

Untersuchung von Saponinen als neuartige Verstärker der Transfektion

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Simko Sama

aus Muş

2018

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.04.2015 bis zum 28.03.2018 unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Melzig

2. Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Fuchs

Disputation am 06.06.2018

*Für Dilava*

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1. Einleitung .....	1
1.1. Saponine .....	1
1.2. RIPs .....	3
1.3. <i>Saponaria officinalis L., Gypsophila paniculata L. und Gypsophila elegans M.Bieb.</i> .....	4
1.4. Zytotoxizität und antitumorale Wirkung .....	6
1.5. Untersuchung und Gewinnung wirksamer Saponine .....	7
1.6. Transfektion .....	9
1.7. Zielsetzung .....	12
2. Materialien und Methoden .....	13
2.1. Materialien .....	13
2.1.1. Geräte .....	13
2.1.2. Software .....	15
2.1.3. Verbrauchsmaterialien .....	15
2.1.4. Chemikalien .....	16
2.1.5. Zelllinien .....	20
2.2. Methoden .....	21
2.2.1. Plasmid-Klonierung .....	21
2.2.2. Saponinisolierung .....	32
2.2.3. Liposomenherstellung .....	35
2.2.4. Nanoplexcharakterisierung .....	35
2.2.4.1. Nanoplexformulierung .....	36
2.2.4.2. Zetapotential & Partikelgröße .....	37
2.2.4.3. Elektronenmikroskop .....	38
2.2.5. MTT-Assay .....	39
2.2.6. Lumineszenz Assay .....	42
2.2.7. Fluoreszenz-Assays .....	43
2.2.7.2. Fluoreszenzmikroskop .....	49
2.2.8. Zytotoxizitäts –Assays .....	50
2.2.8.2.1. Saponin-Permeabilitätsassay .....	51

2.2.8.2.2.	GFP-Toxizitätstests.....	51
2.2.8.2.3.	Saporin/Dianthin-Saponin-Toxizitätstests .....	52
2.2.9.	<i>In-vivo</i> -Studie.....	52
2.2.10.	Statistische Methoden.....	55
3.	Ergebnisse .....	56
3.1.	Plasmid-Klonierung.....	56
3.1.1.	Insert-Amplifizierung.....	56
3.1.2.	pJET-Vektor-Ligation und Amplifizierung.....	57
3.1.3.	Restriktionsverdau - Vektor und Insert .....	58
3.1.4.	Ligation – Vektor und Insert.....	60
3.1.5.	Probe-Verdau der Klonierungsprodukte.....	60
3.1.6.	Sequenzierung.....	61
3.2.	Isolation und Strukturaufklärung von SO1861 und GE1741 .....	63
3.3.	Nanoplexcharakterisierung .....	67
3.3.1.	Größenverteilung und Zetapotential der Nanoplex-Partikel.....	67
3.3.2.	Elektronenmikroskopische Aufnahme von PD-Partikeln .....	68
3.3.3.	Stabilitäts- und Integritätseinflüsse von SO1861 auf Nanoplexe .....	70
3.4.	Bestimmungen zum Zellversuch.....	73
3.4.1.	Bestimmung der Zellzahlen .....	73
3.4.2.	Bestimmung der Saponin-Arbeitskonzentrationen .....	74
3.5.	Lumineszenz-Assay .....	75
3.6.	Fluoreszenz-Assays .....	76
3.6.1.	Transfektionseffizienz .....	76
3.6.2.	Mikroskopische Aufnahmen .....	92
3.7.	Zytotoxizitätsassays .....	96
3.7.1.	MTT-Assay .....	96
3.7.2.	Impedanzmessungen .....	97
3.8.	Tierversuch .....	108
3.8.1.	Initiale Qualitäts-Tests.....	108
3.8.2.	Eigentoxizität der Behandlung .....	110
3.8.3.	Therapieergebnisse .....	112

4. Diskussion .....	117
4.1. Hintergrund .....	117
4.2. Nanoplexe als stabile Nukleinsäure-Vehikel .....	117
4.3. Isolation und Charakterisierung neuartiger Transfektionsverstärker .....	119
4.4. Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung .....	120
4.5. Universelle Transfektionsverstärkung .....	124
4.6. Saponine als Mediator des endosomalen Release .....	127
4.7. Rolle in der anti-tumoralen Gen-Therapie .....	131
5. Zusammenfassung.....	136
6. Summary .....	138
Quellen .....	140
Abbildungsverzeichnis.....	147
Tabellenverzeichnis .....	150
Anhang .....	151
Publikationsverzeichnis .....	155
Artikel in Fachzeitschriften .....	155
Wissenschaftliche Poster .....	155
Vorträge .....	156
Patente .....	156
Stipendien .....	156
Lebenslauf .....	157
Danksagung .....	157
Eidesstattliche Erklärung.....	161

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
Ex	Exzitation
Em	Emission
FBS	Fötale bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde/n
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
IntDen	Integrierte Dichte ( <i>integrated density</i> )
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
LC	Flüssigchromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
kDa	Kilodalton
min	Minute/n
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
p	Druck ( <i>pressure</i> )
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Polydispersitätsindex
MS	Massenspektroskopie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
rpm	Runden pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
s.c.	subkutan
s	Sekunde/n
RT	Raumtemperatur
Rt	Retentionszeit ( <i>retention time</i> )
TFA	Trifluoressigsäure ( <i>trifluoroacetic acid</i> )
V	Volt

# 1. Einleitung

## 1.1. Saponine

Jeder auf der Welt lebende Mikroorganismus, jedes Tier, jeder Mensch und jede Pflanze verfügt zur Vegetation über einen Primärstoffwechsel zur Erhaltung und zur Vermehrung des Lebens. Betrachtet und vergleicht man diesen zwischen den vielfältigen und verschiedenen Lebewesen, so entdeckt man einen großen Anteil an Übereinstimmung derjenigen Vorgänge und Reaktionen, die zum Erhalt und zur Vermehrung des Lebens obligatorisch sind. Darüber hinaus laufen in jedem Organismus zusätzlich weitere Stoffwechselforgänge ab, die sie markant und von anderen Spezies unterscheidbar machen. Dieser Stoffwechsel wird als Sekundärstoffwechsel bezeichnet [1]. Während der Sekundärstoffwechsel für das Wachstum und die Fortpflanzung keine Rolle spielt, ist sie für den Erhalt der Art selbst ein immens wichtiger Faktor. Produkte des Sekundärstoffwechsels dienen – bezogen auf Pflanzen – beispielsweise dem Schutz vor Fraßfeinden, Pathogenen und der Umwelt oder auch dem Anlocken von Insekten durch Farbe, Geruch und Aroma. Eine Gruppe dieser pflanzlichen Sekundärstoffe sind die Saponine. Der Name der Saponine leitet sich aus dem lateinischen Wort *sapo* (Seife) ab und weist auf die in wässrigen Lösungen seifenartige Schaumbildung hin [2]. Diese Eigenschaft lässt sich auf den amphiphilen Charakter der Saponinmoleküle zurückführen, die einen polaren und einen unpolaren Teil besitzen. Bei dieser Sekundärstoffgruppe handelt es sich um Glykoside, einer Verbindung aus einem Alkohol mit einem Zucker. Das Grundgerüst bildet ein Triterpen- oder Steroidkörper (Aglykon), welcher auch als Sapogenin bezeichnet wird. Sowohl Triterpen- als auch Steroidsaponinaglyka entstammen aus einem aus Isopreneinheiten [3] gebildeten Oxidosqualen, einem C-30-Körper. Während die Steroidsaponine drei Methylreste verlieren und C-27-Körper bilden, behalten Triterpensaponine ihr C-30-Grundgerüst [4]. Die Aglyka stellen den lipophilen bzw. unpolaren Teil der Saponine dar. Sie sind über eine glykosidische Bindung mit einem oder mehreren Zuckern verbunden, welche den Saponinen die hydrophilen bzw. polaren Eigenschaften verleihen. Gewöhnliche Zucker wie Glucose, Galaktose, Arabinose, Apiose, Rhamnose, Ribose, Glukuronsäure, und Galakturonsäure kommen klassischerweise in dieser Stoffklasse vor [5]. Saponine lassen aufgrund ihres Aufbaus oder ihres Ursprungs viele Möglichkeiten zur Unterteilung in verschiedene Gruppen zu. Saponine werden primär in Triterpensaponine und Steroidsaponine unterteilt. Gelegentlich werden die Steroidalkaloidsaponine als dritte Gruppe aufgeführt, welcher jedoch nicht selten die Zugehörigkeit zur Klasse der Saponine trotz gleichen Ursprungs abgesprochen und eher den

Alkaloiden zugeordnet wird [5]. Während Triterpensaponine meist in (Eu-)Dikotyledonen (zweikeimblättrige Pflanzen) vorkommen [3], findet man Steroidsaponine primär in Monokotyledonen (einkeimblättrige Pflanzen) [6]. Abhängig von der Anzahl an Zuckerketten oder der Anzahl an Zuckern insgesamt wird eine weitere Unterscheidung und Unterteilung der Saponine ermöglicht. Da die Anzahl der an dem Aglykon gebundenen Zuckerketten einen maßgeblichen Einfluss auf die Wirkung der Moleküle besitzt, wird auf diese Unterscheidung ein besonderes Augenmerk gesetzt. So werden Saponine mit einer Zuckerkette als monodesmosidisch, mit zwei als bidesmosidisch und mit drei als tridesmosidisch bezeichnet. Der beschriebene amphiphile Aufbau (hydrophiler und lipophiler Teil) erklärt die oberflächenaktive und hämolytische Aktivität der Saponine. Sie sind in der Lage mit Lipiden und somit mit Zellmembranen zu wechselwirken und damit ihre Integrität zu stören. Die hämolytischen Eigenschaften lassen sich durch die Interaktion der Saponine mit den Sterolen der Erythrozytenmembran begründen. Durch daraus resultierender irreversibler Lyse der Membran kommt es schließlich zum Austreten von Hämoglobin [7]. Saponine besitzen im Allgemeinen einen intensiv bitteren Geschmack, eine der Ausnahmen bildet hier das Glycyrrhizin der Süßholzwurzel (*Glycyrrhiza glabra* L.). Der bittere Geschmack sowie die hämolytischen Eigenschaften spielen eine große Rolle zum Schutz vor Fraßfeinden und erfüllen somit die Funktion der Saponine als Sekundärstoff der Pflanze. Neben der erwähnten Oberflächen- und hämolytischen Aktivität weisen Saponine jedoch eine Reihe anderer Wirkungen auf, die auf pharmazeutischer Ebene genutzt wurden oder noch immer werden. So werden die expektorierende (auswurfördernde) Wirkung der Saponine des Efeus (*Hedera helix* L.) oder Primel (*Primula veris* L.) bei schleimigen Husten, die exsudativen (flüssigkeits-austreibenden) Eigenschaften der Rosskastaniensaponine (*Aesculus hippocastanum* L.) bei Venenerkrankungen oder auch die lern- und gedächtnisfördernden Effekte des Ginsengs (*Panax ginseng* L.) als Tonikum verwendet. Doch nicht nur diese Wirkungen machen Saponine zu wertvollen Pflanzeninhaltsstoffen.

In den letzten Jahren sind eine Reihe neuer weiterer pharmakologischer Wirkungen sowohl *in-vitro*, sondern auch *in-vivo* untersucht worden und bieten somit neue Möglichkeiten in der pharmazeutischen Anwendung. So wies eine kürzlich veröffentlichte Studie nach, dass einige Saponine – insbesondere Glycyrrhizinsäure (*Glycyrrhiza glabra* L.) und  $\alpha$ -Hederin (*Hedera helix* L.) – in der Lage sind, die Anfälligkeit von vancomycin-resistenten Bakterienstämmen gegenüber einer Reihe von Antibiotika zu erhöhen [8]. Zeitgleich beschrieb eine weitere Studie einen verstärkenden Effekt von Ginsenosiden aus *Panax ginseng* C.A.Mey auf den Gyrasehemmer Ciprofloxacin gegenüber *Staphylococcus aureus* Stämmen [9]. Neben den antibakteriellen Effekten

wurden zudem antivirale Eigenschaften aufgedeckt. So wirkten Quillajasaponine positiv gegen Rotaviren [10], Gänsefingerkraut (*Potentilla anserina* L.) hemmend auf die DNA-Replikation des Hepatitis B-Virus [11] oder Mate-Extrakte reduzierend auf die Aktivität der Herpesviren HSV-1 und HSV-2 [12]. Auch über ein immunmodulierendes Potential wird berichtet, wie Studien aus den Jahren 2014 [13] über Grüntee-Saponinen (*Camelia sinensis* L.) und 2015 [14] über Ginseng-Saponinen (*Panax Ginseng* C.A.Mey) zeigen. Doch besonders die zytotoxischen und antitumoralen Eigenschaften folgender Saponindrogen sind es, die der Medizin zukünftig von großem Wert sein könnten (1.4).

## 1.2. RIPs

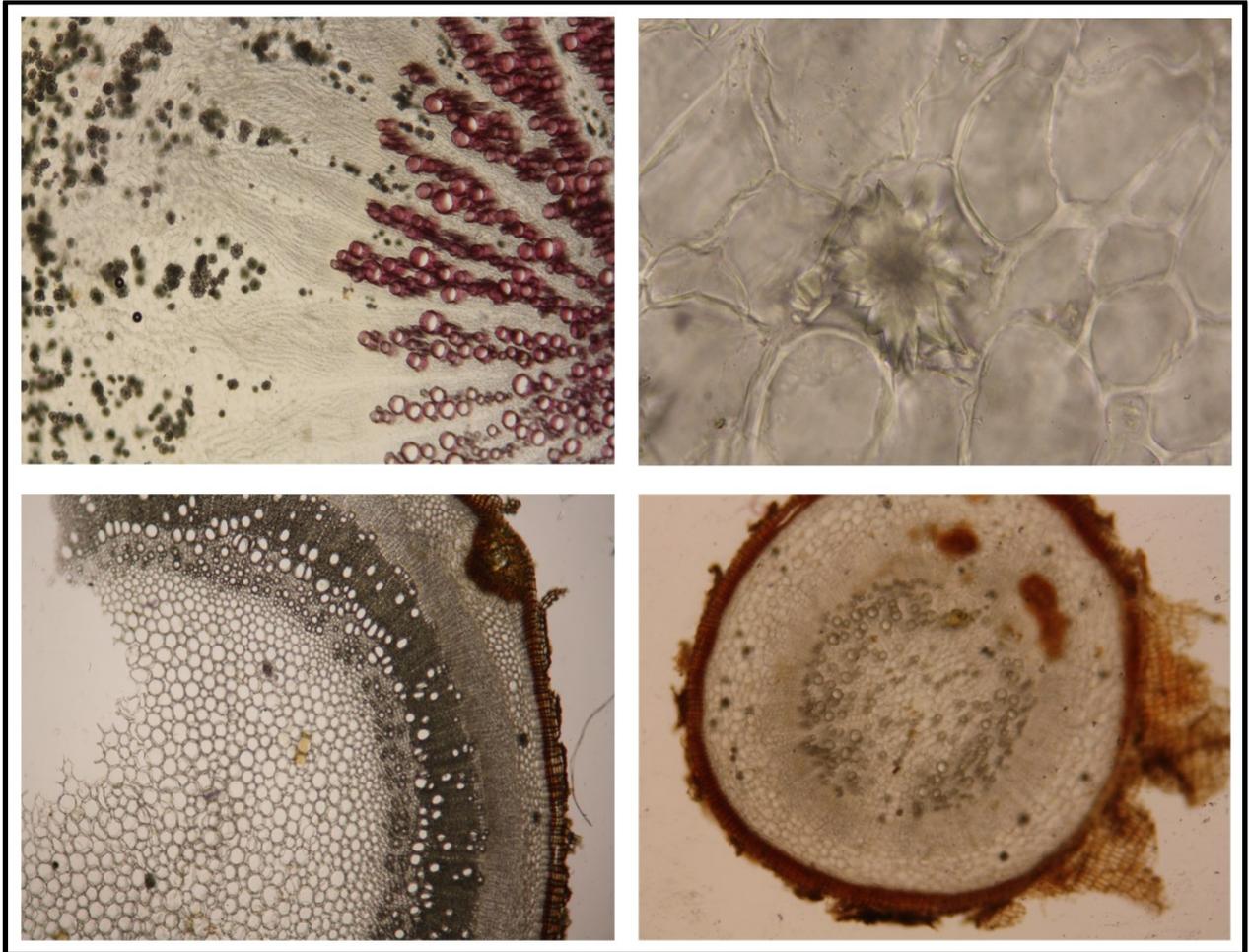
Ribosomen-inaktivierende-Proteine sind enzymatisch wirkende Proteine, welche als N-Glykosidasen fungieren. Sie sind damit in der Lage, eine bestimmte Purinbase – das Adenin – der 28S-RNA-Untereinheit abzuspalten und damit die Translation zu inhibieren [15]. Hauptsächlich werden diese Proteine, auch RIPs genannt, von Pflanzen gebildet, jedoch sind sie auch hin und wieder in gewissen Algen-, Pilz- und Bakterienarten zu finden [16]. RIPs können in der Regel in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden, sie werden jeweils Typ I und Typ II bezeichnet. Der Unterschied liegt in der Anzahl der Proteinketten, aus denen das RIP besteht, und – damit verbunden – in der Toxizität der Proteine. Während RIPs des Typ I lediglich aus einer Polypeptidkette (A) bestehen, besitzen RIPs des Typ II eine zusätzliche Proteinkette (B), welche über eine Disulfidbrücke mit der A-Kette verbunden ist. Die Proteinkette B besitzt die wertvolle Eigenschaft an Zuckerstrukturen der Zellmembran (Galaktosereste) zu binden und somit das Eindringen der Proteinkette A, welche für die N-Glykosidase-Aktivität verantwortlich ist, in die Zelle zu ermöglichen [15]. Somit erreichen RIPs des Typ II in der Regel eine weitaus höhere Toxizität als die des Typ I. Ein bekannter Vertreter des Typ II ist das Ricin der Rizinuspflanze (66 kDa, *Ricinus communis* L.), welches hauptsächlich im Samen lokalisiert ist. Auch das Abrin (63-67 kDa, *Abrus praecatorius* L.) und Viscumin (60-70 kDa, *Viscum album* L.) gehören in diese Gruppe. Bekannte Vertreter der RIPs Typ I sind das Saporin des gewöhnlichen Seifenkrauts (*Saponaria officinalis* L.), wie auch Dianthin (30 kDa, *Dianthus caryophyllus* L.) und das Agrostin (30 kDa) aus *Agrostemma githago* L. [17].

### 1.3. *Saponaria officinalis* L., *Gypsophila paniculata* L. und *Gypsophila elegans* M.Bieb.

*Saponaria officinalis* L. gehört der Familie der Nelkengewächse (Caryophyllaceen) an und erfreut sich wieder wachsender Bedeutung. Aus dem „gewöhnlichen Seifenkraut“, wie die Pflanze im deutschen Sprachgebrauch genannt wird, wurden bereits seit dem Mittelalter Kraut (*Saponariae herba*) und Wurzel (*Saponariae rubrae radix*) aufgrund des hohen Saponingehalts als Expektorans bei Erkrankungen der oberen Atemwege verwendet. Die rote Seifenwurzel enthält ca. 2 – 5% mono- und bisdesmosidische Triterpenglykoside, hauptsächlich mit der Quillajasäure als Aglykon [18]. Ein weiterer wichtiger Inhaltsstoff ist das bereits erwähnte RIP Typ I Saporin. Auch Flavonoide des Flavontyps wie das Saponarin sind in der Pflanze zu finden [19].

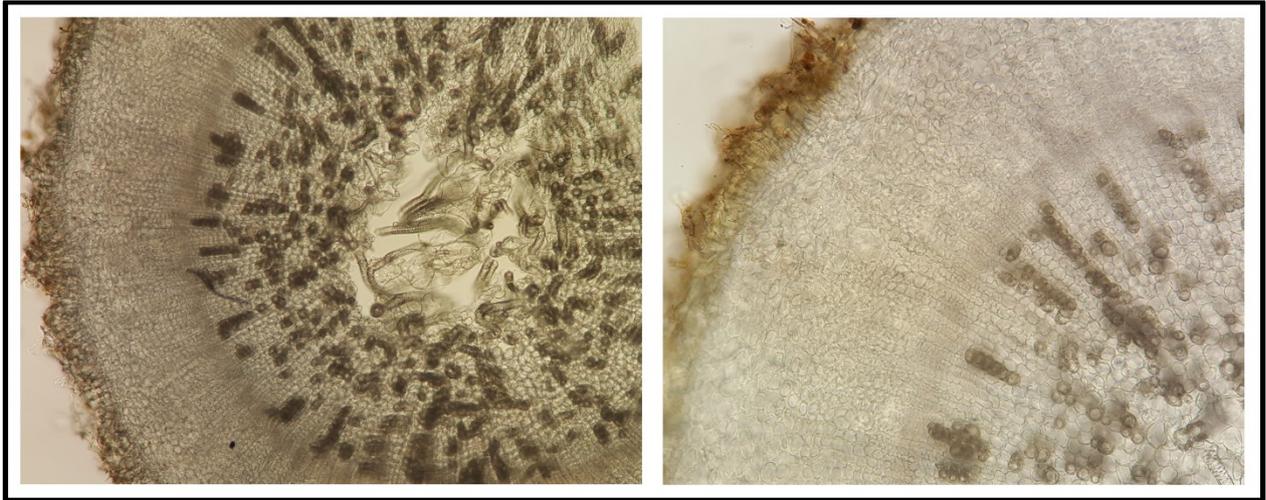
*Gypsophila paniculata* L. entstammt ebenfalls der Familie der Nelkengewächse. Die Wurzeln des Schleierkrauts bzw. rispigen Gipskrauts, welche als weiße Seifenwurzel (*Saponariae albae radix*) bezeichnet wird, wurden ebenfalls in der Vergangenheit bei Katarrhen der oberen Atemwege verwendet. Sie enthalten einen hohen Anteil an Saponinen – die Wurzel kann einen bis zu 20% hohen Saponingehalt besitzen – welches das Schleierkraut für die industrielle Gewinnung von Saponinen (*Saponinum album*) sehr wertvoll machte [18]. Die Saponine beinhalten vorwiegend das Aglykon Gypsogenin.

Sowohl das Seifenkraut, als auch das rispige Gipskraut hatten auf pharmazeutischer Ebene im Laufe der Jahre viel an Bedeutung verloren. Aufgrund der Tatsache, dass sich andere saponinhaltige Arzneidroge wie z.B. Efeu, Primel und Süßholzwurzel als Expektorans weitaus besser zur inneren Anwendung eigneten, wurden sie nahezu vollständig aus dem pharmazeutischen Markt verdrängt. Aufgrund neuerer Entdeckungen in den letzten Jahren könnten *Saponaria officinalis* L. und *Gypsophila paniculata* L. eine neue, ungeahnte Bedeutung wiedererlangen (1.4).



**Abb. 1** Mikroskopische Aufnahmen von *Gypsophila paniculata* L. und *Saponaria officinalis* L. **Oben links:** Wurzelschnitt (quer) von *Gypsophila paniculata* L., angefärbt mit Phloroglucinol/HCl. Eine markante Zahl an Kalziumoxalatdrusen ist im Phloem zu beobachten, vermehrt angereicht entlang der Parenchymstrahlen. **Oben rechts:** Nahaufnahme einer Kalziumoxalatdruse aus *Gypsophila paniculata* L. **Unten links:** Querschnitt eines Ausläufers aus *Saponaria officinalis* L. Eine geringere Anzahl an Oxalatkristallen liegt vor. **Unten rechts:** Wurzelquerschnitt von *Saponaria officinalis* L. Einige Oxalatkristalle sind im parenchymatischen Gewebe vorzufinden.

*Gypsophila elegans* M.Bieb. stellt neben *Gypsophila paniculata* L. eine weitere Gipskrautart dar. Bis dato ist das „Sommer-Schleierkraut“ mehr für ihre Ästhetik als für eine medizinische oder industrielle Verwendung bekannt. Mit Ausnahme von der Untersuchung von Gypsophilin, eines RIPs Typ I aus *Gypsophila elegans* M.Bieb. [20] und dem Flavonoidglykosid Isoorientin [21,22] ist bislang nur wenig über das Inhaltsstoffspektrum dieser Pflanze bekannt.



**Abb. 2 Mikroskopische Aufnahmen von *Gypsophila elegans* M.Bieb.**

**Links:** Querschnitt einer jungen Wurzel von *Gypsophila elegans* M.Bieb. im sekundären Dickenwachstum. Das primäre Xylem wurde durch die Bearbeitung herausgerissen, einige Tracheen sind daher von der Seite zu erkennen. **Rechts:** Vergrößerte Aufnahme des Querschnitts. Ungleich zu *Gypsophila paniculata* L. konnten keine Oxalatkristalle beobachtet werden.

#### 1.4. Zytotoxizität und antitumorale Wirkung

Aufgrund der erwähnten (hämo-) lytischen Eigenschaften sind Saponine ab einer bestimmten Konzentration in der Lage, Zellen irreversibel zu perforieren und damit den Zelltod auszulösen. Eine therapeutische Bedeutung erlangen sie jedoch erst dann, wenn die angewendeten Konzentrationen gesunde Zellen nicht beeinträchtigen und zeitgleich einen eindeutig messbaren zytotoxischen Effekt auf erkrankte Zellen aufweisen. Mitte der Neunziger Jahre wurden die bereits entdeckten antitumoralen Eigenschaften resümiert und in ihnen ein großes Potenzial gesehen. Insbesondere die Interaktionen der Saponine mit der Zellmembran werden hier hervorgehoben [23]. In den darauffolgenden Jahren deuteten die verschiedensten Saponine, beispielsweise die Ginsenoside von *Panax ginseng* L. [24-26] oder das  $\alpha$ -Hederin aus *Hedera helix* L. [27,28] ein zytotoxisches bzw. antitumorales Potenzial an. Jedoch wurde kein Feld so intensiv beforscht wie die Applikation von bestimmten Triterpensaponinen in Kombination mit antitumoralen Wirkstoffen oder Toxinen. Eine in 2002 veröffentlichte Studie beschrieb eine signifikante Akkumulationsverstärkung von Cisplatin in humanen Kolonkarzinomzellen bei gleichzeitiger Gabe von Saponinen mit Quillajasäure-Aglyka [29]. Ebenso wurde eine mögliche Co-Applikation mit Zytostatika später für Ginsenoside beschrieben [30]. Ein Synergismus zwischen Saponinen und RIPs fand erstmals an Erwähnung, als eine deutlich höhere Zytotoxizität des Extrakts aus *Agrostemma githago* L. im Vergleich zum isolierten Saponin festgestellt worden war [31]. Infolge dessen wur-

den verstärkt Struktur-Wirkungs-Beziehungen [32,33] und der Wirkungsmechanismus des Saponin-RIP-Synergismus untersucht. Eine zentrale Rolle spielte hierbei die Endozytose, durch die RIPs in die Zelle gelangen. Während anfangs eine Stimulation der Endozytose durch die Saponine vermutet wurde [34,35], wurde später eine verstärkte Freigabe des Toxins aus den späten Endosomen und Lysosomen postuliert. Diese Freigabe („*endosomal release*“) würde durch eine Wechselwirkung der Saponine mit der Endosomenmembran und eine daraus resultierende gestörte Membranintegrität ermöglicht [36]. Zudem spiele womöglich sowohl der pH-Wert in den Endosomen [36,37] als auch die Ladung der Komponenten [38] eine entscheidende Rolle im Aufnahmeprozess in die Zelle.

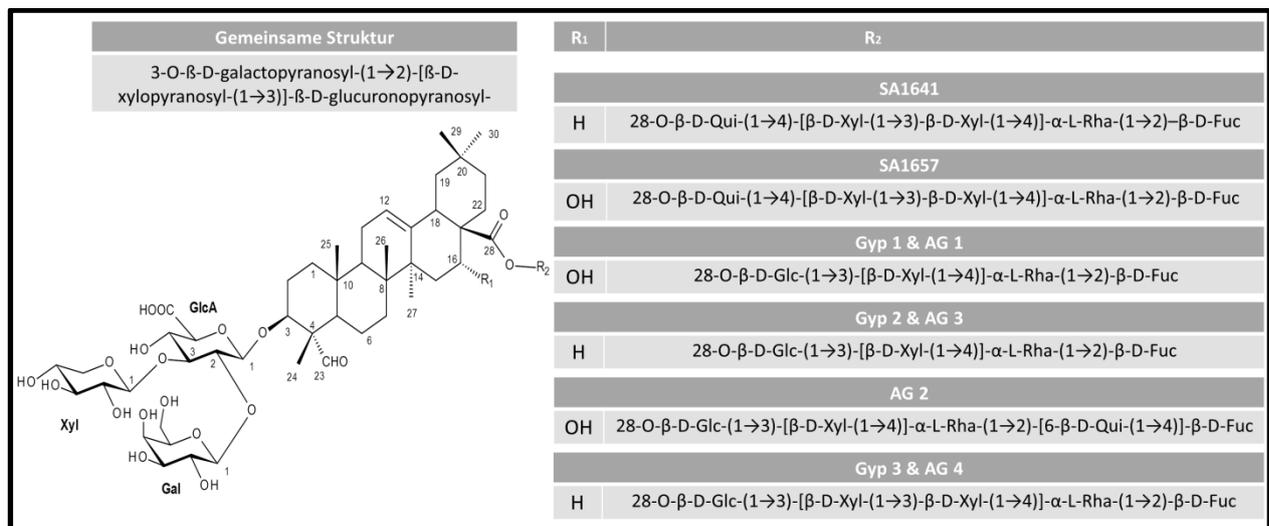
Das große Potential in der Krebsforschung unterstrichen die ersten *in-vivo*-Versuche an tumortragenden Mäusen. Eine Tumorreduktion von 94% wurde durch eine Verabreichung von Saporin und Saponinum album erreicht, die Nebenwirkungen dabei waren moderat [39]. Eine ähnliche starke Tumorreduktion zeigte eine Studie, in der Saporin kovalent an EGF (*epidermal growth factor*) gebunden wurde. Durch die Bindung des gerichteten Toxins (*targeted toxin*) an EGF-Rezeptor überexprimierende Zellen – hauptsächlich Krebszellen – wurde eine zielgerichtete Wirkung erzielt. Das zusätzlich applizierte Saponingemisch mit SO1861 aus *Saponaria officinalis* L. bewirkte hier eine 6900-fache Wirkungsverstärkung [40]. Analoge Ergebnisse (95% Tumorreduktion) zeigte eine weitere Studie mit einem Dianthin-EGF Toxin in Co-Applikation mit SO1861 an Mäusen mit Kolonkarzinom [41].

### **1.5. Untersuchung und Gewinnung wirksamer Saponine**

Die aufgedeckte Struktur bereits isolierter Saponine gibt wertvolle Informationen hinsichtlich der für das endosomalen Release erforderlichen Strukturmerkmale. Mithilfe der Erkenntnisse von *Melzig et al.* [32], *Bachran et al.* [42] und *Böttger et al.* [43], basierend auf vergangenen Studien und aufgeklärter Saponinstrukturen, konnte ein wichtiger Überblick für die Struktur-Wirkungs-Beziehung gewonnen werden. So wurden folgende wichtigen Strukturmerkmale zusammengefasst:

- Aldehydfunktion am C-4 (Melzig et al.)
- Bidesmosidisch (Melzig et al.)
- Eine Esterbindung an C-28 mit einem azidischen Oligosaccharid (Melzig et al.)
- Verzweigte, saure Zuckerkette an C-3 (Bachran et al.)
- Verzweigter, saurer Trisaccharid an C-3 - darunter Glukuronsäure (Böttger et al.)
- Verzweigter Tetrasaccharid (mind. Tetra) an C-28 mit Desoxyzuckern (Böttger et al.)
- Acetylrest in C-28-Zuckerkette (Böttger et al.)
- Molekülmasse > 1600 g/mol (Böttger et al.)

Bereits isolierte, aufgeklärte und hinsichtlich des endosomal Release untersuchte Triterpensaponine wurden anhand ihrer Gemeinsamkeiten in einer Übersicht dargestellt (Abb. 3). Die eben beschriebenen Merkmale können mehrheitlich in der gemeinsamen Struktur wiedergefunden werden.



**Abb. 3 Übersicht isolierter Saponine mit bereits vollständig aufgeklärter Struktur (aus Fuchs et al., 2017)**

Der links abgebildeten gemeinsamen Struktur stehen die rechts aufgelisteten Unterschiede gegenüber. Die Unterschiede in R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> sind letztlich ausschlaggebend für die individuelle Wirkstärke des Saponins.

Ein jüngst veröffentlichter Review-Artikel resümierte die Fähigkeit glykosylierter Triterpene, das endosomale Release zu steigern [44]. Er beschrieb unter anderem eine aktivitätsgeleitete Isolationsstrategie (*Bio-Assay Guided Isolation Strategy*) als Methode zur Identifizierung und Isolation hochpotenter Saponine. Durch die Ausführung von Bio-Assay korrespondierender Subfraktionierungen komplexer Saponingemische wird somit eine gerichtete Isolation eines wirk-

starken Saponins ermöglicht, welches schließlich über spektroskopische Methoden wie NMR und MS spektrometrisch aufgeklärt werden kann.

Eine Kombination jener wichtigen Strukturmerkmale mit der beschriebenen Isolationsstrategie stellt eine vielversprechende und effektive Vorgehensweise dar, hochaktive Saponine zu detektieren, die einen optimalen Erfolg in kommenden *in-vivo*-Therapien garantieren.

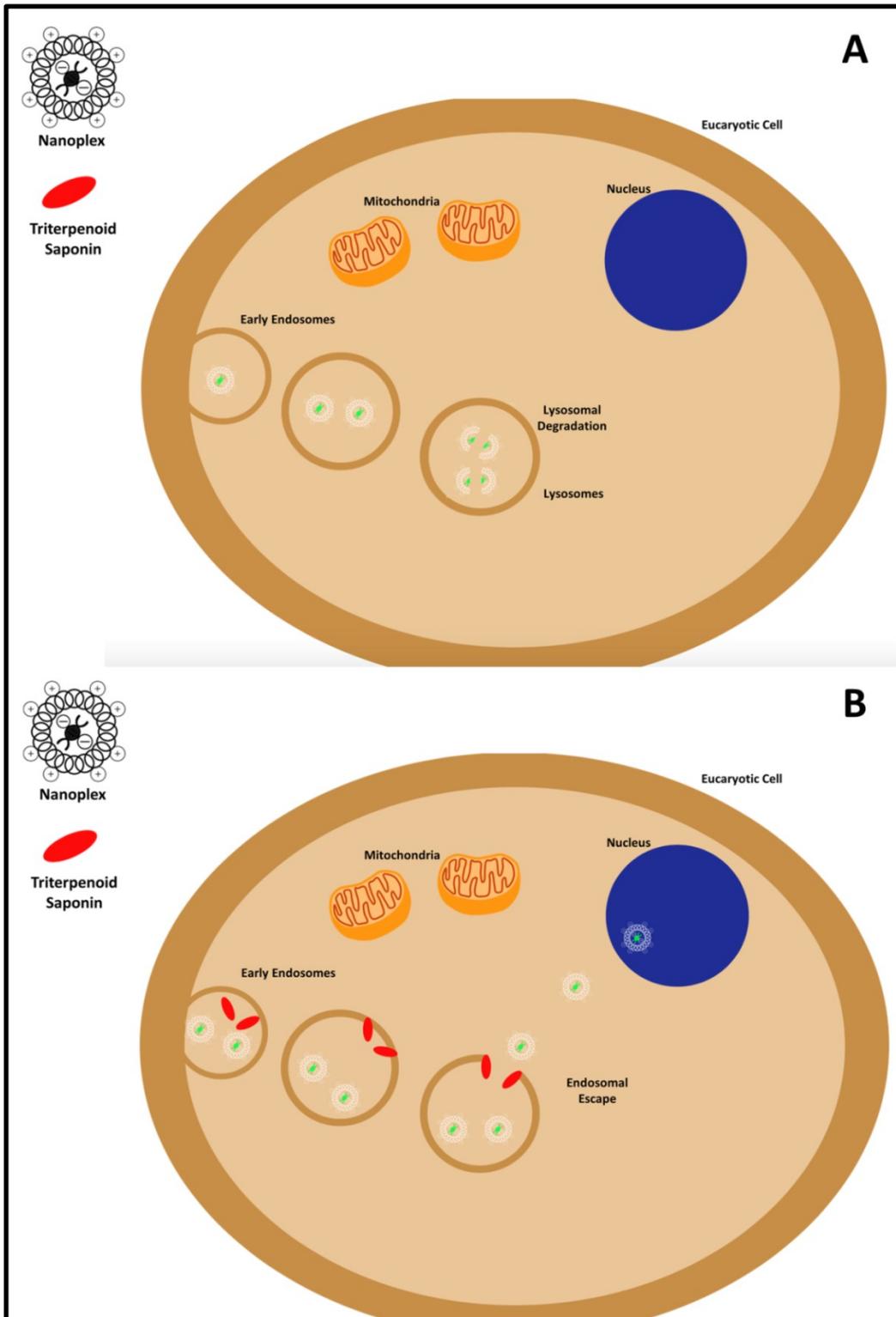
## 1.6. Transfektion

Das Einbringen von genetischem Material in die eukaryotische Zelle wird als Transfektion bezeichnet. Dabei wird je nach angewandeter Methode in virale, physikalische und biochemische Transfektion unterschieden. Während man unter viralen Transfektionen (sog. Transduktion) grundsätzlich den Gentransfer durch einen als DNA-Carrier fungierenden und replikationsincompetenten Virus versteht, bieten physikalische und biochemische Transfektionen ein wesentlich breiteres Spektrum auf. Physikalische Transfektionen bedienen sich entsprechender physikalischer Gesetzmäßigkeiten bzw. Kräfte, um einen effektiven Gentransfer zu gewährleisten. Transfektionsmethoden wie die Elektroporation, Nukleofektion (Porenbildung durch elektrische Impulse) und die „Genkanone“ (Zellbeschuss mit präzipitierten DNA-Gold-Partikeln) sind hier in erster Linie zu nennen. Unter den biochemischen Transfektionen gehört die Kalzium-Phosphat-Präzipitation zu den am meisten angewandten Methoden. Nach Bindung der negativ geladenen DNA an präzipitierte Kalzium-Phosphat-Kristalle findet eine Aufnahme in die Zelle durch Endozytose statt.

Trotz der Effektivität der beschriebenen Transfektionsmethoden wurde der Ruf nach effektiven und zugleich sicheren und nicht toxischen Möglichkeiten laut. Eine mögliche Immunantwort und Bildung replikationskompetenter Viren bei viralen Transfektionen standen Zellstress und damit verbundene Toxizität bei physikalischen und biochemischen Methoden gegenüber [45,46]. Aufgrund dessen erlangte das Prinzip der weniger toxischen Lipofektion in den letzten Jahren eine wachsende Bedeutung. Die Lipofektion beschreibt das Einbringen der DNA in die eukaryotische Zelle mithilfe von Lipiden, die durch die Wechselwirkung mit zellulären Membranen den Gteintritt erleichtern. So wurde 1987 erstmals beschrieben, dass positiv geladene Lipide und nega-

tiv geladene DNA Nanoplexe bilden, wodurch die Aufnahme („Uptake“) der DNA in die Zelle erleichtert wird. Eine Überlegenheit zu anderen biochemischen Transfektionen wurde dabei bewiesen [47]. Im selben Jahr zeigte eine Studie eine ladungsbegründete Komplexbildung aus DNA und kationischen Poly-L-Lysin-Peptiden und die daraus resultierende Formung von DNA-Carriern [48]. Die Kombination der DNA mit sowohl Peptiden als auch Lipiden zugleich lag schließlich nahe [49-51]. Optimierungen der Partikelformulierungen, insbesondere in Bereichen der Partikelzusammensetzung und des Massenverhältnisses, dienten einer weiteren Steigerung der Effizienz nanoplexbasierter Transfektionen [49,50,52-54]. Weitere Anstrengungen wurden hinsichtlich einer zielgerichteten Transfektion unternommen. Gerade im Hinblick auf eine therapiegerechte Tumorthherapie steht ein entsprechendes Zell-Targeting im besonderen Fokus. Integrine spielen hierbei eine wichtige Rolle. Die Überexpression von (Integrin-)Rezeptoren, die insbesondere bei Krebszellen zu beobachten ist, macht sie zu einem beliebten Target in der Krebsforschung [55,56]. Mithilfe einer RGD-Sequenz, bestehend aus drei Aminosäuren (Arginin, Glycin, Asparaginsäure), kann eine Bindung der Integrine ermöglicht werden [57]. Kationische RGD-Peptide, die mit DNA zu Nanoplexen formuliert wurden, stellten somit eine vielversprechende Möglichkeit zum gezielten Gentransfer (*gene-delivery*) in Integrin-exprimierende Zellen dar [58-60]. Aber auch Nanoplexe basierend auf anderen Targets wie Transferrinrezeptoren wurden intensiv beforscht und bereits in klinischen Studien getestet [61,62].

Die Fähigkeit der Saponine, das endosomale Release zu erleichtern, erweckte auch Interesse auf dem Gebiet der Transfektion. So zeigte eine Studie, dass das Saponin SO 1861 aus *Saponaria officinalis* L. in gleicher Weise in der Lage ist, die Freigabe genetischen Materials durch Interaktion mit der Endosomenmembran zu verstärken und damit die Transfektionseffizienz zu erhöhen. Weiterhin beschrieb die Studie den Einbau der Saponine in die Nanopartikel, welcher ein verbessertes und kontrolliertes Gene-Delivery darbieten würde [63]. Der Einfluss bestimmter Saponine auf den endozytotischen Prozess wird in *Abb. 4* bildlich dargestellt.



**Abb. 4 Durch Saponin verstärkter „Endosomal Escape“**

**A** Endozytotischer Prozess mit Nanoplexe – ohne Saponin: Nanoplexe werden in Form von Vesikeln in die Zellen aufgenommen und verschmelzen daraufhin mit den frühen Endosomen. Jene Endosomen entwickeln sich zu späten Endosomen und sind nach Verschmelzung mit den Lysosomen in der Lage durch lytische Prozesse die zellfremden Partikel abzubauen. **B** Endozytotischer Prozess mit Nanoplexe – mit Saponin: Die Anwesenheit von Saponinen führt zu Störungen in der Endosomenmembran. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften interagieren die Saponine mit der Membran und ermöglichen somit ein Austreten der Partikel noch vor einem enzymatischen Abbau.

## 1.7. Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist es, Triterpensaponine auf ihre transfektionsverstärkenden Eigenschaften zu untersuchen. Dabei sollen sowohl bereits identifizierte, als auch neue und potenziell effektivere Saponine herangezogen werden, nicht nur zur Beobachtung des stärkst möglichen Effekts, sondern auch zur Gewinnung von Erkenntnissen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung. Für die Isolation und Untersuchung potenter Saponine stehen *Gypsophila paniculata* L., *Saponaria officinalis* L. und *Gypsophila elegans* M.Bieb. im Fokus. Durch den Einsatz in verschiedenen Zelllinien und an verschiedenen Transfektionsmethoden soll zudem die einfache und universelle Anwendbarkeit der Saponine überprüft werden. Darüber hinaus sollen durch Toxizitätsstudien – *in-vitro* und *in-vivo* – die Möglichkeiten eines Einsatzes von Saponinen bei zielgerichteten Tumorthérapien untersucht und erörtert werden.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1. Materialien**

#### **2.1.1. Geräte**

##### **2.1.1.1. Zellkultur**

- Autoclav Varioklav®, H+P Labortechnik, Hackermos, Deutschland
- Brutschrank Mini Galaxy A RS Biotech®, C&M Scientific, West Lothian, UK
- iCelligence®, ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA
- Maxipette, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Neubauer Zählkammer, Brand, Wertheim, Deutschland
- Sicherheitswerkbank Herasafe HS12, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Wasserbad GFL 1002, GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland

##### **2.1.1.2. Zentrifugen**

- Kühlzentrifuge, Allegra X-30R, Beckman Coulter, Brea, CA, USA
- Zentrifuge Megafuge 1.0®, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

##### **2.1.1.3. Waagen**

- Analysenwaage Sartorius CP 2245 – 0CE®, Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Analysenwaage Sartorius MSP 125P – 1CE – DU®, Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Waage Sartorius portable PT 1200®, Sartorius, Göttingen, Deutschland

##### **2.1.1.4. Gentechnik**

- ABI PRISM 310 Genetic Analyser
- Automatische Pipette, Mikura P-ette, West Sussex, UK

- C25KC Incubator shaker (New Brunswick scientific, Enfield, USA)
- Eppendorf BioSpectrometer® basic, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Mini Sub Cell GT System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Nanodrop ND-1000 Spektrometer, Peqlab, Erlangen, Deutschland
- Niederspannungsanlage, Biometra Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen, Deutschland
- Thermocycler, Biometra T-Gradient, Biometra, Göttingen, Deutschland
- Thermomixer comfort 1.5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- UV-Transilluminator, Biostep USDT-20SL-8E, Biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland

#### **2.1.1.5. Mikroskope**

- Elektronenmikroskop Hitachi SU8010 high resolution SEM, Hitachi, Tokio, Japan
- Elektronenmikroskop Hitachi SU8030 high resolution SEM, Hitachi, Tokio, Japan
- Kompaktes Fluoreszenz-Mikroskop HS BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan
- Konfokal Laser Scanning Mikroskop (LSM780, Axio Observer Z1, Zeiss TRZ 3700, Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil Objective and 20x Objective, Carl Zeiss, MicroImaging, Jena, Deutschland)
- Lichtmikroskop Leica DM LS2, Leica, Wetzlar, Deutschland
- Plan fluor 20x/0.45 EWLD lens
- Tischmikroskop TMS-F® No. 301454, Nikon Instruments, Düsseldorf, Deutschland

#### **2.1.1.6. Sonstige**

- Avestin Liposofast™ extruder, AVESTIN Europe, Mannheim, Deutschland
- Canon EOS 1000D Kit mit Zubehör, Canon, Tokio, Japan
- Durchflusszytometer Cytoflex flow cytometer, Beckman Coulter, Brea, CA, USA
- Malvern Nano Zetasizer. Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK
- Mikroplattenreader Tecan Infinite F200, Tecan, Männedorf, Schweiz
- NightOWL LB 981 imaging system, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland

- Reinstwasseranlage Labostar UV 2 Reinswassersystem®, Siemens, Barsbüttel, Deutschland
- Schüttler Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
- Ultraschallbad Sonorex RK 100, Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin, Deutschland

### **2.1.2. Software**

- PlasmaDNA, Helsinki, Finnland
- ZEN2010 Software, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- WinLight, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
- ImageJ 1.48v, Rockville, MD, USA
- RTCA Data Analysis Software, Version 1.0. , Roche, Basel, Schweiz
- Cyflogic, Version 1.2.1., Turku, Finnland
- CytExpert, Version 1.2., Beckman Coulter, Brea, CA, USA

### **2.1.3. Verbrauchsmaterialien**

#### **2.1.3.1. Zellkultur**

- Cellstar Microplatten 96-Well (transparent, steril), Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- Cellstar Microplatten 24-Well (transparent, steril), Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- 8-Well-E-Plates L8, OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen, Deutschland
- Kryoröhrchen (2ml, steril), Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- Zellkulturflaschen (Gasaustauschfilter, 25 cm<sup>2</sup>; 75 cm<sup>2</sup>), Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- Zellkulturschalen 40x11mm, steril, pyrogenfrei, TPP, Trasadingen, Schweiz
- Sterile Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml), Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Falcon® Round-Bottom Tubes, Polystyrene, 5 ml, Corning®, VWR, Radnor, PA, USA

### 2.1.3.2. Sonstige

- Einmalspritzen (2 ml, 5 ml, 10ml, steril), B.Braun, Melsungen, Deutschland
- Pipettenspitzen (10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l), Greiner, bio-one, Carl Roth, VWR
- Spritzenvorsatzfilter (0,22  $\mu$ m,  $\phi$ 33 mm, PVDF-Membran, steril), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Zentrifugationstubes, Polypropylene, 500 ml, Beckman Coulter, Brea, CA, USA
- Zentrifugenröhrchen (PP, 15 ml, 50 ml, steril, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

### 2.1.4. Chemikalien

#### 2.1.4.1. Zellkultur

- DMEM-Medium mit NaHCO<sub>3</sub>, D-Glucose, stabiles Glutamin, Biochrom, Berlin, Deutschland
- RPMI Medium 1640, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
- PBS Dulbecco ohne Ca<sup>2+</sup>, ohne Mg<sup>2+</sup>, Biochrom, Berlin, Deutschland
- FBS Superior, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Trypsin/EDTA 0.05%/0.02%, Biochrom, Berlin, Deutschland
- Opti-MEM® (1x) Reduced Serum, Biochrom, Berlin, Deutschland
- CuSO<sub>4</sub>, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

#### 2.1.4.2. Elektrophorese

- DNA Elektrophorese Loading Dye (6x), Biorad, Hercules, California, USA
- DNA Elektrophorese Loading Dye (6x), Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
- Ethidiumbromidlösung 0,5%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
- Roti-Safe Gel-Stain, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- SYBR® Safe DNA Gel Stain, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA

- Tris/Acetic Acid/EDTA 50x TAE, Biorad, Hercules, California, USA

#### 2.1.4.3. Klonierung & Plasmidamplifizierung

- Agarose, molecular biology grade, SERVA, Heidelberg, Deutschland
- Ampicillinnatrium, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Big Dye Terminator Mix, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
- BigDye Terminator 5× Sequencing Buffer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
- CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
- dNTP Mix, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
- *E. Coli* Library Efficiency Dh5α Competent cells
- EndoFree® Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
- Hi-Di formamide , Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
- Kanamycinsulfat, Serva, Heidelberg, Deutschland
- LB-Medium (Luria/Miller), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- pCI Mammalian Expression Vector, Promega, Madison, WI, USA
- PCR-Primer (Individualsynthesen s. Methoden), Metabion, Planegg, Deutschland
- pEgFP-n3 – Vektor, Genbank Accession: U57609
- pET11d – Vektor, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
- Quant-iT PicoGreen dsDNA, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
- Restriktionsenzym NotI, NEB, Ipswich, MA, USA
- Restriktionsenzym XcmI, NEB, Ipswich, MA, USA
- Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research Corp., Irvine, USA
- ZymoPURE™ Maxiprep Kit, Zymo Research Corp., Irvine, USA
- Zyppy Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research Corp., Irvine, USA

#### 2.1.4.4. Nukleinsäuren

- GFP-MiniCircle-DNA, im Rahmen einer Kooperation mit der AG Hart (UCL, London) erhalten
- GFP-mRNA-StemMACS eGFP mRNA, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
- GFP-Plasmid-DNA – pEgFP-n3 – Vektor, Genbank Accession: U57609
- Luciferase-Plasmid-DNA - pCI Mammalian Expression Vector, Promega, Madison, WI, USA
- pET-11d-Dianthin [64]
- pET-11d-Saporin [65]

#### 2.1.4.5. Saponine

Rohextrakte und Saponine in ihrer höchsten Reinheitsstufe sind hier aufgeführt. Saponingemische, welche jedoch Vorstufen des isolierten Saponins darstellten, wurden mit „\*“ gekennzeichnet.

- *Saponaria officinalis* L.
  - SO1542 [66]
  - SO1584 [66]
  - SO1658 [66]
  - SO1674 [66]
  - SO1832 [67]
  - SO1861 [68]
- *Gypsophila paniculata* L.
  - SA1641 [36]
  - SA1657 [36]
  - Gyp 1 [69]
  - Gyp 2 [69]

- Gyp 3 [69]
- *Gypsophila Elegans* M.Bieb.
  - Samenrohextrakt\*
  - Wurzelrohextrakt\*
  - P2\*
  - P3\*
  - P4\*
  - GE1741

#### 2.1.4.6. Sonstige

- ATP (Adenosintriphosphat- $\text{Na}_2$ ), SERVA, Heidelberg, Deutschland
- CellMask™ Deep Red Plasma, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
- Chloroform, Sigma Aldrich, MO, USA
- D(-)-Luciferin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- D-Luciferin, Biosynth, Staad, Schweiz
- DOPE (2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), Avanti Polar Lipids, Alabaster, AI, USA
- DOTMA (1, 2-di-O-octadecenyl-3-trimethyl-ammonium propane (chloride salt)), Avanti Polar Lipids, Alabaster, AI, USA
- DTT (DL-Dithiotheitol), Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
- EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure), FLUKA, St.Gallen, Schweiz
- FITC-Poly-Lysin Peptid „FITC-P“, GeneCust, Dudelange, Luxembourg
- FITC-Poly-Lysin Peptid + Rezeptorbindungsmotiv, „FITC-Y“, GeneCust, Dudelange, Luxembourg
- Genecellin, Bulldog Bio, Inc., Portsmouth, UK
- Hoechst 33342, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
- Lipofectamine®, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
- Live Cell Imaging Solution, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
- $\text{MgCO}_3$  (Magnesiumcarbonat), VWR, Radnor, PA, USA
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Magnesiumsulfatheptahydrat), MERCK, Darmstadt, Deutschland

- Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated), Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
- PEI (Polyethylenimine), Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- pHrodo™ Red Dextran 10000 MW, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
- Poly-Lysin Peptid + Rezeptorbindungsmotiv, „Y“ nach *Tagalakis et al.* [70], GeneCust, Dudelange, Luxembourg
- Poly-Lysin Peptid K16, „P“, GeneCust, Dudelange, Luxembourg
- Rezeptorbindungsmotiv, „I“, GeneCust, Dudelange, Luxembourg
- TransIT-X2® Dynamic Delivery System, Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA
- Tricine, MERCK, Darmstadt, Deutschland
- Triton X, SERVA, Heidelberg, Deutschland
- Xtreme Gene™, Sigma Aldrich, MO, USA

### 2.1.5. Zelllinien

#### 1. Neuro-2A-Zellen (ATCC®CCL-131™)

Neuro-2A-Zellen entstammen aus murinem Gehirngewebe und stellen eine Neuroblastom-Zelllinie dar. Die World Organization for Animal Health (OIE) verwendet sie zur Diagnosis von Tollwut [71].

#### 2. Neuro-2A-Luc-Zellen

Die oben beschriebene Zelllinie wurde von der AG Hart (UCL London) stabil mit einem Luciferase-Gen transduziert, um eine konstante Expression von Luciferase zu gewährleisten.

#### 3. SK-N-SH-Zellen (ATCC®HTB-11™)

SK-N-Zellen entstammen aus dem humanem Gehirngewebe eines 4-Jahre alten Mädchens und stellen eine Neuroblastom-Zelllinie dar. Sie wird als eine klassische Zelllinie bei Zytotoxizitätsassays verwendet [72].

#### 4. SH-SY5Y-Zellen (ATCC®CRL-2266™)

SH-SY5Y stellen eine Unterzelllinie der oben genannten SK-N-Zellen dar. Sie unterscheidet sich sowohl in der Wachstumsgeschwindigkeit als auch im Aussehen [73].

#### 5. HepG2-Zellen (ATCC®CRL-11997™)

HepG2-Zellen entstammen aus humanem Lebergewebe eines 15-Jahre alten Jungen und stellen ein hepatozelluläres Karzinom dar [74].

6. Caco-2-Zellen (ATCC®HTB-37™)

Caco-2-Zellen entstammen aus dem humanen Dickdarmgewebe eines 72-Jahre alten Mannes und stellen eine kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie dar [75].

7. HEK293-Zellen (ATCC® CRL-1573™)

HEK293-Zellen entstammen aus einer humanen, unausgereiften Niere eines Fötus [76].

8. HTC-116-Zellen (ATTC® CCL-247™)

HTC-116-Zellen entstammen aus einem humanen Kolonkarzinomgewebe eines erwachsenen Mannes [77].

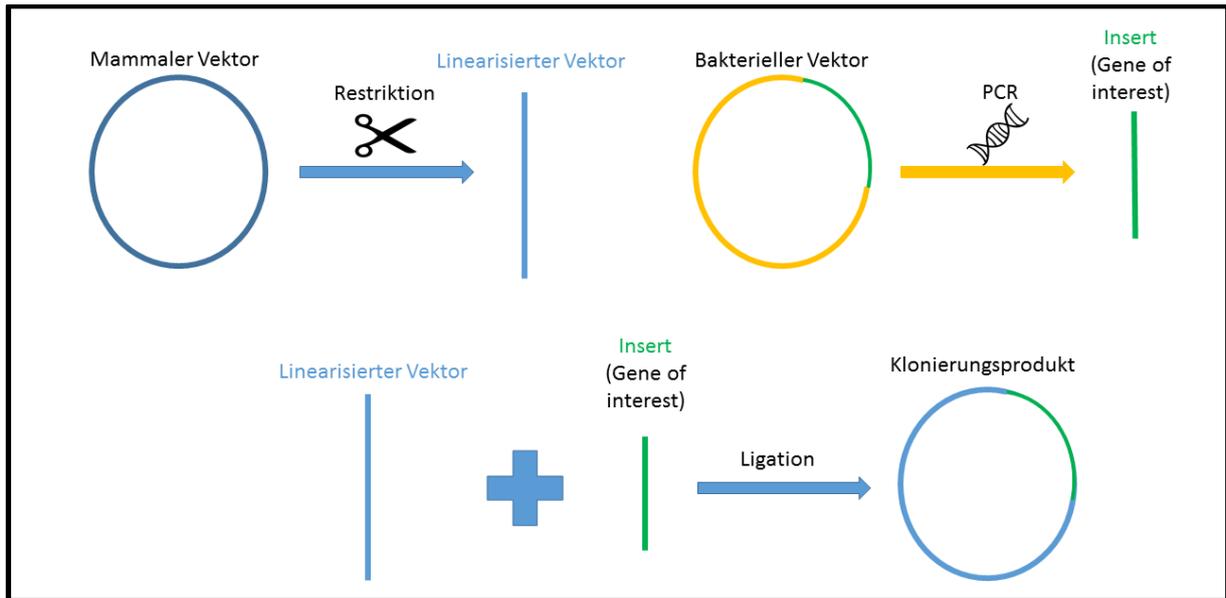
Alle Zelllinien wurden nach Vertreiberempfehlungen kultiviert und kältekonservert. Die Zelllinien wurden maximal bis Passage 20 für Experimente verwendet.

Alle Lösungen, die in der Zellkultur verwendet wurden, unterliefen einer Filtration durch einen 0,22 µm-Filter und wurden in analytisch reinem Wasser (0,055 µS/cm) gelöst.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Plasmid-Klonierung

Die Gene für Saporin und Dianthin lagen im Plasmid pET-11d-Saporin [65] und pET-11d-Dianthin [64] vor. Bei pET-11d handelt es sich um einen bakteriellen Vektor, der zur Klonierung und Expression von rekombinanten Proteinen dient. Für eine *in-vitro*- oder *in-vivo*-Transfektion war eine Klonierung der Gene (Saporin, Dianthin) aus jenem pET-11d in einen mammalen Expressions-Vektor notwendig. Eine grobe Übersicht des Klonierungsplans wurde mithilfe von *Abb. 5* veranschaulicht. Die Nukleotidsequenz von Saporin und Dianthin wurde durch *Barthelemy et al.* [78] und *Legname et al.* beschrieben [79] und diente nach Sequenzierung der Klonierungsprodukte als Vergleich und Erfolgskontrolle.



**Abb. 5 Klonierungs-Übersicht (vereinfachte Darstellung)**

Der mammale Vektor wird durch Restriktionsenzyme beschnitten und linearisiert. Das „Gene of interest“ (Saporin, Dianthin) wird via PCR aus dem bakteriellen Vektor heraus amplifiziert. Vektor und Insert können schließlich ligiert werden. Hierfür müssen beide Komponenten zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten worden sein.

### 2.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen. Sie ist in der Gentechnik ein weitverbreitetes Tool und aufgrund ihrer simplen Handhabbarkeit nicht mehr wegzudenken. Kernstück der Reaktion ist das Enzym DNA-Polymerase, das in der Lage ist, einen DNA-Strang zu duplizieren und durch mehrere Durchgänge gar zu amplifizieren. Die PCR lässt sich in drei Reaktionsschritte aufteilen: Denaturierung, Annealing und Elongation. Nachdem der DNA-Strang durch eine hohe Temperatur in zwei Einzelstränge getrennt wird (Denaturierung), wird mit einer leichten Abkühlung die Anlagerung bzw. Hybridisierung komplementärer Primer an die Einzelstränge ermöglicht (Annealing). In der Elongationsphase, die im Temperaturoptimum der jeweiligen Polymerase stattfindet, ergänzt das Enzym die Primer zu vollwertigen Einzelsträngen und erzielt damit die Bildung eines neuen DNA-Doppelstranges.

