

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Interaktion kationischer Liposomen mit mikrovaskulären
Endothelzellen in vitro unter besonderer Berücksichtigung der endothelialen
Glykokalix und der liposomalen Zytotoxizität**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sophie Hansen
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3347

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

liposomes; uptake mechanisms; endothelial cells; apoptosis; cytotoxicity;
glycocalix; electron microscopy; cell culture; fluorescence microscopy

Tag der Promotion: 10.12.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-847-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010 C

Horiner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Tochter Lea

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Endothelzellen	2
2.1.1. Molekulare Struktur und Funktion der Zellmembran	2
2.1.2. Molekulare Struktur und Funktion der Glykokalix	2
2.1.3. Endotheliale Heterogenität	3
2.1.4. Apoptose	4
2.1.5. In vitro Kultivierung von Endothelzellen	5
2.2. Blutgefäße	6
2.2.1. Entwicklung des vaskulären Systems	6
2.2.1.1. Vaskulogenese	6
2.2.1.2. Angiogenese	6
2.2.1.2.1. Angiogene Kaskade	6
2.2.1.2.2. Regulation der Angiogenese	7
2.2.1.3. Intussuszeption	7
2.2.2. Vaskularisation von Neoplasien	8
2.2.3. Angiotherapie	9
2.2.3.1. Pro-angiogene Therapie	9
2.2.3.2. Anti-angiogene Therapie zur Behandlung von Tumoren	9
2.3. Liposomen	10
2.3.1. Morphologie der Liposomen	10
2.3.2. Reaktivität der Liposomen	10
2.3.3. Interaktionen der Liposomen mit der Zelle	11
2.3.3.1. Fusion	12
2.3.3.2. Endozytose	14
2.3.3.2.1. Phagozytose	14
2.3.3.2.2. Clathrin-vermittelte Endozytose	15
2.3.3.2.3. Caveolae-vermittelte Endozytose	15

2.3.4. Therapeutisches Potential der Liposomen	16
2.3.4.1. Gentransfer	16
2.3.4.2. Drug Targeting	17
2.3.4.3. Diagnostik mittels Liposomen	18
2.3.5. Zytotoxizität von Liposomen	19
3. Materialien	20
3.1. Zellen	20
3.2. Zellkulturmedien	20
3.2.1. Medien und Supplemente	20
3.2.2. Zusammensetzung des Erhaltungsmediums DMEM+ zur Kultivierung muriner Endothel- und Fibrosarkomzellen	20
3.2.3. Zusammensetzung des Selektivmediums P0 zur Kultivierung boviner Endothelzellen	20
3.2.4. Zusammensetzung des Selektivmediums MECGM zur Kultivierung humaner Endothelzellen	21
3.2.5. Zusammensetzung des Einfriermediums	21
3.3. Liposomen	21
3.4. Chemikalien	21
3.5. Lösungen für die Elektronenmikroskopie	22
3.5.1. Standard-Lösungen	22
3.5.1.1. Cacodylatpuffer 0,1M	22
3.5.1.2. Karnovsky-Lösungen	22
3.5.1.3. Epon	22
3.5.1.4. Richardson-Lösungen	22
3.5.1.5. Kontrastierungslösungen	22
3.5.2. Spezielle Lösungen für die Glykokalix-Färbung	22
3.5.2.1. Ruthenium-Rot	22
3.5.3. Spezielle Lösungen für das Silver-Enhancement	23
3.5.3.1. 0,05 M HEPES-Puffer mit 0,2 M Saccharose	23
3.5.3.2. Silver Enhancement	23
3.5.3.3. Fixierlösungen mit Natriumthiosulfat	23
3.6. Apoptose-Kit: Apo-Annexin V-FITC	23
3.7. Verbrauchsmaterialien	23
3.8. Geräte	24
3.9. Software	24

4. Methoden	25
4.1. Zellkultur	25
4.1.1. Kultivierung der Endothelzellen	25
4.1.1.1. Gelatinieren der Zellkulturschalen	25
4.1.1.2. Kultivierung der murinen Sarkomzellen S180 und Gewinnung des S180-konditionierten Mediums	25
4.1.1.3. Kultivierung der humanen Endothelzellen	25
4.1.1.4. Kultivierung der murinen Endothelzellen	25
4.1.1.5. Kultivierung der bovinen Endothelzellen	26
4.1.2. Subkultivierung der Endothelzellen	26
4.1.3. Kryokonservierung der Endothelzellen	26
4.1.4. Auftauen von Zellen	26
4.1.5. Bestimmung der Zellzahl	27
4.2. Herstellung der Liposomen	27
4.2.1. Filmmethode zur Herstellung der Liposomen (SN 230)	27
4.2.2. Ethanol Injektion zur Herstellung der Liposomen (SN 307, SN 334, SI 295, TM 235)	27
4.3. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	27
4.3.1. Transmissionselektronische Untersuchungen der Glykokalix mikrovaskulärer Endothelzellen	28
4.3.2. Transmissionsmikroskopische Untersuchung der Liposomen	28
4.3.3. Transmissionsmikroskopische Untersuchung der Aufnahme und intrazellulären Verteilung gold-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen	29
4.4. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	30
4.4.1. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme Rhodamin-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen	30
4.4.1.1. Quantitative Untersuchung der Aufnahme Rhodamin-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen	30
4.4.1.2. Qualitative Untersuchung der Aufnahme Rhodamin-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen	30
4.5. Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch Inkubation mikrovaskulärer Endothelzellen mit unmarkierten Liposomen	31
4.6. Statistische Verfahren	31

5. Ergebnisse	33
5.1. Untersuchungen zur Glykokalix der Endothelzellen	33
5.1.1. Glykokalix boviner Endothelzellen	33
5.1.1.1. Qualitative Beschreibung der Glykokalix boviner Endothelzellen	33
5.1.1.2. Vermessung der Glykokalix boviner Endothelzellen	36
5.1.2. Glykokalix muriner Endothelzellen	37
5.1.2.1. Qualitative Beschreibung der Glykokalix muriner Endothelzellen	37
5.1.2.2. Vermessung der Glykokalix muriner Endothelzellen	39
5.1.3. Glykokalix humaner Endothelzellen	40
5.1.3.1. Qualitative Beschreibung der Glykokalix humaner Endothelzellen	40
5.1.3.2. Vermessung der Glykokalix humaner Endothelzellen	42
5.1.4. Vergleichende Darstellung der Vermessung der Glykokalix unterschiedlicher Endothelzellen	43
5.2. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der kationischen Liposomen	45
5.3. Quantitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen	47
5.3.1. Bovine Endothelzellen	47
5.3.1.1. Bindung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen	47
5.3.1.2. Internalisierung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen	49
5.3.2. Murine Endothelzellen	50
5.3.2.1. Bindung kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen	50
5.3.2.2. Internalisierung kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen	51
5.3.3. Humane Endothelzellen	53
5.3.3.1. Bindung kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen	53
5.3.3.2. Internalisierung kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen	54

5.4. Qualitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen	56
5.4.1. Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen	57
5.4.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	59
5.4.2.1. Aufnahme und Verteilung Rhodamin-markierter Liposomen durch bovine Endothelzellen	59
5.4.2.2. Aufnahme und Verteilung Rhodamin-markierter Liposomen durch murine Endothelzellen	59
5.4.2.3. Aufnahme und Verteilung Rhodamin-markierter Liposomen durch humane Endothelzellen	60
5.5. Transmissionsmikroskopische Untersuchungen	67
5.5.1. Aufnahme und Verteilung Gold-markierter Liposomen durch bovine Endothelzellen	67
5.5.2. Aufnahme und Verteilung Gold-markierter Liposomen durch murine Endothelzellen	70
5.5.3. Humane Endothelzellen	74
5.6. Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch kationische Liposomen	74
5.6.1. Bovine Endothelzellen	74
5.6.2. Murine Endothelzellen	76
5.6.3. Humane Endothelzellen	78
6. Diskussion	81
6.1. Untersuchungen zur Glykokalix der Endothelzellen	82
6.1.1. Besonderheiten der Glykokalix boviner Endothelzellen	83
6.1.2. Besonderheiten der Glykokalix muriner Endothelzellen	84
6.1.3. Besonderheiten der Glykokalix humaner Endothelzellen	85
6.2. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der kationischen Liposomen	85
6.3. Quantitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen	86
6.3.1. Schwankungen der Ergebnisse der Versuche mit bovinen Endothelzellen	89
6.4. Qualitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen	89
6.4.1. Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen während der Inkubation	90
6.4.2. Bindung und Fusion der Liposomen mit den Endothelzellen	90

6.4.3.	Phagozytose der Liposomen durch die Endothelzellen	91
6.4.4.	Besonderheiten der bovinen Endothelzellen	93
6.4.5.	Besonderheiten der murinen Endothelzellen	93
6.5.	Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch kationische Liposomen	94
7.	Zusammenfassung	97
8.	Summary	99
9.	Literaturverzeichnis	101

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE- α	Angotensin converting enzyme alpha
acLDL	acetyliertes Low Density Lipoprotein
al.	alii
ATP	Adenosintriphosphat
Au	Gold
Bax	BCL2-associated X Protein
BCI2	B-cell lymphoma 2
BCIR	Bovines Corpus Luteum in Regression
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BID	BH3 interacting domain death agonist
BME-Vitamine	Basal Medium Eagle Vitamine Solution
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DDSA	Dodeceny Succinic Anhydride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMP-30	Dimethylaminomethylphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholine
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOTAP	Dioleoyltrimethylammoniumpropan
DPPE	1,2-Bis(diphenylphosphino)ethan
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Endothelial Growth Factor
FBS	Fetales bovines Serum
Fc	Fragment, crystallizable
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
Gc	Glykokalix
GM ₁	Monosialotetrahexosylgangliosid
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IF	Interferon
IL-12	Interleukin 12
IQR	Interquartilsabstand
h	Stunde
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HL	Hodgkin Lymphom
HMVEC	Human Microvascular Endothelial Cells
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
Konz.	Konzentration
KWT	Kruskall-Wallace-Test
LDL	Low Density Lipoprotein
LUV	large unilamellar vesicle
M	molar
MECGM	Microvascular Endothelial Cell Growth Medium
MHEC5	Mouse Heart Endothelial Cell Clone 5

ml	Milliliter
MLV	multilamellar vesicle
min	Minuten
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MNA	Methyl Nadic Anhydride
MPS	mononukleären Phagozytosesystems
MWT	Mann-Whitney-U-Test
nm	Nanometer
PA	Plasminogen-Aktivator
PAO	Phenylarsenoxid
PC	Personal Computer
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PEG	Polyethylenglykol
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
Rh	Rhodamin
RHAMM	Receptor for Hyaluronan-mediated Motility
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
s.	siehe
s. o.	siehe oben
sec	Sekunde
SUV	small unilamellar vesicle
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
UpM	Umdrehungen pro Minute
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VVO	vesiculo-vacuoläre Organellen
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Tabellenverzeichnis

1	Statistische Werte zur Vermessung der Glykokalix boviner Endothelzellen	36
2	Statistische Werte zur Vermessung der Glykokalix muriner Endothelzellen	40
3	Statistische Werte zur Vermessung der Glykokalix humaner Endothelzellen	42
4	Vergleichende Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Messwerte zur Höhe der Glykokalix unterschiedlicher Zellarten innerhalb festgesetzter Intervalle	44
5	Apoptose und Nekrose bei bovinen Endothelzellen	75
6	Apoptose und Nekrose bei murinen Endothelzellen	76
7	Apoptose und Nekrose bei humanen Endothelzellen	79

Abbildungsverzeichnis

1	Ultrastrukturelle Darstellung einer bovinen Endothelzelle nach Ruthenium Rot-Färbung	34
2	Ultrastrukturelle Darstellung eines Abschnittes mit diskontinuierlicher Glykokalix einer bovinen Endothelzelle	34
3	Ultrastrukturelle Darstellung einer bovinen Endothelzelle mit dünner Glykokalix	35
4	Ultrastrukturelle Darstellung der Glykokalix einer bovinen Endothelzelle im Bereich eines Zellausläufers	35
5	Ultrastrukturelle Darstellung eines Vesikels mit und ohne Auskleidung durch eine Glykokalix in einer bovinen Endothelzelle	35
6	Ultrastrukturelle Darstellung von Vesikeln mit Auskleidung durch eine Glykokalix in einer bovinen Endothelzelle	36
7	Höhe der Glykokalix proliferierender boviner Endothelzellen	36
8	Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle nach Ruthenium Rot-Färbung	37
9	Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle mit dünner Glykokalix nach Ruthenium Rot-Färbung	38
10	Ultrastrukturelle Darstellung der rauen Glykokalix an den Zellfortsätzen einer murinen Endothelzelle	39
11	Ultrastrukturelle Darstellung eines intrazellulären Vesikels ohne Auskleidung durch eine Glykokalix, murine Endothelzelle	39
12	Ultrastrukturelle Darstellung eines Vesikels mit Auskleidung durch eine Glykokalix, murine Endothelzelle	39
13	Höhe der Glykokalix proliferierender muriner Endothelzellen	39
14	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle nach Ruthenium Rot-Färbung	40
15	Ultrastrukturelle Darstellung der Glykokalix einer humanen Endothelzelle nach Ruthenium Rot-Färbung	41
16	Ultrastrukturelle Darstellung intrazellulärer Vesikel ohne Glykokalix, humane Endothelzelle	41
17	Höhe der Glykokalix proliferierender humaner Endothelzellen	42
18	Vergleichende Darstellung der Vermessung der endothelialen Glykokalix unterschiedlicher Zellarten.	42
19	Ultrastrukturelle Darstellung solitärer Liposomen	43
20	Ultrastrukturelle Darstellung eines Liposomenclusters	45
21	Ultrastrukturelle Darstellung Gold-markierter Liposomen ohne Silberverstärkung	45
22	Ultrastrukturelle Darstellung Gold-markierter Liposomen nach kurzer Einwirkzeit des Silberverstärkers	46
23	Ultrastrukturelle Darstellung Gold-markierter Liposomen nach intensiver Einwirkzeit des Silberverstärkers	46
24	Ultrastrukturelle Darstellung Gold-markierter Liposomen nach mittlerer Einwirkzeit des Silberverstärkers	46
25	Bindung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen	46
26	Anteil der durch bovine Endothelzellen gebundenen von den insgesamt zugesetzten Liposomen	48
27	Internalisierung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen	48
28	Anteil der durch bovine Endothelzellen internalisierten Liposomen im Verhältnis zu den gebundenen Liposomen	49
29	Bindung kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen	50
30	Anteil der durch murine Endothelzellen gebundenen von den insgesamt zugesetzten Liposomen	51
31	Internalisierung kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen	51
32	Anteil der durch murine Endothelzellen internalisierten Liposomen im Verhältnis zu den gebundenen Liposomen	52

33	Bindung kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen	54
34	Anteil der durch humane Endothelzellen gebundenen von den insgesamt zugesetzten Liposomen	54
35	Internalisierung kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen	55
36	Anteil der durch humane Endothelzellen internalisierten Liposomen im Verhältnis zu den gebundenen Liposomen	56
37	Bovine (A), humane (B) und murine (C,D) Endothelzellen am Ende der Inkubation mit dem liposomenhaltigen Inkubationsmedium	57
38	Bovine (A), humane (B) und murine (C) Endothelzellen während der Inkubation im Kontrollmedium	58
39	Bindung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen	61
40	Internalisierung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen	62
41	Bindung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen	63
42	Internalisierung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen	64
43	Bindung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen	65
44	Internalisierung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen	66
45	Ultrastrukturelle Darstellung von Liposomen und Goldpartikeln an der Zellmembran einer bovinen Endothelzelle	67
46	Ultrastrukturelle Darstellung eines Liposoms an der äußeren Zellmembran einer bovinen Endothelzelle	68
47	Ultrastrukturelle Darstellung der äußeren Zellmembran einer bovinen Endothelzelle mit mehreren Caveolae	68
48	Ultrastrukturelle Darstellung endozytierter Gold-markierter Liposomen in einer bovinen Endothelzelle	69
49	Ultrastrukturelle Darstellung einer bovinen Endothelzelle nach Inkubation mit Gold-markierten Liposomen	69
50	Vorkommen der Goldpartikel an und in den bovinen Endothelzellen	70
51	Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle nach Inkubation mit Gold-markierten Liposomen	71
52	Ultrastrukturelle Darstellung eines Gold-markierten Liposoms in der Nähe von Zellausläufern einer murinen Endothelzelle	71
53	Ultrastrukturelle Darstellung Gold-markierter Liposomen im Prozess der Invagination durch eine murine Endothelzelle	72
54	Ultrastrukturelle Darstellung eines Liposoms im Bereich der äußeren Zellmembran im Prozess der Fusion mit der Zellmembran	72
55	Ultrastrukturelle Darstellung endozytierter Liposomen in einem intrazellulären Vesikel einer murinen Endothelzelle	73
56	Vorkommen der Goldpartikel an und in den bovinen Endothelzellen	73
57	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung apoptotischer boviner Endothelzellen	75
58	Apoptoserate proliferierender boviner Endothelzellen mit und ohne Inkubation mit kationischen Liposomen	76
59	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung muriner apoptotischer und nekrotischer Endothelzellen	77
60	Apoptose- und Nekroserate proliferierender muriner Endothelzellen mit und ohne Inkubation mit kationischen Liposomen	78
61	Apoptose humaner Endothelzellen nach Inkubation mit kationischen Liposomen	79
62	Apoptose- und Nekroserate proliferierender humaner Endothelzellen mit und ohne Inkubation mit kationischen Liposomen	80

1. Einleitung

Der Prozess der Angiogenese, bei dem sich durch Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen aus bestehenden Blutgefäßen neue Kapillaren bilden, tritt physiologischerweise im adulten Organismus nur begrenzt auf (Anbildung der Milchdrüse zur Laktation, Zyklus in Ovar und Plazenta). Angiogenese spielt jedoch im Rahmen vieler pathophysiologischer (Wundheilung) und pathologischer Prozesse (Tumorstadium, Entzündung) eine entscheidende Rolle. So kann ein Tumor erst durch Rekrutierung eines eigenen Gefäßsystems über eine bestimmte Größe hinaus wachsen und metastasieren (Folkman, 1995). Eine erfolgsversprechende Möglichkeit zur Inhibition des Tumorstadiums stellt die Unterdrückung des Gefäßwachstums dar, die Anti-Angiogenese. Proliferierende mikrovaskuläre Endothelzellen stellen das Ziel einer anti-angiogenen Therapie dar. Sie sind durch ihre exponierte Lage zum Blut besonders einfach erreichbar.

Um Wirkstoffe zu den Zielzellen zu transportieren, ohne dabei Zellen anderer Gewebe zu erreichen, werden im Rahmen des Drug Targeting verschiedenste Carrier eingesetzt. Diese sollen eine möglichst spezifische Anreicherung an oder in den Zielzellen ermöglichen. Großen Einsatz finden hierbei Liposomen, sie werden sowohl im Drug Targeting als Carrier für Arzneistoffe als auch im Gentransfer als Vektoren für die Einschleusung von Nukleinsäuren in die Zelle erforscht.

Liposomen sind kleine sphäroide Partikel, bestehend aus einem inneren, flüssigkeitsgefüllten Hohlraum und einer äußeren Lipiddoppelmembran. Durch ihre Ähnlichkeit mit der Zellmembran in Aufbau und Zusammensetzung wird den Liposomen als Carriersystemen eine gute Biokompatibilität zugeschrieben. Die zu transportierenden Wirkstoffe können entweder eingeschlossen in den hydrophoben Innenraum oder integriert in die lipophile Hülle transportiert werden. Durch Beeinflussung der Lipidzusammensetzung oder durch Koppelung von Proteinen und Kohlenhydraten an Lipide der Hülle kann die Affinität zu spezifischen Zellen gesteigert werden. Kationische Liposomen, die eine positive Gesamtladung an ihrer Oberfläche besitzen, weisen eine erhöhte Affinität zu Endothelzellen in Tumoren auf (Thurston et al., 1998).

Zur Evaluierung der Wirksamkeit des mittels Liposomen transportierten Wirkstoffes sind präzise Kenntnisse über die Mechanismen der Bindung und Aufnahme von Liposomen sowie des Zeitpunktes der Freisetzung der Wirkstoffe nötig. Durch Vertiefung der Kenntnisse dieser Mechanismen, insbesondere der Gemeinsamkeiten und der Unterschiede der Prozessierung von Liposomen durch Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs, können unerwünschte Nebenwirkungen gemindert und die Wirksamkeit der eingesetzten Stoffe optimiert werden.

Die Glykokalix, eine Schicht von meist negativ geladenen Makromolekülen (überwiegend Glykoproteine) an der Oberfläche der Zelle, spielt bei der Regulation vieler zellulärer Mechanismen eine Rolle. Sie beeinflusst vielfach die Bindung und Aufnahme von Stoffen durch die Zelle. Ihr Einfluß auf die Bindung von Liposomen wurde bisher noch nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, die Aufnahme von kationischen Liposomen in Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft zu untersuchen. Hierbei sollten die Mechanismen der Bindung an und der Aufnahme durch die Zelle analysiert werden. Besonderes Augenmerk wurde auf die Charakterisierung der zellulären Glykokalix und ihre potentielle Rolle bei den Mechanismen der Bindung und Aufnahme der Liposomen gerichtet. Es wurden mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs eingesetzt, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Liposomenprozessierung durch Endothelzellen aufzudecken.

Des Weiteren sollte die Biokompatibilität der Liposomen überprüft werden. Hierbei galt es festzustellen, ob die Aufnahme von Liposomen zu zellulären Schäden, insbesondere zur Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose), führt.

2. Literaturübersicht

2.1. Endothelzellen

Endothelzellen bilden die Auskleidung des gesamten Blut- und Lymphgefäßsystems sowie der Herzinnenräume. Das vaskuläre Endothel reguliert den Stoffaustausch zwischen dem Blut und den umliegenden Geweben und stellt somit die erste Barriere dar, die intravenös verabreichte Arzneimittel zu überwinden haben, um ihre Wirksamkeit am Zielort zu entfalten (Junquiera et al., 2002; Baldwin und Thurston, 2001; Zipper et al., 1988).

Ursprünglich wurde das Endothel als rein passive Diffusionsbarriere angesehen (Fishman, 1982). Heute ist bekannt, dass Endothelzellen durch eine Vielzahl aktiver Prozesse an der Regulation der Homöostase des Körpers beteiligt sind. So stellt der Transport von Zellen und löslichen Bestandteilen aus dem Blut in die benachbarten Kompartimente via Endothel einen aktiven Vorgang dar (Griendling und Alexander, 1996). Endothelzellen exprimieren Selektine, welche der Bindung und Migration von Leukozyten dienen, und Integrine, die die Interaktionen mit der Basalmembran vermitteln. Zudem synthetisieren sie zahlreiche biologisch aktive Substanzen, die an wichtigen Funktionen wie der Blutgerinnung und Regulation des vaskulären Tonus beteiligt sind (Junquiera et al., 2002; Cines et al., 1998; Griendling und Alexander, 1996; Wagner, 1993).

Die Endothelzellen vieler Spezies besitzen typische Zellorganellen, die Weibel-Palade-Bodies, die spezifische Faktoren, wie beispielsweise den von-Willebrand-Faktor, enthalten, der die Adhäsion von Thrombozyten an geschädigtes Endothel vermittelt (Wagner, 1993).

2.1.1. Molekulare Struktur und Funktion der Zellmembran

Die Zellmembran, die äußere Begrenzung der Zellen, stellt eine selektiv permeable Barriere gegenüber dem äußeren Milieu dar. Sie erfüllt eine Vielzahl von Funktionen und ist unter anderem am Stoffaustausch mit der Umgebung, an der Zellbewegung und an den Reaktionen der Zelle auf Reize beteiligt.

Die Zellmembran setzt sich zusammen aus einer Doppellipidschicht, welche hauptsächlich aus Phospholipiden und Cholesterol besteht (Spector und Yorek, 1985). In diese Lipidmembran sind eine Vielzahl unterschiedlichster Proteine und Kohlenhydrate ein- und angelagert (Hadorn und Wehner, 1974). Die Lipide in der doppellagigen Lipidmembranschicht bestimmen die Stabilität der Zellmembran. Durch Modifikation der Fettsäuren in der Membran kann die Fluidität verändert werden, ein hoher Anteil ungesättigter Fettsäuren erhöht die Fluidität, ein hoher Gehalt an Cholesterol vermindert die Mobilität der Moleküle in der hydrophoben Schicht der Lipiddoppelmembran (Spector und Yorek, 1985). Die Proteine erfüllen eine Vielzahl von Funktionen. So gibt es unter ihnen Rezeptoren, die die Bindung von Makromolekülen vermitteln. Ebenso gehören zu ihnen die Antigene, welche die art- und zellspezifischen Oberflächeneigenschaften der Zelle bestimmen (Hadorn und Wehner, 1974). Eine weitere Gruppe sind Tunnelproteine, welche den Austausch von Ionen und Molekülen für den Zellstoffwechsel ermöglichen. Eine Beeinflussung der Lipide der Zellmembran führt auch zu Veränderungen in der Aktivität der Proteine in der Membran (Spector und Yorek, 1985).

2.1.2. Molekulare Struktur und Funktion der Glykokalix

Die Glykokalix ist ein Saum aus Glykolipiden, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen an der Außenfläche der Zellmembran. In ihr befinden sich spezifische Rezeptoren für Antikörper und Hormone, zudem ist sie verantwortlich für den Zusammenhalt der Zellen im Zellverband. Auch an der Oberfläche der Endothelzellen findet sich diese Schicht membrangebundener Makromoleküle mit überwiegend negativer Ladung (Reitsma et al., 2007; Pries und Kuebler, 2006; Fu et al., 2003; Stace und Damiano, 2001; Luft, 1966). Luft (1966) wies erstmals deren Existenz bei Endothelzellen mittels Färbung durch Rutheniumrot elektronenmikroskopisch nach. Er fand an der luminalen Oberfläche der kapillären

Endothelzellen von Ratten unregelmäßig strukturierte, etwa 20 nm dicke elektronendichte Schichten.

Anhaftend an die endotheliale Glykokalix finden sich weiterhin Plasmaproteine, welche nicht kovalent gebunden sind (Reitsma et al., 2007). Somit stellt die Glykokalix nur einen Teil einer Schicht an der Oberfläche der Endothelzellen dar, die als „endothelial surface layer“ bezeichnet wird (Pries et al., 2000).

Die Darstellung der Dimension der Glykokalix variiert stark in Abhängigkeit von den eingesetzten Färbemethoden (Fassel und Edminston, 1999; Fassel et al., 1998) und den untersuchten Gefäßen. In elektronenmikroskopischen Studien stellt sie sich durchschnittlich als 50-100 nm dicke Schicht dar (Stace und Damiano, 2001; Pries et al., 2000). In den Kapillaren der Skelettmuskulatur von Ratten ist die Glykokalix etwa 100 nm dick (Brown et al., 1996). Haldenby et al. (1994) machten die Glykokalix mittels Färbung durch Alcian Blau elektronenmikroskopisch sichtbar. Sie untersuchten Arterien bei Kaninchen und fanden hier eine Schichtdicke von 45 bis 80 nm. Van den Berg et al. (2003) gaben für Kapillaren im Herzen der Ratte bei Alcian Blau-Färbung Werte zwischen 180 bis 510 nm an, während Untersuchungen an Froschkapillaren Werte zwischen 50-100 nm ergaben (Squire et al., 2002).

In vivo Experimente zeigten jedoch, dass die Glykokalix deutlich dicker ist. Hier wurden Werte zwischen 400-500 nm gemessen (Henry und Duling 1999; Vink und Duling, 1996). Diese Diskrepanz beruht auf der Dehydratation durch die angewendeten Fixierungsmethoden (Stace und Damiano, 2001).

Die luminale endotheliale Glykokalix beeinflusst nachhaltig die Wechselwirkungen zwischen Blutbestandteilen und Endothelzellen (Reitsma et al., 2007; Stace und Damiano, 2001; Damiano, 1998; Secomb et al., 1998). Sie bildet eine selektive Barriere für die Diffusion von Molekülen in die Zellen und die umliegenden Gewebe (Reitsma et al., 2007; Fu et al., 2003; Baldwin und Thurston, 2001; Pries et al., 2000; Vink und Duling, 2000), vermittelt über spezielle Glykoproteine beispielsweise die Aufnahme Peptid-markierter Liposomen (Fretz et al., 2004) oder behindert durch sterische Abstoßung die Bindung inerter Mikrosphären an der Zelloberfläche (Mulivor und Lipowsky, 2002).

Bei der Regulation des Blutkreislaufes wirken spezifische Heparansulfatreste in der Glykokalix als Vermittler für shear stress (Pahakis et al., 2007; Florian et al., 2003). Der Blutfluss wird stark durch die Glykokalix beeinflusst, da sie den Widerstand in den Kapillaren erhöht (Tarbell und Ebong, 2008; Florian et al., 2003; Pries et al., 1997). Durch Entzündungen oder nach Reperfusion der Gefäße in ischämischen Gebieten wird die Schichtdicke der Glykokalix verringert und ihre Kontinuität zerstört (Mulivor und Lipowsky, 2004; Beresewicz et al., 1998). Wird die Integrität der Glykokalix zerstört, so können sich Gewebsödeme bilden (van den Berg et al., 2003).

2.1.3. Endotheliale Heterogenität

Das vaskuläre Endothel stellt eine sehr heterogene Zellpopulation dar, die organ-, spezies- und entwicklungsphasenspezifische Unterschiede aufweist (Langenkamp und Molema, 2009; Conway und Carmeliet, 2004; Plendl et al., 2002b; Plendl et al., 1992). Dies belegen sowohl in vitro als auch in vivo Studien.

In einer umfassenden Studie wiesen Chi et al. (2003) deutliche Unterschiede im Genexpressionsprofil von Endothelzellen verschiedener Gefäß- und Organursprünge nach, z.B. zwischen mikrovaskulären Endothelzellen und solchen, die aus großen Gefäßen isoliert wurden. Ebenso identifizierten sie spezielle Gene, die spezifisch in arteriellen bzw. venösen Gefäßen exprimiert werden. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen wurden Unterschiede in der Lokalisation von verschiedenen Oberflächenantigenen und Proteinen nachgewiesen (Plendl et al., 2000; Plendl et al. 1996a).

Die Heterogenität des Endothels ist jedoch nicht nur auf Gefäß- und Organursprung beschränkt. Mikrovaskuläre Endothelzellen innerhalb eines Organs zeigten in vitro Heterogenität (Staton et al., 2009; Käßmeyer, 2006; Chi et al., 2003; Plendl, 1996a, b).

In vivo wurde unter anderem mittels Immunfluoreszenz und Lektinbindung die Heterogenität des vaskulären Endothels abhängig von Spezies, Alter, Gewebe und Organ belegt (Brouland et al., 1999; Augustin et al., 1995).

2.1.4. Apoptose

Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod, der in jeder Zelle induziert werden kann. Sie ist während der embryonalen Entwicklung sowie für die Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts im adulten Organismus von großer Bedeutung (Segura et al., 2002; Dimmeler und Zeiher, 2000).

Apoptose ist ein energieabhängiger Prozess, bei dem im Gegensatz zu anderen Formen des Zelltodes, wie beispielsweise der Nekrose, die Integrität der Zellorganellen über einen langen Zeitraum erhalten bleibt (Häcker, 2000). Zudem wird die Apoptose einer Zelle nicht von einer Entzündung in der Umgebung begleitet (Stefanec, 2000).

Apoptose ist durch charakteristische morphologische Veränderungen einer Zelle definiert. Initial stehen der Verlust der Zellfortsätze und die Chromatinkondensation im Vordergrund. Die kondensierte DNA lagert sich an die Kernwand an (Kernwandhyperchromasie), der Kern schrumpft (Kernpyknose) und zerfällt (Karyorrhesis, Karyolysis). Das Zytoplasma wird in sogenannten apoptotischen Körperchen abgeschnürt, die auch Zellorganellen enthalten (Häcker, 2000). Diese apoptotischen Körperchen werden rasch durch benachbarte Zellen phagozytiert und abgebaut (Abbro et al., 2004; Saraste, 1999). Diese schnell erfolgende Phagozytose verhindert die Entstehung einer Entzündung (Dini et al., 1995).

Der Prozess der Apoptose wird von Caspasen, einer Familie intrazellulärer Proteasen, vermittelt. Es sind bisher drei Wege bekannt auf denen die Caspasen aktiviert werden können: der Rezeptor-vermittelte Weg, der Mitochondrien-vermittelte Weg und der durch das Endoplasmatisches Retikulum vermittelte Weg (van Cruchten und van den Broeck, 2002).

Bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose bindet ein Apoptose-induzierender Ligand an einen spezifischen, membrangebundenen Rezeptor. Dieser wird dadurch aktiviert und spaltet die Procaspasen zu aktiven Caspasen (Caspase-8). Ein bekannter Ligand für die Rezeptor-vermittelte Apoptose ist der Tumor Nekrose Faktor α .

Die Mitochondrien-vermittelte Apoptose wird durch Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien eingeleitet, welches in der inneren Mitochondrienmembran und im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist. Das ins Zytosol entlassene Cytochrom c bindet an den Apoptose Protease aktivierenden Faktor (Apaf-1), der nach Komplexbildung mit Adenosintriphosphat (ATP) die Procaspase-9 zur Caspase-9 aktiviert. Dieser Weg der Apoptose wird beispielsweise durch Stickstoffmonoxid oder Strahlung aktiviert (van Cruchten und van den Broeck, 2002; Häcker, 2000).

Mitochondrien sind nicht nur in dieser Hinsicht sondern auch durch zahlreiche andere Mechanismen an der Apoptose beteiligt. Sie vermitteln eine Veränderung des Elektronentransportes, setzen pro- und anti-apoptotische Proteine frei und verändern die zellulären Redox-Reaktionen (Green und Reed, 1998). Ein sehr frühes Ereignis im Prozess der Apoptose ist die Umlagerung von Phosphatidylserin aus der inneren in die äußere Lamelle der Zellmembran. An lebenden Zellen kann durch Bindung von Annexin-V an Phosphatidylserin die Induktion der Apoptose bereits sehr zeitig nachgewiesen werden (Bose et al., 2004).

Ein dritter Weg der Apoptoseinduktion wird über das Endoplasmatische Retikulum vermittelt. Es wurde beobachtet, dass nach Applikation von Stressoren des Endoplasmatischen Retikulums Apoptose induziert wird, hierbei spielt die Caspase-12 eine wichtige Rolle. Dieser Weg scheint unabhängig von den beiden oben beschriebenen Wegen zu sein.

Die aktivierten Caspasen aktivieren nun weitere Caspasen. Eine Schlüsselfunktion nimmt hierbei die Caspase-3 ein, diese spaltet zytoplasmatische und nukleäre Proteine. Somit werden nukleäre DNAsen aktiviert. (Häcker, 2000). Die DNA wird in spezifischen Bereichen zwischen den Nucleosomen gespalten, so dass typischerweise Bruchstücke gleicher Länge (146 Basenpaare) entstehen (Nagata et al., 2003; López-Collazo et al., 1997).

Die Regulation der Apoptose erfolgt durch eine Reihe von Genprodukten, wie beispielsweise dem anti-apoptotisch wirkenden Protein Bcl-2, welches in Mitochondrien, im Endoplasmatischen Retikulum und in der Kernhülle zu finden ist. Ein Beispiel für ein Apoptose-förderndes Protein ist Bax (Gerber et al., 1998). Bax fördert die Bildung von Poren in Lipiddoppelmembranen, ermöglicht damit die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und erhöht die Diffusion von Lipiden zwischen den Membranen (Epand et al., 2003; Yethon et al., 2003; van Cruchten und van den Broeck, 2002). Die Permeabilitätssteigerung von Lipidmembranen durch Bax kann beispielsweise durch Fettsäuren erhöht werden (Epand et al., 2004). Über die Proteine der Bcl2-Familie ist zudem eine Interaktion zwischen Rezeptor-vermittelter und Mitochondrien-vermittelter Apoptose gegeben, da die im Rahmen der rezeptor-vermittelten Apoptose aktivierte Caspase-8 das Protein BID aktiviert, das in der Mitochondrienmembran sitzt und zur Familie der Bcl2-Proteine gehört. Die Aktivierung von BID führt nun ebenfalls zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (van Cruchten und van den Broeck, 2002). Die Expression der regulierenden Genprodukte kann durch äußere Faktoren beeinflusst werden. So löst der Entzug von Serum aus dem Nährmedium die Apoptose von in vitro kultivierten Endothelzellen aus (Bombeli et al., 1999). Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der Fibroblast Growth Factor (FGF) oder Albumin hingegen wirken in bestimmten Konzentrationen dieser durch Serumentzug induzierten Apoptose entgegen (Gerber et al., 1998; Zoellner et al., 1996; Araki et al., 1990).

2.1.5. In vitro Kultivierung von Endothelzellen

Endothelzellen können aus zahlreichen Organen und Geweben isoliert, in vitro kultiviert und für Studien eingesetzt werden (Gimbrone et al., 1974). Bereits 1980 konnten Folkman und Haudenschild in einer Langzeitkultur von Endothelzellen die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen mit Lumenbildung beobachten.

Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Assays entwickelt, die zur Erforschung der kaskadenartigen Stadien der Angiogenese herangezogen wurden (Auerbach et al., 2003, Auerbach et al., 2002). So kann die Migration von Endothelzellen in einer Boyden-Kammer untersucht werden, bei der die eingesäten Endothelzellen durch einen Filter in Richtung eines chemotaktischen Stimulus migrieren (Sala et al., 2002). Studien zur Proliferation von Endothelzellen basieren unter anderem auf Zellzählung oder Inkorporation von Markersubstanzen (Ulrich-Merzenich et al., 2002).

Auch die Differenzierung von Endothelzellen zu kapillarähnlichen Strukturen kann in vitro untersucht werden (Auerbach et al., 2000; Iruela-Arispe et al., 1991). Hierfür wurden zahlreiche Modelle entwickelt, die auch eine Quantifizierung der Angiogenese ermöglichen (Bahramsoltani und Plendl, 2004; Auerbach et al., 2003; Bahramsoltani, 2003; Auerbach et al., 2000). Prinzipiell unterscheidet man zwei- und dreidimensionale Modelle der Angiogenese (Lienau et al., 2005; Lienau, 2003, Vailhé et al., 2001). Bei zwei-dimensionalen Modellen bilden sich die kapillarähnlichen Strukturen planar zum Boden einer mit adhäsiven Proteinen oder Gelen (Kollagen Typ IV oder V, Matrigel, Gelatine) beschichteten Kulturschale aus (Vailhé et al., 2001; Auerbach et al., 2000; Ingber und Folkman, 1989a,b). Bei dreidimensionalen Modellen hingegen bildet sich ein Netzwerk kapillarähnlicher Strukturen aus. Hierfür wird meist ein geeignetes dreidimensionales Substrat vorgelegt (Matrigel, Gele mit Kollagen oder Fibrin), in dem sich die Zellen vermehren und strukturieren (Segura et al., 2002). Endothelzellkulturen sind jedoch auch in der Lage, ihr eigenes Substrat zu synthetisieren und in diesem dann dreidimensionale Netzwerke zu bilden (Lienau, 2003).

Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Endothelzellen und anderen Zellen wurden Kokulturmodelle entwickelt, welche die Situationen in vivo simulieren sollen. Kokulturmodelle von Endothelzellen mit Granulosazellen stellen die Gegebenheiten im bovinen Corpus luteum nach und bilden somit ein in vitro Modell dieses Organs (Plendl et al., 2002; Fuchs-Schönleber, 1999). Zudem wurden Kokulturen von Endothelzellen mit glatten Muskelzellen (Sakuda et al., 1992) oder Fibroblasten (Staton et al., 2009; Velázquez, 2002; Bishop et al., 1999) entwickelt.

2.2. Blutgefäße

2.2.1. Entwicklung des Blutgefäßsystems

2.2.1.1. Vaskulogenese

Die ersten Blutgefäße bilden sich in der frühen Embryonalentwicklung durch Vaskulogenese. Dies bezeichnet die de novo Synthese von Blutgefäßen aus den mesenchymalen Blutinseln (Risau und Flamme, 1995). Die außen liegenden Progenitorzellen differenzieren sich zu Endothelzellen, während sich aus den innen liegenden Zellen die Blutzellen entwickeln (Carmeliet, 2000; Sariola, 1985). Endothelzellen und Blutzellen besitzen eine gemeinsame Progenitorzelle, den Hämangioblasten (Choi et al., 1998; Eichmann et al., 1997).

Der Prozess der Vaskulogenese jedoch nicht nur auf die Embryonalentwicklung beschränkt, sondern findet auch im adulten Organismus statt (Conway und Carmeliet, 2004; Ribatti et al., 2001). Im Blut finden sich zirkulierende Progenitorzellen, die sich zu Endothelzellen oder glatten Muskelzellen differenzieren können (Caplice und Doyle, 2005). Diese Progenitorzellen lagern sich möglicherweise in Bereichen physiologischer und pathologischer Neovaskularisation an die Gefäßwand an, differenzieren zu Endothelzellen und proliferieren in situ (Murasawa und Asahara, 2005; Rumpold et al., 2004). Als Ursprung dieser Zellen wird das Knochenmark angesehen (Conway und Carmeliet, 2004; Lin et al., 2000; Rafi, 2000; Asahara et al., 1999; Asahara et al., 1997).

Auch in Endothelzellkulturen in vitro, die aus dem adulten bovinen Ovar isoliert wurden, geht die Blutgefäßbildung teilweise von endothelialen Progenitorzellen aus. In einem in vitro-Modell der Angiogenese von Endothelzellen des bovinen Ovars wurden endotheliale Progenitorzellen identifiziert. Hier werden durch Progenitorzellen die Vaskulogenese und damit die Bildung der kapillarähnlichen Strukturen ausgelöst (Käßmeyer und Plendl, 2009).

2.2.1.2. Angiogenese

Nach Ausbildung eines primären Gefäßnetzes durch Vaskulogenese erfolgt das weitere Wachstum der Gefäße durch Angiogenese und Intussuszeption (Patan 2004; Risau, 1997). Im adulten Organismus ist die Angiogenese der vorherrschende Mechanismus zur Bildung von Blutgefäßen (Vailhé et al., 2001).

Angiogenese bezeichnet das Wachstum und Remodelling des kapillären Gefäßnetzwerkes (Folkman, 2003). Die Aussprossung der Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen erfolgt hierbei durch Proliferation, Migration und dreidimensionale Organisation von Endothelzellen. Angiogenese findet beim Adulten physiologischerweise nur während des Zyklus in Ovar und Uterus, während der Gravidität in Plazenta und Milchdrüse und während der aktiven Phase des Haarwachstums im Haarfollikel statt (Plendl et al., 2002a; Augustin, 2000; Mecklenburg et al., 2000; Plendl, 2000; Modlich et al., 1996; Matsumoto et al., 1992). Ein Beispiel der pathophysiologischen Angiogenese ist die Wundheilung. Pathologische Angiogenese tritt bei einer Vielzahl von Erkrankungen (Tumoren, chronischen Entzündungen, Rheuma, Psoriasis, Periodontitis) in Erscheinung (Folkman, 2007; Koch, 1998; Majno, 1998; Polverini, 1995).

2.2.1.2.1. Angiogene Kaskade

Der erste Schritt in der angiogenen Kaskade besteht in der **Ablösung** der Endothelzellen von der Basalmembran durch Abbau der extrazellulären Matrix. Dann kann die **Migration** der Endothelzellen zum Ort des angiogenen Stimulus einsetzen (Patan 2004; Risau, 1997; Folkman, 1982). Hierfür wird eine Vielzahl proteolytischer Enzyme aus dem Plasminogen-Aktivator- (PA) und dem Matrix-Metalloproteinase-System (MMP) in den Endothelzellen, den Perizyten und anderen Zellen des umliegenden Gewebes exprimiert. Die Expression dieser Proteasen wird durch verschiedene lösliche Faktoren reguliert (Pintucci et al., 1996).

Nach der Migration der ersten Endothelzellen zum Ort des angiogenen Stimulus erfolgt deren **Proliferation** am Ursprung des entstandenen Sprosses, die zu dessen Verlängerung führt. Die Proliferation wird unter anderem stimuliert durch Faktoren, die aus der degradierten Matrix freigesetzt werden (Pepper, 1997). Die gebildeten Zellsprosse fusionieren an der Spitze und bilden so eine Schlinge (Folkman, 1982). Dieser Prozess der Migration und Proliferation wird durch Ausbildung einer Basalmembran abgeschlossen.

Der anschließende Prozess der **Lumenbildung** wird insbesondere durch Vakuolisierung und Apoptose von Endothelzellen vermittelt (Kubota et al., 1988).

Durch Fusion von Vakuolen benachbarter Endothelzellen bildet sich ein Lumen aus, welches von nur einer Zelle begrenzt wird (Bayless und Davis, 2002; Bayless et al., 2000; Davis und Camarillo, 1996). Wenn intrazelluläre Vakuolen mit dem interzellulären Spaltraum fusionieren, entsteht ein Lumen, welches durch mehrere Zellen begrenzt wird (Meyer et al., 1997).

Zentral im Spross liegende Endothelzellen werden apoptotisch und erweitern somit das Lumen, welches zunächst noch mit Detritus gefüllt ist. Diese Zelltrümmer werden von den umliegenden Zellen abgebaut (Peters et al., 2002; Meyer et al., 1997, Kubota et al., 1988).

Die endgültige **Stabilisierung** und **Reifung** des Gefäßes erfolgt durch Rekrutierung perivaskulärer Zellen, wie Perizyten und Myozyten (Patan 2004; Augustin, 2000; Carmeliet, 2000; Benjamin et al., 1998; Goede et al., 1998; Hirschi und D'Amore, 1997; Risau, 1997; Skalak und Price, 1996; Tontsch und Bauer, 1991).

2.2.1.2.2. Regulation der Angiogenese

Angiogenese wird durch eine Vielzahl pro- und anti-angiogener Faktoren gesteuert (Karamysheva A., 2008; Tomanek und Schatteman, 2000; Desai und Libutti, 1999; Iruela-Arispe und Dvorak, 1997; Schott und Morrow, 1993).

Bei den **pro-angiogenen** Faktoren lassen sich direkt und indirekt wirkende Faktoren unterscheiden. Die indirekt wirkenden Angiogenesestimulatoren entfalten ihre pro-angiogene Wirkung, indem sie die Bildung und Freisetzung von direkt wirkenden Angiogenesestimulatoren auslösen. Hier sind besonders der Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) und der Transforming Growth Factor (TGF) charakterisiert. Die direkt wirkenden Angiogenesestimulatoren können unterschieden werden zwischen solchen, die direkt auf Endothelzellen als einzige Zielzellen wirken, oder aber solchen, die auch noch weitere Zielzellen aktivieren. Direkt auf die Endothelzellen wirken beispielsweise Stimulatoren aus der Familie der Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) sowie die Angiopoetine. Dahingegen wirkt beispielsweise der Fibroblast Growth Factor (FGF) nicht nur auf die Endothelzellen, er aktiviert auch eine Reihe weiterer Zielzellen wie glatte Muskelzellen und Neuronen (Karamysheva A., 2008; Klagsbrun und Moses, 1999; Ingber und Folkman, 1989a).

In einem gesunden Organismus ist ein Gleichgewicht zwischen pro- und **anti-angiogenen** Faktoren notwendig. Die anti-angiogenen Faktoren unterdrücken Migration und Proliferation der Endothelzellen, hemmen deren enzymatische Aktivität oder verhindern die Ausbildung funktionsfähiger Kapillaren, z.B. durch Unterdrückung der Apoptose. Zu diesen anti-angiogenen Faktoren zählen u. a. Angiostatin, ein Fragment des Plasminogens, und Endostatin, ein Fragment von Kollagen VIII, aber auch Steroidhormone (Folkman, 2004; Tuszynski et al., 2002; Ergun et al., 2001; Folkman und Ingber, 1987).

2.2.1.3. Intussuszeption

Ein weiterer Mechanismus der Bildung neuer Gefäße ist die Intussuszeption. Im Zuge dieses Prozesses entstehen neue Gefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen durch Teilung des Gefäßlumens (Patan 2004; van Groningen et al., 1991; Caduff et al., 1986). Hierbei schiebt sich eine Endothelzelle in das Gefäßlumen vor und nimmt Kontakt zum gegenüberliegenden Endothel auf. Es entsteht ein transkapillärer Pfeiler (Burri und Tarek, 1990). Durch weitergehende Umlagerung von Endothelzellen wird das Lumen vollständig gespalten und es bilden sich zwei Gefäße aus (Hirschberg und Plendl, 2005; Plendl, 2002a).

Der Vorgang der Intussuszeption wird in vielen Organen, vor allem aber in der Lunge und im Auge beobachtet, besonders während der embryonalen und der frühen postnatalen Entwicklung (Plendl, 2002a; Risau, 1997; Patan et al., 1993; Patan et al., 1992; van Groningen et al., 1991).

2.2.2. Vaskularisation von Neoplasien

Ohne Rekrutierung eines eigenen Blutgefäßsystems ist das Wachstum und die Metastasierung eines Tumors nicht möglich. Eine ausreichende Ernährung durch Diffusion ist nur bis zu einem Tumordurchmesser von etwa 2-3 mm möglich, für weiteres Wachstum benötigt der Tumor ein eigenes Gefäßbett (Hicklin und Ellis, 2005; Paku 1998; Folkman und Shing, 1992; Folkman, 1971). Ohne dieses verharrt er in einem ruhenden Stadium, der prävasculären Phase (Pepper, 1997; Folkman, 1992), in der sich Tumorzellproliferation und –apoptose das Gleichgewicht halten (Carmeliet und Jain 2000, Pepper, 1997).

Die Gefäße eines Tumors entstehen durch Sprossung oder Intussuszeption aus bereits bestehenden Gefäßen. Aber auch im Blut zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark sind an der Entstehung der Tumorgefäße beteiligt sein (Pang und Poon, 2006; Carmeliet und Jain, 2000; Paku, 1998).

Viele Tumorzellen bilden pro-angiogene Substanzen, wie beispielsweise den Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF (Folkman und Hanahan, 1991). Schon 1970 konnten Folkman und Mitarbeiter einen Faktor aus Tumoren isolieren, der die Angiogenese stimuliert. Der Tumor kann jedoch auch Zellen, beispielsweise Makrophagen oder Thrombozyten, rekrutieren, die pro-angiogene Faktoren freisetzen (Pinedo et al., 1998; Folkman, 1992) und damit Angiogenese induzieren (Folkman, 1985; Shing et al., 1985). Dieser Vorgang wird als „angiogenic switch“ bezeichnet (Carmeliet und Jain, 2000; Bouck et al., 1996; Folkman, 1995). Die Tumorzellen sind dann in der Lage, sich weiter zu vermehren, wodurch die räumliche Ausdehnung der Geschwulst über den diffusionsbedingten Schwellenwert hinaus möglich ist (Folkman, 1992). Der Anschluss an das Blutgefäßsystem ermöglicht zudem die hämatogene Metastasierung (Carmeliet und Jain, 2000; Kumar et al., 1999; Paku 1998).

Die von Tumorzellen induzierte Angiogenese hat eine tumorspezifische Blutgefäßbildung zur Folge. Das Gefäßbett eines Tumors weist zahlreiche Besonderheiten auf. Die Gefäße und Kapillaren sind häufig sehr unregelmäßig im Durchmesser, stark gewunden und oftmals über Anastomosen verbunden (Carmeliet und Jain, 2000). Abhängig von ihrer Lokalisation sind Gefäße des Tumors, bedingt durch die besonderen Druckverhältnisse, abschnittsweise kollabiert (Jain, 1988). Die endotheliale Auskleidung ist stellenweise unterbrochen und weist ein unterschiedliches Maß an Fenestration, transzellulären Poren und interzellulären Lücken verschiedener Größe auf, wodurch die Gefäße stark durchlässig werden (Hashizume et al., 2000; Hobbs et al., 1998).

Zudem wurde in bestimmten Tumoren „vaskuläre Mimikry“ beobachtet. Dies bedeutet, dass nicht-endotheliale Zellen die Funktion von Endothelzellen übernehmen und sich an der Bildung von Blutgefäßen beteiligen (Ribatti et al., 2003). Solcherart gebildete „Mosaikgefäße“, die überwiegend aus Tumorzellen bestehen, treten beispielsweise im uvealen Melanom auf (Hendrix et al., 2003). Aber auch in anderen Tumoren (Mamma-, Kolon-, Ovarkarzinom, Osteosarkom) wurden Hinweise auf das Vorhandensein von Mosaikgefäßen gefunden. (Cai et al., 2004; Sun et al., 2004). Vaskuläre Mimikry begünstigt die hämatogene Ausbreitung des Tumors durch Abschwemmen der Tumorzellen (Folkman, 2001; McDonald und Foss, 2000; Paku, 1998).

Viele der durch die Tumor-Angiogenese neugebildeten Gefäße reifen nicht endgültig aus. So rekrutieren sie teilweise keine stabilisierenden Perizyten. Oftmals haften die Endothelzellen nur an einer provisorischen extrazellulären Matrix an und sind dadurch sensibler gegenüber gefäßschädigenden Faktoren (Benjamin et al., 1999; Paku, 1998). Solche unreifen Gefäße bilden sich nach Entzug von VEGF wieder zurück, während reife Gefäße mit Perizyten bestehen bleiben (Benjamin et al., 1999).

2.2.3. Angiotherapie

Angiogenese ist maßgeblich an vielen Erkrankungen beteiligt. So findet sich beim Tumorwachstum und bei rheumatischen Erkrankungen erhöhte Angiogenese, während Angiogenese bei ischämischen Zuständen meist verringert ist. Aus dieser Tatsache entwickelte sich die Idee, neue Therapiemethoden auf Basis einer Manipulation der Angiogenese zu etablieren (Chen et al., 2009; Folkman, 2007; Pepper, 1997). Der große Vorteil der Angiotherapie besteht in der Lokalisation der Endothelzellen. Sie sind dem Blutfluss direkt exponiert, womit ein schnelles und einfaches Erreichen der Zielzellen gegeben ist (Pand und Poon, 2006). Zudem wird von einer niedrigen Therapieresistenz der Endothelzellen ausgegangen, da diese genetisch sehr stabil sind (Folkman, 2007; Longo et al., 2002).

Bei ischämischen Zuständen besteht das Ziel der Therapie in einer Induktion der Angiogenese zur Bildung neuer Blutgefäße. Erkrankungen mit erhöhter Gefäßbildung sollen durch Anti-Angiogenese, einer Unterdrückung der Gefäßneubildung, oder durch Zerstörung oder Rückbildung bereits bestehender Gefäße behandelt werden (Folkman, 2004; Kruger et al., 2001; Folkman und Ingber, 1992).

Bei pro- und anti-angiogenen Therapien soll eine spezifische Induktion der Angiogenese oder Anti-Angiogenese nur im Zielgebiet erreicht werden, um Nebenwirkungen durch Störung der Angiogenese in anderen Organen zu vermeiden.

2.2.3.1. Pro-angiogene Therapie

Pro-angiogene Therapien werden zur Wundheilung erforscht. Hier wurden in Tierversuchen beschleunigte Wund- und Knochenheilung durch Einsatz von Wachstumsfaktoren wie den Fibroblast Growth Factors (FGFs) und dem Plättchenfaktor (PDGF, platelet-derived growth factor) nachgewiesen (Hiraizumi et al., 1996; Duffy et al., 1995). Auch der Einsatz von VEGF und bFGF nach einem Myokardinfarkt zeigte eine beschleunigte Vaskularisierung mit Bildung von Kollateralgefäßen im Infarktgebiet (Yoon et al., 2004; Unger et al., 1994).

2.2.3.2. Anti-angiogene Therapie zur Behandlung von Tumoren

Insbesondere im Bereich der Tumorthherapie wird die Strategie einer anti-angiogenen Therapie intensiv verfolgt (Chang et al., 2009; Chen et al., 2009; Siemann et al., 2005; Browder et al., 2000; Sacco et al., 2000; Bendas et al., 1999). Hierbei liegt das Ziel entweder in der Unterdrückung der Gefäßneubildung (anti-angiogen) oder in der Zerstörung bereits vorhandener Gefäße (disruptiv). Die erste Methode kann vor allem präventiv wirken, um ruhende Tumoren an Wachstum und Ausbreitung zu hindern, während die disruptive Methode in fortgeschrittenen Stadien einer neoplastischen Erkrankung Einsatz findet, um bestehende solide, eventuell bereits gegen Chemotherapeutika resistente Tumoren durch Unterbrechung der Blutzufuhr auszuhungern (Chang et al., 2009; Dabbas et al., 2008; Siemann et al., 2005; Kunstfeldt et al., 2003; Browder et al., 2000).

Zum Einsatz kommen häufig anti-angiogene Wirkstoffe, wie Angiostatin und Endostatin. Der erste zugelassene anti-angiogene Wirkstoff war Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, der 2004 zur Behandlung von Kolontumoren zugelassen wurde (Folkman, 2007; Hicklin und Ellis, 2006). Diese anti-angiogenen Wirkstoffe müssen über einen längeren Zeitraum appliziert werden, um ihre Wirksamkeit zu entfalten. Die Herstellung der wirksamen Peptide in Reinform ist sehr aufwändig. Aus diesem Grunde wird vielfach in der Angiotherapie auch der Gentransfer solcher Nucleinsäuren erforscht, die für diese anti-angiogenen Wirkstoffe kodieren (Dell'Eva et al., 2002). Aber auch die Inhibition der Bildung angiogener Wirkstoffe durch Gentransfer von anti-sense Oligonucleotiden, die an die DNA oder RNA binden und somit die Exprimierung dieser Genprodukte verhindern, wird erforscht (Tomanek und Schatteman, 2000).

Erste Versuche mit anti-angiogenen Medikamenten zeigten in präklinischen Studien zunächst deutliche Erfolge in vivo (Chang et al., 2009). Der Einsatz in klinischen Studien ist

derzeit noch nicht befriedigend etabliert (van Kempen und Leenders, 2006). Dies beruht unter anderem auf suboptimalen Therapiezeitplänen oder Schwierigkeiten im Studiendesign, zudem sind die Therapieerfolge nur transient, so kommt es häufig zu einer Resistenzbildung gegen die anti-angiogenen Substanzen (Bergers und Hanahan, 2008; Longo et al., 2002). Derzeit werden anti-angiogene Tumorthérapien nur unterstützend mit einer Chemotherapie eingesetzt (Goh et al., 2007; Pang und Poon, 2006).

2.3. Liposomen

Durch Aneinanderlagerung von amphiphilen Lipidmolekülen in hydrophilem Milieu entstehen sphärische Partikel, die Liposomen. Erstmals wurden sie 1964 von Bangham et al. beschrieben. Liposomen bestehen aus einer oder mehreren konzentrisch angeordneten Lipiddoppelmembranen, welche hohe strukturelle Ähnlichkeit mit der Zellmembran aufweisen. Liposomen wurden seit 1968 für Studien zur Funktion der biologischen Membranen genutzt (Sessa und Weissman, 1968).

2.3.1. Morphologie der Liposomen

Die Lipiddoppelmembranen umschließen eine wässrige Phase im Inneren der sphärischen Partikel. Entsprechend ihrer Größe und ihres Bestandes an Lipiddoppelmembranen unterscheidet man kleine unilamelläre Liposomen (small unilamellar vesicles, SUV), große unilamelläre Vesikel (large unilamellar vesicles, LUV) und multilamelläre Vesikel (multilamellar vesicles, MLV) (Lasic, 1998; Laverman et al., 1999).

Die Oberflächenladung der Liposomen wird bestimmt durch die Ladung der einzelnen Lipidbestandteile. Es werden neutrale, anionische und kationische Liposomen unterschieden (Laverman et al., 1999; Drummond et al., 1999).

2.3.2. Reaktivität der Liposomen

In Abhängigkeit von den Wechselwirkungen mit Zellen und anderen Molekülen werden Liposomen weiterhin unterteilt in konventionelle, sterisch stabilisierte, polymorphe und zielgerichtete Liposomen (Huwyler et al., 2008; Lasic, 1998).

Konventionelle Liposomen zeigen unspezifische Reaktionen mit anderen Stoffen oder Zellen und bestehen aus einfachen Lipiden und Phospholipiden ohne spezifische Modifikationen ihrer hydrophilen Kopfgruppen (Drummond et al., 1999; Lasic, 1998)

Sterisch stabilisierte Liposomen, auch Stealth-Liposomen genannt, werden unter Verwendung von Glykolipiden oder hydrophilen Polymeren hergestellt (Immordino et al., 2006; Lasic, 1998; Allen, 1994). Als Polymer wird vielfach Polyethylenglykol (PEG) eingesetzt (Gabizon et al., 2008; Lasic, 1997), als Glykolipid wird beispielsweise das Gangliosid GM₁ (Drummond et al., 1999) verwendet. PEG-Polymere sind inert, ungeladen und hydrophil. Sie umgeben die Liposomen somit wie eine Schutzhülle und erschweren durch sterische Abstoßung die Annäherung und Bindung anderer Moleküle an die Liposomen. Somit zeigen sterisch stabilisierte Liposomen eine verminderte Reaktionsfähigkeit mit anderen Molekülen, wie beispielsweise den Komplementfaktoren im Serum oder Serumproteinen, und dadurch eine verminderte Aufnahme durch Zellen des mononukleären Phagozytosesystems (Gabizon et al., 2006; Immordino et al., 2006; Bendas et al., 2003; Drummond et al., 1999; Düzgünes und Nir, 1999; Lasic, 1998; Lasic, 1997; Papahadjopoulos et al., 1991).

Durch Anheftung spezifischer Liganden an die Liposomen (Funktionalisierung) entsteht eine weitere Gruppe, die sogenannten **zielgerichteten (targeted) Liposomen** (Nobs et al., 2004). Die Liganden vermitteln eine Bindung an spezifische Moleküle oder Oberflächenstrukturen der Zellen. So werden Kohlenhydratreste wie Folsäure, Mannose, Transferrin und Galactose an die Liposomenoberfläche gebunden. Diese vermitteln die Bindung und Aufnahme der Liposomen über spezifische Zelloberflächenrezeptoren (Engel et al., 2003; Gabizon et al., 2003; Leamon et al., 2003; Gijssens et al., 2002; Zhou et al.,

2002; Barratt et al., 1986). Auch die Herstellung von Immunliposomen ermöglicht die Bindung an spezielle Oberflächenantigene der Zellen. Hierfür werden Antikörper an die Liposomen gekoppelt. Die Antikörper können kovalent an die Lipidschicht der Liposomen oder bei sterisch stabilisierten Liposomen auch an die PEG-Moleküle gebunden werden. Diese Antikörper binden nun an Antigene der Zelloberfläche. Durch Bindung organspezifischer Antigene kann die Anreicherung der Immunliposomen in einem bestimmten Organ erreicht werden (Bendas et al., 2003, Everts et al., 2003; Kessner et al., 2001; Bendas et al., 1999; Maruyama et al., 1999; Mastrobattista et al., 1999a; Mastrobattista et al., 1999b; Bendas et al., 1998; Spragg et al., 1997). Somit kann mittels der zielgerichteten Liposomen eine verstärkte Aufnahme der Liposomen durch die Zielzellen sowie eine selektive Anreicherung in einem bestimmten Zielgewebe erreicht werden (Pastorino et al., 2003a, b; Lasic, 1998).

Polymorphe Liposomen verändern bei Interaktionen ihre Struktur. Hierzu zählen pH-sensitive Liposomen, welche auf Schwankungen im pH-Wert mit einer Veränderung ihrer Struktur reagieren. Sie ermöglichen durch die Strukturveränderung die gezielte Freisetzung von Stoffen in einem spezifischen Milieu (Düzgünes und Nir, 1999; Lasic, 1998). Auch Temperatur-sensitive Liposomen und kationische Liposomen werden zu den polymorphen Liposomen gerechnet. Erstere weisen bei einer bestimmten Temperatur eine erhöhte Permeabilität der Lipidmembran auf, so dass in ihrem Inneren transportierte Wirkstoffe durch die Membran diffundieren können (Mastrobattista et al., 1999a). Letztere verändern ihre Struktur bei der Reaktion mit DNA-Molekülen und bilden mit diesen Komplexe. Dabei beeinflussen insbesondere die Kopfgruppen der kationischen Lipide die Bindung der DNA-Moleküle (Narang et al., 2005; Felgner et al., 1994).

