

LIPIDFORMULIERUNGEN AUS
MALONSÄUREDIAMIDEN UND PHOSPHOLIPIDEN –
UNTERSUCHUNGEN FÜR DIE NICHT-VIRALE
GENTHERAPIE

KUMULATIVE DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

DER

NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I

– BIOWISSENSCHAFTEN –

DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT

HALLE-WITTENBERG,

VORGELEGT

VON HERRN DIPL. PHARM. CHRISTOPHER JANICH

GEBOREN AM 25. MÄRZ 1988 IN MAGDEBURG

GUTACHTER:

1. PROF. DR. ANDREAS LANGNER

2. PROF. DR. UDO BAKOWSKY

3. PROF. DR. ACHIM AIGNER

TAG DER VERTEIDIGUNG: HALLE (SAALE), 09.09.2016

„Je mehr sich bei Erforschung der Natur die Erfahrungen und Versuche häufen, desto schwankender werden die Theorien. Es ist aber immer gut sie nicht gleich deswegen aufzugeben. Denn jede Hypothese, die gut war, dient wenigstens die Erscheinungen bis auf ihre Zeit gehörig zusammen zu denken und zu behalten. Man sollte die widersprechenden Erfahrungen besonders niederlegen, bis sie sich hinlänglich angehäuft haben, um es der Mühe wert zu machen ein neues Gebäude aufzuführen.“

von Georg Christoph Lichtenberg

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Gentherapie – neue Chancen – neue Herausforderungen	1
1.2 Lipofektion	5
1.2.1 Kationische Lipide	6
1.2.2 Selbstanordnung von Amphiphilen in wässrigen Systemen	8
1.2.3 Interaktionen von DNA mit kationischen Lipidvesikeln- Lipoplexbildung	10
1.2.4 Mechanismen und Barrieren des lipidbasierten Gentransfers	13
1.3 Zielstellung der Arbeit	18
2 KUMULATIVER TEIL	19
2.1 Untersuchungen von Malonsäurediamiden mit zwei aliphatischen Ketten in Mischung mit Phospholipiden	21
2.1.1 Publikation I: “Composites of malonic acid diamides and phospholipids – Structural parameters for optimal transfection efficiency in A549 cells”	21
2.1.2 Publikation II: “Composites of malonic acid diamides and phospholipids – Impact of lipoplex stability on transfection efficiency”	42
2.1.3 Publikation III: “Structures of malonic acid diamide/phospholipid composites and their lipoplexes”	61
2.2 Untersuchungen des Malonsäurediamids DiTT4 mit drei aliphatischen Ketten in Mischung mit Phospholipiden	103
2.2.1 Publikation IV: “Lamellar versus micellar structures — Aggregation behavior of a three-chain cationic lipid designed for nonviral polynucleotide transfer”	103
2.2.2 Publikation V: “Investigation of binary lipid mixtures of a three-chain cationic lipid with phospholipids suitable for gene delivery”	118
3 ALLGEMEINE DISKUSSION	143
4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	149
5 LITERATURVERZEICHNIS	153
6 ANHANG	159

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Organisation des viralen Genoms eines AAVs (linke Seite) und des entsprechend erzeugten AAV-basierten Vektors (rechte Seite).	3
Abbildung 2 Schematischer Aufbau kationischer Transfektionslipide	6
Abbildung 3 Chemische Strukturen von drei kommerziell erhältlichen Cytokofektinen	7
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Molekülaggregate von amphiphilen Molekülen als Funktion ihres Packungsparameters.	8
Abbildung 5 Struktureller Aufbau von häufig verwendeten Helferlipiden für die Lipofektion.....	9
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Bildung von kationischen Lipid-DNA Komplexen in Anlehnung an an Ewert et al. 2005. ^[58]	11
Abbildung 7 Schematische Darstellung der supramolekularen Strukturen von kationischen Lipid-DNA Komplexen.....	11
Abbildung 8 Schematische Darstellung der Lipoplex- Zellinteraktionen, Aufnahmewegen und zellulären Barrieren.	14
Abbildung 9 Schematische Darstellung des Lipoplexaufnahmeweges und des endosomal Freisetzungsmechanismus	15
Abbildung 10 Strukturformeln der in den Veröffentlichungen verwendeten Transfektionslipide.....	20
Abbildung 11 Titelbild der Fachzeitung „ChemPhysChem“ 2015, 16.....	103
Abbildung 12 3D-CLSM Aufnahme von einer HEK-293 Zelle, welche HIV Partikel ausbildet.	144
Abbildung 13 3D-CLSM Aufnahme zeigt die Internalisierung von OH4:DOPE (1:1, n:n) - pDNA Komplexen in A549 nach einer 4 h Inkubationsphase.	146
Abbildung 14 Isotherme und epi-fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen am Langmuir-Monolayer der Lipidmischung OH4:DPPC (1:1, n:n) in Anwesenheit von DNA in der Subphase.	147
Tabelle 1 Vor- und Nachteile von ausgewählten viralen Vektoren.....	3
Tabelle 2 Allgemeine Informationen zu den Fachzeitschriften	19
Tabelle 3 Darlegung des prozentualen Eigenanteils an den Veröffentlichungen	19

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	Adeno-Assoziierter Virus
ADA	Adenosindesaminase
ATMP	<i>Advanced Therapy Medical Products</i>
CAC	<i>Critical Aggregation Concentration</i>
CAE	Clathrin- Abhängige Endozytose
CAV- AE	Caveolae- Abhängige Endozytose
CCV	<i>Clathrine- Coated Vesicle</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CGD	Chronische Granulomatose Erkrankung
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i>
DiTT4	N-[6-amino-1-oxo-1-(N-tetradecylamino)hexan-(2S)-2-yl]-N`-{2-[N,N-bis(2- aminoethyl)amino]ethyl}-2,2-ditetradecylpropandiamide
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOSPA	2,3-dioleoyloxy-N-[2-(spermin-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan
DOTMA	1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium-propan
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
EE	<i>Early Endosome</i>
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
GUV	<i>Giant Unilamellar Vesicle</i>

IRRAS	Infrarot Reflexion Absorptionsspektroskopie
ITR	Invertierte terminale Wiederholung
i.v.	Intravenös
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LE	<i>Late Endosome</i>
LPL	Lipoproteinlipase
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicle</i>
MLV	<i>Multi Lamellar Vesicle</i>
MVB	<i>Multi Vesicular Body</i>
nsTEM	<i>Negative Stain Transmission Electron Microscopy</i>
ODN	Oligonukleotid
OH4	N-{6-amino-1-[N-(9Z)-octadec-9-enylamino]-1-oxohexan-(2S)-2-yl}-N'-(2-[N, N-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl)-2-hexadecylpropandiamid
P	Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PLL	Poly-L-Lysin
Poly A	Polyadenylierungsstelle
RES	Retikuloendotheliales System
RGD	Aminosäuresequenz aus den drei L-Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure im Einbuchstabencode
siRNA	<i>Small Interfering Ribonucleic Acid</i>
SAXS	Röntgenkleinwinkelsteuung
SLN	<i>Solid Lipid Nanoparticle</i>
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicle</i>

TE	Transfektionseffizienz
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TH4	<i>N</i> -[6-amino-1-oxo-1-(<i>N</i> -tetradecylamino)hexan-(2 <i>S</i>)-2-yl]- <i>N'</i> -{2-[<i>N,N</i> -bis(2-aminoethyl)amino]ethyl}-2-hexadecylpropandiamid
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom
WAXS	Röntgenweitwinkelstreuung
X-SCID	<i>X-Linked Severe Combined Immunodeficiency</i>

1 EINLEITUNG

1.1 GENTHERAPIE – NEUE CHANCEN – NEUE HERAUSFORDERUNGEN

Mit dem Konzept durch exogenes genetisches Material eine gezielte Genexpression zu modulieren, um dadurch Krankheiten zu heilen, wurde von Friedmann und Roblin im Jahr 1972 der Ausgangspunkt für die Gentherapie gelegt.^[1] Gentherapeutika stellen heutzutage eine Untergruppe der Arzneimittel für neuartige Therapien, die ATMP's, dar und sind nach Definition der Richtlinie 2009/120/EG ein biologisches Arzneimittel, das folgende Merkmale aufweist:^[2]

- a) Es enthält einen Wirkstoff, der eine rekombinante Nukleinsäure enthält oder daraus besteht, der im Menschen verwendet oder ihm verabreicht wird, um eine Nukleinsäuresequenz zu regulieren, zu reparieren, zu ersetzen, hinzuzufügen oder zu entfernen.
- b) Seine therapeutische, prophylaktische oder diagnostische Wirkung steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der rekombinanten Nukleinsäuresequenz, die es enthält, oder mit dem Produkt, das aus der Expression dieser Sequenz resultiert.

Die Gentherapie weist somit enormes therapeutisches Potential auf, ist jedoch gleichzeitig mit wissenschaftlichen wie auch mit ethischen Problemen behaftet. Aus eben diesen ethischen Gründen wird in Deutschland der Gentransfer durch das Embryonenschutzgesetz §5 ausschließlich auf somatische Zellen begrenzt (somatische Gentherapie). Die somatische Gentherapie kann auf drei Wegen erfolgen – Genaddition, Gensubstitution und Gensuppression. Als Gentransfer wird der Vorgang des Einbringens von Genen in Zellen bezeichnet. „Nackte“ Nukleinsäuren (DNA oder RNA) eignen sich nur bedingt zur Gentherapie, da sie von Nukleasen abgebaut werden und auf Grund ihrer negativen Ladung die Zellmembran nur schwierig passieren können.^[3] Um dies zu umgehen benötigt man ein Vehikel, welches das genetische Material überträgt. Als Gentransfervehikel eignen sich virale und nicht virale Systeme. Der Gentransfer kann dabei *in vivo*, sowie *ex vivo* durch Entnahme von autologen Zellen des individuellen Patienten realisiert werden.^[4] Die *ex vivo*- Methode wird vornehmlich für Genmodifikationen von leicht zu isolierenden Zellen, wie z.B. hämatopoetische Stammzellen, verwendet.^[5] Für diese Behandlungsstrategie werden aus dem Knochenmark autologe CD34⁺ Zellen isoliert und in einem Labor unter definierten Bedingungen kultiviert. Das therapeutische Gen wird anschließend in die Zellen eingebracht und die autologen genmodifizierten Zellen dem Patienten wieder verabreicht.^[5, 6] Große

Fortschritte konnten somit bei der Behandlung von primären Immundefekten und Stoffwechselstörungen beispielsweise bei X-SCID, ADA-Mangel, WAS und der CGD gemacht werden.^[7] Als erstes Medikament zur *in vivo*-Gentherapie wurde von der EMA im Jahr 2012 Glybera[®] (Wirkstoff: Alipogentiparvovec) zur Behandlung der vererbaren Krankheit LPL-Mangel zugelassen.^[8] Der Wirkstoff Alipogentiparvovec enthält die humane LPL-Genvariante LPL^{S447X} in einem Vektor. Der Vektor umfasst u.a. eine Proteinhülle, die vom AAV Serotyp 1 abgeleitet ist. Glybera[®] ist nur für eine einmalige Anwendung zugelassen, die mittels mehrerer intramuskulärer Injektionen in die Beine verabreicht wird.^[9] Die meisten gentherapeutischen Behandlungsstrategien erfordern jedoch eine wiederholte Gabe des Gentherapeutikums, welche bei viralen Systemen oftmals als problematisch anzusehen ist und am Beispiel der Behandlung der zystischen Fibrose näher erläutert werden soll. Hierbei handelt es sich um eine autosomal rezessive Stoffwechselerkrankung, welche durch Mutationen des CFTR-Gens verursacht wird. Das klinische Bild ist u.a. charakterisiert durch zähflüssige Sekrete sowie Narben und Zysten in der Lunge, Bauchspeicheldrüse, Leber und Darm.^[5] Besonders die Erkrankungen der Atemwege und die damit häufig wiederkehrenden Lungenentzündungen sind der Hauptgrund der hohen Morbiditätsrate und der Mortalität der Erkrankungen, welche mit einer Lebenserwartung von durchschnittlich 29 Jahren einhergehen.^[10] Eine Herausforderung bei der Therapie der Erkrankung ist die wiederholte Anwendung einer inhalativen Darreichungsform des Gentherapeutikums. Die meisten viralen Gentransfersysteme, z.B. auf Basis von Adenoviren oder AAVs, sind nicht für eine wiederholte Gentherapie geeignet. Grund dafür ist die Induktion von Immunantworten gegen die viralen Strukturen bei wiederholter Anwendung des Gentherapeutikums. Des Weiteren stellt die begrenzte Beladungskapazität im Fall von AAVs ein zusätzliches Problem dar. Aber auch andere Virustypen sind ungeachtet ihrer hohen Transfereffizienzrate aufgrund von einem der bereits genannte Nachteile oder ihres Tropismus, welcher den zu therapierenden Zelltyp stark begrenzt, oftmals als problematisch für die Gentherapie einzustufen.^[11] Nach den Ergebnissen in einer kürzlich (07/2015) veröffentlichten klinischen Studie der Phase 2b könnten lipidbasierte nicht virale Gentransfersysteme eine vielversprechende Behandlungsalternative bei der Therapie der cystischen Fibrose sein.^[10] Mittlerweile sind bereits 2210 klinische Studien auf dem Gebiet der Gentherapie bekannt. Die Hauptindikationen sind hierbei die Behandlung von Krebserkrankungen (64%), gefolgt von monogenetischen Erbkrankheiten (9,5%) sowie kardiovaskulären Erkrankungen (7,9%).^[12] Dabei spielen heutzutage virus-basierte Vektoren in 66,4 % aller Studien immer noch die größte Rolle. Dies ist nicht zuletzt durch deren effiziente Mechanismen zu begründen, welche

Viren im Lauf von Millionen Jahren entwickelt haben, um ihr Genom in Zielzellen zu integrieren. Der virale Gentransfer wird auch als Transduktion bezeichnet.^[13] Hierbei wird vorher die therapeutische Nukleinsäure in das Virus integriert. Das Virus fungiert somit als Gentransfersystem und Genvektor, weshalb einfachheitshalber von viralen Vektoren gesprochen wird. Der genetische Aufbau eines AAV, sowie der des resultierenden Vektors ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. In klinischen Studien kommen vor allem Vektoren basierend auf Adenoviren (22,2%), Retroviren (18,4%), Vaccinaviren (7,2%) und AAV (6,0%) zum Einsatz.

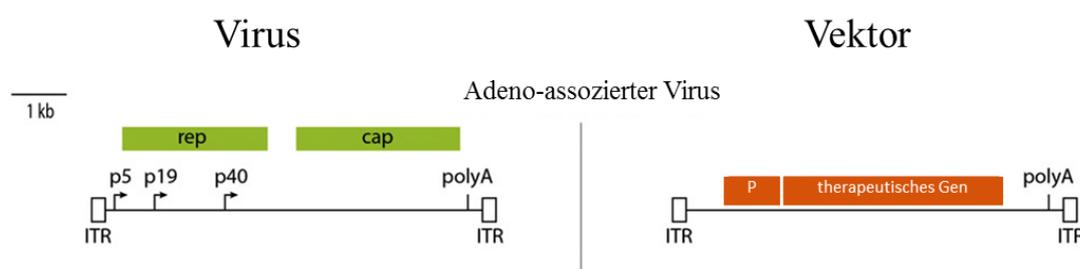


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Organisation des viralen Genoms eines AAVs (linke Seite) und des entsprechend erzeugten AAV-basierten Vektors (rechte Seite).

Die zwei offenen Leserahmen (*rep* und *cap*) sind in hellgrün dargestellt; die Lokalisierung der Promotoren wird durch den Pfeil gezeigt; Folgende Abkürzungen wurden verwendet: ITR - invertierte terminale Wiederholung; Poly A - Polyadenylierungsstelle; P - Promotor. Darstellung modifiziert nach Giacca und Zacchigna.^[14]

Jeder virale Vektor hat je nach Typ verschiedene Vor- und Nachteile und bietet sich für verschiedene therapeutische Einsatzgebiete an (siehe Tabelle 1). Während beispielsweise retrovirale Vektoren auf Grund ihrer Biodistribution und ihrer Neutralisation durch Serumbestandteile besonders bei der *ex vivo*- Applikation Anwendung finden, besitzen adeno-assoziierte Vektoren hohes Potential für *in vivo*- Anwendungen.

