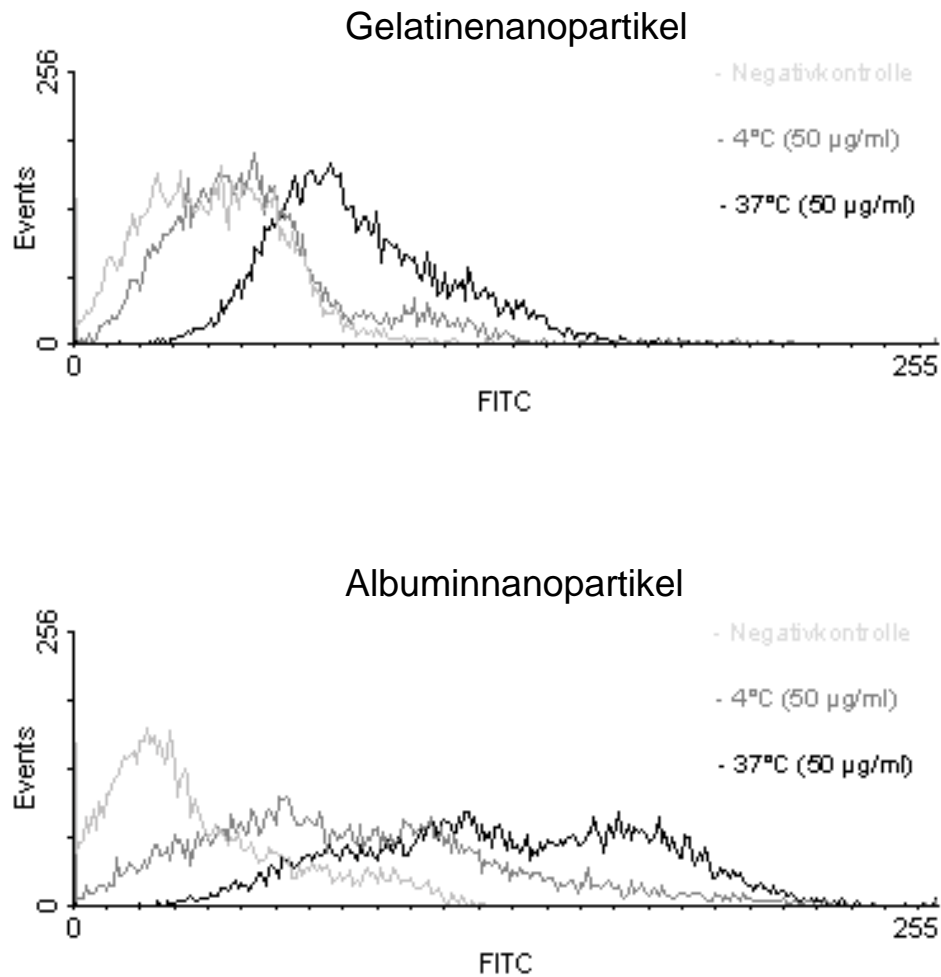
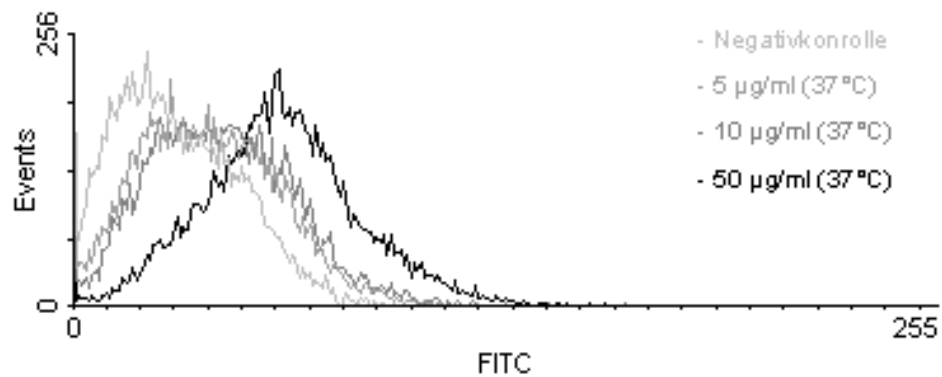
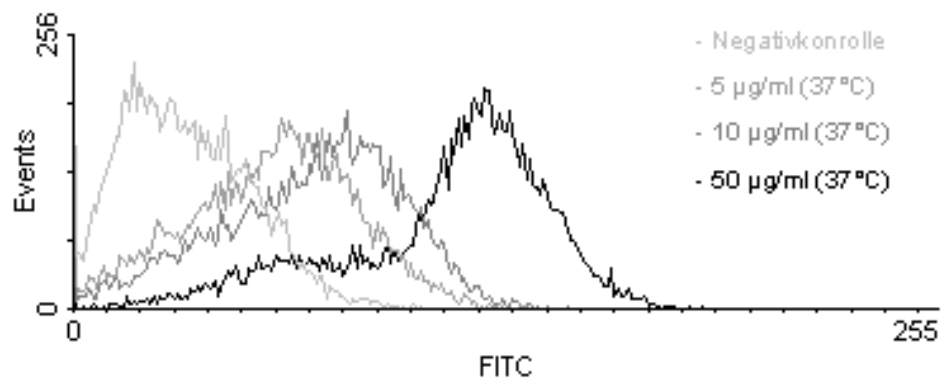


Abbildung 31: Ein Vergleich der Häufigkeitsverteilungen der Fluoreszenzintensität von **primären humanen Bronchialepithelzellen** nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln bei **37°C und bei 4°C**. Hier die Ergebnisse mit **suspendierten Zellen**. Die Stoffwechselhemmung durch Kälte verursacht bei gleicher Inkubationszeit eine verminderte Nanopartikelaufnahme im Vergleich zur Kontrolle bei 37°C, die sich in einer geringeren Fluoreszenzintensität der inkubierten Zellen niederschlägt. Die hier dargestellten Häufigkeitsverteilungen sind statistisch auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  als ungleich zu betrachten.

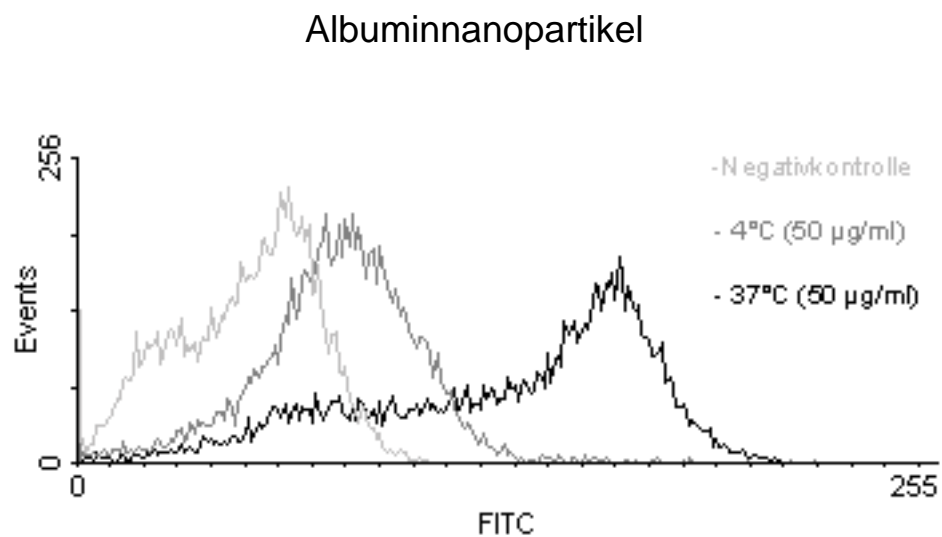
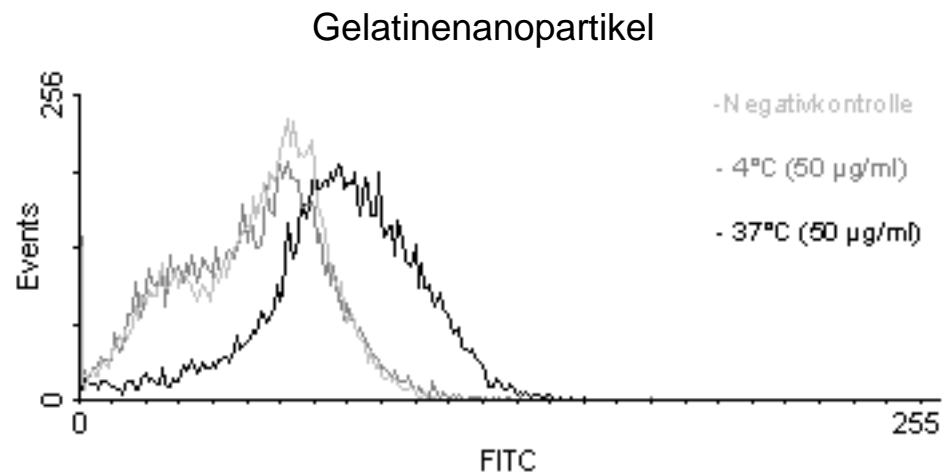
### Gelatinenanopartikel



### Albuminnanopartikel



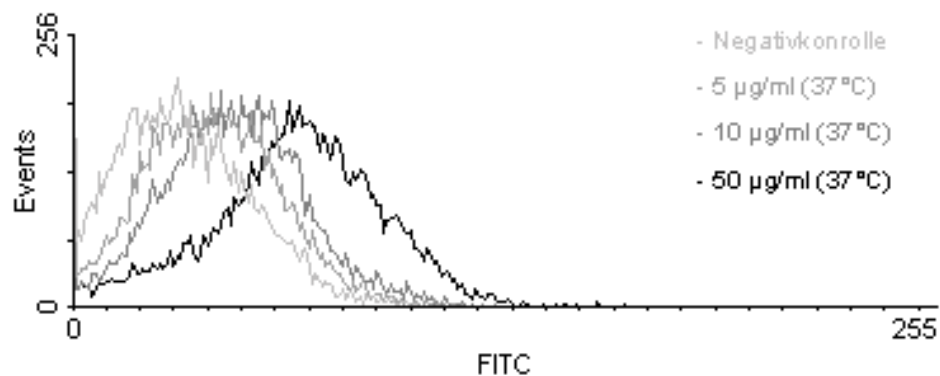
*Abbildung 32:* Die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität von **primären humanen Bronchialepithelzellen** nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Gelatine- und Albuminnanopartikeln in **unterschiedlicher Konzentration**. Auch bei Kultivierung der Zellen auf einer **Plastikoberfläche** nimmt mit steigender Konzentration der Nanopartikel die Intensität des von den Zellen ausgesandten Fluoreszenzlichtes zu. Die hier dargestellten Häufigkeitsverteilungen sind statistisch auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  als ungleich zu betrachten.