Für das Abläufen der Reaktion waren neben einem Reaktionspuffer und Nucleotid-Bausteinen jene genannte Forward- und Reverse-Primer notwendig, die vorab mithilfe einer digitalen Software (PlasmaDNA, Helsinki, Finnland) designt und extern synthetisiert wurden (Metabion, Plannegg, Deutschland):

Saporin-PCR-Forward-Primer:	AGATCCATCGTCGGCATGGGACATCA
Saporin-PCR-Reverse-Primer:	ATTGCGGCCGCCTACTTTGGTTTGC
Dianthin-PCR-Forward-Primer:	TCCATTATCATTATGGGAGCCGCGGCCAC
Dianthin-PCR-Reverse-Primer:	TTGCGGCCGCTTACTTCGGTCTAC

Für eine erfolgreiche PCR und Klonierung mussten die Primer folgende Merkmale aufweisen:

- Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *XcmI* und *NotI*
- Startcodon (AUG) bei Forward-Primer
- Stoppcodon (CTA/TTA) bei Reverse-Primer
- Überlappungssequenz mit dem „Gene-of-interest“ (bei Reverse-Primer komplementär)
- Schmelztemperatur < Annealing-Temperatur
- Anteil der Basen GC im Primer bei 40 – 60%

Die designten Primer entsprachen den genannten Bedingungen:

Saporin:

5'Primer: 5' AGA T| CC ATC GTC GGC ATG G| GA CAT CA 3' GC 53,8 Tm 63,5  
 3'Primer: 5' ATT|GCGGCCGC|CTA CTT TGG TTT GC 3' GC 58,6 Tm 66,9

Dianthin:

5'Primer: 5' T|CC ATT ATC ATT ATG G|GA GCC GCG GCC AC 3' GC 55,2 Tm 65,3  
 3'Primer: 5' TT |GCGGCCGC|TTA CTCGGTCTAC 3' GC 58,3 Tm 63,2

XYZ : 5' Extension; beliebige Sequenz

|xxx| : Restriktionsschnittstelle

xxx : Startcodon (Forward -Primer)/Stoppcodon (Reverse -Primer)

xyz : Annealing-Sequenz; Überlappung mit dem „Gene of interest“

GC\* : GC – Anteil

Tm\* : Schmelztemperatur bei einer Primer-Konzentration von 0,25 µM

\* Berechnung mithilfe des OligoAnalyzer 3.1. [80]

Die PCR wurde entsprechend dem folgenden Protokoll und den Bedingungen ausgeführt:

**Tab. 1 PCR-Protokoll – Amplifizierung des Inserts**

	Volumen in µl	Endkonzentration
Nukleasefreies Wasser	ad 50	
5XPolyPuffer	10	1x
dNTP 10 mM	1	200 µM
Forward-Primer 10 µM	2,5	0,5 µM
Reverse-Primer 10 µM	2,5	0,5 µM
DNA (Saporin 563,2 ng/µl)	1	1,12 ng/µl
<u>oder</u> (Dianthin 725,2 ng/µl)	0,7	1,01 ng/µl
PhuPolymerase 2 u/µl	0,5	1,0 u/50 µl

Die Zugabe der Reagenzien erfolgte entsprechend der dargestellten Reihenfolge. Nach Vorlegen des Wassers werden Puffer, Primer, Nucleotide und DNA dem Reaktionsgemisch hinzugefügt. Das Enzym wird zuletzt zugegeben. Nach vorsichtigem Rühren des Gemisches erfolgte die PCR; u: unit/Einheit

**Tab. 2 PCR-Bedingungen –Amplifizierung des Inserts**

PCR-Bedingungen			
Initiale Denaturierung	98° C	30 Sekunden	
Denaturierung & Annealing	98° C	10 Sekunden	25 Zyklen
	72° C	30 Sekunden	
	72° C	20 Sekunden pro kbp*	
Finale Elongation	72° C	5-10 min	
Hold	4 – 10°C		

*Der doppelsträngige DNA-Strang wird durch Denaturierung (98 °C) aufgespalten. Nach einer leichten Abkühlung (72°C) können sich Primer an die Einzelstränge anheften. In der Elongationsphase (72°C) wird der Polymerase ermöglicht, die neuen Stränge mit den Nucleotiden zu ergänzen. Der Zyklus wird 25-mal wiederholt. \* kbp: kilo-Basenpaare des Vektors*

### 2.2.1.2. Gelelektrophorese

Durch Ansetzen einer elektrischen Spannung in einem Agarosegel können bei der Gelelektrophorese Proteine und Nukleinsäuren anhand ihrer Ladung und Größe aufgetrennt werden. In diesem Falle dient sie zur Auftrennung des in der PCR amplifizierten Inserts von nicht verwerteten Primern, DNA-Bruchstücken und Plasmiden. Die Elektrophorese wurde nach Beladen der Proben (versetzt mit DNA Loading Dye 6x, Biorad, Hercules, California, USA) in die Geltaschen des Agarosegels (1%, mit 1 µl DNA-Farbstoff (Roti-Safe Gel-Stain, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 30 min bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Nach Abbruch der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht untersucht und zur Größenbestimmung die Banden mit denen der mitgelaufenen DNA-Leiter (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA) verglichen.

### 2.2.1.3. DNA-Extraktion

Die aus dem Agarosegel herausgeschnittene Insert-Bande musste zur weiteren Verwendung aus dem Gel extrahiert und gereinigt werden. Für diesen Zweck wurde ein Gel-Extraktionskit (Zymo clean Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research Corp., Irvine, USA) verwendet und die in der

Anweisung beschriebenen Schritte befolgt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mithilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop ND-1000 Spektrometer, Peqlab) gemessen.

#### 2.2.1.4. Ligation in pJET-Vektor

Die aus der PCR erhaltenen DNA-Fragmente wiesen in der Regel keine ausreichende Konzentration auf, um eine Ligation durchzuführen, daher war eine weitere Amplifizierung notwendig. Für diesen Zweck wurden die Ansätze mithilfe eines Cloning-Kits (CloneJET PCR Cloning Kit, Life Technologies, Thermo Scientific) in einen pJET-Vektor ligiert, um diese mithilfe von *E.Coli*-Bakterien zu vermehren.

Für die Ligation liegt allgemein das optimale Insert-Vektor-Massenverhältnis bei 3:1, jedoch wurden zusätzlich weitere Verhältnisse (6:1 und 9:1) herangezogen. Für die Verhältnisberechnung spielen Vektor- und Insertlänge (in Basenpaaren, bp) eine wichtige Rolle:

**Tab. 3 Ligation in pJet-Vektor – Berechnung der Insertmassen**

	Saporin	Dianthin
Vektorlänge (CloneJET)	2974 bp	2974 bp
Insertlänge	818 bp	799 bp
Vektormenge	50 ng	50 ng
Insertmenge 3:1	41,26 ng	40,30 ng
Insertmenge 6:1	82,52 ng	82,60 ng
Insertmenge 9:1	123,78 ng	120,89 ng

Zur Berechnung der Insertmenge wurde ein Online-Tool der Universität verwendet [81]. Jene ist abhängig von je Vektor- und Insertlänge und dem gewünschten Massenverhältnis.

Die Komponenten wurden in der wie folgt dargestellten Reihenfolge miteinander vermengt. Es wurde vorsichtig gemischt und jeweils 10 min bei 22°C, 37°C und 65°C inkubiert. Der letzte Inkubationsschritt (65°C) diente der Inaktivierung des Enzyms, um eine übermäßige und unspezifische Ligation zu unterbinden.

Tab. 4 Ligation in pJet-Vektor – Protokoll

	Volumen
Nukleasefreies Wasser	ad 20 $\mu$ l
2X Ligationsspuffer	10 $\mu$ l
PCR-Produkt	Siehe
pJet1.2/blunt Cloning vector (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
T4 DNA-Ligase	1 $\mu$ l

Die Zugabe der Reagenzien erfolgte entsprechend der dargestellten Reihenfolge. Die für das Insert – Vektor – Verhältnis in berechnete Menge des Inserts wurde mit dem Bluntvektor, Ligationsspuffer und Wasser vermischt. Zuletzt wurde die T4 – Ligase zugegeben. Nach vorsichtigem Rühren der Lösung folgte die Inkubation.

### 2.2.1.5. Transformation

Nach dem Einbau in den pJet-Vektor war eine Amplifizierung mithilfe von Bakterien möglich. Dafür musste das Plasmid in die sich vermehrenden Bakterien eingeschleust werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transformation. Für diesen Schritt wurden *E.Coli*-Bakterien des Stammes Dh5 $\alpha$  (*E.Coli* Library Efficiency Dh5 $\alpha$  Competent cells) herangezogen, welche eine hohe Transformationseffizienz aufweisen. Das Wachstum dieser Bakterien wird auf einer mit einem Antibiotikum versetzten Agarplatte ermöglicht. Das Plasmid, das für die Vermehrung vorgesehen ist, muss für diesen Zweck das Gen für die Antibiotikaresistenz beinhalten, damit die transformierten Bakterien sich ungestört vermehren zu können. Andere – fremde – Bakterien werden durch das Antibiotikum abgetötet bzw. in ihrem Wachstum gehemmt, sodass es nur zur Ausbildung der gewünschten Kolonien (mit Plasmid) kommt. Das hierfür genutzte Prinzip wird als Selektion bezeichnet.

#### Durchführung:

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Dh5 $\alpha$ -Zellen wurden auf  $4^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und darauf mit 5  $\mu$ l des Ligationsspuffers versetzt. Auf eine halbe Stunde Inkubation bei weiterhin  $4^{\circ}\text{C}$  folgte ein 90-sekündiger Hitzeschock der Zellen bei  $42^{\circ}\text{C}$ . Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis ( $4^{\circ}\text{C}$ ) wurden 300  $\mu$ l LB-Medium (*lysogeny broth*) zugegeben und bei  $37^{\circ}\text{C}$  eine Stunde nochmals inkubiert. Nach der Inkubation wurden 300  $\mu$ l des Bakterien-Ansatzes auf der vorgewärmten Agarplatte (50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin) verteilt und im Brutschrank ( $37^{\circ}\text{C}$ ) für 16 h aufbewahrt. Am darauffolgenden Tag wurden die gewachsenen Bakterienkolonien jeweils mit einer Pipette abgestreift, in

4 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) gesetzt und nochmals 16 h bei 200 rpm und 37°C kultiviert.

### 2.2.1.6. Plasmidpreparation

Die trüben Bakteriensuspensionen wurden einer Plasmidpreparation (Plasmidextraktion) unterzogen. Hierfür wurde ein DNA-Isolierungs-Kit (Zyppy Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research Corporation, Irvine, USA) verwendet, um die Plasmide aus den Bakterien zu extrahieren, zu isolieren und zu reinigen. Die Durchführung entsprach der des Kit-Protokolls. Die Konzentrationsmessung der DNA zeigt nicht nur die Amplifizierung der DNA auf, sondern gibt ebenfalls erste Hinweise auf Reinheit und Identität des extrahierten Plasmids.

### 2.2.1.7. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau war als nächster Schritt in vielen Hinsichten obligat. In erster Linie galt es, die Identität des vermehrten und isolierten Saporin-/Dianthin-pJET-Plasmids zu bestätigen. Da zudem lediglich das in den pJet-Vektor eingebaute Insert für die weiteren Schritte benötigt wurde, musste dieses wieder aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Hierfür wurden die Restriktionsenzyme (*XcmI* & *NotI*) herangezogen, für welche die Schnittstellen mithilfe der Primer während der PCR in die Inserts eingebaut wurden. Ebenfalls wurde der pEgFP-n3-Vektor mit den gleichen Enzymen verdaut, um diese später mit den Inserts zu ligieren. Der pEgFP-n3-Vektor wurde zuvor via Transformation und Minipreparation amplifiziert.

**Tab. 5 Restriktionsprotokoll - Linearisierung des Vektors**

	Volumen/Menge
Nukleasefreies Wasser	ad 20 µl
10X Reaktionspuffer (NEB 2.1.)	2 µl
DNA	0,4 µg
<i>NotI</i>	0,2 µl
<i>XcmI</i>	0,2 µl

*Die Zugabe der Reagenzien erfolgte entsprechend der dargestellten Reihenfolge. Nach Vorlegen des Wassers wurden Reaktionspuffer und DNA zugegeben. Die Restriktionsenzyme wurden dem Reaktionsgemisch zuletzt hinzugefügt. Nach vorsichtigem Rühren der Lösung folgte die Inkubation.*

Einer einstündigen Inkubation bei 37° C folgte eine 20-minütige Inaktivierung der Restriktionsenzyme bei 65° C. Zur Kontrolle einer richtig abgelaufenen Restriktion sowie zur Trennung von nicht relevanter DNA wurde im Anschluss eine Kontroll-Elektrophorese (2.2.1.2) durchgeführt. Die benötigten DNA-Banden wurden analog wie in 2.2.1.3 beschrieben aus dem Gel extrahiert und gemessen.

### 2.2.1.8. Ligation in pEGFP-n3

Das Insert (Saporin/Dianthin) wurde mit dem Vektor (pEGFP-n3) gemäß dem unten beschriebenen Protokoll ligiert. Zur Sicherstellung eines ausreichenden ATP-Bedarfs wurde zusätzliches ATP dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Als Insert-Vektor-Verhältnis wurden 3:1 und 6:1 gewählt.

**Tab. 6 Ligation mammaler Vektor – Berechnung der Insertmassen**

	Saporin	Dianthin
Vektorlänge (pEgFP-n3)	4.003 bp	4.003bp
Insertlänge	797 bp	782 bp
Vektormenge	50 ng	50 ng
Insertmenge 3:1	29,87 ng	29,3 ng
Insertmenge 6:1	59,73 ng	58,6 ng

*Zur Berechnung der Insertmenge wurde ein Online-Tool der Universität verwendet [81]. Jene ist abhängig von je Vektor- und Insertlänge und dem gewünschten Massenverhältnis.*

Nach leichtem Vortexen des Reaktionsgemisches (Tab. 7) erfolgte eine einstündige Inkubation. Hier wurde jeweils alle 10 min die Reaktionstemperatur gewechselt – 20°C (Raumtemperatur) und 4°C (Eis). Anschließend folgte eine 20-minütige Enzymaktivierung bei 65°C.

**Tab. 7 Ligation mammaler Vektor – Protokoll**

	Volumen/Menge
Nukleasefreies Wasser	ad 10 $\mu$ l
10X Ligationspuffer	1 $\mu$ l
ATP	2 $\mu$ l
Vektor (p-EGFP-n3)	50 ng
Insert (Saponin, Dianthin)	Siehe Tab. 6
T4 Ligase	1 $\mu$ l

*Die Zugabe der Reagenzien erfolgte entsprechend der dargestellten Reihenfolge. Die für das Insert-Vektor-Verhältnis in Tab. 6 berechnete Menge des Inserts wurde mit dem p-EGFP-n3, Ligationspuffer und Wasser vermischt. Benötigtes ATP wurde ergänzt. Zuletzt wurde die T4-Ligase zugegeben.*

### **2.2.1.9. Transformation der Klonierungsprodukte**

Der Erfolg der durchgeführten Ligation wurde durch eine Transformation (2.2.1.5) bewiesen. Ein Wachsen transformierter Dh5 $\alpha$ -Kolonien bestätigte das Vorliegen einer Antibiotika-Resistenz und damit eines erfolgreich ligierten und intakten Plasmids. Neben den Klonierungsprodukten wurde für die weiteren Untersuchungen ein Plasmid mit dem Reportergen Luciferase benötigt. Es dient als hilfreiches Protein, welches durch Chemolumineszens in Zellen detektierbar ist. Das Plasmid besteht aus dem pCI-Vektor (pCI Mammalian Expression Vector, Promega), in welches das Luciferasegen bereits inkorporiert worden ist. Das Plasmid wurde ebenfalls in Dh5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Nach 16 h wurden gewachsene Kolonien der Ligationsprodukte (Saporin-Vektor/Dianthin-Vektor) und des Luciferasevektors entnommen und für weitere 16 h in LB-Medium inkubiert. Da der pEGFP-n3-Vektor eine Kanamycin-Resistenz trägt, wurde das Medium mit 30 mg/ml Kanamycin versetzt, der pCI-Vektor besitzt hingegen Ampicillin-Resistenz (50 mg/ml).

### **2.2.1.10. Kontrollverdau**

Ein Probeverdau diente dazu, die Identität der DNA zu ermitteln. Durch Restriktion des Plasmids mit den bereits verwendeten Restriktionsenzymen war der Vektor und das eingefügte Insert bei ihren jeweiligen Basenpaarlängen zu erwarten (Vektor: 4.003 bp; Insert: 797 und 782 bp). Der Verdau wurde wie die bereits beschriebene Restriktion (2.2.1.7) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde auf 10  $\mu$ l reduziert, um den Verbrauch an DNA zu verringern.

### 2.2.1.11. Gen-Sequenzierung

Die Plasmide wurden einer Sequenzierung unterzogen, um das Vorliegen der gewünschten Sequenz zu prüfen. Im Verlaufe der Klonierung können zudem Mutationen stattgefunden haben, welche zur Veränderung des Leserhythmus (*open-reading-frame*) geführt haben könnten. Eine daraus resultierende veränderte, gestörte oder ausbleibende Expression wären mögliche Folgen. Ein möglicher Trigger solcher Mutationen ist eine lange UV-Exposition während der Geluntersuchung und des Herausschneidens der DNA. Für die Sequenzierung wurden zwei geeignete Sequenzierungsprimer herangezogen, die das relevante Gen im Plasmid miteinschließen. Somit erhielt man mit Durchführung einer PCR eine DNA-Sequenz des Gens in 3' – 5'-Richtung und eine Sequenz des komplementären DNA-Strangs in 5' – 3'-Richtung. Der Erhalt zweier DNA-Sequenzen war insofern nötig, als dass das Nukleotidsignal mit steigender Sequenzlänge ungenauer wird und eine Identifizierung erschwert werden würde.

**Tab. 8 Sequenzierungs- PCR – Bedingungen**

PCR-Bedingungen			
Initiale Denaturierung	96° C	1 min	
Denaturierung & Annealing	96° C	10 s	25 Zyklen
	55° C	5 s	
Elongation	60° C	4 min	

Nach einer initialen Denaturierung (96°C) der Doppelstrang-DNA, ermöglichte eine Abkühlung (55°C) ein Binden der Primer an die gebildeten Einzelstränge. Die DNA-Polymerase ergänzt mithilfe der applizierten Nucleotide die Primer zu vollwertigen Einzelsträngen (60°C). Der Zyklus wird 25-mal wiederholt.

**Tab. 9 Sequenzierungs-Protokoll**

	Volumen in µl
Nukleasefreies Wasser	4,5 µl
BigDye Terminator 5X Sequencing Buffer	2 µl
Primer	1 µl
Plasmid DNA	1 µl
Big Dye Terminator Mix	1,5 µl

Die für die Sequenzierung notwendigen Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge miteinander vermengt. Mit Zugabe der DNA-Polymerase (Big Dye Terminator Mix) wurde die PCR-Sequenzierung gestartet.

Die Produkte wurden mit einer NucleoSEQ- Lösung aufgereinigt. Nach einer Vakuumzentrifugation (RT, 15 min) wurden jedem PCR-Produkt 25 µl Hi-Di Formamid (10%) als Resuspensie-

rungsreagenz zugegeben. Die Proben wurden in Sequencing-Tubes gefüllt und bis zur Sequenzierung bei 4°C gelagert.

#### **2.2.1.12. DNA-Amplifizierung**

Im Laufe der Dissertation war für die Durchführung diverser Assays eine mehrfache Amplifizierung der Suizidgen-Plasmide (Saporin-DNA, Dianthin-DNA) sowie Reporter-gen-Plasmide (GFP-DNA, Luciferase-DNA) notwendig. Während eine Minipräparation für die Zwecke der Klonierung noch ausreichend war, wurde für hinsichtlich einer Zeit- und Aufwandsersparnis eine Maxipräparation (ZymoPURE™ Maxiprep Kit, Zymo Research Corp.) ausgeführt, die eine DNA-Menge in größerem Maßstab (ca. 500 µg) bereitstellte. Dabei bezog man sich stets an die Anwendungsbeschreibung des Herstellers.

#### **2.2.2. Saponinisolierung**

Im Laufe der Dissertation konnten mithilfe verschiedener Aufreinigungs- und Isolationsmethoden aus den Pflanzen *Saponaria officinalis* L. und *Gypsophila elegans* M.Bieb. neuartige Saponine mit transfektionsverstärkenden Eigenschaften aufgedeckt und untersucht werden. Die in 1.5 beschriebene aktivitätsgeleitete Isolationsstrategie diente hierbei als essentielle Hilfe für das Auffinden jener potenten Saponine. Die Methoden zur Isolation von SO1861 und GE1741 werden im Nachfolgenden dargestellt. Die strukturelle Aufklärung von SO1861 mittels NMR-Spektroskopie wurde von *Sama et al.* [68] detailliert beschrieben.

Die Saponinisolierung sowie die strukturelle Charakterisierung erfolgten in Kooperation mit Dr. Alexander Weng (Freie Universität Berlin), Dr. Gerold Jerz (Technische Universität Braunschweig) und Dr. Peter Schmieder (Leibniz Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie, Berlin).

### 2.2.2.1. SO1861-Isolation

Die getrockneten Wurzeln von *Saponaria officinalis* L. wurden von Kräuter- und Wurzel-Sepp (München, Deutschland) erworben. Die Wurzeln wurden gemahlen, nach Zugabe von 90%igem Methanol wurde ein Rohextrakt erhalten. Das Methanol wurde via Vakuumdestillation evaporiert. Gekühltes Aceton (4°C) wurde im Verhältnis 1:1 (v/v) zugegeben und die Lösung anschließend zentrifugiert. Das weiße Präzipitat wurde luftgetrocknet und schließlich in 30%igem Methanol auf eine Konzentration von 30 mg/ml gelöst. Nach Ultraschallbad und Filtration (0,22 µm) wurde ein semi-präparative HPLC mit einer Ultrasep ES Pharma RP18, 5 µm, 250 × 4 mm, Säule (Dr. Maisch, Ammerbuch, Deutschland) durchgeführt. Ein Wasser (0,01% TFA)/Methanol (B) Gradient wurde für 50 min von 30% zu 70% B und schließlich für 20 min von 70% zu 30% (B) verwendet. Die Durchflussrate betrug 1,5 ml/min, die Detektionswellenlänge lag bei 210 nm. Der Peak bei Rt (Retentionszeit) ~ 60 min wurde gesammelt und einer weiteren semi-präparativen HPLC mit einer Kinetex, 5 µm C18, 100 Å, 250 × 10 mm Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) unterzogen. Die Isolation wurde mit einem Wasser (0,01% TFA)/Acetonitril (B) Gradienten durchgeführt, beginnend mit 30% zu 49% B für 24 min und schließlich von 49% zu 30% B für 8 min. Die Durchflussrate lag bei 4 ml/min, mit einer Detektionswellenlänge bei 210 nm. Der Peak mit der Rt ~ 16,5 min wurde aufgefangen. Mehrere Isolationszyklen wurden wiederholt. Das Acetonitril wurde via Vakuumdestillation entfernt, die verbliebene wässrige Phase wurde gefriergetrocknet. Insgesamt 40,1 mg SO1861 wurde erhalten. SO1861 (Rt 16,5 min) wurde via LC-ESI-MS/MS (Q-TOF) analysiert, eine Kinetex, 2,6 µm C18, 100 Å, 100 × 4.6 mm Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) auf ein UPLC-Synapt G2-S HMDA System (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) wurde dabei verwendet. Ein Wasser (0,01% TFA)/ Acetonitril (B) Gradient wurde angewendet, beginnend von 30% zu 45% (B) für 18 min. Die Durchflussrate betrug 0,5 ml/min, 10 µl wurden injiziert. Alle Parameter wurden einer maximalen Häufigkeit der relativen [M-H]<sup>-</sup> angepasst. Die MS<sup>n</sup>-Analyse wurde offline mithilfe eines Ionen Amazon Speed ETD Ion Trap Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) durchgeführt.

### 2.2.2.2. GE1741-Isolation

Samen der *Gypsophila elegans* M.Bieb. wurden in einem Feld in Brandenburg, Deutschland (52° 45' 24.509" N 13° 24' 34.189" E) angepflanzt. Die reifen Pflanzen wurden geerntet und geschnitten. Die verbliebenen Pflanzenteile wurden gefriergetrocknet und die Samen (ca. 1 mm Durchmesser) wurden durch Sieben gesammelt. Die Wurzeln wurden gewaschen, gefriergetrocknet und zu Pulver vermahlen. Das Pulver wurde mit 90%igem Methanol extrahiert. Nach anschließender Filtrierung wurde das Methanol via Vakuumdestillation entfernt. Der übrige wässrige Extrakt wurde schließlich gefriergetrocknet (Trockenextrakt). Dieser wurde wiederum in 30%igem Methanol auf eine Konzentration von 60 mg/ml gelöst. Die Lösung (je 0,5 ml) wurde einer semi-präparativen HPLC unterzogen. Eine Kinetex® 5 µm C18 100 Å, LC Säule, 250 x 10,0 mm und ein Methanol(A)/Wasser, 0,01% TFA (B) Gradient wurde für 20 min von 30% zu 90% (A) und für 10 min zu 30% (A) verwendet. Die Durchflussrate betrug 4 ml/min. Die Detektionswellenlänge lag bei 210 und 300 nm. Die Peaks P1 – P4 der Retentionszeit (Rt) ~ 18 min – ~ 20 min wurden gesammelt. Eine Reihe von Isolationszyklen wurden wiederholt, die gesammelten Peaks jeweils ge-“poolt“. Das Methanol wurde via Vakuumdestillation evaporiert und das verbliebende Wasser mithilfe der Gefriertrocknung entfernt. Die Proben wurden mit dem Agilent 6200 Series Q-TOF LC/MS System analysiert. Für analytische Zwecke wurde eine Kinetex® C18 Säule, 2,6 µm, 100 Å und ein Acetonitril (A)/Wasser (B) Gradient mit 0,01% Ameisensäure verwendet, beginnend mit 30% bis 70% (A) für 30 min. Das getrocknete Material von P2 wurde in 50% Acetonitril auf eine Konzentration von 4 mg/ml gelöst. Die Lösung (je 0,5 ml) wurde einer semi-präparativen HPLC unterzogen. Eine Kinetex® 5 µm C18 100 Å, LC Säule, 250 x 10,0 mm und ein Acetonitril (A)/Wasser, 0,01% TFA (B) Gradient wurde für 24 min von 30% zu 50% (A) und für 1 min zu 30% (A) verwendet. Die Durchflussrate betrug 4 ml/min. Die Detektionswellenlänge lag bei 210 nm. Der Peak wurde bei Rt ~ 18 min gesammelt. Mehrere Zyklen wurden ausgeführt. Das Acetonitril wurde via Vakuumdestillation evaporiert und das verbliebene Wasser mithilfe der Gefriertrocknung entfernt. Das trockene Material wurde in 50%igem Acetonitril gelöst und einer HPLC unterzogen (0,5 ml pro Lauf), eine Ultrasep ES PEO, Säule, 250 × 4 mm, 5 µm wurde hierfür herangezogen. Die Probe wurde mit 5%igem Acetonitril aufbereitet. Die Polarität des Lösungsmittels wurde abrupt durch einen Acetonitril (A)/Wasser, 0,01% TFA (B) Gradienten geändert, beginnend mit 100% bis hin zu 5% (A) von Minute 1,25 min zu 21 min. Die Detektionswellenlänge lag bei 210 nm, die Durchflussrate bei 1

ml/min. GE1741 wurde bei Rt ~ 4-6 min aufgesammelt. Das Acetonitril wurde via Vakuumdestillation entfernt. Nach Gefriertrocknung wurde GE1741 als weißes Pulver erhalten.

Die Samen wurden gemahlen und mithilfe einer Soxhletextraktion unter Verwendung von Petrolether entfettet. Das entfettete Samenmaterial wurde mit 90%igem Methanol extrahiert. Das Methanol wurde via Vakuumdestillation entfernt und der verbliebene Extrakt wurde einer Gefriertrocknung unterzogen (Samentrockenextrakt). Der Samenextrakt wurde analog zum Wurzelextrakt via LC/MS analysiert.

### 2.2.3. Liposomenherstellung

Die für die Nanoplexcharakterisierung und Transfektion zu verwendenden Liposomen wurden nach den Herstellerempfehlungen von Avanti Polar Lipids hergestellt [82]. Je 5 mg DOPE und DOTMA (1:1, m/m) wurden in einem 5 ml Rundkolben in Chloroform gelöst. Das Chloroform des DOPE/DOTMA-Gemisch wurde mithilfe eines Rotationsverdampfers bei 40°C und schrittweise abnehmenden Druck (p480 → p0) bis zur Trockene und einer Sichtbarkeit eines weißen Liposomenfilms am Kolbenrand abgedampft. Der Film wurde vollständig mit Wasser benetzt und über Nacht bei 4°C gelagert. Die Liposomensuspension wurde am Folgetag einem 10-minütigen Ultraschallbad unterzogen, wobei auf stetige Kühlung geachtet werden musste (4°C). Zuletzt wurde die Liposomenlösung mithilfe eines Extruders (Avestin Liposofast™ extruder, AVESTIN Europe, Mannheim, Deutschland) auf eine einheitliche Größe (100 nm -Filter) homogenisiert. Die Extrusion wurde gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt (Avestin Liposofast™ extruder, Mannheim, Deutschland).

### 2.2.4. Nanoplexcharakterisierung

Für die Transfektionsuntersuchungen sollten als DNA-Vehikel dienende Nanoplexe formuliert und charakterisiert werden. Sie müssen hinsichtlich ihrer Handhabbarkeit, Stabilität und Targeting geeignet sein, eine verlässliche und reproduzierbare Transfektionsmethode - sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* – darzustellen. Für die Formung der Partikel kommen kationische Peptide, Polymere oder Lipide in Frage, welche aufgrund ihrer positiven Ladung ein Gegenstück zur negativ

geladenen DNA darstellen. Dabei nimmt das Massenverhältnis der einzelnen Komponenten – und daraus resultierend – die *N/P-ratio* (Verhältnis N-Atome pro Phosphat, Messgröße des Ladungsverhältnisses) – eine wichtige Rolle ein. Sie entscheidet maßgeblich über die Stabilität, Aufnahmefähigkeit und die Fähigkeit des Zelleintritts der Nanoplexe. Im Folgenden wurden jene für die Charakterisierung notwendigen Methoden beschrieben, die eine hinreichende Aussage über die oben genannten Voraussetzungen geben.

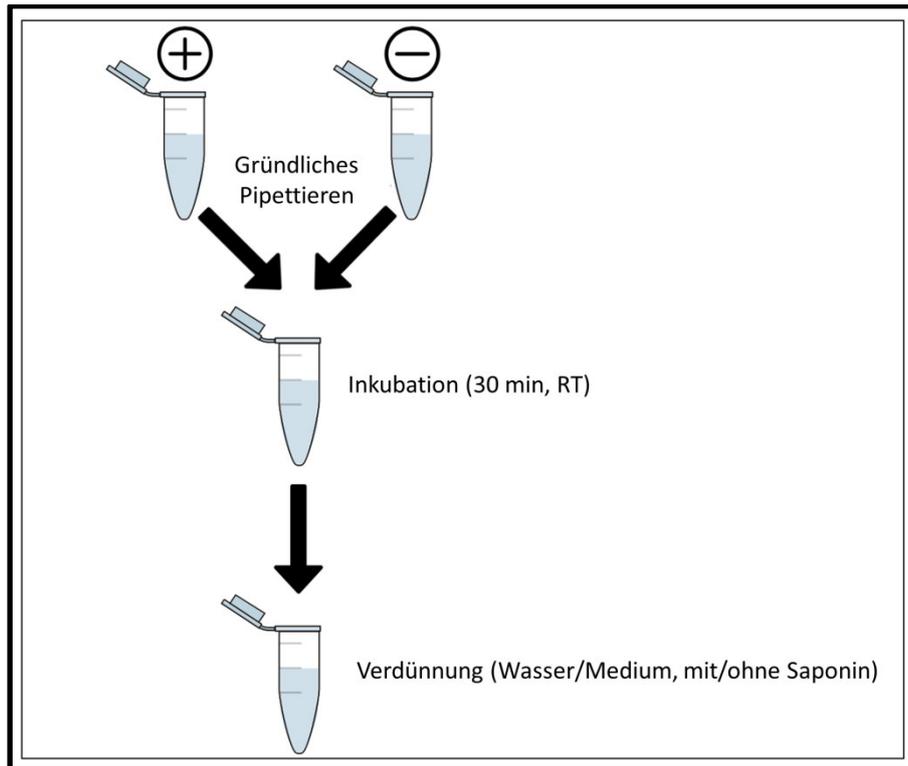
#### 2.2.4.1. Nanoplexformulierung

Die Nanoplexkomponenten wurden durch einfaches Pipettieren in dem jeweiligen Massenverhältnis gründlich miteinander gemischt. Enthielten die Nanoplexe mehrere positiv geladene Bestandteile, wurden diese vorher miteinander vermengt und schließlich mit den Nukleinsäuren vereinigt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Nanoplexsuspension – je nach durchgeführtem Assay – mit Wasser oder Transfektionsmedium verdünnt. Saponine wurden, falls notwendig, zuvor dem Verdünnungsmittel (Wasser, OptiMEM-Medium) beigegeben. Bei der Formulierungsmethode wurde auf die Beschreibung von *Weng et al.* 2015 [63] und hinsichtlich der Massenverhältnisse bzw. des *N/P-ratios* der Nanoplexe auf vergangene Studien [63,83,84] Bezug genommen. Im Laufe der Dissertation wurden folgende Nanoplexe formuliert und getestet:

Tab. 10 Formulierte Nanoplex-Partikel im Rahmen der Dissertation

Abkürzung	1. Komponente	2. Komponente	Nukleinsäure	Verhältnis
<b>PD</b>	Poly-Lysin-„K16“-Peptid		Plasmid-DNA	4:1
<b>PLD</b>	Poly-Lysin-„K16“-Peptid	DOPE/DOTMA	Plasmid-DNA	4:0,5:1
<b>LD</b>	DOPE/DOTMA		Plasmid-DNA	4:1
<b>PEID</b>	Polyethylenimin		Plasmid-DNA	5:1
<b>YD</b>	Rezeptorbindungsmotiv- <b>PD</b>		Plasmid-DNA	4:1
<b>FITC-PD</b>	FITC- Poly-Lysin-„K16“-Peptid		Plasmid-DNA	4:1
<b>FITC-YD</b>	FITC- Rezeptorbindungsmotiv- <b>PD</b>		Plasmid-DNA	4:1
<b>Pm</b>	Poly-Lysin-„K16“-Peptid		mRNA	4:1
<b>PM</b>	Poly-Lysin-„K16“-Peptid		Plasmid-DNA	4:1
<b>YM</b>	Rezeptorbindungsmotiv- <b>PM</b>		MiniCircle-DNA	4:1

Die Zusammensetzung der Partikel, die jeweilige Abkürzung und ihr Massenverhältnis sind zum Zwecke einer besseren Übersichtlichkeit abgebildet; FITC: Fluoresceinisothiocyanat, Rezeptorbindungsmotiv (Sequenz: GACYGLPHKFCG) nach Tagalakis et al. [70]



**Abb. 6 Vereinfachtes Schema der Nanoplexformulierung**

Die positiv und negativ geladenen Komponenten wurden zusammengegeben und durch mehrmaliges hin- und her-pipettieren gut durchmischt. Nach 30-minütiger Inkubation konnte eine Verdünnung mit Medium oder Wasser erfolgen.

#### 2.2.4.2. Zetapotential & Partikelgröße

Die Nanoplexe wurden wie in 2.2.4.1. detailliert beschrieben mit einer DNA-Masse von 5  $\mu\text{g}$  formuliert (Tab. 11). Ausgewählte Massenverhältnisse wurden getestet, auf frühere Publikationen wurde dabei Bezug genommen [63,83,84]. Die Nanoplexsuspension wurde mit Wasser auf 1 ml verdünnt und in eine Zetasizer-Küvette transferiert. Bei 25°C und einer Äquilibrierungszeit von 10 s (Partikelgröße) oder 120 s (Zetapotential) wurde eine dreifache Messung von Größe, PDI (Polydispersitätsindex) und Zetapotential vorgenommen. Zusätzlich bestimmte man Größe, PDI und Zetapotential der einzelnen Komponenten.

**Tab. 11 Nanoplexformulierung - getestete Massenverhältnisse**

	<b>Massenverhältnis</b>
<b>PD</b>	4:1
<b>PEID</b>	5:1
<b>LD</b>	4:1
<b>PLD</b>	4:0,5:1

Die aus der Literatur ermittelten Massenverhältnisse der formulierten Nanoplexe wurden im Hinblick auf Größenverteilung, PDI und Zetapotential getestet.

### **2.2.4.3. Elektronenmikroskop**

PD-Nanoplexe mit einer DNA-Menge von 1 µg wurden nach der Formulierung (2.2.4.1) mit Wasser verdünnt (1 ml). 10 µl wurden auf eine Silikonscheibe übertragen und über Nacht getrocknet. Die elektronenmikroskopischen Messungen wurden mit einem Hitachi SU8010 oder Hitachi SU8030 High Resolution SEM (Hitachi, Tokio, Japan) durchgeführt.

### **2.2.4.4. Gel Retention Assay**

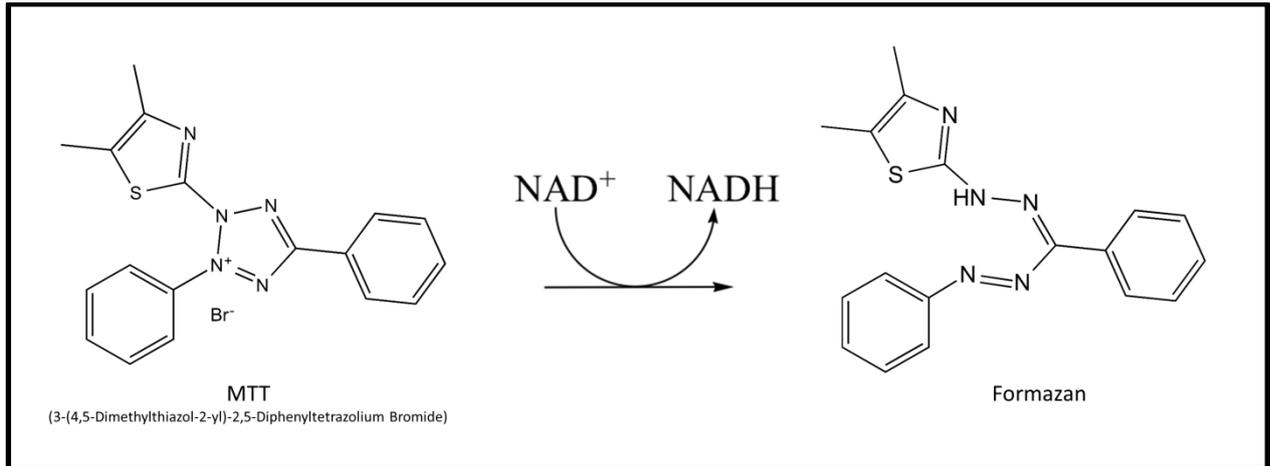
Um die Komplexierung der DNA in die Nanoplexe visuell darzustellen, wurde ein Gel-Retention-Assay durchgeführt. Wird durch die Nanoplex-Formulierung die DNA effizient komplexiert, so sind die auf das Agarosegel applizierten Nanoplexe nicht in der Lage sich während der Gelelektrophorese auf dem elektromagnetischen Feld zu gerichtet zu bewegen, da die negativ geladene DNA durch die Formulierung erreichte kationische Kompensierung nach außen hin neutral erscheint. Die DNA wird demnach „zurückgehalten“ (*retention*). Zudem wurde der Einfluss von SO1861 auf die Integrität der Partikel beobachtet. Hierfür wurden verschiedene Nanoplexe (PD, YD, LD, PEID und PLD) formuliert (2.2.4.1) und jeweils mit und ohne SO1861 (2,5 µg/ml) enthaltendem Wasser verdünnt. Als Kontrolle diente eine wässrige, freie DNA-Lösung. Die Nanplexsuspensionen wurden schließlich einer Gelelektrophorese (1% Agarose) unterzogen (100 V). Die finale DNA-Konzentration pro Probe war 500 ng. Die Banden wurden mit Ethidiumbromid (0,5%ige Lösung) sichtbar gemacht.

#### **2.2.4.5. DNA-Komplexierungsassay**

Zur quantitativen Bestimmung der Komplexierungseffizienz wurde ein fluorimetrisches Assay herangezogen. Die hierbei gemessene Fluoreszenzmessung ist abhängig davon, wie stark die DNA durch die Nanoplexe komplexiert wurden. Eine geringe Fluoreszenzintensität deutet auf eine effiziente Komplexierung hin, da dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff ein Zugang zur komplexierten DNA nicht ermöglicht würde. Analog zu 2.2.4.4 wurden die Nanoplexe (PD, YD, LD, PEID, PLD) sowie eine Lösung freier DNA hergestellt. Jede Probe wurde mit jeweils ohne (0 µg/ml), der Arbeitskonzentration (2,5 µg/ml) und einer vergleichsmäßig hohen Konzentration (20 µg/ml) SO1861 versetzt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde zu jeder Probe 550 µl 200-fach verdünnte Quant-iT PicoGreen dsDNA – Lösung (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) zugegeben. Die finale DNA-Konzentration pro Probe war 500 ng in einem Volumen von 100 µl. Die Fluoreszenz wurde mit dem TECAN F200 infinite in Triplikates gemessen (Ex/Em: 485/533). Die freie DNA-Lösung diente hierbei zum Vergleich und stellte eine 100%ige Fluoreszenz und 0%ige Komplexierung dar. Die Fluoreszenzwerte sind proportional zur freien DNA-Menge und antiproportional zur Komplexierung.

#### **2.2.5. MTT-Assay**

Der MTT-Test ist eine weit verbreitete Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität. Dabei wird sich die Fähigkeit lebender Zellen zu Nutze gemacht, mithilfe der Mitochondrien aus wasserlöslichen Tetrazoliumsalzen (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, MTT) wasserunlösliche Formazanprodukte zu generieren. Gelöst in Lösungsmittel wie DMSO, ist eine Absorptionsmessung des Formazans möglich, das durch einen direkten Zusammenhang eine Aussage über die Viabilität der Zellen wiedergibt.



**Abb. 7 MTT-Assay - Umsetzung von MTT zu Formazan**

Die Anwesenheit von zellulären Mitochondrien ermöglicht die Umsetzung von MTT zu Formazan. Somit besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Formazan und Zellatmung betreibenden Organismen, woraus sich die Viabilität ableiten lässt.

### 2.2.5.1. Zellzahlbestimmung (an Neuro-2A-Zellen)

Für die Durchführung von Zytotoxizitätsassays ist eine Zellzahlbestimmung notwendig, um den optimalen Zeitpunkt für die Reagenzzugabe zu definieren. Zellkulturen folgen einem sigmoidalen Verlauf. Nach Aussaat der Zellen beginnt nach einer bestimmten Zeit ein exponentieller Anstieg der Zellzahl, welcher schließlich in einem Plateau mündet. Der optimale Zeitpunkt für eine Reagenzzugabe stellt die beginnende Proliferationsphase dar. Um diese Zeit zu bestimmen, wurden eine Reihe verschiedener Zellzahlen in eine 96-Well-Platte eingesät und mittels MTT-Test zu verschiedenen Zeitpunkten die Viabilität gemessen. Mit den erhaltenen Ergebnissen waren eine Darstellung einer Wachstumskurve (Absorption-Zeit-Diagramm) und damit eine Bestimmung der passenden Zellzahl möglich. Jede Zellzahl (1.000, 2.000, 3.000, 5.000, 7.500, 10.000) wurden in jeweils Spalten aufgetragen. Vier 96-Well-Platten wurden erstellt, da es 4 verschiedene Entnahmezeitpunkte gab: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h. Zu jenen erwähnten Zeitpunkten wurde die Absorption gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Aus jeder getesteten Zellzahl konnte eine entsprechende Wachstumskurve gebildet und somit die optimale Zellzahl bestimmt werden.

### Durchführung:

1. Zellen in die Platte geben
2. Platten inkubieren (37°C und 5% CO<sub>2</sub>)
3. Nach entsprechender Inkubationszeit Kulturmedium entfernen
4. Zugabe von 180 µl MTT-Lösung\*/Well (0,5 mg/ml im Kulturmedium)
5. 45-minütige Inkubation (37° und 5% CO<sub>2</sub>)
6. Entfernen des Kulturmediums
7. Lösen des unlöslichen Formazans mit 100 µl DMSO /Well
8. 5-minütiges Schütteln
9. Absorptionsmessung (560 nm, Abzug der Referenzwerte, 620 nm)

#### **2.2.5.2. Saponin-Eigentoxizitätsbestimmung (SO1861, SA1641)**

Saponine zeigen ab einer spezifischen Konzentration zelltoxische Effekte auf, indem sie die Zellmembran permeabilisieren und somit einen Zelltod induzieren. Da jedes Saponin unterschiedliche Eigenschaften und Wirkstärken besitzt, ist jene spezifische Konzentration jeweils individuell zu bestimmen. Um von den transfektionsverstärkenden Eigenschaften größtmöglichen Gebrauch zu machen und gleichzeitig eine toxische Wirkung zu vermeiden, wurde die höchste nicht toxische Konzentration der Saponine bestimmt.

Die in 2.2.5.1 bestimmte Zellzahl wurde in 96-Well-Platten eingesät und die entsprechenden Saponinkonzentrationen (SO1861, SA1641 mit je 0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml) nach 24-stündiger Inkubationszeit zugesetzt. Die Absorptionsmessung wurde analog zu 2.2.5.1 durchgeführt. Die berechnete Viabilität wurde mit der Negativkontrolle (100% Viabilität) verglichen und per U-Test auf Signifikanz geprüft.

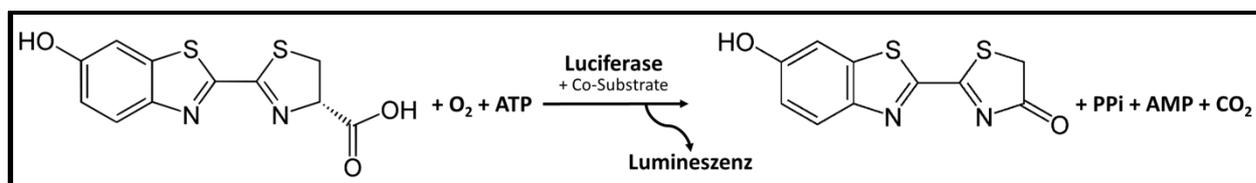
### Anmerkung:

Für alle weiteren Saponine, die im Laufe dieser Dissertation getestet wurden, wurde auf eine Bestimmung der höchsten nicht toxischen Konzentration verzichtet. Jene Saponine wurden im Laufe der Saponinscreenings (2.2.7.1.1) in mehreren Konzentrationen getestet, um eine Aussage

über das Potenzial zu treffen. Hochpotente Saponine wurden im Rahmen der Impedanzmessungen nochmals (2.2.8.2) auf ihre Toxizität getestet.

### 2.2.6. Lumineszenz Assay

Zur Bestimmung der Effektivität getesteter Transfektionsmethoden ist eine Quantifizierung des aus der Transfektion resultierenden Signals notwendig. Für diesen Zweck bedient man sich sogenannter Reportergene, die nach Transfektion in die eukaryotische Zelle zur Expression eines Proteins führen, welche durch vorhandene Assays mess- und quantifizierbar sind. Eine klassische Methode stellt das Luciferase-Assay dar. Die Methode basiert auf einer Lumineszenz-Messung. Durch das Enzym Luciferase, einer Oxygenase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* L. oder *Renilla reniformis* PALL., wird eine Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert und damit Licht freigesetzt. Wird durch eine erfolgreiche Transfektion Luciferase exprimiert und verabreicht man Substrat (Luciferin) und zur Reaktion erforderliche Co-Substrate zu den zuvor aufgeschlossenen Zellen, ist eine Quantifizierung der Lumineszenz und damit der Transfektion möglich.



**Abb. 8 Luciferase Assay - Lumineszenz durch Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin**

Um die Reaktion zu gewährleisten, ist neben Substrat und ATP der Zusatz von Co-Substraten wie  $MgCO_3$ ,  $MgSO_4$ , Tricine, DTT und EDTA nötig. Durch die Umsetzung zu Oxyluciferin wird Licht freigesetzt, dessen Intensität gemessen werden kann.

Für das beschriebene Assay sollten verschiedene Nanoplexe (Gen: Luciferase) formuliert und Neuro-2A-Zellen appliziert werden. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde die Lumineszenz gemessen. Um eine Anschaffung eines Luciferase-Assay-Kits zu umgehen, wurden die Reagenzien (Luciferin und Co-Substrate) gemäß *Siebring-van Olst et al.* 2012 [85] hergestellt und in den entsprechenden Konzentrationen eingesetzt.

**Tab. 12 Luciferase Assay – Reagenzien**

	Konzentration (Stammlösung)	Konzentration (Experiment)
D-Luciferin	25 mM	250 µM
Tricine	200 mM	20 mM
ATP	25 mM	250 µM
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	2,67 mM
MgCO <sub>3</sub>	1,89 mM	1,07 mM
DTT	500 mM	17 mM
EDTA	10 mM	100 µM

Die für das Lumineszenz Assay benötigten Reaktionsreagenzien wurden vor Zellapplikation miteinander vermengt und entsprechend verdünnt. Die Zugabe von D-Luciferin zum Reagenz erfolgte zuletzt.

Die in 2.2.5.1 bestimmte Zellzahl wurden in eine schwarze 96-Well-Platte ausgesät und 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. PD- (2:1,4:1,6:1), LD-, PLD-, YD- Nanoplexe wurden gemäß 2.2.4.1 formuliert und mit OptiMEM-Medium ± SO1861 (2,5 µg/ml) verdünnt. Nach der 24-stündigen Inkubationszeit wurde das Kulturmedium durch das Transfektionsmedium ersetzt. Pro Well wurden den Zellen 100 ng DNA appliziert. Auf eine weitere 48h-Inkubationsphase folgten das Entfernen des Transfektionsmediums und ein 30-minütiges Einfrieren bei -80°C. Nach Aufwärmen auf Raumtemperatur (25°C) wurde das bereits vereinigte Reagenz (Tab. 12) in einem Volumen von 100 µl auf jedes Well gegeben. Die Wellplatte wurde 5 s orbital geschüttelt, anschließend wurde die Lumineszenz jedes einzelnen Wells gemessen.

### 2.2.7. Fluoreszenz-Assays

Fluoreszenzbasierte Assays nehmen in der Forschung einen hohen Stellenwert ein. Fluoreszierende Proteine, Reportergene wie GFP (*green fluorescent proteine*) oder Fluoreszenzmarker bieten aufgrund ihrer qualitativen, als auch quantitativen Detektierbarkeit eine Reihe an Anwendungsmöglichkeiten auf. Durch den Einsatz eines GFP-Reportergens sollen essenzielle Erkenntnisse in Hinsicht auf Transfektionseffizienz und -mechanismus gewonnen werden.

Die Transfektionsmethode der Fluoreszenzassays kann wie folgt beschrieben werden:

1. Aussaat der Zellen in eine transparente 24-Well-Platte
2. 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>
3. Formulierung der Nanoplexe nach 2.2.4.1
4. 30 min Inkubation bei RT
5. Verdünnung der Nanosuspension mit OptiMEM (±Saponin)
6. Entfernen des Kulturmediums
7. Zugabe des Transfektionsmediums
8. 48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>
9. Messung

Pro Well wurde eine Menge von 500 ng DNA/RNA appliziert.

#### Anmerkung:

Bei den folgenden Fluoreszenz-Assays (Messung der Transfektionseffizienz und Mikroskopie) war im Voraus keine Zellzahl zu bestimmen. Da ungleich dem Luciferase- und MTT-Assay kein absoluter Wert gemessen wurde, sondern Analyse einzelner Zellen vorgenommen wurde, musste lediglich eine ausreichende kleine Zellzahl zur Vermeidung einer Konfluenz ausgewählt werden. Aufgrund von Erfahrungswerten, Zellwachstumsrate und entsprechend der Wellbodenfläche wurde für 24-Well-Platten pro Well eine Zellzahl von 15.000 – 40.000 Zellen eingesät.

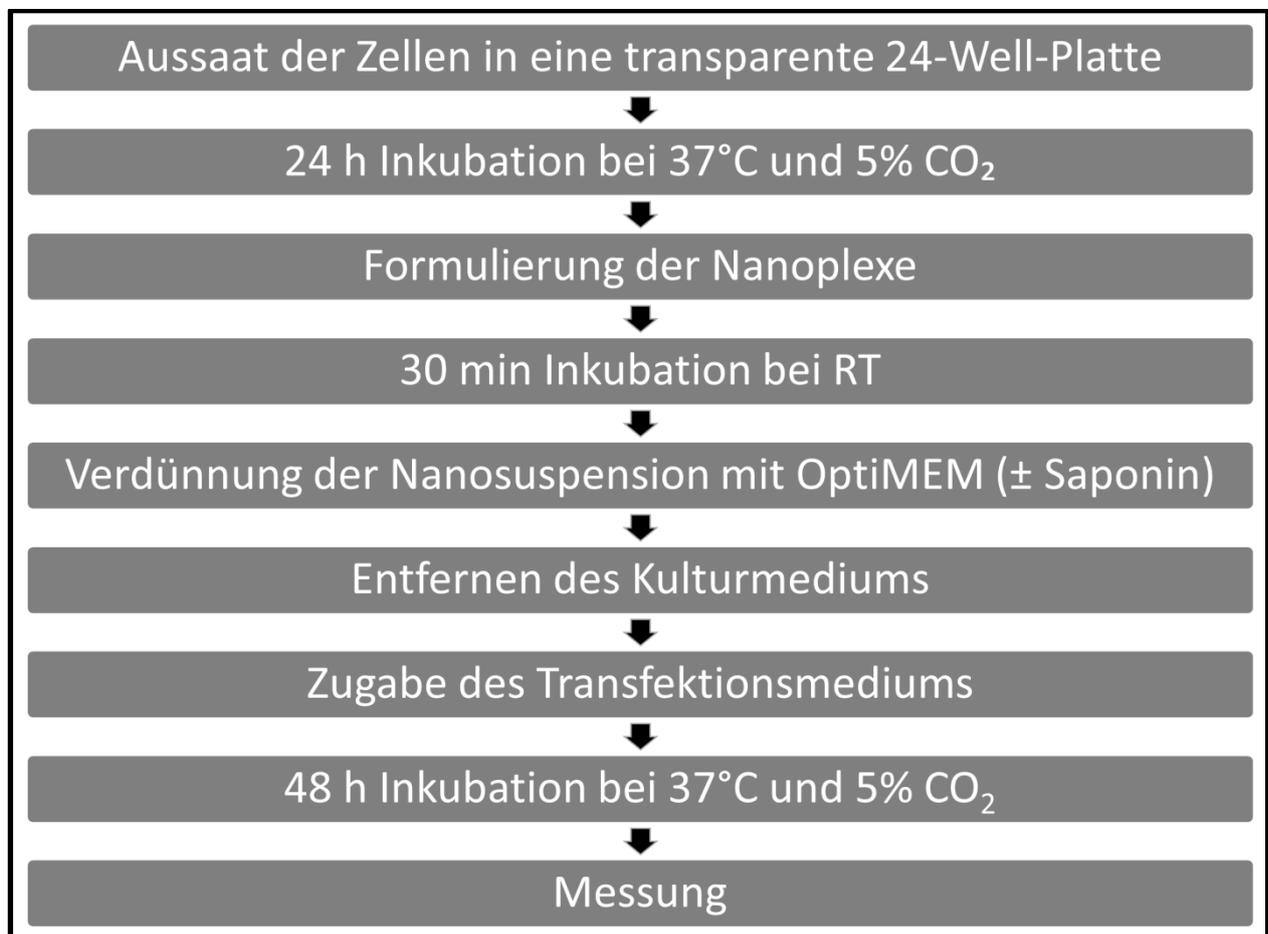
#### **2.2.7.1. Durchflusszytometrie**

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Streuung eines Lichtstrahls (*light scatter*) durch Zellen, welche nacheinander einen dünnen Spalt passieren. Durch die Messung des Streulichts können Angaben über Größe und Granularität getroffen werden. Eine besondere Form der Durchflusszytometrie, das FACS (*fluorescence activated cell sorting*), ermöglicht zudem durch Laseranregung der Zellen eine Fluoreszenzmessung und damit verbunden eine weitere Analyseoption. Mittels FACS soll die Transfektionseffizienz gemessen werden. Durch die Transfektion des GFP-Gens können mit dem Assay – individuell – für jede gemessene Zelle eine erfolgreiche

Transfektion und – insgesamt – eine Effizienz der entsprechenden Transfektionsmethode bzw. des Saponins bestimmt werden.

Durchführung:

Zur Zellablösung wurde jedes Well der 24-Well-Platte mit 200 µl Trypsin versetzt (5-minütige Inkubation bei RT). Vor der Überführung in ein Polystyren-Tube sollte durch schnelles, jedoch vorsichtiges Auf- und Ab-pipettieren (ohne Schaumbildung) eine Ablösung der Zellen sichergestellt werden. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 4°C aufbewahrt.

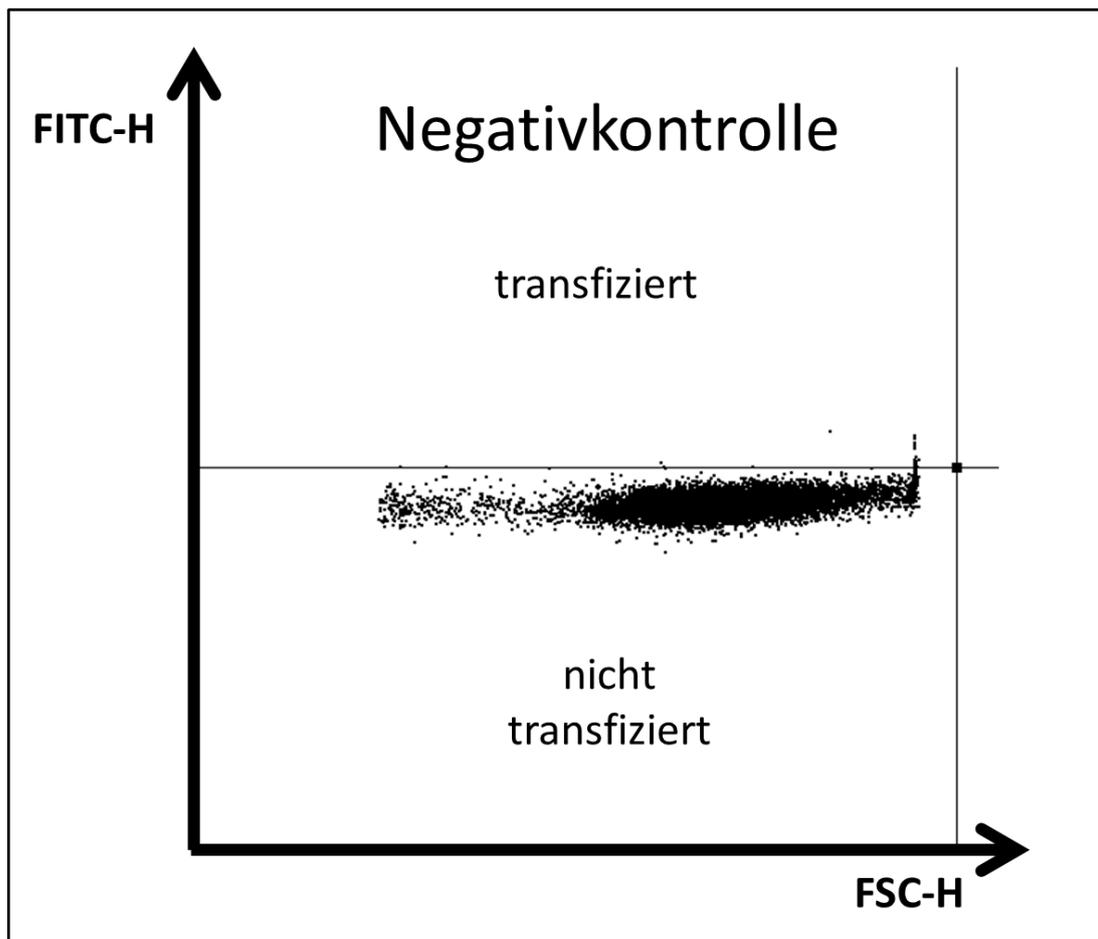


**Abb. 9 Ablauf zur Messung der Transfektionseffizienz (Fließschema)**

Änderungen der Bedingungen werden explizit in der jeweiligen Methodenbeschreibung genannt.

Für die Effizienzbestimmung wurden mindestens 10.000 Zellen herangezogen und bei einer mittleren Flussrate von 30 µl/min am Cytoflex gemessen. Mithilfe der Analysesoftware Cyflogic wurden die Parameter FITC-H (Fluoreszenzintensität im Wellenlängenbereich von Fluoreszein-

isothiocyanat, berechnet aus Peak-Höhe) auf der Ordinate gegen FSC-H (Vorwärtsstreulicht; Maß für Lichtbeugung; Abhängigkeit zum Zellvolumen, berechnet aus Peak-Höhe) auf der Abszisse aufgetragen. Der erhaltene Dotplot konnte unter der Verwendung der Negativkontrolle (unbehandelte Zellen, *Abb. 9*) hinsichtlich der Effizienz ausgewertet werden. Durch Platzieren einer Linie unmittelbar über der Hauptpopulation wurde eine Grenze definiert. Zellen mit FITC-H-Werten oberhalb der Linie wurden als erfolgreich transfiziert betrachtet.



**Abb. 10 Fluoreszenzassay - Durchflusszytometrie – Auswertungsansatz**

Der Dotplot der unbehandelten Negativkontrolle diente zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Die durchgezogene Linie über der Hauptpopulation trennt nicht transfizierte Zellen von transfizierten Zellen; FITC-H: Fluoreszenzintensität im Wellenlängenbereich von Fluoresceinisothiocyanat, berechnet aus Peak-Höhe; FSC-H: Vorwärtsstreuung der Zellen, berechnet aus Peak-Höhe.

#### 2.2.7.1.1. Transfektion mit verschiedenen Methoden

15.000 Neuro-2A-Zellen/Well wurden in 24-Well-Platten ausgesäht. PD-, PLD-, LD- und PEID-Nanoplexe wurden formuliert und den Zellen appliziert. Die Transfektionseffizienz mit und ohne

SO1861-Co-Applikation wurde bestimmt. Lipofectamin® diente als Positivkontrolle. Die beschriebene Effizienzbestimmung wurde analog an Caco2-Zellen (40.000 Zellen/Well), HEK293-Zellen (20.000 Zellen/Well), SKN-Zellen (20.000 Zellen/Well) und SHSY-Zellen (25.000 Zellen/Well) durchgeführt.

### 2.2.7.1.2. Transfektion mit gerichteten und ungerichteten Nanoplexen

PD- und YD-Nanoplexe wurden Neuro-2A-Zellen (15.000 Zellen/Well) appliziert. Der Einfluss von SO1861 (2,5 µg/ml) auf die Transfektionseffizienz wurde beobachtet. Lipofectamin® diente als Positivkontrolle.