Vektoren	Vorteile	Nachteile
Adenovirus	+hohe Transduktionseffizienz <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> ^[15] +transduziert viele Zelltypen ^[15] +transduziert proliferierende und nicht-proliferierende Zellen ^[15] +einfache Produktion und Aufkonzentrierung zu hohen Titern möglich ^[15]	-begrenzte Beladungskapazität von max. 7,5 kb für 1 Gen. und starke Immun- und Entzündungsreaktionen ^[14, 16] -2 Gen. Beladungskapazität bis 14kb, schlechte Expression und starke Immunreaktionen -3 Gen. benötigt Helferadenovirus ^[14, 16] -einige Serotypen werden vom Serum neutralisiert ^[14]
AAV	+hohe Transduktionseffizienz <i>in vivo</i> ^[16] +transduziert proliferierende und nicht-proliferierende Zellen ^[16] +anhaltende Expression bis zu Jahre ^[16] +nicht pathogen, geringe Toxizität ^[4]	-geringe Beladungskapazität von 4-5 kb ^[4, 17] -Produktion ist schwierig ^[17] -< 1% des AAVs kann sich integrieren ^[4] -Restrisiko für Tumorgenese vorhanden ^[4] -manche Serotypen werden von Antikörpern neutralisiert ^[16] -Immunreaktion bei wiederholter Gabe ^[16]
Gammaretroviren	+Integration ins Zellgenom mögl. ^[14] +hohe Transduktionseffizienz <i>ex vivo</i> +stabile Expression ^[17] +transduziert viele Zelltypen ^[17]	-ineffiziente Transduktion <i>in vivo</i> ^[4] -Insertionsmutagenese ^[17] -transduziert nur proliferierende Zellen ^[14] -Begrenzte Beladungskapazität von 9-11 kb ^[14]

Tabelle 1 Vor- und Nachteile von ausgewählten viralen Vektoren

Weiterhin können je nach Virustyp die therapeutischen DNA-Sequenzen in teilende oder sich nicht teilende Zellen transient oder stabil eingebaut werden.^[4, 16] Von einer detaillierten Betrachtung der verschiedenen viralen Vektoren soll jedoch auf Grund des Umfang dieses Themas abgesehen und auf zusammenfassende Literatur verwiesen werden.^[4, 14, 16] Als die schwerwiegendsten Nachteile viraler Vektoren sollen jedoch das immunogene und kanzerogene Potential, die begrenzte Beladungskapazität sowie die schwierige und extrem kostenintensive Produktion von großen Mengen an viralen Vektoren genannt werden. Im Fall vom Gentherapeutikum Glybera[®] liegen die Behandlungskosten bei durchschnittlich 1 Million \$ pro Patient.^[18] Ferner wird nicht zuletzt auf Grund dramatischer Rückschläge in der Gentherapie nach Alternativen gesucht, wie der Fall Jesse Gelsingers deutlich macht, der auf Grund eines Multiorganversagens starb, welches durch einen adenoviralen Vektor ausgelöst wurde.^[19]

Nicht virale Gentransfersysteme erweisen sich daher als potente Wahl, da sie einfach zu produzieren sind und Risiken wie Immunogenität und Kanzerogenität minimieren können.^[20] Der nicht virale Gentransfer wird auch als Transfektion bezeichnet. Die nicht viralen Gentransfersysteme lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen, die physikalischen Methoden und die chemischen Methoden. Das Prinzip der physikalischen Methoden basiert darauf, mittels Energie die Zellmembran permeabel für das Transgen zu machen. Hierbei kann der Gentransfer u.a. durch Ultraschall, Elektroporation oder Bioballistik (Gene Gun) erfolgen.^[17] Die Effizienz dieser Systeme ist meist sehr hoch und es wird kein viraler oder chemischer Gentransporter genutzt. Dennoch sind sie für eine praktikable *in vivo*- Gentherapie nicht geeignet. Hauptvertreter der chemischen Gentransfervehikel sind kationische Polymere sowie kationische Lipide. Die meist verwendeten Polymere für die Gentherapie sind Polyethylenimin (PEI) und Poly-L-Lysin (PLL).^[21] Da kationische Polymere nicht Bestandteil dieser Arbeit sind soll an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen werden.^[22-24] Neben all diesen nicht viralen Vektoren wurden 1987 erstmals durch Felgner et al. kationische Lipid/DNA-Komplexe, sogenannte Lipoplexe, für den Gentransfer beschrieben. Hierbei wurde das monovalente kationische Lipid DOTMA verwendet (siehe Abb. 3) und der Gentransfer mittels kationischen Lipiden als Lipofektion bezeichnet.^[25] Durch die Entwicklung der Lipofektion wurde eine vielversprechende alternative im Vergleich zur Transduktion geschaffen. Als Kernpunkt dieser Arbeit wird sie im Folgenden genauer erläutert.

1.2 LIPOFEKTION

In den letzten Jahren haben kationischen Lipide, auch Cytofektine genannt, enormes wissenschaftliches Interesse erlangt und haben in klinischen Studien derzeit den größten Anteil an nicht-viralen Vektoren.^[12] Cytofektine zeichnen sich durch hohe Beladungskapazität, Bioabbaubarkeit, höhere Sicherheit aufgrund des fehlenden onkogenen und immunogenen Potentials sowie durch die vergleichsweise einfache, großtechnische und preisgünstigere Produktion im Vergleich zu viralen Systemen aus. Die geringe Effizienz, vor allem *in vivo*, stellen das Hauptproblem dar.^[26] Um diese Probleme zu überwinden und Parameter für eine effiziente Transfektion ermitteln zu können, wurde die Lipofektion in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen. Besonders das Verständnis über die Mechanismen der Lipofektion, angefangen bei der Bildung von Lipoplexen bis hin zur intrazellulären Freisetzung der Nukleinsäure, ist entscheidend, um effektivere Gentransfersysteme entwickeln zu können.

Die Lipofektion ist ein sehr komplexer Prozess, welcher bis heute nicht im Detail verstanden wird. Bisher gibt es nur wenige vereinheitlichende Konzepte in Bezug auf Struktur-Wirkungsbeziehungen.^[27] In den nachfolgenden Kapiteln soll ansatzweise auf die grundlegenden Eigenschaften, sowie den strukturellen Aufbau der Cytofektine eingegangen werden. Anschließend wird die Lipoplexbildung genauer beschrieben und auf Mechanismen und Barrieren im lipidbasierten Gentransfer eingegangen. Falls nicht explizit anders erwähnt, handelt es sich nachfolgend um DNA, wenn von Nukleinsäuren gesprochen wird.

1.2.1 KATIONISCHE LIPIDE

Der Aufbau der kationischen Lipide ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt und ist bei allen Vertretern im Allgemeinen in drei Bereiche gegliedert. Jedes Lipid besteht aus einer hydrophilen Kopfgruppe, welche über eine Linkerstruktur mit dem lipophilen Grundgerüst verbunden ist.

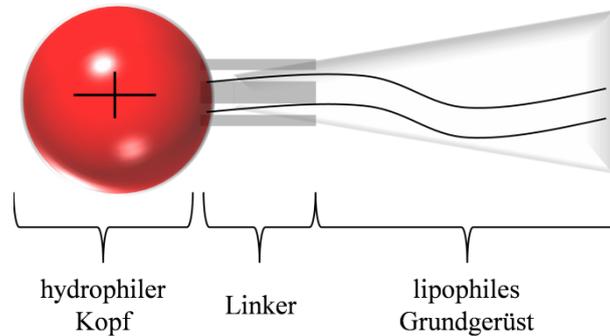


Abbildung 2 Schematischer Aufbau kationischer Transfektionslipide

Für die kationische Ladung, welche zur Lipoplexbildung benötigt wird, können verschiedene kationische Funktionen verwendet werden. Die mit am häufigsten verwendeten funktionellen Gruppen stellen die primären, sekundären und tertiären Amine sowie die quartären Ammoniumionen dar. Weiterhin finden auch unkonventionelle Gruppen, bestehend aus Phosphor oder Arsen Anwendung, wie beispielweise von Floch et al. im Jahr 1997 beschrieben.^[28-30] Des Weiteren kann die Anzahl der kationischen Ladungen variiert werden. Man spricht in diesem Fall von monovalenten oder von polyvalenten Kopfgruppen. Weiterhin kann der Aufbau des Kopfbereiches linear, verzweigt oder globulär erfolgen und damit maßgeblich die Geometrie der Lipide beeinflussen. In wässrigen Medium bilden beispielsweise Lipide mit einem großen Kopfbereich im Vergleich zum lipophilen Grundgerüst oftmals mizellare Aggregatstrukturen aus.^[24] In der Regel wird angenommen, dass durch mehrwertige Aminogruppen mit größerer Oberflächenladungsdichte eine höhere Transfektionseffizienz bei geringer Toxizität ermöglicht werden kann.^[31] So konnte beispielsweise mit dem polyvalenten Cytofektin DOSPA eine höhere Transfektionseffizienz im Vergleich zu dem Strukturanalogon DOTMA erzielt werden.^[32] Jedoch kann eine übermäßige Ladung auch zum gegenteiligen Effekt auf Grund einer zu großen positiven Ladungsdichte und der daraus resultierenden starken Nukleinsäurebindung führen.^[33, 34] Für ausführlichere Betrachtungen der Kopfgruppen von Cytofektinen wird auf folgende Literatur verwiesen.^[35] Die Linkerstruktur verbindet die Kopfgruppe mit dem lipophilen Grundgerüst und besteht oft aus Funktionen, wie Carbamaten oder Amiden, welche eine gewisse chemische Stabilität aufweisen und enzymatisch spaltbar sind. Alternativ werden auch Carbonate oder

Ester (z.B. DOTAP) verwendet, welche jedoch eine geringere Stabilität gegen nicht-enzymatische Hydrolyse im Vergleich zu den zuvor erwähnten Gruppen aufweisen. Aber auch chemisch stabilere und nicht-bioabbaubare Strukturen, wie Ether im Fall von DOTMA, kommen zum Einsatz (siehe Abbildung 3).^[28]

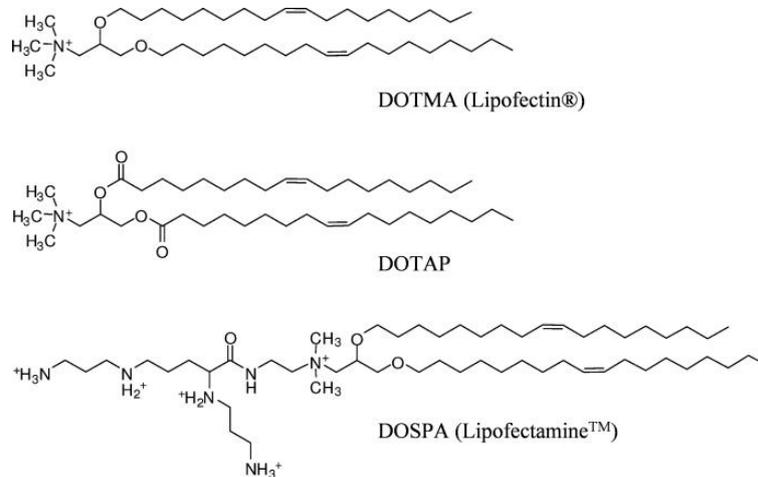


Abbildung 3 Chemische Strukturen von drei kommerziell erhältlichen Cytokineten

Strukturgebend für den lipophilen Teil sind meist aliphatische Ketten oder Steroidstrukturen, wie z.B. Cholesterol. Dabei kann auch hier die Anzahl der Alkylketten sowie deren Länge und Sättigungsgrad variiert werden. Die meisten Cytoketine besitzen ein bis vier aliphatische Ketten.^[24] Allerdings erwiesen sich kationische Lipide mit nur einer Kette bei erhöhter Toxizität im Vergleich zu ihren Vertretern mit zwei aliphatischen Ketten als weniger effektiv.^[36] Weitere Kettenlängen- Transfektionseffizienz- Korrelationsuntersuchungen, welche von Felgner et al. im Jahr 1994 an einer Reihe von Hydroxyethyl- funktionalisierten Lipiden mit quartären Ammoniumfunktionen im Kopfbereich durchgeführt wurden, konnten für Lipide mit der Kettenlänge C14:0 (14 C-Atome, keine Doppelbindung) die höchste Effizienz nachweisen, gefolgt von C18:1, C16:0 und C18:0.^[37] Seit diesen Untersuchungen ist dieser Trend bestätigt worden, was zur allgemeinen Lehrmeinung geführt hat, dass die Transfektionseffizienz mit einer Abnahme der Kettenlänge korreliert.^[38, 39] Dabei ist zu beachten, dass unter Kettenlänge die effektive Kettenlänge gemeint ist, welche zum Beispiel durch Einführung einer Doppelbindung oder Methylverzweigung verkürzt wird.^[40, 41]

1.2.2 SELBSTANORDNUNG VON AMPHIPHILEN IN WÄSSRIGEN SYSTEMEN

Wenn ein Unterschied in der Kohäsionsenergie zwischen den aggregierten Molekülen und den dispers (monomer) vorliegenden Molekülen vorliegt, bilden alle amphiphilen Substanzen bei Überschreiten der CAC im wässrigem Milieu spontan verschiedene Strukturen aus.^[42] Treibende Kraft ist der hydrophobe Effekt. Hierunter versteht man das Phänomen, dass sich unpolare Moleküle in Wasser zu größeren Aggregaten assoziieren.^[43] Weiterhin spielt die hydrophile, ionische oder sterische Abstoßung der Kopfgruppen eine wichtige Rolle, da diese Kräfte die Voraussetzung schafft, dass die Aggregate im Kontakt mit Wasser bleiben.^[42] Die Idee der zwei entgegengesetzten Kräfte wurde von Tanford 1980 beschrieben.^[44] Man spricht in diesem Zusammenhang auch von spontan selbstanordnenden Molekülaggregaten. Eine Möglichkeit ist es aus der Geometrie der amphiphilen Moleküle mit Hilfe des Formfaktors P sowohl die Präferenz für die verschiedenen Molekülaggregate (z.B. Mizellen, Vesikel), wie auch die bevorzugte flüssigkristalline Phase (lamellar, hexagonal, invers hexagonal, kubisch) vorherzusagen. Erstmals wurde dieses geometrische Konzept 1976 von Israelachvili et al. beschrieben und ist in Abbildung 4 veranschaulicht.^[45]

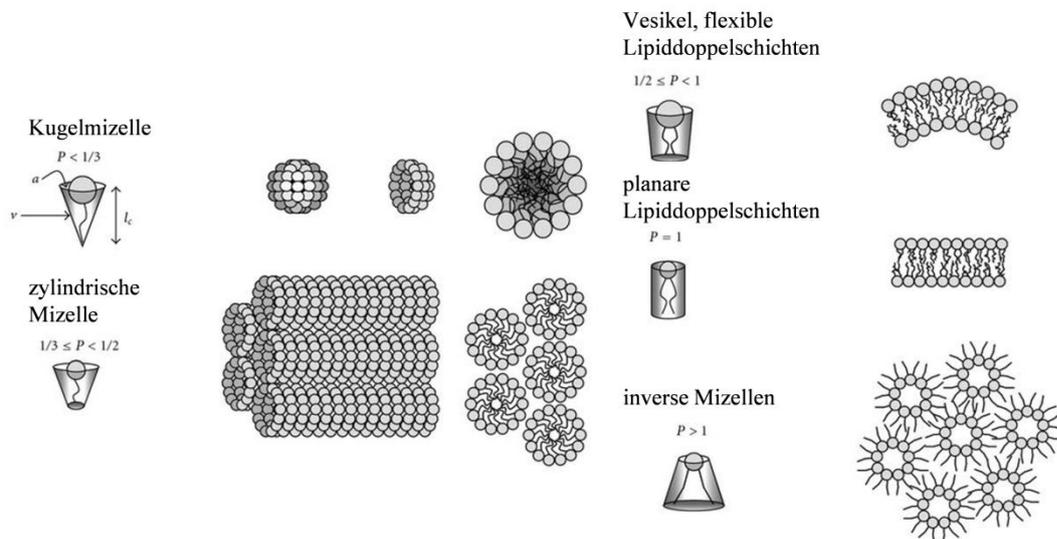


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Molekülaggregate von amphiphilen Molekülen als Funktion ihres Packungsparameters.