2.3.3. Interaktionen der Liposomen mit der Zelle

Eine Zelle kann auf verschiedene Weise mit den Liposomen interagieren. Prinzipiell kann als Form der Interaktion ein Intermembrantransfer zwischen Liposomen und Zellmembran erfolgen, also der Austausch von Lipiden. Weiterhin wird eine Translokation von Liposomen nach Bindung an die äußere Zellmembran diskutiert (Fretz et al., 2004). Weitere Möglichkeiten der Interaktion zwischen Zelle und Liposomen sind Adsorption, Fusion und Endozytose.

Vor jeder intrazellulären Aufnahme muss zunächst eine Adsorption der Liposomen an die Plasmamembran erfolgen (Nir und Nieva, 2003; Azzazy et al., 1995). Die Aufnahmemechanismen der Zelle für Liposomen sind bedeutend für den weiteren Weg der durch Liposomen zur Zelle transportierten Wirkstoffe (Zipper et al., 1988). So muss für einen effektiven Gentransfer zunächst eine intrazelluläre Aufnahme der Liposomen durch Endozytose vorausgehen, bevor die transportierte DNA mittels Fusion der Liposomen mit der Vesikelmembran in das Zytosol freigesetzt wird. Andernfalls ist kein Transport der DNA in den Zellkern möglich (Zabner, 1997; Wroebel und Collins, 1995; Xu und Szoka, 1996; Zabner et al., 1995)

Für Gefäßendothelzellen aus der Aorta von Rindern wurden von Zipper und Mitarbeitern (1988) mittels elektronenmikroskopischer Studien verschiedene Formen der Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Zellen nachgewiesen. Es zeigten sich typische Bilder der Adsorption, Fusion und endozytotischen Aufnahme. In einige Zellen drangen liposomale Ausläufer vor, die eine Wirkstofffreisetzung ermöglichten. Zipper et al. (1988) beobachteten in der Zellkultur auch die Exozytose von zuvor endozytierten Liposomen, was für eine transzelluläre Passage intakter Liposomen spricht.

Die Fusion wurde zunächst als vorrangiger Weg der Liposomen in die Zelle angesehen. Neuere Untersuchungen beschreiben jedoch überwiegend Endozytose als vorherrschenden Mechanismus zur Aufnahme der Liposomen durch Zellen. Hierbei wurden unterschiedliche Wege basierend auf verschiedenen, an der Endozytose beteiligten Zellstrukturen beschrieben (Azzazy et al., 1995; Straubinger et al., 1990).

Die Eigenschaften der Liposomen und die Zellspezies beeinflussen nachhaltig die Aufnahmemechanismen (Dabbas et al., 2008; Rejmann et al., 2004; Dini et al., 1998; Miller

et al., 1998). So wurde für große Liposomen (400-800 nm) eine kürzere Halbwertszeit im Blutkreislauf als für kleine Liposomen (unter 200 nm) beobachtet (Huang et al., 1992).

Auch die Oberflächenladung der Liposomen beeinflusst ihre Aufnahme durch spezifische Zellen. Kationische Liposomen werden besonders von proliferierenden Endothelzellen aufgenommen (Thurston et al., 1998). Auch HeLa Zellen, eine spezielle, aus dem Zervixkarzinom einer Frau isolierte epithelartige Zelllinie, binden positiv geladene Liposomen stärker als negativ geladene oder neutrale Liposomen (Miller et al., 1998).

Für mit Liganden versehene, zielgerichtete Liposomen wurde eine verstärkte Aufnahme über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose nachgewiesen (Arangoa et al., 2003). Ferner beeinflussen Wechselwirkungen mit Serumbestandteilen die Aufnahmemechanismen (Zuhorn et al., 2002d; Huong et al., 1998; Chonn et al., 1992). Durch Opsonierung mit Serumproteinen wird eine Phagozytose durch Makrophagen und die Aufnahme der Liposomen in die Leber gefördert (Harashima et al., 1994).

Somit können für unterschiedliche Liposomenpräparationen verschiedene Aufnahmewege beobachtet werden. Jedoch wurden auch für einheitliche Liposomenpräparate unterschiedliche Aufnahmemechanismen in Abhängigkeit vom aufnehmenden Zelltyp beobachtet (Papadimitriou und Antimisariis, 2000).

Um die Bindung von Liposomen an die Zelle und die Mechanismen der intrazellulären Aufnahme und Verteilung zu evaluieren, wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen (Torchillin, 2005; Huth et al., 2004; Rückert et al., 2003; Huang et al., 1992; Straubinger et al., 1990), radioaktiven Substanzen (Lavermann et al., 1999) oder Goldpartikeln (Thurston et al., 1998; Friend et al., 1996; Huang et al., 1992; Hong et al., 1983) markierte Liposomen eingesetzt. Im Folgenden werden die bisher beobachteten Mechanismen der Aufnahme von Liposomen durch verschiedene Zellen beschrieben.

2.3.3.1. Fusion

Eine der ersten Interaktionen mit der Zelle, die für Liposomen beschrieben wurde, ist die Fusion mit der äußeren Plasmamembran (Almofiti et al., 2003; Düzgünes und Nir, 1999; Zipper et al., 1988). Nach endozytotischer Aufnahme intakter Liposomen kann auch deren Fusion mit den Membranen der Zellorganellen auftreten (Nakanishi und Noguchi, 2001; Wroebel und Collins, 1995).

Für eine Fusion zwischen Membranen müssen sich diese zunächst einander annähern (Cevc und Richardson, 1999; Zimmerberg und Chernomordik, 1999). Hierfür ist insbesondere die Verdrängung von Wassermolekülen zwischen den Membranen notwendig. Dabei kann eine stark ausgebildete Glykokalix oder ein dichter „endothelial surface layer“ an der Oberfläche der Zellen eine ausreichende Annäherung der Liposomen an die Zielmembran erschweren oder verhindern (Cevc und Richardson, 1999).

Durch die Annäherung der Lipiddoppelmembranen entstehen kleine, lokalisierte Kontaktpunkte, welche erstmals von Hui et al. (1981) in einer elektronenmikroskopischen Studie sichtbar gemacht wurden.

Der Annäherung muss nun eine Veränderung der Membrangeometrie folgen, um eine Fusion beider Membranen zu ermöglichen. Zimmermann und Chernomordik (1999) beschreiben folgenden Mechanismus für die Fusion: zunächst bildet sich an der lokal begrenzten Kontaktstelle eine stielähnliche Struktur, welche die Membran des Akzeptorvesikels, der Zelle, mit dem Donorvesikel, dem Liposom, verbindet. Aus den beiden angrenzenden Lipiddoppelmembranen bildet sich eine einzelne Doppelmembran aus. Dieser Schritt wird als Hemifusion bezeichnet. Es folgt die Bildung einer lokal begrenzten Fusionspore. Abschließend wird die sogenannte Donormembran, die Liposomenmembran, vollständig in die sogenannte Akzeptormembran, also die Zellmembran, integriert. Hierbei wird der gesamte Inhalt des fusionierten Donorvesikels in das Innere des Akzeptors freigesetzt.

Cevc und Richardson (1999) weisen ebenfalls auf diesen Mechanismus der Membranfusion hin. Sie beschreiben jedoch, dass eine Membranverschmelzung immer im Bereich von Defekten der fusionierenden Membranen auftritt. Membrandefekte sind lokale Störungen in

der Geometrie der ausgebildeten Lipiddoppelschicht. Eine Anhäufung von Membrandefekten im Kontaktbereich der Membranen fördert eine Fusion. Dies belegen sie vor allem damit, dass bei frisch hergestellten, defektreicheren Lipidvesikeln eine höhere Fusionsrate beobachtet werden kann als bei alten, defektarmen Lipidvesikeln. Finden sich Defekte in der Donor- und der Akzeptormembran in direkter Nachbarschaft, so wird eine Phasenverschiebung der Lipidschichten begünstigt und eine Insertion des Vesikels in die Akzeptormembran kann erfolgen. Hierbei können auch Inhaltsstoffe aus dem wässrigen Innenraum der fusionierenden Vesikel in das umgebende Milieu austreten, da die Umstrukturierung der Lipidschichten ungeordnet ist (Cevc und Richardson, 1999).

Bei Lipoplexen (Komplexe von meist kationischen Liposomen mit Nucleinsäuren) findet während der Fusion eine Phasenverschiebung von der lamellären Phase mit ausgebildeter Lipiddoppelmembran zur hexagonalen Phase statt (Zuhorn und Hoekstra, 2002). In der hexagonalen Phase lagern sich die Lipide zylinderförmig aneinander. Hierbei weisen die hydrophilen Teile entweder alle ins Zentrum des Zylinders oder alle nach außen. Diese Lipidzylinder lagern sich zu größeren Schichten zusammen, so dass Stapel dieser Zylinder entstehen (Lasic, 1998).

Durch die bei einer Phasenverschiebung auftretende Umstrukturierung der Lipidmoleküle wird die Fusion ermöglicht. Verschiedenste Faktoren begünstigen die Ausbildung der hexagonalen Phase. So wird durch die Integration des Lipides Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) in die Liposomenmembran diese Phasenverschiebung begünstigt (Zuhorn et al., 2002c; Smisterova et al., 2001). Aber auch die Ladungsneutralisierung von kationischen Liposomen durch anionische Phospholipide fördert die Transformation zur hexagonalen Phase, wenn ein neutrales Ladungsverhältnis erreicht wird (Lewis und McElhaney, 2000; Xu und Szoka, 1996; Zelphati und Szoka, 1996). Als anionisches Lipid findet sich in der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran häufig Phosphatidylserin, welches mittels Flip-Flop-Mechanismus den kationischen Lipiden als Konterpart gegenübergestellt wird. Beim Flip-Flop-Mechanismus springt ein Lipid aus einem Monolayer in ein benachbartes Monolayer um, so zum Beispiel von der äußeren in die innere Zellmembran oder von der zytoplasmatischen, äußeren Membran eines Endosoms in die innen liegende Membran (Pedroso de Lima et al., 2001; Xu und Szoka, 1996; Zelphati und Szoka, 1996). Diese Durchmischung der Lipide aus den angrenzenden Lipidschichten einer Lipiddoppelmembran führt zu einer Membrandestabilisierung. Dies könnte nach Xu und Szoka (1996) auch für die beobachtete Zytotoxizität von Lipoplexen verantwortlich sein. Durch Wechselwirkungen kationischer Liposomen mit dem anionischen Lipid Cardiolipin der Mitochondrienmembran könnte das Mitochondrium eine irreversible Schädigung erfahren. Da Mitochondrien eine Vielzahl wichtiger Funktionen für den Stoffwechsel der Zelle besitzen, führt eine Schädigung der Mitochondrien zum Tod der Zellen (Xu und Szoka, 1996).

Die Fusion zwischen Lipiddoppelmembranen wird durch zahlreiche Faktoren gefördert. Eine Induktion der Fusion erfolgt physikalisch bei Erhöhung der Temperatur und durch stärkere Krümmung der fusionierenden Membranen, da die Stabilität der Lipidmembran herabgesetzt wird. Chemische Faktoren, welche die Fusion beeinflussen, sind (De-)Protonierung, (De-)Hydrierung und Ladungsneutralisierung. Auch fusogene Lipide wie DOPE oder fusogene Proteine können die Fusion katalysieren (Kakudo et al., 2004; Smisterova et al., 2001; Cevc und Richardson, 1999; Zimmerberg und Chernomordik, 1999; Bailey und Cullis, 1997).

Bailey und Cullis (1997) beobachteten, dass die Fusion kationischer Liposomen mit Membranen durch die Anwesenheit von Serum vollständig gehemmt wird. Eine Wechselwirkung von Serumkomponenten mit kationischen und anionischen Liposomen konnte in mehreren in vivo und in vitro Studien nachgewiesen werden (Senior et al., 1991; Chonn et al., 1992).

Es wurden verschiedene Fusionsassays auf der Grundlage fluoreszierender Marker etabliert, mittels derer eine Quantifizierung der Fusion möglich ist (Düzgünes, 2003; Scott et al., 2003)

2.3.3.2. Endozytose

Endozytose ist der am häufigsten beschriebene Weg der Aufnahme der Liposomen in die Zelle (Chang et al., 2009; Dass und Choong, 2006; Pedroso de Lima et al., 2001; El Ouahabi et al., 1997). Hierbei kann Endozytose durch Rezeptoren vermittelt werden, insbesondere wenn an die Oberfläche der Liposomen Liganden zum Zwecke des Targeting integriert wurden (Chang et al., 2009; Arangoa et al., 2003; Gijssens et al., 2002; Koning et al., 2002; Voinea et al., 2002; Huang et al., 1992; Barratt et al., 1986; Hong et al., 1983). Beispiele für eine Rezeptor-vermittelte Endozytose sind die Clathrin-vermittelte Endozytose und die Caveolae-vermittelte Endozytose. Zellen wie Makrophagen, Monozyten und polymorphkernige Granulozyten können als spezifischen Weg der Endozytose auch die Phagozytose nutzen, um die Liposomen in die Zelle aufzunehmen (Scieszka et al., 1991). Eine weitere Form der Endozytose ist die Pinozytose. Hierbei haften die kleineren Moleküle und Ionen an der Membran an, durch Kontraktion des angrenzenden Zytoskeletts wird das Material in einem Vesikel abgeschnürt und in die Zelle aufgenommen (Kee et al., 2004).

2.3.3.2.1. Phagozytose

Im Rahmen der Phagozytose werden meist größere Partikel ab einem Durchmesser von ca. 1 µm aufgenommen (Voigt und Guillén, 1999; Huong et al., 1998). Das zu phagozytierende Material bindet über Rezeptoren an die Zellmembran (Brown, 1995). Es werden zwei Mechanismen der Phagozytose diskutiert, die Zipper-Methode (Reißverschluss-Methode) und die Trigger-Methode.

Bei der Zipper-Methode erfolgt das Umschließen des Partikels nach initialer Rezeptorbindung durch fortschreitende Anbindung von zellmembranständigen Rezeptoren an dem anhaftenden Partikel, bis dieser schließlich vollständig umschlossen ist. Dieser Mechanismus ist für die Aufnahme von Erythrozyten und Bakterien über Fc-γ-Rezeptoren und Komplementfaktor-3-Rezeptoren verantwortlich.

Bei der Trigger-Methode wird durch die initiale Bindung des Partikels an den Phagozytoserezeptor die Ausbildung von Pseudopodien induziert, die den Partikel umschließen. Dabei tritt eine deutliche Kräuselung der Membran auf. Das Zytoskelett der Pseudopodien wird durch die Polymerisation von Aktinmolekülen zu einem Netzwerk gebildet. Dieser Mechanismus der Phagozytose wird beispielsweise bei der Aufnahme von *Salmonella typhimurium* beobachtet (Swanson und Baer, 1995).

Der gebildete Vesikel mit enthaltenem Partikel (Phagosom) schnürt sich von der Membran ab, hierbei scheinen Wechselwirkungen zwischen Aktin und Myosin die erforderliche Energie für die Abschnürung zu liefern (Voigt und Guillén, 1999). Die Phagosomen fusionieren intrazellulär mit Lysosomen zu Phagolysosomen, der Inhalt wird mittels Enzymen abgebaut oder innerhalb der Zelle gelagert.

Die Phagozytose wird durch Opsonierung mit Serumbestandteilen gefördert (Huong et al., 1998). Binden Komplementfaktoren aus dem Serum an die Liposomen, so vermitteln sie über ihr Fc-Fragment die Phagozytose (Nagayasu et al., 1999). Bedingt durch die Phagozytose ist die Plasmahalbwertszeit der Liposomen oftmals reduziert (Drummond et al., 1998; Lasic, 1998). Bei sterisch stabilisierten Liposomen ist die Anheftung von Serumbestandteilen an die Lipide durch die gebundenen hochmolekularen Stoffe erschwert, die Phagozytoserate somit vermindert und die Plasmahalbwertszeit der Liposomen erhöht (Lasic, 1998; Papahadjopoulos et al., 1991). Dieser Effekt verliert sich jedoch bei wiederholten Injektionen sterisch stabilisierter Liposomen. Bisher konnte dieses Phänomen jedoch noch nicht erklärt werden (Bendas et al., 2003).

Da für die Phagozytose die Ausbildung eines Aktinnetzwerkes notwendig ist, kann durch Hemmung der Aktinpolymerisation die Phagozytose gehemmt werden. Hierfür wurde unter anderem Cytochalasin eingesetzt (Rückert et al., 2003).

2.3.3.2.2. Clathrin-vermittelte Endozytose

Diese Form der Rezeptor-vermittelten Endozytose wird oft im Zusammenhang mit der zellulären Liposomenaufnahme beschrieben (Rückert et al., 2003; Zuhorn et al., 2002a; Kessner et al., 2001; Thurston et al., 1998; Friend et al., 1996).

Bei der Clathrin-vermittelten Endozytose binden die Liganden (z.B. Liposomen) an Oberflächenrezeptoren der Zellmembran. Mehrere dieser Rezeptor-Ligand-Komplexe reichern sich in einem Bereich der Membran an. Dieser Prozess wird als cluster-formation bezeichnet. Es wird nun Clathrin, ein zelleigenes Protein, an Rezeptoren (Adapterproteine, AP) in diesem Membranbereich angelagert (Owen, 2004; Geli und Riezman, 1998) Dadurch entsteht ein im Elektronenmikroskop typisches Bild mit sogenannten „Spikes“ im Bereich des „Clathrin-Coat“.

Durch die Anlagerung des Clathrins erfolgt die Invagination des Membranabschnittes und die Abschnürung dieser „Clathrin-coated pits“ zu „Clathrin-coated“ Vesikeln. Diese Vesikel verlieren intrazellulär im Prozess des „Shedding“ ihre Clathrinhülle und verschmelzen anschließend meist mit Lysosomen. Das Clathrin steht nun erneut bereit zur Anlagerung an die Zellmembran, der endozytierte Inhalt im Endolysosom wird abgebaut. Die Clathrin-coated Vesikel können ihren Inhalt aber auch wieder zurück an die Zelloberfläche (Recycling) oder zum Golgi-Apparat transportieren (Owen, 2004).

Für viele Stoffe wurde eine zelluläre Aufnahme mittels Clathrin-vermittelter Endozytose nachgewiesen, so beispielsweise für Transferrin und Cholesterol. Die Rezeptoren der Low Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptor-Familie binden Cholesterol und vermitteln die Endozytose über Clathrin-coated Vesikel. Für diese Rezeptorfamilie wurde auch eine Beteiligung an der Rezeptor-vermittelten Endozytose verschiedener Arzneistoffe, wie Aminoglykosiden, anionischen Liposomen oder Cyclosporin A postuliert (Chung und Wasan, 2004; Lakkarayu et al., 2002).

Die Clathrin-vermittelte Endozytose wurde von mehreren Arbeitsgruppen als Aufnahmemechanismus für Liposomen bzw. Lipoplexe in die Zelle beschrieben. Sowohl transmissionselektronenmikroskopisch (Thurston et al., 1998; Friend et al., 1996) als auch durch Einsatz von spezifischen Hemmstoffen der Clathrin-vermittelten Endozytose in Fluoreszenzversuchen, wurde eine Beteiligung der „Clathrin-coated pits“ an der Liposomenaufnahme nachgewiesen (Rückert et al., 2003; Kessner et al., 2001). Insbesondere bei Verwendung von Immunliposomen und anderen zielgerichteten Liposomen wurde dieser Weg häufig beschränkt, da hierbei die Aufnahme durch Bindung an spezifische Rezeptoren gefördert wird (Bendas et al., 2003).

Eine Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose kann durch chemische Reduktion des Cholesterol-Gehaltes der Zelle hervorgerufen werden, da Cholesterol für die Abschnürung der Vesikel benötigt wird. Dies wird unter anderem durch Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin erreicht (Nir und Nieva, 2003). Als weitere Hemmstoffe für die Clathrin-vermittelte Endozytose wurden Chlorpromazin, Phenylarsenoxid (PAO) und Amantadine beschrieben (Reijmann et al., 2004; Rückert et al., 2003; Nir und Nieva, 2003). PAO hemmt die Clathrin-vermittelte Endozytose durch Quervernetzung des Clathrin-coats. Amantadine stabilisieren die Clathrin-coated Vesikel und hemmen somit die Endozytose (Rückert et al., 2003). Chlorpromazin hemmt, laut Reijmann et al. (2004), diese Form der Endozytose, indem es die Prozessierung des Clathrins verhindert. Weiterhin wurde durch Reduktion des Kalium-Gehaltes der Zelle die Clathrin-vermittelte Endozytose gehemmt. Hierfür wurden die Zellen in hypotonem Medium inkubiert (Reijmann et al., 2004; Nir und Nieva, 2003).

2.3.3.2.3. Caveolae-vermittelte Endozytose

Auch der Prozess der Caveolae-vermittelten Endozytose ist Rezeptor-vermittelt. Caveolae sind spezifische Membraneinstülpungen, die eine typische Flaschenform (flask-shaped) besitzen und in ihrer Größe sehr einheitlich sind (50-100nm) (Hansen und Nichols, 2009; Bathori et al., 2004; Reijmann et al., 2004). Erstmals beschrieb Palade (1953) diese charakteristischen Plasmamembranformationen an Endothelzellen. In Abhängigkeit von der Endothelauskleidung (durchgängig, fenestriert, mit Poren) kommen diese bei Endothelzellen

besonders häufig vor und sind für die Transzytose verantwortlich. Transzytose bezeichnet den Transport von Molekülen mittels Vesikeln von der luminalen zur abluminalen Seite durch die Endothelzelle hindurch. Caveolae konnten in allen Zelltypen nachgewiesen werden (Minshall et al., 2002; Stan, 2002).

Die Membran der Caveolae ist reich an Cholesterol, Sphingolipiden und dem Protein Caveolin (Rejmann et al., 2004). Insbesondere beim Messenger-Signalling, der interzellulären Kommunikation mittels Botenstoffen, spielen Caveolae eine große Rolle (Mineo und Anderson, 2001; Nir und Nieva, 2003; Anderson, 1993).

Caveolae liegen oftmals in Clustern zusammen. Sie können fusionieren und transzelluläre Kanäle bilden. Diese werden auch vesiculo-vacuoläre Organellen (VVO) genannt und bilden unter Umständen ein sehr weitreichendes Netzwerk, das auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurde (Stan, 2002; Mineo und Anderson, 2001).

Die Caveolae können sich vollständig von der Membran abschnüren oder sich durch Ausbildung einer Proteinbarriere vom Extrazellulärraum abgrenzen (Stan, 2002). Insgesamt werden vier verschiedene intrazelluläre Bahnen für die abgeschnürten Vesikel (Caveosom) beschrieben. Mineo und Anderson (2001) fassen sie unter dem Namen „Potozytose“ zusammen.

Die Caveosomen können entweder ihren Inhalt ins Zytoplasma freisetzen oder zu anderen Zellorganellen transportieren, insbesondere zum endoplasmatischen Retikulum. Eine aktuelle Studie wies Caveolin-1 in der Membran des endoplasmatischen Retikulum nach (Robenek et al., 2004). Weiterhin können die Caveosomen mit ihrem Inhalt als Sequester in der Zelle liegen bleiben oder zur gegenüberliegenden Membran transportiert werden (Minshall et al., 2002). Eine direkte Verschmelzung der Caveosomen mit Lysosomen findet nicht statt (Bathori et al., 2004; Mineo und Anderson, 2001), jedoch können die Caveosomen mit Clathrin-coated Vesikeln fusionieren. Somit ist eine Verbindung zum „Clathrin-coated Pathway“ gegeben (Mineo und Anderson, 2001).

Trotz der relativ geringen Größe der Caveolae können auch größere Partikel auf diesem Weg in die Zelle aufgenommen werden. Das Virus SV 40 nutzt diesen Weg in die Zelle. Es entgeht damit aufgrund fehlender Verschmelzung mit Lysosomen den Abwehrmechanismen der Zelle (Rejmann et al., 2004).

Als Hemmstoffe für die Caveolae-vermittelte Endozytose wurden beispielsweise Filipin und Genistein eingesetzt (Rejmann et al., 2004). Auch die Reduktion des Cholesterol-Gehaltes der Zellen hemmt diese Form der Endozytose, da Cholesterol für die Stabilisierung der Membranen der Caveolae benötigt wird (Rejmann et al., 2004; Stan, 2002).

2.3.4. Therapeutisches Potential der Liposomen

Liposomen werden im therapeutischen Bereich als Trägermoleküle für Wirkstoffe (Arzneimittel und Impfstoffe), DNA-Komplexe, Fluoreszenzfarbstoffe und Schwermetalle eingesetzt (Huywer et al., 2008; Dass und Choong, Immordino et al., 2006; 2006; Dass, 2004; Stone und Smith, 2004; Wu et al., 2004; Brill, 2002; Gijssens et al., 2002; Zho, 2002; Freeman et al., 1983). Hierbei zeigt sich je nach Eigenschaften der Liposomen ein spezifisches Organverteilungsmuster (Kostarellos et al., 2004; Gabizon et al., 2003) und unterschiedliche Plasmahalbwertszeiten (Simberg et al., 2003; Düzgünes und Nir, 1999; Nagayase et al., 1999; Oku et al., 1999). Da sich Liposomen aus Molekülen zusammensetzen, die natürlicherweise in Säugetierzellen vorkommen, können ihre Bestandteile durch die Zelle abgebaut werden. Somit gewährleisten sie eine hohe Bioverträglichkeit und eine geringe Toxizität (Drummond et al., 1999). Insbesondere im Rahmen des Gentransfers und des Drug Targeting wird der Einsatz von Liposomen intensiv erforscht.

2.3.4.1. Gentransfer mittels Liposomen

Für den Gentransfer mittels Liposomen, der sogenannten Lipofektion, haben sich besonders kationische Liposomen bewährt. Aufgrund ihrer positiven Oberflächenladung bilden sie stabile Komplexe mit der negativ geladenen DNA (Almofti et al., 2003; Hein et al., 1998;

Teifel und Friedl, 1995; Gao et al., 1994; Felgner et al., 1994; Düzgünes und Felgner, 1993; Gershon et al., 1993).

Die DNA-Liposomen-Komplexe werden zunächst an die Zelle gebunden und dann von ihr aufgenommen (Cao et al., 2000). Dies kann durch Fusion oder Endozytose erfolgen. Eine Aufnahme durch Endozytose ist Bedingung für eine erfolgreiche Transkription. Nach Fusion der Komplexe mit der Zellmembran ist eine Korrelation zwischen Fusionsrate und Transkriptionsrate nicht nachweisbar (Zuhorn et al., 2002a). Die Endozytose der Lipoplexe erfolgt Rezeptor-vermittelt (Zuhorn et al., 2002a; Friend et al., 1996). Aus den Endosomen der Zelle müssen die Komplexe durch Fusion mit der endosomalen Membran im Zytoplasma freigesetzt werden, um ihre Wirksamkeit entfalten zu können (Almofti et al., 2003, El Ouahabi et al., 1997). Hierfür wurden pH-sensitive Liposomen entwickelt. Da in den Endosomen ein niedriger pH-Wert vorherrscht, wird eine Phasenverschiebung der Lipidmembran und somit die Fusion begünstigt. Weiterhin wurde die Phasenverschiebung durch Integration fusionsfördernder Lipide oder Proteine gefördert (Subramanian et al., 2002; Zuhorn et al., 2002b; Pedroso de Lima et al., 2001; Farhood et al., 1995).

Nach Dissoziation von den Lipidbestandteilen kann der Transport der DNA in den Zellkern erfolgen, wo sie in der Folge zur Transkription bereitsteht (Cao et al., 2000, Zuhorn et al., 2002b; Zabner et al., 1995).

Insbesondere bei in vitro Versuchen wurden mittlerweile gute Transkriptionserfolge mittels Lipofektion erzielt. In vivo ist die Transkriptionsrate jedoch meist deutlich geringer (Miyano-Kurosaki et al., 2004; Nakamura et al., 2004). Im Körper kommt es zu Wechselwirkungen mit Lipoproteinen aus dem Blut und zu einer Vermischung der Lipidbestandteile der Lipoplexe mit denen der Lipoproteine, wodurch die Transfektionseffizienz deutlich vermindert wird (Tandia et al., 2005; Zuhorn et al., 2002c). Auch viele weitere Faktoren beeinflussen in vivo die Transkriptionseffizienz. So wiesen Baatz et al. (2001) eine Verringerung der Transfektionseffizienz durch den Tumor Necrosis Factor- alpha (TNF- α) nach. Auch einige Glykosaminoglykane der Glykokalix, wie beispielsweise Heparansulfat und Chondroitinsulfat behinderten eine effektive Transfektion von Zellen. Dies beruht wahrscheinlich auf einer durch diese Bestandteile der Glykokalix vermittelten Internalisierung in Zellkompartimente, welche die DNA nicht zur Transkription zur Verfügung stellen (Ruponen et al., 2004).

Faneca und Mitarbeiter (2004) wiesen hingegen eine Steigerung der in vivo Effizienz der Transfektionsrate durch Assoziation von Albumin oder Protamin an die Lipoplexe nach, welche deren Resistenz gegenüber dem Serum steigert. Eine Erhöhung der Transkriptionsrate wurde von mehreren Gruppen durch Verwendung zielgerichteter Liposomen erreicht (Arango et al., 2003). Zudem wurde mittels Stabilisierung der Liposomen durch PEG-Polymere die Effizienz der Transkription in vivo gesteigert (Maeda et al., 2004).

2.3.4.2. Drug Targeting mittels Liposomen

Beim Drug Targeting, welches aktiv oder passiv erfolgen kann, wird durch spezifische Modifizierung der Liposomen die Anreicherung in bestimmten Zielgeweben und -zellen gefördert. Werden diese zielgerichteten Liposomen nun mit Wirkstoffen beladen, so erfolgt eine höhere Anlieferung zu den Zielzellen, wodurch Nebenwirkungen vermindert werden (Chang et al., 2009; Dabbas et al., 2008; Drummond et al., 1999; Harashima und Kiwada, 1999). Durch die liposomale Verpackung und die gezielte Freisetzung am Wirkort kann die Menge des applizierten Wirkstoffes erhöht werden (Chang et al., 2009; Harashima et al., 1999).

Liposomen besitzen eine geringe Toxizität, da sie aus Baustoffen bestehen, welche natürliche Bestandteile der Säugetierzellen darstellen (z.B. Phospholipide, Cholesterol). Somit kann der Carrier nahezu vollständig verstoffwechselt werden (Drummond et al., 1999).

Insbesondere in der Tumorthherapie mittels Chemotherapeutika kommen Liposomen vielfach zum Einsatz (Petre und Dittmer, 2007; Immordino et al., 2006; Dubey et al., 2004, Sætern et al., 2004; Lee et al., 2002). So gibt es bereits mehrere kommerziell erhältliche

liposomale Formulierungen, welche die Chemotherapeutika Paclitaxel oder Doxorubicin als Wirkstoff enthalten (Eichhorn et al., 2006; Eliaz et al., 2004; Kunstfeldt et al., 2003; Zhou et al., 2002a; Oku et al., 1999). Auch die Anreicherung von Liposomen mit photoaktiven Substanzen und eine anschließende Bestrahlung des Patienten zur Induktion des Tumorzelluntergangs wird erforscht (Canete et al., 2004; Derycke et al., 2004). Stover und Kester (2003) unterdrückten das Tumorwachstum von Brustkarzinomen durch Liposomen welche Apoptose-induzierende Ceramide enthielten. Zudem wurden Liposomen mit anti-angiogenen Substanzen wie beispielsweise Angiostatin beladen, um eine anti-angiogene Therapie zur Unterdrückung des Tumorwachstums einzuleiten (Sacco et al., 2000).

Durch **aktives Targeting** zu Endozytoserezeptoren kann die Internalisierung der Liposomen durch die Zielzellen gefördert werden (Hölig et al., 2004; Lukyanov et al., 2004; Everts et al., 2003; Harigai et al., 2001). Ein aktives Targeting erfolgt über Funktionalisierung der Liposomen mittels Liganden. Hier werden insbesondere Kohlenhydrate, Proteine und Immunglobuline eingesetzt. Diese werden kovalent an die Liposomen gebunden (Engel et al., 2003; Kamps et al., 1997) und vermitteln eine spezifische Bindung an Oberflächenstrukturen der Zielzellen.

Ein großer Bereich moderner Forschung im Drug Targeting beschäftigt sich mit der Identifikation von Oberflächendeterminanten auf den Zielzellen, welche sich signifikant qualitativ oder quantitativ von dem umgebenden Gewebe unterscheiden (Huywer et al., 2008; Maruyama et al., 1999). Die Oberflächenantigene im Zielgebiet werden zur Targetierung genutzt. So wurden in Entzündungsgebieten spezielle Adhäsionsmoleküle (Selektine) identifiziert und gezielt durch Liposomen angesteuert (Bendas et al., 1998; Spragg et al., 1997). Tumoren präsentieren verschiedene spezifische Oberflächenantigene wie z.B. CD 44 und RHAMM zur Bindung von Hyaluronsäure, die sich als Zielrezeptoren anbieten (Eliaz et al., 2004; Peer und Margalit, 2004). In Endothelzellen wurde die Expression von Integrinen und anderen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, PECAM-1) als Schlüsselrezeptoren ausgenutzt (Hölig et al., 2004; Muzykantov, 2001).

Beim **passiven Targeting** erfolgt die Anreicherung der Liposomen im spezifischen Gewebe durch körpereigene Mechanismen. Die Liposomen werden als körperfremde Strukturen erkannt, im Blut zunächst durch Anheftung von Immunglobulinen oder Komplementfaktoren verändert und anschließend von Zellen des mononukleären Phagozytosesystems (MPS) aufgenommen. Dadurch ergibt sich eine Anreicherung in den Zellen des MPS (Huywer et al., 2008; Medina et al., 2004; Maruyama et al., 1999; Nagayase et al., 1999; Papahadjopoulos et al., 1991). Hierbei spielt auch die Größe der Liposomen eine Rolle. Mit zunehmender Größe werden die Liposomen schneller phagozytiert (Maeda et al., 2000; Nagayase et al., 1999).

Zudem kann durch die Flusseigenschaften des Blutes in Tumoren oder Entzündungsgebieten eine passive Anreicherung erfolgen (Zhou et al., 2002). Hierbei ist vor allem die lokal erhöhte Permeabilität des Gefäßendothels bedeutsam, wodurch ein Austritt der Liposomen aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe erleichtert wird (Nagayase et al., 1999; Huang et al., 1993). Durch den permeabilitätsbedingt verringerten kolloidosmotischen Druck bleiben die Liposomen außerhalb der Blutbahn. Zudem berichteten Nagayasu et al. (1999), dass sich Liposomen ab einer Größe von 100 nm im kollagenen Fasernetzwerk des Tumorinterstitiums verfangen.

Auch für kationische Liposomen konnte eine spezifische Anreicherung in den Endothelzellen des kapillären Gefäßnetzwerkes in Tumoren und Entzündungsgebieten beobachtet werden (Dass und Choong, 2006; Dass, 2004; Thurston et al., 1998).

2.3.4.3. Diagnostik mittels Liposomen

In der Diagnostik werden mit Fluoreszenzfarbstoffen oder mit radioaktiven Substanzen beladene Liposomen eingesetzt. Durch die speziellen Organverteilungsmuster der eingesetzten Liposomen können beispielsweise Aussagen über das Vorhandensein von Metastasen oder über das Ausmaß entzündeten Gewebes getroffen werden (Immordino et al., 2006; Laverman et al., 1999). In der Szintigraphie wurden mit Technetium markierte anionische Liposomen zur Visualisierung von Abszessen eingesetzt. Für andere

inflammatorische Prozesse wie sterile Infektionen, Arthritis, Lungenentzündungen, akute Kolitis oder Osteomyelitis wurde die Verwendung radioaktiver Markersubstanzen beschrieben (Lavermann et al., 1999).

2.3.5. Zytotoxizität von Liposomen

Liposomen bestehen aus natürlich in Säugerzellen vorkommenden Molekülen. Damit ist eine geringe Toxizität zu erwarten. Dennoch wurde in vielen Studien zur Lipofektion ein zytotoxischer Effekt beobachtet (Dabbas et al., 2008; Manosroi et al., 2008; Dass und Choong, 2006; Dass, 2004). Oft ließ sich jedoch nicht genau bestimmen, ob dieser durch den liposomalen Carrier oder die DNA verursacht wurde. Brill (2002) wies in einer Studie zur Inhibition der Angiogenese mittels Doxorubicin-beladener Liposomen jedoch eindeutig auch für die unbeladenen Liposomen eine Erhöhung des Zelluntergangs nach. Auch in anderen Studien konnte ein zytotoxischer Effekt unbeladener Liposomen beobachtet werden. Dieser war abhängig von der elektrischen Ladung an der Oberfläche der Liposomen. So weisen elektrisch geladenen Liposomen höhere zytotoxische Potentiale auf als neutrale Liposomen, wobei wiederum anionische Liposomen stärker zytotoxisch sind als kationische Liposomen. Aber auch innerhalb der Gruppe der kationischen Liposomen variiert das zytotoxische Potential mit den verwendeten kationischen Lipiden (Dabbas et al., 2008; Manosroi et al., 2008)

Für den therapeutischen Einsatz ist die Abklärung der liposomalen Toxizität bedeutsam. In geringer Dosis sind die schädigenden Eigenschaften der Lipide laut Drummond et al. (1999) eher vernachlässigbar. Bei hohen Lipiddosen, wie sie durch wiederholte Injektionen entstehen können, gewinnt die Lipidtoxizität an Bedeutung.

Obwohl die Bauteile der Liposomen überwiegend natürlichen Ursprungs sind, beeinflussen die Lipidbestandteile der Liposomen die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle. Beispielsweise induzieren anionische Liposomen in Zellen die Bildung von Interleukin 12 (IL-12) und Interferon γ (IFN- γ) (Yatsumoto et al., 2004). Verschiedene Phosphatidylcholone hemmen die Expression des Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) in aktivierten Endothelzellen (Baker et al., 2000).

Die applizierten Liposomen binden verschiedene Proteine. Dabei spielt die Lipidzusammensetzung der Liposomen eine Rolle. Diese Prozesse führen zu einer Veränderung der Homöostase und können die Zytotoxizität bedingen (Dabbas et al., 2008; Drummond et al., 1999; Chonn et al., 1992).

Mehrfach konnte die Zytotoxizität von Liposomen bei verschiedenen Zellen auf eine Induktion von Apoptose zurückgeführt werden. So führte die Inkubation von Liposomen mit HL-60 Zellen, einer standardisierten, humanen Leukämiezelllinie, zu einer Inhibition des tumorösen Wachstums dieser Zellen durch Apoptose-Induktion (Imamura et al., 1997). Bei Lipofektion wurde das Auftreten von Apoptose in den transfizierten Zellen beobachtet (Bednarek et al., 2002).

Aramaki et al. (1999) führten die von ihnen beobachtete durch kationische Liposomen verursachte Zytotoxizität ebenfalls auf eine Induktion der Apoptose zurück. Durch Nachweis von DNA-Bruchstücken konnten sie das Vorkommen von Apoptose nach Inkubation mit kationischen Liposomen belegen. Dabei wiesen sie auch einen erhöhten Gehalt an Radikalen (reaktive oxygen species, ROS) in den apoptotischen Zellen nach (Aramaki et al., 2000). In weiterführenden Studien zeigten Aramaki et al. (2001), dass hierbei der Mitochondrien-vermittelte Weg der Apoptose eingeschlagen wird. Die vermehrte Bildung von Radikalen führt zu einer Schädigung der Mitochondrien mit Freisetzung von Cytochrom c als Messenger der Apoptose. Die Bildung der Radikale wurde durch die Aktivierung der Lipoxygenase induziert (Aramaki et al., 2001; Takano et al., 2001). Größe der Liposomen, Konzentration, Ladung und Inkubationsdauer waren Faktoren, für die ein Einfluss auf das Auftreten der Apoptose nachgewiesen wurde (Takano et al., 2003). Es zeigte sich, dass nicht jeder Zelltyp gleichermaßen sensibel auf Liposomen reagiert. Makrophagen waren besonders empfänglich, während andere Zelltypen keine Apoptoseinduktion aufwiesen (Aramaki et al., 2000; Aramaki et al., 1999).

3. Materialien

3.1 Zellen

Zellen	Herkunft
HMVEC	Endothelzellen aus der Haut einer 18-jährigen Frau Fa. Oligene (Berlin), ehemals Cell Lining
BCI Rcobble	Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung vom Rind Prof. Dr. J. Plendl, Institut für Veterinär-Anatomie, FU Berlin (Berlin)
MHEC5	Endothelzellen aus dem Herzmuskel von Mäusen Prof. Dr. J. Plendl, Institut für Veterinär-Anatomie, FU Berlin (Berlin)
S180	Murine Fibrosarkomzellen Prof. R. Auerbach, University of Wisconsin (Madison/USA)

3.2 Zellkulturmedien

3.2.1 Medien und Supplemente

Medium/Supplement	Firma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)	Becton-Dickinson, Heidelberg
BME-Vitamine (Basal Medium Eagle Vitamine Solution)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
MECGM (Microvascular Endothelial Cell Growth Medium)	Oligene, Berlin
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
FBS	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

3.2.2 Zusammensetzung des Erhaltungsmediums DMEM+ zur Kultivierung muriner Endothel- und Fibrosarkomzellen

Medium/Supplement	Menge
L-Glutamin	1 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
FBS	10 %
DMEM	88 %

3.2.3 Zusammensetzung des Selektivmediums P0 zur Kultivierung boviner Endothelzellen

Medium/Supplement	Menge
BME-Vitamine	1 %
Heparin	1 %
ECGS	2 %
FBS	10 %
S180-konditioniertes Medium	20 %
DMEM+	66 %

3.2.4 Zusammensetzung des Selektivmediums MECGM zur Kultivierung humaner Endothelzellen

<i>Medium/Supplement</i>	<i>Menge</i>
EGF	0,1 % (10 ng/ml)
Hydrocortison	0,1 % (1 ug/ml)
Gentamicin	0,1 % (50 ng/ml)
Amphotericin B	0,1 % (50 ug/ml)
ECGS/Heparin	0,4 %
Fetal Calf Serum	5 %
Endothelial Cell Basal Medium	94,2 %

3.2.5. Zusammensetzung des Einfriermediums

<i>Medium/Supplement</i>	<i>Menge</i>
Kultivierungsmedium	90 %
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10 %

3.3 Liposomen

<i>Liposomencharge</i>	<i>Label</i>	<i>Hersteller</i>
SI 295	Rhodamin	Munich Biotech AG, Martinsried
TM 235	ohne Label	Munich Biotech AG, Martinsried
SN 307	Nanogold	Munich Biotech AG, Martinsried
SN 334	Nanogold	Munich Biotech AG, Martinsried
SN 230	Nanogold	Munich Biotech AG, Martinsried

3.4 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Aceton	Biesterfeld, Dahlwitz-Hoppegarten
Agar	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Alcian Blue 8GX	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua Polymount	Polysciences Inc., Warrington, USA
Azur II	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Bacto Gelatine	Difco Laboratories, Detroit, USA
Borax-Lösung	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
DDSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DMP-30	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DMSO	ICN Biomedicals, Eschwege
Epon-Glycidether	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Fluorostab	ICN Pharmaceuticals, Ohio
Giemsa-Lösung	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Glutaraldehyd	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
LI Silver	Nanoprobes, Yaphank, USA
Lysin	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Methanol	Th. Geyer GmbH, Berlin
Methylenblau	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
MNA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumthiosulfat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Phosphate buffered Saline (PBS)	Biochrom, Berlin
Propylenoxid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Rutheniumrot	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Saccharose	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ultrostain I und II	Leica Microsystems, Wetzlar
Uranylacetat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

3.5 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

3.5.1 Standard-Lösungen

3.5.1.1 Cacodylatpuffer, 0,1M

Komponente	Menge
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	4,26 g
Aqua dest.	ad 100 ml
Salzsäure (0,1M)	einstellen auf pH 7,2 – 7,4

3.5.1.2 Karnovsky-Lösungen

Komponente	Menge
Paraformaldehyd	2 %
Glutaraldehyd	2,5 %
Cacodylatpuffer	95,5 %

3.5.1.3 Epon

Komponente	Menge
Epon-Glycidether	45,61 %
DDSA	28,13 %
MNA	24,78 %
DMP-30	1,48 %

3.5.1.4 Richardson-Lösungen

Komponente	Menge
Azur II-Lösung, 1%ig	25 %
Methylenblau, 1%ig	25 %
Borax-Lösung	50 %

3.5.1.5 Kontrastierungslösungen

Komponente	Menge
Osmiumtetroxid	1 %
Cacodylatpuffer (0,1M, pH 7,2-7,4)	99 %

3.5.2 Spezielle Lösungen für die Glykokalix-Färbung

3.5.2.1 Ruthenium-Rot

Komponente	Menge
Glutaraldehyd 25%	
Cacodylatpuffer	
Rutheniumrot	0,05%

3.5.3 Spezielle Lösungen für das Silver-Enhancement

3.5.3.1 0,05 M HEPES-Puffer mit 0,2 M Saccharose

Komponente	Menge
HEPES-Puffer (1 M)	5 ml
Saccharose	6,846 g
Aqua dest.	ad 100 ml
Salzsäure (0,1 M)	einstellen auf pH 5,8

3.5.3.2 Silver Enhancement

Komponente	Menge
Lösung A	50%
Lösung B	50%

3.5.3.3 Fixierlösungen mit Natriumthiosulfat

Komponente	Menge
HEPES-Puffer (1 M)	2 ml
Natriumthiosulfat	6,205 g
Aqua dest.	ad 100 ml
Salzsäure (0,1 M)	einstellen auf pH 7,4

3.6 Apoptose-Kit: Apo-Annexin V-FITC

Komponente	Hersteller
Annexin V-FITC	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Propidium Iodid	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Binding Buffer	BD Biosciences Clontech, Heidelberg

3.7 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Beemkapsel	PLANO, Marburg
Combitips plus	Eppendorf, Berlin
Glasplättchen 12 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Kanülen	Lehnecke, Schortens
Kodak Electron Microscope Film	Kodak, Stuttgart
Kryoröhrchen	
Kupfer- und Nickelgrids	PLANO, Marburg
Membranfilter	Eppendorf, Köln
Pasteurpipetten 150 mm	Th. Geyer Berlin, Berlin
Pipettenspitzen	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Köln
Serologische Einwegpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Spritzen	Lehnecke, Schortens
Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher & Schull, Dassel
24-Lochplatten	Iwaki, Tokio, Japan
6-Lochplatten	Iwaki, Tokio, Japan
Zellkulturschalen	Iwaki, Tokio, Japan
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Zefa Labortechnik, Harthausen
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Zefa Labortechnik, Harthausen

3.8. Geräte

Gerät	Hersteller
Autoclav H+P Varioclav 25 T	H+P Labortechnik AG (München)
Brutschrank INCO 2	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Eppendorf Multipipette Plus	Eppendorf, Köln
Eppendorf Pipetten Reference	Eppendorf, Köln
Fluoreszenzmikroskop Diaplan Leitz	Leica Microsystems, Wetzlar
Invert-Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mikroskop Nikon Optiphot 2	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroplatten-Reader Fluostar Optima	BMG LABTECH GmbH, Jena
Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
Pipettierhilfe Eppendorf Easypet	Eppendorf, Köln
Reinraumwerkbank BDK-S 100	Laborteam Schultheiss GmbH & Co. KG, München
Stickstofftank GT 38	Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf
Transmissionselektronenmikroskop EM 10CR	Zeiss, Jena
Ultramikrotom Ultracut E	Reichert-Jung, Wien, Österreich
Vakuumpumpe Laboport	Neo-Lab Migge Laborbedarf, Berlin
Videokamera Sony DXC 930P	Sony Deutschland GmbH, Köln
Videokamera Inteq 000610	Inteq, Berlin
Videokamera Nikon DXM 1200	Nikon GmbH, Düsseldorf
Wärmeschrank Memmert Modell 600	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge Varifuge RF	Heraeus Sepatech, Osterode

3.9. Software

Axiovision
 Lucia M
 WinFreeze
 ACT-1
 PASW Statistics 17.0

4. Methoden

4.1. Zellkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit den Zellkulturen wurden an einer Reinraumwerkbank in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Sämtliche Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden vor Gebrauch autoklaviert oder heißluftsterilisiert. Die verwendeten Lösungen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm).

Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37°C mit 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung kultiviert.

Alle mit humanen Zellen in Kontakt getretenen Materialien, Geräte und Lösungen wurden anschließend mit 90%igem Alkohol oder durch Autoklavieren sterilisiert.

Die Zellen wurden regelmäßig phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Das hierzu verwendete Invert-Mikroskop (Axiovert 25) war an eine PC-gesteuerte Videokamera (Inteq 000610) angeschlossen, die Fotodokumentation erfolgte mittels dieser Kamera und der Bildverarbeitungssoftware Axiovision.

4.1.1. Kultivierung der Endothelzellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte je nach Zielsetzung in unterschiedlichen Zellkulturschalen und unter Verwendung verschiedener Kultivierungsmedien. Die Endothelzellen wurden stets auf gelatinisierten Zellkulturschalen angezüchtet.

4.1.1.1. Gelatinieren der Zellkulturschalen

Zum Gelatinieren wurden die Zellkulturschalen mit 100 µl/cm² Gelatine (1,5% in 0,1-M-PBS, pH 7,4) überschichtet und für ca. 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Gelatine abgesaugt und die Zellkulturschale einmal mit 150 µl/cm² PBS gespült. Die gelatinisierten Platten wurden mit einigen Tropfen Kulturmedium überschichtet und bis zur weiteren Verwendung (maximal 1h) im Begasungsbrutschrank gelagert.

4.1.1.2. Kultivierung der murinen Sarkomzellen S180 und Gewinnung des S180-konditionierten Mediums

Die **murinen Sarkomzellen S180** wurden zur Gewinnung des konditionierten Mediums in P100-Schalen mit dem Nährmedium DMEM+ bis zum Farbumschlag von rot nach gelb kultiviert und dann mit frischem Medium versorgt. Das abgesaugte gelbe Medium wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 5 min bei 200g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und durch einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert. Das sterile S180-konditionierte Medium wurde in 10 ml Aliquoten bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

4.1.1.3. Kultivierung der humanen Endothelzellen

Die **humanen Endothelzellen HMVEC** wurden aus der Haut einer 18-jährigen Frau isoliert und von der Firma Oligene (ehemals Cell Lining, Berlin) erworben. Zur Identifizierung wurden die Zellen auf das Vorhandensein des Oberflächen-Antigen CD 31 getestet, dieser konnte bei den Zellen nachgewiesen werden. Zur Kultivierung wurde das Nährmedium MECGM der Firma Oligene verwendet, das nach Herstellerangaben angesetzt wurde.

Zur Vermehrung erfolgte die Kultivierung in gelatinisierten 6-Loch-Platten. Die Zellen für die Versuche zur Liposomeninkubation und zur Glykokalix wurden auf gelatinisierten Glasplättchen in den Vertiefungen einer 24-Loch-Platte gezüchtet. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden in den Passagen 5 bis 7 verwendet.

4.1.1.4. Kultivierung der murinen Endothelzellen

Die **murinen Endothelzellen MHEC5** stammen aus dem Myokard 2 Wochen alter Mäuse. Die Identifizierung als mikrovaskuläre Endothelzellen erfolgte mittels der in vitro-Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL), der Lokalisierung des von Willebrand-Faktors (vWF) und der Expression von Angiotensin converting enzyme alpha (ACE-α). Sie

zeigen ab Passage 42 ein verändertes Wachstumsverhalten mit Transformation der Morphologie von endothelial zu epithelial und Induktion von Hämangiosarkomen nach Implantation in geeignete Empfängertiere (Plendl et al., 1995). Die Zellen wurden in den Passagen 42 bis 45 verwendet.

Sie wurden zur Vermehrung in gelatinisierten 6-Loch-Platten unter Verwendung des Nährmediums DMEM+ kultiviert. Für sämtliche Versuche zur Liposomeninkubation und zur Glykokalix wurden die Zellen in 24-Loch-Platten auf gelatinisierten Glasplättchen kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium erneuert.

4.1.1.5. Kultivierung der bovinen Endothelzellen

Die **bovinen Endothelzellen BCIRcobble** wurden aus in Rückbildung befindlichen Gelbkörpern von Rindern durch Frau Prof. Dr. J. Plendl, Berlin, isoliert. Die Identifizierung erfolgte anhand der in vitro-Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL), der Lokalisation des von Willebrand-Faktors (vWF) und des Nachweises der zellulären Bindung des Lektins *Bandeiraea simplicifolia* Agglutinin I (Plendl 1997). Sie wurden zur Vermehrung in gelatinisierten 6-Loch-Platten und für die Versuche zur Liposomeninkubation und zur Glykokalix auf gelatinisierten Glasplättchen in 24-Loch-Platten kultiviert. Zur Kultivierung wurde das Selektivmedium P0 verwendet. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium versorgt. Die Zellen wurden in den Passagen 12 bis 15 verwendet.

4.1.2. Subkultivierung der Endothelzellen

Die Zellen wurden kurz nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers (MHEC5, BCIRcobble, S180) bzw. bei 80-90% Konfluenz (HMVEC) subkultiviert. Je nach Zellkultur wurden die Zellen 1:3 (HMVEC, BCIRcobble) bzw. 1:6 (MHEC5, S180) gesplittet.

Zunächst wurde das Kultivierungsmedium der zu splittenden Zellen abgesaugt und die Zellen mit 150 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Trypsin/EDTA überschichtet und für 2-5 min im Brutschrank inkubiert. Durch Klopfen gegen den Boden der Kulturschale wurden sämtliche noch leicht anhaftenden Zellen abgelöst. Nachdem mittels mikroskopischer Kontrolle überprüft worden war, dass sich die Zellen vom Kulturschalenboden gelöst hatten, wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von 200 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Kultivierungsmedium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, die Vertiefung mit 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Medium gespült und das Spülmedium ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 200 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Abschließend wurden die Zellen im Kultivierungsmedium resuspendiert, entsprechend ihrer Verwendung verdünnt und in den neuen Platten ausgesät.

4.1.3. Kryokonservierung der Endothelzellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen, wie für die Subkultivierung, mit PBS gespült, mittels Trypsin/EDTA vom Kulturschalenboden gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Anschließend wurden sie im Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml der Suspension mit ca. $2-3 \times 10^5$ Zellen in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst in einem Styroporbehälter langsam auf -70°C heruntergekühlt und nach 24-48 Stunden in den Stickstofftank (-196°C) überführt.

4.1.4. Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und in einem 37°C warmen Wasserbad unter leichtem Schwenken aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml DMEM+ (S180, MHEC5, BCIRcobble) oder MECGM (HMVEC) überführt und für 5 min bei 200g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in 1,5 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und in einer gelatinisierten Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kultivierungsmedium gewechselt.

4.1.5. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie oben beschreiben trypsiniert, zentrifugiert und anschließend in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde ein Tropfen der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden 2 (MHEC5) oder 4 (HMVEC, BCI Rcobble) Großquadrate ausgezählt und das arithmetische Mittel bestimmt. Die Berechnung erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{arithmetisches Mittel} \times \text{Verdünnungsstufe} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$$

4.2. Herstellung der Liposomen

Die Liposomen wurden von der Firma Munich Biotech AG (Martinsried) hergestellt und gekühlt geliefert. Die Herstellung erfolgte nach der Filmmethode (SN 230) oder mittels Ethanol- Injektion (SN 307, SN 334, SI 295, TM 235). Der Gesamtlipidgehalt der Liposomen aller Proben betrug 10 mM. Die Bestimmung des Lipidgehaltes erfolgte durch die Firma Shimadzu, Duisburg. Die Partikelgröße lag bei 80-150 nm. Sie wurde mittels Photonenkorrelationspektrometrie durch die Firma Malvern Instruments, Herrenberg, ermittelt. Zur Herstellung wurden die Lipide DOTAP und DOPC (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA), Au-DPPE (Nanoprobes, Yaphank, USA) und Rh-DOPE verwendet.

4.2.1. Filmmethode zur Herstellung der Liposomen (SN 230)

DOTAP (3,5mg/ml) und DOPC (1,62 mg/ml) wurden eingewogen, in Chloroform (ca. 5 ml) gelöst und in einen 100 ml Rundkolben überführt. Au-DPPE (20 nmol/ml) wurde mit Methanol direkt im Gefäß gelöst und ebenfalls in den Rundkolben überführt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer evaporiert, der entstandene Lipidfilm 45 min bei 40°C getrocknet und anschließend in 5% Glucose (steril) durch leichtes Schwenken rehydriert. Da die Löslichkeit des Lipidfilms schlecht war, wurde die Mischung im Rundkolben kurz im Ultraschallbad behandelt (10 sec). Nach der Beschallung wurde die Formulierung bei 20 °C zentrifugiert (300g für 5 min), der Überstand mit Argon überschichtet und im Kühlschrank über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Formulierung rotiert (60 min, ca. 50 UpM) und dann extrudiert. Die Extrusion erfolgte fünf Mal durch 200 nm Membrane mit einem Druck von 5-7 bar.

4.2.2. Ethanol Injektion zur Herstellung der Liposomen (SN 307, SN 334, SI 295, TM 235)

Die eingewogenen Lipide DOTAP, DOPC und Au-DPPE (Konzentrationen siehe Kapitel 4.2.1.) wurden im Chloroform (bzw. in Methanol-Au-DPPE) gelöst und gemischt. Zur Herstellung der Rhodamin-markierten Liposomen (SI 295) wurde Rh-DOPE in einer Konzentration von 0,5 mM verwendet. Die Lösungsmittel wurden evaporiert und das Lipidgemisch in Ethanol gelöst. Die Lösung wurde langsam unter ständigem Rühren in die sterile 5%ige Glucoselösung eingespritzt und die Lösung weitere 60 min gerührt. Bei der Herstellung der Gold-markierten Liposomen (SN 307, SN 334) wurde die Lösung noch zusätzlich mit Ultraschallwellen behandelt (SN 307 5 min, SN 334 3x5 sec). Die Lösung wurde anschließend zentrifugiert (3000g für 10 min), der Überstand mit Argon überschichtet und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde die Formulierung rotiert (60 min, ca. 50 UpM) und dann extrudiert. Die Extrusion erfolgte fünf Mal durch 220 nm Membrane mit einem Druck von 5-7 bar.

4.3. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Für sämtliche transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Zellen in den Vertiefungen einer 24-Loch-Platte auf gelatinierten Glasplättchen ausgesät und für 48 h inkubiert. Sie wurden vor Beginn der Versuchsreihe phasenkontrastmikroskopisch beurteilt und mittels der angeschlossenen Fotokamera (Inteq 000610) und dem Bildbearbeitungssystem Axiovision dokumentiert.

Für sämtliche Versuchsansätze erfolgte die Dehydrierung der Zellproben im Rahmen der Einbettung für die Elektronenmikroskopie nach der Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 30%, 50%, 70%, 80%, 90% je 30 min, 100% für 2x15 min, Propylenoxid 30 min). Die Zellen wurden über Nacht in einem Epon-Propylenoxid-Gemisch (50:50) in Gefäßen mit locker aufgelegtem Deckel belassen. Am nächsten Tag wurden die Präparate für mindestens 4 Stunden in reines Epon überführt und anschließend ausgegossen. Die Polymerisierung des Kunststoffes erfolgte für 48 Stunden bei 60°C.

Von den Proben wurden zunächst 100 nm dicke Semidünnschnitte angefertigt und mittels der Richardson-Lösung gefärbt. Dies diente zur Auswahl geeigneter Proben mit ausreichend Material und zur Orientierung am Präparat für die Anfertigung von Ultradünnschnitten.

Es wurden nun von geeigneten Blöcken Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt, diese auf Nickel- oder Kupfergrids aufgefangen, getrocknet und für je 10 min mit Uranylacetat und Ultrastain II (Bleicitrat) kontrastiert.

Nach Trocknung der Präparate wurden diese im Transmissionselektronenmikroskop EM 10 CR der Firma Zeiss ausgewertet. Die Fotodokumentation erfolgte unter Verwendung von Kodak Electron Microscope Filmen.

4.3.1. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Glykokalix mikrovaskulärer Endothelzellen

Die Zellen wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ (MHEC5) bzw. $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ (BCI Rcobble, HMVEC) in vier Vertiefungen einer 24-Loch-Platte ausgesät. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für die Glykokalixfärbung verwendet. Hierbei zeigten sie bei der phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung vor Versuchseinsatz eine Konfluenz von ca. 70%-80%.

Zunächst wurden die Zellen einmal kurz mit PBS und dann für 5 min mit Cacodylatpuffer mit 0,05% Rutheniumrot gespült. Es folgte die Fixierung mit der Fixierungslösung I (Glutaraldehyd, Rutheniumrot in Cacodylatpuffer) für die Rutheniumrot-Färbung für 1h, anschließend wurde die Zellen in den Vertiefungen 3x10 min mit 0,1-M-Cacodylatpuffer, dem 0,05% Rutheniumrot zugesetzt war, gespült. Abschließend folgte die Fixierung mit der Fixierlösung II (Osmiumtetroxid, Rutheniumrot in Cacodylatpuffer) und weiteres dreimaliges Spülen mit reinem Cacodylatpuffer. Nun wurden die Zellen mit etwas Cacodylatpuffer überschichtet, mit einem Glasspatel vorsichtig von den Glasplättchen abgeschabt und in die Vertiefung eines Agarblöckchens gegeben. Die Zellsuspension wurde in dem Agarblöckchen bei 200g für 5 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet mit Agar übergossen.

Es folgten Dehydrierung, Epon einbettung und die Anfertigung von Schnitten wie in Kapitel 4.2. beschrieben.

Für jeden Versuch wurden je vier Vertiefungen einer 24-Loch-Platte als Kontrollen mitgeführt, welche mit den gleichen Fixierungslösungen, jedoch ohne Zusatz von Rutheniumrot, behandelt wurden.

4.3.2. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Liposomen

Zur Untersuchung der Liposomen wurden je 20 µl jeder Liposomencharge in eine kleine Vertiefung eines Agarblocks gegeben und dann mit Agar überschichtet, so dass die Flüssigkeit im Agarblock eingeschlossen war. Anschließend wurden die Liposomen in Karnovsky-Lösung über Nacht fixiert.

Am folgenden Tag wurden die Blöcke 3x10 min in Cacodylatpuffer gespült, für 2 h mit der osmiumhaltigen Kontrastierungslösung kontrastiert und erneut 3x10 min mit Cacodylatpuffer gespült. Nun wurden die Proben wie oben beschrieben (Kapitel 4.2.) dehydriert, in Kunststoff eingebettet und Ultradünnschnitte gefertigt (60 nm).

Von den Gold-markierten Liposomen wurden einige Proben mittels Silver-Enhancement behandelt. Nach Fixierung der Liposomen in den Agarblöcken wurden diese mit Cacodylatpuffer und anschließend 3 x 5 min mit Aqua dest. gespült. Dann erfolgte das Silver-Enhancement für 3, 5 oder 10 min mit der Silver-Enhancer-Lösung. Es wurde erneut zunächst 3 x 5 min mit Aqua dest. und dann 10 min mit Cacodylatpuffer gespült.

Abschließend erfolgte die Kontrastierung mit 0,1%igem Osmiumtetroxid in 0,1-M-Cacodylatpuffer. Dann wurden die Proben analog der übrigen Liposomen behandelt (s.o.).