### 2.2.7.1.3. Saponinscreening

15.000 Neuro-2A-Zellen/Well wurden ausgesät. PD-Partikel wurden bei Verdünnung mit dem entsprechenden Saponin, gelöst in OptiMEM Medium, versetzt. Folgende Saponingemische bzw. isolierten Saponine wurden im Laufe der Dissertationsarbeit hinsichtlich ihrer transfektionsverstärkenden Eigenschaften getestet:

Tab. 13 Übersicht der im Rahmen der Dissertation getesteten Extrakte und isolierte Saponine

Stammpflanze	Saponin	Konzentrationen in µg/ml
<i>Saponaria officinalis L.</i>	SO1542	10 – 20
	SO1584	10 – 20
	SO1658	10 – 20
	SO1674	10 – 20
	SO1832	1 – 2,5 – 5 – 10 – 20 – 40
	SO1861	2,5 – 5 – 10 – 20
<i>Gypsophila paniculata L.</i>	SA 1641	20
	SA 1657	20
	Gyp 1	10 – 20 – 40
	Gyp 2	10 – 20 – 40
	Gyp 3	10 – 20 – 40
<i>Gypsophila elegans M.Bieb.</i>	GE Samenrohextrakt*	10 – 20 – 40
	GE Wurzelrohextrakt*	1 – 2,5 – 5 – 10 – 20
	P3*	1 – 2,5 – 5
	P2*	1 – 2,5 – 5
	P4*	1 – 2,5 – 5
	GE1741	1 – 2

Lediglich die effektivste sowie nicht toxische Konzentration wurde im Sinne der Übersichtlichkeit in den Ergebnissen dargestellt. \*: Saponingemisch

#### **2.2.7.1.4. Transfektion mit verschiedenen Nukleinsäuren**

Plasmid-DNA (D), mRNA (m) und MiniCircle-DNA (M) wurden mit Poly-Lysin-Peptiden (P) zu Nanoplexen formuliert, Neuro-2A-Zellen verabreicht und die Transfektionseffizienz bestimmt. Der Effekt von SO1861 oder GE1741 auf die Transfektionseffizienz von PD-, Pm- und PM-Nanoplexen wurde untersucht. Pm-Transfektionen fanden bei der SO1861-Untersuchung mit einer je 6-, 24- und 48-stündigen Inkubationszeit statt, bei der GE1741-Untersuchung nur noch mit einer 24-stündigen Inkubationszeit.

#### **2.2.7.1.5. Transfektion mit kommerziellen Transfektionsboostern**

15.000/Well HCT-Zellen wurden ausgesät und 24 h (37° C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Die kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien TransIT®, Xtreme Gene™, Genecellin wurden nach Herstellerempfehlungen formuliert und mit/ohne GE1741-haltigem OptiMEM-Medium (2 µg/ml) versetzt. Nach einer 48-stündigen Inkubationszeit wurde die Transfektionseffizienz bestimmt und die Transfektionsmethoden mit und ohne Saponin-Co-Applikation verglichen.

#### **2.2.7.1.6. Ligandenstudien**

15.000 Neuro-2A-Zellen/Well wurden ausgesät. FITC-PD- und FITC-YD-Nanoplexe wurden formuliert und jeweils mit und ohne SO1861 versetzt. Der Einfluss von SO1861 auf die Partikelaufnahme wurde nach 1 h, 2 h und 4 h am Durchflusszytometer gemessen. Zur Analyse der Partikelaufnahme wurden die FITC-H-Histogramme miteinander verglichen.

Zudem wurde in einem weiteren Ansatz der Einfluss von Peptid I – zugegeben 15 min vor Transfektion in einem 100-fachen oder 1000-fachen molaren Überschuss (zu FITC-P und FITC-Y) – auf die Aufnahme von FITC-PD und FITC-YD untersucht. Nach 1 h Inkubationszeit wurden Fluoreszenzintensitäten in Form des Medians analysiert und miteinander verglichen. Verwendet wurde hierfür die Analysesoftware CytExpert (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

### 2.2.7.2. Fluoreszenzmikroskop

Neuro-2A-Zellen (15.000 Zellen/Well) wurden mit PD- und YD-Partikeln transfiziert und die Wirkung von SO1861 visuell am Fluoreszenzmikroskop Keyence HS BZ-9000 mit einer EWLD-Linse Plan Fluor 20x/0.45 erfasst. Die Aufnahmen wurden durch Überlagern des Bright Field Channels und des GFP-Channels bildlich festgehalten.

### 2.2.7.3. Konfokalmikroskop

10.000 Neuro-2A-Zellen/Well wurden in einem Volumen von 2 ml in Ibidi  $\mu$ -Dishes ausgesät und 24 h inkubiert (37° C, 5% CO<sub>2</sub>).

1. Aufnahme:

12 h vor dem Imaging wurden den Zellen FITC-markierte YD-Nanoplexe ohne Saponin zugegeben.

2. Aufnahme:

6 h vor Imaging wurden die Zellen mit einer SO1861-enthaltenden Pm-Nanoplex-Suspension transfiziert. Vor dem Imaging wurde Zellmembran und Zellkerne mit den Farbstoffen gemäß *Tab. 14* visualisiert.

3. Aufnahme:

Ebenfalls 12 h vor Imaging wurden Neuro-2A-Zellen FITC-YD-Partikeln appliziert, welche erst zu Beginn des Imaging mit SO1861 (2,5  $\mu$ g/ml) versetzt wurden. Eine erneute Zugabe von SO1861 (40  $\mu$ g/ml) erfolgte beim Messzyklus 80 (10 Sekunden/Messzyklus) nach Imaging-Beginn. Der Zellkernfarbstoff wurde entsprechend *Tab. 14* zugegeben.

Tab. 14 Konfokalmikroskop - Imaging-Farbstoffe

Zeitpunkt	Reagenz	Menge	Färbung	Farbe
30 min vor dem Imaging	Hoechst 33342	8 µg/Well	Zellkerne	Blau
5 min vor dem Imaging	CellMask™ Deep Red Plasma	1 µg/Well	Zellmembran	Rot

Die Farbstoffe wurden eingesetzt, um eine bessere Identifizierung, Unterscheidung und Visualisierung der transfizierten Zellen und ihrer Organe zu gewährleisten. Die Farbstofflösungen wurden vor Mikroskopie mit PBS ausgewaschen, um toxische Effekte zu vermeiden.

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und 2 ml Live Cell Imaging Solution (mit 20 mM D-Glucose) versetzt. Das Imaging wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM780, Axio Observer Z1, Zeiss TRZ 3700, Plan-Apochromat 63x/1.4 Öl Objektiv und 20x Objektiv) alle 10 s (Messzyklus) durchgeführt und mit der ZEN2010 Software ausgewertet.

## 2.2.8. Zytotoxizitäts –Assays

### 2.2.8.1. MTT-Assay (nach Transfektion)

Die Zytotoxizität einer Transfektion mit Saporin-DNA sollte mittels MTT-Assay untersucht werden. PD-Partikel verschiedener Massenverhältnisse (1:2, 1:4, 1:6), sowie LD-, PLD-, YD-Partikel und Lipofectamin® als Positivkontrolle wurden formuliert und Neuro-2A-Zellen (Zellzahl nach 3.4.1) appliziert. PD-, PLD und YD-Partikel wurden jeweils mit und ohne SO1861 (2,5 µg/ml) versetzt. Die Absorptionmessung und, damit verbunden, die Viabilität nach der Transfektion wurde analog zu 2.2.3.1. durchgeführt.

### 2.2.8.2. Impedanzmessungen

Impedanzmessungen stellen eine etablierte Methode zur Viabilitätsmessung von adhärennten Zellen dar. Durch die Positionierung zweier Elektroden am Boden der Wellplatten – *positive terminal* (Pluspol) und *negative terminal* (Minuspol) – und das Anlegen einer Spannung wird ein Elektronenfluss erzeugt. Die Anwesenheit von Zellen am Zellboden führt zu einer Widerstandsänderung (Impedanzänderung), dabei ist die Änderung abhängig von Anzahl, Größe und Form der Zellen. Mit Messung der Impedanz, korrelierend mit dem Zellindex, können u.a. Aussagen

über die Viabilität oder Konformität der Zellen gemacht werden. Da das Impedanzmessgerät (iCelligence™) die Messdaten direkt an ein Analysegerät (iPad Air 2) weiterleitet, können in Echtzeit Viabilität und Therapieeffekt beobachtet werden.

#### Transfektion – Durchführung:

Nach einer Blankmessung mit 150 µl reinem Kulturmediums wurden die Zellen in zwei 8-Well-Platten eingesät (8.000/Well in 800 µl Gesamtvolumen) und 24 h wachsen lassen. Die Transfektionsreagenzien wurden in einem Volumen von 50 µl Wasser formuliert (2.2.4.1) und bei Zugabe 1:1 mit dem Kulturmedium ersetzt (50 µl Medientnahme, 50 µl Reagenzzugabe). Die Viabilität wurde über einen normalisierten Zellindex untersucht. Er ergibt sich aus dem Quotient des Cell Index (CI) und dem Cell Index des Zeitpunkts der Zugabe. Mithilfe des normalisierten Zellindex wurde es ermöglicht, den Einfluss des Reagenz auf die Viabilität darzustellen. Für die folgenden Toxizitätsstudien wurde in der Regel der Abfall der Negativkontroll-Kurve als Endpunkt festgelegt, welche entweder eine Konfluenz (Überpopulation) oder ein Verbrauch des Mediums darstellt.

#### **2.2.8.2.1. Saponin-Permeabilitätsassay**

Zur Bestimmung der membranpermeabilisierenden Konzentration der Saponine SO1861 und GE1741 wurden mehrere Konzentrationen (SO1861: 0 – 80 µg/ml; GE1741 0 – 50 µg/ml) nach 24-stündiger Inkubation den Neuro-2A-Zellen appliziert.

#### **2.2.8.2.2. GFP-Toxizitätstests**

PD- und PLD-Nanoplexe und Lipofectamin® (2,5 µg GFP-DNA) ± SO1861 (2,5 µg/ml) wurden den Neuro-2A-Zellen zugesetzt und die Viabilität beobachtet. Um die Transfektionseffizienz der in serum-haltigem Medium durchgeführten Transfektion mit der Effizienz einer serum-freier Transfektion zu vergleichen, wurde analog zu 2.2.7.1 die Transfektionseffizienz nach Beendigung der Impedanz-/Viabilitätsmessung gemessen.

Des Weiteren wurden ungerichtete (PD-) und gerichtete (YD-) Nanoplexe (2,5 µg GFP-DNA) formuliert und Neuro-2A-Zellen appliziert. Zudem wurde der Einfluss von SO1861 (2,5 µg/ml) auf die Toxizität der Transfektion untersucht und mit der Toxizität von Lipofectamin® ± SO1861 verglichen.

### 2.2.8.2.3. Saporin/Dianthin-Saporin-Toxizitätstests

Folgende Transfektionen wurden zur Untersuchung der für die suizidgen-bedingte Toxizität bedeutenden Parameter durchgeführt:

**Tab.15 Impedanzmessungen der Suizidgen-basierten Transfektionen**

Nr.	Nanoplex	DNA-Typ	DNA-Menge	Saporin	Saporinkonzentration	Weitere Kontrolle
1	PD	Saporin & GFP	2 µg & 5µg	SO1861	2,5 µg/ml	
2	PD	Saporin	1 µg & 2,5 µg	SO1861	2,5 µg/ml	
3	YD	Saporin	2,5 µg	SO1861	1,25 µg/ml & 2,5 µg/ml	
4	PD, YD	Saporin	2,5 µg	SO1861	2,5 µg/ml	Lipofectamin®
5	YD	Saporin & GFP	2,5 µg	GE1741	1 µg/ml & 2 µg/ml	GE1741 2µg/ml
6	YD	Saporin & Dianthin	2,5 µg	GE1741	1 µg/ml & 2 µg/ml	

Jede durchgeführte Transfektion wird in einer Zeile beschrieben und damit übersichtlich veranschaulicht.

### 2.2.9. *In-vivo*-Studie

Eine Durchführung einer *in-vivo*-Studie an Albinomäusen (NMRI nu/nu – Mäuse) wurde in Auftrag gegeben, um die *in-vitro*-Ergebnisse zu bestätigen. Die in Buch ansässige Unternehmen EPO (Experimental Pharmacology & Oncology) unter der Leitung von Prof. Wolfgang Walther war hierbei für die Haltung, Applikation und Messung der Tumorgröße sowie der Erhebung der statistischen Daten verantwortlich. Die formulierten YD-Nanoplexe (Saporin-Plasmid) und das Saporin (SO1861) wurden regelmäßig frisch formuliert bzw. injektionsbereit präpariert und am gleichen Tag für die Injektion zur EPO-Einrichtung in Buch transportiert. Für die Studie wurden insgesamt 40 Albinomäuse (NMRI nu/nu-Mäuse) herangezogen.

Studientitel:

Untersuchung zur Wirksamkeit einer Kombinationstherapie aus SO1861 und zielgerichteten Suizidgen-Nanopartikel.

Modell:

Xenotransplantat-Modell mit NMRI nu/nu-Mäusen

Zellen:

Luciferase exprimierende Neuro-2A-Zellen (Neuroblastom)

Readout:

Tumorstadium

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit dem UKCCCR-Guidelines (United Kingdom Coordinated on Cancer Research) ausgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) genehmigt.

### 2.2.9.1. Qualitäts- und Wirksamkeitstests

Vor Beginn der Studie wurden die Therapiekomponenten und die Tumorzelllinie auf ihre Qualität und Wirksamkeit zum Studieneinsatz getestet.

Y-Peptid: Das Peptid wurde in einer > 95%-igen Reinheit von GeneCust (Dudelange, Luxemburg) akquiriert und in Nuklease-freiem Wasser aufgelöst (10 mg/ml).

Saporin-Plasmid-DNA: Das Klonierungsprodukt wurde in mehreren Maxipräparationen (Endo-Free® Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Deutschland) endotoxinfrei vervielfältigt und in Wasser gelöst. Größe, Zetapotential der formulierten YD-Nanoplexe wurden analog zu 2.2.4.2 bestimmt und über drei Tage beobachtet.

Neuro-2A-Zellen: Neuro-2A-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Hart (University College London, UCL) bereitgestellt. Die Zellen wurden stabil mit einem Luciferase-Gen transduziert und exprimieren somit selbstständig das Enzym Luciferase. Um eine stabile Luciferaseexpression zu prüfen, wurden vor Beginn der *in-vivo*-Studie die Zellen *in-vitro* kultiviert und an meh-

renen Zeitpunkten die Lumineszenz gemessen. Neuro-2A-Zellen (4.000/Well) wurden hierfür in 24-Well-Platten ausgesät, dabei wurde analog zu 2.2.6. die Lumineszenz nach 4, 7 und 14 Tagen gemessen.

### **2.2.9.2. Toxizitätsstudie**

Die Toxizitätsstudie diente zur Bestimmung einer optimalen Nanoplex-Konzentration. Keine toxischen Effekte sowie eine problemlose Formulierbarkeit sind für einen Therapieeinsatz obligat.

#### **2.2.9.2.1. Akute Toxizität**

Drei Gruppen á 2 Mäuse wurden herangezogen. Je 15 µg, 30 µg und 55 µg (Saporin-DNA) wurden mit Peptid Y zu Nanoplexen formuliert und pro Maus in einem Volumen von 50 µl (Wasser) i.v. in die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden zwei Wochen auf Auffälligkeiten beobachtet und das Körpergewicht wurde alle 48 h gemessen. Für die Saponin-Konzentration wurde sich auf die Publikation von *Thakur et al., 2013* [40] bezogen, in der 30 µg/Therapie in 100 µl PBS-Lösung verwendet wurden. Eine Konzentrationsbestimmung für SO1861 war somit nicht erforderlich.

#### **2.2.9.2.2. Kombinatorische akute Toxizität**

Eine weitere Gruppe á 4 Mäuse wurde einer kombinatorischen Toxizitätsstudie unterzogen. YD-Nanoplexe in der in 2.2.9.2.1 ermittelten Konzentration wurden zusammen mit SO1861 (30µg) appliziert. Die SO1861-Applikation erfolgte eine Stunde vor der intravenösen Nanoplex-Gabe s.c. in die Nackenfalte. Analog zu 2.2.9.2.1 wurden Körpergewicht dokumentiert und Auffälligkeiten notiert. Bei Anzeichen von Toxizität würde die nächst geringere Nanoplex-Dosis mit SO1861 kombiniert.

### 2.2.9.3. Wirksamkeitsstudie

Drei Therapiegruppen á 10 Mäuse (*Tab. 16*) wurden mit Luciferase transduzierte Neuro-2A-Zellen injiziert ( $1 \times 10^7$  s.c., nach Svensson et al. [86]). An den Tagen 1, 4, 7 und 10 nach Tumorrapplikation wurden den Versuchstieren die YD-Partikel + SO1861 in der davor ermittelten Konzentration appliziert. Wie in den Toxizitätstests (2.2.9.2.1, 2.2.9.2.2) wurde SO1861 s.c. in die Nackenfalte injiziert, eine YD-Nanoplex-Applikation folgte eine Stunde später i.v. in die Schwanzvene. Während der Therapie wurde Tumolvolumen und Körpergewicht ermittelt. An Tag 4 und 11 wurde zudem eine Lumineszenzmessung durchgeführt. Dazu erhielten die Versuchstiere nach Anästhesierung mit Isoflurangas eine einmalige Gabe von D-Luciferin (150 mg/kg, i.p.). Das Tumorstadium wurde mithilfe der Software WinLight and ImageJ 1.48v visualisiert und quantifiziert (Einheit: IntDen, Integrated Density). Der Therapieendpunkt wurde gemäß Ethikrichtlinien der Tierhaltung bestimmt.

**Tab. 16 Therapie-Gruppen der in-vivo-Studie mit NMRI nu/nu-Mäusen**

	Dosis		Anzahl der Applikationen
	SO1861	YD-Nanoplex	
Placebo (Kontrolle)	-	-	Appl. an Tagen 1 , 4 , 7 , 10
YD	-	siehe 3.8.2	Appl. an Tagen 1 , 4 , 7 , 10
YD + SO1861	30 µg	siehe 3.8.2	Appl. an Tagen 1 , 4 , 7 , 10

*Die Placebo-Gruppe erhielt eine komponentenfreie PBS-Lösung. Die angewendete DNA-Konzentration wurde zuvor in den Eigen-toxizitätstests ermittelt, hinsichtlich SO1861 bezog man sich auf die von Thakur et al. angewandte Applikationsmenge [40]. Die Versuchstiere erfuhren eine Partikel-/Saponin-Applikation an jeweils 4 Zeitpunkten.*

### 2.2.10. Statistische Methoden

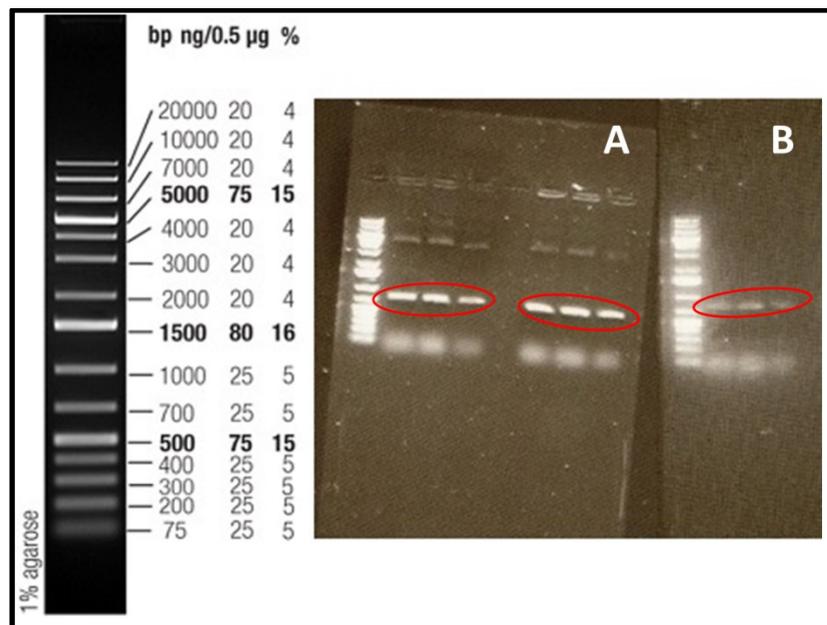
Für die statistische Auswertung der ermittelten Messwerte spielten insbesondere Signifikanztests eine wichtige Rolle, um eine Untersuchung der durch Saponine erzielten Unterschiede statistisch bewerten zu können. Für eine Messwerterhebung mit kleinem Stichprobenumfang ( $n < 10$ ) wurde der nicht parametrische U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney herangezogen. Für größere Stichprobenumfänge ( $n \geq 10$ ) wurde der Student t-Test angewendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Plasmid-Klonierung

##### 3.1.1. Insert-Amplifizierung

Um den Erfolg der Polymerase-Ketten-Reaktion (2.2.1.1) auswerten zu können sowie Informationen über den Reinheitsgrad der DNA-Lösung zu erhalten, wurde die Elektrophorese (2.2.1.2) mithilfe eines DNA-Leiters analysiert. Die Basenlängen des PCR-Produkts, verteilt auf je 6 Gel-taschen, konnte mit dem mitgelaufenen Leiter verglichen werden. Auf beiden Agarosegelen war bei der zu erwartenden Basenlänge (Saporin 818bp, Dianthin 799bp) eine deutliche Bande zu erkennen. Im Bereich niedrigerer Basenpaarlängen konnten kurz-kettige „Primerwolken“ identifiziert werden, in den höheren Bereichen befand sich das bakterielle zirkuläre Plasmid. Nicht bestimmbare Banden waren nicht vorhanden.



**Abb. 11 Gelelektrophorese nach der PCR**

In dem zu erwartenden Bereich von ca. 800 bp war mithilfe der DNA-Leiter eine deutlich erkennbare Bande (rot umrandet) zu erkennen. Sie stellte das amplifizierte Insert dar. Die verschwommenen Banden konnten als Primerreste, die höherliegenden Banden als Plasmide gedeutet werden. **A** Saporin-Insert **B** Dianthin-Insert

Nach Ausschneiden der Gelbanden und Aufreinigung mithilfe des Gel-Extraktionskits konnten folgende DNA-Konzentrationen am Spektralphotometer (Nanodrop) gemessen werden:

	DNA-Konzentration in ng/ $\mu$ l
S1	57,39
S2	148,30
S3	179,30
D1	48,77
D2	68,53
D3	52,53

**Tab. 17 DNA-Konzentrationen nach PCR und Aufreinigung**

Die am Spektralphotometer gemessenen Insert-DNA-Konzentrationen (jeweils 3 Saporin- und Dianthin-Proben) reichten für eine weitere Bearbeitung nicht aus und mussten im weiteren Verlauf amplifiziert werden; S: Saporin-Insert D: Dianthin-Insert

### 3.1.2. pJET-Vektor-Ligation und Amplifizierung

Die Ligationsprodukte (2.2.1.4.) wurden in *E.Coli*-Bakterien transformiert. Das Wachsen von zahlreichen Bakterienkolonien auf der ampicillinhaltigen Agarplatte bestätigte das Vorhandensein einer Antibiotika-Resistenz und damit verbunden die erfolgreiche Ligation sowie Transformation. Die Kultivierung der Bakterienkolonie und die darauffolgende DNA-Extraktion ermöglichten die DNA-Messung und eine ausreichende Menge an DNA zum weiteren Klonierungsablauf.

**Tab. 18 DNA-Konzentrationen nach pJET-Ligation und Transformation**

	DNA-Konzentration in ng/ $\mu$ l		DNA-Konzentration in ng/ $\mu$ l
JS 1	128,1	JS 8	193,5
JS 2	138,7	JS 9	232,5
JS 3	181,0	JS 10	142,3
JS 4	182,8	JD 1	173,1
JS 5	203,1	JD 2	211,1
JS 6	209,8	JD 3	127,1
JS 7	210,7		

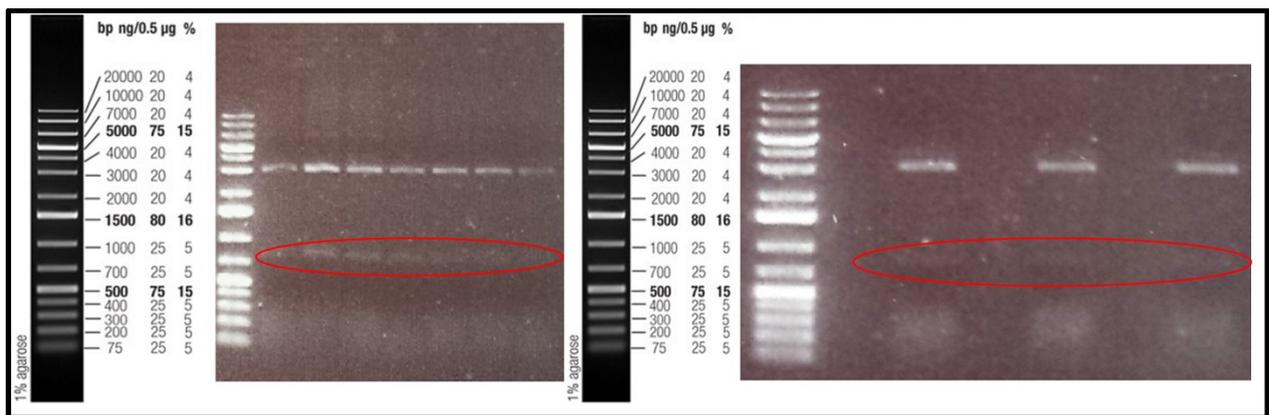
10 pJET-Saporin-Kolonien und 3 pJET-Dianthin-Kolonien wurden aus der Agarplatte entnommen und einer DNA-Extraktion unterzogen. Sämtliche wiesen eine Konzentration von mind. 100 ng/ $\mu$ l auf; JS: Proben mit pJET-Saporin-Plasmid, JD: Proben mit pJET-Dianthin-Plasmid.

### 3.1.3. Restriktionsverdau - Vektor und Insert

Die amplifizierten pJET-Plasmide wie auch der mammale Vektor pEGFP-n3 wurden einer Restriktion unterzogen. Dabei verwendete man für beide Edukte dieselben Restriktionsenzyme (*XcmI* und *NotI*).

#### Inserts:

Die herausgeschnittenen Banden waren wie in 3.1.1 im Bereich von ca. 800 bp zu erwarten (Saporin 797 bp, Dianthin 728 bp). Auf den Agarosegelen waren schwache Banden im erwähnten Bereich sichtbar, ausreichend zur weiteren Aufbereitung. Der pJET-Vektor lag ebenfalls im erwarteten Bereich von ca. 3.000 bp vor.

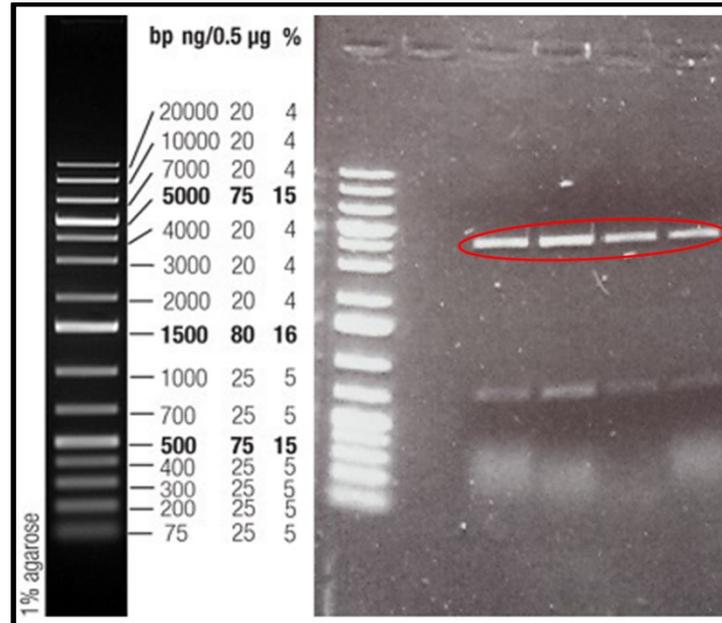


**Abb. 12 Gelelektrophorese nach Restriktion – Inserts**

**Links:** Gel mit Saporin-Insert, **Rechts:** Gel mit Dianthin-Insert; Sowohl die Saporin-, als auch Dianthin-Inserts waren im Bereich von ca. 800 bp als schwache Banden (rot umrandet) sichtbar. Der linearisierte pJet-vektor erschien darüber liegend deutlich im Bereich von ca. 3.000 bp.

#### Vektor:

Durch Restriktion des GFP-Gens aus dem pEGFP-N3 Vektors war der Vektor mit einer Basenpaarlänge von 4.003 bp zu erwarten. Analog zur pJET-Restriktion konnten auf dem Gel deutliche Vektorbanden und schwache Insertbanden ausgemacht werden. Die Position der Vektorbanden stimmte mit der prognostizierten Basenpaarlänge überein.



**Abb. 13 Gelelektrophorese nach Restriktion – Vektor**

Eine Restriktion des Ziel-Vektors p-EGFP-n3 mit denselben Restriktionsenzymen XcmI und NotI führte zu einer Entfernung des GFP-Gens (ca. 800 bp, untere Bande). Der linearisierte Vektor (4.003 bp, obere Bande, rot umrandet) konnte für die finale Ligation herangezogen werden.

Nach Extraktion der benötigten DNA – Komponenten (Insertbänder von Saporin und Dianthin, Vektorbänder von pEGFP-n3) aus den Agarosegelen wurde die Konzentration via Spektralphotometer bestimmt.

**Tab. 19 DNA-Konzentrationen nach Restriktion**

	DNA-Konzentration in ng/µl		DNA-Konzentration in ng/µl
S 1	23,2	S 9	35,4
S 2	19,1	D 1	29,0
S 4	30,0	D 2	67,2
S 5	22,9	D 3	39,5
S 6	35,1	V 1	23,0
S 7	46,7	V 2	24,8
S 8	35,4		

Die nach Restriktion ermittelten DNA-Konzentrationen zwischen 19 – 67 ng/ml reichten für eine anschließende Ligation von Insert und Vektor aus; S: Proben mit Saporin-Insert, D: Proben mit Dianthin-Insert, V: Proben mit Vektor aus pEGFP-n3

### 3.1.4. Ligation – Vektor und Insert

Analog zu 3.1.2 bestätigte das Wachsen Antibiotika-resistenter Bakterienkolonien (Kanamycin-Resistenz) das Vorhandensein eines intakten Plasmids und somit eine erfolgreiche Ligation. Einige der Kolonien wurden kultiviert, ihre DNA extrahiert und mithilfe der Minipräparation amplifiziert. Folgende Konzentrationen konnten gemessen werden:

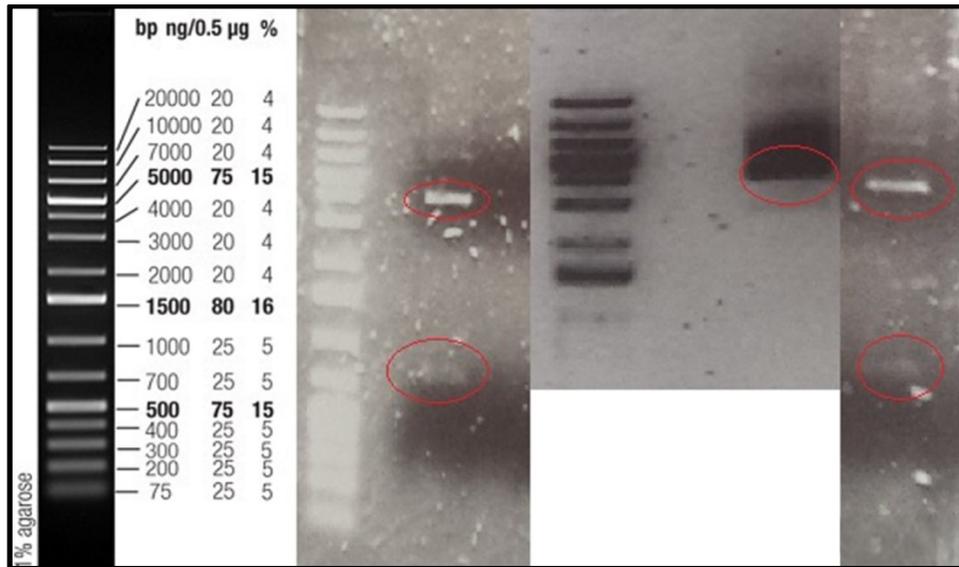
**Tab. 20 DNA-Konzentrationen nach Ligation und Transformation**

	DNA-Konzentration in ng/ $\mu$ l		DNA-Konzentration in ng/ $\mu$ l
VS 1	187,4	VD 3	124,0
VS 2	30,1	VD 4	148,5
VS 3	148,2	VLuci 1	353,9
VS 4	8,5	VLuci 2	310,1
VS 5	1,8	VLuci 3	365,6
VD 1	252,0	VLuci 4	285,0
VD 2	142,1		

*Das bereits vorhandene mammale Luciferase-Plasmid (pCl-Luc) wurde ebenfalls transformiert, in Ampicillinresistenz kultiviert und schließlich extrahiert und amplifiziert. Konzentrationen von über 100 ng/ml bestätigten eine erfolgreiche DNA-Amplifizierung und einen ersten Hinweis auf den Erfolg der Ligation; VS: Proben mit Saporin-Plasmid, VD: Proben mit Dianthin-Plasmid, Luci: Proben mit Luciferase-Plasmid.*

### 3.1.5. Probe-Verdau der Klonierungsprodukte

Der nach der Amplifizierung durchgeführte Probe-Restriktionsverdau bestätigte ebenfalls die Ligation und zudem die Kultivierung der richtigen Bakterienkolonie. Ein Probeverdau mit den verwendeten Restriktionsenzymen *XcmI* und *NotI* bestätigte das Vorhandensein der Klonierungsprodukte (Abb. 14). Auf den Agarosegelen konnte der pEGFP-n3 Vektor bei ca. 4.000 bp und das Insert (Dianthin/Saporin) bei ca. 800 bp erkannt werden. Das Luciferase-Plasmid wurde ohne Restriktion der Gelelektrophorese unterzogen und konnte bei ca. 4.000 bp detektiert werden. Zusätzlich konnte in den Proben eine Freiheit von störenden oder fremden DNA-Fragmenten nachgewiesen werden.



**Abb. 14 Gelelektrophorese nach Probe-Restriktionsverdau**

Durch Restriktionsverdau des Saporin- und Dianthin-Plasmids wurde die Anwesenheit des Produktes (Vektor: ca. 4.000 bp, Insert ca. 800 bp) bestätigt. Das Luciferase-Plasmid wurde nicht verdaut und ist somit nur als Plasmid zu detektieren. Alle Plasmid-Proben wiesen keine Unreinheiten auf; **Links:** Dianthin-Plasmid-Probeverdau, **Mittig:** Luciferase-Plasmid, **Rechts:** Saporin-Plasmid-Probeverdau

### 3.1.6. Sequenzierung

Mit der Sequenzierung konnte die DNA-Sequenz im Bereich des „Gene of interest“ ermittelt werden. Die zu Beginn der Planung verwendeten DNA-Sequenzen von Saporin und Dianthin konnten mit den erhaltenen Sequenzen verglichen werden. Dabei wurden sowohl auf Punktmutationen, Insertion oder Deletionen als auch auf fehlerhaften Einbau der Inserts geachtet. Die Analyse der Sequenzierungsergebnisse (siehe Anhang) bestätigte eine Übereinstimmung mit der zu Beginn der Klonierung erwarteten Gensequenz. Keine Mutationen wurden beobachtet. *Abb. 15* und *Abb. 16* stellen die gesamte Aminosäuresequenz der Produkte kombiniert mithilfe beider Sequenzen dar.

Forward (3' → 5')
MGHHHHHHA AVTSITLDLVNPTAGQYSSFVDKIRNNVKDPNLKYGGT IAVIGPPSKEKFLRINFQSSRGTVSLGLKRDNLV VAYLAMDNNTNVNRA YYFKSEITSAELTALFPEATTANQ <b>KALEYT...</b>
Reverse (5' → 3')
*KPKGLYM LLMQLDKVQRVKGFDFDYDKNFVGNKADGYIATSIKRWS VEFQIVKNDSDFKNPFNKT VLNQIYRFRAVEATMQIAILLFRAENKVVRA KKNVAEMFTLLLDIGLGLKRSKDGQTIQANKEISQYDE <b>TYELAK...</b>
Vollständige Aminosäuresequenz
MGHHHHHHA AVTSITLDLVNPTAGQYSSFVDKIRNNVKDPNLKYGGT DIAVIGPPSKEKFLRINFQSSRGTVSLGLKRDNLV VAYLAMDNNTNVNRA YYFKSEITSAELTALFPEATTANQ <b>KALEYT</b> EDYQSIEKNAQITQGDKSRKEL GLGIDLLLT FMEAVNKKARVVKNEARFLLIAIQMTAEVARFRYIQNLVTK NFPNKFDS DNKVIQFEVSWRKISTAIYGD AKNGVFNKDYDFGFGKVRQV KDLQMGLL MYLGPK*

**Abb. 15 Aminosäure-Sequenz von Saporin**

Die aus der Forward- und Reverse-Sequenzierung erhaltene und eindeutig lesbare Aminosäuresequenz stimmte mit der erwarteten Sequenz von Saporin überein und bestätigte den Klonierungserfolg. Die Aminosäuren wurden gemäß Einbuchstabencode dargestellt; M: Methionin, Sequenzstart \*: Sequenzstopp

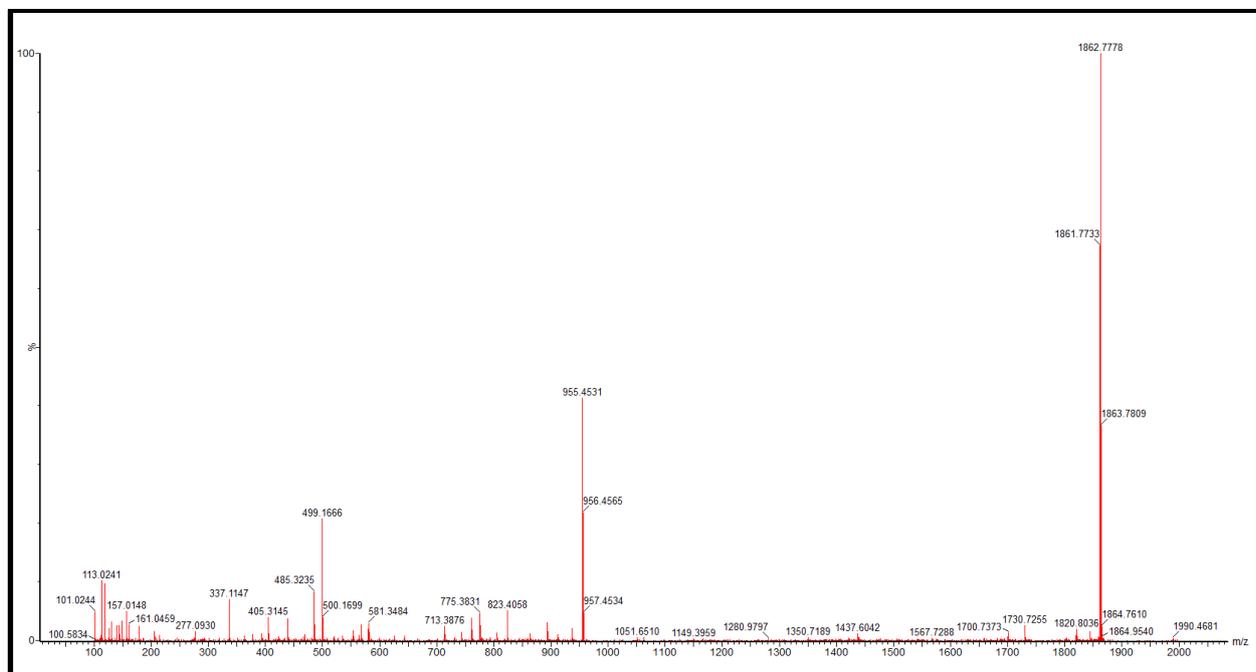
Forward (3' → 5')
MGAAATAYTLNLANPSASQYSSFLDQIRNNVRDTS LIYGGTDVAVIGAPS TTDKFLRLNFQGPRGTVSLGLRRENLYV VAYLAMDNANVN RAYYFKNQIT SAELTALFPEVVANQKQLEYGEDYQ <b>AIEK...</b>
Reverse (5' → 3')
*KPRGLYKLLGMQLDKAQRVKGFDFDYDKNFVGNKCDGFIATSIKSWSV QFQIVKNESDFKNPFNKT VLNQRFRAAEATMQIAILLFRAEDKVV RVKKN VGDIMTILLNIGLGLKRSQDGTTIKAN <b>KEIA...</b>
Vollständige Aminosäuresequenz
MGAAATAYTLNLANPSASQYSSFLDQIRNNVRDTS LIYGGTDVAVIGAPS TTDKFLRLNFQGPRGTVSLGLRRENLYV VAYLAMDNANVN RAYYFKNQIT SAELTALFPEVVANQKQLEYGEDYQ <b>AIEK</b> NAKITTGDQSRKELGLGINLLI TMIDGVNKKVRVVKDEARFLLIAIQMTAE AARFRQNLVTKNFPNKF DSEN KVIQFQVSWSKISTAI FGDCKNGVFNKDYDFGFGKVRQAKDLQMGLL KYL GRPK*

**Abb. 16 Aminosäure-Sequenz von Dianthin**

Die aus der Forward- und Reverse-Sequenzierung erhaltene und eindeutig lesbare Aminosäuresequenz stimmte mit der erwarteten Sequenz von Dianthin überein und bestätigte den Klonierungserfolg. Die Aminosäuren wurden gemäß Einbuchstabencode dargestellt; M: Methionin, Sequenzstart \*: Sequenzstopp

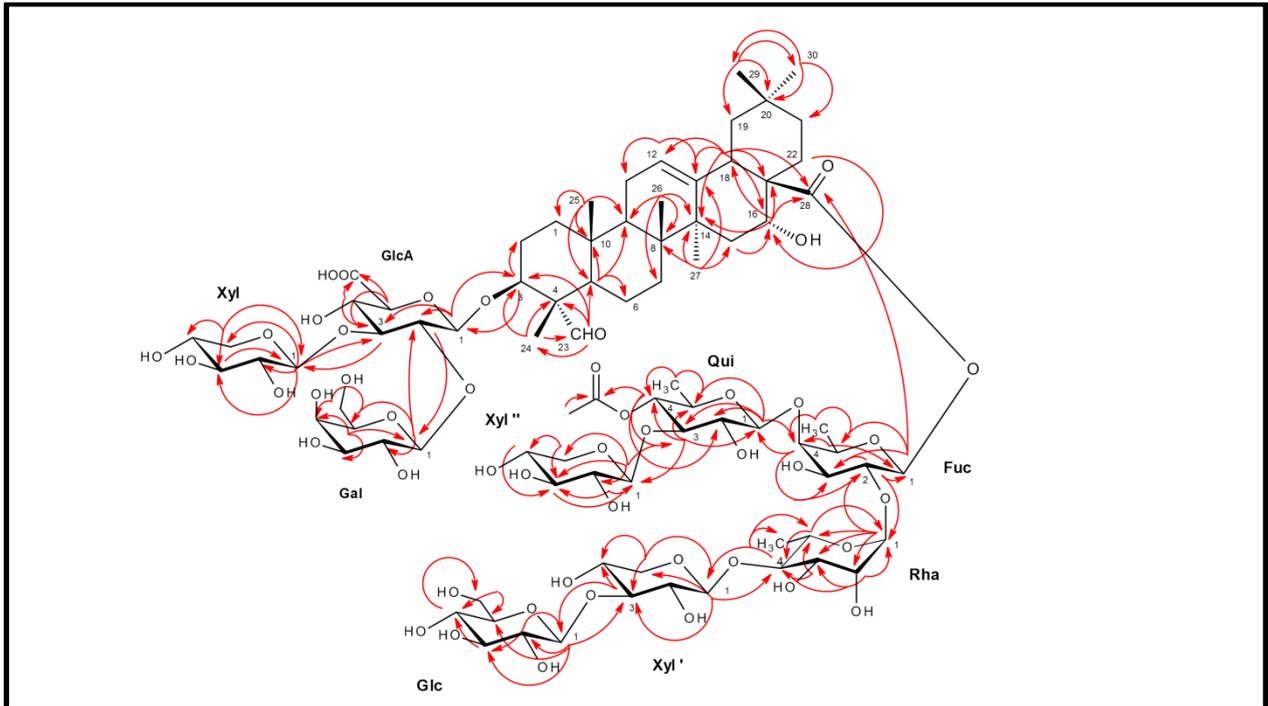
### 3.2. Isolation und Strukturaufklärung von SO1861 und GE1741

Die nach Isolation durchgeführten massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Messungen ermöglichten eine strukturelle Aufklärung von SO1861 aus *Saponaria officinalis* L. (Abb. 17, Abb. 18). Das MS/MS-Spektrum zeigte ein eindeutiges Signal, welches mit dem Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) 1861 auf die Masse des isolierten Saponins mit der Summenformel  $C_{83}H_{129}O_{46}$  hinwies. Durch den Verlust einer Acetylgruppe ( $\rightarrow m/z$  1820), des Oligosaccharids am C-28 ( $\rightarrow m/z$  955) und des Trisaccharids am C-3 ( $\rightarrow m/z$  485 (Aglycon)) konnten weitere Peaks identifiziert werden [87]. Die Abspaltung des Oligosaccharids führte zu weiteren sichtbaren Signalen.  $m/z$  499 und 337 stellen entsprechende Massen der Zucker-Bruchstücke dar. Die NMR-spektroskopischen Messungen erlaubten weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Zuckerreste. Das bisdesmosidische Saponin besitzt jeweils eine Zuckerkette an C-3 und C-28. An C-3 ist ein verzweigtes Trisaccharid mit den Zuckern Glukuronsäure, Xylose und Galaktose glykosidisch verbunden. Über eine Esterbindung bindet das Aglykon am C-28 ein verzweigtes Hexasaccharid. Gebunden an der Fucose ist sowohl ein Quinovose (acetyliert)-Xylose-Rest als auch ein Rhamnose-Xylose-Glucose-Rest.



**Abb. 17 MS/MS-Spektrum des isolierten SO1861**

Das Signal bei  $m/z$  1861 stellt die Massenzahl von SO1861 dar. Durch eine schrittweise Abspaltung der Zuckerreste konnten Peaks bei  $m/z$  955 (Monodesmosid) und  $m/z$  485 (Aglykon) beobachtet werden. Die schwächeren Signale deuten auf weitere Bruchstücke der Zuckerreste (u.a.  $m/z$  499 und 337) und des Aglykons hin.



**Abb. 18 Strukturformel von SO1861 nach Isolation von *Saponaria officinalis* L. nach NMR-Spektroskopie**

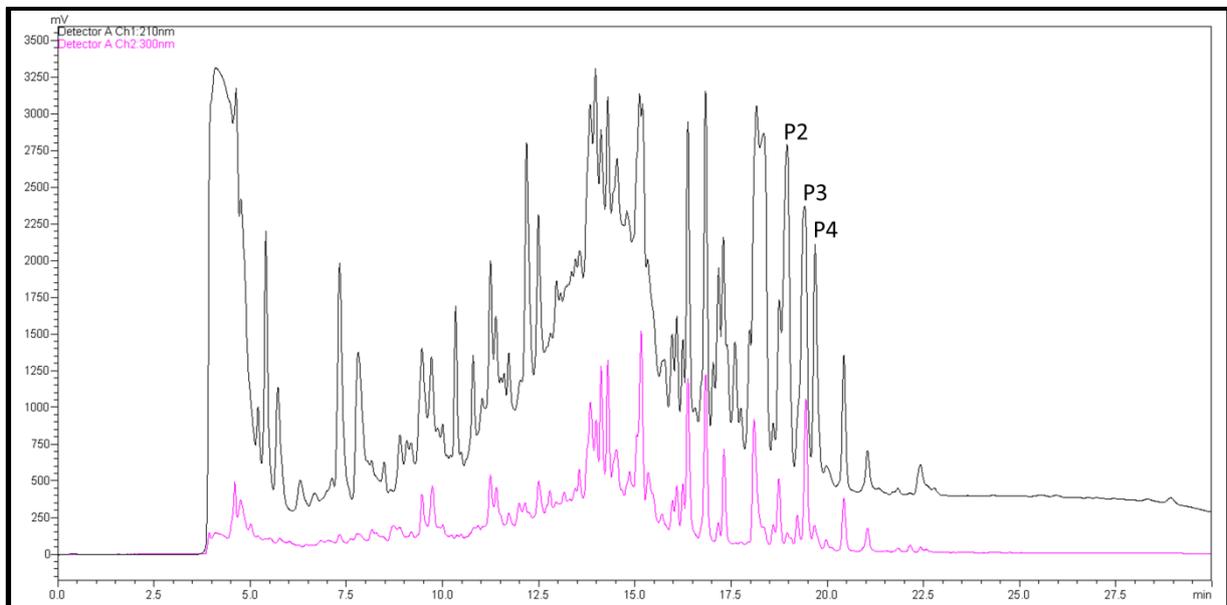
Das Triterpen-Grundgerüst ist mit einer sauren, verzweigten Zuckerkette an C-3 und einer acetylierten, verzweigten Zuckerkette an C-28 verbunden. Die identifizierte Strukturformel ist 3-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl Quillajasäure 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-(4-O-acetyl)- $\beta$ -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-fucopyranoside. Die roten Pfeile beschreiben die HMBC-Korrelationen.

Nach Anbau von *Gypsophila elegans* M.Bieb konnten mehrere Kilo Pflanzenmaterial zur Isolierung aktiver Saponine herangezogen werden (2.2.2.2). Das HPLC-Chromatogramm des Trockenextrakts offenbarte ein komplexes Gemisch (Abb. 20), aus denen Peak 2 – 4 zur Ermittlung der weiteren Isolationsstrategie auf ihre transfektionsverstärkenden Eigenschaften getestet wurden (3.6.1.3.3). Die weiteren Aufreinigungsschritte via HPLC führten schließlich zur Isolation des hochaktiven Saponins (Abb. 21, Abb. 22). Die Ergebnisse der MS/MS-Spektrometrie entschlüsseln die Masse des isolierten GE1741 und gaben mithilfe der weiteren Peaks erste Hinweise bezüglich des Glykosids und des Aglykons (Abb. 23).



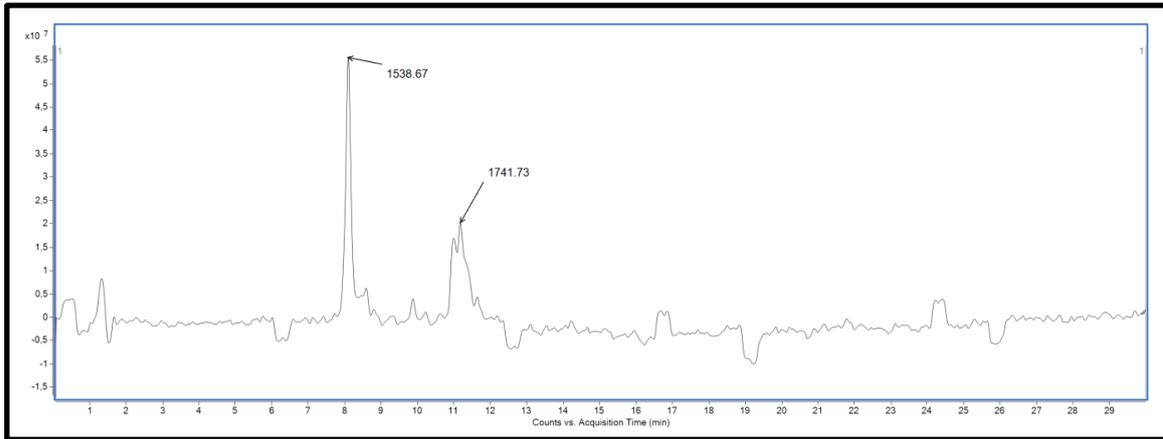
**Abb. 19 Anbau von *Gypsophila elegans* M.Bieb. in Brandenburg, Deutschland**

Nach Erlangen der Reife wurden die Pflanzen geerntet und geschnitten. Nach Gefriertrocknung wurden die Wurzeln gewaschen, getrocknet und gemahlen, die Samen gesiebt, entfettet und gemahlen. Das erhaltene Drogenpulver konnte schließlich für die Extraktion verwendet werden.



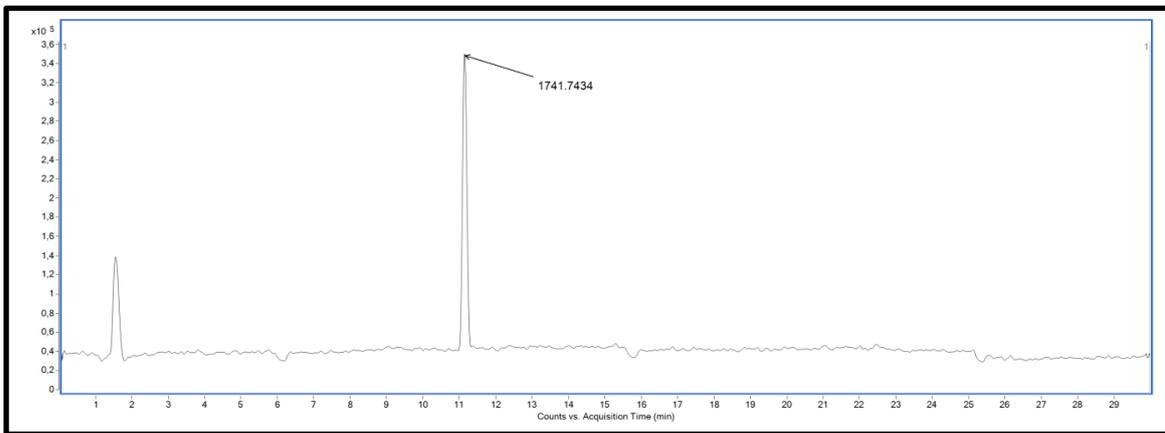
**Abb. 20 HPLC-Chromatogramm des *Gypsophila elegans* M.Bieb. Trockenextrakts**

Die Peaks 2 – 4 wurden auf ihre transfektionsverstärkende Aktivität getestet. Die Ergebnisse bestimmten über weitere Reinigungsschritte; Ordinate: Signalstärke in mV; Abszisse: Retentionszeit in min



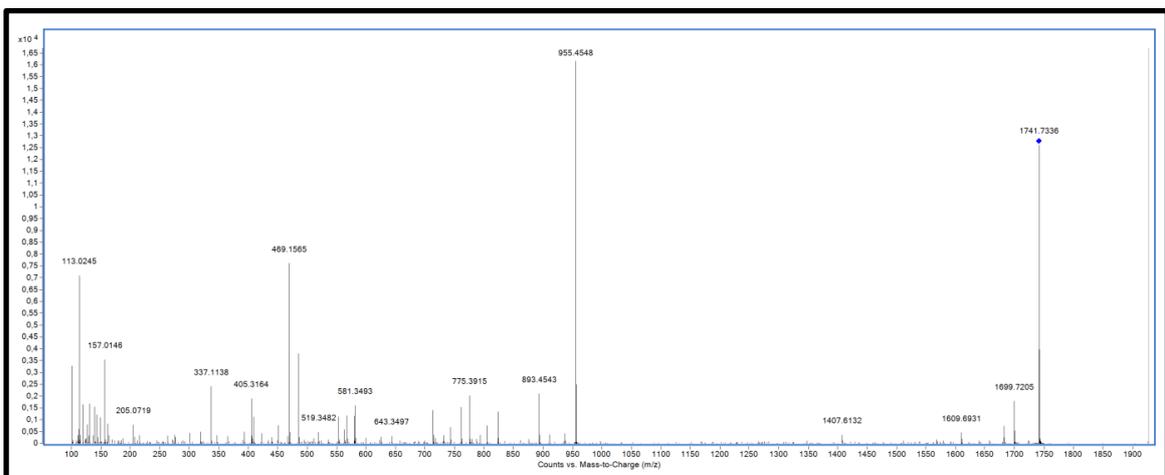
**Abb. 21 LC-MS-Chromatogramm von P2 nach semi-präparativer HPLC**

Zwei eindeutige Peaks mit den im Nachhinein ermittelten  $m/z$  1538 und  $m/z$  1741 konnten nach Auftrennung des P2 mithilfe der LC/MS-Spektrometrie ausgemacht werden; Ordinate: Signalstärke/Anzahl; Abszisse: Messzeit



**Abb. 22 LC-MS-Chromatogramm des isolierten GE1741 aus Gypsophila elegans M.Bieb.**

Eine weitere Auftrennung des detektierten Peaks aus Abb. 22 bewirkte eine deutlich klarere Auftrennung und damit die Isolierung von GE1741; Ordinate: Signalstärke/Anzahl; Abszisse: Messzeit



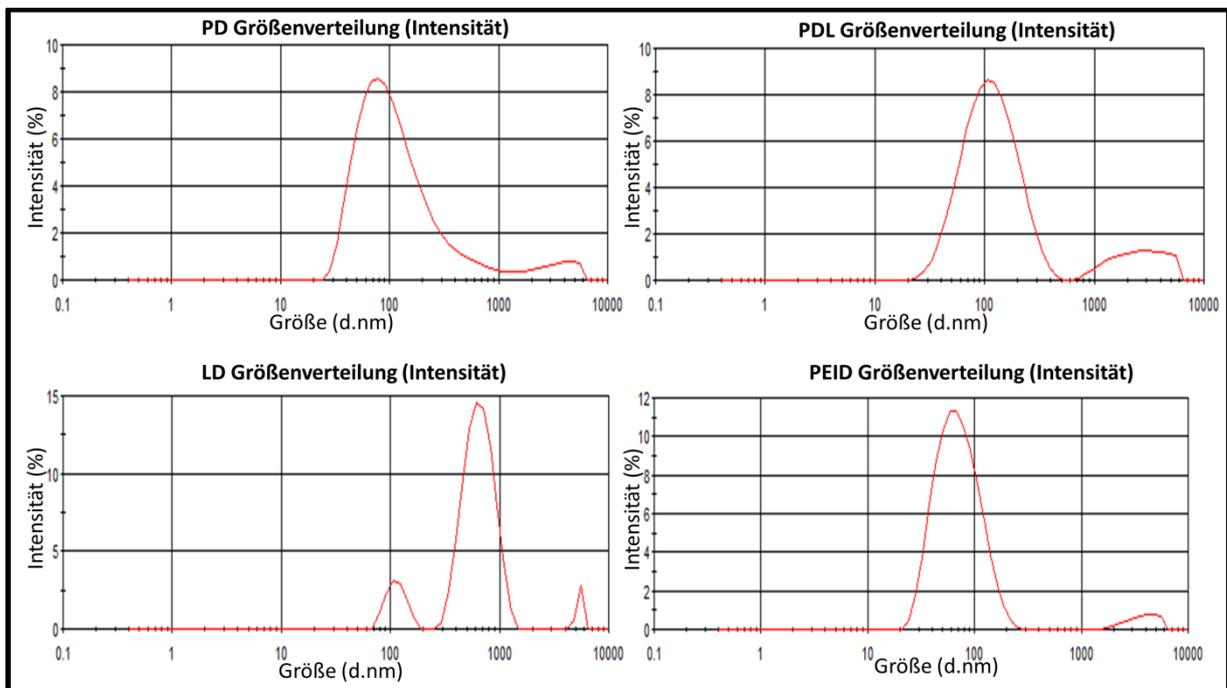
**Abb. 23 MS/MS-Spektrum von GE1741 aus Gypsophila elegans M.Bieb.**

Der Peak bei  $m/z$  1741 stellt das isolierte Saponin dar. Durch Abspaltung der Zucker konnten die Peaks des Monodesmosids ( $m/z$  955) und des Aglykons ( $m/z$  485) sowie der abgespaltenen Zucker aufgezeichnet werden; Ordinate: Signalstärke/Anzahl; Abszisse: Masse-Ladungs-Zahl ( $m/z$ )

### 3.3. Nanoplexcharakterisierung

#### 3.3.1. Größenverteilung und Zetapotential der Nanoplex-Partikel

Die Größe, Zetapotential und PDI der Komponenten und formulierten Nanoplexe ließen eine Einschätzung der Größe, Homogenität und Stabilität der Nanoplexe zu. Während die höchste Intensität der PD-, PDL- und PEID-Nanoplexe hauptsächlich im Bereich von 100 nm (*Abb. 24, Tab. 21*) und ein, relativ gesehen, geringer Anteil in höheren Nanometerbereichen vorlag, konnte eine abweichende Verteilung bei LD-Nanoplexen beobachtet werden. Einem geringen Anteil bei jeweils ca. 100 nm und bei ca. 6.000 nm stand eine hohe Intensität bei ca. 600 nm entgegen.



**Abb. 24 Größenverteilung der formulierten PD-,PDL-,LD- und PEID-Nanoplexe**

Mittels Intensität der Lichtstreuung konnten die prozentualen Anteile der Partikelgrößen dargestellt werden. PD-, PDL- und PEID-Nanoplexe zeigten eine ähnliche Verteilung auf mit einem höchsten Größenanteil bei ca. 100 nm. LD-Nanoplexe ließen lediglich einen geringen Anteil an Partikelgrößen im Bereich von 100 nm erkennen, dagegen konnte die Mehrheit bei ca. 600 nm erfasst werden.

Die Beobachtungen der Größenverteilung werden durch die durchschnittlichen Größenwerte in *Tab. 21* unterstützt. Freie DNA (D) zeigte hohe Partikelgrößen ( $1.723 \pm 1.039$ ), inhomogene Größenverteilungen (PDI 0,923) und ein negatives Potential (Zetapotential  $-27,9$  mV) auf. Der Einbau der DNA in Nanoplexe führte zu einer Reduktion der mittleren Größe, zu einer homoge-

nen Größenverteilung und zu einer Ausbildung eines positiven Zetapotentials. PD- und PEID-Nanoplexe wiesen Partikelgrößen von 74 nm und 66 nm mit niedrigen PDI-Werten ( $\sim 0,2$ ; homogen), dagegen liposomen-basierte Nanoplexe (LD, PLD) mittlere Partikelgrößen von 579 nm und 113 nm mit höheren PDI-Werten ( $\sim 0,5$ ; inhomogen) auf.