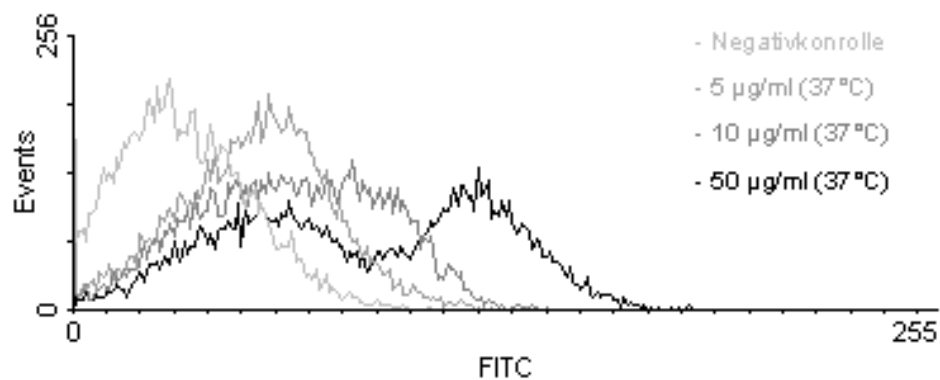
**Abbildung 33:** *Primäre humane Bronchialepithelzellen* nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln bei **37°C** und bei **4°C**. Hier die Ergebnisse mit **Zellrasen auf einer Plastikoberfläche**. Die Stoffwechsellagerung durch Kälte verursacht bei gleicher Inkubationszeit eine verminderte Nanopartikelaufnahme im Vergleich zur Kontrolle bei 37°C. Die hier dargestellten Häufigkeitsverteilungen sind statistisch auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  als ungleich zu betrachten.

---

### Gelatinenanoartikel



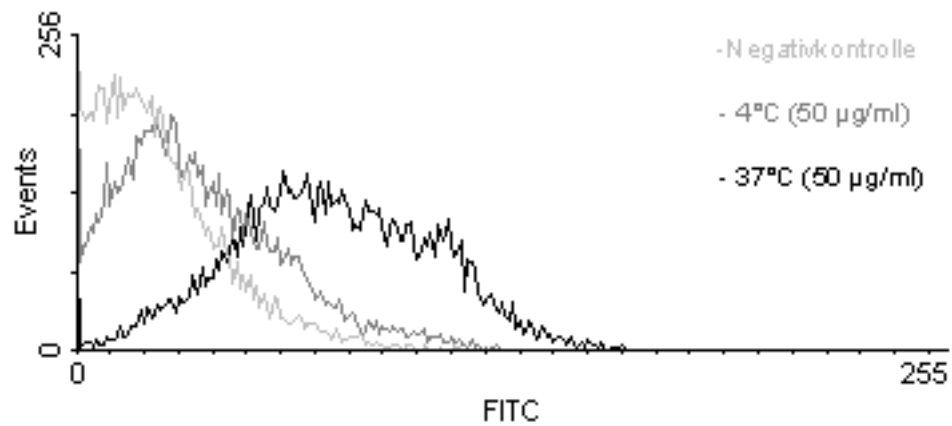
### Albuminnanopartikel



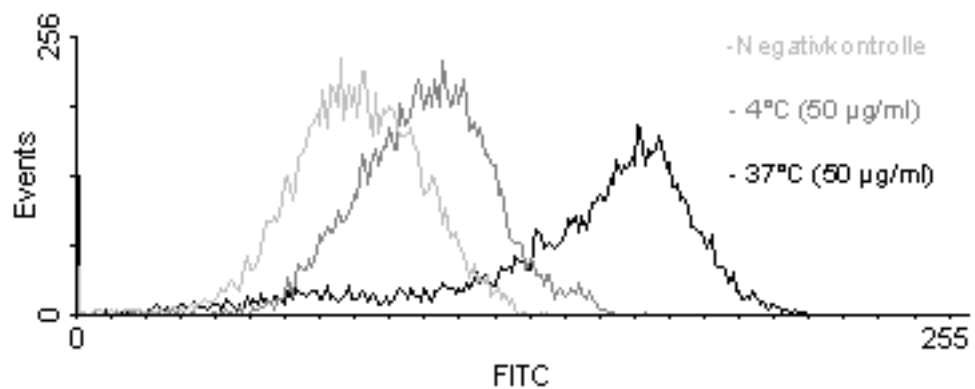
**Abbildung 34: Primäre humane Bronchialepithelzellen** nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Gelatine- und Albuminnanopartikeln in **unterschiedlicher Konzentration**. Hier die Ergebnisse mit **Zellrasen auf Membraneinsätzen**. Sogar auf Membraneinsätzen ist die konzentrationsabhängige Nanopartikelaufnahme zu erkennen. Die hier dargestellten Häufigkeitsverteilungen sind statistisch auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  als ungleich zu betrachten.



### Gelatinenanopartikel



### Albuminnanopartikel



**Abbildung 35: Primäre humane Bronchialepithelzellen** nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln bei **37°C** und bei **4°C** auf **Membraneinsätzen**. Die Stoffwechsellagerung durch Kälte verursacht bei gleicher Inkubationszeit eine verminderte Nanopartikelaufnahme im Vergleich zur Kontrolle bei 37°C. Die hier dargestellten Häufigkeitsverteilungen sind statistisch auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  als ungleich zu betrachten.

---

### 3.3.2 Die Ergebnisse mit 16HBE14o-Zellen

#### 3.3.2.1 Die Versuche mit suspendierten Zellen

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit der Zelllinie 16HBE14o nach dem Protokoll unter 2.2.5.3.1 haben ebenfalls gezeigt, dass die Konzentration der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel mit der Fluoreszenzintensität der mit diesen Nanopartikeln inkubierten suspendierten Zellen in Zusammenhang steht. Eine höhere Nanopartikelkonzentration verursacht eine höhere zelluläre Fluoreszenzintensität und umgekehrt bewirkt die niedrigere Konzentration eine geringere zelluläre Fluoreszenzintensität (vgl. Abbildung 37). Auch hier gilt, dass die gewonnenen Daten sich ausschließlich auf Ordinalskalenniveau bewegen und dass eine absolute Mengenangabe hinsichtlich der aufgenommenen Nanopartikel nicht zulässig ist. Eine semiquantitative Aussage über die Nanopartikelaufnahme wird getroffen.

Die Inkubationstemperatur hat einen Einfluss auf die Fluoreszenzanreicherung in 16HBE14o-Zellen. Auch hier zeigt die bei 4°C inkubierte Probe im Vergleich zur Probe nach Inkubation bei 37°C eine deutlich erniedrigte intrazelluläre Fluoreszenzintensität auf, was in Abbildung 38 dargestellt ist. Die 4°C-Kontrolle ist im Falle von Gelatinenpartikeln praktisch deckungsgleich mit der Negativkontrolle, wohingegen die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Albuminpartikeln auch bei 4°C zu einer deutlich erkennbaren Verschiebung der Häufigkeitsverteilung auf der Fluoreszenzachse führt (vgl. Abbildung 38).

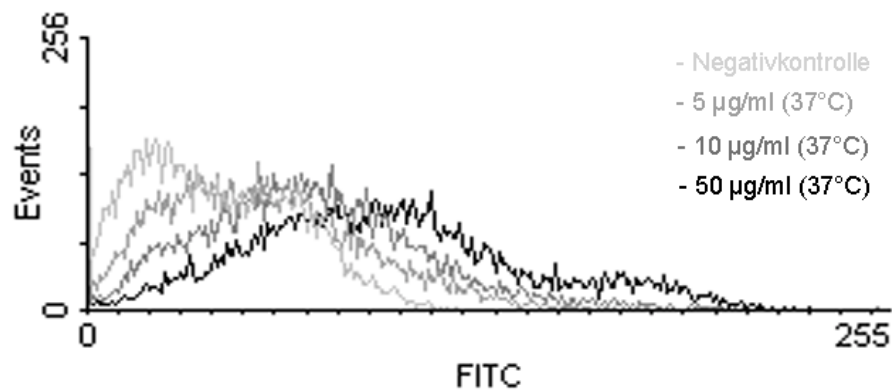
Ferner nehmen alle inkubierten Zellen Nanopartikel auf. Die Inkubation mit Nanopartikeln verursacht, wie auf den Abbildungen 37 und 38 zu sehen ist, eine Verschiebung der gesamten Zellpopulation auf der Fluoreszenzachse.

---

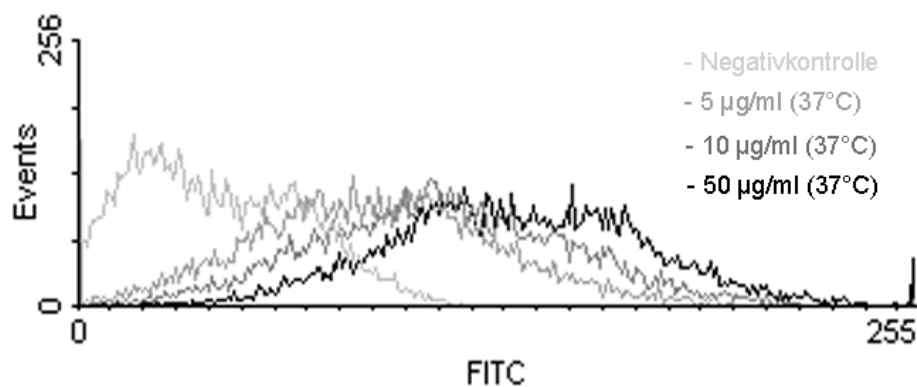
### 3.3.2.2 Die Versuche mit Zellrasen

Bilden die 16HBE14o-Zellen zum Zeitpunkt des Versuchsansatzes einen Zellrasen, so wirkt sich dies äußerst nachteilig auf die Aufnahme der Nanopartikel in die einzelnen Zellen aus. Bei einem konfluenten Zellrasen ist die Aufnahme der Nanopartikel in diese Zelllinie mit der Methode der Durchflußzytometrie nicht nachweisbar.