4.3.3. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Aufnahme und intrazellulären Verteilung Gold-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen

Die Zellen wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ (MHEC5) bzw. $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ (BCI Rcobble) in den Vertiefungen einer 24-Loch-Platte auf gelatinierten Glasplättchen ausgesät und für 40-48 h inkubiert, bis sie eine Konfluenz von 70-80% erreicht hatten. Dann wurden die Zellen einmal kurz mit serum- und antibiotikafreiem Medium gespült (1 min). Zur Liposomeninkubation wurde serum- und antibiotikafreies Medium verwendet, dem 20 μl Liposomen pro ml Medium zugefügt waren. Die Zellen jeder Vertiefung wurden mit 500 μl des Inkubationsmediums überschichtet (enthalten 10 μl Liposomen) und für eine bestimmte Zeitdauer inkubiert (15 min, 30 min, 60 min oder 180 min). Pro Versuchsansatz wurden vier Vertiefungen mit Zellen eingesetzt. Zur Kontrolle wurden je vier Vertiefungen der Zellen in serum- und antibiotikafreiem Medium ohne Zusatz von Liposomen für die gleiche Zeitdauer inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen dreimal kurz (1 min) mit serum- und antibiotikafreiem Medium gespült. Anschließend erfolgte ein erneuter Spülgang für 3 min in Cacodylatpuffer, gefolgt von der Fixierung der Zellen in Karnovsky-Lösung über Nacht.

Nach der Fixierung in Karnovsky-Lösung wurden die Zellen dem Silver-Enhancement-Verfahren unterzogen. Hierfür wurde die Methode modifiziert, die Thurston und Mitarbeiter (1998) anwendeten. Die Zellen wurden zunächst für 10 min mit Cacodylatpuffer gespült, für 5 min mit Glycin (0,05m in PBS) behandelt und anschließend für 5 min mit 0,05 m HEPES-Puffer gespült. Um unspezifische Reaktionen des Silver Enhancers mit Chlorid-Ionen aus dem Spülmedium zu vermeiden, erfolgte anschließend ein dreimaliges Spülen der Zellen mit Aqua dest. für je 5 min. Dann wurden die Zellen für 20 min mit dem Silver Enhancer bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert und erneut dreimal mit Aqua dest. gespült.

Nach dem Silver Enhancement erfolgte eine Fixierung mit Natriumthiosulfat. Hierfür wurden die Zellen zunächst für 5 min mit 0,05 m HEPES-Puffer gespült, anschließend für 10 min mit der Fixierungslösung mit Natriumthiosulfat bei Raumtemperatur inkubiert, erneut für 5 min mit HEPES-Puffer und anschließend für 5 min mit Cacodylatpuffer gespült. Es folgte nun die Fixierung der Lipidstrukturen mittels Osmiumtetroxid. Hierfür erfolgte die Kontrastierung der Präparate der Liposomeninkubation für 30 min mit 0,1%igem Osmiumtetroxid in 0,1 m Cacodylatpuffer bei 4 °C, während die Kontrollzellen mit der normalen Kontrastierungslösung (1% Osmiumtetroxid in 0,1m Cacodylatpuffer) für 2 h bei 4 °C behandelt wurden.

Nach erfolgter Kontrastierung mit Osmiumtetroxid wurden die Zellen gründlich mit Cacodylatpuffer (3x10 min) und anschließend mit HEPES-Puffer (10 min) gespült. Dann erfolgte eine Kontrastierung mit Uranylacetat für 48h bei 37°C, gefolgt von erneutem Spülen mit HEPES-Puffer (2x10 min) und Cacodylatpuffer (10 min).

Zur weiteren Handhabung wurden die Zellen in Agar eingebettet. Hierfür wurden Sie zunächst mit einigen Tropfen Cacodylatpuffer überschichtet, mit einem Glasspatel vorsichtig von dem Boden der Vertiefungen abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Hierbei wurden die Zellen aus je 4 Vertiefungen zusammengefasst, um ein sichtbares Zellpellet zu erhalten. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 200 g zentrifugiert und das entstandene Zellpellet mit Agar überschichtet. Die in dem Agar eingeschlossenen Zellen wurden für 5 min mit Cacodylatpuffer gespült und anschließend dehydriert, in Kunststoff eingebettet und für die Elektronenmikroskopie eingeschnitten (s.o.).

4.4. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

4.4.1. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme Rhodamin-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen

4.4.1.1. Quantitative Untersuchung der Aufnahme Rhodamin-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen

Die Zellen wurden in den Vertiefungen einer 24-Loch-Platte in einer Konzentration von $0,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ (MHEC5) bzw. $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ (BCI Rcobble, HMVEC) auf gelatinisierten Glasplättchen ausgesät und für 40-48 h inkubiert, bis sie eine Konfluenz von 70-80 % erreichten. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mittels Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 25) beurteilt und die Zellzahl pro Vertiefung mikroskopisch bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mittels angeschlossener Videokamera (Inteq 000610) fotografiert, die Zellzahl in 5 Bildausschnitten pro Vertiefung bestimmt und daraus die Zellzahl pro Vertiefung berechnet.

Zur Inkubation mit Rhodamin-markierten Liposomen wurde serum- und antibiotikafreies Medium eingesetzt. Pro ml Medium wurden 20 μl Liposomen (SI 235) zugesetzt. Die Zellen wurden zunächst zweimal kurz mit serum- und antibiotikafreiem Medium gespült (je 1 min) und anschließend mit 500 μl Inkubationsmedium überschichtet (enthalten 10 μl Liposomen SI 235). Die Inkubation erfolgte für 30 min, 60 min oder 180 min. Es wurden pro Versuch vier Vertiefungen mit Liposomen inkubiert und zwei Vertiefungen nur mit serum- und antibiotikafreiem Medium (ohne Zusatz von Liposomen) als Kontrolle mitgeführt.

Nach Abschluss der Inkubation erfolgte die Fluoreszenzmessung im Mikroplattenreader (Fluostar Optima). Hierfür wurde zunächst eine Positivmessung durchgeführt, bei der das Medium mit enthaltenen Liposomen sich noch in der Vertiefung befand. Anschließend wurden nicht gebundene Liposomen durch dreimaliges Spülen mit serum- und antibiotikafreiem Medium aus der Vertiefung entfernt und die gebundene Menge an Liposomen durch erneute Fluoreszenzmessung bestimmt. Es folgte nun eine Inkubation in 0,2%iger Trypan Blau-Lösung für 2 min, um die extrazelluläre Fluoreszenz zu überdecken und so die Menge an internalisierten Liposomen bestimmen zu können. Nach der Inkubation in Trypan Blau wurden die Zellen einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) gespült und es erfolgte eine dritte Messung der Fluoreszenz in den Vertiefungen. Anschließend wurden die Zellen mit 2,5% Glutaraldehyd für 30 min fixiert und anschließend für die Versuche zur qualitativen Untersuchung der Aufnahme der Liposomen im Fluoreszenzmikroskop eingesetzt.

Nach der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden die Zellen mit Methanol und Aceton fixiert und nach Giemsa gefärbt. Es wurde lichtmikroskopisch die Zellzahl auf den Plättchen nach Abschluss der Versuche bestimmt. Diese erneute Bestimmung war notwendig, da die Behandlung der Zellen mit Trypan Blau, welches zelltoxisch ist, zu einer Ablösung eines Teiles der Zellen vom Kulturschalenboden führte. Somit musste die Zellzahl nach Trypan Blau-Behandlung erneut bestimmt werden. Hierfür wurde die Zellzahl unter Verwendung eines Lichtmikroskopes (Nikon Optiphot-2) mit angeschlossener Videokamera (Sony DXC 930P) und dem Bildverarbeitungssystem Lucia M in zehn Bildausschnitten bestimmt und daraus die Gesamtzellzahl pro Glasplättchen berechnet.

4.4.1.2. Qualitative Untersuchung der Aufnahme Rhodamin-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen

Um die Lokalisation der gebundenen und internalisierten Liposomen zu bestimmen, wurden die Zellen auf den Glasplättchen aus den Versuchen zur quantitativen Aufnahme verwendet. Zusätzlich wurden je Versuchsansatz zwei Vertiefungen eingesetzt, die direkt nach der Abspülung ungebundener Liposomen mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert wurden, also nicht mit Trypan Blau gefärbt wurden, um die Bindung der Liposomen an die Zelle erfassen zu können.

Nach der Fixierung wurden die Glasplättchen vorsichtig mit einer Pinzette aus den Vertiefungen herausgehoben und mit einem Tropfen Aqua Polymount auf einen Objektträger gebracht. Die Präparate wurden in einem Lichtmikroskop mit Fluoreszenz (Diaplan Leitz)

betrachtet, die Dokumentation erfolgte mittels einer eingebauten Videokamera (Nikon DXM 1200) und dem Bildbearbeitungssystem ACT-1.

4.5. Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch Inkubation mikrovaskulärer Endothelzellen mit unmarkierten Liposomen

Die Zellen wurden in den Vertiefungen einer 24-Loch-Platte in einer Konzentration von $0,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ (MHEC5) bzw. $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ (BCI Rcobble, HMVEC) auf gelatinierten Glasplättchen ausgesät und für 40-48 h inkubiert. Vor Versuchseinsatz wurden die Zellen phasenkontrastmikroskopisch untersucht und photographisch dokumentiert. Zu diesem Zeitpunkt hatten sie 70-80% Konfluenz erreicht.

Zunächst wurden die Zellen zweimal kurz mit serum- und antibiotikafreiem Medium gespült (je 1 min), dann mit dem Inkubationsmedium versorgt und für 2 h inkubiert. Das Inkubationsmedium enthielt 20 μl Liposomen (Charge TM235) je ml Medium, pro Vertiefung wurden 500 μl Inkubationsmedium zugefügt. Es wurden vier Vertiefungen mit Liposomen und vier Vertiefungen nur in serum- und antibiotikafreiem Medium inkubiert (Kontrollen).

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen erneut zweimal kurz mit serum- und antibiotikafreiem Medium gespült und dann dem Apo-Annexin-V-Test nach Herstellerprotokoll unterzogen. Hierfür wurden die Vertiefungen zunächst einmal kurz mit Binding Buffer gespült. Anschließend wurden die Zellen in drei Vertiefungen mit der nach Herstellerangaben angesetzten Mischung der Komponenten (200 μl Binding Buffer mit 5 μl Annexin V und 10 μl Propidium Iodid) des Apoptose-Kits überschichtet, so dass der Boden gut bedeckt war (100 μl pro Vertiefung). Eine Vertiefung wurde zur Kontrolle (Abgrenzung der Eigenfluoreszenz der Zellen) nur mit Binding Buffer überschichtet. Die Inkubation erfolgte unter Lichtabschluss bei 18°C. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Binding Buffer gespült und für 30 min mit 1%igem Formaldehyd fixiert. Die Glasplättchen wurden nach der Fixierung aus den Vertiefungen gehoben, mit einem Tropfen Aqua Polymount auf einen Objektträger gebracht und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Die Zellen wurden an einem Lichtmikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung (Diaplan Leitz) beurteilt und mittels angeschlossener Videokamera (Nikon DXM 1200) und dem Bildbearbeitungssystem ACT-1 dokumentiert. Es wurden pro Glasplättchen die Zellen in 10 Bildausschnitten im phasenkontrastmikroskopischen Bild und im deckungsgleichen fluoreszenzmikroskopischen Bild dokumentiert. Im phasenkontrastmikroskopischen Bild wurden alle Zellen im Bildausschnitt gezählt, im fluoreszenzmikroskopischen Bild wurde die Anzahl fluoreszierender und somit apoptotischer Zellen im äquivalenten Bildausschnitt gezählt. Daraus wurde der Prozentsatz apoptotischer Zellen bezogen auf die insgesamt gezählten Zellen berechnet.

4.6. Statistische Verfahren

Die computergestützte Analyse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms PASW Statistics 17.0 für Windows durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt. Durchschnittswerte werden als unterschiedlich eingestuft, wenn beim statistischen Vergleich der p-Wert $< 0,05$.

Die Variablen der Versuche zur Glykokalix und zur quantitativen Analyse der Bindung und Internalisierung der Liposomen wurden mittels Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnoff-Test auf Normalverteilung untersucht, alle Variablen erwiesen sich als nicht-normalverteilt (für alle Test $p \leq 0,002$).

Für die Ergebnisse der Glykokalixmessungen wurden der Median, das erste und dritte Quartil und der Interquartilsabstand angegeben, ebenso erfolgte eine Darstellung mittels Boxplots.

Für die quantitativen Analysen zur Bindung und Internalisierung von Liposomen wurde aufgrund der großen Schwankungen der RLU-Werte in den Versuchen aus den Daten der Median berechnet und die Ergebnisse in einfachen Streudiagrammen dargestellt. Zudem wurde der Zusammenhang zwischen der Inkubationsdauer und den nicht-normalverteilten Abhängigen (Anteil gebundener von den zugegebenen Liposomen in %, Anteil internalisierter von gebundenen Liposomen in %, internalisierte Liposomen in RLU/10.000) mit nicht-parametrischen Tests untersucht. Für die stetig metrischen Variablen erfolgte eine

Untersuchung mittels Kruskal-Wallis-Test. Zeigte der Mehrfachvergleich nach Kruskal-Wallis einen signifikanten Unterschied wurde ein paarweiser Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Für die Untersuchungen zur Apoptose wurden keine statistischen Testverfahren angewendet, die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Streudiagrammen.

5. Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Glykokalix der Endothelzellen

Die Untersuchungen zur Glykokalix der verwendeten mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte im subkonfluenten Stadium bei 70-80% Konfluenz der Zellen. Analog zu den Versuchen zur Liposomeninkubation wurden die Zellen nach 48-stündiger Inkubation auf gelatinisierten Glasplättchen in den Vertiefungen einer 24-Loch-Platte für die Versuche eingesetzt. Die Färbung der Glykokalix erfolgte mittels Ruthenium Rot (siehe Kapitel 4.3.1.). Die angefertigten Ultradünnschnitte wurden anschließend elektronenmikroskopisch ausgewertet. Hierbei erfolgte zunächst eine qualitative Beurteilung der gefärbten Glykokalix. Zudem wurde von je 20 Zellen pro Versuchsansatz die Glykokalix fotografisch dokumentiert und ihre Höhe gemessen. Dazu wurde die Glykokalix an je 3 Stellen in Bereichen vermessen, an denen die zwei Lipidschichten der äußeren Zellmembran deutlich dargestellt werden konnten, um Messfehler durch das Messen im Bereich tangentialer Anschnitte der Glykokalix zu vermeiden. Die Ergebnisse dieser 60 Messungen je Versuch wurden statistisch ausgewertet.

5.1.1 Glykokalix boviner Endothelzellen

5.1.1.1 Qualitative Beschreibung der Glykokalix boviner Endothelzellen

An der Oberfläche boviner Endothelzellen stellte sich die Glykokalix nach der Ruthenium Rot-Färbung als ein elektronendichter Saum dar. Diese im Bereich einer erkennbaren Lipiddoppelmembran ausgebildete Glykokalix umgab die Zelle durchgehend bei etwa 90 % der Zellen (Abb. 1).

Dem gegenüber war die Glykokalix bei etwa 10% der untersuchten Zellen stellenweise unterbrochen. Bei diesen Zellen war in Bereichen einer differenzierbaren äußeren Zellmembran, bei der beide Lipidschichten dargestellt werden konnten, kein elektronendichter Saum vorhanden (Abb. 2). Zellen mit Bereichen, in denen keine Glykokalix vorhanden, die Lipiddoppelmembran jedoch nicht darstellbar war, wurden nicht als unterbrochen gewertet, da hier tangentiale Anschnitte zu falsch negativen Ergebnissen führen könnten.

Die Glykokalix der bovinen Endothelzellen war in den meisten Bereichen gleichmäßig hoch, glatt, und regelmäßig ausgebildet (Abb. 1 und 3). In einigen Bereichen ragten Konglomerate über die übliche Ebene hinaus, wodurch die Glykokalix ein aufgerautes Bild bot (Abb. 4). An einigen Zellen war an der basalen Seite ein höherer elektronendichter Saum vorhanden, dieser trat stets im Bereich langer Zellausläufer auf (Abb. 4).

Teilweise war ein elektronendichter Saum auch als Auskleidung von Invaginationen der äußeren Zellmembran und an intrazellulären Vesikeln dicht unterhalb der Zellmembran vorhanden (Abb. 3, 5 und 6). Die Vesikel wiesen dabei keinen sichtbaren Kontakt zur äußeren Zellmembran auf, befanden sich jedoch stets in direkter Nachbarschaft zu dieser. An intrazellulären Vesikeln, die weiter von der äußeren Zellmembran entfernt lagen, war dieser elektronendichte Saum als innere Auskleidung nicht auffindbar (Abb. 5).

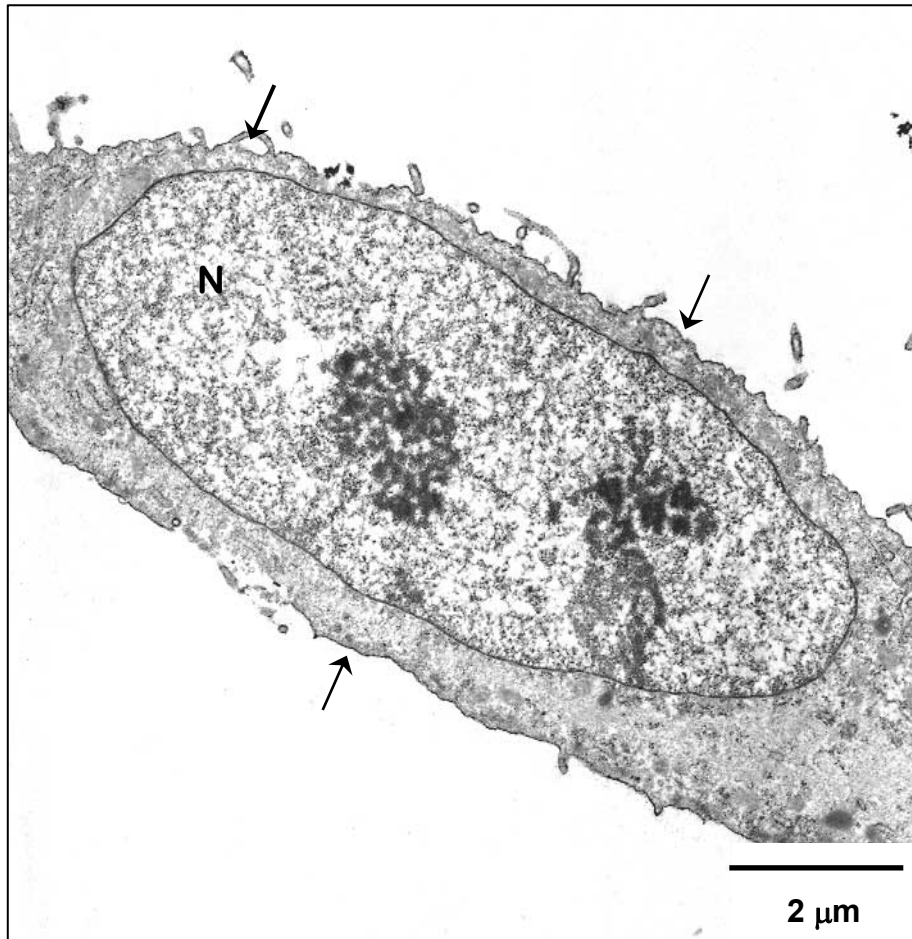


Abb. 1: Ultrastrukturelle Darstellung einer bovinen Endothelzelle nach Ruthenium Rot-Färbung

Ein dünner durchgehender Glykokalixsaum (Pfeile) umgibt die Zelle vollständig, Nukleus (N). Transmissionselektronenmikroskop.

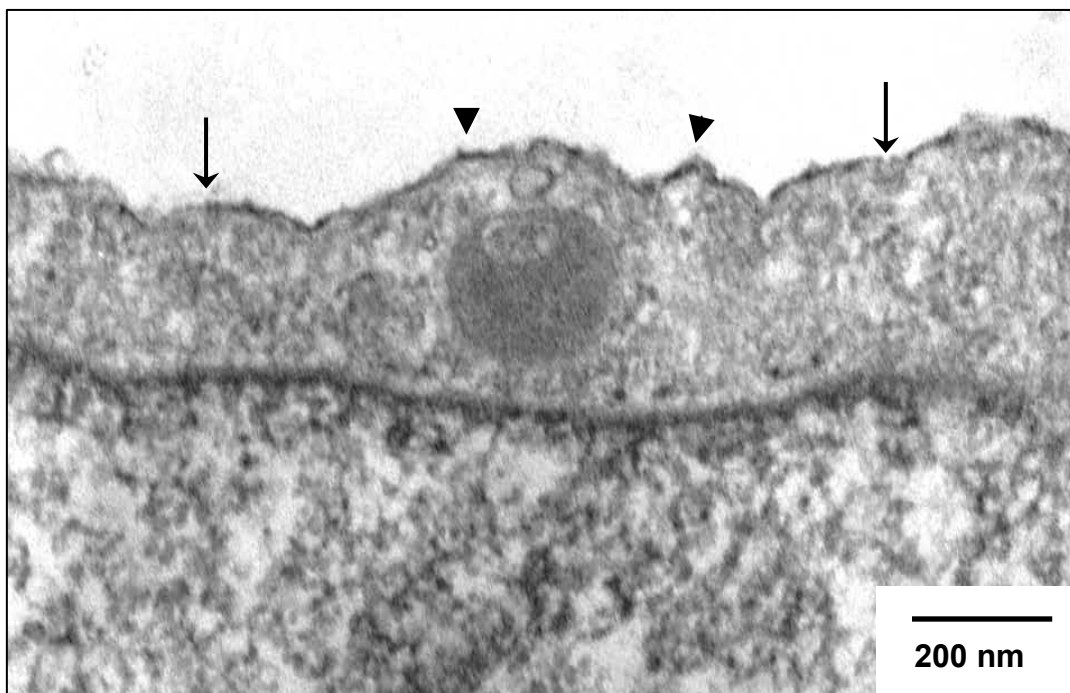


Abb. 2: Ultrastrukturelle Darstellung eines Abschnittes mit diskontinuierlicher Glykokalix einer bovinen Endothelzelle

Unterbrochene Glykokalix an einer bovinen Endothelzelle, kurze Bereiche ohne Glykokalix (Pfeil) und Bereiche mit dünner ausgebildeter Glykokalix (Pfeilspitzen). Transmissionselektronenmikroskop.

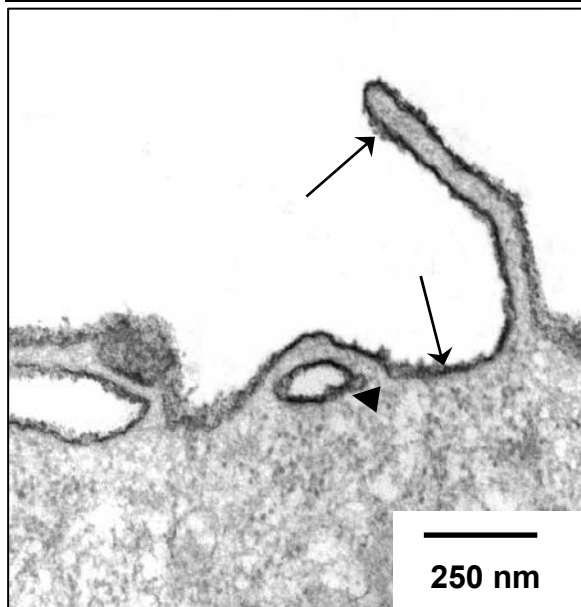


Abb. 3: Ultrastrukturelle Darstellung einer bovinen Endothelzelle mit dünner Glykokalix

Dünnere, regelmäßiger, glatter Glykokalixsaum an der Oberfläche einer bovinen Endothelzelle (Pfeile) und als Auskleidung eines abgeschnürten Vesikels (Pfeilspitze). Transmissionselektronenmikroskop.

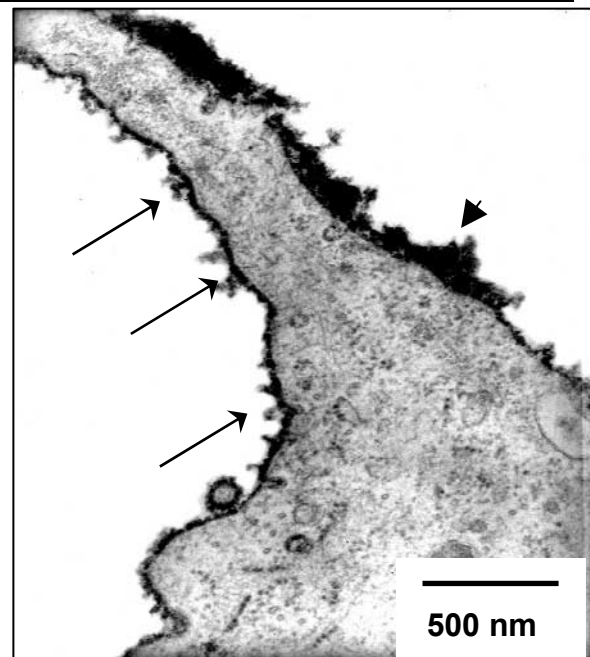


Abb. 4: Ultrastrukturelle Darstellung der Glykokalix einer bovinen Endothelzelle im Bereich eines Zellausläufers

Bereich mit aufgerautem Glykokalixsaum, der von Konglomeraten (Pfeile) überragt wird, verdickte Glykokalix (Pfeilspitze) basal im Bereich eines Zellausläufers. Transmissionselektronenmikroskop.

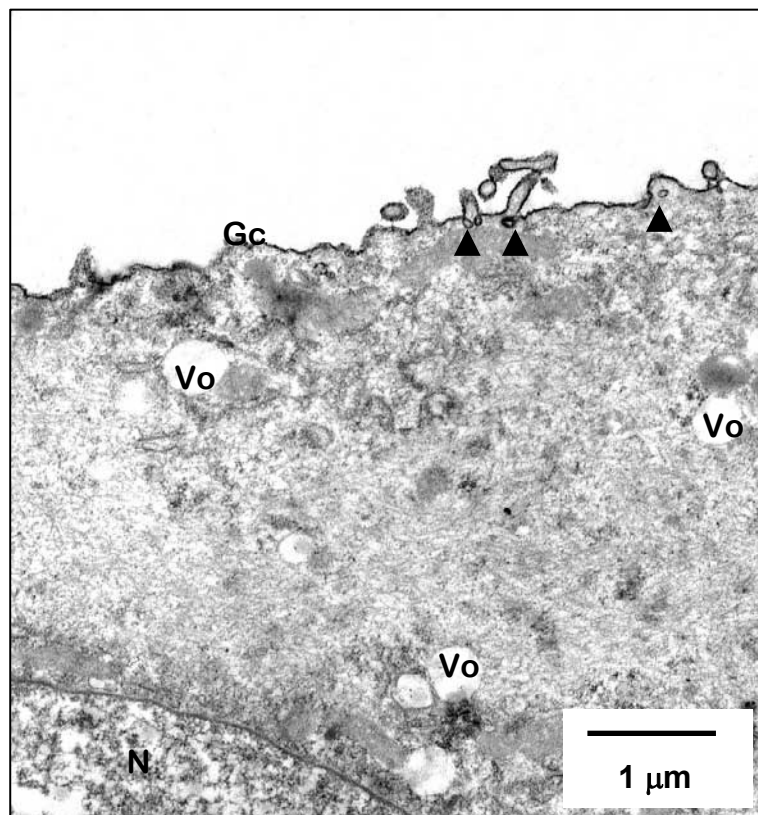


Abb. 5: Ultrastrukturelle Darstellung von Vesikeln mit und ohne Auskleidung durch eine Glykokalix in einer bovinen Endothelzelle

Glatte, kontinuierliche Glykokalix (Gc) an der Oberfläche der Zelle, Glykokalix kleidet Invaginationen und intrazelluläre Vesikel (Pfeilspitzen) in Nachbarschaft zur Zellmembran aus, intrazelluläre Vesikel (Vo) ohne Auskleidung durch eine Glykokalix. Nukleus (N). Transmissionselektronenmikroskop.

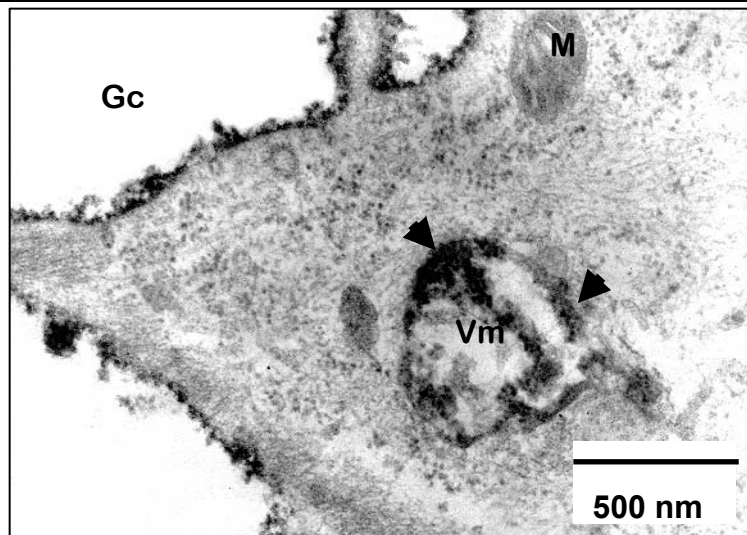


Abb. 6: Ultrastrukturelle Darstellung eines Vesikels mit Auskleidung durch eine Glykokalix in einer bovinen Endothelzelle

Aufgeraute Glykokalix an der Zelloberfläche (Gc), Glykokalix (Pfeilspitze) kleidet intrazellulären Vesikel (Vm) aus. Mitochondrium (M). Transmissionselektronenmikroskop.

5.1.1.2 Vermessung der Glykokalix boviner Endothelzellen

Es wurden nur Stellen in die Auswertung einbezogen, an denen eine Glykokalix ausgebildet war, die Bereiche ohne Glykokalix wurden in der Vermessung nicht berücksichtigt. Die Höhe der Glykokalix schwankte innerhalb der einzelnen Versuchsansätze unterschiedlich stark. So lagen im ersten Versuchsansatz die Messergebnisse verhältnismäßig dicht beieinander, während im zweiten und insbesondere im dritten Versuchsansatz stärkere Schwankungen in der gemessenen Höhe beobachtet werden konnten (Abb. 7). So betrug der Interquartilsabstand im ersten Versuch lediglich 11 nm, während er im zweiten Versuch bei 20,6 nm und im dritten Versuch sogar bei 27,95 nm lag (Tab. 1).

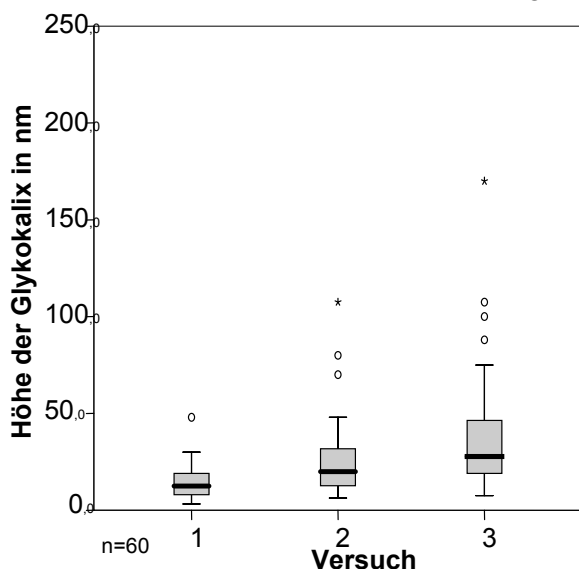


Abb. 7: Höhe der Glykokalix proliferierender boviner Endothelzellen

Bovine Endothelzellen der Passage 13 wurden bis zum Erreichen von ca. 70% Konfluenz kultiviert, die Glykokalix mittels Ruthenium Rot gefärbt und deren Höhe an elektronenmikroskopischen Bildern gemessen.

Tab. 1: Statistische Werte zur Vermessung der Glykokalix boviner Endothelzellen

	n	Minimum	Maximum	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartilsabstand
Versuch 1	60	3,2	48,0	12,5	8,0	19,0	11,0
Versuch 2	60	6,3	107,5	20,0	12,7	33,3	20,6
Versuch 3	60	7,5	170,0	27,75	19,00	46,95	27,95
Gesamt	180	3,2	170,0	19,51	12,13	28,5	16,37

Das gemessene Minimum aus allen drei Versuchen lag bei 3,2 nm, der größte gemessene Wert aller Versuche betrug 170 nm. Der Median lag in der ersten Versuchsreihe bei 12,5 nm, im zweiten Versuch bei 20 nm und im dritten Versuch bei 27,75 nm (Tab. 1).

Fasst man die Ergebnisse aller drei Versuche zusammen, so liegt der Median bei 19,51 nm, das erste Quartil bei 12,13 nm und das dritte Quartil bei 28,5 nm. Somit liegen 50% aller Werte aus den drei Versuchen zwischen 12,13 nm und 28,5 nm. Der Interquartilsabstand der Werte aus allen drei Versuchen beträgt 16,37 nm (Tab. 1).

5.1.2 Glykokalix muriner Endothelzellen

5.1.2.1 Qualitative Beschreibung der Glykokalix muriner Endothelzellen

Auch die murinen Endothelzellen wiesen nach der Ruthenium Rot-Färbung einen elektronendichten Saum an der Oberfläche aller Zellen auf, der die Glykokalix repräsentierte (Abb. 8). Diese war bei allen Zellen kontinuierlich ausgebildet. Die Höhe der Glykokalix variierte. Insbesondere zwischen verschiedenen Zellen traten Abweichungen in der Ausprägung der Glykokalix auf.

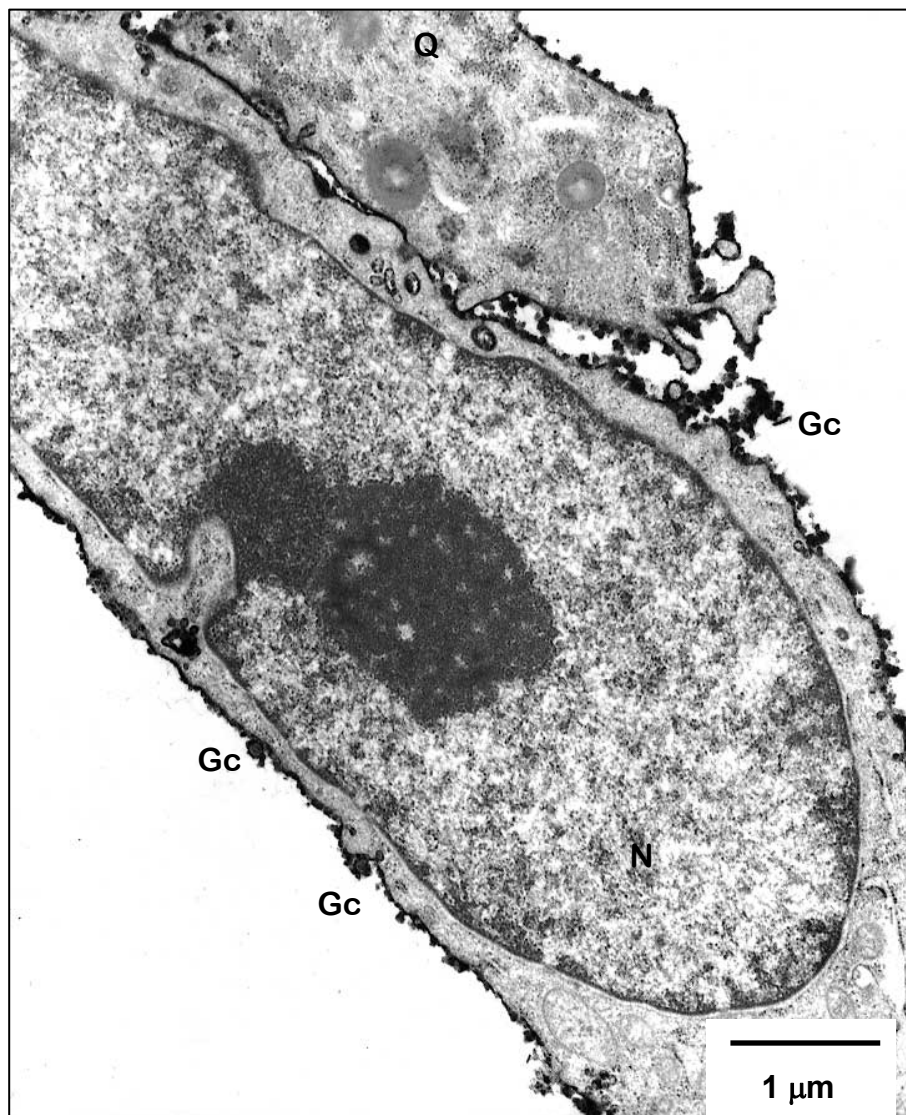


Abb. 8: Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle nach Ruthenium Rot-Färbung

Raue, stark ausgeprägte Glykokalix (Gc) umgibt die Zelle vollständig, Nukleus (N), Querschnitt durch eine benachbarte Zelle (Q). Transmissionselektronenmikroskop.

Einige Zellen zeigten eine ausgeprägte, raue Glykokalix mit Konglomeraten, die das normale Niveau überragten. Diese Zellen waren gestreckter und enthielten viele Mitochondrien. Ihr Zytoplasma war weniger elektronendicht als das der übrigen Zellen und umgab den Kern nur in Form eines dünnen Saumes (Abb. 8 und 10).

Der überwiegende Teil der Zellen gehörte zum zweiten Zelltyp mit dünner Glykokalix und elektronendichtem Zytoplasma. Diese Zellen enthielten viel raues Endoplasmatisches Retikulum sowie viele Ribosomen (Abb. 9 und 12). Sie zeigten ein eher abgerundetes Zellbild mit einem breiten Zytoplasmasaum um den Zellkern sowie mehreren Nukleoli.

Aber auch an verschiedenen Abschnitten der Zellmembran einer einzelnen Zelle konnten Variationen in der Ausprägung der Glykokalix registriert werden. An der luminalen Seite der Zellen und im Bereich von Zellfortsätzen zeigten sich Bereiche mit einer höheren, aufgerauten Glykokalix. In diesem Bereich war der elektronendichte Saum unregelmäßig und einige elektronendichte Konglomerate ragten über das übliche Niveau der Glykokalix hinaus (Abb. 10).

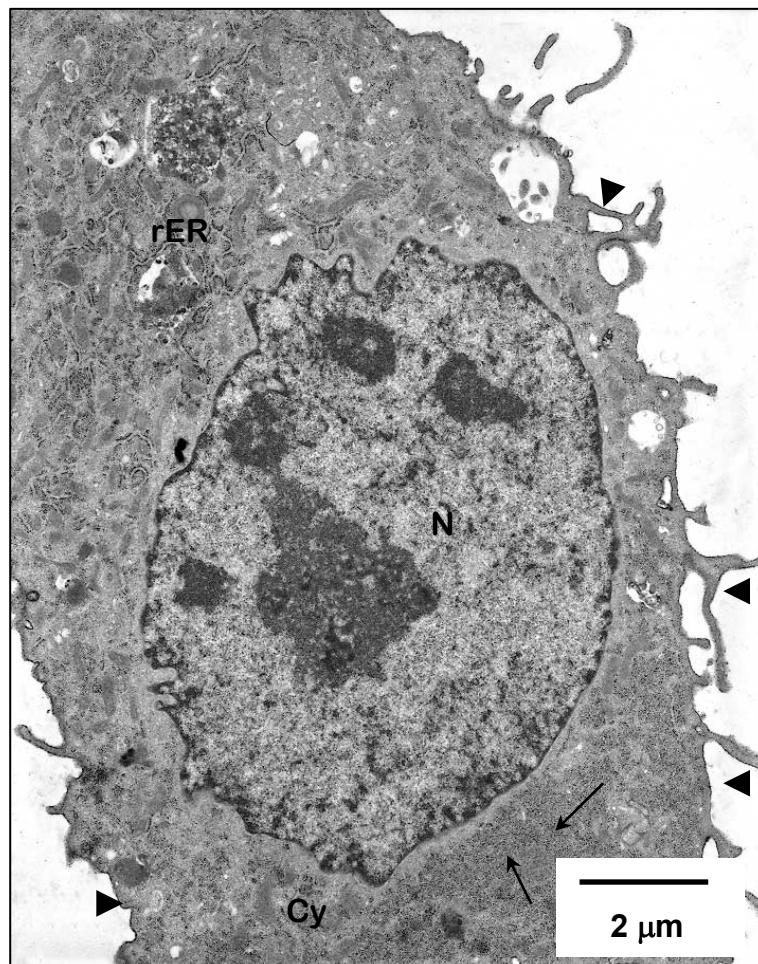


Abb. 9.: Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle mit dünner Glykokalix nach Ruthenium Rot-Färbung

Dünne Glykokalix (Pfeilspitzen) umgibt die Zelle vollständig, elektronendichtes Zytoplasma (Cy) mit vielen Ribosomen (Pfeile) und raumfüllendem Endoplasmatischem Retikulum (rER), Nucleus (N). Transmissionselektronenmikroskop.

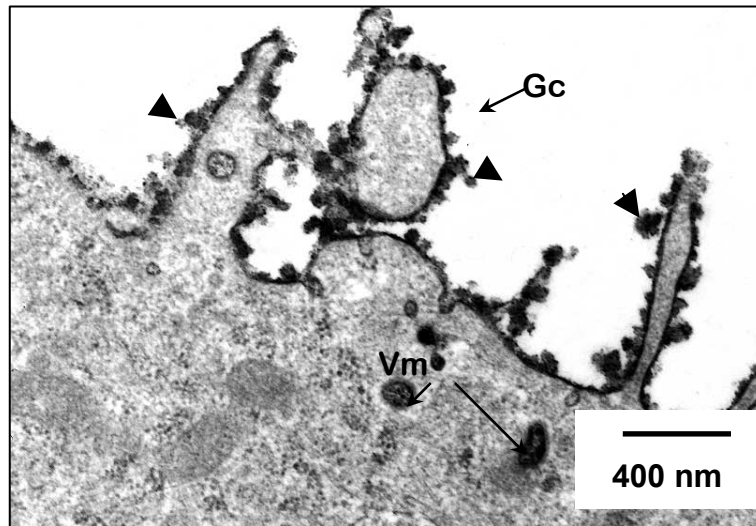


Abb. 10: Ultrastrukturelle Darstellung der rauen Glykokalix an den Zellfortsätzen einer murinen Endothelzelle

Glykokalix (Gc), Konglomerate (Pfeilspitzen) ragen über das Niveau der Glykokalix hinaus, intrazelluläre Vesikel mit Auskleidung durch eine Glykokalix (Vm). Transmissionselektronenmikroskop.

Auch im Zytoplasma der murinen Zellen wiesen einige intrazelluläre Vesikel in der Nähe der äußeren Zellmembran eine Auskleidung mit einer Glykokalix auf, während diese bei anderen Vesikeln fehlte (Abb. 10 bis 12).

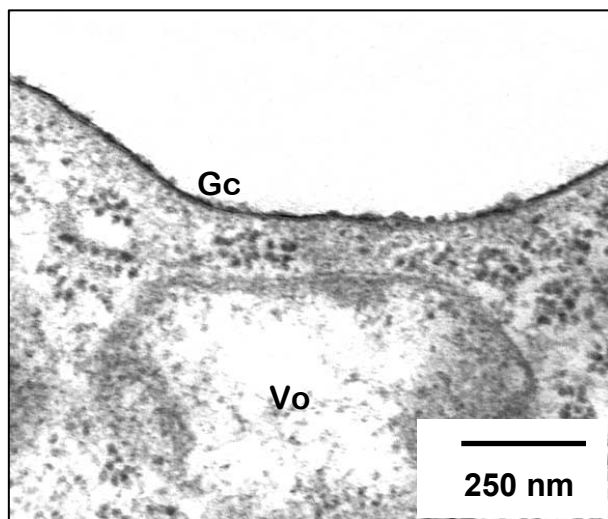


Abb. 11: Ultrastrukturelle Darstellung eines intrazellulären Vesikels ohne Auskleidung durch eine Glykokalix, murine Endothelzelle

Dünne, glatte Glykokalix (Gc) an der äußeren Zellmembran, intrazellulärer Vesikel ohne Glykokalix (Vo). Transmissionselektronenmikroskop.

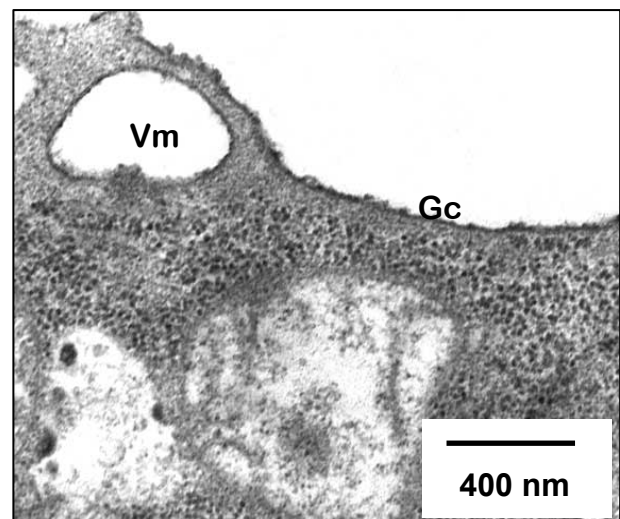


Abb. 12: Ultrastrukturelle Darstellung eines Vesikels mit Auskleidung durch eine Glykokalix, murine Endothelzelle

Dünne, glatte Glykokalix (Gc) an der äußeren Zellmembran, intrazellulärer Vesikel mit Glykokalix (Vm). Transmissionselektronenmikroskop.

5.1.2.2 Vermessung der Glykokalix muriner Endothelzellen

Die Höhe der Glykokalix muriner Endothelzellen schwankte innerhalb der Versuche, die Standardabweichung war in allen drei Versuchen relativ hoch. Sie betrug im ersten Versuch 15,8 nm, im zweiten Versuch 13,27 nm und im dritten Versuch 14,77 nm (Tab.2). Es traten mehrere einzelne Werte auf, die stark vom Median nach oben abwichen (Abb. 13).

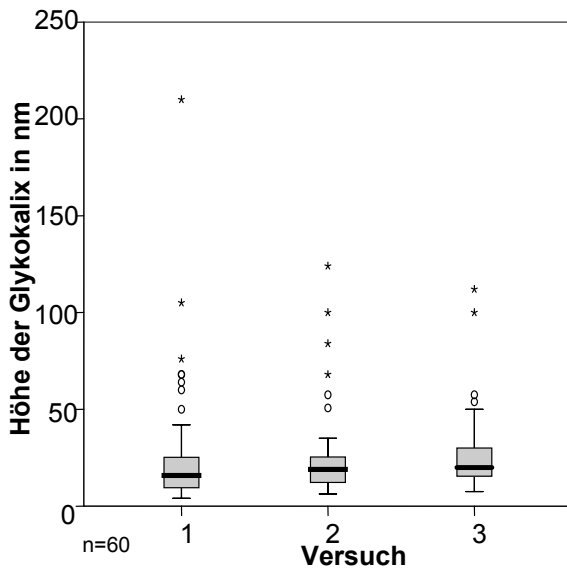


Abb. 13: Höhe der Glykokalix proliferierender muriner Endothelzellen

Murine Endothelzellen in der Passage 45 wurden bis zum Erreichen von ca. 70% Konfluenz kultiviert, die Glykokalix mittels Ruthenium Rot gefärbt und deren Höhe an elektronenmikroskopischen Bildern gemessen

Tab. 2: Statistische Werte zur Vermessung der Glykokalix muriner Endothelzellen

	N	Minimum	Maximum	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartilsabstand
Versuch 1	60	4,0	210,0	15,90	9,50	25,30	15,80
Versuch 2	60	6,3	124,0	19,00	12,13	25,40	13,27
Versuch 3	60	7,5	112,0	20,00	15,23	30,00	14,77
Gesamt	180	4,0	210,0	18,50	12,00	25,40	13,4

Der niedrigste gemessene Wert aus allen drei Versuchen beträgt 4 nm, das Maximum liegt bei 210 nm. Der Median liegt für den ersten Versuch bei 15,9 nm, für den zweiten Versuch bei 19 nm und im dritten Versuch bei 20 nm (Tab. 2).

Fasst man die Ergebnisse aus allen drei Versuchen zusammen, so liegt der Median bei 18,5 nm. Das erste Quartil liegt bei 12 nm und das dritte Quartil bei 25,40 nm (Tab. 2). Somit liegen 50 % aller gemessenen Werte aus den drei Versuchen zwischen 12 nm und 25,40 nm. Der Interquartilsabstand für alle Werte der drei Versuche beträgt 13,4 nm (Tab. 2).

5.1.3 Humane Endothelzellen

5.1.3.1 Qualitative Beschreibung der Glykokalix humaner Endothelzellen

Nach der Ruthenium Rot-Färbung wurde auch die Glykokalix der humanen Zellen als kontinuierlicher elektronendichter Saum an allen Zellen sichtbar (Abb. 14). Die Glykokalix umgab durchgängig alle betrachteten Zellen, es gab keine Variationen in der Höhe.

An allen Zellen war die Glykokalix ein glatter, gleichförmiger Saum (Abb. 15 und 16). Es traten keine Bereiche mit Aufrauungen oder Konglomeraten auf, die über das Niveau hinausragten. Innerhalb des Zytoplasmas humaner Endothelzellen traten nur wenige Vesikel auf, von denen keiner eine Auskleidung mit einer Glykokalix besaß (Abb. 14 und 16).

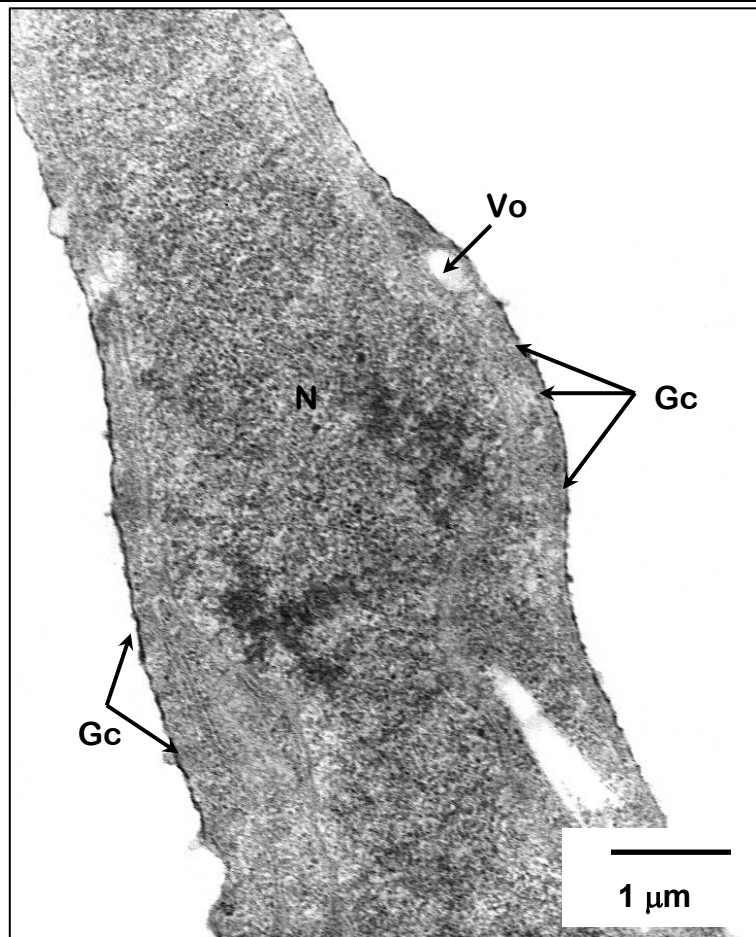


Abb. 14: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle nach Ruthenium Rot-Färbung

Eine gleichförmige Glykokalix umgibt die Zelle vollständig (Gc), Nukleus (N), Vesikel ohne Auskleidung durch eine Glykokalix (Vo). Transmissionselektronenmikroskop.

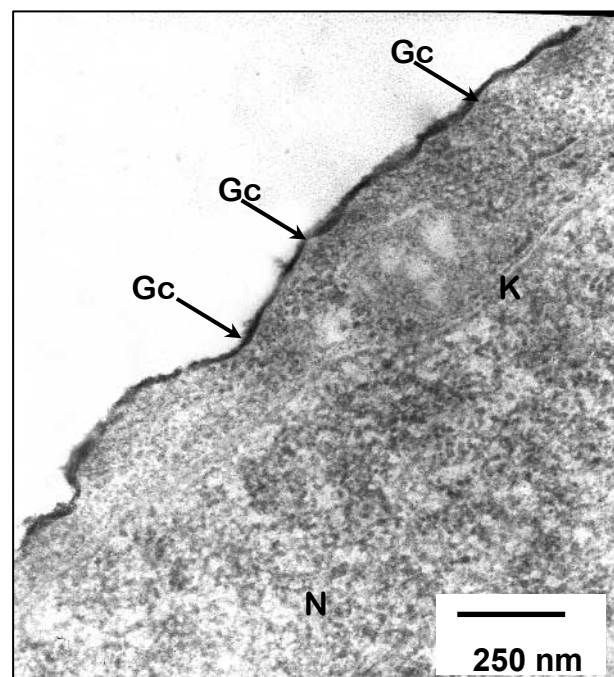


Abb. 15: Ultrastrukturelle Darstellung der Glykokalix einer humanen Endothelzelle nach Ruthenium Rot-Färbung

Glatte, gleichförmige Glykokalix an der äußeren Zellmembran (Gc), Nukleus (N), Kernmembran (K). Transmissionselektronenmikroskop.

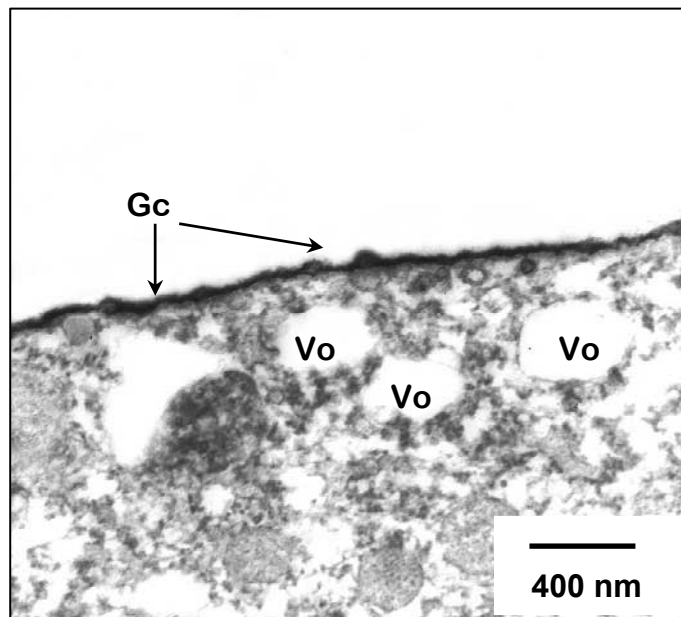


Abb. 16: Ultrastrukturelle Darstellung intrazellulärer Vesikel ohne Glykokalix, humane Endothelzelle

Glatte, gleichförmige Glykokalix (Gc) an der äußeren Zellmembran, Vesikel ohne Glykokalix (Vo). Transmissionselektronenmikroskop.

5.1.3.2 Vermessung der Glykokalix humaner Endothelzellen

Die Werte der Vermessung der Glykokalix humaner Endothelzellen wiesen eine Streuung auf. Auch hier streuten die Werte zwischen den einzelnen Versuchsreihen unterschiedlich stark (Abb. 17). So war der Interquartilsabstand im dritten Versuch mit 13,15 nm am höchsten, im zweiten Versuch betrug er 10 nm. Die geringste Streuung trat beim ersten Versuch auf, hier betrug der Interquartilsabstand 6,48 nm (Tab. 3). Nur in der dritten Versuchsreihe wichen mehrere Messwerte deutlich vom Median ab (Abb. 17).

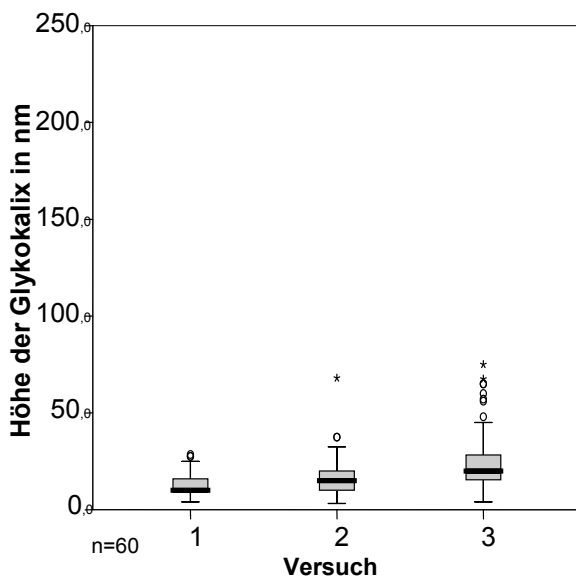


Abb. 17: Höhe der Glykokalix proliferierender humaner Endothelzellen

Humane Endothelzellen der Passage 7 wurden bis zum Erreichen von ca. 70% Konfluenz kultiviert, die Glykokalix mittels Ruthenium Rot gefärbt und deren Höhe an elektronenmikroskopischen Bildern gemessen

Tab. 3: Statistische Werte zur Vermessung der Glykokalix humaner Endothelzellen

	N	Minimum	Maximum	Median	1. Quartil	3. Quartil	Interquartilsabstand
Versuch 1	60	4,0	28,5	10,0	9,5	15,98	6,48
Versuch 2	60	3,2	68,0	15,0	10,00	20,00	10,00
Versuch 3	60	4,0	75,0	20,0	15,23	28,38	13,15
Gesamt	180	4,0	75,0	15,0	10,00	22,20	12,20

Das Maximum aus allen drei Versuchen zur Messung der Glykokalix lag bei 75 nm. Der kleinste gemessene Wert betrug 3,2 nm. Der Median betrug in der ersten Versuchsreihe 10 nm, im zweiten Versuch lag er bei 15 nm und im dritten Versuch bei 20 nm (Tab. 3).

Fasst man die Werte aller drei Versuche zusammen, so liegt der Median bei 15 nm. Das erste Quartil beträgt 10 nm und das dritte Quartil 22,2 nm. Somit liegen 50% aller Werte zwischen 10 nm und 22,2 nm. Der Interquartilsabstand beträgt für alle drei Versuche zusammen 12,2 nm (Tab. 3).

5.1.4 Vergleichende Darstellung der Vermessung der Glykokalix unterschiedlicher Endothelzellen

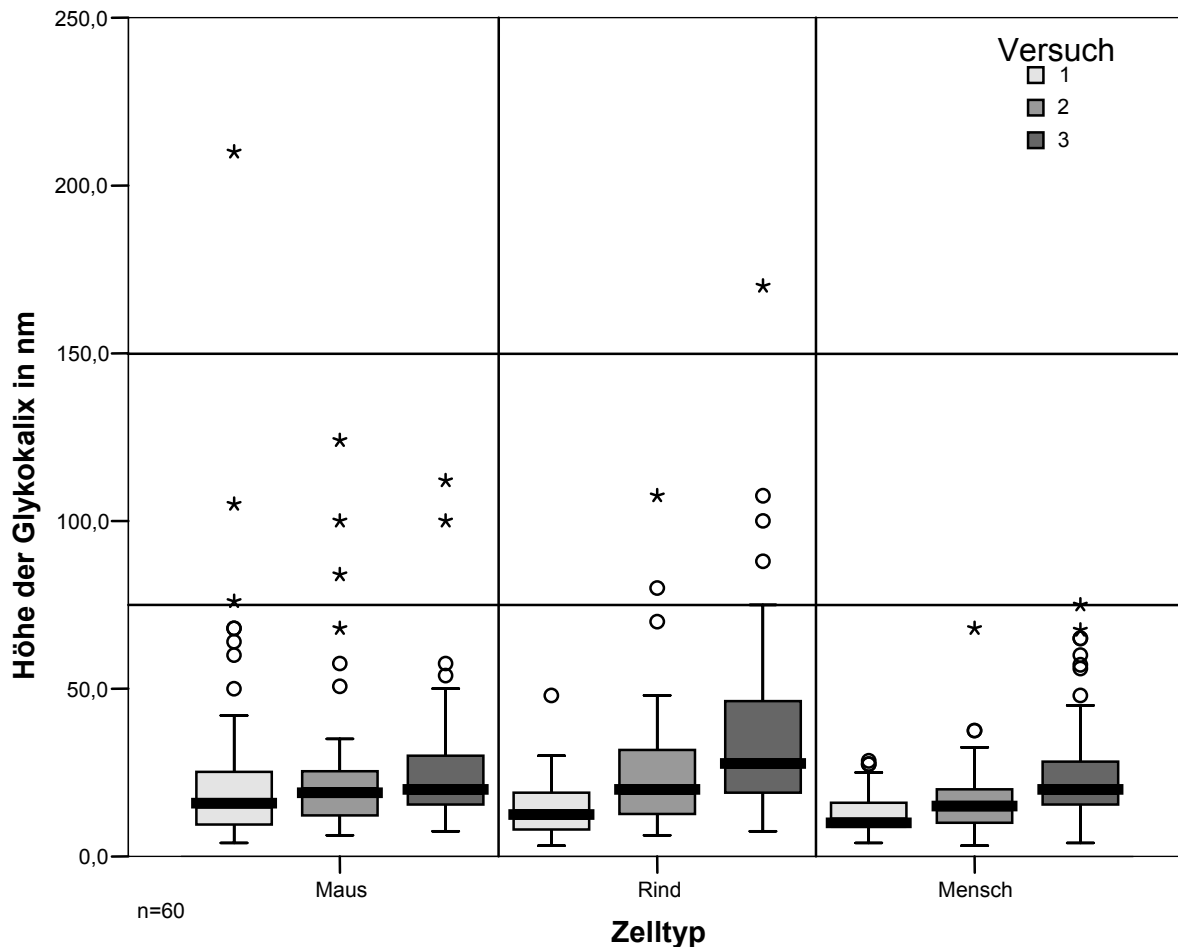


Abb. 18: Vergleichende Darstellung der Vermessung der endothelialen Glykokalix unterschiedlicher Zellarten.

Die Glykokalix humaner Endothelzellen weist die geringste Streuung auf (Interquartilsabstand (IQR)=12,2). Die Interquartilsabstände (Bereich zwischen erstem und drittem Quartil) bei den murinen Endothelzellen sind bei allen drei Versuchsansätzen etwa gleich groß (Abb. 18), die Ergebnisse streuen gleich stark ($IQR_{\text{versuch 1}}=15,8$, $IQR_{\text{versuch 2}}=13,27$, $IQR_{\text{versuch 3}}=14,77$) (Tab. 2). Bei den bovinen und den humanen Endothelzellen schwanken die Interquartilsabstände zwischen den drei Versuchsansätzen relativ stark (Abb. 18). So ist der Interquartilsabstand der bovinen Endothelzellen im zweiten Versuch ($IQR_{\text{versuch 2}}=20,6$) fast doppelt so groß wie im ersten Versuch ($IQR_{\text{versuch 1}}=11$). Im dritten Ansatz ($IQR_{\text{versuch 3}}=27,95$) ist er sogar fast 2,5mal so groß wie im ersten Ansatz (Tab. 1). Bei den humanen Zellen ist die Streuung im dritten Ansatz ($IQR_{\text{versuch 3}}=13,15$) doppelt so groß wie im ersten Ansatz ($IQR_{\text{versuch 1}}=6,48$), im die Streuung im zweiten Versuch liegt dazwischen ($IQR_{\text{versuch 2}}=10$) (Tab 3). Die bovinen Endothelzellen weisen insgesamt die größte Streuung der Messwerte auf ($IQR=16,37$).

