

Charakterisierung von Polymeren mit funktioneller Architektur zur Behandlung von Lebererkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

***doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von M. Sc. David Hertz

geboren am 27.06.1986 in Schleiz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Britta Qualmann,
Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Michael Bauer
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Claus-Michael Lehr
Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS), Universität
des Saarlandes

Tag der öffentlichen Verteidigung: 24.09.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	- 1 -
1. Zusammenfassung.....	- 6 -
2. Einleitung	- 8 -
2.1 Gentherapie	- 8 -
2.1.1 Gentherapeutische Methoden	- 8 -
2.1.2 Polymerbasierte Transfektionsmethoden	- 11 -
2.2 Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks).....	- 15 -
2.2.1 PI3Ks der Klasse I.....	- 15 -
2.2.2 Die Rolle von PI3Ks der Klasse I bei Lebererkrankungen	- 18 -
2.2.3 Möglichkeiten der Inhibition von PI3Ks der Klasse I	- 19 -
3. Fragestellung der Arbeit	- 21 -
4. Materialien und Methoden	- 22 -
4.1 Materialien	- 22 -
4.1.1 Bakterienstamm	- 22 -
4.1.2 Eukaryotische Zelllinien.....	- 22 -
4.1.3 Mausstämme.....	- 22 -
4.1.4 Bakterien- und Zellkulturmedien sowie Zusätze	- 22 -
4.1.5 Biochemikalien und Chemikalien.....	- 23 -
4.1.6 Puffer und Lösungen	- 25 -
4.1.7 Antikörper.....	- 26 -
4.1.8 Plasmid	- 27 -
4.1.9 Polymere.....	- 27 -
4.1.10 Verbrauchsmaterialien	- 30 -
4.1.11 Geräte	- 30 -
4.1.12 Software.....	- 31 -
4.2 Methoden	- 32 -
4.2.1 Subkultivierung von Zelllinien	- 33 -

4.2.2	Polymercharakterisierung.....	- 33 -
4.2.2.1	Molekularbiologische Methoden	- 33 -
4.2.2.1.1	Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i> XL10-Gold®	- 33 -
4.2.2.1.2	Isolation von pDNA mittels Midipräparation	- 33 -
4.2.2.2	Polyplexbildung	- 34 -
4.2.2.3	EB-Quench-Test	- 34 -
4.2.2.4	Heparin-Dissoziationstest.....	- 34 -
4.2.2.5	Größenverteilung und Zetapotenzial	- 35 -
4.2.2.6	Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT	- 35 -
4.2.2.7	Untersuchungen zur Polyplexaufnahme mittels Durchflusszytometrie..... und Lebendzell-Mikroskopie	- 36 -
4.2.2.8	Bestimmung von GFP-positiven Zellen mit Hilfe der..... Durchflusszytometrie	- 37 -
4.2.3	Untersuchungen von PI3K-Signalwegen in der Leber und der	- 37 -
	hepatischen Zelllinie Hepa1-6	- 37 -
4.2.3.1	Aktivierung und Inhibition von PI3Ks in Hepa1-6 Zellen	- 37 -
4.2.3.2	Proteinbiochemische Methoden	- 38 -
4.2.3.2.1	Herstellung von Hepa1-6 Zelllysaten.....	- 38 -
4.2.3.2.2	Präparation von Mausleberhomogenaten.....	- 38 -
4.2.3.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA	- 39 -
4.2.3.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	- 39 -
4.2.3.2.5	WB-Transfer und -Detektion mit dem LI-COR Odyssey	- 40 -
4.2.3.3	Immunfluoreszenzfärbungen	- 40 -
4.2.3.3.1	ICC von Hepa1-6 Zellen.....	- 40 -
4.2.3.3.2	ICW von Hepa1-6 Zellen	- 41 -
4.2.3.3.3	IHC von Leberschnitten.....	- 41 -
4.2.3.4	Mikroskopie und Analysemethoden.....	- 42 -
4.2.3.4.1	Fluoreszenzmikroskopie	- 42 -
4.2.3.4.2	Quantifizierung von p-AKT und AKT in Hepa1-6 Zellen.....	- 42 -
4.2.4	Statistische Auswertung	- 42 -

5.	Ergebnisse	- 44 -
5.1	Untersuchung der DNA-Interaktionen von Polymeren mit..... unterschiedlichen Funktionalitäten	- 44 -
5.2	Zytotoxizität von Polymeren in ausgewählten Zelllinien	- 55 -
5.3	Polyplexaufnahme in Hepa1-6 und L929 Zellen	- 59 -
5.4	GFP-Expressionen in Hepa1-6 und L929 Zellen	- 64 -
5.5	Mikroskopische Untersuchungen zur Polyplexfreisetzung in Hepa1-6 Zellen	- 68 -
5.6	PI3K-Aktivitäten in der inflammatorischen Leber	- 71 -
5.7	Möglichkeiten der Untersuchung von PI3Ks-Aktivitäten in Hepa1-6 Zellen.....	- 74 -
6.	Diskussion.....	- 80 -
6.1	P(Ox)- und P(AGE)-Polymere mit funktioneller Architektur variieren in ihren..... DNA-Interaktionen und Toxizitäten.....	- 80 -
6.2	Polyplexe mit P(Ox)s und P(AGE)s werden effektiv in Zellen	- 86 -
6.3	PI3K γ trägt zu hepatischen PI3K-Aktivitäten während der septischen	- 91 -
6.4	Bei der Methodenetablierung zur Charakterisierung von isoformspezifischen	- 93 -
7.	Schlussfolgerungen.....	- 98 -
8.	Literatur- und Quellenverzeichnis	- 100 -
9.	Anhang.....	- 110 -
9.1	Zusätzliches Material.....	- 110 -
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	- 115 -
9.3	Tabellenverzeichnis.....	- 117 -
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	- 118 -
9.5	Danksagung	- 119 -
9.6	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9.7	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	- 120 -

Abkürzungsverzeichnis

λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Extinktionswellenlänge
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
a.i.	<i>ad iniectabilia</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	AS-605240
BAD	<i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure (vom engl. <i>bicinchoninic acid</i>)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BPEI	verzweigtes (vom engl. <i>branched</i>) PEI
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches (vom engl. <i>cyclic</i>) AMP
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
cdc42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (vom engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase(n)	Desoxyribonuklease(n)
DP	Polymerisationsgrad (vom engl. <i>degree of polymerization</i>)
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Ethidiumbromid
ED	Ethylenoxid + Dimethylamin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (vom engl. <i>epidermal growth factor</i>)
EI	Ethylenoxid + Imidazol
ELS	elektrophoretische Lichtstreuung
EN	Ethylenoxid + Amin

FFR	schnelle Umkehr des elektrischen Feldes (vom engl. <i>Fast Field Reversal</i>)
FKS	fötale Kälberserum
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FOXO	<i>forkhead-box-protein O</i>
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR(s)	G-Protein-gekoppelter Rezeptor(en)
grad	gradient
GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GTPase(n)	Guanosintriphosphatase(n)
h	Stunde(n)
HBG	HEPES- <i>buffered glucose</i>
HBS	HEPES- <i>buffered saline</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HBV	Hepatitis B-Virus/Viren
HCC(s)	Leberzellkarzinom(e) (vom engl. <i>hepatocellular carcinoma</i>)
HCV	Hepatitis C-Virus/Viren
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor (vom engl. <i>hepatocyte growth factor</i>)
ICC	Immunzytochemie (vom engl. <i>immunocytochemistry</i>)
ICW	In-Cell Western™
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie (vom engl. <i>immunohistochemistry</i>)
IL	Interleukin
KD	<i>kinase-dead</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
l	Liter
LAMP1	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LPEI	lineares PEI
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	Molar (mol/l)
M _n	theoretische Molmasse

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute(n)
MIP	Maximum-Intensitätsprojektion
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC2	<i>mTOR complex 2</i>
Mrp2	<i>multidrug resistance-associated protein 2</i>
MP	<i>Molecular Probes</i> [®]
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
N/P	molares Verhältnis von Stickstoffen des Polymers zu Phosphaten der DNA
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettleber (vom engl. <i>nonalcoholic fatty liver disease</i>)
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NGS	Ziegen Serum (vom engl. <i>normal goat serum</i>)
NS5A	nicht-strukturelles Protein 5A
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
P(AGE)(s)	Polyallylglycidylether
p-AKT	Phosphorylierung von AKT
P(AmOx)(s)	Polyaminoxazolin(e)
PCI	<i>peritoneal contamination and infection</i>
PB	<i>Phosphate buffer</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDE3B	Phosphodiesterase 3B
PDI	Polydispersitätsindex
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
pDNA	Plasmid-DNA
PEI(s)	Polyethylenimin(e)
P(EO)(s)	Polyethylenoxid(e)
P(EtOx)(s)	Polyethyloxazolin(e)
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K(s)	Phosphoinositid-3-Kinase(n)
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	Proteinkinase B

P(MeOx)(s)	Polymethyloxazolin(e)
P(Ox)(s)	Polyoxazolin(e)
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
R	Rest
Rac	<i>Ras-related C3</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RFE	relative Fluoreszenzeinheit
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure (vom engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
RTK(s)	Rezeptor-Tyrosin-Kinase(n)
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (vom engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Ser	Serin
SFR	langsame Umkehr des elektrischen Feldes (vom engl. <i>Slow Field Reversal</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SHIP	<i>SH2-containing-phosphatases</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOC	SOB-Glukose
SREBP-1/2	<i>sterol regulatory element binding proteins 1/2</i>
stat	statistisch
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>Terrific broth</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	TBS-Tween
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	<i>tuberous sclerosis complex</i>
U	Aktivitätseinheit(en) (vom engl. <i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
v/v	Volumen pro Volumen (vom engl. <i>volume per volume</i>)

w/v	Gewicht pro Volumen (vom engl. <i>weight per volume</i>)
WB	Western Blot
WM	Wortmannin
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YT	<i>yeast extract tryptone</i>
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Gentherapien mit Hilfe von Polymeren rücken aufgrund der Möglichkeit der gezielten Genexpression in verschiedenen Organen wie der Leber immer mehr in den Fokus der Forschung. Neben vererbbaaren Krankheiten wie Hyperbilirubinämie und chronischen Infektionen wie Hepatitis C werden auch akute Erkrankungen der Leber als Ziel von Gentherapien diskutiert. Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-AKT-Signalweg stellt hierbei ein interessantes Ziel dar, da dieser nicht nur in physiologischen sondern auch in pathologischen Konditionen wie der nichtalkoholischen Fettleber (NAFLD) oder der septischen Cholestase wichtige Rollen übernimmt.

In dieser Arbeit wurden Copolymere funktionalisierter Polyoxazoline (P(Ox)) und Polyallylglycidylether (P(AGE)) auf ihre DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Interaktionen und Zytotoxizitäten hin untersucht. Dabei wurden zum einen Polymethyloxazoline (P(MeOx)), Polyethyloxazoline (P(EtOx)) oder Polyethylenoxide (P(EO)) genutzt, welche die Interaktionen mit Plasmaproteinen verringern und die Polymere vor Immunzellen verbergen (*Stealth*-Effekt) sollen. Zum anderen wurden Polyaminoxazoline (P(AmOx)) oder P(AGE)s mit variierendem Amingehalt bzw. unterschiedlichen Funktionalitäten verwendet, die vor allem für DNA-Interaktionen und die zelluläre Aufnahme relevant sind. Neben den unterschiedlichen Polymerklassen wurde auch die Polymeranordnung variiert (gradient, statistisch, block), um deren Einfluss zu untersuchen. Hierbei wurden für die P(Ox)-Polymere mit steigendem P(AmOx)-Anteil stärkere Interaktionen der Polymere mit DNA sowie höhere Toxizitäten gefunden. Die Verwendung von entweder P(MeOx) oder P(EtOx) als *Stealth*-Polymer zeigte dabei keinen Unterschied bei den DNA-Interaktionen und den Toxizitäten. Für P(AGE)-Polymere mit primären Aminen konnte dagegen nur für die Toxizität eine Abhängigkeit vom Anteil an primären Aminen beobachtet werden, während die DNA-Interaktionen unabhängig vom Anteil an primären Aminen ähnlich stark waren. Die Verwendung von NaCl-Lösung zur Polyplexherstellung ergab höhere Stabilitäten für Polyplexe mit gradienten und Blockcopolymeren im Vergleich zu statistischen Copolymeren, was vor allem für spätere klinische Applikationen relevant ist.

Die zelluläre Aufnahme von den verschiedenen Polyplexen, welche einen Komplex aus Polymeren und DNA darstellen, lag unabhängig vom Anteil an P(AmOx) oder P(AGE), funktionalisiert mit primären Aminen, über 70% im Kulturmedium ohne fötales Kälberserum (FKS) in der murinen Leberzelllinie Hepa1-6 und der murinen Fibroblastenzelllinie L929. Dagegen war im Kulturmedium mit FKS eine deutliche Reduktion der Polyplexaufnahme für die P(Ox)-Polymere im Vergleich zu der Polyplexaufnahme in Kulturmedium ohne FKS zu verzeichnen. Für Polyplexe mit P(AGE)-Polymeren konnten nur geringe Unterschiede in der

Aufnahmeeffizienz zwischen beiden Medien gefunden werden. P(AGE)-Polymere mit tertiären Aminen zeigten eine geringere Polyplexaufnahme im Vergleich zu P(AGE)-Polymeren mit gleichem Anteil an primären Aminen. Für P(Ox)-Polymere mit Carboxylgruppen oder P(AGE)-Polymere mit Imidazolen konnte dagegen keine Polyplexaufnahme detektiert werden.

Trotz vielversprechender Ergebnisse in den DNA-Interaktionen und Polyplexaufnahmen in den verschiedenen Zelllinien für eine Vielzahl der charakterisierten Polymere ergaben sich für keines der Polyplexe nennenswerte GFP (grün fluoreszierendes Protein)-Expressionen in Hepa1-6 oder L929 Zellen. Mikroskopische Untersuchungen zeigten für die P(Ox)-Polyplexe Hinweise auf eine Verhinderung der Freisetzung aus dem endolysosomalen Transportweg.

Um Polymere in der Gentherapie zu nutzen, sind Analysen der Inhibition des Zielproteins notwendig. Deshalb wurde im zweiten Teil dieser Arbeit zunächst untersucht, ob PI3K-Aktivitäten während einer akuten Lebererkrankung wie einer Sepsis gefunden werden können. Hierbei wurde die Phosphorylierung von AKT (p-AKT) als Maß der PI3K-Aktivität analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in Lipopolysaccharid (LPS)-injizierten als auch septischen Mäusen der PI3K-AKT-Signalweg aktiviert ist. Weiterhin wurde zum ersten Mal die PI3K in Hepatozyten immunhistochemisch nachgewiesen.

In darauffolgenden Schritten wurden verschiedene Methoden etabliert, die zur Untersuchung von PI3K-Aktivitäten in Hepa1-6 Zellen genutzt werden können. Dabei konnte gezeigt werden, dass die WB (Western Blot)-Methode im Vergleich zur ICC (Immunzytochemie)- und ICW (In-Cell Western™)-Methode bei der Aktivierung und Inhibition des PI3K-AKT-Signalweges in Hepa1-6 Zellen die höchste Sensitivität aufwies. Mit den Methoden ist es möglich, die Inhibition von PI3K-Aktivitäten durch das therapeutische Genmaterial mit Hilfe neu synthetisierter Polymere zu charakterisieren.

So wurden in dieser Arbeit die Grundlagen für neue Gentransfersysteme zur Behandlung von Lebererkrankungen basierend auf dem PI3K-AKT-Signalweg geschaffen. Die erhöhte Transfektionseffizienz von Polymeren bei gleichzeitiger geringer Toxizität stellt aber immer noch ein Hindernis dar, welches durch weitere Modifikationen der Polymere behoben werden muss.

2. Einleitung

2.1 Gentherapie

Zu Beginn der 1970er Jahre wurde zum ersten Mal die Möglichkeit diskutiert, Krankheiten, die auf den Ausfall oder der Veränderung von Genen basieren, mittels Gentherapie zu behandeln (Friedmann und Roblin 1972). Hierbei versteht man unter Gentherapie den Transfer von genetischem Material in spezifische Zellen eines Patienten zur Behandlung von Krankheiten (Mulligan 1993). Seither gab es einige vielversprechende Ansätze zur Umsetzung dieser Idee. Eine Vielzahl an klinischen Studien zur Therapie von vererbaren Krankheiten, Krebs oder chronischen Infektionen wurde innerhalb der letzten 20 Jahre durchgeführt. Jedoch zeigten nur einige von ihnen einen klaren Nutzen und es traten bei den Patienten gelegentlich Nebenwirkungen wie unkontrollierte Immunantworten auf das Gentransfersystem auf (Naldini 2015). Der Tod eines Patienten durch solch eine überschießende Immunantwort während einer der ersten klinischen Studien zur gentherapeutischen Behandlung des Ornithin-Transcarbamylase-Mangels (Raper et al. 2003) führte zu einer großen Skepsis in der Bevölkerung (Brunetti-Pierri 2008). Deshalb ist es notwendig, Gentransfersysteme so zu gestalten, dass das therapeutische Genmaterial (z.B. DNA, *small interfering* (si) Ribonukleinsäure (RNA, vom engl. *ribonucleic acid*), *small hairpin* (sh)RNA) effizient zu den Zielzellen transportiert wird und dabei die Nebenwirkungen auf ein Minimum beschränkt sind (Brunetti-Pierri 2008).

2.1.1 Gentherapeutische Methoden

Gentherapien können auf zwei Ebenen durchgeführt werden: Auf Ebene der Keimbahn und auf der somatischen Ebene (Nayerossadat et al. 2012). Obwohl die Keimbahntherapie großes Potenzial besitzt, vor allem schwerwiegende vererbare Krankheiten zu behandeln, ist der Eingriff in die Keimbahn ethisch umstritten und die Durchführung daher u.a. in Deutschland verboten (Resnik und Langer 2001, McDonough 1997, Grosshans 2000). Auf somatischer Ebene wurde dagegen in den letzten Jahren eine beachtliche Anzahl an Fortschritten erzielt, die nicht nur die Therapie von vererbaren Krankheiten betreffen (Ginn et al. 2013). In der somatischen Gentherapie können drei Arten unterschieden werden. Bei der *ex vivo*-Methode werden Zellen des Zielgewebes entnommen, *in vitro* kultiviert, genetisch manipuliert und anschließend wieder in das Zielgewebe eingebracht. Aufgrund der Verwendung eigener Zellen kommt es zu keinen immunologischen Reaktionen, jedoch ist nur eine geringe Anzahl der reimplantierten Zellen lebensfähig (Herrero et al. 2012). Die *in situ*-Methode beruht auf der Injektion des therapeutischen Genmaterials direkt ins

Zielgewebe. Sie wird vor allem bei Krebstherapien angewandt, ist aber aufgrund geringer Transfektionseffizienzen nur beschränkt nutzbar (Sato et al. 2005). Die Nutzung von Gentransfersystemen für den Transport und die Aufnahme des therapeutischen Genmaterials in eine Zielzelle wird als *in vivo*-Methode bezeichnet. Sie ist die bisher am wenigsten untersuchte Methode, verspricht aber großes Potenzial aufgrund der direkten Behandlung von verschiedenen Zielorganen im Patienten (Nayerossadat et al. 2012).

Allgemein kann man Gentransfersysteme nach Art der Übertragung von Nukleinsäuren in virale und nicht-virale Transfersysteme unterteilen (Abbildung (Abb.) 1) (El-Aneed 2004, Pannier und Shea 2004, Nayerossadat et al. 2012).

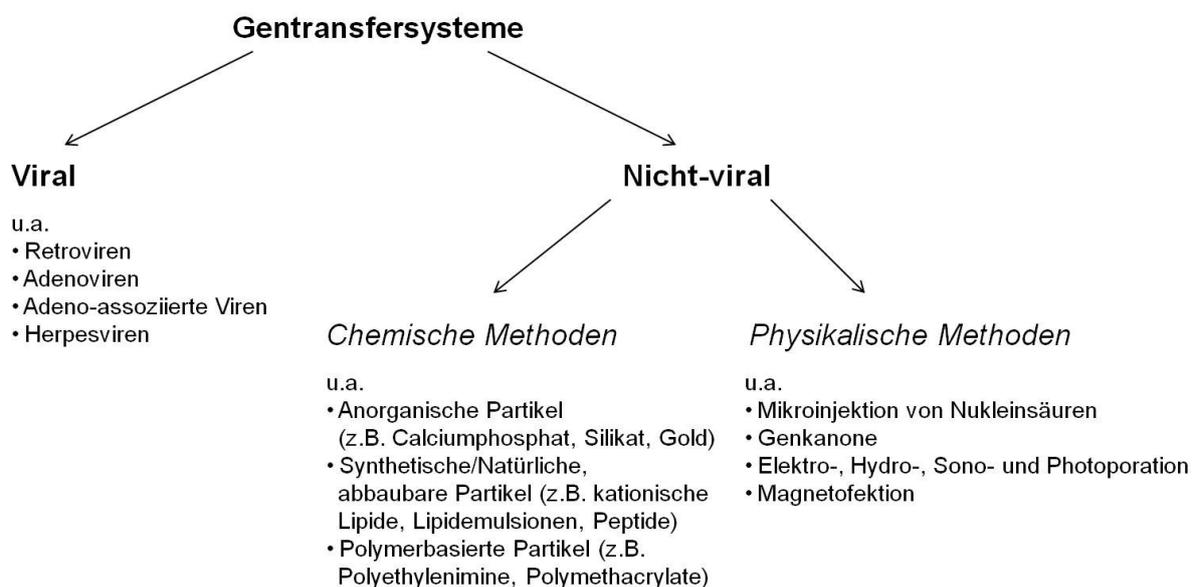


Abb. 1: Gentransfersysteme zur Nutzung in der Genterapie. Gentransfersysteme werden in virale und nicht-virale Transfersysteme unterteilt. Die am häufigsten verwendeten Viren sind Retro-, Adeno-, Adeno-assoziierte und Herpesviren. Nicht-virale Gentransfersysteme können nochmals in chemische und physikalische Methoden unterteilt werden. Zu den chemischen Methoden gehören anorganische Partikel wie Calciumphosphat, synthetische bzw. natürliche Partikel wie Lipide oder polymerbasierte Partikel wie Polyethylenimine (PEI). Bei den physikalischen Methoden werden zum Transfer des therapeutischen Genmaterials verschiedene Gerätschaften verwendet. So können Nukleinsäuren per Mikroinjektion, mittels Genkanone oder Magnetofektion in die Zellen gebracht werden.

Zurzeit werden virale Transfersysteme aufgrund ihrer höheren Transfektionseffizienzen (u.a. wurden für Adeno-assoziierte Viren Transfektionseffizienzen *in vitro* von >90% gezeigt (Stiehler et al. 2006)) in etwa 70% der klinischen Studien u.a. zu Therapien von Krebs oder monogenetischen Erkrankungen eingesetzt (Ginn et al. 2013). Die wichtigsten viralen Vektoren sind Retro-, Adeno-, Herpesviren und Adeno-assoziierte Viren (El-Aneed 2004). Je nach Therapieziel muss die Auswahl des viralen Transfersystems angepasst werden. Für über einen längeren Zeitraum zu exprimierende Genprodukte werden vor allem Retroviren

und Adeno-assoziierte Viren genutzt, die die DNA-Fragmente stabil in das Wirts-Genom integrieren (El-Aneed 2004). Dagegen kommen für transiente Transfektionen hauptsächlich Adeno- und Herpes-Viren zum Einsatz (El-Aneed 2004). Neben den Vorteilen von viralen Transfersystemen wie der hohen Transfektionseffizienz gibt es aber auch einige Nachteile. So besitzen sie zum Teil nur geringe DNA-Ladepkapazitäten (Brunetti-Pierri 2008) und einen geringen Zelltropismus (Thomas et al. 2003), rufen Immunreaktionen hervor (Brunetti-Pierri et al. 2004) oder sind kanzerogen durch den Einbau des therapeutischen Gens in kodierende Regionen des Genoms (Hacein-Bey-Abina et al. 2003, Check 2002).

Aufgrund dieser Nachteile wurde in den letzten Jahrzehnten die Erforschung nicht-viraler Transfersysteme intensiviert (Aied et al. 2013). Die Vorteile dieser Transfersysteme sind die kosteneffiziente Herstellung, das relativ hohe Sicherheitsprofil und die Möglichkeit, unterschiedliche Funktionalitäten an gleichbleibende Polymergrundstrukturen anzufügen, wodurch gezielte Genexpressionen in verschiedenen Geweben möglich sind (Foldvari et al. 2016, Zhang et al. 2007, Schatzlein 2001). Die größten Herausforderungen bei nicht-viralen Transfersystemen sind die zumeist geringen Transfektionseffizienzen und die daraus folgenden zu geringen Transgenexpressionen (Wang et al. 2013, Mintzer und Simanek 2009). Werden dagegen höhere Transfektionseffizienzen mit Polymeren erreicht, gehen diese häufig mit verstärkter Zytotoxizität einher (Fischer et al. 1999, Fischer et al. 2003). Daher liegt der Fokus der Forschung vor allem auf der Entwicklung nicht-viraler Transfersysteme mit hoher Transfektionseffizienz und geringer Zytotoxizität.

Nicht-virale Transfermethoden lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: Physikalische und chemische Methoden (Ramamoorth und Narvekar 2015). Eine große Anzahl an physikalischen Methoden wie z.B. die Mikroinjektion von Nukleinsäuren, die Genkanone, Elektro-, Hydro-, Sono- und Photoporation oder auch die Magnetofektion sind mittlerweile beschrieben (Kamimura et al. 2011, Mellott et al. 2013, Ramamoorth und Narvekar 2015). Aufgrund der eingeschränkten Anwendbarkeit dieser Methoden sind sie aber nur beschränkt für *in vivo*-Therapien geeignet.

Chemische Transfermethoden werden zurzeit in einigen klinischen Studien auf ihre Anwendbarkeit für die Gentherapie untersucht (Foldvari et al. 2016). Der Gentransfer kann hierbei durch anorganische Partikel (z.B. Calciumphosphat, Silikat, Gold), synthetische und natürliche, abbaubare Partikel (z.B. kationische Lipide, Lipidemulsionen, Peptide) oder polymerbasierte Partikel (z.B. PEI, Polymethacrylate) erfolgen (Ramamoorth und Narvekar 2015). Hierbei wurden für die Komplexierung von Nukleinsäuren mit Lipiden oder Polymeren die Begriffe Lipoplex bzw. Polyplex eingeführt (Felgner et al. 1997).

Zur Verwendung der verschiedenen Gentransfersysteme für mögliche Therapieziele benötigen diese Eigenschaften, die das genetische Material vor schneller Degradation *in vivo* schützen, mit der Zellmembran interagieren und mittels Endozytose oder direkter Freisetzung durch Verschmelzung mit der Zellmembran das Genmaterial in die Zielzelle bringen (Midoux et al. 2008, Mees et al. 2016). Ist das Genmaterial in die Zelle gelangt, gibt es je nach Gentransfersystem weitere Hürden, die überwunden werden müssen, wie die Freisetzung aus dem endosomalen Transportweg, den Transport durch das Zytosol und im Falle von DNA oder shRNA den Eintritt in den Zellkern (Luo und Saltzman 2000, Pack et al. 2005, Aied et al. 2013).

2.1.2 Polymerbasierte Transfektionsmethoden

Neben der Möglichkeit, polymerbasierte Nanopartikel zur Verkapselung von Medikamenten zu nutzen, stellt die Komplexierung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Polymeren für die Nutzung in der Gentherapie ein interessantes Forschungsgebiet dar (Jin et al. 2014). Ein großer Vorteil von Polymeren ist die Herstellung der Polymere mit definierten physikalischen und chemischen Eigenschaften. Diese werden durch Polymeranordnung, -architektur und -funktionalitäten bestimmt (Rinkenauer et al. 2015a).

Polymere können als Homopolymere oder Copolymere zusammengesetzt sein, wobei Copolymere aufgrund der Verteilung der einzelnen Polymereinheiten nochmals in Blockpolymere, statistische, periodische oder gradiente Copolymere unterteilt werden können (Abb. 2A). Als Strukturen treten Polymere linear, verzweigt, aufgepfropft oder sternförmig auf (Abb. 2B). Aufgrund von nicht-kovalenten Interaktionen sind Polymere zudem in der Lage, sich in höher geordnete Strukturen (Topologie) wie Vesikel oder sphärische und wurmartige Mizellen zusammenzulagern (Abb. 2C) (Rinkenauer et al. 2015a).

Kationische Polymere wie PEI, Polyamide (z.B. Poly(L-Lysine)) (De Smedt et al. 2000) und Polymethacrylate (z.B. Poly(2-(Dimethylamino)-Ethylmethacrylate) (Favretto et al. 2015) finden in Transfektionsexperimenten *in vitro* verstärkten Einsatz, wobei PEI aufgrund der hohen Transfektionseffizienz in verschiedenen Zelllinien und der kommerziellen Verfügbarkeit als „Goldstandard“ angesehen werden kann (Boussif et al. 1995). Sowohl lineares (LPEI) als auch verzweigtes (BPEI) PEI zeigen jedoch toxische Effekte und geringe Transfektionseffizienzen *in vivo* (Fischer et al. 1999, Fischer et al. 2003). Die Entwicklung neuer Polymerklassen oder Modifikationen in bisherigen Polymerklassen könnten Lösungsansätze darstellen, um Polymere auch *in vivo* einsetzen zu können.

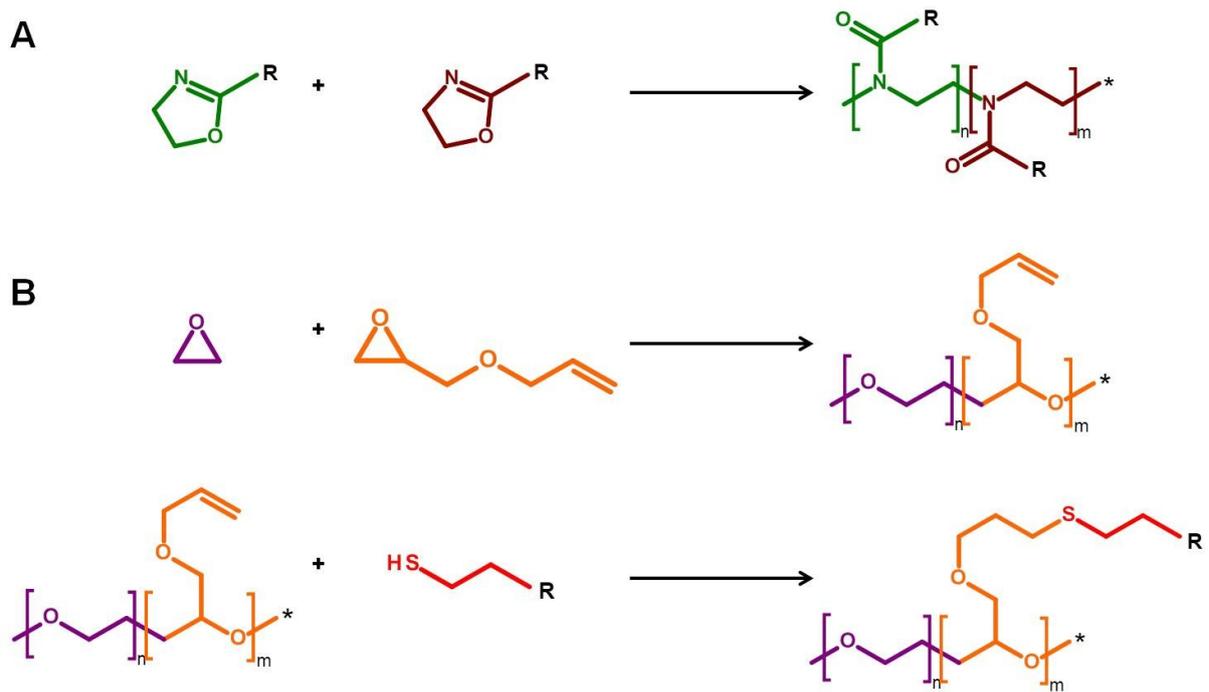


Abb. 3: Darstellung der Synthese von Copolymeren aus P(Ox)s oder P(EO) und P(AGE). Zur Herstellung von Copolymeren A) aus P(Ox)s oder B) P(EO) (violett) und P(AGE) (orange) kann die Ringöffnungspolymerisation verwendet werden, die heutzutage häufig mittels Mikrowellentechnik durchgeführt wird. Hierbei ist es möglich, Seitengruppen (R = Rest) A) direkt durch geeignete Polymermonomere oder B) erst nach der Polymerisation u.a. durch Thiol-En-Klickreaktionen einzuführen (zweiter Teilschritt).

Häufig genutzte P(Ox)s sind P(MeOx) und P(EtOx), da diese mit verschiedenen Polymerkettenlängen keine toxischen oder hämolytischen Effekte zeigen. Weiterhin besitzen diese Polymere ähnlich wie P(EO) Eigenschaften (hydrophil, nichtionisch), die die Interaktionen der Polymere mit Immunzellen vermindern, was in der Literatur als Tarnkappen- oder *Stealth*-Effekt beschrieben ist (Bauer et al. 2012, Bauer et al. 2013). Jedoch zeigen P(MeOx) und P(EtOx) aufgrund fehlender funktioneller Gruppen, die mit Nukleinsäuren interagieren können, keine Transfektionseffizienzen, weswegen es notwendig ist, funktionelle Gruppen wie z.B. Amine (Rinkenauer et al. 2015a) oder Imidazole (Midoux et al. 2009) einzuführen. Durch die Möglichkeit der Modifikation der 2-Oxazoline in der 2-Position konnten vielfältige P(Ox)-Polymere synthetisiert werden (Wilson et al. 2017, Glassner et al. 2018). So können u.a. Carbonsäuren (Bouten et al. 2015), Aldehyde (Taubmann et al. 2005, Legros et al. 2015) oder auch Amingruppen als mögliche Seitengruppe verwendet werden (Cesana et al. 2006, He et al. 2015). Rinkenauer et al. (Rinkenauer et al. 2015b) konnten durch Nutzung eines Bibliotheksansatzes von Amin-funktionalisierten P(Ox)s vor allem in Bezug auf die Biokompatibilität Vorteile gegenüber LPEI aufzeigen. Hierbei wurden Copolymere genutzt, die neben den Amin-funktionalisierten P(Ox)s auch P(MeOx) enthielten, die zur erhöhten Biokompatibilität beitrugen (Rinkenauer et al. 2015b). Die Verwendung von Triblocksystemen bietet zudem die Möglichkeit, weitere

Funktionalitäten einzubauen (Bus et al. 2017). So können Antikörper, Kohlenhydrate, Proteine oder andere kleine Moleküle genutzt werden, um eine selektive Aufnahme in Zielzellen zu ermöglichen (Hill et al. 2016). Zur Einführung funktioneller Gruppen in P(Ox)s als auch in andere Polymerklassen werden u.a. Doppelbindungen für Thiol-En-Klickreaktionen genutzt (Abb. 3B, zweiter Teilschritt). Hierbei reagieren Thiole mit Alkenen unter Bildung von Alkylsulfiden (Hoyle und Bowman 2010).

Eine weitere vielversprechende Polymerklasse stellen die Glycidylether wie P(AGE)s dar, da diese in der Seitenkette eine Allylgruppe besitzen, die zur Herstellung funktioneller Polymere genutzt werden kann (Abb. 3B) (Lee et al. 2011). Ähnlich den P(Ox)s können P(AGE)-Polymere mittels Ringöffnungspolymerisation synthetisiert werden, wobei hier ein anionischer Initiator (z.B. Alkoholate, Carboxylate oder Thiolate (Nuyken und Pask 2013)) genutzt wird (Hruby et al. 2005). In ersten Untersuchungen charakterisierten Barthel et al. Mizellen basierend auf Triblockcopolymeren mit Amin-, Carboxyl- und Galactosyl-funktionalisiertem P(AGE)s auf ihre zelluläre Aufnahmeeffizienzen und Zytotoxizitäten (Barthel et al. 2014). Dabei konnte gezeigt werden, dass Mizellen mit kationischen Ladungen (Amin-funktionalisiertes P(AGE)) eine deutlich höhere Toxizität, aber auch bessere Aufnahmen in Zellen in Kulturmedium ohne Serum zeigen im Vergleich zu Mizellen mit anionischen (Carboxyl-funktionalisiertes P(AGE)) oder neutralen Ladungen (Galactosyl-funktionalisiertes P(AGE)). Die Zugabe von Serum, was die physiologische Umgebung in der Blutbahn besser widerspiegelt, führte zu einer starken Reduktion der zellulären Aufnahmen von Mizellen mit kationischen Ladungen, während für die Mizellen mit anionischer oder neutraler Ladung keine signifikanten Reduktionen gefunden werden konnten (Barthel et al. 2014). Für DNA-Interaktionen und damit zur möglichen Nutzung in der Gentherapie sind jedoch noch keine näheren Untersuchungen für solche Copolymere beschrieben.

Für Gentherapieansätze stellt die Leber schon seit langem ein mögliches Zielorgan dar (Mingozzi und High 2011). Neben der Therapie von vererbaren Lebererkrankungen wie Hyperbilirubinämie sind auch Therapien von erworbenen Erkrankungen wie maligne Neoplasie, Hepatitis B und C oder Leberzirrhose im Fokus der Untersuchungen (Aravalli et al. 2015, Schmitz et al. 2002). Bei verschiedensten Erkrankungen der Leber wie der NAFLD (Matsuda et al. 2013), Leberzellkarzinomen (HCC, vom engl. *hepatocellular carcinoma*) (Chen et al. 2009) oder Hepatitis B und C (Street et al. 2004, Kim et al. 2007) spielt der PI3K-AKT-*mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Signalweg als zentraler Mediator von anabolen Proliferationsprozessen eine entscheidende Rolle (Vanhaesebroeck et al. 2012). Deswegen stellen PI3Ks als Zielproteine eine vielversprechende Möglichkeit für gentherapeutische Anwendungen dar.

2.2 Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks)

PI3Ks gehören zu einer Familie evolutionär konservierter Enzyme, welche die Phosphorylierung der 3'-OH-Position des Inositolringes verschiedener Phosphatidylinositol-Lipide katalysieren (Vanhaesebroeck et al. 2001). Mitte der 1980er Jahre zum ersten Mal beschrieben (Whitman et al. 1985), regulieren sie zelluläre Prozesse wie Wachstum (Weinkove et al. 1999), Zellteilung (Alvarez et al. 2003) und Apoptose (Kulik et al. 1997), spielen aber auch eine wichtige Rolle bei metabolischen (Alessi und Downes 1998, Hay und Sonenberg 2004, Cantley 2002) und immunologischen (Hirsch et al. 2000) Vorgängen. Man unterteilt PI3Ks nach ihrer Struktur, Substratspezifität und Regulation in drei Klassen (Vanhaesebroeck et al. 1997, Kriplani et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde sich hierbei auf PI3Ks der Klasse I konzentriert.

2.2.1 PI3Ks der Klasse I

PI3Ks der Klasse I treten vorwiegend als heterodimere Enzyme auf, welche aus einer etwa 110 Kilodalton (kDa) großen katalytischen (p110) und einer 50-101 kDa großen regulatorischen Untereinheit aufgebaut sind. Die regulatorischen Untereinheiten dienen hierbei zur Rekrutierung der katalytischen Untereinheiten an aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Abb. 4) (Vanhaesebroeck et al. 2001). Alle PI3Ks der Klasse I wandeln bevorzugt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) um. Dieses interagiert mit einer Vielzahl von Signalproteinen über deren Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne (Vanhaesebroeck et al. 2012). So bringt es die Serin-Threonin-Kinasen *Phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) und Proteinkinase B (PKB; auch bekannt als AKT) in räumliche Nähe, wodurch AKT je nach Isoform am Aminosäurerest Threonin (Thr)-308 (AKT1), Thr-309 (AKT2) oder Thr-305 (AKT3) phosphoryliert wird (Alessi et al. 1996, Hanada et al. 2004). Für seine volle Aktivität muss AKT weiterhin am Aminosäurerest Serin (Ser)-473 (AKT1), Ser-474 (AKT2) bzw. Ser-472 (AKT3) durch den mTOR *complex 2* (mTORC2) phosphoryliert werden (Sarbasov et al. 2005). Die AKT-Isoformen sind zwischen Maus, Ratte und Mensch evolutionär konserviert und stimmen in über 95% der Aminosäuresequenzen überein, so dass auch die Phosphorylierungsstellen in allen drei Spezies identisch sind (Hanada et al. 2004). Durch Phosphorylierungen von verschiedenen Proteinen reguliert das aktive AKT anschließend wichtige intrazelluläre Signalkaskaden wie die Proteinsynthese durch *tuberous sclerosis complex* (TSC), den Glukosemetabolismus durch *glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK3 β) oder auch die Zellvitalität durch *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2)-*antagonist of cell death* (BAD) und *forkhead-box-protein O* (FOXO) (Cantley 2002, Vanhaesebroeck et al. 2012).

Andererseits werden diese Signalwege durch den Abbau von PIP₃ durch Lipophosphatasen gegenreguliert. Dabei sind vor allem die Phosphatasen *Src-homology 2 (SH2)-containing-phosphatases* (SHIP) und *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) wichtige Regulatoren, die PIP₃ dephosphorylieren (Cantley 2002, Kriplani et al. 2015).

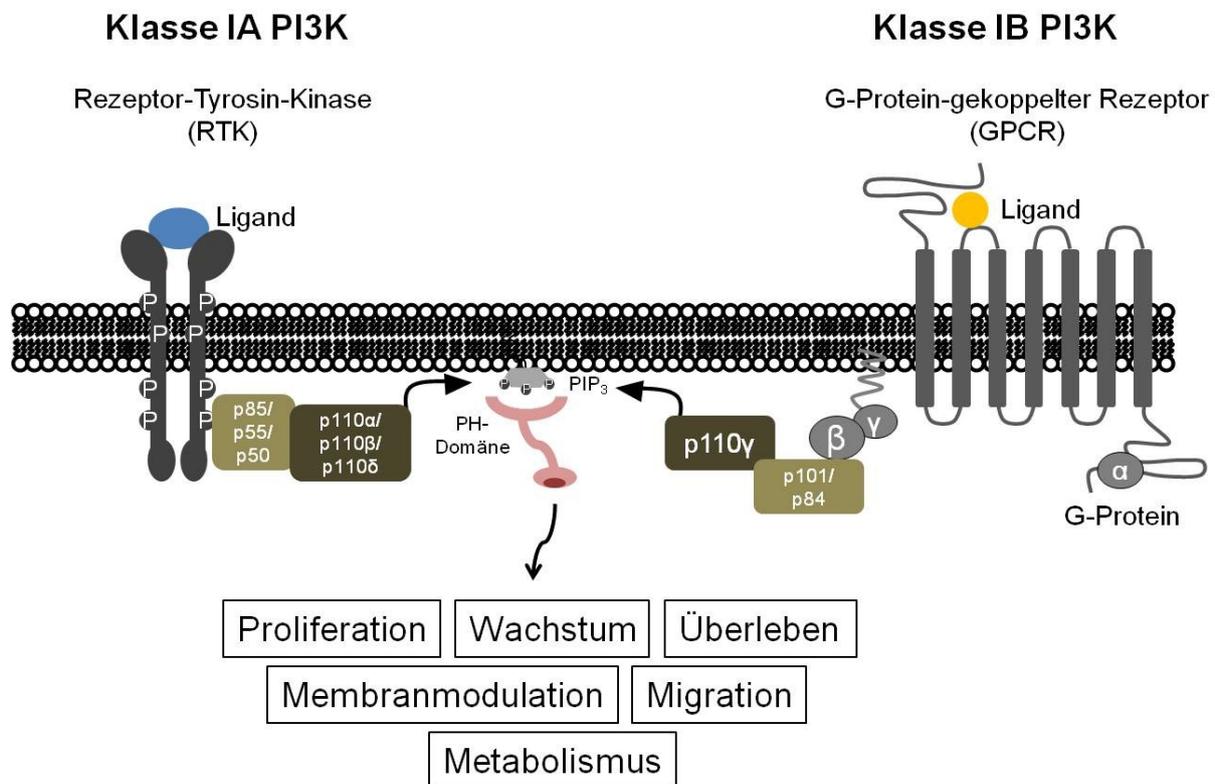


Abb. 4: PI3Ks Klasse I-Signalwege und deren nachfolgende Funktionen. PI3Ks der Klasse I werden in die Unterklassen IA und IB unterteilt. Zur Klasse IA zählen die PI3K α , PI3K β und PI3K δ , die aus den regulatorischen Untereinheiten p85, p55 oder p50 und den katalytischen Untereinheiten p110 α , p110 β und p110 δ aufgebaut sind und hauptsächlich über RTKs aktiviert werden. In die Klasse IB gehört einzig die PI3K γ , die aus der regulatorischen Untereinheit p101 oder p84 und der katalytischen Untereinheit p110 γ aufgebaut ist und hauptsächlich über GPCRs aktiviert wird. Durch die jeweilige Aktivierung der beiden Unterklassen kommt es zur Bildung von PIP₃, wodurch Proteine mit PH-Domäne an PIP₃ binden können und so eine Vielzahl zellulärer Funktionen regulieren. Modifiziert nach (Vanhaesebroeck et al. 2010).

PI3Ks der Klasse I werden aufgrund unterschiedlicher Aktivierungsmechanismen und der Bindung an die regulatorische Untereinheit (p85, p55, p50, p101, p84) in die Unterklassen IA und IB unterteilt (Vanhaesebroeck et al. 2010). Zur Unterklasse IA werden die PI3K α , PI3K β und PI3K δ gezählt, welche hauptsächlich durch RTKs aktiviert werden. Dies geschieht durch SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheiten (p85, p55 oder p50), welche an spezifische phosphorylierte Tyrosinreste der RTKs binden und so die katalytischen Untereinheiten an die Plasmamembran rekrutieren (Cantley 2002). Dagegen wird der Unterklasse IB, die hauptsächlich durch GPCRs aktiviert wird, nur die PI3K γ zugeordnet (Stoyanov et al. 1995, Vanhaesebroeck et al. 1997). Durch die Aktivierung der GPCRs

mittels verschiedener Liganden kommt es zur Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in die G α - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die Bindung der regulatorischen Untereinheit (p101 oder p84) an die G $\beta\gamma$ -Untereinheit führt zur Rekrutierung der katalytischen Untereinheit p110 γ an den Rezeptor (Rommel et al. 2007). Die Trennung der PI3Ks in die beiden Unterklassen aufgrund der Aktivierungsmechanismen ist seit einigen Jahren jedoch überholt, da u.a. auch Aktivierungen von PI3K β durch GPCRs oder durch Guanosintriphosphatasen (GTPasen) wie *Ras-related C3 (Rac)* und *cell division control protein 42 homolog (cdc42)* sowie von PI3K α und PI3K γ durch die GTPase *rat sarcoma (Ras)* gezeigt werden konnten (Vanhaesebroeck et al. 2016).

Unterschiedliche Expressionsprofile in verschiedenen Organen sind für PI3Ks der Klasse I beschrieben, was zu den vielfältigen biologischen Funktionen beiträgt (Kok et al. 2009). So kommen PI3K α und PI3K β ubiquitär vor und sind vor allem in metabolische als auch Proliferations- und Überlebenssignalprozesse involviert (Knight et al. 2006, Zhao et al. 2006, Jia et al. 2008). Aufgrund dieser wichtigen Funktionen ist die genetische Inaktivierung von p110 α oder p110 β schon im Embryonenstadium letal (Bi et al. 1999, Bi et al. 2002). Dagegen sind Mäuse mit Deletionen der katalytischen Untereinheiten von PI3K γ und PI3K δ lebensfähig und zeigen augenscheinlich keine morphologischen Veränderungen (Hirsch et al. 2000, Camps et al. 2005). Da PI3K δ und PI3K γ vor allem in Immunzellen exprimiert werden, wurden die PI3K δ - und PI3K γ -KO-Mäuse zunächst vor allem bei entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis untersucht (Kok et al. 2009). So zeigte sich, dass die genetische Inaktivierung von p110 γ zu einer verminderten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsherd führte und mit einer geringeren Mobilität von dendritischen Zellen verbunden war (Hirsch et al. 2000). Für die p110 δ -Inaktivierung zeigte sich vor allem eine beeinträchtigte B- und T-Zellaktivierung (Camps et al. 2005). Zusätzlich zu ihrer Kinasefunktion besitzt die PI3K γ über Protein-Protein-Wechselwirkungen auch Gerüstfunktionen (Hirsch et al. 2009). So zeigten Patrucco et al., dass PI3K γ direkt mit der Phosphodiesterase 3B (PDE3B) interagiert und so die durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-induzierte Herzkontraktilität beeinflusst. Dies wurde u.a. mit Hilfe von PI3K γ -*kinasedead* (KD)-Mäusen nachgewiesen, die das Protein PI3K γ exprimieren, aber durch eine Mutation im aktiven Zentrum keine Kinasefunktionen mehr besitzt (Patrucco et al. 2004). Mit diesen Untersuchungen konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass PI3K γ nicht nur in Immunzellen vorkommt, sondern auch in anderen Geweben trotz geringer Expression eine wichtige Rolle spielt. In den letzten Jahren wurden neben dem Herzen weitere PI3K γ -Expressionen in anderen Geweben wie dem Fettgewebe, dem Gehirn oder der Leber detektiert (Becattini et al. 2011, Ghigo et al. 2012, Ruckle et al. 2006, Recknagel et al. 2012).