Die Geometrie wird durch den Packungsparameter ausgedrückt, welcher zur Voraussage der bevorzugten Aggregatform der Moleküle in einer wässrigen Phase genutzt wird. Die Abbildung wurde modifiziert nach Balazs et al. 2011.^[32]

Als P ist dabei der kritische Packungsparameter zu verstehen. Hierbei wird eine Korrelation zwischen den Verhältnissen der Flächen des hydrophoben Teils und der hydrophilen Region unter Beachtung der kritischen Länge des lipophilen Teils aufgestellt. Zu den spontan gebildeten Molekülstrukturen gehören, je nach Geometrie der Lipide, beispielsweise sphärische, zylindrische und inverse Mizellen, wie auch flexible oder planare

Lipiddoppelschichten. Auch heutzutage ist diese Theorie anerkannt, wobei beachtet werden sollte, dass auch andere Parameter, wie z. B. Ionenstärke, Lösungsmittel, pH-Wert, Temperatur sowie die Konzentration des Amphiphils, auf die gebildeten Strukturen Einfluss nehmen. Außerdem kann durch geeignete Herstellungsmethoden die Bildung bestimmter Aggregate gesteuert werden.^[46] Die am häufigsten für den Gentransfer verwendeten Lipidsysteme sind liposomale Formulierungen aber u.a. auch mizellare Systeme oder SLNs werden verwendet.^[47, 48] Es gibt viele verschiedene Methoden um Liposomen herzustellen. Die zuerst beschriebene und immer noch häufig verwendete Methode ist die Filmbildungsmethode nach Bangham et al. 1965.^[49] Hierfür werden die Lipide in einem organischen Solvent gelöst und über die Phasenübergangstemperatur erwärmt, dann wird das Lösungsmittel entfernt. Der so gewonnene dünne Lipidfilm wird anschließend hydratisiert. Auf diese Weise können sehr heterogene Liposomenformulierungen entstehen, die anschließend durch Extrusion, Ultraschall oder Hochdruckhomogenisation zu kleineren Liposomen (SUV) homogenisiert werden können. Ein Liposom ist ein zwischen ca. 20 nm und mehreren μm großer, aus Lipiddoppelschichten bestehender Vesikel, in dem eine wässrige Phase eingeschlossen ist.^[32] Für die Bildung von Liposomen werden flexible Doppelschichten benötigt, welche häufig von Lipiden mit einem Packungsparameter zwischen 0,5 bis <1 gebildet werden (siehe Abbildung 4). Die Liposomen lassen sich je nach Größe und Anzahl der Doppelschichten in kleine unilamellare Vesikel (SUV), große unilamellare Vesikel (LUV), sehr große unilamellare Vesikel (GUV) und multilamellare Vesikel (MLV) einteilen. An dieser Stelle soll kurz erwähnt werden, dass die meisten Lipide unter Rühren hydratisiert werden müssen um Liposomen zu erzeugen. Daher handelt es sich im Gegensatz zu Mizellen, welche thermodynamisch stabile Systeme darstellen, im Allgemeinen nicht um einen thermodynamisch stabilen Zustand. Liposomenformulierungen besitzen deshalb den Nachteil, dass sie nicht kolloidal stabil sind.^[50] Zur Steigerung der Transfektionseffizienz sowie zur Verbesserung der Liposomenbildung hat es sich bewährt die Cytokine mit sogenannten neutralen Helferlipiden zu mischen. Hierbei werden oft das Phospholipid DOPE und Cholesterol verwendet (siehe Abbildung 5).^[51-54]

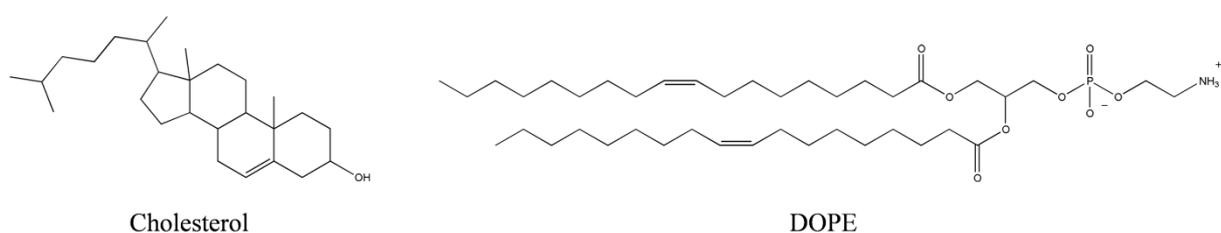


Abbildung 5 Struktureller Aufbau von häufig verwendeten Helferlipiden für die Lipofektion.

1.2.3 INTERAKTIONEN VON DNA MIT KATIONISCHEN LIPIDVESIKELN- LIPOPLEXBILDUNG

Schlüsselement für die Lipofektion ist das kationische Lipid, welches benötigt wird um die negative Nukleinsäure zu kondensieren und zu komplexieren. Weiterhin vermittelt es die Bindung an der negativ geladenen Säugetierzellmembran auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen. Ohne makromolekulare Kondensation der DNA würde beispielsweise ein 5 kb langes lineares DNA Molekül eine Länge von 1,7 μm und einen Durchmesser von 2.2 nm aufweisen.^[46] Die Interaktion zwischen kationischer Lipidformulierung und Nukleinsäure resultiert aus einer spontanen Formierung von thermodynamisch quasi-stabilen Strukturen, welche als Lipoplexe bezeichnet werden.^[55] In Abbildung 6 ist der Vorgang der Lipoplexbildung schematisch dargestellt. Im wässrigen Milieu sind die anionischen Gruppen der DNA und die kationischen Gruppen des Lipids permanent durch ihre Gegenionen nahezu neutralisiert. Bei Vereinigung der kationischen Liposomendispersion mit der negativ geladenen DNA tendiert das kationische Lipid zur vollständigen Neutralisierung der Phosphatgruppen der DNA. Infolgedessen werden die eng gebundenen Gegenionen ersetzt und freigesetzt.^[56] Treibende Kraft für die spontane Lipoplexbildung ist somit die Entropiezunahme, welche aus der Freisetzung der Gegenionen resultiert.^[57-59] Dieser Vorgang konnte mit Hilfe von ITC Experimenten (Isotherme Titrationskalorimetrie) am Beispiel der Interaktion von DOTAP:DOPE (1:1) (n:n) und DNA bestätigt werden.^[60] Weiterhin sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Lipid und DNA als treibende Kraft nicht zu vernachlässigen. Es konnte gezeigt werden, dass die Lipoplexbildung in einem Zwei- Stufen-Mechanismus erfolgt. Der erste Schritt, in dem die Anlagerung der DNA an die kationischen Lipidassoziate erfolgt, ist ein sehr schneller exothermer Prozess. Im zweiten Schritt erfolgt die wesentlich langsamere, endotherme Reorganisation der Lipoplexe.^[28] Der Vollständigkeit halber soll erwähnt werden, dass sowohl die Morphologie der Lipoplexe, wie auch die Kinetik ihrer Bildung davon abhängig ist, ob und wie schnell die DNA zu den kationischen Vesikeln hinzugegeben wird oder in welcher Reihenfolge die Komplexbildung erfolgt.^[61] Die durch die Lipoplexbildung erfolgte Kondensation der DNA ist eine Voraussetzung, um die DNA vor dem Abbau durch Nukleasen zu schützen und die Aufnahme in die Zelle zu gewährleisten.^[55]

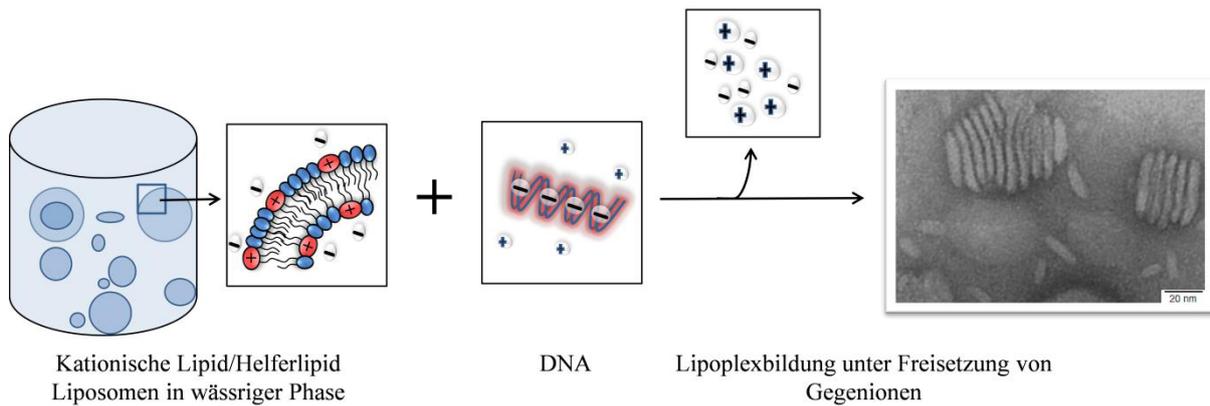


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Bildung von kationischen Lipid-DNA Komplexen in Anlehnung an Ewert et al. 2005.^[58]

Kationische Lipide und DNA setzen bei der Lipoplexbildung ihre Gegenionen frei. Die dadurch steigende Entropie ist die treibende Kraft der Lipoplexbildung. Auf der rechten Seite ist ein typischer Ausschnitt von kationischen Lipid-DNA Komplexen dargestellt, welche mittels ns-TEM visualisiert wurden.

Je nach Menge des eingesetzten Cytofektins bzw. der DNA können bei der Komplexbildung negativ, neutral oder positiv geladene Lipoplexe entstehen. Das kationische Lipid:DNA Ladungsverhältnis gilt als universeller Einflussparameter für die Transfektion und wird oft als N/P Verhältnis ausgedrückt.^[62, 63] Hierbei handelt es sich um ein stöchiometrisches Stoffmengenverhältnis von protonierbaren (in unserem Fall primären) Aminen des kationischen Lipids und den negativen Phosphatgruppen der DNA. Für die effiziente Transfektion werden meist Lipoplexe mit positiver Gesamtladung verwendet, da diese über elektrostatische Wechselwirkungen mit der auf Grund von Proteoglykanen negativ geladenen Zellmembran interagieren können^[58].

Durch Röntgenbeugungsexperimente konnten bisher mehrere Typen von supramolekularen Strukturen von kationischen Lipid-DNA Komplexen nachgewiesen werden. In Abbildung 7 sind drei gängige Strukturvertreter schematisch dargestellt.

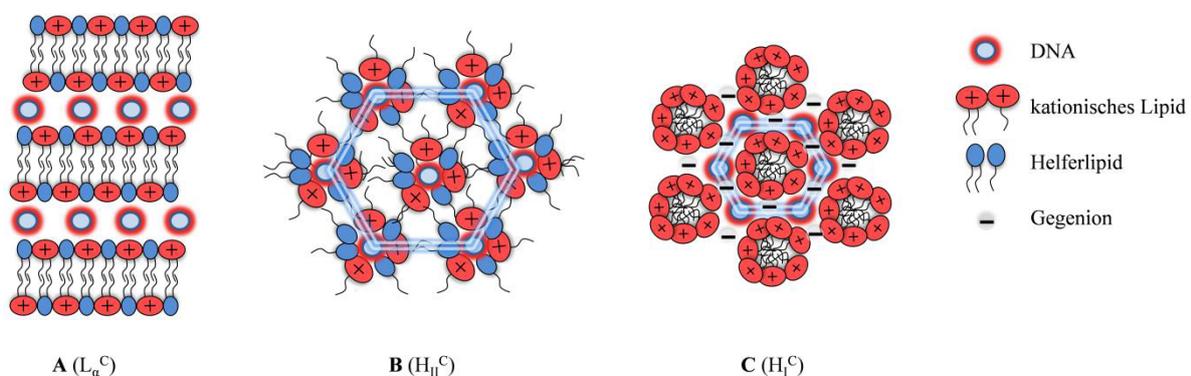


Abbildung 7 Schematische Darstellung der supramolekularen Strukturen von kationischen Lipid- DNA Komplexen

Die am häufigsten vorkommende Lipoplexstruktur ist die L_{α}^C Formation.^[39] Bei der L_{α}^C Phase handelt es sich um multilamellare Lipiddoppelschichten, in den die DNA eingebettet ist. Diese Sandwich-Struktur wurde erstmals im Jahr 1997 von Rädler et. al. beschrieben.^[56] Diese relativ stabilen L_{α}^C Komplexe können DNA vor Nukleasen schützen und die DNA erfolgreich in Zellen einschleusen. Bei Komplexen dieses Strukturtyps ist die Transfektionseffizienz in unmittelbarem Zusammenhang mit ihrer Ladungsdichte verknüpft, welche sich in einer Glockenkurve darstellt.^[33, 34, 64] Kurz darauf wurde von Koltover et al. 1998 die Struktur von invers-hexagonalen kationischen Lipid-DNA Komplexen (H_{II}^C) aufgeklärt, der eine im Vergleich zur L_{α}^C Phase höhere Transfektionseffizienz *in vitro* zugesprochen wurde.^[65] Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Phasenumwandlung $L_{\alpha}^C \rightarrow H_{II}^C$ durch Zugabe des Helferlipids DOPE bei physiologischer Ionenstärke begünstigt werden kann. Jedoch liefern neuere Studien konträre Ergebnisse in Bezug auf die allgemeine Annahme der universellen Transfektionseffizienz von instabilen H_{II}^C Strukturen und zeigen damit auch die generelle Problematik der Korrelation zwischen supramolekularer Lipoplexstruktur und Transfektionseffizienz.^[39, 66, 67] Gegenstand von kürzlich veröffentlichten Arbeiten ist die Untersuchung der Interaktion zwischen Lipoplexen und negativ geladenen, in der Zellmembran enthaltenen Lipiden. In diesen Arbeiten wird versucht ein Bezug zwischen supramolekularer Lipoplexstruktur und ihrer Auswirkung auf die DNA Freisetzung herzustellen.^[68, 69] Die jüngst entdeckte Lipoplexformation ist die H_I^C Phase, bei der die hexagonal angeordneten kationischen Lipidröhren von DNA umgeben sind. Diese Strukturen wurden von stark geladenen multivalenten kationischen Lipiden mit dendritischen Kopfgruppen ausgebildet.^[27, 62] Im Allgemeinen bilden viele Lipide, welche eine L_{α} oder eine H_{II} Phase bilden, auch Lipoplexe mit dieser Phase.^[39] Weiterhin lassen sich durch Zugabe von Helferlipiden die supramolekularen Lipoplexstrukturen, die Lipoplexelektrostatik, die Hydratation sowie die sekundäre und tertiäre Struktur der DNA beeinflussen. Für *in vitro*-Versuche scheint hierbei das Helferlipid DOPE die Transfektionseffizienz im Allgemeinen zu verbessern. Bei *in vivo*-Versuchen hingegen stellt Cholesterol das effizientere Helferlipid dar.^[52, 62] Bis heute sind die vollständigen Funktionen der Lipoplexstrukturen und deren Einfluss auf die Transfektion nicht abschließend geklärt und erfordern weitere intensive Untersuchungen. Grund hierfür ist die große Anzahl an Einflussparametern. Dennoch gibt es einige interessante Entdeckungen und Theorien darüber, wie Lipoplexe nach der Interaktion mit der Zellmembran in die Zelle gelangen und wie die DNA intrazellulär freigesetzt werden kann, um so den Zellkern zu erreichen. Dies soll im nachfolgenden Kapitel genauer betrachtet werden.

1.2.4 MECHANISMEN UND BARRIEREN DES LIPIDBASIERTEN GENTRANSFERS

Für eine erfolgreiche Gentherapie sind der Transport sowie die Freisetzung der Nukleinsäure in den Kompartimenten der Zielzellen entscheidend. Je nachdem, ob eine *in vivo*- oder *ex vivo*- Therapie angestrebt wird und welche Art von Nukleinsäuren Verwendung findet, sind sowohl die Mechanismen als auch die Barrieren des Gentransfers damit verknüpft. Relevante Hindernisse bei einer systemischen Applikation sind beispielsweise die unspezifischen Interaktionen mit Serumproteinen, welche zur Instabilität des Lipoplexes führen können. Hierdurch kann die Nukleinsäure vorzeitig im Blutstrom durch darin enthaltene Nukleasen abgebaut werden. Weitere Risiken stellen die Hämolyse sowie die Aggregation der Lipoplexstrukturen als auch die Thrombozytenaktivierung und die damit verbundene Gefahr einer Thrombose dar. Außerdem kann es durch Aktivierung des RES zur Elimination des Lipoplexes kommen. Aber auch die Migration durch die extrazelluläre Matrix ist ein limitierender Faktor.^[70, 71] Die Entwicklung von stabileren Lipoplexen sowie die Reduzierung der Lipoplexladung oder die sterische Stabilisierung durch Verwendung von pegylierten Lipiden sind Möglichkeiten die Zirkulationszeit zu verlängern. Des Weiteren bietet die Targetierung der Zielstrukturen durch Liganden, wie z.B. RGD-Peptide oder das Glykoprotein Transferrin, interessante Lösungsansätze für zielgerichtete Therapieansätze *in vivo*.^[72-74] Daneben existieren weitere zelluläre Barrieren, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Rolle spielen. Um in die Zielzelle aufgenommen zu werden, muss der Lipoplex auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen mit negativ geladenen Glykosaminoglykanketten der Proteoglykane interagieren, welche auf der Oberfläche der Zellen lokalisiert sind.^[75] In den letzten Jahren wurden transmembrane Proteine, die Syndecane, welche mehrere Heparansulfatketten besitzen, als Hauptbindungsstellen für kationische Vektoren identifiziert.^[73, 76] Besonders an Aktin- reichen Zellfortsätzen, den Filopodien, sind die Syndecane lokalisiert. Mittels verschiedener mikroskopischen Techniken, gelang es Rehman et al. 2012 diesen Syndecan- abhängigen Transportmechanismus in Filopodien von Polyplexen und Lipoplexen zum Erreichen der Zelloberfläche zu visualisieren.^[77] Abbildung 8 bietet eine schematische Übersicht zu den Lipoplex-Zellinteraktionen, Aufnahmewegen und zellulären Barrieren.