Tab. 4: Vergleichende Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Messwerte zur Höhe der Glykokalix unterschiedlicher Zellarten innerhalb festgesetzter Intervalle

	Rind		Maus		Mensch	
	Anzahl Werte	%	Anzahl Werte	%	Anzahl Werte	%
>75 nm	6	3,33	8	4,44	0	0
30 nm – 75 nm	22	12,22	15	8,33	3	1,67
10 nm – 30 nm	108	60	120	66,67	121	67,22
<10 nm	44	24,45	37	20,56	56	31,11
Gesamt	180	100	180	100	180	100

Bei den humanen Zellen sind sämtliche Werte (100%) im Bereich zwischen 0 nm und 75 nm angesiedelt. Bei den murinen Zellen sind acht Werte (4,44% aller Werte) größer als 75 nm, sie liegen im Bereich zwischen 75 und 250 nm, wobei nur ein Wert (0,56%) größer als 150 nm ist. Somit liegen 95,56% aller Werte im Intervall von 0 nm bis 75 nm. Bei den bovinen Zellen sind sechs Werte (3,33%) größer als 75 nm, auch hier liegt einer (0,56%) dieser sechs Werte oberhalb von 150 nm. Hier liegen also 96,67% der Werte im Intervall von 0 nm bis 75 nm.

Etwa zwei Drittel aller Werte liegen bei allen drei Zellarten im Intervall von 10 bis 30 nm. Hier liegen bei den murinen Endothelzellen 120 Messwerte (66,67%), bei den bovinen Endothelzellen 108 Messwerte (60%) und bei den humanen Endothelzellen 121 Messwerte (67,22%).

Unterhalb von 10 nm liegen in etwa ein Viertel bis ein Drittel aller Werte: bei den murinen Zellen 37 Werte (20,56%), bei den bovinen Zellen 44 Werte (24,44%) und bei den humanen Zellen 56 Messwerte (31,11%).

Bei den murinen und bovinen Zellen liegen etwa ein Zehntel aller Werte im Bereich zwischen 30 nm und 75 nm (Maus: 15 Werte (8,33%), Rind 22 Werte (12,22%)), bei den humanen Zellen liegt hier nur knapp ein Zwanzigstel aller Werte (3 Werte (1,67%)).

5.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der kationischen Liposomen

Zur Untersuchung der Aufnahme der Liposomen durch Endothelzellen wurden zunächst die reinen Liposomen mittels Elektronenmikroskopie untersucht, um deren elektronenmikroskopische Struktur für die nachfolgenden Versuche zu identifizieren. Hierfür wurden die Liposomen wie in Kapitel 4.3.2. beschrieben für die Elektronenmikroskopie vorbereitet und die Proben untersucht und fotografisch dokumentiert.

Bei einem Teil der Gold-markierten Liposomenproben erfolgte zusätzlich eine Behandlung der Liposomen mittels Silver-Enhancement, um die markierenden Nanogold-Partikel darzustellen.

In den untersuchten Proben aller Liposomenchargen fanden sich annähernd runde Strukturen mit variierendem Durchmesser. Diese Strukturen bestanden aus zwei äußeren, elektronendichten Schichten, die einen Hohlraum umschlossen. Diese dünnen Schichten stellen die Lipiddoppelmembranen der Liposomen dar. Die Liposomen lagen überwiegend in großen Clustern zusammen, wobei die Liposomenmembranen benachbarter Strukturen einander berührten (Abb. 20). Teilweise lagen die Liposomen auch isoliert vor, ohne in Kontakt zu anderen Liposomen zu treten (Abb. 19). Der Durchmesser der Liposomen variierte teilweise stark (Abb. 20).

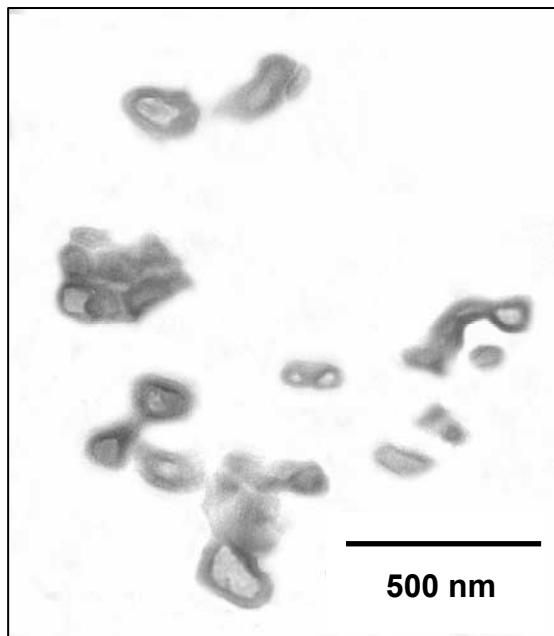


Abb. 19: Ultrastrukturelle Darstellung solitärer Liposomen

Einzelne und in kleinen Clustern liegende Liposomen (Charge SN 230) mit deutlicher Doppelmembran (Pfeil).
Transmissionselektronenmikroskop.

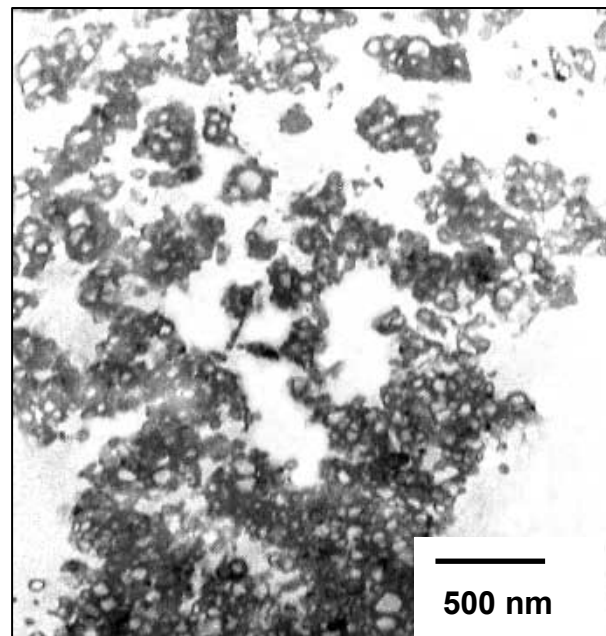


Abb. 20: Ultrastrukturelle Darstellung eines Liposomenclusters

Großes Liposomencluster (Charge SN 307).
Transmissionselektronenmikroskop.

Bei den mittels Silver-Enhancement behandelten Proben wiesen die Liposomenmembranen intensiv elektronendichte Punkte (silberverstärkte Goldpartikel) auf. Diese waren je nach Einwirkdauer des Silberverstärkers unterschiedlich groß. Je länger der Verstärker einwirkte, desto größer waren auch die silberverstärkten Goldpartikel (Abb. 22 bis 24). Nach einer intensiven Einwirkzeit überdeckten die silberverstärkten Goldpartikel die Strukturen der Lipiddoppelmembranen der Liposomen, so dass diese nicht mehr deutlich erkennbar waren (Abb. 23). Auch ließen sich nach langer Einwirkzeit kaum mehr einzelne Partikel voneinander abgrenzen, es kam zur Konfluenz der einzelnen Goldpartikel, so dass sich großflächige, stark elektronendichte Areale bildeten, die darunter liegende Strukturen nicht mehr erkennen ließen (Abb. 23 und 24).

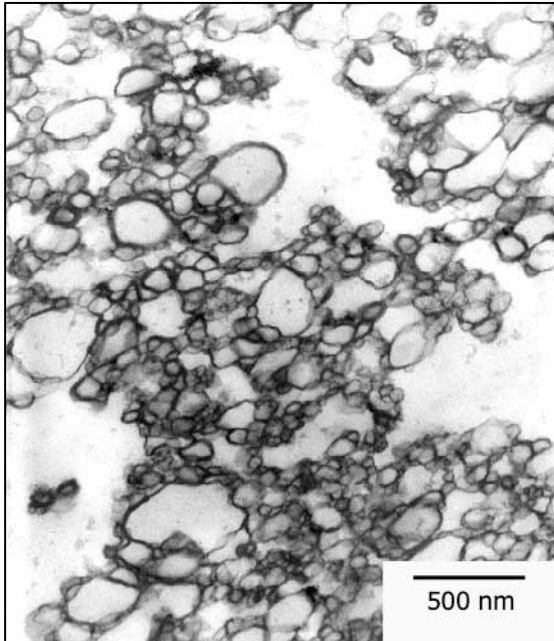


Abb. 21: Ultrastrukturelle Darstellung Goldmarkierter Liposomen ohne Silberverstärkung

Großes Liposomencluster (Charge SN 334), mit teilweise stark variierendem Durchmesser. Transmissionselektronenmikroskop.

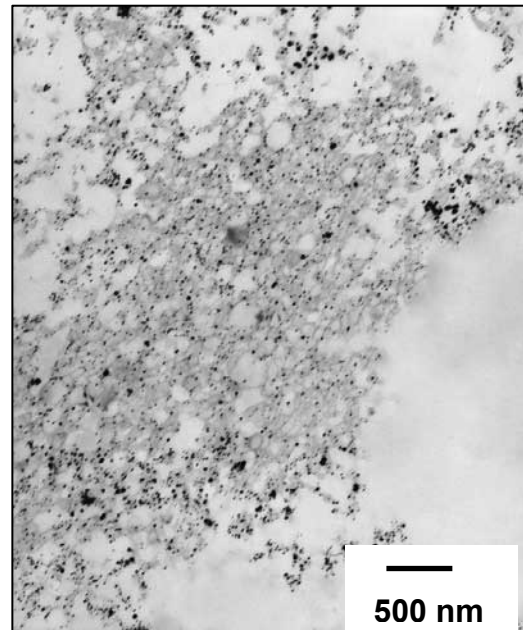


Abb. 22: Ultrastrukturelle Darstellung Goldmarkierter Liposomen nach kurzer Einwirkzeit des Silberverstärkers

Einzelne schwarze Punkte in den Lipidmembranen der Liposomen (Charge SN 230) zeigen an, wo silberverstärkte Goldpartikel lokalisiert sind. Die Struktur der Liposomen aus Lipiddoppelmembran und innerem Hohlraum ist gut zu erkennen. Transmissionselektronenmikroskop.

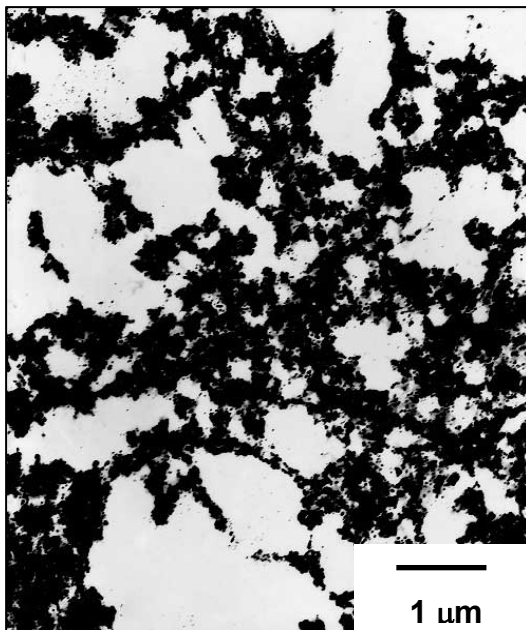


Abb. 23: Ultrastrukturelle Darstellung Goldmarkierter Liposomen nach intensiver Einwirkzeit des Silberverstärkers

Großflächige elektronendichte Areale im Bereich eines Liposomenclusters. Die Silberschalen um die einzelnen Goldpartikel sind so groß, dass sie konfluieren, isolierte Partikel sind nur vereinzelt in Randbereichen auszumachen. Die darunter liegenden Liposomen (Charge SN 307) sind nicht mehr erkennbar. Transmissionselektronenmikroskop.

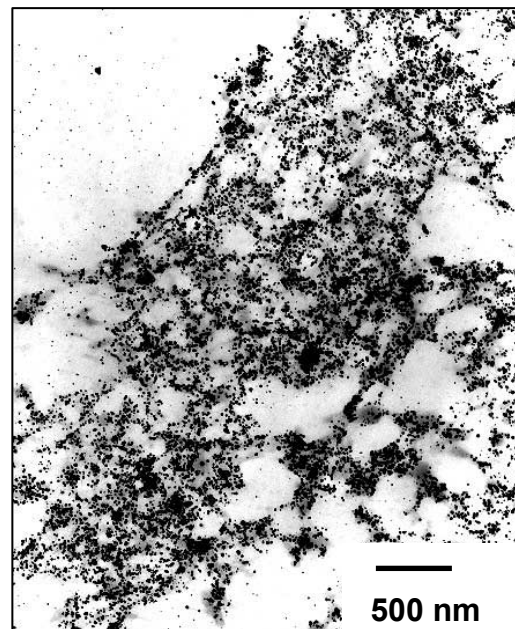


Abb. 24: Ultrastrukturelle Darstellung Goldmarkierter Liposomen nach mittlerer Einwirkzeit des Silberverstärkers

Viele größere schwarze Punkte zeigen die silberverstärkten Goldpartikel an. Die darunter liegenden Liposomen (Charge SN 307) sind nicht mehr deutlich zu erkennen, die Fixierung der Lipidstrukturen ist nur unzureichend. Transmissionselektronenmikroskop.

5.3 Quantitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen

Für die quantitativen Untersuchungen zur Aufnahme der Liposomen wurden die Zellen wie in allen Versuchen bei einer Konfluenz von 70-80% nach 48-stündiger Inkubation für die Experimente eingesetzt. Es wurden Rhodamin-markierte Liposomen verwendet und diese wie in Kapitel 4.4.1.1 beschrieben mit den Zellen inkubiert.

Die gemessene Fluoreszenz in den einzelnen Vertiefungen der Versuchsansätze wurde in Verhältnis gesetzt zur Zellzahl in der jeweiligen Vertiefung, da davon ausgegangen wurde, dass mehr Zellen auch mehr Liposomen binden und aufnehmen und somit in einer Vertiefung mit mehr Zellen auch eine stärkere Fluoreszenz zu messen ist.

Die ermittelte Zellzahl vor Beginn der Inkubation wurde in Verhältnis gesetzt zur Fluoreszenz nach Bindung der Liposomen. Da sich nach der Färbung mit Trypan Blau einige Zellen vom Kulturschalenboden lösten, wurde die Zellzahl nach Abschluss dieser Versuche erneut für jede Vertiefung bestimmt. Diese zweite ermittelte Zellzahl wurde für die Ermittlung der Fluoreszenz der internalisierten Liposomen, also der Fluoreszenz nach Trypan Blau-Färbung, herangezogen.

Aus diesen beiden Werten wurde der Prozentsatz internalisierter Liposomen von den insgesamt gebundenen Liposomen bestimmt. Dies ist von Interesse, da in den Liposomen transportierte Wirkstoffe nur nach Internalisierung in der Zielzelle ihre Wirkung entfalten. Auch wie viel Prozent der insgesamt zugesetzten Liposomen von den verschiedenen Zellkulturen gebunden worden war, wurde berechnet.

5.3.1 Bovine Endothelzellen

5.3.1.1 Bindung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen

Nach Inkubation mit Rhodamin-markierten Liposomen wurden diese durch die bovinen Endothelzellen gebunden, in allen Versuchsansätzen war Fluoreszenz nachweisbar. Die Fluoreszenzintensität wurde vor und nach dem Abwaschen der ungebundenen Liposomen gemessen und auf die Zellzahl der jeweiligen Vertiefung genormt (Abb. 25). Rechnerisch wurde dann der Anteil gebundener von den insgesamt zugegebenen Liposomen bestimmt (Abb. 26). In Abb. 25 werden die Versuchsergebnisse zur Fluoreszenzintensität gebundener Liposomen graphisch dargestellt. Nach 30 min Inkubationsdauer lag der Median der vier Assays bei 311,7156 RLU/10.000 Zellen. Nach 60 Minuten Inkubation betrug der Median der vier Assays 233,5075 RLU/10.000 Zellen und nach einer Inkubationsdauer von 180 min 294,6632 RLU/10.000 Zellen. Somit war der Median nach 30 Minuten am höchsten (Abb. 25). Unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Testes (KWT) zeigt sich, dass sich die Bindung zwischen den einzelnen Gruppen signifikant unterscheidet ($p=0,024$). Die Messwerte innerhalb der einzelnen Assays streuten verhältnismäßig wenig, jedoch unterschieden sich die Messwerte zwischen den einzelnen Assays. Fast alle Messwerte aus allen Assays liegen im Bereich von 100-500 RLU/10.000 Zellen. Der niedrigste Messwert aus allen Bindungsversuchen mit den bovinen Endothelzellen lag bei 151,22 RLU/10.000 Zellen, der höchste Wert bei 780,00 RLU/10.000 Zellen.

Auffällig war, dass die Messwerte im vierten Versuchslauf mit 60 Minuten Inkubationsdauer und im zweiten Versuchslauf mit 30 Minuten Inkubationsdauer alle oberhalb dieser Schwelle von 500 RLU/10.000 Zellen lagen, also höher waren als in den übrigen Versuchen. Im zweiten Versuchslauf mit 30 Minuten Inkubationsdauer war jedoch auch die Fluoreszenzintensität vor dem Abspülen der ungebundenen Liposomen höher, so dass sich bei der relativen Betrachtung gebundener von insgesamt zugesetzten Liposomen dieses wieder relativiert (Abb. 26).

Von den insgesamt zugegebenen Liposomen wurden in allen Versuchen jeweils nur knapp 2% durch die bovinen Endothelzellen gebunden. So lag der Median der vier Assays nach 30 Minuten bei 1,83%, nach 60 min bei 1,79% und nach 180 min bei 1,9%. Unter Anwendung des KWT ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnisse zu den einzelnen Inkubationszeiten ($p=0,005$). Untersucht man die Messwerte mittels Mann-Whitney-U-Test (MWT) so zeigt sich, dass nach 60 Minuten signifikant weniger der

zugesetzten Liposomen gebunden worden waren als nach 30 Minuten ($p=0,003$) und 180 Minuten ($p=0,012$). Jedoch sind nach 180-minütiger Inkubation nicht signifikant mehr Liposomen durch die bovinen Endothelzellen gebunden als nach 30 Minuten ($p=0,763$). Somit gibt es keine stetige Zunahme der Bindung kationischer Liposomen mit zunehmender Inkubationsdauer, da nach 180 Minuten vergleichbar viele Liposomen gebunden waren wie nach 30 Minuten. Mit zunehmender Inkubationsdauer stieg der Prozentsatz gebundener Liposomen nicht stetig an sondern schwankte (Abb. 26). Das Minimum aus allen Versuchen lag bei 1,01% gebundener Liposomen, der höchste Wert betrug 3,6

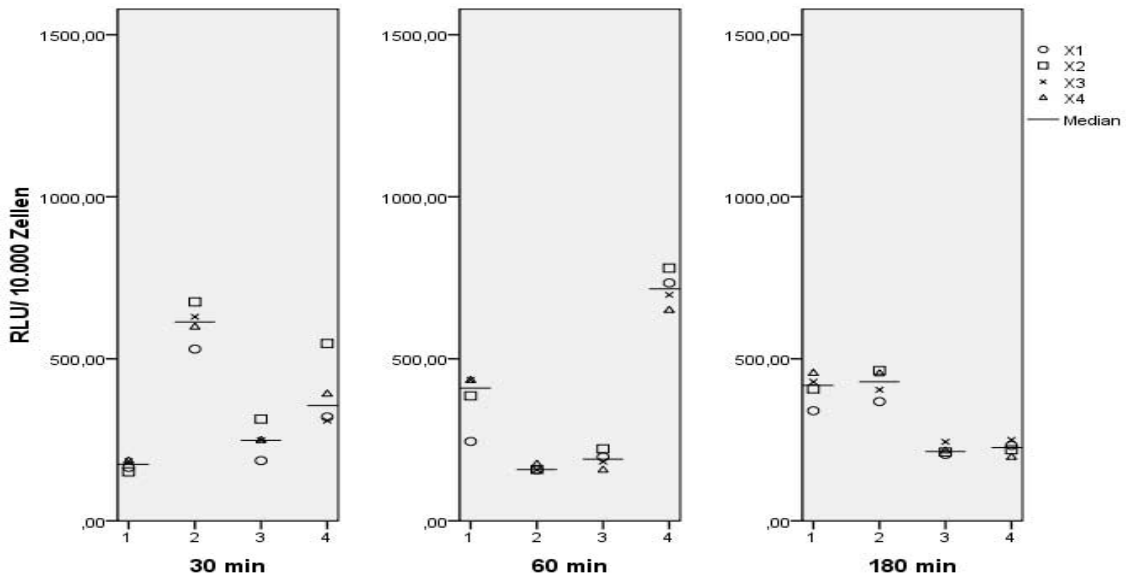


Abb. 25: Bindung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen

Bovine Endothelzellen wurden bei 70% Konfluenz für 30, 60 und 180 Minuten mit Rhodamin-markierten Liposomen inkubiert und die Fluoreszenz nach Abwaschen der ungebundenen Liposomen bestimmt. Dargestellt ist jeweils die Fluoreszenz in RLU/10.000 Zellen für die einzelnen Vertiefungen (X1 bis X4) und der Median der vier unabhängigen Versuche.

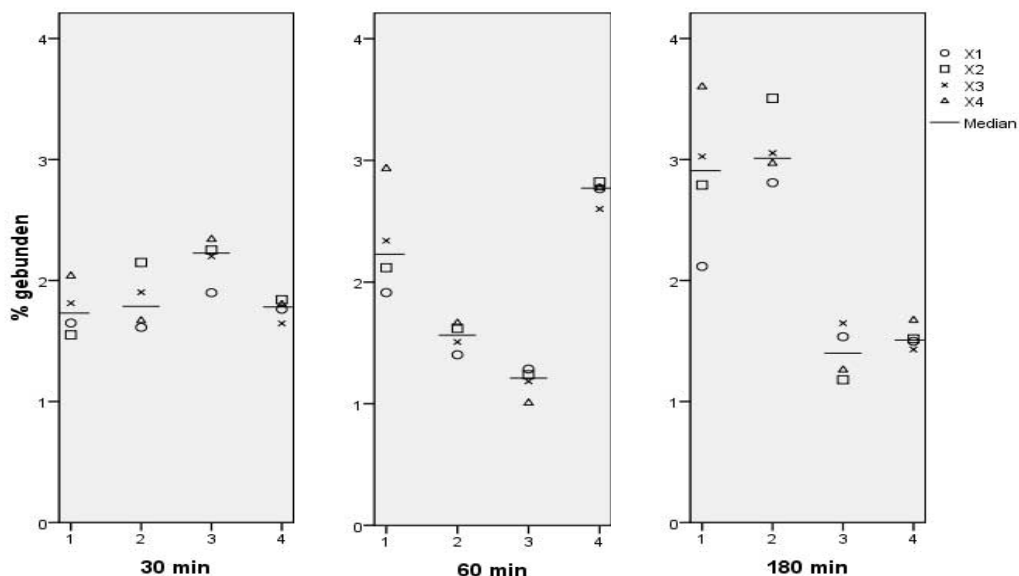


Abb. 26: Anteil der durch bovine Endothelzellen gebundenen von den insgesamt zugesetzten Liposomen

Ausgehend von den gemessenen Fluoreszenzwerten aus den Versuchen wurde der Anteil der gebundenen Liposomen an den insgesamt zugesetzten Liposomen bestimmt und in % wiedergegeben. Dargestellt sind die Werte für die einzelnen Vertiefungen der Versuche (X1 bis X4) und der Median der unabhängigen Versuche.

5.3.1.2 Internalisierung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen

Nach Färbung mit Trypan Blau wurde die Internalisierung der Liposomen beurteilt. Die Fluoreszenzintensität für die einzelnen Vertiefungen wurde bestimmt und auf die Zellzahl der jeweiligen Vertiefung genormt (Abb. 27). Zudem wurde rechnerisch der Anteil internalisierter an den insgesamt gebundenen Liposomen bestimmt (Abb. 28).

Der Median der vier Assays betrug 9,744 RLU/10.000 Zellen nach 30 Minuten Inkubation, lag nach 60 Minuten Inkubation bei 11,0565 RLU/10.000 Zellen und nach 180 min Inkubationsdauer bei 22,005 RLU/10.000 Zellen. Hier war der Median der Assays nach 180-minütiger Inkubation am höchsten. Betrachtet man aber in Abb. 27 die Darstellung der einzelnen Messwerte, so wird ersichtlich, dass eine Steigerung der Internalisierung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen mit zunehmender Inkubationsdauer erst nach 180 Minuten auffällig wurde. Alle Messwerte liegen nach 30 Minuten und 60 Minuten Inkubation im Bereich von 0 bis 50 RLU/10.000 Zellen, nach 180 Minuten Inkubation liegen hier 14 der 16 Messwerte, nur zwei Messwerte überschreiten diese Schwelle von 50 RLU/10.000 Zellen.

Abb. 28 stellt dar, wie viel Prozent der insgesamt gebundenen Liposomen internalisiert wurden. Hier betrug der Median der vier Assays nach 30 Minuten 3,71%, nach 60 Minuten 4,11% und nach 180 Minuten 8,49%. Somit war hier der Median der vier Assays nach 180 Minuten Inkubation etwa doppelt so hoch wie nach 30 Minuten und nach 60 Minuten. Wie sich bei Betrachtung der graphischen Darstellung zeigt, ist diese Steigerung gering (Abb. 28). Mittels KWT ergibt sich auch hier eine signifikante Abweichung zwischen den Gruppen ($p=0,004$). Unter Verwendung des MWT zeigt sich, dass nach 60 Minuten nicht signifikant mehr der gebundenen Liposomen internalisiert worden waren als nach 30 Minuten ($p=0,346$), jedoch waren nach 180 Minuten signifikant mehr der gebundenen Liposomen aufgenommen worden als nach 30 Minuten ($p=0,002$) und nach 60 Minuten ($p=0,016$).

Auffällig war, dass nach 60 Minuten und nach 30 Minuten Inkubation in allen Versuchen unter 10 % der gebundenen Liposomen durch die Zellen internalisiert worden waren, während nach 180 Minuten Inkubation in einigen Vertiefungen deutlich höhere Werte bestimmt wurden. So lagen zwar auch hier in elf der 16 Vertiefungen nur unter 10% der gebundenen Liposomen innerhalb der Zellen, jedoch waren in einer Vertiefung sogar 38,19% der gebundenen Liposomen internalisiert. Insgesamt fünf Werte lagen zum Teil deutlich oberhalb der Marke von 10% (Abb. 28).

Der niedrigste Wert bei der prozentualen Auswertung der internalisierten an den gebundenen Liposomen betrug 0,58%.

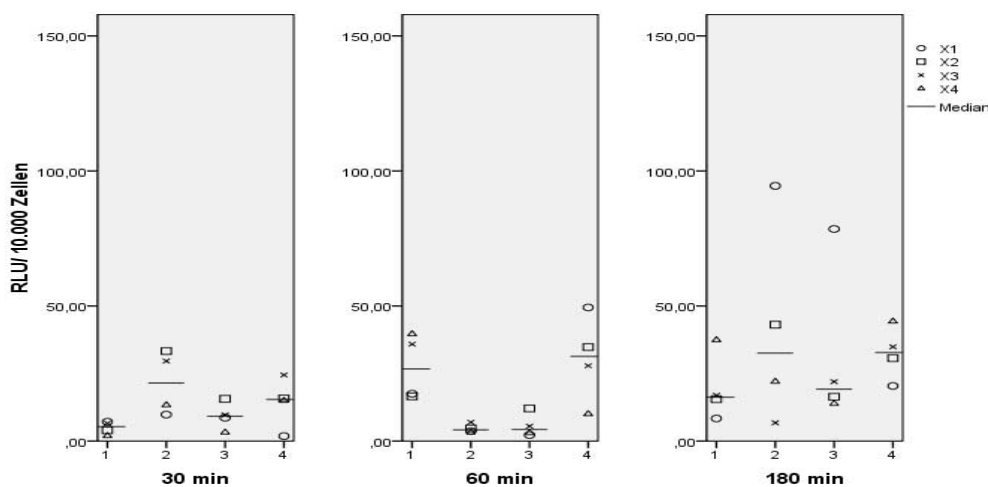


Abb. 27: Internalisierung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen

Bovine Endothelzellen wurden bei 70% Konfluenz für 30, 60 und 180 Minuten mit Rhodamin-markierten Liposomen. Die Zellen wurden mit Trypan Blau gefärbt, um die Fluoreszenz extrazellulär gebundener Liposomen zu überdecken. Nach Färbung mit Trypan Blau repräsentiert die gemessene Fluoreszenz die internalisierten Liposomen. Dargestellt ist jeweils die Fluoreszenz in RLU/10.000 Zellen für die einzelnen Vertiefungen (X1 bis X4) und der Median der vier unabhängigen Versuche.

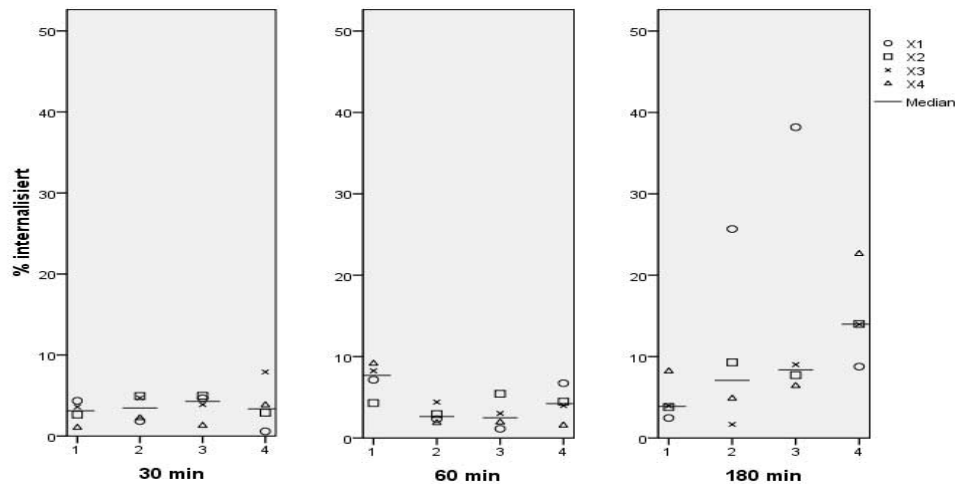


Abb. 28: Anteil der durch bovine Endothelzellen internalisierten Liposomen im Verhältnis zu den gebundenen Liposomen

Ausgehend von den gemessenen Fluoreszenzwerten aus den Versuchen wurde der Anteil der internalisierten Liposomen an den insgesamt gebundenen Liposomen bestimmt und in % wiedergegeben. Dargestellt sind die Werte für die einzelnen Vertiefungen der Versuche (X1 bis X4) und der Median der unabhängigen Versuche.

5.3.2 Murine Endothelzellen

5.3.2.1 Bindung kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen

Nach Inkubation der murinen Endothelzellen für 30 Minuten, 60 Minuten und 180 Minuten mit Rhodamin-markierten Liposomen wurde die Fluoreszenz in den einzelnen Vertiefungen vor und nach dem Abspülen der ungebundenen Liposomen bestimmt und auf die Zellzahl genormt. Bei den murinen Endothelzellen ließ sich nach dem Abspülen der ungebundenen Liposomen eine sehr intensive Fluoreszenz in den einzelnen Vertiefungen nachweisen (Abb. 29). Diese war deutlich höher als in den Versuchen mit den bovinen (Abb. 25) und den humanen Endothelzellen (Abb. 33). Der Median der vier Assays betrug für eine Inkubationsdauer von 30 Minuten 721,975 RLU/10.000 Zellen, für 60 Minuten Inkubationsdauer lag der Median bei 1181,5306 RLU/10.000 Zellen und nach 180 Minuten Inkubation mit den Liposomen bei 1522,4809 RLU/10.000 Zellen. Der höchste gemessene Wert lag in diesen Versuchen bei 4007,16 RLU/10.000 Zellen, der niedrigste Wert bei 424,02 RLU/10.000 Zellen.

Obwohl hier in allen Versuchsreihen die Zellzahl bei Einsatz für die Versuche relativ konstant gehalten werden konnte, gab es in jeder Versuchsreihe eine Messung, deren Ergebnisse deutlich von den übrigen Messungen abwichen (Abb. 29). So war die Intensität der Fluoreszenz in der ersten Messung nach 30 Minuten und in der vierten Messung bei 60 Minuten Inkubation höher, es waren mehr Liposomen gebunden. Dahingegen waren in der ersten Messung bei 180-minütiger Inkubation die Messwerte niedriger als in den anderen Messungen mit gleicher Inkubationsdauer.

Insgesamt betrachtet konnte ein stetiger Anstieg der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Inkubationsdauer verzeichnet werden. Nach 180 Minuten waren am meisten Liposomen gebunden, hier war die Fluoreszenz um den Faktor 2,11 bzw. 1,29 höher als nach 30 bzw. 60 Minuten. Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm auch die Streuung innerhalb der einzelnen Versuche deutlich zu. Dieser Anstieg der Fluoreszenzintensität ist jedoch unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Testes nicht als signifikant zu werten ($p=0,332$).

Prozentual gesehen wurden mindestens 11,06% und höchstens 50,88% der zugegebenen Liposomen durch die murinen Endothelzellen gebunden (Abb. 30). Hier lag der Median der vier Assays für 30 Minuten bei 14,23%, für 60 Minuten bei 17,19% und nach 180 Minuten betrug der Median 26,87%. Auch hier stellte sich wieder dar, dass nach 180 Minuten mehr Liposomen gebunden worden waren als nach 30 Minuten (Faktor 1,89) bzw. 60 Minuten (Faktor 1,56). Auch hier ist die Steigerung nach KWT nicht signifikant ($p=0,248$).

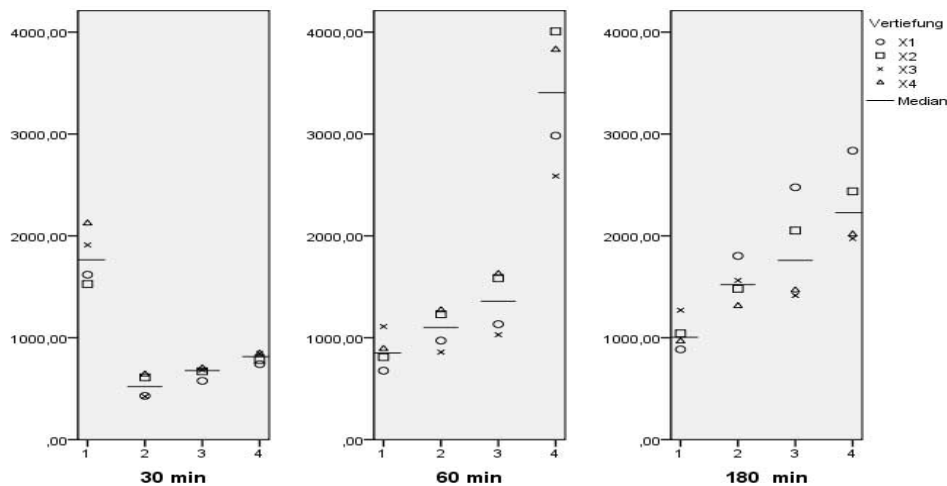


Abb. 29: Bindung kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen

Murine Endothelzellen wurden bei 70% Konfluenz für 30, 60 und 180 Minuten mit Rhodamin-markierten Liposomen inkubiert und die Fluoreszenz nach Abwaschen der ungebundenen Liposomen mit PBS bestimmt. Die Zellzahl pro Vertiefung wurde im Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Dargestellt ist jeweils die Fluoreszenz in RLU/10.000 Zellen für die einzelnen Vertiefungen (X1 bis X4) und der Median der vier unabhängigen Versuche.

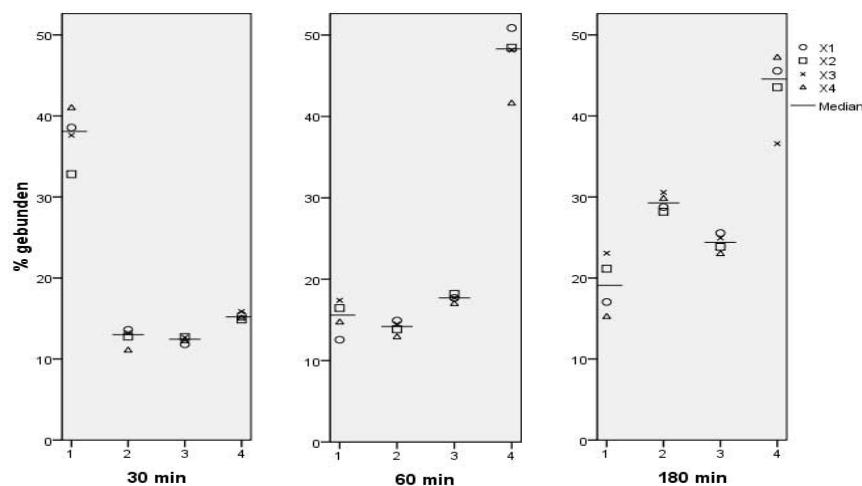


Abb. 30: Anteil der durch murine Endothelzellen gebundenen von den insgesamt zugesetzten Liposomen

Ausgehend von den gemessenen Fluoreszenzwerten aus den Versuchen wurde der Anteil der gebundenen Liposomen an den insgesamt zugesetzten Liposomen bestimmt und in % wiedergegeben. Dargestellt sind die Werte für die einzelnen Vertiefungen der Versuche (X1 bis X4) und der Median der unabhängigen Versuche.

5.3.2.2 Internalisierung kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen

Analog zu den Versuchen mit bovinen Endothelzellen wurden die murinen Endothelzellen nach Messung der Fluoreszenzintensität nach Liposomenbindung mit Trypan Blau gefärbt. Durch erneute Messung nach Trypan Blau-Färbung wurde die Fluoreszenzintensität der internalisierten Liposomen bestimmt und auf die Zellzahl genormt. Auch hier lagen die Messergebnisse insgesamt höher (Abb. 31) als in den Versuchen mit den bovinen (Abb. 27) und den humanen Endothelzellen (Abb. 35).

Der höchste gemessene Wert betrug in diesen Versuchen 1206,69 RLU/10.000 Zellen und der niedrigste 75,63 RLU/10.000 Zellen. Der Median der Fluoreszenz der vier Assays lag nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 143,1144 RLU/10.000 Zellen, nach 60 Minuten bei 303,1228 RLU/10.000 Zellen und nach 180 Minuten bei 653,9348 RLU/10.000 Zellen (Abb. 31). Somit war hier eine erhöhte Internalisierung der Liposomen nach 180 Minuten Inkubationsdauer zu beobachten (Abb. 31). Bereits nach 60 Minuten lag der Median um den

Faktor 2,12 höher als nach 30 Minuten, folglich waren bereits zu diesem Zeitpunkt etwa doppelt so viele Liposomen durch die murinen Endothelzellen internalisiert worden. Nach 180 Minuten waren sogar fast 5mal so viele Liposomen durch die Zellen aufgenommen worden wie nach 30 Minuten, der Median der vier Assays betrug das 4,57fache. Dies entsprach einer Aufnahme von doppelt so vielen Liposomen wie nach 60 Minuten (Faktor 2,16). Der KWT ergab hier signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,001$). Die Steigerung der Internalisierung ist nach MWT von 30 Minuten nach 60 Minuten nicht signifikant ($p = 0,970$), jedoch sind nach 180 Minuten signifikant mehr Liposomen in den murinen Zellen aufgenommen worden als nach 30 Minuten ($p < 0,001$) und 60 Minuten ($p < 0,001$). Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm die Streuung der Messwerte innerhalb der einzelnen Assays deutlich zu. Nach 30 Minuten bzw. nach 60 Minuten betrug kein bzw. ein Messwert mehr als 500 RLU/10.000 Zellen. Nach 180 Minuten lagen nur drei Messwerte knapp unterhalb der Schwelle von 500 RLU/10.000 Zellen und zwei Messwerte waren größer als 1000 RLU/10.000 Zellen (Abb. 31).

Betrachtet man den prozentualen Anteil internalisierter an den gebundenen Liposomen, so lag hier der Median nach 30 Minuten bei 17,39%, nach 60 Minuten bei 22,55% und nach 180 Minuten bei 47,21%. Folglich waren nach 180 Minuten fast dreimal so viele der gebundenen Liposomen internalisiert wie nach 30 Minuten (Faktor 2,71) und doppelt so viele wie nach 60 Minuten (Faktor 2,09). Elf der 16 Werte bei 180-minütiger Inkubation lagen im Intervall von 40% bis 70%, während alle 16 Werte bei 30-minütiger Inkubation und 14 der 16 Werte bei 60-minütiger Inkubation unter 40% lagen (Abb. 32). Auch hier ist die Steigerung der Internalisierung nach 180 Minuten signifikant ($p = 0,002$ für 30 Minuten und 60 Minuten, MWT), während der Unterschied zwischen 30-minütiger Inkubation und 60-minütiger Inkubation nicht signifikant ist ($p = 0,94$, MWT).

Auffällig war, dass die Ergebnisse der vier Assays nach 60-minütiger Inkubation sich stärker voneinander unterschieden als nach 30-minütiger und 180-minütiger Inkubation. Während im zweiten Versuchslauf prozentual deutlich mehr der gebundenen Liposomen internalisiert worden waren, lagen im vierten Versuchslauf prozentual nur sehr wenige der gebundenen Liposomen innerhalb der Zellen.

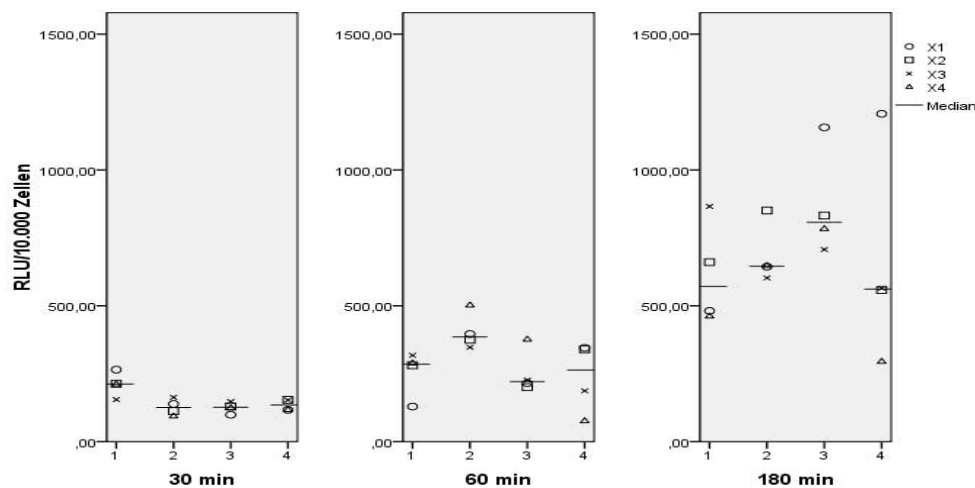


Abb. 31: Internalisierung kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen

Murine Endothelzellen wurden bei 70% Konfluenz für 30, 60 und 180 Minuten mit Rhodamin-markierten Liposomen inkubiert. Die Zellen wurden mit Trypan Blau gefärbt, um die Fluoreszenz extrazellulär gebundener Liposomen zu überdecken. Nach Färbung mit Trypan Blau repräsentiert die gemessene Fluoreszenz die internalisierten Liposomen. Dargestellt ist jeweils die Fluoreszenz in RLU/10.000 Zellen für die einzelnen Vertiefungen (X1 bis X4) und der Median der vier unabhängigen Versuche.

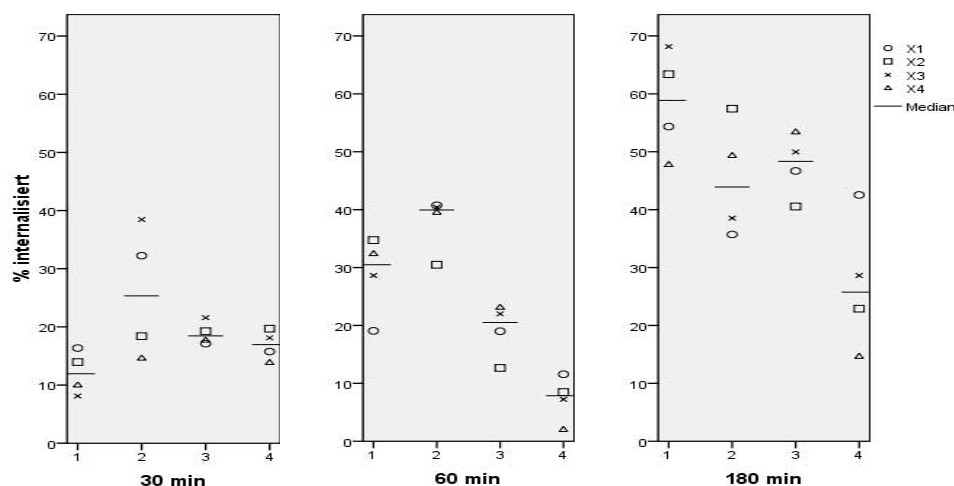


Abb. 32: Anteil der durch murine Endothelzellen internalisierten Liposomen im Verhältnis zu den gebundenen Liposomen

Ausgehend von den gemessenen Fluoreszenzwerten aus den Versuchen wurde der Anteil der internalisierten Liposomen an den insgesamt gebundenen Liposomen bestimmt und in % wiedergegeben. Dargestellt sind die Werte für die einzelnen Vertiefungen der Versuche (X1 bis X4) und der Median der unabhängigen Versuche.

5.3.3 Humane Endothelzellen

5.3.3.1 Bindung kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen

Auch die humanen Zellen wurden mit Rhodamin-markierten Liposomen für 30 Minuten, 60 Minuten und 180 Minuten inkubiert. Es wurde zunächst die gesamte Fluoreszenz vor dem Abspülen der ungebundenen Liposomen für jede Vertiefung bestimmt und auf den Zellgehalt der Vertiefung genormt. Nachdem die ungebundenen Liposomen mittels PBS abgespült worden waren, wurde die Fluoreszenz der gebundenen Liposomen bestimmt und ebenfalls auf den Zellgehalt genormt.

Die zugegebenen Liposomen wurden auch durch die humanen Endothelzellen gebunden, nach 30 Minuten lag der Median der vier Assays bei 607,9558 RLU/10.000 Zellen, nach 60 Minuten bei 303,4663 RLU/10.000 Zellen und nach 180 Minuten bei 770,371 RLU/10.000 Zellen. Somit waren in diesen Versuchen nach 60 Minuten nur etwa halb so viele Liposomen pro Zelle gebunden wie nach 30 Minuten und 180 Minuten. Nach 180 Minuten waren am meisten Liposomen gebunden (Abb.33). Auffällig war hier wieder, dass in Messung 3 etwas niedrigere Werte gemessen wurden als in den übrigen Messungen mit 180-minütiger Inkubationsdauer. Trotz der Bemühungen um eine gleichmäßige Zellaussaat bei den verschiedenen Versuchen war hier die Zelldichte in den einzelnen Vertiefungen minimal höher als in den anderen Ansätzen.

Der höchste gemessene Wert aus allen Versuchen lag bei 1370,86 RLU/10.000 Zellen, der niedrigste bei 154,82 RLU/10.000 Zellen.

Insgesamt wurden durch die humanen Endothelzellen nur etwa 1-4% der zugegebenen Liposomen gebunden (Abb. 34). So lag der Median der vier Assays nach 180 min bei 3,67%, nach 60 min bei 1,47%, und nach 30 min bei 1,75%. Auch hier wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden (KWT: $p < 0,001$). Mit zunehmender Inkubationsdauer waren also deutlich mehr Liposomen durch die humanen Zellen gebunden worden, nach 180 Minuten waren 2,1fach bzw. 2,5fach so viele Liposomen gebunden wie nach 30 Minuten bzw. 60 Minuten. Auffallend ist, dass bei Betrachtung der prozentual gebundenen von den zugegebenen Liposomen nach 60 Minuten noch keine signifikante Steigerung zu beobachten ist ($p = 0,906$, MWT), während nach 180 Minuten mehr Liposomen gebunden wurden als nach 30 Minuten und 180 Minuten ($p < 0,001$, MWT)

In allen Versuchen wurden mindestens 1,03% und maximal 5,29% aller zugegebenen Liposomen durch die humanen Endothelzellen gebunden.

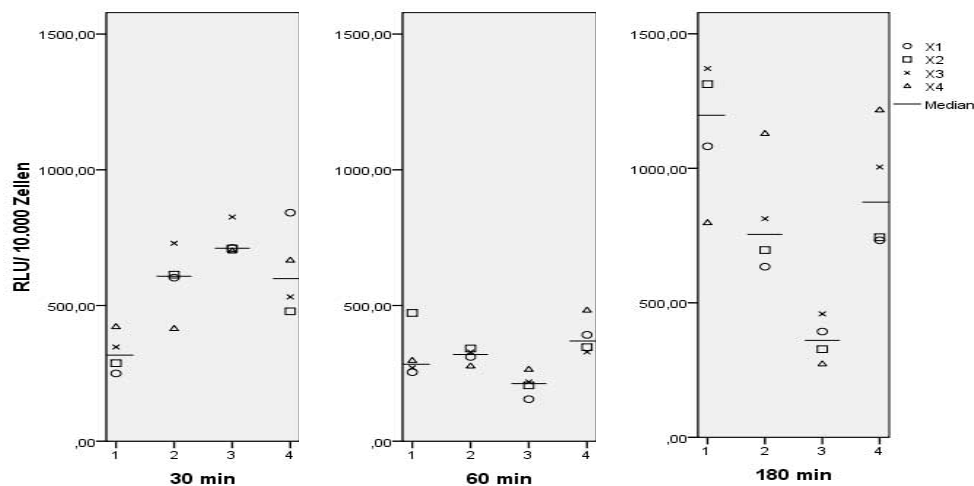


Abb. 33: Bindung kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen

Humane Endothelzellen wurden bei 70% Konfluenz für 30, 60 und 180 Minuten mit Rhodamin-markierten Liposomen inkubiert und die Fluoreszenz nach Abwaschen der ungebundenen Liposomen mit PBS bestimmt. Die Zellzahl pro Vertiefung wurde im Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Dargestellt ist jeweils die Fluoreszenz in RLU/10.000 Zellen für die einzelnen Vertiefungen (X1 bis X4) und der Median der vier unabhängigen Versuche.

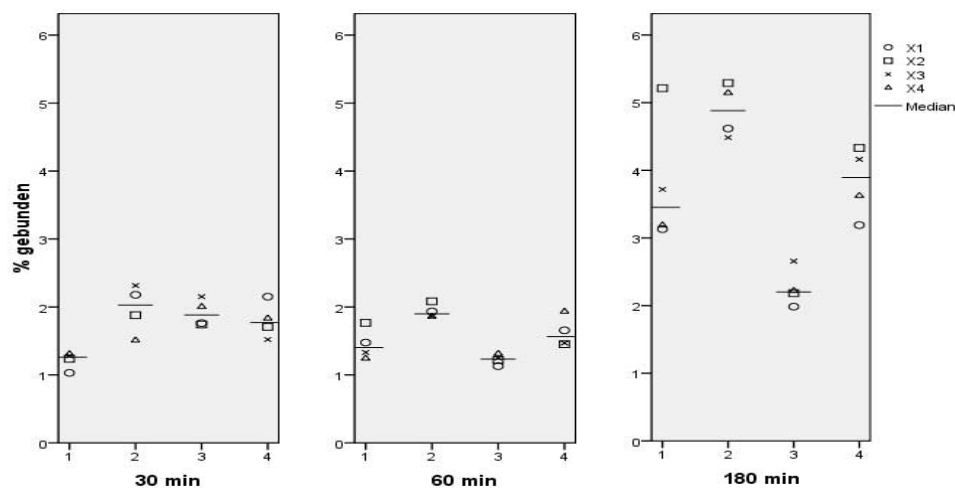


Abb. 34: Anteil der durch humane Endothelzellen gebundenen von den insgesamt zugesetzten Liposomen

Ausgehend von den gemessenen Fluoreszenzwerten aus den Versuchen wurde der Anteil der gebundenen Liposomen an den insgesamt zugesetzten Liposomen bestimmt und in % wiedergegeben. Dargestellt sind die Werte für die einzelnen Vertiefungen der Versuche (X1 bis X4) und der Median der unabhängigen Versuche.

5.3.3.2 Internalisierung kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen

Für die humanen Zellen wurde die Fluoreszenz der internalisierten Liposomen nach Färbung mittels Trypan Blau bestimmt und auf die Zellzahl genormt (Abb. 35). Der höchste Messwert aller Versuche lag hier bei 340,14 RLU/10.000 Zellen und der niedrigste Wert bei 2,37 RLU/10.000 Zellen. Der Median aus den vier Assays betrug für die Versuche mit 30 Minuten Inkubationsdauer 25,1032 RLU/10.000 Zellen, für 60 Minuten Inkubation 16,22 RLU/10.000 Zellen und nach der Inkubation für 180 Minuten 77,1141 RLU/10.000 Zellen. Es waren folglich nach 180 Minuten deutlich mehr Liposomen internalisiert als nach 30 Minuten und 60 Minuten. Während nach 30 Minuten Inkubation bzw. 60 Minuten Inkubation nur drei bzw. zwei Messwerte über 50 RLU/10.000 Zellen betragen, lagen nach 180 Minuten Inkubation nur zwei Messwerte unterhalb dieser Schwelle (Abb. 35). Der Median der Assays lag nach 180 Minuten um den Faktor 3,07 höher als nach 30 Minuten und um den Faktor

4,75 höher als nach 60 Minuten Inkubation. Nach 180 Minuten Inkubation waren signifikant mehr Liposomen durch die humanen Endothelzellen internalisiert worden als nach 30 Minuten ($p < 0,001$, MWT) und 60 Minuten ($p < 0,001$, MWT).

Auffällig war auch hier wieder, dass bei einer Inkubationsdauer von 180 Minuten in der dritten Messung insgesamt niedrigere Messwerte zu verzeichnen waren. Die Streuung der einzelnen Messwerte innerhalb der Assays war in allen Versuchen mit dieser langen Inkubationsdauer höher als nach 30-minütiger und 60-minütiger Inkubation (Abb. 35).

Auch bei der Betrachtung des prozentualen Anteils internalisierter an den gebundenen Liposomen fiel auf, dass mit steigender Inkubationsdauer mehr Liposomen internalisiert wurden (Abb. 36). So lag der Median der vier Assays nach 30 Minuten Inkubation bei 3,81%, nach 60 Minuten bei 5,17% und nach 180 Minuten bei 11,28%. Hierbei fällt auf, dass isoliert betrachtet zwar nach 60 Minuten am wenigsten Liposomen internalisiert waren (Abb. 35), der Wert relativiert sich aber bei Betrachtung in Abhängigkeit von den gebundenen Liposomen, da nach 60 Minuten auch am wenigsten Liposomen gebunden waren. (Abb. 33). Nach 60 Minuten waren etwas mehr der gebundenen Liposomen internalisiert als nach 30 Minuten (Faktor 1,35). Nach 180 Minuten waren prozentual am meisten Liposomen internalisiert: etwa dreimal so viele wie nach 30 Minuten (Faktor 2,96) und doppelt so viele (Faktor 2,18) wie nach 60 Minuten (Abb. 36). Nach 30-minütiger bzw. 60-minütiger Inkubation lagen nur ein resp. zwei Messwerte über 10%, während nach 180 Minuten Inkubation nur bei vier Vertiefungen weniger als 10% der zugegebenen Liposomen gebunden wurden (Abb. 36). Hier zeigte sich bereits nach 60 Minuten eine signifikant höhere Internalisierung gebundener kationischer Liposomen ($p = 0,04$, MWT). Nach 180 Minuten waren wiederum signifikant mehr Liposomen internalisiert als nach 30 Minuten ($p < 0,001$, MWT) und 60 Minuten ($p = 0,001$).

Bei einer Inkubation von 180 Minuten trat auch hier die größte Streuung innerhalb der einzelnen Versuche auf (Abb. 35 und 36).

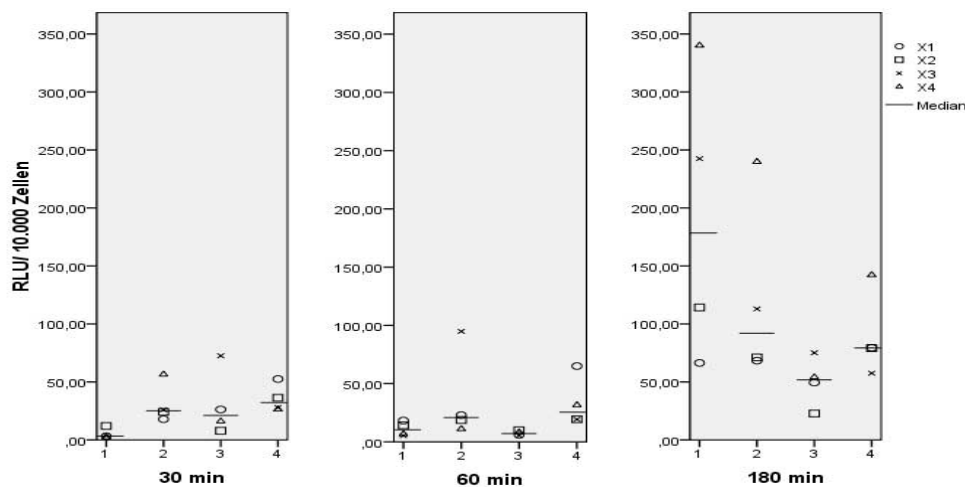


Abb. 35: Internalisierung kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen

Humane Endothelzellen wurden bei 70% Konfluenz für 30, 60 und 180 Minuten mit Rhodamin-markierten Liposomen inkubiert. Die Zellen wurden mit Trypan Blau gefärbt, um die Fluoreszenz extrazellulär gebundener Liposomen zu überdecken. Nach Färbung mit Trypan Blau repräsentiert die gemessene Fluoreszenz die internalisierten Liposomen. Dargestellt ist jeweils die Fluoreszenz in RLU/10.000 Zellen für die einzelnen Vertiefungen (X1 bis X4) und der Median der vier unabhängigen Versuche.

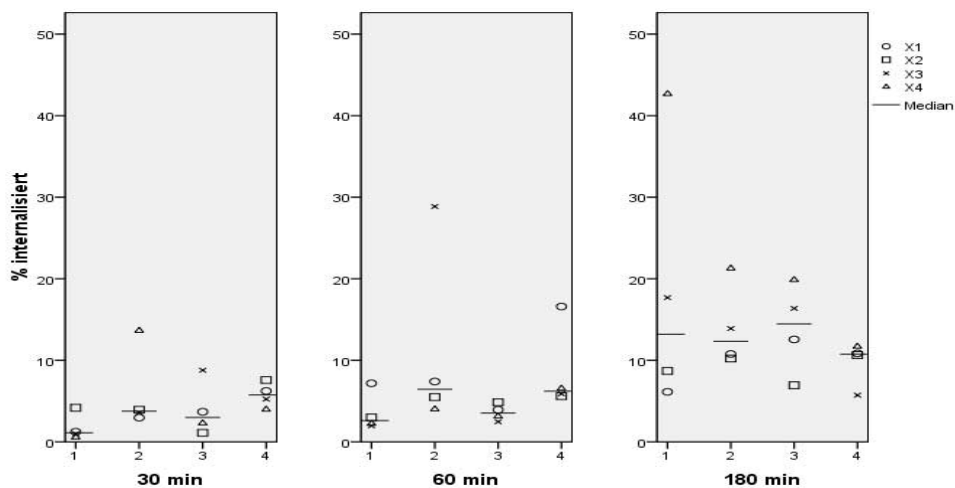
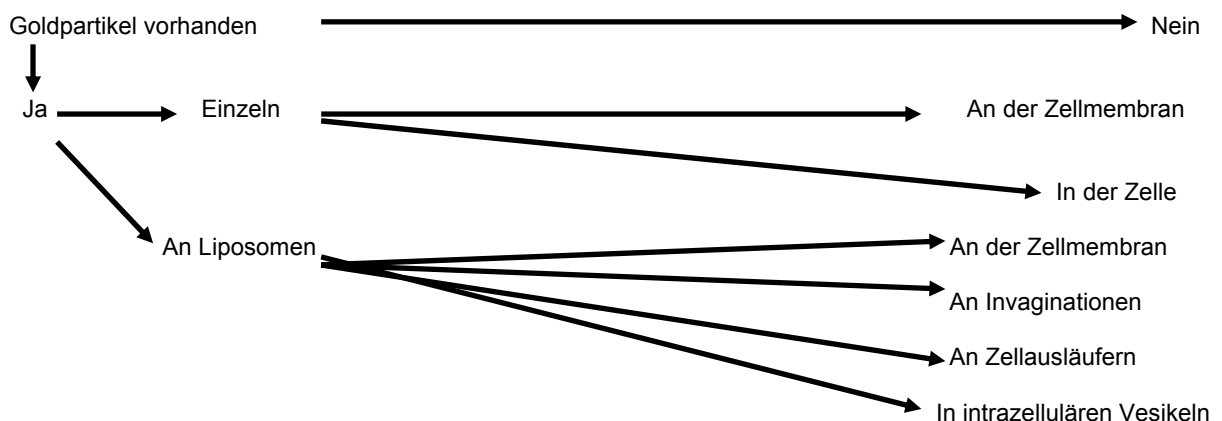


Abb. 36: Anteil der durch humane Endothelzellen internalisierten Liposomen im Verhältnis zu den gebundenen Liposomen

Ausgehend von den gemessenen Fluoreszenzwerten aus den Versuchen wurde der Anteil der internalisierten Liposomen an den insgesamt gebundenen Liposomen bestimmt und in % wiedergegeben. Dargestellt sind die Werte für die einzelnen Vertiefungen der Versuche (X1 bis X4) und der Median der unabhängigen Versuche.

5.4 Qualitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Lokalisation der durch die verschiedenen Endothelzellen aufgenommenen markierten Liposomen zu erfassen. Hierfür wurden mittels verschiedener Marker (Nanogold, Rhodamin) gekennzeichnete Liposomen mit den Endothelzellen inkubiert und anschließend die Lokalisation der Liposomen im Fluoreszenzmikroskop (Rhodamin) oder Transmissionselektronenmikroskop (Nanogold) untersucht. Während der Inkubation erfolgte eine phasenkontrastmikroskopische Beobachtung der Zellen im Inkubationsmedium. Auch in dieser Versuchsreihe wurden die Endothelzellen über unterschiedlich lange Zeiträume mit den Liposomen inkubiert (30 min, 60 min, 180 min). Bei den Versuchen mit Gold-markierten Liposomen wurden zusätzlich das Vorkommen und die Lokalisation der Goldpartikel an den einzelnen Zellorganellen der Endothelzellen untersucht. Hierfür wurden an je 50 Zellen pro Versuch das Vorkommen der Goldpartikel und deren Lokalisation bestimmt. Hierbei erfolgte eine Zuordnung analog des folgenden Schemas:



5.4.1 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen

Die Zellen wurden kurz nach Zusatz des Inkubationsmediums und nach Ende der Inkubation beurteilt.

Zu Beginn der Inkubation waren vereinzelt rundliche Vesikel zwischen den Zellen sichtbar. Mit zunehmender Inkubationsdauer waren am Ende der Inkubation in allen Versuchen sowohl mit den Gold-markierten Liposomen als auch mit den Rhodamin-markierten Liposomen zunehmend mehr Vesikel zwischen den Zellen vorhanden. Teilweise waren große Massen zusammenhängender Vesikel am Kulturschalenboden zu sehen, die die darunter liegenden Zellen verdeckten (Abb. 37B).

Die Vesikel hatten in den Versuchen mit Rhodamin-markierten Liposomen einen violetten Schimmer (Abb. 37A, D). Die Vesikel in den Versuchen mit Gold-markierten Liposomen wiesen einzeln keine Färbung auf, hier hatten jedoch die Konglomerate von Vesikeln eine bräunliche Färbung (Abb. 37C).