2.2.2 Die Rolle von PI3Ks der Klasse I bei Lebererkrankungen

Patienten mit Lebererkrankungen weisen eine deutlich erhöhte Mortalitätsrate auf (Blachier et al. 2013). Durch das hohe regenerative Potenzial der Leber führen akute Erkrankungen jedoch häufig nicht zum Leberversagen (Michalopoulos 2017). Während der Regeneration der Leber zeigt sich eine schnelle und deutliche Aktivierung von PI3Ks der Klasse I durch verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF, vom engl. *hepatocyte growth factor*), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, vom engl. *epidermal growth factor*)), Hormone (z.B. Insulin) und Cytokine (z.B. Interleukin (IL)-6), was zur Inhibition der Apoptose führt (Hong et al. 2000, Haga et al. 2009).

Neben dieser physiologischen Funktion des PI3K-Signalweges während der Leberregeneration kann eine zu starke oder zu geringe Aktivierung zu hepatischen Erkrankungen oder mit der Leber verknüpften Syndromen wie NAFLD oder Hepatitis B und C führen (Morales-Ruiz et al. 2017, Matsuda et al. 2013). So zeigt sich durch den Anstieg an Lipidakkumulationen in Hepatozyten eine Aktivierung von PI3K/AKT bei der NAFLD und der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH). Durch die Überaktivierung dieses Signalweges kommt es zu einem negativen Feedbackeffekt der PI3K-Aktivierung und einer Insulinresistenz, was schlussendlich zu einem höheren *Bcl-2-associated X protein* (Bax)/*Bcl-2*-Verhältnis führt und damit zur erhöhten Apoptose von Hepatozyten (Piro et al. 2008). PI3Ks (vor allem PI3K α und PI3K β) sind zentrale Mediatoren der metabolischen Funktionen von Insulin wie dem Glukosetransport oder der Glykogen- und Proteinsynthese (Virkamaki et al. 1999, Taniguchi et al. 2006). Eine gegenüber Kontrollpersonen verringerte Protein- und Genexpression verschiedener Moleküle im Insulin-Signalweg (u.a. AMP-aktivierte Proteinkinase und *Bcl-2*) konnte als Ursache von Leberschädigungen in NASH-Patienten nachgewiesen werden (Piro et al. 2008). Die genauen Mechanismen der verminderten Expressionen sind zurzeit aber noch Gegenstand intensiver Forschung. Veränderungen in der PI3K/AKT-Aktivität sind häufig auch in Tumoren wie dem HCC zu finden (Chen et al. 2009). So ist in 35% der HCCs die p110 α -Untereinheit mutiert, was zu einer Überaktivierung und folglich zu einer erhöhten Proliferation von Hepatozyten führt (Lee et al. 2005). Eine positive Korrelation der Expression von p110 γ und HCC konnte ebenfalls festgestellt werden (Dituri et al. 2012). Infektionen der Leber durch Hepatitis B (HBV)- und Hepatitis C-Viren (HCV) führen u.a. durch Bindung des nicht-strukturellen (NS) Proteins 5A an die regulatorische Untereinheit p85 zur Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges, wodurch die Apoptose in den infizierten Zellen verhindert wird (Street et al. 2004, Kim et al. 2007). Bei chronischen HCV-Infektionen kommt es zudem häufig zur Steatose (Fettleber) und Insulinresistenz durch erhöhten oxidativen Stress, wodurch es zur Aktivierung von PI3K/AKT und folgend zur Transaktivierung von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) γ

und *sterol regulatory element binding proteins* (SREBP)-1/2 kommt (Kim et al. 2007, Waris et al. 2007).

In den letzten Jahren konnte bei der Cholestase, die als eine Stauung von Gallenflüssigkeit durch einen verminderten oder fehlenden Abfluss definiert ist, ebenfalls eine Beteiligung des PI3K-AKT-Signalweges festgestellt werden (Anwer 2012). Hierbei führt die Aktivierung von PI3Ks der Klasse IA zu positiven Auswirkungen wie Cholereese (Erhöhung der Gallenflüssigkeitsausscheidung) und anti-apoptotischen Effekten, während die Aktivierung von PI3K γ zur Entwicklung der Cholestase und Apoptose von Zellen beiträgt (Anwer 2012, Rust et al. 2005). Untersuchungen von Recknagel et al. zeigten, dass PI3K γ -KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen während einer Sepsis, einer lebensbedrohlichen Organdysfunktion aufgrund einer inadäquaten Wirtsantwort auf eine Infektion (Singer et al. 2016), geringere Bilirubinkonzentrationen im Plasma besitzen (Recknagel et al. 2012). Hierbei beeinflusst PI3K γ nicht nur den Metabolismus und Transport von Endo- und Xenobiotika in Hepatozyten, sondern wird auch mit dem Verlust von hepatischen Mikrovilli in Verbindung gebracht (Recknagel et al. 2012). Vor allem die Zellmembranlokalisation des Transporters *multidrug resistance-associated protein 2* (Mrp2), welcher u.a. auf der kanalikulären Seite von Hepatozyten (Nies und Keppler 2007) für den Transport von lipophilen oder schwefelenthaltenden Endo- und Xenobiotika wie konjugiertes Bilirubin oder sulfatierte Steroide zuständig ist (Gu und Manautou 2010), scheint stark von dem PI3K γ -AKT-Signalweg abhängig zu sein (Recknagel et al. 2012, Suda et al. 2016). So konnte durch Inhibition der PI3K γ mit WM, einem nicht-selektiven Inhibitor für PI3Ks, und AS, einem selektiven PI3K γ -Inhibitor, eine Erhöhung der Mrp2-Dichte in der Zellmembran von HepG2-Zellen nach Cytokinmix-Stimulation gezeigt werden (Recknagel et al. 2012).

2.2.3 Möglichkeiten der Inhibition von PI3Ks der Klasse I

Um die physiologischen und pathophysiologischen Einflüsse der verschiedenen PI3Ks zu untersuchen und gegebenenfalls zu manipulieren, wurde in den letzten Jahrzehnten eine große Anzahl an unterschiedlichen Inhibitoren und RNA-Interferenz (RNAi)-Methoden entwickelt (Venable et al. 2010, Janku 2017). Bei den Inhibitoren kann man zwischen nicht-selektiven und selektiven Inhibitoren unterscheiden (Janku 2017). Einer der bekanntesten nicht-selektiven PI3K-Inhibitoren ist WM, ein natürlich vorkommender Metabolit verschiedener Pilze, welcher kovalent an alle PI3K-Isoformen der Klasse I mit annähernd gleicher Affinität bindet (Arcaro und Wymann 1993, Wymann et al. 1996, Shugg et al. 2013). Aufgrund der Inhibition aller PI3Ks zeigt WM in Tierversuchen schon bei niedriger Konzentration vor allem in der Leber toxische Effekte (Anstieg von Alanin- und

Aspartataminotransferasen im Blut, welche als Marker für eine Leberschädigung dienen) und kann daher bisher nicht als Therapeutikum genutzt werden (Wymann et al. 2003, Ihle et al. 2004). Selektive Inhibitoren bieten die Möglichkeit, bestimmte PI3K-Isoformen zu inhibieren, während die Funktionen von anderen PI3Ks nur gering oder gar nicht beeinflusst werden (Shuttleworth et al. 2011, Janku 2017). So wurden u.a. selektive Inhibitoren (AS-604850, AS oder AS-605091) im Zusammenhang von PI3K γ und entzündungsgetriebenen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis untersucht (Camps et al. 2005). Da PI3K γ eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten zum Entzündungsherd als auch bei der Degranulation von Mastzellen spielt, könnten solche selektiven Inhibitoren zur Behandlung genutzt werden (Camps et al. 2005).

Neben den verschiedenen Inhibitoren sind RNAi-Techniken eine weitere Alternative für mögliche Therapieansätze (Janku 2017). Diese Techniken sind vor allem dann relevant, wenn man die isoformspezifischen Proteinexpressionen reduzieren will. So beeinflussen PI3K-Inhibitoren einzig die Kinase-abhängigen Funktionen. Aufgrund Kinase-unabhängiger Funktionen bei PI3K γ ist es aber gegebenenfalls nötig, die Expression generell zu vermindern, um alle Funktionen zu adressieren. Eine Vielzahl an potentiellen RNAi-Sequenzen ist für die unterschiedlichen PI3K-Untereinheiten beschrieben (Smith et al. 2007, Zhang et al. 2004, An et al. 2007). Hierbei zeigten Smith et al., dass mittels Elektroporation von siRNA gegen PI3K γ in isolierten T-Lymphozyten eine Reduktion der PI3K γ -*messenger* (m)RNA-Level um etwa 60% möglich ist (Smith et al. 2007). Ähnliche Verminderungen der mRNA-Level um 60% erhielten An et al. nach Transfektion von siRNA gegen PI3K β mit Lipofectamin[®] 2000 (An et al. 2007). Zhang et al. nutzten zunächst *in silico*-Untersuchungen, um humane PI3K α -RNAi-Zielsequenzen zu identifizieren. Mit der ausgewählten siRNA-Sequenz konnte in anschließenden Experimenten die relative mRNA-Expression von humaner PI3K α nach Transfektion mit FuGENE[®] 6 *Transfection Reagent*, einem kommerziellen nichtliposomalen Transfektionsreagenz (Nagy und Watzele 2006), um etwa 80% reduziert werden, während humane PI3K β und murine PI3K α nicht beeinflusst wurden (Zhang et al. 2004). So konnte gezeigt werden, dass es mit unterschiedlichsten Gentransfersystemen möglich ist, die Isoformen der PI3Ks der Klasse I mit Hilfe von RNAi-Techniken höchst effizient zu inhibieren.

3. Fragestellung der Arbeit

Eine Vielzahl an polymeren Gentransfersystemen wurde in den letzten Jahren untersucht und einige werden mittlerweile kommerziell produziert und vermarktet. Jedoch sind aufgrund von zytotoxischen Effekten und geringen Transfektionseffizienzen *in vivo* noch keine Polymere für die Nutzung in der Gentherapie zugelassen. Die Leber stellt ein potentielles Zielorgan für Gentherapien dar. PI3Ks der Klasse I sind sowohl in physiologischen Funktionen als auch pathophysiologischen Aspekten der Leber involviert. So kommt es durch entzündliche Prozesse wie bei einer Sepsis zu einem Expressionsanstieg von PI3K γ in der Leber und zu verschiedenen pathophysiologischen Ereignissen (u.a. Verlust von hepatischen Mikrovilli, verringerte Zellmembranlokalisation des Transporters Mrp2). Um PI3K-Isoformen in der Leber mit polymerbasierten Gentransfersystemen selektiv zu inhibieren, ist es notwendig, neue Polymerklassen und Polymere mit funktioneller Struktur für gentherapeutische Anwendungen herzustellen und zu charakterisieren. P(Ox)s und P(AGE)s stellen hierbei interessante Polymerklassen dar, da sie einfach und effizient hergestellt und modifiziert werden können. Durch die Nutzung von Copolymeren ist es zudem möglich, verschiedene Eigenschaften zu kombinieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher DNA-Interaktionen von Copolymeren, bestehend aus P(MeOx), P(EtOx) oder P(EO) als *Stealth*-Polymer und P(Ox)s oder P(AGE)s mit variierendem Amingehalt bzw. unterschiedlichen Seitengruppen, analysiert werden. Von den vielversprechendsten Polymeren sollten im Anschluss die zytotoxische Wirkung und die Möglichkeit der gentherapeutischen Nutzung im Zellsystem untersucht werden. Dabei wurde sich auf Leberzellen konzentriert, da diese als Modellzellsystem in späteren Untersuchungen für PI3K-*knockdown*-Experimente genutzt werden sollten. Mit diesen Untersuchungen können Schlussfolgerungen über die Einflüsse von Polymeranordnung und -funktionalitäten auf die DNA-Interaktionen, Zytotoxizitäten sowie die zellulären Interaktionen der Polyplexe gezogen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung von PI3K-Aktivitäten bei entzündlichen und septischen Konditionen in der Mausleber. Dabei sollte analysiert werden, ob PI3K γ in Hepatozyten vorkommt und somit zur septischen Cholestase beitragen kann. Für spätere polymerbasierende PI3K-*knockdown*-Experimente sollte in darauffolgenden Schritten in einer immortalisierten Leberzelllinie RTK- und GPCR-abhängige PI3K-Aktivitäten untersucht werden. Dazu sollten verschiedene Methoden (WB, ICC, ICW) etabliert werden, die die Untersuchung der PI3K-Inhibition durch das therapeutische Genmaterial mit Hilfe der neu synthetisierten Polymere ermöglichen.

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Bakterienstamm

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA (pDNA) wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) vom Stamm XL10-Gold[®] (Agilent Technologies Inc.) mit dem Genotyp Tet^rΔ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r] verwendet.

4.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Die murine Hepatozyten-Zelllinie Hepa1-6 (CRL-1830TM, ATCC[®]) diente sowohl der Untersuchung des PI3K-AKT-Signalweges durch verschiedene Stimulanzen als auch zur Charakterisierung der neu synthetisierten Polymere. Als Vergleichszelllinie für die Polymercharakterisierung wurde die murine Fibroblasten-Zelllinie L929 (CCL-1TM; ATCC[®]) genutzt.

4.1.3 Mausstämme

Für den immunhistochemischen Nachweis der PI3K γ in Leberschnitten wurde als Wildtypstamm C57/BL6j (Charles River Laboratories, Inc.) und zusätzlich PI3K γ -KD- und PI3K γ -KO-Mäuse (Hirsch et al. 2000, Patrucco et al. 2004) verwendet.

4.1.4 Bakterien- und Zellkulturmedien sowie Zusätze

Bakterienkulturmedien

Hefeextrakt	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG
<i>Lysogeny Broth</i> (LB)-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG
<i>2x yeast extract tryptone</i> (YT) <i>Broth</i>	Gibco [®] Invitrogen GmbH

Zellkulturmedien und Zusätze

B-27 [®] <i>Serum-Free Supplement</i> (50x)	Gibco [®] Invitrogen GmbH
--	------------------------------------

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Gibco® Invitrogen GmbH bzw. Lonza Group AG
FKS	PAA Laboratories GmbH/GE Healthcare
GlutaMAX™ Supplement (100x)	Gibco® Invitrogen GmbH
<i>Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)</i> , no Calcium, no Magnesium, no Phenolred	Gibco® Invitrogen GmbH
L-Glutamin (100x)	Gibco® Invitrogen GmbH
Pferdeserum, hitzeinaktiviert	Gibco® Invitrogen GmbH
Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (10x), no Phenolred	Gibco® Invitrogen GmbH

Antibiotika

Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth® GmbH & Co. KG
Chloramphenicol	Carl Roth® GmbH & Co. KG
Penicillin-Streptomycin (100x)	Gibco® Invitrogen GmbH
Tetracyclin	Carl Roth® GmbH & Co. KG

4.1.5 Biochemikalien und Chemikalien

Proteinstandard für elektrophoretische Trennung

<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas GmbH
---	----------------

Proteine

Albumin Fraktion V (Bovines Serum Albumin (BSA))	Carl Roth® GmbH & Co. KG
Milchpulver	Carl Roth® GmbH & Co. KG

Kit-Systeme

Pierce™ Bicinchoninsäure (BCA, vom engl. <i>bicinchoninic acid</i>) Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
NucleoBond® Xtra Midi-Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Zellproliferationskit I (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT))	Sigma-Aldrich® Co. LLC

Chemikalien und Reagenzien

<i>Aqua ad iniectabilia</i> (a.i.)	B. Braun Melsungen AG
------------------------------------	-----------------------

AS	Selleck Chemicals
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH
C5a (mouse)	ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.
Chloroquin-Diphosphatsalz	Sigma-Aldrich® Co. LLC
4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Roche Diagnostics AG
Ethidiumbromid (EB)-Lösung (10 mg/ml)	Carl Roth® GmbH & Co. KG
Fluoromount-G®	SouthernBiotech
Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)	Sigma-Aldrich® Co. LLC
Heparin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich® Co. LLC
Hoechst 33342, Trihydrochlorid, Trihydrat	Thermo Fisher Scientific Inc.
Insulin, human rekombinant	Sigma-Aldrich® Co. LLC
LPS von <i>E. coli</i> O111:B4	Sigma-Aldrich® Co. LLC
LysoTracker™ Red DND-99	Thermo Fisher Scientific Inc.
Mowiol® 4-88	Calbiochem
Phalloidin Alexa Fluor™ 568	Thermo Fisher Scientific Inc.
Protease Inhibitor Cocktail (PIC) <i>complete</i>	Roche Applied Science
PhosSTOP™	Roche Applied Science
Salbutamol	Sigma-Aldrich® Co. LLC
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich® Co. LLC
TurboFect™ <i>in vitro Transfection Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
YOYO™-1-Iodid (1 M)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ziegenserum (NGS, vom engl. <i>normal goat serum</i>)	Gibco® Invitrogen GmbH
WM	Selleck Chemicals

Als weiteres Transfektionsreagenz wurde LPEI verwendet, welches von Christoph Englert und Anne-Kristin Trützscher (Institut für Organische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) synthetisiert wurde.

Alle weiteren Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von den Firmen Sigma-Aldrich® Co. LLC, Carl Roth® GmbH & Co. KG, Merck KGaA und SERVA *Electrophoresis* GmbH bezogen.

Wässrige Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) aus der Milli-Q® Gradient-Reinstwasseranlage (Millipore) angesetzt.

4.1.6 Puffer und Lösungen

Blocklösung	2% (w/v) BSA; 10% (v/v) Pferdeserum in <i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS); pH 7,4
Bromphenolblau	2% (w/v) Bromphenolblau in 10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-HCl _(aq) (pH 8,0)
BSA-Lösung	5% (w/v) BSA in <i>Tris-buffered saline</i> (TBS)-Tween (TBST); pH 7,5
Hepa1-6 Kulturmedium	DMEM; 10% (v/v) FKS (hitzeinaktiviert); 1000 µg/ml Penicillin-Streptomycin
HEPES- <i>buffered glucose</i> (HBG)	20 mM [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES); 5% (w/v) Glukose; pH 7,2
Histologie-Blocklösung	5% (v/v) NGS; 0,25% (v/v) Triton [®] X-100 in 0,1 M <i>Phosphate buffer</i> (PB)
L929 Kulturmedium	DMEM; 10% (v/v) FKS (hitzeinaktiviert); 2 mM Glutamin; 1000 µg/ml Penicillin-Streptomycin
Mowiol	10% (w/v) Mowiol [®] 4-88; 25% (w/v) Glycerol; 100 mM Tris-HCl _(aq) (pH 8,5)
Phenolrot	Phenolrot gesättigt in 40 mM Tris-HCl _(aq) (pH 8,0)
PB (0,1 M)	77,4 mM Na ₂ HPO ₄ ; 22,6 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PBS	2,68 mM KCl; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; 136,9 mM NaCl; 7,98 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; pH 7,5
25x PIC	1 Tablette PIC in 2 ml ddH ₂ O
Quenchpuffer	25 mM Glycin in PBS; pH 7,4
<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> (RIPA)-Puffer	50 mM Tris-HCl _(aq) (pH 8,0); 150 mM NaCl; 1% (v/v) NP40 (IGEPAL); 0,5% (v/v) Natriumdeoxychololat; 0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS, vom engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>); 1x PIC; 1x PhosSTOP [™]
4x Sammelgelpuffer	0,4% (w/v) SDS; 0,5 M Tris-HCl _(aq) (pH 6,8)
4x SDS-Probenpuffer	4% (w/v) SDS; 40% (v/v) Glycerol; 250 mM Tris-HCl _(aq) (pH 6,8); 20% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,004% (w/v) Bromphenolblau
<i>Super optimal broth</i> (SOB)-Medium	2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 2,5 mM KCl
SOB-Glukose (SOC)-Medium	20 mM Glukose in SOB-Medium
Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,02% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol

<i>Terrific broth</i> (TB)-Medium	1,2% (w/v) Trypton/Pepton; 2,4% (w/v) Hefeextrakt; 0,4% (v/v) Glycerol; 1,7 M KH ₂ PO ₄ ; 7,2 M K ₂ HPO ₄
4x Trenngelpuffer	0,4% (w/v) SDS; 1,5 M Tris-HCl _(aq) (pH 8,8)
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE)- Puffer	2 M Tris; 5,71% (v/v) Eisessig; 0,05 M EDTA; pH 8,5
TBS	50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,5
TBST	0,1% (v/v) Tween [®] 20 in TBS; pH 7,5
10x Tris-Glycin-Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
1x Trypsin-EDTA	0,05% Trypsin-EDTA in HBSS
WB-Antikörper-Lösung	5% (w/v) BSA; 0,025% (w/v) NaN ₃ in TBST

4.1.7 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 1 aufgelistet. Aufgrund der Verwendung in verschiedenen Methoden sind die zugehörigen Verdünnungen der Antikörper separat angegeben. Die sekundären Antikörper wurden für die Immunhistochemie (IHC) 1:1000, für WB-Analysen 1:10000 und für die ICC sowie den ICW 1:800 verdünnt (Tabelle 2).

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper. CD31 (*Cluster of differentiation 31*); GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase)

Spezifität	Spezies	IHC	ICC/ICW	WB	Firma
anti-Albumin (ab106582)	Huhn	1:200	-	-	Abcam [®] plc
anti-CD31 (ab28364)	Kaninchen	1:50	-	-	Abcam [®] plc
anti-PI3Kγ (ABD-026)	Maus	1:1000	-	-	Jena Bioscience GmbH
anti-AKT (40D4)	Maus	-	1:400	1:1000	Cell Signaling Technology [®]
anti-p-AKT (D9E)	Kaninchen	-	1:400	1:1000	Cell Signaling Technology [®]
anti-GAPDH (L-18)	Ziege	-	-	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.

Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper. Immunglobulin G (IgG); MP (*Molecular Probes*[®])

Spezifität	Spezies	Verwendung	Firma
Alexa Fluor [®] 488 anti-Huhn-IgG	Esel	IHC	MP Invitrogen GmbH
Alexa Fluor [®] 488 anti-Kaninchen-IgG	Esel	IHC/ICC	MP Invitrogen GmbH
Alexa Fluor [®] 488 anti-Maus-IgG	Esel	IHC	MP Invitrogen GmbH
Alexa Fluor [®] 568 anti-Maus-IgG	Esel	IHC/ICC	MP Invitrogen GmbH
Alexa Fluor [®] 680 anti-Maus-IgG	Ziege	ICW/WB	Thermo Fisher Scientific Inc.
Alexa Fluor [®] 680 anti-Ziege-IgG	Esel	WB	Thermo Fisher Scientific Inc.
DyLight [™] 800 anti-Kaninchen-IgG	Ziege	ICW/WB	Thermo Fisher Scientific Inc.

4.1.8 Plasmid

In dieser Arbeit wurde der Plasmidvektor pRNAT H1.1 von der Firma GenScript USA Inc. verwendet. Für die GFP-Expressionsexperimente in Hepa1-6 und L929 Zellen kam das DNA-Konstrukt *scrambled* RNAi (Laborcode FRA1) (Nolze et al. 2013) zur Anwendung.

4.1.9 Polymere

Die in der Arbeit verwendeten Polymere wurden durch Meike N. Leiske, Fabian H. Sobotta und Carsten Rössel vom Institut für Organische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, synthetisiert und chemisch charakterisiert (Abb. 5, Tabelle 3).

Hierbei gibt der Polymerisationsgrad (DP, vom engl. *degree of polymerization*) die Gesamtzahl der jeweiligen Polymereinheiten in einem Polymermolekül an. Da sich für P(MeOx) im Vergleich zu P(AmOx) schnellere Reaktionskinetiken feststellen ließen, bilden diese Copolymere *gradiente (grad)* Polymeranordnungen aus. Die Reaktionskinetiken von P(EtOx) und P(AmOx) waren vergleichbar, so dass hier von statistischen (*stat*) Polymeranordnungen ausgegangen werden konnte (Hertz et al. 2018). Für die Synthese von P(EtOx-*block*-AmOx-*stat*-Carboxyloxazolin (CarbOx))-Copolymeren wurde P(EtOx) als Blockpolymer synthetisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von P(AmOx) und P(CarbOx), wodurch aufgrund ähnlicher Reaktionskinetiken dieser beiden Polymermonomere statistische Verteilungen in den Copolymeren erzielt wurden.

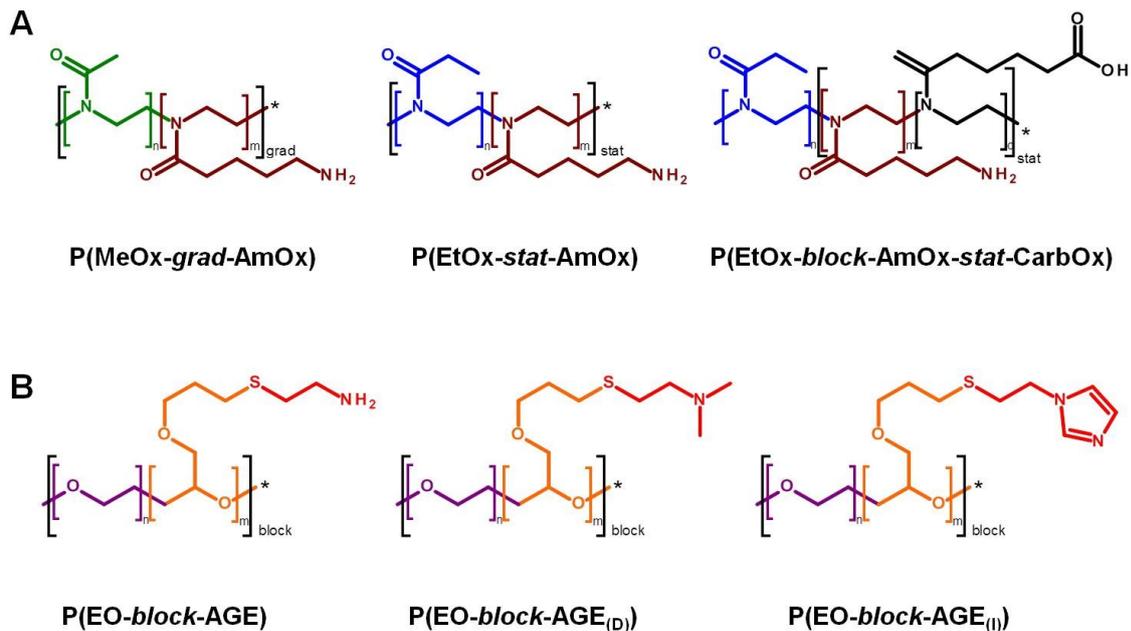


Abb. 5: Anordnungen und Funktionalitäten der in dieser Arbeit untersuchten Copolymere. Es wurden Copolymere bestehend aus A) P(Ox)-Polymeren oder B) P(EO) und P(AGE)-Polymeren synthetisiert und charakterisiert. Hierbei bilden P(Ox)-Copolymere aus P(MeOx) (grün) und P(AmOx) (braun) aufgrund ihrer Reaktionskinetiken gradiente (*grad*) Copolymere aus. Dagegen bilden sich bei P(Ox)-Copolymeren aus P(EtOx) (blau) und P(AmOx) durch ähnliche Reaktionskinetiken statistische (*stat*) Copolymere. Bei der Synthese von P(EtOx-*block*-AmOx-*stat*-CarbOx) wurde zunächst P(EtOx) als Blockpolymer synthetisiert und anschließend P(AmOx) und P(CarbOx) (schwarz) zugegeben. Durch die ähnlichen Reaktionskinetiken dieser beiden Polymermonomere sind statistische Copolymere entstanden. Für die Synthese von Copolymeren aus P(EO) (violett) und P(AGE)s (orange-rot) wurden Blocksysteme gewählt. Für die Untersuchungen wurden die P(Ox)-Copolymere entweder mit primären Aminen oder einer Kombination aus primären Aminen und Carboxylgruppen funktionalisiert. Für die P(AGE)-Polymere wurden entweder primäre Amine, tertiäre Amine (P(AGE_(D))) oder Imidazolgruppen (P(AGE_(I))) als funktionelle Gruppen genutzt.

Bei den P(AGE)-Polymeren wurden Blockcopolymere synthetisiert. Für EN (**E**thylenoxid + **A**min) 15(65%) wurden dabei nur 65% der P(AGE)s mit primären Aminen funktionalisiert. Alle anderen Polymere mit EN wurden vollständig mit primären Aminen funktionalisiert. ED (**E**thylenoxid + **D**imethylamin) 29 hatte als Seitengruppe tertiäre Amine, während EI (**E**thylenoxid + **I**midazol) 83 mit Imidazolen funktionalisiert wurde. Zur Berechnung der N/P-Konstante, welche die Masse (μg) an Polymer für 15 μg DNA bei einem N/P-Verhältnis (molares Verhältnis von Stickstoffen des Polymers zu Phosphaten der DNA) von 1 angibt, wurde folgende Gleichung genutzt:

$$\text{N/P Konstante} = m(\text{DNA}) \times \frac{\text{Phosphate pro Nukleotid}/\bar{M}(\text{Nukleotid})}{\text{Stickstoffe pro Polymer}/\bar{M}(\text{Polymer})} \quad (1)$$

Hierbei stellt $m(\text{DNA})$ die Masse an eingesetzter DNA (15 μg), $\bar{M}(\text{Nukleotid})$ die mittlere molare Masse eines Nukleotids (357 g/mol) und $\bar{M}(\text{Polymer})$ die mittlere molare Masse des Polymers dar.

Tabelle 3: Untersuchte Polymere und deren DP, prozentualer Anteil der einzelnen Polymereinheiten, theoretische Molmasse (M_n), N/P Konstante sowie die Konzentration bei einem N/P-Verhältnis von 15.

Polymer-abkürzung	Polymer	DP	mol% P(MeOx), P(EtOx) oder P(EO)	mol% P(AmOx) (P(CarbOx)) oder P(AGE)	M_n (theor.) [g/mol]	N/P Konstante	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$] bei einem N/P- Verhältnis von 15
P(M ₁₃₀ A ₃₁)	P(MeOx ₁₃₀ - <i>grad</i> -AmOx ₃₁)	161	81	19	15474	3,38	5,08
P(M ₉₇ A ₅₅)	P(MeOx ₉₇ - <i>grad</i> -AmOx ₅₅)	152	64	36	16078	3,26	4,89
P(M ₇₃ A ₈₉)	P(MeOx ₇₃ - <i>grad</i> -AmOx ₈₉)	162	45	55	18870	3,16	4,74
P(M ₂₉ A ₁₆₆)	P(MeOx ₂₉ - <i>grad</i> -AmOx ₁₆₆)	195	15	85	26074	3,03	4,55
P(E ₁₅₀ A ₃₃)	P(EtOx ₁₅₀ - <i>stat</i> - AmOx ₃₃)	183	82	18	19565	3,80	5,71
P(E ₇₇ A ₅₅)	P(EtOx ₇₇ - <i>stat</i> - AmOx ₅₅)	132	58	42	15456	3,47	5,21
P(E ₅₇ A ₁₃₉)	P(EtOx ₅₇ - <i>stat</i> - AmOx ₁₃₉)	196	29	71	25417	3,19	4,78
P(E ₃₁ A ₁₆₃)	P(EtOx ₃₁ - <i>stat</i> - AmOx ₁₆₃)	194	16	84	26252	3,09	4,63
P(E ₃ A ₁₅₇)	P(EtOx ₃ - <i>block</i> - AmOx ₁₅₇)	160	2	98	22623	3,00	4,50
P(E ₁₁₈ A ₆₁ C ₁₂)	P(EtOx ₁₁₈ - <i>block</i> -AmOx ₆₁ - <i>stat</i> -CarbOx ₁₂)	191	62	32 (6)	22428	3,74	5,61
EN15(65%)	P(EO ₄₂ - <i>block</i> - AGE _{15(65%)})	57	74	17	4449	19,17	28,75
EN15	P(EO ₄₂ - <i>block</i> - AGE ₁₅)	57	74	26	4765	13,34	20,01
EN29	P(EO ₄₂ - <i>block</i> - AGE ₂₉)	71	59	41	7443	10,78	16,17
EN45	P(EO ₄₂ - <i>block</i> - AGE ₄₅)	87	48	52	10504	9,80	14,71
EN60	P(EO ₄₂ - <i>block</i> - AGE ₆₀)	102	41	59	13373	9,36	14,04
EN76	P(EO ₄₂ - <i>block</i> - AGE ₇₆)	118	36	64	16433	9,08	13,62
ED29	P(EO ₄₂ - <i>block</i> - AGE _{29(D)})	71	59	41	8257	11,96	17,94
EI83	P(EO ₄₂ - <i>block</i> - AGE _{83(I)})	125	34	66	22010	5,57	8,35
LPEI	-	600	-	-	25842	1,81	2,71

4.1.10 Verbrauchsmaterialien

Cellstar® Gewebekulturflasche (75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-well)	Greiner Bio-One GmbH
CELLview™ 4-Kammer-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH
Nunc™ MicroWell™ 96-well-Platten aus Polypropylen (schwarz)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Nunc™ MicroWell™ 96-well-Platten mit transparentem Boden aus Polymer (schwarz)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Deckgläser #1 rechteckig (24x 32/50 mm)	Gerhard Menzel GmbH
Deckgläser No. 1 rund (Ø 12 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
gefaltete Kapillarküvetten DTS1070 (Folded Capillary Cell)	Malvern Instruments Ltd
HistoBond® adhäsive Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Immobilon®-FL Polyvinylidenfluorid-Membran; Porengröße 0,45 µm	Merck KGaA Millipore
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH

4.1.11 Geräte

Allgemein

Leica CM3050 S Kryostat	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Potter S Homogenisator	Sartorius AG
T3-Thermo Cycler	Biometra GmbH
Thermomixer compact	Eppendorf AG
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD 70	Bandelin electronic GmbH & Co. KG
Cytomics FC 500 Durchflussszytometer	Beckman Coulter GmbH
SpectraMax® M2 Multi-Mode-Mikroplattenreader	Molecular Devices LLC
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd

Brutschränke und Inkubatoren

C150	Binder GmbH
GFL Orbital Shaking Inkubator 3032	Gesellschaft für Labortechnik mbH
HeraCell 240(i) CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc.
Incu-line® Inkubator	VWR International GmbH

Gelelektrophorese und Western Blot

Agarose-Gelelektrophoresekammern

Consort EV265 Power Supply

Criterion™ Blotter

Intas® Gel-Imager

Mini-PROTEAN® Tetra Cell

Odyssey® Imager

PowerPac™ HC Power Supply

Ultraviolett-Transilluminator UVstar 15

Werkstatt, Universitätsklinikum Jena

Consort bvba

Bio-Rad Laboratories GmbH

INTAS Science Imaging Instruments
GmbH

Bio-Rad Laboratories GmbH

LI-COR Biosciences GmbH

Bio-Rad Laboratories GmbH

Biometra® GmbH

Mikroskopsysteme

Axio Observer.Z1

AxioCam MRm charge-coupled device
(CCD) Kamera

ApoTome.2

COLIBRI

HXP 120 C Quecksilberdampf Lampe

Leica TCS SP5

LSM880 *Elyra PS.1 system*

Objektiv 63x/1,4 Öl

Carl Zeiss Microscopy GmbH

Carl Zeiss Microscopy GmbH

Carl Zeiss Microscopy GmbH

Carl Zeiss Microscopy GmbH

Leistungselektronik JENA GmbH

Leica Biosystems Nussloch GmbH

Carl Zeiss Microscopy GmbH

Carl Zeiss Microscopy GmbH

Sicherheitswerkbänke

Biowizard Golden Line/Cleanwizard KH-170

HeraSafe HS/LaminAir® HB2472/HVR2448

KOJAIR Tech OY

Thermo Fisher Scientific Inc.

Zentrifugen

Heraeus® Multifuge® 3SR+

Tischzentrifuge 5415D/5417R (kühlbar)

Thermo Fisher Scientific Inc.

Eppendorf AG

4.1.12 Software

Adobe Creative Suite 2

AxioVision SE64Rel. 4.9

CXP Cytometer Software 2.2

GraphPad Prism 5

ImageJ 1.48v

Adobe Systems, Inc.

Carl Zeiss Microscopy GmbH

Beckman Coulter GmbH

GraphPad Software, Inc.

National Institute of Health

Leica Confocal Software
 Microsoft Office Enterprise 2007
 Odyssey *Infrared Imaging System*
Application Software Version 3.0.16
 SoftMax Pro 5.4.6
 Zen 2011/2012
 Zetasizer Software 7.11

Leica Biosystems Nussloch GmbH
 Microsoft Corporation
 LI-COR Biosciences GmbH
 Molecular Devices LLC
 Carl Zeiss Microscopy GmbH
 Malvern Instruments Ltd

4.2 Methoden

Zur Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Polymere sowie zur Test-Entwicklung zur Untersuchung hepatischer PI3K-Signalwege wurden die in Abb. 6 genannten Methoden angewandt.

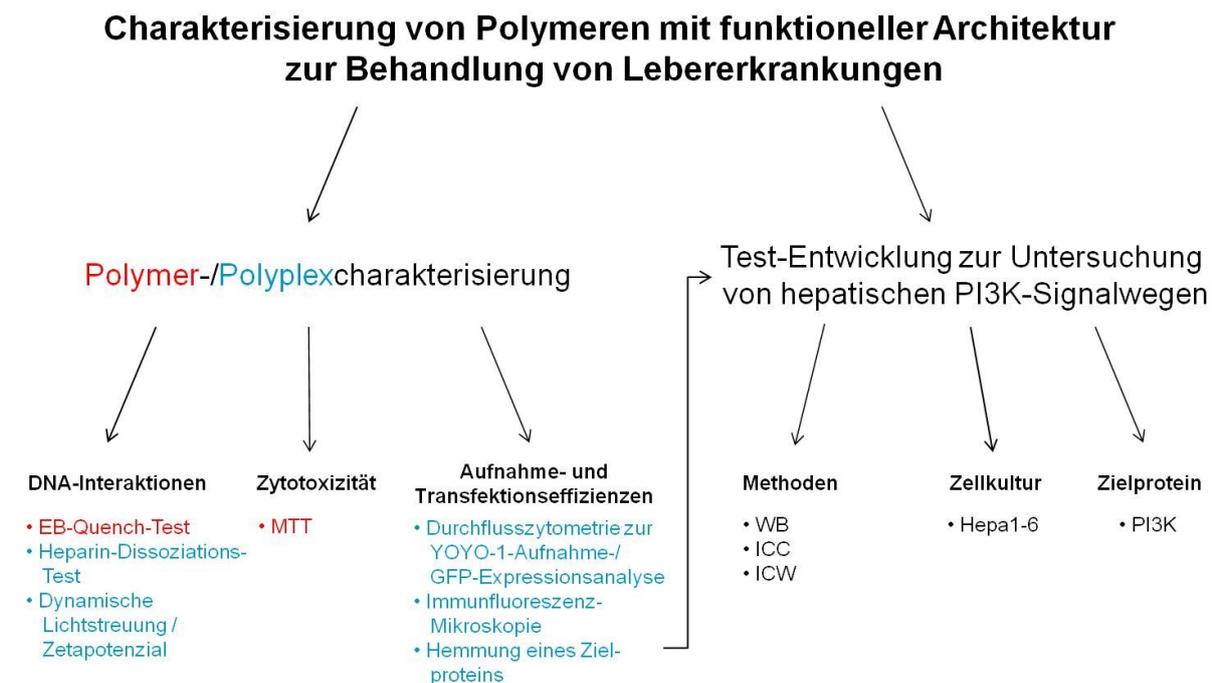


Abb. 6: Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen. Neu synthetisierte Polymere mit funktioneller Architektur wurden sowohl auf ihre DNA-Interaktionen als auch Zytotoxizitäten untersucht. Dabei wurde für die DNA-Interaktionen sowohl der EB-Quench-Test als auch der Heparin-Dissoziationstest verwendet, während für Größenverteilung und Ladung der gebildeten Polyplexe die dynamische Lichtstreuung und das Zetapotenzial genutzt wurde. Die Zytotoxizität wurde mittels MTT bestimmt. Die Aufnahme von Polyplexen mit YOYOTM-1 markierter DNA wurde sowohl durchflusszytometrisch als auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Weiterhin wurde die GFP-Expression 48 h nach Transfektion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für spätere gentherapeutische Anwendungen ist die Analyse der Inhibition von PI3Ks notwendig. Deswegen wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, ob man mit Hilfe von verschiedenen Methoden den PI3K-Signalweg in Hepa1-6 Zellen aktivieren und inhibieren kann, um schlussendlich die vielversprechendste Methode als Screening-Test für Polyplexe mit den neu synthetisierten Polymeren zu nutzen.

4.2.1 Subkultivierung von Zelllinien

Für die Durchführung der Kultivierung und Passage von Hepa1-6 und L929 Zellen waren Michaela Vogel (Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Jena) und Elisabeth Preußger (Institut für Organische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) zuständig. Die Zelllinien wurden in Kulturmedium in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Für Stimulationsexperimente bzw. zur Charakterisierung der Polymere wurde das alte Kulturmedium der Zellen vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen, die Zellen mit 5 ml HBSS gewaschen und für 5 min mit 1 ml 1x Trypsin-EDTA deadheriert. Die Zellsuspension wurde in 9 ml Kulturmedium aufgenommen, durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt und je nach Untersuchungsmethode in frischem Kulturmedium in den entsprechenden *well*-Platten ausgesät. Die Kultivierung erfolgte für 24 h bei 37°C im Zellinkubator.

4.2.2 Polymercharakterisierung

4.2.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1.1 Hitzeschocktransformation von *E. coli* XL10-Gold[®]

Die Herstellung hitzeschockkompetenter *E. coli* erfolgte durch die Technischen Assistentinnen Birgit Schade, Michaela Öhler und Michaela Vogel vom Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Jena. Zur Transformation des Plasmids in hitzeschockkompetente *E. coli* wurde ein Aliquot XL10-Gold[®] langsam auf Eis aufgetaut, mit 1 µg pDNA vermischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42°C und eine weitere Inkubation für 5 min auf Eis. Die transformierten Zellen wurden in 0,2 ml SOC-Medium überführt und die Suspension für 1 h bei 37°C und mit 800 Umdrehungen pro min in einem Thermomixer schüttelnd inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde danach auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.2.2.1.2 Isolation von pDNA mittels Midipräparation

Für die GFP-Expressionsexperimente wurde pDNA in hoher Konzentration und mit hohem Reinheitsgrad benötigt. Hierfür wurde mit dem NucleoBond[®] Xtra Midi-Kit entsprechend der Herstellerangaben pDNA aus 100 ml einer transformierten XL10-Gold[®]-Übernachtskultur (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) isoliert. Die Elution der Säulen-gebundenen DNA erfolgte mit 200 µl Aqua a.i..

4.2.2.2 Polyplexbildung

Zur Herstellung der Polyplexe wurden – wenn nicht anders angegeben – Stammlösungen von pDNA (15 µg/ml) und unterschiedliche Konzentrationen von Polymeren (Stammlösung 1 mg/ml) in HBG gemischt. Die Lösungen wurden für 10 s bei maximaler Geschwindigkeit gevortext und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um eine stabile Polyplexbildung zu gewährleisten.

4.2.2.3 EB-Quench-Test

Die Polyplexbildung mit pDNA wurde mit Hilfe des EB-Quench-Tests untersucht. Für die Durchführung wurden zunächst pDNA (15 µg/ml) und EB (10 µg/ml) in einem Volumen von 100 µl HBG für 10 min bei RT inkubiert. Die verschiedenen Polymere wurden in aufsteigender Konzentration in schwarze Nunc™ MicroWell™ 96-well-Platten pipettiert. Durch Zugabe des DNA-EB-Gemisches und anschließendes dreimaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Polyplexe in den wells gebildet und für 15 min bei RT inkubiert. Die Messung der relativen Fluoreszenzeinheit (RFE) erfolgte mittels eines SpectraMax® M2 Multi-Mode-Mikroplattenreaders. Dafür wurde eine Extinktionswellenlänge (λ_{Ex}) von 525 nm genutzt und bei einer Emissionswellenlänge (λ_{Em}) von 605 nm gemessen. Als Referenz diente eine Probe ohne Polymerlösung (Fluoreszenz 100%; F_{pDNA}), sowie eine Probe mit EB in HBG (Hintergrundsignal; F_0). Die Berechnung der EB-Fluoreszenz nach Polyplexbildung (F_{Probe}) erfolgte mit folgender Gleichung:

$$RFE [\%] = \frac{F_{Probe} - F_0}{F_{pDNA} - F_0} \times 100 \quad (2)$$

4.2.2.4 Heparin-Dissoziationstest

Zur Untersuchung der Polyplexstabilität wurde der Heparin-Dissoziationstest verwendet. Hierzu wurden zunächst pDNA (15 µg/ml) und EB (10 µg/ml) in einem Volumen von 100 µl HBG für 10 min bei RT inkubiert und anschließend die Polyplexe wie in 4.2.2.2 beschrieben gebildet. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurden die Polyplexe in schwarze Nunc™ MicroWell™ 96-well-Platten pipettiert, welche aufsteigende Konzentrationen an Heparin (500 Aktivitätseinheiten (U, vom engl. *unit*)/ml) enthielten. Die Lösungen wurden durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und für 30 min bei 37°C im Dunkeln

inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 525 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{Em}} = 605 \text{ nm}$ mit Hilfe des Multi-Mode-Mikroplattenreaders gemessen. Der Prozentsatz an interkaliertem EB wurde mit Formel (2) berechnet.

4.2.2.5 Größenverteilung und Zetapotenzial

Für die Bestimmung der Größenverteilung der Polyplexe wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) mit einem Zetasizer Nano ZS gemessen. Dazu wurden für alle Messungen gefaltete Kapillarküvetten (DTS1070) verwendet. Nach einer Äquilibrierungszeit von 180 s wurden Durchläufe von 3 x 30 s bei 25°C durchgeführt ($\lambda_{\text{Ex}} = 633 \text{ nm}$). Das gestreute Licht wurde in einem Winkel von 173° gemessen. Die durchschnittliche Polyplexgröße wurde als der effektive Durchmesser (z-Durchschnitt) und die Breite der Größenverteilung als der Polydispersitätsindex (PDI), welcher durch die Kumulantenmethode (Koppel 1972) erhalten wurde, dargestellt. Dabei wurde eine sphärische Form der Polyplexe angenommen. Weiterhin konnte mit Hilfe der Zetasizer Software 7.11 die Größenverteilung (dargestellt als drei Peaks) und die jeweiligen Prozente der Peaks bestimmt werden. Jede Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Zur Messung des Zetapotenzials, welches das elektrostatische Potential an der elektrischen Doppelschicht eines Nanopartikels in Lösung angibt (Clogston und Patri 2011), wurde die elektrophoretische Lichtstreuung (ELS) verwendet. Hierzu wurde durch Anwendung der Laser-Doppler-Anemometrie wieder der Zetasizer Nano ZS genutzt. Jede Messung erfolgte in 20 Durchläufen unter Verwendung der langsamen (SFR, vom engl. *Slow Field Reversal*) und schnellen (FFR, vom engl. *Fast Field Reversal*) Umkehr des elektrischen Feldes. Jedes Experiment wurde als Dreifachbestimmung bei 25°C durchgeführt. Das Zetapotenzial wurde aus der elektrophoretischen Bewegung (μ) gemäß der Henry-Gleichung berechnet. Die Berechnung des Henry-Koeffizienten $f(\text{ka})$ erfolgte nach Ohshima (Ohshima 1994).

4.2.2.6 Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT

Die Zytotoxizität der untersuchten Polymere wurde mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Dieser beruht auf der Umwandlung von MTT zu Formazan durch metabolisch aktive Zellen. Da somit nicht direkt die Zelllebensfähigkeit gemessen werden kann, ist in den Abb. die relative Zelllebensfähigkeit angegeben. Zur Untersuchung wurden sowohl Hepa1-6 als auch L929 Zellen verwendet. Die Zellen (2×10^5 Zellen/ml; 100 μl) wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 in 96-well-Platten kultiviert. Die zu untersuchenden Polymere wurden in einer finalen Konzentration von 0-500 $\mu\text{g/ml}$ in einem Volumen von 10 μl DMEM zu den entsprechenden

wells hinzupipettiert und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 10 µl MTT *labeling reagent* (Kit-Zubehör) für 4 h bei 37°C und 5% CO₂. Die gebildeten Formazankristalle wurden durch Zugabe von *Solubilization solution* (10% SDS, gelöst in 0,01 M HCl; Kit-Zubehör) über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ gelöst. Anschließend wurde die Extinktion bei $\lambda_{\text{Ex1}} = 550 \text{ nm}$ und die Referenz bei $\lambda_{\text{Ex2}} = 690 \text{ nm}$ mit Hilfe des Multi-Mode-Mikroplattenreaders gemessen. Die Berechnung der relativen Zellebensfähigkeit erfolgte mit folgender Gleichung:

$$\text{relative Zellebensfähigkeit [\% der Kontrolle]} = \frac{(\lambda_{\text{Ex1}} - \lambda_{\text{Ex2}})_{\text{Probe}}}{(\lambda_{\text{Ex1}} - \lambda_{\text{Ex2}})_{\text{Kontrolle}}} \times 100 \quad (3)$$

4.2.2.7 Untersuchungen zur Polyplexaufnahme mittels Durchflusszytometrie und Lebendzell-Mikroskopie

Zur Untersuchung der Aufnahme von Polyplexen in die Zellen wurden Hepa1-6 und L929 Zellen in 24-*well*-Platten (2×10^5 Zellen/ml; 500 µl) für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Eine Stunde vor der Zugabe der Polyplexe wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und 500 µl DMEM mit oder ohne FKS hinzugefügt. Für kinetische Studien zur Polyplexaufnahme wurde die pDNA vor der Polyplexbildung mit YOYOTM-1 markiert. Dazu wurden pDNA (15 µg/ml) und 0,05 µM YOYOTM-1-Lösung in HBG gegeben, gevortext und für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Polyplexe wie in 4.2.2.2 beschrieben gebildet und zu den Zellen gegeben (50 µl je *well*). Die Zellen wurden für 2 h oder 4 h bei 37°C inkubiert, mit HBSS gewaschen und trypsiniert. Die relative Polyplexaufnahme wurde in HBSS, versetzt mit 1% FKS, mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dazu wurden 10000 Zellen analysiert, lebende von toten Zellen mittels Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht getrennt (Vollrath et al. 2013) und der Prozentsatz an Zellen mit YOYOTM-1-Signal als auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von YOYOTM-1 mit Hilfe der CXP Cytometer Software 2.2 bestimmt.