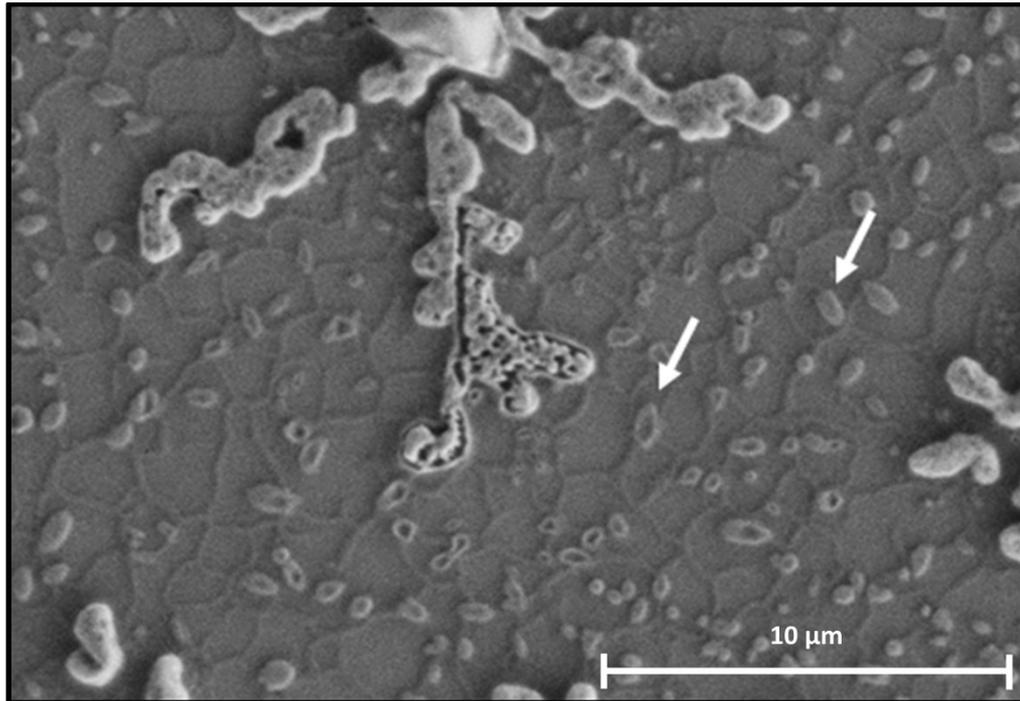
**Tab. 21 Größe, PDI und Zetapotential der formulierten Nanoplexe und derer Komponenten**

	Z-average Mittelwert in nm	PDI	Zetapotential in mV
<b>Nanoplex - Komponenten</b>			
<b>P</b>	224 ± 6,4	0,587	+5,9
<b>D</b>	1.723 ± 1.039	0,924	-27,8
<b>L</b>	72 ± 2,0	0,293	+57,2
<b>PEI</b>	385 ± 78,2	0,236	+10,0
<b>Nanoplex – Formulierungen</b>			
<b>PD</b>	74 ± 3,2	0,234	+28,5
<b>PDL</b>	113 ± 3,2	0,455	+44,1
<b>LD</b>	579 ± 6,7	0,562	+35,6
<b>PEID</b>	66 ± 0,9	0,236	+10,0

*Durch Formulierung in Nanoplexe konnte eine Komplexierung der DNA erreicht werden. Alle Nanoplexe wiesen ein positives Zetapotential auf. PD- und PEID-Nanoplexe bildeten homogene Partikelgrößen unter 80 nm, liposomale Nanoplexe (LD, PLD) inhomogene Partikelgrößen über >100 nm.*

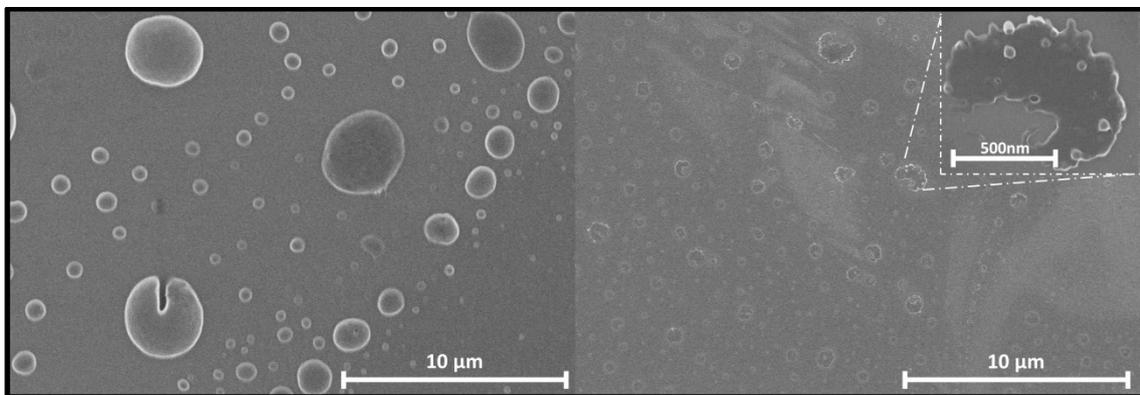
### 3.3.2. Elektronenmikroskopische Aufnahme von PD-Partikeln

Mikroskopische Aufnahmen sollten die Form, Größe und die Wechselwirkung der Nanoplexe mit Saponinen offenbaren. Mithilfe der Maßstäbe konnte die gemessene PD-Partikelgröße im Bereich von < 100 nm bestätigt werden. Die Form konnte als „ei“- bzw. „doughnut“-förmig erkannt werden (*Abb. 25*). Mit Präsenz von SO1861 in der Nanoplex-Suspension wurden an der Oberfläche der Partikel Anzeichen von Wechselwirkungen beobachtet (*Abb. 26*).



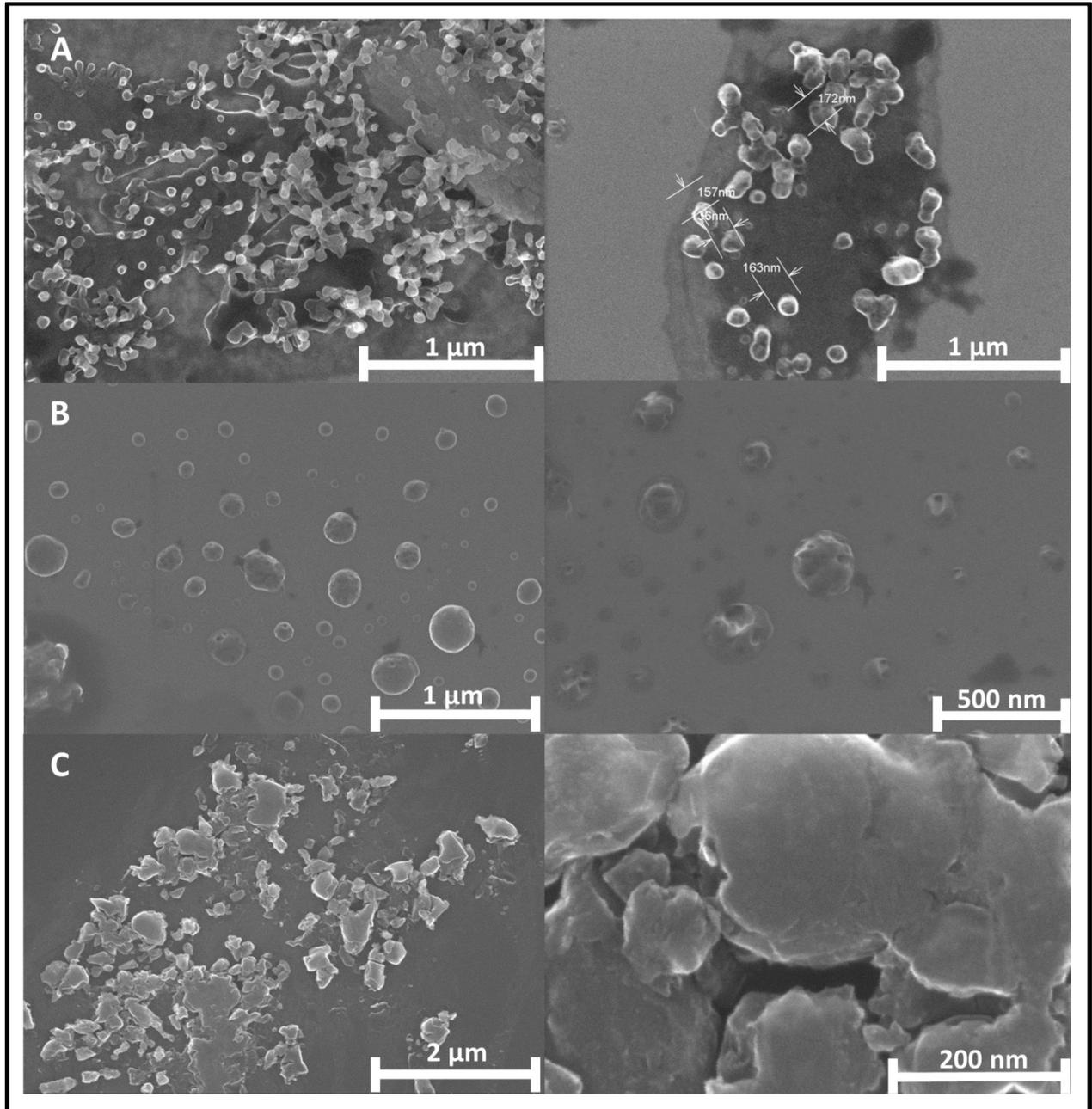
**Abb. 25 Elektronenmikroskopische Aufnahme der formulierten PD-Nanoplexe**

Mithilfe des Maßstabs konnten die mit Pfeil markierten Formen als „ei“- bzw. „doughnut“-förmige PD-Nanoplexe identifiziert werden. Das große Gebilde stellte womöglich ein unbestimmbares Artefakt dar.



**Abb. 26 Elektronenmikroskopische Aufnahme der PD-Nanoplexe  $\pm$  SO1861**

**Links:** Formuliert PD-Nanoplexe ohne Saponinzugabe. Die Partikel wiesen eine rundliche Form und gemäß Maßstab eine Größe von  $< 100$  nm und  $> 500$  nm auf. **Rechts:** Formuliert PD-Nanoplexe mit Saponinzugabe. Vergleichbare Partikelgrößen ( $< 100$  nm und  $> 500$  nm) waren zu erkennen, jedoch konnten Formveränderungen beobachtet werden.



**Abb. 27 Elektronenmikroskopische Aufnahme der PD-Nanoplexe  $\pm$  SO1861 (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )**

**A** PD-Nanoplexe ohne Saponinzugabe. Runde Nanoplexe im Größenbereich von ca. 100nm konnten verzeichnet werden

**B** PD-Nanoplexe mit 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SO1861. Erneut wurden oberflächliche Veränderungen an den Nanoplexen beobachtet.

**C** PD-Nanoplexe mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SO1861. Die hohe Konzentration an SO1861 führte zu drastischen Strukturveränderungen.

### 3.3.3. Stabilitäts- und Integritätseinflüsse von SO1861 auf Nanoplexe

Das DNA-Komplexierungs-Assay sowie das Gel-Retention-Assay sollten die Komplexierungseffizienz der verwendeten Nanoplexe erfassen. Zusätzlich wurde der Saponineinfluss (SO1861)

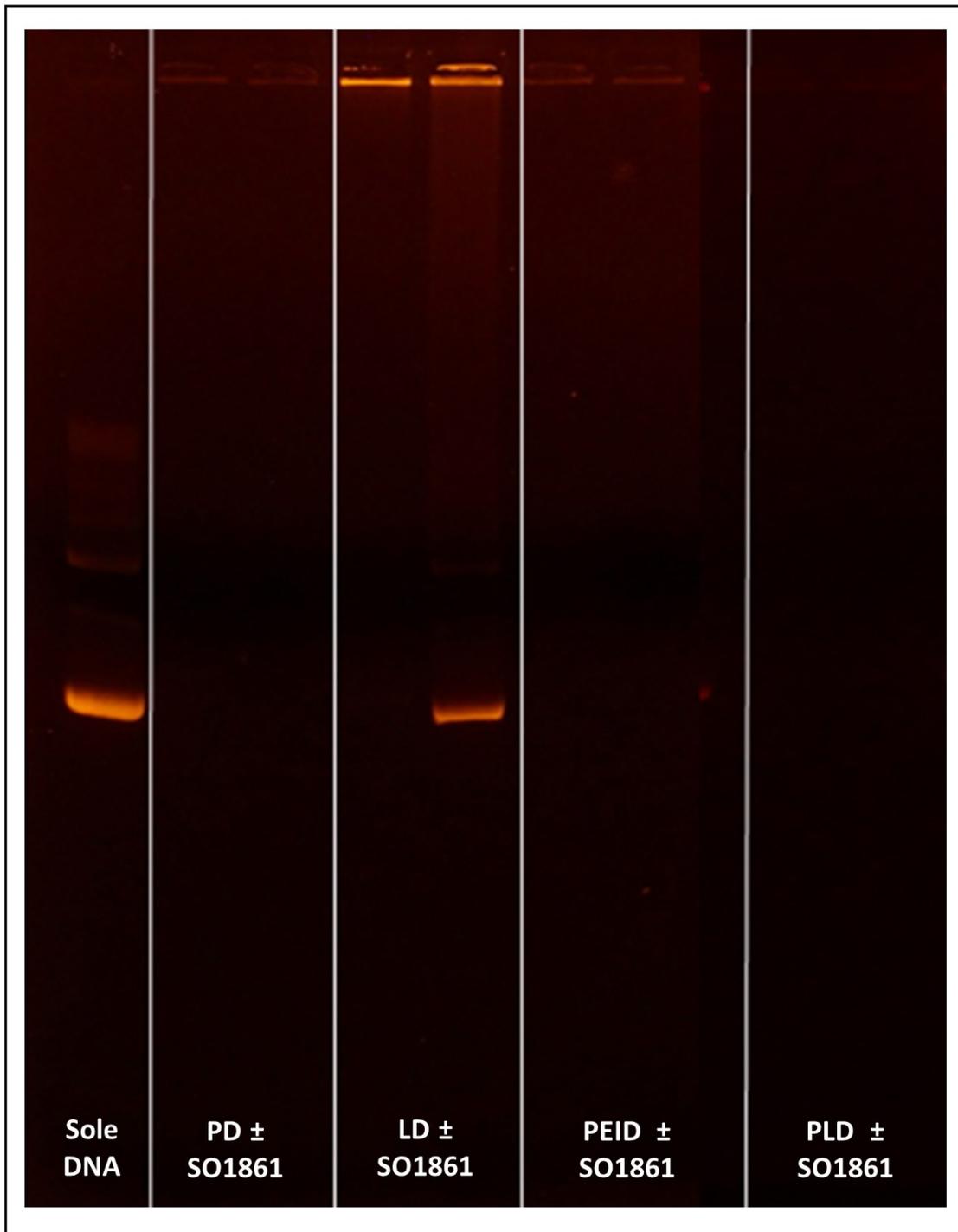
auf die Integrität der Partikel untersucht (Tab. 22). Die quantitative Ermittlung der Komplexieffizienz mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs wies eine nahezu vollständige DNA-Bindung durch PD (98,2%), PDL (96,3%) und PEID (97%)-Nanoplexe auf. Die Zugabe von SO1861 in 2,5 µg/ml oder 20 µg/ml führte zu keiner signifikanten Änderung der Effizienz. Liposomale LD-Partikel zeigten eine inhomogene und ineffiziente Komplexierung (64,4%), welche durch SO1861 (2,5 µg/ml: 72%, 20 µg/ml: 78,2%) jedoch leicht und bei Gabe von 20 µg/ml SO1861 signifikant erhöht wurde.

**Tab. 22 Komplexierungsassay – Einfluss von SO1861 auf die DNA-Komplexierung der Nanoplexe (quantitativ)**

	SO1861 0 µg/ml	SO1861 2,5 µg/ml	SO1861 20 µg/ml
PD	98 ± 0,2	98 ± 0,9	98 ± 0,2
PDL	96 ± 2,8	97 ± 1,5	98 ± 0,7
LD	64 ± 10,9	72 ± 3,0	78 ± 3,8*
PEID	97 ± 1,8	97 ± 2,0	97 ± 1,4

SO1861 führte zu keiner signifikanten Änderung der kompakt eingebauten DNA Peptid-basierter oder Polymer-basierter Nanoplexe. Liposomen-basierte LD-Partikel zeigten eine mäßige DNA-Komplexierung, welche durch SO1861-Zugabe konzentrationsabhängig erhöht wurde. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne SO1861-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an einem Agarosegel wurde der Anteil an freier DNA von komplexierter DNA (in nach außen neutralen Partikeln) getrennt und mithilfe von Ethidiumbromid visualisiert (Abb. 28). PD-, PDL- und PEID-Nanoplexe wiesen schwach sichtbare DNA-Banden und somit eine effiziente Komplexierung auf. Deutliche DNA-Banden waren im Bereich des Startpunktes bei LD-Nanoplexen zu beobachten. Während SO1861 das Ergebnis von PD-, PDL- und PEID-Nanoplexen nicht beeinflusste, kam es nach Saponinzugabe zu einer spannungsgerichteten Migration freier DNA.



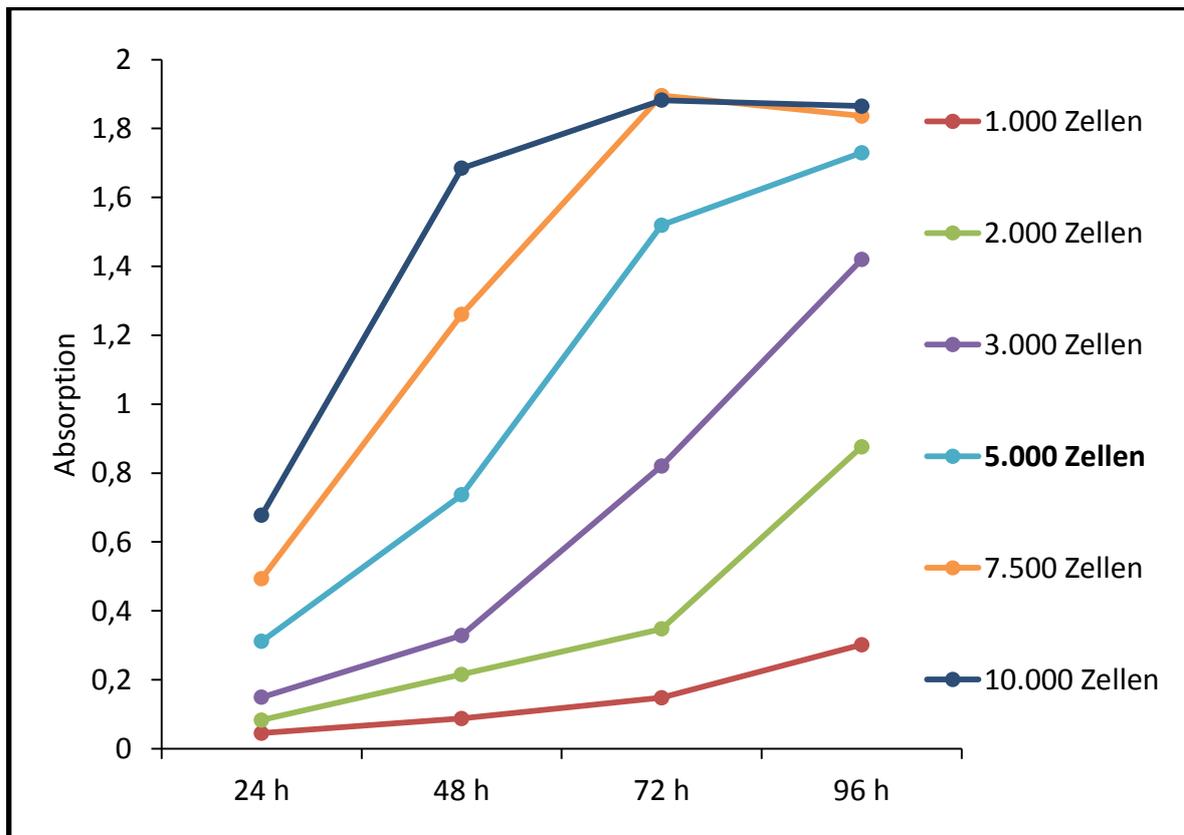
**Abb. 28 DNA-Retentions-Assay – Einfluss von SO1861 auf die DNA-Komplexierung der Nanoplexe (visuell)**

Freie DNA wurde durch Ethidiumbromid angefärbt und erschien als rot-orangene Bande. PD-, PEID- und PLD-Nanoplexe deuten mit keiner/geringer Färbung auf eine komplexe DNA-Bindung hin. LD-Partikel wiesen eine sichtbare Bande am Startpunkt auf, SO1861-Zugabe führte zu einer gerichteten DNA-Wanderung auf dem elektromagnetischen Feld.

### 3.4. Bestimmungen zum Zellversuch

#### 3.4.1. Bestimmung der Zellzahlen

Für die Durchführung eines MTT-Assays war vorab die Zellzahl zu bestimmen, um eine Zellüberpopulation und damit verbundene toxische Auswirkungen zu verhindern (Abb. 29). Der Wachstumsverlauf ist grundsätzlich sigmoidal. Betrachtet wird jedoch lediglich der Zeitabschnitt von 0 – 96 h (Dauer des Assays), sodass verschiedene Abschnitte des Wachstumsverlaufs dargestellt werden. Da mit unterschiedlichen Zellzahlen unterschiedliche Startpunkte des Sigmoidalverlaufs gewählt werden, galt es die optimale Zellzahl (beginnender exponentieller Anstieg) zu ermitteln. Während mit mehr als 5.000 Zellen zum Endpunkt des Assays eine Plateauphase erreicht wurde und weniger als 2.000 Zellen eine unzureichende Zellzahl für Absorptionsmessung aufwiesen, empfahl sich die Zahl von 5.000 Zellen für die folgenden Absorptionsmessungen.

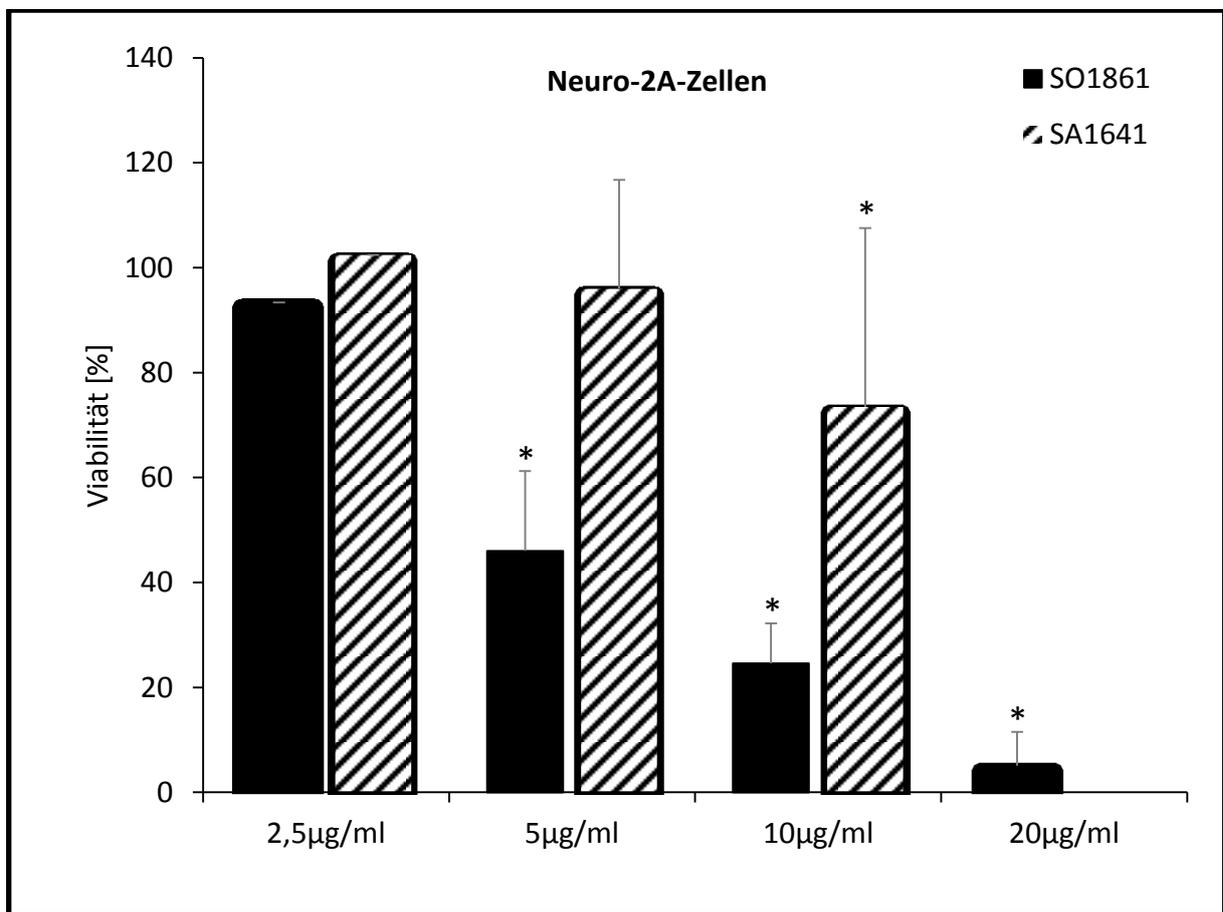


**Abb. 29 Bestimmung der optimalen Zellzahl für weitere Assays via MTT-Assay an Neuro-2A-Zellen**

Mit dem Einsatz von 5.000 Zellen wurde eine ausreichende Zellzahl, jedoch keine Überpopulation der Zellen erzielt. 7.500 und 10.000 erreichten früh eine Überpopulation, während 1.000 – 3.000 eingesetzte Zellen noch zu geringe Zellzahlen aufwiesen.

### 3.4.2. Bestimmung der Saponin-Arbeitskonzentrationen

Eine Absorptionsmessung im Rahmen des MTT-Tests sollte die für Zellversuche zu verwendende Saponinkonzentration ermitteln. Durch den Bezug zur unbehandelten Negativkontrolle (100%) konnte aus der Absorption die Viabilität abgeleitet werden (*Abb. 30*). Durch einen Signifikanztest (U-Test) konnte eine nicht toxische Arbeitskonzentration für SO1861 (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) und SA1641 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) ermittelt werden.

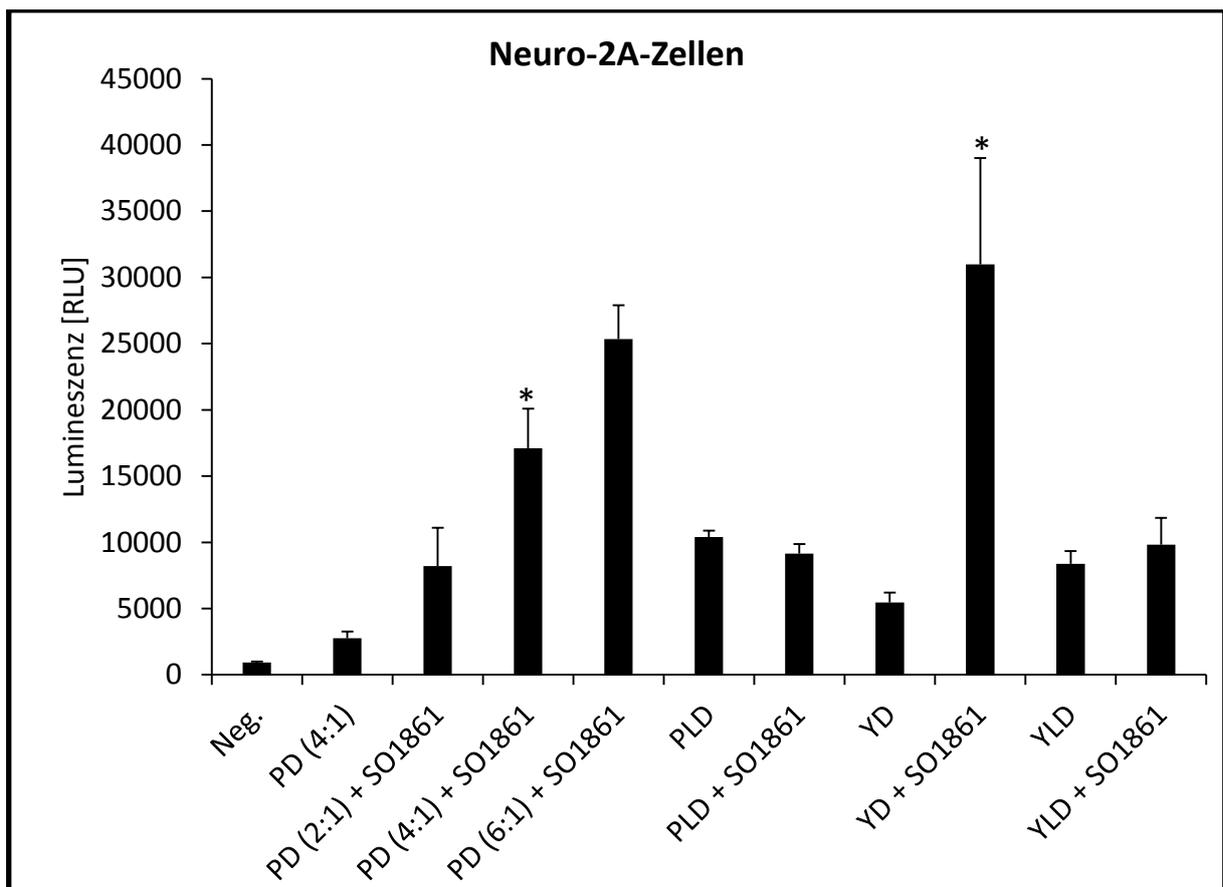


**Abb. 30** Ermittlung der SO1861- und SA1641-Arbeitskonzentration via MTT-Assay an Neuro-2A-Zellen

5  $\mu\text{g/ml}$  SO1861 und 10  $\mu\text{g/ml}$  SA1641 wiesen einen signifikanten Viabilitätsunterschied zur Negativkontrolle (100%) auf, sodass die nächstkleinere Konzentration für Zelleperimente angewendet werden musste. \*signifikant verglichen zur unbehandelten Negativkontrolle, die 100%ige Viabilität darstellte, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

### 3.5. Lumineszenz-Assay

Die Transfektion von Neuro-2A-Zellen mit einem Luciferasevektor stellte die erste Transfektionsmethode zur Bestimmung der transfektionsverstärkenden Eigenschaften dar. Durch Lumineszenzmessung sollte sowohl die Transfektionsmethode als auch der Einfluss von Saponinen auf die Transfektion beurteilt werden (Abb. 31). Ohne SO1861-Zugabe wiesen liposomale Nanoplexe (PLD, YLD) die höchste Lumineszenz auf (~10.000 RLU). Abgesehen von PLD-Transfektionen führte SO1861 (2,5 µg/ml) zu einer Verstärkung des Lumineszenzsignals aller Transfektionsmethoden. YLD-Transfektionen wurden durch SO1861 nur leicht verstärkt. PD-Nanoplexe mit einem Massenverhältnis von 6:1 zeigten sich überlegen gegenüber PD-Nanoplexen mit 4:1- und 2:1-Massenverhältnissen mit Saponineinfluss. Der höchste Lumineszenzwert fand sich bei SO1861 vermittelten YD-Nanoplexen (~30.000 RLU).



**Abb. 31 Lumineszenzmessung nach Luciferasegen-Transfektion von Neuro-2A-Zellen**

Neuro-2A-Zellen wurden mithilfe verschiedener Transfektionsmethoden mit einem Luciferasegen transfiziert. Während bei PLD-Partikeln eine leichte Lumineszenzschwächung beobachtet wurde, konnte SO1861 die Lumineszenz der anderen Methoden erhöhen. Zielgerichtete YD-Nanoplexe erreichten die höchsten Werte. Lediglich peptidbasierte PD- und YD-Transfektionen erzielten eine signifikante Intensitätsänderung. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne SO1861-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

## **3.6. Fluoreszenz-Assays**

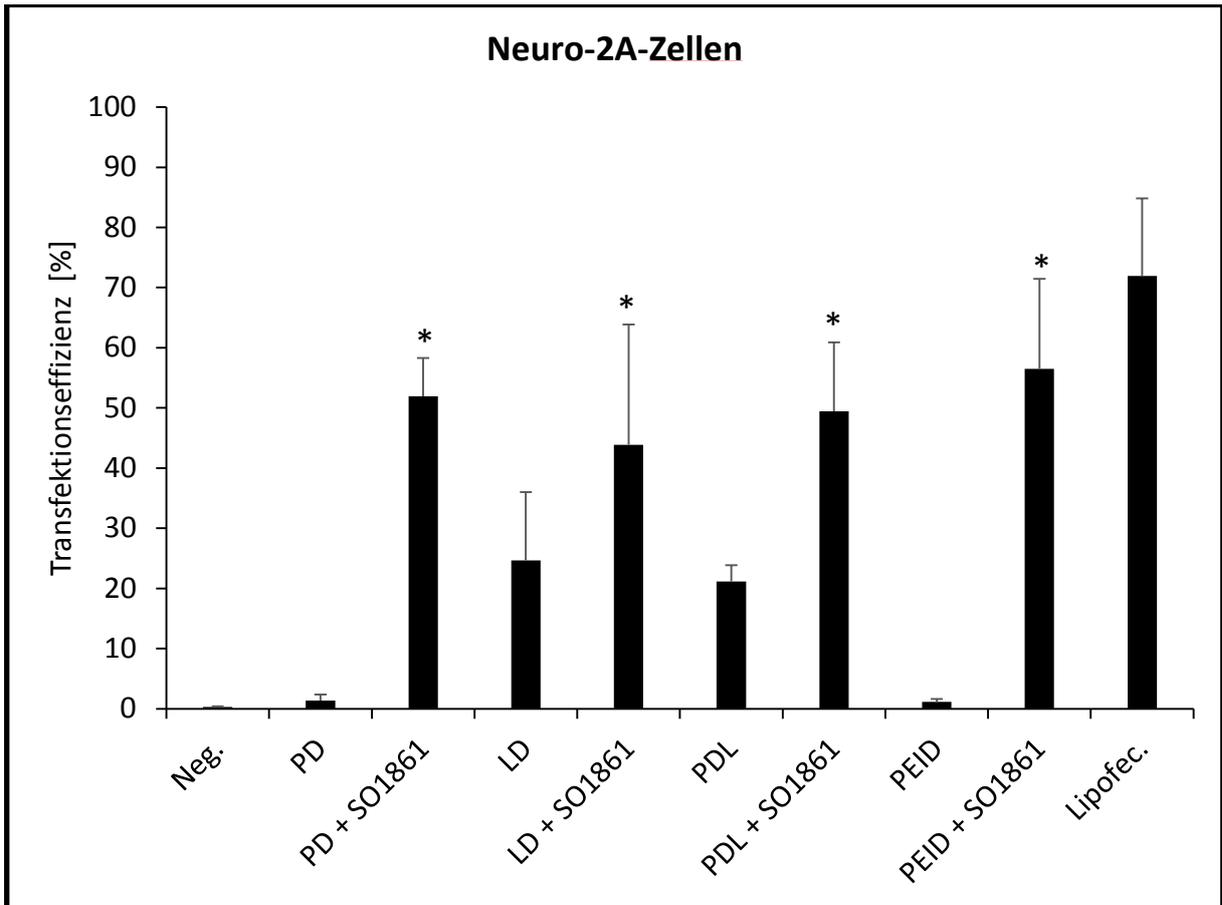
### **3.6.1. Transfektionseffizienz**

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz stellt eine praktische und aussagekräftige Methode dar, welche die transfektionsverstärkenden Eigenschaften umfassend beschreibt. Durch das Betrachten jeder einzelnen Zelle mithilfe des FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) konnte nach Fluoreszenzmessung eine Aussage über die Gesamtpopulation und verbunden mit der Bestimmungsmethode nach (2.2.7.1, *Abb. 10*) eine (Transfektions-)Effizienz bestimmt werden, welche in% angegeben wurde.

#### **3.6.1.1. Effizienzänderung von Transfektionsmethoden**

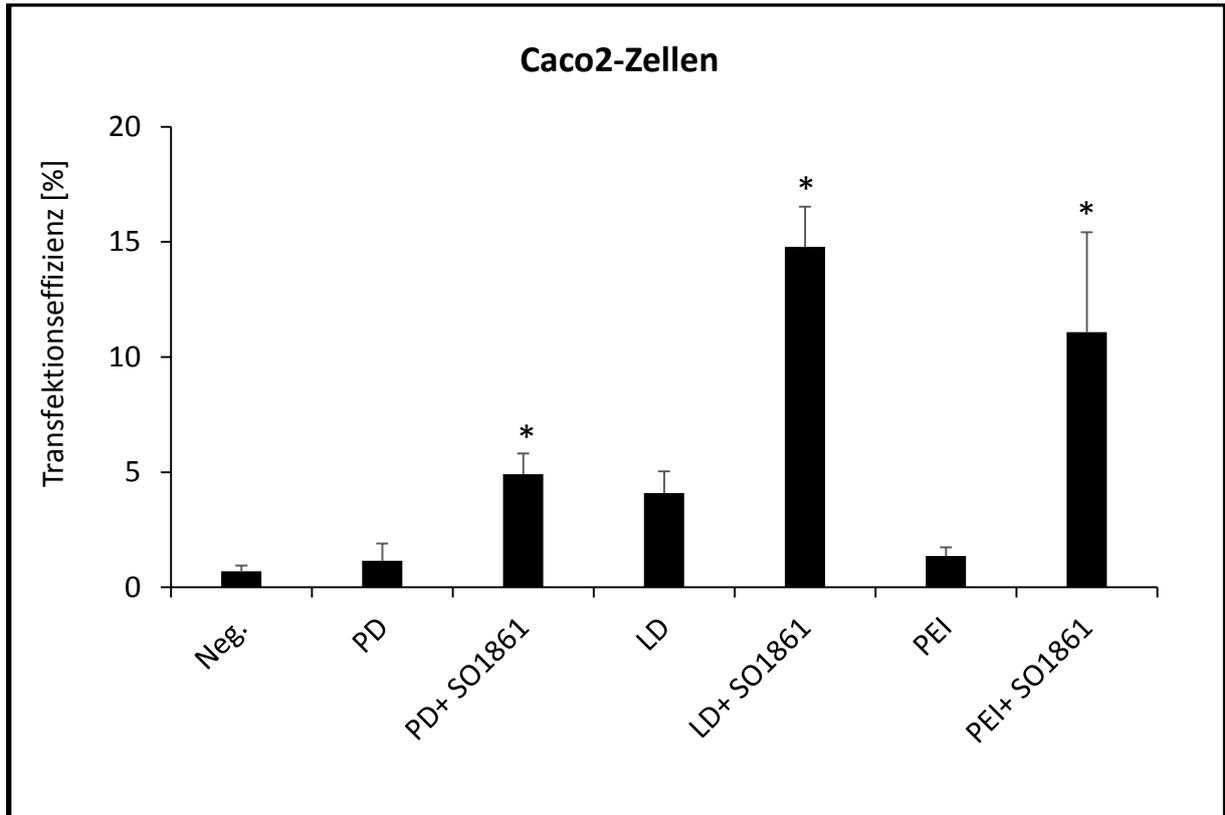
Die in 3.3 charakterisierten Nanoplexe PD, LD, PEID und PLD wurden formuliert und zur Transfektion von Neuro-2A-, Caco2-, HEK293-, SKN- und SHSY-Zellen mit GFP-DNA herangezogen (*Abb. 32, Abb. 33, Abb. 34, Abb. 35*). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen.

An Neuro-2A-Zellen erzielten PD- (2%) und PEID-Partikel (2%) eine geringe Effizienz, liposomale PLD- und LD-Partikel hingegen transfizierten je 25% und 22% der Zellen. Der Einsatz von SO1861 (2,5 µg/ml) führte zu einer signifikanten Verstärkung aller Transfektionsmethoden. Mit SO1861 konnte eine 38-fache Verstärkung für PD-Transfektionen und eine 49-fache Verstärkung für PEID-Transfektionen erreicht werden. Die Kombination von Saponin und liposomalen Nanoplexten führte zu einer Steigerung um ca. 20% auf je 44% (LD) und 50% (PLD) Transfektionseffizienz. Als Positivkontrolle diente das kommerziell erhältliche Lipofectamin® (72%).



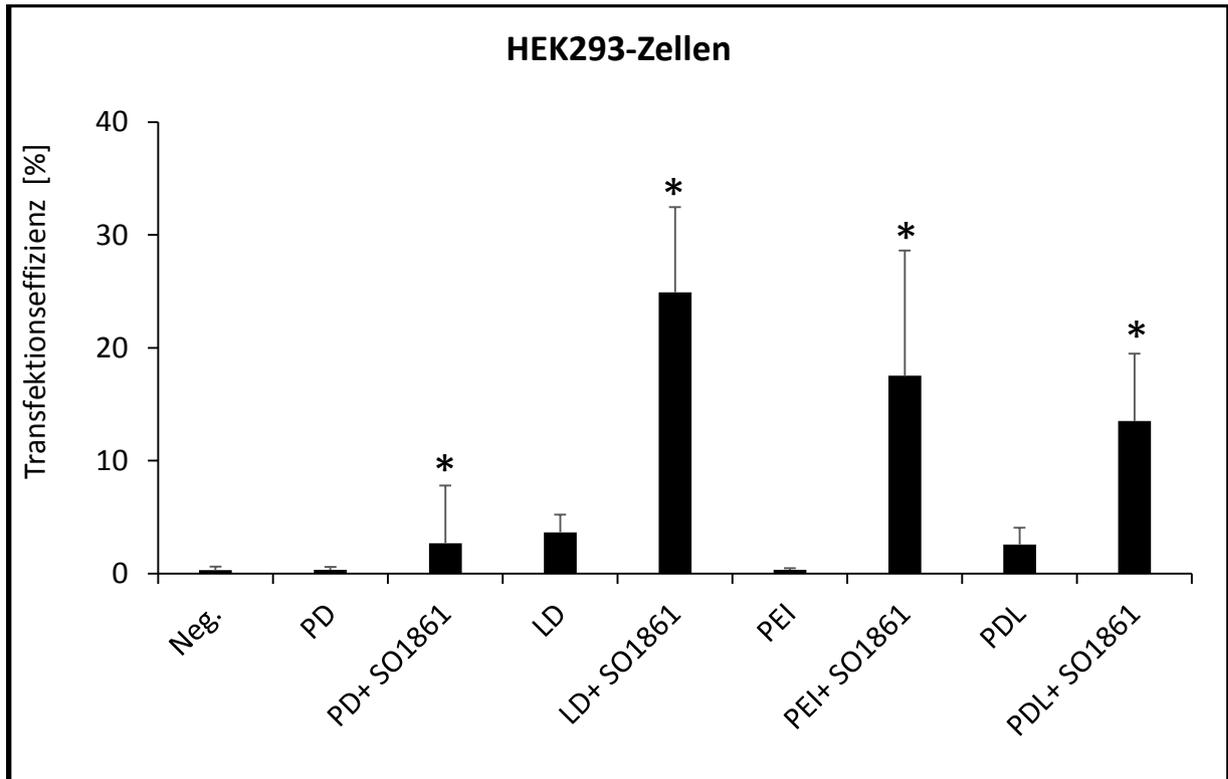
**Abb. 32** Transfektion von pEGFP-N3 mit verschiedenen Transfektionsmethoden an Neuro-2A-Zellen  $\pm$  SO1861  
 Mit SO1861-Co-Applikation konnte durchgehend eine deutliche Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht werden.  
 \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne SO1861-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

Bei Caco2-Zellen konnte insgesamt eine geringere Transfektionseffizienz beobachtet werden (Abb. 33). Der Effekt von SO1861 an PD-Transfektionen zeigte sich trotz signifikanter Steigerung als schwach ausgeprägt (2% → 4%). Die Effizienz liposomaler Nanoplexe wurde mit SO1861 von 2% auf 12% erhöht, polymere PEID-Nanoplexe wiesen mit Saponin eine Effizienz von 8% auf (ohne SO1861 5%).



**Abb. 33 Transfektion von pEGFP-N3 mit verschiedenen Transfektionsmethoden an Caco2-Zellen ± SO1861**  
 SO1861 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Transfektionseffizienz. Liposomale Nanoplexe erwiesen sich am effizientesten. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne SO1861-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

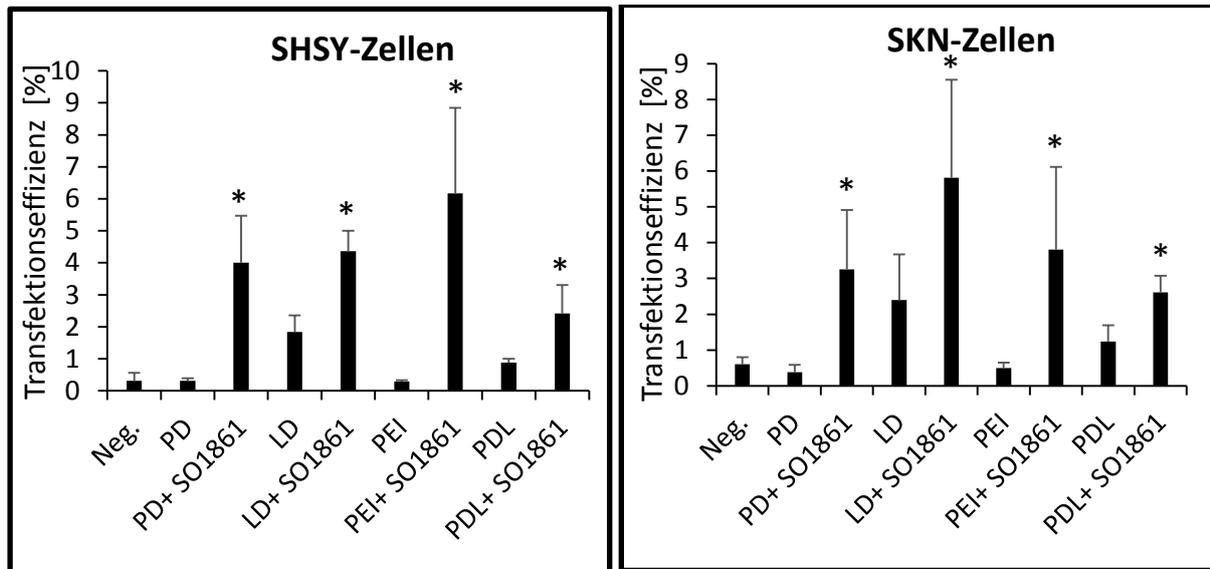
Die höchsten SO1861-vermittelten Transfektionseffizienzwerte an humanen Krebszellen wurden bei HEK293-Zellen beobachtet (Abb. 34). Analog zu den Caco2-Zellen stellten liposomale und polymere Nanoplexe die effektivsten Methoden dar. Die Zugabe von SO1861 führte zu einer je 21%igen und 11%igen Effizienzerhöhung liposomaler Nanoplexe auf insgesamt 25% (LD) und 14% (PDL). Die Kombination von PEID-Nanoplexen und SO1861 transfizierte 18% aller Zellen, PD-Transfektionen wurden nur gering beeinflusst (1% → 3%).



**Abb. 34** Transfektion von pEGFP-N3 mit verschiedenen Transfektionsmethoden an HEK293-Zellen ± SO1861

Alle Transfektionsmethoden wiesen eine signifikante Effizienzsteigerung auf. LD-Nanoplexe transfizierten mit SO186 25% aller Zellen, PD-Transfektionen erreichten niedrige Effizienzwerte. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne SO1861-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

An den humanen Neuroblastomazelllinien SHSY und SKN wurde prozentual nur ein geringer Anteil an Zellen transfiziert (Abb. 35). Obwohl durchgehend eine signifikante Steigerung durch SO1861 erzielt wurde, stellten PEID-Transfektionen bei SHSY-Zellen (7%) und LD-Transfektionen bei SKN-Zellen (6%) die effizientesten Methoden.

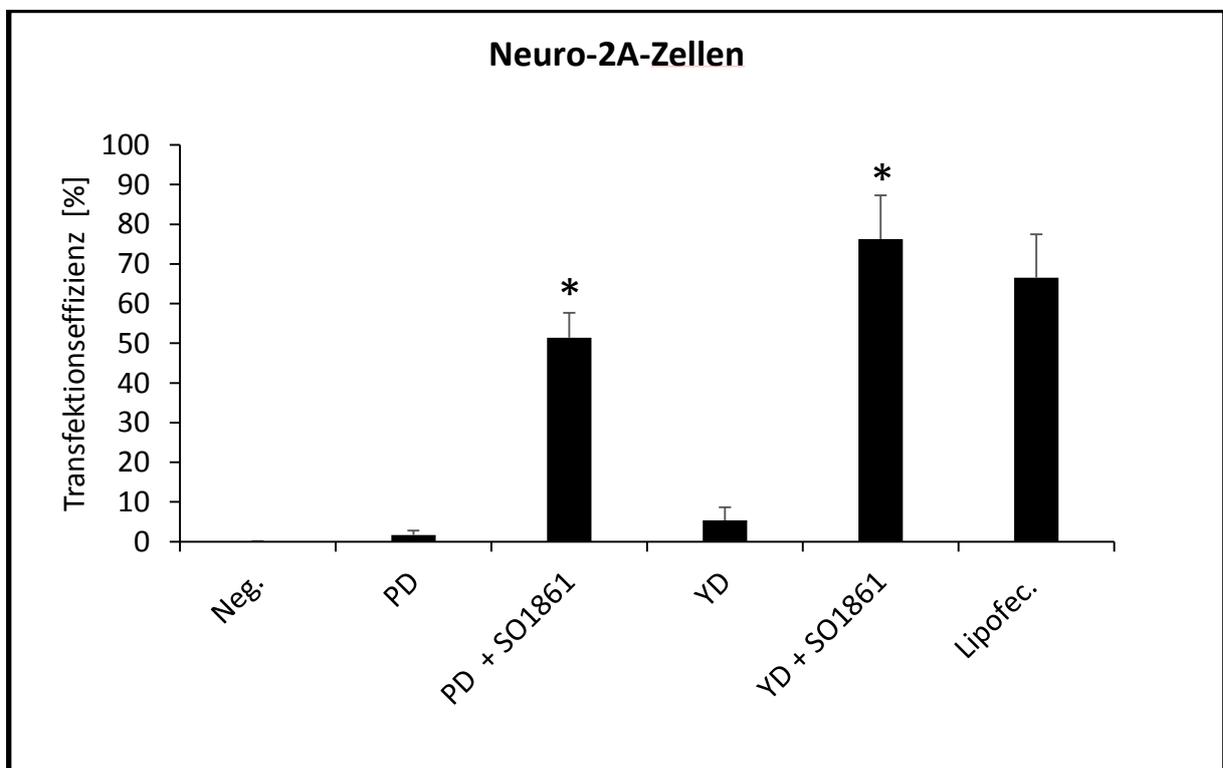


**Abb. 35 Transfektion von pEGFP-N3 mit verschiedenen Transfektionsmethoden an SHSY- und SKN-Zellen  $\pm$  SO1861**

Die Transfektion von SHSY- und SKN-Zellen erwies sich insgesamt als ineffizient. Die Co-Applikation von SO1861 erhöhte die Transfektionseffizienz jeglicher Methoden signifikant. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne SO1861-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

### 3.6.1.2. Effizienzänderung gerichteter und ungerichteter Transfektionen

Der Effekt der Erweiterung der Poly-Lysin-Peptide mit einer spezifischen Aminosäuresequenz (GACYGLPHKFCG), die zu einer gerichteten, aber noch unbekannt [70] Rezeptorbindung führt, wurde untersucht und jene gerichteten YD-Nanoplexe mit ungerichteten PD-Nanoplexen verglichen (Abb. 36). Lipofectamin® diente als Positivkontrolle und erzielte eine gewohnt hohe Effizienz von 67%. PD-Transfektionen wurden durch SO1861 (2,5 µg/ml) von 2% auf 52% verstärkt. YD-Nanoplexe wiesen verglichen mit PD-Nanoplexen eine höhere Effizienz auf, sowohl ohne SO1861 (6%) als auch mit SO1861 (77%).



**Abb. 36 Transfektion von pEGFP-N3 mit gerichteten und ungerichteten Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen**

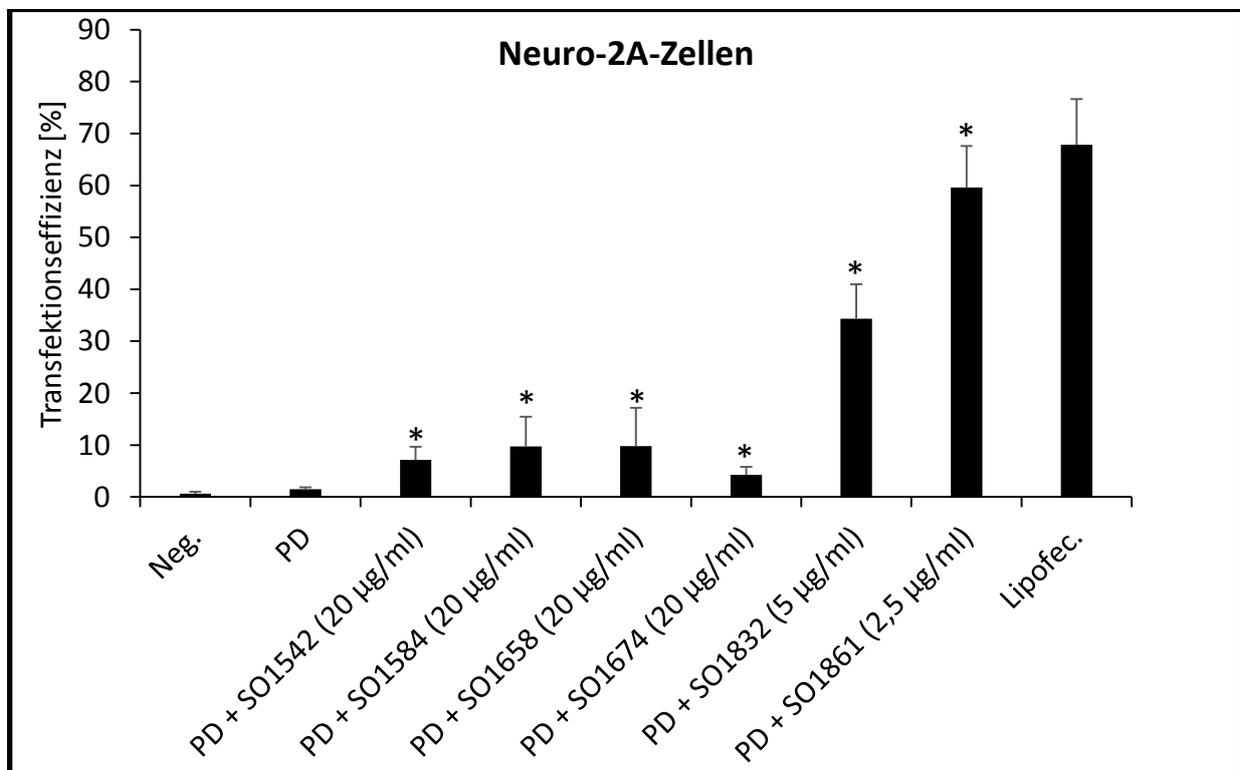
YD-Nanoplexe wiesen mit und ohne Saponin-Co-Applikation eine effizientere Transfektion als PD-Nanoplexe auf. Die SO1861-vermittelte YD-Transfektion übertraf zudem die Lipofectamin-vermittelte Transfektion. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne SO1861-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

### 3.6.1.3. Saponinscreening

Zur bestmöglichen Beurteilung der transfektionsverstärkenden Eigenschaft isolierter Saponine wurden Neuro-2A-Zellen mit PD-Nanoplexen transfiziert, dabei wurde der Einfluss der co-applizierten Saponine betrachtet.

#### 3.6.1.3.1. *Saponaria officinalis* L.-Saponine

Isolierte Saponine der Stammpflanze *Saponaria officinalis* L. zeigten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Transfektion (Abb. 37). Getestete Saponine mit einer molaren Masse niedriger als 1800 g/mol erhöhten die Effizienz in nur geringem Ausmaß. Obwohl SO1832 (5 µg/ml) zu einer 35-fachen Potenzierung der Effizienz führte, übertraf sie nicht die Wirkung von SO1861 (2,5 µg/ml, 60%), welches eine nahezu gleich starke Effizienz aufwies wie Lipofectamin® als Positivkontrolle (68%).

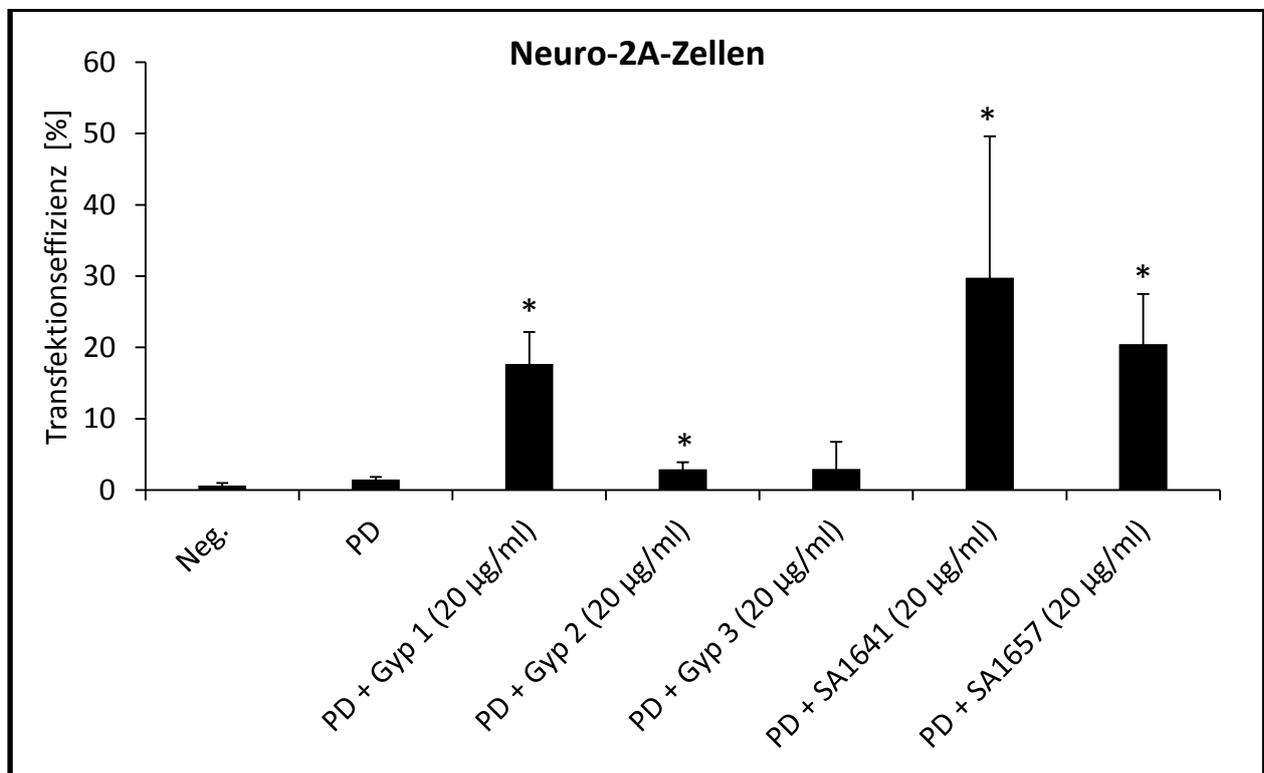


**Abb. 37 Transfektion von pEGFP-N3 mit PD-Nanoplexen und *Saponaria officinalis* L. - Saponinen an Neuro-2A-Zellen**

Alle getesteten Saponine erzielten eine signifikante Effizienzsteigerung. Höhermolekulare *Saponaria*-Saponine (SO1861, SO1832) erwiesen sich aktiver als niedermolekulare (<1700 g/mol). \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne Saponin-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

### 3.6.1.3.2. *Gypsophila paniculata* L.-Saponine

Diverse Saponine der Stammpflanze *Gypsophila paniculata* L. wurden auf ihre transfektionsverstärkenden Eigenschaft geprüft (Abb. 38). Als potentestes der getesteten Saponine erwies sich das bereits intensive erforschte SA1641 (20 µg/ml, 30%). Gyp 1 (20 µg/ml, 18%) und SA1657 (20 µg/ml, 21%) erreichten ebenfalls eine deutliche Verstärkung verglichen zur saponinfreien Transfektion (1%). Gyp2 und Gyp3 (je 20 µg/ml) wiesen nur eine geringe Aktivität auf (je 3%).