Insbesondere bei den murinen Endothelzellen lagen einige dieser Vesikel gegen Ende der Inkubation im Zytoplasma der Zellen.

In den Kontrollversuchen traten weder extra- noch intrazellulär Vesikel auf, noch bildeten sich Konglomerate aus Vesikeln am Kulturschalenboden (Abb. 38 A bis C).

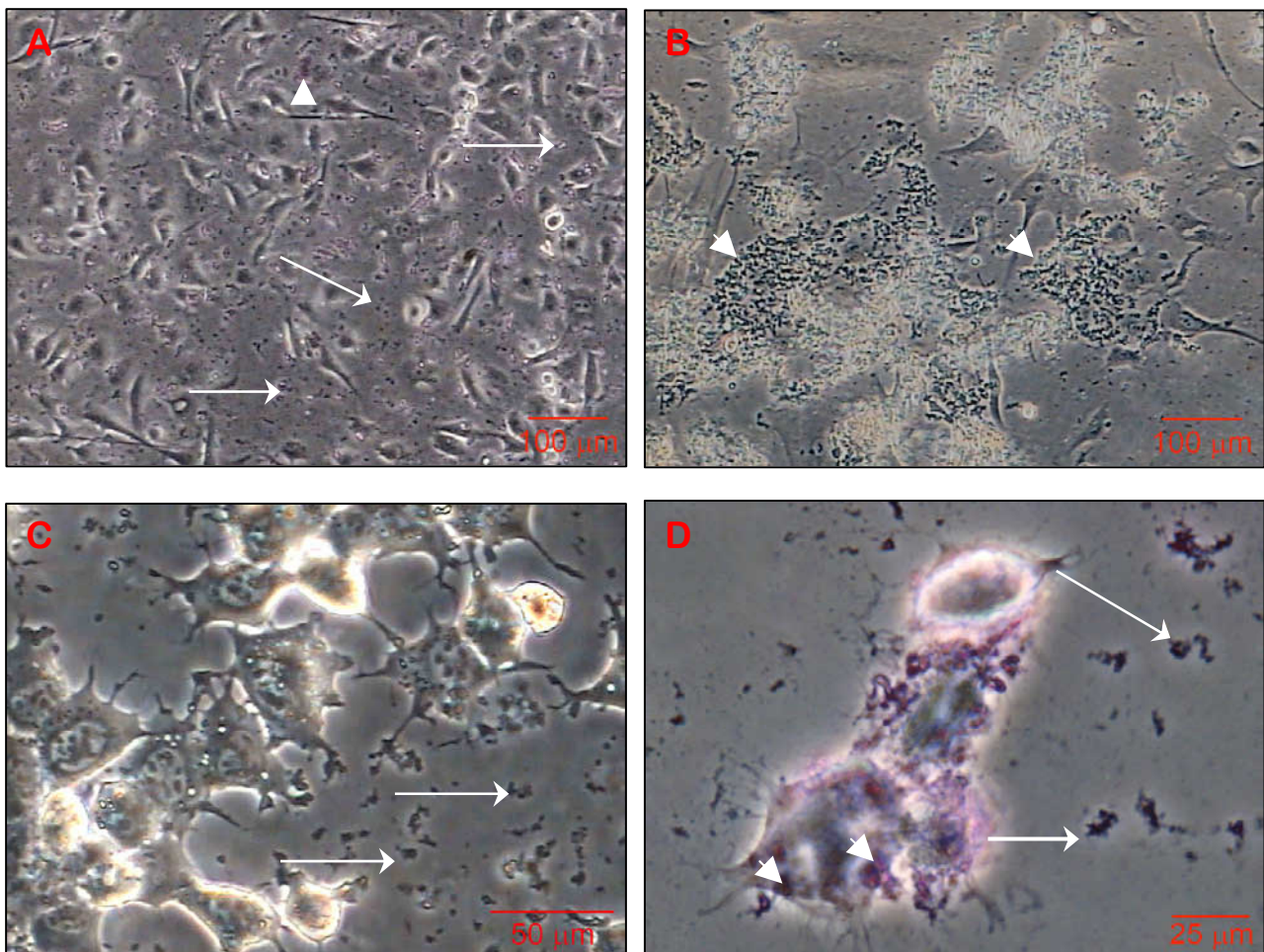


Abb. 37: Bovine (A), humane (B) und murine (C,D) Endothelzellen am Ende der Inkubation mit dem liposomenhaltigen Inkubationsmedium

(A) Bovine Endothelzellen nach Inkubation mit Rhodamin-markierten Liposomen: leicht violett schimmernde Vesikel am Boden der Kulturschale (Pfeile), ein kleineres, etwas stärker violettes Konglomerat (Pfeilspitze), (B) humanen Endothelzellen nach Inkubation mit unmarkierten Liposomen: großen Massen konglomerierter Vesikel (Pfeilspitzen) überdecken die am Boden befindlichen Endothelzellen, (C) murine Endothelzellen nach Inkubation mit gold-markierten Liposomen: die einzeln liegenden Vesikel (Pfeile) weisen keine Färbung aus, (D) murine Endothelzellen nach Inkubation mit Rhodamin-markierten Liposomen: extra- (Pfeilspitzen) und intrazelluläre (Pfeile) Vesikel

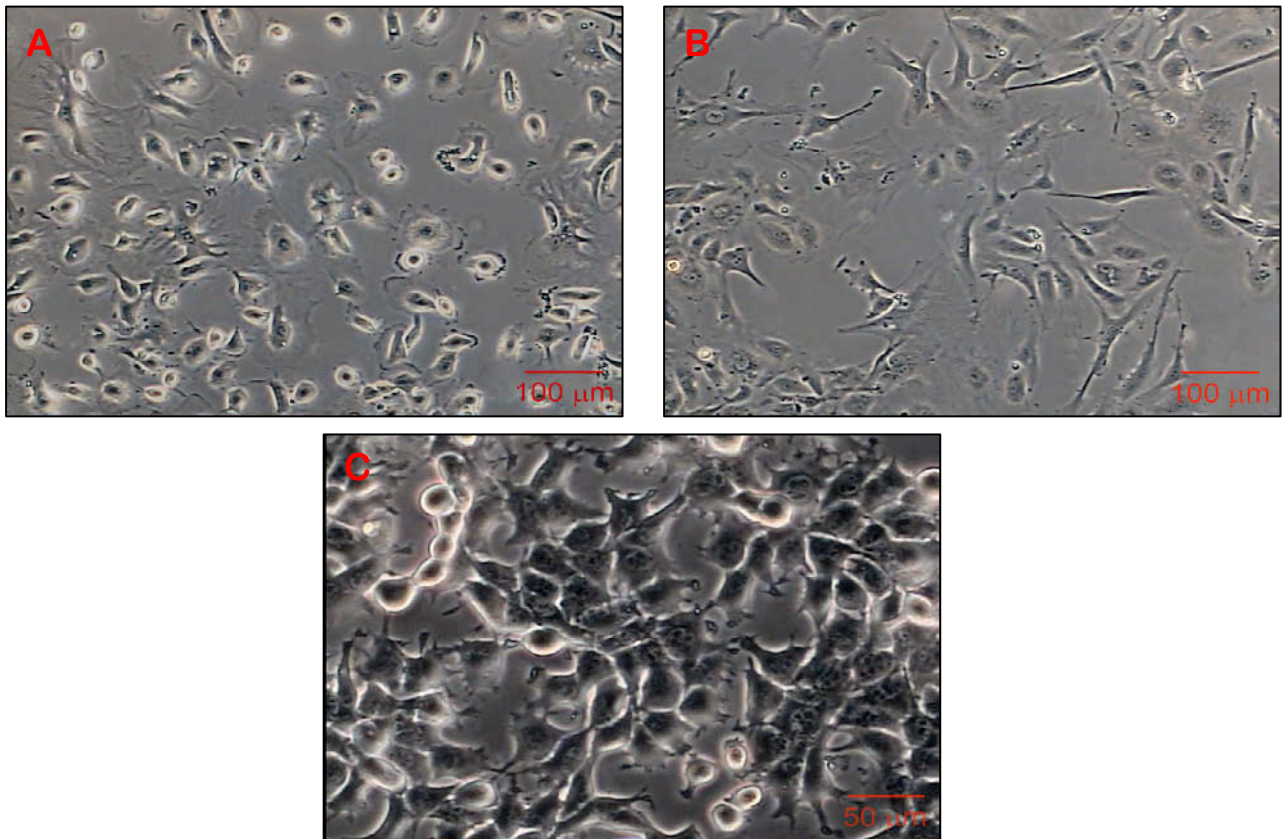


Abb. 38: Bovine (A), humane (B) und murine (C) Endothelzellen während der Inkubation im Kontrollmedium

Keine intra- und extrazellulären Vesikel an den Zellen oder am Boden der Kulturschale. Phasenkontrastmikroskop.

Im Zuge der Liposomeninkubation kam es mit zunehmender Inkubationsdauer vermehrt zu einer Abrundung von Endothelzellen, vereinzelt lösten sich auch Zellen vom Kulturschalenboden. Insbesondere bei den murinen Endothelzellen konnte dieses Phänomen beobachtet werden. Bei den humanen und den bovinen Endothelzellen kam es nur vereinzelt zu einer Abrundung von Zellen, nur sehr selten lösten sich auch einzelne Zellen partiell vom Kulturschalenboden ab.

Auch bei den Kontrollversuchen kam es nach Zugabe des Kontrollmediums bei allen Zellkulturen teilweise zu einer Abrundung vereinzelter Endothelzellen, jedoch lösten sich hier die Zellen nicht vom Kulturschalenboden.

5.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

5.4.2.1 Aufnahme und Verteilung Rhodamin-markierter Liposomen durch bovine Endothelzellen

Die bovinen Endothelzellen wurden für 30 Minuten, 60 Minuten und 180 Minuten mit den Rhodamin-markierten Liposomen inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde nach Ablauf der Inkubationszeit mit Trypan Blau gefärbt. Dieser Farbstoff überdeckt die Fluoreszenz extrazellulär gebundener Liposomen. Der Farbstoff kann jedoch nicht in intakte, vitale Zellen eindringen, so dass die Fluoreszenz internalisierter Liposomen unverändert erhalten bleibt.

In allen Versuchen, auch in den Kontrolluntersuchungen, wiesen die bovinen Endothelzellen eine schwache dunkelrote Eigenfluoreszenz auf. Neben dieser Eigenfluoreszenz zeigten etwa 80% der bovinen Endothelzellen nach Inkubation mit Rhodamin-markierten zusätzlich eine intensive hellrote, teils eher orange Fluoreszenz. 20% der bovinen Endothelzellen zeigten keine zusätzliche Fluoreszenz, weder intra- noch extrazellulär.

Bei den nicht mit Trypan Blau behandelten Zellen erschien diese hellrote Fluoreszenz sowohl punktuell und intensiv an verschiedenen Lokalisationen als auch diffus über die gesamte Fläche der Zelle verteilt (Abb. 39). Nach Färbung mit Trypan Blau verminderte sich die diffuse Fluoreszenz, zudem schwächte sich die punktuelle Fluoreszenz ab, es mussten längere Belichtungszeiten gewählt werden, um die Fluoreszenz fotografisch dokumentieren zu können (Abb. 40).

Bereits nach 30 Minuten wiesen die Zellen diffuse und punktuelle Fluoreszenz auf (Abb. 39A). Nach 60 Minuten war die Fluoreszenz an den Zellen etwas stärker; insbesondere die punktuelle, intensive Fluoreszenz nahm zu, die fluoreszierenden Punkte wurden größer (Abb. 39C). Nach 180-minütiger Inkubationsdauer war keine weitere Zunahme der Fluoreszenz feststellbar (Abb. 39E).

Nach Färbung mit Trypan Blau zeigte sich in den Zellen nur punktuelle Fluoreszenz. Eine diffuse Fluoreszenz konnte mittels dieser Untersuchungsmethode nicht sicher von der roten Eigenfluoreszenz der Zellen abgegrenzt werden. Die punktuelle Fluoreszenz fand sich nach 30 Minuten hauptsächlich dicht in der Nähe der äußeren Zellmembran (Abb. 40A). Nach längerer Inkubationsdauer (60 min, 180 min) waren weniger Bereiche mit punktueller Fluoreszenz in den bovinen Endothelzellen vorhanden als nach 30 Minuten (Abb. 40E). Auch hier war diese punktuelle Fluoreszenz meist in den äußeren Bereichen des Zytoplasmas zu sehen, vereinzelt war auch punktuelle Fluoreszenz in der Nähe des Zellkerns auffindbar (Abb. 40C, E).

5.4.2.2 Aufnahme und Verteilung Rhodamin-markierter Liposomen durch murine Endothelzellen

Nach 30 Minuten, 60 Minuten und 180 Minuten Inkubationsdauer wurden die murinen Endothelzellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Auch bei den murinen Endothelzellen wurden einige Zellpräparate mittels Trypan Blau gefärbt, um die extrazelluläre Fluoreszenz zu überdecken und somit die intrazelluläre Fluoreszenz isoliert darzustellen.

Bereits nach 30 Minuten Inkubationsdauer wiesen alle Zellen eine intensive Fluoreszenz auf. Diese erstreckte sich bei den ohne Trypan Blau verarbeiteten Zellen sowohl diffus über die Zelle als auch intensiv punktuell (Abb. 41). Die punktuelle Fluoreszenz hob sich nur schwach von der diffusen Fluoreszenz ab. Nach 30 Minuten Inkubationszeit war die Fluoreszenz insbesondere im Randbereich der Zellen sehr intensiv (Abb. 41A). Wurden die Zellen für 60 Minuten mit den Liposomen inkubiert, so erstreckte sich die Fluoreszenz nahezu gleichmäßig intensiv über die gesamte Zelle (Abb. 41C). Nach 180 Minuten Inkubation war im Bereich der Zellkerne weniger diffuse Fluoreszenz vorhanden, diese hoben sich nun deutlich als Bereiche mit weniger Fluoreszenz von der Umgebung ab. In den Randbereichen des Zytoplasmas unterhalb der Zellmembran nahm die Fluoreszenz ab (Abb. 41E).

Nach Behandlung mit Trypan Blau wiesen die murinen Zellen eine intensive diffuse intrazelluläre Fluoreszenz im Zytoplasma auf (Abb. 42). Mit zunehmender Inkubationsdauer drängte sich diese Fluoreszenz zunehmend näher um den Zellkern, während die Fluoreszenz in der Peripherie abnahm (Abb. 42 C, E). Innerhalb dieser kräftigen, diffusen

Fluoreszenz waren punktuell intensiver fluoreszierende Bereiche auffindbar. Nach 60 Minuten stellte sich in den peripheren, schwächer fluoreszierenden Bereichen die punktuelle Fluoreszenz deutlicher dar als nach 30 Minuten und 180 Minuten (Abb. 42 C). Nach 180 Minuten zeigte sich ein kräftiger fluoreszierender Saum um den kompletten Zellkern herum (Abb. 42 E).

5.4.2.3 Aufnahme und Verteilung Rhodamin-markierter Liposomen durch humane Endothelzellen

Für die fluoreszenzmikroskopischen Versuche wurden die humanen Zellen mit Rhodamin-markierten Liposomen für 30 Minuten, 60 Minuten und 180 Minuten inkubiert und einige Zellpräparate zur Darstellung der intrazellulären Fluoreszenz zusätzlich mit Trypan Blau behandelt.

Auch bei den humanen Zellen war bereits nach 30 Minuten Inkubationszeit Fluoreszenz an den Zellen feststellbar (Abb. 43 A). Diese wurde mit längerer Inkubationsdauer nicht deutlich intensiver. Die Fluoreszenz verteilte sich wohl schwach und diffus über die ganze Zelle, es trat aber auch bei diesen Zellen eine intensive punktuelle Fluoreszenz in Erscheinung (Abb. 43). Nach 60 Minuten stellte sich der Zellkern als nicht fluoreszierender Bereich deutlicher (Abb. 43C) dar als nach 30 Minuten. Nach 180 Minuten war die Fluoreszenz auch in den Präparaten ohne Trypan Blau-Färbung um den Zellkern herum dichter konzentriert (Abb. 43E) als nach 30 Minuten und 60 Minuten.

Wurden die Zellen mit Trypan Blau behandelt, so zeigten die Zellen weiterhin sowohl diffuse als auch punktuelle Fluoreszenz (Abb. 43). Nach 30 Minuten fand sich eine schwache diffuse Fluoreszenz im gesamten Plasmabereich der Zellen, die punktuelle Fluoreszenz war nur wenig vorhanden (Abb. 44A). Nach 60 Minuten konzentrierte sich die diffuse Fluoreszenz etwas mehr um den Zellkern, es fand sich dort oft ein fluoreszierender Saum. Auch war vermehrt punktuelle Fluoreszenz im Rest des Zytoplasmas, auch zellmembrannah, zu finden (Abb. 43 C). Nach 180 Minuten war die diffuse Fluoreszenz konzentriert im peripheronukleären Bereich aufzufinden, die zellmembrannah Fluoreszenz nahm ab. Insgesamt wurde die Fluoreszenz stärker, der fluoreszierende Saum um den Zellkern herum breiter (Abb. 44 E).

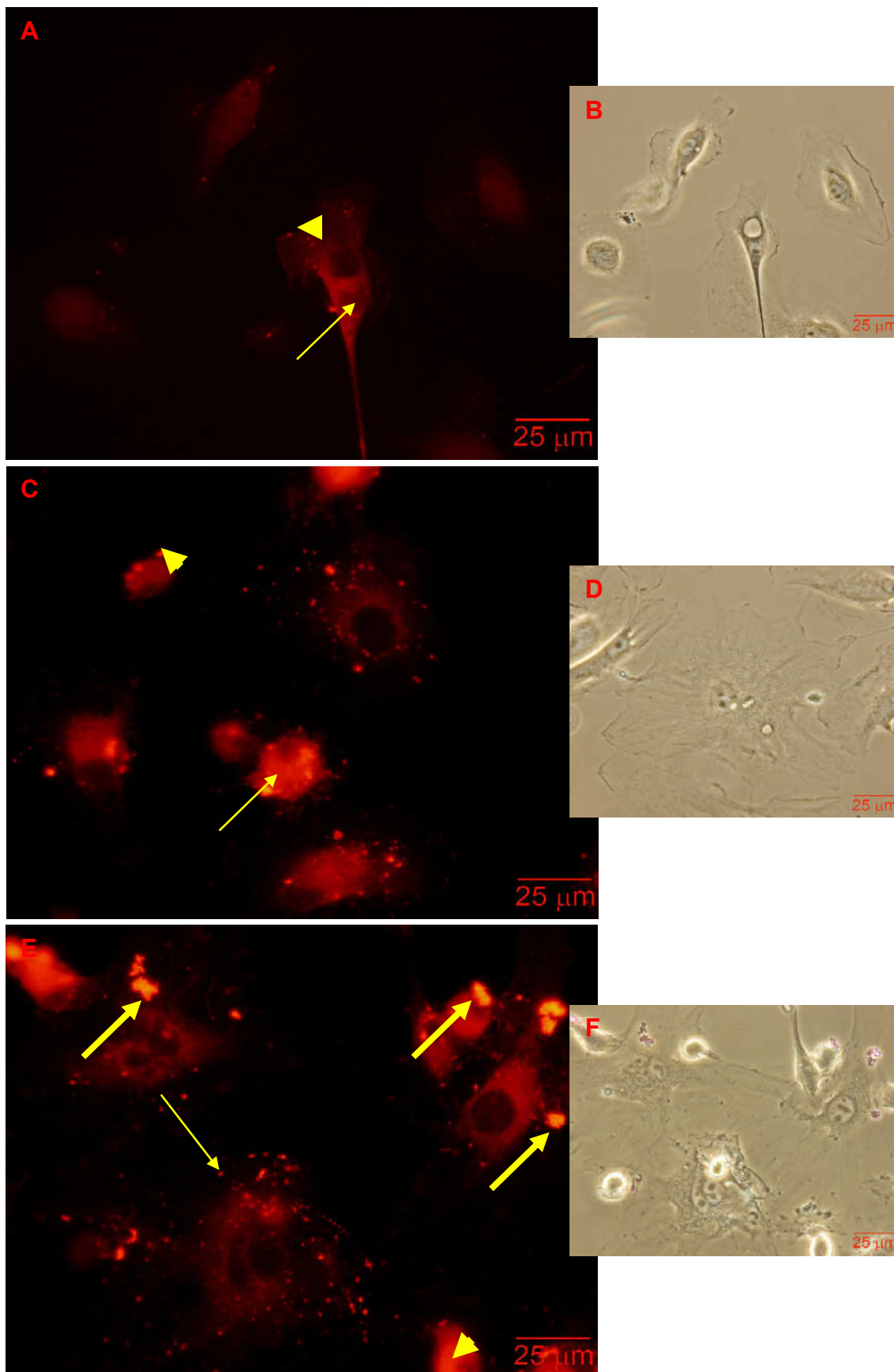


Abb. 39A-F: Bindung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen

diffuse (Pfeilspitzen) und punktuelle (dünne Pfeile) Fluoreszenz nach 30 Minuten (A), 60 Minuten (B) und 180 Minuten (E) Inkubation, größere punktuelle orangerote Fluoreszenz an den Zellen (dicke Pfeile).

(A, C, E) Fluoreszenzmikroskop, (B, D, F) identische Ausschnitte im Phasenkontrastmikroskop.

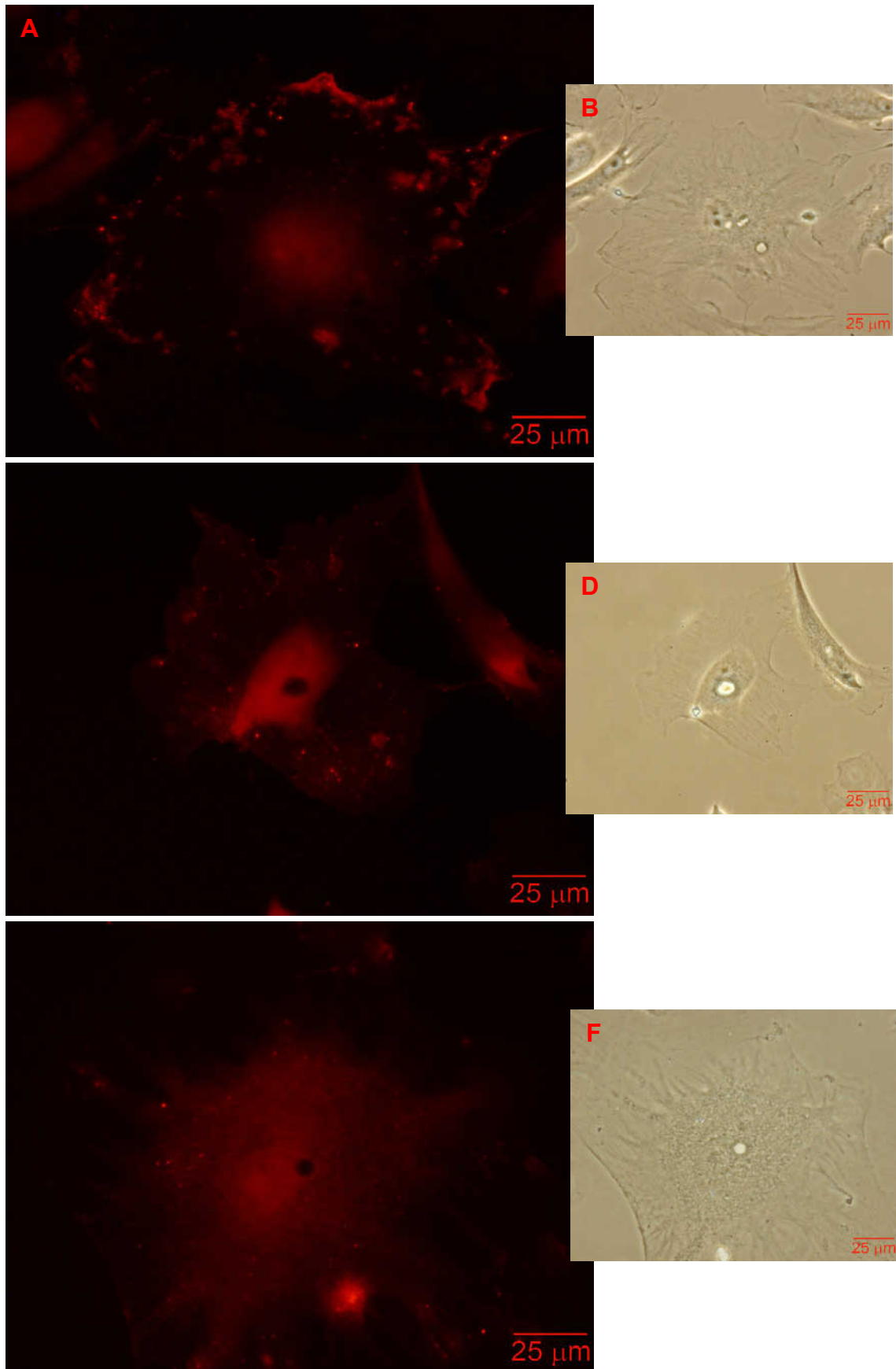


Abb. 40A-F: Internalisierung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen

(A) punktuelle Fluoreszenz im Bereich der Zellmembran nach 30 Minuten Inkubation, (C) punktuelle und diffuse Fluoreszenz im Zytoplasma nach 60 Minuten Inkubation, (E) punktuelle und diffuse Fluoreszenz im Zellinneren nach 180 Minuten Inkubation.

(A, C, E) Fluoreszenzmikroskop, (B, D, F) identische Ausschnitte im Phasenkontrastmikroskop.

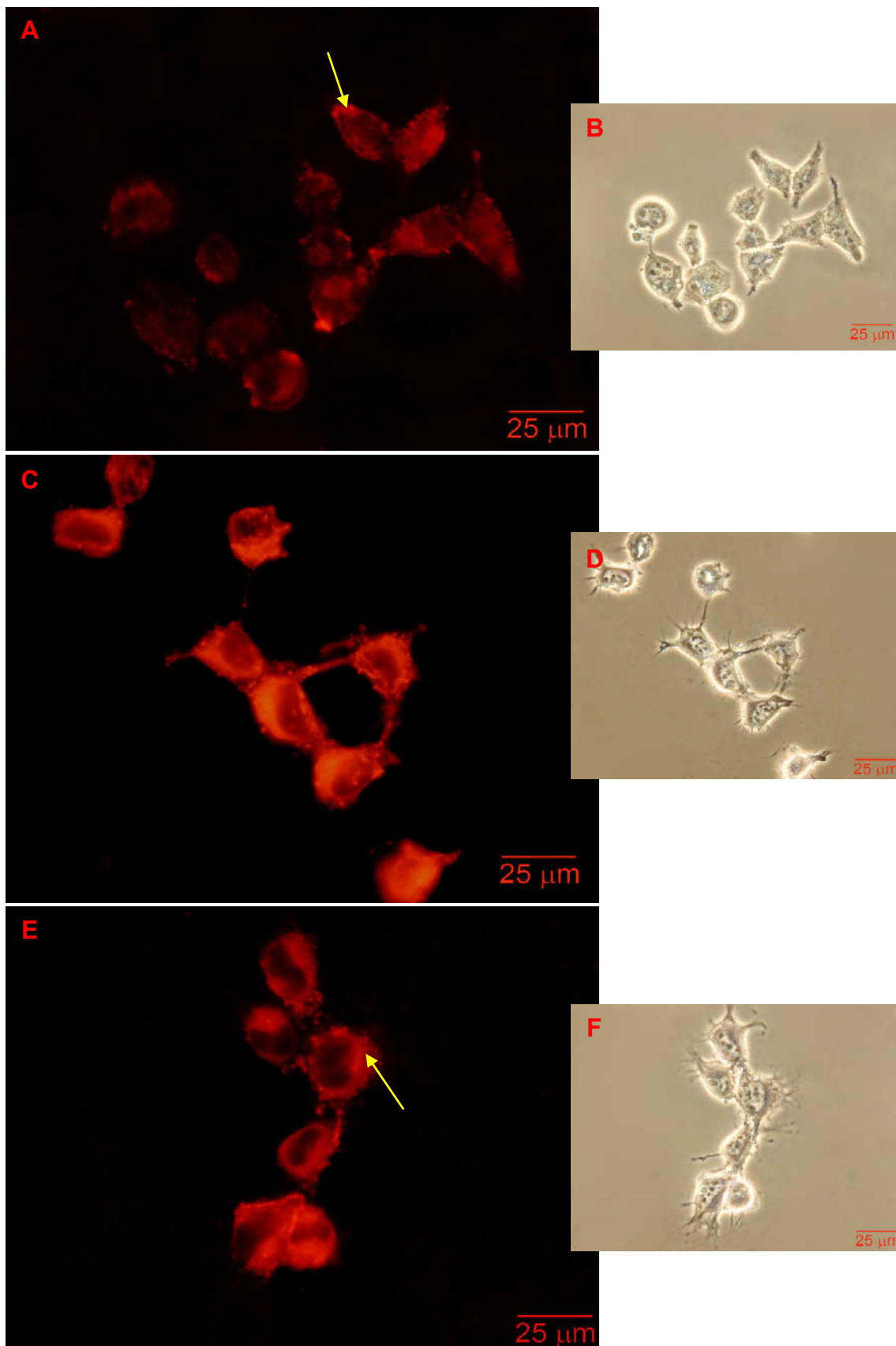


Abb. 41A-F: Bindung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen

(A) punktuelle Fluoreszenz vermehrt an den äußeren Bereichen der Zellmembran (Pfeil), diffuse Fluoreszenz an der Zelle nach 30 Minuten Inkubation, (C) diffuse und punktuelle Fluoreszenz verteilt über die Zelle nach 60 Minuten Inkubation, (E) diffuse und punktuelle Fluoreszenz verstärkt um den Zellkern nach 180 Minuten Inkubation (Pfeil).

(A, C, E) Fluoreszenzmikroskop, (B, D, F) identische Ausschnitte im Phasenkontrastmikroskop.

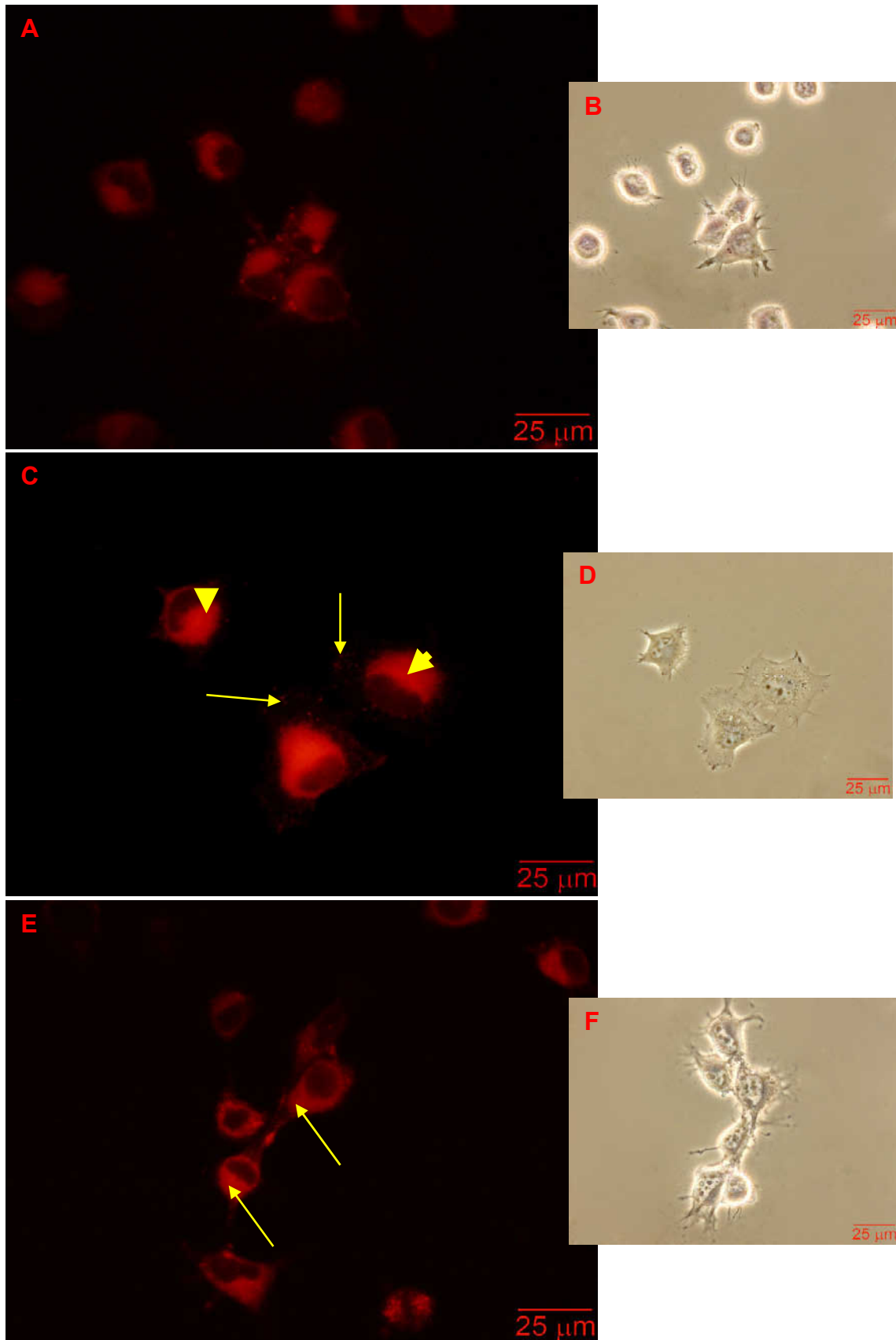


Abb. 42A-F: Internalisierung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen

(A) diffuse und punktuelle Fluoreszenz im Zytosol muriner Endothelzellen nach 30 Minuten Inkubation, vermehrte diffuse Fluoreszenz (Pfeilspitzen) um den Zellkern und vereinzelte punktuelle Fluoreszenz (Pfeile) im Zytosol nach 60 Minuten Inkubation, kräftiger peripheronukleärer fluoreszierender Saum (Pfeile) nach 180 Minuten Inkubation.

(A, C, E) Fluoreszenzmikroskop, (B, D, F) identische Ausschnitte im Phasenkontrastmikroskop.

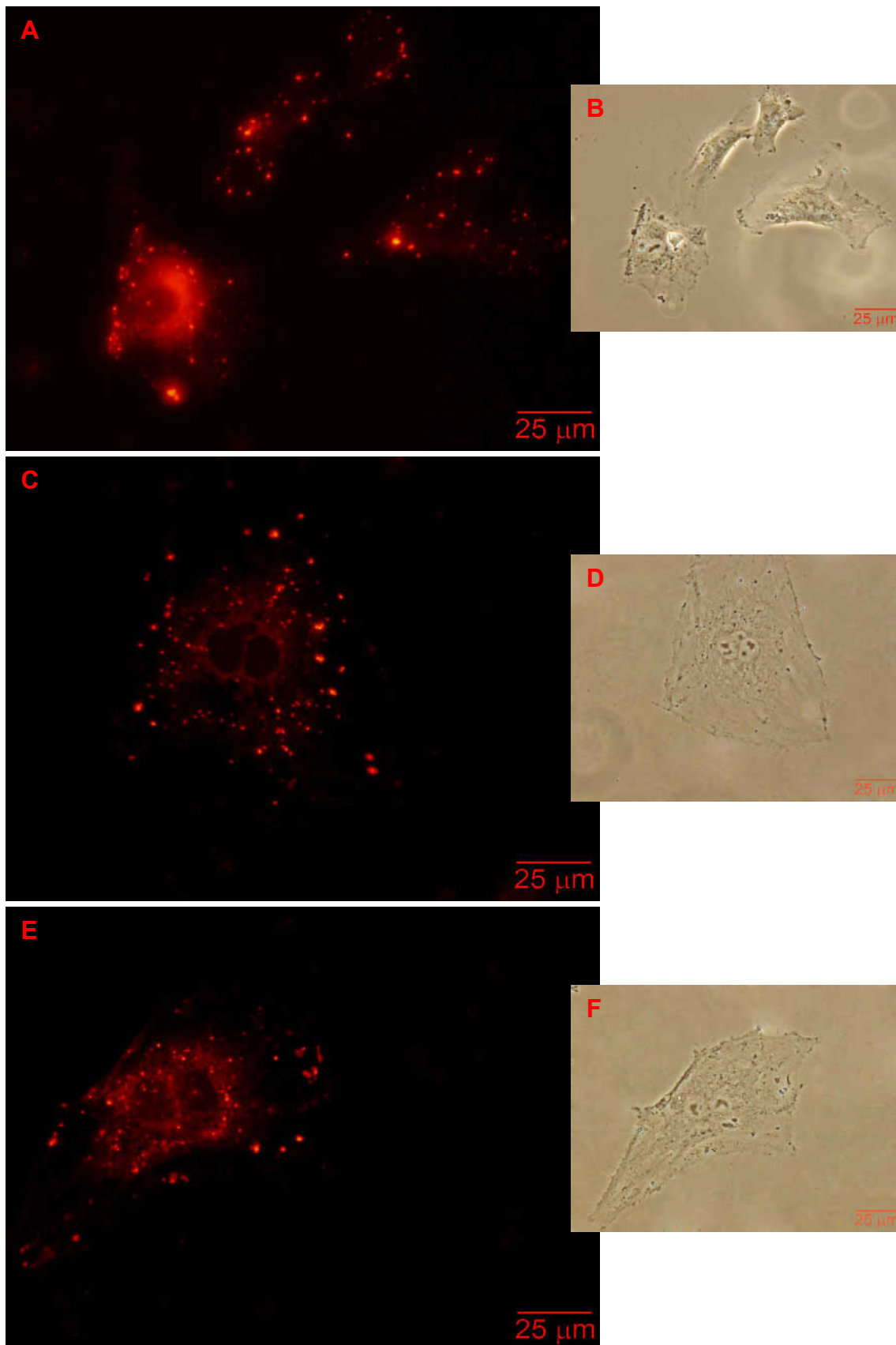


Abb. 43A-F: Bindung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen

(A) kräftige punktuelle und sehr schwache diffuse Fluoreszenz an den human Endothelzellen nach 30 Minuten Inkubation, (C) punktuelle Fluoreszenz und leichter diffus fluoreszierender peripheronukleärer Saum nach 60 Minuten Inkubation, (E) kräftiger diffus fluoreszierender Saum und vermehrte Anreicherung der punktuellen Fluoreszenz um den Zellkern nach 180 Minuten Inkubation. (A, C, E) Fluoreszenzmikroskop, (B, D, F) identische Ausschnitte im Phasenkontrastmikroskop

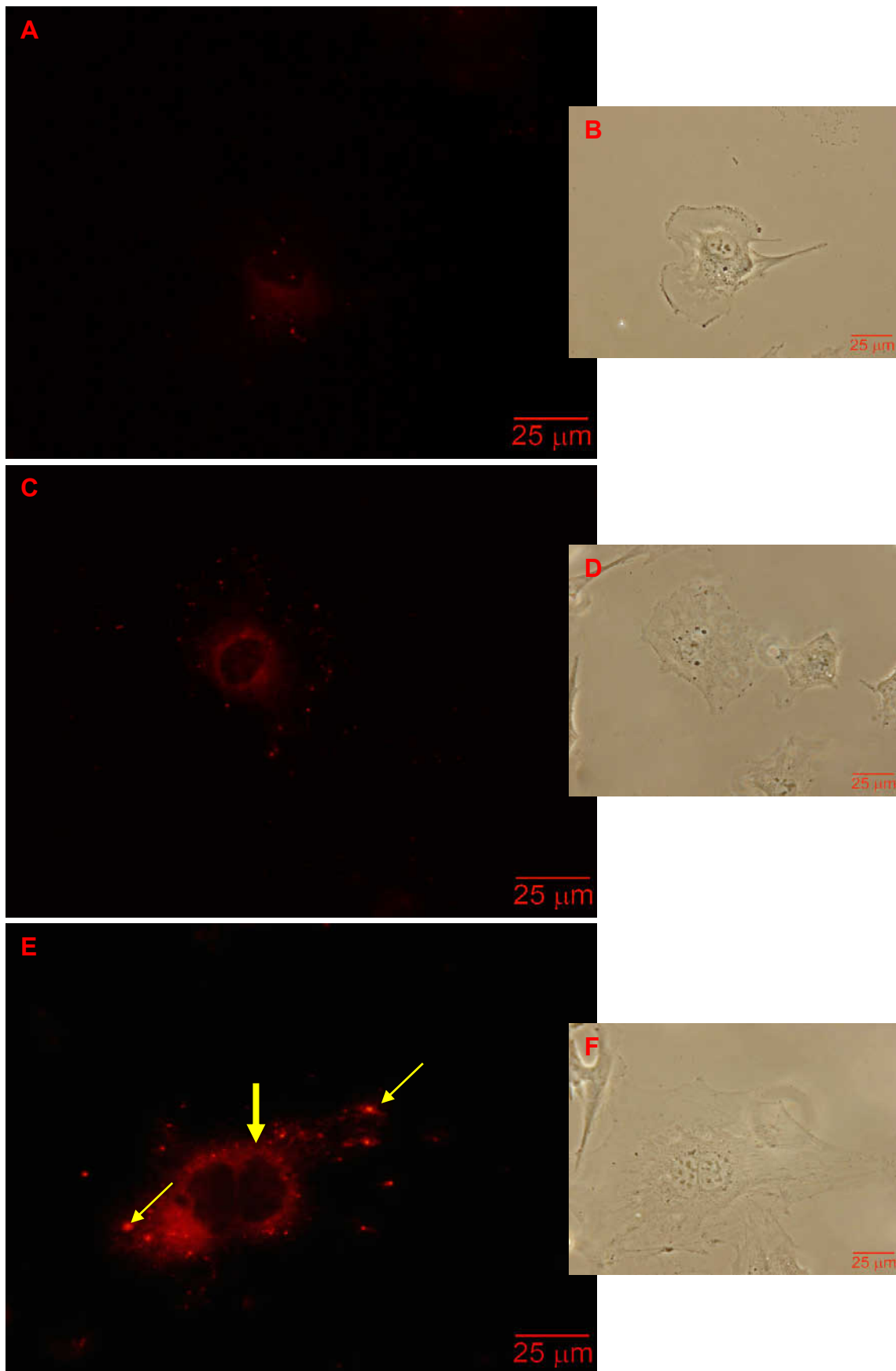


Abb. 44A-F: Internalisierung Rhodamin-markierter kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen

(A) Geringe punktuelle Fluoreszenz nach 30 Minuten Inkubation, (C) leichter peripheronukleärer Saum nach 60 Minuten Inkubation, (E) kräftig fluoreszierender peripheronukleärer Saum (dicker Pfeil) nach 180 Minuten Inkubation, starke punktuelle Fluoreszenz (dünne Pfeile).

(A, C, E) Fluoreszenzmikroskop, (B, D, F) identische Ausschnitte im Phasenkontrastmikroskop.

5.5 Transmissionsmikroskopische Untersuchungen

5.5.1 Aufnahme und Verteilung Gold-markierter Liposomen durch bovine Endothelzellen

Für die transmissionselektronischen Versuche wurden die bovinen Endothelzellen für 30 Minuten, 60 Minuten und 180 Minuten mit Gold-markierten Liposomen inkubiert und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Im Transmissionselektronenmikroskop stellten sich die mittels Silver-Enhancement verstärkten Nanogold-Partikel als elektronendichte schwarze Punkte dar. Diese befanden sich sowohl einzeln in der Zelle und der äußeren Zellmembran (Abb. 45, 46 und 48) als auch an Liposomen an der äußeren Zellmembran (Abb. 45, 46, 47 und 48) und in Vesikeln innerhalb der Zelle (Abb. 49).

Auch in diesen Versuchen wiesen teilweise bis zu 86% der bovinen Zellen keine Goldpartikel auf. Viele der bovinen Zellen zeigten nur einzelne Goldkörner an der äußeren Zellmembran und in der Zelle. An einigen Zellen fanden sich jedoch Liposomen an Zellausläufern oder Invaginationen der äußeren Zellmembran. Hierbei lagen einige Liposomen auch in Caveolae (Abb. 48). In vereinzelt Zellen fanden sich die Liposomen auch innerhalb von intrazellulären endozytotischen Vesikeln dicht unterhalb der Zellmembran (Abb. 49). Die Struktur der Liposomen war in diesen Vesikeln und auch an den Invaginationen teilweise nicht mehr intakt, die Goldpartikel lagen in einer elektronendichten Masse (Abb. 48 und 49).

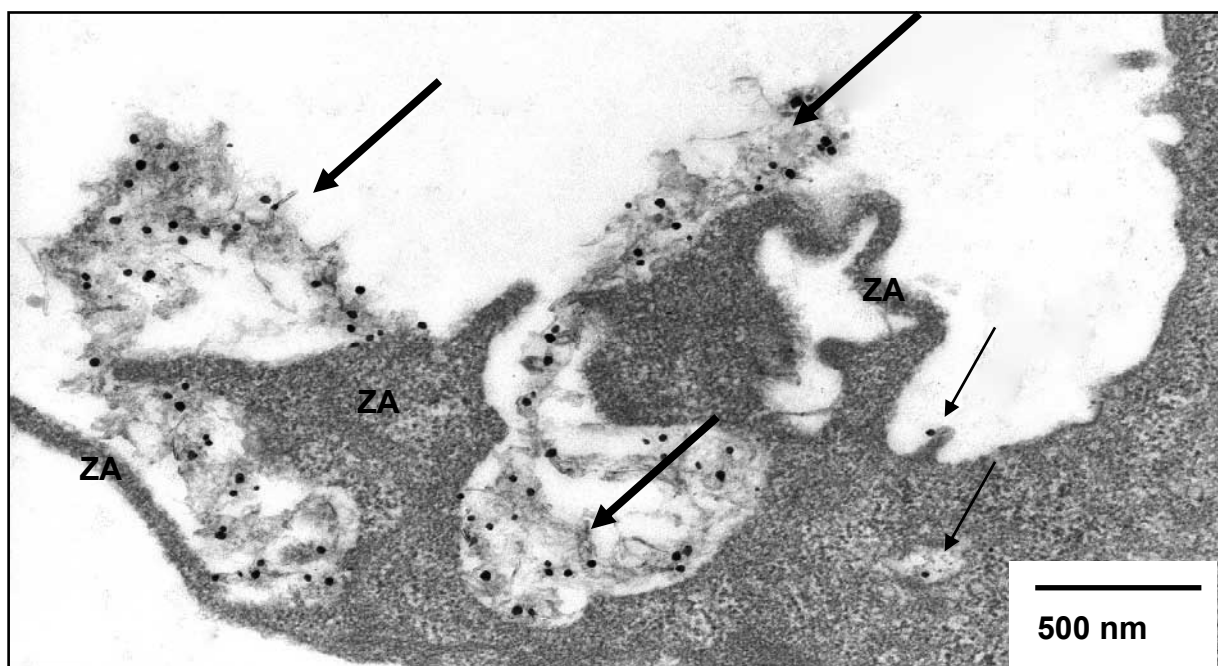


Abb. 45: Ultrastrukturelle Darstellung einer bovinen Endothelzelle nach Inkubation mit Gold-markierten Liposomen

Einzelne Goldpartikel an der äußeren und in der Zelle (dünne Pfeile). Großes Liposomencluster (dicke Pfeile) im Bereich der Zellmembran mit vielen Zellausläufern (ZA). Transmissionselektronenmikroskop.

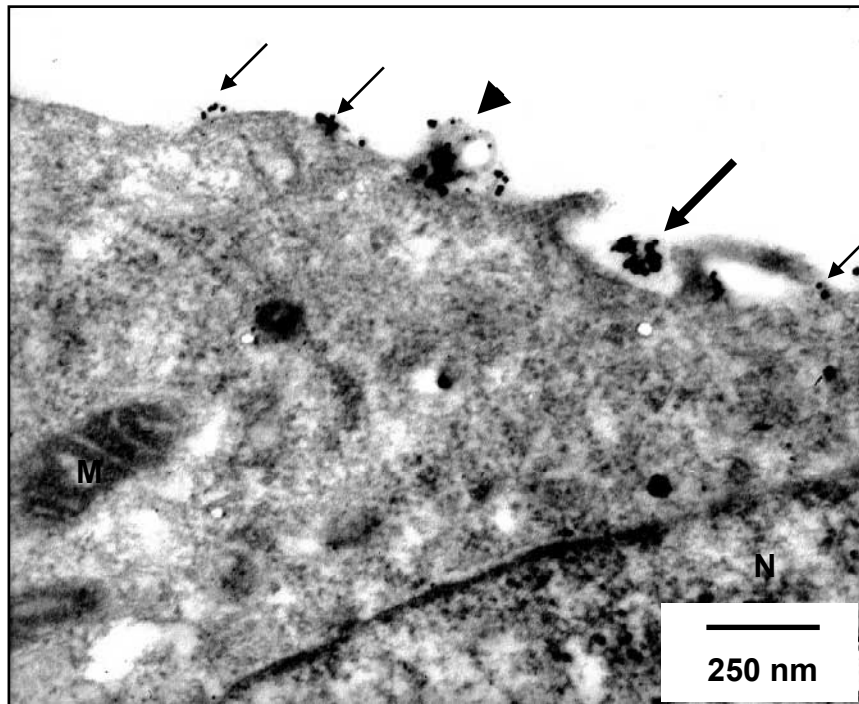


Abb. 46: Ultrastrukturelle Darstellung von Liposomen und Goldpartikeln an der Zellmembran einer bovinen Endothelzelle

Einzelne Goldpartikel an der äußeren Zellmembran (dünne Pfeile). Liposomen mit Goldpartikel (Pfeilspitze) an der Zelle ohne deutliche Zellmembran. Liposom an einer Invagination (dicker Pfeil). Mitochondrium (M). Nukleus (N). Transmissionselektronenmikroskop.

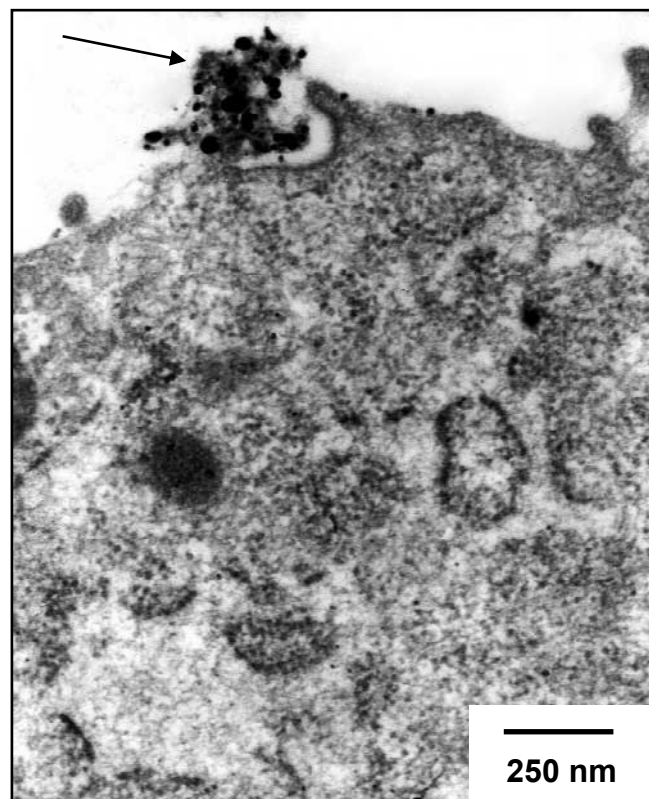


Abb. 47: Ultrastrukturelle Darstellung eines Liposoms an der äußeren Zellmembran einer bovinen Endothelzelle

Liposomencluster (Pfeil) an einer Invagination der äußeren Zellmembran. Transmissionselektronenmikroskop.

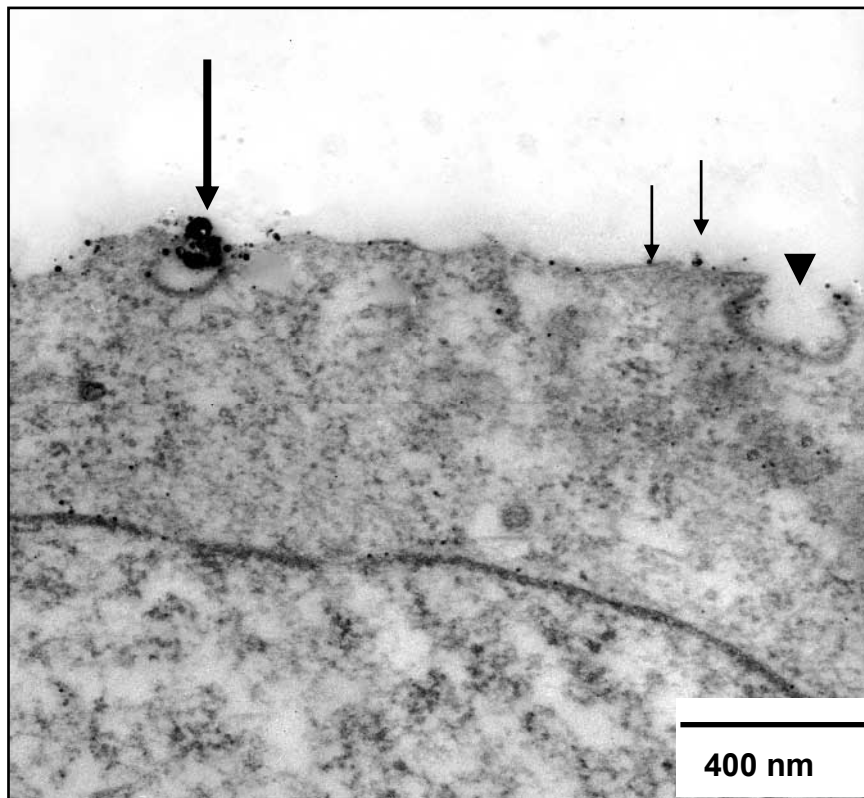


Abb. 48: Ultrastrukturelle Darstellung der äußeren Zellmembran einer bovinen Endothelzelle mit mehreren Caveolae

Liposom an einer Caveola (dicker Pfeil). Caveola ohne Liposom (Pfeilspitze). Einzelne Goldpartikel an der äußeren Zellmembran (dünne Pfeile) Transmissionselektronenmikroskop.

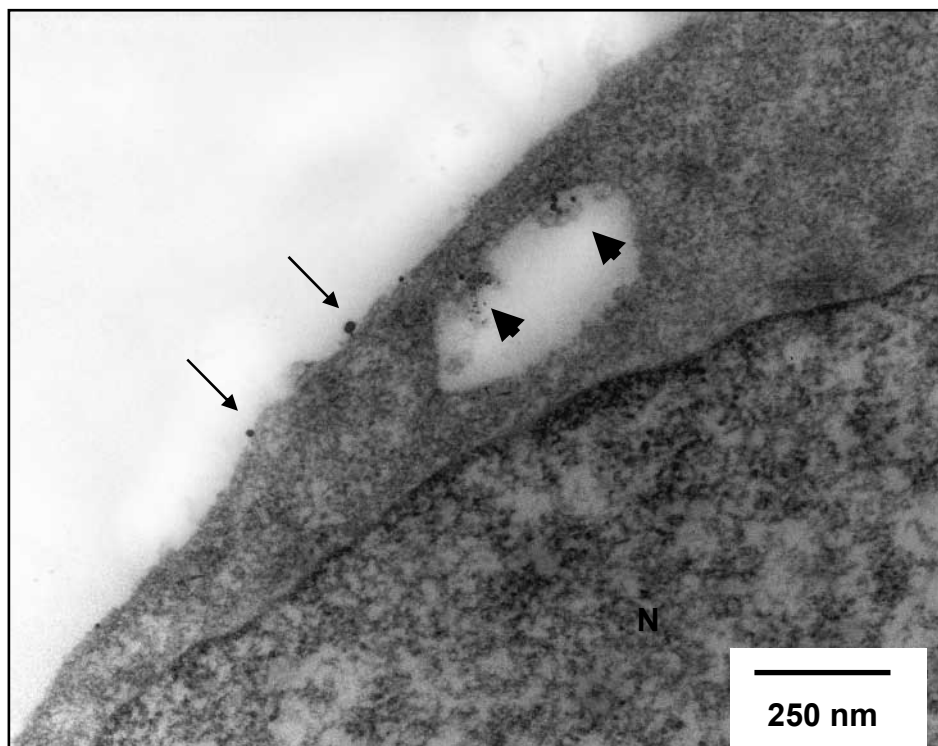


Abb. 49: Ultrastrukturelle Darstellung endozytierter Gold-markierter Liposomen in einer bovinen Endothelzelle

Liposomen in einem intrazellulären Vesikel (Pfeilspitzen). Einzelne Goldpartikel an der äußeren Zellmembran (dünne Pfeile). Nukleus (N). Transmissionselektronenmikroskop.

Insgesamt schwankten die Ergebnisse zur Lokalisation der Goldpartikel an den bovinen Endothelzellen sehr stark auch innerhalb der einzelnen Versuchsreihen. Zu keinem Zeitpunkt sind auffallend mehr Liposomen oder Goldpartikel an oder in der Zelle zu verzeichnen. Tendenziell scheinen nach 180 Minuten weniger Liposomen an der Zellmembran und an Zellausläufern zu aufzutreten, während sich zu diesem Zeitpunkt mehr Liposomen in intrazellulären Vesikel finden (Abb. 50).

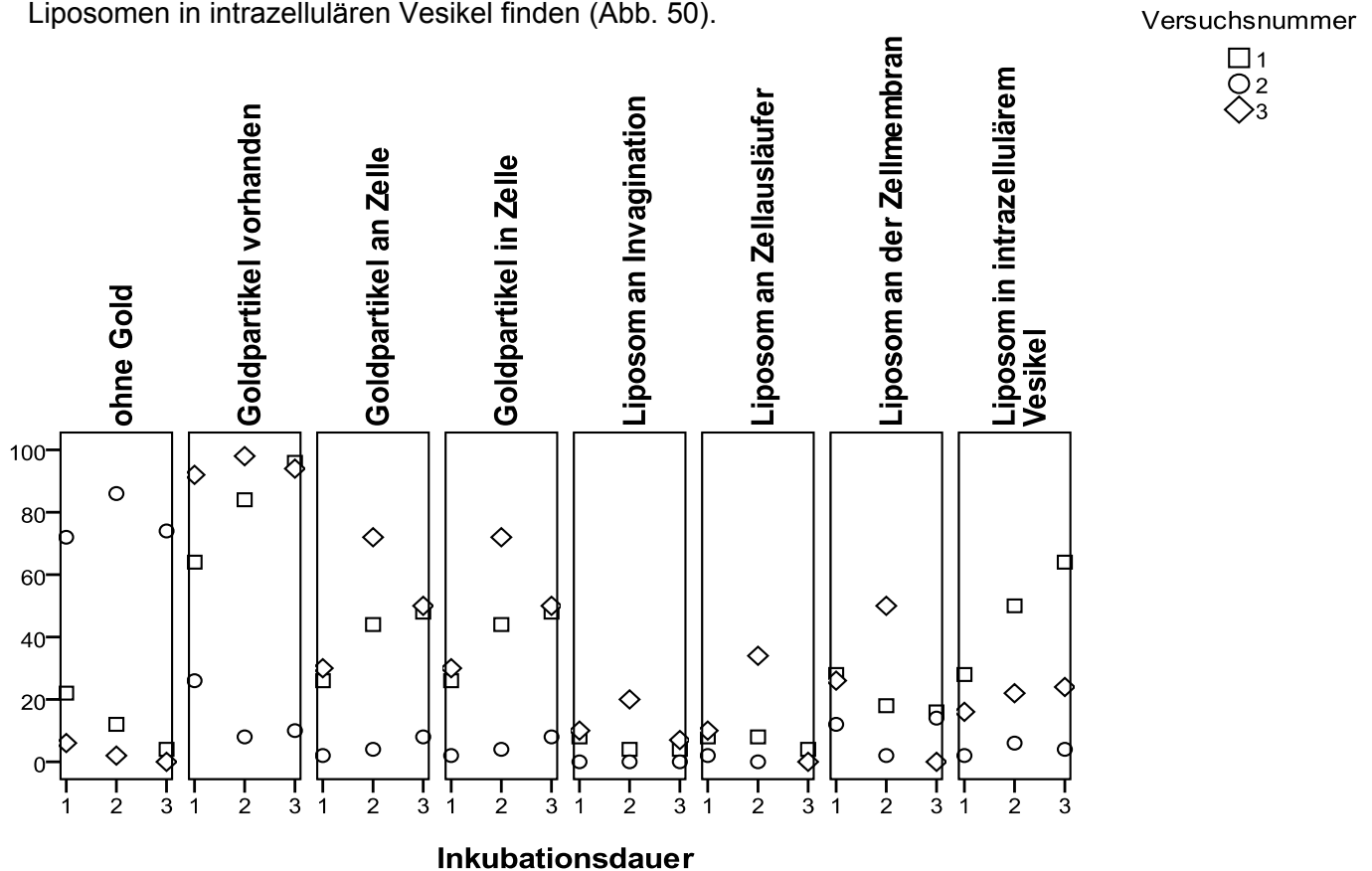


Abb. 50: Vorkommen der Goldpartikel an und in den bovinen Endothelzellen

Bovine Endothelzellen wurden bei 70% Konfluenz für 30, 60 und 180 Minuten mit Gold-markierten Liposomen inkubiert. Zur Auswertung wurden 50 Zellen pro Versuchsansatz auf die Lokalisation der Goldpartikel untersucht. Dargestellt ist das prozentuale Auftreten der definierten Ereignisse nach 30 Minuten (1), 60 Minuten (2) und 180 Minuten (3).

5.5.2 Aufnahme und Verteilung Gold-markierter Liposomen durch murine Endothelzellen

Die murinen Endothelzellen wurden für 30 Minuten, 60 Minuten und 180 Minuten mit den Gold-markierten Liposomen inkubiert. Nahezu alle Zellen zeigten nach Inkubation mit den Liposomen Goldpartikel, nur vereinzelt wiesen Zellen keine Goldpartikel auf. Die Goldpartikel fanden sich auch hier sowohl einzeln an der äußeren Zellmembran und in der Zelle als auch an Liposomen (Abb. 51 und 54). Die Liposomen hafteten den Zellen oftmals von außen an, besonders häufig im Bereich von Zellausläufern und Invaginationen (Abb. 51, 52 und 53). In einigen Bereichen wurden die Liposomen regelrecht von Zellausläufern umschlungen (Abb. 52). Die Invaginationen wurden teilweise von dünnen Zellfortsätzen überbrückt (Abb. 53), hier schienen sie im Prozess der Abschnürung von der äußeren Zellmembran zu sein. Häufig fanden sich auch Liposomen intrazellulär in Endosomen (Abb. 54). Diese lagen zumeist dicht unterhalb der Zellmembran.

In einigen Bereichen, in denen Liposomen an der äußeren Zellmembran anhafteten, war die Struktur der äußeren Zellmembran nicht mehr deutlich erkennbar (Abb. 51 und 54). Im Bereich des Kontaktes zwischen Liposomen und Zellmembran stellten sich die Grenzen zwischen den Strukturen nur sehr verschwommen dar.