Für die Lebendzell-Mikroskopie wurden Hepa1-6 Zellen in 4-Kammer-Zellkulturplatten (2×10^5 Zellen/ml; 500 µl) für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Eine Stunde vor der Zugabe der Polyplexe wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und DMEM ohne FKS hinzugefügt. Polyplexe wurden wie in 4.2.2.2 beschrieben gebildet und zu den Zellen gegeben (50 µl je *well*). Die Zellen wurden für 4 h bei 37°C inkubiert, mit PBS gewaschen und mit einem Mix aus 250 µl Kulturmedium, 250 µl PBS sowie LysoTrackerTM Red (final 1 µM) und Hoechst 33342 (final 16,2 µM) für 5 min inkubiert. Um extrazelluläre Polyplexe auszuschließen, wurde vor den Untersuchungen Trypanblau-Lösung (50 µl je *well*) zur Unterdrückung des Fluoreszenzsignals der extrazellulären Polyplexe zugegeben.

Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines LSM880 *Elyra PS.1 system* untersucht. Die Quantifizierung von YOYOTM-1- und LysoTrackerTM Red-positiven Organellen pro Zelle erfolgte mit der Software ImageJ und dem Plugin Coloc2 (Version 3.0.0). Da die Zellbegrenzungen aufgrund von Überlagerungen der Zellen nicht immer eindeutig definiert werden konnten, wurde die mittlere Anzahl an YOYOTM-1-positiven Organellen allein und an YOYOTM-1- und LysoTrackerTM Red-positiven Organellen pro Zelle (festgelegt durch die Anzahl an Hoechst 33342-positiven Zellkernen) in einer Fläche von 112,5 µm x 112,5 µm für die P(Ox)-Polymere und in einer Fläche von 225 µm x 225 µm für die P(AGE)-Polymere bestimmt. Der Schwellenwert für die Organellengröße wurde auf 5 bis 1000 Pixeleinheiten gesetzt.

4.2.2.8 Bestimmung von GFP-positiven Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Für die GFP-Expressionsexperimente wurden Hepa1-6 und L929 Zellen in 24-*well*-Platten (10⁵ Zellen/ml; 500 µl) für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Eine Stunde vor der Transfektion wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und 500 µl DMEM mit oder ohne FKS hinzugefügt. Die Bildung der Polyplexe wurde wie in 4.2.2.2 beschrieben durchgeführt und die Polyplexe anschließend zu den Zellen gegeben (50 µl je *well*). Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C wurde der Überstand durch frisches Kulturmedium ersetzt und die Zellen wurden für weitere 44 h kultiviert. Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen, durch Trypsinierung abgelöst und in HBSS, versetzt mit 1% FKS, mit Hilfe des Durchflusszytometers gemessen. Pro Kondition wurden 10000 Zellen analysiert und lebende von toten Zellen durch das Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht getrennt. Der Prozentsatz an lebenden Zellen mit GFP-Expression als auch die MFI von GFP wurden anschließend mit Hilfe der CXP Cytometer Software 2.2 bestimmt.

4.2.3 Untersuchungen von PI3K-Signalwegen in der Leber und der hepatischen Zelllinie Hepa1-6

4.2.3.1 Aktivierung und Inhibition von PI3Ks in Hepa1-6 Zellen

Zur Untersuchung des PI3K-AKT-Signalweges in Hepa1-6 Zellen wurden als Stimulanzen Insulin (Endkonzentration 100 nM), Salbutamol (10 µM), LPS (100 ng/ml), C5a (10 ng/ml) und fMLP (1 µM) eingesetzt. Dazu wurden alle Stimulanzen in ddH₂O gelöst. Als Inhibitoren wurden WM (100 nM) und AS (1 µM) verwendet, die in DMSO gelöst wurden. Für die Experimente wurden die Hepa1-6 Zellen für den WB (6-*well*-Platten; 1,5 ml) und die ICC (24-

well-Platten mit Deckgläschen, 500 µl) 2 h vor der jeweiligen Untersuchung mit HBSS gewaschen und in DMEM ohne Zusätze für 2 h inkubiert. Für den ICW (schwarze 96-*well*-Platten mit durchsichtigem Boden; 100 µl) wurde der Medienwechsel nicht vollzogen, da sich in Pilotexperimenten der Verlust an Zellen durch einen Waschschrift als zu groß erwies. Anschließend wurde entweder WM (1:100) oder AS (1:100) zu den Zellen gegeben und diese für 1 h im Brutschrank inkubiert. In den Kontrollen bzw. den Stimulationen ohne Inhibitor wurde jeweils DMSO mit einer Endkonzentration von 0,1% hinzupipettiert, da dies der Konzentration an DMSO im *well* mit Inhibitor entsprach. Anschließend erfolgte die Inkubation für 5 min mit den jeweiligen Stimulanzen (1:100).

4.2.3.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.3.2.1 Herstellung von Hepa1-6 Zelllysaten

Nach den jeweiligen Stimulationsexperimenten wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und die 6-*well*-Platten ohne Medium in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Platten bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Lyse wurde zu den jeweiligen *wells* 200 µl RIPA-Puffer (versetzt mit 25x PIC und PhosSTOP™) gegeben, für 20 min bei 4°C geschwenkt und das Zelllysate in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden für 5 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert, zum Aufschluss der Zellpellets sonifiziert (5 Pulse á 1 s) und nochmals für 10 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände (150 µl) wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl 4x SDS-Probenpuffer gemischt, für 5-10 min bei 100°C inkubiert und nach dem Abkühlen bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.3.2.2 Präparation von Mausleberhomogenaten

Zur Untersuchung der Aktivierung von PI3Ks in der Leber von septischen bzw. mit LPS behandelten Mäusen wurden bei -80°C gelagerte Leberstücke von Bianka Wissuwa (Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Jena) erhalten. Hierbei wurde zur Induktion der Sepsis das *peritoneal contamination and infection* (PCI)-Modell verwendet, bei welcher 2 ml/kg Körpergewicht einer standardisierten und mikrobiologisch validierten humanen Stuhlprobe intraperitoneal verabreicht wird, während für das LPS-Modell 15 µg/g Körpergewicht LPS intraperitoneal appliziert wurde (Wissuwa et al. 2018). Alle Arbeiten erfolgten auf Eis. Die Leberstücke wurden mit RIPA-Puffer (versetzt mit 25x PIC und PhosSTOP™) im Verhältnis 1:6,5 (Leber (g):RIPA (ml)) versetzt, mit dem Potter S Homogenisator bei 900 Umdrehungen pro min homogenisiert (12 Stöße) und die Homogenate aliquotiert (1 ml je 1,5 ml-Reaktionsgefäß). Die Proben wurden in flüssigem

Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und für WB-Untersuchungen wurden die Proben auf Eis aufgetaut, für 10 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

4.2.3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Leberproben erfolgte mit dem BCA-Kit nach Herstellerangaben. Hierzu wurden die zu quantifizierenden Proben mit ddH₂O 1:40 verdünnt. Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Standardprotein BSA von 0 bis 20 µg in einem finalen Volumen von 100 µl erstellt.

4.2.3.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1970) verwendet. Dabei wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE genutzt, bei welchem das Trenngel mit 9,5% Acrylamidgehalt mit einem Sammelgel von 5% Acrylamid kombiniert wurde. Die Dicke des Gels betrug 1,5 mm. Die Zusammensetzung der Gelgießlösungen ist in Tabelle 4 exemplarisch für ein Gel angegeben. Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben wurden auf das Gel geladen und in 1x Tris-Glycin-Laufpuffer durch Anlegen einer konstanten elektrischen Spannung von 120 V für 1,5 h elektrophoretisch getrennt. Der Proteinstandard *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* wurde jeweils als Größenreferenz mitgeführt. Das Gel wurde direkt im Anschluss für den WB eingesetzt.

Tabelle 4: Ansatz für ein SDS-Polyacrylamidgel

5%iges Sammelgel	1,62 ml 4x Sammelgelpuffer 1,00 ml Rotiphorese®Gel 30 1,94 ml ddH ₂ O 1,37 ml 87% (v/v) Glycerol 8,5 µl Phenolrot 5,8 µl N,N,N',N'-Tetramethyldiamin 34,46 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxosulfat
9,5%iges Trenngel	2,5 ml 4x Trenngelpuffer 3,16 ml Rotiphorese®Gel 30 3,64 ml ddH ₂ O 700 µl 87% (v/v) Glycerol 4,2 µl Bromphenolblau 6,7 µl N,N,N',N'-Tetramethyldiamin 66,76 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxosulfat

4.2.3.2.5 WB-Transfer und -Detektion mit dem LI-COR Odyssey

Zur Immundetektion wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens aus dem Gel auf Polyvinylidenfluorid-Membranen, welche vorher für 1 min mit Methanol aktiviert und anschließend für 5 min mit Transferpuffer äquilibriert wurden, transferiert. Der Transfer erfolgte für 1 h bei konstanter Spannung (100 V) und 4°C in Transferpuffer. Zur Detektion von Proteinen erfolgte zunächst eine Blockierung mit BSA-Lösung für 30 min bei RT. Anschließend wurde mit Primärantikörpern (Tabelle 1) in WB-Antikörper-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert, dreimal für 10 min mit TBST bei RT gewaschen und mit Sekundärantikörpern (Tabelle 2) in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBST und einmal mit TBS für jeweils 10 min wurden die an den Sekundärantikörper gekoppelten Infrarotfarbstoffe mit Hilfe des LI-COR Odyssey Systems detektiert.

4.2.3.3 Immunfluoreszenzfärbungen

4.2.3.3.1 ICC von Hepa1-6 Zellen

Für die Immunfärbung von auf Deckgläschen kultivierten Hepa1-6 Zellen wurde nach der jeweiligen Stimulation das Kulturmedium abgenommen und mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurde das PFA verworfen und die Quervernetzung der Proteine mit Hilfe von Quenchpuffer für 20 min gestoppt. Nach der Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen und der Permeabilisierung mit 0,3% (v/v) Triton[®] X-100 in Blocklösung für 1 h wurden die Deckgläschen aus der 24-well-Platte genommen und in eine feuchte Kammer überführt. Die primären Antikörper, welche in 0,3% (v/v) Triton[®] X-100/Blocklösung wie in Tabelle 1 angegeben verdünnt wurden, wurden auf die Deckgläschen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit TBST für je 10 min gewaschen und die sekundären Antikörper, gelöst in 0,3% Triton[®] X-100/Blocklösung, zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1,5 h bei RT im Dunkeln. Im nachfolgenden Waschschrift für 10 min mit Blocklösung wurde DAPI (1:10000) zum Anfärben des Zellkerns mitgeführt. Danach wurde noch einmal mit TBST und einmal mit TBS für jeweils 10 min gewaschen. Die Deckgläschen wurden abschließend kurz in ddH₂O getaucht, auf einem Tuch abgetupft und danach auf einen Objektträger gebracht, auf welchem ein Tropfen Mowiol platziert wurde. Zur Aushärtung erfolgte eine Verwahrung über Nacht bei RT und anschließend die Aufbewahrung bei 4°C bis zur weiteren Verwendung.

4.2.3.3.2 ICW von Hepa1-6 Zellen

Für die Untersuchungen mittels ICW wurden die in schwarzen 96-*well*-Platten mit durchsichtigem Boden kultivierten Hepa1-6 Zellen nach Stimulation mit 8% (w/v) PFA in PBS für 10 min bei RT fixiert. Da das Kulturmedium hierbei nicht abgesaugt wurde, um den Verlust an Zellen zu minimieren, betrug die Endkonzentration an PFA je *well* 4%. Alle weiteren Schritte erfolgten wie unter 4.2.3.3.1 beschrieben. Nach der Inkubation mit Sekundärantikörpern und dem Waschen mit TBST (2x) und TBS für 10 min wurde die Waschlösung vollständig abgenommen und die 96-*well*-Platten mit Hilfe des Odyssey® Imager detektiert.

4.2.3.3.3 IHC von Leberschnitten

Zur Anfertigung von Leberschnitten für die immunhistochemische Färbung wurden 14 Wochen alte WT-, PI3Ky-KD- und PI3Ky-KO-Mäuse (Hirsch et al. 2000, Patrucco et al. 2004) vom Forschungszentrum Lobeda (Universitätsklinikum Jena) erhalten. Durch cervikale Dislokation wurden die Mäuse getötet und die Bauchdecke geöffnet. Anschließend wurde die Leber mittels Kanulierung der Vena cava inferior mit PBS perfundiert. Durch Öffnen der Portalvene konnte das überschüssige Volumen ablaufen. Die Perfusion wurde für 5 min mit einer Flussrate von 8 ml/min durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Wechsel auf 4% (w/v) PFA in PBS für 10 min. Nach der Fixierung wurde die Leber isoliert und über Nacht in 4% (w/v) PFA/PBS nachfixiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit Unterstützung von Christin Scharf (Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Jena). Die Leber wurde mit PBS und ddH₂O gewaschen und in PBS mit 0,02% Natriumazid über Nacht bei 4°C gelagert. Im folgenden Schritt wurde die Leber in 30% (w/v) Saccharose in PBS über Nacht inkubiert. Zur Anfertigung der Leberschnitte wurde der Lobus lateralis sinister verwendet. Dazu wurden mit Hilfe eines Skalpell 1 mm³ große Leberstücke geschnitten und mit 5% (w/v) Saccharose/PBS im Vibratom festgefroren. Es erfolgten Vibratomschnitte mit einer Schnittdicke von 14 µm. Die Leberschnitte wurden in 0,1 M PB und 0,02% Natriumazid bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Immunfärbung wurden die Leberschnitte zunächst in PB gegeben und nach vorsichtiger Abnahme 500 µl Histologie-Blocklösung zugefügt. Nach einer Inkubation für 1 h bei RT wurde die Histologie-Blocklösung abgenommen und 250 µl primäre Antikörperlösung in Histologie-Blocklösung hinzupipettiert (Tabelle 1). Die Inkubation erfolgte für zwei Nächte bei 4°C auf einem Schüttler. Die Schnitte wurden anschließend dreimalig mit 500 µl PB für 10 min gewaschen und mit sekundärem Antikörper (Tabelle 2), Phalloidin Alexa Fluor™ 568 (1:50) und DAPI (1:1000) in Histologie-Blocklösung schüttelnd bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PB für 10 min wurden die Schnitte in eine dunkle Schale mit PBS transferiert. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und mit PBS feucht gehalten. Abschließend wurden etwa 100 µl Fluoromount-G® auf die Schnitte auf dem Objektträger gegeben und die Schnitte mit einem Deckglas abgedeckt. Die Proben wurden bei RT im Dunkeln getrocknet und nach 1 h mit Nagellack abgedichtet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger mit den Leberschnitten bei 4°C gelagert.

4.2.3.4 Mikroskopie und Analysemethoden

4.2.3.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Bildaufnahmen der Hepa1-6 Zellen erfolgten mit einem inversen Epifluoreszenzmikroskop (Axio Observer.Z1). Hierbei wurden Z-Stapel mit aktiviertem ApoTome aufgenommen. Dabei wurde bei einem 63x-Objektiv ein Abstand von 0,24 µm verwendet. Als Software wurde AxioVision SE64Rel. 4.9 genutzt.

Die Leberschnitte wurden mit dem Leica TCS SP5 aufgenommen. Auch hier erfolgte die Aufnahme in Z-Stapeln mit einem Abstand von 1 µm bei einem 63x-Objektiv.

4.2.3.4.2 Quantifizierung von p-AKT und AKT in Hepa1-6 Zellen

Die Quantifizierung der Signalintensitäten von p-AKT und AKT erfolgte für die WB- und ICW-Methoden mittels der *Odyssey Infrared Imaging System Application Software*. Für die ICC-Methode wurden die Signalintensitäten von p-AKT und AKT mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ 1.48v quantifiziert. Hierzu wurden alle Einzelbilder der jeweiligen Kanäle zusammengefügt und dann die Maximum-Intensitätsprojektion (MIP) gebildet. Anschließend wurden um die einzelnen Zellen Bereiche von Interesse (*region of interest*; ROI) gelegt, indem die Zellmembranen als Begrenzungen für die ROI genutzt wurden, und die Pixelintensität in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen bestimmt. Zur Normalisierung wurde ein Verhältnis zwischen p-AKT und AKT gebildet.

4.2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde in dieser Arbeit das Programm GraphPad Prism 5 genutzt. Zunächst erfolgte eine Prüfung auf Normalverteilung mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests. Bei einer Normalverteilung wurde je nach Stichprobengröße ein T-Test (2 Konditionen) oder ein *One-Way-ANOVA* (ab 3 Konditionen) verwendet. Waren die Werte nicht normal verteilt, schloss sich ein Mann-Whitney-U-Test (2 Konditionen) oder ein Kruskal-

Wallis-Test (ab 3 Stichproben) an. Kam es zu einer Signifikanz im *One-Way-ANOVA* bzw. Kruskal-Wallis-Test, wurde anschließend als Posttest der Tukey's *Range* Test bei Normalverteilung bzw. der Dunn's *Multiple Comparison* Test bei Nichtnormalverteilung verwendet. Bei Varianzanalysen mit zwei Faktoren wurde ein *Two-Way-ANOVA* mit anschließendem Bonferroni's Post Test bei Signifikanz angewandt.

5. Ergebnisse

5.1 Untersuchung der DNA-Interaktionen von Polymeren mit unterschiedlichen Funktionalitäten

Für gentherapeutische Applikationen von Polyplexen, die als Komplexe aus Polymeren und Nukleinsäuren definiert sind, ist es wichtig, hohe Polyplexstabilitäten zu erreichen, um das Genmaterial nicht frühzeitig freizusetzen. Neben einer hohen Stabilität während des Transportes zum Zielorgan ist die Freisetzung des Genmaterials nach Aufnahme in die Zelle aber essentiell, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Zur Untersuchung der Interaktion von Polymeren mit pDNA wurde der EB-Quench-Test verwendet. Dieser basiert auf der Interkalation von EB in die DNA und der dadurch ansteigenden Fluoreszenz von EB durch intramolekulare Veränderungen (Waring 1965, Olmsted und Kearns 1977). Die Zugabe von Polymerlösung und die mögliche folgende Interaktion des Polymers mit der DNA führt zur Verdrängung des EB aus der DNA, welche durch einen Abfall der EB-Fluoreszenz detektiert werden kann (Mehta et al. 2014). Durch Hinzufügen von Heparin, einem negativ geladenem Polysaccharid, ist es möglich, die Polymer-DNA-Interaktionen zu einem Großteil aufzulösen, wodurch EB erneut in die DNA interkaliert und es zum Anstieg des EB-Fluoreszenzsignals kommt. Damit spiegelt der Heparin-Dissoziationstest die Stabilität der Polyplexe wider (Hwang et al. 2014, Mehta et al. 2014).

Zur Bestimmung der Polymer-DNA-Interaktionen wurde neben dem Verhältnis Polymer/DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) auch das N/P-Verhältnis gebildet, welches das molare Verhältnis von den Stickstoffen des Polymers zu den Phosphaten der DNA angibt, da diese entscheidend an den Interaktionen beteiligt sind (Gary et al. 2013). Zum besseren Verständnis der Polymerabkürzungen sind alle in dieser Arbeit untersuchten Polymere sowie deren Funktionalitäten und der Amingehalt in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Polymerabkürzungen und -namen, Funktionalitäten und Amingehalt der in dieser Arbeit untersuchten Polymere.

Polymer-abkürzung	Polymername	Funktionalitäten	mol% P(AmOx) oder P(AGE)
P(M ₁₃₀ A ₃₁)	Poly(Methyloxazolin- <i>grad</i> - Aminoxazolin)	Primäre Amine	19
P(M ₉₇ A ₅₅)			36
P(M ₇₃ A ₈₉)			55
P(M ₂₉ A ₁₆₆)			85
P(E ₁₅₀ A ₃₃)	Poly(Ethyloxazolin- <i>stat</i> - Aminoxazolin)	Primäre Amine	18
P(E ₇₇ A ₅₅)			42
P(E ₅₇ A ₁₃₉)			71
P(E ₃₁ A ₁₆₃)			84
P(E ₃ A ₁₅₇)	Poly(Ethyloxazolin- <i>block</i> - Aminoxazolin)		98
P(E ₁₁₈ A ₆₁ C ₁₂)	Poly(Ethyloxazolin- <i>block</i> - Aminoxazolin- <i>stat</i> -Carboxyloxazolin)	Primäre Amine + Carboxylgruppen	32
EN15(65%)	Poly(Ethylenoxid- <i>block</i> - Allylglycidylether)	Primäre Amine	17
EN15			26
EN29			41
EN45			52
EN60			59
EN76			64
ED29		Tertiäre Amine	41
E183		Imidazole	66
LPEI	Lineares Polyethylenimin	Sekundäre Amine	-
TurboFect™	Gemisch aus linearen, hydroxylierten Polyethyleniminen	Sekundäre Amine und Hydroxylgruppen	-

In ersten Untersuchungen wurden zunächst die Interaktionen des Referenzpolymers LPEI (Boussif et al. 1995) sowie von TurboFect™, einem kommerziell erhältlichen Polymergemisch basierend auf hydroxyliertem LPEI (Lagunavicius et al. 2007), mit pDNA bestimmt (Abb. 7). Schon bei einem Verhältnis von 1 µg LPEI/µg DNA, das etwa einem N/P-Verhältnis von 9 entspricht, kam es zu einem starken Abfall der EB-Fluoreszenz (Abb. 7A + 7B). Die weitere Erhöhung der LPEI-Konzentration führte zu geringen Veränderungen in der EB-Fluoreszenz, so dass mit einem Verhältnis von 3 µg LPEI/µg DNA die Fluoreszenz nicht mehr weiter sank (Abb. 7A – 7C). Im Vergleich dazu zeigte sich für

TurboFect™ zunächst ein etwas geringerer Fluoreszenzabfall (Abb. 7A + 7B). Die Erhöhung der TurboFect™-Konzentration führte aber zu ähnlichen RFE wie bei LPEI (Abb. 7A – 7C).

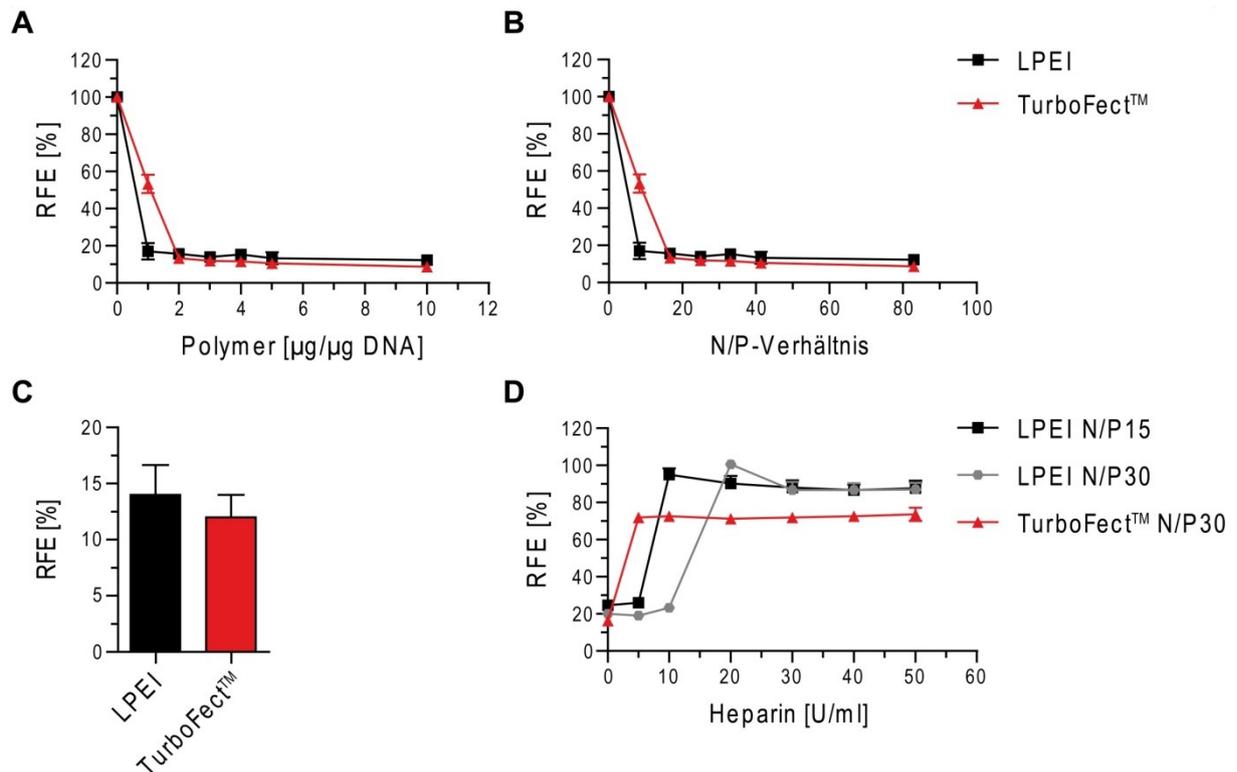


Abb. 7: EB-Quench-Test und Heparin-Dissoziationstest zur Bestimmung der DNA-Interaktionen von LPEI und TurboFect™. A + B) Die EB-Fluoreszenz nach Interkalation von EB in pDNA wurde auf 100% gesetzt. Durch Zugabe von aufsteigenden Konzentrationen an LPEI oder TurboFect™ kam es zur Verringerung der EB-Fluoreszenz. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz sowohl in Abhängigkeit von der Konzentration der Polymere je µg DNA (A) als auch vom N/P-Verhältnis (B), welches das molare Verhältnis von den Stickstoffen des Polymers zu den Phosphaten der DNA angibt. C) Ab einem Polymer/DNA-Verhältnis von 3:1 (µg/µg) konnte keine weitere Reduktion der EB-Fluoreszenz mehr detektiert werden. D) Durch die Zugabe von aufsteigenden Konzentrationen an Heparin wurde ein Anstieg der EB-Fluoreszenz detektiert. Hierbei entspricht 100% RFE der EB-Fluoreszenz nach Interkalation von EB in pDNA und anschließender Inkubation für 30 min bei 37°C. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. RFE – relative Fluoreszenzeinheit von interkaliertem EB; U – Enzymaktivität (Unit)

Für GFP-Expressionsexperimente werden häufig Polymer/DNA-Verhältnisse von 2-4 µg/µg verwendet (Thermo 2018), welche für LPEI einem N/P-Verhältnis von 15-30 entsprechen. Da sich für diese N/P-Verhältnisse im EB-Quench-Test gute DNA-Interaktionen zeigten, wurden für den Heparin-Dissoziationstest Verhältnisse von N/P15 und N/P30 verwendet (Abb. 7D). Für Polyplexe mit LPEI mit einem N/P-Verhältnis von 15 wurden zur Auflösung des Polyplexes 10 U/ml Heparin benötigt. Dabei stellt U die Aktivität von Heparin gegen verschiedene Gerinnungsfaktoren dar (Hardy et al. 1996). Bei einem N/P-Verhältnis von 30 bedurfte es höherer Heparin-Konzentrationen (20 U/ml) zur Auflösung des Polyplexes. Bei TurboFect™ wurde schon mit 5 U/ml Heparin ein deutlicher Anstieg der EB-Fluoreszenz

verzeichnet. Dies lässt auf geringere DNA-Polymer-Interaktionen bei diesem Polymer schließen. Jedoch scheinen diese Interaktionen nicht vollständig auflösbar zu sein, da mit TurboFect™ trotz steigender Heparin-Konzentrationen die RFE-Werte nicht über 80% stiegen (Abb. 7D).

Die in dieser Arbeit zu untersuchenden Polymere besitzen verschiedene Modifikationen (Polymeranordnung und -funktionalitäten), die gegenüber LPEI vor allem geringere Toxizitäten und Protein-Polymer-Interaktionen bei gleicher oder besserer Transfektionseffizienz aufweisen sollen. Da für die mögliche gentherapeutische Nutzung der Polymere aber DNA-Interaktionen essentiell sind, sollten für die Polymere zunächst die DNA-Interaktionen untersucht werden.

Für die P(Ox)-Polymere ergab sich dabei eine deutliche Abhängigkeit der DNA-Interaktionsfähigkeit in Bezug auf den Anteil an P(AmOx) (Abb. 8). Während Polymere mit etwa 20% P(AmOx)-Anteil keine DNA-Bindung aufwiesen (Abb. 8A - 8E, schwarz) und deshalb aus allen weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden, zeigte sich für Polymere mit steigendem P(AmOx)-Anteil >35% ein deutlicher Anstieg an DNA-Interaktionen. Die höchste DNA-Bindung wurde mit einem Anteil an P(AmOx) von 98% erreicht (Abb. 8C - 8E, violett). Hierbei lag der RFE-Wert, bei welchem trotz Zugabe von Polymer keine Reduktion der EB-Fluoreszenz mehr gefunden werden konnte, in dem Bereich der DNA-Interaktionen von LPEI und TurboFect™ (Abb. 7). Das Einbringen von P(CarbOx) (Abb. 8C - 8E, grau) erbrachte bei vergleichbaren P(AmOx)-Anteilen (Abb. 8C - 8E, rot) eine Verbesserung der DNA-Interaktionen. Für die meisten untersuchten P(Ox)-Polymere wurde ab einem Polymer/DNA-Verhältnis von 4:1 keine weitere Reduktion der EB-Fluoreszenz mehr detektiert (Abb. 8A + 8B). Bei diesem Verhältnis wurde deutlich, dass mit steigendem P(AmOx)-Anteil die RFE sanken, was auf unterschiedlich starke DNA-Polymer-Interaktionen schließen lässt (Abb. 8E). Die Nutzung von P(MeOx) oder P(EtOx) ergab keinen Unterschied in den DNA-Polymer-Interaktionen, was sich in vergleichbaren Höhen der EB-Fluoreszenz widerspiegelte (Abb. 8E). Auch beim Heparin-Dissoziationstest, bei welchem ein N/P-Verhältnis von 30 verwendet wurde, konnten ähnliche RFE zwischen Polymeren mit P(MeOx) oder P(EtOx) gefunden werden. Einzig für Polymere mit einem P(AmOx)-Anteil von 80% ergab sich ein tendenzieller Unterschied (Abb. 8F + 8G, orange). Hier wurden für Copolymere mit P(MeOx) in Anwesenheit von 5 U/ml Heparin noch stabilere DNA-Interaktionen festgestellt, während Copolymere mit P(EtOx) bei dieser Konzentration schon verdrängt wurden. Für P(E₃A₁₅₇) ergaben sich die stabilsten DNA-Interaktionen, da hier zum einen 10 U/ml Heparin benötigt wurden, um die DNA-Polymer-Interaktionen zu lösen, zum anderen diese Interaktionen aber nicht vollständig gelöst werden konnten, da die RFE-Werte trotz steigender Heparin-Konzentration nicht über 90% stiegen (Abb. 8G). Damit

zeigte dieses Polymer stärkere DNA-Interaktionen als TurboFect™, aber geringere als LPEI (Abb. 7D).

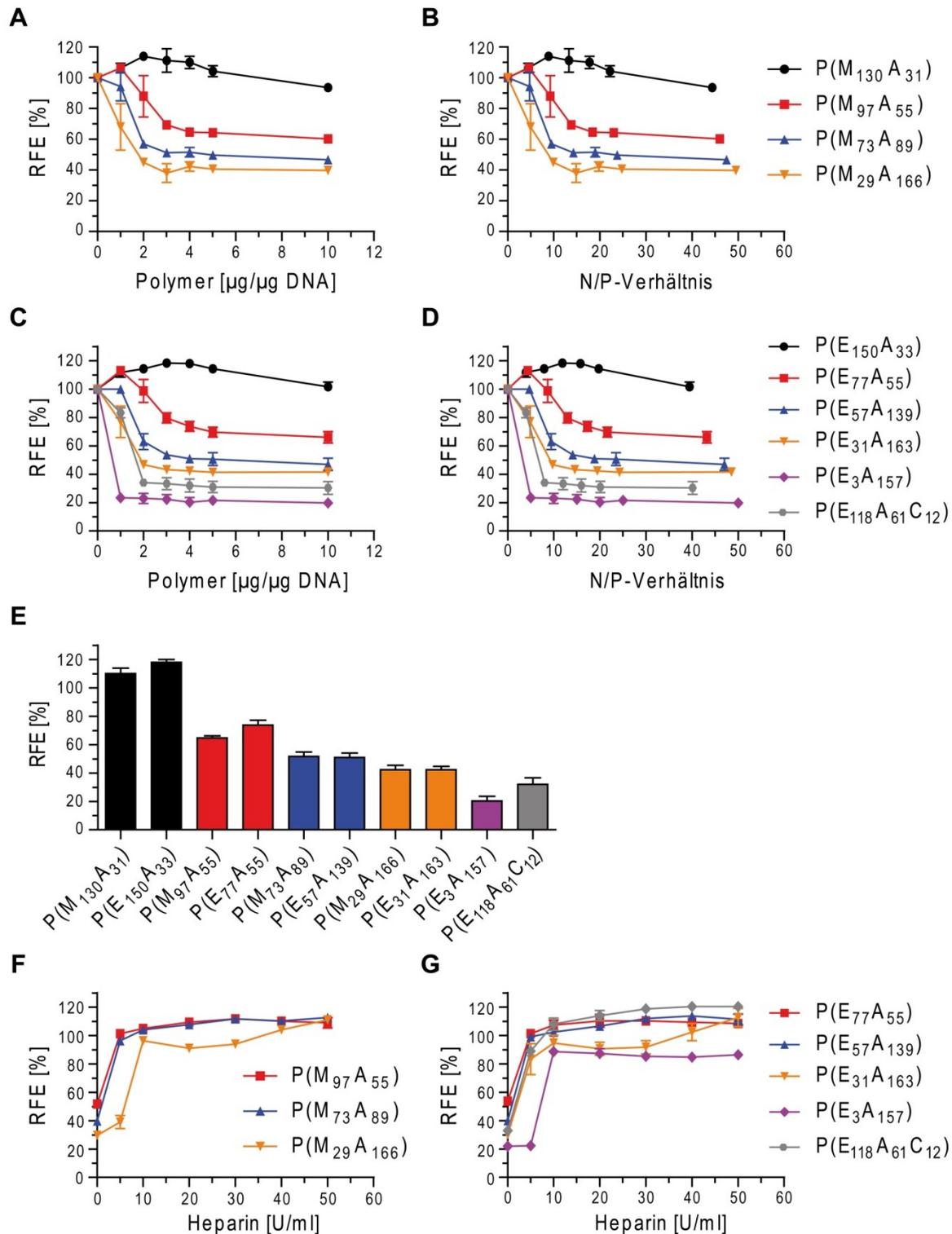


Abb. 8: DNA-Interaktionen von P(Ox)-Polymeren mit steigendem P(AmOx)-Anteil. A + B) Die EB-Fluoreszenz wurde auf 100% gesetzt, nachdem EB in die pDNA interkalierte. Die Zugabe von aufsteigenden Konzentrationen der verschiedenen P(Ox)-Polymere führte je nach Polymer zu einer unterschiedlich starken Verdrängung des EB und folgend zu einer Verringerung der EB-Fluoreszenz. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration der Polymere je $\mu\text{g DNA}$ (A + C) und vom N/P-Verhältnis

(B + D). Da ab einem Polymer/DNA-Verhältnis von 4:1 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) für die meisten Polymere keine weitere Reduktion der EB-Fluoreszenz mehr detektiert werden konnte, wurden diese RFE-Werte zum Vergleich der einzelnen Polymere in (E) dargestellt. F + G) Die Zugabe von aufsteigenden Konzentrationen an Heparin führte je nach Polymer zu einem unterschiedlichen Anstieg der EB-Fluoreszenz. Für die Untersuchungen wurde ein N/P-Verhältnis von 30 gewählt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. RFE – relative Fluoreszenzeinheit von interkaliertem EB; U – Enzymaktivität (Unit)

Die Untersuchungen der DNA-Interaktionen von P(AGE)-Polymeren zeigten starke DNA-Interaktionen für die meisten der untersuchten Polymere (Abb. 9A + 9B). Unterschiede konnten einzig im Funktionalisierungsgrad (EN15(65%)) und in der Verwendung der funktionellen Gruppen (ED29 und EI83) gefunden werden. So zeigten sich für EN15(65%) nur geringe DNA-Interaktionen, während bei ED29 und EI83 die RFE-Werte bei einem Polymer/DNA-Verhältnis von 3:1 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) tendenziell etwas über den RFE-Werten der Polymere mit primären Aminen lagen (Abb. 9C).

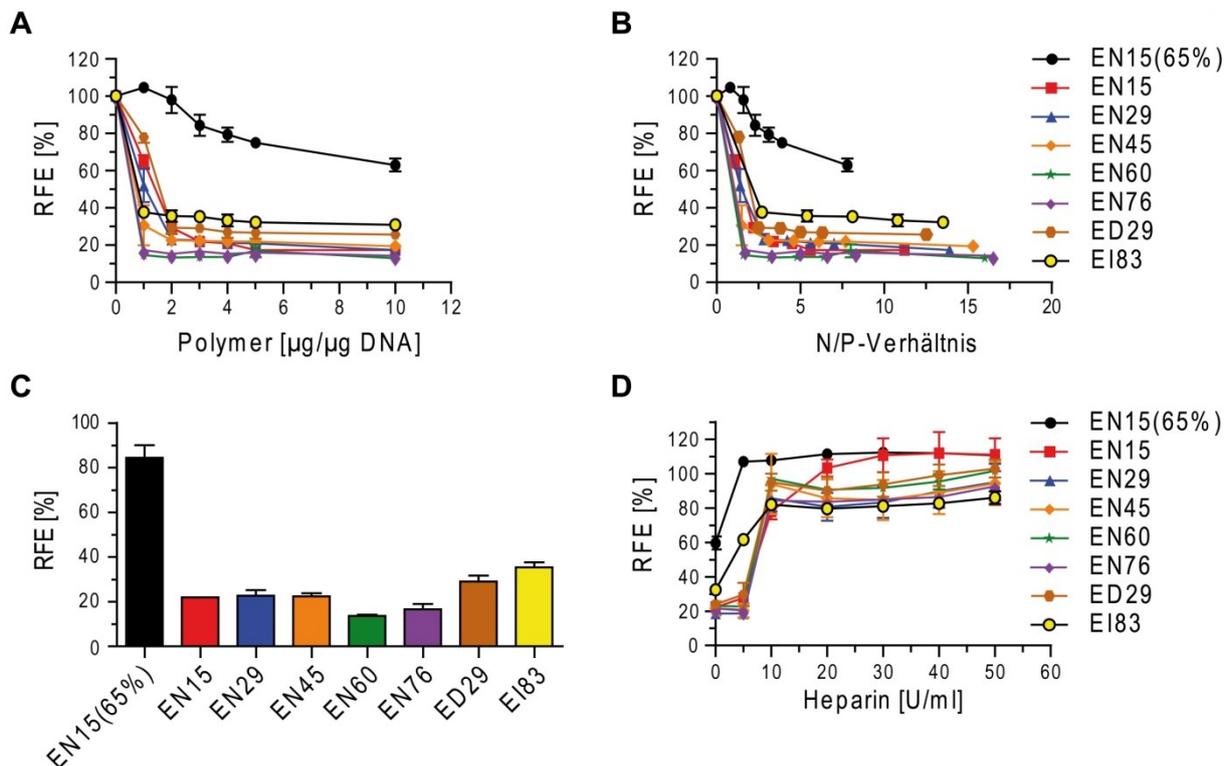


Abb. 9: DNA-Interaktionen von P(AGE)-Polymeren mit verschiedenen Funktionalitäten. A + B) Die EB-Fluoreszenz nach Interkalation von EB in pDNA wurde auf 100% gesetzt. Durch Zugabe der verschiedenen P(AGE)-Polymere in aufsteigenden Konzentrationen kam es je nach Polymer zu einer Verringerung der EB-Fluoreszenz. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz in Abhängigkeit von sowohl der Konzentration der Polymere je μg DNA (A) als auch vom N/P-Verhältnis (B), welches das molare Verhältnis von den Stickstoffen des Polymers zu den Phosphaten der DNA angibt. Für die meisten Polymere wurde ab einem Polymer/DNA-Verhältnis von 3:1 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) keine weitere Reduktion der EB-Fluoreszenz mehr detektiert, so dass diese RFE-Werte zum Vergleich der einzelnen Polymere in (C) dargestellt sind. D) Die Zugabe von aufsteigenden Konzentrationen an Heparin führte je nach Polymer zu einem unterschiedlich starken Anstieg der EB-Fluoreszenz. Für die Untersuchungen wurde ein N/P-Verhältnis von 15 gewählt. Dargestellt sind die Mittelwerte

und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. RFE – relative Fluoreszenzeinheit von interkaliertem EB; U – Enzymaktivität (Unit)

Während bei den P(Ox)-Polymeren eine Abhängigkeit vom Anteil an primären Aminen (P(AmOx)-Anteil) nachgewiesen werden konnte (Abb. 8), konnte bei den P(AGE)-Polymeren mit steigendem Anteil an primären Aminen bei vollständiger Funktionalisierung keine größeren Unterschiede in den DNA-Interaktionen gefunden werden (Abb. 9C). Die RFE-Werte für diese Polymere bei einem Polymer/DNA-Verhältnis von 3:1 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) waren ähnlich hoch zu denen von LPEI und TurboFect™ (Abb. 7). Aufgrund der hohen DNA-Affinität wurde für den Heparin-Dissoziationstest ein N/P-Verhältnis von 15 gewählt. Hier zeigte sich trotz geringerem N/P-Verhältnis eine stabilere DNA-Bindung für die meisten P(AGE)-Polymere (Abb. 9D) verglichen mit den P(Ox)-Polymeren (Abb. 8F + 8G). Ähnlich dem EB-Quench-Test konnte auch für den Heparin-Dissoziationstest vor allem für die Polymere mit primären Aminen eine vergleichbare DNA-Affinität wie bei LPEI (Abb. 7D) festgestellt werden. Einzig für EN15(65%) und EI83 zeigten sich schon bei 5 U/ml Heparin ein Anstieg der RFE (Abb. 9D).

Da die meisten untersuchten Polymere stabile DNA-Interaktionen aufwiesen, wurde im nächsten Schritt die Größe und Ladung der Polyplexe bestimmt, da diese sowohl einen starken Einfluss auf die Aufnahmeeffizienzen in Zellen als auch auf die Interaktionen mit verschiedenen Bestandteilen von Kulturmedien (z.B. FKS) oder Blut (z.B. Albumin, aber auch Immunzellen) haben (Tenzer et al. 2013, Gratton et al. 2008). Für die Analyse der Größenverteilung wurde die DLS verwendet, während für das Zetapotenzial, welches die Ladung der Polyplexe angibt, die ELS genutzt wurde.

Zum Vergleich mit den neu synthetisierten Polymeren wurden zunächst LPEI und TurboFect™ in HBG, einem Puffermedium, welches häufig für *in vitro*-Transfektionen genutzt wird (Bus et al. 2017), oder 150 mM NaCl, das in dieser Konzentration als physiologische Kochsalzlösung im klinischen Alltag im Gebrauch ist, untersucht. Während sich in HBG Polyplexe mit einem mittleren Durchmesser von 121 nm (LPEI N/P30), 215 nm (TurboFect™ N/P15) und 305 nm (LPEI N/P15) bildeten, wurden für Polyplexe in NaCl mittlere Durchmesser im μm -Bereich erhalten (Abb. 10A). Zur Beurteilung der Größenverteilungen der Polyplexe wurden die PDIs bestimmt. Diese werden im Bereich von 0 bis 1 dargestellt, wobei 0 eine homodisperse und 1 eine polydisperse Größenverteilung angibt (Bhattacharjee 2016). Sowohl für LPEI als auch TurboFect™ wurden in HBG und NaCl PDIs $>0,3$ gefunden, was auf Polyplexe mit unterschiedlichem Durchmesser schließen lässt (Abb. 10B). Hierbei waren die PDIs in NaCl tendenziell geringer als in HBG. Eine nähere Betrachtung der durchschnittlich vorkommenden Polyplexgrößen sowie deren prozentuale

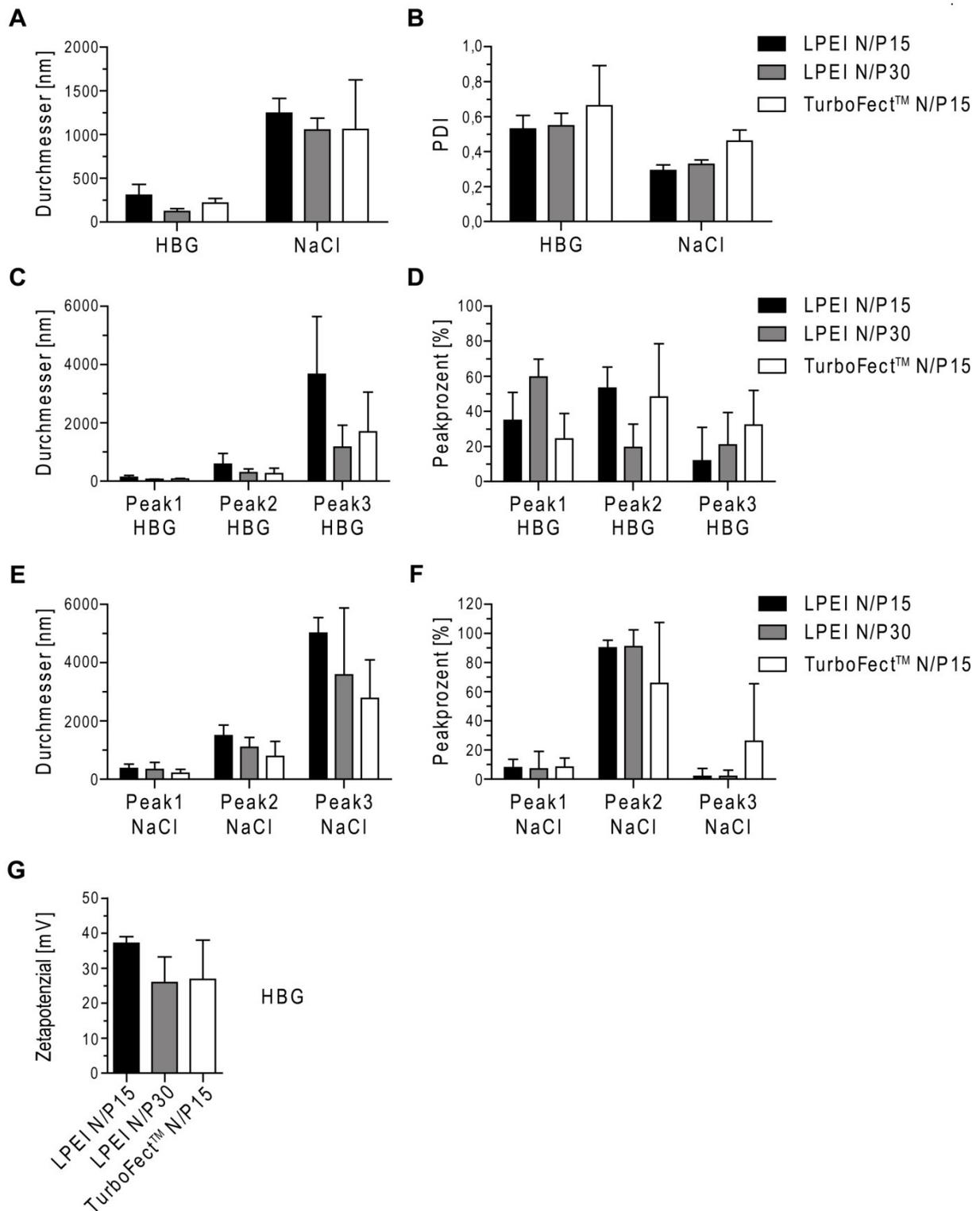


Abb. 10: Größenverteilungen und Zetapotenziale von Polyplexen mit LPEI und TurboFect™ in HBG oder 150 mM NaCl. Die Polyplexe wurden in den jeweiligen Medien hergestellt und nach 15 min mittels DLS und ELS auf ihre Größe (A), Größenverteilung (B - F) und Ladungen (G) untersucht. Für die Größenverteilung wurden die PDIs (B) und die prozentualen Anteile (D + F) der durchschnittlich vorkommenden Polyplexgrößen (C + E) in HBG und NaCl mittels der Zetasizer Software 7.11 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. Je Experiment erfolgten Dreifachbestimmungen.