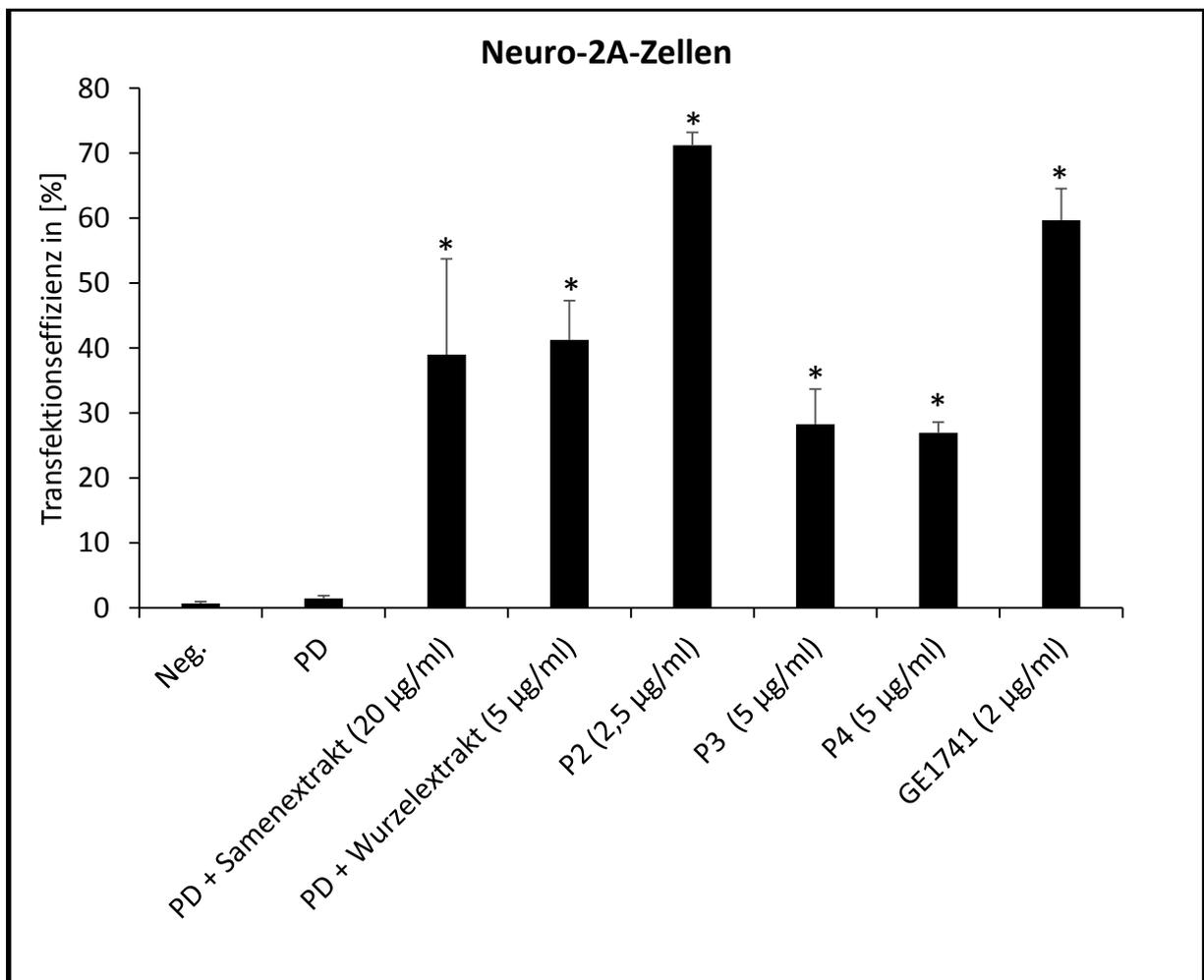


**Abb. 38** Transfektion von pEGFP-N3 mit PD-Nanoplexen und *Gypsophila paniculata* L.-Saponinen an Neuro-2A-Zellen

Die getesteten Saponine erwiesen sich als unterschiedlich aktiv. Aktivitäten von 3% – 30% wurden erfasst. Gyp 3 wies keinen signifikanten Unterschied zur saponinfreien Transfektion auf. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne Saponin-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

### 3.6.1.3.3. *Gypsophila elegans* M. Bieb.-Saponine

Die jeweiligen Aufreinigungsstufen, die zur Isolation vom Saponin GE1741 führten, wurden durchgehend auf ihre transfektionsverstärkenden Eigenschaften geprüft (Abb. 39). Sowohl der Rohextrakt aus den Samen (20 µg/ml, 40%) als auch aus der Wurzel erzielten ähnliche Effizienzwerte (5 µg/ml, 42%), die geringere Konzentration im Wurzelextrakt deutete jedoch auf ein höheres Potential hin. P2 (2,5 µg/ml, Peak 2) aus dem ersten HPLC-Lauf hob sich verglichen zu P3 (5 µg/ml, 29%) und P4 (5 µg/ml, 27%) deutlich ab und führte zu einer Transfektion 72% aller Zellen. Das isolierte GE1741 (2 µg/ml) zeigt eine geringere Aktivität mit einer von Effizienz von 60%.

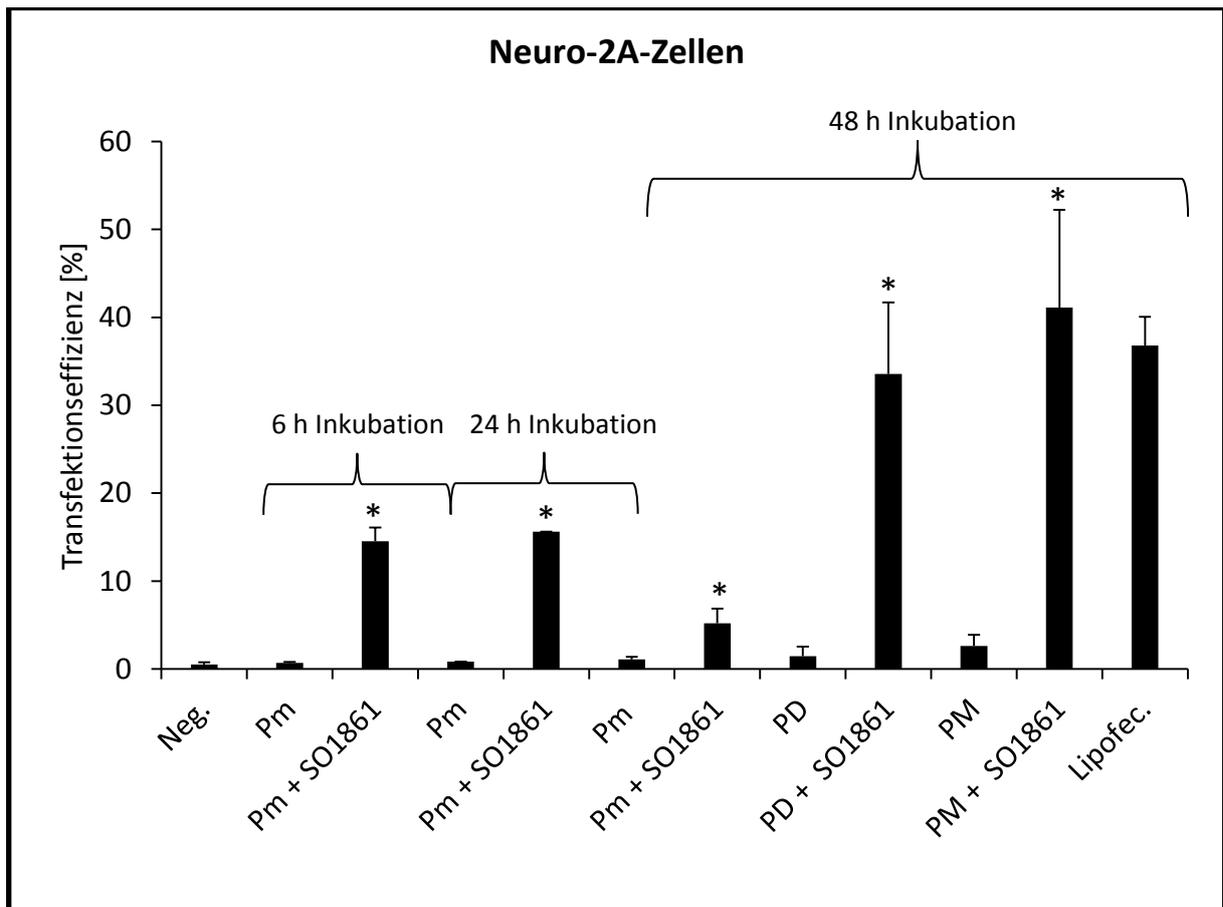


**Abb. 39** Transfektion von pEGFP-N3 mit PD-Nanoplexen und verschiedenen GE1741-Reinheitsstufen an Neuro-2A-Zellen

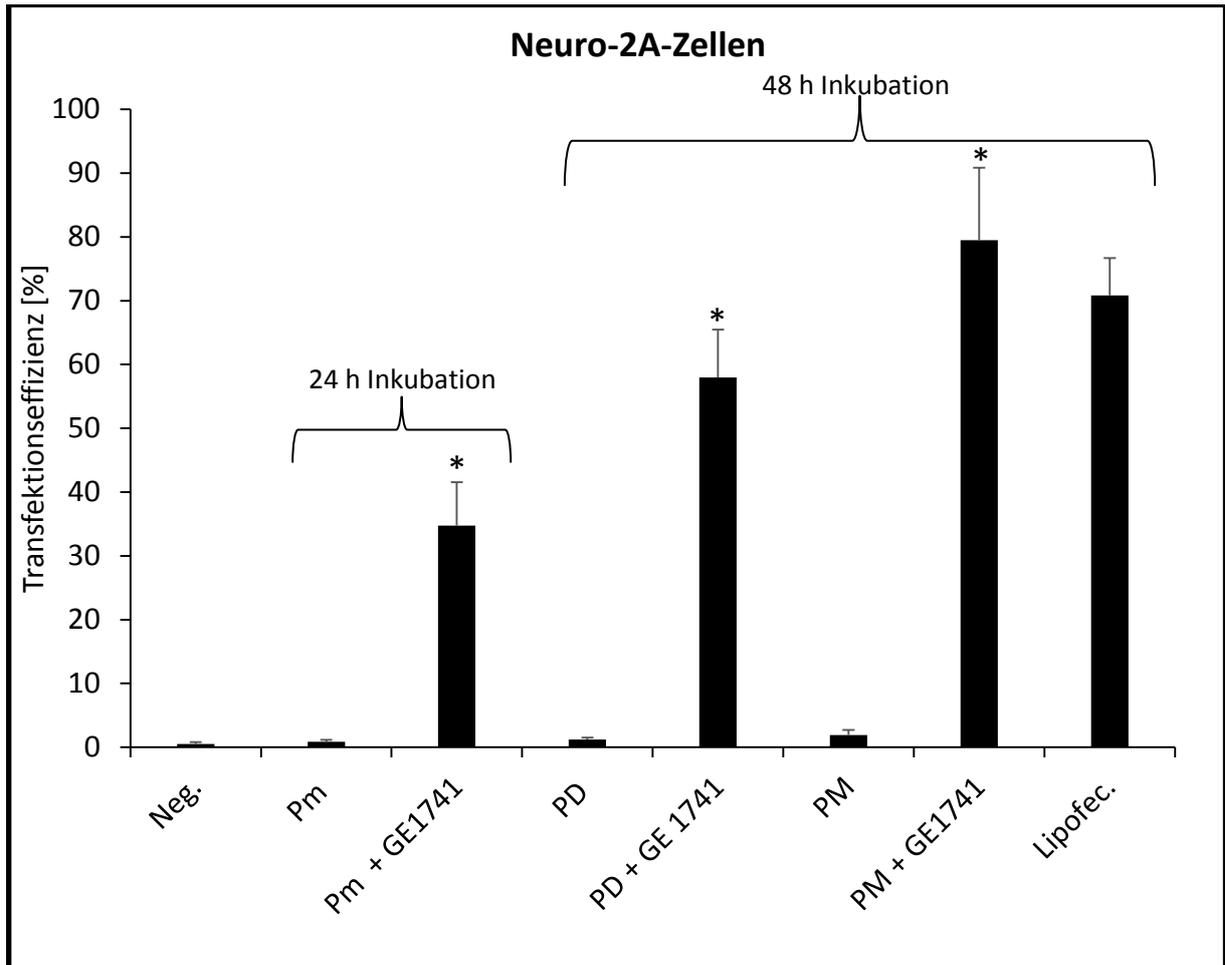
Die höchste Transfektionseffizienz wurde mit dem Saponingemisch des P2 gemessen, das isolierte GE1741 allein zeigte deutliche transfektionsverstärkende Eigenschaften. Sämtliche getesteten Saponin bzw. Saponingemische wiesen einen signifikanten Unterschied zur saponinfreien Kontrolle auf. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne Saponin-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

### 3.6.1.4. Effizienzänderung verschiedener Nukleinsäure-Transfektionen

Zur Untersuchung des universellen Gentransfers („gene delivery“) wurden für GFP codierende mRNA und MiniCircle-DNA mit poly-lysin-Peptiden (P) zu Nanoplexen formuliert (Pm, PM) und mit SO1861 (Abb. 40) und GE1741 (Abb. 41) an Neuro-2A-Zellen getestet. Die Transfektionseffizienz wurde mit PD-Transfektionen (Plasmid-DNA) verglichen. Der Anteil transfizierter Zellen konnte durch Saponinzugabe bei allen Transfektionen deutlich und signifikant gesteigert werden. Zudem zeigte sich der Trend einer Überlegenheit bei dem Einsatz von MiniCircle-DNA (SO1861: 42%, GE1741: 80%) gegenüber DNA (SO1861: 34%, GE1741: 58%) und mRNA (SO1861: 15%, GE1741: 35%, nach 24 h Inkubation). Die Effizienz von Pm-Transfektionen fiel nach 48-stündiger Inkubationszeit rapide ab (SO1861: 6%). Lipofectamin®, mitgeführt als Positivkontrolle, wies eine geringere Effizienz als PM-Nanoplexe auf, zeigte sich verglichen zu dem Plasmid-DNA enthaltenden Pendant (PD) leicht effektiver.



**Abb. 40 Transfektion diverser Nucleinsäuren mit peptid-basierten Nanoplexen und SO1861 an Neuro-2A-Zellen**  
Die Zugabe von SO1861 erzielte einen signifikanten Effekt mit allen Transfektionsmethoden. Transfektionen mit mRNA erreichten nach 6 h ihren maximalen Effekt. Transfektionen mit DNA zeigten sich effektiver, MiniCircle-DNA war dabei Plasmid-DNA überlegen. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne SO1861-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$



**Abb. 41 Transfektion diverser Nucleinsäuren mit peptid-basierten und GE1741 an Neuro-2A-Zellen**  
 GE1741 erzielte ähnliche Ergebnisse zur Transfektion mit SO1861. Auch mit GE1741 wurde eine einheitliche signifikante Effizienzsteigerung bewirkt. Ein stärkerer Einfluss von GE1741 auf die Effizienz und damit eine höhere Aktivität wurde beobachtet.  
 \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne GE1741-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

### 3.6.1.5. Effizienzänderung kommerzieller Transfektionsmethoden

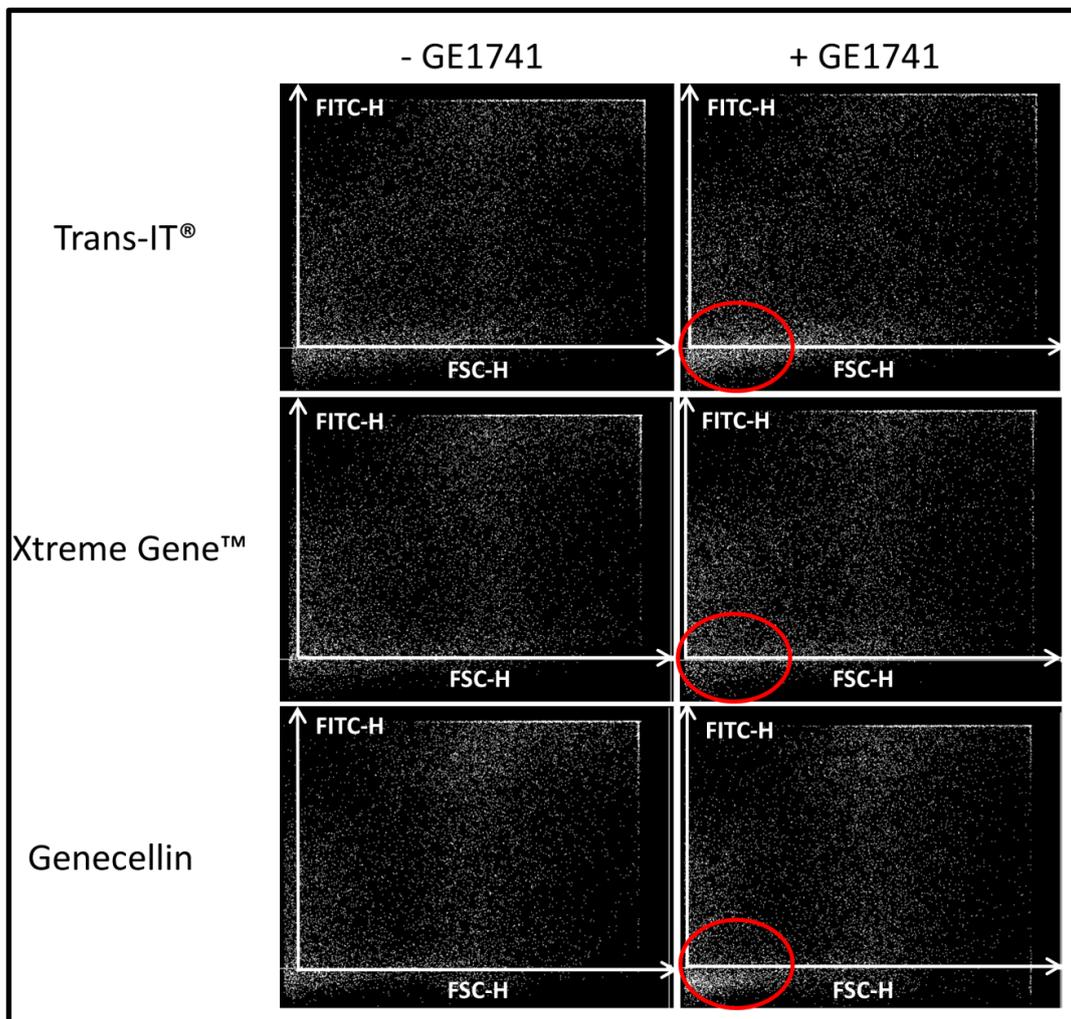
Das Potential von GE1741 aus *Gypsophila elegans* M.Bieb. sollte weiter erörtert werden, indem dessen Einfluss auf kommerziell erhältliche Transfektionsmethoden überprüft wurde. Hierfür wurden erst Neuro-2A-Zellen und im Anschluss HTC-116-Zellen transfiziert. Transfektionen an Neuro-2A-Zellen mit TransIT, Xtreme Gene und Genecellin erreichten eine hohe Transfektionsrate und wurden durch die Zugabe von GE1741 nicht signifikant beeinflusst bzw. leicht verringert (Tab. 23).

**Tab. 23 Transfektionseffizienz kommerziell erwerblicher Transfektionsreagenzien  $\pm$  GE1741 an Neuro-2A-Zellen**

	TransIT	Xtreme Gene		Genecellin		
	+ GE1741		+ GE1741		+ GE1741	
	88%	83%	93%	93%	88%	78%

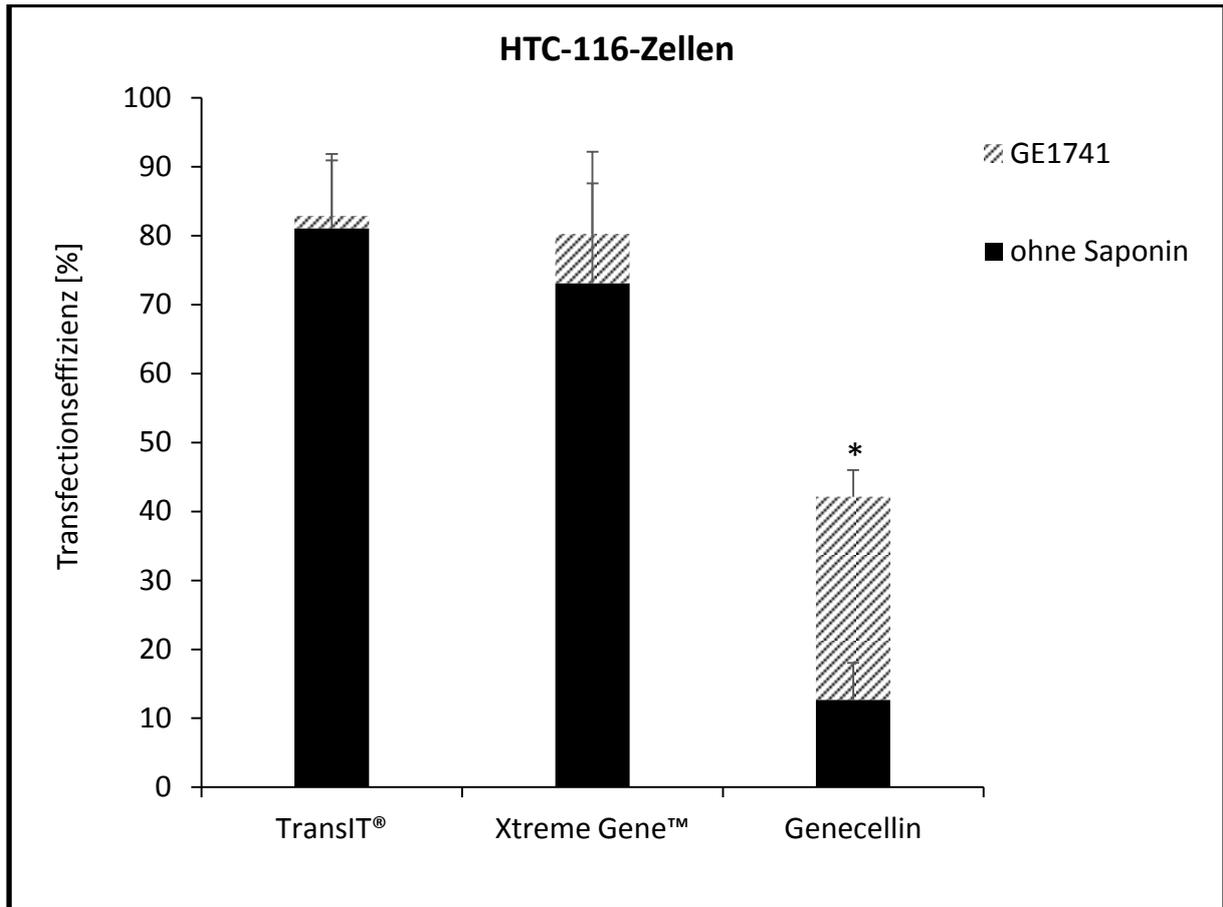
GE1741 konnte die Transfektionseffizienz kommerzieller Reagenzien nicht positiv beeinflussen. Gar eine Effizienzabnahme war zu beobachten (Genecellin).

Nach Analyse der Dotplots der FACS-Messung wurde eine Toxizitätssteigerung (Abb. 42)) erkannt. Das Experiment wurde mit HTC-116-Zellen wiederholt (Abb. 43). Hier wurde für alle drei Transfektionsmethoden eine Steigerung der Transfektionseffizienz durch GE1741 beobachtet, eine signifikante Erhöhung wurde bei Genecellin-Transfektionen festgestellt (13%  $\rightarrow$  43%).



**Abb. 42 Dotplot nach Transfektion mit kommerziell erwerblichen Transfektionsreagenzien an Neuro-2A-Zellen**

**Links:** FITC-H-FSC-H-Dotplot der Transfektionen ohne Saponin, **Rechts:** FITC-H-FSC-H-Dotplot der Transfektionen mit Saponin; Der rote Kreis deutete auf eine vermehrte Zahl niederer Zellstrukturen hin. Eine verstärkte Auflösung von Zellen und damit auf eine erhöhte transfektionsbedingte Toxizität lag nahe. Ordinate: FITC-H, Fluoreszenzintensität; Abszisse: FSC-H, Vorwärtsstreuung, Zellgröße



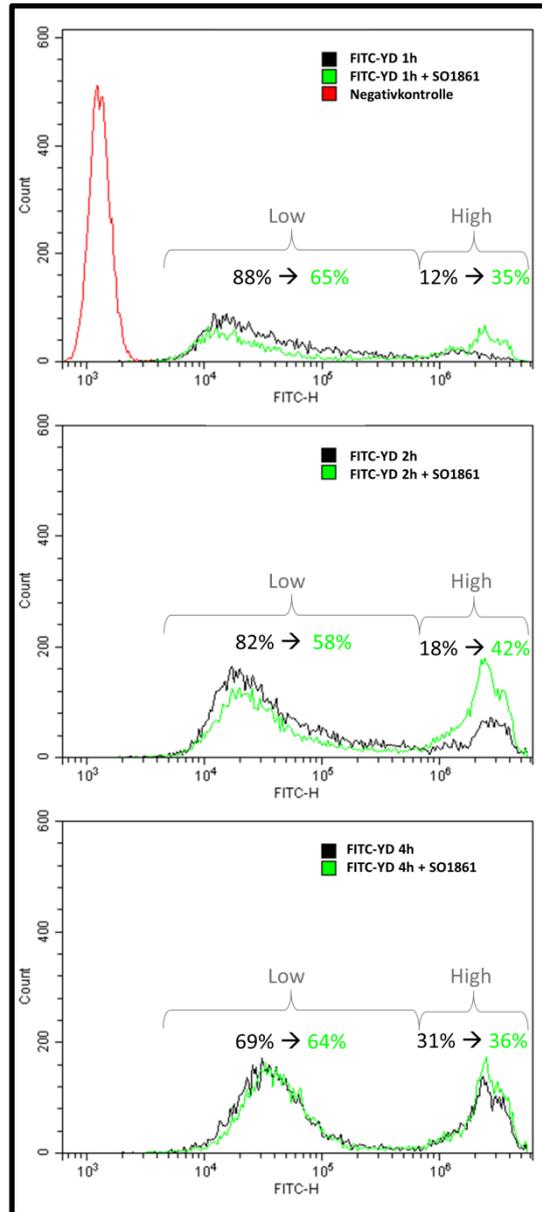
**Abb. 43 Transfektion von pEGFP-n3 mit kommerziellen Transfektionsmethoden und GE1741 an HTC-116 – Zellen**

Die Co-Applikation von GE1741 konnte die Effizienz kommerzieller Transfektionsreagenzien erhöhen. Bereits hohe Effizienzwerte wiesen nur eine geringe Steigerung auf. Eine signifikante Effizienzsteigerung wurde nur bei GeneCellin-Transfektionen erreicht.

\*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne GE1741-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

### 3.6.1.6. Ligandenstudien

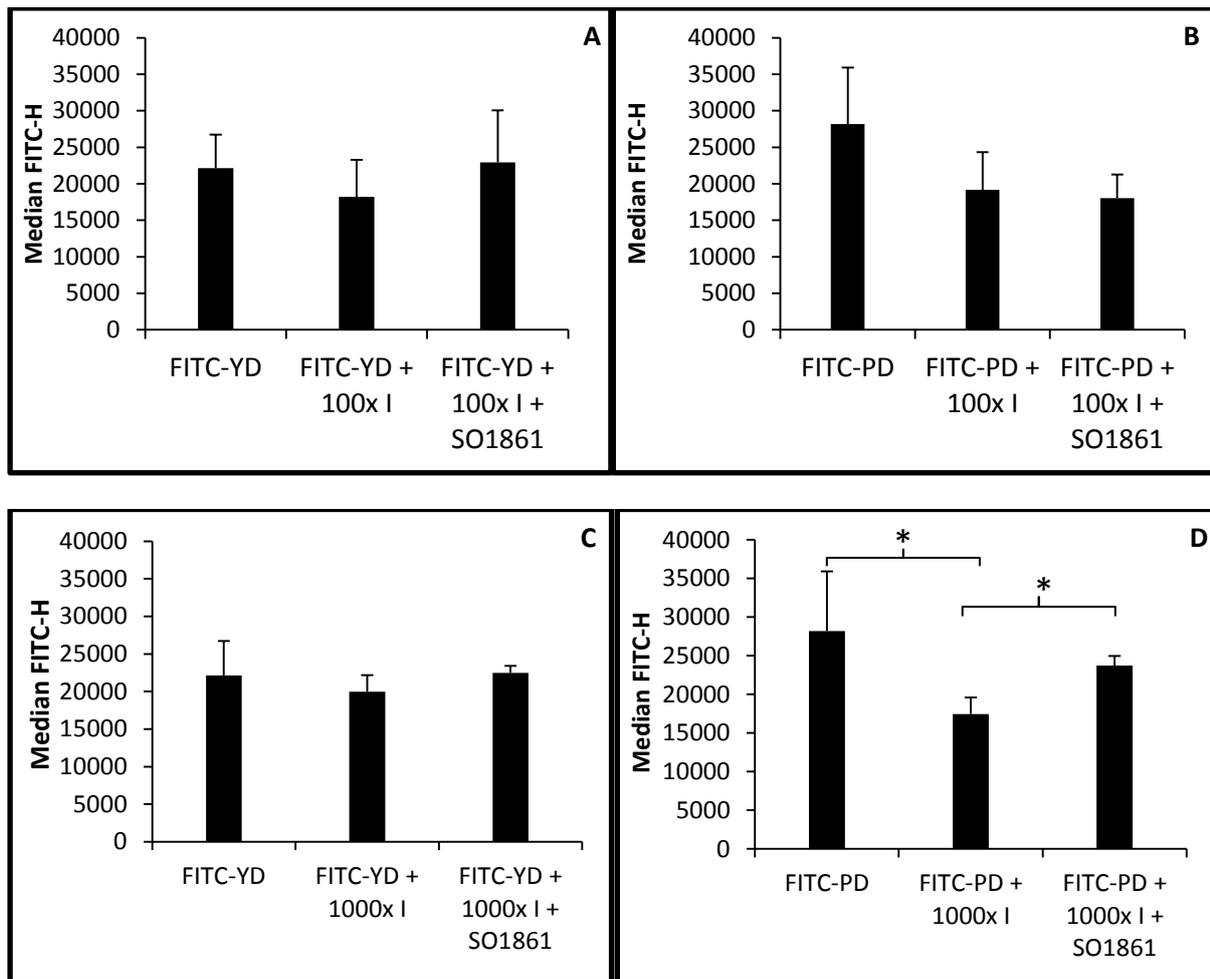
Fluoreszenzmarkierte FITC-PD- und FITC-YD-Nanoplexe wurden formuliert und Neuro-2A-Zellen appliziert. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 2 h, 4 h) wurde die Aufnahme der Partikel in das Zellinnere beobachtet und der Einfluss von SO1861 evaluiert (Abb. 44). Um eine detailliertere Analyse der Saponin-bedingten Partikelaufnahme zu ermöglichen, wurden willkürlich zwei Fluoreszenzintensitätsbereiche festgelegt und als „Low“ und „High“ bezeichnet. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle und wiesen höchstens Eigenfluoreszenz auf. Grundsätzlich zu erkennen war ein zeitabhängiger Anstieg stärker (*high*) fluoreszierender Zellen (ohne SO1861: 12% (1 h) → 18% (2 h) → 31% (4 h)) und ein Abfallen schwächer (*low*) fluoreszierender Zellen (ohne SO1861: 88% (1 h) → 82% (2 h) → 69% (4 h)). Nach einer Stunde Inkubationszeit induzierte SO1861 einen „Shift“ fluoreszierender Zellen von niedrigen (*low*) zu höheren (*high*) Intensitäten. Während der Saponineffekt nach 2 h einen noch stärkeren Effekt aufwies und die Anzahl „*high*“ fluoreszierender Zellen mehr als verdoppelt (18% → 42%) wurde, war nach 4 h wieder eine Abnahme des Intensität verstärkenden Effekts zu verzeichnen (*high*: 31% → 36%). Die Anzahl an fluoreszierenden Zellen wurde durch SO1861 nicht signifikant beeinflusst.



**Abb. 44 Fluoreszenzhistogramme zur Untersuchung der saponin-bedingten Nanoplexaufnahme in Neuro-2A-Zellen**

Die Fluoreszenzintensität höher als die Intensität der Negativkontrolle wurde in „high“ und „low“ unterschieden. SO1861 erhöhte die Fluoreszenzintensität jeweils nach 1 h, 2 h, 4 h. Die Anzahl „low“ transfizierter Zellen wurden nach 2 h vermindert, die Anzahl „high“ transfizierter Zellen dagegen erhöht. Der Einfluss von SO1861 war nach 2 h am höchsten, am geringsten nach 4 h Inkubationszeit. Ordinate: Signalstärke; Abszisse: FITC-H, Fluoreszenzintensität

Die vorherige Gabe einer rezeptorbindenden Aminosäuresequenz (I) in 100-fachen bzw. 1000-fachen Überschuss sollte zusätzliche Informationen über den Aufnahmemechanismus geben (Abb. 45). Die Präsenz der Aminosäuresequenz führte sowohl bei FITC-YD-, als auch bei FITC-PD-Transfektionen zu einer Minderung der Fluoreszenzintensität. Die Zugabe von SO1861 zeigte den Trend einer erneuten Intensitätserhöhung (A, C, D), welcher jedoch nicht gänzlich bestätigt wurde (B).



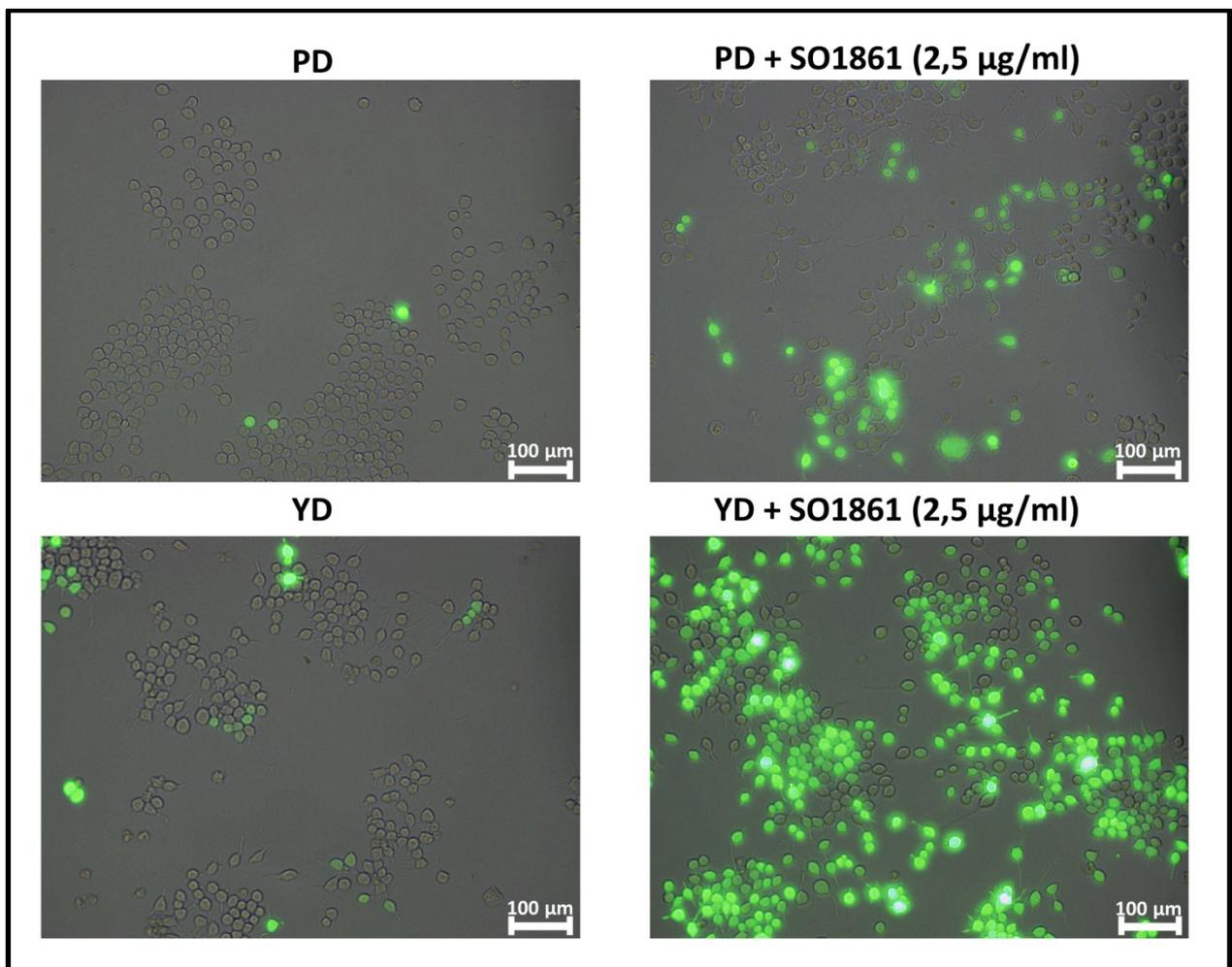
**Abb. 45 Untersuchung der saponin-bedingten und rezeptor-bedingten Nanoplexaufnahme in Neuro-2A-Zellen**

Die Zugabe eines Rezeptorliganden führte zu einer Minderung der Fluoreszenzintensität. SO1861 zeigte den Trend einer leichten Kompensierung. Ein 1000-facher molarer Überschuss an Ligand I führte zu einer signifikanten Minderung der PD-Aufnahme, welche durch SO1861 signifikant erhöht wurde. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne I- und/oder SO1861-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

### 3.6.2. Mikroskopische Aufnahmen

#### 3.6.2.1. Fluoreszenzmikroskop

Der Einfluss von SO1861 auf peptidbasierte Nanoplex-Transfektionen sollte durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen visualisiert werden (*Abb. 46*). PD- und YD-Transfektionen führten zu einer deutlichen Steigerung an fluoreszierenden Zellen, wenn SO1861 co-appliziert wurde. Ähnliche Ergebnisse zur zuvor gemessenen Transfektionseffizienz (*Abb. 36*) konnten festgestellt werden und bestätigten das Ausmaß saponinbedingten Fluoreszenzsteigerung.

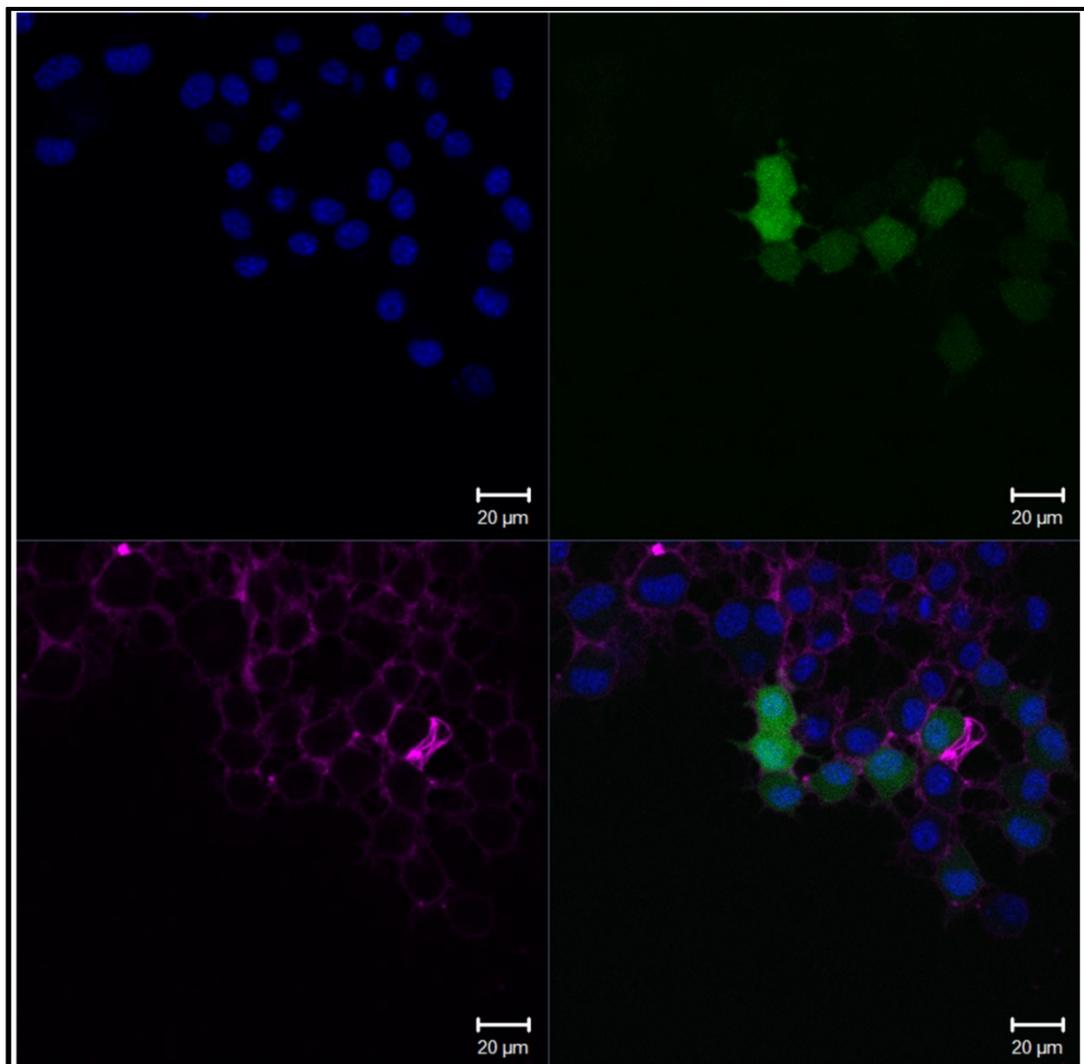


**Abb. 46** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Neuro-2A-Zellen nach Transfektion von GFP-DNA

Der Einfluss von SO1861 auf die Transfektion mit Peptid-basierten PD- und YD-Nanoplexen wurde visuell evaluiert. Mit der SO1861-Zugabe konnte eine deutliche Fluoreszenzsteigerung hinsichtlich Zellzahl und Intensität erreicht werden. Auch ein deutlicher Unterschied zwischen PD- und YD-Transfektion konnte beobachtet werden.

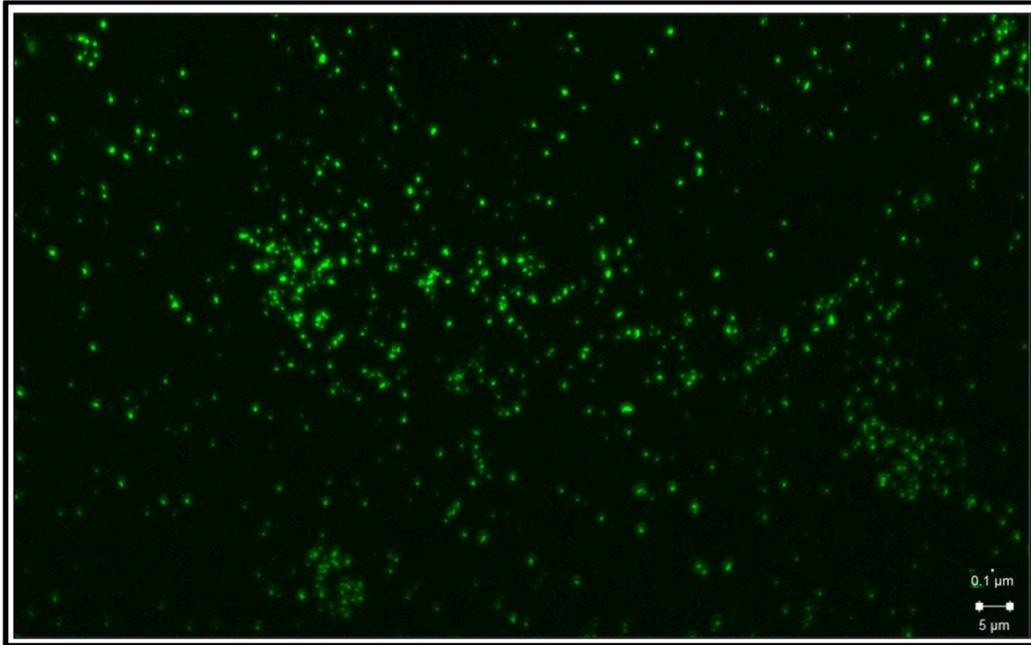
### 3.6.2.2. Konfokalmikroskop

Differenzierte Informationen sollten durch konfokalmikroskopische Bildgebung erhalten werden. Das Eintreten einer Fluoreszenz, die durch Transfektion von GFP-mRNA verursacht wurde, wurde im Hinblick auf Intensität, Lokalisation und Zeit ausgewertet (*Abb. 47*). Nach 6-stündiger Inkubation konnte in einigen Zellen sichtbare Fluoreszenz (grün) im Zytosol der Neuro-2A-Zellen erkannt werden. Fluoreszierende Zellen waren auffällig miteinander verbunden. Formulierten FITC-YD-Nanoplexe (*Abb. 48*) konnten durch FITC-Markierung visualisiert und die zuvor quantifizierte Partikelgröße (*Abb. 24*) bestätigt werden.



**Abb. 47 Konfokalmikroskopische Aufnahme nach Pm-Transfektion (GFP-mRNA) von Neuro-2A-Zellen.**

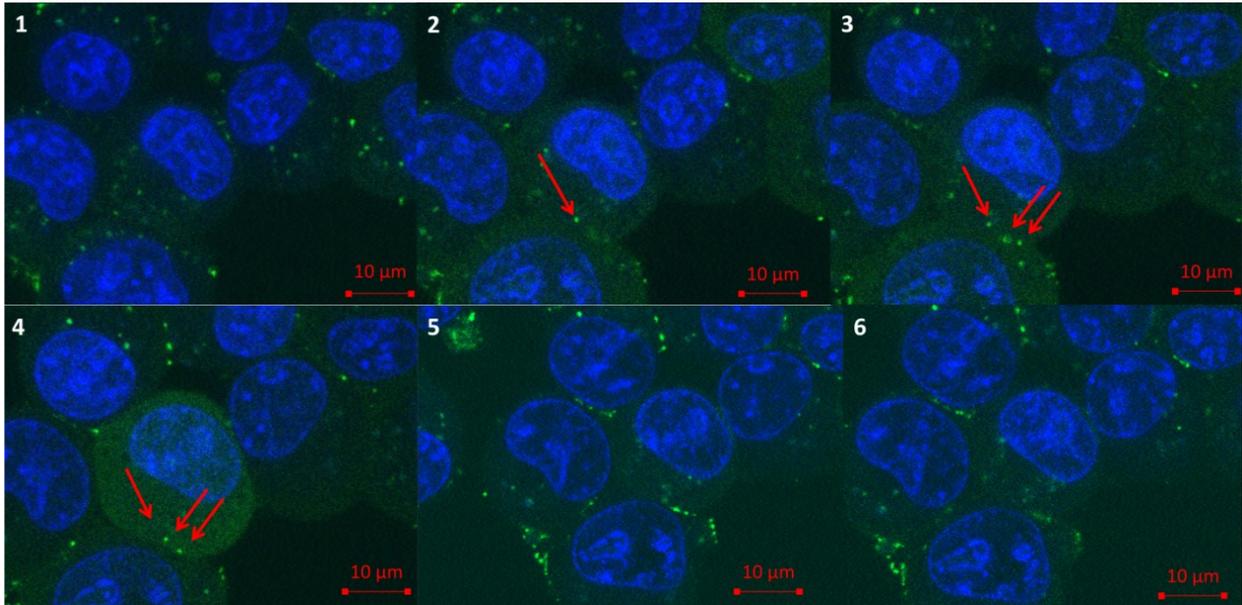
Nach 6 h Inkubationszeit und Färbung des Zellkerns und der Zellmembran wurde das Vorhandensein und die Intensität von GFP-bedingter Fluoreszenz untersucht. Erste transfizierte Zellen, verbunden über ihre Dendriten, konnten fluoreszierend in grün detektiert werden; Magenta: Zellmembran (CellMask™ Deep Red Plasma); Blau: Zellkerne (Hoechst 33342); Grün: green fluorescent proteins



**Abb. 48 Konfokalmikroskopische Aufnahme von FITC-YD-Nanoplexen**

Formulierte Nanoplexe (dichte grüne Punkte) wurden durch Fluoreszenzmarkierung visualisiert. Unterschiedlich große Partikelgrößen ( $> 1 \mu\text{m}$ ) konnten erfasst werden. Kein Farbstoff wurde angewendet.

Die Fluoreszenzmarkierung der YD-Nanoplexe mit der zusätzlichen Färbung der Zellkerne (blau) ermöglichten die Visualisierung der endosomalen Partikelaufnahme (Abb. 49, Bild 1 – 3). 80 Messzyklen (13,3 min) nach der SO1861-Gabe ( $2,5 \mu\text{g/ml}$ ) konnte eine deutliche Fluoreszenzsteigerung im Zytosol beobachtet werden (Abb. 49, Bild 4), die nach der weiteren SO1861-Gabe ( $40 \mu\text{g/ml}$ ) deutlich abnahm (Abb. 49, Bild 5 – 6).



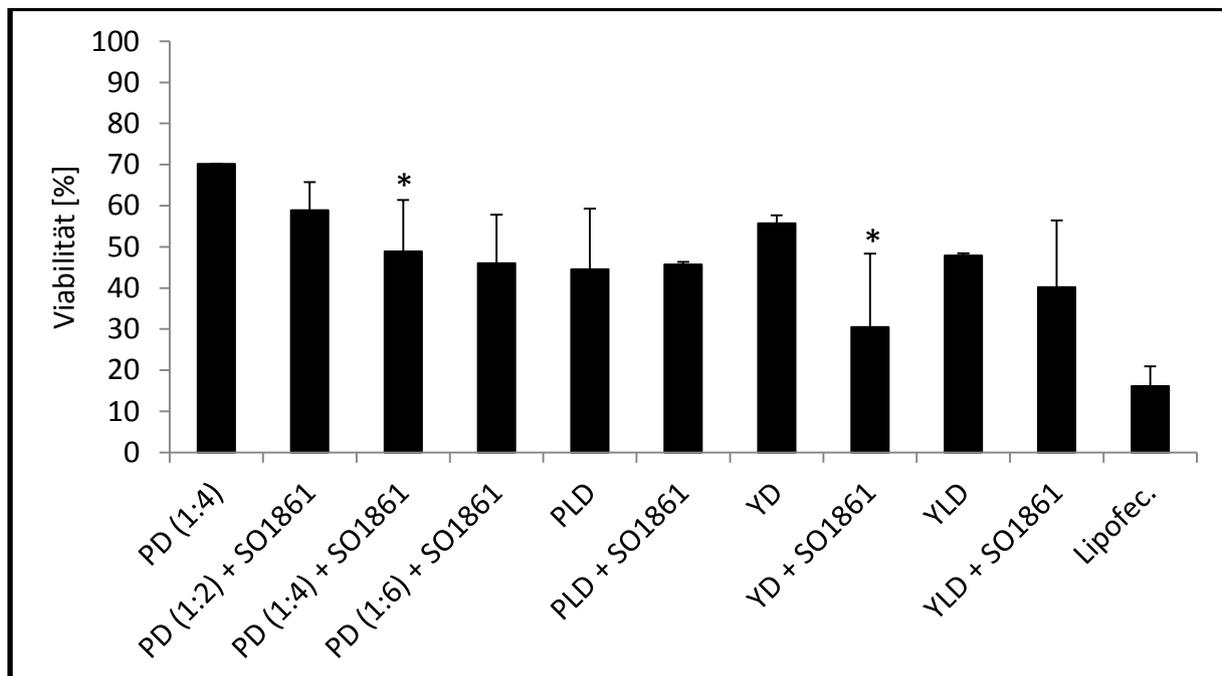
**Abb. 49 Konfokalmikroskopische Aufnahme des endosomalen „Uptake“ und „Release“ in Neuro-2A-Zellen**

Neuro-2A-Zellen 12 h nach FITC-YD-Transfektion. Abbildungen 1 – 6 (alle 20 Zyklen á 10 Sekunden) sind in chronologischer Reihenfolge dargestellt: 2,5 μg/ml SO1861 wurde zugegeben (1). Die Nanoplexe akkumulierten an der Zellmembran (2+3) bevor sie endozytiert wurden (4). Mit der Partikelaufnahme wurde gleichzeitig eine deutliche Fluoreszenz im Zytosol wahrgenommen. Mit 40 μg/ml SO1861 nahm die Fluoreszenz wieder ab (5 + 6). Blau: Zellkerne (Hoechst 33342); Grün: FITC-markierte YD-Nanoplexe

### 3.7. Zytotoxizitätsassays

#### 3.7.1. MTT-Assay

Analog zum Luciferase-Assay und Fluoreszenz-Assay sollte mithilfe des MTT-Assays und der ihm ermöglichten Viabilitätsbestimmung eine Aussage über das Ausmaß der saponinbedingten Transfektionsverstärkung verschiedener Transfektionsmethoden getroffen werden (Abb. 50). Für diesen Zweck wurden Neuro-2A-Zellen untersucht. Formulierten Nanoplexe (2.2.4.1) beinhalteten hierfür das Gen für das RIP Saporin („Suizidgen“). Die Effizienz der Transfektion äußerte sich somit in Form von Zytotoxizität. Die Tendenz einer von SO1861 bewirkten Toxizitätssteigerung der Transfektionsmethoden wurde zwar deutlich, traf jedoch nicht auf alle Methoden zu (PLD-Transfektion). Ein signifikanter Unterschied wurde lediglich für Peptid-basierte Transfektionsmethoden festgestellt. Transfektionen ohne Saponin wiesen eine Viabilität von maximal 71% auf.



**Abb. 50 MTT-Assay zur Viabilitätsbestimmung nach Transfektion von Neuro-2A-Zellen mit Saporin-DNA**

Verglichen zur unbehandelten Negativkontrolle (100% Viabilität) konnten für sämtliche Transfektion toxische Effekte beobachtet werden. SO1861 (2,5 µg/ml) verstärkte die Toxizität nicht (PLD), leicht (YLD) oder deutlich (YD). Eine signifikante Toxizitätsänderung wurde bei peptidbasierten PD (1:4)-, YD-Transfektionen ermittelt. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Transfektionsmethode ohne SO1861-Zugabe, U-Test,  $p < 0,05$ ,  $n \geq 3$

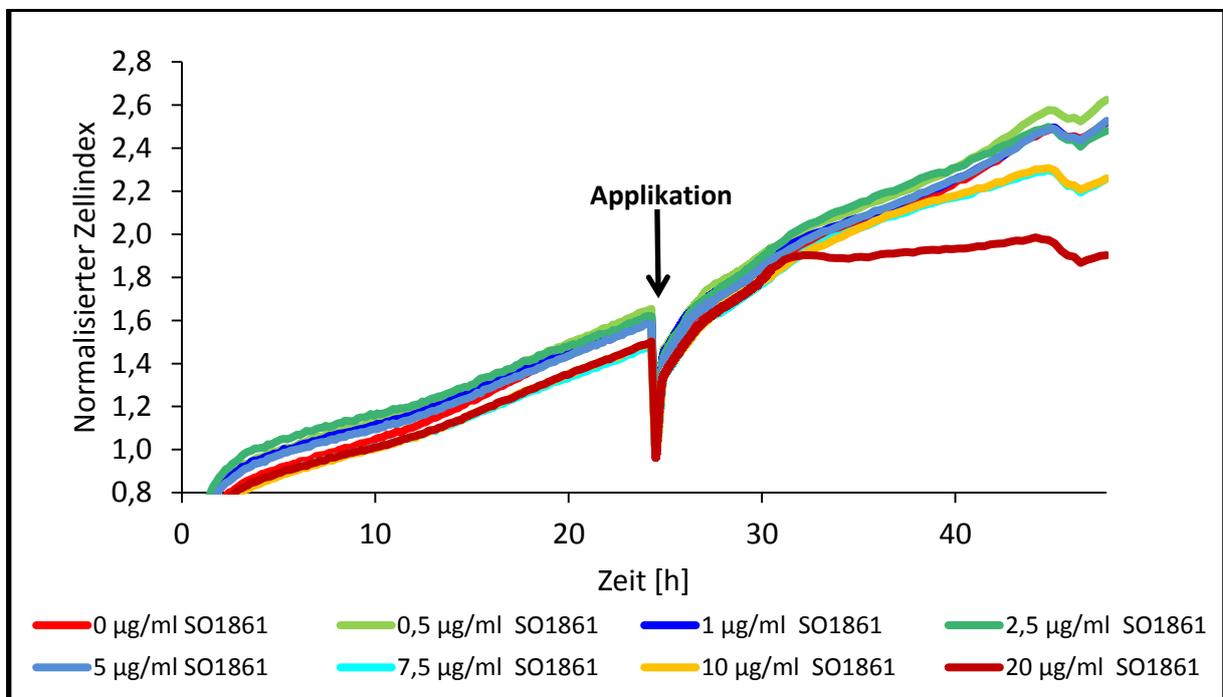
### 3.7.2. Impedanzmessungen

Die Echtzeit-Analyse ausgeführter Transfektionen von Suizidgenen und Reportergenen ermöglichte eine differenzierte Analyse der Transfektionseffizienz. Informationen über einen einzelnen Endpunkt hinaus konnten akquiriert und gaben einen Einblick in das Zellwachstum über den gesamten Verlauf des Experiments hinweg.

Zur Zeitpunkt der Saponinapplikation kam es in allen Impedanzexperimenten aufgrund des Pausierens der Impedanzmessung zu einem experimentunabhängigen, messungsbedingten Impedanzabfall, welcher sich im Laufe der ersten Stunde wieder normalisiert. Die beschriebene Erscheinung ging nicht in die Auswertung ein.

### 3.7.2.1. Saponin-begründete Toxizität

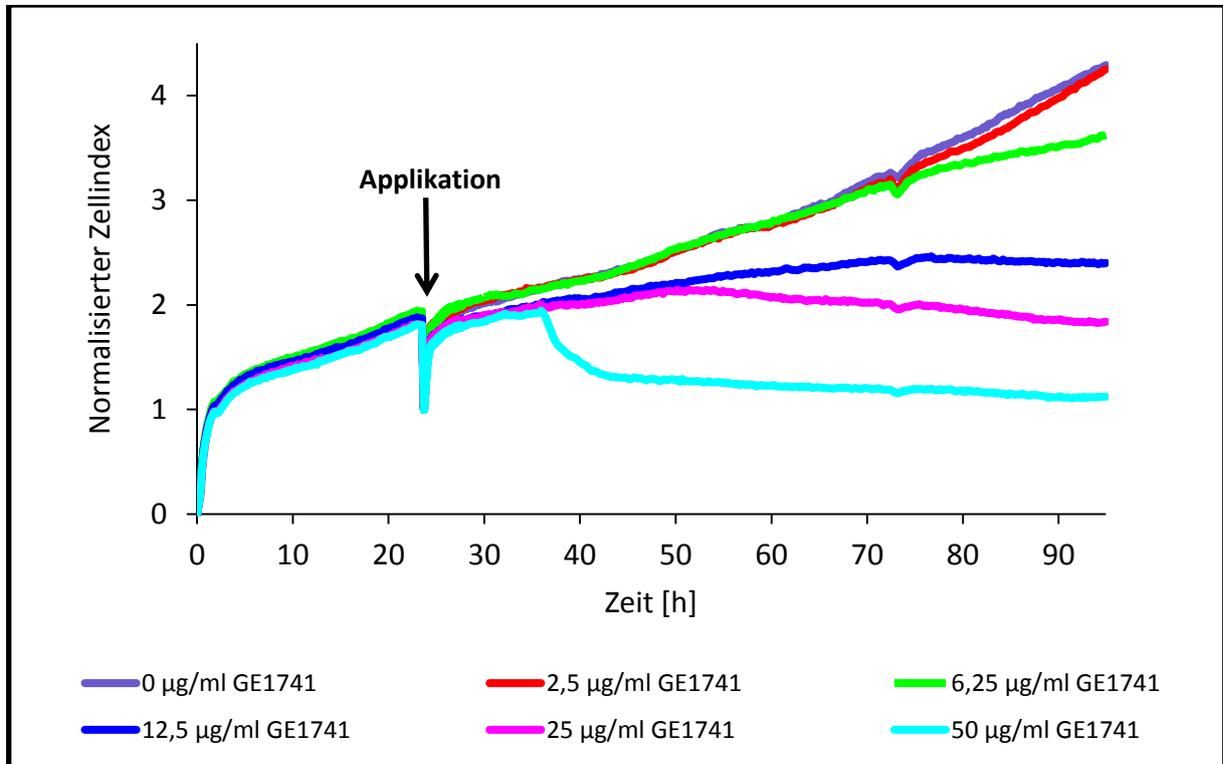
SO1861 und GE1741 wurden im Hinblick auf ihr membranpermeabilisierendes Potential an Neuro-2A-Zellen getestet. Hierfür wurde die Konzentration ermittelt, die zu einer Permeabilisierung von Zellmembran und damit verbunden zur Zelllyse führt (*Abb. 51, Abb. 52*). Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle (rot). Erste toxische Effekte von SO1861 traten bei 7,5  $\mu\text{g/ml}$  auf, welche mit 20  $\mu\text{g/ml}$  deutlicher sichtbar wurden. Ein abrupter Impedanzabfall ließ beginnende lytische Prozesse vermuten.



**Abb. 51 Echtzeit-Analyse der SO1861-bedingten Zellpermeabilität an Neuro-2A-Zellen**

Die Arbeitskonzentration von SO1861 mit 2,5  $\mu\text{g/ml}$  lag deutlich unter der Konzentration, die toxische Effekte offenbarte (7,5  $\mu\text{g/ml}$ ). 20  $\mu\text{g/ml}$  deuteten einen leicht abrupten Impedanzabfall und damit eine Zelllyse an.

Bereits 6,25  $\mu\text{g/ml}$  GE1741 führten zu toxischen Erscheinungen, welche schließlich bei 50  $\mu\text{g/ml}$  in einem rapiden Impedanzabfall mündeten und auf massive Zellyse hindeuteten.