### Gelatinenanopartikel



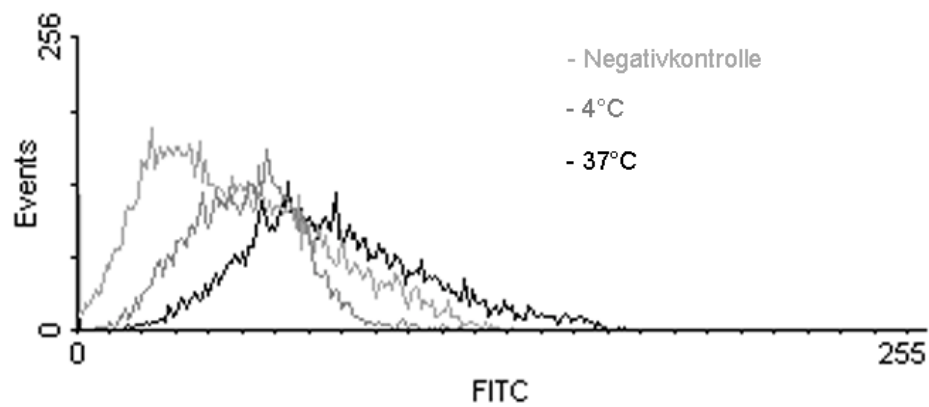
### Albuminnanopartikel



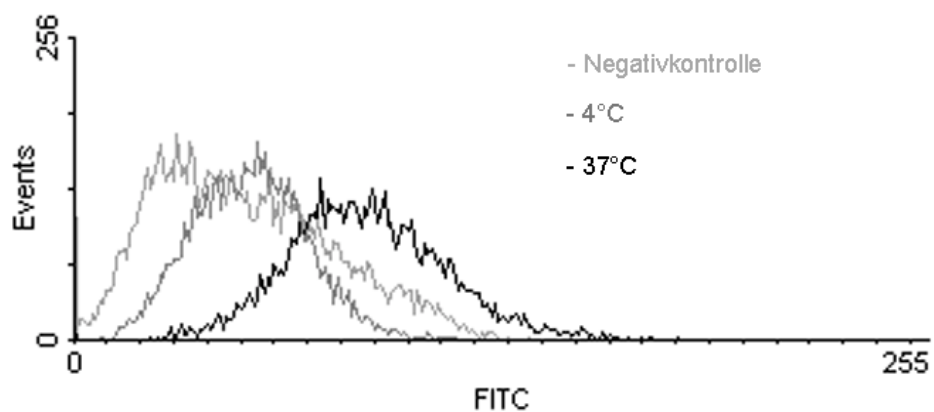
*Abbildung 36: Die Anreicherung von **Gelatine- und Albuminnanopartikeln** in suspendierten **16HBE14o-Zellen** in Abhängigkeit von der Nanopartikelkonzentration. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität (Abszisse) der Stichproben als Häufigkeitsverteilung. Die hier dargestellten Häufigkeitsverteilungen sind statistisch auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  als ungleich zu betrachten.*

---

### Gelatinenanoartikel



### Albuminnanoartikel



*Abbildung 37: Ein Vergleich der Anreicherung von **Albumin- und Gelatinenanoartikeln** in suspendierten **16HBE14o-Zellen** bei 37°C und 4°C. Die hier dargestellten Häufigkeitsverteilungen sind statistisch auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  als ungleich zu betrachten.*

---

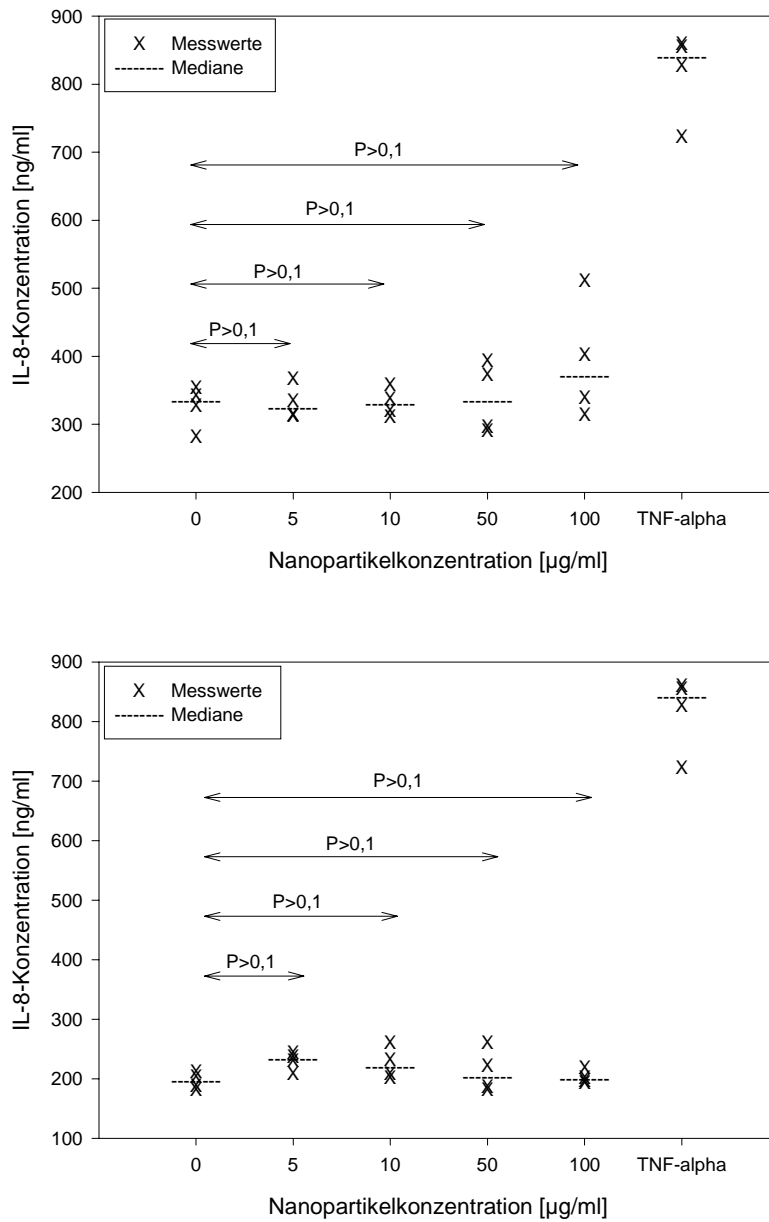
### **3.4 Die Quantitative IL-8 Bestimmung zur Untersuchung des inflammatorischen Potenzials von Nanopartikeln**

Um das inflammatorische Potenzial von Nanopartikeln zu untersuchen, wurde eine Interleukin 8 Bestimmung nach Reizung der Bronchialepithelzellen mit Gelatine- und Albuminnanopartikeln durchgeführt (vgl. Kapitel 2.2.6). Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit erfolgte eine dreimalige Ausführung dieser Versuche.

#### **3.4.1 Die Ergebnisse mit primären Bronchialepithelzellen**

Die Abbildung 39 zeigt beispielhaft eine Messung des Effekts von Gelatine- und Albuminnanopartikeln auf primäre humane Bronchialepithelzellen.

Gelatine- wie auch Albuminnanopartikel provozieren in den Konzentrationen 5, 10, 50 und 100 µg/ml keinen Anstieg des IL-8-Spiegels im Überstand. Die Positivkontrolle weicht bei einem zehnpromigen Signifikanzniveau von den Stichproben ab. Ein solches Ergebnis ist in wiederholten Messungen reproduzierbar gewesen.



**Abbildung 38:** Interleukin-8-Konzentrationen nach Inkubation primärer humaner Bronchialepithelzellen mit verschiedenen Konzentrationen von Gelatine- (oben) und Albuminnanopartikeln (unten). Die Messwerte mit Median sind abgebildet und auf den Pfeilen sind die Testwerte aus dem Vergleich zweier Stichproben mit dem Wilcoxon-Rangsummentest aufgetragen.

---

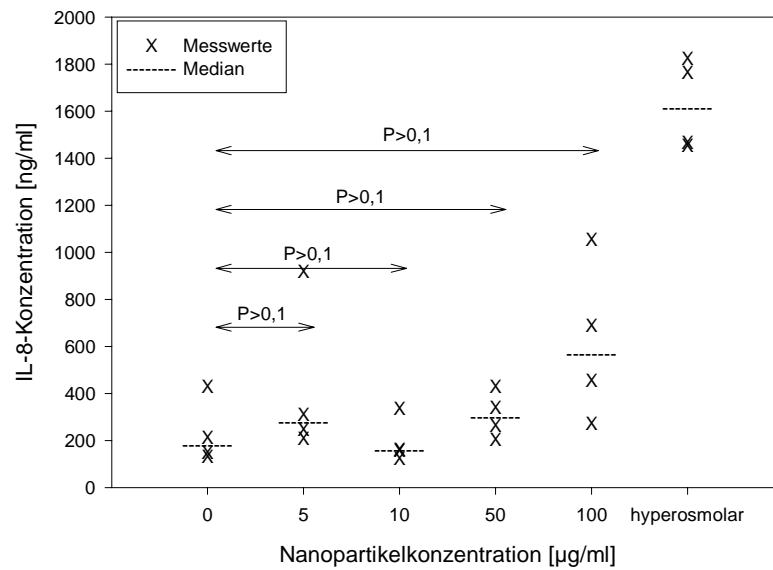
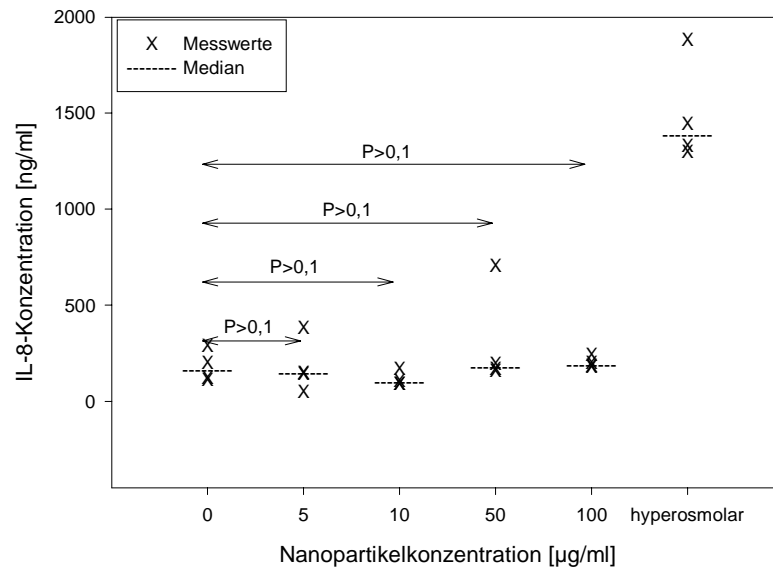
### **3.4.2 Die Ergebnisse mit 16HBE14o-Zellen**

Die Abbildung 40 zeigt beispielhaft eine Messung des Effekts von Gelatine- und Albuminnanopartikeln auf 16HBE14o-Zellen.