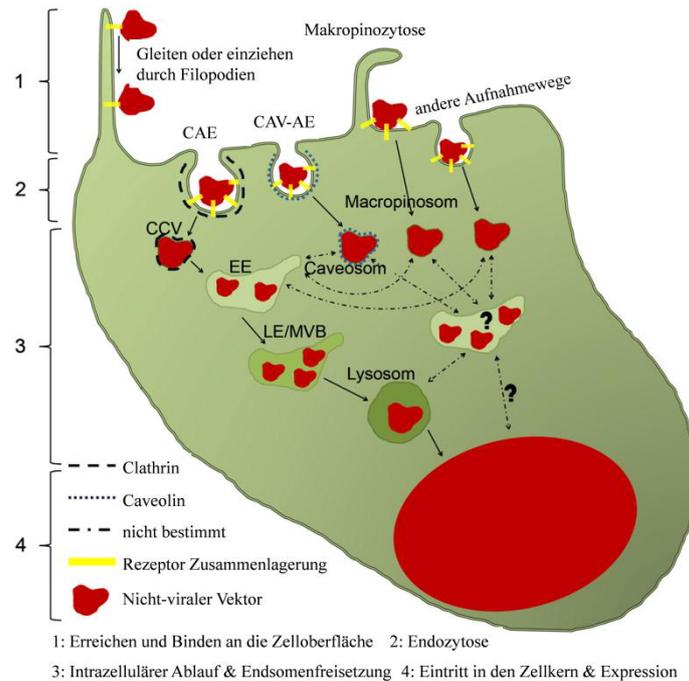


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Lipoplex- Zellinteraktionen, Aufnahmewege und zellulären Barrieren.

Die Bindung an die Zelloberfläche kann in Verbindung mit Filopodien oder durch direkte Wechselwirkungen mit der Zelloberfläche erfolgen (1). Hiernach erfolgt die Aufnahme über verschiedene Endozytosewege (2). Nach anschließender intrazellulärer Verarbeitung kann die Freisetzung der Nukleinsäure aus den unterschiedlichen endozytotischen Kompartimenten durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen (3). Im letzten Schritt erfolgen der Transport und die Aufnahme der DNA in den Zellkern. CAE= Clathrin- abhängige Endozytose; CAV- AE= Caveolae- abhängige Endozytose (Clathrin- unabhängig); CCV= Clathrin- umhüllte Vesikel; EE= frühes Endosomen; LE= spätes Endosomen; MVB= Multi vesikulär Body. Die Abbildung wurde modifiziert nach Rehman et al. 2013.^[73]

Aktuell geht man davon aus, dass der Hauptaufnahmeweg von Lipoplexen in die Zelle mittels Endozytose erfolgt.^[47, 78] Die Endozytose kann dabei in mehrere unterschiedliche Mechanismen eingeteilt werden. Hierzu zählen sowohl Phagozytose als auch Pinozytose. Die Pinozytose wiederum kann in Clathrin-abhängig oder -unabhängig eingeteilt werden. Die Clathrin-unabhängige Endozytose kann nochmals in Caveolae- abhängig, Caveolae-unabhängig oder Makropinozytose eingeteilt werden. Für eine detaillierte Auseinandersetzung der endozytotischen Mechanismen kann an dieser Stelle auf folgenden Übersichtsartikel verwiesen werden.^[79] Der Aufnahmeweg ist dabei von vielen Faktoren abhängig, wie beispielsweise Größe und Struktur des Lipoplexes oder die Art der Zelle. Anschließend muss die DNA aus dem Endosom freigesetzt werden, um dem lysosomalen Abbau zu entgehen. Der Mechanismus dieses transfektionslimitierenden Schrittes ist bisher nicht genau aufgeklärt. Schon Mitte der 90er Jahre wurde der Membranfusion auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen der positiv geladenen Lipoplexe mit der Endosomenmembran eine Schlüsselrolle zugesprochen. In Abbildung 9 ist der von Y. Xu und F. C. Szoka 1996 postulierte DNA Freisetzungsmechanismus dargestellt.^[80] Hierbei fusioniert der Lipoplex mit

der Endosomenmembran und destabilisiert diese. Im Folgenden resultiert daraus eine Art Flip-Flop von anionischen Lipiden von der äußeren Seite der Endosomenmembran auf die innere Seite. Die Freisetzung der Nukleinsäure erfolgt auf Grund der Bildung von ladungsneutralen Ionenpaaren zwischen anionischen Lipiden und dem kationischen Lipid.^[80]

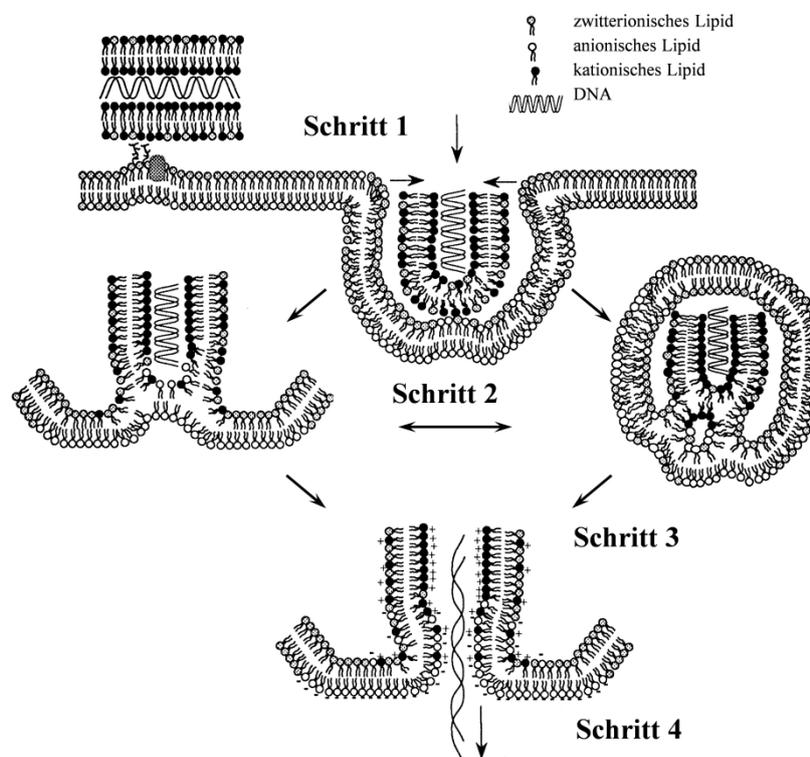


Abbildung 9 Schematische Darstellung des Lipoplexaufnahmeweges und des endosomalen Freisetzungsmechanismus

Schritt 1: Endozytische Aufnahme des Lipoplexes nach elektrostatischer Interaktion mit der Zellmembran. Schritt 2: Destabilisation der Membran des frühen Endosoms, daraus resultiert Flip-Flop von anionischen Phospholipiden. Schritt 3: Anionische Lipide diffundieren in den Komplex und formen ladungsneutrale Ionenpaare mit dem kationischen Lipid. Schritt 4: Die DNA dissoziiert vom Komplex und wird in Zytoplasma freigesetzt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Xu und Szoka 1996.^[80]

Nach heutigem Stand der Forschung geht man zwar davon aus, dass kationische Lipide die Endosomenmembran destabilisieren, der genaue Freisetzungsmechanismus ist jedoch unklar. Insbesondere ist hierbei nicht geklärt, ob die Freisetzung der Nukleinsäure aus einer lokalen und vorübergehenden Membrandestabilisierung resultiert oder eine vollständige Verschmelzung der Endosomenmembran mit der Lipoplexmembran erfordert.^[73] In diesem Zusammenhang wurde in einem kürzlich veröffentlichten Artikel von der Lipoplex-induzierten Bildung transienter Poren in der Endosomenmembran berichtet, durch die die Nukleinsäure in das Zytoplasma gelangt.^[81] Weiterhin wird auch von lamellaren Lipoplexstrukturen berichtet, welche eine hervorragende Transfektionseffizienz aufweisen und für die mehrere Freisetzungstheorien bestehen:

1.) auf Grund der Mischung mit Membranlipiden bilden sich nicht-lamellare Strukturen, die eine erhöhte DNA Freisetzung induzieren.^[82]

2.) die endosomale Freisetzung wird in Abhängigkeit einer höheren Lipoplexladungsdichte forciert.^[33]

Aber auch andere Strategien, wie die endosomale Membrandestabilisierung durch pH sensitive Lipide basierend auf der Azidifikation bei der endosomal Reifung, sind Gegenstand der Forschung.^[83] Nicht zuletzt scheint die Membranfluidität der Lipoplexe ein entscheidender Schlüsselparameter bei der endosomal Freisetzung der Nukleinsäure zu sein.^[84] Zusammenfassend kann man sagen, dass bisher keine universell verwendbare Theorie existiert, wobei nicht auszuschließen ist, dass strukturabhängig unterschiedliche Mechanismen wirken. Die meisten nicht-zellulären Modellsysteme zur Untersuchung der zellulären DNA-Freisetzungsmechanismen besitzen nur wenige Variablen, woraus nur eingeschränkte Möglichkeiten zur Nachvollziehbarkeit von zellulären Prozessen resultieren. Obwohl der in Abbildung 9 beschriebene Flip- Flop- Mechanismus nicht Anspruch auf generelle Richtigkeit erhebt, bleibt er einer der plausibelsten Theorien und ist vermutlich größtenteils bei der Freisetzung der Nukleinsäure aus Lipoplexen involviert.

Nach der Freisetzung aus den Endosomen müssen die unterschiedlichen Nukleinsäuren unterschiedliche Zielkompartimente erreichen. Für antisense ODN`s oder siRNA`s ist der Zielort das Zytoplasma. Für DNA existiert noch eine weitere Barriere, die Zellkernmembran.^[70] Um zum Zellkern zu gelangen muss die DNA durch das Zytoplasma wandern. Jedoch ist die Mobilität von großen Moleküle sehr gering, wodurch die Anfälligkeit für den Abbau durch zytosolische Nukleasen steigt. Die Halbwertszeit von nackter pDNA im Zytoplasma beträgt ca. 50-90 min.^[24] In proliferierenden Zellen kann die Aufnahme in den Zellkern während der Zellteilung passiv erfolgen. Für nicht-proliferierende Zellen stellt die Kernmembran ein weiteres Hindernis dar. Mittels passiver Diffusion durch den Kernporenkomplex können jedoch nur kleine Moleküle mit einer Länge von bis zu 9 nm und eine Molmasse von bis zu ca. 50 kDa gelangen. Für größere Moleküle ist ein aktiver Transport erforderlich, der durch kurze Peptidsequenzen, den Kernlokalisierungssequenzen, unterstützt wird.^[24] Jedoch sind auch hier die Aufnahmemechanismen noch nicht genau aufgeklärt.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Gentherapie eine vielversprechende Behandlungsform darstellt. Insbesondere die Lipofektion erweist sich als potentes Werkzeug, um Polynukelotide in Zellen einzubringen. Jedoch ist diese zurzeit mit vielen Limitierungen verknüpft und bisher konnte noch kein ideales Gentransfersystem etabliert werden. Zudem

sind für zahlreiche Prozesse die Mechanismen nicht vollständig aufgeklärt. Daher ist es weiterhin notwendig neuartige Transfektionslipide zu synthetisieren, zu charakterisieren und Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen, um effiziente und sichere Gentransfersysteme zu entwickeln.

1.3 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Für eine zielgerichtete Weiterentwicklung lipidbasierter Gentransfersysteme ist ein grundlegendes Verständnis der Struktur- Wirkungsbeziehungen notwendig. Einen idealen Kandidaten für die Ableitung dieser Beziehungen stellt die kürzlich beschriebene zweite Generation der kationischen Malonsäurediamide dar^[85-87]. Ein Vorteil dieser potenten Klasse an Verbindungen ist, dass ihr Aufbau nach dem Baukastenprinzip konzipiert ist und somit gezielt Strukturmodifikationen im Kopf, Linker und lipophilen Bereich durchgeführt werden können. Eine weitere Voraussetzung für die hier vorliegende Arbeit war das im Rahmen dieser Promotion erfolgte Screening einer Reihe, bestehend aus zwölf Malonsäurediamiden, am Zellkulturmodell. Die gewonnenen Ergebnisse konnten in einer Diplomarbeit und einer Dissertation bereits veröffentlicht werden und würden den Rahmen dieser Dissertationsschrift überschreiten.^[88, 89]

Basierend auf den Ergebnissen des *in vitro*- Screenings wurde sowohl ein effektives (OH4) als auch ein ineffektives (TH4) kationisches Lipid ausgewählt. Diese unterscheiden sich strukturell in nur einer der beiden Alkylketten. Für die angefertigte Dissertation sollten diese beiden Vertreter in Mischungen mit verschiedenen Phospholipiden einer ausgiebigeren physiko- chemischen und biologischen Charakterisierung unterzogen werden. Insbesondere galt es hierbei transfektionslimitierende und transfektionssteigernde Parameter zu ermitteln. Des Weiteren sollte ein Strukturanalogon, welches mit drei C14- Alkylketten modifiziert (DiTT4) wurde hinsichtlich Transfektionseffizienz und dessen physiko- chemischen Eigenschaften untersucht werden.

2 KUMULATIVER TEIL

ALLGEMEINE INFORMATIONEN ZU DEN FACHZEITSCHRIFTEN					
Titel	European Journal of Lipid Science and Technology	Journal of Controlled Release	Soft Matter	ChemPhysChem	Bioconjugate Chemistry
Impact Factor 2014	1,812	7,705	4,029	3,419	4,513
5-Year Impact	2.090	8,10	4,29	3,24	4,68
Herausgeber	Wiley-VCH Verlag	Elsevier	Royal Society of Chemistry	Wiley-VCH Verlag	American Chemical Society

Tabelle 2 Allgemeine Informationen zu den Fachzeitschriften

DARLEGUNG DES PROZENTUALEN EIGENANTEILS AN DEN NACHFOLGENDEN VERÖFFENTLICHUNGEN	
Publikation I	C. Janich, C. Wölk, S. Taßler, S. Drescher, A. Meister, G. Brezesinski, B. Dobner and A. Langner: <i>Composites of malonic acid diamides and phospholipids - Structural parameters for optimal transfection efficiency in A549 cells.</i> Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2014, 116, 1184-1194 Eigenanteil: A= ca. 60% B= ca. 60%
Publikation II	C. Janich, C. Wölk, F. Erdmann, T. Groth, G. Brezesinski, B. Dobner, and A. Langner: <i>Composites of malonic acid diamides and phospholipids — Impact of lipoplex stability on transfection efficiency.</i> J. Controlled Release 2015, 220, 295–307 Eigenanteil: A= ca. 90% B= ca. 80%
Publikation III	C. Janich, S. Taßler, A. Meister, G. Hause, J. Schäfer, U. Bakowsky, G. Brezesinski, C. Wölk: <i>Structures of malonic acid diamide/phospholipid composites and their lipoplexes.</i> Soft Matter 2016, 12, 5854-5866 Eigenanteil: A= ca. 50% B= ca. 50%
Publikation IV	C. Wölk, C. Janich, D. Pawlowska, S. Drescher, A. Meister, G. Hause, B. Dobner, A. Langner, and G. Brezesinski: <i>Lamellar versus micellar structures - Aggregation behaviour of a three-chain cationic lipid designed for nonviral polynucleotide transfer.</i> ChemPhysChem 2015, 10, 2115-2126. Eigenanteil: A= ca. 40% B= ca. 30%
Publikation V	C. Wölk, C. Janich, A. Meister, S. Drescher, A. Langner, G. Brezesinski, and U. Bakowsky: <i>Investigation of binary lipid mixtures of a three-chain cationic lipid with phospholipids suitable for gene delivery.</i> Bioconjugate Chem. 2015, 26 (12), 2461–2473. Eigenanteil: A= ca. 50% B= ca. 30%

Tabelle 3 Darlegung des prozentualen Eigenanteils an den Veröffentlichungen

Der Eigenanteil setzt sich wie folgt zusammen:

- A: eigener Anteil an der Planung, der Durchführung, der Auswertung der Experimente und der Anfertigung der dazugehörigen Abbildungen
- B: eigener Anteil an der Anfertigung des Manuskripts

Der folgende Abschnitt beinhaltet 5 Publikationen, welche als *Research Artikel* in internationalen Fachzeitschriften unter Anwendung des *Peer-Review* Verfahren veröffentlicht wurden. Diese Artikel bilden die Grundlage meiner Arbeit und fassen die experimentellen Ergebnisse zusammen. Die Artikel sind eng miteinander verknüpft, wobei sich die Artikel I-III mit der Charakterisierung der Transfektionslipide OH4 und TH4 in Mischung mit verschiedenen Phospholipiden befassen. In den Artikeln IV und V wird das hoch potente dreikettige Transfektionslipid DiTT4 sowohl separat als auch in Mischung mit verschiedenen Phospholipiden untersucht. Das Lipid DiTT4 stellt eine Weiterentwicklung der Malonsäurediamide der 2. Generation dar. Die ausgewählten Transfektionslipide sind in ihrem Grundgerüst, einer Malonsäurediamidstruktur, gleich. Des Weiteren ist bei allen Transfektionslipiden eine Carboxylgruppe des Malonsäurebausteins mit einer Tris(2-aminoethyl)amin-Einheit über eine Amidbindung verknüpft, welche einen Teil der Kopfgruppe darstellt. Den zweiten Teil der Kopfgruppe bildet das L-Lysin, welches durch eine weitere Amidbindung mit der zweiten Carboxylgruppe des Malonsäurebausteins verknüpft ist. In Abbildung 10 sind die verschiedenen Transfektionslipide schematisch dargestellt. Die gemeinsamen Strukturmerkmale sind zur besseren Übersichtlichkeit rot hinterlegt. Hierbei wird ersichtlich, dass sich die Lipide nur in ihren Alkylketten unterscheiden. Bei den Lipiden OH4 und TH4 variiert die Alkylkette (OH4: Oleyl, TH4: Tetradecyl), welche über eine Amidbindung mit der Carboxylgruppe des L-Lysins verbunden ist. An C₂ Position der Malonsäurediamidbausteins befindet sich jeweils eine Hexadecylkette. Das Transfektionslipid DiTT4 besitzt drei Tetradecylketten, wobei zwei davon an Position C₂ des Malonsäurediamidbausteins gebunden sind.