Anteile mittels der Zetasizer Software 7.11 (pro Polymer konnten mit der Software 3 Peaks bestimmt werden) ergab, dass 70-90% der in HBG hergestellten Polyplexe von LPEI und TurboFect™ einen mittleren Durchmesser von 50-500 nm besaßen, während etwa 10-30% >1 µm im mittleren Durchmesser groß waren (Abb. 10C + 10D; Abb. 30A). In NaCl besaßen dagegen nur 8% der Polyplexe einen mittleren Durchmesser von 50-500 nm. Die meisten Polyplexe (>90%) waren im mittleren Durchmesser >750 nm groß (Abb. 10E + 10F; Abb. 30B). Die Analyse des Zetapotenzials in HBG ergab sowohl für Polyplexe mit LPEI als auch für TurboFect™ Werte >+25 mV, was darauf hindeutet, dass die negativ geladene DNA vollständig komplexiert wurde (Abb. 10G). In NaCl konnte kein Zetapotenzial bestimmt werden, da hohe Salzkonzentration das Zetapotenzial zu stark beeinflussen (Clogston und Patri 2011).

Polyplexe der neu synthetisierten P(Ox)-Polymere hatten bei einem N/P-Verhältnis von 15 in HBG mittlere Durchmesser von 150-200 nm unabhängig von dem verwendeten *Stealth*-Polymer (P(MeOx) oder P(EtOx)) oder dem P(AmOx)-Anteil (Abb. 11). Einzig Polyplexe mit P(CarbOx) (P(E₁₁₈A₆₁C₁₂)) hatten einen geringeren mittleren Durchmesser von etwa 100 nm (Abb. 11A). Damit lagen die durchschnittlichen Polyplexgrößen im Bereich von TurboFect™ und waren kleiner als bei LPEI (N/P15) (Abb. 10A).

Die PDIs der Polyplexe mit P(Ox)-Polymeren lag zwischen 0,3 und 0,6, was auf Akkumulationen ähnlich wie bei LPEI und TurboFect™ hindeutet (Abb. 11B). In NaCl konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den Polyplexen mit P(MeOx) oder P(EtOx) festgestellt werden. Polyplexe mit P(MeOx)-Copolymeren, welche eine gradiente Polymeranordnung aufwiesen, und einem P(AmOx)-Anteil unter 60% (P(M₉₇A₅₅) + P(M₇₃A₈₉)) besaßen mittlere Durchmesser von 100-200 nm und PDIs von 0,05-0,1, was für eine sehr homodisperse Größenverteilung spricht (Abb. 11C + 11D). Die Erhöhung des P(AmOx)-Anteils auf 80% führte zu einem Anstieg der Polyplexgröße (mittlerer Durchmesser 350 nm) und des PDI (0,3) (Abb. 11C + 11D). Neben Polyplexen mit P(MeOx)-Copolymeren wurde auch für Polyplexe mit P(CarbOx) ein mittlerer Durchmesser von 180 nm gemessen, jedoch war der PDI mit 0,4 ähnlich den Polyplexen in HBG vergleichsweise hoch (Abb. 11C + 11D). Im Gegensatz zu den Polyplexen mit P(MeOx)-Copolymeren ergaben sich für die Polyplexe mit P(EtOx)-Copolymeren (statistische Copolymere) mittlere Durchmesser von >700 nm und PDIs >0,3. Die Zetapotenziale der Polyplexe waren ähnlich wie bei LPEI >+25 mV (Abb. 10E). Einzig Polyplexe mit P(E₁₁₈A₆₁C₁₂) ergaben Zetapotenziale von +16 mV, welche durch die Amin- und Carboxylgruppen in den Seitenketten des Polymers begründet sind. Aufgrund des positiven Zetapotenzials kann aber von einer vollständigen DNA-Komplexierung ausgegangen werden.

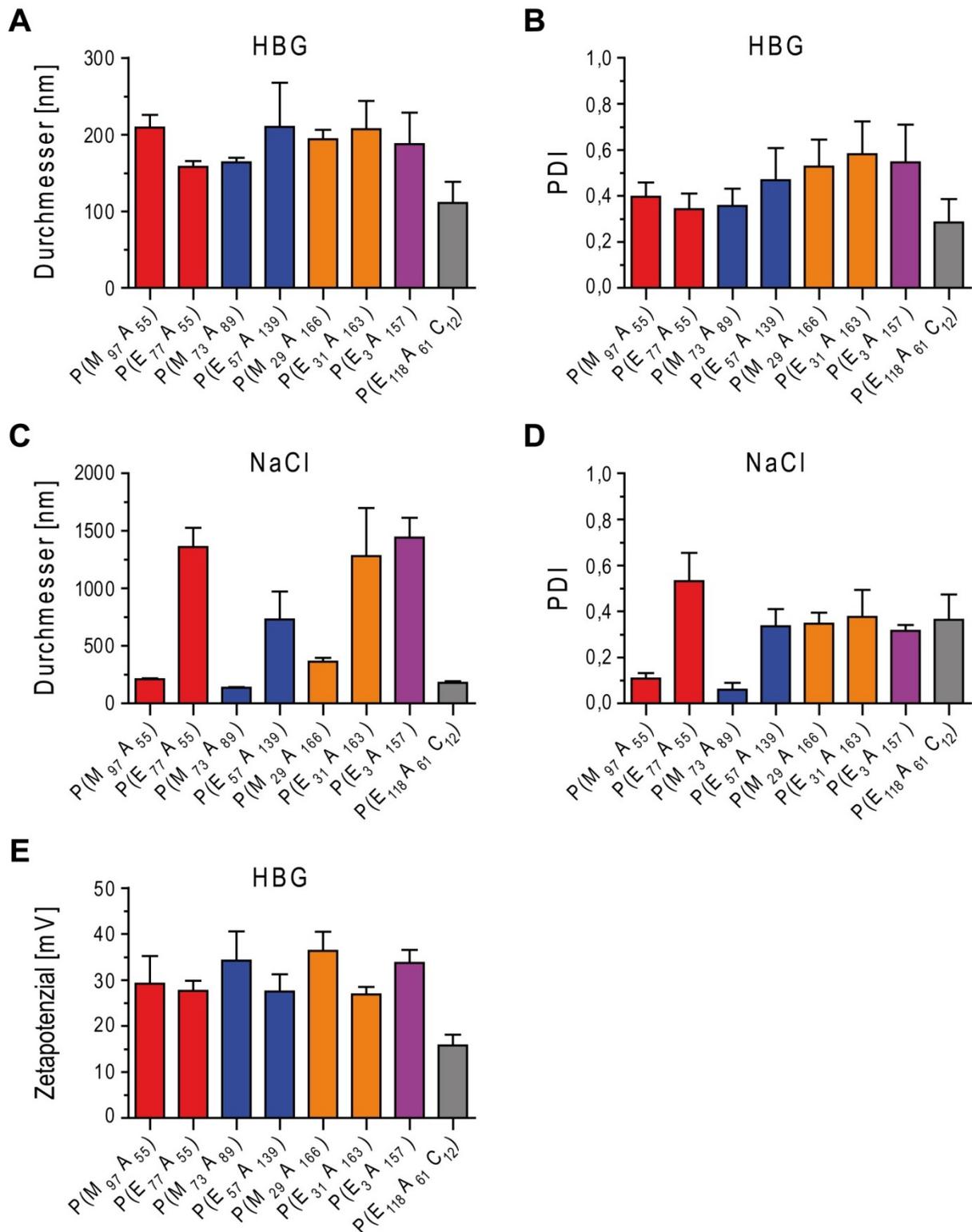


Abb. 11: Größenverteilungen und Zetapotenziale von P(Ox)-basierten Polyplexen in HBG und 150 mM NaCl. Die Polyplexe der jeweiligen P(Ox)-Polymere wurden mit einem N/P-Verhältnis von 15 in HBG oder NaCl hergestellt und nach 15 min mittels DLS und ELS auf ihre Größe (A + C), PDIs (B + D) und Ladungen (E) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. Je Experiment erfolgten Dreifachbestimmungen.

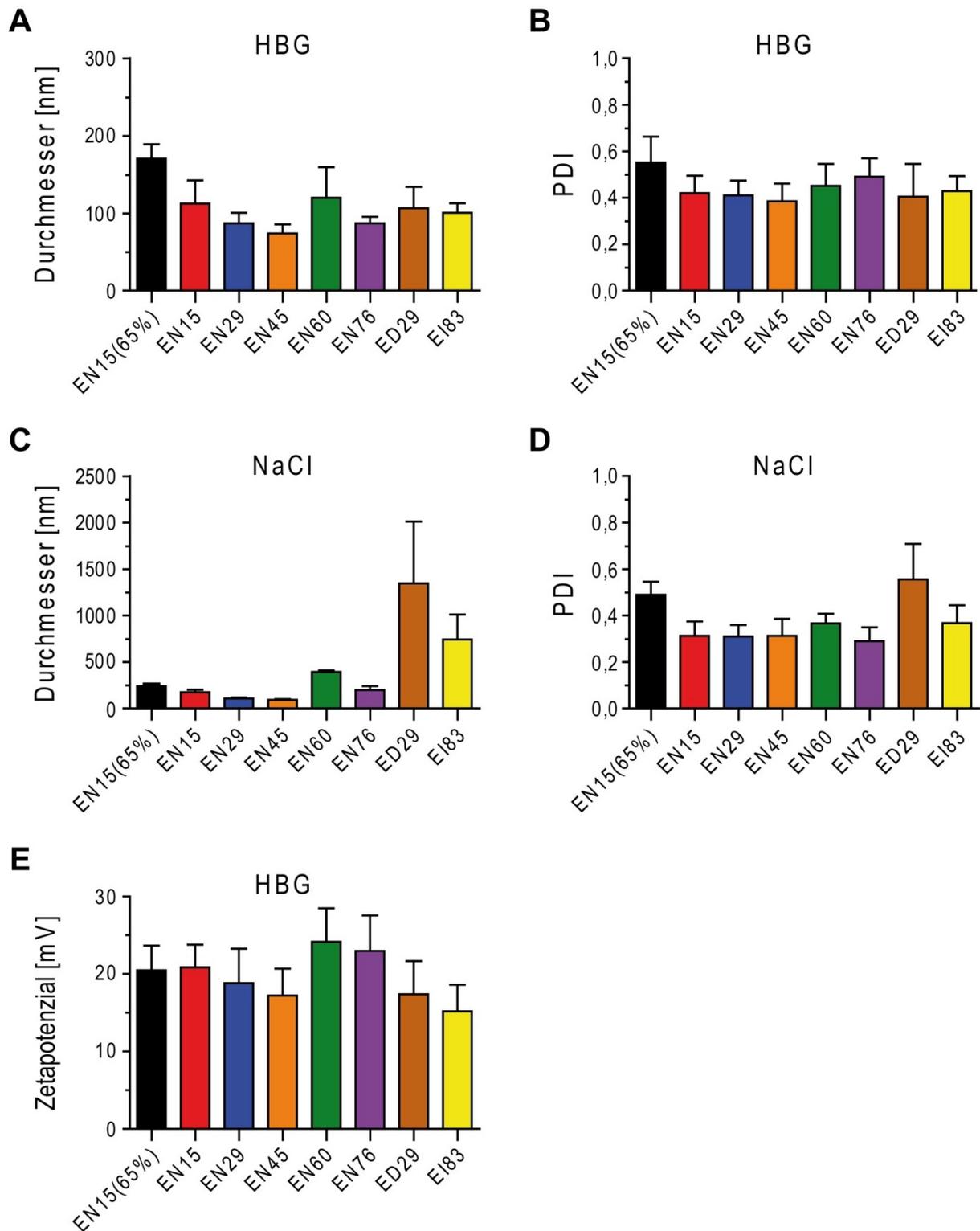


Abb. 12: Größenverteilungen und Zetapotenziale von Polyplexen mit P(AGE)-Copolymeren mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen in HBG und 150 mM NaCl. Polyplexe mit einem N/P-Verhältnis von 15 wurden in den jeweiligen Medien hergestellt. Nach 15 min wurden die Polyplexe mittels DLS und ELS auf ihre Größe (A + C) und Ladungen (E) untersucht. Für die Größenverteilung wurden zusätzlich die PDIs bestimmt (B + D). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. Je Experiment erfolgten Dreifachbestimmungen.

Für Polyplexe mit P(AGE)-Polymeren wurden in HBG bei einem N/P-Verhältnis von 15 mittlere Durchmesser von 70-170 nm und PDIs ähnlich wie bei LPEI und den P(Ox)-Polymeren von 0,4-0,6 erhalten (Abb. 12A + 12B). Polyplexe mit primären Aminen hatten auch in NaCl mittlere Durchmesser von 90-390 nm, welche damit vergleichbar zu den P(MeOx)-Polyplexen waren und deutlich kleinere Durchmesser aufwiesen als Polyplexe mit LPEI oder P(EtOx)-Copolymeren in NaCl (Abb. 12C). Im Gegensatz dazu ergaben P(AGE)-Polymere mit tertiären Aminen (ED29) oder Imidazolen (EI83) deutlich größere Polyplexe (Abb. 12C). Die PDI-Werte waren in NaCl mit 0,3-0,6 ähnlich denen in HBG (Abb. 12D). Beim Zetapotenzial wurden in HBG geringere Werte im Vergleich zu den Polyplexen mit den meisten P(Ox)-Polymeren oder LPEI bestimmt (Abb. 12E). Die DNA-Komplexierung sollte aber aufgrund der positiven Werte auch für diese Polymere vollständig abgelaufen sein.

So konnte mit diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Polymer-DNA-Interaktionen nicht von den Polymeranordnungen abhängig sind, die Polymeranordnungen aber bei der Polyplexherstellung in verschiedenen Medien wichtig sind. Daneben spielen die Polymerfunktionalitäten eine wichtige Rolle bei der DNA-Komplexierung.

5.2 Zytotoxizität von Polymeren in ausgewählten Zelllinien

Zur Nutzung neuer Polymere als Gentransfersysteme spielt neben der DNA-Interaktion die Toxizität von Polymeren eine wichtige Rolle. Häufig werden zur Polyplexbildung Polymere im Überschuss zugegeben, um eine bessere Zellaufnahme und Freisetzung aus den Endosomen zu erzielen (Yue et al. 2011). Diese freien Polymere können aber zur Toxizität beitragen, da die freien kationischen Ladungen der Polymere (z.B. Amine) mit den anionischen Ladungen der Zellmembranen (z.B. Phospholipide + Proteine) wechselwirken können (Yue et al. 2011). Weiterhin werden nach der Dissoziation der Polyplexe innerhalb der Zelle die Polymere wieder freigesetzt und können ebenfalls zur Toxizität beitragen. Aufgrund dessen wurde für die verschiedenen Polymere die Toxizität bestimmt. Zur Untersuchung wurde der MTT-Test verwendet, welcher auf der Umwandlung von MTT zu Formazan durch metabolisch aktive Zellen beruht (Mosmann 1983). Für den Test wurden Hepa1-6 Zellen genutzt, da das Ziel dieser Arbeit eine selektive Behandlung von Lebererkrankungen war und diese Zellen hierfür eine geeignete Zelllinie darstellen. Als Referenz wurde die Fibroblastenzelllinie L929 verwendet, da diese Zellen eine hohe Endozytoserate und Sensitivität gegenüber zytotoxischen Effekten besitzen (Fischer et al. 2003, Remy-Kristensen et al. 2001, Zhao et al. 2011).

In der Literatur ist beschrieben, dass LPEI zytotoxische Effekte zeigt (Fischer et al. 1999, Fischer et al. 2003). Untersuchungen in den beiden Zelllinien ergaben einen identischen

Verlauf der toxischen Effekte mit steigender Konzentration an LPEI (Abb. 13A). Auch der Vergleich zwischen LPEI und TurboFect™ zeigte einen vergleichbaren Grad der Toxizität in Hepa1-6 Zellen. Aufgrund dieser vergleichbaren Toxizitäten wurde das kommerziell erworbene TurboFect™ nur in Hepa1-6 Zellen untersucht. Die zytotoxische Konzentration, bei welcher 50% der Zellen keine metabolische Aktivität mehr zeigten (CC_{50}), lag sowohl für LPEI in L929 und Hepa1-6 Zellen als auch für TurboFect™ in Hepa1-6 Zellen zwischen 25-33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Abb. 13B).

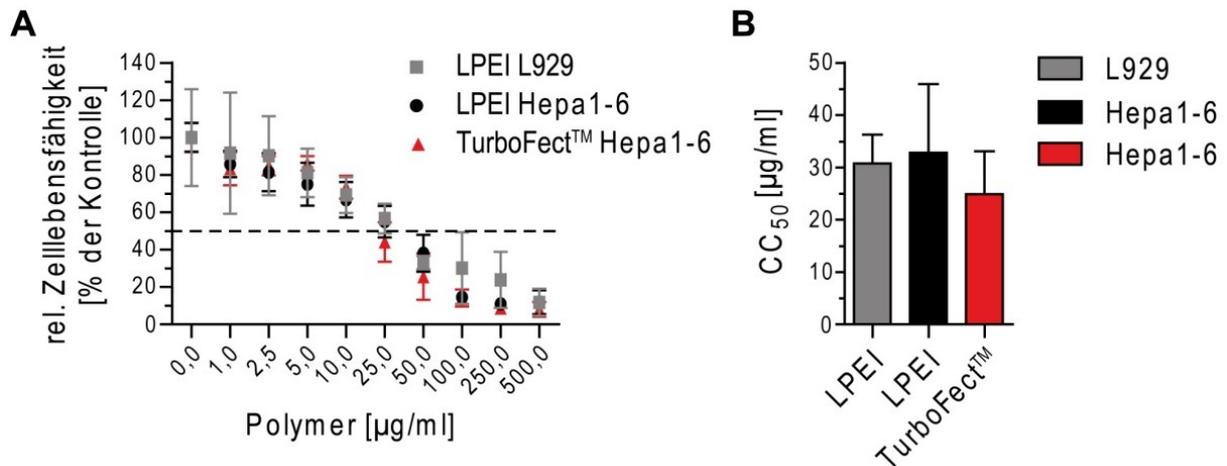


Abb. 13: Untersuchungen zur Zytotoxizität von LPEI und TurboFect™ in Hepa1-6 und L929 Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit LPEI oder TurboFect™ in aufsteigender Konzentration inkubiert und es wurde anschließend die metabolische Aktivität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Hierbei wurden sowohl LPEI in L929 Zellen als auch LPEI und TurboFect™ in Hepa1-6 Zellen untersucht (A) und anschließend die zytotoxische Konzentration, bei der 50% der Zellen keine metabolische Aktivität mehr zeigten (CC_{50}), bestimmt (B). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. Je Experiment wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Für die neu synthetisierten P(Ox)-Polymere ergab sich ähnlich den DNA-Interaktionen eine Abhängigkeit der Zytotoxizität vom Anteil an P(AmOx) (Abb. 14). Sowohl in Hepa1-6 Zellen (Abb. 14A + 14C + 14E) als auch in L929 Zellen (Abb. 14B + 14D + 14F) zeigten sich mit Erhöhung des P(AmOx)-Anteils verstärkt toxische Wirkungen. Diese spiegelten sich auch in der CC_{50} wider (Abb. 14E + 14F).

Zwischen Polymeren mit P(MeOx) oder P(EtOx) gab es bei gleichem P(AmOx)-Anteil nur geringe Unterschiede in den CC_{50} -Werten, so dass die Verwendung der beiden *Stealth*-Polymere keinen Unterschied machte. Weiterhin machte auch die Anordnung der Polymere (gradient gegenüber statistisch) keinen Unterschied in der Toxizität in den beiden Zelllinien. Vergleicht man die beiden Zelllinien, wiesen Hepa1-6 Zellen im Vergleich zu L929 Zellen erst bei etwas höheren Konzentrationen an Polymeren zytotoxische Effekte auf (Abb. 14E + 14F). Das Einbringen von P(CarbOx) erbrachte im Vergleich zu dem Polymer mit etwa gleichem P(AmOx)-Anteil (P(E₇₇A₅₅)) eine tendenzielle Verminderung der Zytotoxizität vor allem bei

höheren Konzentrationen in Hepa1-6 und L929 Zellen (Abb. 14C + 14D). Ein Vergleich der CC_{50} der P(Ox)-Polymere mit LPEI und TurboFect™ (Abb. 13B) zeigte eine ähnliche Toxizität für P(E₃A₁₅₇) in Hepa1-6 Zellen (Abb. 14E). In L929 Zellen waren dagegen schon die CC_{50} -Werte von P(Ox)-Polymeren mit einem Amingehalt >80% (P(M₂₉A₁₆₆), P(E₃₁A₁₆₃) + P(E₃A₁₅₇)) (Abb. 14F) vergleichbar zu LPEI.

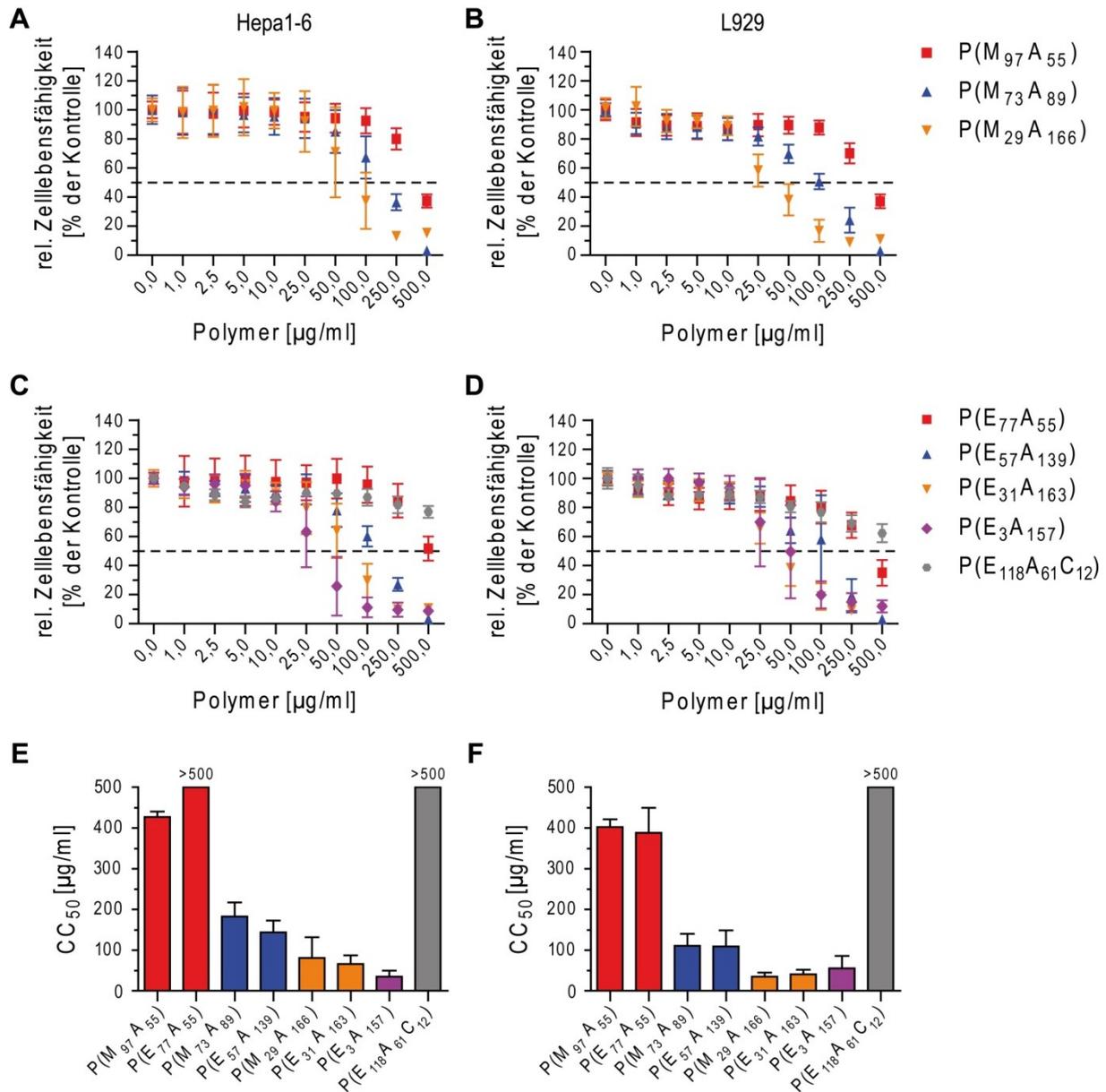


Abb. 14: Zytotoxizitäten von P(Ox)-Polymeren mit unterschiedlichem P(AmOx)-Anteil in Hepa1-6 und L929 Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen Polymeren in aufsteigender Konzentration inkubiert. Anschließend wurde die metabolische Aktivität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Hierbei wurde die Zytotoxizität in Hepa1-6 (A + C + E) und in L929 Zellen (B + D + F) untersucht. Zur besseren Veranschaulichung wurde ebenfalls die CC_{50} bestimmt (E + F). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. Je Experiment wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Für die P(AGE)-Polymere konnte eine Abhängigkeit der Zytotoxizität vom Anteil an primären Aminen bei vollständiger Funktionalisierung der P(AGE)s gefunden werden (Abb. 15). In beiden Zelllinien wurden für EN15 geringere toxische Effekte detektiert als für EN15(65%), bei welchem nur 65% der P(AGE)s mit primären Aminen funktionalisiert wurden (Abb. 15A – 15D).

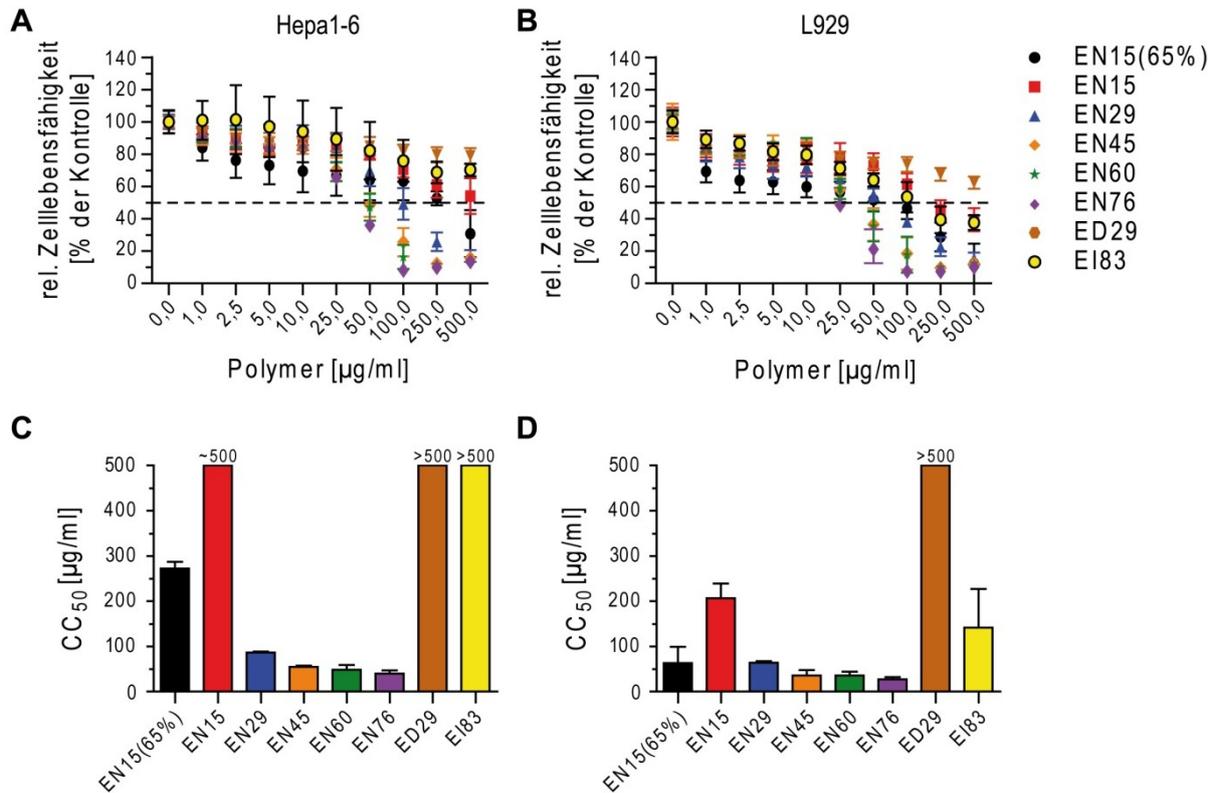


Abb. 15: Zytotoxizitäten von P(AGE)s mit unterschiedlichen Funktionalitäten in Hepa1-6 und L929 Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den verschiedenen P(AGE)-Polymeren in aufsteigender Konzentration inkubiert und anschließend die metabolische Aktivität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Hierbei wurde sowohl die Zytotoxizität in Hepa1-6 (A + C) als auch in L929 Zellen (B + D) analysiert. Im Anschluss wurde die CC₅₀ zur besseren Veranschaulichung bestimmt (C + D). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. Je Experiment wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Aufgrund des hohen Verbrauchs an EN15(65%) zum Erreichen eines N/P-Verhältnisses von 15 (für Konzentrationsangaben siehe Tabelle 3), der schlechteren DNA-Interaktionen (Abb. 9) und der toxischen Effekte vor allem in L929 Zellen (Abb. 15D) wurde EN15(65%) für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die Erhöhung an Amin-funktionalisierten P(AGE)s führte zu einem deutlichen Anstieg der toxischen Effekte, welche für EN76 vergleichbar mit der Zytotoxizität von LPEI war (Abb. 13B). Polymere mit tertiären Aminen (ED29) oder Imidazolen (EI83) zeigten vor allem in Hepa1-6 Zellen nur geringe toxische Effekte (Abb. 15A + 15C), während in L929 Zellen für EI83 Toxizitäten detektiert werden konnten (Abb. 15B + 15D). Ähnlich zu den Analysen der Toxizitäten der P(Ox)-Polymere konnte auch bei den P(AGE)-Polymeren ein Unterschied in den Toxizitäten zwischen den

beiden Zellkulturen gefunden werden. Hierbei zeigten wiederum die L929 Zellen (Abb. 15B + 15D) schon bei geringeren Polymerkonzentrationen stärkere toxische Effekte im Vergleich zu den Hepa1-6 Zellen (Abb. 15A + 15C). So wurden u.a. für EN15(65%), EN15 und EI83 deutlich stärkere Toxizitäten in L929 Zellen als in Hepa1-6 Zellen detektiert. Für Polymere mit höherem Amingehalt waren die Unterschiede der Toxizitäten zwischen beiden Zelllinien dagegen geringer, auch wenn tendenziell die CC_{50} -Werte in L929 Zellen unter denen in Hepa1-6 Zellen lagen (Abb. 15C + 15D).

Zusammenfassend zeigte sich für die Zytotoxizität der verschiedenen Polymere eine Abhängigkeit von den Funktionalisierungen, dem Anteil des primären Amins und der Wahl der Zellen, aber nicht von der Polymeranordnung.

5.3 Polyplexaufnahme in Hepa1-6 und L929 Zellen

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der neu synthetisierten Polymere in Bezug auf die DNA-Interaktionen und die Toxizität, auch im Vergleich zu LPEI und TurboFect™, wurden im nächsten Schritt die Polyplexe auf ihre Aufnahme in Zellen analysiert. Dazu wurde die pDNA mit YOYO™-1 markiert. Dieser Farbstoff interkaliert ähnlich wie EB in DNA, zeigt aber keine Verdrängung durch Polymerzugabe. Nach Inkubation der Zellen mit YOYO™-1 markierten Polyplexen ist es möglich, mittels Durchflusszytometrie die Aufnahmeeffizienz in verschiedenen Zelllinien zu bestimmen. Weiterhin kann mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie der Weg der Polyplexe intrazellulär verfolgt werden. Für die Durchflusszytometrie wurde neben der Aufnahmeeffizienz auch die MFI bestimmt, die ein Maß für die Polyplexanzahl je Zelle darstellt. Durch Waschen der Zellen nach der Inkubation mit den Polyplexen wurde gewährt, dass Polyplexe, die extrazellulär an die Zellmembran gebunden haben, bei der Analyse nicht mit einbezogen wurden.

Zunächst wurde mit LPEI und TurboFect™ die Polyplexaufnahme in Hepa1-6 und L929 Zellen untersucht (Abb. 16). Hierbei wurde sowohl nach 2 h (Abb. 16A + 16B; 16E + 16F) als auch nach 4 h Inkubation (Abb. 16C + 16D; 16G + 16H) die Polyplexaufnahme analysiert. Weiterhin wurde der Einfluss des Mediums mit 10% (D10) oder ohne FKS (D0) auf die Polyplexaufnahme ermittelt. 2 h nach Inkubation mit den LPEI- oder TurboFect™-Polyplexen konnten mehr als 50% YOYO™-1-positive Hepa1-6 Zellen detektiert werden (Abb. 16A). Zusätzlich wurde für die MFIs ein Anstieg im Vergleich zur Kontrolle (YOYO™-1-markierte pDNA) festgestellt (Abb. 16B). Tendenzielle Unterschiede zeigten sich bei der Variation des N/P-Verhältnisses von LPEI, dem Vergleich mit TurboFect™ als auch in der Wahl des Mediums. So führte bei LPEI eine Erhöhung des N/P-Verhältnisses von 15 (Tabelle 3) auf 30

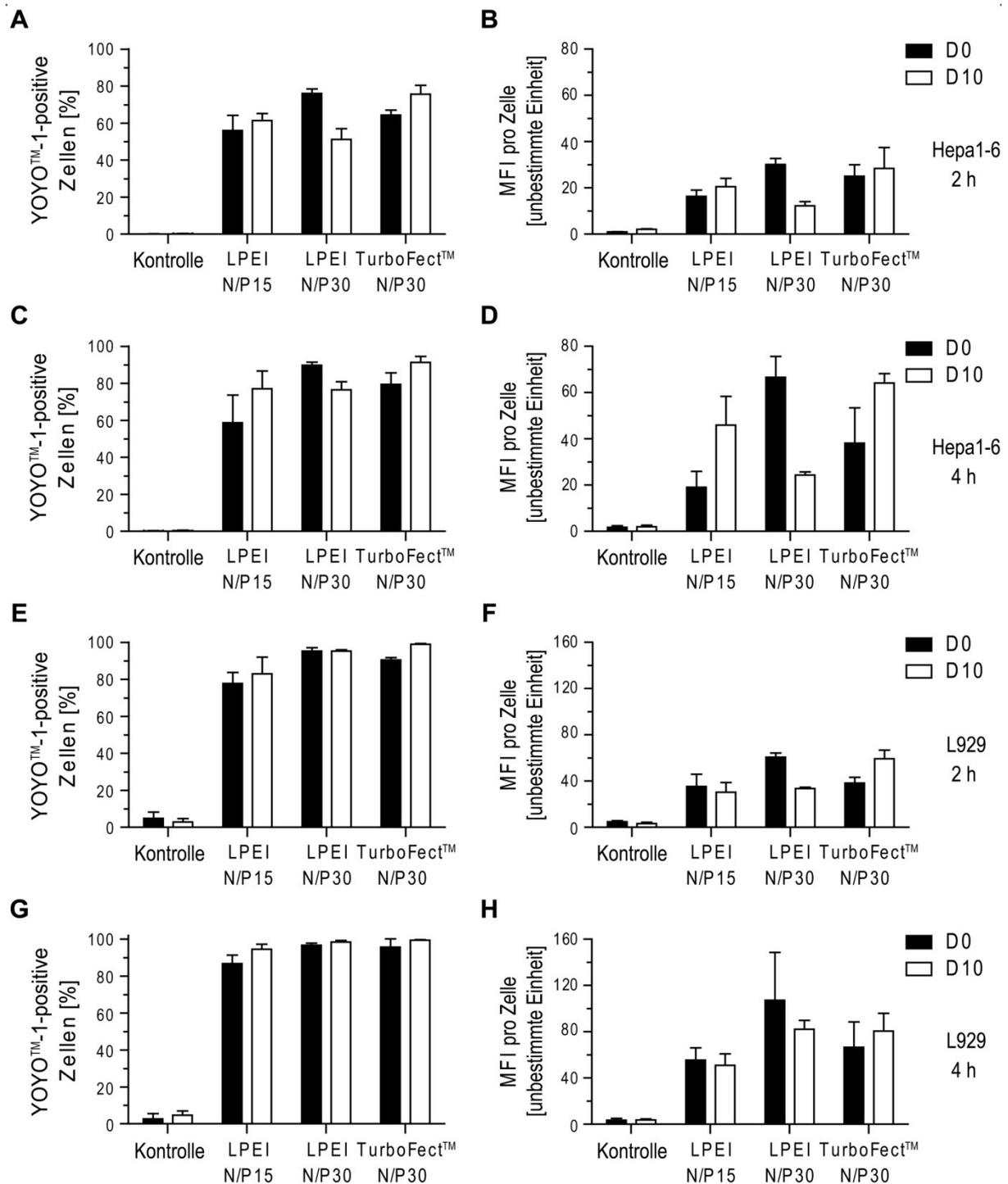


Abb. 16: Aufnahme von Polyplexen mit LPEI oder TurboFectTM in Hepa1-6 und L929 Zellen. Zum Verfolgen der Aufnahmeraten wurde die pDNA mit YOYOTM-1 markiert und Polyplexe mit LPEI oder TurboFectTM gebildet. Anschließend wurden Hepa1-6 (A - D) und L929 Zellen (E - H) für 2 h (A + B, E + F) oder 4 h (C + D, G + H) mit den Polyplexen in Medium mit 10% (D10) oder ohne FKS (D0) inkubiert und die YOYOTM-1-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Neben der Aufnahmerate wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) bestimmt, die ein Maß für die mittlere Polyplexanzahl je Zelle widerspiegeln. Als Kontrolle wurde YOYOTM-1-markierte pDNA genutzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

zu einer verstärkten Aufnahme von Polyplexen in D0, jedoch zu einer tendenziellen Verminderung in D10 (Abb. 16A + 16B). Für TurboFect™ wurde ein N/P-Verhältnis von 30 gewählt, da dieses dem Polymer/DNA-Verhältnis von 3-4 µg/µg DNA entsprach, welches vom Hersteller empfohlen wird (Thermo 2018). Interessanterweise zeigte sich für TurboFect™ ein geringerer Einfluss des Mediums auf die Polyplexaufnahme. So wurden TurboFect™-Polyplexe in D10 sehr effektiv aufgenommen (Abb. 16A + 16B). Nach 4 h konnte eine weitere Steigerung in den YOYO™-1-positiven Hepa1-6 Zellen und den MFIs für die meisten Konditionen erzielt werden (Abb. 16C + 16D). Ein Vergleich von Hepa1-6 und L929 Zellen ergab eine größere Anzahl an YOYO™-1-positiven L929 Zellen und höhere MFI-Werte bei gleicher Kondition (Abb. 16E-16H), was auch schon in der Literatur beschrieben wurde (Remy-Kristensen et al. 2001). Vor allem für LPEI und TurboFect™ mit einem N/P-Verhältnis von 30 konnte nach 2 h für über 90% der Zellen ein positives YOYO™-1-Signal detektiert werden (Abb. 16E). Weiterhin wurden höhere MFIs für LPEI in D0 festgestellt, während für TurboFect™-Polyplexe höhere MFIs in D10 gefunden wurden (Abb. 16F). Aufgrund der großen Anzahl an YOYO™-1-positiven L929 Zellen nach 2 h konnte nach 4 h einzig in den MFIs ein deutlicher Anstieg gemessen werden (Abb. 16G + 16H). Durch den Anstieg der MFIs nach 4 h wurde für die nachfolgenden Polymere diese Kondition gewählt.

Für die Polyplexe mit P(Ox)-Polymeren und einem N/P-Verhältnis von 30 (Tabelle 3) konnte eine hohe Aufnahme nach 4 h in beiden Zelllinien bestimmt werden (Abb. 17). Dabei war der Prozentsatz an YOYO™-1-positiven Hepa1-6 und L929 Zellen in D0 bei P(Ox)-Polyplexen mit einem Amingehalt >50% vergleichbar mit den Werten für LPEI (Abb. 16C + 16D; 16G + 16H). Interessanterweise waren in Hepa1-6 Zellen die MFI-Werte bei den P(Ox)-Polyplexen mit einem Amingehalt von 40-80% im Vergleich zu LPEI deutlich erhöht (Abb. 16D + Abb. 17B). Dagegen zeigte sich für die L929 Zellen nur für P(Ox)-Polyplexe mit einem Amingehalt von 60-80% ein Anstieg in den MFI-Werten verglichen mit LPEI (Abb. 16H + Abb. 17D). In D10 konnten tendenziell geringere Aufnahmeleistungen und MFIs in Hepa1-6 Zellen im Vergleich zu LPEI gefunden werden (Abb. 16C + 16D, Abb. 17A + 17B). Die Aufnahmeleistungen und MFIs von P(Ox)-Polyplexen mit einem Amingehalt von 60-80% waren in D10 in L929 Zellen ähnlich zu denen von LPEI (Abb. 16G + 16H, Abb. 17C + 17D). Es konnten für alle Polyplexe außer mit P(E₁₁₈A₆₁C₁₂) in D0 unabhängig von den *Stealth*-Polymeren P(MeOx) und P(EtOx) über 70% YOYO™-1-positiv Zellen detektiert werden (Abb. 17A + 17C). Hierbei zeigte sich, dass Polyplexe mit P(Ox)-Polymeren und einem Amingehalt von etwa 40% (P(M₉₇A₅₅) + P(E₇₇A₅₅)) tendenziell geringer aufgenommen werden als Polymere mit einem Amingehalt >50% (Abb. 17A + 17C). Polyplexe mit P(E₁₁₈A₆₁C₁₂) zeigten keine Aufnahme, weder in Hepa1-6 (Abb. 17A + 17B) noch in L929 Zellen (Abb. 17C + 17D). Der Vergleich der beiden Zelllinien ergab ähnlich zu LPEI tendenziell erhöhte Aufnahmeleistungen und MFIs in L929 Zellen. Ein deutlicher Unterschied wurde in den

YOYOTM-1-positiven Hepa1-6 Zellen und den MFIs der beiden Zelllinien in Abhängigkeit von der Anwesenheit von FKS im Medium detektiert.

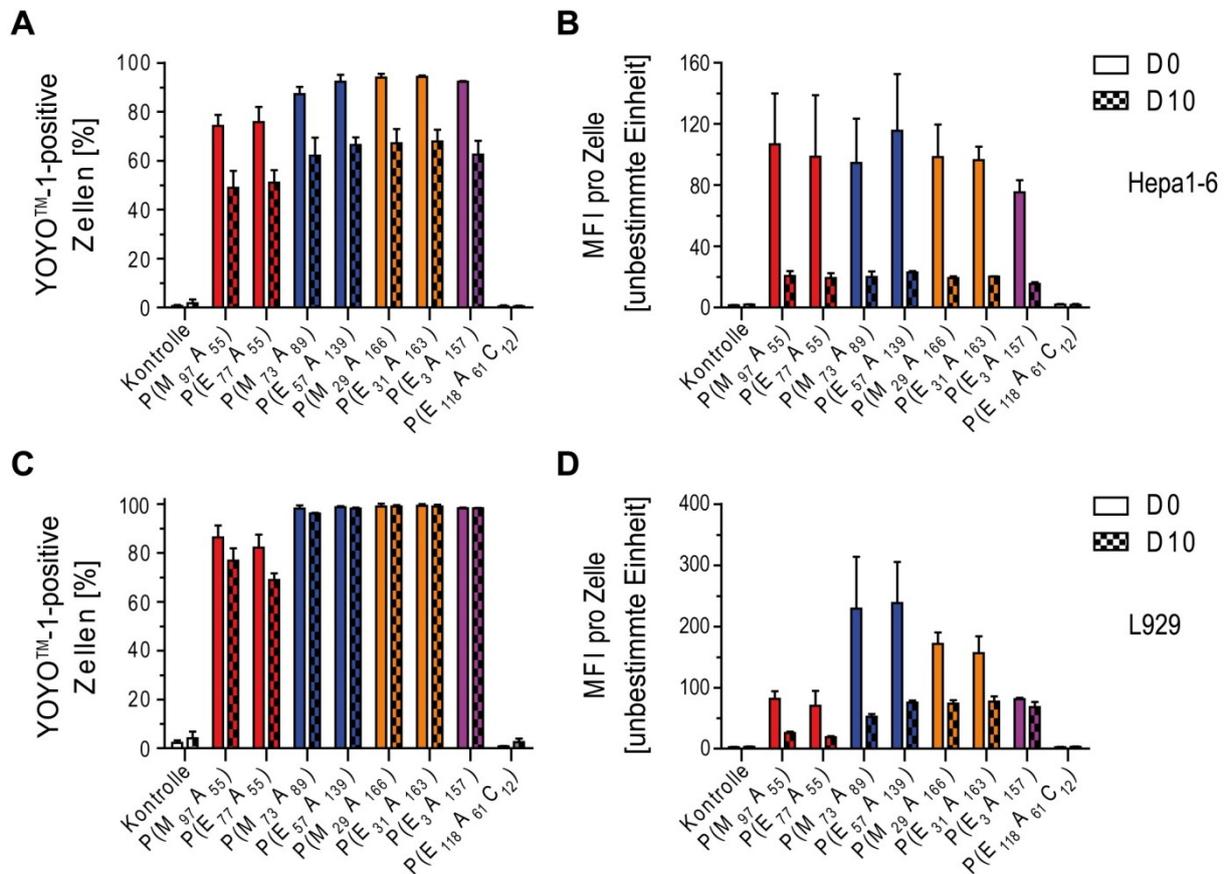


Abb. 17: Aufnahme von P(Ox)-Polyplexen in Hepa1-6 und L929 Zellen. Die pDNA wurde mit YOYOTM-1 markiert und anschließend Polyplexe mit den jeweiligen P(Ox)-Polymeren bei einem N/P-Verhältnis von 30 in HBG gebildet. Hepa1-6 (A + B) und L929 Zellen (C + D) wurden für 4 h mit den Polyplexen in Medium mit 10% (D10) oder ohne FKS (D0) inkubiert und die Aufnahmezeiten mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Neben den YOYOTM-1-positiven Zellen wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) bestimmt, die ein Maß für die Polyplexanzahl je Zelle widerspiegeln. YOYOTM-1-markierte pDNA wurde als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

Während in D0 MFI-Werte von 75-116 (Hepa1-6 Zellen) bzw. 71-238 (L929 Zellen) gefunden wurden, waren die MFI-Werte in D10 zum Teil deutlich geringer, was auf eine geringere Anzahl an Polyplexen je Zelle schließen lässt (Abb. 17B + 17D).

Für die P(AGE)-Polyplexe wurde ein N/P-Verhältnis von 15 (Tabelle 3) gewählt, da bei diesem N/P-Verhältnis schon sehr gute DNA-Interaktionen gezeigt werden konnten (Abb. 9) und damit auch mögliche toxische Effekte in den Zellen reduziert werden können (Abb. 15). Hierbei zeigten sich für P(AGE)-Polyplexe mit primären Aminen unterschiedliche Aufnahmezeiten und MFIs im Vergleich zu LPEI (Abb. 18). So waren für Hepa1-6 Zellen in D0 für EN15 die Werte für YOYOTM-1-positiven Zellen und MFIs geringer, für EN29 vergleichbar

und für EN45, EN60 und EN76 sogar größer als die für LPEI (Abb. 16C + 16D, Abb. 18A + 18B).