Gelatinenanopartikel provozieren hierbei in den Konzentrationen 5, 10, 50 und 100 µg/ml keinen Anstieg des IL-8-Spiegels im Überstand. Die Positivkontrolle weicht bei einem zehnpromzentigen Signifikanzniveau von den Stichproben ab. Ein solches Ergebnis ist in wiederholten Messungen reproduzierbar gewesen. Bei einer Messung gab es einen geringfügigen Anstieg von Interleukin 8 bei einer Gelatinenanopartikelkonzentration von 100 µg/ml.

Albuminnanopartikel zeigen in dem Beispiel in Abbildung 40 keinen nachweisbaren Anstieg der IL-8-Konzentration, obwohl man bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine Abweichung vermutet. In zwei anderen Messungen ist bei dieser Konzentration eindeutig keine Abweichung erkennbar gewesen. Auch hier weicht die Positivkontrolle bei einem zehnpromzentigen Signifikanzniveau von den Stichproben ab.





**Abbildung 39:** Interleukin-8-Spiegel nach Reizung von 16HBE14o-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Nanopartikeln. Oben sind die Ergebnisse mit Gelatinenanopartikeln, unten die mit Albuminnanopartikeln abgebildet.

---

## 4 Diskussion

### ***4.1 Zytotoxizität von Nanopartikeln auf Bronchialepithelzellen***

Eine wichtige Vorbedingung für Trägersysteme, die im Bereich des Gentransfers eingesetzt werden sollen, ist eine geringe Zytotoxizität. Ein gelungener Transfer eines Gens in eine Zelle verfehlt seine Wirkung, wenn diese Zelle nach der Behandlung abstirbt. Diese Zytotoxizität ist insbesondere vom Zelltyp abhängig. Ähnliche Versuche zur Zytotoxizität wie die in dieser Arbeit beschriebenen wurden beispielsweise mit PHCA an Makrophagen durchgeführt. In jener Studie war ein zytotoxischer Effekt auf die erprobten Zellen nicht nachzuweisen (Bender 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass Cyanoakrylatnanopartikel auf Bronchialepithelzellen eine unterschiedliche Wirkung haben. PHCA zeigten insbesondere auf die Zelllinie 16HBE14o eine ausgeprägte Zytotoxizität, mit einem etwas mildereren Effekt auf primäre Zellen. Insbesondere PBCA mit kurzen Seitenketten führten zu massiven Zelluntergängen. Die Konsequenz aus diesen Ergebnissen war, dass die Cyanoakrylate für folgende Versuche zur Nanopartikelaufnahme nicht mehr herangezogen wurden. Ein wesentliches Anliegen bei der Herstellung der Cyanoakrylate, der problemlose Abbau durch zelluläre Enzyme, scheint ursächlich für diese Beobachtungen zu sein. So verursachen gerade die kurzkettigen Abbauprodukte der PBCA, und hierbei insbesondere der Seitenkettenalkohol, die größten Zelluntergänge.

Im Gegensatz dazu zeichneten sich Gelatine- und Albuminnanopartikel in den durchgeführten Experimenten durch extrem geringe Zytotoxizität aus, Späteffekte waren nicht feststellbar. Die im menschlichen Organismus

---

natürlicherweise vorkommenden Proteine Albumin und Kollagen, als Vorstufe der Gelatine, scheinen folglich auch nach Aufnahme in die Zellen keine Noxe darzustellen. Somit erfüllen diese Nanopartikelarten eine wesentliche Vorbedingung, um als Trägersystem Verwendung zu finden.

#### ***4.2 Beurteilung der intrazellulären Verteilung von Nanopartikeln in Bronchialepithelzellen mit Hilfe des konfokalen Laserrastermikroskops***

Mit dem CLSM konnte gezeigt werden, dass tatsächlich eine Aufnahme von Gelatine- und Albuminnanopartikeln in primäre Bronchialepithelzellen erfolgt. Somit konnte experimentell eine Nanopartikelaufnahme in Zellen nachgewiesen werden, die nicht zum monozytären Phagozytensystem gehören. Fluoreszenzsignale sind deutlich innerhalb der äußeren Zellmembran zu erkennen. Bei diesen leuchtenden Strukturen handelt es sich am ehesten um Aggregate von Nanopartikeln, wobei auffällt, dass Albuminnanopartikel größere „Klumpen“ bilden und ein deutlicheres Signal erzeugen. Auch bei den Messungen mit dem Durchflußzytometer hatten Albuminnanopartikel das deutlichere Signal.

Die Stoffwechselhemmung durch Inkubation der Zellen mit Nanopartikeln bei einer Temperatur von 4°C schaltete die vorher beobachtete Nanopartikelaufnahme in die Zellen praktisch aus. Fluoreszenzsignale waren nach Inkubation mit fluoreszeinmarkierten Gelatinenanopartikeln praktisch nicht mehr erkennbar. Nach Inkubation mit fluoreszeinaminmarkierten Albuminnanopartikeln waren trotz des Waschvorgangs immer noch Signale vorhanden, allerdings ausschließlich in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran, was am ehesten einer Anlagerung an die äußere Zellmembran ohne Aufnahme entspricht. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die zelluläre Aufnahme der Nanopartikel in Bronchialepithelzellen durch einen stoffwechselabhängigen, aktiven Vorgang erfolgt, der am ehesten als Phagozytose zu beschreiben ist. Es handelt sich dabei um Mechanismen, die

---

denen bei der Nanopartikelaufnahme in Makrophagen ähnlich sind (Schäfer 1993; Schäfer et al. 1994a; Schäfer et al. 1994b). Ungeklärt bleibt jedoch, ob es zu einem Übertritt der Nanopartikel in das Zytoplasma kommt mit einem Abbau des Trägersystems in diesem Kompartiment, oder ob die Nanopartikel in Lysosomen verbleiben und ausschließlich dort abgebaut werden. Bemerkenswert ist weiterhin das unterschiedliche Verhalten von Gelatine- und Albuminnanopartikeln nach Inkubation bei 4°C, da es einen Hinweis darauf gibt, dass Albuminnanopartikel im Gegensatz zu Gelatinenpartikeln bioadhäsiv sind. Dieses Prinzip wurde auch bei den Messungen im Durchflußzytometer beobachtet und soll in der dazugehörigen Diskussion wieder aufgegriffen werden.

Das Verteilungsmuster der Nanopartikel in den Zellen zeigt als besonderes Merkmal eine Aussparung dort, wo der auf den Bildern nicht zur Darstellung kommende Zellkern zu vermuten ist. Eine Anreicherung im Kern ist beispielsweise für an Nanopartikel gebundene Antisense-Oligonukleotide oder Plasmide wünschenswert. Momentan ist die Aufnahme der hier getesteten Nanopartikel in das Zytoplasma selbst ein strittiger Punkt: Es ist nicht bekannt, welcher Anteil der Nanopartikel in Phagosomen verbleibt und welcher den Übertritt in das Zytoplasma erreicht, so dass hier ein Ansatzpunkt für die Verbesserung dieses Trägersystems liegt. Eine Oberflächenmodifikation der Nanopartikel mit Transferrin, um sich die rezeptorvermittelte Endozytose nutzbar zu machen, könnte das Vordringen der Nanopartikel in das Zytoplasma verbessern. Weiter muss untersucht werden, ob die Substanzen, mit denen Nanopartikel beladen werden, den Übertritt in das Zytoplasma erreichen und intrazellulär von der Bindung an die Nanopartikel wieder gelöst werden können. Die Optimierung der Bindung zwischen Trägersystem und Arzneistoff spielt folglich ebenso eine Rolle für die Weiterentwicklung der Nanopartikel. Ein Beispiel ist hierbei die Erprobung neuer Avidin-Biotin-Komplexbindungen (Langer et al. 2000; Coester et al. 2000).

---

### **4.3 Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme unter Zuhilfenahme des Durchflußzytometers**

Der mit dem CLSM geführte Beweis für die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen diente als Grundlage für die Messungen mit dem Durchflußzytometer. Die gemessenen Fluoreszenzen wurden folglich nicht ausschließlich von an der Zelloberfläche haftenden, sondern tatsächlich gleichfalls von intrazellulären fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln hervorgerufen.

Zunächst hat sich gezeigt, dass die erprobten Nanopartikel nicht nur von einer bestimmten Subpopulation der kultivierten primären Bronchialepithelzellen aufgenommen werden. Denkbar ist ein unterschiedliches Aufnahmeverhalten von Zellen, die sich auf verschiedenen Differenzierungsniveaus befinden. Die bei der Zellbürstung zur Herstellung der primären Zellkulturen gewonnenen Zelltypen, wie beispielsweise Drüsenzellen und Basalzellen, könnten ebenfalls ein unterschiedliches Aufnahmeverhalten zeigen, was allerdings nicht nachgewiesen werden konnte. Auch alle 16HBE14o-Zellen nehmen Nanopartikel auf.