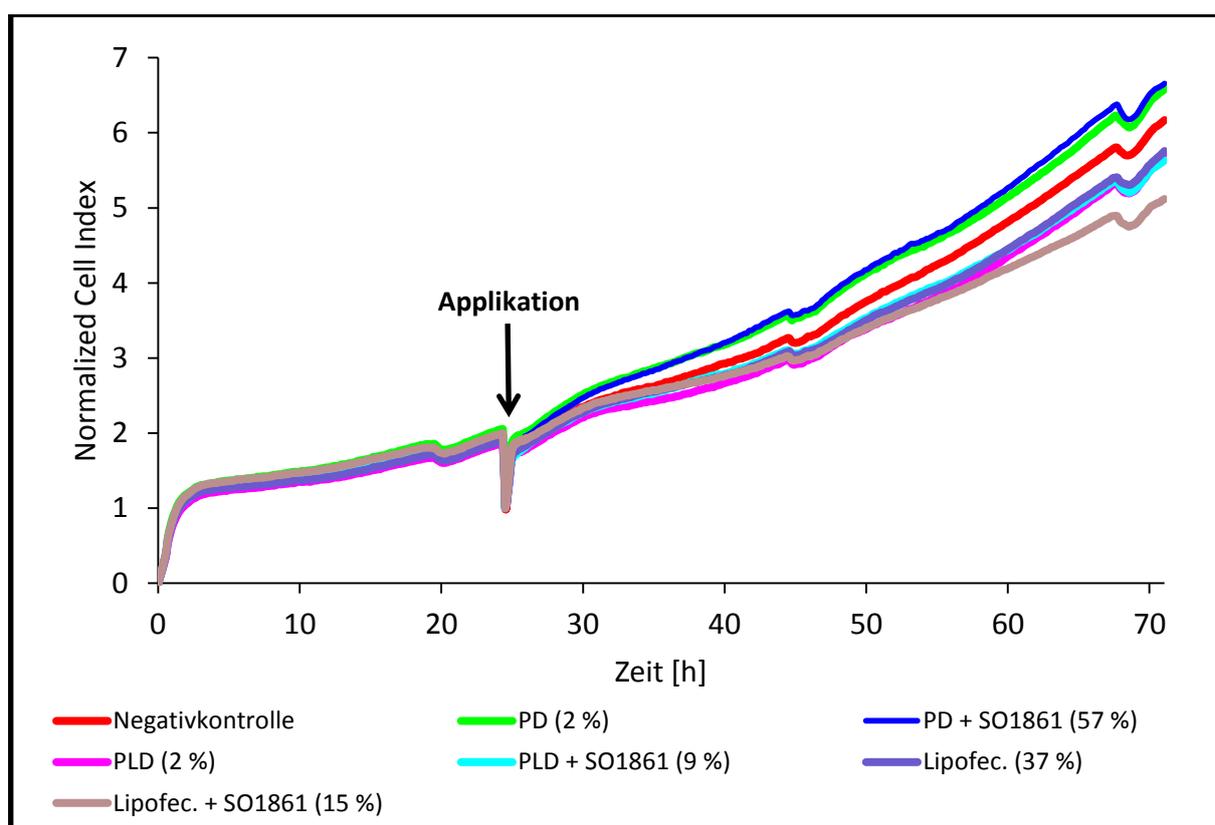


**Abb. 52 Echtzeit-Analyse der GE1741-bedingten Zellpermeabilität an Neuro-2A-Zellen**

Toxische Effekte zeigten sich abhängig von Konzentration unterschiedlich bezüglich Intensität und Verlauf. Infolgedessen konnten unterschiedliche Formen von Zelltod vermutet werden. Während Konzentrationen bis zu 25  $\mu\text{g/ml}$  eher auf apoptotische Prozesse vermuten ließen, konnte bei 50  $\mu\text{g/ml}$  eindeutig eine Festlegung auf eine Zellyse erfolgen.

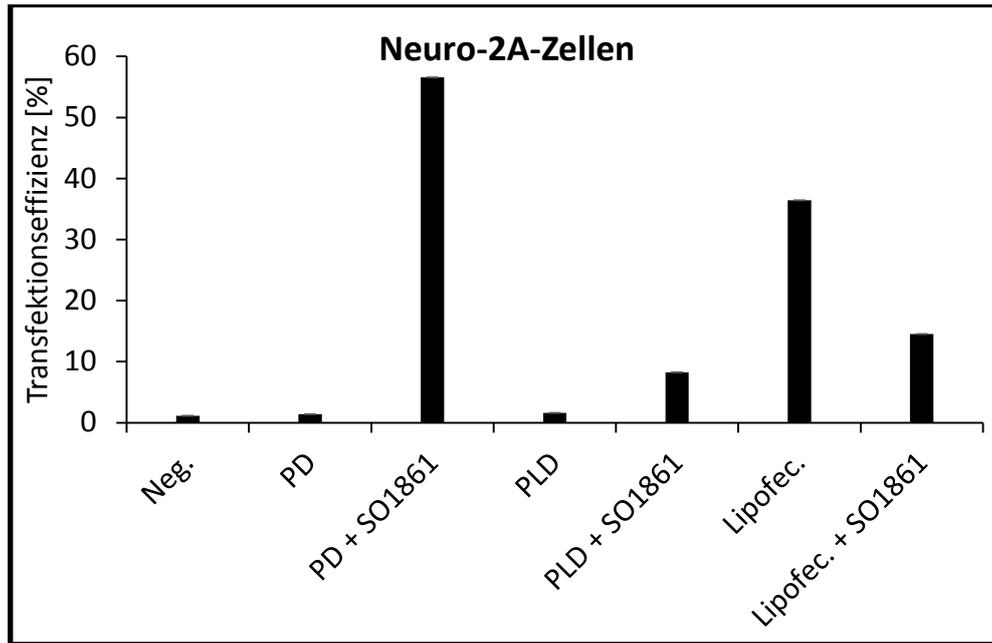
### 3.7.2.2. Reagenz-/ Transfektions-begründete Toxizität

PD- und PLD-Nanoplexe, formuliert mit GFP-Plasmid-DNA, sollten mit/ohne SO1861 Co-Applikation (2,5 µg/ml) auf ihre Eigentoxizität an Neuro-2A-Zellen untersucht werden (Abb. 53). Zudem wurde der Einfluss von Serum im Medium auf die Transfektionseffizienz bewertet und mit Lipofectamin® verglichen. PD-Nanoplexe zeigten unabhängig von SO1861-Zugabe verglichen zur unbehandelten Negativkontrolle (rot) eine leicht gesteigerte Impedanz. Sowohl LD-Transfektionen, als auch Lipofectamin zeigten Ansätze von Toxizität. Der toxische Effekt von Lipofectamin® wurde durch SO1861 gesteigert. Die Transfektionseffizienz von PD-Transfektionen wurden durch serumhaltiges Medium nicht beeinflusst (Abb. 54). Lipofectamin® erfuhr verglichen zur Transfektion in serumfreiem Medium (vergl. Abb. 32) eine Wirksamkeitsminderung.



**Abb. 53 Echtzeit-Analyse der Eigentoxizität der formulierten Nanoplexe ± SO1861 an Neuro-2A-Zellen**

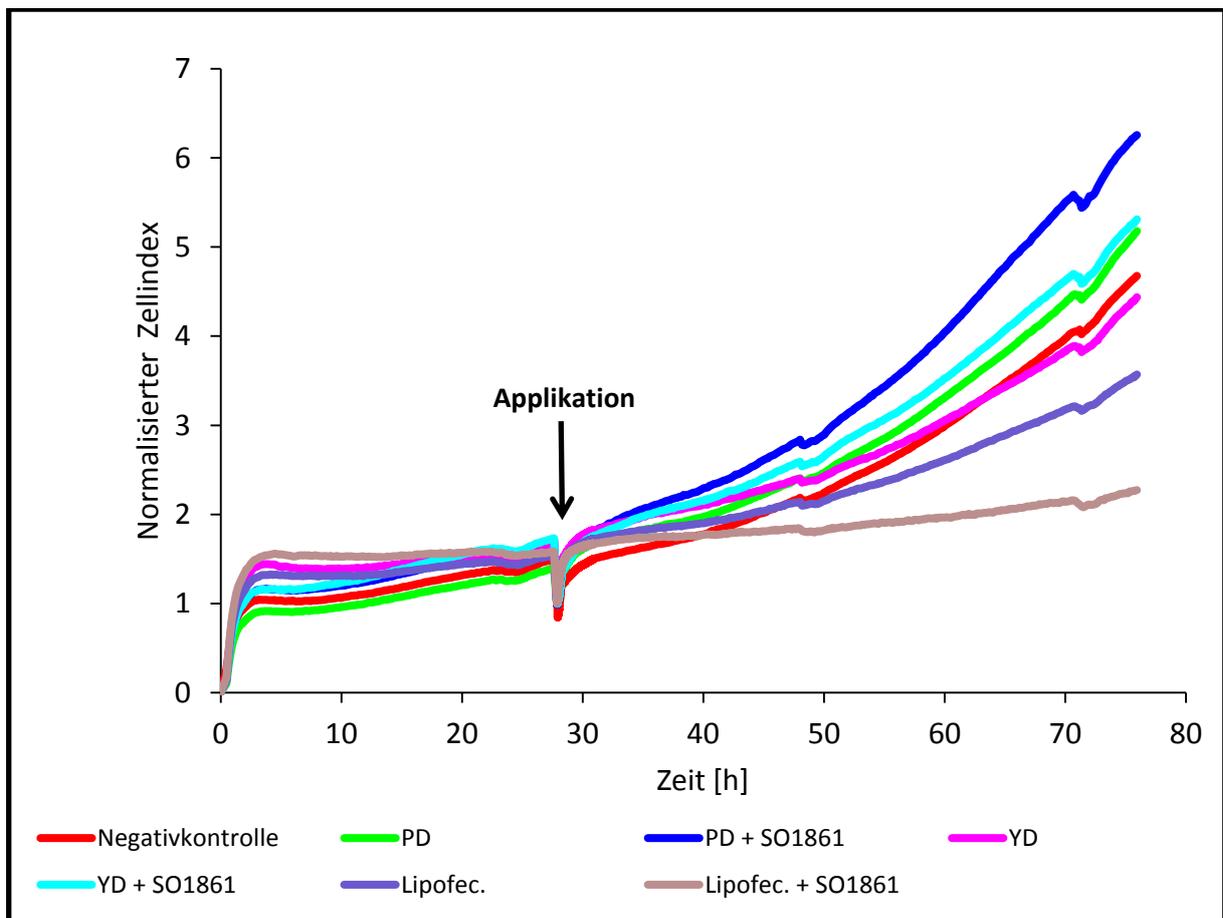
Durch Transfektion von GFP-DNA konnte auf toxische Eigenschaften der Methoden geprüft werden. PD-Transfektionen wiesen keine Toxizität auf. Liposomale Nanoplexe und Lipofectamin® zeichneten sich durch geringe toxische Effekte aus. In Klammern wurden die Transfektionseffizienzen aus Abb. 32 abgebildet.



**Abb. 54 Transfektion von pEGFP-N3 in serumhaltigen Medium an Neuro-2A-Zellen  $\pm$  SO1861**

Nach der Echtzeit-Analyse der Viabilität von Neuro-2A-Zellen wurde die Transfektionseffizienz von PD-, PLD- und Lipofectamin<sup>®</sup>-Transfektionen in serumhaltigem Medium untersucht. PD-Transfektionen (konstante Effizienz zu serumfreien Transfektionen) wiesen eine deutlich höhere Effizienz als PLD- und Lipofectamin<sup>®</sup>-Transfektionen auf.

PD- und YD-Nanoplexe wurden im Hinblick auf ihre Eigentoxizität an Neuro-2A-Zellen untersucht und mit Lipofectamin® verglichen (Abb. 55). Ferner wurde der Effekt einer SO1861-Gabe (2,5 µg/ml) in Bezug auf die Toxizität beobachtet. Aufgrund der gleichen bzw. höheren Impedanz verglichen zur Negativkontrolle konnte von keiner toxischen Aktivität der PD- und YD-Nanoplexe ausgegangen werden. Auch die Zugabe von SO1861 beeinflusste das Ergebnis nicht in negativer Sicht. Lipofectamin® zeigte eine ausgeprägte Toxizität, welche durch SO1861 intensiviert wurde.



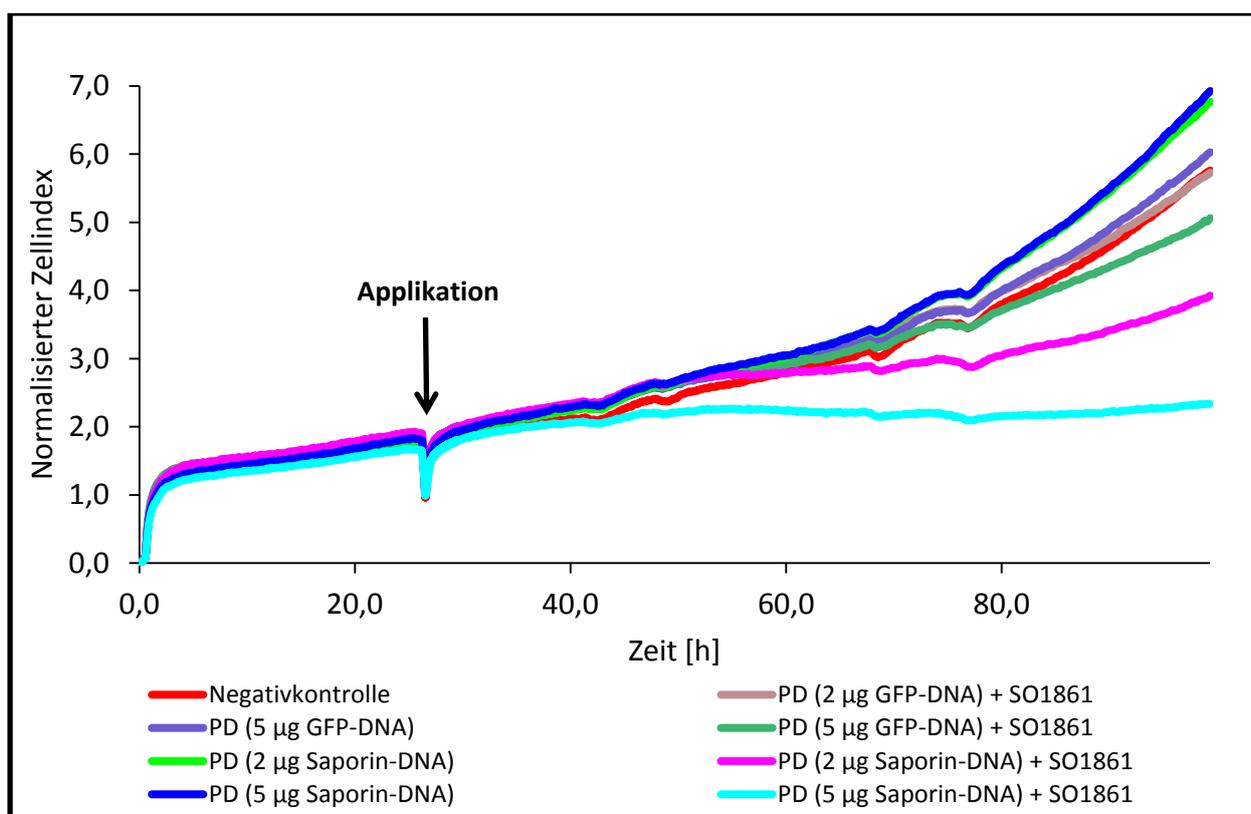
**Abb. 55 Echtzeit-Analyse der Eigentoxizität von gerichteten und ungerichteten peptidbasierten Nanoplexen ± SO1861 an Neuro-2A-Zellen**

YD- und PD-Nanoplexe zeigten zum Teil höhere Impedanzwerte als die unbehandelte Negativkontrolle auf. Von einer Toxizität musste daher nicht ausgegangen werden. Lipofectamin bestätigte die ausgeprägte Toxizität, die durch Zugabe von SO1861 verstärkt wurde.

### 3.7.2.3. Suizidgen-begründete Toxizität

Die Transfektion von DNA, codierend für zytotoxische Proteine wie Saporin und Dianthin, war für die folgenden Untersuchungen von immenser Bedeutung. Nachdem zuvor die Saponin-Toxizität sowie die Eigentoxizität der Nanoplexe (mit GFP-DNA) in Kombination mit SO1861 getestet wurde, sollte nun eine ausschließlich durch RIP-Expression bewirkte Toxizität an Neuro-2A-Zellen untersucht werden (Abb. 56).

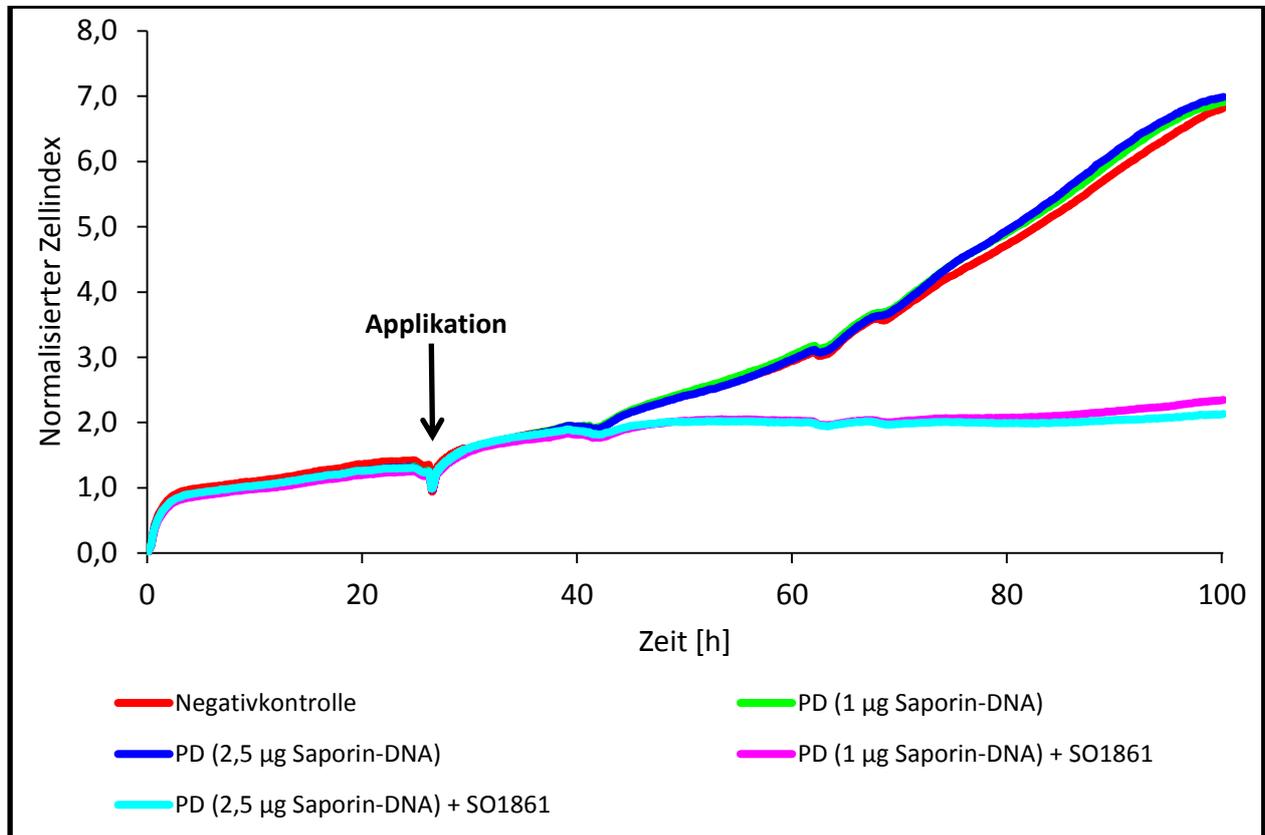
Dazu wurden unbehandelte Zellen als Negativkontrolle (rot dargestellt) und Transfektionen von GFP (je 2  $\mu\text{g}$  und 5  $\mu\text{g}$ ) als Kontrollen herangezogen. PD-Nanoplexe mit GFP-DNA oder Saporin-DNA ohne Saponinzugabe wiesen keine Toxizität auf. Während die Co-Applikation von SO1861 bei GFP-Nanoplexen keinen (2  $\mu\text{g}$ ) oder einen geringen (5  $\mu\text{g}$ ) Effekt auf die Viabilität der Zellen hatte, wurde mit SO1861 ein starker Impedanzabfall bei Saporin-Nanoplexen beobachtet.



**Abb. 56 Echtzeit-Analyse der SO1861-vermittelten Toxizität von suizidgen-enthaltenden (2,5  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ ) PD-Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen**

Durch das Mitführen der Negativ- als auch Vektorkontrolle (PD mit GFP-DNA) konnte eine Saporin-bedingte Toxizität der PD-Transfektion belegt werden, wenn eine Co-Applikation von SO1861 vorlag. Der Einsatz einer höheren Saporin-DNA-Menge hatte Auswirkungen auf die Toxizität.

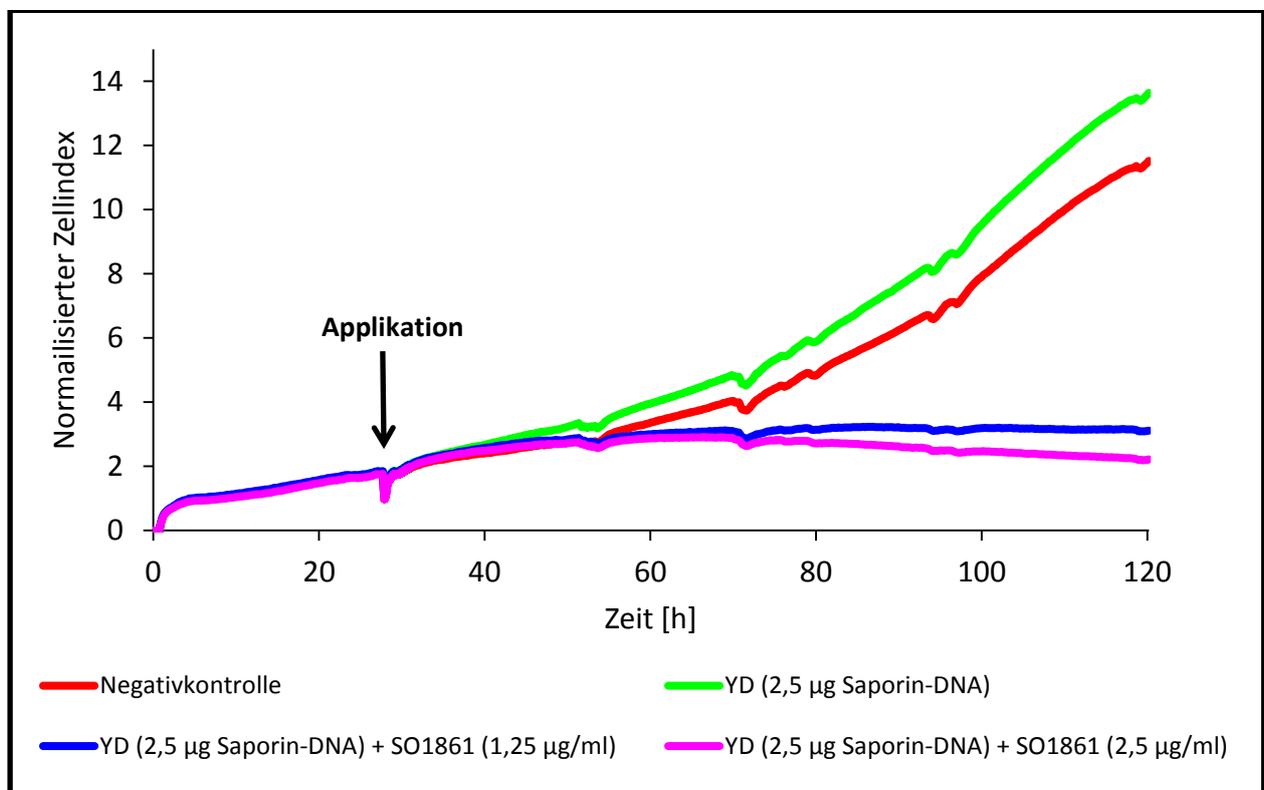
Eine weitere Impedanzmessung bestätigte die Ergebnisse und verdeutlichte den durch SO1861 bewirkten Toxizitätsunterschied (Abb. 57). Die eingesetzte Saporin-DNA-Menge (1  $\mu\text{g}$  und 2,5  $\mu\text{g}$ ) wirkte sich minimal auf die Impedanz aus.



**Abb. 57 Echtzeit-Analyse der SO1861-vermittelten Toxizität von suizidgen-enthaltenden (1  $\mu\text{g}$ , 2,5  $\mu\text{g}$ ) PD-Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen**

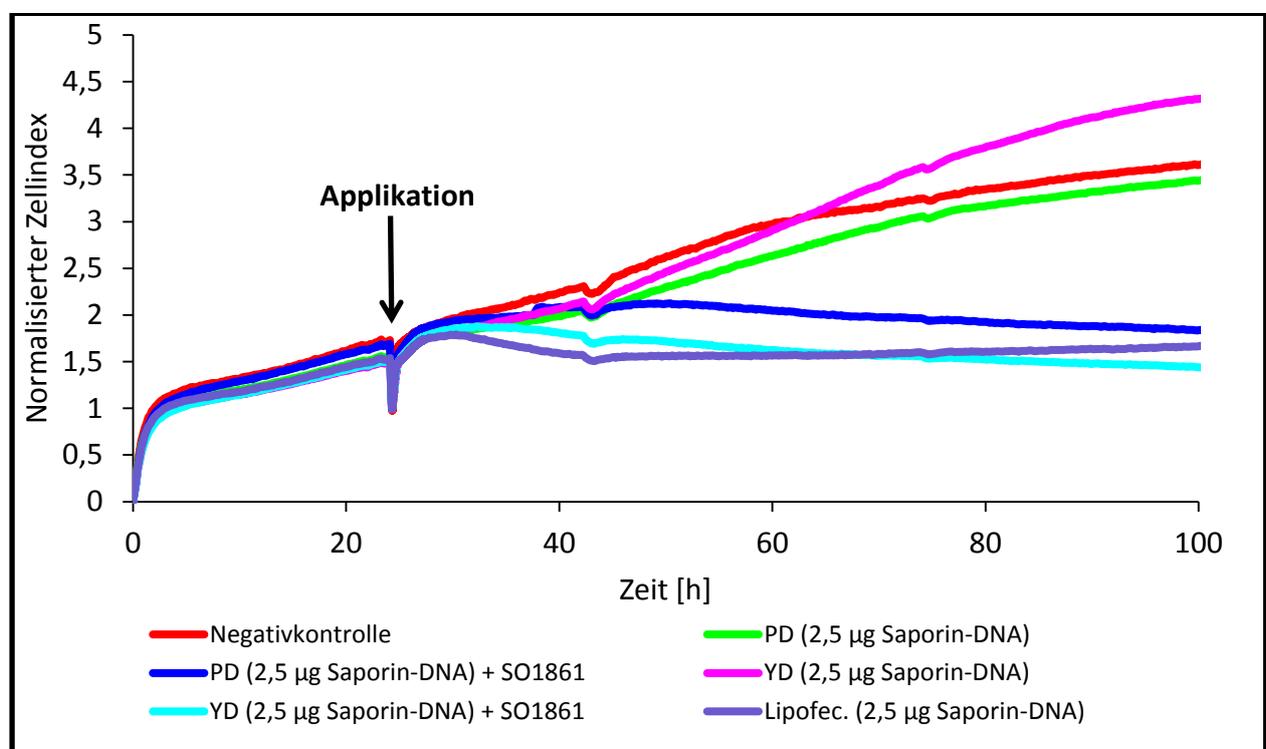
Wie in Abb. 56 konnte eine SO1861- und saporin-vermittelte Toxizität der PD-Nanoplexe beobachtet werden. Ohne Saporin-Co-Applikation lag keine Toxizität vor. Die Variation der eingesetzten Saporin-DNA-Menge (1 $\mu\text{g}$ , 2,5 $\mu\text{g}$ ) beeinflusste die Toxizität hier nur in geringem Ausmaß.

YD-Nanoplexe (2,5 µg Saporin-DNA) wurden formuliert und Neuro-2A-Zellen appliziert, um das Potenzial der YD-Nanoplexe und die Konzentrationsabhängigkeit von SO1861 zu beurteilen (Abb. 58). Die in diesem Experiment angewandten Komponenten wurden für die spätere *in-vivo*-Studie (2.2.9) verwendet. Mit einer erhöhten Impedanz verglichen zur Negativkontrolle deuteten YD-Transfektionen auf keine toxischen Effekte hin. Die Zugabe von SO1861 bewirkte eine Stagnation (1,25 µg/ml) bzw. einen Abfall (2,5 µg/ml) des Zellindex und deutete damit auf eine starke transfektionsbedingte Toxizität hin. Ein starker Kontrast zur Negativkontrolle konnte beobachtet werden.



**Abb. 58 Echtzeit-Analyse der SO1861-vermittelten Toxizität von suizidgen-enthaltenden YD-Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen**  
 Einem starken Zellwachstum bei sowohl der Negativkontrolle als auch bei der saponinfreien YD-Transfektion, steht ein Wachstumsstillstand bzw. -abfall bei der saponinhaltigen YD-Transfektion gegenüber, welcher durch Zugabe von SO1861 verursacht wurde. Eine geringere Saponinkonzentration führte zu einer entsprechend geringeren Toxizität.

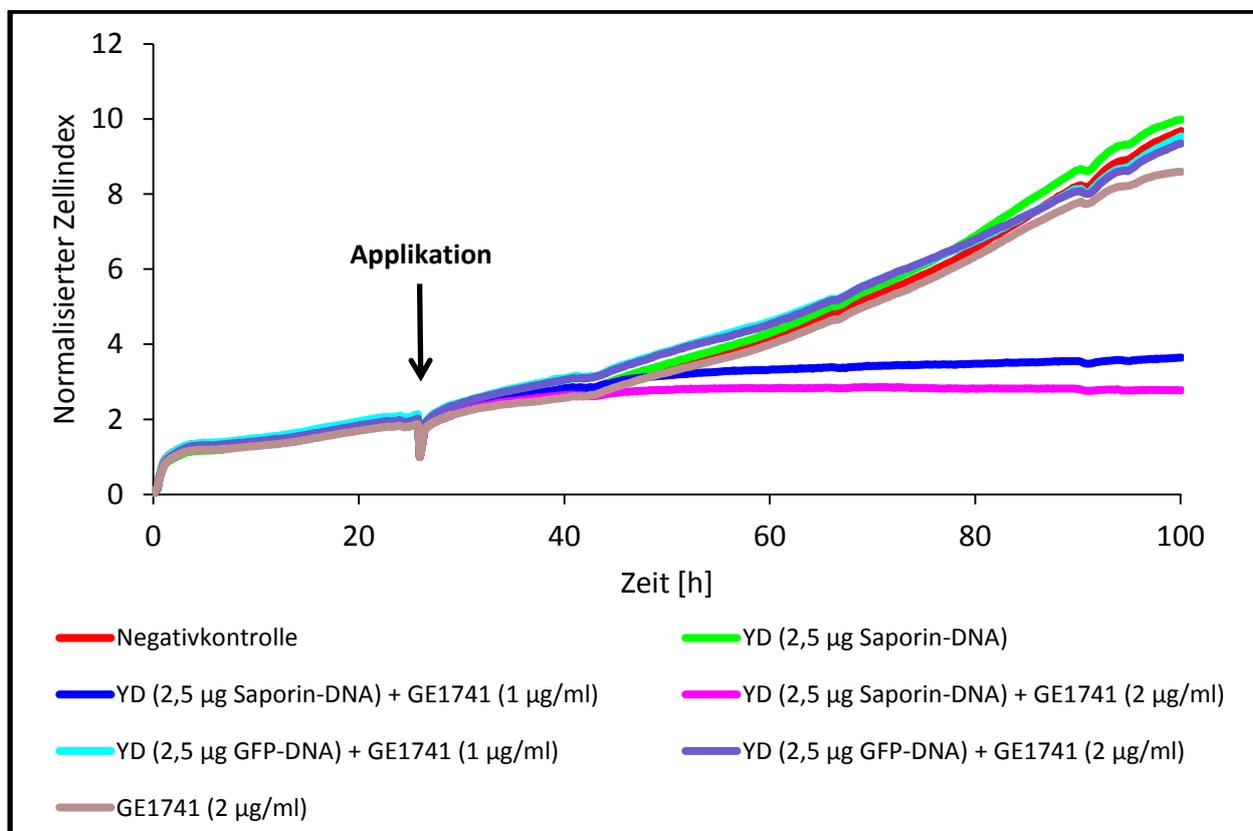
Für den zytotoxischen Effekt von ungerichteten und gerichteten Nanoplexten zu vergleichen, wurden Neuro-2A-Zellen mit sowohl PD- als auch YD-Nanoplexten (2,5 µg Saporin-DNA) – jeweils mit und ohne SO1861 – transfiziert (Abb. 59). Zudem wurden die Zellen mit Lipofectamin® (ebenfalls 2,5 µg Saporin-DNA) behandelt. Durch SO1861 (2,5 µg/ml) wurde eine eindeutige Toxizität durch PD- und YD-Nanoplexe beobachtet. YD-Transfektionen zeigten sich hierbei leicht überlegen. Auch die Lipofectamin®-basierte Transfektion wies eine deutliche Toxizität auf. Aufgrund eines konstant bleibenden Zellindex nach ca. 42 h stellte sich eine anfänglich stärkere toxische Wirkung als weniger effektiv heraus als die entsprechende YD-Transfektion.



**Abb. 59 Echtzeit-Analyse der SO1861-vermittelten Toxizität von Suizidgen-enthaltenden PD- und YD-Nanoplexten an Neuro-2A-Zellen**

Der Effekt eines Einsatzes von PD- und YD-Nanoplexten wurde miteinander verglichen. YD-Transfektionen zeigten sich hinsichtlich der Toxizität leicht überlegen (erhöhte Toxizität bei YD im Vergleich zu PD und YD+SO1861 im Vergleich zu PD+SO1861) und übertraf zudem die Lipofectamin-vermittelte Transfektion in ihrer Toxizität.

Aufgrund des in *Abb. 39* und *Abb. 41* nachgewiesenen Potenzials zur massiven Transfektionseffizienzsteigerung wurde statt SO1861 das beschriebene Experiment mit dem *Gypsophila elegans* M.Bieb. – Saponin GE1741 wiederholt (*Abb. 60*). Neben der Negativkontrolle (rot) und Saponinkontrolle (braun) wurden YD-Transfektionen mit GFP-DNA (je 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GE1741) als Kontrollen herangezogen. YD-Transfektion mit Saporin-DNA zeigten ohne Saponin einen der Negativkontrolle vergleichbaren Zellindex und somit keine Toxizität. Durch GE1741-Co-Applikation konnte erneut ein deutlicher Impedanz- bzw. Zellindex-Abfall erreicht werden.

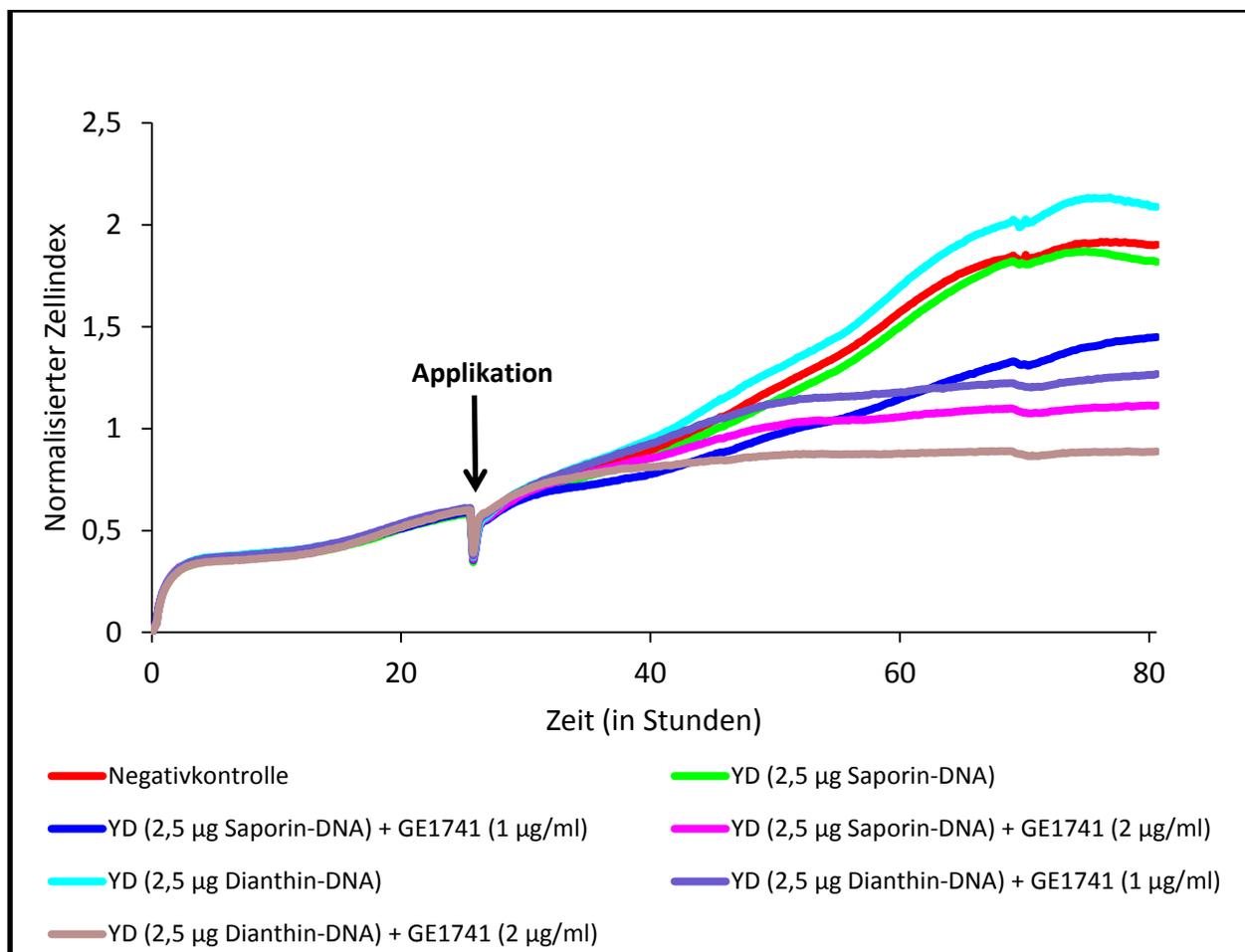


**Abb. 60** Echtzeit-Analyse der GE1741-vermittelten Toxizität von suizidgen-enthaltenden (Saporin) YD-Nanoplexten an Neuro-2A-Zellen

Analog zu PD-Nanoplexten (*Abb. 58*) konnte eine Saporin- und Saponin-vermittelte Toxizität der YD-Nanoplexe beobachtet werden. Die Kontrollen (Negativ- und Vektorkontrolle) bestätigten die Verträglichkeit der eingesetzten Komponenten. Die Toxizität war abhängig von der eingesetzten Saponinkonzentration (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Die gleichen Bedingungen wurden angewandt, um die Toxizität der Klonierungsprodukte (Dianthin-DNA und Saporin-DNA) miteinander zu vergleichen (*Abb. 61*). Sowohl Dianthin-DNA-, als auch Saporin-DNA-haltige Nanoplexe allein zeigten einen ähnlichen Zellindex wie die Negativkontrolle und wiesen somit keine Toxizität auf. Die Zugabe von GE1741 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 2

$\mu\text{g/ml}$ ) bewirkte eine Toxizitätserscheinung, die mit der Transfektion von Dianthin-DNA eindeutig stärker ausfiel.



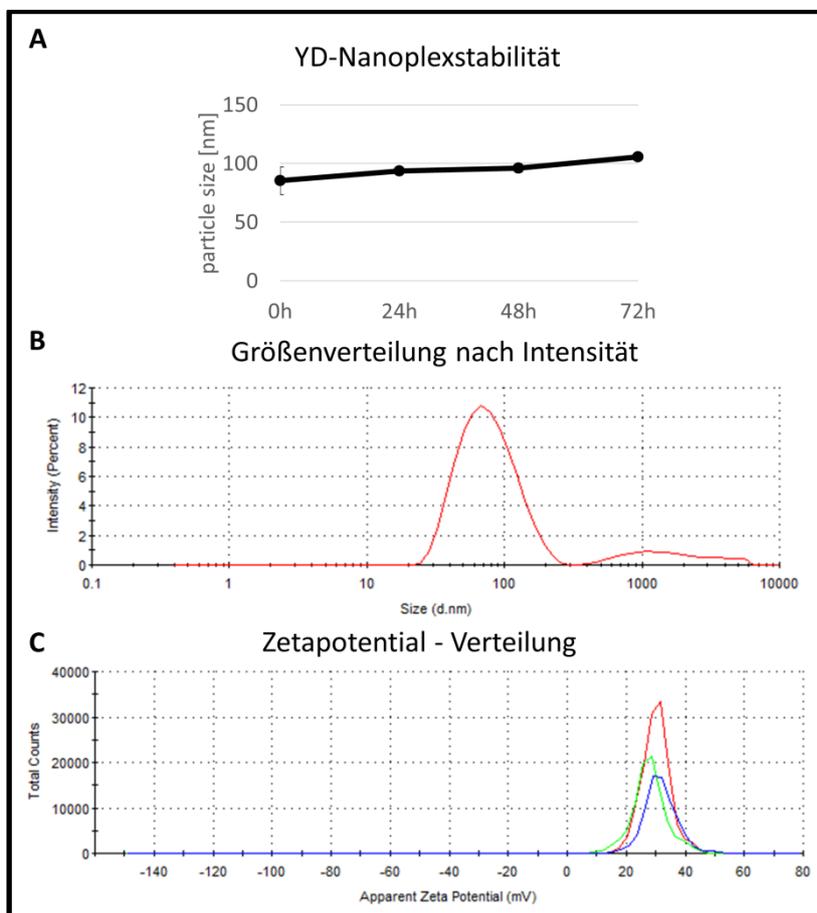
**Abb. 61 Echtzeit-Analyse der GE1741-vermittelten Toxizität von suizidgen-enthaltenden YD-Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen**  
Die saponin-vermittelte Transfektion mit YD-Nanoplexen mit Dianthin-DNA führte erkennbar toxischeren Effekten als die vergleichbare Transfektion mit YD-Nanoplexen mit Saporin-DNA. Bei der Negativkontrolle und bei Transfektion ohne GE1741-Einsatz war keine Toxizität zu erkennen.

### 3.8. Tierversuch

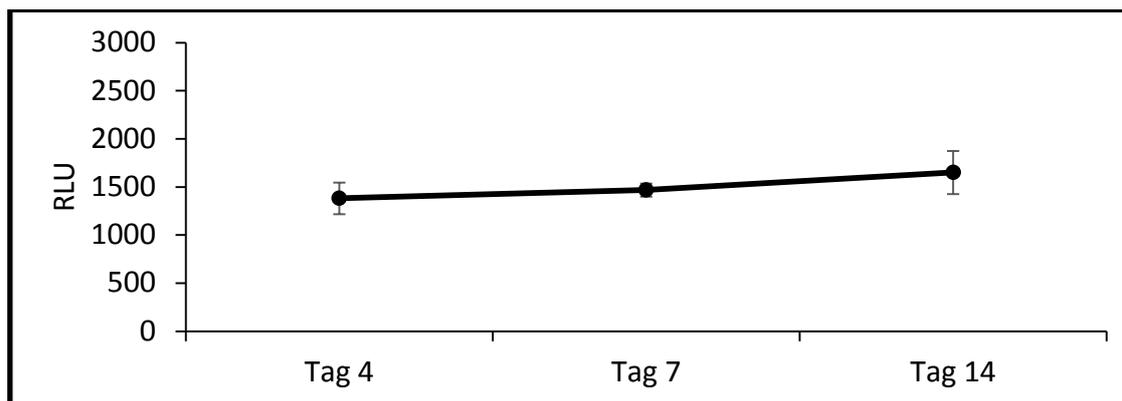
#### 3.8.1. Initiale Qualitäts-Tests

Um die Funktionalität der in der *in-vivo*-Studie angewendeten Komponenten zu gewährleisten, musste deren Qualität durch verschiedene Tests sichergestellt werden. Formulierten YD-Nanoplexe wiesen unmittelbar nach Formulierung eine Größenverteilung  $< 100 \text{ nm}$  auf, nur ein geringer Anteil von Partikelgrößen im Bereich von  $1.000 \text{ nm}$  wurden detektiert (Abb. 62 B). Die

mittlere Partikelgröße blieb bis zu 48 h nach Formulierung unter 100 nm (Abb. 62 A). Das Zeta-potential zeigte sich stabil im Bereich von +30 mV (Abb. 62 C). Bei mit Luciferase-Plasmid transduzierten Neuro-2A-Zellen konnte durch Lumineszenzmessung (analog zu 2.2.6) eine stabile Luciferase-Expression bewiesen werden (Abb. 63).



**Abb. 62 Qualitäts-Test der formulierten YD-Nanoplexe zur in-vivo-Studie hinsichtlich Stabilität, Größe und Zetapotential**  
 Formulierten YD-Nanoplexe wiesen eine hinreichende Stabilität (A, bis zu 48 h), Größe (B, < 100 nm) und Zetapotential (C, +30 mV) auf und zeigten sich in Hinblick auf die in-vivo-Studie geeignet.

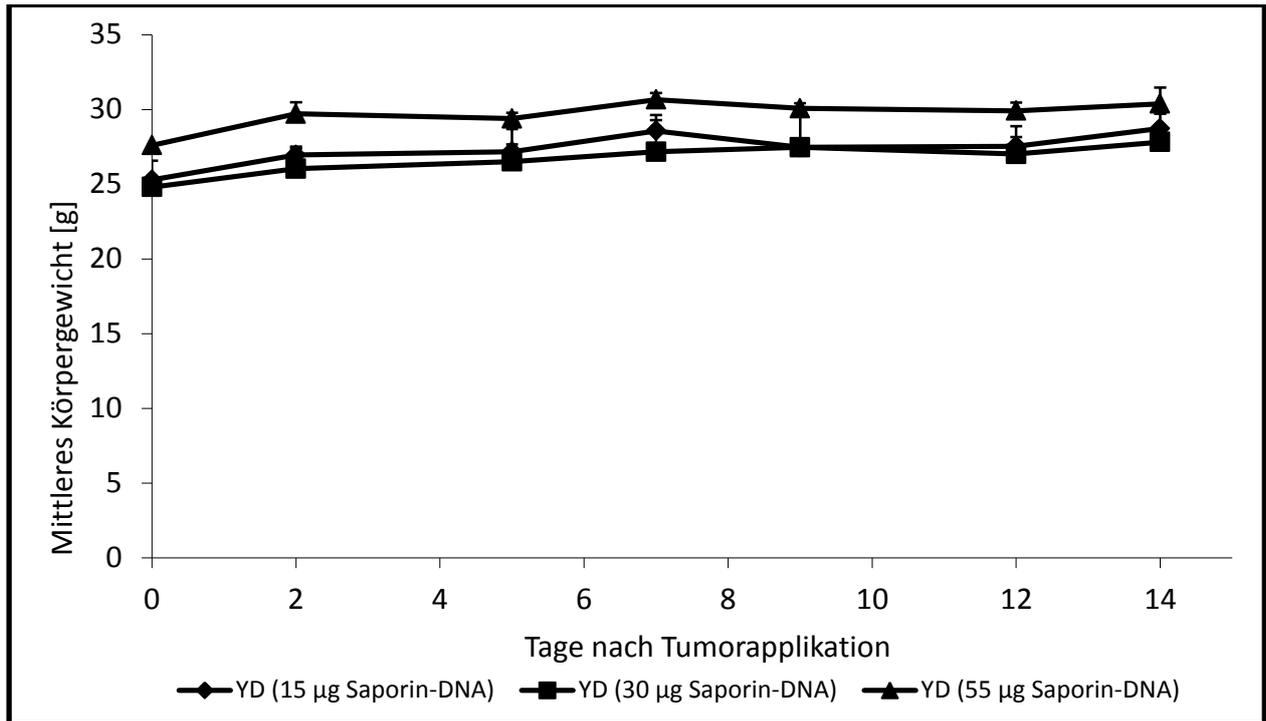


**Abb. 63 Messung der Luciferase-Expression transduzierter Neuro-2A-Zellen**

Die Bestimmung einer konstanten Luciferase-Expression (gemessen in RLU, relative light units) der Neuro-2A-Zellen war für eine zuverlässige Lumineszenzmessung und die damit verbundene Relation zur Tumorgroße obligatorisch.

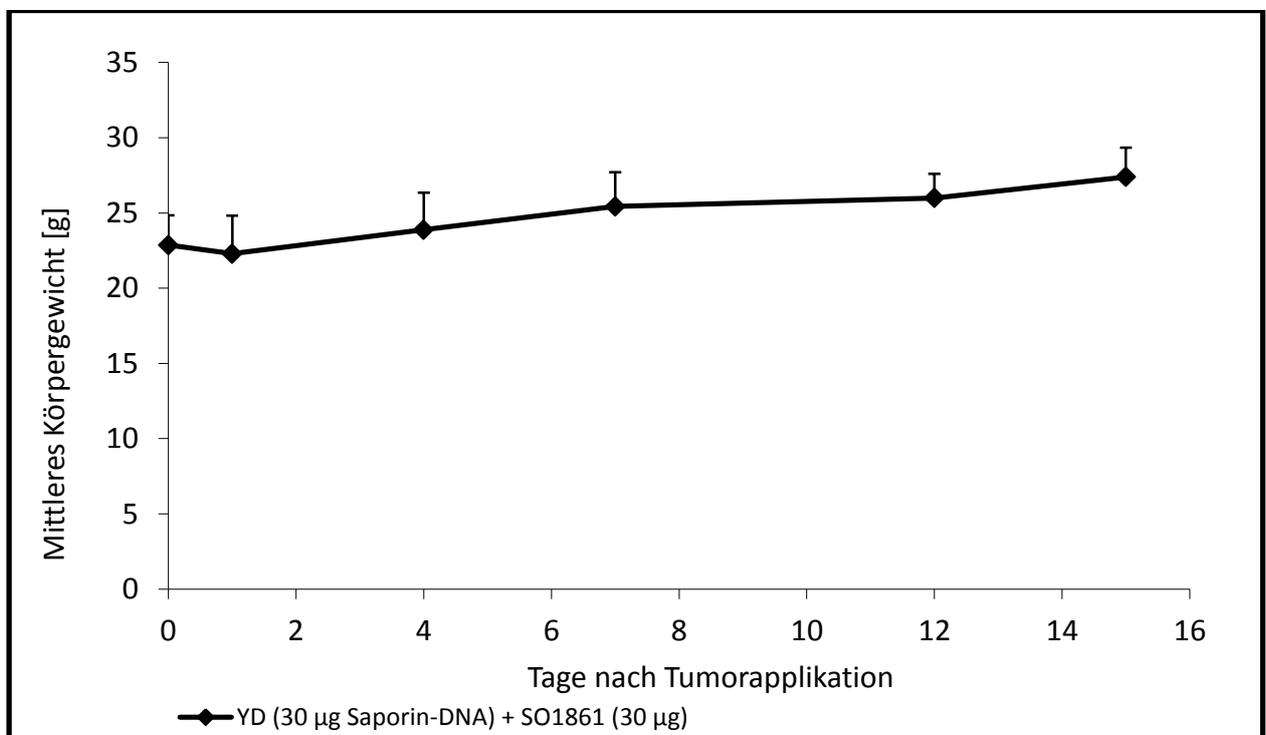
### 3.8.2. Eigentoxizität der Behandlung

Zur Bestimmung einer nicht toxischen und zugleich ausreichend hohen Konzentration von Saporin-DNA wurden Eigentoxizitätstests ausgeführt (akute Toxizität). YD-Nanoplexe mit drei verschiedenen DNA-Konzentrationen (15 µg, 30 µg, 55 µg) wurden je zwei NMRI nu/nu-Mäusen appliziert, diese wurden auf Verhalten und Körpergewicht beobachtet (Abb. 64). Keine der applizierten DNA-Konzentration führte in den folgenden 14 Tagen zu sichtbaren Toxizitätsercheinungen. Das mittlere Körpergewicht der Mäuse bewegte sich im Bereich von 25 – 30 g. Aufgrund von auftretenden Präzipitationserscheinungen während der Formulierung der 55 µg DNA-haltigen YD-Nanoplexen in 50 µl Applikationsvolumen wurde für die folgenden Behandlungen auf die nächstniedrigere Dosis (30 µg) zurückgegriffen. Des Weiterhin war zur Einschätzung einer Langzeittoxizität die kombinatorische Gabe von YD-Nanoplexen (30 µg) und SO1861 (30 µg) notwendig (Abb. 65). Im Laufe der 14-tägigen Beobachtungszeit kam es zu einer leichten Steigung des mittleren Körpergewichts.



**Abb. 64 Eigentoxizitäts-Tests (akute Toxizität) – Bestimmung der YD-Nanoplex-Toxizität an NMRI nu/nu-Mäusen**

Das mittlere Körpergewicht wurde durch die Applikation von YD-Nanoplexe (in unterschiedlichen Mengen) nicht beeinträchtigt. Es konnte somit von keinen toxischen Effekten ausgegangen werden. Allgemein konnte im Laufe des zweiwöchigen Behandlungszeitraums ein leichter Anstieg des Körpergewichts verzeichnet werden.

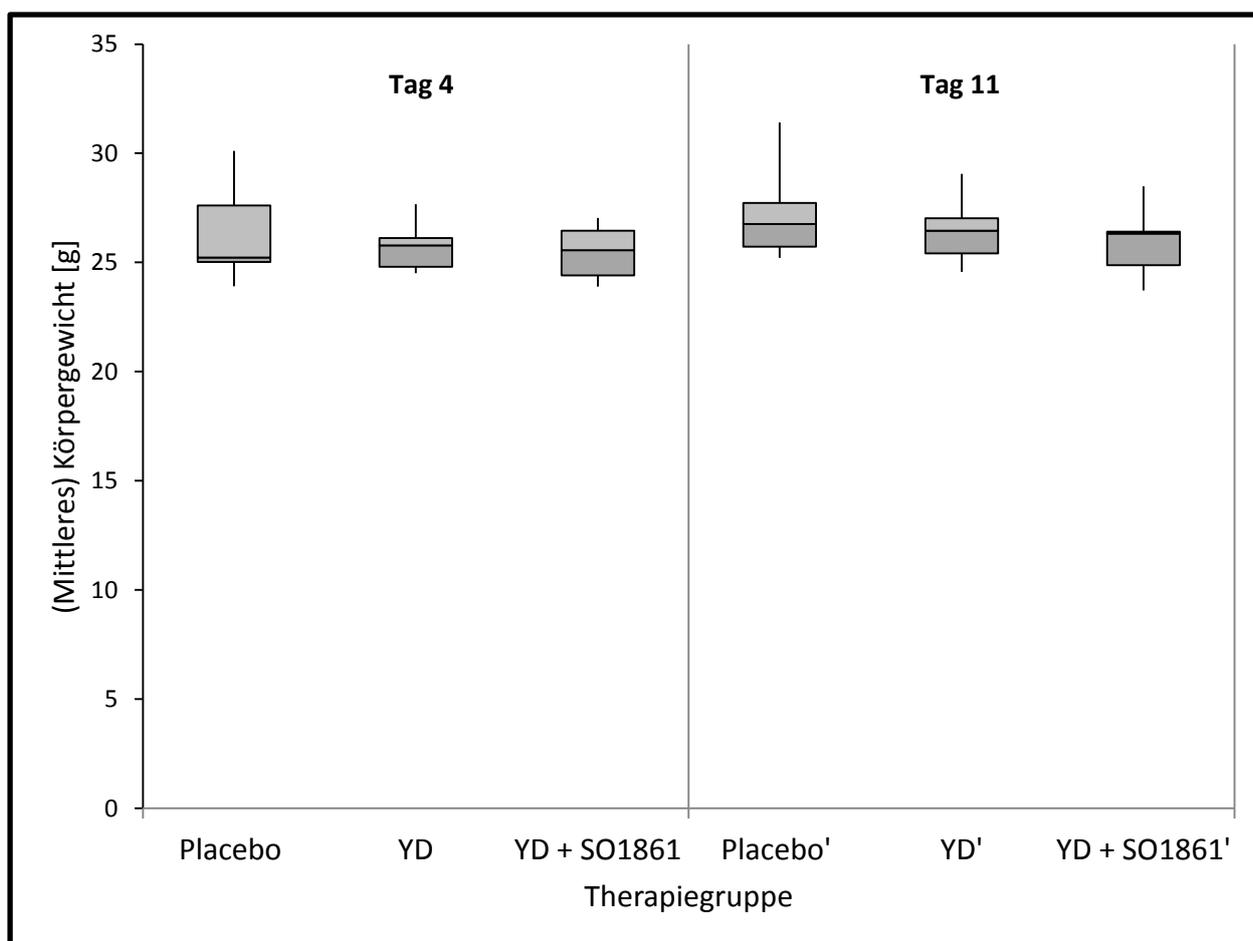


**Abb. 65 Eigentoxizitäts-Tests (kombinatorische Toxizität) – Bestimmung der kombinatorischen (YD-Nanoplex und SO1861) Toxizität an NMRI nu/nu-Mäusen**

Die kombinatorische Gabe von YD-Nanoplexen (30 µg Saporin-DNA) und SO1861 ließ keine toxischen Effekte erkennen. Ein Anstieg des Körpergewichts deutete auf eine gute Verträglichkeit hin.

### 3.8.3. Therapieergebnisse

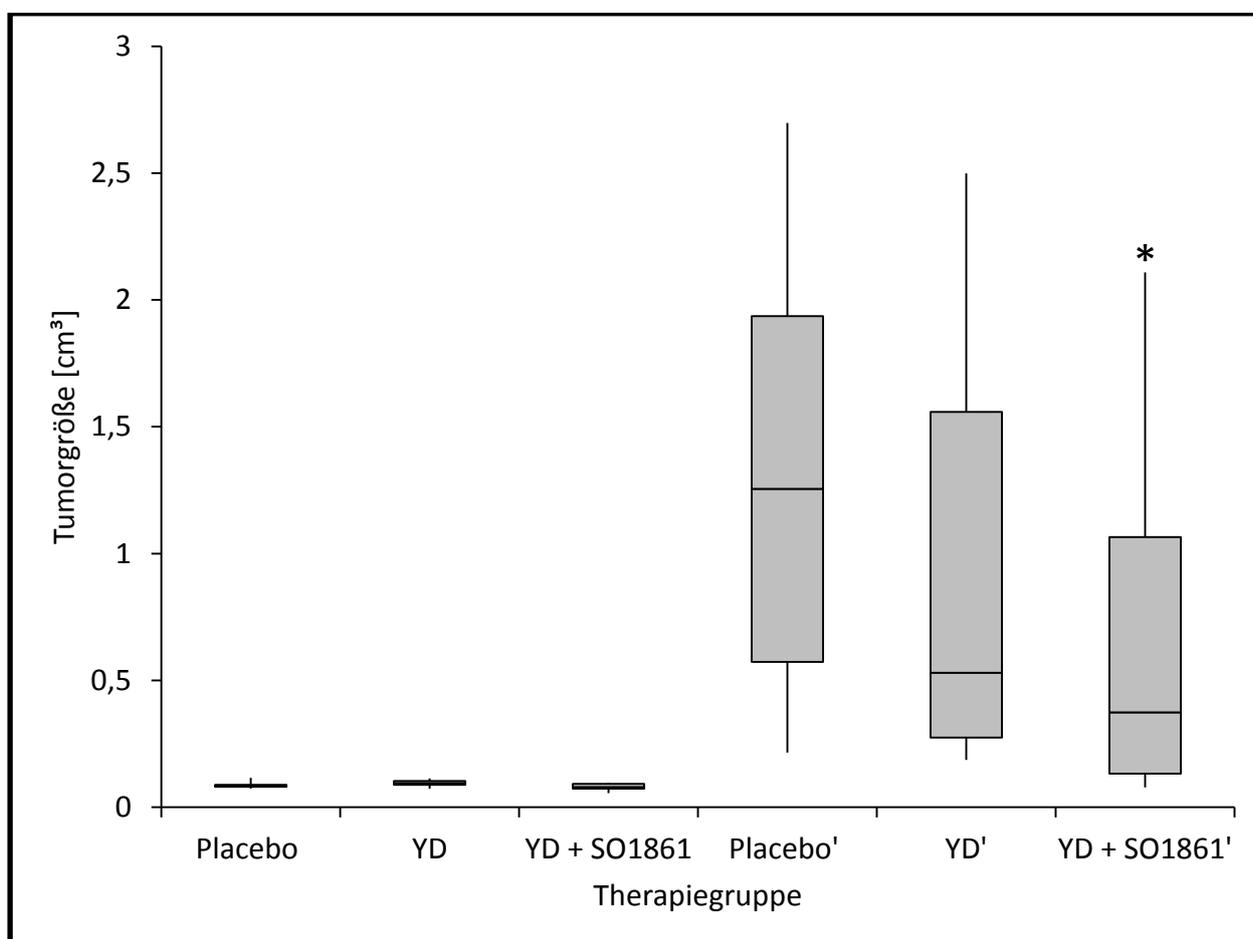
Das Körpergewicht der jeweiligen Therapiegruppen (Placebo, YD, YD+S) wurde mit Therapiebeginn bis hin zur Termination der Behandlung überwacht (Abb. 66). Der Box-Whisker-Plot (Methode zur graphischen Darstellung von Verteilungsparametern in einer komprimierten Form) der Therapiegruppen an Tag 4 wurde dem Boxplot nach Tag 11 gegenübergestellt. Eine signifikante Änderung des mittleren Körpergewichts konnte bei keiner Therapiegruppe beobachtet werden. Geringe Unterschiede zwischen den Therapiegruppen konnten verzeichnet werden. So wies die Placebo-Gruppe nach Tag 11 einen im Vergleich zu YD' und YD+S' höher gelegenen Boxplot auf. Überdies deutete der obere Whisker zusätzlich auf eine höhere Gewichtsverteilung hin.



**Abb. 66** Mittleres Körpergewicht der NMRI nu/nu-Maus-Therapiegruppen während der Tumorthherapie (Tag 4 und 11 nach Tumorapplikation)

Keine signifikante Änderung des Körpergewichts zwischen Tag 4 und 11 wurde festgestellt. Ein Körpergewicht von 25 – 30g deutete auf eine gute Verträglichkeit der Behandlungsmethoden hin. Ein leicht steigender Trend konnte bei der Placebo-Gruppe ausgemacht werden, ein Gewichtseinfluss durch die schnell wachsenden Tumore lag dabei nahe. \*signifikant verglichen zur jeweiligen Behandlung am Tag 4, t-Test,  $p < 0,05$ ,  $n = 10$

In der durchgeführten *in-vivo*-Studie wurde die TumorgroÙe als Primär-MessgröÙe der Therapiewirksamkeit bestimmt (Abb. 67). Sie wurde an Tag 4 und Tag 11 nach Tumorapplikation via Kaliper (Messschieber) gemessen. Die an Tag 4 ermittelte TumorgroÙe betrug für alle Therapiegruppen  $\sim 0,1 \text{ cm}^3$ . Nach einer Woche (Tag 11) konnten deutliche Unterschiede zwischen den Therapiegruppen erkannt werden. Mit dem Einsatz von YD-Nanoplexten (YD') konnte ein deutlicher „Shift“ des Box-Whisker-Plots (Verglichen zu Placebo') verzeichnet werden, welcher durch die Co-Applikation von SO1861 nochmals sichtlich verstärkt wurde (YD+S'). Auch eine merkliche Abnahme des Medians wurde beobachtet. Auffällig war der obere Whisker, der mit einer hohen Spanne bei allen Therapiegruppen auf einzelne Mäuse mit hoher TumorgroÙe hinwies.