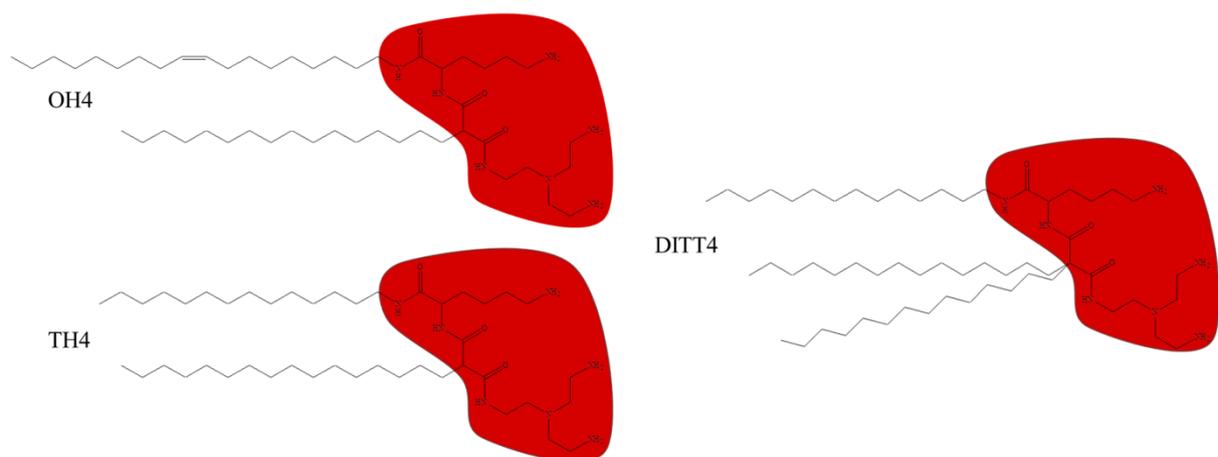


Abbildung 10 Strukturformeln der in den Veröffentlichungen verwendeten Transfektionslipide. Kopfbereich und Malonsäurediamid-Rückgrat sind bei allen 3 Lipiden gleich und rot hinterlegt. Die Transfektionslipide unterscheiden sich in der Anzahl und Art der Alkylketten.

2.1 UNTERSUCHUNGEN VON MALONSÄUREDIAMIDEN MIT ZWEI ALIPHATISCHEN KETTEN IN MISCHUNG MIT PHOSPHOLIPIDEN

2.1.1 PUBLIKATION I: “COMPOSITES OF MALONIC ACID DIAMIDES AND PHOSPHOLIPIDS – STRUCTURAL PARAMETERS FOR OPTIMAL TRANSFECTION EFFICIENCY IN A549 CELLS”

Link Artikel:

<http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201300405>

Link Supporting Information:

<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/ejlt.201300405/asset/supinfo/ejlt201300405-sm-0001-SuppData.pdf?v=1&s=1ffaabec40ffbc4be7b1b10c1f616e0e2866ab94>

Zitat:

C. Janich, C. Wölk, S. Taßler, S. Drescher, A. Meister, G. Brezesinski, B. Dobner and A. Langner: *Composites of malonic acid diamides and phospholipids - structural parameters for optimal transfection efficiency in A549 cells.*

Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2014, 116, 1205-1216.

2.1.2 PUBLIKATION II: “COMPOSITES OF MALONIC ACID DIAMIDES AND PHOSPHOLIPIDS – IMPACT OF LIPOPLEX STABILITY ON TRANSFECTION EFFICIENCY”

Link Artikel:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.045>

Link Supporting Information:

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S016836591530211X/1-s2.0-S016836591530211X-mmc1.doc/271103/html/S016836591530211X/28fc57d730b0e7a9b17f82d4a3711390/mmc1.doc>

Zitat:

C. Janich, C. Wölk, F. Erdmann, T. Groth, G. Brezesinski, B. Dobner, and A. Langner: *Composites of malonic acid diamides and phospholipids — Impact of lipoplex stability on transfection efficiency.*

J. Controlled Release 2015, 220, 295–307.

2.1.3 PUBLIKATION III: “STRUCTURES OF MALONIC ACID DIAMIDE/PHOSPHOLIPID COMPOSITES AND THEIR LIPOPLEXES”

Link Artikel:

<http://dx.doi.org/10.1039/C6SM00807K>

Link Supporting Information:

<http://www.rsc.org/suppdata/c6/sm/c6sm00807k/c6sm00807k1.pdf>

Zitat:

C. Janich, S. Taßler, A. Meister, G. Hause, J. Schäfer, U. Bakowsky, G. Brezesinski and C.

Wölk:

Structures of malonic acid diamide/phospholipid composites and their lipoplexes.

Soft Matter 2016, 12, 5854-5866

2.2 UNTERSUCHUNGEN DES MALONSÄUREDIAMIDS DITT4 MIT DREI ALIPHATISCHEN KETTEN IN MISCHUNG MIT PHOSPHOLIPIDEN

2.2.1 PUBLIKATION IV: "LAMELLAR VERSUS MICELLAR STRUCTURES — AGGREGATION BEHAVIOR OF A THREE-CHAIN CATIONIC LIPID DESIGNED FOR NONVIRAL POLYNUCLEOTIDE TRANSFER"

Link Artikel:

<http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201500188>

Link Supporting Information:

http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/cphc.201500188/asset/supinfo/cphc_201500188_sm_miscellaneous_information.pdf?v=1&s=df997b6e45f469966a656971c810881830da6bb5

Zitat:

C. Wölk, C. Janich, D. Pawlowska, S. Drescher, A. Meister, G. Hause, B. Dobner, A. Langner, and G. Brezesinski:

Lamellar versus Micellar Structures - Aggregation Behaviour of a Three-Chain Cationic Lipid Designed for Nonviral Polynucleotide Transfer.

ChemPhysChem 2015, 16 (10), 2115-2126.

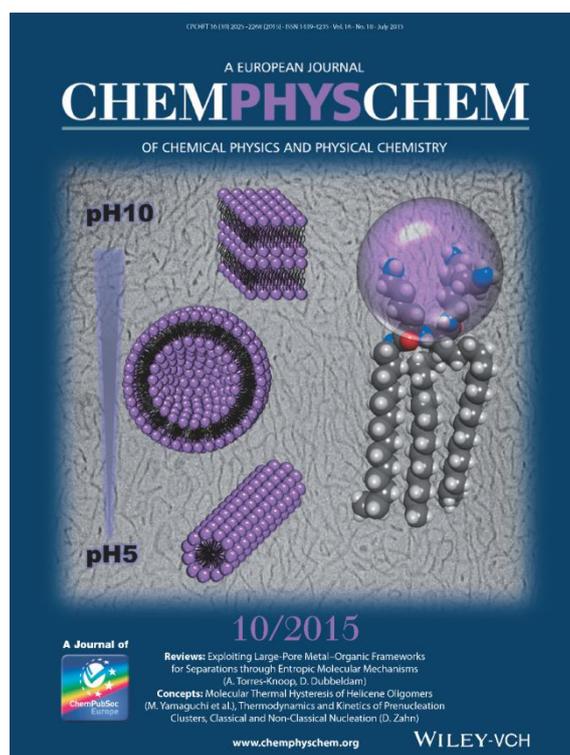


Abbildung 11 Titelbild der Fachzeitung „ChemPhysChem“ 2015, 16.

2.2.2 PUBLIKATION V: “INVESTIGATION OF BINARY LIPID MIXTURES OF A THREE-CHAIN CATIONIC LIPID WITH PHOSPHOLIPIDS SUITABLE FOR GENE DELIVERY”

Link Artikel:

<http://dx.doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00505>

Link Supporting Information:

<http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/acs.bioconjchem.5b00505>

Zitat:

C. Wölk, C. Janich, A. Meister, S. Drescher, A. Langner, G. Brezesinski, and U. Bakowsky: *Investigation of Binary Lipid Mixtures of a Three-Chain Cationic Lipid with Phospholipids Suitable for Gene Delivery*.

Bioconjugate Chem. 2015, 26 (12), 2461–2473

3 ALLGEMEINE DISKUSSION

Die hier vorliegende Dissertation soll einen Beitrag für die Weiterentwicklung von Lipid-basierten Gentransfersystemen liefern. Obwohl mittlerweile mehrere Jahrzehnte intensiv auf dem Gebiet der Gentherapie geforscht wurde, konnte bisher noch kein nicht-virales Gentransfersystem für die *in vivo* Anwendung zugelassen werden. Um die Vorteile der Gentherapie in Zukunft sicher nutzen zu können, ist ein grundlegendes Verständnis über alle an ihr beteiligten Mechanismen notwendig. Hierbei ist ein wichtiger Baustein die Entwicklung von sicheren Polynukleotiden, auf denen die genetischen Informationen gespeichert sind, erforderlich. Besonderes Interesse aktueller Forschungen auf diesem Gebiet gilt dem „genome editing“ mittels der CRISPR- Technologie.^[90, 91] Der zweite wichtige Baustein ist die Entwicklung von sicheren und effektiven Transporten. Insbesondere die Lipofektion ist eine sehr vielversprechende Methode, Polynukleotide in Zellen einzubringen. Um ein besseres Verständnis über die an der Lipofektion beteiligten Mechanismen zu erlangen und Parameter, welche mit effektiven Gentransfersystemen verknüpft sind, ermitteln zu können, wurde in dieser Arbeit eine breit gefächerte multidisziplinäre Charakterisierung ausgewählter Lipidformulierungen (Malonsäurediamid:Phospholipid- Mischungen) und der Lipoplexe durchgeführt. Die in dieser Arbeit untersuchten bioabbaubaren kationischen Malonsäurediamidlipide sind ideale Kandidaten, da sie Strukturveränderungen sowohl im Kopfbereich als auch im Alkylkettenbereich zulassen. Ein weiterer Vorteil dieser Lipidformulierungen ist die bekannte, variierbare Zusammensetzung aus kationischen Lipid und Helferlipid, welche für die physikochemische Charakterisierung zwingend erforderlich ist. Bei vielen kommerziell erhältlichen Produkten wie beispielsweise Lipofectamine[®] 2000 ist hingegen die genaue Zusammensetzung nicht bekannt. Die in den Publikationen vorgestellten Ergebnisse sind jedoch streng genommen nur für das Modellsystem gültig, in dem sie untersucht wurden, können aber gleichzeitig auch in anderen Modellen zukünftig überprüft werden. Dieser Aspekt ist umso wichtiger, da die Lipofektion ein hochdynamischer multifaktorieller Prozess ist, bei dem eine Vielzahl von variablen Einflussgrößen vorhanden ist. In diesem Zusammenhang sollte bei den Publikationen I-V beachtet werden, dass die Experimente nur mit dem Reportergen peGFP-C2 mit einer Größe von 4,7 kB und nur mit drei verschiedenen Transfektionslipiden durchgeführt wurden und somit nur einfachen Modellcharakter besitzen. In Kooperation mit Herrn Dr. Daniel Ivanusic und Frau M. Sc. Elena Plotzki vom Robert Koch Institut (Berlin, Deutschland) konnten wir jedoch zeigen, dass unsere Lipidformulierungen (OH4:DOPE, 1:1, n:n) in der Lage sind, sogar sehr große

Plasmide (>15 kB) einzuschleusen, wodurch eine gewisse Übertragbarkeit auf andere Systeme gezeigt werden konnte. Abbildung 12 zeigt eine drei-dimensionale Aufnahme der Zelloberfläche von HEK-293, auf der sich HIV-Partikel (grün dargestellt) ausgebildet haben. Die Zellen wurden hierfür 24 h vorher mit dem Lipidsystem (OH4:DOPE, 1:1, n:n) und dem Moleklarklon HIV-1_{JR-FL} Gag-iGFP, welcher eine Plasmidgröße von 15,6 kB besitzt, transfiziert.

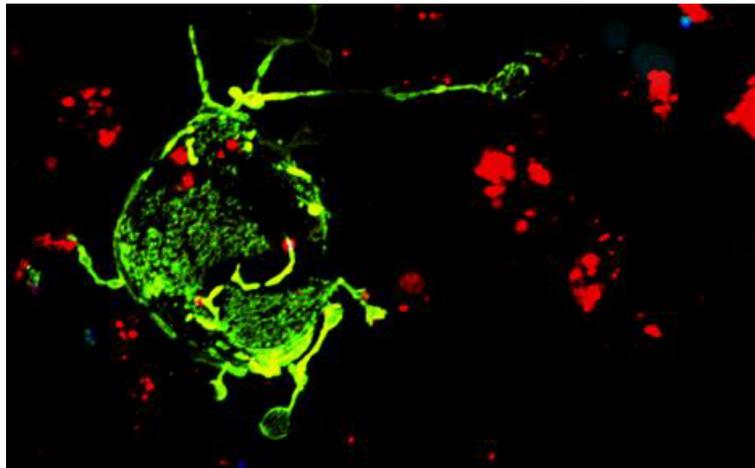


Abbildung 12 3D-CLSM Aufnahme von einer HEK-293 Zelle, welche HIV Partikel ausbildet. HEK-293 Zellen wurden hierfür mit dem HIV-1_{JR-FL} Gag-iGFP Moleklarklon und der Lipidmischung OH:DOPE (1:1, n:n) im N/P Verhältnis 4 24 h vorher transfiziert. Die HIV-Partikel sind mit GFP markiert und sind grün dargestellt, als Lipidlabel wurde ein 18:1 Liss Rhod PE (rot; 0,02 mol-%) verwendet. Das Bild wurde mit einem invertierten konfokalen Laser Mikroskop (Zeiss LSM 780) angefertigt. Hierfür wurde ein Stapel von optischen Schnitten durch die Probe (z-stack) aufgenommen und mit Hilfe der Zeiss ZEN-Software zu einer 3D-Projektion umgewandelt.

Ein weiterer allgemeiner Punkt, welcher großen Einfluss auf die Ergebnisse hat und damit unbedingt beachtet werden sollte, ist eine einheitliche und geeignete Herstellungsmethodik sowie die Verwendung eines geeigneten Puffersystems der Lipiddispersion. Relevante Punkte sind hierbei die chemische Stabilität der Lipide (z. B. Hydrolyse), welche beispielsweise von Temperatur, pH-Wert, Lagerungsbedingungen, Zeit und Intensität der Ultraschallbeschallung abhängig sind. Die von uns hergestellten Lipiddispersionen wiesen keine Zerfallsprodukte auf und wurden nicht länger als drei Tage verwendet. Weiterhin sollte nur mit steril filtrierten Puffern gearbeitet werden, um biologische Kontaminationen, aber auch Schwebstoffe zu vermeiden. Mit der Herstellungsmethode der Lipiddispersion sind somit auch ihre physikochemischen Parameter verbunden, wie beispielsweise Größe und Form der Lipidaggregate und der daraus entstehenden Lipoplexe. In den für diese Arbeit vorliegenden Artikeln wurden alle Herstellungsparameter konstant gehalten, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

In Publikation I erfolgte die Korrelation ausschließlich zwischen den physikochemischen Parametern der reinen Lipidmischungen und der Transfektionseffizienz an A549 Zellen. Obwohl Korrelation zwischen physikochemischen Parametern und der Transfektionseffizienz

der Lipoplexe, wie in Publikation II und III beschrieben, direktere Ableitungen zulassen, besitzt die Charakterisierung der reinen Lipidmischungen auch einige Vorteile. Hierbei ist der vergleichsweise geringere experimentelle und zeitliche Aufwand zu nennen. Besonders die DLS- Messungen, DSC Versuche oder Zeta-Potential Messungen sind relativ einfach durchführbar und bieten sich für ein Screening von diversen Lipidformulierungen an. Ein Gentransfersystem, welches beispielweise i.v. appliziert werden soll, sollte eine Größe von 100-200 nm nicht überschreiten.^[92] Aus pharmazeutischer Sicht ist daher eine kleine Teilchengröße der Lipidaggregate erstrebenswert. Sollten diese Lipidaggregate schon deutlich größer als 200 nm sein, kann versucht werden diese zu reduzieren oder diese Lipidmischungen sind nicht für den i.v. Applikationsweg geeignet. In diesem Zusammenhang ist das kationische Lipid DiTT4 äußerst interessant, da es sowohl bei pH 5,0 als auch bei pH 7,3 stets Aggregate unter einer Größe von 200 nm ausbildet.