Wie mit dem CLSM auch wurden Messungen nach Stoffwechselhemmung bei 4°C angestellt. Diese Messungen dienten zur Objektivierung der durch subjektiven Vergleich von Bildern aus dem CLSM getroffenen Aussage über die Quantität der Nanopartikelaufnahme in die Zellen. So kam es zu einer deutlich verminderten Fluoreszenzintensität in den bei 4°C inkubierten Zellen im Vergleich zu den bei 37°C gemessenen Zellen, was das in Kapitel 4.2 gesagte bestätigt: Die Aufnahme muss durch einen stoffwechselabhängigen, aktiven Prozess vermittelt sein. Weiterhin fanden die bei Messungen im konfokalen Laserrastermikroskop mit primären Bronchialepithelzellen gemachten Beobachtungen, dass Albuminnanopartikel nach Inkubation bei 4°C und anschließender Zellwäsche im Gegensatz zu Gelatinnanopartikeln an den Zellmembranen haften, ein entsprechendes Korrelat. Die 4°C-Kontrolle war im Falle von Gelatinnanopartikeln praktisch deckungsgleich mit der Negativkontrolle wohingegen die Inkubation von primären Bronchialepithelzellen mit

---

fluoreszenzmarkierten Albuminnanopartikeln auch bei 4°C zu einer deutlich erkennbaren Verschiebung der Häufigkeitsverteilung auf der Fluoreszenzachse führte. Letzteres wurde folglich durch an der Zelloberfläche haftende Albuminnanopartikel hervorgerufen.

Die Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Gelatine- und Albuminnanopartikeln zeigte, dass die Nanopartikelaufnahme in dem hier erprobten Bereich eine Konzentrationsabhängigkeit aufweist. Weiterhin verursachen Albuminnanopartikel mit steigender Konzentration einen sehr viel steileren Anstieg der Fluoreszenzintensität. Ein quantitativer Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Gelatine und Albuminnanopartikeln im Durchflußzytometer wurde nicht durchgeführt, da die verschiedenen Nanopartikel mit unterschiedlichen Einstellungen gemessen werden mussten. Weiterhin konnte mit dem FACS gezeigt werden, dass die zur besseren Differenzierung auf Membraneinsätzen kultivierten primären Bronchialepithelzellen Nanopartikel aufnehmen. Die Zelldifferenzierung in dem Ausmaß wie sie mit der hier beschriebenen Methode zu erreichen war, behindert die Aufnahmeprozesse deshalb nicht.

#### ***4.4 IL-8-ELISA zur Untersuchung der von Nanopartikeln hervorgerufenen Inflammation***

Bisherige Gentherapie-Studien haben gezeigt, dass der Gentransfer mit adenoviralen Vektoren in den Atemwegen zu einer inflammatorischen Immunantwort führt. Diese Immunantwort beendet die Expression des Transgens in kurzer Zeit (vgl. Kapitel 1.2.1.2 und 1.3). Somit steht zur Diskussion, inwiefern das Trägersystem für diese Entzündungsreaktion verantwortlich ist. Dieser Fragestellung widmeten sich zwei Arbeiten durch Interleukin-8-Messungen nach Inokulation von Zellkulturen mit Adenoviren. Eine der beiden Studien mit 16HBE14o-Zellen konnte keine Interleukin-8 Erhöhung nach Exposition der Zellen mit Adenoviren feststellen (Noah et al. 1996). Die zweite Arbeit, die ein Jahr später erschien, beschreibt einen Interleukin-8-

---

Anstieg nach Inokulation von HeLa-Zellen mit Adenoviren (Bruder und Kovetsdi 1997).

Falls Nanopartikel für den Gentransfer eingesetzt werden, so sollten auch sie ein möglichst geringes inflammatorisches Potenzial aufweisen, um die Expression von Transgenen nicht vorzeitig zu beenden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel zumindest nicht zu intrazellulären Entzündungskaskaden führen, die mit einer Interleukin-8-Expression einhergehen. Für genauere Ergebnisse ist die Untersuchung von Einflüssen auf den „mitogen-activated protein kinase pathway“ (MAPK), den Nuklearfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und einiger Zytokine notwendig, wie zum Beispiel, TNF- $\alpha$ , IL-6 und des erst kürzlich geklonten IL-18 (Ushio et al. 1996; Dinarello 1999).

#### **4.5 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die hier vorgestellten Experimente konnten mit Versuchen an Bronchialepithelzellen eine Nanopartikelaufnahme in Zellen nachweisen, die nicht zum monozytären Phagozytensystem gehören. Bisherige Studien hatten die Aufnahme von Nanopartikeln in Makrophagen gezeigt (Schäfer 1993; Schäfer et al. 1994b). Auch Bronchialepithelzellen auf Membraneinsätzen wiesen eine Nanopartikelaufnahme auf, was die Aufnahme von Nanopartikeln in Bronchialepithelzellen nach Verteilung in die Atemwege in Form eines Aerosolsprays wahrscheinlich macht. Solche Nanopartikel-aerosole könnten nicht nur zum Zwecke des Gentransfers eingesetzt werden, sondern auch zum Transport von Arzneistoffen in den Intrazellulärraum von Bronchialepithelzellen. Interessant ist auch, inwiefern der Surfactant für Nanopartikel eine ebenso große Barriere darstellt wie für Liposomen, deren Wirksamkeit durch den pulmonalen Surfactant behindert wird (Duncan et al. 1997).

Da ein gewebeorientiertes Drug-Targeting mit Nanopartikeln nach systemischer Applikation außer in die Zellen des RES bisher nicht gelungen ist (Allémann et al. 1993), ist zu untersuchen, ob eine topische Verteilung der Nanopartikel in den Atemwegen das gewebeorientierte Drug-Targeting mit Nanopartikeln

---

ermöglicht. Weitere Entwicklungen im Bereich des „Drug-Targeting“ sind ohnehin äußerst wichtig für die Weiterentwicklung der Nanopartikel als Trägersysteme für den Gentransfer, da sie im Gegensatz zu viralen Vektoren bislang nicht über spezielle und effektive Mechanismen zur Aufnahme in die Zellen und zur Transkription von genetischem Material im Zellkern besitzen. Denkbar ist die Ausstattung von Nanopartikeln mit Antigenstrukturen, die auf gewebespezifische Rezeptoren an den Zielzellen passen und eine Adhäsion oder sogar eine rezeptorvermittelte Endozytose hervorrufen.

Gelatine- und Albuminnanopartikel erfüllen weiterhin eine Reihe von Voraussetzungen, wie geringe Zytotoxizität, Aufnahme in die Zellen und geringe inflammatorische Potenz, um als Trägersystem für den Gentransfer fungieren zu können. Erste Versuche mit Plasmiden, die mit Reportergenen wie GFP (grün-fluoreszierendes-Protein) und lac-Z (ein Gen des lac Operons von *Escherichia coli*, das für  $\beta$ -Galaktosidase kodiert) bestückt sind, werden durchgeführt. Grundsätzlich ist der Gentransfer in Bronchialepithelzellen insbesondere mit Gelatinenanopartikeln möglich, was eine Arbeitsgruppe unter Truong-Le mit Gelatinenanopartikeln, die sich allerdings in ihrer Zubereitung wesentlich von den hier vorgestellten unterscheiden, bereits zeigen konnte (Truong-Le et al. 1998).

Da bisher noch keine Lösung für den Gentransfer in Bronchialepithelzellen gefunden worden ist, sollte das primäre Ziel in Zukunft sein, die Transfereffizienz von Nanopartikeln zu verbessern, um vielleicht sogar ähnlich gute Ergebnisse erzielen zu können wie mit Viren und Liposomen. Geeignete Methoden zur Verwirklichung dieses Ziels sind die Verbesserung der Aufnahme und die Erhöhung der Beladungskapazität der Nanopartikel. Weiterhin soll eine Methode zur Kernfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff etabliert werden, um insbesondere die Verteilung von an Nanopartikeln gebundenen fluoreszenzmarkierten Plasmiden oder Oligonukleotiden beurteilen zu können (Chavany et al. 1992; Zobel et al. 1997; Fattal et al. 1998).



---

Auch zu erwähnen sind alternative Nanopartikelzubereitungen aus Chitosan mit denen bereits gute Transfereffizienzen erzielt worden sind (Moffatt und Cookson 1999; Roy et al. 1999).

---

## 5 Zusammenfassungen

### ***5.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache***

Verschiedene Nanopartikel, darunter Gelatine- und Albuminnanopartikel und Cyanoakrylatnanopartikel mit Butyl- und Hexylseitenketten, wurden in dieser Arbeit auf ihre Tauglichkeit als Trägersystem zum Einsatz für einen späteren Gentransfer in Bronchialepithelzellen erprobt. In der Zellkultur wurden dazu an primären humanen Bronchialepithelzellen und an der Zelllinie 16HBE14o Zytotoxizitätstest nach Inkubation mit oben genannten Nanopartikeln durchgeführt. Weiterhin wurden qualitative und quantitative Aspekte der Anreicherung von fluoreszenzmarkierten Gelatine- und Albuminnanopartikeln in diese Zellen mit dem konfokalen Laserrastermikroskop und dem Durchflußzytometer untersucht. Zusätzlich evaluiert wurde die inflammatorische Potenz von Gelatine- und Albuminnanopartikeln mittels einer quantitativen Interleukin-8-Bestimmung.

Es konnte gezeigt werden, dass Cyanoakrylate aufgrund eines hohen zytotoxischen Effekts nicht für die Behandlung von Bronchialepithelzellen geeignet sind. Hierbei zeigten Cyanoakrylate mit kurzen Butylseitenketten eine ausgeprägtere Zytotoxizität als jene mit langen Hexylseitenketten. Gelatine- und Albuminnanopartikel hingegen zeichneten sich durch sehr geringe bis fehlende Zytotoxizität aus.

Mit dem konfokalen Laserrastermikroskop konnte die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Gelatine- und Albuminnanopartikel in das Zellinnere von primären Bronchialepithelzellen dokumentiert werden. Erstmals wurde somit eine Nanopartikelaufnahme in Zellen nachgewiesen, die nicht zum

---

mononukleären Phagozytensystem gehören. Die Versuche zur zellulären Aufnahme der Nanopartikel mit verschiedenen Inkubationsbedingungen zeigten, dass primäre Bronchialepithelzellen und 16HBE14o-Zellen Gelatine- und Albuminnanopartikel in einem aktiven, stoffwechselabhängigen Prozess aufnehmen, der am ehesten der Phagozytose entspricht. Ferner haben sich Albuminnanopartikel im Rahmen dieser Versuche als bioadhäsiv erwiesen.