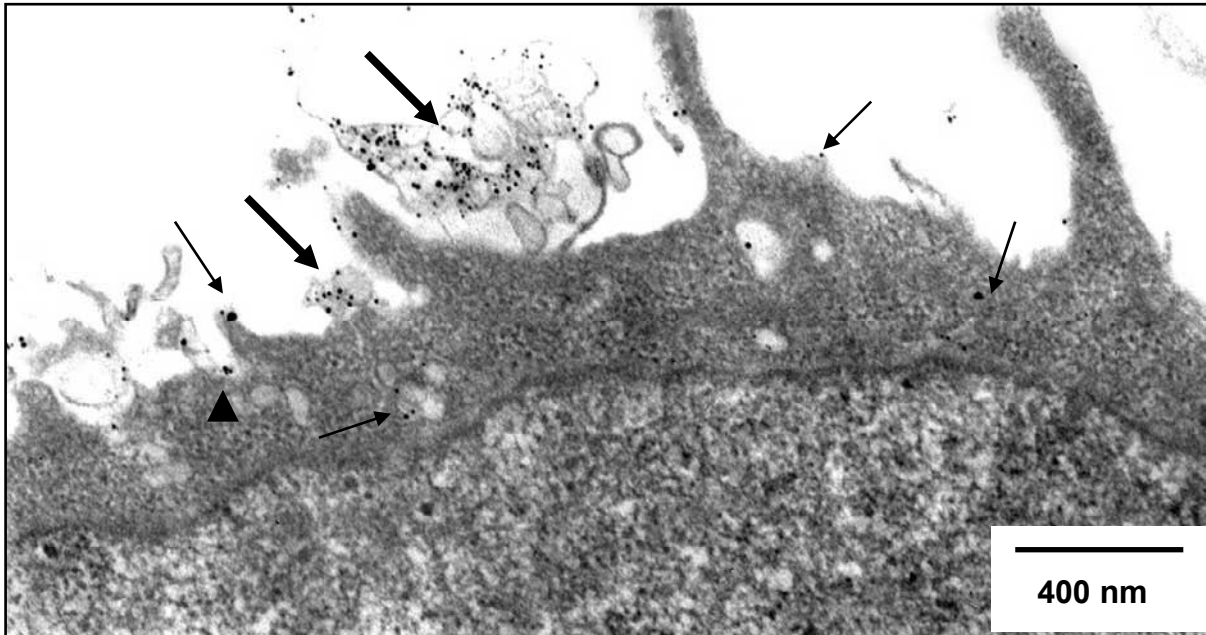


Abb. 51: Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle nach Inkubation mit Gold-markierten Liposomen

Liposomencluster (dicke Pfeile) an der äußeren Zellmembran zwischen Zellausläufern. Einzelne Goldpartikel an und in der Zelle (dünne Pfeile). Undeutliche Zellmembran im Bereich anhaftender Liposomen (Pfeilspitze). Transmissionselektronenmikroskop.

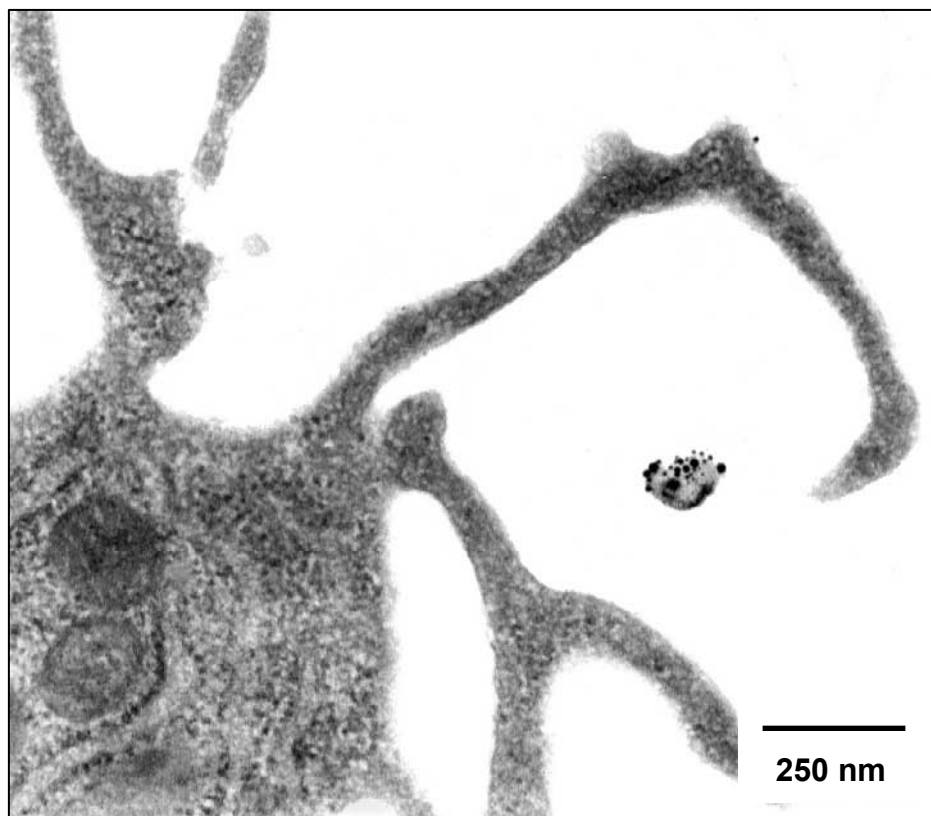


Abb. 52: Ultrastrukturelle Darstellung eines Gold-markierten Liposoms in der Nähe von Zellausläufern einer murinen Endothelzelle

Liposom im Bereich eines Zellausläufers. Transmissionselektronenmikroskop.

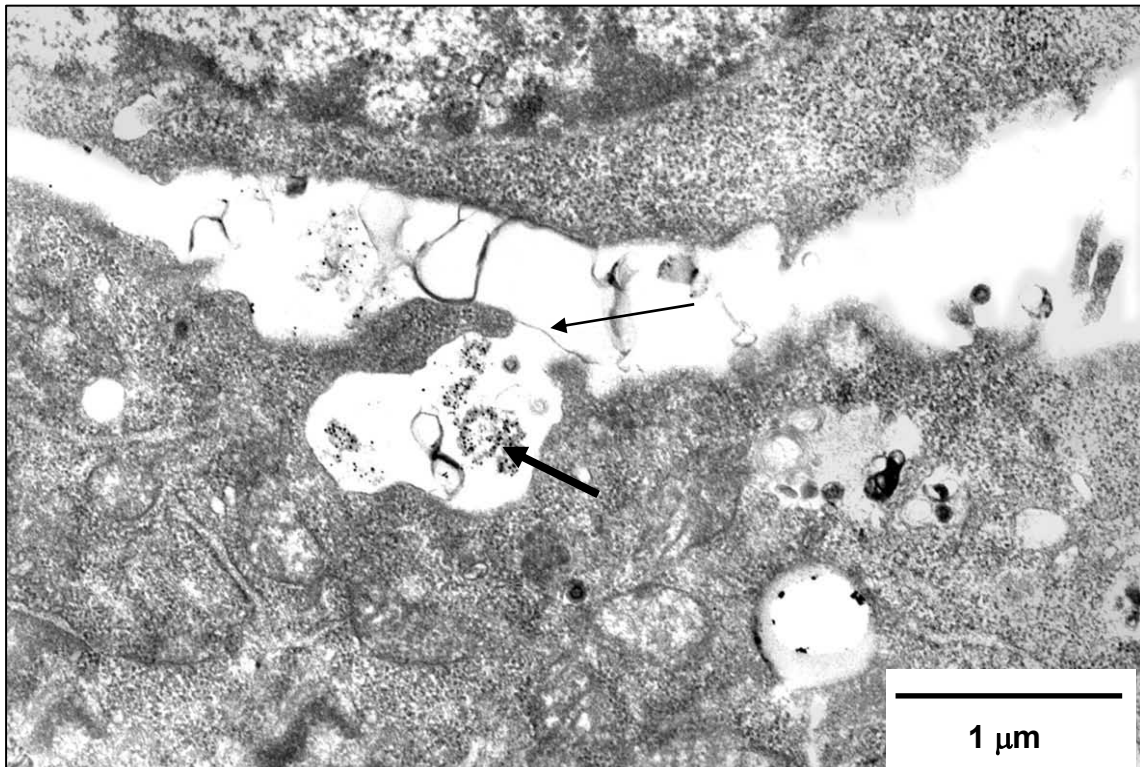


Abb. 53: Ultrastrukturelle Darstellung Gold-markierter Liposomen im Prozess der Endozytose durch eine murine Endothelzelle

Liposomencluster (dicker Pfeil) im Prozess der Invagination. Ein fadenförmiger Zellausläufer (dünner Pfeil) verschließt die Invagination an der äußeren Zellmembran. Transmissionselektronenmikroskop.

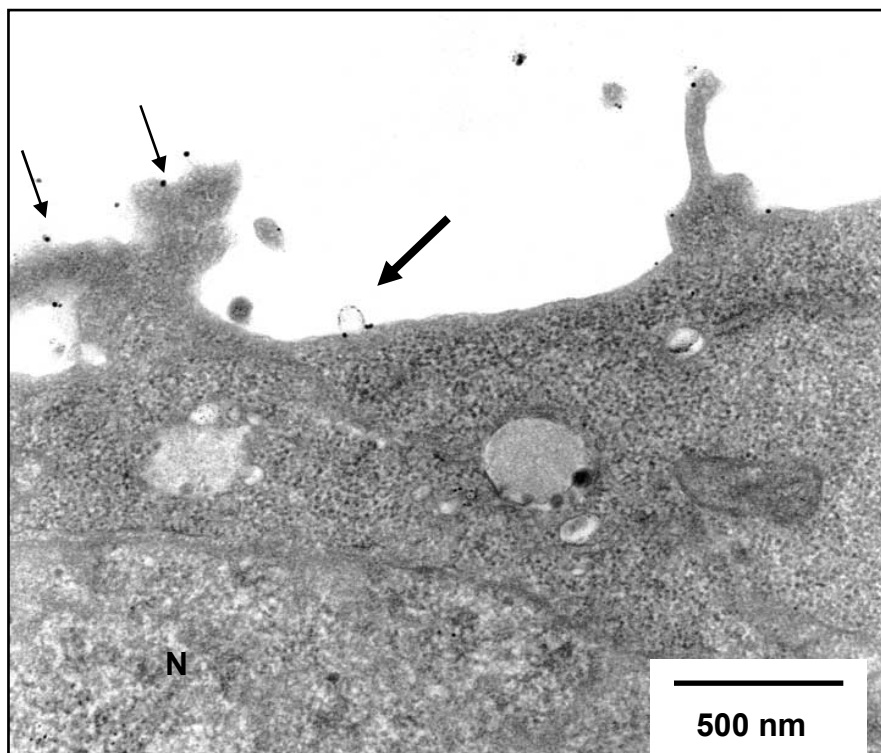


Abb. 54: Ultrastrukturelle Darstellung eines Liposoms an einer murinen Endothelzelle im Prozess der Fusion mit der Zellmembran

Einzelne Goldpartikel an der Zelle (dünne Pfeile). An der Zelle anhaftendes Liposom ohne deutliche Zellmembran im Bereich der Anhaftung (dicker Pfeil). Nukleus (N). Transmissionselektronenmikroskop.

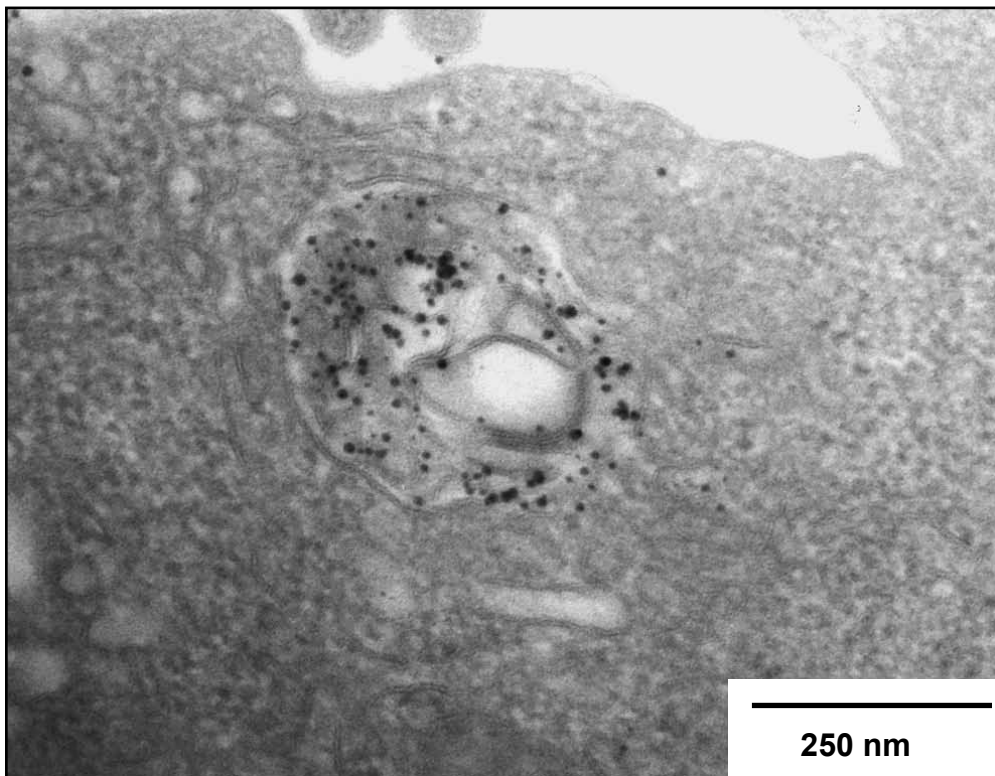


Abb. 55: Ultrastrukturelle Darstellung endozytierter Liposomen in einem intrazellulären Vesikel einer murinen Endothelzelle

Liposomencluster in einem intrazellulären Vesikel. Transmissionselektronenmikroskop.

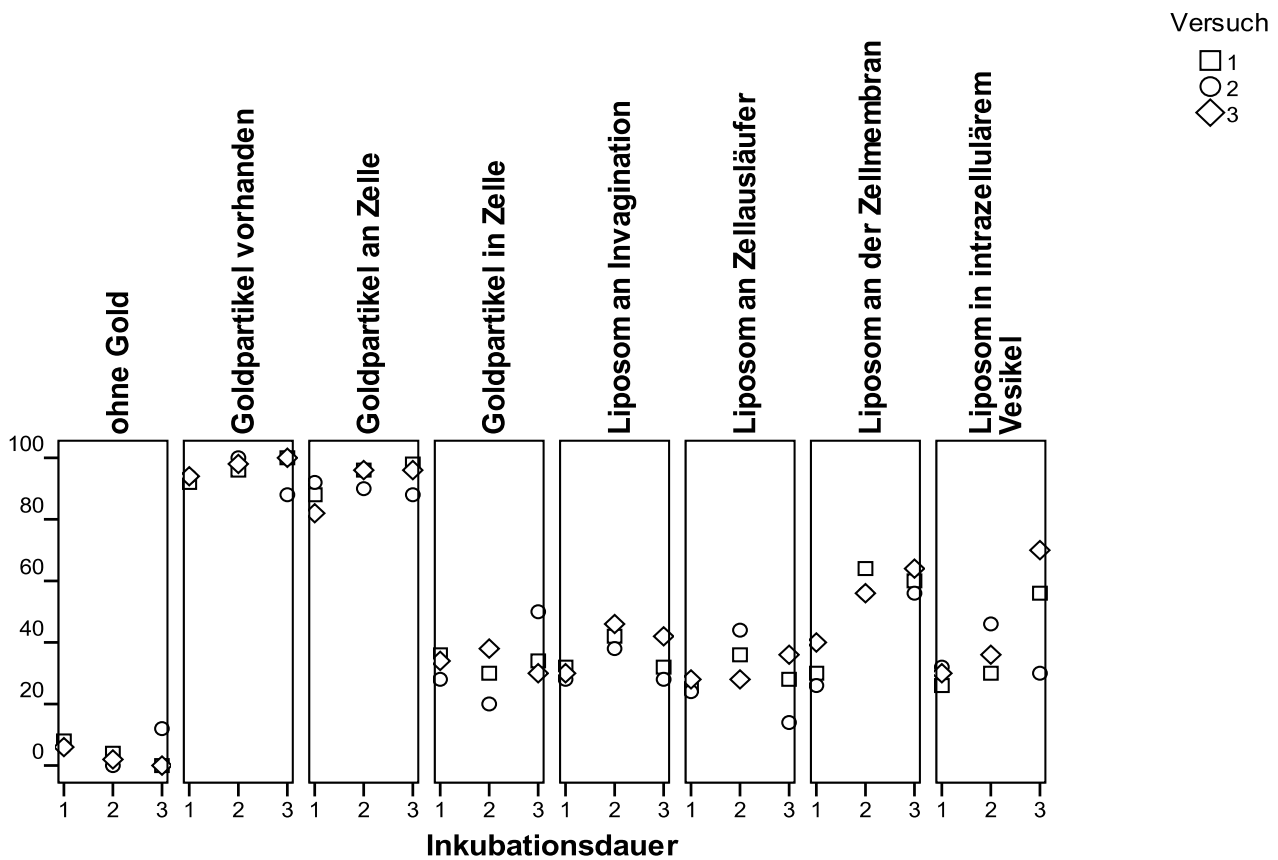


Abb. 56: Vorkommen der Goldpartikel an und in den bovinen Endothelzellen

Murine Endothelzellen wurden bei 70% Konfluenz für 30, 60 und 180 Minuten mit Gold-markierten Liposomen inkubiert. Zur Auswertung wurden 50 Zellen pro Versuchsansatz auf die Lokalisation der Goldpartikel untersucht. Dargestellt ist das prozentuale Auftreten der definierten Ereignisse nach 30 Minuten (1), 60 Minuten (2) und 180 Minuten (3).

Unabhängig von der Dauer der Inkubation fanden sich etwa gleich viele Zellen Goldpartikeln an und in der Zelle. Mit längerer Inkubation nahm zunächst der Anteil Zellen mit Liposomen an Invaginationen und Zellausläufern zu, um dann wieder abzusinken. Es wiesen mit zunehmender Inkubationsdauer mehr Zellen Liposomen in intrazellulären Vesikeln auf. Zudem hatten nach 60 Minuten und 180 Minuten mehr Zellen Liposomen an der äußeren Zellmembran. Bei der kürzesten Inkubationszeit von nur 30 Minuten hatten nur wenige Zellen bereits Liposomen endozytiert. Auch fanden sich hier weniger Zellen mit extrazellulär anhaftenden intakten Liposomen. Nach 60 und 180 Minuten Inkubationszeit wiesen insgesamt am meisten Zellen extrazellulär intakte Liposomen auf (Abb.56).

5.5.3 Humane Endothelzellen

Eine Untersuchung mittels Transmissionselektronenmikroskopie konnte nicht durchgeführt werden, da die empfindlichen humanen Zellen den Aufarbeitungsprozeß für die Elektronenmikroskopie nicht überstanden, die Zellmembranen waren nach der Bearbeitung nicht mehr darstellbar. Lediglich Kern und Plasma konnten voneinander abgegrenzt werden. Die Goldpartikel stellten sich auch hier deutlich dar, konnten jedoch aufgrund des mangelhaften Kontrastes der Zellen nicht eindeutigen Strukturen zugeordnet werden.

5.6 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch kationische Liposomen

Ziel dieser Reihe der Untersuchungen war es, die Toxizität der Liposomen auf die Endothelzellen zu untersuchen. Die Zellen wurden im Medium mit und ohne Zusatz von Liposomen für zwei Stunden inkubiert und dann dem ApoAnnexin V Test unterzogen. Dieser Test ermöglicht eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Zellnekrose. Die apoptotischen Zellen binden das mit FITC markierte Annexin V an ihrer Oberfläche und weisen somit eine diffuse grüne Fluoreszenz auf. Nekrotische Zellen werden mittels des zugesetzten Farbstoffes Propidiumiodid markiert und fluoreszieren rot. Dieser Farbstoff kann nur in die Zelle eindringen, wenn die Zellmembran geschädigt ist. Im frühen Stadium einer Apoptose ist sie noch intakt, kann aber im späten Stadium der Apoptose auch geschädigt sein. Bei nekrotischen Zellen ist die Zellmembran stets geschädigt. Somit fluoreszieren nekrotische Zellen rot, während Zellen im frühen Stadium der Apoptose grün und im späten Stadium der Apoptose rot und grün fluoreszieren.

5.6.1 Bovine Endothelzellen

Bovine Endothelzellen wurden in der Passage 15 verwendet und nach einer Kultivierungsphase von ca. 48 Stunden bei einer Konfluenz von 70-80% für die Versuche eingesetzt. Die Zellen wurden nach der ApoAnnexin V Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierbei wurden sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den mit Liposomen inkubierten Zellen vereinzelt Zellen mit einer diffusen grünen Fluoreszenz beobachtet (Abb. 57). Die bovinen Zellen wiesen eine schwache gelbgrüne Autofluoreszenz auf, die von der intensiveren grünen Fluoreszenz des Annexin-gebundenen FITC abgegrenzt werden musste. Es wurden nur intensiv fluoreszierende Zellen als Apoptose positiv gewertet. Das Ergebnis der Zellzählungen der unabhängigen Versuche ist nachfolgend tabellarisch dargestellt (Tab. 5).

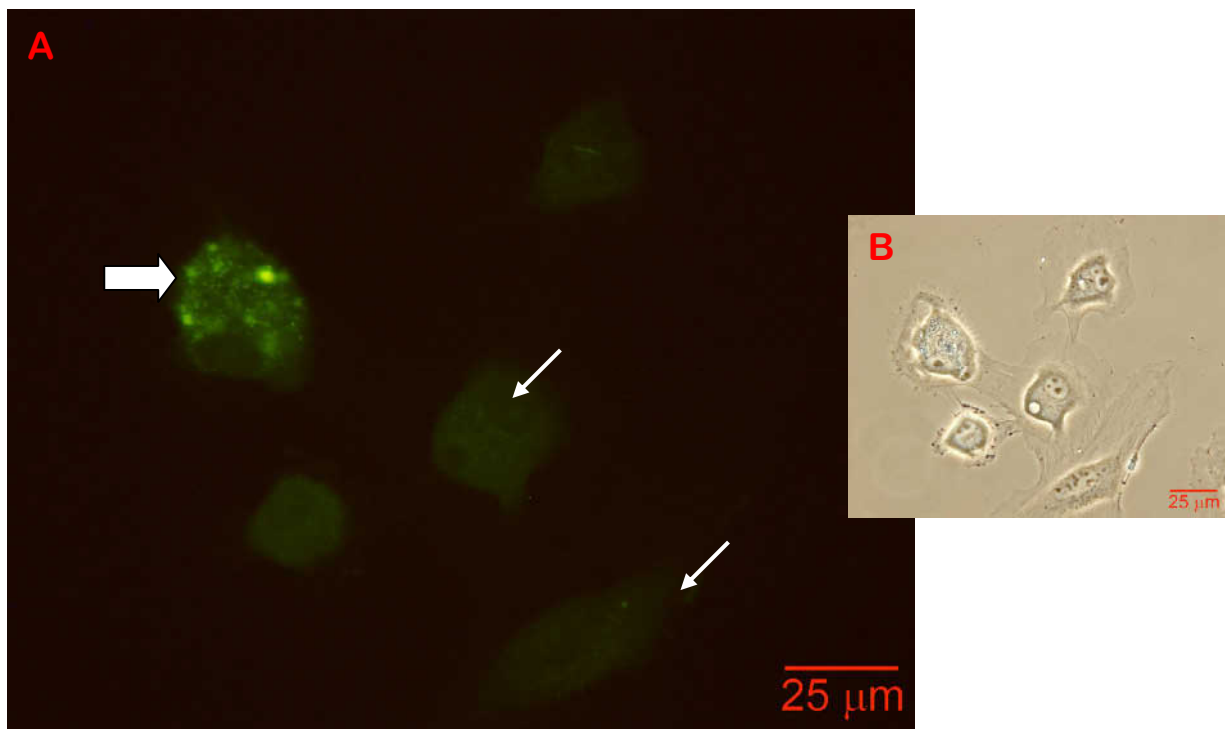


Abb. 57: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung apoptotischer boviner Endothelzellen
 (A) Intensiv grün fluoreszierende, apoptotische Zelle (dicker Pfeil), nicht-apoptotische Zellen mit schwacher Autofluoreszenz (dünne Pfeile), Fluoreszenzmikroskop. (B) Identischer Ausschnitt im Phasenkontrastmikroskop.

Tab. 5: Apoptose und Nekrose bei bovinen Endothelzellen

Nach der Liposomeninkubation wurden die Zellen in 20 Bereichen je Vertiefung ausgezählt und der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt. Dargestellt ist die Apoptoserate und Nekroserate der insgesamt 60 Bereiche aus den jeweiligen Versuchen.

	Kontrollen		Liposomen	
	apoptotische Zellen in %	nekrotische Zellen in %	apoptotische Zellen in %	nekrotische Zellen in %
Versuch 1	9,85	0	10,13	0
Versuch 2	6,10	0	7,70	0
Versuch 3	1,84	0	3,10	0

Die Apoptoserate der einzelnen unabhängigen Versuche unterscheidet sich teilweise stark. Innerhalb einer jeden Versuchsreihe ist jedoch keine Erhöhung der Apoptoserate durch Inkubation mit den Liposomen aufgetreten. Hier ist die Apoptoserate zwischen den Kontrollzellen und den mit Liposomen inkubierten Zellen annähernd gleich groß. Das Auftreten von Zellnekrosen wurde nicht beobachtet (Tab. 5).

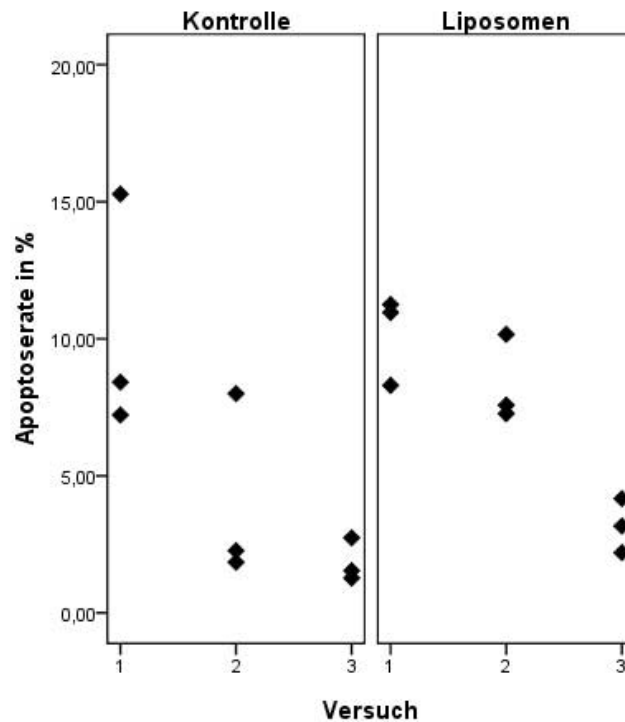


Abb. 58: Apoptoserate proliferierender boviner Endothelzellen mit und ohne Inkubation mit kationischen Liposomen

Dargestellt ist die Apoptoserate in den einzelnen Vertiefungen bestimmt aus je 20 Bildausschnitten pro Vertiefung. In diesen Versuchen tritt keine Nekrose auf.

5.6.2 Murine Endothelzellen

Murine Endothelzellen wurden in der Passage 45 nach einer Kultivierungsphase von etwa 48 Stunden mit dem Erreichen von 70-80% Konfluenz in die Versuche einbezogen. Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nach Anwendung des ApoAnnexin V Testes wurden in den Kontrollversuchen vereinzelt apoptotische Zellen in einem frühen Stadium mit einer diffusen grünen Fluoreszenz beobachtet. Bei den mit Liposomen inkubierten Zellen wiesen ebenfalls einige Zellen eine diffuse grüne Fluoreszenz auf (Abb. 59A). Ebenso traten hier einige nekrotische Zellen mit einer roten Fluoreszenz auf (Abb. 59C). Viele Zellen fluoreszierten zudem sowohl grün als auch rot, befanden sich also in einem späten Stadium der Apoptose (Abb. 59C).

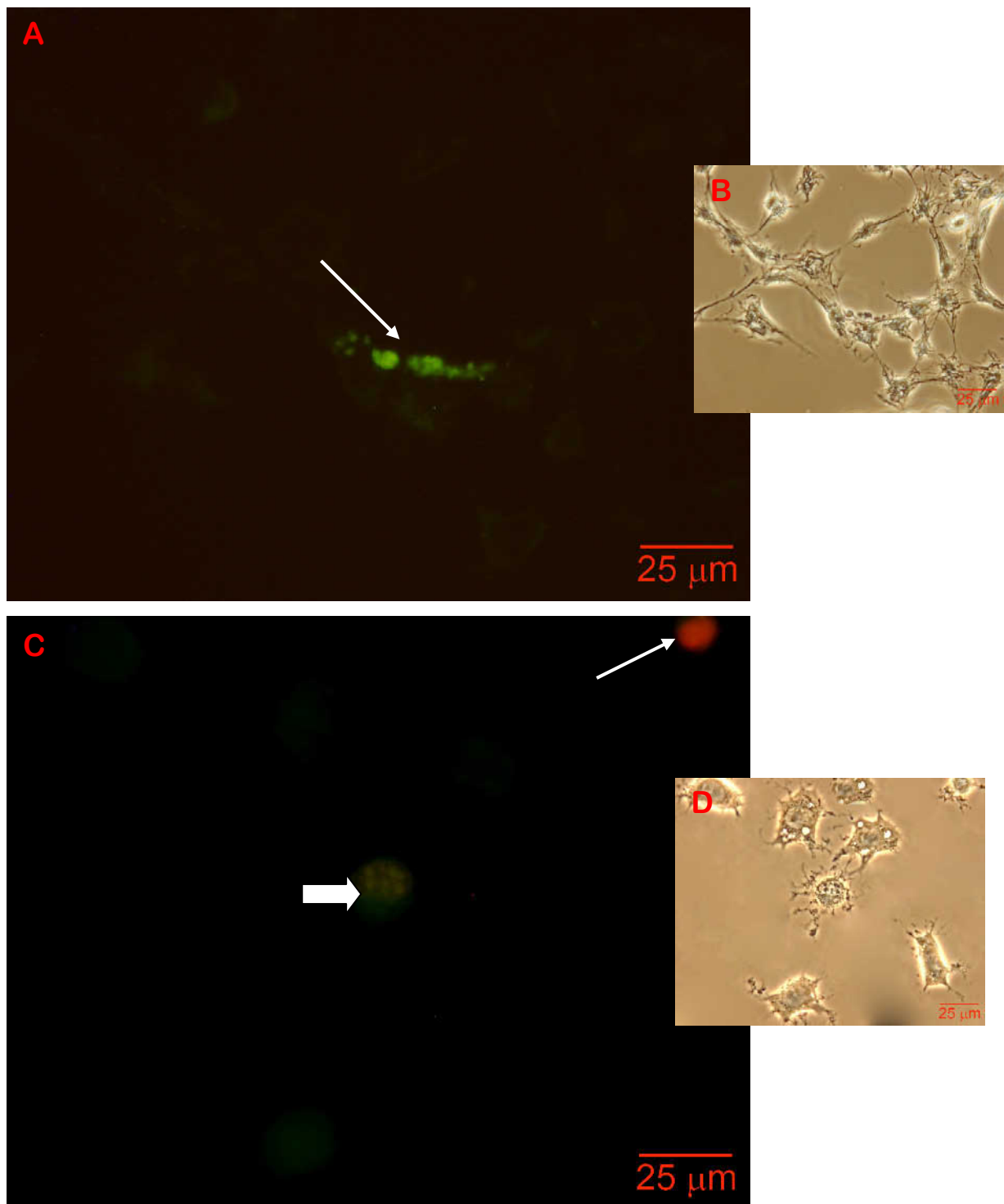


Abb. 59: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung muriner apoptotischer und nekrotischer Endothelzellen

(A) Grün fluoreszierende Zelle (Pfeil) im frühen Stadium der Apoptose. (B) Identischer Ausschnitt zu (A). (C) Grün und rot fluoreszierende Zelle (dicker Pfeil) im späten Stadium der Apoptose; rot fluoreszierende, nekrotische Zelle (dünner Pfeil). (D) Identischer Ausschnitt zu (C). (A,C) Fluoreszenzmikroskop. (B,D) Phasenkontrastmikroskop.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Zellzählungen der unabhängigen Versuche dargestellt (Tab. 6).

Tab. 6: Apoptose und Nekrose bei murinen Endothelzellen

Nach der Liposomeninkubation wurden die Zellen in 20 Bereichen je Vertiefung ausgezählt und der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt. Dargestellt ist die Apoptoserate und Nekroserate der insgesamt 60 Bereiche aus den jeweiligen Versuchen.

	Kontrollen		Liposomen	
	apoptotische Zellen in %	nekrotische Zellen in %	apoptotische Zellen in %	nekrotische Zellen in %
Versuch 1	1,94	0	30,08	7,56
Versuch 2	1,34	0	44,80	23,53
Versuch 3	1,09	0	16,20	14,50

Bei diesen Versuchen ist die Apoptoserate zwischen den einzelnen unabhängigen Versuchen nur geringfügig unterschiedlich. Es zeigt sich innerhalb der Versuche durch die Inkubation mit Liposomen ein deutlicher Anstieg sowohl an Apoptosen als auch an Nekrosen bei den Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 60).

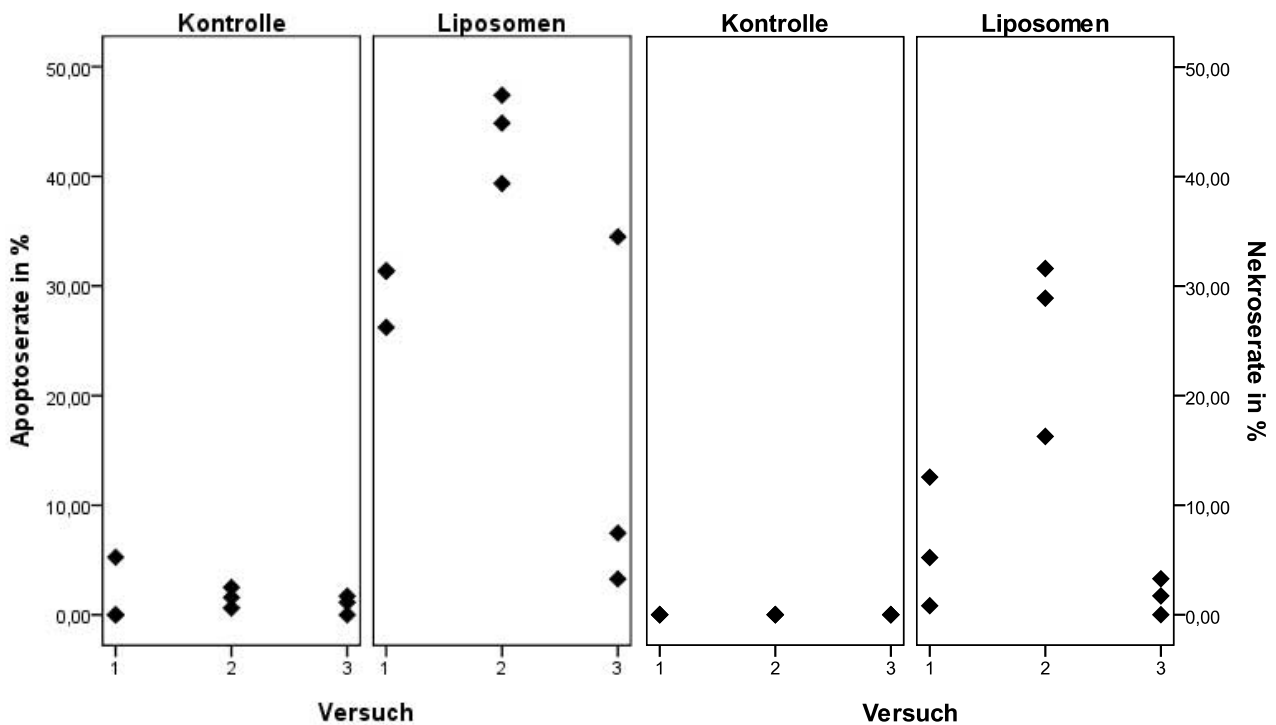


Abb. 60: Apoptose- und Nekroserate proliferierender muriner Endothelzellen mit und ohne Inkubation mit kationischen Liposomen

Dargestellt ist die Apoptoserate und die Nekroserate in den einzelnen Vertiefungen bestimmt aus je 20 Bildausschnitten pro Vertiefung.

5.6.3 Humane Endothelzellen

Humane Zellen wurden in der Passage 7 verwendet und nach einer Kultivierungszeit von 48 Stunden bei einer Konfluenz von etwa 70-80% für die Apoptosetests herangezogen. Nach der ApoAnnexin V-Färbung zeigten sich im Fluoreszenzmikroskop sowohl bei den Kontrollen als auch bei den mit Liposomen inkubierten Zellen viele Zellen mit einer leichten, grüngelben, diffusen Autofluoreszenz. Nur sehr vereinzelt fanden sich apoptotische Zellen mit einer intensiveren grünen Fluoreszenz bedingt durch das mit FITC markierte gebundene Annexin V (Abb. 61A).

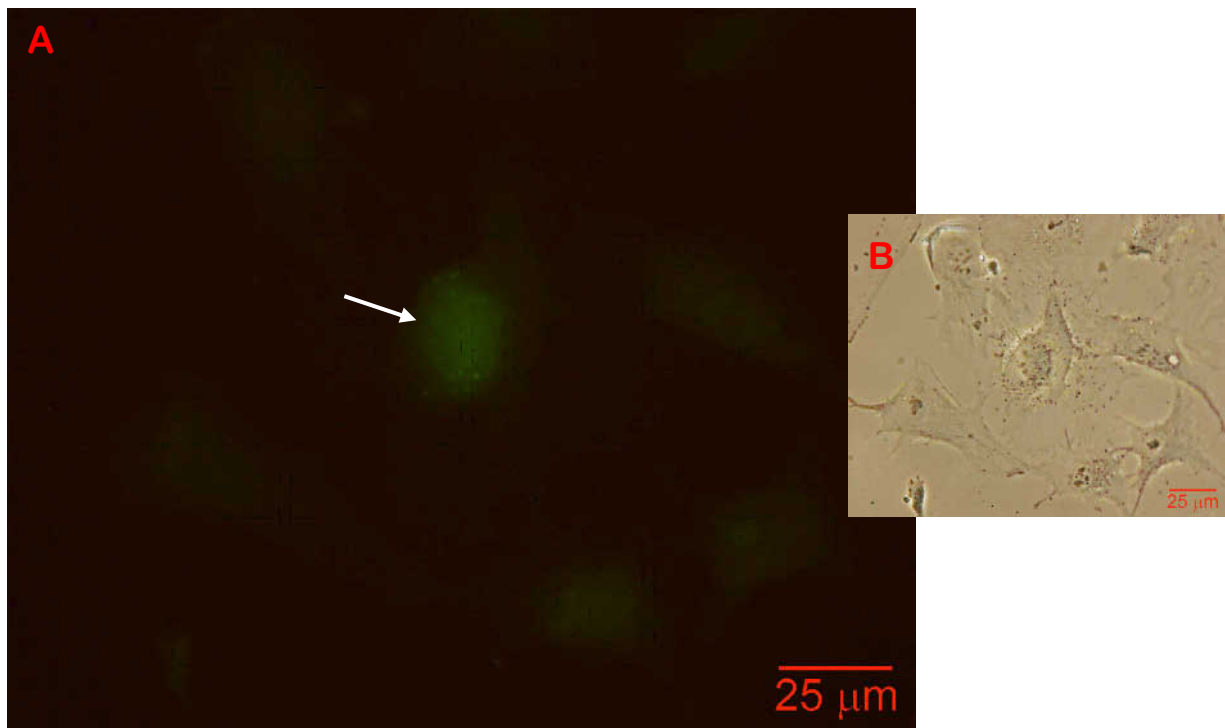


Abb. 61: Apoptose humaner Endothelzellen nach Inkubation mit kationischen Liposomen
 (A) Intensiv grün fluoreszierende, apoptotische (Pfeil) Zelle, Fluoreszenzmikroskop. (B) Identischer Ausschnitt im Phasenkontrastmikroskop.

Die Ergebnisse der unabhängigen Versuche werden nachfolgend dargestellt (Tab. 7).

Tab. 7: Apoptose und Nekrose bei humanen Endothelzellen

Nach der Liposomeninkubation wurden die Zellen in 20 Bereichen je Vertiefung ausgezählt und der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt. Dargestellt ist die Apoptoserate und Nekroserate der insgesamt 60 Bereiche aus den jeweiligen Versuchen.

	Kontrollen		Liposomen	
	apoptotische Zellen in %	nekrotische Zellen in %	apoptotische Zellen in %	nekrotische Zellen in %
Versuch 1	0,41	0	0,43	0
Versuch 2	11,44	0	12,14	0
Versuch 3	1,07	0	1,56	0

Die Apoptoserate zwischen den einzelnen unabhängigen Versuchen ist unterschiedlich hoch (Abb. 62). Innerhalb einer Versuchsreihe weicht die Apoptoserate der Kontrollversuche nicht von der Apoptoserate der mit Liposomen inkubierten Zellen ab. Das Auftreten von Zellnekrose wurde nicht beobachtet (Tab. 7).

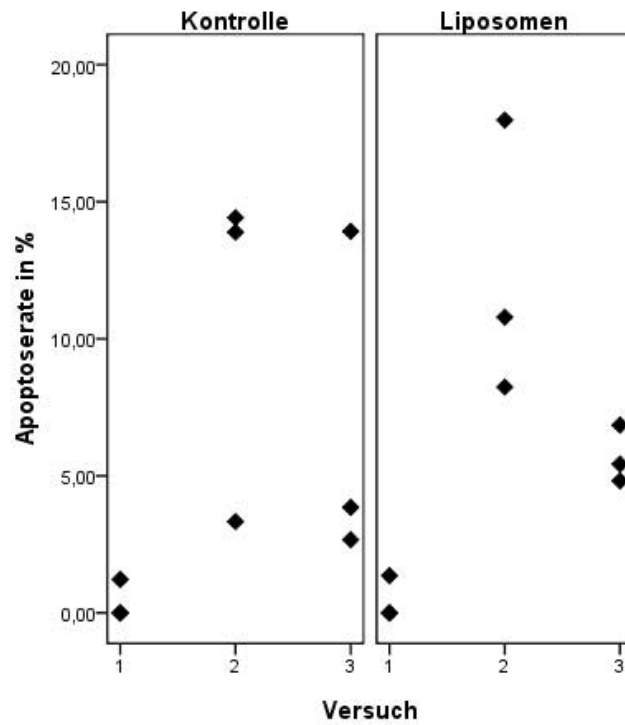


Abb. 62: Apoptose- und Nekroserate proliferierender humaner Endothelzellen mit und ohne Inkubation mit kationischen Liposomen

Dargestellt ist die Apoptoserate in den einzelnen Vertiefungen bestimmt aus je 20 Bildausschnitten pro Vertiefung. In diesen Versuchen tritt keine Nekrose auf.

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Aufnahme kationischer Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen *in vitro* untersucht. Da Liposomen weiten Einsatz als Vektoren im Rahmen des zielgerichteten Arzneimittel- und Gentransportes in Körperzellen finden, können die Mechanismen der Aufnahme und das weitere Schicksal der aufgenommenen Liposomen in der Zelle wichtige Erkenntnisse für ihren Einsatz im therapeutischen Bereich liefern. Diese Kenntnisse sollen es ermöglichen, die Effektivität der eingesetzten Vektoren zu optimieren, und mögliche Nebenwirkungen abzuschätzen und zu minimieren.

Vielfach werden die Liposomen mit Antikörpern bestückt, um über oberflächengebundene Zellantigene eine spezifische Anreicherung im Zielgewebe zu erreichen. Eine Anreicherung kationischer Liposomen in angiogenen Endothelzellen des Gefäßbettes von Tumoren nach intravenöser Injektion wurde in mehreren aktuellen Studien nachgewiesen (Wu et al., 2007; Strieth et al., 2004; Krasnici et al., 2003; Campbell et al., 2002; Thurston et al., 1998). Auch für die in diesen Studien eingesetzten kationischen Liposomen wurde eine Anreicherung in den Endothelzellen von Tumoren nachgewiesen, ohne dass eine Zielsteuerung mittels Antikörpern stattfand. Wurden diese Liposomen zum Zwecke einer antivaskulären Therapie mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel beladen, so konnte durch die gezielte Anreicherung in den Endothelzellen das Gefäßbett des Tumors zerstört und somit das Tumorstadium deutlich gehemmt werden (Bode et al., 2009; Strieth et al., 2004; Krasnici et al., 2003).

Für die vermehrte Bindung und Aufnahme kationischer Liposomen durch angiogene Endothelzellen müssen ladungsbezogene Mechanismen verantwortlich gemacht werden, da neutrale und anionische Liposomen diese spezifische Anreicherung nicht zeigen (Wu et al., 2007; Krasnici et al., 2003). Da die Glykokalix, die als Vermittler zellulärer Aufnahmeprozesse eine große Rolle spielt, eine negative Oberflächenladung aufweist, scheint es möglich, dass eine ausgeprägte Glykokalix, die mehr negative Ladungen an ihrer Oberfläche präsentiert, die positiv geladenen Liposomen stärker bindet. Es wurde also in den hier durchgeführten Studien die Glykokalix der verwendeten Zellkulturen vermessen, um in nachfolgenden Versuchen deren Einfluss auf die Bindung und Aufnahme der Liposomen durch die Zelle näher untersuchen zu können.

Für die Studien wurden in dieser Arbeit mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft eingesetzt. Die Zellen stammten aus der Haut eines Menschen, dem Eierstock eines Rindes und dem Herzmuskel einer Maus. Alle drei Zellkulturen wurden eindeutig als mikrovaskuläre Endothelzellen identifiziert. Die Zellkulturen zeigen unterschiedliches Wachstumsverhalten *in vitro*, jedoch können sie alle kapilläre Strukturen ausbilden (Bahramsoltani, 2004; Lienau, 2003). Die murinen Endothelzellen zeigen in höheren Passagen (ab Passage 42) ein verändertes Wachstumsverhalten durch spontane Transformation. Diese Zellen führen dann nach Implantation in geeignete Empfängertiere zur Induktion von Hämangiosarkomen (Plendl et al., 1995). In dieser Arbeit wurden die Zellen in der Passage 45, also nach Transformation zu Tumor-induzierenden Zellen, eingesetzt. Diese Heterogenität der verwendeten Endothelzellkulturen sollte es ermöglichen, Gemeinsamkeiten und auch eventuell auftretende Unterschiede in den Mechanismen der Liposomenaufnahme durch mikrovaskuläre Endothelzellen aufzudecken. Insbesondere der Einsatz der transformierten Tumor-induzierenden Zellen sollte Modell für das in der anti-vaskulären Tumorthherapie angesteuerte Zielgewebe dienen. Diese Zellen galt es insbesondere im Vergleich zu den untransformierten Zellen aus gesundem Gewebe (Haut, Ovar) zu beurteilen.

Im Rahmen der Versuche zur Aufnahme der Liposomen fiel auf, dass sich je nach Dauer der Inkubation einige Zellen deutlich abrundeten oder vom Kulturschalenboden ablösten. Nach langen Inkubationszeiten waren, abhängig von den eingesetzten Zellkulturen, unterschiedlich viele Zellen abgerundet oder abgelöst, obwohl alle Zellen nach dem gleichen Protokoll behandelt wurden. Dies legte die Vermutung nahe, dass durch die Inkubation mit kationischen Liposomen die Zellen geschädigt wurden. Um diese mögliche Zytotoxizität zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Inkubation mit kationischen Liposomen einem Apoptosetest unterzogen.

6.1 Untersuchungen zur Glykokalix der Endothelzellen

Die lumenwärtig ausgebildete Glykokalix der Endothelzellen stellt die erste Kontaktfläche der im Blut zirkulierenden Liposomen mit den Endothelzellen dar. Werden Liposomen als Vektoren eingesetzt, so verbleiben sie in der Blutkreislaufbahn, bis sie durch die Zellen des Organismus aufgenommen werden. Die Glykokalix enthält viele Moleküle und Zelloberflächenantigene, die für die Bindung im Blut zirkulierender Stoffe von Bedeutung sein können (Fretz et al., 2004; Stace und Damiano, 2001; Vink und Duling, 2000). Da in zahlreichen Studien nachgewiesen wurde, dass die Aufnahme von Liposomen durch die Zellen nicht nur von ihrer eigenen Struktur, sondern auch von den Eigenschaften der Zielgewebe beeinflusst wird, ist es wahrscheinlich, dass insbesondere die Glykokalix als Ort der primären Kontaktaufnahme die Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Liposomen beeinflusst (Dabbas et al., 2008; Dini et al. 1998; McLean et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden kationische Liposomen untersucht. Für die in diesen Studien verwendeten kationischen Liposomen wurde nachgewiesen, dass sie nicht von allen Endothelzellen gleichermaßen aufgenommen werden, sondern dass insbesondere eine Anreicherung in den angiogenen Kapillaren in Tumoren und chronisch entzündeten Gebieten erfolgt (Strieth et al., 2004; Krasnici et al., 2003; Thurston et al., 1998). Auch McLean und Mitarbeiter (1997) wiesen in ihren Studien nach, dass die Aufnahme kationischer Lipoplexe in den Gefäßen der verschiedenen Organe in unterschiedlichem Maße stattfand. So nahmen die kapillären Endothelzellen in Lunge und Ovar sehr viele Lipoplexe auf, während im Gehirn kaum eine Aufnahme stattfand. In den Lymphknoten fand die Aufnahme der Lipoplexe in hohem Maße nicht durch kapilläre Endothelzellen, sondern durch Endothelzellen der venösen Gefäße statt.

Da die Glykokalix nicht in allen Endothelzellen gleich ausgeprägt ist, sondern je nach Organ und Blutgefäß (arteriell, venös, kapillär) die Ausprägung dieser Zelloberflächenschicht variiert (Pries und Kuebler, 2006), sollte die Glykokalix der hier eingesetzten Endothelzellen untersucht werden, um in späteren Versuchen Zusammenhänge zwischen der Glykokalix und der Aufnahme kationischer Liposomen aufzudecken.

Die Glykokalix besitzt eine Vielzahl an Molekülen und Rezeptoren, die die Bindung und Aufnahme der Liposomen beeinflussen können. Deren Charakterisierung ist jedoch sehr zeitaufwändig und speziell, somit wurden Überlegungen angestellt, ob auch einfach physikalische Mechanismen Einfluss auf die Interaktion von Liposomen und Endothelzellen haben könnten. So behindert eine stark ausgeprägte Glykokalix die Bindung von inerten Mikrosphären durch sterische Abstoßung (Mulivor und Lipowsky, 2002). Da die Glykokalix aus einer Vielzahl anionischer Makromoleküle besteht und somit eine negative Gesamtladung besitzt, wohingegen die kationischen Liposomen eine positive Oberflächenladung aufweisen, postulierte Krasnici (2003) die Hypothese, dass physikalische Anziehungskräfte für die bevorzugte Bindung der Liposomen an die Oberfläche der angiogenen Endothelzellen verantwortlich sind. Der einfache physikalische Grundsatz, dass sich gegensätzliche Ladungen anziehen, könnte im Fall der kationischen Liposomen eine stärkere Anhaftung der Liposomen an der Glykokalix der Endothelzellen verursachen. Ein hoher Gehalt kationischer Ladungen führt zu einer vermehrten Aufnahme unterschiedlicher kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen (Dabbas et al., 2008). Unter der Annahme, dass eine stärker ausgebildete Glykokalix auch mehr negative Ladungen enthält, wurde in dieser Arbeit die Dicke der Glykokalix der eingesetzten Endothelzellen vermessen. Der eingesetzte Farbstoff Rutheniumrot bindet bevorzugt an stark geladene Polyanionen in der Glykokalix und weist somit auf deren negativ geladenen Charakter hin (Fassel und Edminston 1999; Luft 1971).

Viele Studien zum Nachweis der Glykokalix an der Zelloberfläche wurden an Bakterien oder an intakten Gefäßen durchgeführt, der Einsatz von Ruthenium Rot zur Färbung der Glykokalix in proliferierenden subkonfluenten angiogenen Endothelzellkulturen ist in der Literatur nicht beschrieben. Aus diesem Grund wurde analog der in der Literatur beschriebenen Methoden zur Färbung der Glykokalix der Endothelzellen in Geweben vorgegangen und entsprechende Lösungen auf die Zellkultur aufgegeben (Luft 1971), jedoch wurde berücksichtigt, dass die Struktur der Glykokalix durch Zusatz von Lysin zur

Aldehydfixierung stabilisiert wird, wie dies in mehreren Studien an Staphylokokken gezeigt wurde (Fassel und Edminston, 1999; Fassel et al. 1998).

Die Glykokalix ließ sich bei allen eingesetzten Endothelzellkulturen mittels einer Färbung mit Ruthenium Rot und anschließender elektronenmikroskopischer Untersuchung darstellen und nach photographischer Dokumentation vermessen. Sie umgibt die Zelle in Form eines feinen elektronendichten Saumes. Einzig bei den bovinen Endothelzellen war dieser Glykokalixsaum nicht durchgehend ausgebildet, sondern stellenweise unterbrochen (Kap. 5.1.1.1).

Bei allen drei Zellkulturen lagen zwei Drittel der gemessenen Bereiche zwischen 10-30 nm (Kap. 5.1.5). Diese Messwerte decken sich mit den von Luft bereits 1966 gemessenen Werten für die Dicke der Glykokalix in den Kapillaren von Ratten. Somit sind unabhängig von der eingesetzten Endothelzellkultur der Großteil der Messwerte im gleichen Intervall angesiedelt. Zwar werden mit anderen Färbemethoden deutlich höhere Werte für die Glykokalix gemessen, aber auch bei diesen Methoden wird durch die Fixierung und Färbung und die damit einhergehenden chemischen Reaktionen die Glykokalix verändert (Pries et al., 2000). Somit entsprechen die Versuchsergebnisse nie vollständig den realen Gegebenheiten. Dennoch sind in den Versuchen dieser Arbeit Unterschiede zwischen den eingesetzten Endothelzellkulturen sichtbar, die in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden.

6.1.1 Besonderheiten der Glykokalix boviner Endothelzellen

Die Glykokalix der bovinen Endothelzellen war gleich in mehreren Eigenschaften auffällig. Das erste auffällige Merkmal war, dass einzig bei diesen Zellen die Glykokalix die Zellen teilweise nicht vollständig umgab, sondern bei einigen Zellen Lücken in der Glykokalix auftraten. Auch Brown et al. (1996) beschreiben in ihren Studien eine stellenweise unterbrochene Glykokalix an den Kapillaren der Skelettmuskulatur. Zudem beschreiben sie, dass eine Stimulation der Muskulatur und die dadurch induzierte Angiogenese zu einer Rückbildung der Glykokalix führen. Henry und DeFouw (1995) führten eine Studie durch, bei der sie eine Degradation der Glykokalix im Rahmen der Angiogenese in der Chorionallantoismembran von Hühnern beobachteten. Ebenso werden einige Bestandteile der Glykokalix durch Entzündungen und Ischämie reduziert (Mulivor und Lipowsky, 2004). Die Glykokalix ist also in einem ständigen Prozess des Umbaus, der durch Einflüsse des umgebenden Milieus beeinflusst wird. Die in diesen Versuchen eingesetzten bovinen Endothelzellen stammen aus einem bovinen Gelbkörper in Rückbildung. In diesem Organ finden massive Umbauvorgänge im Bereich des Gefäßbettes statt. So nimmt im Regressionsgelbkörper die Anzahl an Kapillaren ab (Bisplinghoff, 2006). Eventuell weisen dadurch die Endothelzellen aus dieser bovinen Kultur eine unterbrochene Glykokalix auf, da in der Rückbildung der Kapillaren zunächst ein Abbau der umgebenden Matrix und der Glykokalix erfolgen muss.

Da jedoch alle in diesen Versuchen eingesetzten Endothelzellen zur in vitro Angiogenese fähig sind und unter Einfluss pro-angiogener Substanzen angezüchtet wurden, ist es unwahrscheinlich, dass die hier beobachteten Lücken in der bovinen Glykokalix allein auf angiogene Einflüsse zurückgehen.

Ein weiteres auffälliges Merkmal der bovinen Endothelzellen war die basal vereinzelt deutlich verdickte Glykokalix im Bereich von Zellausläufern. Die Glykokalix der Endothelzellen wird überwiegend im Gewebeverband untersucht und durch Perfusion der Gewebe mit den entsprechenden Färbelösungen angefärbt, so dass nur die luminal Seite der Zellen betrachtet wird, da die Farbstoffe nicht in die Tiefe der Gewebe vordringen. Somit lassen sich in der Literatur keine ähnlichen Beobachtungen finden. In diesen Versuchen weisen einzig die bovinen Endothelzellen eine solchermaßen verdickte basale Glykokalix auf, während die murinen und humanen Endothelzellen basal und luminal eine vergleichbar hohe Glykokalix besitzen. Alle Zellen wurden auf der gleichen Matrix, einer Gelatinebeschichtung der Glasplättchen, angezüchtet. Bei der Verarbeitung der bovinen Endothelzellen für die Elektronenmikroskopie fiel auf, dass die bovinen Endothelzellen besonders stark am Kulturschalenboden anhafteten und sich nur schwer abschaben ließen, wohingegen die

humanen Zelle leichter und die murinen Zellen besonders einfach abzulösen waren. Diese dicke basale Glykokalix hat somit die bovinen Endothelzellen stärker am Kulturschalenboden verhaftet.

Weiterhin waren bei den bovinen Endothelzellen dicht unterhalb der Zellmembran zahlreiche Vesikel auffällig, die ebenfalls eine Ruthenium Rot-positive Auskleidung besaßen. Auch die murinen Endothelzellen wiesen mit Ruthenium Rot-ausgekleidete Vesikel auf, während diese bei humanen Endothelzellen nicht beobachtet werden konnten. Da Ruthenium Rot aber nicht in die Zellen diffundieren kann wenn die Zellmembran intakt ist (Luft 1971), müssen diese Vesikel eine Verbindung zur Zelloberfläche besitzen. Es ist ebenso möglich, dass diese Vesikel sehr frisch abgeschnürte Endosomen repräsentieren, in denen die Glykokalix noch nicht degradiert wurde. Da Ruthenium Rot bereits der Spül- und auch der Fixierungslösung zugegeben wurde, könnte hier vor Eintritt der vollständigen Zellfixierung und damit dem Sistieren sämtlicher Stoffwechselfvorgänge noch Ruthenium Rot in diesen Vesikeln aufgenommen worden sein.

6.1.2 Besonderheiten der Glykokalix muriner Endothelzellen

Auffälligstes Merkmal der Glykokalix der murinen Endothelzellen war die starke Varianz in der Höhe. Zudem konnten hier zwei Gruppen an Zellen unterschieden werden, die jeweils eine verschieden ausgeprägte Glykokalix aufwiesen. Zum überwiegenden Teil traten Zellen mit einer dünnen, regelmäßigen Glykokalix auf, die vergleichbar der Glykokalix der humanen Endothelzellen nur wenig Dickenvarianz zeigte. Das Zytoplasma dieser Zellen war deutlich elektronendichter und enthielt viele Zellorganellen und freie Ribosomen. Häufig waren auch mehrere Nukleoli vorhanden. Die Zellen waren eher rundlich. All diese Eigenschaften sprechen dafür, dass diese Zellen besonders aktiv sind, es wird viel DNA abgelesen. Dies weist auf einen besonders aktiven Metabolismus der Zellen hin, es findet viel Biosynthese von Proteinen an den zahlreichen freien Ribosomen und dem rauen Endoplasmatischen Retikulum statt (Sinowatz, 2000) wie es eher für immature Endothelzellen typisch ist (Welt et al., 1990). Da diese Endothelzellkultur in der eingesetzten Passage spontan Tumortransformiert ist (Plendl et al., 1995) und ein verändertes ungehemmtes Wachstum zeigt, repräsentieren diese Zellen die entdifferenzierten Zellen des Tumors.

Deutlich weniger Zellen waren dem zweiten Zelltyp zuzuordnen. Diese Zellen waren gut differenziert, mit einem lockeren Zytoplasma und weniger Zellorganellen, der Zellkern besaß nur einen Nukleolus. Die Zellen waren eher spindelförmig und wiesen eine deutliche Polarität zwischen basaler, dem Kulturschalenboden zugewandter, und luminaler, dem Medium zugewandter Seite, auf. Diese Zellen besaßen eine sehr unregelmäßige Glykokalix, die in der Höhe deutlich schwankte. Häufig waren Konglomerate vorhanden, die stellenweise deutlich über die übrige Höhe der Glykokalix hinausragten und somit der Glykokalix ein aufgerautes Aussehen gaben. Diese Konglomerate entstehen durch Verklebung der einzelnen Makromoleküle im Rahmen der Fixierung und Färbung mit den eingesetzten Methoden (Pries et al., 2000; Fassel und Edminston, 1999). Es ist also davon auszugehen, dass hier eine faserige, mit besonders langen Makromolekülen ausgestattete Glykokalix in diesen Bereichen vorliegt. Die Konglomerate traten häufig an den Zellfortsätzen der luminalen Glykokalix auf. Da die Glykokalix der Zellen viele Rezeptoren und andere Makromoleküle enthält, mit denen sie mit dem Nährmedium in Kontakt tritt und Moleküle aus der Umgebung bindet und aufnimmt (Fu et al., 2003; Baldwin und Thurston, 2001; Pries et al., 2000; Vink und Duling, 2000), ist folglich insbesondere die luminal Seite der Zellen mit einer großen Anzahl dieser Makromoleküle bestückt.

Auch bei den murinen Endothelzellen traten in Nähe zur Zellmembran intrazelluläre Vesikel mit einer Ruthenium Rot-positiven Auskleidung auf. Ob diese Vesikel Verbindung zur Zelloberfläche besaßen oder während der Färbeprozesse abgeschnürt wurden, ließ sich mit den durchgeführten Versuchen nicht klären.

6.1.3 Besonderheiten der Glykokalix humaner Endothelzellen

Von allen drei untersuchten Endothelzellkulturen war die Glykokalix der humanen Endothelzellen am regelmäßigsten ausgebildet. Wie auch bei den murinen Endothelzellen umgab sie jede Zelle als durchgehenden, feinen elektronendichten Saum vollständig. Die Streuung der Messwerte war hier insgesamt am niedrigsten, und nur bei den humanen war die Glykokalix an keiner Stelle höher als 75 nm.

Auffällig war zudem, dass nur bei den humanen Endothelzellen keine mit einer Glykokalix ausgekleideten Vesikel innerhalb der Zellen auftraten. Folglich hatten diese Vesikel in keinem Fall Kontakt zur Zelloberfläche. Wenn man davon ausgeht, dass im Prozess der Fixierung abgeschürfte Endosomen noch Ruthenium Rot mit einschließen würden, dann spricht das fehlen jeglicher Ruthenium Rot-Färbung in den Vesikeln der humanen Endothelzellen dafür, dass bei diesen Zellen nur wenig Endozytose stattfindet.

Die humanen Endothelzellen sind dermalen Ursprungs und wurden aus der Haut einer 18-jährigen Frau gewonnen. Sie zeigen ein homogenes Zytoplasma mit nur sehr wenigen Zellorganellen. Damit repräsentieren sie gut differenzierte und reife Endothelzellen. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass die Glykokalix hier regelmäßig ausgebaut ist, da in der Probe, aus der die Zellen isoliert wurden, keine massiven Umbauvorgänge stattfinden. Diese steht jedoch im Gegensatz zu den murinen Endothelzellen, bei denen gerade die besser differenzierten und metabolisch weniger aktiven Zellen eine ausgeprägtere Glykokalix besaßen.

6.2 Transmissionsmikroskopische Untersuchungen der kationischen Liposomen

Für diese Arbeit wurden zur Identifikation der Liposomen in den nachfolgenden Versuchen die eingesetzten unmarkierten und Gold-markierten Liposomen mit dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Hierbei musste zunächst eine Methode gefunden werden, mit der sich die flüssigen Liposomen in den Agar einbetten ließen.