Mittels Zeta-Potential Messungen lassen sich die Partikelladung und erste Erkenntnisse über die Stabilität der Dispersion ableiten. Des Weiteren lassen sich mit Hilfe der DSC erste Information über das Mischungsverhalten, Phasenumwandlungen und somit auch über die Fluidität der Lipidmischungen gewinnen. In diesem Zusammenhang bedeutet, wie in Publikation I beschrieben, die Fähigkeit einer kationischen Lipidmischung Vesikel auszubilden nicht pauschal, dass diese gleichzeitig eine hohe Transfektionseffizienz aufweist. Jedoch zeigen die Ergebnisse im Fall der getesteten Malonsäurediamid:Phospholipid-Mischungen die Tendenz, dass Eigenschaften von Lipidformulierungen, die für die Vesikelbildung vorteilhaft sind, mit einer guten Transfektionseffizienz korreliert sein können, obgleich die aus den Lipidvesikeln gebildeten Lipoplexe in den allermeisten Fällen keine liposomalen Strukturen mehr aufweisen. Es kann somit festgehalten werden, dass Lipoplexe meistens keine Liposomen sind, an denen oder in denen sich die DNA befindet, obwohl dieses Modell häufiger postuliert wird. Diese Aussage wird durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Publikation III bestätigt. Im Fall der mit den Transfektionslipiden OH4 und TH4 untersuchten Lipidmischungen bilden alle unter Zugabe von pDNA lamellare Lipoplexe aus, die sich jedoch in charakteristischen Parametern unterscheiden, siehe Publikation III. Lipoplexe welche DPPC als Helferlipid beinhalten bilden Stapel aus kleinen Lipidscheiben und pDNA aus. Lipoplexe mit dem Helferlipid DOPE hingegen formen undefinierbare 3-dimensionale Strukturen, in denen die pDNA lamellare Schichten mit der Lipidmischung bildet. Welchen Einfluss diese Lipoplexstrukturen genau auf die Transfektion ausüben, kann derzeit nicht genau gesagt werden.

Weiterhin ist das Anfertigen von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Internalisierung der Lipoplexe in die Zelle bzw. deren zeitlicher Aufnahmeverlauf in die verschiedenen Zellkompartimente ein wichtiger Schritt, um die Aufnahmemechanismen aufzuklären. Er ist Bestandteil gegenwärtiger Untersuchungen. Abbildung 13 zeigt eine 3D-CLSM- Aufnahme, in der die Internalisierung des OH4:DOPE (1:1, n:n) – peGFP-C2 DNA Komplexes in A549 nach einer 4 h Inkubationsphase dargestellt ist. Deutlich zu sehen ist die Interaktion der Lipoplexe mit den Membranausstülpungen, sogenannte Filopodien oder Lamellipodien, welche wie in der Einleitung beschrieben an der Lipoplexaufnahme beteiligt sind. Im Gegensatz dazu waren nach 1h Inkubationsphase die Membranausstülpungen nicht so stark ausgeprägt (Bild nicht gezeigt).

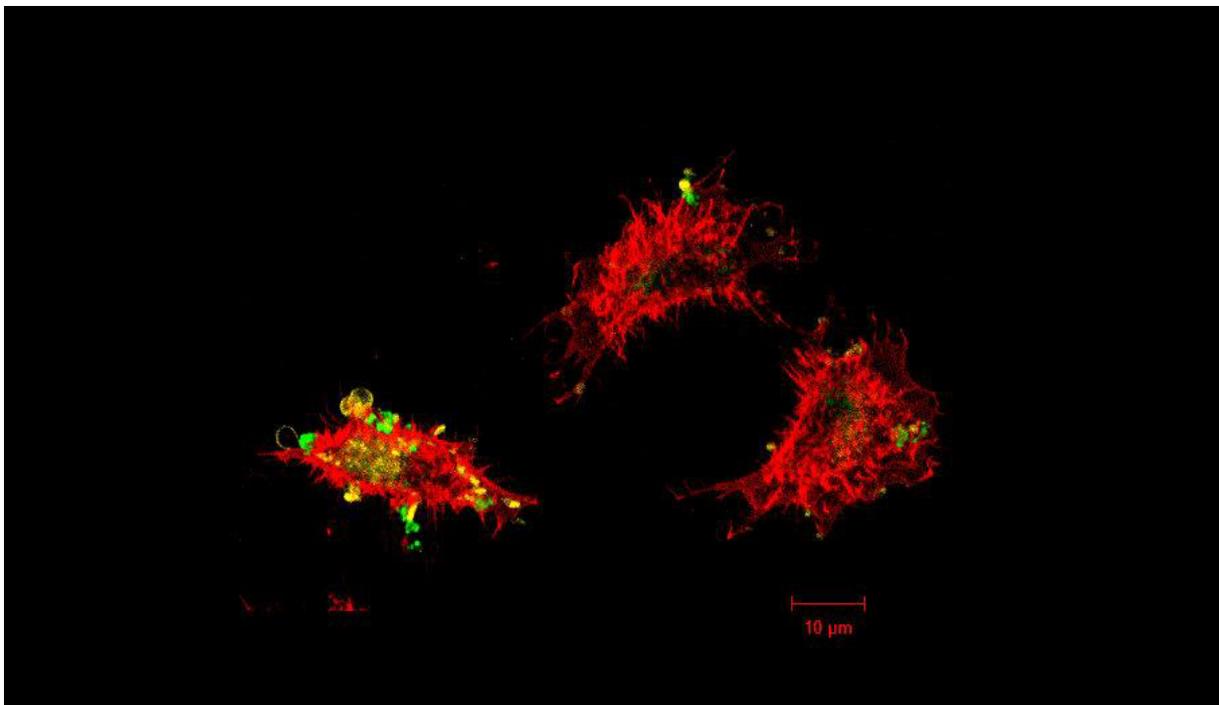


Abbildung 13 3D-CLSM Aufnahme zeigt die Internalisierung von OH4:DOPE (1:1, n:n) - pDNA Komplexen in A549 nach einer 4 h Inkubationsphase.

Die Zellmembran wurde mit WGA- Alexa Fluor® 633 markiert (rot), die peGFP-C2 DNA wurde mit YoYo-1® (grün) und als Lipidlabel wurde ein 18:1 Liss Rhod PE (gelb; 0,02 mol-%) verwendet. Das Bild wurde mit einem invertierten konfokalen Laser Mikroskop (Zeiss LSM 710) angefertigt. Hierfür wurde ein Stapel von optischen Schnitten durch die Probe (z-stack) aufgenommen und mit Hilfe der Zeiss ZEN-Software zu einer 3D-Projektion umgewandelt.

Ein weiterer noch nicht abschließend geklärt Punkt, welcher in den Publikationen I-III angesprochen wird, ist das Entmischungsphänomen der unterschiedlichen Lipidmischungen und ihren Einfluss auf die Ladungsdichteverteilung und somit auch auf die Transfektionseffizienz. Jedoch lassen die vorliegenden Ergebnisse der Publikationen I und III, sowie weitergehende unveröffentlichte epi-fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen die Aufstellung von Thesen für die Anforderungen an Lipidformulierung für den Gentransfer zu: Die Lipidmischung sollte bei biologisch relevanten Drücken (30 mN/m) im fluiden Phasenzustand sein und es sollte auch in Anwesenheit von DNA nicht zu starken Entmischungen kommen.

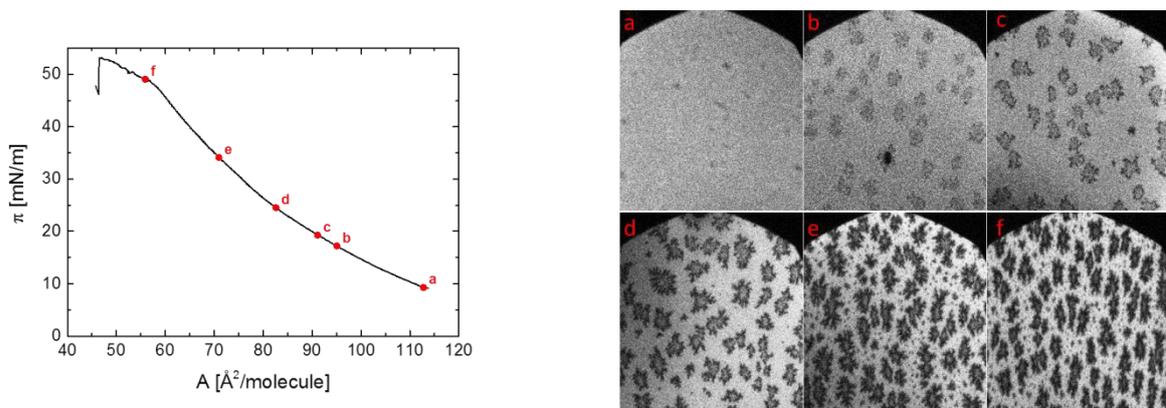


Abbildung 14 Isotherme und epi-fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen am Langmuir-Monolayer der Lipidmischung OH4:DPPC (1:1, n:n) in Anwesenheit von DNA in der Subphase.

Links Isotherme der Lipidmischung OH4:DPPC im mol. Verhältnis 1:1 gespreitet auf 10 mM MES-Puffer pH 6,5 bei 25°C unter Anwesenheit von DNA ($c = 0,1 \text{ mM}$ Nukleotid) in der Subphase. Rechts epi-fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der Domänen an verschiedenen Punkten dieser Isotherme. Als Fluoreszenzmarker wurde BODIPY® 558/568 C12 (0,01 mol-%) verwendet.

Abbildung 14 zeigt am Beispiel der ineffizienten Lipidmischung OH4:DPPC im Gegensatz zu OH4:DOPE (nicht gezeigt) in Anwesenheit von DNA in der Subphase eine Domänenbildung schon bei sehr kleinen Drücken. Inwiefern es sich hierbei um eine direkte Entmischung der Lipidkomponenten oder zumindest zwischen fluider und kondensierter Phase handelt, ist noch nicht geklärt und ist u.a. Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Weiterhin können sich je nach Zelllinie, Art und Größe der Nukleinsäure unterschiedliche Lipoplexstrukturen als effektiv erweisen. Welche Struktur und Lipidzusammensetzung ein „effizienter“ Lipoplex haben muss, ist somit nicht allgemein vorhersagbar und muss für das jeweilige System experimentell ermittelt werden. Besonders die Übertragbarkeit von *in vitro* Versuchen auf *in vivo* Versuche sollte kritisch hinterfragt werden. Dennoch sind *in vitro* Versuche für erste Voruntersuchungen essentiell und können erste Hinweise auf mögliche potenzielle Kandidaten liefern. Erwähnenswert ist an dieser Stelle nochmals, das in Publikation IV und V untersuchte Transfektionslipid DiTT4, welches am Zellkulturmodell

ohne Helferlipid eine moderate Transfektionseffizienz aufwies. Erste Transfektionsuntersuchungen mit dem Lipid DiTT4 am Hühnerei-Test an der Chorion-Allantois-Membran (HET-CAM), welche von unserem Kooperationspartner (AG Bakowsky, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt wurden, belegen eine hohe Transfektionseffizienz von nahezu 100% bei gleichzeitig sehr geringer Toxizität und sind gegenwärtig Bestandteil von weitergehenden Untersuchungen.

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Für eine zielgerichtete Weiterentwicklung von sicheren und biokompatiblen Gentransfersystemen ist eine detaillierte biologische und physiko- chemische Untersuchung sowohl der Lipidformulierungen als auch ihrer Komplexe mit Nukleinsäuren unumgänglich. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden drei neuartige Malonsäurediamidlipide, welche sich strukturell nur in den Alkylketten unterscheiden, in Kombination mit verschiedenen Phospholipiden auf ihre Transfektionseffizienz am Zellkulturmodell untersucht. Hierfür wurden gezielt effiziente und uneffiziente Lipidformulierungen ausgewählt. Mittels einer Vielzahl von verschiedenen physiko- chemischen Untersuchungsmethoden wurden diese Lipidformulierungen und deren Lipid- DNA- Komplexe charakterisiert.

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der für die Dissertation relevanten Publikationen zusammengefasst.

1. Im Fokus der Publikation I stand die physikochemische Untersuchung der reinen Transfektionslipid : Helferlipid Mischungen in verschiedenen molaren Verhältnissen und die Ermittlung der Transfektionseffizienz, welche mittels eines Zellkulturscreenings an A549 Zellen durchgeführt wurde. Die Lipidmischungen bestehen aus einem kationischen Lipid mit Malonsäurediamidrückgrat, welches in der Alkylkette variiert (OH4 oder TH4), und einem neutralen Co-Lipid (DOPE, DOPC oder DPPC). Obwohl die kationischen Lipide nur geringe Unterschiede in ihrer Struktur zeigen, verändert sich die Transfektionseffizienz drastisch. Als Reportergen wurde das Plasmid peGFP-C2 verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Fähigkeit dieser Lipidmischungen, Vesikel mit einer schmalen Größenverteilung zu bilden, mit einer guten Transfektionseffizienz assoziiert ist. Weiterhin sollten für eine hohe Transfektionseffizienz Helferlipid und Transfektionslipid im gleichen Phasenzustand sein und sich gut mischen. Eine gute Mischbarkeit ist u.a. ein wichtiger Parameter für eine gleichmäßige Ladungsdichte. Die fluide Lipidmischung OH4:DOPE wies eine Transfektionseffizienz auf, welche mit der des kommerziell erhältlichen Lipofectamine 2000[®] vergleichbar ist. In der Publikation konnte somit neben der Präsentation eines effizienten Gentransfersystems (OH4:DOPE) an A459 Zellen gezeigt werden, dass die Alkylkettenfluidität, Lipidmischbarkeit und die gleichmäßige Ladungsdichte wichtige Einflussfaktoren für einen effizienten Gentransfer darstellen.

2. In der Publikation II wurden die Transfektionsergebnisse an zwei weiteren Zelllinien verifiziert (HeLa und LLC-PK1 Zellen). Aus den gewonnenen Daten, ergaben sich zwei Fragestellungen:

1. Warum ist die Lipidmischung OH4:DOPE (1:1 n:n) den anderen Lipidmischungen in der Transfektionseffizienz überlegen?

2. Wie wichtig ist der Einfluss der Mischbarkeit der Lipide auf die DNA Komplexierung und daher auch auf die Transfektionseffizienz?

Aus diesem Grund wurden die Lipoplexformulierungen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, DNA zu komplexieren, und ihres DNA Freisetzungsverhaltens verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Fähigkeit der Lipidmischungen, DNA zu komplexieren notwendig ist, aber nicht hinreichend für eine effiziente Transfektion ist. Es konnte gezeigt werden, dass alle Lipidmischungen die gleiche Menge an DNA binden können. Weiterhin spielt eine optimale Bindungsstärke von Lipid zu DNA eine wichtige Rolle für eine effiziente Transfektion. In diesem Zusammenhang sind die effektive Ladungsdichte und die Zusammensetzung des Lipoplex wichtige Faktoren. Wie aus der Literatur bekannt ist, stellt für einen effizienten Gentransfer die Interaktion zwischen extrazellulären GAGs auf der Zelloberfläche und den Lipoplexen einen sehr wichtigen Prozess dar. Jedoch resultiert aus dieser Interaktion oft eine Lipoplex-Destabilisierung und damit auch eine vorzeitige DNA Freisetzung. Dadurch ist diese Interaktion zugleich ein starker transfektionslimitierender Schritt.

3. Als Fortsetzung der bisherigen Arbeiten wurde in Publikation III der Selbstanorganisationsprozess der binären Lipidmischungen in Anwesenheit und Abwesenheit von DNA untersucht. Die Lipidformulierungen wurden sowohl in 3D-Systemen als auch in 2D-Systemen untersucht. Hierfür wurden SAXS-, WAXS-Messungen und TEM Experimente (3D) sowie IRRAS-Messungen auf Langmuir-Filmen (2D) durchgeführt. In Abwesenheit von DNA zeigen die untersuchten Lipidmischungen eine sehr unterschiedliche Selbstorganisation mit heterogenen Strukturen. Hierbei sind diverse Aggregatformen, angefangen bei Vesikeln (OH4:DOPE; TH4:DOPE), über Röhren (TH4:DOPE) bis hin zu diskoiden Strukturen (OH4:DPPC; TH4:DPPC) zu erkennen. Verdrehte Bänder und flächige Strukturen, welche über ein Netzwerk von Wasserstoff-Bindung stabilisiert sind, wurden in allen untersuchten Lipidmischungen in Abwesenheit von DNA gefunden. Die Zugabe von DNA führt bei allen untersuchten Lipidformulierungen zur Bildung von lamellaren

Lipoplexen. Die Lipoplexe unterscheiden sich in entscheidenden Parametern wie im lamellaren Wiederholungsabstand oder im Abstand zwischen den DNA-Strängen, welche auf Unterschiede in der Bindungsstärke zwischen DNA und der jeweiligen Lipidformulierung hindeuten. Für einen effizienten DNA-Transfer könnte daher die Bildung von Lipoplexen mit einer idealen Ladungsdichte ein wichtiger Schlüsselparameter sein. Weiterhin lassen die unterschiedlichen Strukturen der Lipidformulierungen in Abwesenheit von DNA Spielraum für andere Anwendungen neben der Gentherapie.