Mit dem Durchflußzytometer ließ sich schließlich eine Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme fluoreszenzmarkierter Gelatine- und Albuminnanopartikel zeigen und feststellen, dass alle Zellen einer Zellpopulation von primären Bronchialepithelzellen oder 16HBE14o-Zellen Nanopartikel aufnehmen. Selbst primäre Zellen, die durch die Kultur auf Membraneinsätzen auf einem hohen Differenzierungsniveau gehalten wurden, nahmen Nanopartikel auf.

Eine quantitative Interleukin-8-Bestimmung zeigte schließlich, dass Gelatine- und Albuminnanopartikel keine Inflammation in primären humanen Bronchialepithelzellen und der Zelllinie 16HBE14o verursachen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die hier erprobten Nanopartikel bezüglich ihrer Zytotoxizität und ihrem inflammatorischem Potenzial als geeignet für den Gentransfer erscheinen. Die Aufnahme der Nanopartikel in das Zellinnere ist vielversprechend für eine spätere Expression von Transgenen in Bronchialepithelzellen.

## ***5.2 Zusammenfassung in englischer Sprache***

In this work various nanoparticles including gelatine- and albuminparticles and cyanoakrylatenparticles with butylic and hexylic sidechains have been evaluated for their potential as a carrier-system for gene transfer to airway epithelium cells in the future. This has been achieved by determining cytotoxicity after exposure to the listed nanoparticles on primary human airway epithelium cells and the cell line 16HBE14o in culture: Furthermore confocal laserscan microscopy and flow cytometry allowed the observation of qualitative

---

and quantitative aspects of the uptake of fluorescence labelled gelatine- and albuminnanoparticles into these cells. In addition the inflammatory potential of gelatine- and albuminenanoparticles has been evaluated performing a quantitative Interleukine-8-ELISA.

Due to a high cytotoxic effect polyalkylcyanoakrylate nanoparticles appeared not to be suitable for the interaction with airway epithelium cells. Cyanoacrylates with short butylic sidechains showed a more severe cytotoxicity than those with long hexylic sidechains. In contrast to that gelatine- and albuminenanoparticles appeared highly suitable showing little or no cytotoxic effect.

Confocal laserscan microscopy allowed the documentation of the cellular uptake of fluorescence labelled gelatine- and albuminnanoparticles, for the first time showing the uptake of nanoparticles into cells not belonging to the mononuclear phagocyte system. Tests with various incubation conditions showed that nanoparticle incorporation is an active, metabolism-dependent process, most resembling phagocytosis. Albumin nanoparticles proved to be bioadhesive during these tests.

Flow cytometry finally proved that the uptake of fluorescence labelled gelatine- and albuminnanoparticles is dependent on the nanoparticle concentration and that all cells of a population of primary airway epithelium cells or 16HBE14o-cells incorporated nanoparticles. Even highly differentiated primary cells cultured on membrane inserts showed nanoparticle uptake.

Performing the quantitative Interleukine-8-ELISA it could be shown that gelatine- and albuminnanoparticles provoked no inflammation in primary human airway epithelium cells or 16HBE14o-cells.

Concluding the tested nanoparticles appear to be suitable for gene transfer as to cytotoxicity and inflammatory potential. The uptake of nanoparticles into the cells is promising for an expression of transgenes in airway epithelium cells in the future.

---

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ackermann H: *Biometrie*. Hochheim-Darmstadt, epsilon-Verlag, 1997
2. Albelda SM, Wiewrodt R, Zuckermann JB: Gene Therapy for Lung Disease: Hype or Hope? *Ann Intern Med.* 2000; 132: 649-660
3. Allémann E, Gurny R, Doelker E: Drug-loaded nanoparticles - Preparation Methods and Drug Targeting Issues. *Eur.J.Pharm.Bioharm.* 1993; 39: 173-191
4. Anderson WF: Human Gene Therapy: The Initial Concepts in Brigham KL (Herausgeber): *Gene Therapy for Diseases of the Lung*. New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker, Inc., 1997, S. 3-16
5. Bargon J, Buhl R: Strategien für eine Gentherapie bei zystischer Fibrose. *Pneumologie* 1996; 50
6. Bargon J, Sanders S, Caspary W, Buhl R: Therapie der zystischen Fibrose im Erwachsenenalter - Gegenwart und Zukunft. *Pneumologie* 1995; 49: 573-583
7. Barnhart JL, Harada M, Lyle LR, Saravis CA: Immunologic Reactions of Human Recipients to Repeated Exposures to Alburnex Microspheres. *Investigative Radiology* 1991; 26: 192-193
8. Bellon G, Michel-Calemard L, Thouvenot D, Jagneaux V, Poitevin F, Malcus C: Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Human Gene Therapy* 1997; 8: 15-25

- 
9. Bender AR: Nanopartikel und Liposomen als Trägersysteme für antivirale Wirkstoffe gegen HIV: Entwicklung und präklinische Testung in der Zellkultur. Dissertation des Fachbereichs Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main 1997
  10. Bender AR, Von Briesen H, Kreuter J, Duncan IB, Rübsamen-Waigmann H: Efficiency of Nanoparticles as a Carrier System for Antiviral Agents in Human Immunodeficiency Virus-Infected Human Monocytes/Macrophages in Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40: 1467-1471
  11. Bertling WM, Gareis M, Paspaleeva V, Zimmer A, Kreuter J, Nürnberg E, Harrer P: Use of Liposomes, Viral Capsids, and Nanoparticles as DNA Carriers. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1991; 13: 390-405
  12. Blömer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH: Highly Efficient and Sustained Gene Transfer in Adult Neurons with a Lentivirus Vector. *Journal of Virology* 1997; 71: 6641-6649
  13. Bodner U: Antisense Phosphorothioat-Oligonukleotide: Inhibitoren der Translation in vivo. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1991; 2: 51-54
  14. Bogue CW, Jacobs HC, Dynia DW, Wilson CM, Gross I: Retinoic Acid increases surfactant protein mRNA in fetal rat lung in culture. *American Physiological Society* 1999; L862-L868
  15. Bosch K: Nichtparametrische (verteilungsfreie) statistische Methoden, in *Statistiktaschenbuch*. München, R. Oldenbourg Verlag GmbH, 1993, S. 669-752

- 
16. Boucher RC: Status of gene therapy for cystic fibrosis lung disease. *The Journal of Clinical Investigation* 1999; 103: 441-445
  17. Brody SL, Metzger M, Danel C, Rosenfeld MA, Crystal RG: Acute responses of non-human primates to airway delivery of an adenovirus vector containing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA. *Human Gene Therapy* 1994; 5: 821-836
  18. Bruder JT, Kovesdi I: Adenovirus Infection Stimulates the Raf/MAPK Signaling Pathway and Induces Interleukin-8 Expression. *Journal of Virology* 1997; 71: 398-404
  19. Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ: Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996; 85: 530-536
  20. Caplen NJ: The Gene as the Drug. *Nature* 1995a; 1: 39-46
  21. Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG, Dorin JR, Stevenson BJ, Gao X, Durham SR, Jeffrey PK, Hodson ME, Coutelle C, Huang L, Porteous DJ, Williamson R, Geddes DM: Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nature Medicine* 1995b; 1: 39-46
  22. Chavany C, Trung Le D, Couvreur P, Puisieux F, Hélène C: Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles as Polymeric Carriers for Antisense Oligonucleotides. *Pharmaceutical Research* 1992; 9: 441-449
  23. Coester CJ, Langer K, Briesen Hv, Kreuter J: Gelatin nanoparticles by two step desolvation - a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of Microencapsulation* 2000; 17: 187-193

- 
24. Coester C, Kreuter J, Von Briesen H, Langer K: Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA). *International Journal of Pharmaceutics* 2000; 196: 147-149
  25. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB: Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1973; 70: 3240-3244
  26. Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohrui T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Gruenert DC: CFTR Expression and Chloride Secretion in Polarized Immortal Human Bronchial Epithelial Cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1994; 10: 38-47
  27. Cromwell O, Hamid Q, Corrigan CJ, Barkans J, Meng Q, Collins PD, Kay AB: Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 $\beta$  and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 1992; 77: 330-337
  28. Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, Chu CS, Mastrangeli A, Hay JG: Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nature Genetics* 1994; 8: 42-51
  29. Dai Y, Schwarz EM, Gu D, Sarvetnick N, Verma IM: Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene. Tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1401-1405
  30. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG: Regulation of Interleukin 8 Gene Expression by Oxidant Stress. *The journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 25568-25576



- 
31. Dinarello CA: Interleukin-18. *Methods* 1999; 19: 121-132
  32. Douglas SJ, David SS, Illum L: Nanoparticles in drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1987; 3: 233-261
  33. Dreyfuss G, Hentze M, Lamond AI: From Transcript to Protein. *Cell* 1996; 85: 963-972
  34. Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui L-C, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM: Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 1990; 62: 1227-1233
  35. Duncan JE, Whitsett JA, Horowitz AD: Pulmonary Surfactant Inhibits Cationic Liposome-Mediated Gene Delivery to Respiratory Epithelial Cells In Vitro. *Human Gene Therapy* 1997; 8: 431-438
  36. Duncker H-R: Atemapparat (Apparatus respiratorius), in Drenckhahn D, Zenker W (Herausgeber): *Benninghoff Anatomie*. München-Wien-Baltimore, Urban&Schwarzenberg, 1994, S. 529-587
  37. Edmondson SW, Wu R, Mossman BT: Regulation of Differentiation and Keratin Protein Expression by Vitamin A in Primary Cultures of Hamster Tracheal Epithelial Cells. *Journal of Cellular Physiology* 1990; 142: 21-30
  38. Engelhardt J, Simon RH, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Doranz B, Grossman M, Wilson JM: Adenovirus-mediated Transfer of the CFTR Gene to the Lung of nonhuman Primates: Biological Efficacy Study. *Human Gene Therapy* 1993; 4: 759-769
  39. Fattal E, Vauthier C, Aynie I, Nakada Y, Lambert G, Malvy C, Courveur P: Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery

- 
- of oligonukleotides. *Journal of Controlled Release* 1998; 53: 137-143
40. Flotte TR, Carter BJ: In vivo gene therapy with adeno-associated virus vectors for cystic fibrosis. *Advanced Pharmacology* 1997; 40: 85-101
41. Friedmann T: Principles for Human Gene Therapy Studies. *Science* 2000; 287: 2163-2165
42. Friemel H: *Immunologische Arbeitsmethoden*. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1984
43. Gaspar R, Opperdoes FR, Preat V, Roland R: Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: in vitro activity of primaquine-loaded nanoparticles against intracellular *Leishmania donovani*. *Ann Trop Med Parasitol* 1992; 86: 41-9
44. Gill DR, Southern KW, Mofford KA, Seddon T, Huang L, Sorgi F: A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Therapy* 1997; 4: 199-209
45. Greenberg DS: Stricter regulation proposed for US gene-therapy trials. *Lancet* 2000; 355: 1977-1977
46. Halbert CL, Alexander IE, Wolgamot GM, Miller AD: Adeno-associated virus vectors transduce primary cells much less efficiently than immortalized cells. *Journal of Virology* 1995; 65: 1473-1479
47. Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Nakayama T, Takeshita I, Horie T: Hyperosmolarity-induced Interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1999; 159: 634-640

- 
48. Hay JG, McElvaney NG, Herena J, Crystal RG: Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector. *Human Gene Therapy* 1995; 6: 1487-1496
  49. Ibelgaufts H: *Lexikon Zytokine*. München, Medikon Verlag München, 1992
  50. Jaroszeski MJ, R Heller: *Flow Cytometry Protocols*. Humana Press, 1998
  51. Jorissen M, Schueren BVd, Berghe HVd, Cassiman JJ: Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *European Respiratory Journal* 1991; 4: 210-217
  52. Kahl G: *Dictionary of Gene Technology*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995
  53. Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Elfenbein DH, Alvira M, Buttrick PM, Leinwand LA: The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Therapy* 1994; 1: 395-402
  54. Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui L-C: Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080
  55. Khair OA, Davies RJ, Devalia JL: Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *European Respiratory Journal* 1996; 9: 1913-1922

- 
56. Knowles MR, Hohneker KW, Zhou Z, Olsen JC, Noah TL, Hu PC, Leigh MW, Engelhardt JF, Edwards LJ, Jones KR, Grossman M, Wilson JM, Johnson LG, Boucher RC: A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *The New England Journal of Medicine*. 1995; 333: 823-831
  57. Kreuter J: Evaluation of Nanoparticles as a Drug-Delivery System I: Preparation Methods. *Pharm.Acta Helv.* 1983a; 58: 196-209
  58. Kreuter J: Evaluation of Nanoparticles as Drug-Delivery Systems II: Comparison of the Body Distribution of Nanoparticles with the Body Distribution of Microspheres (Diameter >1  $\mu\text{m}$ ), Liposomes, and Emulsions. *Pharm.Acta Helv.* 1983b; 58: 217-226
  59. Labhasetwar V, Song C, Humphrey W, Shebuski R, Levy RJ: Arterial Uptake of Biodegradable Nanoparticles: Effect of Surface Modifications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998; 87: 1229-1234
  60. Langer K: Nanopartikel - Herstellung, Charakterisierung, Anwendung. Diavortrag 1999.
  61. Langer K, Coester C, Weber C, Von Briesen H, Kreuter J: Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000; 49: 303-307
  62. Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K: The Neutrophil-Activating Protein (NAP-1) Is Also Chemotactic for T-Lymphocytes. *Science* 1989; 243: 1464

- 
63. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: Proteinstoffwechsel, in Tschesche H (Herausgeber): *Prinzipien der Biochemie*. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag, 1994, S. 1015-1066
  64. Leutz M, Sybrecht GW: Mukoviszidose, in *Thiemes Innere Medizin*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1999, S. 1495-1505
  65. Lindl T, J Bauer: *Zell- und Gewebekultur*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, 2000a
  66. Lindl T, Bauer J: Zusätze zu serumfreien Medien, in Lindl T, Bauer J (Herausgeber): *Zell- und Gewebekultur*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, 2000b, S. 79-79
  67. Loitsch S, Mallinckrodt Cv, Kippenberger S, Steinhilber D, Wagner TOF, Bargon J: Reactive Oxygen Intermediates Are Involved in IL-8 Production Induced by Hyperosmotic Stress in Human Bronchial Epithelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 276: 571-578
  68. Martin LD, Rochelle LG, Fischer BM, Krunkosky TM, Adler KB: Airway epithelium as an effector of inflammation: molecular regulation of secondary mediators. *European Respiratory Journal* 1997; 10: 2139-2146
  69. Marty JJ, Oppenheim RC, Speiser PP: Nanoparticles - a New Colloidal Drug Delivery System. *Pharm.Acta Helv.* 1978; 53: 17-23
  70. McCoy RD, Davidson BL, Roessler BJ, Huffnagle GB, Janich SL, Laing TJ, Simon RH: Pulmonary inflammation induced by incomplete or inactivated adenoviral particles. *Human Gene Therapy* 1995; 6: 1553-1560

- 
71. Moffatt MF, Cookson WOC: Gene therapy for peanut allergy. *Nature Medicine* 1999; 5: 380-380
72. Mohan C: Lektins, in *Glycobiology Catalog*. Calbiochem, 2000,
73. Mohr H: Genomanalyse: Verspricht die Wissenschaft zu viel?  
*Laborjournal* 2000; 8: 20-21
74. Mutschler E, Schäfer-Korting M: Pharmakokinetik, in  
*Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1997, S. 5-54
75. N.N.: Gene therapy's trials. *Nature* 2000; 405: 599-599
76. Noah TL, Wortmann IA, Hu P-C, Leigh MW,oucher RC: Cytokine Production by Cultured Human Bronchial Epithelial Cells Infected with a Replication-deficient Adenoviral Gene Transfer Vector or Wild-type Adenovirus Type 5. *Am J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1996; 14: 417-424
77. Noether GE: Sample Size Determination for Some Common Nonparametric Tests. *Journal of the American Statistical Association* 1987; 82: 645-647
78. Pilewski JM, Frizzell RA: Role of CFTR in Airway Disease. *Physiological Reviews* 1999; 79: S215-S255
79. Porteous DJ, Dorin JR, McLachlan G, Davidson-Smith H, Davidson H, Stevenson BJ: Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Therapy* 1997; 4: 210-218

- 
80. Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, McCann JD, Klinger KW, Smith AE, Welsh MJ: Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation. *Nature* 1990; 347: 358-363
  81. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C: Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073
  82. Roebuck KA: Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: Differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 1999; 4: 223-230
  83. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS: Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science* 1989; 245: 1059-1065
  84. Rosenberg LE, Schlechter AN: Gene Therapist, Heal Thyself. *Science* 2000; 287: 1751-1751
  85. Roy K, Mao H-Q, Huang S-K, Leong KW: Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine* 1999; 5: 387-391
  86. Rubenstein RC, McVeigh U, Flotte TR, Guggino WB, Zeitlin PL: CFTR gene transduction in neonatal rabbits using an adeno-associated virus (AAV) vector. *Gene Therapy* 1997; 4: 384-392
  87. Sachs L: *Angewandte Statistik*. Berlin, Heidelberg, Springer, 1996

- 
88. Schäfer V, Kreuter J, Rübsamen-Waigmann H, Gerte S, Von Briesen H: Influence of HIV-Infection on the phagocytic activity of monocytes / macrophages and granulocytes. *Clin.Diagn.Virol.* 1994a; 1: 279-287
89. Schäfer V, Von Briesen H, Rübsamen-Waigmann H, Steffan AM, Royer C, Kreuter J: Phagocytosis and degradation of human serum albumin microspheres and nanoparticles in human macrophages. *Journal of Microencapsulation* 1994b; 1994: 261-269
90. Schäfer V: *Partikuläre Arzneistoffträger als System für Drug-Targeting bei der Therapie der HIV-Infektion und AIDS.* Frankfurt am Main, VAS - Verlag für Akademische Schriften oHG, 1993
91. Schuber R: Liposomen in Arzneimitteln, in Müller RH, Hildebrand GE (Herausgeber): *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneimittelformen.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1998, S. 219-242
92. Sheppard DN, Welsh MJ: Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews* 1999; 79: S23-S46
93. Speiser PP: Nanopartikel, in Müller RH, Hildebrand GE (Herausgeber): *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneimittelformen.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999, S. 339-356
94. Tatum EL: Reflections on Research and the Future of Medicine: Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med* 1966; 10: 19-32



- 
95. Tröster SD, Müller U, Kreuter J: Modification of the Body Distribution of Polymethylmethacrylate Nanoparticles in Rats by Coating with Surfactants. *International Journal of Pharmaceutics* 1990; 61: 85-100
96. Truong-Le VL, Walsh SM, Schweibert E, Mao H-Q, Guggino WB, August JT, Leong KW: Gene Transfer by DNA Gelatin Nanospheres. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1998; 361: 47-56
97. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M: Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *Journal of Immunology* 1996; 156: 4274-4279
98. Verma IM, Somia N: Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 389: 239-242
99. Wagner JA, Moran ML, Messner AH, Daifuku R, Conrad CK, Reynolds T: A phase I/II study of tgAAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Human Gene Therapy* 1998a; 9: 889-909
100. Wagner JA, Reynolds T, Moran ML, Moss RB, Wine JJ, Fotte TR: Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *Lancet* 1998b; 35: 1702-1703
101. Walther W, Stein U: Viral Vectors for Gene Transfer: A Review of Their Use in the Treatment of Human Diseases. *Drugs* 2000; 60: 249-271
102. Watson JV: *Flow Cytometry Data Analysis - Basic Concepts and Statistics*. Cambridge University Press, 1992

- 
103. Weber C, Kreuter J, Langer K: Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2000a; 196: 197-200
104. Weber C, Kreuter J, Langer K: Desolvation process and surface characterization of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2000b; 194: 91-102
105. Welsh MJ, Smith AE: Molecular Mechanisms of CFTR Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251-1254
106. Wiesel JM, Gamiel H, Vlodaysky I, Gay I, Ben-Bassat H: Cell attachment, growth characteristics and surface morphology of human upper-respiratory tract epithelium cultured on extracellular matrix. *European Journal of Clinical Investigation* 1983; 13: 57-63
107. Wu R, Nolan E, Turner C: Expression of tracheal differentiated functions in serum-free, hormone-supplemented medium. *Journal of Cellular Physiology* 1985; 127: 167-181
108. Wu R, Wu MMJ: Effects of Retinoids on Human Bronchial Epithelial Cells: Differential Regulation of Hyaluronate Synthesis and Keratin Protein Synthesis. *Journal of Cellular Physiology* 1986; 127: 73-82
109. Yamaya M, Finkbeiner WE, Chun SY, Widdicombe JH: Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am.J.Physiol.* 1992; 262: L713-L724
110. Yang Y, Li Q, Ertl H, Wilson J: Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung directed gene therapy with recombinant adenovirus. *Journal of Virology* 1995; 69: 2004-2015