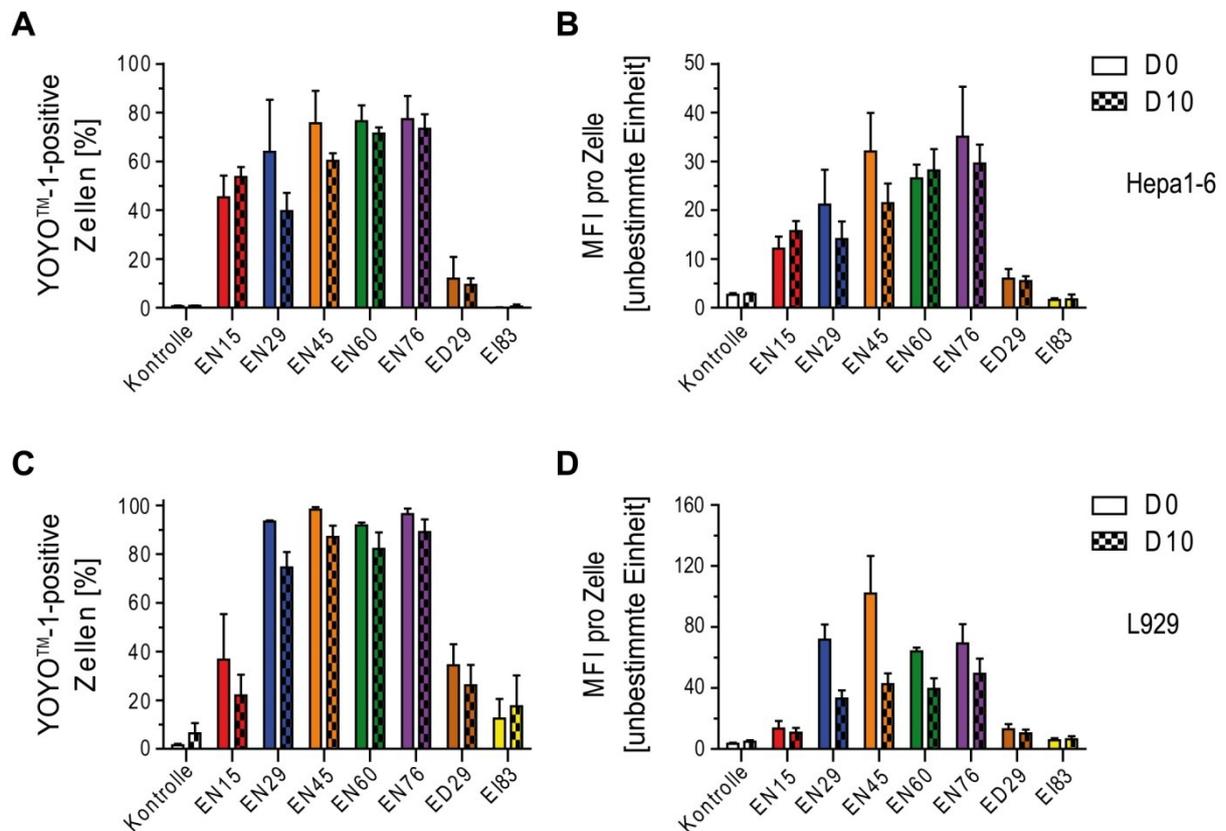


Abb. 18: Aufnahme von Polyplexen mit P(AGE)-Polymeren in Hepa1-6 und L929 Zellen. Nach Markierung der pDNA mit YOYOTM-1 und anschließender Polyplexbildung mit den jeweiligen P(AGE)-Polymeren bei einem N/P-Verhältnis von 15 in HBG wurden Hepa1-6 (A + B) und L929 Zellen (C + D) für 4 h mit den Polyplexen in Medium mit 10% (D10) oder ohne FKS (D0) inkubiert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Prozentsatz an YOYOTM-1-positiven Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) bestimmt, die ein Maß für die Polyplexanzahl je Zelle widerspiegeln. Als Kontrolle diente YOYOTM-1-markierte pDNA. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

In D10 waren dagegen nur EN60 und EN76 vergleichbar mit LPEI in den YOYOTM-1-positiven Hepa1-6 Zellen, auch wenn die MFIs unter denen von LPEI-Polyplexen lagen. Für L929 Zellen in D0 war die Anzahl der YOYOTM-1-positiven Zellen für EN29, EN45, EN60 und EN76 vergleichbar zu LPEI. Die MFI-Werte waren aber vor allem für EN45 deutlich größer als die Werte für LPEI (Abb. 16G + 16H, Abb. 18C + 18D). In D10 konnte dagegen eine tendenziell geringere Anzahl an YOYOTM-1-positiven Zellen und geringere MFI-Werte detektiert werden im Vergleich zu LPEI. Einzig EN76 zeigte vergleichbare Werte zu LPEI (Abb. 16G + 16H, Abb. 18C + 18D). Es konnte eine starke Abhängigkeit der Polyplexaufnahme von den unterschiedlichen Funktionalitäten festgestellt werden. So konnte in Hepa1-6 Zellen (Abb. 18A + 18B) für ED29 nur eine geringe, für EI83 keine Aufnahme gemessen werden. In L929 Zellen waren die Anzahl der YOYOTM-1-positiven Zellen und

MFI für Polyplexe mit ED29 und EI83 höher, erreichten aber nicht die Werte der Polyplexe mit vergleichbarem Anteil an primären Aminen (EN29 bzw. EN76) (Abb. 18C + 18D). Tendenzielle Unterschiede zwischen D0 und D10 konnten bei P(AGE)-Polyplexen mit einem Amingehalt >40% bei den YOYOTM-1-positiven Zellen und den MFIs der beiden Zelllinien gefunden werden. Dabei war die Anzahl der YOYOTM-1-positiven Zellen in Hepa1-6 Zellen in D10 um bis zu 25% und die MFIs um bis zu 12 reduziert (Abb. 18A + 18B), während in L929 die Anzahl der YOYOTM-1-positiven Zellen um bis zu 15% und die MFI um bis zu 60 vermindert waren (Abb. 18C + 18D).

Abschließend kann man zusammenfassen, dass für eine erfolgreiche Aufnahme von Polyplexen in die Zelle das Kulturmedium und die Zelllinie, aber auch der Amingehalt und die Funktionalisierung der Polymere entscheidend sind. Dagegen spielt die Polymeranordnung nur eine untergeordnete Rolle.

5.4 GFP-Expressionen in Hepa1-6 und L929 Zellen

Da die Aufnahmeraten für die meisten neu synthetisierten Polymere sehr vielversprechend waren, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sie potentiell für Gentherapien genutzt werden können. Hierzu wurde pDNA verwendet, die u.a. eine Sequenz für das grün fluoreszierende Protein GFP enthielt. So ist es möglich, Aussagen zur DNA-Freisetzung und Expressionseffizienz zu treffen, um weitergehend eine Selektion der am besten funktionierenden Polymere vornehmen zu können. Aufgrund des Einflusses des Kulturmediums bei den Aufnahmeraten der Polyplexe wurde auch für die Analysen der GFP-Expressionen die An- und Abwesenheit von FKS im Kulturmedium untersucht.

Zunächst wurden in den beiden Zelllinien die GFP-positiven Zellen nach Inkubation mit LPEI- oder TurboFectTM-Polyplexen mit einem N/P-Verhältnis von 30 (Tabelle 3) analysiert (Abb. 19). Dabei zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der GFP-positiven Zellen und MFIs von dem Kulturmedium. Sowohl in Hepa1-6 (Abb. 19A + 19B) für LPEI als auch in L929 Zellen (Abb. 19C + 19D) für LPEI und TurboFectTM konnte eine deutliche Reduktion der GFP-Expressionen in Anwesenheit von 10% FKS (D10) im Vergleich zu Medium ohne FKS (D0) gefunden werden. Einzig für Polyplexe mit TurboFectTM konnte in D10 in Hepa1-6 Zellen keine Reduktion in der Anzahl der GFP-positiven Zellen und den MFIs im Vergleich zu D0 detektiert werden (Abb. 19A + 19B).

Der Vergleich von LPEI und TurboFectTM zeigte in D0 eine ähnlich hohe Anzahl an GFP-positiven Zellen und MFIs in beiden Zelllinien. In D10 zeigten LPEI-Polyplexe in Hepa1-6

Zellen eine deutliche Reduktion der GFP-positiven Zellen und MFIs im Vergleich zu TurboFect™ (Abb. 19A + 19B).

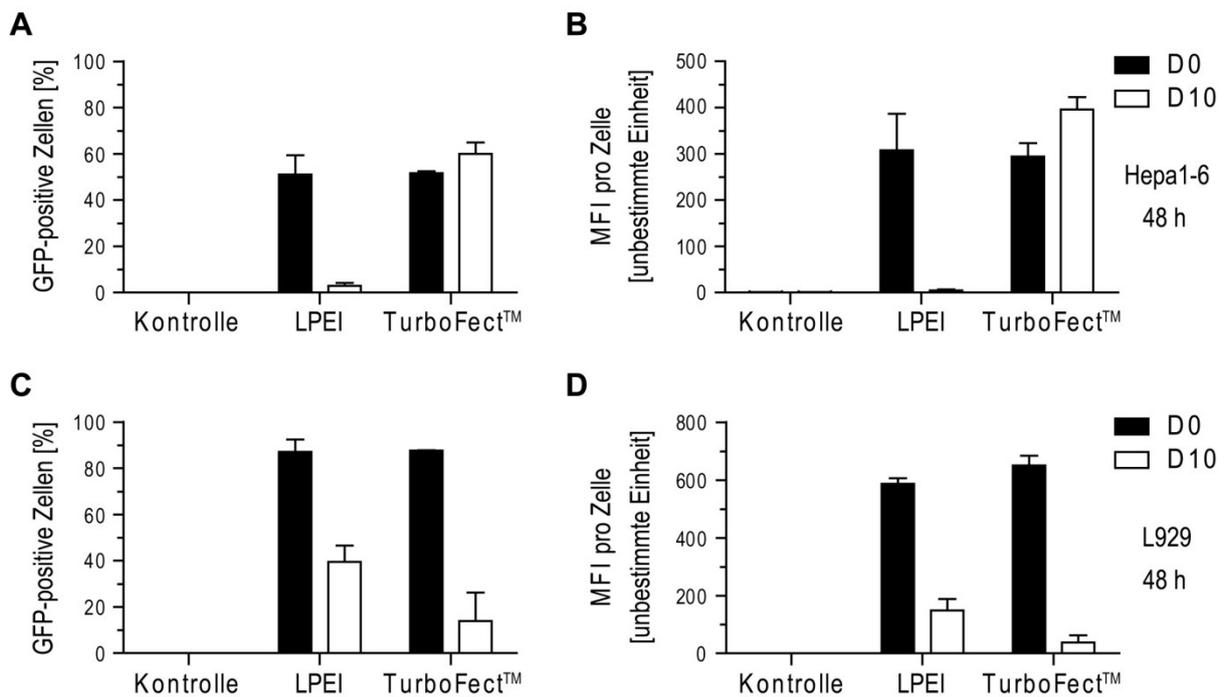


Abb. 19: GFP-Expressionen von Polyplexen mit LPEI und TurboFect™ nach 48 h in Hepa1-6 und L929 Zellen. Hepa1-6 (A + B) und L929 Zellen (C + D) wurden mit LPEI oder TurboFect™ bei einem N/P-Verhältnis von 30 für 4 h in Medium mit 10% (D10) oder ohne FKS (D0) transfiziert und anschließend weitere 44 h in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit pDNA für 4 h inkubiert. Die Analyse der GFP-positiven Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

Dagegen war in L929 Zellen die Anzahl an GFP-positiven Zellen und MFIs mit LPEI-Polyplexen tendenziell höher als mit TurboFect™-Polyplexen (Abb. 19C + 19D). Vergleicht man die Zelllinien untereinander, konnte eine geringere Anzahl an GFP-positiven Zellen und reduzierte MFIs in Hepa1-6 Zellen nach Transfektion mit LPEI-Polyplexen detektiert werden. So exprimierten 48 h nach Transfektion in D0 nur etwa 50% der Zellen GFP (Abb. 19A). In L929 Zellen waren es dagegen fast 90% (Abb. 19C). Weiterhin war auch in D10 die Expressionsrate an GFP in L929 Zellen mit LPEI-Polyplexen deutlich höher. Die Verwendung des kommerziell erhältlichen TurboFect™ zeigte 48 h nach Transfektion in D0 keine wesentliche Verbesserung der GFP-Expressionslevel in Hepa1-6 Zellen im Vergleich zu LPEI, jedoch wurden in D10 ähnliche GFP-Expressionen wie in D0 erreicht (Abb. 19A + 19B). In L929 Zellen wurde dagegen eine deutliche Reduktion in der Anzahl der GFP-positiven Zellen und den MFIs nach Transfektion mit TurboFect™-Polyplexen detektiert (Abb. 19C + 19D).

Trotz vielversprechender Ergebnisse in den Aufnahmezeiten der verschiedenen Polyplexe mit den neu synthetisierten P(Ox)-Polymeren (>75% an YOYOTM-1-positiven Hepa1-6 und L929 Zellen) (Abb. 17) führte keines der aus ihnen hergestellten Polyplexe bei einem N/P-Verhältnis von 30 (Tabelle 3) zu einer GFP-Expression vergleichbar mit LPEI oder TurboFectTM (Abb. 20). Für Hepa1-6 Zellen wurden nur 0-0,5% GFP-positive Zellen detektiert, während für LPEI und TurboFectTM ca. 50% der Zellen nach 48 h GFP exprimierten (Abb. 19A + Abb. 20A).

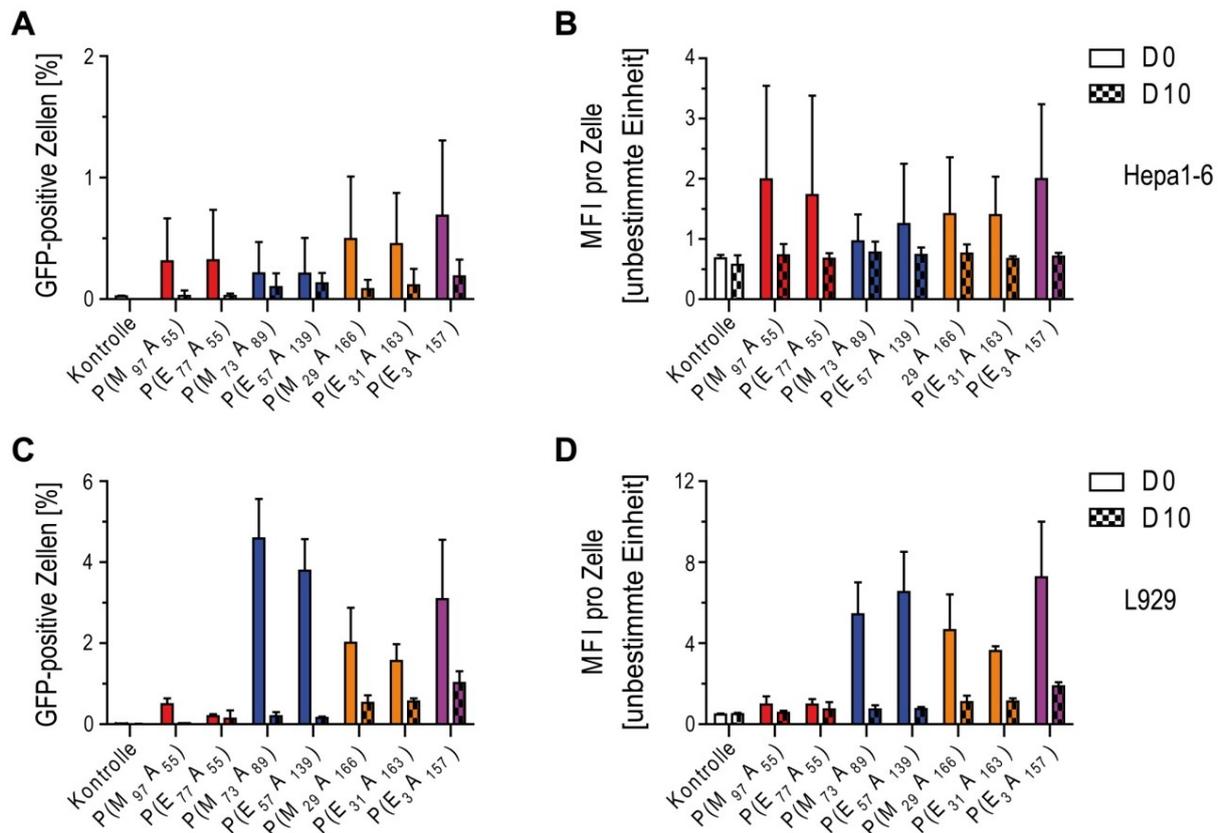


Abb. 20: Darstellung der Anzahl an GFP-positiven Zellen und MFIs von Polyplexen mit P(Ox)-Polymeren nach 48 h in Hepa1-6 und L929 Zellen. Nach Transfektion von Hepa1-6 (A + B) und L929 Zellen (C + D) mit Polyplexen der jeweiligen Polymere bei einem N/P-Verhältnis von 30 für 4 h in Medium mit 10% (D10) oder ohne FKS (D0) wurden die Zellen weitere 44 h in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Kontrolle wurden die Zellen mit pDNA für 4 h inkubiert. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

In L929 Zellen waren die GFP-Expressionsraten etwas höher als in Hepa1-6 Zellen, waren aber deutlich niedriger im Vergleich zu LPEI- und TurboFectTM-Polyplexen (ca. 90% GFP-positive Zellen) (Abb. 19C + Abb. 20C). Neben der Anzahl der GFP-positiven Zellen waren auch die MFIs in beiden Zelllinien deutlich reduziert im Vergleich zu LPEI (Abb. 19B + 19D, Abb. 20B + 20D). Die Verwendung von D10 zur Transfektion führte zur Reduktion der GFP-positiven Zellen und MFIs, die für eine Vielzahl der Polyplexe nicht über Kontrollniveau lagen

(Abb. 20). Der Amingehalt schien vor allem in L929 Zellen einen Einfluss auf die GFP-Expressionen zu haben, da hier bei Polyplexen mit einem Amingehalt >50% ($P(M_{73}A_{89}) + P(E_{57}A_{139})$) ein Anstieg der GFP-positiven Zellen detektiert werden konnte (Abb. 20C + 20D). In Hepa1-6 Zellen konnte dagegen kein Einfluss des Amingehaltes der Polymere mit der Anzahl an GFP-positiven Zellen festgestellt werden (Abb. 20A + 20B). Da Polyplexe mit ähnlichem Amingehalt tendenziell vergleichbare GFP-Expressionen zeigten, macht die Nutzung von P(MeOx) oder P(EtOx) keinen Unterschied. Auch die Polymeranordnung spielt für die GFP-Expressionen nur eine untergeordnete Rolle (Abb. 20).

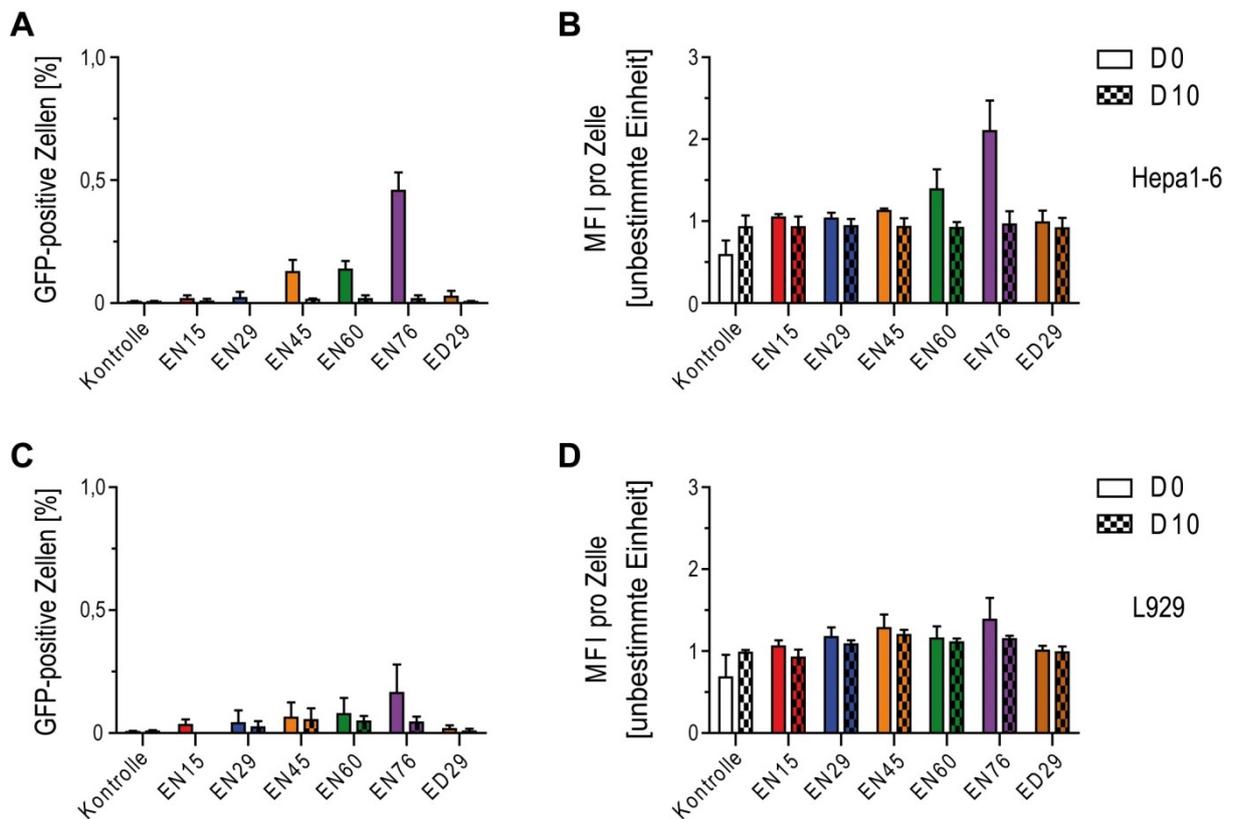


Abb. 21: GFP-Expressionen von P(AGE)-Polyplexen nach 48 h in Hepa1-6 und L929 Zellen. Hepa1-6 (A + B) und L929 Zellen (C + D) wurden mit Polyplexen der jeweiligen Polymere bei einem N/P-Verhältnis von 15 für 4 h in Medium mit 10% (D10) oder ohne FKS (D0) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 44 h in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen für 4 h mit pDNA inkubiert. Die Analyse der Anzahl an GFP-positiven Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

Ähnlich den P(Ox)-Polyplexen wurden auch für Polyplexe mit den neuen P(AGE)-Polymeren bei einem N/P-Verhältnis von 15 (Tabelle 3) nur extrem geringe GFP-Expressionsraten detektiert (Abb. 21). So war die Anzahl an GFP-positiven Zellen in D0 mit maximal 0,5% (EN76) in Hepa1-6 Zellen und 0,2% (EN76) in L929 Zellen deutlich unter den Werten von LPEI und TurboFect™ (50% bzw. 90%) (Abb. 19A + 19B; Abb. 21A + 21C). Für eine Vielzahl

an Polyplexen ergaben sich Werte in der Anzahl an GFP-positiven Zellen und den MFIs, die vergleichbar waren zur Kontrolle (Abb. 21). Vor allem die Verwendung von D10 verhinderte die GFP-Expressionen vollständig. So waren u.a. die MFIs in D10 in Hepa1-6 Zellen für die Kontrolle und EN76, dem besten Polymer in D0, bei 0,9 (Abb. 21B).

Damit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die meisten der hier untersuchten Polymere erfolgreich mit DNA interagieren und die daraus resultierenden Polyplexe effizient in die Zelle aufgenommen werden können, dies aber nicht zu Proteinexpressionen führen muss. Deshalb wurde angenommen, dass es intrazelluläre Ursachen gibt, die die Proteinexpressionen verhindern. Eine Möglichkeit zur Untersuchung dieser Annahme ist die Verwendung der Immunfluoreszenzmikroskopie zur Verfolgung der Polyplexe in der Zelle.

5.5 Mikroskopische Untersuchungen zur Polyplex-freisetzung in Hepa1-6 Zellen

Da keines der untersuchten Polyplexe vergleichbare GFP-Expressionen wie LPEI erreichte (Reduktion um bis zu 50% bei Hepa1-6 Zellen und um bis zu 90% bei L929 Zellen (Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 21)), wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die mögliche Ursache der verhinderten GFP-Expression untersucht. Um die Polyplexe in den Zellen zu verfolgen, ist es nötig, die Polyplexe sichtbar zu machen. Hierzu können u.a. die Polymere bzw. die DNA mit Farbstoffen markiert werden. Da zur Ermittlung der Aufnahmeeffizienzen mittels Durchflusszytometrie YOYOTM-1-markierte DNA genutzt wurde, wurde diese Markierung der DNA auch für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Nach Aufnahme der Polyplexe in die Zelle mittels Endozytose müssen die Polyplexe aus den endolysosomalen Organellen freigesetzt, die Polyplexe aufgelöst und die DNA in den Zellkern transportiert werden, um eine erfolgreiche Transkription zu gewährleisten (Luo und Saltzman 2000, Pack et al. 2005, Aied et al. 2013). Lysosomale Organellen können u.a. mit LysoTrackerTM markiert werden, einem Farbstoff, der nur im sauren pH-Bereich eine Fluoreszenz aufweist. Für die Untersuchungen wurden ausgewählte Polyplexe genutzt. Dazu wurden für die P(Ox)-Polyplexe neben dem Polymer mit dem höchsten Amingehalt (P(E₃A₁₅₇)) noch Polymere mit niedrigerem Amingehalt (P(M₇₃A₈₉) + P(E₅₇A₁₃₉)) verwendet, da man den Einfluss des Amingehaltes auf die Freisetzung aus den Lysosomen besser analysieren kann. Für die P(AGE)-Polyplexe wurden die Polymere ausgewählt, die in den GFP-Expressionsanalysen die besten Werte zeigten (Abb. 21). Zum Ausschluss von extrazellulären Polyplexen bei der Analyse wurde Trypanblau-Lösung zur Unterdrückung der Fluoreszenz verwendet.

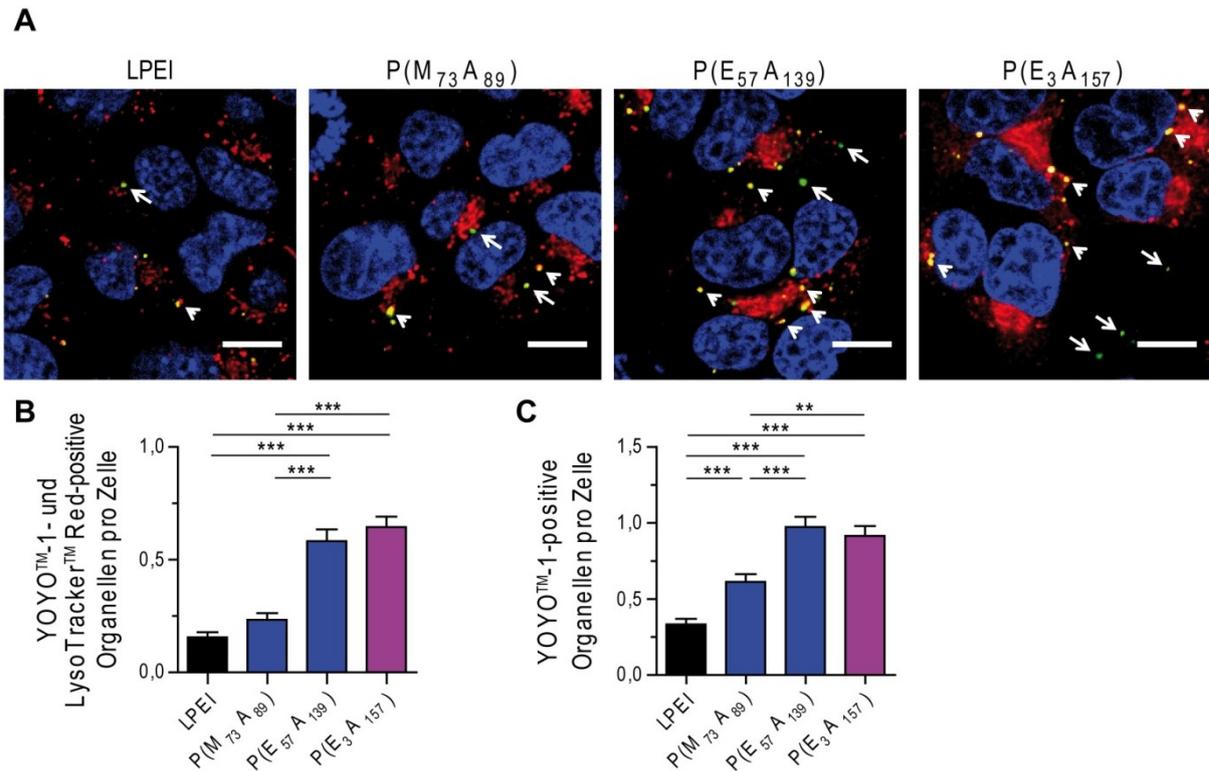


Abb. 22: Mikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von Polyplexen mit LPEI und P(Ox)-Polymeren in Hepa1-6 Zellen. Hepa1-6 Zellen wurden mit Polyplexen der jeweiligen Polymere bei einem N/P-Verhältnis von 30 für 4 h bei 37°C in Medium ohne FKS transfiziert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau), Lysosomen mit LysoTrackerTM Red (rot) und pDNA mit YOYOTM-1 (grün) markiert. Um extrazelluläre Polyplexe bei der Analyse auszuschließen, wurde Trypanblau-Lösung zum Unterdrücken der Fluoreszenz verwendet. A) Pfeile - YOYOTM-1-positive Organellen; Pfeilspitzen - YOYOTM-1- und LysoTrackerTM Red-positive Organellen; Maßstabsbalken 10 µm; B + C) Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten. Je Experiment wurden 20 Bilder analysiert. Der Shapiro-Wilk-Test ergab keine Normalverteilung. Aufgrund der Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test wurde anschließend der Dunn's *Multiple Comparison* Test durchgeführt. **, p<0,01; ***, p<0,001

Es konnten für alle Polyplexe mit LPEI oder den P(Ox)-Polymeren bei einem N/P-Verhältnis von 30 (Tabelle 3) sowohl YOYOTM-1- (Abb. 22A, Pfeile) als auch YOYOTM-1- und LysoTrackerTM Red-positiven Organellen (Abb. 22A, Pfeilspitzen) detektiert werden. Hierbei variierte die Anzahl der jeweiligen Organellen bei den verschiedenen Polyplexen (Abb. 22B + 22C). So konnte ein signifikanter Anstieg der YOYOTM-1- und LysoTrackerTM Red-positiven Organellen pro Zelle für Polyplexe mit P(EtOx) (P(E₅₇A₁₃₉)+ P(E₃A₁₅₇)) detektiert werden (Abb. 22B). Deutlich wurde dies anhand der Fluoreszenzbilder, in denen eine Kolokalisation von YOYOTM-1 und LysoTrackerTM Red detektiert wurde (Abb. 22A, Pfeilspitzen). Für P(M₇₃A₈₉) zeigten sich dagegen nur gering höhere Werte für die YOYOTM-1- und LysoTrackerTM Red-positiven Organellen pro Zelle als bei LPEI (Abb. 22B), auch wenn die Anzahl an YOYOTM-1 positiven Organellen signifikant erhöht war im Vergleich zu LPEI (Abb. 22A, Pfeile + Abb. 22C). Die Polyplexe mit P(EtOx) zeigten auch hier einen signifikanten Anstieg.

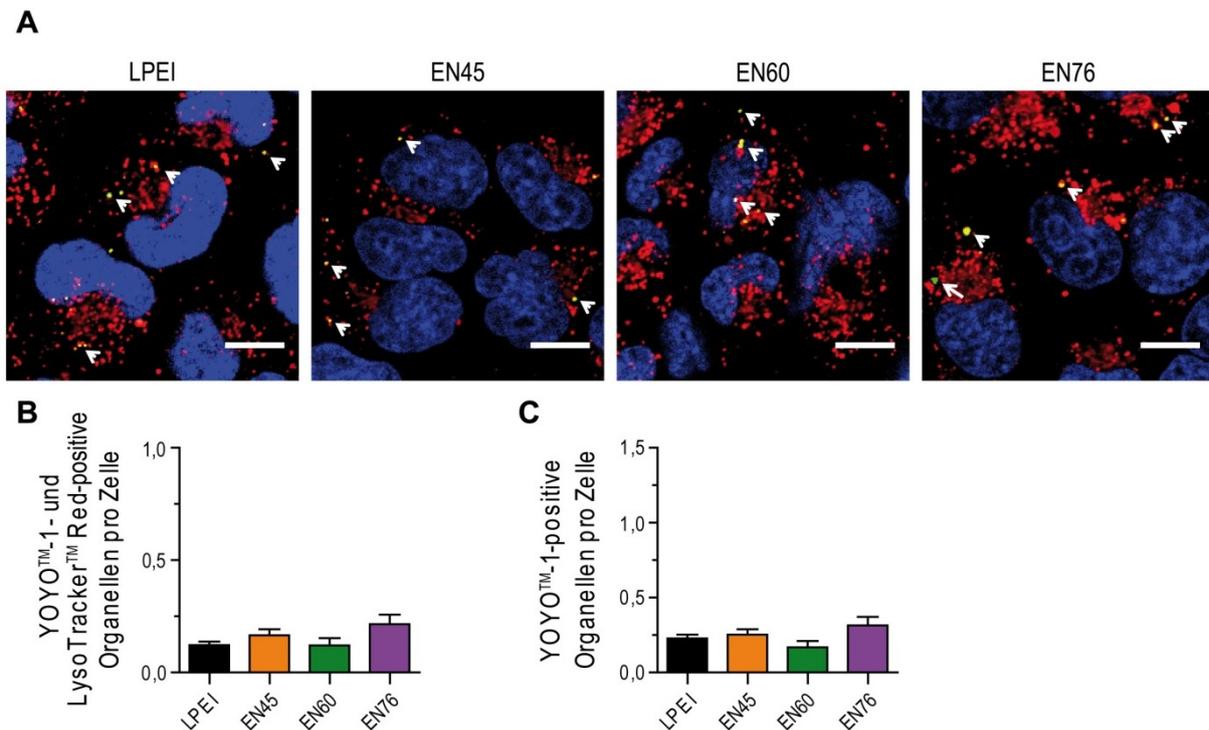


Abb. 23: Mikroskopische Untersuchungen in Hepa1-6 Zellen zur Lokalisation von P(AGE)-basierten Polyplexen. Hepa1-6 Zellen wurden in Medium ohne FKS mit Polyplexen der jeweiligen Polymere bei einem N/P-Verhältnis von 15 für 4 h bei 37°C transfiziert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau), Lysosomen mit LysoTracker™ Red (rot) und pDNA mit YOYO™-1 (grün) markiert. Zum Ausschluss von extrazellulären Polyplexen bei der Analyse wurde Trypanblau zum Unterdrücken der Fluoreszenz verwendet. A) Pfeile - YOYO™-1-positive Organellen; Pfeilspitzen - YOYO™-1- und LysoTracker™ Red-positive Organellen; Maßstabsbalken 10 μm; B + C) Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten. Je Experiment wurden 5-6 Bilder analysiert. Der Shapiro-Wilk-Test ergab keine Normalverteilung und der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine Signifikanz.

Für die Analyse von Polyplexen mit P(AGE)-Polymeren (Abb. 23) bei einem N/P-Verhältnis von 15 (Tabelle 3) konnten sowohl für die Anzahl von YOYO™-1- und LysoTracker™ Red-positiven Organellen (Abb. 23B) als auch für YOYO™-1-positive Organellen allein pro Zelle (Abb. 23C) kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu LPEI festgestellt werden. Zur Bestätigung, dass die verhinderten GFP-Expressionen mit den verschiedenen Polyplexen mit P(AGE)-Polymeren nicht an der Freisetzung aus dem endolysosomalen Transportweg lagen, wurde Chloroquin genutzt, welches die Zellmembranen der Lysosomen destabilisiert und so zu einer erhöhten Freisetzung von Polyplexen aus den Lysosomen führt (Erbacher et al. 1996). Dadurch kann es zu einem erhöhten Gentransfer und folglich zu erhöhten GFP-Expressionen kommen. Mit dieser Methode konnte die Anzahl an GFP-positiven Zellen und die MFIs in Hepa1-6 Zellen tendenziell gesteigert werden (Abb. 31A + 31B), erreichten aber nicht die GFP-Expressionsraten von LPEI-Polyplexen ohne Chloroquin in D0 (Abb. 19). Die Erhöhung des N/P-Verhältnisses auf 30 erbrachte im Vergleich zu einem N/P-Verhältnis von 15 (Abb. 21) ebenfalls eine geringe Erhöhung der GFP-positiven Zellen bei allen

untersuchten P(AGE)-Polyplexen, jedoch war auch hier der prozentuale Anteil an GFP-positiven Zellen nicht >1,5% (Abb. 32A + 32B).

So konnte mit der Immunfluoreszenzmikroskopie für die P(Ox)-Polyplexe gezeigt werden, dass die Freisetzung aus den endolysosomalen Organellen (YOYOTM-1- sowie YOYOTM-1- und LysoTrackerTM Red-positiven Organellen) verhindert ist (Abb. 22). Dagegen konnte für die P(AGE)-Polyplexe diese verhinderte Freisetzung nicht bestätigt werden.

Um Polymere in der Gentherapie als Polyplexe zu nutzen, müssen diese neben den in dieser Arbeit untersuchten Eigenschaften wie den DNA-Interaktionen auch das für eine Krankheit verursachende Protein mittels RNAi-Techniken auf Genebene ausschalten können. Bei verschiedenen Lebererkrankungen konnte eine Beteiligung von PI3Ks der Klasse 1 nachgewiesen werden (siehe Einleitung). Deswegen wurde für die Charakterisierung von möglichen neuen Polyplexen, welche eine Expressionseffizienz vermitteln, im zweiten Teil dieser Arbeit Untersuchungen zum PI3K-AKT-Signalweg in Hepatozyten, im Speziellen der PI3K γ , durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf der Etablierung von Methoden zur Aktivierung und Inhibition der PI3Ks der Klasse 1 in Hepa1-6 Zellen als weiteres Charakterisierungskriterium.

5.6 PI3K-Aktivitäten in der inflammatorischen Leber

Recknagel et al. (2012) konnten zeigen, dass während einer Sepsis die PI3K γ eine wichtige Rolle in der Leber spielt. Da bisher aber noch nicht bekannt war, ob während einer LPS-induzierten Immunantwort, welche eine Entzündungsreaktion ohne Beteiligung von Pathogenen darstellt, bzw. bei der Sepsis PI3K-Aktivierungen in der Leber festzustellen sind, wurden zunächst Leberhomogenate von naiven (unbehandelten), LPS-injizierten und septischen (PCI-Modell) WT-Mäusen angefertigt und im WB analysiert. Als Maß für die PI3K-Aktivität wurde die Phosphorylierung von AKT - einer Serin-Threonin-Kinase, die durch PI3Ks indirekt aktiviert wird - bestimmt. Dabei ist der in dieser Arbeit verwendete Antikörper spezifisch für die Phosphorylierung von AKT an Ser473. Für die Phosphorylierung an dieser Position ist in der Literatur bisher nur mTORC2 beschrieben (Sarbasov et al. 2005). Da mTORC2 eine PH-Domäne besitzt und somit zur Lokalisation in der Nähe von AKT PIP₃ benötigt (Liu et al. 2015), welches nur durch PI3Ks gebildet wird, korreliert die Phosphorylierung an Ser473 von AKT direkt mit der PI3K-Aktivität. Für die Analysen wurden Verhältnisse von phosphoryliertem AKT (p-AKT) zu Gesamt-AKT gebildet und die Kontrollwerte (p-AKT/AKT-Verhältnis der naiven Leberhomogenate) auf 1 normalisiert.

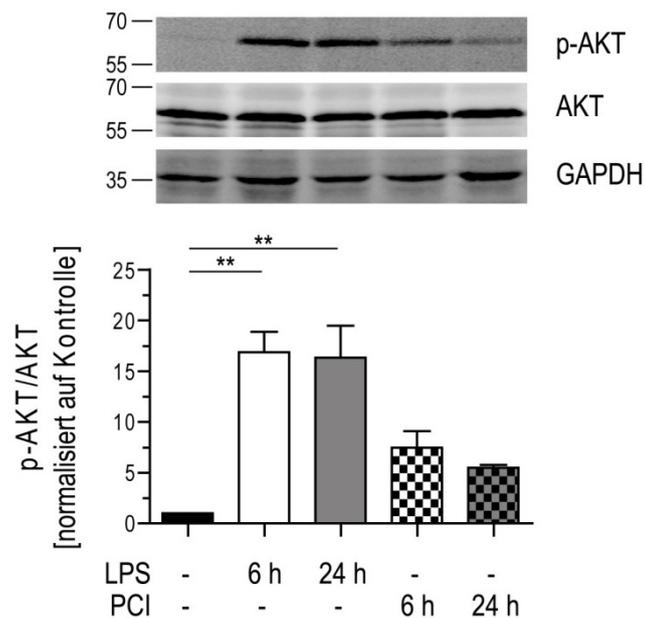


Abb. 24: Untersuchung des p-AKT/AKT-Verhältnisses in Leberhomogenaten von naiven, LPS-injizierten und septischen WT-Mäusen. Um eine PI3K-Aktivität nachzuweisen, wurde die Phosphorylierung von AKT, einer Serin-Threonin-Kinase, welche indirekt durch PI3Ks aktiviert wird, bestimmt. Ein deutlicher Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses, vor allem 6 h nach Induktion, in Leberhomogenaten von LPS-injizierten und von septischen Mäusen im Vergleich zu Leberhomogenaten von naiven Mäusen deutet auf eine Aktivität von PI3Ks in der Leber hin. Es wurden Leberhomogenate von jeweils 4 Mäusen analysiert. Die Kontrollwerte (p-AKT/AKT-Verhältnisse der naiven Leberhomogenate) wurden auf 1 normalisiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte mit jeweiligem Standardfehler. Der Shapiro-Wilk-Test ergab keine Normalverteilung. Aufgrund der Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test wurde der Dunn's *Multiple Comparison* Test durchgeführt. **, $p < 0,01$

Es zeigte sich, dass sowohl in Leberhomogenaten von LPS-injizierten als auch von septischen Mäusen das p-AKT/AKT-Verhältnis 6 h nach Induktion signifikant anstieg (Abb. 24). Während in Leberhomogenaten der LPS-injizierten Mäuse das p-AKT/AKT-Verhältnis um den Faktor 17 der Kontrolle anstieg und nach 24 h nur gering auf 16,3 sank, war in den Leberhomogenaten der septischen Mäuse ein Anstieg um den Faktor 7,5 nach 6 h zu verzeichnen, welcher nach 24 h auf etwa 5,5 sank (Abb. 24).

Für den Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses können verschiedene PI3K-Isoformen verantwortlich sein. Während für PI3K α und PI3K β ein ubiquitäres Vorkommen beschrieben ist (Knight et al. 2006, Zhao et al. 2006, Jia et al. 2008) und diese somit zum Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses beitragen können, wurde für PI3K γ , die von Recknagel et al. (2012) als relevantes Enzym während einer septischen Cholestase beschrieben wurde, bisher noch keine Expression in der Leber, im Speziellen den Hepatozyten, gezeigt. Deshalb wurde im

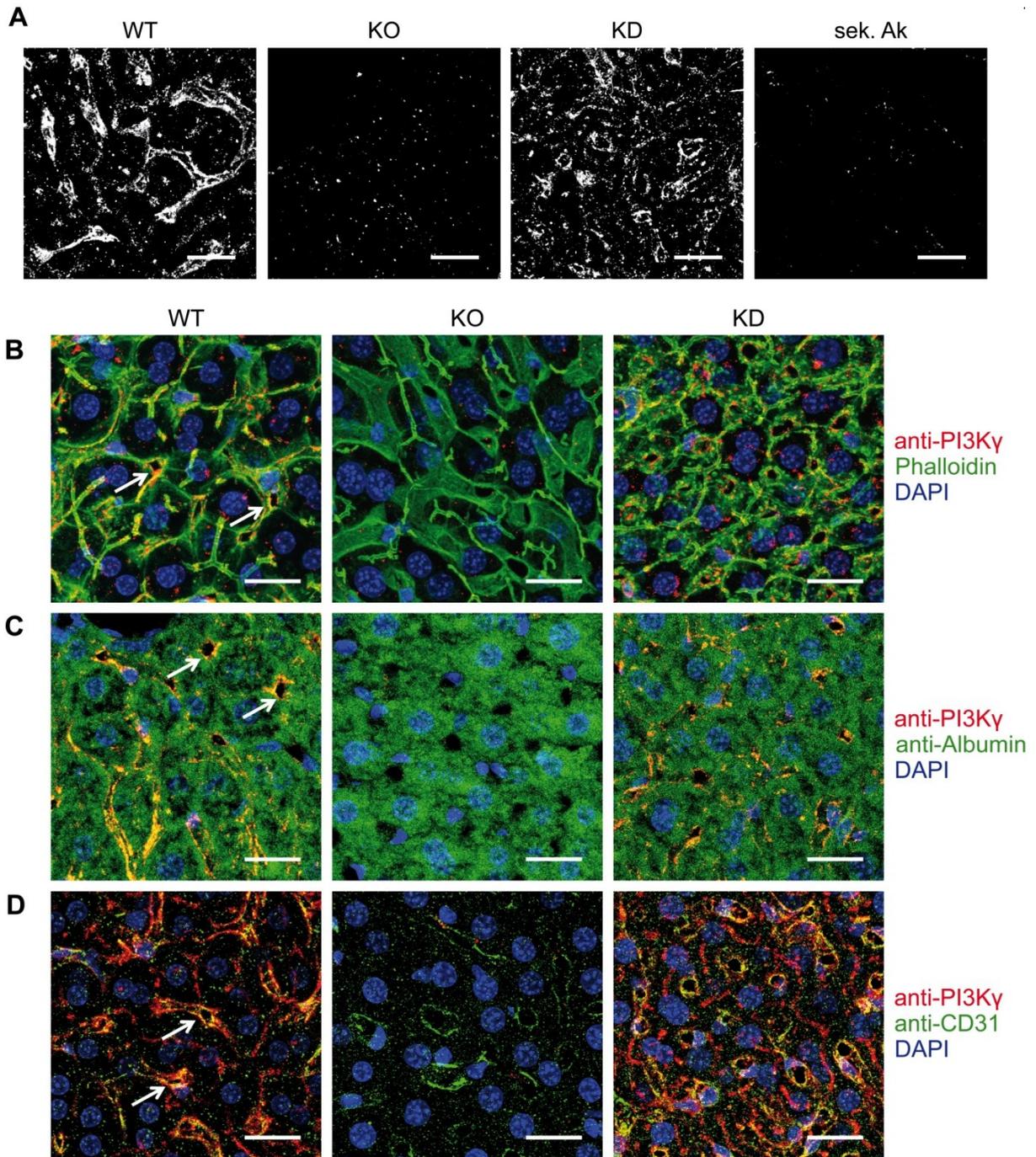


Abb. 25: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von PI3K γ in Leberschnitten. Hierzu wurden von 14 Wochen alten WT-, PI3K γ -KO- und PI3K γ -KD-Mäusen Leberschnitte von 14 μ m Schichtdicke angefertigt und mit Antikörpern gegen PI3K γ (rot) sowie in der Leber vorkommenden zelltypspezifischen Antigenen (grün) markiert. DAPI wurde zum Anfärben der Zellkerne genutzt. A) Darstellung von PI3K γ -Signalen in Leberschnitten von WT-, PI3K γ -KO- und PI3K γ -KD-Mäusen und der Signale der sekundären Antikörper allein in Leberschnitten von WT-Mäusen. B-D) Durch Nutzung zelltypspezifischer Marker konnte sowohl eine Kolokalisation von PI3K γ -Signalen mit dem Hepatozytenmarker Albumin als auch dem endothelspezifischen Marker CD31 detektiert werden (Pfeile). Phalloidin (grün) wurde genutzt, um Kolokalisationen von PI3K γ mit F-Aktin zu untersuchen. Maßstabsbalken 20 μ m

nächsten Schritt die PI3K γ -Expression in der Leber mittels IHC von Schnitten des Lobus lateralis sinister von WT-Mäusen sowie Mäusen, die keine (KO) oder eine inaktive PI3K γ (KD) besitzen, untersucht (Abb. 25). Dabei konnte zum ersten Mal PI3K γ in Leberschnitten immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abb. 25A). Es konnte gezeigt werden, dass Leberschnitte von WT-Mäusen und PI3K γ -KD-Mäusen ein deutliches PI3K γ -Signal aufwiesen, das sich in kortikalen Regionen anreicherte, während für Leberschnitte von PI3K γ -KO-Mäusen und von WT-Mäusen, inkubiert nur mit sekundärem Antikörper, solche Signale nicht detektiert wurden (Abb. 25A). Eine nähere Betrachtung der PI3K γ -Immunfärbung ergab zu meist lineare, aber auch verzweigte Strukturen, die mit F-Aktin kolokalisierten, welches mittels Phalloidin markiert wurde (Abb. 25B, Pfeile). Mit der Nutzung von Antikörpern gegen zelltypspezifische Antigene konnte eine Kolokalisation von PI3K γ -Signalen mit dem Hepatozytenmarker Albumin gezeigt werden (Abb. 25C, Pfeile), so dass geschlussfolgert werden kann, dass PI3K γ in Hepatozyten exprimiert wird. Zudem kolokalisierten PI3K γ -Signale auch mit dem endothelspezifischen Marker CD31 (Abb. 25D, Pfeile). Die Darstellung der einzelnen Kanäle für die IHC-Bilder zeigte, dass gelegentliche Schwankungen bei den PI3K γ -Intensitäten auftraten, die auf eine unterschiedlich starke Lokalisation der PI3K γ in verschiedenen Bereichen der Leber hindeuten (Abb. 33 - Abb. 35).

Mit diesen Ergebnissen und der vorangegangenen Arbeit (Recknagel et al. 2012) konnte darauf geschlossen werden, dass während Entzündungsprozessen in der Leber auch die PI3K γ eine wichtige Rolle in Hepatozyten spielt und als mögliches Behandlungsziel während der septischen Cholestase dienen kann.