4. Das Ziel der Publikation IV war die physikochemische Untersuchung des Selbstorganisationsverhaltens des reinen, mit drei Alkylketten modifizierten Transfektionslipids DiTT, in wässriger Dispersion bei verschiedenen pH-Werten (5, 7,3, 10). Des Weiteren wurde die Transfektionseffizienz des Transfektionslipids mittels eines Zellkulturscreenings an A549 Zellen bestimmt. Die Experimente belegen ein außergewöhnliches Aggregationsverhalten des dreikettigen Lipids. Bei pH 10 bildet das Lipid lamellare Strukturen. Bei pH 7,3 sind Vesikel die bevorzugten Lipidassoziate, während bei pH 5 sehr kleine Stäbchenmizellen ausgebildet werden. Besonders unter dem Aspekt, dass DiTT4 das Vermögen besitzt, auch ohne Helferlipid Zellen zu transfizieren, ist dieses Lipid ein sehr vielversprechender Kandidat für weitergehende *in vivo* Untersuchungen.
5. In der Publikation V wurden die binären Lipidmischungen unterschiedlicher Zusammensetzung, bestehend aus dem kationischen Lipid DiTT4 und verschiedenen Phospholipiden (DOPE, DMPE, DMPC) im wässrigen System charakterisiert. Weiterhin wurde der Einfluss von unterschiedlichen Serumkonzentrationen auf die Transfektionseffizienz der Lipoplexe untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass mit einer effizienten Transfektion die folgenden Parameter korrelieren: 1. gute Lipidmischbarkeit, 2. hoher Anteil von Lipiden, deren Alkylketten im fluiden Phasenzustand sind, 3. Fähigkeit Vesikel zu bilden, 4. hohe effektive Ladung, 5. kleine Partikelgröße mit einer schmalen Größenverteilung.
Die Lipidmischung DiTT4/DOPE $x_{\text{DiTT4}} = 0,2$ war ein sehr effektives Gentransfersystem, welches auch in Anwesenheit von 50% Serum eine gute Transfektionseffizienz aufwies. Weiterhin bestätigen die neu gewonnen Erkenntnisse die Thesen, welche in den vorherigen Publikationen aufgestellt wurden.

Abschließend lässt sich sagen, dass durch diese Untersuchungen zwei äußerst potente kationische Lipide (OH4, DiTT4) entdeckt wurden, welche sich für künftige *in vitro* und *in vivo* Experimente eignen. Außerdem konnten diverse physikochemische Parameter von effektiven und ineffektiven Malonsäurediamid:Phospholipid- Lipidformulierungen bestimmt und miteinander verglichen werden. Diese Ergebnisse können für die Weiterentwicklung von lipidbasierten Gentransfersystemen verwendet werden.

In zukünftigen Forschungsarbeiten könnten aufbauend auf dieser Dissertation mit den Lipidformulierungen verschiedene Themen untersucht werden. Hierzu zählt neben der Aufklärung der Internalisierungsmechanismen mittels CLSM auch die Bestimmung der eingeschleusten Nukleinsäuren in den verschiedenen Zellkompartimenten, beispielsweise mittels Ultra- Zentrifugation und PCR. Weiterhin könnte die Plasmid-DNA durch siRNA ausgetauscht werden und die Einflüsse auf die Transfektionseffizienz sowie auf die physikochemischen Eigenschaften der Lipoplexe bestimmt werden. Des Weiteren sollte demnächst die genauere Charakterisierung der Lipoplexe von DiTT4 veröffentlicht werden. Insbesondere die Ermittlung der *in vivo* Transfektionseffizienz des Lipids DiTT4 sollte demnächst in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Bakowsky (Philipps-Universität Marburg, Deutschland) begonnen werden. In diesem Zusammenhang ist die Pegylierung der Liposomen ein weiterer interessanter Forschungspunkt, da hierdurch laut Literatur die liposomale Stabilität erhöht, die Zirkulationshalbwertszeit verlängert und das Profil der Bioverteilung verbessert werden kann. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Groth (Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) könnte das Entwickeln von Bioimplantaten, welche lokal transfizieren, ein weiteres sehr interessantes Projekt werden. Ein weiteres äußerst vielversprechendes Projekt stellt der Austausch der natürlichen Phospholipide gegen die von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Zumbühl (Universität Freiburg, Schweiz) synthetisierten 1,3-Diamidphospholipide dar. Nicht zuletzt könnten auch andere Anwendungsgebiete neben der Gentransfektion, wie beispielsweise die Verwendung der kationischen Lipide (z.B. OH4) als Adjuvans, untersucht werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] T. Friedmann, R. Roblin, Gene Therapy for Human Genetic Disease?, *Science*, 175 (1972) 949-955.
- [2] Richtlinie 2009/120/EG der Kommission vom 14. September 2009 zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel im Hinblick auf Arzneimittel für neuartige Therapien, in: A.d.E.U.L. 242/3 (Ed.), (2009).
- [3] H. Nam, J. Park, K. Kim, I. Kwon, S. Jeong, Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers, *Arch. Pharm. Res.*, 32 (2009) 639-646.
- [4] M.A. Kay, State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead, *Nat Rev Genet*, 12 (2011) 316-328.
- [5] K.F. Buckland, H. Bobby Gaspar, Gene and cell therapy for children — New medicines, new challenges?, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 73 (2014) 162-169.
- [6] F. Candotti, Gene transfer into hematopoietic stem cells as treatment for primary immunodeficiency diseases, *Int J Hematol*, 99 (2014) 383-392.
- [7] A. Fischer, S. Hacein-Bey Abina, F. Touzot, M. Cavazzana, Gene therapy for primary immunodeficiencies, *Clinical Genetics*, 88 (2015) 507-515.
- [8] S. Ylä-Herttuala, Glybera's Second Act: The Curtain Rises on the High Cost of Therapy, *Mol Ther*, 23 (2015) 217-218.
- [9] EMA, Glybera Product information Annex I - Summary of product characteristics 09/12/2015, in, (2015).
- [10] E.W.F.W. Alton, D.K. Armstrong, D. Ashby, K.J. Bayfield, D. Bilton, E.V. Bloomfield, A.C. Boyd, J. Brand, R. Buchan, R. Calcedo, P. Carvelli, M. Chan, S.H. Cheng, D.D.S. Collie, S. Cunningham, H.E. Davidson, G. Davies, J.C. Davies, L.A. Davies, M.H. Dewar, A. Doherty, J. Donovan, N.S. Dwyer, H.I. Elgmati, R.F. Featherstone, J. Gavino, S. Gea-Sorli, D.M. Geddes, J.S.R. Gibson, D.R. Gill, A.P. Greening, U. Griesenbach, D.M. Hansell, K. Harman, T.E. Higgins, S.L. Hodges, S.C. Hyde, L. Hyndman, J.A. Innes, J. Jacob, N. Jones, B.F. Keogh, M.P. Limberis, P. Lloyd-Evans, A.W. Maclean, M.C. Manvell, D. McCormick, M. McGovern, G. McLachlan, C. Meng, M.A. Montero, H. Milligan, L.J. Moyce, G.D. Murray, A.G. Nicholson, T. Osadolor, J. Parra-Leiton, D.J. Porteous, I.A. Pringle, E.K. Punch, K.M. Pytel, A.L. Quittner, G. Rivellini, C.J. Saunders, R.K. Scheule, S. Sheard, N.J. Simmonds, K. Smith, S.N. Smith, N. Soussi, S. Soussi, E.J. Spearing, B.J. Stevenson, S.G. Sumner-Jones, M. Turkkila, R.P. Ureta, M.D. Waller, M.Y. Wasowicz, J.M. Wilson, P. Wolstenholme-Hogg, Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial, *The Lancet Respiratory Medicine*, 3 (2015) 684-691.
- [11] P.K.M. Griesenbach Uta, and Alton Eric W.F.W., Cystic Fibrosis Gene Therapy in the UK and Elsewhere, *HUMAN GENE THERAPY*, 26 (2015) 266-275.
- [12] T.J.o.G. Medicine, Gene Therapy Clinical Trails Worldwide updated july 2015, in, John Wiley and Sons Ltd, 08/12/2015.
- [13] T. Wirth, N. Parker, S. Ylä-Herttuala, History of gene therapy, *Gene*, 525 (2013) 162-169.
- [14] M. Giacca, S. Zacchigna, Virus-mediated gene delivery for human gene therapy, *Journal of Controlled Release*, 161 (2012) 377-388.
- [15] T.A. Ratko, J.P. Cummings, J. Blebea, K.A. Matuszewski, Clinical gene therapy for nonmalignant disease, *The American Journal of Medicine*, 115 (2003) 560-569.

- [16] M.A. Kotterman, T.W. Chalberg, D.V. Schaffer, Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 17 (2015) 63-89.
- [17] D. Ibraheem, A. Elaissari, H. Fessi, Gene therapy and DNA delivery systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 459 (2014) 70-83.
- [18] C. Morrison, [dollar]1-million price tag set for Glybera gene therapy, *Nat Biotech*, 33 (2015) 217-218.
- [19] J.M. Wilson, Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency, *Molecular Genetics and Metabolism*, 96 (2009) 151-157.
- [20] H. Yin, R.L. Kanasty, A.A. Eltoukhy, A.J. Vegas, J.R. Dorkin, D.G. Anderson, Non-viral vectors for gene-based therapy, *Nat Rev Genet*, 15 (2014) 541-555.
- [21] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 114 (2006) 100-109.
- [22] N. Gemma, M. Sara, P.T. Vladimirov, Current Trends in the Use of Cationic Polymer Assemblies for siRNA and Plasmid DNA Delivery, *Pharmaceutical Nanotechnology*, 1 (2013) 165-183.
- [23] A. Namvar, A. Bolhassani, N. Khaikhan, F. Motevalli, Physicochemical properties of polymers: An important system to overcome the cell barriers in gene transfection, *Biopolymers*, 103 (2015) 363-375.
- [24] C.H. Jones, C.-K. Chen, A. Ravikrishnan, S. Rane, B.A. Pfeifer, Overcoming Nonviral Gene Delivery Barriers: Perspective and Future, *Molecular Pharmaceutics*, 10 (2013) 4082-4098.
- [25] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, M. Danielsen, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (1987) 7413-7417.
- [26] L. Wasungu, D. Hoekstra, Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes, *Journal of Controlled Release*, 116 (2006) 255-264.
- [27] K.K. Ewert, H.M. Evans, N.F. Bouxsein, C.R. Safinya, Dendritic Cationic Lipids with Highly Charged Headgroups for Efficient Gene Delivery, *Bioconjugate Chemistry*, 17 (2006) 877-888.
- [28] C. Tros de Ilarduya, Y. Sun, N. Düzgüneş, Gene delivery by lipoplexes and polyplexes, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40 (2010) 159-170.
- [29] V. Floch, G. Le Bolc'h, M.-P. Audrézet, J.-J. Yaouanc, J.-C. Clément, H. des Abbayes, B. Mercier, J.-F. Abgrall, C. Férec, Cationic Phosphonolipids as non Viral Vectors for DNA Transfection in Hematopoietic Cell Lines and CD34+ Cells, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 23 (1997) 69-87.
- [30] M.A. Mintzer, E.E. Simanek, Nonviral Vectors for Gene Delivery, *Chemical Reviews*, 109 (2009) 259-302.
- [31] E. Junquera, E. Aicart, Recent progress in gene therapy to deliver nucleic acids with multivalent cationic vectors, *Advances in Colloid and Interface Science*.
- [32] D.A. Balazs, W. Godbey, Liposomes for Use in Gene Delivery, *Journal of Drug Delivery*, 2011 (2011).
- [33] A. Ahmad, H.M. Evans, K. Ewert, C.X. George, C.E. Samuel, C.R. Safinya, New multivalent cationic lipids reveal bell curve for transfection efficiency versus membrane charge density: lipid-DNA complexes for gene delivery, *The Journal of Gene Medicine*, 7 (2005) 739-748.
- [34] A.J. Lin, N.L. Slack, A. Ahmad, C.X. George, C.E. Samuel, C.R. Safinya, Three-Dimensional Imaging of Lipid Gene-Carriers: Membrane Charge Density Controls Universal Transfection Behavior in Lamellar Cationic Liposome-DNA Complexes, *Biophysical Journal*, 84 (2003) 3307-3316.

- [35] S. Bhattacharya, A. Bajaj, Advances in gene delivery through molecular design of cationic lipids, *Chemical Communications*, (2009) 4632-4656.
- [36] S. Zhang, Y. Xu, B. Wang, W. Qiao, D. Liu, Z. Li, Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 100 (2004) 165-180.
- [37] J.H. Felgner, R. Kumar, C.N. Sridhar, C.J. Wheeler, Y.J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin, P.L. Felgner, Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations, *Journal of Biological Chemistry*, 269 (1994) 2550-2561.
- [38] D. Liu, W. Qiao, Z. Li, Y. Chen, X. Cui, K. Li, L. Yu, K. Yan, L. Zhu, Y. Guo, L. Cheng, Structure-Function Relationship Research of Glycerol Backbone-Based Cationic Lipids for Gene Delivery, *Chemical Biology & Drug Design*, 71 (2008) 336-344.
- [39] R. Koynova, B. Tenchov, Cationic Lipids: Molecular Structure/Transfection Activity Relationships and Interactions with Biomembranes, in: W. Bielke, C. Erbacher (Eds.) *Nucleic Acid Transfection*, Springer Berlin Heidelberg, (2010), 51-93.
- [40] F.M. Menger, M.G. Wood, Q.Z. Zhou, H.P. Hopkins, J. Fumero, Thermotropic properties of synthetic chain-substituted phosphatidylcholines: effect of substituent size, polarity, number, and location on molecular packing in bilayers, *Journal of the American Chemical Society*, 110 (1988) 6804-6810.
- [41] G. Cevc, How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model, *Biochemistry*, 30 (1991) 7186-7193.
- [42] J.N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, in, Elsevier, San Diego, (2011).
- [43] R.N. Winter, F.; , *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, in, Teubner Verlag, (1998), 11.
- [44] T. C., *The hydrophobic effect: formation of micelles an biological membranes*, in, John Wiley & Sons Inc, New York, (1980).
- [45] J .N. Israelachvili, D.J. Mitchell, B.W. Ninham, Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 72 (1976) 1525-1568.
- [46] W. Li, F. Szoka, Jr., Lipid-based Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery, *Pharm Res*, 24 (2007) 438-449.
- [47] M.B. de Jesus, I.S. Zuhorn, Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms, *Journal of Controlled Release*, 201 (2015) 1-13.
- [48] G. Navarro, J. Pan, V.P. Torchilin, Micelle-like Nanoparticles as Carriers for DNA and siRNA, *Molecular Pharmaceutics*, 12 (2015) 301-313.
- [49] P.T. Vladimirov, V. Weissig, *Liposomes*, in, Oxford University Press, 2003, pp. 4.
- [50] D.D. Lasic, Novel applications of liposomes, *Trends in Biotechnology*, 16 (1998) 307-321.
- [51] A. Zidovska, H.M. Evans, A. Ahmad, K.K. Ewert, C.R. Safinya, The Role of Cholesterol and Structurally Related Molecules in Enhancing Transfection of Cationic Liposome-DNA Complexes, *The Journal of Physical Chemistry B*, 113 (2009) 5208-5216.
- [52] D. Hirsch-Lerner, M. Zhang, H. Eliyahu, M.E. Ferrari, C.J. Wheeler, Y. Barenholz, Effect of "helper lipid" on lipoplex electrostatics, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1714 (2005) 71-84.
- [53] X. Zhou, L. Huang, DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1189 (1994) 195-203.
- [54] D. Simberg, D. Danino, Y. Talmon, A. Minsky, M.E. Ferrari, C.J. Wheeler, Y. Barenholz, Phase Behavior, DNA Ordering, and Size Instability of Cationic Lipoplexes: RELEVANCE TO OPTIMAL TRANSFECTION ACTIVITY, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 47453-47459.
- [55] V.A. Bloomfield, DNA condensation by multivalent cations, *Biopolymers*, 44 (1997) 269-282.