- 
111. Yei S, Mittereder N, Tang K, O'Sullivan C, Trapnell BC: Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated in vivo vector administration to the lung. *Gene Therapy* 1994; 1: 192-200
112. Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ: Neutrophil chemotactic cofactor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: Partial characterization and separation from interleukin-1 (IL 1). *Journal of Immunology* 1987; 139: 788-793
113. Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ: Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 1993; 75: 207-216
114. Zabner J, Freimuth P, Puga A, Fabrega A, Welsh MJ: Lack of high Affinity Fiber Receptor Activity Explains the Resistance of Ciliated Airway Epithelia to Adenovirus Infection. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 100: 1144-1149
115. Zabner J, Ramsey BW, Meeker DP, Aitken ML, Balfour RP, Gibson RL: Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97: 1504-1511
116. Zimmer A, Kreuter J, Robinson JR: Studies on the transport pathway of PBCA nanoparticles in ocular tissues. *Journal of Microencapsulation* 1991; 8: 497-504

- 
117. Zimmer A, Mutschler E, Lambrecht G, Mayer D, Kreuter J:  
Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of an ophthalmic  
pilocarpine nanoparticle-delivery-system. *Pharmaceutical Research*  
1994; 11: 1435-1442
118. Zobel HP, Kreuter J, Werner D, Noe CR, Kumel G, Zimmer A: Cationic  
polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense  
oligonukleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Development* 1997;  
7: 483-493
119. Zuckerman JB, Robinson CB, McCoy KS, Shell R, Sferra TJ, Chirmule N:  
A phase I study of adenovirus-mediated transfer of the human cystic  
fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the lung  
segment of individuals with cystic fibrosis. *Human Gene Therapy*  
1999; 10: 2973-2985

---

## 7 Anhang

### 7.1 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	Aktivatorprotein
bzw.	beziehungsweise
CF	cystic fibrosis
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CLSM	confocal laserscan microscopy (deutsch: Konfokale Laserraster Mikroskopie)
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]Oktan
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
ED50	Effektdosis 50
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epithelial growth factor
engl.	englisch
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FL	fluorecence

---

FSC	forward scatter
GFP	grün-fluoreszierendes-Protein
GM-CSF	granulocyte-makrophage-colony-stimulating-factor
Hepes	4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazin-[2-ethansulfonsäure]
HSA	humanes Serumalbumin
iCAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
KGF	keratinocyte growth factor
INF	Interferon
lac-Z	ein Gen des lac Operons von Escherichia coli, dass für $\beta$ -Galaktosidase kodiert
LDH	Laktatdehydrogenase
LTRs	long terminal repeats
M	Molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEM	minimal essential medium
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
NAD <sup>+</sup>	Nikotinsäureamiddinukleotid
NADH+H	Nikotinsäureamidadenindinukleotid, reduziert
NF	Nuklearfaktor (engl.: nuclear factor)
osm	Osmol (Einheit der Osmolarität: osm/l)
PAF	platelet activating factor
PBS	phosphate buffer solution
PBCA	Polybutylcyanoacrylat
PHCA	Polyhexylcyanoacrylat
RES	reticuloendotheliales System
ROS	reactive oxygen species
SSC	sideward scatter
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	tumor necrosis factor
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiozyanat

---

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-amino-methan
U	Unit
vgl.	vergleiche

---

## **7.2 Kongressbeiträge**

„Nanoparticles as a vehicle for gene transfer to pulmonary epithelial cells“,  
Autoren: C. v. Mallinckrodt, M. Brzoska, K. Langer, C. Coester, A. Zimmer, S.  
Loitsch, J. Bargon, T.O.F. Wagner; Kongress der European Respiratory Society  
(ERS), 9. - 13. Oktober 1999 in Madrid

„Nanopartikel als alternativer Vektor für den Gentransfer in  
Bronchialepithelzellen“, Autoren: M. Brzoska, C. von Mallinckrodt, J. Bargon,  
K. Langer, C. Coester, A. Zimmer, S. Loitsch, T.O.F. Wagner; 35. Tagung der  
Gesellschaft für Lungen- und Atemwegsforschung e. V. in der Deutschen  
Gesellschaft für Pneumologie, 1. - 4. Dezember 1999 in Bochum

„Nanopartikel und der optimierte Gentransfer?“, Autoren: C. von Mallinckrodt,  
M. Brzoska, K. Langer, A. Zimmer, J. Bargon, S. Loitsch, T.O.F. Wagner; 41.  
Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, 01. – 04. März 2000 in  
Hamburg

„Einfluss von Gelatine- und Albuminnanopartikeln auf die Interleukin-8-  
Ausschüttung von Bronchialepithelzellen“, Autoren: M. Brzoska,  
C. v. Mallinckrodt, J. Bargon, K. Langer, A. Zimmer, S. Loitsch, T.O.F. Wagner;  
42. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, 21. – 24. März  
2001 in Jena

„Effect of Gelatin and Albumin Nanoparticles on the IL-8-Release by Airway  
Epithelium Cells“, Autoren: M. Brzoska, K. Langer, S. Loitsch, J. Bargon,  
C. v. Mallinckrodt; 97. internationaler Kongress der American Thoracic Society,  
18. - 23. Mai 2001 in San Francisco



---

### 7.3 Tabellarischer Lebenslauf

#### **Persönliche Daten**

Name:	Martin Brzoska
Geburtsdatum:	08. Juli 1977
Geburtsort:	Frankfurt am Main
Staatsbürgerschaft:	Deutsch
Wohnort:	Hartmannsweilerstrasse 30, 65933 Frankfurt am Main

#### **Schulbildung**

1983 - 1987	Besuch der Albrecht-Dürer-Schule in Frankfurt am Main
1987 - 1993	Gymnasiale Unter- und Mittelstufe an der Helene-Lange-Schule in Frankfurt-Höchst
1993 - 1996	Gymnasiale Oberstufe am Friedrich-Dessauer-Gymnasium in Frankfurt-Höchst
1996	Abitur mit der Gesamtnote 1,2

#### **Studium**

September 1996	Beginn des Medizinstudiums an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
September 1998	Physikum mit der Gesamtnote „gut“: mündlich „gut“, schriftlich „gut“

---

Oktober 1998	Beginn der Doktorarbeit zum Thema: „Sind Nanopartikeln als Vehikel für den Gentransfer in Bronchialepithelzellen geeignet?: Untersuchungen in der Zellkultur“ am Fachbereich für Pneumologie/Allergologie der Johann Wolfgang Goethe-Universitätsklinik in Frankfurt am Main unter Prof. Dr. T.O.F. Wagner
August 1999	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Note „befriedigend“
März 2002	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote „gut“: mündlich „sehr gut“, schriftlich „gut“
April 2003	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“
<b>Famulaturen und praktisches Jahr</b>	
September 1997	Praktikum auf der kardiologischen Station der medizinischen Klinik IV am Uniklinikum Frankfurt am Main unter Prof. Dr. A. M. Zeiher
März 1999	Famulatur auf der gastroenterologischen Station der medizinischen Klinik II am Uniklinikum Frankfurt am Main unter Prof. Dr. W. F. Caspary
März 2000	Famulatur in der Gemeinschaftspraxis für Radiologie und Nuklearmedizin am Bethanien-Krankenhaus in Frankfurt am Main
Juli 2000	Famulatur in der urologischen Abteilung des städtischen Klinikums Frankfurt-Höchst unter Prof. Dr. Ludwig
August 2000	Famulatur in der neurochirurgischen Abteilung des städtischen Klinikums Frankfurt-Höchst unter Prof. Dr. H.-G. Höllerhage

---

Mai 2002	Beginn des praktischen Jahres in den Kliniken des Main-Taunus-Kreises: Bad Soden und Hofheim
<b>Weiterbildung</b>	<p>Freiwillige Kurse zum Thema:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>„Abdominelle Ultraschalldiagnostik“,</li> <li>„Sonographie in der Urologie“,</li> <li>„Klinische Elektrokardiographie“,</li> <li>„Sportmedizin und Rehabilitation“,</li> <li>„klassische Massagetechniken“,</li> <li>„Hämatologie“ und</li> <li>„Auskultation und Pathophysiologie des Herzens“</li> </ul>
<b>Persönliches Engagement und Hobbys</b>	<p>Organisation und Durchführung von Nachhilfeunterricht in den Fächern Biochemie, Physiologie und Physik für Mediziner</p> <p>Mitwirkung am biochemischen Praktikum für Studierende der Zahnmedizin als studentische Hilfskraft im August 2001</p> <p>Trainer im Taekwondo-Sportverein Dojang-Frankfurt: Betreuung der Wettkampfgruppe</p> <p>Musikalisches Interesse für Klavier</p>
<b>Sprachen</b>	Deutsch, Englisch, Französisch, Polnisch, Latein

---

**EDV-Kenntnisse**

Maschinenschreiben

Betriebssysteme: Dos, Windows

Programmiersprachen: Turbo Pascal

Office-Anwendungen: Word, Excel, PowerPoint

Bildbearbeitung: Photoshop, Pagemaker

Internet-Anwendungen: Netscape, Internet-Explorer,  
insbesondere Internetrecherche mit PubMed

Wissenschaft und Statistik: SigmaPlot, Reference  
Manager, WinMDI, Cellquest, SAS, SPSS

Frankfurt, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

---

#### **7.4 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Nanopartikel als Trägersystem für den Gentransfer in Bronchialepithelzellen: Untersuchung in der Zellkultur“, im Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Medizinische Klinik II, Schwerpunkt: Pneumologie / Allergologie unter Leitung von Prof. Dr. T.O.F. Wagner mit Unterstützung von Dr. Christian von Mallinckrodt ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt, \_\_\_\_\_