5.7 Möglichkeiten der Untersuchung von PI3Ks-Aktivitäten in Hepa1-6 Zellen

In dieser Arbeit wurden die drei Methoden WB, ICC und ICW zur Untersuchung der PI3K-Aktivitäten in Hepa1-6 Zellen verwendet. Um diese Methoden zu etablieren, wurde zunächst auf bekannte Stimulanzen des RTK- und GPCR-abhängigen Signalweges zurückgegriffen. Dabei bindet Insulin an den Insulinrezeptor, welcher als RTK hauptsächlich PI3Ks der Klasse IA aktiviert, während Salbutamol an den β_2 -Adrenozeptor (GPCR) bindet und damit hauptsächlich PI3K γ aktiviert (Zucchetti et al. 2011, Taniguchi et al. 2006).

Abb. 26 zeigt die Analyse des p-AKT/AKT-Verhältnisses mittels WB. Die Stimulation mit Insulin führte erwartungsgemäß zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von AKT auf etwa das 160-fache. Durch eine Inhibition der PI3Ks mit WM konnte das p-AKT/AKT-Verhältnis nach Insulin-Stimulation um etwa 90% reduziert werden.

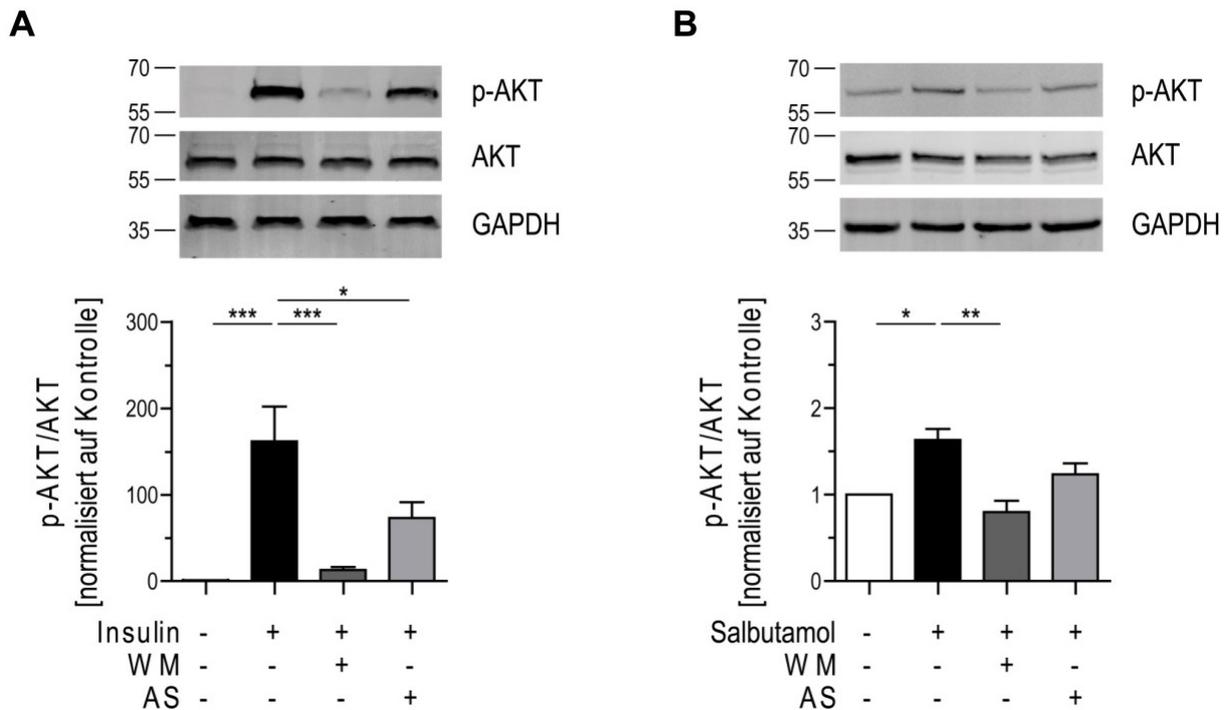


Abb. 26: Untersuchung des p-AKT/AKT-Verhältnisses nach Stimulation bzw. Inhibition von Hepa1-6 Zellen mittels WB. Hepa1-6 Zellen wurden 2 h in Medium ohne FKS inkubiert und anschließend der allgemeinen PI3K-Inhibitor WM oder der PI3K γ -selektive Inhibitor AS zugegeben. 1 h nach der Inkubation wurde mit Insulin (A) oder Salbutamol (B) für 5 min stimuliert. Es wurden 7 (Insulin) bzw. 6 (Salbutamol) Zellysate je Kondition analysiert. Die Kontrollwerte wurden auf 1 normalisiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. Pro Kondition ist der Mittelwert der p-AKT/AKT-Verhältnisse aller Experimente mit jeweiligem Standardfehler angegeben. In A) wurde aufgrund einer Normalverteilung im Shapiro-Wilk-Test und einer Signifikanz im *One-way-ANOVA* der Tukey's *Multiple Comparison* Test durchgeführt. In B) wurde keine Normalverteilung im Shapiro-Wilk-Test festgestellt und nach einer Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test der Dunn's *Multiple Comparison* Test durchgeführt. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$

Interessanterweise gab es auch mit dem PI3K γ -selektivem Inhibitor eine Reduktion des Verhältnisses von p-AKT/AKT um etwa die Hälfte (Abb. 26A). Im Gegensatz dazu wurde bei der Stimulation mit Salbutamol nur ein Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses um einen Faktor von 1,6 detektiert, der aber im Vergleich zur Kontrolle signifikant war. Dieser Anstieg konnte wiederum mit WM signifikant reduziert werden. Die Inhibition mit AS führte zu einer Verminderung des p-AKT/AKT-Verhältnisses um etwa die Hälfte (Abb. 26B). Die Untersuchung des p-AKT/AKT-Verhältnisses in Hepa1-6 Zellen nach Inkubation mit WM und AS ohne anschließende Stimulation konnte nicht quantifiziert werden, da die Werte der p-AKT-Intensitäten gelegentlich in der Kontrolle sowie nach Inkubation mit WM oder AS 0 betragen und so kein p-AKT/AKT-Verhältnis gebildet werden konnte (Abb. 36).

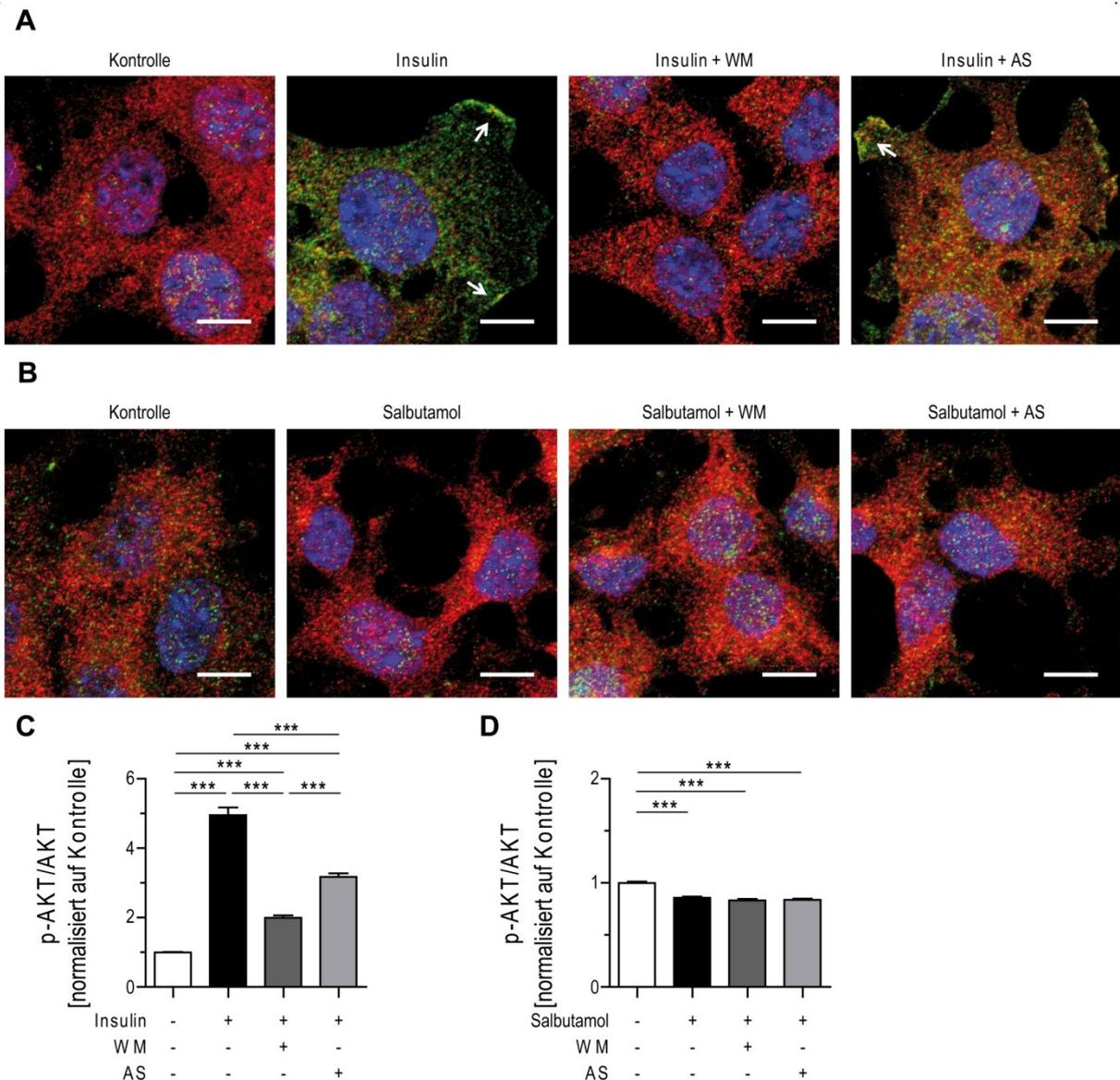


Abb. 27: Detektion von p-AKT und AKT nach Aktivierung und Inhibition von PI3Ks in Hepa1-6 Zellen mit Hilfe der ICC. Die Zellen wurden 2 h in Medium ohne FKS inkubiert und 1 h vor Stimulation der allgemeine PI3K-Inhibitor WM bzw. der PI3K γ -selektivem Inhibitor AS zugegeben. Anschließend wurde für 5 min mit Insulin (A + C) oder Salbutamol (B + D) stimuliert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert, die Immunsignale von anti-AKT sind in rot und von anti-p-AKT in grün dargestellt. Auffallend waren Anreicherungen von p-AKT nach Insulin-Stimulation in bestimmten Regionen der Zellmembran (Pfeile). Es wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt und je Experiment mehr als 60 Zellen analysiert. Dazu wurden Maximum-Intensitätsprojektionen (MIPs) der jeweiligen Bilder gebildet und anschließend in den jeweiligen Kanälen die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellen bestimmt. Die Kontrollwerte wurden auf 1 normalisiert. Pro Kondition ist der Mittelwert der p-AKT/AKT-Verhältnisse aller Experimente mit jeweiligem Standardfehler angegeben. Der Shapiro-Wilk-Test ergab keine Normalverteilung. Aufgrund der Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test wurde anschließend der Dunn's *Multiple Comparison* Test durchgeführt. ***, $p < 0,001$; Maßstabsbalken 10 μ m

Neben den WB-Analysen wurde auch mittels ICC untersucht, ob ähnliche Aktivierungsgrade detektiert werden können. Mit der ICC ist es möglich, auf Einzelzellebene von unterschiedlichen Zelltypen die Aktivierungsgrade durch verschiedene Stimulanzen zu

beobachten. Zudem können durch Nutzung von Reporter-genen (z.B. GFP) RNAi-Techniken in GFP-positiven Zellen im Vergleich zu GFP-negativen Zellen in der gleichen Zellkultur untersucht werden. Es zeigte sich für Insulin-stimulierte Hepa1-6 Zellen ähnliche Tendenzen in der Aktivierung und Inhibition der PI3Ks wie im WB (Abb. 27A + 27C). Die Quantifizierung der p-AKT/AKT-Verhältnisse ergab einen signifikanten Anstieg nach Insulin-Stimulation auf etwa das 5-fache der Kontrolle (Abb. 27C). Damit waren die Werte nach Stimulation etwa 32-fach geringer im Vergleich zu den WB-Werten (Abb. 26A + Abb. 27C).

Die Nutzung von WM führte zu einer signifikanten Reduktion der p-AKT/AKT-Verhältnisse, auch wenn diese im Vergleich zur Kontrolle immer noch signifikant höher waren. Die Analyse der Inhibition mit AS zeigte eine signifikante Verminderung um etwa die Hälfte im Vergleich zu den p-AKT/AKT-Werten nach Stimulation. Auch hier konnte aber weiterhin noch eine signifikante Erhöhung der p-AKT/AKT-Verhältnisse im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Weiterhin konnte ein signifikanter Unterschied zwischen WM und AS detektiert werden (Abb. 27C). Auffallend war zudem, dass sich nach Insulin-Stimulation in spezifischen Regionen der Zellmembran eine Anreicherung von p-AKT detektieren ließ, was auf einen Umbau des Zytoskeletts deutet (Abb. 27A; Pfeile).

Die Detektion von p-AKT nach Salbutamol-Stimulation war mit dieser Methode nicht möglich, so dass auch kein Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses festgestellt werden konnte. Interessanterweise zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle sogar ein signifikanter Abfall nach Stimulation oder Inhibition und anschließender Stimulation (Abb. 27B + 27D).

Eine weitere Methode zur Analyse von p-AKT/AKT-Verhältnissen stellt die Detektion im ICW dar, welcher für verschiedene Zelllinien und Proteine schon beschrieben ist (Khoury et al. 2013, Egorina et al. 2006, Hoffman et al. 2010, Lammi et al. 2015), aber für Hepa1-6 Zellen noch nicht etabliert wurde. Da man hierbei in 96-*well*-Platten arbeitet, ist es möglich, in kurzer Zeit eine Vielzahl an Konditionen zu untersuchen, was vor allem für Hochdurchsatzanalysen von neuen Polyplexen eine interessante Option darstellt. Analog der WB- und ICC-Ergebnisse konnte für Hepa1-6 Zellen nach Insulin-Stimulation ein signifikanter Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses im ICW detektiert werden (Abb. 28A), welcher deutlich niedriger war als der Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses im WB (Abb. 26) aber höher als im ICC (Abb. 27). Die Zugabe von WM vor der Insulin-Stimulation führte zu einem signifikanten Abfall des p-AKT/AKT-Verhältnisses. Dabei waren die Werte nicht mehr signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Im Gegensatz zur WB- und ICC-Analyse konnte für die ICW-Methode kein signifikanter Unterschied im p-AKT/AKT-Verhältnis nach Inhibition mit AS im Vergleich zur Insulin-Stimulation detektiert werden (Abb. 28A). Für Salbutamol-stimulierte Hepa1-6 Zellen konnte kein signifikanter Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses mit der ICW-Methode gezeigt werden (Abb. 28B). Einzig die Inhibition mit WM vor der

Salbutamol-Stimulation erbrachte eine signifikante Reduktion. Im Vergleich zur Kontrolle wurde aber kein signifikanter Unterschied detektiert (Abb. 28B).

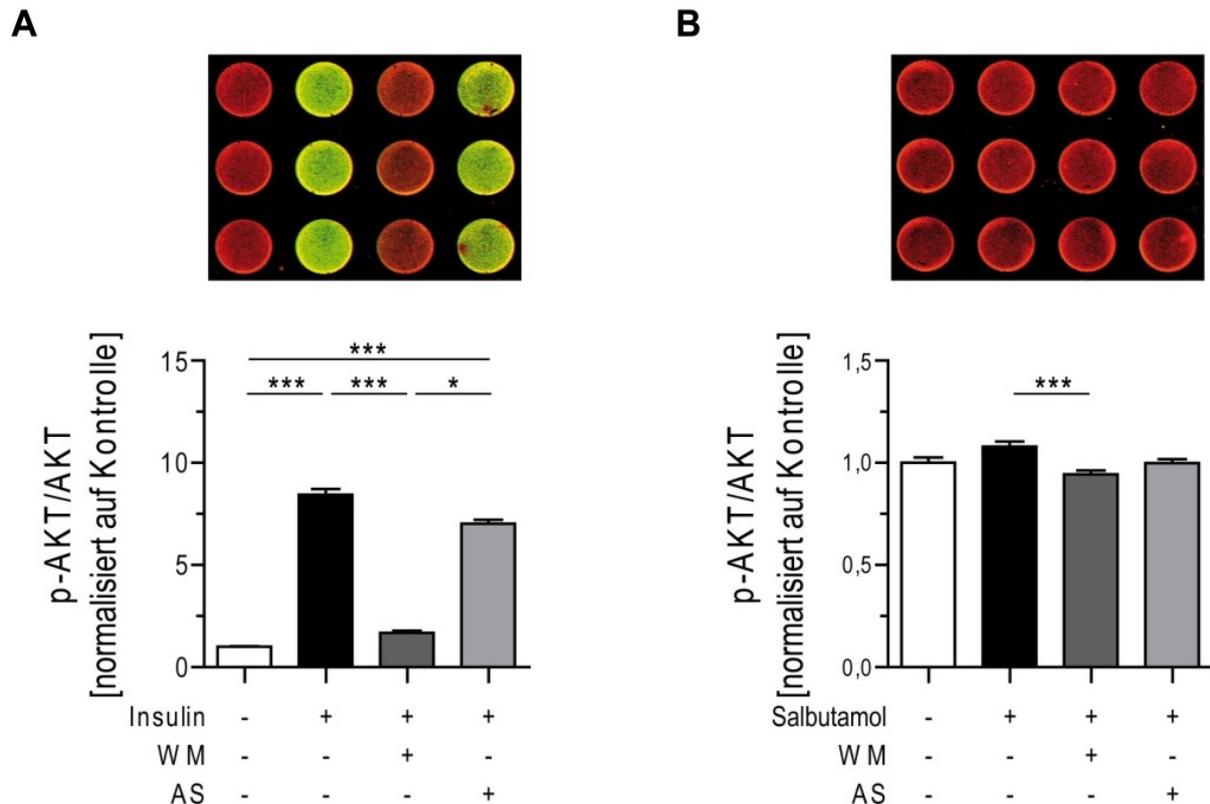


Abb. 28: Darstellung der p-AKT/AKT-Verhältnisse mittels ICW nach Aktivierung und Inhibition von PI3Ks in Hepa1-6 Zellen. Aufgrund des zu großen Verlusts an Zellen durch einen Waschschrift wurde für diese Methode die Inkubation in Kulturmedium ohne FKS nicht durchgeführt. So wurden die Zellen 1 h vor Stimulation mit dem allgemeinen PI3K-Inhibitor WM bzw. dem PI3K γ -selektivem Inhibitor AS inkubiert und anschließend mit Insulin (A) oder Salbutamol (B) für 5 min stimuliert. Die Bestimmung der anti-p-AKT- (grün) und anti-AKT- (rot) Intensitäten erfolgte am Odyssey[®] Imager. Es wurden 3 unabhängige Experimente mit 6-fach-Bestimmungen pro Kondition durchgeführt. Die Kontrollwerte wurden auf 1 normalisiert. Pro Kondition ist der Mittelwert der p-AKT/AKT-Verhältnisse aller Experimente mit jeweiligem Standardfehler angegeben. Der Shapiro-Wilk-Test ergab keine Normalverteilung. Aufgrund der Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test wurde anschließend der Dunn's *Multiple Comparison* Test durchgeführt; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

Mit der Möglichkeit, verschiedene Methoden zur Untersuchung von PI3K-Aktivitäten zu nutzen, wurde nach Stimulanzen gesucht, welche in der Literatur als PI3K γ -Aktivatoren beschrieben sind. Dabei wurden neben dem endogen vorkommenden Komplementfaktor C5a auch die exogenen, bei Bakterien vorkommenden fMLP und LPS genutzt (Hirsch et al. 2000, Luo et al. 2014). Die Stimulation von Hepa1-6 Zellen mit diesen Stimulanzen zeigte jedoch schon im WB, der in den Insulin-Stimulationsexperimenten sensitivsten Methode (Abb. 26), keine Phosphorylierung von AKT (Abb. 29).

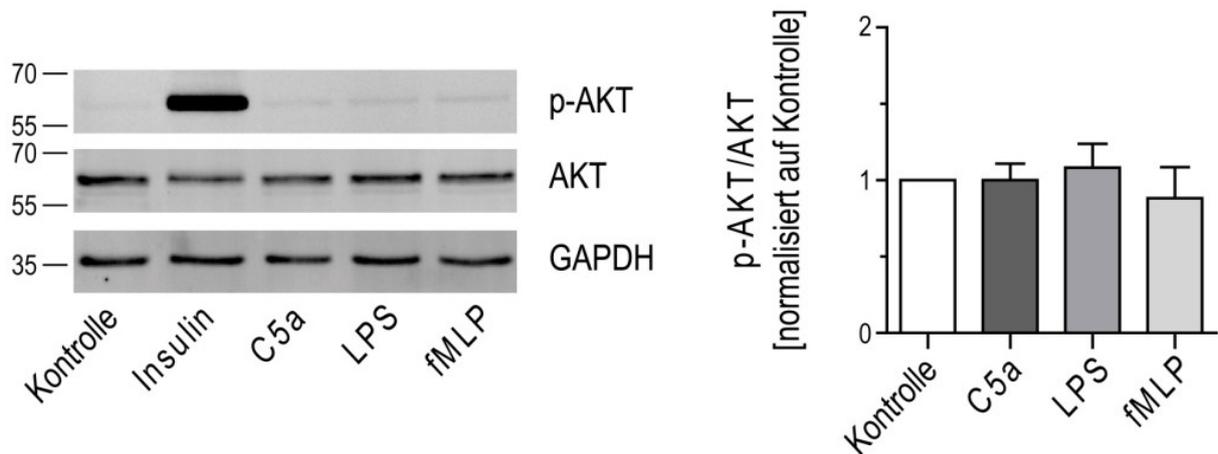


Abb. 29: Untersuchungen zur PI3K γ -selektiven Stimulation in Hepa1-6 Zellen mittels WB. Zellen wurden für 2 h in Medium ohne FKS inkubiert, 5 min mit der jeweiligen Stimulanz stimuliert und im WB analysiert. Insulin wurde als Positivkontrolle zur Aktivierung von PI3Ks verwendet. Die Kontrollwerte wurden auf 1 normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von 5-6 unabhängigen Experimenten. Der Shapiro-Wilk-Test ergab keine Normalverteilung und der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine Signifikanz.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass man in Hepa1-6 Zellen RTK- und GPCR-abhängige PI3K-Aktivitäten darstellen kann, diese aber stark von dem Stimulanz abhängen. Hierbei ergaben sich für die WB-Analysen die höchsten Sensitivitäten gegenüber der ICC- und ICW-Methode.

6. Diskussion

6.1 P(Ox)- und P(AGE)-Polymere mit funktioneller Architektur variieren in ihren DNA-Interaktionen und Toxizitäten

Eine Vielzahl an Polymeren wurde in den letzten Jahrzehnten synthetisiert und ihr Potenzial als Gentransfersysteme charakterisiert. Hierbei stellt PEI aufgrund seiner kommerziellen Verfügbarkeit und seiner hohen Transfektionseffizienz in verschiedenen Zelllinien den „Goldstandard“ dar (Boussif et al. 1995). Die geringen Transfektionseffizienzen sowie die toxischen Effekte in vivo verhindern jedoch eine Anwendung in klinischen Studien. Deswegen wird intensiv nach neuen Polymerklassen oder Modifikationen an bereits bekannten Polymerklassen geforscht.

Für diese Arbeit wurden P(Ox)s und P(AGE)s mit unterschiedlicher Anordnung und Funktionalitäten durch Meike N. Leiske, Fabian H. Sobotta und Carsten Rössel vom Institut für Organische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, synthetisiert und chemisch charakterisiert.

Zur Verwendung der Polymere als Gentransfersysteme müssen diese zunächst DNA-Interaktionen aufweisen. Für die DNA-Interaktionsuntersuchungen mittels EBA diente als Referenz LPEI und TurboFect™, welches ein Polymergemisch basierend auf LPEI mit Hydroxylgruppen an verschiedene Positionen ist (Lagunavicius et al. 2007). Es zeigte sich für beide Polymere eine hohe Interaktion mit der DNA, die vor allem an der hohen Ladungsdichte von LPEI aufgrund des hohen Amingehaltes liegt (Boussif et al. 1995). Die DNA-Interaktionen der in dieser Arbeit untersuchten P(Ox)-Polymere zeigten eine Abhängigkeit vom P(AmOx)-Anteil und damit von den primären Aminen. So zeigten P(Ox)-Polymere mit weniger als 35% P(AmOx) ($P(M_{130}A_{31}) + P(E_{150}A_{33})$) keine DNA-Interaktionen während P(Ox)-Polymere mit >35% P(AmOx)-Anteil mit DNA interagierten. Hierbei stiegen mit dem P(AmOx)-Anteil auch die Polymer-DNA-Interaktionen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch Rinkenauer et al. (2015) beobachten, die einen Bibliotheksansatz von kationischen P(Ox)s mit unterschiedlichem Amingehalt auf deren Verwendung als Gentransfersysteme untersuchten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Amingehalt mit der DNA-Komplexierung korreliert. Damit ist es dringend notwendig, einen bestimmten Prozentsatz an Aminen zu besitzen, um DNA-Interaktionen zu gewährleisten. Im Vergleich zu LPEI zeigte das Polymer mit dem höchsten Amingehalt ($P(E_3A_{157})$) ähnlich starke DNA-Interaktionen. Interessanterweise erbrachte die Verwendung von zusätzlichen Carboxylgruppen ($P(E_{118}A_{61}C_{12})$) eine Verstärkung der DNA-Bindungen im Vergleich zu dem Polymer, welches

noch 10% mehr P(AmOx) (P(E₇₇A₅₅)) enthielt. Dies ist verwunderlich, da durch das Einbringen der Carboxylgruppen keine Affinitätssteigerung zu DNA zu erwarten war. Möglicherweise könnte EtBr aufgrund zweier Amingruppen in der Struktur mit dem Polymer interagieren, wodurch verhindert wird, dass EtBr in die DNA interkalieren kann. Damit wäre der EtBr-Assay zur Untersuchung von Polymeren mit Carboxylgruppen limitiert.

Die Verwendung der beiden Polymereinheiten P(MeOx) und P(EtOx) im Copolymer zeigte keinen Unterschied in den DNA-Interaktionen. Homopolymere von P(MeOx) und P(EtOx) wurden in der Forschung intensiv untersucht. So zeigten diese beiden Polymere keine zytotoxischen und hämolytischen Effekte, jedoch auch keine DNA-Interaktionen (Bauer et al. 2012, Bauer et al. 2013, Adams und Schubert 2007, persönliche Kommunikation). Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionskinetiken von P(MeOx) und P(EtOx) im Vergleich zu P(AmOx) entstanden Copolymere mit gradienter (P(MeOx-grad-AmOx)) bzw. statistischer (P(EtOx-stat-AmOx)) Polymeranordnung (Hertz et al. 2018). Diese unterschiedlichen Anordnungen zeigten aber ebenfalls keine Unterschiede in den DNA-Interaktionen, was sich in ähnlichen Fluoreszenzen widerspiegelte. Für die Dissoziation von Polyplexen aus P(Ox)-Polymeren und DNA nach Zugabe von Heparin zeigten sich geringere Stabilitäten aller P(Ox)-Polyplexe verglichen mit LPEI. Diese geringe Stabilität der Polyplexe kommt vor allem durch den verringerten Anteil an Aminen zustande (Rinkenauer et al. 2015b, persönliche Kommunikation) und kann bei *in vivo*-Experimenten einen großen Einfluss haben, da die Polyplexe schon in der Blutbahn dissoziieren könnten und dann ihre Zielzelle nicht erreichen würden. Einzig P(M₂₉A₁₆₆) und P(E₃A₁₅₇) zeigten etwas stabilere Polyplexe.

Für die P(AGE)-Polymere mit primären Aminen zeigte sich ein anderes Bild in den DNA-Interaktionen als bei den P(Ox)-Polymeren. Während sich für das Polymer, welches nur zu 65% mit primären Aminen funktionalisiert wurde (EN15(65%)), schwächere DNA-Bindungen ergaben, wurden bei 100%iger Funktionalisierung und unterschiedlichem Prozentsatz an Aminen starke DNA-Interaktionen festgestellt, die vergleichbar zu LPEI und P(E₃A₁₅₇) waren. Somit müssen bei diesen Polymeren noch andere Mechanismen an der DNA-Bindung beteiligt sein. Eine Möglichkeit wären die verlängerten Seitenketten in den P(AGE)-Polymeren, die eine höhere Beweglichkeit verursachen könnten, wodurch das Polymer besser mit der DNA interagieren kann (Rinkenauer et al. 2015b). Die Nutzung von tertiären Aminen (ED29) oder Imidazolen (EI83) führte zu etwas geringeren DNA-Interaktionen, was sich in tendenziell höheren Fluoreszenzen im Vergleich zu den P(AGE)-Polymeren mit primären Aminen widerspiegelte. Jedoch waren die RFE für ED29 und EI83 noch deutlich stärker als für die meisten P(Ox)-Polymere. Die Verminderung der DNA-Interaktionen durch tertiäre Amine im Vergleich zu primären Aminen ist in der Literatur beschrieben und wurde u.a. auch bei Rinkenauer et al. (2015) gezeigt. Die Polyplexe mit P(AGE)s wiesen eine hohe

Stabilität auf. Einzig EN15(65%) und EI83 dissoziierten schon bei geringerer Heparin-Konzentration. Damit ergaben sich für die P(AGE)-Polymere neben stärkeren DNA-Interaktionen auch höhere Stabilitäten im Vergleich zu den P(Ox)-Polymeren. P(AGE)-Polymere mit primären Aminen (EN) und vollständiger Funktionalisierung zeigten dabei vergleichbare DNA-Interaktionen wie LPEI.

Wie einleitend erwähnt, spielt neben der Charakterisierung der DNA-Interaktionen und der Stabilität auch die Größe (<200 nm) und Ladung (positiv, was einer vollständigen Komplexierung der Polymere mit DNA entspricht) eine entscheidende Rolle für eine effiziente Aufnahme in Zellen (Luxenhofer et al. 2011). Für LPEI zeigte sich eine Abhängigkeit des mittleren Polyplexdurchmessers vom entsprechenden Medium. Während in HBG mittlere Durchmesser erreicht wurden, die für eine effiziente Aufnahme in Zellen vorgeschlagen sind, waren die Polyplexe in NaCl durchschnittlich >1 μm . Ähnliche Ergebnisse fanden Curtis et al. (2016), die zeigten, dass Größen von Polyplexen mit LPEI stark von der Salzkonzentration abhängen. Die PDI-Werte ergaben für LPEI eine hohe Variation in den mittleren Durchmessern der einzelnen Polyplexe. Dies lässt auf Akkumulationen schließen. In der Literatur sind häufig keine PDIs angegeben oder sie bestätigen die hier erhaltenen Beobachtungen (Rinkenauer et al. 2013, Pezzoli et al. 2017). Die Zetapotenziale der LPEI-Polyplexe ergaben Werte über +25 mV, welche auf eine vollständige Komplexierung der DNA sowie einen Überschuss an freiem Polymer hinweist (Yue et al. 2011).

Für alle P(Ox)-Polyplexe konnten in HBG mittlere Durchmesser von 150-200 nm gemessen werden, die damit ebenfalls im Bereich der gewünschten mittleren Durchmesser für erfolgreiche Aufnahme in Zellen lagen. Ähnlich LPEI konnten auch für die P(Ox)-Polyplexe in HBG höhere PDIs festgestellt werden. In NaCl wurden für die Polyplexe mit P(E₁₁₈A₆₁C₁₂) oder für die P(MeOx)-Copolymere mit einem Anteil an P(AmOx) unter 60% mittlere Polyplexdurchmesser <200 nm und geringe PDIs um 0,1 gemessen. Für die P(Ox)-Polyplexe mit P(EtOx) und primären Aminen bzw. mit P(MeOx) und einem P(AmOx)-Anteil von über 60% (P(M₂₉A₁₆₆)) wurde ein Anstieg der mittleren Durchmesser >700 nm festgestellt. Für diese Unterschiede könnten vor allem die Polymeranordnungen verantwortlich sein. So scheinen die gradienten Polymere (mit P(MeOx)) eine Akkumulation der Polyplexe in Medien mit höherer Salzkonzentration zu verhindern, während statistische Polymere (mit P(EtOx)) diese Akkumulationen nicht verhindern können. Zusätzlich könnte für den mittleren Durchmesser der Polyplexe mit P(E₁₁₈A₆₁C₁₂) von 180 nm intramolekulare Interaktionen der Amine und Carboxylgruppen zu einer gradienten-ähnlichen Struktur führen, die Akkumulationen verhindern (persönliche Kommunikation). Bisher wurden Untersuchungen zum Einfluss von Polymeranordnungen auf verschiedene Eigenschaften wie DNA- und Zell-

Interaktionen nur vereinzelt durchgeführt. Filippov et al. (2017) untersuchten verschiedene Block- und gradient Mizellen und konnten feststellen, dass Blockmizellen eine einheitliche Dichte im Mizellenkern aufwiesen, während gradient Mizellen eher höhere Dichten in der Mizellenhülle besaßen, wodurch der mittlere Durchmesser der Blockmizellen in Wasser größer war als der mittlere Durchmesser der gradient Mizellen. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei Polyplexen mit linearen Polymeren und unterschiedlicher Polymeranordnung der mittlere Polyplexdurchmesser in Medien mit verschiedener Salzkonzentration variiert. Bisher ist dieser Einfluss noch nicht weiter untersucht worden, stellt aber eine hohe Relevanz für mögliche *in vivo*-Applikationen dar. Interessanterweise stieg bei einem Amingehalt über 60% auch die Polyplexgröße der gradient Copolymere an. So könnte der Anstieg des Amingehaltes dazu führen, dass die Polyplexe eher miteinander interagieren und dadurch akkumulieren. Die Zetapotenziale der P(Ox)-Polymere waren mit Ausnahme von P(E₁₁₈A₆₁C₁₂) alle um +30 mV, wodurch sie als stark kationisch eingestuft werden können (Clogston und Patri 2011). P(E₁₁₈A₆₁C₁₂) besaß mit +16 mV ein deutlich geringeres Zetapotenzial. Diese Reduktion im Zetapotenzial könnte durch das Einführen von negativ geladenen Carboxylgruppen verursacht werden.

Polyplexe mit P(AGE)-Polymeren waren in HBG <200 nm im mittleren Durchmesser. Es wurden PDIs um 0,4 festgestellt, die wiederum auf Akkumulationen hindeuten. Ähnlich den gradient Copolymeren der P(Ox)s mit P(AmOx)-Anteilen unter 60% zeigten die Blockpolymere mit primären Aminen geringe mittlere Polyplexdurchmesser in NaCl. Polyplexe mit tertiären Aminen (ED29) oder Imidazolen (EI83) ergaben in NaCl dagegen einen Anstieg des mittleren Polyplexdurchmessers. So sind neben der Polymeranordnung auch die Funktionalitäten entscheidend für mögliche Akkumulationen in Medien mit verschiedenen Salzkonzentrationen. Da die PDIs in NaCl für die Polyplexe mit P(AGE)s vergleichbar zu denen in HBG waren, scheinen aber auch hier Akkumulationen nicht vermeidbar. Die Zetapotenziale waren für alle Polyplexe unabhängig von den Funktionalitäten um +20 mV und somit geringer im Vergleich zu den P(Ox)-Polymeren und LPEI. Dies könnte an der Anordnung (Blockcopolymer) und P(EO) liegen, die beide zur Abschirmung der kationischen Ladung beitragen könnten.

So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass für die Polyplexbildung mit P(Ox)s oder P(AGE)s die Funktionalitäten und der Amingehalt verantwortlich sind. Je nach Polymerklasse kann der Einfluss der Funktionalitäten und des Amingehaltes auf die DNA-Interaktionen aber unterschiedlich stark ausfallen. Die Nutzung von P(MeOx) oder P(EtOx) machte für die DNA-Interaktionen keinen Unterschied. Eine Vielzahl der untersuchten Polymere zeigten Polyplexe mit einem mittleren Polyplexdurchmesser im Bereich für erfolgreiche Aufnahme in Zellen, jedoch gab es auch häufig Akkumulationen, welche in

späteren Applikationen Probleme verursachen könnten. Diese Akkumulationen konnten aber durch die Verwendung von Polyplexen mit Block- oder gradienten Polymeren vor allem in NaCl im Vergleich zu Polyplexen mit statistischen Polymeren reduziert werden.

Häufig werden Polymere zur Polyplexbildung im Überschuss zugegeben, was eine bessere Zellaufnahme und Freisetzung aus den Endosomen bewirkt, aber auch deutlich zur Toxizität beiträgt, da die freien kationischen Ladungen der Polymere (z.B. Amine) mit den anionischen Ladungen der Zellmembranen (z.B. Phospholipide und Membranproteine) wechselwirken (Yue et al. 2011, Boeckle et al. 2004). Zudem kann die Dissoziation der Polyplexe im Blut durch Interaktion mit Blutkomponenten wie Plasmaproteinen und Erythrozyten zu freien Polymeren führen (Fischer et al. 2003). Deshalb wurde als *Worst-Case-Szenario* die Toxizität der untersuchten Polymere in den beiden Zelllinien Hepa1-6 und L929 bestimmt. Hierbei ergaben sich für LPEI ähnliche Toxizitätsverläufe und CC_{50} -Werte in beiden Zelllinien, so dass man für beide Zelllinien einen vergleichbaren Ausgangspunkt zur Charakterisierung der neu synthetisierten Polymere besaß. In der Literatur sind für PEI recht kontroverse Toxizitäts-Werte beschrieben (Bus et al. 2017, Wen et al. 2009, Forrest et al. 2003, Leclercq et al. 2000). So werden verschiedene Zelllinien (L929 Zellen, HeLa Zellen, MDA-MB-231 Zellen), Toxizitätstests (MTT, XTT, alamarBlue) oder auch die Durchführung der Toxizitäts-Untersuchungen variiert (u.a. 4 h Polymer-Inkubation mit anschließendem Mediumwechsel und Analyse 20 h später, 24 h-Inkubation und direkter Analyse). Aufgrund dessen variieren auch die CC_{50} -Werte (3,6 $\mu\text{g/ml}$ (Bus et al. 2017), 25 $\mu\text{g/ml}$ (Forrest et al. 2003), 40 $\mu\text{g/ml}$ (Wen et al. 2009)). Die in dieser Arbeit gefundenen CC_{50} -Werte sind aber in etwa im Bereich von denen von Forrest et al. (2003) und Wen et al. (2009). Wie aber gezeigt, wären in Zukunft einheitliche Vorschriften zur Toxizitätsbestimmung zwingend nötig, um die Toxizitätsdaten vor allem von Kontrollpolymeren in den verschiedenen Laboren miteinander zu vergleichen.

Die P(Ox)-Polymere zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Toxizität vom P(AmOx)-Anteil. Dabei hatten Polymere mit etwa 40% P(AmOx)-Anteil ($P(M_{97}A_{55}) + P(E_{77}A_{55})$) sehr geringe Toxizitäten, die sich in hohen CC_{50} -Werten widerspiegeln. Durch schrittweise Erhöhung des P(AmOx)-Anteils um 20% halbierten sich die CC_{50} -Werte, so dass hier verstärkt Toxizitätseffekte auftraten. Für $P(E_3A_{157})$ waren die CC_{50} -Werte vergleichbar mit LPEI, was dafür spricht, dass allein der Gehalt an primären Aminen die Toxizität verursachte. Aufgrund vergleichbarer CC_{50} -Werte macht die Verwendung von P(MeOx) oder P(EtOx) bzw. die Variation der Polymeranordnung keinen Unterschied in der Toxizität. Neben den guten DNA-Interaktionen und Polyplexgrößen ergaben sich für $P(E_{118}A_{61}C_{12})$ keine CC_{50} -Werte im Messbereich, so dass dieses Polymer bisher die besten Eigenschaften vermittelte. Bei der Charakterisierung der P(Ox)-Polymere konnte in L929 Zellen vor allem bei P(AmOx)-Anteilen

über 40% größere toxische Effekte als in Hepa1-6 Zellen gefunden werden. So könnten stärkere Interaktionen der Polymere mit der Zellmembran von L929 Zellen zu erhöhten Zellschädigungen führen. Weiterhin könnte eine erhöhte Aufnahmerate der Polyplexe und freien Polymere zu intrazellulären Schädigungen führen (Fischer et al. 2003). Die erhöhte Aufnahmerate konnte für einen Teil der in dieser Arbeit untersuchten Polymere bestätigt werden (u.a. P(M₇₃A₈₉) + P(E₅₇A₁₃₉)). Jedoch zeigte die Aufnahmerate von LPEI-Polyplexen ebenfalls eine Erhöhung in L929. Die Korrelation mit einer erhöhten Toxizität konnte hier aber nicht bestätigt werden, da die CC₅₀-Werte in beiden Zelllinien vergleichbar waren. Möglicherweise sind aber auch die toxischen Effekte schon so hoch, dass man die Unterschiede zwischen den beiden Zellen nicht mehr detektieren kann, so wie sie bei den P(Ox)-Polymeren festgestellt wurden.

Ähnlich den P(Ox)-Polymeren konnte auch für die P(AGE)-Polymere eine Abhängigkeit der Toxizität vom P(AGE)-Anteil mit primären Aminen festgestellt werden. Es zeigte sich für EN15(65%) in beiden Zelllinien eine höhere Toxizität als für EN15. Dies kann an den freien Doppelbindungen in EN15(65%) liegen, welche intrazellulär modifiziert werden können und zu toxischen Effekten führen. So werden Doppelbindungen von Cytochrom P450-Monooxygenasen zu Epoxiden oxidiert, welche sehr reaktiv sind und erheblich zur Toxizität bestimmter Medikamente beitragen (Macherey 2008). Eine vollständige Funktionalisierung ist deswegen wichtig zur Reduktion der toxischen Effekte. Die Erhöhung des P(AGE)-Anteils mit primären Aminen ergab einen deutlichen Anstieg der Toxizität in beiden Zelllinien. Dabei zeigten sich wiederum geringere toxische Effekte in Hepa1-6 Zellen im Vergleich zu L929 Zellen. So wurden für L929 Zellen schon bei etwa 50% funktionalisiertem P(AGE) (EN45) vergleichbare Toxizitäten wie in LPEI gefunden. Für P(AGE)-Polymere mit tertiären Aminen (ED29) oder Imidazolen (EI83) konnten in Hepa1-6 Zellen keine CC₅₀ bestimmt werden, während in L929 Zellen nur für ED29 keine CC₅₀ ermittelt werden konnte. Für EI83 war der CC₅₀-Wert bei etwa 140 µg/ml. Auch hier könnte eine Kombination aus erhöhter Aufnahmerate, was für EI83-Polyplexe in L929 Zellen gezeigt werden konnte, und Interaktion der freien EI83-Polymere mit der Zellmembran ursächlich für die erhöhte Toxizität sein.

Zusammenfassend ergab sich für die in dieser Arbeit untersuchten Polymere, dass die Toxizität der verschiedenen Polymere abhängig von deren Funktionalitäten und dem Amingehalt ist. Dabei waren die Toxizitäten aber wiederum stark abhängig von der verwendeten Polymerklasse. P(AGE)-Polymere mit primären Aminen vermitteln hierbei stärkere Toxizitäten als tertiäre Amine und Imidazole. Die Verwendung von P(MeOx) oder P(EtOx) sowie die unterschiedliche Polymeranordnung der P(Ox)s machte keinen Unterschied in den Toxizitätswerten der Polymere. Aufgrund der unterschiedlichen Toxizitäten für einen Teil der Polymere in den beiden untersuchten Zelllinien sollten für jede

Fragestellung einer Gentherapie in einem Zielorgan immer auch Toxizitäten für diesen Zelltyp bestimmt werden.

6.2 Polyplexe mit P(Ox)s und P(AGE)s werden effektiv in Zellen aufgenommen, vermitteln aber keine GFP-Expression

Zur Verwendung von Polymeren in der Gentherapie müssen diese das therapeutische Genmaterial in die Zelle transportieren (Midoux et al. 2008, Mees et al. 2016). Dort muss das genetische Material aus dem endosomalen Transportweg freigesetzt werden, durch das Zytosol transportiert werden und im Falle von DNA oder shRNA in den Zellkern eintreten (Luo und Saltzman 2000, Pack et al. 2005, Aied et al. 2013). Für die in dieser Arbeit untersuchten Polymere wurde durch Markieren der pDNA mit YOYOTM-1 die Polyplexaufnahme in Hepa1-6 und L929 Zellen untersucht. Zunächst erfolgte die Charakterisierung der Aufnahmeraten der Polyplexe mit LPEI und TurboFectTM in den Hepa1-6 und L929 Zellen, da vor allem Hepa1-6 Zellen bisher selten für Polymercharakterisierungen verwendet wurden. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Polyplexaufnahme vom N/P-Verhältnis, der Inkubationszeit und dem bei der Polyplex-Inkubation verwendeten Kulturmedium, was in der Literatur schon beschrieben ist (Trützschler et al. 2018, Shum et al. 2012, Tenzer et al. 2013). So stieg mit höherem N/P-Verhältnis auch tendenziell die Anzahl an YOYOTM-1-positiven Zellen und die Aufnahmerate der Polyplexe (dargestellt durch den MFI) mit LPEI in beiden Zellkulturen in Medium ohne Zusatz von FKS (D0). Hier scheint der steigende Überschuss an freiem LPEI bei höherem N/P-Verhältnis zu verstärkten Interaktionen mit der Zellmembran zu führen, wodurch es zur erhöhten Aufnahme der Polyplexe kommt (Yue et al. 2011, Boeckle et al. 2004). In Medium mit FKS (D10) wurde bei einem N/P von 30 eine Reduktion der Polyplex-Aufnahme im Vergleich zu Medium ohne FKS in beiden Zelllinien festgestellt. Für diese Reduktion in der Aufnahme sind mögliche Interaktionen der Polyplexe und freien Polymer mit den Serumproteinen verantwortlich (Tenzer et al. 2013). Interessanterweise zeigte sich in D10 für Hepa1-6 Zellen bei einem N/P-Verhältnis von 15 ein Anstieg der Polyplexaufnahme im Vergleich zu D0. Hier scheinen die Serumproteine sogar einen positiven Einfluss auf die Aufnahme der Polyplexe zu haben. Da dies bisher in der Literatur noch nicht beschrieben ist, bedarf es näherer Untersuchungen, warum bei niedrigerem N/P-Verhältnis in Hepa1-6 Zellen Serumproteine bei der Aufnahme der Polyplexe helfen. So könnten die Interaktionen der Polyplexe mit verschiedenen Serumproteinen (u.a. Albumin) untersucht werden und in

diesem Zusammenhang die Aufnahme in Hepa1-6 Zellen. In L929 Zellen konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden, so dass es scheinbar zelllinienabhängig ist. Im Gegensatz zu LPEI konnte für TurboFect™ in den beiden Zelllinien keine Reduktion in der Aufnahme der Polyplexe in D10 im Vergleich zu D0 detektiert werden. TurboFect™ besitzt in der Polymerstruktur zusätzliche Hydroxylgruppen, welche die Hydrophilie erhöhen (Lagunavicius et al. 2007). Diese führen zu verringerten Polyplex-Protein-Interaktionen und somit zu vergleichbaren Aufnahmeraten von Polyplexen in Medium mit und ohne Serumproteinen (Neu et al. 2005). In L929 Zellen ergaben sich wie erwartet deutlich höhere Aufnahmeraten im Vergleich zu Hepa1-6 Zellen. So ist die Aufnahme der Polyplexe stark abhängig von der verwendeten Zelllinie und dessen Endozytoserate.

Für die P(Ox)-Polymere mit primären Aminen konnte eine ähnlich große Anzahl an YOYO™-1-positiven Hepa1-6 Zellen in D0 und D10 wie mit LPEI detektiert werden. Die Aufnahmeraten (MFI) der P(Ox)-Polyplexe mit primären Aminen waren in Hepa1-6 Zellen in D0 sogar etwas höher verglichen mit LPEI. Die Anwesenheit von FKS reduzierte hierbei sowohl die Anzahl an YOYO™-1-positiven Zellen als auch die Aufnahmeraten, was an möglichen Interaktionen der Polyplexe und freien Polymere mit Serumproteinen liegen kann. Das Verwenden von P(MeOx) oder P(EtOx) bzw. die Veränderung der Polymeranordnung machte aufgrund der vergleichbaren Anzahl an YOYO™-1-positiven Zellen und Aufnahmeraten keinen Unterschied. In L929 Zellen war wiederum eine höhere Anzahl an YOYO™-1-positiven Zellen in D0 und D10 im Vergleich zu Hepa1-6 Zellen feststellbar. Dagegen zeigte sich in den MFI wieder die Abhängigkeit vom Proteingehalt des Mediums. Interessanterweise zeigte sich in D0 für P(M₇₃A₈₉) und P(E₅₇A₁₃₉) ein deutlicher Anstieg in der Aufnahmerate der Polyplexe im Vergleich zu den Polyplexen mit 40% P(AmOx) (P(M₉₇A₅₅) + P(E₇₇A₅₅)) und LPEI. Eine weitere Erhöhung des P(AmOx)-Anteils auf über 80% reduzierte tendenziell die Aufnahmeraten wieder. Da sich dieser Verlauf für alle durchgeführten Experimente zeigte, reduzieren die Zellen scheinbar die Aufnahme der Polyplexe mit einem P(AmOx)-Anteil über 80%. Für das Polymer, welches in der Charakterisierung der DNA-Interaktionen und Toxizitäten die besten Ergebnisse zeigte (P(E₁₁₈A₆₁C₁₂)), konnte weder in Hepa1-6 noch L929 Zellen eine Aufnahme gefunden werden. So könnte es zu Abstoßungseffekten zwischen den Carboxylgruppen und der Zellmembran kommen, wodurch keine Polyplexe aufgenommen werden. Da Polymere mit primären Aminen und Carboxylgruppen bisher nicht näher untersucht wurden, müssen hier grundlegende Untersuchungen zur Polymer-Zellinteraktion gemacht werden. So könnte das Einführen von weiteren Funktionalitäten wie Antikörpern, Kohlenhydrate, Proteine oder anderer kleiner Moleküle zu einer Erhöhung der Aufnahme in Zielzellen führen (Hi et al. 2016).