**Abb. 67 TumorgroÙe der NMRI nu/nu-Maus-Therapiegruppen (Tag 4 und 11 nach Tumorapplikation)**

Die kombinatorische Gabe von YD-Nanoplexten und SO1861 führte zu einer signifikanten Tumorreduktion. Box-Whisker-Plot und Median (Strich im Box-Plot) der transfizierten Behandlungsgruppen wiesen verglichen zur Placebogruppe eine Verteilung in Richtung niedriger TumorgroÙen auf. \*signifikanter Unterschied verglichen zur Placebo-Gruppe, t-Test,  $p < 0,05$ ,  $n = 10$

Die ermittelten Messdaten wurden in der folgenden Tabelle (Tab. 24) zusammengefasst. Neben der relevanten Abnahme des Medians spielte für die Interpretation der Therapiewirksamkeit der T/C-Wert eine besondere Rolle. Der Wert gibt das prozentuale Tumorwachstum der Behandlung (T = *treated*) verglichen mit der Kontrolle (C = *control*) an. Mit einer YD-Nanoplex-Behandlung wurde, verglichen zur Placebo-Gruppe (Kontrolle, 100% Tumorwachstum), ein 68,3%iges, durch zusätzliche SO1861-Zugabe gar ein 49,6%iges Tumorwachstum erreicht.

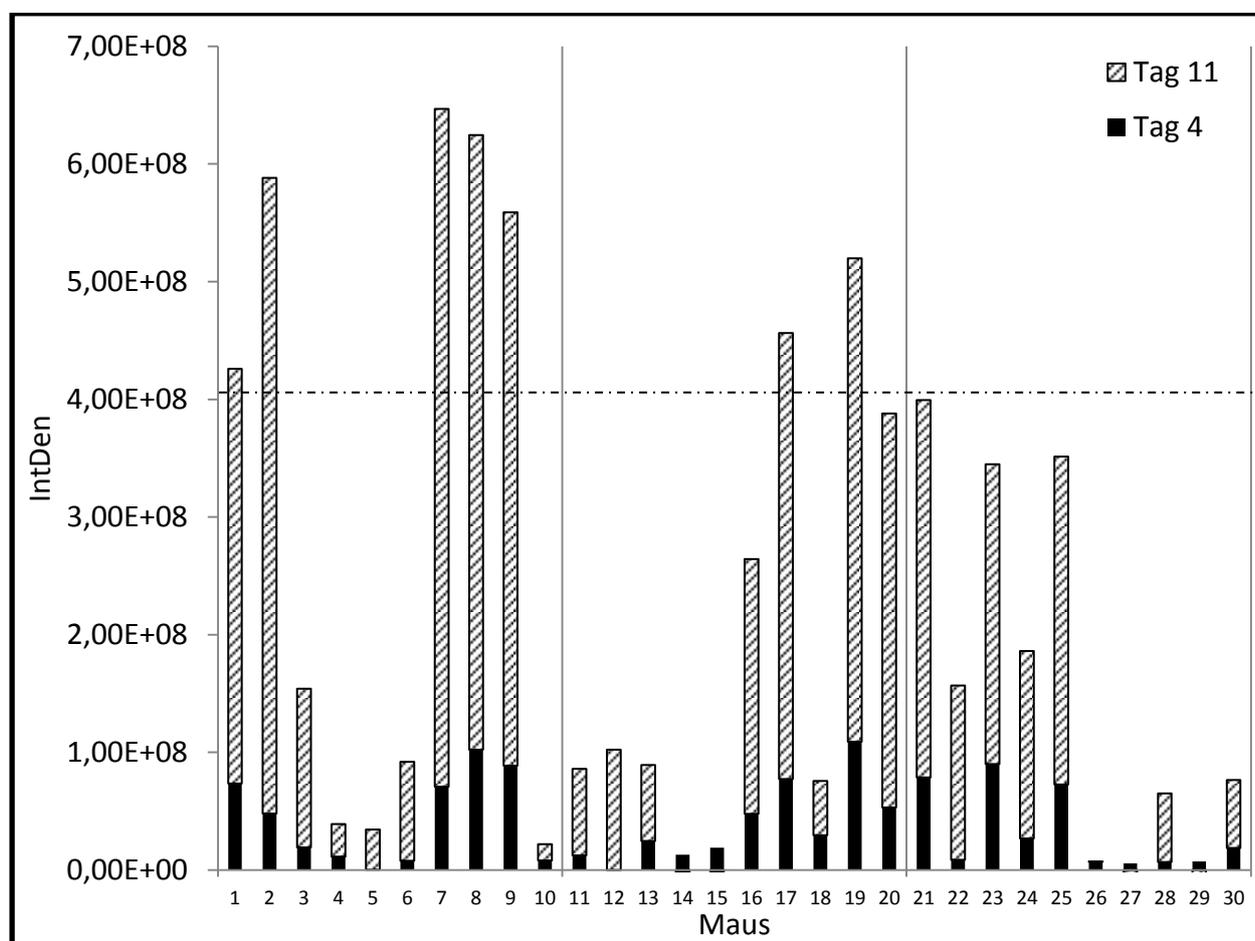
**Tab. 24** Statistische Messdaten der drei NMRI nu/nu-Maus-Therapiegruppen (4 Tage und 11 Tage nach Tumorapplikation)

Gruppe	Tag:		4	11
Placebo	(n)		10	10
	Tumorvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Median	0,08	1,26
		Mittelwert	0,09	1,35
		[S.D.]	0,012	0,946
	RTV	Median	1,0	12,5
		Mittelwert	1,0	15,4
YD	(n)		10	10
	Tumorvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Median	0,09	0,53
		Mittelwert	0,09	0,92
		[S.D.]	0,0123	0,831
	RTV	Median	1,0	7,8
		Mittelwert	1,0	10,1
	T/C [%]		101,1	68,3
YD + SO1861	(n)		10	10
	Tumorvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Median	0,08	0,37
		Mittelwert	0,08	0,67
		[S.D.]	0,014	0,718
	RTV	Median	1,0	5,1
		Mittelwert	1,0	7,9
T/C [%]		92,4	49,6	

Ein aussagekräftiger Parameter zur Beurteilung des Therapieerfolgs stellt der T/C-Wert dar. Während ohne Saponin-Zugabe ein Tumorwachstum von 68% erreicht wurde, konnte mit SO1861 das Tumorwachstum mehr als halbiert werden (49,6%); n: Anzahl an Versuchstieren; S.D: Standardabweichung; RTV: Relatives Tumorvolumen; T/C [%]: Tumorwachstum verglichen zur Kontrolle in% (treated/control-value).

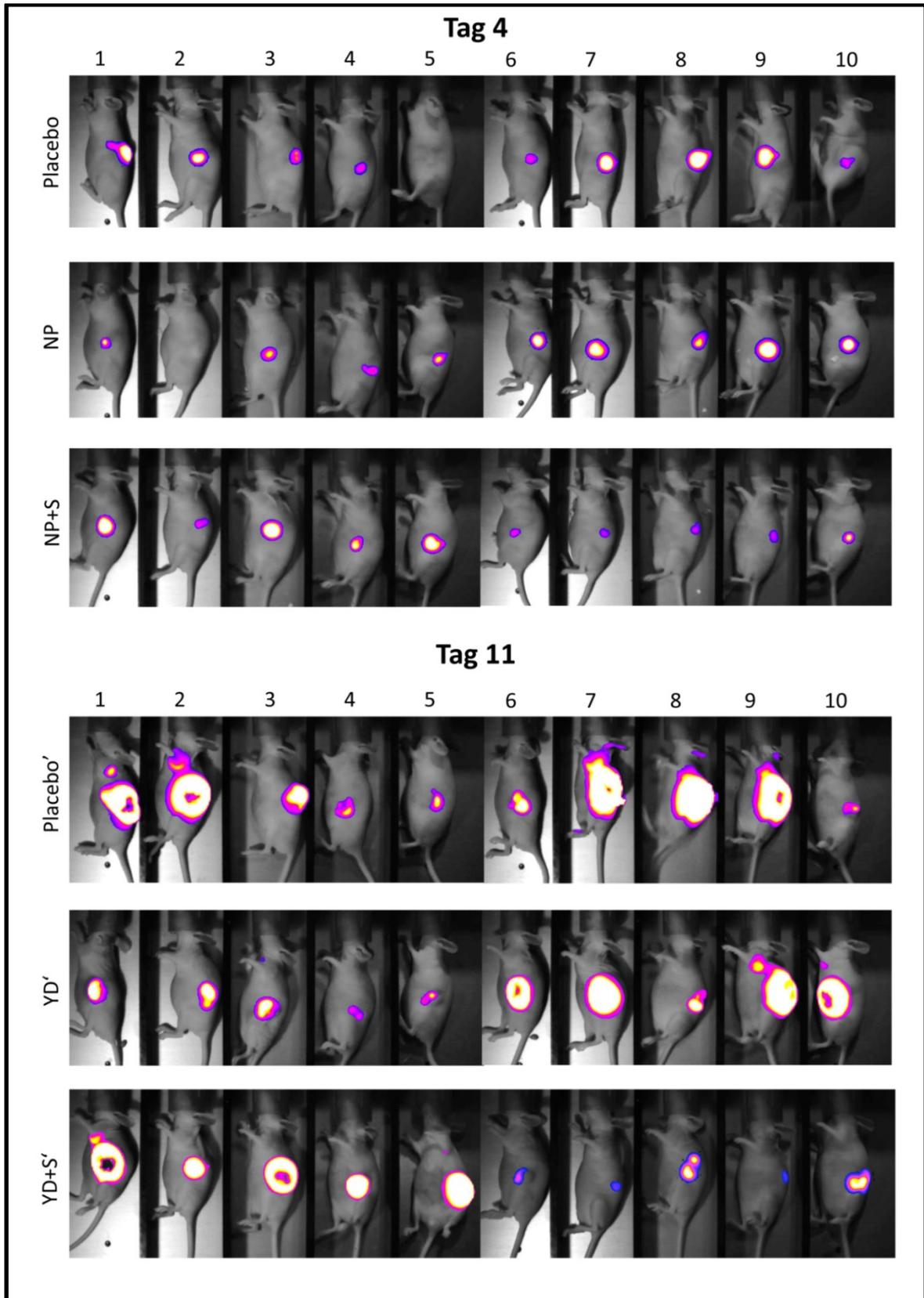
Die Lumineszenzmessung, welche durch die stabile Luciferase-Expression der transduzierten Neuro-2A-Zellen ermöglicht wurde, stellte die Sekundär-Messgröße des Tumorwachstums dar. Durch Ermittlung der integrierten Dichte (IntDen, Summe der Pixelwerte im jeweiligen Bild) konnte die Lumineszenz, welche im direkten Zusammenhang mit dem Tumorvolumen steht, quantifiziert werden (Abb. 68). Die behandelten Mäuse wurden individuell auf die Lumineszenzintensität ihrer Tumore untersucht und mithilfe zusätzlicher Bildgebung (Abb. 69) ausgewer-

tet. Ein Vergleich der Intensität zwischen Tag 4 und Tag 11 war zur Interpretation notwendig. Nach Tag 4 konnten analog zur gemessenen Tumorgroße (Abb. 66) keine sichtbaren Unterschiede zwischen den Therapiegruppen ausgemacht werden. An Tag 11 konnten schnellwachsende Tumore mit einer Intensität von  $1 \times 10^8$  IntDen in sowohl Placebogruppe als auch den Transfektionsgruppen beobachtet werden. Während jedoch die Placebo'-Gruppe 6 Mäuse mit rasant wachsendem Tumor verzeichnete, wies die YD'-Gruppe dagegen lediglich 4, die YD+S'-Gruppe 3 vergleichbare Mäuse auf. Eine nähere Analyse der Lumineszenzintensität konnte eine Dämpfung des Tumorwachstums bei den mit YD-Nanoplexten transfizierten Mäusen aufzeigen, welche mit Co-Applikation von SO1861 noch deutlicher wurde. Die gesetzte Trendlinie bei  $4 \times 10^8$  diente zur Verdeutlichung der Wachstumsunterdrückung.



**Abb. 68** Lumineszenzintensität des applizierten Tumors 4 Tage und 11 Tage nach Tumorapplikation (quantitativ) an NMRI nu/nu-Mäusen

Schwarze Säulen: Lumineszenzintensität nach Tag 4; Gestrichelte Säulen: Lumineszenzintensität nach Tag 11. Mit der Applikation von YD-Nanoplexten konnte eine Unterdrückung des Tumorwachstums beobachtet werden. SO1861 verstärkte den Effekt, deutlich erkennbar bei Versuchstieren mit hoher Wachstumsrate.



**Abb. 69** Lumineszenzintensität der einzelnen Tumore 4 Tage und 11 Tage nach Tumorapplikation (qualitativ) an NMRI nu/nu-Mäusen

Alle Therapiegruppen beinhalteten Versuchstiere, die nicht auf die Therapie ansprachen und welche damit eine hohe Lumineszenzintensität aufwiesen. Durch die Therapie mit dem Suizid-Gen  $\pm$  SO1861 konnte die Anzahl dieser Mäuse verringert werden.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Hintergrund**

Mit der erstmaligen Entdeckung bestimmter Triterpensaponine als Verstärker des endosomalen Release [31] begannen in den darauffolgenden Jahren umfassende Untersuchungen hinsichtlich des Mechanismus [35,36,88], der Struktur-Wirkungs-Beziehung [32,42,43] und der Anwendungsmöglichkeiten dieses Phänomens. Doch trotz der Fülle an Erkenntnissen, die seither gewonnen werden konnten, ist eine Vielzahl an Fragen bis heute unzureichend beantwortet worden. Wie wird das endosomale Release verstärkt? Welche strukturellen Merkmale der Saponine erzielen den maximalen Effekt? Darüber hinaus wurde das Potential, welche Triterpensaponine wie SA1641 und SO1861 mit sich brachten, bei weitem nicht ausgeschöpft. Ist aufgrund des verstärkten endosomalen Release eine Anwendung von Saponinen in der Gentherapie denkbar? Wie könnte ein effizienter Gentransfer verwirklicht werden?

Das Ziel der angefertigten Dissertation war es, jene offenen Fragen weitestgehend zu untersuchen und zu beantworten. Der zentrale Fokus lag hierbei in der Erörterung der Rolle der Saponine als neuartige Verstärker der Transfektion.

### **4.2. Nanoplexe als stabile Nukleinsäure-Vehikel**

Für die Untersuchung der Saponine zur Transfektionsverstärkung bedurfte es der Etablierung einer Methode, welche sowohl einen verlässlichen Gentransfer (Stabilität, Zelleintritt), als auch eine Möglichkeit versprach, das Potential der Saponine hinsichtlich des endosomalen Release umfassend zu beschreiben. Darüber hinaus war die Eignung der Methode zu einem Einsatz in der Gentherapie eine weitere substantielle Voraussetzung. Insbesondere die Toxizität und ein zielgerichteter Gentransfer spielten bei der Methodenentwicklung eine besondere Rolle.

Die biochemische Transfektion erwies sich für die genannten Bedingungen daher am besten geeignet. Die Idee eines gerichteten DNA-Vehikels im Nanometerbereich, zellulär aufgenommen via Endozytose, entwickelte sich in den letzten Dekaden schrittweise zu einer Methode, die nach gezielten Optimierungsschritten eine vielversprechende Option in der Gentherapie darstellt.

Die Klonierung der „*Genes of Interest*“ in einen zur mammalen Expression geeigneten Vektor bildete den Grundstein der Entwicklung von DNA-Vehikeln (Plasmid-Klonierung). Die naturgegebene negative Ladung (bedingt durch die Phosphatgruppen der Nukleotide) ermöglicht die ladungsbedingte Bindung der Nukleinsäure mit positiv geladenen Komponenten und damit die Bildung von Nanoplexen. *Felgner et al.*, *Wu und Wu* und *De Smedt et al.* zeigten in der Vergangenheit, dass verschiedene Kandidaten den Platz als kationisches Gegenstück einnehmen können [47,48,89]. Bei der Nanoplexformulierung wurde dabei besonderes das Massenverhältnis und die daraus resultierende *N/P-ratio* berücksichtigt, um eine effektive DNA-Komplexierung und einen optimalen Eintritt durch die Zellmembran zu gewährleisten. *Ahn et al.* postulierte dabei eine optimale *N/P-ratio* bei 4 [90] für PEI-Nanoplexe, *Kwok et al.* eine *N/P-ratio* von 3 für Polypeptid-Nanoplexe [91]. Ebenso spielen Partikelgröße und Zetapotential eine essentielle Rolle beim Zelleintritt, *Shang et al.* beschrieb hierbei die Mindestgröße von <200 nm für eine passive Endozytose [92], *Son et al.* betonte die Wichtigkeit des Zetapotentials als Indikator für effektive Transfektionen [93].

In Anlehnung vergangener Studien wurden die Nanoplexe in ausgewählten Massenverhältnissen formuliert und in puncto Größe, Stabilität und Integrität untersucht. Die übernommenen Massenverhältnisse der PD- und PEID-Nanoplexe führten zu Partikelgrößen <100 nm mit geringem PDI und homogener Größenverteilung (3.3.1). Eine Komplexierungseffizienz der Peptid- und Polymer-basierten Nanoplexe konnte sowohl qualitativ, als auch quantitativ nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Anwesenheit von Saponinen keinen Einfluss auf die Integrität (3.3.3), wengleich elektronenmikroskopische Aufnahmen von PD-Nanoplexen nach Saponinzugabe auf Wechselwirkungen an der Ei- bzw. Doughnut-förmigen Partikeloberfläche hindeuteten (3.3.2). Liposomen beinhaltende Formulierungen (LD, PLD) zeigten von Literatur abweichende Werte. Partikelgrößen von 78 nm für LD-Nanoplexe [94] und 66 nm für PLD-Nanoplexe [51] konnten nicht erzielt werden. Stattdessen sprechen Partikelgröße (LD: 579 nm, PLD: 113 nm) und inhomogene Größenverteilungen ( $PDI > 0,4$ ) für eine unzureichende und instabile Partikelbildung (3.3.1). Während in den Komplexierungs-Assays durch höhere Effizienzwerte bei PLD-Nanoplexen eine kompakte DNA-Komplexierung aufgezeigt werden konnte, die trotz Saponineinfluss ihre Stabilität bewahrten, deckten LD-Nanoplexe erhebliche Stabilitäts- und Komplexierungsdefizite auf (3.3.3). Infolgedessen wurde im Gel-Retentions-Assay eine Visualisierung der LD-Nanoplexe durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid ermöglicht (*Abb. 28*). Wie die hohe Partikelgröße spricht dies für eine ineffiziente DNA-Komplexierung. Die zusätzli-

che Gabe von SO1861 ließ eine Freigabe von DNA und die verbundene Wanderung im elektromagnetischen Feld zu, welche mit einer Saponin-bedingten Verdrängung aus den Nanoplexen zu erklären ist. Die lose DNA-Bindung wird weiter mit den Ergebnissen des quantitativen Komplezierungs-Assay verdeutlicht (Tab. 22). Auf dem ersten Blick widersprüchlich erschien eine steigende Effizienz mit gleichzeitig steigender SO1861-Konzentration. Verbunden mit den beschriebenen Erkenntnissen des Retentions-Assays kann die Erscheinung jedoch mit einer Inkorporierung der Saponinmoleküle in die Nanoplexe begründet werden. Der Einbau der Saponine in die Nanoplexe führt schließlich zu einer festeren DNA-Bindung und zu einer gleichzeitigen Verdrängung loser DNA.

Die Diskrepanz zwischen den neu ermittelten und bereits beschriebenen Ergebnissen hinsichtlich der LD-Nanoplexe kann nicht eindeutig erklärt werden. Nichtsdestotrotz kann eine mögliche Begründung in der Liposomenherstellung (2.2.3) gefunden werden. Eine zu schnelle und damit suboptimale Lipidfilmbildung oder eine inkorrekte Extrusion könnten als systematischer Fehler die ineffiziente Liposomenformung erklären, auch das Massenverhältnis der Komponenten ist zu hinterfragen. Angesichts einer untergeordneten Bedeutung wurde die Problematik der liposomalen Nanoplexe im Laufe der Dissertation nicht weiterverfolgt.

Die Charakterisierung der beschriebenen Nanoplexe stellte eine erste und wichtige Maßnahme zum Aufbau einer verlässlichen und robusten Transfektionsmethode dar. Peptid-basierte (PD) und Polymer-basierte (PEID) Nanoplexe eignen sich hierfür hinsichtlich der notwendigen Partikelparameter (Größe, Homogenität, Zetapotential) und bieten eine effiziente und stabile DNA-Komplexierung (ohne/mit Saponingabe) auf. Liposomale Nanoplexe (LD, PLD) konnten sich aufgrund der oben beschriebenen Erkenntnisse als keine stabile DNA-Carrier empfehlen.

### **4.3. Isolation und Charakterisierung neuartiger Transfektionsverstärker**

Die Auftrennung von Saponingemischen und Isolation einzelner Saponine aus diesen stellt einen sehr zeitraubenden und aufwendigen Prozess dar. Die Herausforderung in der Isolierung besteht darin, die Komponenten mit fast identischer Polarität – begründet durch die Zuckerketten – mithilfe chromatographischer Methoden (HPLC) voneinander zu trennen.

Mit Saponinum album befand sich lange Zeit ein komplexes Saponingemisch aus *Gypsophila paniculata* L. (Merck) auf dem Markt. Mit *Hebestreit et al.* wurde 2006 erstmals die Zytotoxizi-

tätssteigerung von Lektinen mithilfe des Saponingemisches beschrieben [33]. Neben der Aufklärung des Synergismus bestand ein gesteigertes Interesse darin, die verantwortliche aktive Komponente des Gemisches auszumachen. Trotz der anschließenden Erkenntnis, dass der toxisitätssteigernde Effekt ein Resultat mehrerer zusammenwirkender Saponine aus Saponinum album sei [95], wurde durch *Weng et al.* aus dem Gemisch das aktivste und bisher meist beschriebene Saponin SA1641 isoliert [96] und charakterisiert [97]. Die höhere Aktivität von SA1641 verglichen zu weiteren isolierten *Gypsophila paniculata* L.-Saponinen konnte mit der Methode zur Bestimmung der transfektionsverstärkenden Fähigkeiten veranschaulicht werden (3.6.1.3.2).

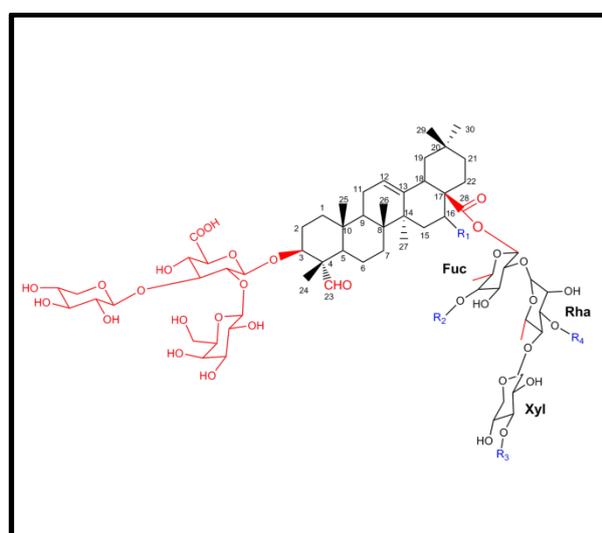
Die Isolation von weiteren hochaktiven Mediatoren des endosomalen Release wurde zeitgleich in der Pflanze *Saponaria officinalis* L. fortgeführt. Mit SO1861 wurde infolgedessen ein Saponin identifiziert, das in *in-vivo*-Studien vielversprechende Ergebnisse aufzeigte [98,99]. Die Charakterisierung von SO1861 mit der Identifizierung der Masse durch *Thakur et al.* [40] und der Entschlüsselung der Grundstruktur durch *Weng et al.* [63] konnte mittels Isolation des aufgereinigten SO1861 und Aufklärung der Gesamtstruktur in dieser Arbeit komplettiert werden (3.2). Hinsichtlich der Transfektionseffizienz konnte SO1861 einen deutlichen Wirkungsunterschied verglichen zu anderen identifizierten *Saponaria officinalis* L.-Saponinen verzeichnen (3.6.1.3.1). Aus *Gypsophila elegans* M.Bieb. konnte mithilfe der in 1.5 beschriebenen aktivitätsgeleiteten Isolationsstrategie das bisher unbeschriebene Bidesmosid GE1741 isoliert und strukturell identifiziert werden (3.2). Dessen Potential hinsichtlich der Transfektionsverstärkung und dessen Überlegenheit gegenüber weiteren *Elegans*-Saponinen wurde durch die Isolationsmethode selbst bereits aufgezeigt (3.6.1.3.3).

Mit der Bestimmung der Wirkstärke der in dieser Arbeit getesteten Saponine konnte nicht nur die Existenz komplexer Saponingemische mit vielen, unterschiedlich aktiven Komponenten demonstriert werden. Vielmehr konnten weitere und wertvolle Erkenntnisse im Hinblick auf die Struktur-Wirkungs-Beziehung gewonnen werden.

#### **4.4. Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung**

Durch *Melzig et al.* (2015), *Bachran et al.* (2006) und insbesondere *Böttger et al.* (2013) konnten bereits essentielle Strukturmerkmale für ein effektives endosomales Release beschrieben und durch *Fuchs et al.* (2017) umfassend resümiert werden (1.5).

Mit der Isolation des SO1861 aus *Saponaria officinalis* L. und GE1741 aus *Gypsophila elegans* M.Bieb. wurden zwei hochaktive Mediatoren des endosomalen Release gewonnen, die dazu verhelfen, die Beschreibung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung auf eine nächste Ebene zu bringen. Die Etablierung eines Transfektions-Assays, basierend auf dem Gentransfer GFP-DNA beinhaltender PD-Nanoplexe, ermöglichte hierbei, das transfektionsverstärkende Vermögen der Saponine zu bestimmen und miteinander zu vergleichen (3.6.1.3). Die Gegenüberstellung der durch *Weng et al.* [36,69], *Jia et al.* [67], *Lu et al.* [66] sowie in dieser Arbeit beschriebenen Strukturformeln der Gypsophila- und Saponaria-Saponine mit den ermittelten Transfektionseffizienzen erlaubte eine Identifizierung neuer Strukturmerkmale und eine Neuevaluierung der Struktur-Wirkungs-Beziehung (*Abb. 70*).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Konz. [µg/ml]	TE [%]
SA1641	H	Qui	Xyl	H	20	30
SA1657	OH					21
Gyp1	OH	H	H	Glc		18
Gyp2	H					3
Gyp3	H					Xyl
SO1542	OH	H	H	Glc	20	8
SO1584	OH	H	H	GlcAc		10
SO1658	H	H	Xyl	Glc		10
SO1674	OH					5
SO1832	OH	-QuiAc-(1→3)-Xyl	Xyl	H	5	35
SO1861	OH	-QuiAc-(1→3)-Xyl	Glc	H	2,5	60
GE1741	OH	QuiAcAc	Xyl	H	2	60

**Abb. 70** Essentielle Strukturmerkmale von isolierten Triterpensaponinen für ein endosomales Release

Die gemeinsame Struktur aller getesteten Saponine wird links dargestellt, die Tabelle verweist auf die individuellen strukturellen Unterschiede. Die in der Tabelle beschriebenen Zucker liegen alle in der  $\beta$ -D-Form vor. **Rot**: Bereits beschriebene für die Wirkung wertvolle Strukturmerkmale; **Grün**: Neu beschriebene für die Wirkung wertvolle Strukturmerkmale; Qui: Quinovose; Xyl: Xylose; Glc: Glucose; Ac: Acetyliert; TE: Transfektionseffizienz

Der Fokus richtet sich hierbei vollständig auf die C-28-Zuckerkette und die Hydroxylierung des C-16 (R<sub>1</sub>). Ein entscheidender Einfluss der OH-Gruppe auf die Transfektionseffizienz konnte nicht beobachtet werden. Verdeutlicht wird dies durch die Unterschiede zwischen SA1641 und SA1657 sowie SO1658 und SO1674, in der die Hydroxylierung keine positive Auswirkung auf die Effizienz zeigte. Allenfalls eine partielle und sterische Rolle kann vermutet werden, da eine ein Aktivitätsunterschied zwischen Gyp1 und Gyp2 vorliegt und die Hydroxylgruppe bei den drei potentesten Saponinen (SO1832, SO1861, GE1741) vorzufinden ist.

An der Fucose-Rhamnose-Xylose-Kette – via Esterbindung am C-28 des Aglykon gebunden – können drei Reste ( $R_2 - R_4$ ) ausgemacht werden, die einen unterschiedlichen Einfluss auf die Wirkung haben. Eine Substitution der Rhamnose am  $R_4$ -Rest mit einem Glucose-Zucker zeigte weder bei Gypsophila- (Gyp1 – 3) noch Saponaria-Saponinen (SO1542, SO1674) einen Effekt. Gar eine Acetylierung der Glucose (SO1584), wie sie in *Böttger et al.* als günstiges Strukturmerkmal beschrieben wurde [43], hatte keine Auswirkung auf die Potenz. Die bedeutendsten Aktivitätsänderungen wurden durch  $R_2$ -Substituierungen der Fucose hervorgerufen. So konnten mit der an der Fucose gebundenen Quinovose (6-Desoxy-Glucose) deutlich stärkere Transfektionseffizienzen beobachtet werden (SA1641, SA1657) als bei Saponinen ohne  $R_2$ -Substituierung. Durch Acetylierung jener Quinovose konnte eine weitere Aktivitätssteigerung erreicht werden (SO1832, SO1861). Mit einer zweifachen Acetylierung der Quinovose, verbunden mit einer Entfernung einer an ihr gebundenen Xylose, konnte die Potenz unter Berücksichtigung der verwendeten Konzentrationen weiter gesteigert werden (GE1741). Anhand der Ergebnisse ist ebenfalls von einem entscheidenden Einfluss einer  $R_3$ -Substituierung auszugehen. Eine erhöhte Transfektionseffizienz durch  $R_3$ -Substituierung konnte jedoch nur beobachtet werden, wenn gleichzeitig eine  $R_2$ -Substituierung der Fucose vorlag. Dass die Art der  $R_3$ -Substituierung an der Xylose zusätzlich eine wichtige Rolle spielt, wird durch SO1832 und SO1861 veranschaulicht. So führte der Austausch der Xylose mit einer Glucose am  $R_3$ -Rest der Xylose zu einem Effizienzunterschied von 25% zugunsten von SO1861, dessen Wirkpotenz angesichts der geringeren eingesetzten Konzentration sogar weitaus stärker anzusiedeln ist.

Die Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehung ermöglichte somit die Erhebung neuer Strukturmerkmale, welche sich in die Liste der bisher beschriebenen (1.5) einreihen könnten:

- Quinovose am  $R_2$ -Rest der Fucose
- Acetylierung (vorzugsweise mehrfach) der Quinovose am  $R_2$ -Rest der Fucose
- Glucose am  $R_3$ -Rest der Xylo

Zur gleichen Zeit werfen jedoch die formulierten Entdeckungen Fragen auf:

- Ist eine spezifische Substituierung am  $R_2$ -Rest der Fucose mit einer Quinovose notwendig oder ist ein anderer (Desoxy-)Zucker ausreichend oder gar besser geeignet?

Von einer ausschließlich durch Quinovose verursachten Wirkungssteigerung kann nicht ausgegangen werden. In der von *Böttger et al.* erstellten Strukturgegenüberstellung zeigten auch am R<sub>2</sub>-Rest der Fucose gebundene Desoxyzucker wie Rhamnose oder Fettsäuren eine hohe Aktivität. Eine verglichen zur Quinovose stärkere oder schwächere endosomale Freigabe ist daher in der Folge zu untersuchen.

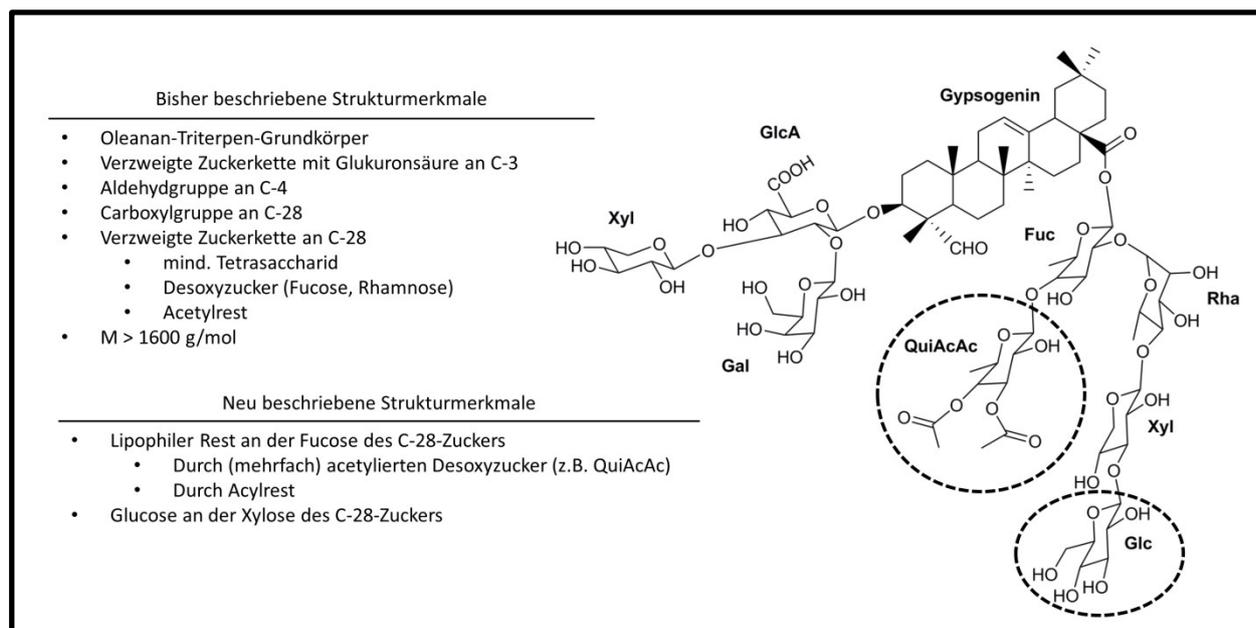
- Ist eine Acetylierung lediglich an R<sub>2</sub>-Zuckern vorteilhaft?

Die Fragestellung ist in der Zukunft näher zu verfolgen. Obwohl SO1584 einen am R<sub>4</sub>-Rest acetylierten Zucker vorweisen kann, konnte keine effektive Transfektion beobachtet werden. Da anhand der Ergebnisse eine notwendige Substituierung des R<sub>2</sub>-Rests abgeleitet werden konnte und diese bei SO1584 nicht vorlag, ist eine eindeutige Schlussfolgerung nicht möglich. Eine Aussage kann somit erst dann getroffen werden, wenn ein Saponin eine R<sub>2</sub>-Substituierung und eine gleichzeitige Acetylierung der R<sub>3</sub>- oder R<sub>4</sub>-Zucker aufweist.

- Kann eine weitere Verstärkung der Wirkpotenz am R<sub>3</sub>-Rest mit einem von Glucose verschiedenen Zucker erreicht werden?

Der Unterschied in Form einer Glucose statt einer Xylose bei SO1861 zu SO1832 bewies eine mögliche Transfektionssteigerung durch Modulation des R<sub>3</sub>-Rests. Über mögliche Gründe wie Polarität, Masse oder sterische Hinderung können lediglich gemutmaßt werden. So muss bis zur Aufklärung von einer optimalen Substituierung des R<sub>3</sub>-Rests mit Glucose ausgegangen werden.

Eine Neuevaluierung der Struktur-Wirkungs-Beziehung bedeutete einen wichtigen Schritt für die Bestimmung eines optimalen Triterpensaponins für das endosomale Release. Die folgende abgebildete Struktur stellt ein hypothetisches Saponin dar, das sämtliche bisher entdeckten wichtigen Strukturmerkmale vereint und eine Erweiterung des von *Böttger et al.* beschriebenen idealen Saponins darstellt:



**Abb. 71 Ideales Saponin mit allen erfassten und wichtigen Strukturmerkmalen**

Die bisher beschriebenen Strukturmerkmale wurden mit den neu entdeckten Merkmalen ergänzt. Das ideale hypothetische Saponin besitzt eine Masse von 1755 g/mol und den Namen 3-O-β-D-Galactopyranosyl-(1→2)-[β-D-Xylopyranosyl-(1→3)]-β-D-Glucuronopyranosyl Gypsogenin 28-O-β-D-Glucopyranosyl-(1→3)-β-D-Xylopyranosyl-(1→4)-α-L-Rhamnopyranosyl-(1→2)-[(3,4-Di-(O-Acetyl)-β-D-Quinovopyranosyl-(1→4)]-β-D-Fucopyranosid.

#### 4.5. Universelle Transfektionsverstärkung

Mit der umfassenden Charakterisierung verschiedener Nanoplexe und der Erfassung hochwirksamer Saponine wie das SO1861 und GE1741 konnte zunächst die Etablierung einer verlässlichen und effizienten Methode zur Effizienzbestimmung realisiert werden. Das Lumineszenz-Assay stellte sich hierfür als nicht zufriedenstellende Methode zur Bestimmung der Transfektionseffizienz heraus (2.2.6). Obwohl eine signifikante Steigerung der Lumineszenzintensität der Peptid-basierten Transfektionen durch SO1861 verdeutlicht werden konnte, ließen weitere Ergebnisse wie die Intensitätsschwächung der PLD-Transfektion die Verlässlichkeit und Aussagekraft der Methode hinterfragen. Die gemessene Lumineszenzintensität als einzelner Wert lieferte diesbezüglich keine Information über Quantität oder Qualität der ausgeführten Transfektion. Eine Unterscheidung zwischen „vielen schwach transfizierten“ und „wenigen intensiv transfizierten“ Zellen war demnach nicht möglich. So konnte sich schließlich die fluoreszenzbasierte Effizienzbestimmung mit einer individuellen Zellanalyse von mindestens 10.000 Zellen als deutlich detailreicheres und damit vielversprechenderes Modell erweisen (2.2.7.1). Durch die Transfektion verschiedener Zelllinien konnte sowohl die Eignung der formulierten Nanoplexe als auch die universelle Anwendbarkeit der getesteten Saponine untersucht werden (3.6.1.1). Insgesamt

konnte ein unterschiedlich starkes Ansprechen der Zelllinien auf die Transfektion mit GFP-DNA beobachtet werden. Während Neuro-2A-Zellen Transfektionseffizienzen von mind. 40% (nach SO1861-Zugabe) aufwiesen, konnten bei Caco2-Zellen maximal 15%, HEK293 maximal 25% und SHSY und SKN unter 10% der Zellen transfiziert werden. Als mögliche Gründe für die Diversität der Transfektionsraten sind hierbei insbesondere die unterschiedliche Struktur der jeweiligen Zell- und Endosomenmembran (unterschiedliches Ausmaß der Saponin-Wechselwirkung) sowie die Zellwachstumsrate zu nennen, da eine unterschiedliche ribosomale Aktivität mit einer veränderten GFP-Expression einhergeht. Nichtsdestotrotz konnte bei allen Zelllinien und Transfektionsmethoden stets eine signifikante Effizienzerhöhung (U-Test) durch SO1861-Zugabe ermittelt werden.

Die Bestimmung der zur weiteren Verwendung im Laufe der Dissertation vorgesehenen Nanoplexe erforderte eine differenzierte Entscheidungsfindung. Trotz der vielversprechenden Transfektion der HEK293-Zellen und Caco2-Zellen erlauben die in 3.3.1 und 3.3.3 offenbarten und in 4.2 beschriebenen Stabilitäts- und Komplexierungs-Defizite der liposomalen Nanoplexe (LD, PLD) keinen verlässlichen und reproduzierbaren Gentransfer. PEID-Transfektionen erzielten durchgehend bessere Ergebnisse als PD-Transfektionen. Eine weitere Verwendung Polymerbasierter Nanoplexe wäre somit die logische Wahl gewesen. Doch die simple Erweiterung der kationischen Poly-Lysin-Peptide mit einer Rezeptor gerichteten [70] Aminosäuresequenz (GACYGLPHKFCG) war schließlich der ausschlaggebende Punkt, der die weiteren Transfektions-Assays mit Peptid-basierten Nanoplexen begründete.

In Hinblick auf eine gerichtete Zelltransfektion in *in-vivo*-Tumormodellen war eine Ausstattung des DNA-Carriers mit einem geeigneten Liganden unentbehrlich. *Hart et al.* beschrieben 1997 erstmals mit RGD-Motiv ausgestattete Peptide [58], *Harbottle et al.* schließlich das K<sub>16</sub>-Polylysin-Peptid (PD) mit RGD-Motiv für eine gerichtete Integrinrezeptorbindung [59]. *Tagalakis et al.* konnten schließlich mehrere Rezeptor gerichtete Peptide, darunter das Peptid Y, charakterisieren, eine genaue Identifizierung des Rezeptors blieb hierfür jedoch aus [70]. Ein Vergleich zwischen den Transfektionen mit ungerichteten PD- und gerichteten YD-Nanoplexe bekräftigte den großen Wert einer gerichteten Transfektion für die folgenden Untersuchungen (3.6.1.2). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen unterstrichen dabei den erheblichen Unterschied hinsichtlich der GFP-Expression (3.6.2.1). Nicht nur die Überlegenheit gegenüber PD-Transfektionen, sondern auch der effizientere Gentransfer im Vergleich zum kommerziellen Transfektionsreagenz Lipofectamin® wurde demonstriert (3.6.1.2).

Nachdem die saponinbedingte Verstärkung der Transfektion sowohl an diversen Zelllinien als auch verschiedenen Transfektionsmethoden beobachtet werden konnte, sollte die universelle Anwendbarkeit der potenten Saponine SO1861 und GE1741 in weiteren Assays untersucht werden. So wurden in der Folge verschiedene Nukleinsäuren mithilfe der Poly-Lysin-Peptide (P) in Nanoplexe inkorporiert und deren Transfektionseffizienz nach SO1861- bzw. GE1741-Zugabe miteinander verglichen (3.6.1.4). Als Nukleinsäuren wurden für GFP codierende mRNA, Plasmid-DNA und MiniCircle-DNA herangezogen. Die Untersuchung der Transfektionsverstärkung durch SO1861 offenbarte ein wertvolles Erkenntnis hinsichtlich der Transfektion von mRNA (Abb. 40). Bedingt durch eine für enzymatischen Abbau angenommene verstärkte Anfälligkeit der mRNA kam es nach 48-stündiger Inkubationszeit zu einer Abnahme der Transfektionseffizienz verglichen zu einer 6-stündigen oder 24-stündigen Inkubation. Die ähnliche Effizienz nach 6 und 24 h deutete entweder auf eine konstante Effizienz oder ein Maximum zwischen beiden Zeitpunkten hin. Konfokalmikroskopische Aufnahmen bestätigten die Präsenz fluoreszierender Zellen nach 6 h (Abb. 47). Der ermittelte Anteil mit mRNA transfizierter Zellen konnte Transfektionen mit Plasmid- oder MiniCircle-DNA nicht übertreffen. Neben dem bereits erwähnten enzymatischen Abbau könnte hierbei ein weiterer Faktor eine Rolle spielen. Aufgrund einer vorgeschalteten Transkription der DNA in die jeweilige mRNA liegen bei Transfektionen mit DNA eine höhere Anzahl an mRNA-Transkripten, und daraus resultierend, eine erhöhte GFP-Expression vor. Aus dem gleichen Grund liegt somit bei Transfektionen mit mRNA bereits nach wenigen Stunden (6 h) eine hohe Transfektionsrate vor, da eine Transkription nicht erforderlich ist. Der Unterschied zwischen Transfektionen mit Plasmid-DNA und MiniCircle-DNA liegt abermals in der vermuteten Anfälligkeit gegenüber degradierender Enzyme. Die Tatsache, dass MiniCircle-DNA bakterieller Merkmale entledigt wurden, macht sie zu einer potentiell erheblich stabileren Nukleinsäure. Der Vorteil spiegelt sich dementsprechend in der Transfektionseffizienz wieder. Die beschriebenen Ergebnisse der Transfektion mit SO1861-Einfluss ließen sich mit GE1741 bestätigen (Abb. 41). Gar effektivere Transfektionen wurden beobachtet.

Der Einsatz transfektionsverstärkender Saponine wurde des Weiteren an verschiedenen kommerziellen Transfektionsmethoden getestet (3.6.1.5). Eine Effizienzsteigerung sollte die bereits angedeutete universelle Anwendbarkeit weiter untermauern. Die Transfektion von Neuro-2A-Zellen und HTC-116-Zellen zeigte diesbezüglich zwei unterschiedliche Resultate. Die Co-Applikation von GE1741 zu Neuro-2A-Zellen führte zu keiner erwarteten Steigerung der Transfektionseffizienz, die mit der alleinigen Gabe der kommerziellen Transfektionsreagenzien bereits hoch ausfiel (Tab. 23). Gar eine Transfektionsschwächung wurde beobachtet, die durch eine

vermutliche Toxizität hervorgerufen wurde (*Abb. 42*). Die Transfektion von HTC-116-Zellen offenbarte geringere Transfektionsraten, die durch eine GE1741-Zugabe jedoch erhöht werden konnten (*Abb. 43*). Auffallend war hierbei das Ausmaß der Transfektionsverstärkung. Wurde durch eine Transfektionsmethode nur ein geringer Anteil von Zellen transfiziert (Genecellin), erfuhr diese Methode mit Saponinzugabe aufgrund des Ausbleibens toxischer Effekte eine deutlichere und signifikante Transfektionsverstärkung. Mit den Ergebnissen der Neuro-2A-Transfektion kann folglich geschlossen werden: Je effektiver die Transfektionsmethode, desto geringer ist der transfektionsverstärkende Effekt der Saponine und desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von toxischen Effekten. Nichtsdestotrotz kann unter Berücksichtigung sämtlicher in diesem Kapitel beschriebener Ergebnisse von einer universellen Anwendbarkeit der Saponine als Transfektionsverstärker ausgegangen werden.

#### **4.6. Saponine als Mediator des endosomalen Release**

Die Rolle der Triterpensaponine als Mediator des endosomalen Release wurde bereits intensiv beforscht, eine hinreichende Erklärung des genauen Mechanismus konnte jedoch bis heute nicht abgegeben werden. Die Idee einer Beeinflussung des endosomalen Release löste eine Reihe von Hypothesen wie zelluläre Porenbildung [31] und induzierte Endozytose [35] als Grund für den Synergismus von Saponin und Toxin ab. Mithilfe neuerer Erkenntnisse wurde eine durch Saponine verursachte Partikelfreigabe aus den Endosomen postuliert [36,100], eine evidente Erklärung des saponin-bedingten Release blieb jedoch bisher aus.

*Weng et al.* konnte mithilfe eines Konfokalmikroskop einen visuellen Einblick in das endosomale Release von peptid-basierten Nanoplexen geben [63]. Durch diverse Farbstoffe wurde dabei der Eintritt von YD-Nanoplexen in die frühen Endosomen sowie die Präsenz in späten Endosomen und Lysosomen illustriert. Des Weiteren konnte ein SO1861-bedingtes endosomales Release via FITC-markierte YD-Nanoplexe demonstriert werden. Wie auch *Gilabert-Oriol et al.* zuvor in 2014 demonstrieren konnte, führte eine Gabe einer lytischen Saponinkonzentration zu einem Austreten des fluoreszierenden Zellinhalts [63,101]. Die konfokalmikroskopischen Untersuchungen ermöglichten eine Erweiterung der beschriebenen Entdeckungen (3.6.2.2). Wie in 4.5 bereits beschrieben, konnten durch Pm-Nanoplexe positiv transfizierte Neuro-2A-Zellen nach 6 h nachgewiesen werden (*Abb. 47*). FITC-markierte YD-Nanoplexe konnten als dichte, leuchtend grüne Komplexe identifiziert werden (*Abb. 48*) und wurden zur darauffolgenden Beschreibung des endosomalen Release herangezogen. Mit der Zugabe von SO1861 (2,5 µg/ml), 12 h nach

FITC-YD-Transfektion wurde der Saponineinfluss auf die Transfektion und die daraus resultierende Fluoreszenz untersucht (*Abb. 49*). Das Andocken der gerichteten Nanoplexe an die Zellmembran, sowie die Aufnahme in das Zellinnere und eine anschließende Fluoreszenzerhöhung inmitten des Zytosols konnte beobachtet werden. Durch das unmittelbar vorher zugegebene SO1861 kann von einem Saponin induzierten endosomalen Release ausgegangen werden. Dasselbe SO1861 führte in höheren Konzentrationen (40 µg/ml) zu einem „Auslaufen“ der fluoreszierenden Partikel.

Trotz wertvoller visueller Beobachtungen der endosomalen Partikelfreigabe, einschließlich des Einflusses der Saponine auf die selbige, konnten keine weiteren Erkenntnisse hinsichtlich des Mechanismus gewonnen werden. Eine mithilfe der Durchflusszytometrie ermöglichte quantitative Erfassung der Fluoreszenz versprach daher größere Chancen zum Verstehen der abspielenden Pathways. So erlaubte die Transfektion von Neuro-2A-Zellen mit FITC-markierten YD-Nanoplexen eine Beobachtung des Zelleintritts in Abhängigkeit mit Rücksicht auf die Parameter Zeit, Intensität, Rezeptorbindung und Saponin-Einfluss (3.6.1.6). Die Co-Applikation von SO1861 führte zu einem schnelleren Zelleintritt der FITC-YD-Partikel (*Abb. 44*). Ein schnellerer Zelleintritt erscheint logisch und begründbar, da es nach 4-stündiger Inkubation zu einem Angleichen der Fluoreszenzintensität saponin-haltiger Transfektionen mit saponin-freien Transfektionen kam. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine durch Saponin verursachte Wechselwirkung an der Zellmembran, die zu einer vorläufig vermehrten Partikel-Endozytierung führt. Auch eine saponinvermittelte Beschleunigung des Partikelverfalls in den Endosomen und ein damit verbundener Dequench-Effekt (Freisetzung zuvor gequenchter, („gelöschter“) Fluoreszenz) erscheint realistisch.

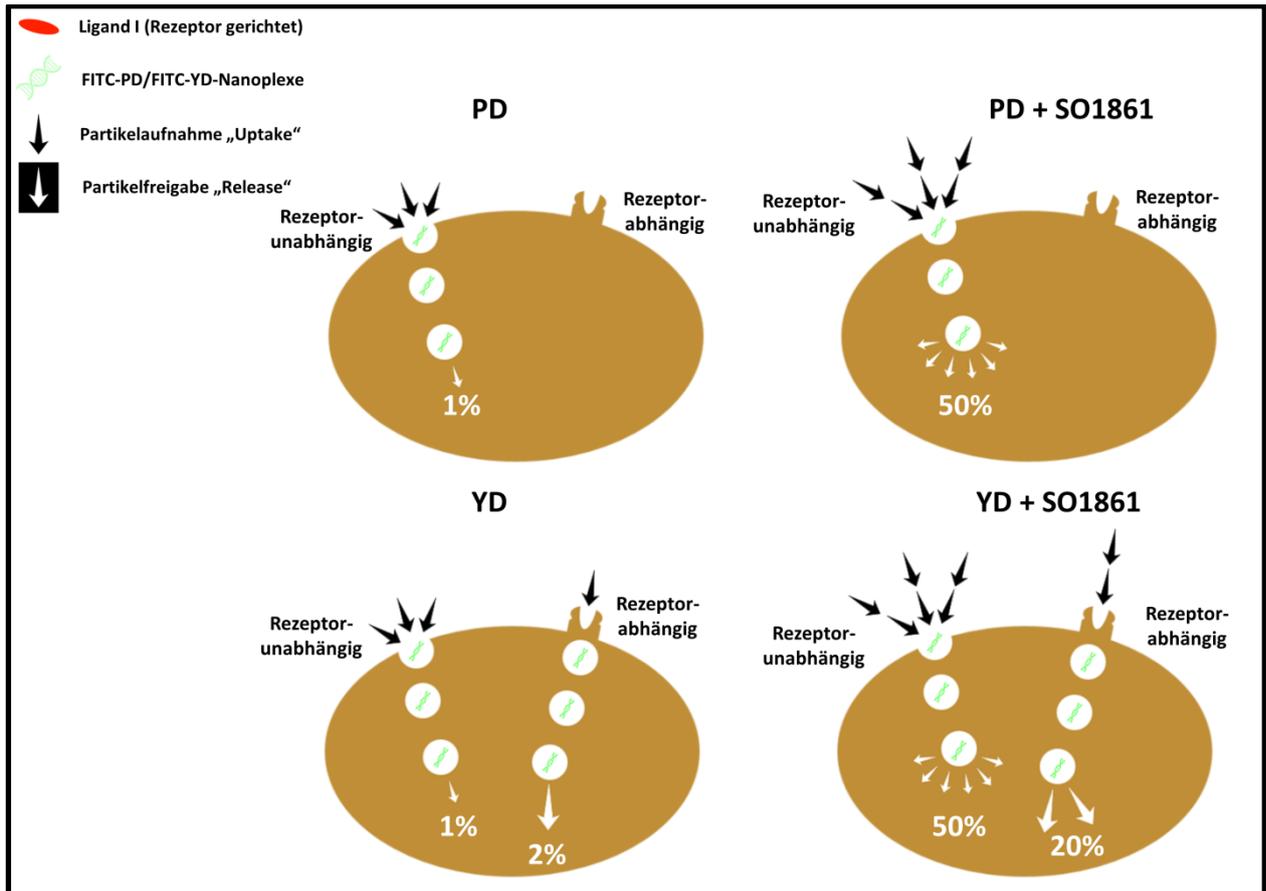
Eine Präinkubation der Neuro-2A-Zellen mit einer gerichteten Aminosäuresequenz (Ligand I) zielte auf eine Blockade der Rezeptoren auf der Zelloberfläche ab. Durch die Blockade des Rezeptors sollten – mit den sich an der Fluoreszenzintensität auswirkenden Konsequenzen – Erkenntnisse hinsichtlich der PD-Nanoplex- bzw. YD-Nanoplex-Pathways gewonnen werden (3.6.1.6). Insbesondere die beschriebenen Unterschiede der Transfektionseffizienzen nach PD- und YD-Transfektion (2.2.7.1.2, *Abb. 46*) sollten hiermit erklärt werden.

Mit der Anwesenheit der gerichteten Aminosäuresequenz (I) in 100- und 1000-fachem molaren Überschuss konnte eine Fluoreszenzabnahme bei FITC-PD und FITC-YD beobachtet werden (*Abb. 45*). Das Ergebnis steht im Kontrast mit einer anfänglichen Vermutung, dass YD- und PD-Nanoplexe grundsätzlich über je zwei verschiedene Pathways (rezeptorvermittelt und rezeptor-

unvermittelt) aufgenommen werden. Eine Blockade des Rezeptors wäre jedoch mit einem drastischen Abfall der Fluoreszenzintensität bei FITC-YD-Nanoplexe verbunden gewesen. Den Ergebnissen bedarf es daher einer komplexen Sichtweise. Bereits *Bachran et al.* beschrieb 2008 verschiedene Endozytose-Aufnahmewege für gerichtete Toxine mit und ohne Saponineinfluss [37]. Obwohl dabei grob in Clathrin-abhängige (rezeptorvermittelt) und Clathrin-unabhängige Endozytosewege (rezeptorunvermittelt) unterteilt wurde, konnten eine weitreichende Komplexität hinsichtlich der Partikelaufnahme aufgezeigt werden. Eine mengenabhängige Aufnahme konnte beispielsweise durch *Sigismund et al.* begründet werden [102]. Eine mehrheitliche Aufnahme von Liganden (EGF, epidermal growth factor) über Clathrin-unabhängige Endozytose, dagegen nur eine geringe Aufnahme über Clathrin-abhängige Endozytose wurde postuliert.

Unter Berücksichtigung der bisher geschilderten Ergebnisse sowie der aufgeführten Literatur könnte die (Saponin-vermittelte) Nanoplex-Aufnahme wie folgt ausgelegt und verbildlicht (*Abb. 72, Abb. 73*) werden:

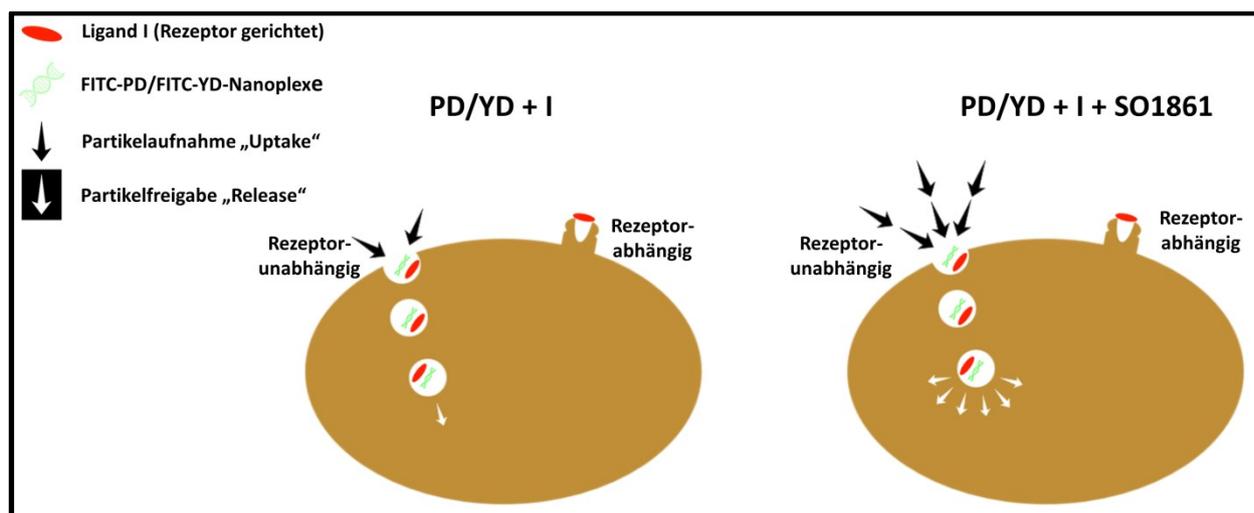
Nanoplexe können über rezeptorunvermitteltem und rezeptorvermitteltem Wege aufgenommen werden. Neben LDL, Transferrine führen auch Integrine führen zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose [103]. Aufgrund des Fehlens eines Liganden werden PD-Nanoplexe über eine Rezeptor-unabhängige Endozytose, YD-Nanoplexe dagegen auch über Rezeptor-abhängige, Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen. Der mehrheitliche Anteil an PD- und YD-Nanoplexen wird über rezeptorunvermitteltem Wege aufgenommen, der Release der Partikel in das Zytosol ist dagegen deutlich ineffektiver (Transfektionseffizienz mit PD  $\rightarrow$  1%). Die Zugabe von SO1861 führt sowohl zu einem schnelleren Eintritt der Partikel in die Endosomen, als auch zu einem vermehrten endosomalen Release (Transfektionseffizienz mit PD  $\rightarrow$  50%). Ein geringer Anteil von YD-Nanoplexen wird zugleich über rezeptorvermitteltem Wege aufgenommen. Das Release ist hierbei vielversprechender (Transfektionseffizienz mit YD  $\rightarrow$  3%) als auf rezeptorunvermitteltem Wege. Durch die Präsenz von SO1861 kommt es auch hier zu einer zusätzlichen Freigabe aus den Endosomen, wodurch die Überlegenheit der YD-Transfektionen gegenüber PD-Transfektionen erklärt werden kann (Transfektionseffizienz mit YD  $\rightarrow$  70%).



**Abb. 72 Auswirkung der Saponin-Zugabe (SO1861) auf den „Uptake“ und das „endosomale Release“ (Schema)**

Schwarzer Pfeil: Partikelaufnahme „Uptake“; Weißer Pfeil: Partikelfreigabe „Release“; Hintereinander liegende Pfeile beschreiben eine schnellere Partikelaufnahme, nebeneinanderliegende Pfeile einen stärkeren Uptake bzw. Release. Die Zugabe von SO1861 führte zu einer schnelleren Partikelaufnahme und zu einem verstärkten endosomalen Release.

Durch die Präsenz der Rezeptor gerichteten Aminosäuresequenz (I) in 100-fachem oder 1000-fachem molaren Überschuss wird die rezeptorvermittelte Endozytose blockiert. Durch die hohe Konzentration wird Ligand I (nicht fluoreszierend und damit undetektierbar) zugleich über rezeptorunvermitteltem Wege aufgenommen und führt somit durch eine Behinderung der fluoreszenzmarkierten Nanoplexe zu einer Intensitätsminderung.



**Abb. 73 Auswirkung der Ligand I und Saponin-Zugabe auf den „Uptake“ und das „endosomale Release“ (Schema)**  
 Schwarzer Pfeil: Partikelaufnahme „Uptake“; Weißer Pfeil: Partikelfreigabe „Release“; Hintereinander liegende Pfeile beschreiben eine schnellere Partikelaufnahme, nebeneinander liegende Pfeile einen stärkeren Uptake bzw. Release. Die Zugabe von SO1861 führte zu einer schnelleren Partikelaufnahme und zu einem verstärkten endosomalen Release. Die Rezeptor gerichtete Aminosäuresequenz (I) bewirkte eine Blockade der Rezeptoren sowie eine behinderte Partikelaufnahme über rezeptorunvermitteltem Wege.