Nachdem es gelungen war, die Liposomen in den Agar einzubetten, wurden diese elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei konnten auch die Lipiddoppelmembran und der flüssigkeitsgefüllte Hohlraum deutlich dargestellt werden. Die Liposomen lagen in großen und kleinen Konglomeraten zusammen, waren annähernd rund, teilweise jedoch auch leicht unregelmäßig geformt und eingedellt. Einige Liposomen lagen isoliert ohne Kontakt zu anderen Liposomen vor. Einige Liposomen wiesen keinen Hohlraum auf, dies wurde insbesondere bei den silberverstärkten Proben deutlich. Eventuell wurden hier die Liposomen nur tangential im Bereich der Lipidmembranen getroffen. Der Durchmesser der Liposomen variierte, dies könnte unter anderem auch dadurch bedingt sein, dass das Liposom mit seiner Kugelform nicht immer im Bereich des größten Durchmessers geschnitten wird. Dennoch entsprachen die Probemessungen an den eher mittelgroßen Liposomen einer Probe (also unter Nichtbeachtung der sehr großen und sehr kleinen Liposomen) in etwa den mittels Photonenkorrelationsspektrometrie bestimmten Größenangaben des Herstellers der Liposomen überein.

Einige elektronenmikroskopische Studien untersuchten Liposomen bereits isoliert, jedoch zumeist indem sie die Liposomen auf ein Gitternetz auftrugen und nach der Bearbeitung evaluierten (Nallamothe et al., 2006, Hainfeld, 1996). Bei dieser Methode kann jedoch nur die Oberfläche der fixierten Liposomen untersucht werden, nicht aber ein Querschnitt durch das Objekt. Auch Zipper et al. (1988) untersuchten Tropfpräparate ihrer kationischen Liposomen mittels Transmissionselektronenmikroskopie, jedoch beschreiben sie in ihrer Arbeit die genaue Methode zur Herstellung dieser Tropfpräparate nicht, es scheint sich jedoch auch hier nicht um Querschnitte durch das Innere der Liposomen zu handeln. Bei ihren Untersuchungen der inkubierten bovinen Endothelzellen waren unilamellären Liposomen bestehend aus einer Lipiddoppelmembran um einen inneren Hohlraum in Wechselwirkung mit den Zellen dargestellt. Auch McLean et al. (1997) konnten unilamelläre Liposomen in Nachbarschaft zum Endothel nach intravenöser Injektion

kationischer Liposomen in den untersuchten Gewebeproben elektronenmikroskopisch nachweisen.

Einige Studien setzten für ihre elektronenmikroskopischen Studien markierte Liposomen ein, um an den Geweben diese Liposomen mittels des Markers eindeutig identifizieren zu können (Thurston et al., 1998, Friend et al., 1996). Thurston et al. (1998) setzten hierfür mit Nanogold markierte Liposomen ein. In den Bildern ihrer Publikation erscheinen die Liposomen jedoch oft als kleine Kugeln. Die lamelläre Lipiddoppelstruktur mit dem Hohlraum, in dem im Rahmen des Drug Targeting Arzneimittel transportiert werden sollen, war nicht deutlich dargestellt. In den Studien von Friend et al. (1996) waren die multilamellären Liposomen in Konjugation mit kolloidalem Gold an und innerhalb der eingesetzten Zellen darstellbar.

Die in der vorliegenden Studie eingesetzten Liposomen konnten mittels der Einbettung in Agar erstmals in Schnittpräparaten ohne umgebendes Gewebe, mit dem sie in Wechselwirkung treten konnten, dargestellt werden. Auch gelang der elektronenmikroskopische Nachweis, dass der Marker Nanogold in die äußeren Lipidschichten der Liposomen inkorporiert vorlag.

Um die Effizienz der Silberverstärkung für die Gold-markierten Liposomen zu testen, wurden diese für unterschiedlich lange Zeiten mit dem Silberverstärker behandelt und dann elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei zeigte sich deutlich, dass eine zu lange Einwirkzeit des Silberverstärkers sich nachteilig auf die elektronenmikroskopische Beurteilung auswirkte. Die Liposomen waren teilweise unter der Silberschale in ihrer Struktur kaum mehr zu erkennen. Somit besteht in den Versuchen die Gefahr, dass nach zu langer Silberverstärkung diese Liposomen vollständig von dem Verstärker überdeckt werden und dies eventuell als Artefakt gewertet wird. Nach kurzem Einwirken des Silberverstärkers waren jedoch die Goldpartikel deutlich sichtbar, ohne die Liposomenstruktur zu überdecken. Die Lipiddoppelmembranen waren bei Einsatz der Silberfärbung jedoch undeutlich, dies beruht auf einer schwächeren Fixierung der Lipidstrukturen, da eine starke Osmierung unverträglich mit der Silberfärbung ist, das Osmium jedoch die Lipidstrukturen besser fixiert (Owen et al., 2001, Sawada und Esaki, 2000, Hainfeld, 1996).

6.3 Quantitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen

Der Einsatz kationischer Liposomen als Vektoren im Rahmen einer anti-vaskulären Therapie setzt voraus, dass die Liposomen durch die Zielzellen gebunden und der in Ihnen enthaltene Wirkstoff mittels Internalisierung oder Fusion in das Zytosol der Zellen gelangt, um dort seine Wirkung zu entfalten. Somit gilt es nicht nur zu klären, ob und wie die eingesetzten Zellen in Wechselwirkung mit den kationischen Liposomen treten, sondern auch quantitativ zu bestimmen in welchem Ausmaß eine Aufnahme mittels Bindung, Fusion und Internalisierung erfolgt.

Da für kationische Liposomen bereits in mehreren Versuchsreihen eine Internalisierung durch aktivierte Endothelzellen *in vivo* belegt wurde (Campbell et al., 2002; Thurston et al., 1998), haben sich diese Liposomen als Vektoren für das aktivierte Endothel im Tumorbereich interessant gemacht. Üblicherweise befindet sich das Endothel *in vivo* in einem nicht aktivierten Zustand aus dem es unter bestimmten physiologischen (z.B. im Reproduktionszyklus im Gelbkörper oder während der Gravidität) und pathologischen Prozessen (z.B. Tumorerkrankungen, Entzündungen) wieder in den aktiven Zustand der Angiogenese übertreten kann. Um die Wechselwirkungen kationischer Liposomen mit angiogenen Endothelzellen zu untersuchen, wurden in diesen Studien proliferierende angiogene Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs eingesetzt, wobei die Zellen der verwendeten Zellkulturen sowohl aus Organen pathologischer Prozesse (spontan Tumortransformierte Endothelzellen aus dem Herzmuskel einer Maus) als auch aus Organen in physiologischen Stadien (humane Endothelzellen aus der Haut eines Menschen, bovinen Endothelzellen aus dem Corpus luteum) isoliert worden waren. Somit können sowohl Endothelzellen pathologischer als auch physiologischer Prozesse auf ihre Wechselwirkungen mit kationischen Liposomen untersucht werden. Da jedoch die

Zellkulturen von unterschiedlichen Spezies gewonnen wurden, ist ein Vergleich zwischen den Ergebnissen von Zellen pathologischen und physiologischen Ursprungs nur unter Vorbehalt einer spezies-internen Überprüfung möglich.

Die Inkubation der verschiedenen Zellkulturen mit kationischen Liposomen führte in allen Versuchen zu einer nachweisbaren Fluoreszenz und somit zu einer Bindung Aufnahme der Rhodamin-markierten Liposomen durch die Zellen. Somit fand auch in diesen Versuchen eine nachweisliche Interaktion kationischer Liposomen mit den inkubierten proliferierenden Endothelzellen statt, wie diese auch in anderen in vitro und in vivo Studien beobachtet werden konnte (Eichhorn et al., 2007; McLean et al., 1997; Friend et al. 1996). Thurston und Mitarbeiter (1998) wiesen bereits 20 Minuten nach intravenöser Applikation kationische Liposomen an und in den Endothelzellen tumorös und entzündlich veränderter Gebiete nach. Jedoch nicht nur in den Endothelzellen in Bereichen pathologischer Prozesse, sondern auch durch Endothelzellen gesunder Gewebe erfolgt eine Aufnahme kationischer Liposomen, wobei dies jedoch in organabhängig unterschiedlich hohem Maße erfolgt (McLean et al., 1997). In diesen Versuchen waren die intravenös verabreichten Liposomen nach 20 Minuten aus dem Blut entfernt worden, sie banden an Endothelzellen, Leukozyten und Makrophagen. Nach vier Stunden waren hier die Liposomen von den Zellen internalisiert worden.

Analog dazu sind auch in den Versuchen dieser Studie Unterschiede in der Menge aufgenommener Liposomen zwischen den verschiedenen Zellkulturen auffällig, teils wurden bis zum 10fachen an Liposomen gebunden und internalisiert. Während die bovinen und humanen Endothelzellen nur sehr wenige der zugesetzten Liposomen (etwa 1-4%) aufnehmen und ein noch geringerer Anteil davon mittels Endozytose internalisiert wird (ca. 0,16-0,4%), war die Aufnahme durch die murinen Endothelzellen deutlich höher. Hier wurden abhängig von der Dauer der Inkubation etwa 15-30%, vereinzelt sogar bis zu fast 50% der zugesetzten Liposomen durch die Zellen gebunden oder waren mit der Zellmembran fusioniert, etwa 13% der Liposomen waren nach 180 Minuten endozytiert worden. Damit war auch in diesen Studien die Aufnahme kationischer Liposomen durch das dem Gefäßgebiet eines Tumors entsprechende Zellkulturmodell am größten.

Die hier eingesetzten kationischen Liposomen wiesen eine deutlich geringere Bindungseffizienz auf als dies bei anderen in vitro Studien mit anderen Liposomen der Fall war. So wiesen beispielsweise Bendas et al. (1999) nach, dass die von ihnen hergestellten Immunoliposomen zu fast 90% an den Zielzellen anhafteten. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass die Immunoliposomen mittels einer spezifischen Bindung an Antigenen der Zelloberfläche der Zellen gebunden werden, während für die Bindung der kationischen Liposomen unspezifische Bindungsreaktionen verantwortlich sind. Ein spezifisches Oberflächenantigen, welches die Bindung vermittelt, konnte bisher nicht identifiziert werden. Bereits für mit Apolipoprotein-E-modifizierte kationische Liposomen konnten Leupold und Mitarbeiter (2009) eine unspezifische Aufnahme nachweisen, diese Liposomen wurden nicht über Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Endozytose aufgenommen, sondern über nicht-selektive Endozytosemechanismen. Ebenso konnten sie einen Endozytose-unabhängigen Aufnahmemechanismus beobachten. Auch die von Papadimitriou und Antimisiaris (2000) beobachtete Endozytose von Liposomen durch humane Endothelzellen war Clathrin-unabhängig.

Entgegen anderen Studien (Papadimitriou und Antimisiaris 2000; Bendas et al., 1999) konnte in den vorliegenden Versuchen nicht für alle Zellen ein Sättigungseffekt der Bindung kationischer Liposomen durch die Zellen festgestellt werden. Einzig die murinen Endothelzellen zeigten keinen signifikanten Anstieg gebundener Liposomen nach längerer Inkubation, hier schien also analog zu den Beobachtungen von Papadimitriou und Antimisiaris (2000) und Bendas et al. (1999) ein Plateau für die Bindung erreicht worden zu sein. Mit längerer Inkubationsdauer nahm dahingegen die Bindung der Liposomen durch die humanen Zellen deutlich zu. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Studien von Dabbas und Mitarbeitern (2008), die bei längerer Inkubation auch eine erhöhte Bindung kationischer Liposomen an humane Endothelzellen beobachteten. Sie untersuchten Zellen nach 30 Minuten und 24 Stunden Inkubation. Im bovinen Zellkulturmodell konnte zwar mit zunehmender Inkubationsdauer keine stetig vermehrte Bindung der Liposomen beobachtet werden, jedoch war hier insgesamt die Bindungseffizienz sehr gering und die Ergebnisse der

einzelnen Versuche schwankten teilweise sehr stark, so dass eine sichere Interpretation bezüglich einer Sättigung der Bindung nicht möglich ist.

Gründe für das Fehlen einer Bindungssättigung könnten sein, dass Bendas und Mitarbeiter bei den Versuchen ihrer Arbeitsgruppe Immunoliposomen verwendeten, also mit Liposomen gearbeitet haben, die mittels in ihrer Lipidschicht verankerter Antikörper eine spezifische Bindung an Antigenen an der Oberfläche der Zielzellen vermitteln. Es erscheint wahrscheinlich, dass eine unspezifische Bindungsreaktion langsamer abläuft als die spezifische Bindung an Oberflächenantigene. Zudem ist die spezifische Bindungsreaktion gesättigt, wenn alle an der Oberfläche der Zielzellen vorhandenen Antigene Immunoliposomen gebunden haben, da keine freien Bindungsstellen mehr vorhanden sind. Somit spricht die Beobachtung, dass auch nach langer Inkubationsdauer noch keine Sättigung der Liposomenbindung auftritt, dafür, dass keine spezifischen Antigene an den Zielzellen für die Vermittlung der Bindung verantwortlich sind. Die Ergebnisse für die humanen Endothelzellen deuten eher auf unspezifische Bindungsmechanismen, wie zum Beispiel Bindung durch elektrostatische Wechselwirkungen, wie sie zwischen den kationischen Liposomen und der anionischen Glykokalix auftreten, hin, wie dies auch in anderen Studien diskutiert wird (Bode et al., 2009; Dabbas et al., 2008; McLean et al., 1997; Baldwin et al., 1991). Aber auch einfache van-der-Waals-Kräfte könnten die Bindung vermitteln.

Gleichzeitig spricht die Beobachtung, dass die murinen Endothelzellen keinen signifikanten Anstieg der Bindung kationischer Liposomen zeigten und dass die Ergebnisse aus den bovinen Endothelzellkulturen einer zeitlichen Schwankung unterliegen dafür, dass unterschiedliche Bindungsmechanismen von den einzelnen Endothelzellkulturen genutzt werden könnten. Es gilt zu untersuchen, ob diese Spezies-spezifisch sind. Möglich wäre auch, dass die spontan Tumor-transformierten Endothelzellen durch ihren aktiven Metabolismus sehr viel schneller mit Partikeln aus dem Nährmedium interagieren und dadurch zügig ein Bindungsplateau erreicht wird.

Im Gegensatz zu den von Papadimitriou und Antimisiaris (2000) eingesetzten humanen Endothelzellen in den Passagen 1-5 wurden die humanen Zellen dieser Versuche in einer höheren Passage 7 verwendet. Zudem inkubierten sie die Zellen im Monolayer mit den Liposomen und nicht im subkonfluenten Zustand. In dieser höheren Passage und im konfluenten Zustand nutzen die Zellen vermutlich andere Mechanismen der Interaktion. Auch setzten sie anionischen Liposomen ein, für die sie eine Aufnahme mittels Caveolae-vermittelter Endozytose nachwiesen. Eine elektrostatische Bindung an die ebenfalls anionische Glykokalix, wie sie vermutlich für die Bindung kationischer Liposomen verantwortlich ist, ist aufgrund der Abstoßung gleichartiger Ladungen für die anionischen, Phosphatidylserin enthaltenden Liposomen nicht wahrscheinlich.

Es gilt auch zu berücksichtigen, dass die in dem zugesetzten Inkubationsmedium enthaltenen Liposomen zunächst auf den Boden der Kulturschalen sedimentieren müssen, bevor sie mit den dort wachsenden Zielzellen in Kontakt treten können und eine Bindung überhaupt erst möglich wird. Wenn die Liposomen nur sehr langsam sedimentieren, so kann dies mitverantwortlich dafür sein, dass erst nach 180-minütiger Inkubation ausreichend Liposomen Kontakt zu den Zellen aufnehmen konnten, um dort gebunden zu werden.

Nachdem die Liposomen an die Zellen gebunden wurden, muss eine Fusion oder eine Aufnahme mittels Endozytose erfolgen, damit der transportierte Wirkstoff im Inneren der Zelle seine Wirkung entfalten kann. Mittels der hier eingesetzten Methoden kann eine Fusion der Liposomen mit der Zellmembran nicht von einer Bindung intakter Liposomen an der Zelloberfläche abgegrenzt werden, so dass quantitativ nur die Aufnahme mittels Endozytose beurteilt werden kann.

In der vorliegenden Studie werden durch die murinen Endothelzellen etwa 13% der Liposomen endozytiert, somit würde ein im Inneren transportierter Wirkstoff in deutlichem Ausmaß das Innere der Zellen erreichen, um dort seine Wirkung zu entfalten. Da die Internalisierung durch die bovinen (0,16%) und humanen (0,4%) Endothelzellen in nur minimalem Maße erfolgt, scheint es fraglich, ob ein durch die kationischen Liposomen transportiertes Chemotherapeutikum in ausreichendem Maße die Zielzellen erreicht, um diese nachhaltig zu schädigen. Die Internalisierung der gebundenen Liposomen nimmt mit

zunehmender Inkubationsdauer in allen drei Zellkulturen stetig zu, eine Sättigung tritt im beobachteten Zeitraum nicht ein. Folglich scheint es wahrscheinlich, dass nach noch längerer Inkubation auch weiter mehr Liposomen internalisiert werden. So wiesen McLean und Mitarbeiter (1997) in ihren Studien nach, dass nach vier Stunden eine Internalisierung ihrer intravenös verabreichten Liposomen erfolgt war. Dies könnte bedeuten, dass eine Internalisierung gebundener Liposomen erfolgt, bis keine Liposomen mehr an der Zellmembran anhaften oder die Zelle eventuell durch eine zu große Menge internalisierter Liposomen zerstört wird (s.a. Kap. 5.5. und 6.5.)

6.3.1 Schwankungen der Ergebnisse der Versuche mit bovinen Endothelzellen

Die Messwerte zwischen den einzelnen Assays schwanken teilweise deutlich, wobei keine auffälligen Zusammenhänge zwischen der Inkubationsdauer und den Schwankungen zu beobachten sind. Auch im zeitlichen Verlauf schwankt die Menge gebundener Liposomen pro Zelle und der Prozentsatz gebundener von den insgesamt zugesetzten Liposomen. Dass die Messwerte zwischen den einzelnen Assays teils deutlich schwanken, könnte durch die Heterogenität der eingesetzten bovinen Endothelzellen verursacht werden, die bereits in verschiedenen Studien untersucht wurde (Käßmeyer, 2006; Plendl et al., 1992). In den mikroskopischen Untersuchungen zur Bindung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen (Kap. 5.4.1.1.) zeigte sich zudem, dass einige der Zellen keine mit dem Mikroskop sichtbare Fluoreszenz durch gebundene Liposomen aufwiesen. Geht man nun davon aus, dass in einer Kultur zum Zeitpunkt der Inkubationsversuche vermehrt Zellen vorhanden waren, die keine Liposomen binden, kann dies die deutlichen Schwankungen verursacht haben. Es ist jedoch mit den Versuchen dieser Studie nicht eindeutig zu klären gewesen, aufgrund welcher Mechanismen einige der bovinen Endothelzellen kationische Liposomen in sichtbarem Maße binden, während dies bei anderen Zellen nicht der Fall ist.

6.4 Qualitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen

Um die Aufnahme der kationischen Liposomen durch Endothelzellen zu untersuchen, wurden mit Markern versehene Liposomen mit den Endothelzellen inkubiert und die Lokalisation der Liposomen in den Zellen mittels Nachweis der Marker bestimmt. Dabei wurden auf mikroskopischer Ebene zunächst Rhodamin-markierte Liposomen eingesetzt. Anhand dieser wurde untersucht, ob die Liposomen nur an der Oberfläche der Zellen binden oder in die Zelle aufgenommen werden. Auch sollten hierbei erste Hinweise gesammelt werden, ob eine Fusion von Liposomen mit der Zellmembran stattfindet und inwieweit sich eventuell aufgenommene Liposomen in bestimmten Bereichen innerhalb der Zelle anreichern.

Um auf ultrastruktureller Ebene den Verbleib der Liposomen bzw. deren Lipidbausteinen an der Zellmembran und innerhalb der Zelle genauer zu untersuchen, kamen Gold-markierte Liposomen zum Einsatz.

Die in diesen Studien eingesetzten Rhodamin-markierten Liposomen wurden bereits in vorangehenden Studien im Tierversuch eingesetzt, um die Anreicherung der intravenös applizierten Liposomen in bestimmten Geweben darzustellen (Krasnici et al., 2003; Kunstfeld et al., 2003; Schmitt-Sody et al., 2003). Auch andere Studien setzen Rhodamin als Marker an Liposomen ein, um deren Aufnahme durch unterschiedliche Zellen zu untersuchen (Dabbas et al., 2008; Kaltra und Campbell, 2006; Huth et al., 2004; Almofti et al., 2003; Zuhorn et al., 2001; Miller et al., 1998;).

6.4.1 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen während der Inkubation

In allen Versuchen zur Inkubation der unterschiedlichen Liposomen mit und ohne Marker waren nach Zusatz des Inkubationsmediums im Medium, am Boden der Kulturschale und an den Zellen Vesikel sichtbar, die vor Zusatz des Inkubationsmediums und in den mitgeführten Kontrollen nicht vorhanden waren. Bei diesen Vesikeln handelt es sich um die dem Medium zugesetzten Liposomen. Dafür spricht insbesondere, dass in den Versuchen mit den Rhodamin-markierten Liposomen diese Vesikel einen rot-violetten Schimmer aufwiesen. Hierbei handelt es sich um eine Färbung, die von dem in den Liposomen inkorporierten Farbstoff Rhodamin verursacht wird, auch die unverdünnte Liposomenflüssigkeit zeigte eine intensive rot-violette Farbe.

Derartige lichtmikroskopisch sichtbare Vesikel wurden auch von Lienau (2003) und Meng (2002) bei der Transfektion von Zellen mittels liposomaler Trägerstoffe beschrieben. Meng setzte in ihren Studien Endothelzellen und Granulosazellen ein, Lienau verwendete in ihren Versuchen die auch in diesen Studien eingesetzten humanen und murinen Endothelzellen. Zu Beginn der Inkubation sind die Liposomen im gesamten Medium in Suspension, mit zunehmender Inkubationsdauer sedimentieren Sie jedoch auf den Boden der Kulturschale, so dass nach längerer Zeit mehr Liposomen den Grund der Kulturschale und somit auch die dort wachsenden Zellen erreichen. Ein Teil der Zellen scheint die Liposomen aufzunehmen, jedoch ist dies im Phasenkontrastmikroskop nicht eindeutig zu beurteilen, da durch die zweidimensionale Darstellung nicht sicher zwischen extrazellulären, nur anhaftenden oder aufliegenden, Liposomen und intrazellulären Liposomen unterschieden werden kann.

6.4.2 Bindung und Fusion der Liposomen mit den Endothelzellen

In den Versuchen dieser Studie war an den mit Liposomen inkubierten Zellen nach den Versuchen eine diffuse schwächere Fluoreszenz nachweisbar. Auffällig war, dass die diffuse Fluoreszenz nach der Färbung mit Trypan Blau kaum mehr nachweisbar war. Folglich muss diese diffuse Fluoreszenz sich überwiegend an der Oberfläche der Zelle befinden. Es waren also mit Rhodamin markierte Lipidbestandteile der Liposomen in der Zellmembran vorhanden. Dies kann durch Fusion der Liposomen mit der äußeren Zellmembran verursacht werden, wobei nun der Marker Rhodamin in der äußeren Zellmembran integriert wird (Almoffi et al., 2003; Düzgünes und Nir, 1999; Zipper et al., 1988). Eine Fusion von Liposomen mit der Zellmembran von Endothelzellen wurde von Zipper et al. (1988) beobachtet. Sie setzten in ihren elektronenmikroskopischen Studien bovine Endothelzellen aus der Aorta ein. Sie konnten an einigen Stellen elektronenmikroskopisch Bereiche nachweisen, in denen eine Fusion der liposomalen Lipiddoppelmembran mit der äußeren Zellmembran stattfand. Auch in der hier vorliegenden Studie konnte elektronenmikroskopisch ein Bereich gefunden werden, an dem ein Liposom mit der Zellmembran fusionierte (Abb. 54 Kap. 5.4.3.2) Liposomale Ausläufer, die in die Endothelzellen eindringen, wie sie in der Studie von Zipper et al. (1998) beobachtet wurden, traten in diesen Untersuchungen nicht auf.

Eine weitere mögliche Ursache für das Auftreten von Rhodamin-markierten Lipiden in der Zellmembran wäre auch ein Intermembrantransfer, bei dem Bestandteile der Liposomen und der Zellmembran sich bei Annäherung der Oberfläche austauschen, ohne dass eine Fusion stattfindet (Fretz et al., 2004).

Es erschien unwahrscheinlich, dass nur eine der oben genannten Möglichkeiten die diffuse Fluoreszenz verursacht. Durch die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung auf ultrastruktureller Ebene war es jedoch möglich, dies genauer zu untersuchen.

In den elektronenmikroskopischen Studien wiesen die untersuchten Zellen aus allen Versuchsreihen einzelne Goldkörner in der äußeren Zellmembran auf. Dies belegt, dass die in den Liposomen vorhandenen Nanogold-Marker nach Intermembrantransfer von Lipiden oder Fusion der Liposomen mit der äußeren Zellmembran Bestandteil der letzteren wurden. Eine solch deutliche Darstellung der Fusion konnte in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser Studie nur an einer Stelle erreicht werden, jedoch war in einigen Bereichen anhaftender Liposomen die Lipiddoppelschicht der äußeren Zellmembran nur

undeutlich dargestellt und schien sich in Auflösung zu befinden (Abb. 51 und 54 Kap. 5.4.3.2). Dies kann als Hinweis auf eine stattfindende Fusion oder einen Intermembrantransfer von Lipiden gewertet werden. Somit konnte auch in diesen Studien belegt werden, dass die kationischen Liposomen mit der äußeren Zellmembran der eingesetzten Endothelzellen fusionieren oder Lipidbestandteile austauschen. Dabei wird bei einer Fusion der Inhalt der Liposomen in das Zytosol freigesetzt, so dass im Inneren der Vesikel enthaltene Chemotherapeutika direkt in die Zelle gelangen und dort ihre Wirkung entfalten können.

Auch waren auf ultrastruktureller Ebene einzelne Liposomen an der Oberfläche der Zellen nachweisbar. Da diese nicht durch die verschiedenen Spülvorgänge von der Zelloberfläche abgelöst wurden, müssen sie stabil an die Zelloberfläche gebunden vorliegen. Diese gebundenen Liposomen können ebenso für einen Teil der in den fluoreszenzmikroskopischen Versuchen beobachteten diffusen, schwächeren Fluoreszenz verantwortlich gemacht werden. Möglich ist nun, dass diese Liposomen mit der Zellmembran zu einem späteren Zeitpunkt fusionieren. Da der Prozess der Fusion mit der Zellmembran sehr schnell stattfindet, war dieser in den ultrastrukturellen Studien nicht eindeutig darstellbar.

Zwar waren in den ultrastrukturellen Untersuchungen auch innerhalb des Zytosol vereinzelt isolierte Goldpartikel nachweisbar, diese wiesen jedoch keinen Kontakt zu anderen Zellorganellen auf. Auch innerhalb der Membranen der einzelnen Zellorganellen waren keine Goldpartikel nachweisbar. Es ist also nicht davon auszugehen, dass die Liposomen innerhalb der Zelle mit anderen Zellorganellen fusionieren oder nach Degradation der phagozytierten Liposomen deren Lipidbestandteile zum Aufbau zelleigener Membranen verwendet wurden. Somit konnte in diesen Versuchen eine Fusion der Liposomen mit der Kernmembran wie sie als Voraussetzung für eine erfolgreiche Transfektion von Zellen notwendig ist (Zabner, 1997; Wroebel und Collins, 1996), nicht nachgewiesen werden.

6.4.3 Phagozytose der Liposomen durch die Endothelzellen

Zusätzlich zu der diffusen, schwachen Fluoreszenz war an den Zellen aller eingesetzten Kulturen eine punktuelle, intensive Fluoreszenz nachweisbar. Diese punktuelle Fluoreszenz war sowohl vor als auch nach Färbung mit Trypan Blau vorhanden. Da durch die Färbung mit Trypan Blau die extrazelluläre Fluoreszenz gelöscht wird (Wasungu et al., 2006; Zuhorn et al., 2002a) musste folglich hier für die noch vorhandene Fluoreszenz nach Trypan Blau-Färbung ein internalisierter Marker verantwortlich sein.

Die beobachtete Fluoreszenz wird verursacht von Liposomen, die in Cluster zusammen liegen und somit punktuell und intensiver fluoreszieren. Diese Cluster aus Liposomen ließen sich bereits während der Inkubation im Phasenkontrastmikroskop beobachten, wo sie sich als unregelmäßig große Partikel zwischen den Zellen am Kulturschalenboden darstellen ließen. Die an den Zellen vorhandenen Liposomencluster lassen sich im Gegensatz zu den Clustern von Liposomen zwischen den Zellen phasenkontrastmikroskopisch auch nach den Spülvorgängen darstellen. Sie sind folglich fest an die Zellen gebunden. Ein Teil dieser Liposomencluster ist nur oberflächlich an der Zelle gebunden, dies lässt sich daraus folgern, das vor Färbung mit Trypan Blau mehr dieser stark fluoreszierenden Bereiche vorhanden waren als nach der Färbung.

Anhand der Beobachtungen aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen kann gefolgert werden, dass ein großer Teil der Liposomen innerhalb von intrazellulären Vesikeln in der Zelle liegen: die eingesetzten kationischen Liposomen werden von den Endothelzellen mittels Phagozytose aufgenommen.

Phagozytose wird vielfach als Aufnahmemechanismus für Liposomen durch Zellen beschrieben (Kakudo et al., 2004; Rückert et al., 2003; Zuhorn et al., 2002b; Kessner et al., 2001; Thurston et al., 1998; McLean et al., 1997; Friend et al., 1995; Zipper et al., 1988). Hierbei werden teilweise über oberflächengekoppelte Antikörper gezielt Antigene auf Zellen gebunden, die eine Endozytose vermitteln. Die in diesen Studien verwendeten kationischen Liposomen besitzen jedoch keine integrierten Antikörper, werden also über bisher unbekannte Rezeptoren gebunden und endozytiert. Krasnici et al. (2003) machen hierfür

negativ geladene so genannte Scavenger-Rezeptoren verantwortlich. Dabbas et al. (2008) sehen die Ursache der Bindung kationischer Liposomen durch Endothelzellen in elektrostatischen Wechselwirkungen der kationischen Lipide mit Bestandteilen der Zellmembran: ein hoher Gehalt an kationisch geladenen Lipiden erhöht die Aufnahme der Liposomen durch humane Endothelzellen.

Laut Huth et al. (2004) beeinflusst der Marker Rhodamin die Interaktion von Liposomen mit der Zelle, da die Kopfgruppe dieses Phospholipids als Ligand für die Clathrin-vermittelte Endozytose agiere. Weitere Studien, die diese These stützen, wurden bisher nicht publiziert. Da jedoch auch in den ultrastrukturellen Studien der hier durchgeführten Versuchsreihen Liposomen in unterschiedlichen Phasen des Prozesses der Endozytose beobachtet wurden, kann die Aufnahme mittels Phagozytose nicht allein durch den Marker Rhodamin initiiert worden sein. In den transmissionselektronenmikroskopischen Studien mit Gold-markierten Liposomen waren diese Liposomen sowohl in intrazellulären Vesikeln als auch an Invaginationen der äußeren Zellmembran im Prozess der Abschnürung endozytotischer Vesikel sichtbar. Demnach ist es als gesichert anzusehen, dass die eingesetzten kationischen Liposomen auch mittels Endozytose in die Endothelzellen aufgenommen werden. Ob tatsächlich der Marker Rhodamin die Endozytose der Liposomen beeinflusst, sollte jedoch in weiterführenden Studien eruiert werden.

Die Inkubation über unterschiedlich lange Zeiträume sollte es ermöglichen, Aussagen über den zeitlichen Ablauf der Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen zu treffen. Analog zu den Untersuchungen von Kunstfeld et al. (2003) waren in den Versuchen mit Rhodamin-markierten Liposomen bei den murinen und den humanen Endothelzellen eine zunehmend peripheronukleäre Anreicherung der Fluoreszenz im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Eine peripheronukleäre Anreicherung von Liposomen wiesen auch Dabbas et al. (2008) mittels Rhodamin-markierter Liposomen im Fluoreszenzmikroskop und MAG-C-markierten Liposomen auf ultrastruktureller Ebene nach, sie beobachteten dieses Phänomen insbesondere nach 24-stündiger Inkubation. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den murinen und humanen Endothelzellen waren bei den bovinen Endothelzellen die Vesikel stets in Zellmembrannähe oder verteilt im Zytoplasma der Zellen. Hier waren nach längerer Inkubationszeit die Liposomen auch spärlicher vorhanden, eine deutliche Anreicherung perinukleär trat auch nach längerer Inkubation nicht auf.

In den elektronenmikroskopischen Studien waren im zeitlichen Verlauf prozentual weniger Liposomen extrazellulär gebunden, es lagen vermehrt Liposomen in intrazellulären Vesikeln vor. Eine deutliche Anreicherung dieser Vesikel um den Zellkern herum konnte jedoch elektronenmikroskopisch nicht dargestellt werden. Somit ist die peripheronukleäre Anreicherung aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eher dadurch zu erklären, dass in diesem Bereich der am Kulturschalenboden anhaftenden Zellen aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur mehr Zytoplasma und folglich mehr Vesikel mit endozytierten Liposomen vorhanden sind als in den kernfernen Zellausläufern. Eine Assoziation der eingesetzten kationischen Liposomen mit anderen Zellorganellen konnte in den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass die Liposomen nach der Endozytose in Phagolysosomen enzymatisch abgebaut werden. Hierfür spricht, dass in den Vesikel teilweise die Struktur der Lipiddoppelmembran nicht mehr deutlich zu erkennen ist, vereinzelt sind nur noch Goldkörner innerhalb der gefüllten Vesikel nachweisbar. Die in den Zellen vereinzelt vorliegenden Goldkörner können als Reste dieses Abbauprozesses angesprochen werden. Somit könnten die Bestandteile der Liposomen nach deren Abbau für den Aufbau zelleigener Membranen verwendet werden. Deutliche Hinweise darauf waren in diesen Studien nicht nachweisbar, da sich in keiner der untersuchten Proben Goldkörner an den Membranen der Zellorganellen nachweisen ließen, somit nicht eindeutig Lipide liposomalen Ursprungs für den Aufbau verwendet wurden. Es wäre jedoch auch möglich, dass erst nach längeren Zeiträumen als den in diesen Studien gewählten die Lipide in zelleigene Organellen eingebaut werden. Weiterhin wäre es möglich, dass bei der Degradation der Liposomen der Marker vom Lipidbestandteil abgelöst wurde und somit eine Identifizierung der liposomalen Lipide nicht mehr möglich war.

6.4.4 Besonderheiten der bovinen Endothelzellen

Auffälligste Abweichung in den fluoreszenzmikroskopischen Versuchen war, dass die bovinen Endothelzellen Vesikel mit endozytierten Liposomen überwiegend in der Nähe der Zellmembran aufwiesen. Zudem nahmen die bovinen Endothelzellen nur sehr wenige Liposomen auf, Vesikel innerhalb der Zelle waren nur sehr vereinzelt zu sehen. Darüber hinaus wiesen einige Zellen gar keine Fluoreszenz auf. Zipper et al. (1988) berichten in ihrer Studie, dass die von ihnen eingesetzten bovinen Endothelzellen aus der Aorta die Liposomen zunächst aufnahmen und dann wieder abgaben. Sie machten dies daran fest, dass sich nach längeren Inkubationszeiten wieder vermehrt Liposomen an der Oberfläche der Zellen befanden. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch hier für die Reduzierung der intrazellulären Vesikel in den fluoreszenzmikroskopischen Versuchen verantwortlich sein.

Auch in den transmissionselektronenmikroskopischen Studien, wiesen ca. 20-40% der bovinen Zellen keine Goldpartikel auf. Es handelt sich zwar bei den ultrastrukturellen Präparaten immer nur um einen Schnitt durch die Zelle, so dass an anderen Bereichen und Ebenen der Zelle Goldpartikel gebunden sein könnten, jedoch waren bei den murinen Endothelzellen an jeder Zelle Goldpartikel vorhanden. Die bovinen Endothelzellen nehmen folglich deutlich weniger Liposomen auf. Dies wurde in den Versuchen zur Quantifizierung der Aufnahme der Liposomen bestätigt.

Einzig bei den bovinen Endothelzellen konnten auf ultrastruktureller Ebene Liposomen an Caveolae der Zellmembran gefunden werden. Bei der Caveolae-vermittelten Endozytose verschmelzen die Endosomen nicht mit Lysosomen. Es werden hier vier Wege der Vesikel beschrieben. Die Vesikel können ihren Inhalt ins Zytosol freisetzen, sie können mit dem Endoplasmatischen Retikulum fusionieren oder als Sequester innerhalb der Zelle liegen bleiben. Weiterhin können sie ihren Inhalt durch die Zelle hindurch zur gegenüberliegenden Seite der Zelle transportieren und dort durch Fusion mit der Zellmembran in den Extrazellularraum freisetzen (Minshall et al., 2002; Mineo und Anderson, 2001). Es ist denkbar, dass die Liposomen von den bovinen Zellen über Caveolae-vermittelte Endozytose aufgenommen werden und dicht unterhalb der Zelle im weitreichenden Netzwerk der vesiculo-vacuolären Organellen, die aus fusionierenden und über Kanäle verbundenen Caveolae entstehen (Stan, 2002; Mineo und Anderson, 2001), liegen bleiben. Aus diesem können sie dann wieder in den Extrazellularraum freigesetzt werden.

6.4.5 Besonderheiten der murinen Endothelzellen

Die murinen Endothelzellen nahmen mit Abstand am meisten Liposomen auf. Zur Fotodokumentation der gebundenen Liposomen reichte hier ein Bruchteil der Belichtungszeit aus, der zur Dokumentation der gebundenen Liposomen an den humanen und bovinen Zellen nötig war. Da sich die Fluoreszenz mit zunehmender Inkubationsdauer nicht intensivierte, scheint hier relativ schnell ein gesättigter Effekt eingetreten zu sein; die murinen Endothelzellen nehmen folglich auch am schnellsten Liposomen auf. Dies ist bedeutsam, da es sich bei den murinen Endothelzellen um spontan Tumor-transformierte Zellen handelt, die in diesen Versuchen als Modell für die Endothelzellen in den Kapillaren eines beliebigen Tumorgefäßbettes stehen sollten. Tumorzellen weisen eine hohe Stoffwechselrate auf; da sie sich ungehemmt und schnell vermehren und wachsen benötigen sie besonders viele Rohstoffe. Da die Liposomen als Trägerstoffe für Chemotherapeutika intravenös verabreicht werden, werden stoffwechselaktive Endothelzellen wie die hier eingesetzten Tumor-transformierten murinen Endothelzellen einen Großteil der applizierten Liposomen aufnehmen und aus dem Blutfluss entfernen. Somit würden die unerwünschten Nebenwirkungen der Chemotherapeutika reduziert werden, da weniger andere Zellen des Körpers erreicht werden. Es gilt jedoch sicherzustellen, dass die vermehrte Aufnahme kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen nicht Spezies-spezifisch ist. Dies könnte durch Untersuchungen mit murinen Endothelzellen anderen Ursprunges, die nicht Tumor-transformiert sind, erfolgen.

6.5 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch kationische Liposomen

Die Untersuchungen auf Zytotoxizität der eingesetzten Liposomen erfolgten, da sich insbesondere in den Versuchen mit den murinen Endothelzellen die Zellen teilweise vom Kulturschalenboden ablösten. Dies ist als Zeichen für eine Zellschädigung durch die eingesetzten Liposomen zu beurteilen, da in den Kontrolle zu den Versuchen ein solches deutliches Ablösen der Zellen nicht erfolgte, folglich auch nicht allein durch die Handhabung der Zellen innerhalb der einzelnen Versuchsansätze verursacht wurde.

Für die Versuche zur Zytotoxizität der Liposomen wurde als ein Beispiel für den Zelltod die Apoptose untersucht. Hierfür wurde der ApoAnnexin-V-Test verwendet, der eine Unterscheidung zwischen früher Apoptose und Zellnekrose ermöglicht. Da die Handhabung der Zellen für die Liposomen mit den verschiedenen Spülvorgängen und der Inkubation in serumfreiem Medium bereits eine starke Belastung für die Zellen darstellte, wurden für alle Zellkulturen Kontrollen mitgeführt, die den gleichen Spülvorgängen unterzogen wurden, ohne jedoch mit Liposomen inkubiert zu werden. Dies war insbesondere bedeutsam, da der Entzug von Serum bei in vitro kultivierten Endothelzellen Apoptose induzieren kann (Bombeli et al., 1999; Gerber et al., 1998). Diese muss von einer durch die Liposomen induzierten Apoptose oder Nekrose abgegrenzt werden können.

Beim ApoAnnexin-V-Test bindet das mit einem Marker versehene Annexin an Phosphatidylserin in der äußeren Lipidschicht der Zellmembran, welches nur bei apoptotischen Zellen und dort bereits sehr früh nach Induktion der Apoptose an der Zelloberfläche zu finden ist (Bose et al., 2004). Zusätzlich ist dem Reagenz Propidiumiodid zugesetzt, das nach Schädigung der Zellmembran in die Zelle eindringt und den Zellkern rot färbt. Somit können auch nekrotische Zellen identifiziert werden, da im Gegensatz zum Zelluntergang durch Nekrose die Integrität der Zellmembranen im Prozess der Apoptose über einen langen Zeitraum hinweg noch erhalten bleibt (Häcker, 2000).

In allen Versuchen wurden Phosphatidylserin-positive Zellen sowohl in den Kontrollen als auch in den mit Liposomen inkubierten Versuchsansätzen nachgewiesen. Diese Zellen befinden sich in einem frühen Stadium der Apoptose. Nur bei den murinen Zellen waren auch nekrotische Zellen, die einen intensiv rot fluoreszierenden Zellkern aufweisen, vorhanden. Obwohl in den einzelnen Versuchen teilweise deutlich unterschiedlich hohe Apoptoseraten auftraten, war nur bei den murinen Endothelzellen die Apoptoserate in allen Versuchen mit Liposomeninkubation höher als in den zugehörigen Kontrollen. Bei den bovinen und humanen Zellen waren zwar zwischen den einzelnen Versuchsreihen unterschiedlich hohe Apoptoseraten zu beobachten, jedoch war keine Erhöhung der Apoptoserate zwischen Liposomen-inkubierten Zellen und den Zellen der Kontrollversuche vorhanden. Ob diese Apoptose durch die Inkubation mit serumfreiem Medium oder durch andere Prozesse in der Handhabung der Zellen induziert wurde, lässt sich mit den durchgeführten Versuchen nicht klären. Es ist aber davon auszugehen, dass Unterschiede in der Handhabung der Zellen während der Versuchsansätze für das veränderte Auftreten von Apoptose in den einzelnen Versuchsreihen verantwortlich sind, da in allen Versuchen serumfreies Medium verwendet wurde und die Apoptoseraten dennoch unterschiedlich hoch waren. Zwar wurden die Zellen analog einem gleich bleibenden Protokoll behandelt, jedoch lassen sich minimale Abweichungen während der Handhabung der empfindlichen Zellkulturen nicht völlig eliminieren.

In diesen Versuchen wurde die Zytotoxizität der eingesetzten kationischen Liposomen auf Endothelzellen in vitro belegt. Diese Zytotoxizität war einzig bei den murinen Zellen zu beobachten, nach Inkubation mit kationischen Liposomen kam es zu einer Steigerung der Apoptoserate und zum Auftreten von Nekrosen der Zellen. Bereits Brill (2002) wies in seiner Dissertation nach, dass die von ihm eingesetzten kationischen Liposomen in hohen Konzentrationen das Zellwachstum hemmen und zytotoxisch wirken. In seinen Studien wiesen die kationischen Liposomen bei in vitro Inkubation mit Makrophagen eine erhöhte Zytotoxizität auf. Auch Schmitt-Sody et al. (2003) beobachteten in ihren Studien einen antitumoralen Effekt unbeladener kationischer Liposomen, jedoch untersuchten sie die Ursache dieses Effekts nicht näher.

Drummond et al. (1999) gehen in ihrer Publikation davon aus, dass die in den Liposomen enthaltenen Lipide nur in hohen Konzentrationen toxisch wirken. Auch Manosroi et al. (2008) konnten in ihren Studien belegen, dass die Zytotoxizität unterschiedlicher Liposomen mit steigender Konzentration an Liposomen im Nährmedium ebenfalls zunimmt, wobei jedoch die Unterschiede im zytotoxischen Potential der verschiedenen kationischen, neutralen und anionischen Liposomen deutlich waren. Dabbas et al. (2008) wiesen in ihren Studien zur Zytotoxizität verschiedener kationischer Liposomen nach, dass die Bindung verschiedener kationischer Liposomen an die von ihnen verwendeten Zellen deutlich von den bei der Herstellung verwendeten kationischen Lipide und deren Gehalt in den Liposomen bestimmt wird. Insbesondere das Zeta-Potential, also das elektrische Potential des Feldes um die geladenen kationischen Liposomen, beeinflusst die Bindung der Liposomen an die Zellen. So führen ein höherer Gehalt kationischer Ladungen und ein hohes Zeta-Potential zu einer vermehrten Zellassoziation von Liposomen.

Von den in dieser Studie verwendeten Zellen nehmen die murinen Zellen mit Abstand am meisten Liposomen auf. Da die Zellen als Tumor-transformierte Zellen ein ungehemmtes Wachstum und somit einen erhöhten Stoffwechsel aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass sich nur bei den murinen Endothelzellen Apoptose und Nekrose der Zellen durch Inkubation mit kationischen Liposomen steigerte, da nur hier eine toxische Menge an Liposomen aufgenommen wurde. Um dies zu belegen, müssten Studien folgen, bei denen die murinen Endothelzellen mit unterschiedlichen, absteigenden Mengen an Liposomen inkubiert werden. Interessant wäre es festzustellen, ab welcher Menge aufgenommener Liposomen keine Zytotoxizität bei den murinen Endothelzellen mehr auftritt. Da die verwendeten Liposomen stets die gleiche Zusammensetzung und somit einen konstanten Gehalt an kationischen Lipiden und ein konstantes Zeta-Potential aufweisen, muss die Ursache für die unterschiedliche Zellassoziation bei den eingesetzten Zellkulturen liegen. Somit weisen die eingesetzten Liposomen auf verschiedene Zellen ein unterschiedlich hohes zytotoxisches Potential auf. Bei einer systemischen Anwendung dieser kationischen Liposomen als Drug-Carrier ist dies ein potentieller Risikofaktor, der für eventuell auftretende Nebenwirkungen verantwortlich sein kann, sollten die kationischen Liposomen auch an „gesunde“ Zellen des Organismus in ebenso hohem Maße binden.

Takano et al. (2003) zeigten in Ihren Studien, dass die Induktion der Apoptose durch Liposomen von vielen Faktoren abhängig ist, wie beispielsweise der Ladung der Liposomen, der Konzentration der Liposomen im Inkubationsmedium und der Inkubationsdauer. Diese Faktoren waren in den hier durchgeführten Studien jedoch konstant gehalten. Folglich konnten diese Faktoren in den durchgeführten Studien keinen Einfluss nehmen, jedoch können die Unterschiede in der Induktion der Apoptose durch die Menge aufgenommener Lipide verursacht werden. Zudem handelt es sich auch um Endothelzellen unterschiedlicher Spezies, es wäre auch möglich, dass in diesem Fall die Endothelzellen von Mäusen empfindlicher auf die Inkubation mit Liposomen reagieren. Aramaki et al. (1999, 2000) zeigten, dass nicht jeder Zelltyp gleichermaßen sensibel auf die Liposomeninkubation reagiert. In ihren Studien deckten sie auf, dass insbesondere Makrophagen empfindlich mit einer Apoptoseinduktion auf die Inkubation mit Liposomen reagierten.

Dabbas et al. (2008) wiesen in ihren Studien bereits nach, dass humane Endothelzellen verschiedenen Ursprungs unterschiedlich sensibel auf das zytotoxische Potential von Liposomen reagieren, jedoch verwendeten sie keine Endothelzellen tumorösen Ursprungs. Somit ist noch ungeklärt, ob tumorös entartete Endothelzellen oder Endothelzellen aus dem Gefäßsystem eines Tumors noch deutlichere Unterschiede in der Aufnahme und der zytotoxischen Sensibilität im Vergleich zu Endothelzellen aus gesunden Organen aufweisen. Um dies näher zu untersuchen, sind weitere Untersuchungen mit dem Einsatz unterschiedlicher Liposomenkonzentrationen zum Inkubationsmedium und mit murinen Endothelzellen anderen Ursprungs erforderlich.

Werden kationische Liposomen als Vektoren für Chemotherapeutika eingesetzt, so könnte die Zytotoxizität der kationischen Liposomen die anti-vaskuläre Therapie durch das Drug Targeting der Chemotherapeutika zusätzlich effektivieren. Diese These formulierten auch Wu et al. (2007) in ihrer Arbeit zur Effektivität verschiedener Doxorubicin-beladener Liposomen. Schmitt-Sody et al. (2003) halten in ihren Studien zu LipoPac, einem Paclitaxel-

enthaltenden liposomalen Produkt, einen additiven Effekt von anti-tumoraler Wirkung der kationischen Liposomen und dem Chemotherapeutikum Paclitaxel für eine mögliche Ursache der erhöhten antitumoralen Wirksamkeit von LipoPac.

Weiterhin ist die genauere Kenntnis über Zytotoxizität kationischer Liposomen relevant für den therapeutischen Einsatz im Bezug auf unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Sollten sich Zellen bestimmter Gewebe als empfänglicher für eine durch kationische Liposomen induzierte Zytotoxizität erweisen, so könnte durch den Vektor „Liposom“ auch bei geringer Anreicherung in diesem Gewebe ein negativer Effekt auftreten, der nicht durch das im Vektor verursachte Chemotherapeutikum verursacht wird.

7. Zusammenfassung

Untersuchungen zur Interaktion kationischer Liposomen mit mikrovaskulären Endothelzellen in vitro unter besonderer Berücksichtigung der endothelialen Glykokalix und der liposomalen Zytotoxizität

Liposomen waren in den letzten Jahren Fokus intensiven Forschungen und haben sich insbesondere als Vektoren im Rahmen des Drug Targeting etabliert. Für kationische Liposomen konnte eine Anreicherung in den Endothelzellen des Tumorgefäßbettes nachgewiesen werden, so dass sie im Rahmen eines neovaskulären Targetings zur anti-angiogenen Tumorthherapie intensiven Forschungen unterzogen wurden und werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Aufnahme kationischer Liposomen durch proliferierende mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs in vitro zu untersuchen, um Gemeinsamkeit und Unterschiede in der Prozessierung kationischer Liposomen zwischen Endothelzellen aus gesunden Organen und aus Tumoren aufzudecken. Die Glykokalix als Vermittler vieler zellulärer Aufnahmemechanismen sollte für die eingesetzten Endothelzellkulturen charakterisiert werden, um Hinweise zu erhalten, ob sie Einfluss auf die Aufnahme kationischer Liposomen haben könnte. Darüber hinaus deutete sich in den durchgeführten Versuchen zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der Aufnahme an, dass die Liposomen ein zytotoxisches Potential besitzen. Aus diesem Grunde wurden Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch Inkubation kationischer Liposomen mit proliferierenden Endothelzellen durchgeführt, um dieses Phänomen näher zu charakterisieren.

Zum Einsatz kamen Endothelzellen, die aus gesunden Organen isoliert worden waren (Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Regression; BCl Rcobble), Endothelzellen aus der Haut eines Menschen; HMVEC) ebenso wie eine Endothelzellkultur, die spontan transformiert war (MHEC5, isoliert aus dem Herzmuskel einer Maus). Es wurden phasenkontrast-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Liposomeninkubation ebenso wie Apoptosetests nach Liposomeninkubation und spezielle Färbungen der Glykokalix für elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

In diesen Studien wurde erstmals die Glykokalix der hier eingesetzten Endothelzellkulturen in vitro charakterisiert. An allen Zellen ließ sich die Glykokalix mit einer durchschnittlichen Höhe von 10-30 nm deutlich darstellen, jedoch unterschieden sich die Endothelzellen hinsichtlich der Ausprägung der Glykokalix. Die humanen Endothelzellen wiesen eine gleichmäßig hohe Glykokalix auf. Im Vergleich dazu war die Glykokalix muriner und boviner Endothelzellen an einigen Stellen von Konglomeraten überragt und somit unregelmäßig hoch und aufgeraut, in der Grundhöhe jedoch vergleichbar der Glykokalix humaner Endothelzellen. Diese aufgeraute Glykokalix trat insbesondere auf der luminalen Seite der Zellen an Zellausläufern auf. Am auffälligsten war, dass bei den bovinen Endothelzellen die Glykokalix stellenweise unterbrochen war, während sie bei den murinen und humanen Endothelzellen die Zellen vollständig umgab.

Zur Untersuchung der Aufnahmemechanismen der Liposomen durch die Endothelzellen wurden markierte Liposomen für fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Studien eingesetzt. In allen Studien wurden die Liposomen durch die eingesetzten Endothelzellen gebunden und internalisiert, jedoch waren Unterschiede zwischen den Kulturen auffällig.

Quantitativ nahmen die murinen Endothelzellen, die spontan transformiert waren, am meisten kationische Liposomen auf, sie banden bis zu 10 Mal so viele Liposomen wie die humanen und die bovinen Endothelzellen. Zudem internalisierten sie 30-100 Mal so viele Liposomen wie die humanen und bovinen Endothelzellen, die aus gesunden Organen isoliert worden waren. Somit wurden durch die Endothelzellen eines Tumorgefäßbettes mehr Liposomen gebunden und internalisiert als durch Endothelzellen gesunden Ursprungs. Mit größerer Inkubationsdauer nahm die Internalisierung kationischer Liposomen in allen drei Endothelzellkulturen stetig zu. Dahingegen war die Bindung der kationischen Liposomen in den eingesetzten Kulturen im zeitlichen Verlauf unterschiedlich, die humanen Endothelzellen banden stetig mehr Liposomen, bei den bovinen Endothelzellen schwankte die Bindung und

bei den murinen Endothelzellen wurde schnell ein Bindungsplateau erreicht, es gab im zeitlichen Verlauf keine vermehrte Bindung kationischer Liposomen.

Internalisierte Liposomen in intrazellulären Vesikeln der Zellen waren sowohl elektronen- als auch fluoreszenzmikroskopisch aufzufinden, sie waren mittels Endozytose aufgenommen worden. Die bovinen Endothelzellen wiesen Liposomen an Caveolae auf, somit könnte hier eine Caveolae-vermittelte Endozytose für die Aufnahme verantwortlich sein. Bei den murinen Endothelzellen schien eine nicht-selektive Endozytose für die Internalisierung verantwortlich zu sein, es gab keine Anzeichen von Liposomen an Caveolae oder Clathrin-coated pits. Es sind also in den verschiedenen Endothelzellkulturen unterschiedliche Mechanismen der Endozytose für die Internalisierung verantwortlich. Somit konnte mit den hier verwendeten Endothelzellkulturen demonstriert werden, dass Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs auch Unterschiede in ihrer Interaktion mit den eingesetzten kationischen Liposomen aufweisen.

Zudem fanden sich elektronenmikroskopisch Hinweise auf eine Fusion kationischer Liposomen mit der äußeren Zellmembran. Die Liposomen erreichten keine anderen Zellorganellen.

Die Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch Inkubation mit kationischen Liposomen ergaben, dass einzig bei den murinen Endothelzellen eine gesteigerte Apoptoserate und das Auftreten von Nekrosen nach Liposomeninkubation beobachtet werden konnte. Dies legte die Vermutung nahe, dass einzig durch die murinen Endothelzellen ausreichend Liposomen aufgenommen wurden, um eine Zellschädigung zu verursachen. Für den Einsatz kationischer Liposomen im Rahmen des Drug Targeting in vivo bedeutet dies, dass die kationischen Liposomen die zytotoxische Wirkung eines transportierten Chemotherapeutikums durch ihre eigene Zytotoxizität unterstützen können. Sollten Endothelzellen außerhalb des Gefäßbettes des Tumors vermehrt kationische Liposomen aufnehmen, so könnten auch gesunde Gewebe geschädigt werden.

8. Summary

Studies on the interaction of cationic liposomes with microvascular endothelial cells in vitro in consideration of the endothelial glycocalyx and liposomal cytotoxicity

Liposomes have been the target of a large number of studies in the last decade. They have been established as vectors for Drug Targeting. Cationic liposomes have been shown to selectively target endothelial cells in tumour vessels, thus they have been intensively studied for neovascular targeting in anti-angiogenic tumour therapy.

The aim of this study was to evaluate the uptake of cationic liposomes by proliferating microvascular endothelial cells of different origin in vitro. Common features and differences of liposomal binding and uptake by tumour-transformed endothelial cells and endothelial cells derived from healthy organs should be examined. The endothelial glycocalyx was characterized for the used endothelial cell cultures. The glycocalyx is a mediator of multiple cellular mechanisms of uptake and thus might be a possible factor influencing liposomal uptake by endothelial cells.

Furthermore, during incubation studies for qualitative and quantitative liposomal uptake evidence for cytotoxicity was observed, hence the incidence of increased apoptosis as an example of cell death was examined.

Endothelial cells derived from healthy organs and tumour-derived endothelial cells (bovine endothelial cells from the corpus luteum in regression (BCI Rcobble), human dermal microvascular endothelial cells (HMVEC) and spontaneously tumour-transformed murine heart endothelial cells (MHEC5) were incubated with cationic liposomes and examined by phase contrast, fluorescence, and electron microscopy. Furthermore, fluorescence measurements for quantification of liposomal binding and uptake were performed. After cell incubation with liposomes, Apo-Annexin V-tests for detection of apoptosis were carried out. Special staining techniques were used to visualize endothelial cell glycocalyx with electron microscopy.

The endothelial glycocalyx could be visualized in all endothelial cell cultures. Glycocalyx mean height was about 10-30 nm for all cell cultures but characteristic differences in shape could be detected for the different cell cultures. HMVEC glycocalyx was uniform and smooth. BCI Rcobble glycocalyx was interrupted for some cells, whereas MHEC5 and HMVEC glycocalyx was continuous. MHEC5 and BCI Rcobble glycocalyx was uniform and smooth in some parts. In other parts it appeared rough with conglomerates towering above the basic glycocalyx. These parts of rough glycocalyx were often observed at the luminal cell side at cell protrusions.

To evaluate the mechanisms of liposomal uptake by endothelial cells, labelled liposomes were used for fluorescence and electron microscopic studies. In all experiments binding and uptake of liposomes by proliferating microvascular endothelial cells was observed. Differences in binding and uptake mechanisms for the evaluated endothelial cell cultures could be observed.

As shown by quantitative fluorescence studies, binding and uptake by murine endothelial cells (spontaneously tumour-transformed) was higher than binding and uptake by HMVEC and BCI Rcobble (both derived from healthy tissue). Binding was approximately 10 times higher for MHEC5 compared to BCI Rcobble and HMVEC, uptake by MHEC5 far exceeded uptake by HMVEC and BCI Rcobble, being approximately 30-100 times higher.

The amount of internalized liposomes was time-dependent, increasing with prolonged incubation times for all three cell cultures. The amount of binding was time-dependent for HMVEC, also increasing with prolonged incubation, but uniform for MHEC5. For BCI Rcobble, the amount of bound liposomes fluctuated with prolonged incubation.

Internalized liposomes in intracellular vesicles were visible in both electron and fluorescence microscopic studies. Uptake of those liposomes was due to endocytosis. Endocytosis mechanisms are different for the investigated cell cultures. In BCI Rcobble cultures, liposomes were visible in caveolae, hence caveolae-mediated endocytosis seems to be a

mechanism of liposomal uptake by BCI Rcobble. For MHEC5 there were no indications that caveolae or clathrin-coated pits were involved in endocytosis, therefore unspecific endocytosis must be held responsible for liposomal uptake by MHEC5.

Another detected way of liposomal uptake was fusion with the outer cell membrane, evidence for fusion was found in electron microscopy studies. No association of cationic liposomes with other cell organelles was observed.

Apoptosis studies showed increased rate of apoptosis and occurrence of necrosis after incubation with cationic liposomes only for MHEC5. Since uptake of liposomes by MHEC5 was much higher than uptake by BCI Rcobble and HMVEC it is likely that only MHEC5 cells internalized an adequate amount of liposomes to induce cell death. For the application of cationic liposomes for drug targeting in vivo this implicates that the cytotoxic potential of cationic liposomes might enhance the cytotoxic effect of a transported chemotherapeutic agent. Also, if uptake occurs by non-tumour endothelial cells, damage to healthy tissue might occur.

Zitierte Literatur

- Abbro L., Lanubile R., Dini L.** (2004) Ultrastructural study of apoptotic U7 cells treated with different pro-apoptotic substances. *Microscopy Research and Technique* **64**, 77-85.
- Allen T.M.** (1994) Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends in Pharmacological Sciences* **15**, 215-220.
- Almofiti M. R., Harashima H., Shinohara Y., Almofiti A., Baba Y., Kiwada H.** (2003) Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **410**, 246-253.
- Anderson R.G.W.** (1993) Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10909-10913.
- Antohe F., Lin L., Kao G.Y., Poznansky M.J., Allen T.M.** (2004) Transendothelial movement of liposomes in vitro mediated by cancer cells, neutrophils or histamine. *Journal of Liposome Research* **14**, 1-25.
- Araki S., Simada Y., Kaji K., Hayashi H.** (1990) Role of protein kinase C in the inhibition by fibroblast growth factor of apoptosis in serum-depleted endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **172**, 1081-1085.
- Aramaki Y., Takano S., Tsuchiya S.** (2001) Cationic liposomes induce macrophage apoptosis through mitochondrial pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **392**, 245-250.
- Aramaki Y., Takano S., Arima H., Tsuchiya S.** (2000) Induction of apoptosis in WEHI 231 cells by cationic liposomes. *Pharmaceutical Research* **17**, 515-520.
- Aramaki Y., Takano S., Tsuchiya S.** (1999) Induction of apoptosis in macrophages by cationic liposomes. *FEBS Letters* **460**, 472-476.
- Arangoa M.A., Düzgünes N., Tros de Ilarduya C.** (2003) Increased receptor-mediated gene delivery to the liver by protamine-enhanced-asialofetuin-lipoplexes. *Gene Therapy* **10**, 5-14.
- Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearne M., Wagner M., Isner J.M.** (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Research* **85**, 221-228.
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.** (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967.
- Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L., Akhtar N.** (2003) Angiogenesis assays: a critical overview. *Clinical Chemistry* **49**, 32-40.
- Auerbach R., Akhtar N., Lewis R. L., Shinnars B.L.** (2000) Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Reviews* **19**, 167-172.
- Augustin H.G.** (2000) Vascular morphogenesis in the ovary. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynecology* **14**, 867-882.