Für Polyplexe mit P(AGE)s zeigte sich bis EN45 in beiden Zelllinien ein Anstieg in der Anzahl an YOYOTM-1-positiven Zellen und der Aufnahme rate der Polyplexe mit Erhöhung des Amingehaltes. Eine weitere Erhöhung des Amingehaltes (EN60 bzw. EN76) brachte dagegen keine weitere Erhöhung der Anzahl der YOYOTM-1-positiven Zellen oder der Aufnahme rate der Polyplexe. Damit wäre ein P(AGE)-Anteil mit primären Aminen von 50% (EN45) ausreichend für eine effektive Polyplexaufnahme. Die Anzahl an YOYOTM-1-positiven Zellen und die Aufnahme rate variierten von Polymer zu Polymer in Medium mit oder ohne FKS, wobei tendenziell wieder etwas geringere Werte in D10 im Vergleich zu D0 detektiert wurden. Im Vergleich zu LPEI war die Aufnahme rate in D0 ab EN29 vergleichbar bzw. tendenziell erhöht, während in D10 eine Reduktion in der Aufnahme rate festgestellt wurde. Der Vergleich der Aufnahme rates in D0 mit denen der P(Ox)-Polymere ergab zumeist verminderte Werte für die P(AGE)-Polymere. Einzig EN45 konnte in L929 Zellen ähnliche Werte erreichen wie einige P(Ox)-Polymere. Eine mögliche Ursache könnten die geringeren Zetapotenziale für diese Polymerklasse sein, wodurch geringere Interaktionen der Polyplexe und freien Polymere mit der Zellmembran stattfinden. Polymere mit tertiären Aminen (ED29) oder Imidazolen (EI83) zeigten vor allem in Hepa1-6 Zellen deutlich verminderte bzw. keine YOYOTM-1-positive Zellen und Aufnahme rates. Diese Beobachtungen wurden in der Literatur schon beschrieben und liegen hauptsächlich an den geringen Interaktionen der tertiären Amine bzw. Imidazole mit der Zellmembran (Rinkenauer et al. 2015b). In L929 Zellen konnte ein leichter Anstieg der Anzahl an YOYOTM-1-positiven Zellen für ED29 und EI83 festgestellt werden, was wiederum die erhöhte Endozytoserate im Vergleich zu Hepa1-6 Zellen nochmals bestätigt.

Es konnten so für die Anzahl an YOYOTM-1-positiven Zellen und die Aufnahme rates der Polyplexe Effekte durch die Zelllinien und das Kulturmedium gezeigt werden. Weiterhin spielten die Funktionalitäten und der Amingehalt eine wichtige Rolle, müssen aber immer im Zusammenhang mit der Polymerklasse und Zelllinie gesehen werden. So zeigte sich für P(Ox)-Polymere in Hepa1-6 Zellen eher ein geringerer Einfluss des Amingehaltes auf die Polyplexaufnahme, während für P(AGE)-Polymere nur bis zu einem bestimmten Amingehalt (EN45) die Polyplexaufnahme gesteigert werden konnte. Die Nutzung von Carboxylgruppen (P(E₁₁₈A₆₁C₁₂)) bzw. tertiären Aminen (ED29) und Imidazolen (EI83) muss mit weiteren Funktionalisierungen ausgestattet werden, welche eine Erhöhung der Polyplexaufnahme hervorrufen. Ähnlich den DNA-Interaktionen und Toxizitätsdaten machte die Verwendung von P(MeOx) oder P(EtOx) bzw. die Variation der Polymeranordnung keinen Unterschied für die Polyplexaufnahme.

Neben der Quantifizierung der Polyplexaufnahmen in die Zelle wurde mit Hilfe der GFP-Expression eine weitere Analyse methode genutzt, um den intrazellulären Transportweg der

pDNA bis in den Zellkern indirekt nachzuvollziehen. Ähnlich der Anzahl an YOYOTM-1-positiven Zellen und der Aufnahmeraten der Polyplexe konnte eine stark verminderte Anzahl an GFP-positiven Zellen und reduzierte GFP-Expressionsrate (MFI) 48 h nach Transfektion mit LPEI-Polyplexen in beiden Zelllinien in D10 im Vergleich zu D0 gefunden werden. Dies könnte durch die verminderte Aufnahmerate der Polyplexe (LPEI N/P30) durch Interaktion mit Serumproteinen verursacht werden. In L929 Zellen waren die Aufnahmeraten der LPEI-Polyplexe weniger abhängig vom Medium, wodurch auch eine höhere Anzahl an GFP-positiven Zellen und höhere GFP-Expressionsraten im Vergleich zu Hepa1-6 Zellen detektiert wurden. Für TurboFectTM ergab sich in Hepa1-6 Zellen ähnlich den Ergebnissen der Aufnahmeraten ein Anstieg der Anzahl an GFP-positiven Zellen und der GFP-Expressionsrate in D10 verglichen mit D0. Dagegen war in L929 Zellen in D10 sowohl die Anzahl an GFP-positiven Zellen und die GFP-Expressionsrate stark reduziert im Vergleich zu D0. Da die Aufnahmeraten in D0 und D10 in L929 Zellen vergleichbar waren, müssen hier intrazelluläre Hindernisse eine GFP-Expression verhindern. So könnte eine mögliche Verhinderung der Dissoziation der Polyplexe dazu führen, dass die pDNA im Zellkern nicht abgelesen werden kann. Um die Ursachen herauszufinden, sind weitere Untersuchungen nötig wie z.B. die Fluoreszenzmikroskopie zum Verfolgen der Polyplexe in der Zelle.

Trotz der sehr guten Aufnahmeraten der Polyplexe mit den neu synthetisierten Polymeren konnten in Hepa1-6 Zellen nur in maximal 1% der Zellen, in L929 Zellen in maximal 5% der Zellen GFP-Expressionen in D0 detektiert werden. Hierbei zeigte sich sowohl für Polyplexe mit P(Ox)s als auch P(AGE)s eine Verringerung der GFP-Expressionsraten in D10. Für P(AGE)-Polyplexe mit primären Aminen konnten mit steigendem Amingehalt tendenziell eine größere Anzahl an GFP-positiven Zellen festgestellt werden, während es für Polyplexe mit P(Ox)s keine Abhängigkeit der Anzahl an GFP-positiven Zellen vom Amingehalt gab. Für P(Ox)s konnte Rinkenauer et al. zeigen, dass in Bibliotheksansätzen von neu synthetisierten Polymeren häufig nur einzelne Polymere für gentherapeutische Anwendungen vielversprechende Ergebnisse aufweisen, während eine Vielzahl der Polymere aufgrund unterschiedlicher nicht erwünschter Eigenschaften ausgeschlossen werden müssen (Rinkenauer et al. 2015b). Aufgrund von Waschschritten und dem Umpipettieren der Zellen in Polypropylenröhrchen vor der Analyse der aufgenommenen Polyplexe in die Zellen, sollten Polyplexe, die extrazellulär an der Zellmembran gebunden sind, nicht mit detektiert wurden sein. Somit muss es aufgrund der guten Aufnahmeraten von einer Vielzahl der verschiedenen P(Ox)- und P(AGE)-Polyplexe in die Zelle intrazelluläre Ursachen geben, die die GFP-Expressionen verhinderten.

Zur Untersuchung, warum die in dieser Arbeit untersuchten Polyplexe kaum GFP-Expressionen vermitteln, wurde durch Anfärben von Lysosomen mit LysoTrackerTM überprüft,

ob die Polyplexe, welche mit YOYOTM-1 markiert wurden, aus dem endolysosomalen Transportweg freigesetzt werden. Im Vergleich zu den Polyplexen mit LPEI konnte für die ausgewählten Polyplexe mit P(EtOx)s ein signifikanter Anstieg der YOYOTM-1- und LysoTrackerTM-positiven Organellen gefunden werden. Dieser Anstieg spricht für eine Verhinderung der Freisetzung der Polyplexe aus dem endolysosomalen Transportweg. So könnte die verhinderte Polyplexfreisetzung zur Dissoziation der Polyplexe in den Lysosomen führen und anschließend die pDNA durch Desoxyribonukleasen (DNasen), welche durch Absenkung des pH-Wertes aktiviert werden, degradiert werden (Howell et al. 2003). Nähere Untersuchungen mittels Säure-Base-Titration durch Meike N. Leiske vom Institut für Organische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, zeigten, dass die P(Ox)-Polymere bei physiologischem pH (pH 7,4) eine vollständige Protonierung aller Amine aufweisen und somit keine Pufferkapazität besitzen, die die endolysosomale Freisetzung begünstigen würden (Hertz et al. 2018). Diese Pufferkapazität, die die Reduktion des pH-Wertes in den Endosomen verhindert, ist u.a. für PEI beschrieben und als „Protonenschwammeeffekt“ (engl. *proton sponge effect*) bekannt (Boussif et al. 1995). Durch die Pufferkapazität von PEI kommt es zu einer starken Anreicherung von Protonen und Chlorid-Ionen in den Endosomen und einem passiven Einstrom von Wasser. Dies führt zu einer Steigerung des osmotischen Drucks und zum Platzen der Endosomen, wodurch die Polyplexe ins Zytoplasma freigesetzt werden (Aied et al. 2013). Für die Polyplexe mit P(MeOx) konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zu LPEI festgestellt werden. Die Quantifizierung der Gesamtanzahl an YOYOTM-1-positiven Organellen zeigte aber ähnlich den Polyplexen mit P(EtOx)s einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu Polyplexen mit LPEI. Eine Hypothese wäre, dass sich die Polyplexe mit P(MeOx) noch in Endosomen befinden und diese Endosomen noch nicht angesäuert wurden. Für eine Bestätigung dieser Annahme können endosomale (EEA1, vom engl. *Early Endosome Antigen 1*) und lysosomale (LAMP1, vom engl. *Lysosomal-associated membrane protein 1*) Marker genutzt werden und die Kolo-kalisation analysiert werden.

Im Gegensatz zu den P(Ox)-Polyplexen konnte bei keinem der ausgewählten Polyplexe mit P(AGE)s ein signifikanter Unterschied zu LPEI gefunden werden. Dies betraf sowohl die Anzahl an YOYOTM-1- und LysoTrackerTM-positiven Organellen als auch die nur YOYOTM-1-positiven Organellen. Eine Verhinderung der Freisetzung der Polyplexe aus dem endolysosomalen Transportweg kann in diesem Fall nicht bestätigt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Zur Verifizierung der hier erhaltenen Ergebnisse wurde u.a. Chloroquin genutzt, da dieses den lysosomalen pH-Wert neutralisiert und so die DNasen hemmt. Daneben fördert es die Freisetzung der Polyplexe aus dem endolysosomalen Transportweg, wodurch die GFP-Expression in den Zellen deutlich erhöht werden kann (Erbacher et al. 1996). Es zeigte sich ein Anstieg in der Anzahl an GFP-positiven Zellen und der GFP-Expressionsrate, jedoch waren diese noch deutlich niedriger als die Anzahl an

GFP-positiven Zellen und die GFP-Expressionsrate nach Transfektion mit LPEI-Polyplexen ohne Verwendung von Chloroquin. Weiterhin wurden auch P(AGE)-Polyplexe mit einem N/P-Verhältnis von 30 getestet. Auch dies führte zu einem Anstieg der Anzahl an GFP-positiven Zellen und der GFP-Expressionsrate, konnte aber nicht die Werte von der Transfektion mit LPEI-Polyplexen erreichen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung von siRNA zur Überprüfung, ob der Transport der pDNA in den Zellkern verhindert wird.

Somit konnte in dieser Arbeit für die Polyplexe der unterschiedlichen Polymerklassen mit verschiedenen Funktionalitäten und Polymeranordnung unterschiedlich erfolgreiche Aufnahmen in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden. Aufgrund der Verhinderung der Freisetzung von P(Ox)-Polyplexen aus dem endolysosomalen Transportweg sind diese Polymere als Gentransfersysteme in der Gentherapie nicht geeignet. Modifikationen der P(Ox)s könnten dagegen zu besseren GFP-Expressionseffizienzen führen. So konnten Leiske et al. zeigen, dass die Herstellung von Mizellen durch Einführen hydrophober Polymereinheiten zu einer erhöhten GFP-Expression führt (Leiske et al. 2018). Für Polyplexe mit P(AGE)s bedarf es dagegen weiterer Untersuchungen, um die verhinderte GFP-Expression aufzuklären.

6.3 PI3Ky trägt zu hepatischen PI3K-Aktivitäten während der septischen Cholestase bei

PI3Ky ist ein wichtiger Mediator von immunologischen und inflammatorischen Reaktionen. Hierbei ist PI3Ky vor allem an proinflammatorischen Prozessen in Immunzellen wie der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, Phagozytose und Apoptose sowie der Migration der Immunzellen in Richtung Entzündungs- bzw. Infektionsherd beteiligt (Sasaki et al. 2000, Del Prete et al. 2004). Im letzten Jahrzehnt wurde jedoch festgestellt, dass geringe Mengen an PI3Ky auch in anderen Geweben vorkommen und dort essentielle Aufgaben übernehmen (Patrullo et al. 2004, Ruckle et al. 2006, Recknagel et al. 2012). Studien von Recknagel et al. zeigten hierbei eine deutliche Verbesserung der septischen Cholestase in PI3Ky-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Weiterhin war es möglich, die Anzahl an antikörpermarkierten Mrp2-Transportern in der Membran von HepG2 Zellen nach Stimulation mit einem Cytokinmix durch Nutzung des PI3Ky-selektiven Inhibitors AS im Vergleich zu HepG2 Zellen, die nur mit Cytokinmix behandelt wurden, zu erhöhen (Recknagel et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde in ersten Untersuchungen überprüft, ob in Leberhomogenaten von LPS-behandelten Mäusen, welche eine Entzündungsreaktion ohne Infektion darstellt, und septischen Mäusen, induziert durch das PCI-Modell, PI3K-Aktivitäten auftreten. Hierfür wurde das Signalprotein AKT analysiert, welches durch PI3K-Aktivitäten

phosphoryliert wird (Alessi et al. 1996, Sarbassov et al. 2005). Jedoch kann man durch Quantifizierung der Phosphorylierung von AKT nicht die isoformspezifische Aktivität von PI3Ks bestimmen. Diese PI3K-Aktivitäten müssten durch isoformspezifische PI3K-Inhibitoren oder RNAi-Techniken in weiteren Schritten näher charakterisiert werden. Im Vergleich zu den Leberhomogenaten der Kontrollmäuse konnte 6 h nach LPS-Behandlung bzw. Sepsisinduktion ein Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses in den Leberhomogenaten gefunden werden, der für die LPS-behandelten Leberhomogenate signifikant war. Die PI3K-Aktivitäten in den Leberhomogenaten konnten auch 24 h nach LPS-Behandlung bzw. Sepsisinduktion noch detektiert werden, wobei die Leberhomogenate der LPS-behandelten Mäuse wiederum ein höheres p-AKT/AKT-Verhältnis besaßen als die Leberhomogenate der septischen Mäuse. Eine mögliche Ursache der Unterschiede im p-AKT/AKT-Verhältnis in den Leberhomogenaten zwischen LPS-behandelten und septischen Mäusen könnte eine schnellere Detektion von LPS durch Immunzellen nach der intraperitonealen Verabreichung sein, die schon nach kurzer Zeit zu erhöhten inflammatorischen Prozessen führt. So zeigt die Verabreichung von LPS in Mausmodellen im Vergleich zur Sepsis schnellere und stärkere proinflammatorische Cytokinantworten (Lewis et al. 2016, Rittirsch et al. 2007). Die Dosis an LPS im inflammatorischen Modell könnte ebenfalls Unterschiede bewirken, da diese möglicherweise höher ist als die LPS-Konzentrationen der Pathogene in der Stuhlprobe. So konnten Postel et al. (1975) zeigen, dass die Level an LPS im Blut von septischen Patienten nur sehr gering sind. Weiterhin ist bekannt, dass LPS die hepatische Insulinsensitivität erhöht, welche bei septischen Patienten im kritischen Zustand zur Hypoglykämie beitragen kann (van der Crabben et al. 2009). Da PI3Ks zentrale Mediatoren von metabolischen Funktionen sind (Virkamaki et al. 1999, Taniguchi et al. 2006), könnte diese Insulinsensitivität zu erhöhten p-AKT/AKT-Verhältnissen führen.

Der Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses in den Leberhomogenaten der LPS-behandelten und septischen Mäuse kann durch verschiedene PI3K-Isoformen hervorgerufen werden. Für PI3K α und PI3K β ist eine ubiquitäre Expression beschrieben (Knight et al. 2006, Zhao et al. 2006, Jia et al. 2008), wodurch diese zum Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses in den Leberhomogenaten beitragen könnten. Zur Überprüfung der isoformspezifischen PI3K-Aktivitäten wäre eine LPS-Behandlung bzw. Sepsisinduktion in isoformspezifischen PI3K-KO-Mäusen durchzuführen. Neben diesen beiden PI3K-Isoformen konnte Recknagel et al. (2012) auch eine mögliche Rolle der PI3K γ in Hepatozyten während einer Sepsis aufzeigen. Da diese PI3K-Isoform hauptsächlich in Immunzellen exprimiert wird (Hirsch et al. 2000), war die Frage, ob auch hepatozytenspezifische PI3K γ -Expressionen vorhanden sind. Um dies zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der IHC verschiedene Zelltypen der Leber selektiv markiert und anschließend die Expression der PI3K γ analysiert. Hierbei konnte eine Anwesenheit von PI3K γ in Endothelzellen nachgewiesen werden, die in der Literatur auch

schon beschrieben ist (Puri et al. 2005). Zum ersten Mal konnte PI3K γ aber auch in Hepatozyten immunhistochemisch gezeigt werden. Damit könnte die PI3K γ ebenfalls zum Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses in den Leberhomogenaten der LPS-behandelten und septischen Mäuse beitragen. Neben diesen Untersuchungen wurde in einer weiteren Arbeit die zelltypspezifische Rolle der PI3K γ in der entzündungsgetriebenen Cholestase untersucht (Beretta 2018). Hier konnte sowohl die Präsenz als auch Aktivität (nach Stimulation mit einem Cytokinmix) von PI3K γ in primären murinen Hepatozyten und hepatozytenspezifischen Zelllinien durch Western Blot-Analysen detektiert werden. Aufgrund der zu geringen PI3K γ -Expression in den primären murinen Hepatozyten und den hepatozytenspezifischen Zelllinien konnte die Detektion der PI3K γ -Expression aber nur mittels Immunpräzipitation erfolgen. Es zeigte sich weiterhin, dass die Verwendung des PI3K γ -selektiven Inhibitors AS zu einer Verminderung des p-AKT/AKT-Verhältnisses nach Stimulation mit einem Cytokinmix führte. Daneben wurde durch AS auch eine erhöhte Mrp2-Lokalisation in der Zellmembran von primären Hepatozyten 6 h nach Stimulation mit einem Cytokinmix erreicht (Beretta 2018). Mit dieser Arbeit und den Untersuchungen von M. Beretta (2018) konnte somit eine hepatozytenspezifische PI3K γ -Aktivität während der septischen Cholestase gezeigt werden.

6.4 Bei der Methodenetablierung zur Charakterisierung von isoformspezifischen PI3K-Aktivitäten in Hepa1-6 Zellen weist die WB-Methode die höchste Sensitivität auf

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PI3K γ in Hepatozyten exprimiert wird und somit neben den bekannten PI3K-Isoformen PI3K α und PI3K β auch zum Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses in der Leber von septischen Mäusen beitragen kann. Um die Expression der PI3K-Isoformen durch RNAi-Techniken mit möglichen neuen Polymeren, die für eine gentherapeutische Nutzung vielversprechend erscheinen (geringe Toxizität, hohe Transfektionseffizienz), zu unterdrücken, werden Methoden benötigt, die die Charakterisierung der PI3K-Aktivierungen und Inhibition ermöglichen. Da die PI3K-Expression nichts über die Aktivität der PI3K-Isoformen aussagt, wurde für die Methodenetablierung auf das p-AKT/AKT-Verhältnis zurückgegriffen. Zum Nachweis der PI3K-Aktivitäten sowie der Inhibition der Aktivität wurde neben dem WB und ICC auch der ICW als Methode etabliert, der eine Hochdurchsatzanalyse erlaubt und so für mögliche Polymerbibliotheksansätze eine vielversprechende Methode wäre. Die Nutzung der ICC

gewährt zudem Einzelzellanalysen, wodurch intrazelluläre Veränderungen wie der Umbau des Zytoskeletts oder die Lokalisation von AKT nach Phosphorylierung nachvollzogen werden können.

Da PI3Ks der Klasse I nach ihren Aktivitätsmechanismen (RTK bzw. GPCR) unterschieden werden können, wurde für die jeweiligen Methoden sowohl Insulin als auch Salbutamol genutzt, da diese Stimulanzen über RTK bzw. GPCR PI3Ks der Klasse IA bzw. IB aktivieren und die PI3K-Aktivierungen in Hepatozyten für diese Stimulanzen schon beschrieben sind (Zucchetti et al. 2011, Taniguchi et al. 2006). Zur Inhibition wurde WM als allgemeiner PI3K-Inhibitor und AS als PI3K γ -selektiver Inhibitor verwendet (Arcaro und Wymann 1993, Wymann et al. 1996, Shugg et al. 2013). Die Ergebnisse der WB-Untersuchungen ergaben einen signifikanten Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses nach Stimulation mit Insulin bzw. Salbutamol, welcher durch WM signifikant reduziert wurde. Der Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses zeigte einen deutlichen Unterschied nach Stimulation mit Insulin oder Salbutamol. So ergab sich ein Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses nach Insulin-Stimulation um den Faktor 160, während es für Salbutamol etwa der Faktor 1,6 war. Dies spricht für eine deutlich höhere Sensitivität der Hepa1-6 Zellen für Insulin im Vergleich zu Salbutamol. Die zur Methodenetablierung verwendete Zelllinie Hepa1-6 stammt von einem murinen HCC ab (Darlington et al. 1980). Diese Zelllinie hat einen Teil ihrer hepatischen Funktionen verloren (u.a. Produktion von Cytochromen und Komplementfaktoren), zeigt dagegen aber eine verstärkte Proliferation mit erhöhter Verstoffwechslung von Glukose (Pan et al. 2009). Somit könnte eine erhöhte Sensitivität für Insulin bei diesen Zellen vorliegen, die zu einem im Vergleich zu Salbutamol erhöhten p-AKT/AKT-Verhältnis führt. Auch ist es möglich, dass der Rezeptor für Salbutamol (β 2-Adrenorezeptor, ein GPCR) in der Zellmembran von Hepa1-6 Zellen nur gering exprimiert wird. In einer Arbeit von Kawai et al. konnte gezeigt werden, dass β 2-Adrenorezeptoren in der Plasmamembran von Hepatozyten exprimiert sind (Kawai et al. 1986), jedoch sind quantitative Analysen zur Expressionen des β 2-Adrenorezeptoren in der Zellmembran von Hepa1-6 Zellen bisher noch nicht beschrieben.

Interessanterweise konnte auch mit AS eine Reduktion des p-AKT/AKT-Verhältnisses nach Insulin-Stimulation festgestellt werden. In der Literatur ist eine Konzentration von 1 μ M als gebräuchlich beschrieben (Camps et al. 2005), weshalb diese Konzentration auch in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde. Möglicherweise könnte diese AS-Konzentration aber schon zu hoch sein, wodurch neben PI3K γ auch weitere PI3Ks inhibiert werden (Wei et al. 2010). Eine Überprüfung der Inhibition mit unterschiedlichen Konzentrationen an AS und Insulin-Stimulation könnte Aufschluss über den Einfluss von AS auf die unterschiedlichen PI3Ks geben. Die Reduktion des p-AKT/AKT-Verhältnisses durch AS nach Insulin-Stimulation könnte aber auch auf eine PI3K γ -Aktivität zurückzuführen sein. So konnte

gezeigt werden, dass Insulin neben den RTK-abhängigen PI3K-AKT-Signalweg auch den *Ras-mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg aktiviert (Taniguchi et al. 2006). Ras kann wiederum eine Aktivierung der PI3K hervorrufen (Vanhaesebroeck et al. 2016), wodurch es möglich ist, dass diese PI3K auch durch Insulin aktiviert wird. Für die AS-Inhibition von Hepa1-6 Zellen, die mit Salbutamol stimuliert wurden, ergab sich eine Reduktion des p-AKT/AKT-Verhältnisses, welche aber nicht signifikant zur Stimulation allein noch zur Kontrolle war. M. Beretta konnte in ihrer Arbeit mit AS nach Salbutamol-Stimulation eine Reduktion des p-AKT/AKT-Verhältnisses auf Kontrollniveau detektieren (Beretta 2018). Aufgrund dieser Diskrepanz zwischen den p-AKT/AKT-Verhältnissen mit AS nach Salbutamol-Stimulation in dieser Arbeit und der Arbeit von M. Beretta, müssen weitere Analysen erfolgen. So könnte die unterschiedliche Durchführung und Analyse der Untersuchungen zu den Unterschieden im p-AKT/AKT-Verhältnis führen.

Die Auswertung von Einzelzellen mittels ICC ergab deutliche Anreicherungen von p-AKT an der Zellmembran nach Stimulation mit Insulin, die für Veränderungen im Zytoskelett sprechen (Mommel et al. 2017). Ähnlich den WB-Ergebnissen zeigte sich eine stärkere Inhibition des p-AKT/AKT-Verhältnisses mit WM im Vergleich zu AS. Im Gegensatz zu den WB-Analysen waren die p-AKT/AKT-Verhältnisse deutlich niedriger. Hier könnten u.a. Hintergrundsignale, unspezifische Signale oder Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit anderen Antigenen zu einer Veränderung des p-AKT/AKT-Verhältnisses führen. Aufgrund dieser Beobachtungen ist es nötig, deutliche Aktivierungen von AKT im WB zu finden, um Effekte im ICC festzustellen. Dies spiegelte sich auch in den Ergebnissen der Salbutamol-Stimulation wider. Hier konnten im ICC keine Aktivierungen mehr von AKT nach Stimulation festgestellt werden. Interessanterweise gab es sogar eine signifikante Reduktion des p-AKT/AKT-Verhältnisses nach Stimulation mit Salbutamol bzw. Inhibition mit WM oder AS und anschließender Salbutamol-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle. Da dies nach den WB-Ergebnissen nicht zu erwarten war, bedarf es näherer Untersuchungen, warum mit der ICC eine Verminderung des p-AKT/AKT-Verhältnisses detektiert wurde.

Ähnlich den ICC-Ergebnissen konnten im ICW nur geringe p-AKT/AKT-Verhältnisse nach Stimulation mit Insulin detektiert werden. Auch hier könnten wieder Hintergrundsignale, unspezifischen Signale oder Kreuzreaktivitäten zu der Veränderung des p-AKT/AKT-Verhältnisses führen. Dadurch war es auch nicht möglich, einen Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses nach Stimulation mit Salbutamol zu detektieren. Im Vergleich zu WB und ICC konnte mit dieser Methode weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation mit Insulin und der Inhibition mit AS mit folgender Insulin-Stimulation gefunden werden. Bei dieser Methode wurde vor Inhibition und Stimulation das Kulturmedium nicht auf ein Medium ohne FKS gewechselt, da durch den Wechsel ein zu hoher Verlust an Zellen entstand.

Aufgrund dieser Änderung könnte AS mit den Serum-Proteinen im Kulturmedium interagiert haben. Diese Interaktion von AS mit den Serum-Proteinen könnte zu einer geringeren Aufnahme und folglich geringeren Inhibitionen führen. Weiterhin könnte FKS auch auf mögliche Rezeptoren auf der Zellmembran der Hepa1-6 Zellen wirken und so eine Verhinderung der Interaktion von AS mit der Zellmembran bewirken. Mit Hilfe des WB oder der ICC könnten diese Annahmen der geringeren Inhibition von AS in Kulturmedium mit FKS überprüft werden, in dem man bei beiden Methoden ebenfalls das Kulturmedium nicht wechselt.

Da die WB-Methode die höchste Sensitivität bei der Detektion des p-AKT/AKT-Verhältnisses im Vergleich zur ICC und dem ICW aufwies, wurde mit Hilfe dieser Methode nach weiteren PI3Kγ-Aktivatoren in Hepa1-6 Zellen gesucht. In der Literatur sind für diese PI3K vor allem Entzündungsmediatoren beschrieben. Hierbei können sowohl körpereigene Mediatoren wie der Komplementfaktor C5a als auch körperfremde Mediatoren wie fMLP und LPS PI3Kγ in Immunzellen aktivieren (Hirsch et al. 2000, Luo et al. 2014). Für diese Entzündungsmediatoren wird schon nach kurzer Stimulationszeit ein Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses gefunden, so dass für die Experimente in dieser Arbeit 5 min Stimulationszeit gewählt wurde, um ebenfalls einen Vergleich mit der Insulin-Stimulation zu ermöglichen. Es konnte jedoch weder für C5a noch fMLP oder LPS eine Erhöhung des p-AKT/AKT-Verhältnisses detektiert werden. Da M. Beretta für die Stimulation von Hepa1-6 Zellen mit fMLP einen Anstieg des p-AKT/AKT-Verhältnisses zeigen konnte, sind Unterschiede in den Durchführungen und Analysen der Stimulationsexperimente in den verschiedenen Laboren ein möglicher Grund für die Diskrepanz. So wurde bei M. Beretta bei der WB-Methode mit Hilfe der Chemilumineszenz detektiert (Beretta 2018), während in dieser Arbeit sekundäre Antikörper, welche mit Infrarotfarbstoffen gekoppelt sind, zur Detektion verwendet wurden. In weiteren Untersuchungen sollten diese beiden Detektionsmöglichkeiten parallel analysiert werden, um die Diskrepanz aufzuklären.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit verschiedenen Methoden PI3K-Aktivitäten untersucht werden können. Zur Analyse auf Einzelzellebene (ICC) und für Hochdurchsatzanalysen (ICW) konnte aber einzig Insulin als PI3K-Aktivator genutzt werden. Neben der Methodenetablierung konnte ein möglicher Einfluss von Insulin auf den PI3Kγ-AKT-Signalweg gezeigt werden. Diese Beobachtungen könnten einen essentiellen Einfluss auf die septische Cholestase haben, da in septischen Patienten häufig zunächst eine Hyperglykämie festgestellt wird und deswegen eine mögliche Insulintherapie nutzbringend sein könnte (Andersen et al. 2004). Mit den hier gezeigten Ergebnissen könnte diese Therapie aber eine Verschlechterung der septischen Cholestase hervorrufen, falls PI3Kγ durch Insulin aktiviert wird. Um die Rolle der PI3Kγ bei insulinabhängigen Signalwegen in der

Leber zu definieren, bedarf es weiterer Untersuchungen. So könnte der Einfluss von Insulin auf Merkmale der septischen Cholestase (u.a. veränderter Metabolismus, verringerte Mrp2-Lokalisation in der Zellmembran, reduzierte Mikrovillanzahl) in septischen und gesunden WT- und PI3K γ -KO-Mäusen analysiert werden.

7. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend konnte die hier vorliegende Arbeit zeigen, dass die Polymeranordnung und die Funktionalitäten der Polymere Einfluss auf die DNA-Interaktionen und Toxizitäten nehmen, diese aber immer im Zusammenhang mit der Polymerklasse zu sehen sind. Daneben sind diese Polymereigenschaften auch bei der zellulären Aufnahme von gebildeten Polyplexen und der Expression des Reportergens GFP nach erfolgreicher Polyplexaufnahme relevant.

Hierbei zeigten

- a) die Verwendung von P(MeOx) oder P(EtOx) keinen Unterschied bei den DNA-Interaktionen und der Toxizität,
- b) Polyplexe aus Blockcopolymeren und gradienten Copolymeren bessere Stabilitäten in Puffern mit variierenden Salzkonzentrationen als statistische Copolymere,
- c) die meisten Polyplexe unabhängig von der Polymeranordnung und -funktionalität Akkumulationen nach Polyplexherstellung in verschiedenen Puffern, die in späteren *in vivo* Applikationen zu Problemen führen können,
- d) P(Ox)-Polymere mit steigendem Prozentsatz an primären Aminen bessere DNA-Interaktionen, aber auch höhere Toxizitäten,
- e) P(AGE)-Polymere mit primären Aminen stärkere DNA-Interaktionen und höhere Zytotoxizitäten als P(AGE)-Polymere mit tertiären Aminen oder Imidazolen,
- f) die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Polyplexe mit primären Aminen hohe zelluläre Aufnahmeraten,
- g) keine der untersuchten Polyplexe GFP-Expressionsraten in verschiedenen Zelllinien, die vergleichbar zu Polyplexen mit dem Referenzpolymer LPEI waren.

Dabei konnte für die P(Ox)-Polyplexe eine Verhinderung der Freisetzung aus dem endolysosomalen Transportweg als Ursache der geringen GFP-Expressionen gezeigt werden.

Für neue Polymeransätze wären basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit:

- a) die Nutzung von P(MeOx) oder P(EtOx) als *Stealth*-Polymer möglich,
- b) gradiente oder Blockcopolymere gegenüber statistischen Copolymeren zu bevorzugen,
- c) Polymere mit primären Aminen als Funktionalitäten im Vergleich zu tertiären Aminen oder Imidazolen zu nutzen, wenn keine organselektiven Funktionalitäten verwendet werden,

d) tertiäre Amine oder Imidazole als Funktionalitäten für DNA-Interaktionen verwendbar, wenn weitere Funktionalitäten zur Erhöhung der zellulären Aufnahme der Polyplexe eingeführt werden.

Zur Charakterisierung von Polyplexen mit neu synthetisierten Polymeren konnten in dieser Arbeit verschiedene Methoden etabliert werden, mit denen der PI3K-AKT-Signalweg in Hepa1-6 Zellen untersucht werden kann. Hierbei zeigte sich, dass die WB-Methode im Vergleich zu der ICC und ICW-Methode die höchste Sensitivität aufwies.

In über diese Arbeit hinausgehenden Untersuchungen könnten nun mit den verschiedenen Methoden die Aktivität der PI3K-Isoformen mittels selektiver Stimulanzien und Inhibitoren in Hepatozyten untersucht werden. Daneben ist es möglich, neue zu untersuchende Polyplexe mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden zu charakterisieren.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adams N, Schubert US. 2007. Poly(2-oxazolines) in biological and biomedical application contexts. *Adv Drug Deliv Rev*, 59 (15):1504-1520.
- Aied A, Greiser U, Pandit A, Wang W. 2013. Polymer gene delivery: overcoming the obstacles. *Drug Discov Today*, 18 (21-22):1090-1098.
- Alessi DR, Downes CP. 1998. The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta*, 1436 (1-2):151-164.
- Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. 1996. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*, 399 (3):333-338.
- Alvarez B, Garrido E, Garcia-Sanz JA, Carrera AC. 2003. Phosphoinositide 3-kinase activation regulates cell division time by coordinated control of cell mass and cell cycle progression rate. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (29):26466-26473.
- An HJ, Cho NH, Yang HS, Kwak KB, Kim NK, Oh DY, Lee SW, Kim HO, Koh JJ. 2007. Targeted RNA interference of phosphatidylinositol 3-kinase p110-beta induces apoptosis and proliferation arrest in endometrial carcinoma cells. *J Pathol*, 212 (2):161-169.
- Andersen SK, Gjedsted J, Christiansen C, Tonnesen E. 2004. The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis. *J Leukoc Biol*, 75 (3):413-421.
- Anwer MS. 2012. Intracellular Signaling by Bile Acids. *J Biosci (Rajshari)*, 20:1-23.
- Aravalli RN, Belcher JD, Steer CJ. 2015. Liver-targeted gene therapy: Approaches and challenges. *Liver Transplantation*, 21 (6):718-737.
- Arcaro A, Wymann MP. 1993. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J*, 296 (Pt 2):297-301.
- Barthel MJ, Rinkenauer AC, Wagner M, Mansfeld U, Hoepfener S, Czaplewska JA, Gottschaldt M, Trager A, Schacher FH, Schubert US. 2014. Small but Powerful: Co-Assembly of Polyether-Based Triblock Terpolymers into Sub-30 nm Micelles and Synergistic Effects on Cellular Interactions. *Biomacromolecules*, 15 (7):2426-2439.
- Bassiri TG, Levy A, Litt M. 1967. Polymerization of Cyclic Imino Ethers .I. Oxazolines. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Letters*, 5 (9pb):871-&.
- Bauer M, Lautenschlaeger C, Kempe K, Tauhardt L, Schubert US, Fischer D. 2012. Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymer poly(ethylene glycol): comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility. *Macromol Biosci*, 12 (7):986-998.
- Bauer M, Schroeder S, Tauhardt L, Kempe K, Schubert US, Fischer D. 2013. In vitro hemocompatibility and cytotoxicity study of poly(2-methyl-2-oxazoline) for biomedical applications. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 51 (8):1816-1821.
- Becattini B, Marone R, Zani F, Arsenijevic D, Seydoux J, Montani JP, Dulloo AG, Thorens B, Preitner F, Wymann MP, Solinas G. 2011. PI3K gamma within a nonhematopoietic cell type negatively regulates diet-induced thermogenesis and promotes obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (42):E854-E863.
- Beretta M. 2018. Cell-type specific role of phosphoinositide 3-kinase γ in inflammatory-induced cholestasis Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Bhattacharjee S. 2016. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*, 235:337-351.
- Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Nussbaum RL. 2002. Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm Genome*, 13 (3):169-172.
- Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Wynshaw-Boris A, Nussbaum RL. 1999. Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 274 (16):10963-10968.

- Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. 2013. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*, 58 (3):593-608.
- Boeckle S, von Gersdorff K, van der Piepen S, Culmsee C, Wagner E, Ogris M. 2004. Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J Gene Med*, 6 (10):1102-1111.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (16):7297-7301.
- Bouten PJM, Hertsen D, Vergaelen M, Monnery BD, Boerman MA, Goossens H, Catak S, van Hest JCM, Van Speybroeck V, Hoogenboom R. 2015. Accelerated living cationic ring-opening polymerization of a methyl ester functionalized 2-oxazoline monomer. *Polymer Chemistry*, 6 (4):514-518.
- Brunetti-Pierri N. 2008. Gene therapy for inborn errors of liver metabolism: progress towards clinical applications. *Ital J Pediatr*, 34 (1):2.
- Brunetti-Pierri N, Palmer DJ, Beaudet AL, Carey KD, Finegold M, Ng P. 2004. Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates. *Hum Gene Ther*, 15 (1):35-46.
- Bus T, Englert C, Reifarh M, Borchers P, Hartlieb M, Vollrath A, Hoepfener S, Traeger A, Schubert US. 2017. 3rd generation poly(ethylene imine)s for gene delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 5 (6):1258-1274.
- Camps M, Ruckle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, Ferrandi C, Chabert C, Gillieron C, Francon B, Martin T, Gretener D, Perrin D, Leroy D, Vitte PA, Hirsch E, Wymann MP, Cirillo R, Schwarz MK, Rommel C. 2005. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med*, 11 (9):936-943.
- Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296 (5573):1655-1657.
- Cesana S, Auernheimer J, Jordan R, Kessler H, Nuyken O. 2006. First poly(2-oxazoline)s with pendant amino groups. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 207 (2):183-192.
- Check E. 2002. Regulators split on gene therapy as patient shows signs of cancer. *Nature*, 419 (6907):545-546.
- Chen JS, Wang Q, Fu XH, Huang XH, Chen XL, Cao LQ, Chen LZ, Tan HX, Li W, Bi J, Zhang LJ. 2009. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatol Res*, 39 (2):177-186.
- Clogston JD, Patri AK. 2011. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol*, 697:63-70.
- Curtis KA, Miller D, Millard P, Basu S, Horkay F, Chandran PL. 2016. Unusual Salt and pH Induced Changes in Polyethylenimine Solutions. *PLoS One*, 11 (9):e0158147.
- Darlington GJ, Bernhard HP, Miller RA, Ruddle FH. 1980. Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 64 (4):809-819.
- De Smedt SC, Demeester J, Hennink WE. 2000. Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm Res*, 17 (2):113-126.
- Del Prete A, Vermi W, Dander E, Otero K, Barberis L, Luini W, Bernasconi S, Sironi M, Santoro A, Garlanda C, Facchetti F, Wymann MP, Vecchi A, Hirsch E, Mantovani A, Sozzani S. 2004. Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO J*, 23 (17):3505-3515.
- Dituri F, Mazzocca A, Lupo L, Edling CE, Azzariti A, Antonaci S, Falasca M, Giannelli G. 2012. PI3K class IB controls the cell cycle checkpoint promoting cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 130 (11):2505-2513.
- Egorina EM, Sovershaev MA, Osterud B. 2006. In-cell Western assay: a new approach to visualize tissue factor in human monocytes. *J Thromb Haemost*, 4 (3):614-620.
- El-Aneed A. 2004. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release*, 94 (1):1-14.

- Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P. 1996. Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA lactosylated polylysine complexes. *Experimental Cell Research*, 225 (1):186-194.
- Favretto ME, Krieg A, Schubert S, Schubert US, Brock R. 2015. Multifunctional poly(methacrylate) polyplex libraries: A platform for gene delivery inspired by nature. *J Control Release*, 209:1-11.
- Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, Cheng SH, Cullis P, Huang L, Jessee JA, Seymour L, Szoka F, Thierry AR, Wagner E, Wu G. 1997. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther*, 8 (5):511-512.
- Filippov SK, Verbraeken B, Konarev PV, Svergun DI, Angelov B, Vishnevetskaya NS, Papadakis CM, Rogers S, Radulescu A, Courtin T, Martins JC, Starovoytova L, Hruba M, Stepanek P, Kravchenko VS, Potemkin, II, Hoogenboom R. 2017. Block and Gradient Copoly(2-oxazoline) Micelles: Strikingly Different on the Inside. *J Phys Chem Lett*, 8 (16):3800-3804.
- Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP, Kissel T. 1999. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res*, 16 (8):1273-1279.
- Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Kriegelstein J, Kissel T. 2003. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24 (7):1121-1131.
- Foldvari M, Chen DW, Nafissi N, Calderon D, Narsineni L, Rafiee A. 2016. Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *J Control Release*, 240:165-190.
- Forrest ML, Koerber JT, Pack DW. 2003. A degradable polyethylenimine derivative with low toxicity for highly efficient gene delivery. *Bioconjug Chem*, 14 (5):934-940.
- Friedmann T, Roblin R. 1972. Gene therapy for human genetic disease? *Science*, 175 (4025):949-955.
- Gary DJ, Min J, Kim Y, Park K, Won YY. 2013. The effect of N/P ratio on the in vitro and in vivo interaction properties of PEGylated poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-based siRNA complexes. *Macromol Biosci*, 13 (8):1059-1071.
- Ghigo A, Morello F, Perino A, Hirsch E. 2012. Phosphoinositide 3-kinases in health and disease. *Subcell Biochem*, 58:183-213.
- Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med*, 15 (2):65-77.
- Glassner M, Vergaelen M, Hoogenboom R. 2018. Poly(2-oxazoline)s: A comprehensive overview of polymer structures and their physical properties. *Polymer International*, 67 (1):32-45.
- Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM. 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (33):11613-11618.
- Grosshans H. 2000. Gene therapy--when a simple concept meets a complex reality. Review on gene therapy. *Funct Integr Genomics*, 1 (2):142-145.
- Gu X, Manautou JE. 2010. Regulation of hepatic ABC transporters by xenobiotics and in disease states. *Drug Metab Rev*, 42 (3):482-538.
- Guillerm B, Monge S, Lapinte V, Robin JJ. 2012. How to modulate the chemical structure of polyoxazolines by appropriate functionalization. *Macromol Rapid Commun*, 33 (19):1600-1612.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302 (5644):415-419.

- Haga S, Ozaki M, Inoue H, Okamoto Y, Ogawa W, Takeda K, Akira S, Todo S. 2009. The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology*, 49 (1):204-214.
- Hanada M, Feng J, Hemmings BA. 2004. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*, 1697 (1-2):3-16.
- Hardy JF, Belisle S, Robitaille D, Perrault J, Roy M, Gagnon L. 1996. Measurement of heparin concentration in whole blood with the Hepcon/HMS device does not agree with laboratory determination of plasma heparin concentration using a chromogenic substrate for activated factor X. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 112 (1):154-161.
- Hay N, Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, 18 (16):1926-1945.
- He ZJ, Miao L, Jordan R, S-Manickam D, Luxenhofer R, Kabanov AV. 2015. A Low Protein Binding Cationic Poly(2-oxazoline) as Non-Viral Vector. *Macromolecular Bioscience*, 15 (7):1004-1020.
- Herrero MJ, Sabater L, Guenechea G, Sendra L, Montilla AI, Abargues R, Navarro V, Alino SF. 2012. DNA delivery to 'ex vivo' human liver segments. *Gene Ther*, 19 (5):504-512.
- Hertz D, Leiske MN, Wloka T, Traeger A, Hartlieb M, Kessels MM, Schubert S, Qualmann B, Schubert US. 2018. Comparison of random and gradient amino functionalized poly(2-oxazoline)s: Can the transfection efficiency be tuned by the macromolecular structure? *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 56 (12):1210-1224.
- Hill AB, Chen MF, Chen CK, Pfeifer BA, Jones CH. 2016. Overcoming Gene-Delivery Hurdles: Physiological Considerations for Nonviral Vectors. *Trends in Biotechnology*, 34 (2):91-105.
- Hirsch E, Braccini L, Ciraolo E, Morello F, Perino A. 2009. Twice upon a time: PI3K's secret double life exposed. *Trends Biochem Sci*, 34 (5):244-248.
- Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP. 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*, 287 (5455):1049-1053.
- Hoffman GR, Moerke NJ, Hsia M, Shamu CE, Blenis J. 2010. A high-throughput, cell-based screening method for siRNA and small molecule inhibitors of mTORC1 signaling using the In Cell Western technique. *Assay Drug Dev Technol*, 8 (2):186-199.
- Hong F, Nguyen VA, Shen X, Kunos G, Gao B. 2000. Rapid activation of protein kinase B/Akt has a key role in antiapoptotic signaling during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 279 (3):974-979.
- Howell DP, Krieser RJ, Eastman A, Barry MA. 2003. Deoxyribonuclease II is a lysosomal barrier to transfection. *Mol Ther*, 8 (6):957-963.
- Hoyle CE, Bowman CN. 2010. Thiol-ene click chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 49 (9):1540-1573.
- Hruby M, Konak C, Ulbrich K. 2005. Poly(allyl glycidyl ether)-block-Poly(ethylene oxide): A Novel Promising Polymeric Intermediate for the Preparation of Micellar Drug Delivery Systems. *Journal of Applied Polymer Science*, 95:201-211.
- Hwang HS, Hu J, Na K, Bae YH. 2014. Role of polymeric endosomolytic agents in gene transfection: a comparative study of poly(L-lysine) grafted with monomeric L-histidine analogue and poly(L-histidine). *Biomacromolecules*, 15 (10):3577-3586.
- Ihle NT, Williams R, Chow S, Chew W, Berggren MI, Paine-Murrieta G, Minion DJ, Halter RJ, Wipf P, Abraham R, Kirkpatrick L, Powis G. 2004. Molecular pharmacology and antitumor activity of PX-866, a novel inhibitor of phosphoinositide-3-kinase signaling. *Mol Cancer Ther*, 3 (7):763-772.
- Jäger M, Schubert S, Ochrimenko S, Fischer D, Schubert US. 2012. Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application. *Chem Soc Rev*, 41 (13):4755-4767.
- Janku F. 2017. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. *Cancer Treat Rev*, 59:93-101.

- Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, Zhang J, Signoretti S, Loda M, Roberts TM, Zhao JJ. 2008. Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature*, 454 (7205):776-779.
- Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. 2014. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*, 4 (3):240-255.
- Kagiya T, Narisawa S, Maeda T, Fukui K. 1966. Ring-Opening Polymerization of 2-Substituted 2-Oxazolines. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Letters*, 4 (7pb):441-&.
- Kamimura K, Suda T, Zhang G, Liu D. 2011. Advances in Gene Delivery Systems. *Pharmaceut Med*, 25 (5):293-306.
- Kawai Y, Powell A, Arinze IJ. 1986. Adrenergic receptors in human liver plasma membranes: predominance of beta 2- and alpha 1-receptor subtypes. *J Clin Endocrinol Metab*, 62 (5):827-832.
- Khoury L, Zalko D, Audebert M. 2013. Validation of high-throughput genotoxicity assay screening using gammaH2AX in-cell western assay on HepG2 cells. *Environ Mol Mutagen*, 54 (9):737-746.
- Kim KH, Shin HJ, Kim K, Choi HM, Rhee SH, Moon HE, Kim HH, Yang US, Yu DY, Cheong J. 2007. Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPAR gamma. *Gastroenterology*, 132 (5):1955-1967.
- Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, Goldenberg DD, Williams O, Loewith R, Stokoe D, Balla A, Toth B, Balla T, Weiss WA, Williams RL, Shokat KM. 2006. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell*, 125 (4):733-747.
- Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. 2009. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci*, 34 (3):115-127.
- Koppel DE. 1972. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy - Method of Cumulants. *Journal of Chemical Physics*, 57 (11):4814-&.
- Kriplani N, Hermida MA, Brown ER, Leslie NR. 2015. Class I PI 3-kinases: Function and evolution. *Adv Biol Regul*, 59:53-64.
- Kulik G, Klippel A, Weber MJ. 1997. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Molecular and Cellular Biology*, 17 (3):1595-1606.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227 (5259):680-+.
- Lagunavicius A, Zigmantas S, Riauba L, Zaliauskiene L, Makuska R, Vareikis A, Bernadisiute U. 2007. Transfection Reagent USA: Thermo Fisher Scientific Baltics UAB
- Lammi C, Zanoni C, Arnoldi A. 2015. A simple and high-throughput in-cell Western assay using HepG2 cell line for investigating the potential hypocholesterolemic effects of food components and nutraceuticals. *Food Chem*, 169:59-64.
- Leclercq F, Dubertret C, Pitard B, Scherman D, Herscovici J. 2000. Synthesis of glycosylated polyethylenimine with reduced toxicity and high transfecting efficiency. *Bioorg Med Chem Lett*, 10 (11):1233-1235.
- Lee BF, Kade MJ, Chute JA, Gupta N, Campos LM, Fredrickson GH, Kramer EJ, Lynd NA, Hawker CJ. 2011. Poly(allyl Glycidyl Ether)-A Versatile and Functional Polyether Platform. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 49 (20):4498-4504.
- Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. 2005. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 24 (8):1477-1480.
- Legros C, De Pauw-Gillet MC, Tam KC, Lecommandoux S, Taton D. 2015. Aldehyde-functional copolymers based on poly(2-oxazoline) for post-polymerization modification. *European Polymer Journal*, 62:322-330.
- Leiske MN, Sobotta FH, Richter F, Hoepfener S, Brendel JC, Traeger A, Schubert US. 2018. How To Tune the Gene Delivery and Biocompatibility of Poly(2-(4-aminobutyl)-2-oxazoline) by Self- and Coassembly. *Biomacromolecules*, 19 (3):748-760.

- Lewis AJ, Seymour CW, Rosengart MR. 2016. Current Murine Models of Sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*, 17 (4):385-393.
- Liu P, Gan W, Chin YR, Ogura K, Guo J, Zhang J, Wang B, Blenis J, Cantley LC, Toker A, Su B, Wei W. 2015. PtdIns(3,4,5)P₃-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov*, 5 (11):1194-1209.
- Luo D, Saltzman WM. 2000. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol*, 18 (1):33-37.
- Luo L, Wall AA, Yeo JC, Condon ND, Norwood SJ, Schoenwaelder S, Chen KW, Jackson S, Jenkins BJ, Hartland EL, Schroder K, Collins BM, Sweet MJ, Stow JL. 2014. Rab8a interacts directly with PI3K γ to modulate TLR4-driven PI3K and mTOR signalling. *Nat Commun*, 5:4407.
- Luxenhofer R, Sahay G, Schulz A, Alakhova D, Bronich TK, Jordan R, Kabanov AV. 2011. Structure-property relationship in cytotoxicity and cell uptake of poly(2-oxazoline) amphiphiles. *J Control Release*, 153 (1):73-82.
- Macherey AC DP. 2008. Biotransformations leading to toxic metabolites: chemical aspects. CG Wermuth (Ed), *The Practice of Medicinal Chemistry (3rd edn)*, Academic Press.
- Matsuda S, Kobayashi M, Kitagishi Y. 2013. Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Endocrinol*, 2013:472432.
- McDonough PG. 1997. The ethics of somatic and germline gene therapy. *Ann N Y Acad Sci*, 816:378-382.
- Mees M, Haladjova E, Momekova D, Momekov G, Shestakova PS, Tsvetanov CB, Hoogenboom R, Rangelov S. 2016. Partially Hydrolyzed Poly(n-propyl-2-oxazoline): Synthesis, Aqueous Solution Properties, and Preparation of Gene Delivery Systems. *Biomacromolecules*, 17 (11):3580-3590.
- Mehta R, Kumari R, Das P, Bhowmick AK. 2014. Synthesis and characterization of a biocompatible monotyrosine-based polymer and its interaction with DNA. *J Mater Chem B*, 2 (37):6236-6248.
- Mellott AJ, Forrest ML, Detamore MS. 2013. Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, 41 (3):446-468.
- Memmel S, Sisario D, Zoller C, Fiedler V, Katzer A, Heiden R, Becker N, Eing L, Ferreira FLR, Zimmermann H, Sauer M, Flentje M, Sukhorukov VL, Djuzenova CS. 2017. Migration pattern, actin cytoskeleton organization and response to PI3K-, mTOR-, and Hsp90-inhibition of glioblastoma cells with different invasive capacities. *Oncotarget*, 8 (28):45298-45310.
- Michalopoulos GK. 2017. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology*, 65 (4):1384-1392.
- Midoux P, Breuzard G, Gomez JP, Pichon C. 2008. Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Curr Gene Ther*, 8 (5):335-352.
- Midoux P, Pichon C, Yaouanc JJ, Jaffres PA. 2009. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol*, 157 (2):166-178.
- Mingozzi F, High KA. 2011. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature Reviews Genetics*, 12 (5):341-355.
- Mintzer MA, Simanek EE. 2009. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev*, 109 (2):259-302.
- Morales-Ruiz M, Santel A, Ribera J, Jimenez W. 2017. The Role of Akt in Chronic Liver Disease and Liver Regeneration. *Semin Liver Dis*, 37 (1):11-16.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65 (1-2):55-63.
- Mulligan RC. 1993. The basic science of gene therapy. *Science*, 260 (5110):926-932.
- Nagy V, Watzel M. 2006. FuGENE® 6 Transfection Reagent: minimizing reagent-dependent side effects as analyzed by geneexpression profiling and cytotoxicity assays. *Nat Methods*, 3:414.
- Naldini L. 2015. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526 (7573):351-360.
- Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res*, 1:27.

- Neu M, Fischer D, Kissel T. 2005. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med*, 7 (8):992-1009.
- Nies AT, Keppler D. 2007. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch*, 453 (5):643-659.
- Nolze A, Schneider J, Keil R, Lederer M, Huttelmaier S, Kessels MM, Qualmann B, Hatzfeld M. 2013. FMRP regulates actin filament organization via the armadillo protein p0071. *RNA*, 19 (11):1483-1496.
- Nuyken O, Pask SD. 2013. Ring-Opening Polymerization—An Introductory Review. *Polymers*, 5 (2):361-403.
- Ohshima H. 1994. A Simple Expression for Henrys Function for the Retardation Effect in Electrophoresis of Spherical Colloidal Particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 168 (1):269-271.
- Olmsted J, 3rd, Kearns DR. 1977. Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry*, 16 (16):3647-3654.
- Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. 2005. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 4 (7):581-593.
- Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. 2009. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics*, 8 (3):443-450.
- Pannier AK, Shea LD. 2004. Controlled release systems for DNA delivery. *Mol Ther*, 10 (1):19-26.
- Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. 2004. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*, 118 (3):375-387.
- Pezzoli D, Giupponi E, Mantovani D, Candiani G. 2017. Size matters for in vitro gene delivery: investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation. *Sci Rep*, 7:44134.
- Piro S, Spadaro L, Russello M, Spampinato D, Oliveri CE, Vasquez E, Benigno R, Brancato F, Purrello F, Rabuazzo AM. 2008. Molecular determinants of insulin resistance, cell apoptosis and lipid accumulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18 (8):545-552.
- Postel J, Schloerb PR, Furtado D. 1975. Pathophysiologic alterations during bacterial infusions for the study of bacteremic shock. *Surg Gynecol Obstet*, 141 (5):683-692.
- Puri KD, Doggett TA, Huang CY, Douangpanya J, Hayflick JS, Turner M, Penninger J, Diacovo TG. 2005. The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood*, 106 (1):150-157.
- Ramamoorth M, Narvekar A. 2015. Non viral vectors in gene therapy- an overview. *J Clin Diagn Res*, 9 (1):GE01-06.
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML. 2003. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, 80 (1-2):148-158.
- Recknagel P, Gonnert FA, Westermann M, Lambeck S, Lupp A, Rudiger A, Dyson A, Carre JE, Kortgen A, Krafft C, Popp J, Sponholz C, Fuhrmann V, Hilger I, Claus RA, Riedemann NC, Wetzker R, Singer M, Trauner M, Bauer M. 2012. Liver Dysfunction and Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalling in Early Sepsis: Experimental Studies in Rodent Models of Peritonitis. *Plos Medicine*, 9 (11).
- Remy-Kristensen A, Clamme JP, Vuilleumier C, Kuhry JG, Mely Y. 2001. Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1514 (1):21-32.
- Resnik DB, Langer PJ. 2001. Human germline gene therapy reconsidered. *Hum Gene Ther*, 12 (11):1449-1458.

- Rinkenauer AC, Schubert S, Traeger A, Schubert US. 2015a. The influence of polymer architecture on in vitro pDNA transfection. *Journal of Materials Chemistry B*, 3 (38):7477-7493.
- Rinkenauer AC, Tauhardt L, Wendler F, Kempe K, Gottschaldt M, Traeger A, Schubert US. 2015b. A Cationic Poly(2-oxazoline) with High In Vitro Transfection Efficiency Identified by a Library Approach. *Macromolecular Bioscience*, 15 (3):414-425.
- Rinkenauer AC, Vollrath A, Schallon A, Tauhardt L, Kempe K, Schubert S, Fischer D, Schubert US. 2013. Parallel high-throughput screening of polymer vectors for nonviral gene delivery: evaluation of structure-property relationships of transfection. *ACS Comb Sci*, 15 (9):475-482.
- Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. 2007. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*, 81 (1):137-143.
- Rommel C, Camps M, Ji H. 2007. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol*, 7 (3):191-201.
- Ruckle T, Schwarz MK, Rommel C. 2006. PI3K gamma inhibition: towards an 'aspirin of the 21st century'? *Nature Reviews Drug Discovery*, 5 (11):903-918.
- Rust C, Bauchmuller K, Fickert P, Fuchsbichler A, Beuers U. 2005. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling modulates taurochenodeoxycholic acid-induced liver injury and cholestasis in perfused rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289 (1):G88-94.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307 (5712):1098-1101.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM. 2000. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*, 287 (5455):1040-1046.
- Satoh T, Irie A, Egawa S, Baba S. 2005. In situ gene therapy for prostate cancer. *Curr Gene Ther*, 5 (1):111-119.
- Schatzlein AG. 2001. Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress. *Anticancer Drugs*, 12 (4):275-304.
- Schmitz V, Qian C, Ruiz J, Sangro B, Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Prieto J. 2002. Gene therapy for liver diseases: recent strategies, for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut*, 50 (1):130-135.
- Seeliger W, Aufderhaar E, Diepers W, Feinauer R, Nehring R, Thier W, Hellmann H. 1966. Recent Syntheses and Reactions of Cyclic Imidic Esters. *Angewandte Chemie-International Edition*, 5 (10):875-+.
- Shugg RP, Thomson A, Tanabe N, Kashishian A, Steiner BH, Puri KD, Pereverzev A, Lannutti BJ, Jirik FR, Dixon SJ, Sims SM. 2013. Effects of isoform-selective phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors on osteoclasts: actions on cytoskeletal organization, survival, and resorption. *J Biol Chem*, 288 (49):35346-35357.
- Shum VW, Gabrielson NP, Forrest ML, Pack DW. 2012. The effects of PVP(Fe(III)) catalyst on polymer molecular weight and gene delivery via biodegradable cross-linked polyethylenimine. *Pharm Res*, 29 (2):500-510.
- Shuttleworth SJ, Silva FA, Cecil AR, Tomassi CD, Hill TJ, Raynaud FI, Clarke PA, Workman P. 2011. Progress in the preclinical discovery and clinical development of class I and dual class I/IV phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitors. *Curr Med Chem*, 18 (18):2686-2714.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315 (8):801-810.
- Smith LD, Hickman ES, Parry RV, Westwick J, Ward SG. 2007. PI3Kgamma is the dominant isoform involved in migratory responses of human T lymphocytes: effects of ex vivo maintenance and limitations of non-viral delivery of siRNA. *Cell Signal*, 19 (12):2528-2539.

- Stiehler M, Duch M, Mygind T, Li H, Ulrich-Vinther M, Modin C, Baatrup A, Lind M, Pedersen FS, Bungler CE. 2006. Optimizing viral and non-viral gene transfer methods for genetic modification of porcine mesenchymal stem cells. *Adv Exp Med Biol*, 585:31-48.
- Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, et al. 1995. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science*, 269 (5224):690-693.
- Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. 2004. The hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (13):12232-12241.
- Suda J, Rockey DC, Karvar S. 2016. Akt2-Dependent Phosphorylation of Radixin in Regulation of Mrp-2 Trafficking in WIF-B Cells. *Dig Dis Sci*, 61 (2):453-463.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (2):85-96.
- Taubmann C, Luxenhofer R, Cesana S, Jordan R. 2005. First aldehyde-functionalized poly(2-oxazoline)s for chemoselective ligation. *Macromolecular Bioscience*, 5 (7):603-612.
- Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, Schlenk F, Fischer D, Kiouptsi K, Reinhardt C, Landfester K, Schild H, Maskos M, Knauer SK, Stauber RH. 2013. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol*, 8 (10):772-781.
- Thermo. 2018. TurboFect Transfection Reagent Thermo Fisher Scientific Inc.
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 4 (5):346-358.
- Tomalia DA, Sheetz DP. 1966. Homopolymerization of 2-Alkyl- and 2-Aryl-2-Oxazolines. *Journal of Polymer Science Part a-1-Polymer Chemistry*, 4 (9pa1):2253-&.
- Trützscher AK, Bus T, Reifarth M, Brendel JC, Hoepfener S, Traeger A, Schubert US. 2018. Beyond Gene Transfection with Methacrylate-Based Polyplexes-The Influence of the Amino Substitution Pattern. *Bioconjug Chem*, 29 (7):2181-2194.
- van der Crabben SN, Blumer RM, Stegenga ME, Ackermans MT, Endert E, Tanck MW, Serlie MJ, van der Poll T, Sauerwein HP. 2009. Early endotoxemia increases peripheral and hepatic insulin sensitivity in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 94 (2):463-468.
- Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13 (3):195-203.
- Vanhaesebroeck B, Whitehead MA, Pineiro R. 2016. Molecules in medicine mini-review: isoforms of PI3K in biology and disease. *J Mol Med (Berl)*, 94 (1):5-11.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD. 1997. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci*, 22 (7):267-272.
- Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11 (5):329-341.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual Review of Biochemistry*, 70:535-602.
- Venable JD, Ameriks MK, Blevitt JM, Thurmond RL, Fung-Leung WP. 2010. Phosphoinositide 3-kinase gamma (PI3Kgamma) inhibitors for the treatment of inflammation and autoimmune disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 4 (1):1-15.
- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. 1999. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 103 (7):931-943.
- Vollrath A, Schallon A, Pietsch C, Schubert S, Nomoto T, Matsumoto Y, Kataoka K, Schubert US. 2013. A toolbox of differently sized and labeled PMMA nanoparticles for cellular uptake investigations. *Soft Matter*, 9 (1):99-108.

- Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. 2013. Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol*, 14 (1):46-60.
- Waring MJ. 1965. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol*, 13 (1):269-282.
- Waris G, Felmlee DJ, Negro F, Siddiqui A. 2007. Hepatitis C virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress. *Journal of Virology*, 81 (15):8122-8130.
- Wei X, Han J, Chen ZZ, Qi BW, Wang GC, Ma YH, Zheng H, Luo YF, Wei YQ, Chen LJ. 2010. A phosphoinositide 3-kinase-gamma inhibitor, AS605240 prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 397 (2):311-317.
- Weinkove D, Neufeld TP, Twardzik T, Waterfield MD, Leever SJ. 1999. Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ site by *Drosophila* class I(A) phosphoinositide 3-kinase and its adaptor. *Current Biology*, 9 (18):1019-1029.
- Wen Y, Pan S, Luo X, Zhang X, Zhang W, Feng M. 2009. A biodegradable low molecular weight polyethylenimine derivative as low toxicity and efficient gene vector. *Bioconjug Chem*, 20 (2):322-332.
- Whitman M, Kaplan DR, Schaffhausen B, Cantley L, Roberts TM. 1985. Association of Phosphatidylinositol Kinase-Activity with Polyoma Middle-T Competent for Transformation. *Nature*, 315 (6016):239-242.
- Wiesbrock F, Hoogenboom R, Abeln CH, Schubert US. 2004. Single-mode microwave ovens as new reaction devices: Accelerating the living polymerization of 2-ethyl-2-oxazoline. *Macromolecular Rapid Communications*, 25 (22):1895-1899.
- Wilson P, Ke PC, Davis TP, Kempe K. 2017. Poly(2-oxazoline)-based micro- and nanoparticles: A review. *European Polymer Journal*, 88:486-515.
- Wissuwa B, Heinemann SH, Bauer M, Coldewey SM. 2018. Studies into Slo1 K(+) channels and their ligand docosahexaenoic acid in murine sepsis to delineate off-target effects of immunonutrition. *Life Sci*, 203:112-120.
- Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M. 2003. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci*, 24 (7):366-376.
- Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayotou G. 1996. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol*, 16 (4):1722-1733.
- Yue Y, Jin F, Deng R, Cai J, Chen Y, Lin MC, Kung HF, Wu C. 2011. Revisit complexation between DNA and polyethylenimine - Effect of uncomplexed chains free in the solution mixture on gene transfection. *J Control Release*, 155 (1):67-76.
- Zhang L, Yang N, Liang S, Barchetti A, Vezzani C, Huang J, O'Brien-Jenkins A, Rubin SC, Coukos G. 2004. RNA interference: a potential strategy for isoform-specific phosphatidylinositol 3-kinase targeted therapy in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*, 3 (12):1283-1289.
- Zhang Y, Zhang Y, Chen J, Zhang B, Pan Y, Ren L, Zhao J, Luo Y, Zhai D, Wang S, Wang J. 2007. Polybutylcyanoacrylate nanoparticles as novel vectors in cancer gene therapy. *Nanomedicine*, 3 (2):144-153.
- Zhao JJ, Cheng H, Jia S, Wang L, Gjoerup OV, Mikami A, Roberts TM. 2006. The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (44):16296-16300.
- Zhao N, Roesler S, Kissel T. 2011. Synthesis of a new potential biodegradable disulfide containing poly(ethylene imine)-poly(ethylene glycol) copolymer cross-linked with click cluster for gene delivery. *Int J Pharm*, 411 (1-2):197-205.
- Zucchetti AE, Barosso IR, Boaglio A, Pellegrino JM, Ochoa EJ, Roma MG, Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EJ. 2011. Prevention of estradiol 17beta-D-glucuronide-induced canalicular transporter internalization by hormonal modulation of cAMP in rat hepatocytes. *Mol Biol Cell*, 22 (20):3902-3915.

9. Anhang

9.1 Zusätzliches Material

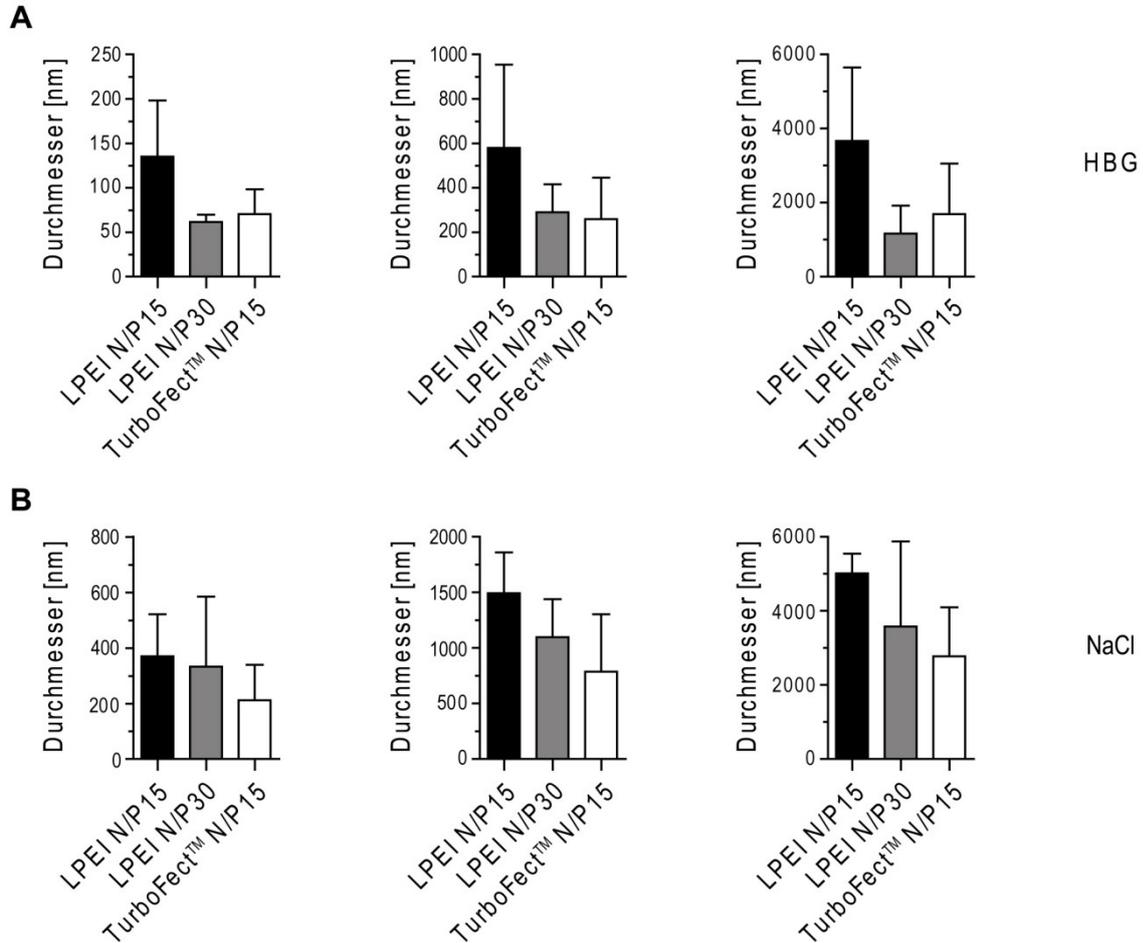


Abb. 30: Darstellung der einzelnen Peaks der vorkommenden Polyplexgrößen mit LPEI oder TurboFect™. Polyplexe wurden entweder in A) HBG oder B) 150 mM NaCl hergestellt und nach 15 min Inkubation mittels DLS auf ihre Größenverteilung untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. Je Experiment erfolgten Dreifachbestimmungen.

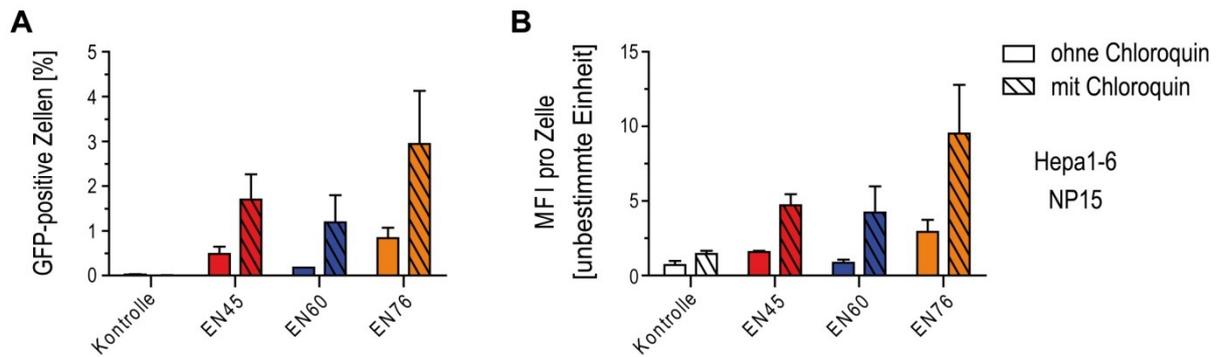


Abb. 31: Einfluss von Chloroquin auf die Transfektion von P(AGE)-Polyplexen in Hepa1-6 Zellen. Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 15 hergestellt und in Kulturmedium ohne FKS (D0) mit oder ohne Chloroquin (100 μ M) für 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen weitere 44 h in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Kontrolle wurden die Zellen mit pDNA für 4 h inkubiert. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen und die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFIs) wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

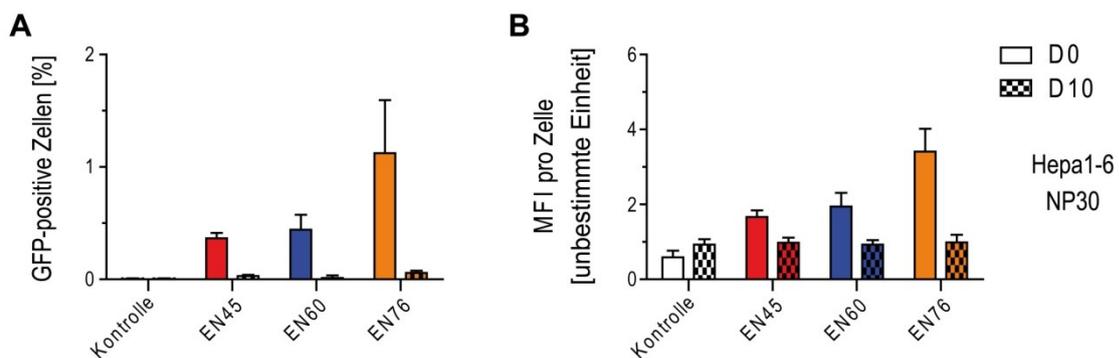


Abb. 32: Untersuchung von P(AGE)-Polyplexen mit einem N/P-Verhältnis von 30 48 h nach Transfektion in Hepa1-6 Zellen. Die Zellen wurden mit Polyplexen der jeweiligen Polymere bei einem N/P-Verhältnis von 30 für 4 h in Medium mit 10% (D10) oder ohne FKS (D0) transfiziert und anschließend weitere 44 h in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Inkubation der Zellen mit pDNA für 4 h diente als Kontrolle. Die Analyse der Anzahl der GFP-positiven Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFIs) erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

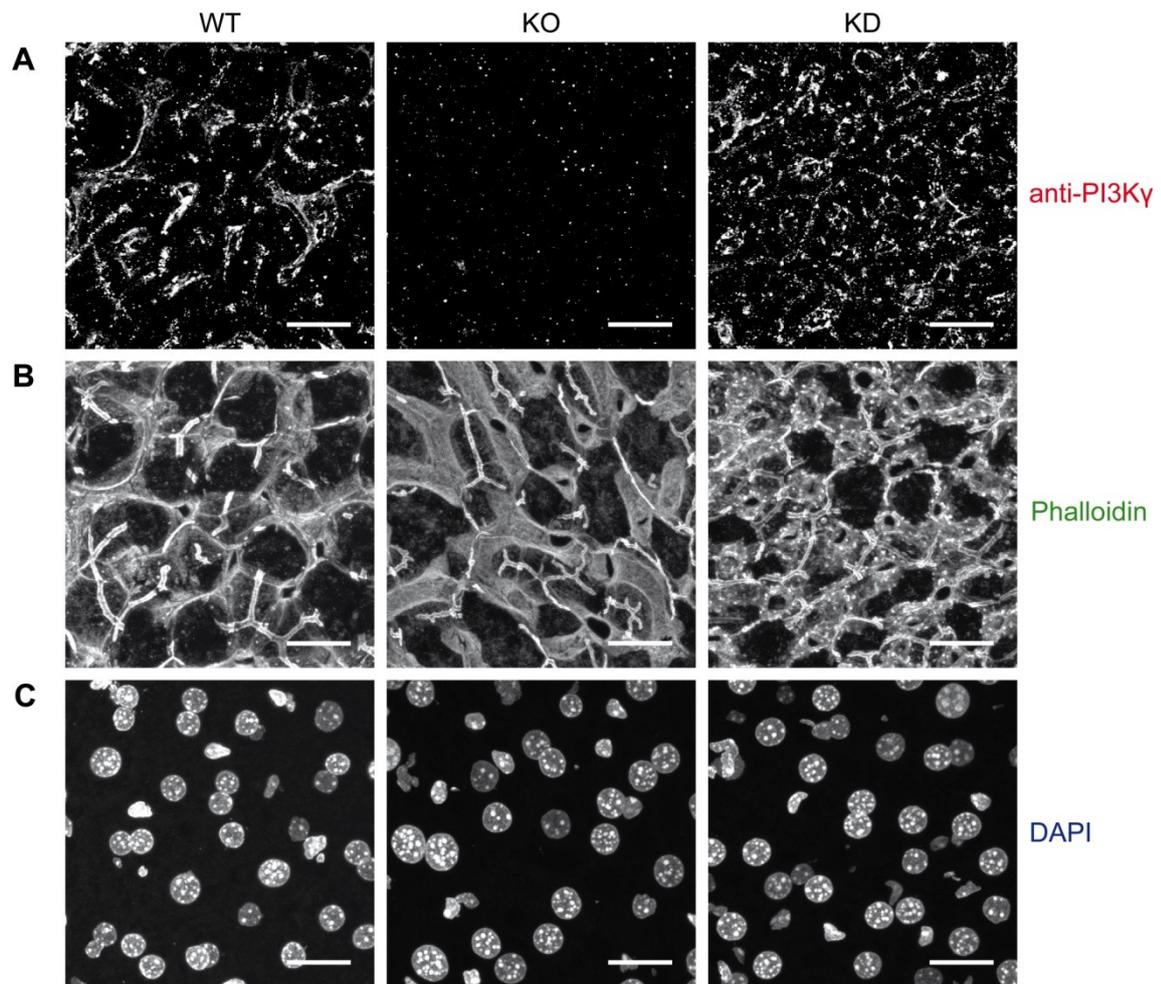


Abb. 33: Kanäle der immunhistochemischen Färbung von Leberschnitten mit Phalloidin. Leberschnitte (Schichtdicke 14 μm) von 14 Wochen alten WT-, PI3Ky-KO- und PI3Ky-KD-Mäusen wurden mit Antikörpern gegen PI3Ky (A) markiert. Phalloidin (B) wurde zum Anfärben von F-Aktin und DAPI (C) zum Anfärben der Zellkerne genutzt. Maßstabsbalken 20 μm

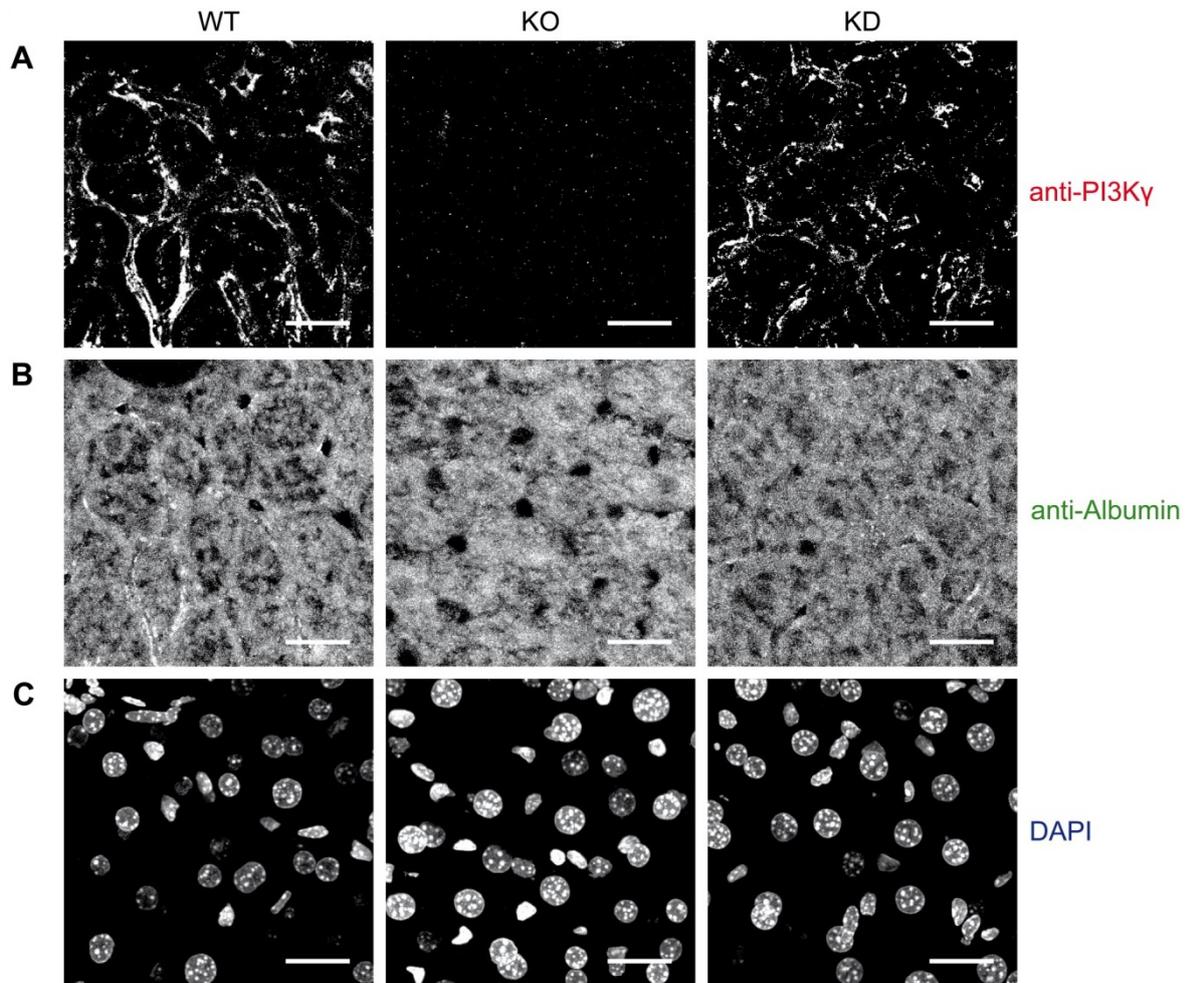


Abb. 34: Kanäle der immunhistochemischen Färbung von Leberschnitten mit anti-Albumin. Es wurden Leberschnitte (14 μm Schichtdicke) von 14 Wochen alten WT-, PI3K γ -KO- und PI3K γ -KD-Mäusen angefertigt und mit Antikörpern gegen PI3K γ (A) sowie den Hepatozytenmarker Albumin (B) markiert. DAPI (C) wurde zum Anfärben der Zellkerne genutzt. Maßstabsbalken 20 μm

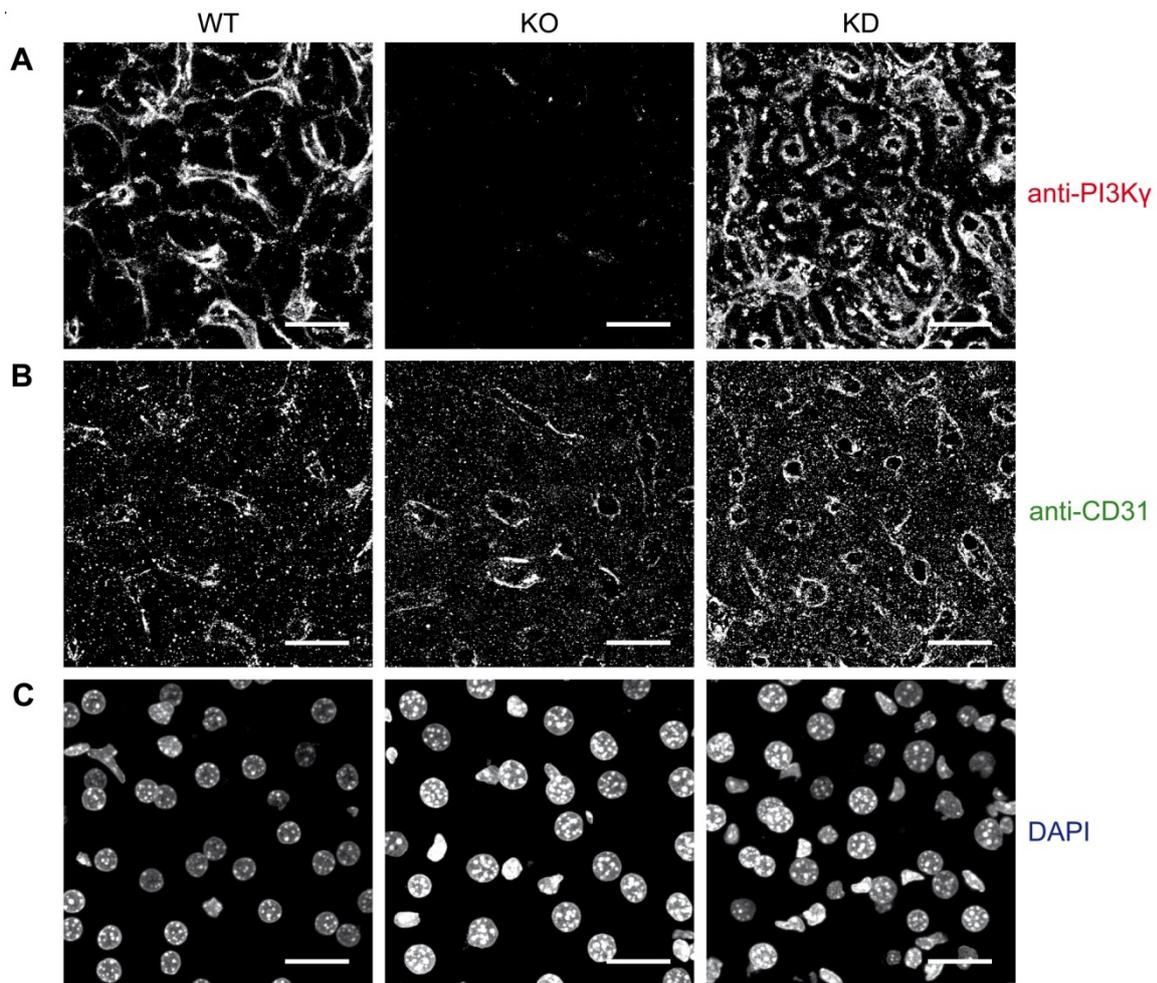


Abb. 35: Kanäle der immunhistochemischen Färbung von Leberschnitten mit anti-CD31. Es wurden von 14 Wochen alten WT-, PI3K γ -KO- und PI3K γ -KD-Mäusen Leberschnitte mit einer Schichtdicke von 14 μ m angefertigt und mit Antikörpern gegen PI3K γ (A) und dem endothelspezifischen Marker CD31 (B) markiert. Zum Anfärben der Zellkerne wurde DAPI (C) genutzt. Maßstabsbalken 20 μ m

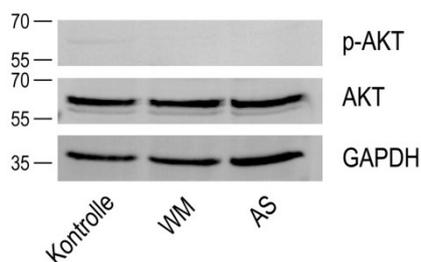


Abb. 36: WB von Hepa1-6-Lysaten nach Inkubation mit WM oder AS. Hepa1-6 Zellen wurden 2 h in Medium ohne FKS inkubiert und anschließend WM oder AS für 1 h zugegeben. Es wurden 6 Zelllysate je Kondition analysiert. Aufgrund des geringen p-AKT-Signales in einigen Lysaten konnte die Quantifizierung des p-AKT/AKT-Verhältnisses nicht erfolgen.

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gentransfersysteme zur Nutzung in der Gentherapie.....	- 9 -
Abb. 2: Anordnungen sowie strukturelle und topologische Varianten von Polymeren. ...	- 12 -
Abb. 3: Darstellung der Synthese von Copolymeren aus P(Ox)s oder P(EO) und P(AGE).....	- 13 -
Abb. 4: PI3Ks Klasse I-Signalwege und deren nachfolgende Funktionen.....	- 16 -
Abb. 5: Anordnungen und Funktionalitäten der in dieser Arbeit untersuchten Copolymere.....	- 28 -
Abb. 6: Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen.	- 32 -
Abb. 7: EB-Quench-Test und Heparin-Dissoziationstest zur Bestimmung der DNA-Interaktionen von LPEI und TurboFect™.....	- 46 -
Abb. 8: DNA-Interaktionen von P(Ox)-Polymeren mit steigendem P(AmOx)-Anteil.	- 48 -
Abb. 9: DNA-Interaktionen von P(AGE)-Polymeren mit verschiedenen..... Funktionalitäten.....	- 49 -
Abb. 10: Größenverteilungen und Zetapotenziale von Polyplexen mit LPEI und..... TurboFect™ in HBG oder 150 mM NaCl.....	- 51 -
Abb. 11: Größenverteilungen und Zetapotenziale von P(Ox)-basierten Polyplexen in HBG und 150 mM NaCl.	- 53 -
Abb. 12: Größenverteilungen und Zetapotenziale von Polyplexen mit P(AGE)-..... Copolymeren mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen in HBG und 150 mM NaCl.	- 54 -
Abb. 13: Untersuchungen zur Zytotoxizität von LPEI und TurboFect™ in Hepa1-6 und L929 Zellen.	- 56 -
Abb. 14: Zytotoxizitäten von P(Ox)-Polymeren mit unterschiedlichem P(AmOx)-Anteil in Hepa1-6 und L929 Zellen.....	- 57 -
Abb. 15: Zytotoxizitäten von P(AGE)s mit unterschiedlichen Funktionalitäten in..... Hepa1-6 und L929 Zellen.	- 58 -
Abb. 16: Aufnahme von Polyplexen mit LPEI oder TurboFect™ in Hepa1-6 und L929 Zellen.	- 60 -
Abb. 17: Aufnahme von P(Ox)-Polyplexen in Hepa1-6 und L929 Zellen.....	- 62 -
Abb. 18: Aufnahme von Polyplexen mit P(AGE)-Polymeren in Hepa1-6 und L929 Zellen.	- 63 -
Abb. 19: GFP-Expressionen von Polyplexen mit LPEI und TurboFect™ nach 48 h in Hepa1-6 und L929 Zellen.	- 65 -
Abb. 20: Darstellung der Anzahl an GFP-positiven Zellen und MFIs von Polyplexen mit P(Ox)-Polymeren nach 48 h in Hepa1-6 und L929 Zellen.....	- 66 -

Abb. 21: GFP-Expressionen von P(AGE)-Polyplexen nach 48 h in Hepa1-6 und L929 Zellen.	- 67 -
Abb. 22: Mikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von Polyplexen mit LPEI und P(Ox)-Polymeren in Hepa1-6 Zellen.	- 69 -
Abb. 23: Mikroskopische Untersuchungen in Hepa1-6 Zellen zur Lokalisation von P(AGE)-basierten Polyplexen.	- 70 -
Abb. 24: Untersuchung des p-AKT/AKT-Verhältnisses in Leberhomogenaten von naiven, LPS-injizierten und septischen (PCI) WT-Mäusen.	- 72 -
Abb. 25: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von PI3K γ in Leberschnitten.	- 73 -
Abb. 26: Untersuchung des p-AKT/AKT-Verhältnisses nach Stimulation bzw. Inhibition von Hepa1-6 Zellen mittels WB.	- 75 -
Abb. 27: Detektion von p-AKT und AKT nach Aktivierung und Inhibition von PI3Ks in Hepa1-6 Zellen mit Hilfe der ICC.	- 76 -
Abb. 28: Darstellung der p-AKT/AKT-Verhältnisse mittels ICW nach Aktivierung und Inhibition von PI3Ks in Hepa1-6 Zellen.	- 78 -
Abb. 29: Untersuchungen zur PI3K γ -selektiven Stimulation in Hepa1-6 Zellen mittels WB.	- 79 -
Abb. 30: Darstellung der einzelnen Peaks der vorkommenden Polyplexgrößen mit LPEI oder TurboFect TM	- 110 -
Abb. 31: Einfluss von Chloroquin auf die Transfektion von P(AGE)-Polyplexen in Hepa1-6 Zellen.	- 111 -
Abb. 32: Untersuchung von P(AGE)-Polyplexen mit einem N/P-Verhältnis von 30 48 h nach Transfektion in Hepa1-6 Zellen.	- 111 -
Abb. 33: Kanäle der immunhistochemischen Färbung von Leberschnitten mit Phalloidin.	- 112 -
Abb. 34: Kanäle der immunhistochemischen Färbung von Leberschnitten mit anti-Albumin.	- 113 -
Abb. 35: Kanäle der immunhistochemischen Färbung von Leberschnitten mit anti-CD31.	- 114 -
Abb. 36: WB von Hepa1-6-Lysaten nach Inkubation mit WM oder AS.	- 114 -

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper.....	- 26 -
Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper.	- 27 -
Tabelle 3: Untersuchte Polymere und deren DP, prozentualer Anteil der einzelnen Polymereinheiten, theoretische Molmasse (M_n), N/P Konstante sowie die..... Konzentration bei einem N/P-Verhältnis von 15.	- 29 -
Tabelle 4: Ansatz für ein SDS-Polyacrylamidgel.....	- 39 -
Tabelle 5: Polymerabkürzungen und -namen, Funktionalitäten und Amingehalt der in dieser. Arbeit untersuchten Polymere.	- 45 -

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Britta Qualmann und PD Dr. Michael M. Kessels,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bargteheide, den 19.02.2019

David Hertz

9.5 Danksagung

Mein herzlichster Dank geht an Prof. Dr. Britta Qualmann, PD Dr. Michael M. Kessels, Prof. Michael Bauer, Prof. Felix Schacher und Prof. Ulrich S. Schubert, die mir die Gelegenheit gaben, an einem spannenden und zugleich fordernden Projekt zu arbeiten und mir die nötigen Freiräume und Zugänge gewährten, um dieses Thema voranzutreiben.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Britta Qualmann, PD Dr. Michael M. Kessels und Dr. Anja Träger für die intensive Betreuung während meiner Promotion bedanken.

Herrn Prof. Dr. Claus-Michael Lehr möchte ich für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Dissertation danken.

Mein besonderer Dank geht an die technischen Assistentinnen der Biochemie I und des Jena Center for Soft Matters (JCSM), die mich in hervorragender Weise in die verschiedenen Methoden einlernten und mich bei anstehenden Problematiken stets unterstützten.

Bei Meike N. Leiske und Carsten Rössel möchte ich mich dafür bedanken, dass sie die hier untersuchten Polymere synthetisiert sowie chemisch charakterisiert haben. Durch ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bzgl. theoretischer und praktischer Fragestellungen trugen sie entscheidend zum Projektfortschritt bei.

Weiterhin möchte ich Martina Beretta, Carolin Schmidt und Nadine Schneble danken, die mich in der PI3K-Problematik mit nützlichen Hinweisen und Anregungen unterstützten.

Außerdem möchte ich mich vielmals bei Prof. Dr. Britta Qualmann, Dr. Nicole Koch und Anne Meinhardt für die exzellente Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an die Arbeitsgruppen der Biochemie I und des JCSM für die immer freundliche Arbeitsatmosphäre und die vielen Tipps und Anregungen während meiner Promotion.

Ich möchte mich besonders bei meiner Familie, Bruni und meinen Freunden bedanken, die mir den Rückhalt und die nötige Ablenkung während meiner Promotion gaben.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Partnerin Nicole bedanken, für deren Liebe und Unterstützung ich unendlich dankbar bin.

9.6 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen:

Hertz D, Leiske MN, Wloka T, Traeger A, Hartlieb M, Kessels MM, Schubert S, Qualmann B, Schubert US. 2018. *Comparison of random and gradient amino functionalized poly(2-oxazoline)s: Can the transfection efficiency be tuned by the macromolecular structure?* Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 56 (12):1210-1224.

Hertz D & Schneider B. 2018. *Sex differences in Tuberculosis*. Seminars in Immunopathology. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0725-6>

Poster:

Meinhardt A, Seemann E, Hertz D, Beretta M, Wetzker R, Kessels MM, Bauer M, Qualmann B. 2017. *Hepatocyte-specific targeting of PI3Ky to prevent sepsis-associated excretory failure*. AK-PANOS Meeting: Tomography from molecules to cells, Regensburg, Deutschland

Hertz D, Dibbern J, Eggers L, Schneider B. 2018. *Sex differences in Tuberculosis*. NDI, Borstel, Deutschland

Vorträge:

Hertz D, Dibbern J, Eggers L, Schneider B. 2018. *Sex differences in Tuberculosis*. NDI, Borstel, Deutschland

Andere Aktivitäten:

Vorsitz LCI Symposium 2019. *Sex differences in Infection & Immunity*. BNITM, Hamburg, Deutschland