- [56] J.O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt, C.R. Safinya, Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes, *Science*, 275 (1997) 810-814.
- [57] E. Pozharski, R.C. MacDonald, Lipoplex Thermodynamics: Determination of DNA-Cationic Lipoid Interaction Energies, *Biophysical Journal*, 85 (2003) 3969-3978.
- [58] K. Ewert, A. Ahmad, H.M. Evans, C.R. Safinya, Cationic lipid-DNA complexes for non-viral gene therapy: relating supramolecular structures to cellular pathways, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5 (2005) 33-53.
- [59] D. Harries, S. May, W.M. Gelbart, A. Ben-Shaul, Structure, Stability, and Thermodynamics of Lamellar DNA-Lipid Complexes, *Biophysical Journal*, 75 (1998) 159-173.
- [60] B.A. Lobo, G.S. Koe, J.G. Koe, C.R. Middaugh, Thermodynamic analysis of binding and protonation in DOTAP/DOPE (1:1): DNA complexes using isothermal titration calorimetry, *Biophysical Chemistry*, 104 (2003) 67-78.
- [61] M.T. Kennedy, E.V. Pozharski, V.A. Rakhmanova, R.C. MacDonald, Factors Governing the Assembly of Cationic Phospholipid-DNA Complexes, *Biophysical Journal*, 78 (2000) 1620-1633.
- [62] K.K. Ewert, A. Zidovska, A. Ahmad, N.F. Boussein, H.M. Evans, C.S. McAllister, C.E. Samuel, C.R. Safinya, Cationic Lipid-Nucleic Acid Complexes for Gene Delivery and Silencing: Pathways and Mechanisms for Plasmid DNA and siRNA, *Topics in current chemistry*, 296 (2010) 191-226.
- [63] Q.-Q. Zhao, J.-L. Chen, T.-F. Lv, C.-X. He, G.-P. Tang, W.-Q. Liang, Y. Tabata, J.-Q. Gao, N/P Ratio Significantly Influences the Transfection Efficiency and Cytotoxicity of a Polyethylenimine/Chitosan/DNA Complex, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32 (2009) 706-710.
- [64] K. Ewert, A. Ahmad, H.M. Evans, H.-W. Schmidt, C.R. Safinya, Efficient Synthesis and Cell-Transfection Properties of a New Multivalent Cationic Lipid for Nonviral Gene Delivery, *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2002) 5023-5029.
- [65] I. Koltover, T. Salditt, J.O. Rädler, C.R. Safinya, An Inverted Hexagonal Phase of Cationic Liposome-DNA Complexes Related to DNA Release and Delivery, *Science*, 281 (1998) 78-81.
- [66] L. Wang, R. Koynova, H. Parikh, R.C. MacDonald, Transfection Activity of Binary Mixtures of Cationic O-Substituted Phosphatidylcholine Derivatives: The Hydrophobic Core Strongly Modulates Physical Properties and DNA Delivery Efficacy, *Biophysical Journal*, 91 (2006) 3692-3706.
- [67] A. Congiu, D. Pozzi, C. Esposito, C. Castellano, G. Mossa, Correlation between structure and transfection efficiency: a study of DC-Chol-DOPE/DNA complexes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 36 (2004) 43-48.
- [68] G. Caracciolo, H. Amenitsch, Cationic liposome/DNA complexes: from structure to interactions with cellular membranes, *European Biophysics Journal*, 41 (2012) 815-829.
- [69] D. Pozzi, G. Caracciolo, R. Caminiti, S.C. De Sanctis, H. Amenitsch, C. Marchini, M. Montani, A. Amici, Toward the Rational Design of Lipid Gene Vectors: Shape Coupling between Lipoplex and Anionic Cellular Lipids Controls the Phase Evolution of Lipoplexes and the Efficiency of DNA Release, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1 (2009) 2237-2249.
- [70] C. Scholz, E. Wagner, Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: Common and different tasks for synthetic carriers, *Journal of Controlled Release*, 161 (2012) 554-565.
- [71] D.W. Pack, A.S. Hoffman, S. Pun, P.S. Stayton, Design and development of polymers for gene delivery, *Nat Rev Drug Discov*, 4 (2005) 581-593.

- [72] S. Somani, D.R. Blatchford, O. Millington, M.L. Stevenson, C. Dufès, Transferrin-bearing polypropylenimine dendrimer for targeted gene delivery to the brain, *Journal of Controlled Release*, 188 (2014) 78-86.
- [73] Z.u. Rehman, I.S. Zuhorn, D. Hoekstra, How cationic lipids transfer nucleic acids into cells and across cellular membranes: Recent advances, *Journal of Controlled Release*, 166 (2013) 46-56.
- [74] M. Oba, S. Fukushima, N. Kanayama, K. Aoyagi, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Cyclic RGD Peptide-Conjugated Polyplex Micelles as a Targetable Gene Delivery System Directed to Cells Possessing $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ Integrins, *Bioconjugate Chemistry*, 18 (2007) 1415-1423.
- [75] G.M.K. Poon, J. Gariépy, Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells, *Biochemical Society Transactions*, 35 (2007) 788-793.
- [76] S. Paris, A. Burlacu, Y. Durocher, Opposing Roles of Syndecan-1 and Syndecan-2 in Polyethyleneimine-mediated Gene Delivery, *Journal of Biological Chemistry*, 283 (2008) 7697-7704.
- [77] Z.u. Rehman, K.A. Sjollem, J. Kuipers, D. Hoekstra, I.S. Zuhorn, Nonviral Gene Delivery Vectors Use Syndecan-Dependent Transport Mechanisms in Filopodia To Reach the Cell Surface, *ACS Nano*, 6 (2012) 7521-7532.
- [78] A.K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H.J. Haisma, Endosomal escape pathways for delivery of biologicals, *Journal of Controlled Release*, 151 (2011) 220-228.
- [79] G. Sahay, D.Y. Alakhova, A.V. Kabanov, Endocytosis of nanomedicines, *Journal of Controlled Release*, 145 (2010) 182-195.
- [80] Y. Xu, F.C. Szoka, Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection, *Biochemistry*, 35 (1996) 5616-5623.
- [81] Z.u. Rehman, D. Hoekstra, I.S. Zuhorn, Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis, *ACS Nano*, 7 (2013) 3767-3777.
- [82] R. Koynova, B. Tenchov, R.C. MacDonald, Nonlamellar Phases in Cationic Phospholipids, Relevance to Drug and Gene Delivery, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 1 (2015) 130-138.
- [83] J. Zhu, R.J. Munn, M.H. Nantz, Self-Cleaving Ortho Ester Lipids: A New Class of pH-Vulnerable Amphiphiles, *Journal of the American Chemical Society*, 122 (2000) 2645-2646.
- [84] D. Zhi, S. Zhang, B. Wang, Y. Zhao, B. Yang, S. Yu, Transfection Efficiency of Cationic Lipids with Different Hydrophobic Domains in Gene Delivery, *Bioconjugate Chemistry*, 21 (2010) 563-577.
- [85] C. Wölk, Kationische Lipide für den Gentransfer – Synthese und Charakterisierung neuer Lipide auf Malonamidbasis sowie Beiträge zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens im wässrigen Milieu, in: Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, (2014).
- [86] C. Janich, Synthese neuartiger, kationischer Transfektionslipide auf Grundlage basisch substituierter Malonsäurediamide, in: Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, (2013).
- [87] C. Wölk, S. Drescher, A. Meister, A. Blume, A. Langner, B. Dobner, General Synthesis and Physicochemical Characterisation of a Series of Peptide-Mimic Lysine-Based Amino-Functionalised Lipids, *Chemistry – A European Journal*, 19 (2013) 12824-12838.
- [88] L. Zabel, Untersuchung und Charakterisierung ausgewählter Lipide mit Malonsäurediamidstruktur zur Gentransfektion an der Zellkultur, in: Institut für Pharmazie, Martin - Luther - Universität Halle - Wittenberg, Halle, (2014).

- [89] S. Taßler, Physical-Chemical Investigation of newly synthesised Lysine-Based Amino-Functionalised Lipids for gene transfection in 2D and 3D model systems, in: *Physikalische Chemie*, Universität Potsdam, Potsdam, (2015).
- [90] J.D. Sander, J.K. Joung, CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes, *Nat Biotech*, 32 (2014) 347-355.
- [91] A.J. Mahiny, A. Dewerth, L.E. Mays, M. Alkhaled, B. Mothes, E. Malaeksefat, B. Loretz, J. Rottenberger, D.M. Brosch, P. Reautschnig, P. Surapolchai, F. Zeyer, A. Schams, M. Carevic, M. Bakele, M. Griese, M. Schwab, B. Nurnberg, S. Beer-Hammer, R. Handgretinger, D. Hartl, C.-M. Lehr, M.S.D. Kormann, In vivo genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency, *Nat Biotech*, 33 (2015) 584-586.
- [92] F. Kiessling, Pichler, Bernd J., *Small Animal Imaging*, in: *Basics and Practical Guide*, Springer, (2011) 144.

6 ANHANG

Liste der Veröffentlichungen

Publikationen:

1. C. Janich, S. Taßler, A. Meister, G. Hause, J. Schäfer, U. Bakowsky, G. Brezesinski, C. Wölk: *Structures of malonic acid diamide/phospholipid composites and their lipoplexes*.
Soft Matter eingereicht am 04.04.2016
2. C. Janich, C. Wölk, F. Erdmann, T. Groth, G. Brezesinski, B. Dobner, and A. Langner: *Composites of malonic acid diamides and phospholipids — Impact of lipoplex stability on transfection efficiency*.
Journal of Controlled Release 2015, 220, 295–307
3. C. Wölk, C. Janich, A. Meister, S. Drescher, A. Langner, G. Brezesinski, and U. Bakowsky: *Investigation of Binary Lipid Mixtures of a Three-Chain Cationic Lipid with Phospholipids Suitable for Gene Delivery*.
Bioconjugate Chem. 2015, 26 (12), 2461–2473.
4. N. Erdmann, C. Wölk, I. Schulze, C. Janich, M. Folz, S. Drescher, M. Dittrich, A. Meister, J. Vogel, T. Groth, B. Dobner, and A. Langner: *Tris(2-aminoethyl) amine-based alpha-branched fatty acid amides - Synthesis of lipids and comparative study of transfection efficiency of their lipid formulations*.
Eur. J. Pharm. Biopharm. 2015, 96, 349-362.
5. C. Wölk, C. Janich, D. Pawolwska, S. Drescher, A. Meister, G. Hause, B. Dobner, A. Langner, and G. Brezesinski: *Lamellar versus Micellar Structures - Aggregation Behaviour of a Three-Chain Cationic Lipid Designed for Nonviral Polynucleotide Transfer*.
ChemPhysChem 2015, 16 (10), 2115-2126.
ChemPhysChem 2015, 16 (10), 2029. (Cover Profile)
6. C. Janich, C. Wölk, S. Taßler, S. Drescher, A. Meister, G. Brezesinski, B. Dobner and A. Langner: *Composites of malonic acid diamides and phospholipids - structural parameters for optimal transfection efficiency in A549 cells*.
Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2014, 116, 1205-1216.

Posterbeiträge:

1. C. Janich, C. Wölk, André Hädicke, A. Langner
Monolayer studies of phospholipid-based gene delivery systems
Joint Meeting of the Membrane Sections of the French and German Biophysical Societies –BPMI – Bad Herrenalb 2016
2. C. Janich, C. Wölk, A. Langner
Phospholipid-Based Gene Delivery Systems – DNA complexation and DNA release behavior of lipoplexes
11th international Conference and Workshop on Biological Barriers–Saarbrücken 2016
3. C. Janich, A. Langner, U. Bakowsky, S. Taßler, G. Brezesinski, B. Dobner, C. Wölk
Structural Investigations of Cationic Lipid Compositions and their Complexes with DNA
21th Ostwald-Colloquium- MPI-KG Potsdam 2015
4. C. Janich, C. Wölk, F. Erdmann, T. Groth, G. Brezesinski, B. Dobner, A. Langner
Phospholipid-Based Gene Delivery Systems – Impact of Lipoplex Stability on Transfection Efficiency
4. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg 2015
5. C. Wölk, C. Janich, S. Taßler, A. Meister, G. Hause, U. Bakowsky, A. Langner, G. Brezesinski, B. Dobner
Phospholipid-Based Gene Delivery Systems – Aggregate Structures
4. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg 2015
6. S. Taßler, C. Janich, C. Wölk, B. Dobner, G. Brezesinski
Physical-chemical investigation of a new cationic lipid for Gene Transfection.
International Workshop "Molecular Membrane Biophysics" - Hünfeld 2014
7. C. Janich, C. Wölk, S. Taßler, S. Drescher, A. Meister, G. Brezesinski, B. Dobner, A. Langner
Investigation of Phospholipids in Mixture with Cationic Lipids - Biological and Physicochemical Characterization.
International Workshop "Molecular Membrane Biophysics" - Hünfeld 2014
8. C. Janich, C. Wölk, B. Dobner, A. Langner
Evaluation of Transfection Efficiency of Cationic Lipids/Co-lipid-Complexes using an EGFP-Assay
3. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg 2013

Betreute Diplomarbeiten:

1. Thema Untersuchung und Charakterisierung ausgewählter Lipide mit Malonsäurediamidstruktur zur Gentransfektion an der Zellkultur
L. Zabel (11/2013-05/2014)
Die Ergebnisse dieser Arbeit fanden keine Anwendung in der vorliegenden Dissertation.

Danksagung

Ich möchte mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben.

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Andreas Langner, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, der Überlassung des interessanten Themas und für die Anfertigung des ersten Gutachtens. Insbesondere danke ich ihm für den wissenschaftlichen Freiraum, den er mir im Rahmen der finanziellen Mittel immer gegeben hat – das habe ich sehr zu schätzen gelernt.

Zu besonderem Dank bin ich meinem Arbeitskollegen Herrn Dr. Christian Wölk verpflichtet. Es war eine sehr angenehme und konstruktive Zusammenarbeit. An dieser Stelle möchte ich besonders seine wissenschaftliche Tatkraft und fortwährende motivierende Unterstützung hervorheben, welche sehr wertvoll für die Anfertigung dieser Arbeit war. Es war mir immer eine Freude mit dir zusammenzuarbeiten.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Bodo Dobner für die vielen fachlichen und privaten Gespräche, sowie für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik während meiner Promotion bedanken.

Außerdem gilt mein Dank unserem Kooperationspartner Herrn Prof. Gerald Brezesinski. Durch ihn hatten wir nicht nur freien Zugang zu diversen Messgeräten, sondern konnten auch beeindruckende Erfahrungen am Desy (Hamburg) oder Bessy (Berlin) sammeln. Insbesondere bedanke ich mich für die vielen Ratschläge, die ausführlichen Gespräche während der Arbeitsgruppentreffen und für das Korrekturlesen der englischen Manuskripte. In diesem Zusammenhang möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Stephanie Taßler, Frau Dr. Dorothea Pawlowska und Frau M. Sc. Joana Oliveira für die netten Gespräche bedanken.

Ein weiterer Dank gilt unseren Kooperationspartnern Herrn Dr. Simon Drescher, Frau PD Dr. Annette Meister und Herrn Dr. Gerd Hause für die Anfertigung der zahlreichen TEM Aufnahmen. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Simon Drescher für die kontinuierliche Hilfsbereitschaft bei offenen Fragen und wissenschaftlichen Problemdiskussionen.

Ebenfalls möchte ich mich bei unserem Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky für die gute Zusammenarbeit, Anregungen sowie für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Bei Herrn Dr. Frank Erdmann möchte ich mich ebenfalls für die gute Kooperation sowie für die interessanten fachlichen Gespräche bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Groth für die Möglichkeit am CLSM arbeiten zu dürfen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Angela Munk für die Hilfe bei den Zellkulturuntersuchungen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Biochemische Pharmazie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die schöne Zeit.

Bei meinem guten Freund Victor bedanke ich mich herzlich für die Zeit, die er in das Korrekturlesen investiert hat.

Meiner Freundin Elena danke ich besonders für den starken Rückhalt über die Dauer meines gesamten Promotionsstudiums.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Janich, Christopher
Anschrift	Körnerstraße 30, 06114 Halle
Geburtsdatum	25. März 1988
Geburtsort	Magdeburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1994 - 1998	Grundschule Am Kannenstieg (Magdeburg)
1998 - 2007	Norbertusgymnasium (Magdeburg)
	<u>Abschluss:</u> Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung und Studium

11/2007 – 11/2011	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
08/2009	1. Staatsexamen
11/2011	2. Staatsexamen
11/2011 – 05/2011	Praktisches Jahr Teil 1: Diplom „Synthese von neuartigen kationischen Malonsäurediamiden zur Gentransfektion“ an der MLU
05/2012 – 11/2012	Praktisches Jahr Teil 2: Heilig Geist Apotheke Rosenheim
11/2012	3. Staatsexamen
12/2012	Approbation um Apotheker
03/2013	Prüfung zum Diplom Pharmazeuten

Berufserfahrung

seit 12/2012	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Abteilung Biochemische Pharmazie
seit 02/2016	studentische Hilfskraft an der Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Technologie & Biopharmazie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die daraus wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung weder im In- noch im Ausland zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Halle (Saale), 17. Mai 2016

Christopher Janich