- Augustin H.G., Braun K., Telemenakis I., Modlich U., Kuhn W.** (1995) Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. *American Journal of Pathology* **147**, 339-351.
- Azzazy H.M., Hong K., Wu M.C., Gross G.W.** (1995) Interaction of cationic liposomes with cells of electrically active neuronal networks in culture. *Brain Research* **695**, 231-236.
- Baatz J.E., Zou Y., Korfhagen T.R.** (2001) Inhibitory effects of tumor necrosis factor-alpha on cationic lipid-mediated gene delivery to airway cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* **1535**, 100-109.
- Bahramsoltani M., Plendl J.** (2004) Ein neues in vitro Modell zur Quantifizierung der Angiogenese. *ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten* **21**, 227-244.
- Bahramsoltani M.** (2003) Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in vitro. *Dissertationsschrift. Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin.*
- Bailey A.L., Cullis P.R.** (1997) Membrane fusion with cationic liposomes: effects of target membrane lipid composition. *Biochemistry* **36**, 1628-1634.
- Baker P.W., Rye K.A., Gamble J.R., Vadas M.A., Barter P.J.** (2000) Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *Journal of Lipid Research* **41**, 1261-1267.
- Baldwin A.L., Thurston G.** (2001) Mechanisms of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* **29**, 247-278.
- Baldwin A.L., Wu, N.Z., Stein D.L.** (1991) Endothelial surface charge of intestinal mucosal capillaries and its modulation by dextran. *Microvascular Research* **42**, 160-178.
- Bangham A.D.** (1964) Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* **12**, 660-668.
- Barratt G., Tenu J.P., Yapo A., Petit J.F.** (1986) Preparation and characterisation of liposomes containing mannosylated phospholipids capable of targeting drugs to macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta* **862**, 153-164.
- Basehore S., Braman J.** (2000) Highest transfection efficiency of an endotoxin-sensitive mammalian cell line. *Strategies* **13**, 62-63.
- Bathori G., Cervenak L., Karadi I.** (2004) Caveolae - an alternative endocytic pathway for targeted drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **21**, 67-95.
- Bayless K.J., Davis G.E.** (2002) The Cdc42 and Rac1 GTPases are required for capillary lumen formation in the three-dimensional extracellular matrices. *Journal of Cell Science* **115**, 1123-1136.
- Bayless K.J., Salazar R., Davis G.E.** (2000) RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *American Journal of Pathology* **156**, 1673-1683.

- Bednarek I., Czajka M., Wilczok T.** (2002) Efficiency of lipofection of adherent cells is limited by apoptosis. *Folia histochemica et cytobiologica* **40**, 133-134.
- Bendas G., Rothe U., Scherphof G.L., Kamps J.A.A.M.** (2003) The influence of repeated injections on pharmacokinetics and biodistribution of different types of sterically stabilized immunoliposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1609**, 63-70.
- Bendas G., Krause A., Bakowsky U., Vogel J., Rothe U.** (1999) Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *International Journal of Pharmaceutics* **181**, 79-93.
- Bendas G., Krause A., Schmidt R., Vogel J., Rothe U.** (1998) Selectins as new targets for immunoliposome-mediated drug delivery. A potential way of anti-inflammatory therapy. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **73**, 19-26.
- Benjamin L.E., Golijanin D., Itin A., Pode D., Keshet E.** (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of Clinical Investigation* **103**, 159-165.
- Benjamin L.E., Hemo I., Keshet E.** (1998) A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125**, 1591-1598.
- Beresewicz A., Czarnowska E., Maczewki M.** (1998) Ischemic preconditioning and superoxide dismutase protect against endothelial dysfunction and endothelium glycocalyx disruption in the postischemic guinea-pig hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry* **186**, 87-97.
- Bergers G., Hanahan D.** (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews. Cancer* **8**, 592-603.
- Bishop ET, Bell GT, Bloor S, Broom IJ, Hendry NF, Wheatley DN.** (1999) An in vitro model of angiogenesis: basic features. *Angiogenesis* **3**, 335-344.
- Bisplinghoff P.** (2006) Angiogenese, Anti-Angiogenese und vaskuläre Regression am Modell des bovinen Corpus luteum. *Dissertationsschrift. Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin.*
- Bombeli T., Schwartz B.R., Harlan J.M.** (1999) Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* **93**, 3831-3838.
- Bode, C., Trojan, L., Weiss, C., Kraenzlin, B., Michaelis, U., Teifel, M., Alken, P., Michel, M.S.** (2009) Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes: A new option for neovascular targeting for the treatment of prostate cancer. *Oncology Reports* **22**, 321-326.
- Bose S., Tuunainen I., Parry M., Penate Medina O., Mancini G., Kinnunen P.** (2004) Binding of cationic liposomes to apoptotic cells. *Analytical Biochemistry* **331**, 385-394.
- Bouck N., Stellmach V., Hsu S.C.** (1996) How tumors become angiogenic. *Advances in Cancer Research* **69**, 135-174.
- Boyankowski B., Karakashian A., King K., Giltiy N., Nikolova-Karakashian M.** (2003) Uptake and metabolism of low density lipoproteins with elevated ceramide content by human microvascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 26992-26999.

- Briane D., Lesage D., Cao A., Coudert R., Lievre N., Salzmann J.L., Taillandier E.** (2002) Cellular pathways of plasmids vectorized by cholesterol-based cationic liposomes. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **50**, 983-991.
- Brill B.** (2002) Inhibition der Angiogenese durch kationische Liposomen. *Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität Gießen*
- Brouland J.P., Gilbert M.A., Bonneau M., Pigneaud G., Bal Dit Solier C., Drouet L.** (1999) Macro and microheterogeneity in normal endothelial cells: different composition of luminal glycocalyx and functional implications. *Endothelium* **6**, 251-262.
- Browder T., Butterfield C.E., Kraling B.M., Shi B., Marshall B., O'Reilly M.S., Folkman J.** (2000) Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Research* **60**, 1878-1886.
- Brown E.J.** (1995) Phagocytosis. *Bioessays* **17**, 109-117.
- Brown M.D., Egginton S., Hudlicka O., Zhou A.-L.** (1996) Appearance of the capillary endothelial glycocalyx in chronically stimulated rat skeletal muscles in relation to angiogenesis. *Experimental Physiology* **81**, 1043-1046.
- Burri P.H., Tarek M.R.** (1990) A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *The Anatomical Record* **228**, 35-45.
- Caduff J.H., Fischer L.C., Burri P.H.** (1986) Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *The Anatomical Record* **216**, 154-164.
- Cai X.S., Jia Y.W., Mei J., Tang R.Y.** (2004) Tumor blood vessels formation in osteosarcoma: vasculogenesis mimicry. *Chinese Medical Journal* **117**, 94-98.
- Canete M., Ortega C., Gavada A., Cristobal J., Juarranz A., Nonell S., Teixido J., Borrell J.I., Villanueva A., Rello S., Stockert J.C.** (2004) Necrotic cell death induced by photodynamic treatment of human lung adenocarcinoma A-549 cells with palladium (II)-tetraphenylporphycene. *International Journal of Oncology* **24**, 1221-1228.
- Cao A., Briane D., Coudert R., Vassy J., Lievre N., Olsman E., Tamboise, Salzmann J.L., Rigaut J.P., Taillander E.** (2000) Delivery and pathway in MCF7 cells of DNA vectorized by cationic liposomes derived from cholesterol. *Antisense Nucleic Acid Drug Delivery* **10**, 369-380.
- Campbell R.B., Fukumura D., Brown E.B., Mazzola L.M. Izumi Y., Jain R.K., Torchilin V.P., Munn L.L.** (2002) Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors. *Cancer Research* **62**, 6831-6836.
- Caplice N.M., Doyle B.** (2005) Vascular progenitor cells: origin and mechanism of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. *Stem Cells and Development* **14**, 122-139.
- Carmeliet P.** (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* **6**, 389-395.
- Carmeliet J., Jain R.K.** (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257.

- Cartier R., Velinova M., Lehman C., Erdmann B., Reszka R.** (2003) Ultrastructural analysis of DNA complexes during transfection and intracellular transport. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **51**, 1237-1240.
- Celano M., Calvagno M.G., Bulotta S., Paolino D., Arturi F., Rotiroti D., Filetti S., Fresta M., Russo D.** (2004) Cytotoxic effects of gemcitabine-loaded liposomes in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *BMC Cancer* **4**, 63.
- Cevc G., Richardsen H.** (1999) Lipid vesicles and membrane fusion. *Advanced Drug Delivery Reviews* **38**, 207-232.
- Chang D-K., Chiu Ch.-Y., Kuo S.-Y., Lin W.-Ch., Lo A., Wang Y.-P., Li P.-Ch., Wu H.-Ch.** (2009) Antiangiogenic Targeting Liposomes Increase Therapeutic Efficacy for Solid Tumors. *Journal of Biology and Chemistry* **284**, 12905-12916.
- Chen B., Jin H., Wu K.** (2009) Potential role of vascular targeted therapy to combat against tumor. *Expert Opinion on Drug Delivery* **6**, 719-726.
- Chi J.-T., Chang H.Y., Haraldsen G., Jahnsen F.L., Troyanskaya O.G., Chang D.S., Wang Z., Rockson S.G., van de Rijn M., Botstein D., Brown P.O.** (2003) Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10623-10628.
- Choi K., Kennedy M., Kazarov A., Papadimitriou J.C., Keller G.** (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* **125**, 725-732.
- Chonn A., Semple S.C., Cullis P.R.** (1992) Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 18759-18765.
- Chung N.S., Wasan K.M.** (2004) Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 1315-1334.
- Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A.-M., Stern D.M.** (1998) Endothelial cells in physiology and in pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527-3561.
- Conway E.M., Carmeliet P.** (2004) The diversity of endothelial cells: a challenge for therapeutic angiogenesis. *Genome Biology* **5**, 207.
- Dabbas S., Kaushik R.R., Dandamudi S., Kuesters G.M., Campbell R.B.** (2008) Importance of the liposomal cationic lipid content and type in tumor vascular targeting: Physicochemical characterization and in vitro studies using human primary and transformed endothelial cells. *Endothelium* **15**, 189-201.
- Damiano E.R.** (1998) The effect of the endothelial-cell glycocalyx on the motion of red blood cells through capillaries. *Microvascular Research* **55**, 77-91.
- Dass C.R., Choong P.F.** (2006) Targeting of small molecule anticancer drugs to the tumour and its vasculature using cationic liposomes: lessons from gene therapy. *Cancer Cell International* **6**, 17.
- Dass C.R.** (2004) Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *Journal of Molecular Medicine* **82**, 579-591.

- Davis G.E., Camarillo C.W.** (1996) An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Experimental Cell Research* **224**, 39-51.
- Dell'Eva R., Pfeffer U., Indraccolo S., Albini A., Noonan D.** (2002) Inhibition of tumor angiogenesis by angiostatin: from recombinant protein to gene therapy. *Endothelium* **9**, 3-10.
- Derycke A.S., Kamuhabwa A., Gijssens A., Roskams T., De Vos D., Kasran A., Huwyler J., Missiaen L., de Witte P.A.** (2004) Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer AIPcS4 to rat bladder carcinoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* **96**, 1620-1630.
- Desai S.B., Libutti S.K.** (1999) Tumor angiogenesis and endothelial cell modulatory factors. *Journal of Immunotherapy* **22**, 186-211.
- Diez-Roux G., Lang R.A.** (1997) Macrophages induce apoptosis in normal cells in vivo. *Development* **124**, 3633-3638.
- Dimmeler S., Zeiher A.M.** (2000) Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circulation Research* **87**, 434-439.
- Dini L., Falasca L., Ruzzittu M.T., Mossa G., Finazii-Agro A., Di Giulio A.** (1998) Interaction between isolated and purified liver cells and small unilamellar liposomes. *Liver* **18**, 229-238.
- Dini L., Lentini A., Diez G., Rocha M., Falasca L., Serafino L., Vidal-Vanaclocha F.** (1995) Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *Journal of Cell Science* **108**, 967-973.
- Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D.B., Papahadjopoulos D.** (1999) Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological Reviews* **51**, 691-743.
- Dubey P.K., Mishra V., Jain S., Mahor S., Vyas S.P.** (2004) Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting. *Journal of Drug Targeting* **12**, 257-264.
- Düzgünes N.** (2003) Fluorescence assays for liposome fusion. *Methods in Enzymology* **372**, 260-274.
- Düzgünes N., Felgner P.L.** (1993) Intracellular delivery of nucleic acids and transcription factors by cationic liposomes. *Methods in Enzymology* **221**, 303-306
- Düzgünes N., Nir S.** (1999) Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* **40**, 3-18.
- Duffy F.J., Seiler J.G., Gelberman R.H.** (1995) Growth factors and canine flexor tendon healing: initial studies in uninjured and repair models. *The Journal of Hand Surgery* **20**, 645-649.
- Eichhorn M.E., Luedemann S., Strieth S., Papyan A., Ruhstorfer H., Haas H., Michaelis U., Sauer B., Teifel M., Enders G., Brix G., Jauch K.W., Bruns C.J., Dellian M.** (2007) Cationic lipid complexed camptothecin (EndoTAG-2) improves antitumoral efficacy by tumor vascular targeting. *Cancer Biology and Therapy* **6**, 920-929.

- Eichhorn M.E., Strieth S., Krasnici S., Sauer B., Teifel M., Michaelis U., Naujoks K., Dellian M.** (2004) Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels. *Angiogenesis* **7**, 133-141.
- Eichmann A., Corbel C., Nataf V., Vaigot P., Bréant C., Le Douarin N.M.** (1997) Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5141-5146.
- EI Ouahabi A., Thiry M., Pector V., Fuks R., Ruyschaert J.M., Vandenbranden M.** (1997) The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Letters* **414**, 187-192.
- Eliaz R.E., Nir S., Marty C., Szoka F.C.** (2004) Determination and modeling of kinetics of cancer cell killing by doxorubicin and doxorubicin encapsulated in targeted liposomes. *Cancer Research* **64**, 711-718.
- Engel A., Chatterjee S.K., Al-Arifi A., Riemann D., Langner J., Nuhn P.** (2003) Influence of spacer length on interaction of mannosylated liposomes with human phagocytic cells. *Pharmacological Research* **20**, 51-57.
- Epand R.F., Martinou, J.-C., Montessuit S., Epand R.M.** (2004) Fatty acids enhance membrane permeabilization by pro-apoptotic bax. *The Biochemical Journal* **377**, 509-516.
- Epand R.F., Martinou J.C., Montessuit S., Epand R.M.** (2003) Transbilayer lipid diffusion promoted by bax: implications for apoptosis. *Biochemistry* **42**, 14576-14582.
- Ergun S., Kilic N., Wurmbach J.H., Ebrahimnejad A., Fernando M., Sevinc S., Kilic E., Chalajour F., Fiedler W., Lauke H., Lamszus K., Hammerer P., Weil J., Herbst H., Folkman J.** (2001) Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. *Angiogenesis* **4**, 193-206.
- Everts M., Koning G.A., Kok R.J., Asgeirsdottir S.A., Vestweber D., Meijer D.K., Storm G., Molema G.** (2003) In vitro cellular handling and in vivo targeting of E-selectin-directed immunoconjugates and immunoliposomes used for drug delivery to inflamed endothelium. *Pharmacological Research* **20**, 64-72.
- Faneca H., Simoes S., Pedroso de Lima M. C.** (2004) Association of albumin or protamine to lipoplexes: enhancement of transfection and resistance to serum. *The Journal of Gene Medicine* **6**, 681-692.
- Farhood H., Serbina N., Huang L.** (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1235**, 289-295.
- Fassel T.A., Edminston C.E.** (1999) Bacterial biofilms: strategies for preparing glycocalyx for electron microscopy. *Methods in Enzymology* **310**, 194-203.
- Fassel T.A., Mozdziak P.E., Sanger J.R., Edminston C.E.** (1998) Superior preservation of the staphylococcal glycocalyx with aldehyd-ruthenium red and select lysine salts using extended fixation times. *Microscopy Research and Technique* **41**, 291-297.

- Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., Tsai Y.J., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P.L.** (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 2550-2561.
- Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M.** (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection in procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 7413-7417.
- Fishman A.P.** (1982) Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Annals of the New York Academy of Sciences* **401**, 1-8.
- Florian J.A., Kosky J.R., Ainslie K., Pang Z., Dull R.O., Tarbell J.M.** (2003) Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circulation Research* **93**, 136-142.
- Folkman J.** (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews on Drug Discovery* **6**, 273-28
- Folkman J.** (2004) Endogenous angiogenesis inhibitors. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* **112**, 496-507.
- Folkman J.** (2003) Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current Molecular Medicine* **3**, 643-651.
- Folkman J.** (2001) Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 398-400.
- Folkman J.** (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine* **1**, 27-31.
- Folkman J.** (1992) The role of angiogenesis in tumor growth. *Seminars in Cancer Biology* **3**, 65-71.
- Folkman J., Ingber D.** (1992) Inhibition of angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology* **3**, 89-96.
- Folkman J., Shing Y.** (1992) Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 10931-10934.
- Folkman J., Hanahan D.** (1991) Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symposia* **22**, 339-347.
- Folkman J., Ingber D. E.** (1987) Angiostatic steroids. Method of discovery and mechanism of action. *Annals of Surgery* **206**, 347-383.
- Folkman J.** (1985) Tumor angiogenesis. *Advances in Cancer Research* **43**, 175-203.
- Folkman J.** (1982) Angiogenesis: initiation and control. *Annals of the New York Academy of Science* **401**, 212-227.
- Folkman J., Haudenschild C.** (1980) Angiogenesis in vitro. *Nature* **288**, 551-556.

- Folkman J.** (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* **285**, 1182-1186.
- Folkman J., Merler E., Abernathy C., Williams G.** (1970) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *Journal of Experimental Medicine* **133**, 275-288.
- Freemann B.A., Young S.L., Crapo J.D.** (1983) Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 12534-12542.
- Fretz M.M., Koning G.A., Mastrobattista E., Jiskoot W., Storm G.** (2004) OVCAR-3 cells internalize TAT-peptide modified liposomes by endocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1665**, 48-56.
- Friend D.S., Papahadjopoulos D., Debs R.J.** (1996) Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1278**, 41-50.
- Fu B.M., Chen B., Chen W.** (2003) An electrodiffusion model for effects of surface glycocalyx layer on microvessel permeability. *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology* **284**, H1240-H1250.
- Fuchs-Schönleber T.** (1999) Etablierung eines in vitro-Modells des bovinen Corpus luteum. *Dissertationsschrift Universität München*.
- Gabzion A.A., Shmeeda H., Zalipsky S.** (2006) Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. *Journal of Liposome Research* **16**, 175-183.
- Gabzion A., Horowitz A.T., Goren D., Tzemach D., Shmeeda H., Zalipsky S.** (2003) In vivo fate of folate-targeted polyethylen-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clinical Cancer Research* **9**, 6551-6559.
- Gao X., Jaffurs D., Robbins P.D., Huang L.** (1994) A sustained, cytoplasmic transgene expression system delivered by cationic liposomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **200**, 1201-1206.
- Gasparini G., Biganzoli E., Bonoldi E., Morabito A., Fanelli M., Boracchi P.** (2001) Angiogenesis sustains tumor dormancy in patients with breast cancer treated with adjuvant chemotherapy. *Brest Cancer Research and Treatment* **65**, 71-75.
- Geli M.I., Riezman H.** (1996) Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *Journal of Cell Science* **111**, 1031-1037.
- Gerber H.-P., Dixit V., Ferrera N.** (1998) Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 13313-13316.
- Gershon H., Ghirlando R., Guttman S.B., Minsky A.** (1993) Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* **32**, 7143-7151.
- Gijsens A., Derycke A., Missiaen L., De Vos D., Huwyler J., Eberle A., de Witte P.** (2002) Targeting of the photocytotoxic compound AIPcS4 to HeLa cells by transferrin conjugated PEG-liposomes. *International Journal of Cancer* **101**, 78-85.

- Gimbrone M.A., Cotran R.S., Folkman J.** (1974) Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *Journal of Cell Biology* **60**, 673-684.
- Goede V., Schmidt T., Kimmina S., Koziar D., Augustin H.G.** (1998) Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Laboratory Investigation* **78**, 1385-1394.
- Goh P.P., Sze D.M., Roufogalis B.D.** (2007) Molecular and cellular regulators of cancer angiogenesis. *Current Cancer Drug Targets* **7**, 743-758.
- Gorodetsky R., Levdansky L., Vexler A., Shimeliovich I., Kassis I., Ben-Moshe M., Magdassi S., Marx G.** (2004) Liposome transduction into cells enhanced by haptoacetic peptides (Haptides) homologous to fibrinogen C-termini. *Journal of Controlled Release* **95**, 477-488.
- Green D.R., Reed J.C.** (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Griendling K.K., Alexander R.W.** (1996) Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB Journal* **10**, 283-292.
- Hadorn E. von, Wehner, R.** (1974) Zellmembran. In: *Allgemeine Zoologie; 19. Auflage*, Georg Thieme Verlag, 4-7.
- Häcker, G.** (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research* **301**, 5-17.
- Hainfeld J.F.** (1996) Labeling with Nanogold and undecagold: techniques and results. *Scanning Microscopy Supplements* **10**, 309-322.
- Haldenby K.A., Chappell D.C., Winlove C.P., Parker K.H., Firth J.A.** (1994) Focal and regional variations in the composition of the glycocalyx of large vessel endothelium. *Journal of Vascular Research* **31**, 2-9.
- Hamaguchi I., Huang X.L., Takakura N., Tada J., Yamaguchi Y., Kodama H., Suda T.** (1999) In vitro hematopoietic and endothelial cell development from cells expressing TEK receptor in murine aorta-gonad-mesonephros region. *Blood* **93**, 1549-1556.
- Hansen C.G., Nichols B.J.** (2009) Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *Journal of Cell Sciences* **122**, 1713-1721.
- Harashima H., Tsuchihashi M., Iida S., Doi H., Kiwada H.** (1999) Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of antitumor agents encapsulated into liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **40**, 39-61.
- Harashima H., Kiwada H.** (1999) The Pharmacokinetics of Liposomes in Tumor Targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews* **40**, 1-2.
- Harashima H., Sakata K., Funato K., Kiwada H.** (1994) Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharmacological Research* **11**, 402-406.
- Harigai T., Kondo M., Isozaki M., Kasukawa H., Hagiwara H., Uchiyama H., Kimura J.** (2001) Preferential binding of polyethylene glycol-coated liposomes containing a novel cationic lipid, TRX-20, to human subendothelial cells via chondroitin. *Pharmacological Research* **18**, 1284-1290.

- Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J.W., Thurston G., Roberge S., Jain R. K., McDonald D.M.** (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *American Journal of Pathology* **156**, 1363-1380.
- Hein M., Ernst M., Möller F., Regensburger D.** (1998) Gene transfer into rat heart-derived endothelial cells. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* **13**, 460-466.
- Hendrix M.J., Seftor E.A., Hess A.R., Seftor R.E.** (2003) Vasculogenic mimicry and tumor-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nature Reviews Cancer* **3**, 411-421.
- Henry C.B.S., Duling B.R.** (1999) Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology* **277**, H508-H514.
- Henry C.B., DeFouw D.O.** (1995) Differential lectin binding to microvascular endothelial glycoconjugates during normal angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Microvascular Research* **49**, 2001-2011.
- Hicklin D.J., Ellis LM.** (2005) Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 1011-27.
- Hiraizumi Y., Fujimaki E., Transfeldt E.E., Kawahara N., Fiegel V.D., Knighton D., Sung J.H.** (1996) The effect of the platelet derived wound healing formula and the nerve growth factor on the experimentally injured spinal cord. *Spinal Cord* **34**, 394-402.
- Hirschberg RM, Plendl J.** (2005) Pododermal angiogenesis and angioadaptation in the bovine claw. *Microscopic Research Techniques* **66**, 145-155.
- Hirschi K.K., D'Amore P.A.** (1997) Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS* **79**, 419-428.
- Hobbs S.K., Monsky W.L., Yuan F., Roberts W.G., Griffith L., Torchilin W.P., Jain R.K.** (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4607-4612.
- Hölig P., Bach M., Völkel T., Nahde T., Hoffmann S., Müller R., Kontermann R.E.** (2004) Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells. *Protein Engineering, Design and Sciences* **17**, 433-441.
- Hong K., Friend D.S., Glabe C.G., Papahadjopoulos D.** (1983) Liposomes containing colloidal gold are a useful probe of liposome-cell interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* **732**, 320-323.
- Huang S.K., Martin F.J., Jay G., Vogel J., Papahadjopoulos D., Friend D.S.** (1993) Extravasation and transcytosis of liposomes in Kaposi's sarcoma-like dermal lesions of transgenic mice bearing the HIV tat gene. *The American Journal of Pathology* **143**, 10-14.
- Huang S.K., Lee K.D., Hong K., Friend D.S., Papahadjopoulos D.** (1992) Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma-bearing mice. *Cancer Research* **52**, 5135-5143.
- Hui S.W., Stewart T.P., Boni L.T., Yeagle P.L.** (1981) Membrane fusion through point defects in bilayers. *Science*. **212**, 921-923.

- Huong T.M., Harashima H., Kiwada H.** (1998) Complement dependent and independent liposome uptake by peritoneal macrophages: cholesterol content dependency. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **21**, 969-973.
- Huth U., Wieschollek A., Garini Y., Schubert R., Peschka-Süss R.** (2004) Fourier transformed spectral bio-imaging for studying the intracellular fate of liposomes. *Cytometry Part A* **57A**, 10-21.
- Huwylar J., Drewe J., Krähenbühl S.** (2008) Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *International Journal of Nanomedicine* **3**, 21-29.
- Imamura C., Kemura Y., Matsumoto Y., Ueoka R.** (1997) Remarkable inhibitory effects of hybrid liposomes on the growth of HL-60 cells coupled to induction of apoptosis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **20**, 1119-1121.
- Immordino M.L., Dosio F., Cattel L.** (2006): Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*. **1**, 297–315.
- Ingber D.E., Folkman J.** (1989a) Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro. Role of extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology* **109**, 317-330.
- Ingber D.E., Folkman J.** (1989b) How does extracellular matrix control capillary morphogenesis. *Cell* **58**, 803-805.
- Iruela-Arispe M.L., Dvorak H.F.** (1997) Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thrombosis and Haemostasis* **78**, 672-677.
- Iruela-Arispe M.L., Hasselaar P., Sage H.** (1991) Differential expression of extracellular protein is correlated with angiogenesis in vitro. *Laboratory Investigation* **64**, 174-186.
- Jain R.K.** (1988) Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Research* **48**, 2641-2658.
- Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O.** (2002) Kreislaufsystem. In: *Histologie* (Gratzl M., Hrsg.). 5. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 163-187
- Käßmeyer S., Plendl J., Custodis P., Bahramsoltani M.** (2009) New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells *Anatomia Histologia Embryologia* **38**, 1-11.
- Käßmeyer S.** (2006) Identifikation und Charakterisierung endothelialer Stamm- und Progenitorzellen in vitro und in situ. *Dissertationsschrift. Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin.*
- Kalra A.V., Campbell R.B.** (2006) Development of 5-FU and Doxorubicin-loaded cationic liposomes against human pancreatic cancer: implications for tumor vascular targeting. *Pharmaceutical Research* **23**, 2809-2817.
- Kakudo T., Chaki S., Futaki S., Nakase I., Akaji K., Kawakami T., Maruyama K., Kamiya H., Harashima H.** (2004) Transferrin-modified liposomes equipped with pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry* **43**, 5618-5628.

- Kamps J. A. A. M., Morselt H. W. M., Swart P. J., Meijer D. K. F., Scherphof G. L.** (1997) Massive targeting of liposomes, surface-modified with anionized albumins, to hepatic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 11681-11685.
- Karamysheva A.** (2008) Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry* **73**, 751-762.
- Kee, S.H., Cho E.J., Song J.W., Park, K.S., Baek L.J., Song, K.J.** (2004) Effects of endocytosis inhibitory drugs on rubella virus entry into VeroE6 cells. *Microbiology & Immunology* **48**, 823-829.
- Kessner S., Krause A., Rothe U., Bendas G.** (2001) Investigation of cellular uptake of E-selectin-targeted immunoliposomes by activated human endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1514**, 177-190.
- Klagsbrun M., Moses M.A.** (1999) Molecular angiogenesis. *Chemistry & Biology* **6**, R217-R224.
- Koning G.A., Kamps J.A., Scherphof G.L.** (2002) Efficient intracellular delivery of 5-fluorodeoxyuridine into colon cancer cells by targeted immunoliposomes. *Cancer Detection and Prevention* **26**, 299-307.
- Koch A.E.** (1998) Angiogenesis. Implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **41**, 951-962.
- Kostarelos K., Emfietzoglou D., Papakostas A., Yang W.H., Ballangrud A., Sgouros G.** (2004) Binding and interstitial penetration of liposomes with avascular tumor spheroids. *International Journal of Cancer* **112**, 713.
- Krasnici S., Werner A., Eichhorn M.E., Schmitt-Sody M., Pahernik S.A., Sauer B., Schulze B., Teifel M., Michaelis U., Naujoks K., Dellian M.** (2003) Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *International Journal of Cancer* **105**, 561-567.
- Kruger E.A., Duray P.H., Price D.K., Pluda J.M., Figg W.D.** (2001) Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents. *Seminars in Oncology* **28**, 570-576.
- Kruth H.S., Zhang W.-Y., Skarlatos S.I., Chao F.-F.** (1999) Apolipoprotein B stimulates formation of monocyte-macrophage surface-connected compartments and mediates uptake of low density lipoprotein-derived liposomes into these compartments. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 7495-7500.
- Kubota Y., Kleinman H.K., Martin G.R., Lawley T.J.** (1988) Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *The Journal of Cell Biology* **107**, 1589-1598.
- Kumar S., Ghellal A., Li C., Byrne G., Haboubi N., Wang J.M., Bundred N.** (1999) Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Research* **59**, 856-861.
- Kunstfeld R., Wickenhauser G., Michaelis U., Teifel M., Umek W., Naujoks K., Wolff K., Petzelbauer P.** (2003) Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a "humanized" SCID mouse model. *The Journal of Investigative Dermatology* **120**, 476-482.

- Lakkaraju A., Rahman Y.-E., Dubinsky J.M.** (2002) Low-density lipoprotein receptor-related protein mediates the endocytosis of anionic liposomes in neurons. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 15085-15092.
- Langenkamp E., Molema G.** (2009) Microvascular endothelial cell heterogeneity: general concepts and pharmacological consequence for anti-angiogenic therapy of cancer. *Cell Tissue Research* **335**, 205-222.
- Lappalainen K., Miettinen R., Kellokoski J., Jääskeläinen I., Syrjänen S.** (1997) Intracellular distribution of oligonucleotides delivered by cationic liposomes: light and electron microscopic study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **45**, 265-274.
- Larkin J.M., Brown M.S., Goldstein J.L., Anderson R.G.** (1983) Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* **33**, 273-285.
- Lasic D. D.** (1998) Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology* **16**, 307-321.
- Lasic D. D.** (1997) Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. *Journal of Controlled Release* **48**, 203-222.
- Laverman P., Dams E.T.M., Storm G., Hafmans T.G., Croes H.J., Oyen W.J.G., Corstens F.H.M., Boerman O.C.** (2001) Microscopic localization of PEG-liposomes in a rat model of focal infection. *Journal of Controlled Release* **75**, 347-355.
- Laverman P., Boerman O.C., Oyen W.J.G., Dams E.T.M., Storm G., Corstens F.H.M.** (1999) Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **37**, 225-235.
- Le Querrec A., Duval D., Tobelem G.** (1993) Tumor angiogenesis. *Baillière's Clinical Haematology* **6**, 711-730.
- Leamon C.P., Cooper S.R., Hardee G.E.** (2003) Folate-liposome-mediated antisense oligodeoxynucleotide targeting to cancer cells: evaluation in vitro and in vivo. *Bioconjugate Chemistry* **14**, 738-747.
- Lee C.M., Tanaka T., Murai T., Kondo M., Kimura J., Su W., Kitagawa T., Ito T., Matsuda H., Miyasaka M.** (2002) Novel chondroitin sulfate-binding cationic liposomes loaded with cisplatin efficiently suppress the local growth and liver metastasis of tumor cells in vivo. *Cancer Research* **62**, 4282-4288.
- Leupold E., Nikolenko H., Dathe M.** (2009) Apolipoprotein E peptide-modified colloidal carriers: the design determines the mechanism of uptake in vascular endothelial cells. *Biochimica Biophysica Acta* **1788**, 442-449.
- Lewis R.N., McElhaney R.N.** (2000) Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming propensities of lipid bilayer membranes: calorimetric and ³¹P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids. *Biophysical Journal* **79**, 1455-1464.
- Lienau J, Kaletta C, Teifel M, Naujoks K, Bhoola K, Plendl J.** (2005) Morphology and transfection study of human microvascular endothelial cell angiogenesis: an in vitro three-dimensional model. *Biological Chemistry* **386**, 167-175.

- Lienau J. R.** (2003) Etablierung von in vitro-Modellen der Angiogenese muriner und humaner Endothelzellen sowie deren Transfektion mit verschiedenen Plasmidkonstrukten. *Dissertationsschrift. Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin*
- Lin Y., Weisdorf D.J., Solovey A., Hebbel R.P.** (1999) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *The Journal of Clinical Investigation* **105**, 71-77.
- Lières D., Weibel J.-M., Heissler D., Zuber G., Duportail G., Mély Y.** (2004) Dependence of the cellular internalization and transfection efficiency on the structure and physicochemical properties of cationic detergent/DNA/liposomes. *The Journal of Gene Medicine* **6**, 415-428.
- Longo R., Sarmiento R., Fanelli M. Capaccetti B., Battuso D., Gasparini, G.** (2002) Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* **5**, 237-256.
- Lopez-Collazo E., Mateo J., Miras-Portugal M.T., Bosca L.** (1997) Requirement of nitric oxide and calcium mobilization for the induction of apoptosis in adrenal vascular endothelial cells. *FEBS Letters* **413**, 124-128.
- Luft J. H.** (1971) Ruthenium Red and Violet. *The Anatomical Record* **171**, 347-441.
- Luft J. H.** (1966) Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Federation Proceedings* **25**, 1773-1783.
- Lukyanov A.N., Elbayoumi T.A., Chakilam A.R., Torchilin V.P.** (2004) Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody. *Journal of Controlled Release* **100**, 135-144.
- Maeda N., Takeuchi Y., Takada M., Sadzuka Y., Namba Y., Oku N.** (2004) Anti-neovascular therapy by use of tumor neovascular-targeted long-circulating liposome. *Journal of Controlled Release* **100**, 41-52.
- Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K.** (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* **65**, 271-284.
- Majno G.** (1998) Chronic inflammation. Links with angiogenesis and wound healing. *American Journal of Pathology* **153**, 1035-1039.
- Manosroi A., Thathang K., Werner R.G., Schubert R., Peschka-Süss R., Mansroi J.** (2008) Development of highly stable and low toxic cationic liposomes for gene therapy. *Arzneimittel-Forschung* **58**, 485-492.
- Maruyama K., Ishida O., Takizawa T., Moribe K.** (1999) Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **40**, 89-102.
- Mastrobattista E., Koning G.A., Storm G.** (1999a) Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **40**, 103-127.
- Mastrobattista E., Storm G., van Bloois L., Reszka R., Bloemen P.G.M., Crommelin D.J.A., Henricks P.A.J.** (1999b) Cellular uptake of liposomes targeted to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on bronchial epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1419**, 353-363.

- Matsui H., Johnson L.G., Randell S.H., Boucher R.C.** (1997) Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 1117-1126.
- Matsumoto M., Nishinakagawa H., Kurohmaru M., Hayashi Y., Otsuka J.** (1992) Pregnancy and lactation affect the microvasculature of the mammary gland in mice. *The Journal of Veterinary Medical Science* **54**, 937-943.
- McDonald D.M., Foss A.J.** (2000) Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent. *Cancer Metastasis Reviews* **19**, 109-120.
- McLean J.W., Fox E.A., Baluk P., Bolton P.B., Haskell A., Pearlman R., Thurston G., Umemoto E.Y., McDonald D.M.** (1997) Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice. *The American Journal of Physiology* **273**, H387-H404.
- Mecklenburg L., Tobin D.J., Müller-Röver S., Handjiski B., Wendt G., Peters E.M.J., Pohl S., Paus R.** (2000) Active Hair growth (anagen) is associated with angiogenesis. *The Journal of Investigative Dermatology* **114**, 909-916.
- Medina O.P. Zhu Y., Kairemo K.** (2004) Targeted liposomal drug delivery in cancer. *Current Pharmaceutical Design* **10**, 2981-2989.
- Meng K.** (2002) Untersuchungen zur Transfektion angiogener Endothelzellen. *Dissertationsschrift. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.*
- Meyer G.T., Matthias L.J., Noack L., Vadas M.A., Gamble J.R.** (1997) Lumen formation during angiogenesis in vitro involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death and capillary tube remodelling by different populations of endothelial cells. *The Anatomical Record* **249**, 327-340.
- Miller C.R., Bondurant B., McLean S.D., McGovern K.A., O'Brien D.F.** (1998) Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* **37**, 12875-12883.
- Mineo C., Anderson R.G.W.** (2001) Potocytosis. *Histochemistry and Cell Biology* **116**, 109-118.
- Minshall R.D., Tirrupathi C., Vogel S.M., Malik A.B.** (2002) Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochemistry and Cell Biology* **117**, 105-112.
- Miyano-Kurosaki N., Barnor J.S., Takeuchi H., Owada T., Nakashima H., Yamamoto n., Matsuzaki T., Shimada F., Takaku H.** (2004) In vitro and in vivo transport and delivery of phosphorothioate oligonucleotides with cationic liposomes. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **15**, 93-100.
- Modlich U., Kaup F.J., Augustin H.G.** (1996) Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial detachment and vessel occlusion. *Laboratory Investigation* **74**, 771-780.
- Mulivor A.W., Lipowsky H.H.** (2004) Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology* **286**, H1672-H1680.

- Mulivor A.W., Lipowsky H.H.** (2002) Role of glycocalyx in leukocyte-cell adhesion. *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology* **283**, H1282-H1291.
- Murasawa S., Asahara T.** (2005) Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)* **20**, 36-42.
- Muzykantow V.R.** (2001) Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *Journal of Controlled Release* **71**, 1-21.
- Nagata S., Nagase H., Kawane K., Mukae N., Fukuyama H.** (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **10**, 108-116.
- Nagayase A., Uchiyama K., Kiwada H.** (1999) The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **40**, 75-87.
- Nakamura M., Yamaguchi S., Watanabe Y., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M.** (2004) Exogenous expression of interferon-beta in cultured brain microvessel endothelial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **27**, 1441-1443.
- Nakanishi M., Noguchi A.** (2001) Confocal and probe microscopy to study gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative. *Advanced Drug Delivery Reviews* **52**, 197-207.
- Nallamothu R., Wood G., Pattillo C., Scott R., Kiani M., Moore B., Thoma L.** (2006) A tumor vasculature targeted liposome delivery system for combretastatin A4: design, characterization, and in vitro evaluation. *AAPS PharmSciTech.* **7**, E1-E10.
- Narang A.S., Thoma L., Miller D.D., Mahato R.I.** (2005) Cationic lipids with increased DNA binding affinity for nonviral gene transfer in dividing and nondividing cells. *Bioconjugate Chemistry* **16**, 156-168.
- Nir S., Nieva L.** (2003) Uptake of liposomes by cells: experimental procedures and modeling. *Methods in Enzymology* **372**, 235-248.
- Nobs L., Buchegger F., Gurny R., Allémann E.** (2004) Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **93**, 1981-1992.
- Oku N.** (1999) Anticancer therapy using glucuronate modified long-circulating liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **40**, 63-73.
- Owen D.J.** (2004) Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle function. *Biochemical Society Transactions* **32**, 1-14.
- Owen, G.R., Meredith D.O., Ap Gwynn I., Richards R.G.** (2001) Enhancement of immunogold-labelled focal adhesion sites in fibroblasts cultured on metal substrate: problems and solutions. *Cell Biology International* **25**, 1251-1259.
- Pahakis M.Y., Kosky J.R., Dull R.O., Tarbell J.M.** (2007) The Role of Endothelial Glycocalyx Components in Mechanotransduction of Fluid Shear Stress. *Biochemica Biophysica Research Communications* **355**, 228-233.
- Paku S.** (1998) Current concepts of tumor-induced angiogenesis. *Pathology Oncology Research* **4**, 62-75.

- Palade G.E.** (1953) Fine structure of blood capillaries. *Journal of Applied Science* **24**, 1424.
- Pang R.W.C, Poon R.T.P.** (2006) Clinical Implications of Angiogenesis in Cancers. *Vascular Health Risk Management*. **2**, 97–108.
- Papadimitriou E., Antimisiaris S.G.** (2000) Interactions of PC/Chol and PS/Chol liposomes with human cells in vitro. *Journal of Drug Targeting* **8**, 335-351.
- Papahadjopoulos D., Allen T.M., Gabizon A., Mayhew E., Matthey K., Huang S.K., Lee K.-D., Woodle M.C., Lasic D.D., Redemann C., Martin F.J.** (1991) Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 11460-11464.
- Pastorini F., Brignole C., Marimpietri D., Cilli M., Gambini C., Ribatti D., Longhi R., Allen T.M., Corti A., Ponzoni M.** (2003a) Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy. *Cancer Research* **63**, 7400-7409.
- Pastorini F., Brignole C., Marimpietri D., Pagnan G., Morando A., Ribatti D., Semple S.C., Gambini C., Allen T.M., Ponzoni M.** (2003b) Targeted liposomal c-myc antisense oligodeoxynucleotides induce apoptosis and inhibit tumor growth and metastases in human melanoma models. *Clinical Cancer Research* **9**, 4595-4605.
- Patan S.** (2004) Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treatment and Research* **117**, 3-32.
- Patan S., Haenni B., Burri P.H.** (1993) Evidence for intussusceptive growth in the chicken chorio-allantoic membrane (CAM). *Anatomie Embryologie* **187**, 121-130.
- Patan S., Alvarez M.J., Schittny J.C., Burri P.H.** (1992) Intussusceptive microvascular growth: a common alternative to capillary sprouting. *Archives of Histology and Cytology* **55 Supplement**, 65-75.
- Pedroso de Lima M.C., Simoes S., Pires P., Faneca H., Düzgünes N.** (2001) Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **47**, 277-294.
- Peer D., Margalit R.** (2004) Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models. *Neoplasia* **6**, 343-353.
- Pepper M.S.** (1997) Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **17**, 605-619.
- Perry D.G., Wisniowski P., Daugherty G.L., Downing J., Martin W.J.** (1997) Nonimmune phagocytosis of liposomes by rat alveolar macrophages is enhanced by vitronectin and is vitronectin-receptor mediated. *American Journal of Cell Molecular Biology* **17**, 462-470.
- Peters K., Troyer D., Kummer S., Kirkpatrick C.J., Rauterberg J.** (2002) Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro. *Microvascular Research* **64**, 334-338.
- Petre C.E., Dittmer D.P.** (2007) Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma. *International Journal of Nanomedicine*. **2**, 277–288.

- Pinedo H.M., Verheul H.M., D'Ámato R.J., Folkman J.** (1998) Involvement of platelets in tumor angiogenesis? *Lancet* **352**, 1775-1777.
- Pintucci G., Bikfalvi A., Klein S., Rifkin D.B.** (1996) Angiogenesis and the fibrinolytic system. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **22**, 517-524.
- Plendl J., Hirschberg R.M., Hünigen H.** (2002a) Mechanismen der vaskulären Entwicklung und Regression. Eine aktuelle Übersicht. *Tierärztliche Praxis* **30**, 243-253.
- Plendl J., Gilligan B.R., Wang S.-J., Lewis R., Shinnars B., Vandebroek K., Auerbach R.** (2002b) Primitive endothelial cell lines derived from the porcine embryonic yolk sac. *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal* **38**, 334-342.
- Plendl J.** (2000) Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anatomia Histologia Embryologia* **29**, 257-266.
- Plendl J., Snyman C., Naidoo S., Sawant S., Mahabeer R., Bhoola K.D.** (2000) Expression of tissue kallikrein and kinin receptors in angiogenic microvascular endothelial cells. *Biological Chemistry* **381**, 1103-1115.
- Plendl J., Sinowatz F.** (1999) Angiogenese und Antiangiogenese: neue therapeutische Strategien. *Tierärztliche Praxis* **27**, 348-353.
- Plendl J., Neumüller C., Vollmar A., Auerbach R., Sinowatz F.** (1996b) Isolation and characterization of endothelial cells from different organs of fetal pigs. *Anatomy and Embryology* **194**, 445-456.
- Plendl J., Neumüller C., Sinowatz F.** (1996a) Differences of microvascular endothelium in the bovine corpus luteum of pregnancy and the corpus luteum of the estrous cycle. *Biology of the Cell* **87**, 179-188.
- Plendl J., Sinowatz F., Auerbach R.** (1995) A transformed murine endothelial cell clone: characterization of cells in vitro and of tumours derived from the clone in situ. *Virchows Archives* **426**, 619-628.
- Plendl J., Sinowatz F., Auerbach R.** (1992) Die Heterogenität des vaskulären Endothels. *Anatomia Histologia Embryologia* **21**, 256-262.
- Polverini P.J.** (1995) The pathophysiology of angiogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **6**, 230-247.
- Pries A.R., Kuebler W.M.** (2006) Normal endothelium. *Handbook of experimental pharmacology* **176**, 1-40.
- Pries A.R., Secomb T.W., Gaethgens P.** (2000) The endothelial surface layer. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology* **440**, 653-666.
- Pries A.R., Secomb T.W., Jabobs H., Sperandio M., Osterloh K., Gaehtgens P.** (1997) Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. *The American Journal of Physiology* **273**, H2272-H2279.
- Rafi S.** (2000) Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *The Journal of Clinical Investigation* **105**, 17-19.
- Reitsma S., Slaaf D.W., Vink H., van Zandvoort M.A.M.J., oude Egbrink M.G.A.** (2007) The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pfluegers Archive* **454**, 345-359.

- Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D.** (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical Journal* **377**, 159-169.
- Ribatti D., Vacca A., Dammacco F.** (2003) New non-angiogenesis dependent pathway for tumour growth. *European Journal of Cancer* **39**, 1835-1841.
- Ribatti D., Vacca A., Nico B., Roncali L., Dammacco F.** (2001) Postnatal vasculogenesis. *Mechanisms of Development* **100**, 157-163.
- Risau W.** (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674.
- Risau W., Flamme I.** (1995) Vasculogenesis. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology* **11**, 73-91.
- Robenek M.J., Severs N.J., Schlattmann K., Plenz G., Zimmer K.-P., Troyer D., Robenek H.** (2004) Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB Journal* **18**, 866-868.
- Rostgaard J., Qvortrup K.** (1997) Electron microscopic demonstration of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvascular Research* **53**, 1-13.
- Rückert P., Bates S.R., Fisher A.B.** (2003) Role of clathrin- and actin-dependent endocytotic pathways in lung phospholipid uptake. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **284**, L981-L989.
- Rumpold H., Wolf D., Koeck R., Gunsilius E.** (2004) Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **8**, 509-518.
- Ruponen M., Honkakoski P., Tammi M., Urtti A.** (2004) Cell-surface glycosaminoglycans inhibit cation-mediated gene transfer. *The Journal of Gene Medicine* **6**, 405-414.
- Sacco M.G., Caniatti M., Cató E.M., Frattini A., Chiesa G., Ceruti R., Adorni F., Zecca L., Scanziani E., Vezzoni P.** (2000) Liposome-delivered angiostatin strongly inhibits tumor growth and metastatization in a transgenic model of spontaneous breast cancer. *Cancer Research* **60**, 2660-2665.
- Sætern A.M., Brandl M., Bakkelund W.H., Sveinbjørnsson B.** (2004) Cytotoxic effect of different camptothecin formulations on human colon carcinoma in vitro. *Anti-Cancer Drugs* **15**, 899-906.
- Sakuda H., Nakashima Y., Kuriyama S., Sueishi K.** (1992) Media conditioned by smooth muscle cells cultured in a variety of hypoxic environments stimulates in vitro angiogenesis. A relationship to transforming growth factor-beta 1. *American Journal of Pathology* **141**, 1507-1516.
- Sala R., Jefferies W.A., Walker B., Yang J., Tiong J., Law S.K., Carlevaro M.F., Di Marco E., Vacca A., Cancedda R., Cancedda F.D., Ribatti D.** (2002) The human melanoma associated protein melanotransferrin promotes endothelial cell migration and angiogenesis in vivo. *European Journal of Cell Biology* **81**, 599-607.
- Saraste A.** (1999) Morphological criteria and detection of apoptosis. *Herz* **24**, 189-195.
- Sariola H.** (1985) Interspecies chimeras: an experimental approach for studies on embryogenic angiogenesis. *Medical Biology* **63**, 43-65.

- Sawada H., Esaki M.** (2000) A practical technique to postfix nanogold-immunolabelled specimens with osmium and to embed them in Epon for electron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **48**, 493-498.
- Schott R.J., Morrow L.A.** (1993) Growth factors and angiogenesis. *Cardiovascular Research* **27**, 1155-1161.
- Schuster S.** (2002) Zelluläre und molekulare Mechanismen der in vitro-Angiogenese: Lichtmikroskopische, elektronenmikroskopische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen. *Dissertationsschrift. Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin.*
- Scieszka J.F., Maggiora L.L., Wright S.D., Cho M.J.** (1991) Role of complements C3 and C5 in the phagocytosis of liposomes by human neutrophils. *Pharmaceutical Research* **8**, 65-69.
- Scott B.L., Van Komen J.S., Liu S., Weber T., Melia T.J., McNew J.A.** (2003) Liposome fusion assay to monitor intracellular membrane fusion machines. *Methods in Enzymology* **372**, 274-300 .
- Secomb T.W., Hsu R., Pries A.R.** (1998) A model for red blood cell motion in glycocalyx-lined capillaries. *The American Journal of Physiology* **274**, H1016-H1022.
- Segura I., Serrano A., De Buitrago G.G., Gonzalez M.A., Abad J.L. Claveria C., Gomez L., Bernad A., Martinez-A. C., Riese H.H.** (2002) Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis. *FASEB Journal* **16**, 833-841.
- Senior J.H., Trimble K.R., Maskiewicz R.** (1991) Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo. *Biochimica Biophysica Acta* **18**, 173-179.
- Sessa G., Weissmann G.** (1968) Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research* **9**, 310-318.
- Shing Y., Folkman J., Haudenschild C., Lund D., Crum R., Klagsbrun M.** (1985) Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial growth factor. *Journal of Cell Biology* **29**, 275-287.
- Siemann D.W., Bibby M.C., Dark G.G., Dicker A.P., Eskens F.A., Horsman M.R., Marme D., Lorusso P.M.** (2005) Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. *Clinical Cancer Research* **11**, 416-420.
- Simberg D., Weisman S., Talmon Y., Faerman A., Shoshani T., Barenholz Y.** (2003) The role of organ vascularization and lipoplex-serum initial contact in intravenous murine lipofection. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 39858-39865.
- Sims D.E., Horne M.M.** (1993) Non-aqueous fixative preserves macromolecules on the endothelial cell surface: an in situ study. *European Journal of Morphology* **31**, 251-255.
- Sinowatz F.** (2000) Die Zelle. In: *Histologie*. 3. Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, S. 35-93.
- Skalak T.C., Price R.J.** (1996) The role of mechanical stress in microvascular remodelling. *Microcirculation* **3**, 143-165.

- Smisterová J., Wagenaar A., Stuart M.C., Polushkin E., ten Brinke G., Hulst R., Engberts J.B., Hoekstra D.** (2001) Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 47615-47622.
- Spector A.A., Yorek M.A.** (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of Lipid Research* **26**, 1015-1035.
- Spragg D.D., Alford D.R., Greferath R., Larsen C.E., Lee K.-D., Gurtner G.C., Cybulsky M.I., Tosi P.F., Nicolau C., Gimbrone M.A.** (1997) Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: a strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 8795-8800.
- Squire J.M., Chew M., Nneji G., Neal C., Barry J., Michel C.** (2001) Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering? *Journal of Structural Biology* **136**, 239-255.
- Stace T.M., Damiano E.R.** (2001) An electrochemical model of the transport of charged molecules through the capillary glycocalyx. *Biophysical Journal* **80**, 1670-1690.
- Stan R.-V.** (2002) Structure and function of endothelial caveolae. *Microscopy Research and Technique* **57**, 350-364.
- Staton C., Reed M., Brown N.** (2009) A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology* **90**, 195-221.
- Stefanec T.** (2000) Endothelial apoptosis. Could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* **117**, 841-854.
- Stone W.L., Smith M.** (2004) Therapeutic uses of antioxidant liposomes. *Molecular Biotechnology* **27**, 217-230.
- Stover T., Kester M.** (2003) Liposomal delivery enhances short-chain ceramide-induced apoptosis of breast cancer cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **307**, 468-475.
- Straubinger R.M., Papahadjopoulos D., Hong K.** (1990) Endocytosis and intracellular fate of liposomes using pyranine as a probe. *Biochemistry* **29**, 4929-4939.
- Strieth S., Eichhorn M.E., Sauer B., Schulze B., Teifel M., Michaelis U., Dellian M.** (2004) Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *International Journal of Cancer* **110**, 117-124.
- Sun B., Zhang S., Zhao X., Zhang W., Hao X.** (2004) Vasculogenic mimicry is associated with poor survival in patients with mesothelial sarcomas and alveolar rhabdomyosarcomas. *International Journal of Oncology* **25**, 1609-1614.
- Swanson T.M., Baer S.C.** (1995) Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends in Cellular Biology* **5**, 89-92.
- Takano S., Aramaki Y., Tsuchiya S.** (2003) Physicochemical properties of liposomes affecting apoptosis induced by cationic liposomes in macrophages. *Pharmaceutical Research* **20**, 962-967.

- Takano S., Aramaki Y. Tsuchiya S.** (2001) Lipoxygenase may be involved in cationic liposome-induced macrophage apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**, 116-120.
- Tandia B.-M., Lonez C., Vandenbranden M., Ruyschaert J.-M., El Ouahabi A.** (2005) Lipid mixing between lipoplexes and plasma lipoproteins is a major barrier for intravenous transfection mediated by cationic lipids. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 12255-12261.
- Tarbell J.M., Ebong E.E.** (2008) The endothelial glycocalyx: a mechano-sensor and – transducer. *Science Signaling* **1**, pt8.
- Teifel M., Friedl P.** (1995) New lipid mixture for efficient lipid-mediated transfection of BHK cells. *BioTechniques* **19**, 79-82.
- Thurston G., McLean J.W., Rizen M., Baluk P., Haskell A., Murphy T.J., Hanahan D., McDonald D.M.** (1998) Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *Journal of Clinical Investigation* **28**, 1401-1413.
- Tomanek R.J., Schatteman G.C.** (2000) Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *The Anatomical Record* **261**, 126-135.
- Tontsch U., Bauer H.-C.** (1991) Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Research* **539**, 247-253.
- Torchilin V.P.** (2005) Fluorescence microscopy to follow the targeting of liposomes and micelles to cells and their intracellular fate. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 95-109.
- Tuszynski G.P., Sharma M.R., Rothman V.L., Sharma M.C.** (2002) Angiostatin binds to tyrosine kinase substrate annexin II through the lysin-binding domain in endothelial cells. *Microvascular Research* **64**, 448-462.
- Ulrich-Merzenich G., Metzner C., Schiermeyer B., Vetter H.** (2002) Vitamin C and vitamin E antagonistically modulate human vascular endothelial and smooth muscle cell DNA synthesis and proliferation. *European Journal of Nutrition* **41**, 27-34.
- Unger E.F., Banai S., Shou M., Lazarous D.F., Jaklitsch M.T., Scheinowitz M., Correa R., Klingbeil C., Epstein S.E.** (1994) Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *American Journal of Physiology* **266**, H1588-H1595.
- Vailhé B., Vittet D., Feige J.-J.** (2001) In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Laboratory Investigation* **81**, 439-452.
- van den Berg B.M., Vink H., Spaan J.A.E.** (2003) The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circulation Research* **92**, 592-594.
- van Cruchten, S., van den Broeck, W.** (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia Histologia Embryologia* **31**, 214-223.
- van Groningen J.P., Wenink A.C., Testers L.H.** (1991) Myocardial capillaries: increase in number by splitting of existing vessels. *Anatomy and Embryology* **184**, 65-70.
- van Kempen L.C., Leenders W.P.** (2006) Tumours can adapt to anti-angiogenic therapy depending on the stromal context: lessons from endothelial cell biology. *European Journal of Cell Biology* **85**, 61-68.

- Vélazquez O.C., Snyder R., Liu Z.-J., Fairman R.** (2002) Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *FASEB Journal* **10**, 1316-1318.
- Vermette P., Griessner H.J., Kambouris P., Meagher L.** (2004) Characterization of surface-immobilized layers of intact liposomes. *Biomacromolecules* **5**, 1496-1502.
- Vink H., Duling B.R.** (2000) Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology* **278**, H285-H289.
- Vink H., Duling B.R.** (1996) Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leucocytes within mammalian capillaries. *Circulation Research* **79**, 581-589.
- Voigt H., Guillén N.** (1999) New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology* **1**, 195-203.
- Voinea M., Dragomir E., Manduteanu I., Simionescu M.** (2002) Binding and uptake of transferrin-bound liposomes targeted to transferrin receptors of endothelial cells. *Vascular Pharmacology* **39**, 13-20.
- Wagner D.D.** (1993) The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thrombosis and Haemostasis* **70**, 105-110.
- Wasungu L., Scarzello M., van Dam G., Molema G., Wagenaar A., Engberts J.B., Hoekstra D.** (2006) Transfection mediated by pH-sensitive sugar-based Gemini surfactants; potential for in vivo applications. *Journal of Molecular Medicine* **84**, 774-784.
- Weinbaum S., Zhang X., Han Y., Vink H., Cowin S.C.** (2003) Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7988-7995.
- Welt K., Schippel K., Mironov V.A., Mironov A.A., Alimov G.A., Bobrik I.I., Banin V.V., Karaganov J.L.** (1990) Vascular endothelium (review). I. General morphology. 2A: histogenesis of the vascular endothelium. *Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch* **136**, 163-199.
- Wroebel I., Collins D.** (1995) Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1235**, 296-304.
- Wu J., Lee A., Lu Y., Lee R.J.** (2007) Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* **337**, 329-335.
- Wu J., Liu L., Yen R.D., Catana A., Nantz M.H., Zern M.A.** (2004) Liposome-mediated extracellular superoxide dismutase gene delivery protects against acute liver injury in mice. *Hepatology* **40**, 195-204.
- Xu Y., Szoka F.C.** (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **35**, 5616-5623.
- Yatsumoto S., Aramaki Y., Kakiuchi T., Tsuchiya S.** (2004) Induction of antigen-dependent interleukin-12 production by negatively charged liposomes encapsulating antigens. *Vaccine* **22**, 3503-3509.

- Yethon J.A., Epand R.F., Leber B., Epand R.M., Andrews D.W.** (2003) Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 48935-48941.
- Yoon Y.S., Johnson I.A., Park J.S., Diaz L., Losordo D.W.** (2004) Therapeutic myocardial angiogenesis with vascular endothelial growth factors. *Molecular and Cellular Biochemistry* **264**, 63-74.
- Zabner J.** (1997) Cationic lipids used in gene transfer. *Advanced Drug Delivery Review*. **27**, 17-28.
- Zabner J., Fasbender A.J., Moninger T., Poellinger K.A., Welsh M.J.** (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 18997-19007.
- Zelphati O., Szoka F.C. Jr.** (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 11493-11498.
- Zho F., Neutra M.R.** (2002) Antigen delivery to mucosa-associated lymphoid tissues using liposomes as a carrier. *Bioscience Reports* **22**, 355-369.
- Zhou R., Mazurchuk R., Straubinger R.M.** (2002) Antivascular effects of doxorubicin-containing liposomes in an intracranial rat brain tumor model. *Cancer Research* **62**, 2561-2566.
- Zhou W., Yuan X., Wilson A., Yang L., Mokotoff M., Pitt B., Li S.** (2002) Efficient intracellular delivery of oligonucleotides formulated in folate-receptor-targeted lipid vesicles. *Bioconjugate Chemistry* **13**, 1220-1225.
- Zimmerberg J., Chernomordik L.V.** (1999) Membrane fusion. *Advanced Drug Delivery Reviews* **38**, 197-205.
- Zipper J., Sarrach D., Halle W.** (1988) Wechselwirkung von Liposomen mit Gefäßendothelzellen. *Biomedica Biochimica Acta* **7**, 713-719.
- Zoellner H., Höfler M., Beckmann R., Hufnagl P., Vanjek E., Bielek E., Wojta J., Fabry A., Lockie S., Binder B.R.** (1996) Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells. *Journal of Cell Science* **109**, 2571-2580.
- Zuhorn I.S., Hoekstra D.** (2002) On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: is that the question? *The Journal of Membrane Biology* **189**, 167-179.
- Zuhorn I.S., Kalichran R., Hoekstra D.** (2002a) Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 18021-18028.
- Zuhorn I.S., Oberle V., Visser W.H., Engberts J.B.F.N., Bakowsky U., Polushkin E., Hoekstra D.** (2002b) Phase behaviour of cationic amphiphiles and their mixture with helper lipid influences lipoplex shape, DNA translocation, and transfection efficiency. *Biophysical Journal* **83**, 2096-108.
- Zuhorn I.S., Visser W.H., Bakowsky U., Engberts J.B., Hoekstra D.** (2002c) Interference of serum with lipoplex-cell interaction: modulation of intracellular processing. *Biochimica et Biophysica Acta* **1560**, 25-36.

Publikationsverzeichnis

Hansen S, Bahramsoltani M, Plendl J (2007) Differences in the glycocalix of human, bovine and murine endothelial cells. *3rd Glycan Forum*. Berlin, 22.2.-23.2.2007

Hansen S, Bahramsoltani M, Plendl J (2006) Die Glykokalix boviner Endothelzellen: Mögliche Konsequenzen für den Einsatz kationischer Liposomen. *6. Berlin-Brandenburgischer Rindertag*. Berlin, 5.-7.10.2006, *6. Berlin-Brandenburgischer Rindertag, Berlin: Mensch & Buch Verlag*, S. 242-244

Hansen S, Bahramsoltani M, Plendl J (2006) Species-specific uptake of cationic liposomes by endothelial cells. *101st Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft*. Freiburg, 7.-10.4.2006

Hansen S, Bahramsoltani M, Plendl J (2005) Binding and uptake of cationic liposomes by proliferating microvascular endothelial cells. *Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., Jahrestagung 2005*. Rostock, 15.-17.9.2005, *Journal of Vascular Research*, S. 50-51

Hansen S, Teifel M, Plendl J (2004) The glycocalix of human, bovine and murine endothelial cells. *Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie e. V.* Berlin, 7.-10.10.2004, *Journal of Vascular Research* **41**, 59

Hansen S, Brunner C, Plendl J (2003) Uptake of cationic gold-labelled liposomes by microvascular endothelial cells in vitro. *Annual Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology*. München, 16.-18.10.2003, *Journal of Vascular Research* **41**, 104

Hansen S, Brunner C, Plendl J (2003) Uptake of cationic liposomes by murine endothelial cells in vitro. *4th Symposium on the biology of endothelial cells*. München, 18.-20.7.2003

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. J. Plendl für die freundliche Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Hilfestellung während der Forschungstätigkeit und Ihre nahezu grenzenlose Geduld bei der Betreuung meiner Arbeit.

Bei Frau M. Sachtleben möchte ich mich für die Unterstützung während der gesamten Zeit und besonders für die ausgezeichnete Einarbeitung und Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen bedanken.

Frau K. Schütz danke ich für die Hilfe bei der Durchführung fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen zur Apoptose. Auch Frau Dr. H. Hünigen danke ich ganz herzlich für ihre Hilfestellung zu den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und die Anregungen, die ich in Ihrem Arbeitszimmer am Mikroskop sammeln durfte.

Frau Dr. G. Arndt und insbesondere Herrn F. Lotz und vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung möchte ich für die fachliche Beratung bei der statistischen Auswertung danken.

Ich danke allen Mitdoktoranden, insbesondere meiner Zimmerkollegin Frau Dr. Sabine Käßmeyer, die mir bei der Einarbeitung in die Zellkultur behilflich war und mich aus so manchem Motivationstief herausgeholt hat.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die mich mein ganzes Leben lang stets liebevoll unterstützt haben. Allergrößter Dank gilt meinem Mann Kai Backhaus, der mich durch seine stetige Motivation zum Abschluss der Dissertation getrieben und mit stets unendlicher Geduld alle meine Stimmungsschwankungen ertragen hat.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Oberhausen, den 14.09.2009

.....

Sophie Hansen