Die Darstellung der Partikelaufnahme stellt eine in sich schlüssige, aber hypothetische Erklärung der beobachteten Effekte dar. Aufgrund der Komplexität der an der Zell- und Endosomen-Membran ablaufenden Vorgänge sowie des mehrheitlichen Ausbleibens statistisch signifikanter Unterschiede kann davon ausgegangen werden, dass ein detailliertes Verstehen des Geschehens bisher nicht erreicht worden ist. Prinzipiell können jedoch einige Beobachtungen bestätigt und festgehalten werden:

- Die Nanoplexaufnahme kann über mehrere Endozytose-Wege stattfinden
- Das Ausmaß des endosomalen Release ist abhängig von der Endozytoseweg
- Saponine interagieren mit den Zell- und Endosomen-Membranen und beeinflussen somit Aufnahme („Uptake“) und Freigabe („Release“) des endozytierten Inhalts

#### 4.7. Rolle in der anti-tumoralen Gen-Therapie

Das Nutzen gentechnischer Methoden zur Antikrebs-therapie wurde 2006 von *Cross und Burmester et al.* als die Zukunft der Krebs-therapie betitelt [104]. Eine entscheidende Rolle nimmt dabei die Suizidgen-Therapie ein. 2013 resümierte *Zarogoulidis et al.* gegenwärtige Strategien zu Tumorbehandlungen mithilfe von Suizid-Genen wie DNAsen, Caspasen, Genen zur Antikörperexpression und zum Gene-Silencing [105]. *Zarovni et al.* war es schließlich, der erstmalig eine

mögliche Anwendung von für RIPs codierende Genen (hier: Saporin) für eine antitumorale Therapie beschrieb [106,107]. Für einen effektiven Gentransfer wurde in dem Falle das kommerziell wirksame Lipofectamin® verwendet. Mit der hohen Transfektionseffizienz, welches das Liposomen-basierte Lipofectamin® mit sich bringt, werden in gleicher Weise zytotoxische Effekte beobachtet, die in der Vergangenheit von unter anderem *Zhong et al.* und *Bauer et al.* beschrieben wurden [108,109]. Gerade in Hinblick auf *in-vivo*-Studien ist eine (ausbleibende) toxische Wirkung auf gesunde Zellen und Gewebe ein ebenso wichtiger Faktor wie die erreichte Transfektionsrate.

Mithilfe früherer und gegenwärtiger Entdeckungen konnten Saponine bisher als universeller und effektiver (4.5) Mediator des endosomalen Release (4.6) beschrieben werden. Eine Evaluierung der toxischen Eigenschaften der Saponine, insbesondere in der Anwendung des gerichteten Gentransfers für eine potentielle Gentherapie, erschien somit als der nächste logische Schritt (3.7). Der MTT-Assay stellte eine verlässliche Methode zur Ermittlung der höchsten nicht toxischen Konzentration von Saponinen für *in-vitro*-Assays dar (3.7.1). Aus dieser konnten die Arbeitskonzentrationen von SO1861 (2,5 µg/ml) und SA1641 (5 µg/ml) auf einfachem Wege bestimmt werden (3.4.2). Für eine Bestimmung einer Transfektionseffizienz durch Gentransfer eines Suizid-Gens mit dem Outcome der Zytotoxizität konnte sich das MTT-Assay jedoch nicht empfehlen (3.7.1). Trotz einer erkennbaren Tendenz der Saponin-begründeten Toxizitätserhöhung wurde die Interpretation der Ergebnisse durch mehrere Faktoren erschwert. Mögliche Zellüberpopulation und Zellverluste (verbunden mit der Ausführung des Assays, z.B. häufiges Abpipettieren) können in erster Linie angeführt werden, sowie eine Nichtunterscheidbarkeit zwischen Reagenz-begründeter oder Suizidgen-begründeter Toxizität.

Die Ausführung einer Echtzeit-Analyse durch Impedanzmessung erwies sich infolgedessen als eine Alternative, die die beschriebenen Probleme nicht aufwies (3.7.2). An Stelle einer Endpunktmessung (MTT) konnte von der Initiierung bis zur Terminierung des Experiments eine Aussage über die Viabilität der Zellen getroffen werden. Ein einmaliges Eingreifen in das Messsystem (zur Reagenzzugabe) sowie die Normalisierung des ermittelten Zellindex auf den Zeitpunkt der Reagenzzugabe ermöglichte zudem eine weitere Reduktion bzw. Ausblendung von irrelevanten Störfaktoren. Die Untersuchung der toxischen Effekte hochpotenter Saponine wie SO1861 und GE1741 bildete insofern die Grundlage für die kommenden zytotoxischen Untersuchungen, als dass die Unterscheidung von Saponin-bedingter und Transfektions-bedingter Toxizität erleichtert wurde. Mit der Applikation mehrerer Saponinkonzentrationen mittels Impe-

danzmessung konnten somit nicht nur die ersten toxischen, sondern auch membranpermeabilisierenden bzw. lysierenden Eigenschaften der Saponine beobachtet werden (3.7.2.1). Dass sich jene Eigenschaften stets auf eine unterschiedliche Art und Weise bemerkbar machen können, wurde anhand der getesteten SO1861 und GE1741 verdeutlicht (Abb. 51, Abb. 52). Die Echtzeit-Analyse der Zellen nach Transfektion von GFP-DNA ermöglichte weiterhin eine Bestimmung einer Reagenz- bzw. Transfektions-bedingten Toxizität (3.7.2.2). Konnte nach Transfektion mit GFP-DNA keine Toxizität beobachtet werden, so könnte im nächsten Schritt (Transfektion mit einem Suizidgen wie Saporin) von einer einzig Suizidgen-bedingten Toxizität ausgegangen werden. Der Einsatz der Saponin- sowie Vektor-/Transfektions-Kontrolle war für eine Aussage bezüglich der Toxizitätsform (Saponin, Transfektion oder Suizidgen) entsprechend von essentieller Bedeutung. Abgesehen von der Rolle als Kontrolle für Transfektionen von Suizidgenen konnten mithilfe der Transfektion von GFP-DNA weitere grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden. So bestätigte die Toxizitätsbestimmung verschiedener Transfektionsmethoden  $\pm$  SO1861 in Verbindung mit den in 3.6.1.1 und 3.6.1.2 ermittelten Transfektionseffizienzen einen nicht toxischen Gentransfer (3.7.2.3). Weiterhin konnte ein essentieller Vorteil Saponin-basierter Transfektionen gegenüber Lipofectamin®-Transfektionen ausgemacht werden. Nicht nur die zuvor beschriebenen toxischen Effekte des Lipofectamin® wurden bestätigt, gleichermaßen wurde durch eine im Anschluss der Echtzeit-Analyse durchgeführte Effizienzbestimmung eine erhebliche Wirkungsminderung des Lipofectamin® aufgezeigt (Abb. 54). Jene Effizienzschwächung stand einer konstanten Effizienz von PD-Transfektionen gegenüber. Als Grund konnte der Einsatz des serumhaltigen Kulturmediums ausgemacht werden. Eine behinderte Partikelformation sowie Zellpenetration kann durch die Präsenz von Serumproteinen (u.a. Albumin) beeinflusst und damit gestört werden, eine reduzierte Transfektionseffizienz wäre dabei eine potentielle Folge. Transfektionen, in den Fluoreszenz-Assays (2.2.7) noch in serum-freiem OptiMEM-Medium realisiert, wurden in Hinsicht auf minimalem Eingriff in die Reaktionsbedingungen in serum-haltigem Kulturmedium ausgeführt. Von einer serum-unabhängigen Transfektionsverstärkung durch Saponine wie SO1861 kann folglich ausgegangen werden.

Die Transfektion von DNA, codierend für Ribosomen-inaktivierende-Proteine, diente schließlich als entscheidender *in-vitro*-Test für eine Eignung zielgerichteter Suizidgentransfers mithilfe von hochpotenten Saponinen wie SO1861 und GE1741 (3.7.2.3). Die zuvor beschriebenen Kontrollen (Saponin- und Transfektions-Kontrolle) wurden dabei für beide Saponine mitgeführt und bestätigten eine durch Suizidgen verursachte Zelltoxizität. Gleichzeitig können durch systematische Vergleiche der einzelnen Echtzeit-Analysen zusätzliche Aussagen über jene Faktoren ge-

macht werden, die einen substanziellen Einfluss auf die Zellviabilität haben. Grundsätzlich konnte ein konzentrationsabhängiger Einfluss der eingesetzten Komponenten auf die Toxizität ausgemacht werden. Unterschiedliche Saponinkonzentrationen (*Abb. 58, Abb. 60, Abb. 61*), Suizidgene (*Abb. 61*), Nanoplexe (*Abb. 59*) sowie Suizidgenkonzentrationen (*Abb. 56*) wiesen unterschiedlich starke toxische Effekte auf. Nichtsdestotrotz konnte hinsichtlich der eingesetzten Suizidgen-Konzentration eine Auffälligkeit beobachtet werden. Während bei 2,5 µg und 5 µg eingesetzter Saporin-DNA deutliche Unterschiede hinsichtlich der Toxizität beobachtet werden konnten (*Abb. 56*), wurde hingegen zwischen 2,5 µg und 1 µg kein entscheidender Unterschied verzeichnet (*Abb. 57*). In wichtige Rolle hierbei spielt möglicherweise das RIP. Bereits von anderen transfizierten Zellen exprimiert, könnte auch das Protein nach Zelltod-bedingtem Zellaustritt in geringen Konzentrationen wieder über das endosomale Release zu einer Toxizitätsentwicklung beitragen. Gerade im Hinblick auf einen Einsatz der Transfektion im rasant wachsenden Tumorgewebe würde dieser Effekt einen wichtigen Faktor zur Tumorthherapie darstellen. Eine Bestimmung der Saporin-Konzentration nach Terminierung des Experiments durch Protein-Quantifizierungsmethoden wie Western Blot könnte die Theorie bestätigen oder widerlegen.

Anhand der in Echtzeit-Analyse ermittelten Erkenntnisse konnte in der Folge erstmals eine *in-vivo*-Gentherapie unter Beteiligung von Saponinen initiiert werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich SO1861 hinsichtlich der Lösungseigenschaften als erheblich praktikabler herausstellte sowie bereits Erfahrungen in Tierversuchen vorhanden waren, wurde es dem grundsätzlich effektiveren GE1741 vorgezogen. Im Vergleich zu den vorherigen Studien mit SO1861, in denen SO1861-enthaltende Saponinmischungen eingesetzt wurden, kam hier erstmals eine hoch aufgereinigte und reine SO1861-Lösung zum Einsatz. Der Umstand eines gleichen pflanzlichen Ursprungs ließ zudem die Wahl auf Saporin als zu transfizierendes Gen fallen. Die Transfektion von Neuro-2A-Zellen mit Saporin-DNA, inkorporiert in YD-Nanoplexen wurde in 3.7.2.3 bereits *in-vitro* getestet und auf die resultierende Toxizität beobachtet (*Abb. 58*).

Die Wahl einer Neuroblastoma-Therapie für die *in-vivo*-Studie war gründlich durchdacht. Die schlechten Prognosen der Hochrisikogruppen von bis zu 40% [110,111] aufgrund einer aggressiven Wachstumsrate sowie die vielversprechenden Ergebnisse in Bezug auf Effizienz (*Abb. 32, Abb. 36*) und Suizidgen-begründeter Toxizität (3.7.2.3) ließen die Therapie mithilfe von Neuro-2A-Zellen als sinnvoll erscheinen. Studien von *Thakur et al.* und *Svensson et al.* wurden zwecks Etablierung eines Therapieablaufs herangezogen [40,86]. Die für die *in-vivo*-Studie akquirierten

Mäuse wurden zu Beginn auf akute und kombinatorische Toxizität getestet (3.8.2). Der im Behandlungszeitraum beobachtete Anstieg des Körpergewichts sowie visuelle Unauffälligkeiten ließen eine gute Verträglichkeit der formulierten Nanoplexe (bis zu 55 µg) vermuten. Gleichmaßen wies die in Kombination mit SO1861 (30 µg) eingesetzte Nanoplex-Menge (30 µg) keine sichtbaren toxischen Effekte auf. Hierdurch waren die grundlegenden Voraussetzungen für die eigentliche Tumorthherapie gegeben. Nach der Beimpfung der Versuchstiere mit den Neuro-2A-Zellen konnte der Effekt der applizierten Nanoplexe analysiert werden (3.8.3). Das im Verlauf der Therapie ermittelte Körpergewicht zeigte eine gute Verträglichkeit (Abb. 66). Erst eine ausreichende Wachstumszeit von 11 Tagen war letztendlich ausreichend, um die Therapieeffekte erkennbar werden zu lassen. Durch die Erfassung der Tumorgröße und die Darstellung über einen Box-Whisker-Plot konnte nicht nur eine sichtliche Abnahme der Tumorgröße von Placebo'- zu YD'-Gruppe, sondern auch ein statistisch signifikanter Unterschied von Placebo' zu YD+S'-Gruppe demonstriert werden (Abb. 67). Der antitumorale Effekt der YD'-Gruppe erwies sich als erheblich effektiver als vermutet wurde, zeigten sich die durch *in-vitro*-Tests offenbarten Effekte (Abb. 36, Abb. 58, Abb. 59) doch wesentlich schwächer. Dieser Umstand verdeutlicht die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Ergebnissen. Als eine mögliche Begründung für die Erscheinung könnte eine merklich stärker zum Vorschein kommende gerichtete Transfektion der betroffenen Zellen mithilfe einer zusätzlich Rezeptor gerichteten Aminosäuresequenz angeführt werden. Des Weiteren offenbarten alle Therapiegruppen einen hohen oberen Whisker, welcher auf Werte deutlich oberhalb der Box (= 50% aller Messwerte) hindeutete. Ein Nichtansprechen der Versuchstiere auf die therapeutischen Maßnahmen ist dabei zu erfragen und durch nicht bekannte, komplexe Gründe zu erklären. Individuell ausbleibende Behandlungserfolge wurden auch während der Luciferase-Intensitäts-Bestimmung detektiert (Abb. 68, Abb. 69). Eine genauere Betrachtung der Intensitätsanstiege zwischen Tag 4 und 11 ließen jedoch gewichtige Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen erkennen (Abb. 68). Der Anstieg der Tumorintensität innerhalb der Placebogruppe zeigte sich als erheblich aggressiver als jener Anstieg der YD'- und YD+S'-Gruppe. Mit der gerichteten und durch Saponin unterstützen YD-Transfektion konnte somit eine Wachstumsdämpfung bei einigen Versuchstieren sowie ein Ausbleiben ausbrechender Tumore bei anderen Versuchstieren erreicht werden. Eine abschließende Bewertung der YD'- und YD+S'-Therapie konnte mithilfe des T/C-Wertes abgegeben werden (Tab. 24). Der mit 69% und 50% ermittelte T/C-Wert der YD'- bzw. YD+S'-Gruppe spiegelt damit die Ergebnisse des Tumorwachstums und der Luciferase-Intensität wieder. Eine durch Saponin verbesserte Transfektionsverstärkung

von 19% wurde damit bewiesen. Unter Berücksichtigung der systemischen Gabe der Transfektionsreagenzien zusammen mit der subkutanen Injektion des SO1861 und damit ungleich bisheriger *in-vivo*-Studien mit intratumoraler Applikation [40,41], kann das Ergebnis als ein bedeutender Meilenstein in Hinsicht auf eine antitumorale Suizidgen-Therapie angesehen werden. Durch gezielte Optimierungsschritte können zudem eine weitere Tumorreduktion erreicht werden. Der Einsatz potenterer Saponine wie GE1741, potenterer Suizidgene wie Dianthin oder zellspezifischerer Transfektionsmethoden wären in der Zukunft zu realisierende Ansatzpunkte. Des Weiteren diene eine mögliche Nanoplex-Saponin-Kopplung nicht nur einer praktikableren Applikation (*one-dose*), sondern stelle zudem einen gemeinsamen Zelleintritt in die Endosomen und damit verbunden ein effizienteres endosomales Release sicher.

## 5. Zusammenfassung

Die Fähigkeit bestimmter Triterpensaponine als Mediator des endosomalen Release zu agieren, wurde in der Vergangenheit intensiv beforscht. Durch Interaktion mit der Endosomenmembran sind diese Sekundärstoffe aus u.a. *Saponaria*- oder *Gypsophila*-Arten in der Lage, den endosomalen Inhalt vor dem lysosomalen Abbau aus den späten Endosomen oder Lysosomen zu befreien. Ein besonderes Interesse galt dabei dem Einsatz von Ribosomen-inaktivierenden Proteinen, die durch enzymatische Abspaltung eines Adenins aus der 28S-Untereinheit der Ribosomen den apoptotischen Zelltod induzieren. Ein Synergismus zwischen den Triterpensaponinen und RIPs verzeichnete in zahlreichen Experimenten eine vervielfachte Zytotoxizität, die gar in vielen *in-vivo*-Studien erfolgreich getestet wurde. Aus der weniger spezifischen Freigabe aus den Endosomen resultierend, war es lediglich eine logische Konsequenz, die Fähigkeit der Triterpensaponine an weiteren Gebieten zu testen. So wurde es in dieser Arbeit zur Aufgabe, die Möglichkeiten eines durch Saponine verstärkten Gentransfers (Transfektion) zu testen.

Für diesen Zweck wurden zunächst eine Reihe verschiedener Nanocarrier formuliert und durch ihre Größe, Zetapotential, Uniformität, Stabilität sowie DNA-Komplexierungseffizienz hinsichtlich ihrer Eignung als stabile Nanoplexe analysiert. Nach der Etablierung einer robusten Transfektionsmethode mit peptidbasierten Nanoplexen konnte eine Vielzahl verschiedener Saponine auf ihre transfektionsverstärkenden Eigenschaften getestet werden. Darunter gehörten unter anderem das aus *Saponaria officinalis* L. isolierte SO1861 und aus *Gypsophila elegans* M.Bieb. isolierte GE1741. Mithilfe der Screenings konnte zudem eine weitere Aufschlüsselung der bisher

beschriebenen Struktur-Wirkungs-Beziehung bezüglich des endosomalen Release erreicht werden. Mit der Identifizierung der hochpotenten Saponine SO1861 und GE1741 wurden nicht nur die Transfektionseffizienz, sondern gleichermaßen die universellen Anwendungsmöglichkeiten untersucht. Dabei wurde ein flexibler Einsatz der Saponine hinsichtlich verschiedener Zelllinien, verschiedener Transfektionsmethoden oder gar verschiedener Nukleinsäuren demonstriert. Die Tatsache eines bisher nicht aufgeklärten Mechanismus des modulierten endosomalen Release war ferner Gegenstand dieser Arbeit. Anhand diverser mikroskopischen oder fluoreszenzbasierter Methoden konnten wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich der intrazellulären Aufnahme sowie Freigabe gewonnen werden.

Mit der Transfektion eines RIP-Gens wurde eine neue Methode der nicht viralen Tumorentherapie demonstriert, sowie die Möglichkeit einer konkreten therapeutischen Anwendung erstmalig ergründet. Initiale *in-vitro*-Tests bestätigten hierbei einen nicht toxischen Reporter-Gentransfer sowie einen effektiven und hochtoxischen Suizid-Gentransfer. An NMRI nu/nu-Mäusen mit beimpftem Neuroblastoma wurde schließlich zum ersten Mal durch eine saponinvermittelte *in-vivo*-Gentherapie eine Wirksamkeit demonstriert, nachdem durch eine kombinierte Gabe von SO1861 und gerichteten YD-Nanocarriern (Suizidgen) eine 50%ige Tumorstillung beobachtet worden war.

In dieser Arbeit konnte somit erstmals das große Potential spezifischer Triterpensaponine als potente Transfektionsverstärker beschrieben werden. Trotz der umfassenden Untersuchungen und der damit verbundenen Erstellung einer fundierten Wissensgrundlage ist eine weitere Erforschung der beschriebenen Anwendung jedoch dringend notwendig. Eine weitere Entschlüsselung der genauen mechanistischen Vorgänge sowie präzise Optimierungsschritte sind von ungemeiner Wichtigkeit, um einen hohen Wert für die zukünftige Gen- und Krebstherapie zu manifestieren.

## 6. Summary

The ability of specific triterpenoid saponins to act as a novel mediator of the endosomal release was investigated thoroughly in the past. By interacting with the endosomal membrane, these secondary plant metabolites from *Saponaria*- or *Gypsophila*-specimen are able to release the endosomal or lysosomal content before being degraded by lysosomal enzymes. Special attention hereby was paid to the use of ribosome-inactivating proteins, which can induce the apoptotic cell death by cleaving an adenine out of the 28S-Subunit of the ribosomes. A synergy between triterpenoid saponins and RIPs achieved an amplified cell toxicity in several studies, which was even tested successfully in many *in-vivo*-studies. Resulting out of a less specific release from the endosomes, a logic consequence was to test the ability of the triterpenoid saponins in other scientific fields. Therefore, the quest of this work happened to be the investigation of the saponin mediated enhanced gene delivery (transfection). For this purpose, a number of different nanocarriers were formulated and analyzed for their suitability as stable nanoplexes in terms of size, zeta potential, uniformity, stability and DNA-complexation efficiency. After the establishment of a robust transfection method with peptide-based nanoplexes, a number of different saponins could be tested on their transfection enhancing properties, among them SO1861, isolated from *Saponaria officinalis* L., and GE1741, isolated from *Gypsophila elegans* M.Bieb. In addition, a further breakdown of the structure-activity relationship regarding the endosomal release could be achieved. After the identification of the highly active saponins SO1861 and GE1741, not only the transfection efficiency, but also the universal applicability was investigated. A flexible assignment could be demonstrated in different cell lines, transfection methods as well as with different nucleic acids. The fact of a not elucidated mechanism of the modulated endosomal escape was a further topic of this work. By applying microscopic and fluorescence-based methods, valuable insights regarding the intracellular uptake and release could be gathered. With the transfection of a RIP-gene the opportunity of a concrete therapeutic application was investigated. Initial *in-vitro*-tests confirmed a non-toxic reporter gene delivery as well as an effective and highly toxic suicide gene delivery. On neuroblastoma bearing NMRI nu/nu mice, finally an *in-vivo*-efficacy was demonstrated, after the combined application of SO1861 and targeted YD-nanocarrier (suicide gene) led to a 50% decrease of tumor growth.

In this work, for the first time the big potential of specific triterpenoid saponins as potent transfection enhancer could be described. Despite detailed investigations and connected with that, an

establishment of a sound basis, a further breakdown of the mechanistic actions and precise optimizations are highly necessary in order to manifest a big value of saponins in future gene and cancer therapies.

## Quellen

1. Hänsel, R. *Pharmakognosie - Phytotherapie*. 2009.
2. Tyler, V.E.; Brady, L.R.; Robbers, J.E. *Pharmacognosy*. 8. ed.; Lea & Febiger: Philadelphia, 1981; p X, 520 S.
3. Osbourn, A.; Goss, R.J.; Field, R.A. The saponins: Polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat Prod Rep* **2011**, *28*, 1261-1268.
4. Haralampidis, K.; Trojanowska, M.; Osbourn, A.E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2002**, *75*, 31-49.
5. Vincken, J.P.; Heng, L.; de Groot, A.; Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 275-297.
6. Bruneton, J.N. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Lavoisier Publishing: Paris, 1995.
7. Sparg, S.G.; Light, M.E.; van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol* **2004**, *94*, 219-243.
8. Schmidt, S.; Heimesaat, M.M.; Fischer, A.; Bereswill, S.; Melzig, M.F. Saponins increase susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to antibiotic compounds. *European journal of microbiology & immunology* **2014**, *4*, 204-212.
9. Zhang, J.; Sun, Y.; Wang, Y.; Lu, M.; He, J.; Liu, J.; Chen, Q.; Zhang, X.; Zhou, F.; Wang, G., *et al.* Non-antibiotic agent ginsenoside 20(s)-rh2 enhanced the antibacterial effects of ciprofloxacin in vitro and in vivo as a potential nora inhibitor. *Eur J Pharmacol.* **2014**, *740*, 277-284.
10. Tam, K.I.; Roner, M.R. Characterization of in vivo anti-rotavirus activities of saponin extracts from quillaja saponaria molina. *Antiviral Res.* **2011**, *90*, 231-241.
11. Zhao, Y.-L. Anti-hepatitis b virus activities of triterpenoid saponin compound from potentilla anserine l. *Phytomedicine* **2008**, *15(4)*, 253-258.
12. Luckemeyer, D.D.; Muller, V.D.; Moritz, M.I.; Stoco, P.H.; Schenkel, E.P.; Barardi, C.R.; Reginatto, F.H.; Simoes, C.M. Effects of ilex paraguariensis a. St. Hil. (yerba mate) on herpes simplex virus types 1 and 2 replication. *Phytother Res : PTR* **2012**, *26*, 535-540.
13. Bhardwaj, J.; Chaudhary, N.; Seo, H.J.; Kim, M.Y.; Shin, T.S.; Kim, J.D. Immunomodulatory effect of tea saponin in immune t-cells and t-lymphoma cells via regulation of th1, th2 immune response and mapk/erk2 signaling pathway. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **2014**, *36*, 202-210.
14. Lin, X.; Yin, L.; Gao, R.; Liu, Q.; Xu, W.; Jiang, X.; Chong, B.H. The effects of panaxadiol saponins on megakaryocytic maturation and immune function in a mouse model of immune thrombocytopenia. *Exp Hematol* **2015**, *43*, 364-373.
15. Schrot, J.; Weng, A.; Melzig, M.F. Ribosome-inactivating and related proteins. *Toxins (Basel)* **2015**, *7*, 1556-1615.
16. Olarte-Sanchez, C.M.; Valencia Torres, L.; Body, S.; Cassaday, H.J.; Bradshaw, C.M.; Szabadi, E. Effect of orexin-b-saporin-induced lesions of the lateral hypothalamus on performance on a progressive ratio schedule. *J Psychopharmacol* **2012**, *26*, 871-886.
17. Weng, A. Untersuchungen zur wirkung von saponinen als verstärker der penetration von proteinen im zellmodell. Berlin, Freie Univ., Diss., 2009, 2009.

18. Dingermann, T.; Schneider, G. *Arzneidrogen*. 5. Aufl. 2004, Nachdr. ed.; Spektrum: Heidelberg, Neckar, 2011; p XV, 627 S.
19. Runeckles, V.C.; Briggs, W.R. *Structural and functional aspects of phytochemistry*. Acad. Press: New York u.a., 1972; p XII, 350 S.
20. Yoshinari, S.; Koresawa, S.; Yokota, S.; Sawamoto, H.; Tamura, M.; Endo, Y. Gypsophilin, a new type 1 ribosome-inactivating protein from gypsophila elegans: Purification, enzymatic characterization, and subcellular localization. *Biosci Biotechnol Biochem* **1997**, *61*, 324-331.
21. Huang, Q.F.; Zhang, S.J.; Zheng, L.; Liao, M.; He, M.; Huang, R.; Zhuo, L.; Lin, X. Protective effect of isoorientin-2''-o-alpha-l-arabinopyranosyl isolated from gypsophila elegans on alcohol induced hepatic fibrosis in rats. *Food Chem Toxicol* **2012**, *50*, 1992-2001.
22. Lin, X.; Wei, J.; Chen, Y.; He, P.; Lin, J.; Tan, S.; Nie, J.; Lu, S.; He, M.; Lu, Z., *et al.* Isoorientin from gypsophila elegans induces apoptosis in liver cancer cells via mitochondrial-mediated pathway. *J Ethnopharmacol* **2016**, *187*, 187-194.
23. Rao, A.V.; Sung, M.K. Saponins as anticarcinogens. *J Nutr* **1995**, *125*, 717s-724s.
24. Shibata, S. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *J Korean Med Sci* **2001**, *16 Suppl*, S28-37.
25. Yun, T.K. Experimental and epidemiological evidence on non-organ specific cancer preventive effect of korean ginseng and identification of active compounds. *Mutat Res* **2003**, *523-524*, 63-74.
26. Liu, W.K.; Xu, S.X.; Che, C.T. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci* **2000**, *67*, 1297-1306.
27. Rooney, S.; Ryan, M.F. Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of nigella sativa, on human cancer cell lines. *Anticancer Res* **2005**, *25*, 2199-2204.
28. Cheng, L.; Xia, T.S.; Wang, Y.F.; Zhou, W.; Liang, X.Q.; Xue, J.Q.; Shi, L.; Wang, Y.; Ding, Q.; Wang, M. The anticancer effect and mechanism of alpha-hederin on breast cancer cells. *Int J Oncol* **2014**, *45*, 757-763.
29. Gaidi, G.; Correia, M.; Chauffert, B.; Beltramo, J.L.; Wagner, H.; Lacaille-Dubois, M.A. Saponins-mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxicity in human colon cancer cells. *Planta Med* **2002**, *68*, 70-72.
30. Jia, W.W.; Bu, X.; Philips, D.; Yan, H.; Liu, G.; Chen, X.; Bush, J.A.; Li, G. Rh2, a compound extracted from ginseng, hypersensitizes multidrug-resistant tumor cells to chemotherapy. *Can J Physiol Pharmacol* **2004**, *82*, 431-437.
31. Hebestreit, P.; Melzig, M.F. Cytotoxic activity of the seeds from agrostemma githago var. Githago. *Planta Med* **2003**, *69*, 921-925.
32. Melzig, M.F.; Hebestreit, P.; Gaidi, G.; Lacaille-Dubois, M.A. Structure-activity-relationship of saponins to enhance toxic effects of agrostin. *Planta Med* **2005**, *71*, 1088-1090.
33. Hebestreit, P.; Weng, A.; Bachran, C.; Fuchs, H.; Melzig, M.F. Enhancement of cytotoxicity of lectins by saponinum album. *Toxicon* **2006**, *47*, 330-335.
34. Weng, A.; Melzig, M.F.; Bachran, C.; Fuchs, H. Enhancement of saporin toxicity against u937 cells by gypsophila saponins. *J Immunotoxicol* **2008**, *5*, 287-292.
35. Weng, A.; Bachran, C.; Fuchs, H.; Melzig, M.F. Soapwort saponins trigger clathrin-mediated endocytosis of saporin, a type i ribosome-inactivating protein. *Chem Biol Interact* **2008**, *176*, 204-211.

36. Weng, A.; Thakur, M.; von Mallinckrodt, B.; Beceren-Braun, F.; Gilabert-Oriol, R.; Wiesner, B.; Eichhorst, J.; Bottger, S.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. Saponins modulate the intracellular trafficking of protein toxins. *J Control Release* **2012**, *164*, 74-86.
37. Bachran, D.; Schneider, S.; Bachran, C.; Weng, A.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. The endocytic uptake pathways of targeted toxins are influenced by synergistically acting gypsophila saponins. *Mol Pharm* **2011**, *8*, 2262-2272.
38. Gilabert-Oriol, R.; Mergel, K.; Thakur, M.; von Mallinckrodt, B.; Melzig, M.F.; Fuchs, H.; Weng, A. Real-time analysis of membrane permeabilizing effects of oleanane saponins. *Bioorg Med Chem* **2013**, *21*, 2387-2395.
39. Bachran, C.; Durkop, H.; Sutherland, M.; Bachran, D.; Muller, C.; Weng, A.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. Inhibition of tumor growth by targeted toxins in mice is dramatically improved by saponinum album in a synergistic way. *J Immunother* **2009**, *32*, 713-725.
40. Thakur, M.; Mergel, K.; Weng, A.; von Mallinckrodt, B.; Gilabert-Oriol, R.; Durkop, H.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. Targeted tumor therapy by epidermal growth factor appended toxin and purified saponin: An evaluation of toxicity and therapeutic potential in syngeneic tumor bearing mice. *Mol Oncol* **2013**, *7*, 475-483.
41. von Mallinckrodt, B.; Thakur, M.; Weng, A.; Gilabert-Oriol, R.; Durkop, H.; Brenner, W.; Lukas, M.; Beindorff, N.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. Dianthin-egf is an effective tumor targeted toxin in combination with saponins in a xenograft model for colon carcinoma. *Future Oncol* **2014**, *10*, 2161-2175.
42. Bachran, C.; Sutherland, M.; Heisler, I.; Hebestreit, P.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure. *Exp Biol Med (Maywood)* **2006**, *231*, 412-420.
43. Bottger, S.; Westhof, E.; Siems, K.; Melzig, M.F. Structure-activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type i (rip-i). *Toxicol* **2013**, *73*, 144-150.
44. Fuchs, H.; Niesler, N.; Trautner, A.; Sama, S.; Jerz, G.; Panjideh, H.; Weng, A. Glycosylated triterpenoids as endosomal escape enhancers in targeted tumor therapies. *Biomedicines* **2017**, *5*.
45. Kim, T.K.; Eberwine, J.H. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *397*, 3173-3178.
46. Weaver, J.C. Electroporation: A general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J Cell Biochem* **1993**, *51*, 426-435.
47. Felgner, P.L.; Gadek, T.R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M.; Danielsen, M. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 7413-7417.
48. Wu, G.Y.; Wu, C.H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* **1987**, *262*, 4429-4432.
49. Hart, S.L.; Arancibia-Carcamo, C.V.; Wolfert, M.A.; Mailhos, C.; O'Reilly, N.J.; Ali, R.R.; Coutelle, C.; George, A.J.; Harbottle, R.P.; Knight, A.M., *et al.* Lipid-mediated enhancement of transfection by a nonviral integrin-targeting vector. *Hum Gene Ther* **1998**, *9*, 575-585.
50. Munye, M.M.; Ravi, J.; Tagalakis, A.D.; McCarthy, D.; Ryadnov, M.G.; Hart, S.L. Role of liposome and peptide in the synergistic enhancement of transfection with a lipopolyplex vector. *Sci Rep* **2015**, *5*, 9292.

51. Du, Z.; Munye, M.M.; Tagalakis, A.D.; Manunta, M.D.; Hart, S.L. The role of the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplex formulations. *Sci Rep* **2014**, *4*, 7107.
52. Farhood, H.; Serbina, N.; Huang, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* **1995**, *1235*, 289-295.
53. Grosse, S.M.; Tagalakis, A.D.; Mustapa, M.F.; Elbs, M.; Meng, Q.H.; Mohammadi, A.; Tabor, A.B.; Hailes, H.C.; Hart, S.L. Tumor-specific gene transfer with receptor-mediated nanocomplexes modified by polyethylene glycol shielding and endosomally cleavable lipid and peptide linkers. *FASEB J* **2010**, *24*, 2301-2313.
54. Han, H.D.; Byeon, Y.; Jeon, H.N.; Shin, B.C. Enhanced localization of anticancer drug in tumor tissue using polyethylenimine-conjugated cationic liposomes. *Nanoscale Res Lett* **2014**, *9*, 209.
55. Sun, C.C.; Qu, X.J.; Gao, Z.H. Integrins: Players in cancer progression and targets in cancer therapy. *Anticancer Drugs* **2014**, *25*, 1107-1121.
56. Bianconi, D.; Unseld, M.; Prager, G.W. Integrins in the spotlight of cancer. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*.
57. D'Souza, S.E.; Ginsberg, M.H.; Plow, E.F. Arginyl-glycyl-aspartic acid (rgd): A cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci* **1991**, *16*, 246-250.
58. Hart, S.L.; Collins, L.; Gustafsson, K.; Fabre, J.W. Integrin-mediated transfection with peptides containing arginine-glycine-aspartic acid domains. *Gene Ther* **1997**, *4*, 1225-1230.
59. Harbottle, R.P.; Cooper, R.G.; Hart, S.L.; Ladhoff, A.; McKay, T.; Knight, A.M.; Wagner, E.; Miller, A.D.; Coutelle, C. An rgd-oligolysine peptide: A prototype construct for integrin-mediated gene delivery. *Hum Gene Ther* **1998**, *9*, 1037-1047.
60. HART, L.S. Integrin-zielvektoren mit transfektionaktivität. Google Patents: 2006.
61. Davis, M.E. The first targeted delivery of sirna in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: From concept to clinic. *Mol Pharm* **2009**, *6*, 659-668.
62. Zuckerman, J.E.; Gritli, I.; Tolcher, A.; Heidel, J.D.; Lim, D.; Morgan, R.; Chmielowski, B.; Ribas, A.; Davis, M.E.; Yen, Y. Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with calaa-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing sirna. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 11449-11454.
63. Weng, A.; Manunta, M.D.; Thakur, M.; Gilibert-Oriol, R.; Tagalakis, A.D.; Eddaoudi, A.; Munye, M.M.; Vink, C.A.; Wiesner, B.; Eichhorst, J., *et al.* Improved intracellular delivery of peptide- and lipid-nanoplexes by natural glycosides. *J Control Release* **2015**, *206*, 75-90.
64. Lorenzetti, I.; Meneguzzi, A.; Fracasso, G.; Potrich, C.; Costantini, L.; Chiesa, E.; Legname, G.; Menestrina, G.; Tridente, G.; Colombatti, M. Genetic grafting of membrane-acting peptides to the cytotoxin dianthin augments its ability to de-stabilize lipid bilayers and enhances its cytotoxic potential as the component of transferrin-toxin conjugates. *Int J Cancer* **2000**, *86*, 582-589.
65. Fabbrini, M.S.; Rappocciolo, E.; Carpani, D.; Solinas, M.; Valsasina, B.; Breme, U.; Cavallaro, U.; Nykjaer, A.; Rovida, E.; Legname, G., *et al.* Characterization of a saporin isoform with lower ribosome-inhibiting activity. *Biochem J* **1997**, *322 ( Pt 3)*, 719-727.
66. Lu, Y.; Van, D.; Deibert, L.; Bishop, G.; Balsevich, J. Antiproliferative quillaic acid and gypsogenin saponins from *saponaria officinalis* L. Roots. *Phytochemistry* **2015**, *113*, 108-120.
67. Jia, Z.; Koike, K.; Nikaido, T. Major triterpenoid saponins from *saponaria officinalis*. *J Nat Prod* **1998**, *61*, 1368-1373.

68. Sama, S.; Jerz, G.; Schmieder, P.; Woith, E.; Melzig, M.F.; Weng, A. Sapofectosid - ensuring non-toxic and effective DNA and rna delivery. *Int J Pharm* **2017**, *534*, 195-205.
69. Weng, A.; Jenett-Siems, K.; Schmieder, P.; Bachran, D.; Bachran, C.; Gorick, C.; Thakur, M.; Fuchs, H.; Melzig, M.F. A convenient method for saponin isolation in tumour therapy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2010**, *878*, 713-718.
70. Tagalakis, A.D.; He, L.; Saraiva, L.; Gustafsson, K.T.; Hart, S.L. Receptor-targeted liposome-peptide nanocomplexes for sirna delivery. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6302-6315.
71. ATCC. Neuro-2a (atcc® ccl-131™) <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-131>
72. ATCC. Sk-n-sh (atcc® htb-11™). <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-11>
73. ATCC. Sh-sy5y (atcc® crl-2266™) <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2266>
74. ATCC. Hep g2 [hepg2] (atcc® hb-8065™). <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065>
75. ATCC. Caco-2 [caco2] (atcc® htb-37™). <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-37>
76. ATCC. 293 [hek-293] (atcc® crl-1573™) <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1573>
77. ATCC. Hct 116 (atcc® ccl-247™). <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-247>
78. Barthelemy, I.; Martineau, D.; Ong, M.; Matsunami, R.; Ling, N.; Benatti, L.; Cavallaro, U.; Soria, M.; Lappi, D.A. The expression of saporin, a ribosome-inactivating protein from the plant *saponaria officinalis*, in *escherichia coli*. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 6541-6548.
79. Legname, G.; Bellosta, P.; Gromo, G.; Modena, D.; Keen, J.N.; Roberts, L.M.; Lord, J.M. Nucleotide sequence of cDNA coding for dianthin 30, a ribosome inactivating protein from *dianthus caryophyllus*. *Biochim Biophys Acta* **1991**, *1090*, 119-122.
80. Technologies, I.D. Oligoanalyzer 3.1. <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>
81. Düsseldorf, U. Ligation calculator. [http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html)
82. Avanti Polar Lipids, I. Liposome preparation. <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>
83. Choosakoonkriang, S.; Lobo, B.A.; Koe, G.S.; Koe, J.G.; Middaugh, C.R. Biophysical characterization of pei/DNA complexes. *J Pharm Sci* **2003**, *92*, 1710-1722.
84. Longo, P.A.; Kavran, J.M.; Kim, M.S.; Leahy, D.J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (pei). *Methods Enzymol* **2013**, *529*, 227-240.
85. Siebring-van Olst, E.; Vermeulen, C.; de Menezes, R.X.; Howell, M.; Smit, E.F.; van Beusechem, V.W. Affordable luciferase reporter assay for cell-based high-throughput screening. *J Biomol Screen* **2013**, *18*, 453-461.
86. Svensson, A.; Azarbayjani, F.; Backman, U.; Matsumoto, T.; Christofferson, R. Digoxin inhibits neuroblastoma tumor growth in mice. *Anticancer Res* **2005**, *25*, 207-212.
87. Sama, S.; Jerz, G.; Schmieder, P.; Woith, E.; Melzig, M.F.; Weng, A. Sapofectosid – ensuring non-toxic and effective DNA and rna delivery. *Int J Pharm* **2017**, *534*, 195–205.
88. Weng, A.; Bachran, C.; Fuchs, H.; Krause, E.; Stephanowitz, H.; Melzig, M.F. Enhancement of saporin cytotoxicity by *gypsophila* saponins--more than stimulation of endocytosis. *Chem Biol Interact* **2009**, *181*, 424-429.

89. De Smedt, S.C.; Demeester, J.; Hennink, W.E. Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharmaceutical Research* **2000**, *17*, 113-126.
90. Ahn, H.H.; Lee, M.S.; Cho, M.H.; Shin, Y.N.; Lee, J.H.; Kim, K.S.; Kim, M.S.; Khang, G.; Hwang, K.C.; Lee, I.W., *et al.* DNA/pei nano-particles for gene delivery of rat bone marrow stem cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *313-314*, 116-120.
91. Kwok, A.; McCarthy, D.; Hart, S.L.; Tagalakis, A.D. Systematic comparisons of formulations of linear oligolysine peptides with sirna and plasmid DNA. *Chem Biol Drug Des* **2016**, *87*, 747-763.
92. Shang, L.; Nienhaus, K.; Nienhaus, G.U. Engineered nanoparticles interacting with cells: Size matters. *J Nanobiotechnology* **2014**, *12*, 5.
93. Son, K.K.; Tkach, D.; Patel, D.H. Zeta potential of transfection complexes formed in serum-free medium can predict in vitro gene transfer efficiency of transfection reagent. *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1468*, 11-14.
94. Kenny, G.D.; Villegas-Llerena, C.; Tagalakis, A.D.; Campbell, F.; Welser, K.; Botta, M.; Tabor, A.B.; Hailes, H.C.; Lythgoe, M.F.; Hart, S.L. Multifunctional receptor-targeted nanocomplexes for magnetic resonance imaging and transfection of tumours. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7241-7250.
95. Weng, A.; Thakur, M.; Schindler, A.; Fuchs, H.; Melzig, M.F. Liquid-chromatographic profiling of saponinum album (merck). *Pharmazie* **2011**, *66*, 744-746.
96. Weng, A.; Bachran, D.; Gorick, C.; Bachran, C.; Fuchs, H.; Melzig, M.F. A simple method for isolation of gypsophila saponins for the combined application of targeted toxins and saponins in tumor therapy. *Planta Med* **2009**, *75*, 1421-1422.
97. Weng, A.; Thakur, M.; Beceren-Braun, F.; Bachran, D.; Bachran, C.; Riese, S.B.; Jenett-Siems, K.; Gilabert-Oriol, R.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins. *Mol Oncol* **2012**, *6*, 323-332.
98. Gilabert-Oriol, R.; Weng, A.; Trautner, A.; Weise, C.; Schmid, D.; Bhargava, C.; Niesler, N.; Wookey, P.J.; Fuchs, H.; Thakur, M. Combinatorial approach to increase efficacy of cetuximab, panitumumab and trastuzumab by dianthin conjugation and co-application of so1861. *Biochem Pharmacol* **2015**, *97*, 247-255.
99. Bhargava, C.; Durkop, H.; Zhao, X.; Weng, A.; Melzig, M.F.; Fuchs, H. Targeted dianthin is a powerful toxin to treat pancreatic carcinoma when applied in combination with the glycosylated triterpene so1861. *Mol Oncol* **2017**, *11*, 1527-1543.
100. Thakur, M.; Weng, A.; Pieper, A.; Mergel, K.; von Mallinckrodt, B.; Gilabert-Oriol, R.; Gorick, C.; Wiesner, B.; Eichhorst, J.; Melzig, M.F., *et al.* Macromolecular interactions of triterpenoids and targeted toxins: Role of saponins charge. *Int J Biol Macromol* **2013**, *61*, 285-294.
101. Gilabert-Oriol, R.; Thakur, M.; von Mallinckrodt, B.; Bhargava, C.; Wiesner, B.; Eichhorst, J.; Melzig, M.F.; Fuchs, H.; Weng, A. Reporter assay for endo/lysosomal escape of toxin-based therapeutics. *Toxins (Basel)* **2014**, *6*, 1644-1666.
102. Sigismund, S.; Woelk, T.; Puri, C.; Maspero, E.; Tacchetti, C.; Transidico, P.; Di Fiore, P.P.; Polo, S. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 2760-2765.
103. Lakadamyali, M.; Rust, M.J.; Zhuang, X. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* **2006**, *124*, 997-1009.
104. Cross, D.; Burmester, J.K. Gene therapy for cancer treatment: Past, present and future. *Clin Med Res* **2006**, *4*, 218-227.

105. Zarogoulidis, P.; Darwiche, K.; Sakkas, A.; Yarmus, L.; Huang, H.; Li, Q.; Freitag, L.; Zarogoulidis, K.; Malecki, M. Suicide gene therapy for cancer - current strategies. *J Genet Syndr Gene Ther* **2013**, *4*.
106. Zarovni, N.; Vago, R.; Solda, T.; Monaco, L.; Fabbrini, M.S. Saporin as a novel suicide gene in anticancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* **2007**, *14*, 165-173.
107. Zarovni, N.; Vago, R.; Fabbrini, M.S. Saporin suicide gene therapy. *Methods Mol Biol* **2009**, *542*, 261-283.
108. Zhong, Y.Q.; Wei, J.; Fu, Y.R.; Shao, J.; Liang, Y.W.; Lin, Y.H.; Liu, J.; Zhu, Z.H. [toxicity of cationic liposome lipofectamine 2000 in human pancreatic cancer capan-2 cells]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2008**, *28*, 1981-1984.
109. Bauer, M.; Kristensen, B.W.; Meyer, M.; Gasser, T.; Widmer, H.R.; Zimmer, J.; Ueffing, M. Toxic effects of lipid-mediated gene transfer in ventral mesencephalic explant cultures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2006**, *98*, 395-400.
110. Oeffinger, K.C.; Mertens, A.C.; Sklar, C.A.; Kawashima, T.; Hudson, M.M.; Meadows, A.T.; Friedman, D.L.; Marina, N.; Hobbie, W.; Kadan-Lottick, N.S., *et al.* Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* **2006**, *355*, 1572-1582.
111. Laverdiere, C.; Liu, Q.; Yasui, Y.; Nathan, P.C.; Gurney, J.G.; Stovall, M.; Diller, L.R.; Cheung, N.K.; Wolden, S.; Robison, L.L., *et al.* Long-term outcomes in survivors of neuroblastoma: A report from the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* **2009**, *101*, 1131-1140.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Mikroskopische Aufnahmen von <i>Gypsophila paniculata</i> L. und <i>Saponaria officinalis</i> L. ....	5
Abb. 2 Mikroskopische Aufnahmen von <i>Gypsophila elegans</i> M.Bieb. ....	6
Abb. 3 Übersicht isolierter Saponine mit bereits vollständig aufgeklärter Struktur (aus Fuchs et al.,2017 ).....	8
Abb. 4 Durch Saponin verstärkter „Endosomal Escape“ .....	11
Abb. 5 Klonierungs-Übersicht (vereinfachte Darstellung).....	22
Abb. 6 Vereinfachtes Schema der Nanoplexformulierung .....	37
Abb. 7 MTT-Assay - Umsetzung von MTT zu Formazan .....	40
Abb. 8 Luciferase Assay - Lumineszenz durch Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin.....	42
Abb. 9 Ablauf zur Messung der Transfektionseffizienz (Fließschema) .....	45
Abb. 10 Fluoreszenzassay - Durchflusszytometrie – Auswertungsansatz.....	46
Abb. 11 Gelelektrophorese nach der PCR.....	56
Abb. 12 Gelelektrophorese nach Restriktion – Inserts .....	58
Abb. 13 Gelelektrophorese nach Restriktion – Vektor.....	59
Abb. 14 Gelelektrophorese nach Probe-Restriktionsverdau .....	61
Abb. 15 Aminosäure-Sequenz von Saporin.....	62
Abb. 16 Aminosäure-Sequenz von Dianthin .....	62
Abb. 17 MS/MS-Spektrum des isolierten SO1861.....	63
Abb. 18 Strukturformel von SO1861 nach Isolation von <i>Saponaria officinalis</i> L. nach NMR-Spektroskopie.....	64
Abb. 19 Anbau von <i>Gypsophila elegans</i> M.Bieb. in Brandenburg, Deutschland .....	65
Abb. 20 HPLC-Chromatogramm des <i>Gypsophila elegans</i> M.Bieb. Trockenextrakts.....	65
Abb. 21 LC-MS-Chromatogramm von P2 nach semi-präparativer HPLC .....	66
Abb. 22 LC-MS-Chromatogramm des isolierten GE1741 aus <i>Gypsophila elegans</i> M.Bieb. ....	66
Abb. 23 MS/MS-Spektrum von GE1741 aus <i>Gypsophila elegans</i> M.Bieb. ....	66
Abb. 24 Größenverteilung der formulierten PD-,PDL-,LD- und PEID-Nanoplexe .....	67
Abb. 25 Elektronenmikroskopische Aufnahme der formulierten PD-Nanoplexe.....	69
Abb. 26 Elektronenmikroskopische Aufnahme der PD-Nanoplexe ± SO1861 .....	69
Abb. 27 Elektronenmikroskopische Aufnahme der PD-Nanoplexe ± SO1861 (2,5 µg/ml, 20 µg/ml).....	70
Abb. 28 DNA-Retentions-Assay – Einfluss von SO1861 auf die DNA-Komplexierung der Nanoplexe (visuell).....	72
Abb. 29 Bestimmung der optimalen Zellzahl für weitere Assays via MTT-Assay an Neuro-2A-Zellen .....	73

Abb. 30 Ermittlung der SO1861- und SA1641-Arbeitskonzentration via MTT-Assay an Neuro-2A-Zellen.....	74
Abb. 31 Lumineszenzmessung nach Luciferasegen-Transfektion von Neuro-2A-Zellen .....	75
Abb. 32 Transfektion von pEGFP-N3 mit verschiedenen Transfektionsmethoden an Neuro-2A-Zellen ± SO1861.....	77
Abb. 33 Transfektion von pEGFP-N3 mit verschiedenen Transfektionsmethoden an Caco2-Zellen ± SO1861.....	78
Abb. 34 Transfektion von pEGFP-N3 mit verschiedenen Transfektionsmethoden an HEK293-Zellen ± SO1861.....	79
Abb. 35 Transfektion von pEGFP-N3 mit verschiedenen Transfektionsmethoden an SHSY- und SKN-Zellen ± SO1861 .....	80
Abb. 36 Transfektion von pEGFP-N3 mit gerichteten und ungerichteten Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen.....	81
Abb. 37 Transfektion von pEGFP-N3 mit PD-Nanoplexen und Saponaria officinalis L. - Saponinen an Neuro-2A-Zellen .....	82
Abb. 38 Transfektion von pEGFP-N3 mit PD-Nanoplexen und Gypsophila paniculata L.-Saponinen an Neuro-2A-Zellen .....	83
Abb. 39 Transfektion von pEGFP-N3 mit PD-Nanoplexen und verschiedenen GE1741-Reinheitsstufen an Neuro-2A-Zellen.....	84
Abb. 40 Transfektion diverser Nucleinsäuren mit peptid-basierten Nanoplexen und SO1861 an Neuro-2A-Zellen .....	85
Abb. 41 Transfektion diverser Nucleinsäuren mit peptid-basierten und GE1741 an Neuro-2A-Zellen .....	86
Abb. 42 Dotplot nach Transfektion mit kommerziell erwerblichen Transfektionsreagenzien an Neuro-2A-Zellen .....	87
Abb. 43 Transfektion von pEGFP-n3 mit kommerziellen Transfektionsmethoden und GE1741 an HTC-116 – Zellen.....	88
Abb. 44 Fluoreszenzhistogramme zur Untersuchung der saponin-bedingten Nanoplexaufnahme in Neuro-2A-Zellen .....	90
Abb. 45 Untersuchung der saponin-bedingten und rezeptor-bedingten Nanoplexaufnahme in Neuro-2A-Zellen .....	91
Abb. 46 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Neuro-2A-Zellen nach Transfektion von GFP-DNA .....	92
Abb. 47 Konfokalmikroskopische Aufnahme nach Pm-Transfektion (GFP-mRNA) von Neuro-2A-Zellen. ....	93
Abb. 48 Konfokalmikroskopische Aufnahme von FITC-YD-Nanoplexen .....	94
Abb. 49 Konfokalmikroskopische Aufnahme des endosomalen „Uptake“ und „Release“ in Neuro-2A-Zellen .....	95
Abb. 50 MTT-Assay zur Viabilitätsbestimmung nach Transfektion von Neuro-2A-Zellen mit Saporin-DNA .....	96
Abb. 51 Echtzeit-Analyse der SO1861-bedingten Zellpermeabilität an Neuro-2A-Zellen .....	98
Abb. 52 Echtzeit-Analyse der GE1741-bedingten Zellpermeabilität an Neuro-2A-Zellen .....	99
Abb. 53 Echtzeit-Analyse der Eigentoxizität der formulierten Nanoplexe ± SO1861 an Neuro-2A-Zellen .....	100
Abb. 54 Transfektion von pEGFP-N3 in serumhaltigen Medium an Neuro-2A-Zellen ± SO1861 .....	101
Abb. 55 Echtzeit-Analyse der Eigentoxizität von gerichteten und ungerichteten peptidbasierten Nanoplexen ± SO1861 an Neuro-2A-Zellen .....	102
Abb. 56 Echtzeit-Analyse der SO1861-vermittelten Toxizität von suizidgen-enthaltenden (2,5 µg, 5 µg) PD-Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen .....	103
Abb. 57 Echtzeit-Analyse der SO1861-vermittelten Toxizität von suizidgen-enthaltenden (1 µg, 2,5 µg) PD-Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen .....	104
Abb. 58 Echtzeit-Analyse der SO1861-vermittelten Toxizität von suizidgen-enthaltenden YD-Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen .....	105

Abb. 59 Echtzeit-Analyse der SO1861-vermittelten Toxizität von Suizidgen-enthaltenden PD- und YD-Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen .....	106
Abb. 60 Echtzeit-Analyse der GE1741-vermittelten Toxizität von suizidgen-enthaltenden (Saporin) YD-Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen .....	107
Abb. 61 Echtzeit-Analyse der GE1741-vermittelten Toxizität von suizidgen-enthaltenden YD-Nanoplexen an Neuro-2A-Zellen .....	108
Abb. 62 Qualitäts-Test der formulierten YD-Nanoplexe zur in-vivo-Studie hinsichtlich Stabilität, Größe und Zetapotential .....	109
Abb. 63 Messung der Luciferase-Expression transduzierter Neuro-2A-Zellen .....	110
Abb. 64 Eigentoxizitäts-Tests (akute Toxizität) – Bestimmung der YD-Nanoplex-Toxizität an NMRI nu/nu-Mäusen .....	111
Abb. 65 Eigentoxizitäts-Tests (kombinatorische Toxizität) – Bestimmung der kombinatorischen (YD-Nanoplex und SO1861) Toxizität an NMRI nu/nu-Mäusen .....	111
Abb. 66 Mittleres Körpergewicht der NMRI nu/nu-Maus-Therapiegruppen während der Tumorthherapie (Tag 4 und 11 nach Tumorapplikation).....	112
Abb. 67 Tumorgroße der NMRI nu/nu-Maus-Therapiegruppen (Tag 4 und 11 nach Tumorapplikation).....	113
Abb. 68 Lumineszenzintensität des applizierten Tumors 4 Tage und 11 Tage nach Tumorapplikation (quantitativ) an NMRI nu/nu-Mäusen.....	115
Abb. 69 Lumineszenzintensität der einzelnen Tumore 4 Tage und 11 Tage nach Tumorapplikation (qualitativ) an NMRI nu/nu-Mäusen.....	116
Abb. 70 Essentielle Strukturmerkmale von isolierten Triterpensaponinen für ein endosomales Release.....	121
Abb. 71 Ideales Saponin mit allen erfassten und wichtigen Strukturmerkmalen.....	124
Abb. 72 Auswirkung der Saponin-Zugabe (SO1861) auf den „Uptake“ und das „endosomale Release“ (Schema) .....	130
Abb. 73 Auswirkung der Ligand I und Saponin-Zugabe auf den „Uptake“ und das „endosomale Release“ (Schema) .....	131

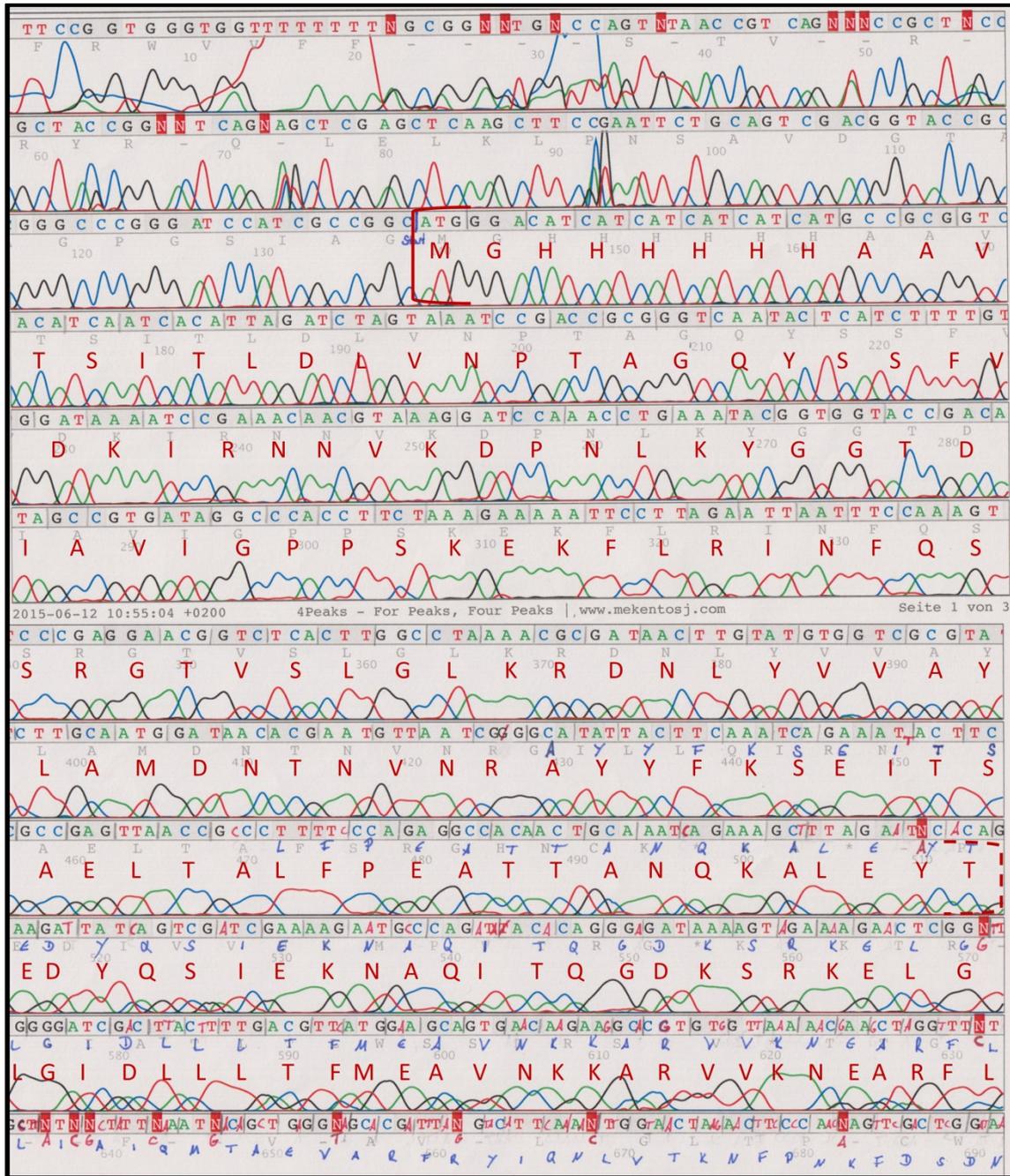
## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 PCR-Protokoll – Amplifizierung des Inserts.....	24
Tab. 2 PCR –Bedingungen –Amplifizierung des Inserts.....	25
Tab. 3 Ligation in pJet-Vektor – Berechnung der Insertmassen.....	26
Tab. 4 Ligation in pJet-Vektor – Protokoll.....	27
Tab. 5 Restriktionsprotokoll - Linearisierung des Vektors.....	28
Tab. 6 Ligation mammaler Vektor – Berechnung der Insertmassen.....	29
Tab. 7 Ligation mammaler Vektor – Protokoll.....	30
Tab. 8 Sequenzierungs- PCR – Bedingungen.....	31
Tab. 9 Sequenzierungs-Protokoll .....	31
Tab. 10 Formulerte Nanoplex-Partikel im Rahmen der Dissertation .....	36
Tab. 11 Nanoplexformulierung - getestete Massenverhältnisse .....	38
Tab. 12 Luciferase Assay – Reagenzien.....	43
Tab. 13 Übersicht der im Rahmen der Dissertation getesteten Extrakte und isolierte Saponine .....	47
Tab. 14 Konfokalmikroskop - Imaging-Farbstoffe.....	50
Tab.15 Impedanzmessungen der Suizidgen-basierten Transfektionen.....	52
Tab. 16 Therapie-Gruppen der in-vivo-Studie mit NMRI nu/nu-Mäusen .....	55
Tab. 17 DNA-Konzentrationen nach PCR und Aufreinigung .....	57
Tab. 18 DNA-Konzentrationen nach pJET-Ligation und Transformation .....	57
Tab. 19 DNA-Konzentrationen nach Restriktion .....	59
Tab. 20 DNA-Konzentrationen nach Ligation und Transformation.....	60
Tab. 21 Größe, PDI und Zetapotential der formulierten Nanoplexe und derer Komponenten .....	68
Tab. 22 Komplexierungsassay – Einfluss von SO1861 auf die DNA-Komplexierung der Nanoplexe (quantitativ).....	71
Tab. 23 Transfektionseffizienz kommerziell erwerblicher Transfektionsreagenzien ± GE1741 an Neuro-2A-Zellen.....	87
Tab. 24 Statistische Messdaten der drei NMRI nu/nu-Maus-Therapiegruppen (4 Tage und 11 Tage nach Tumorapplikation)....	114

# Anhang

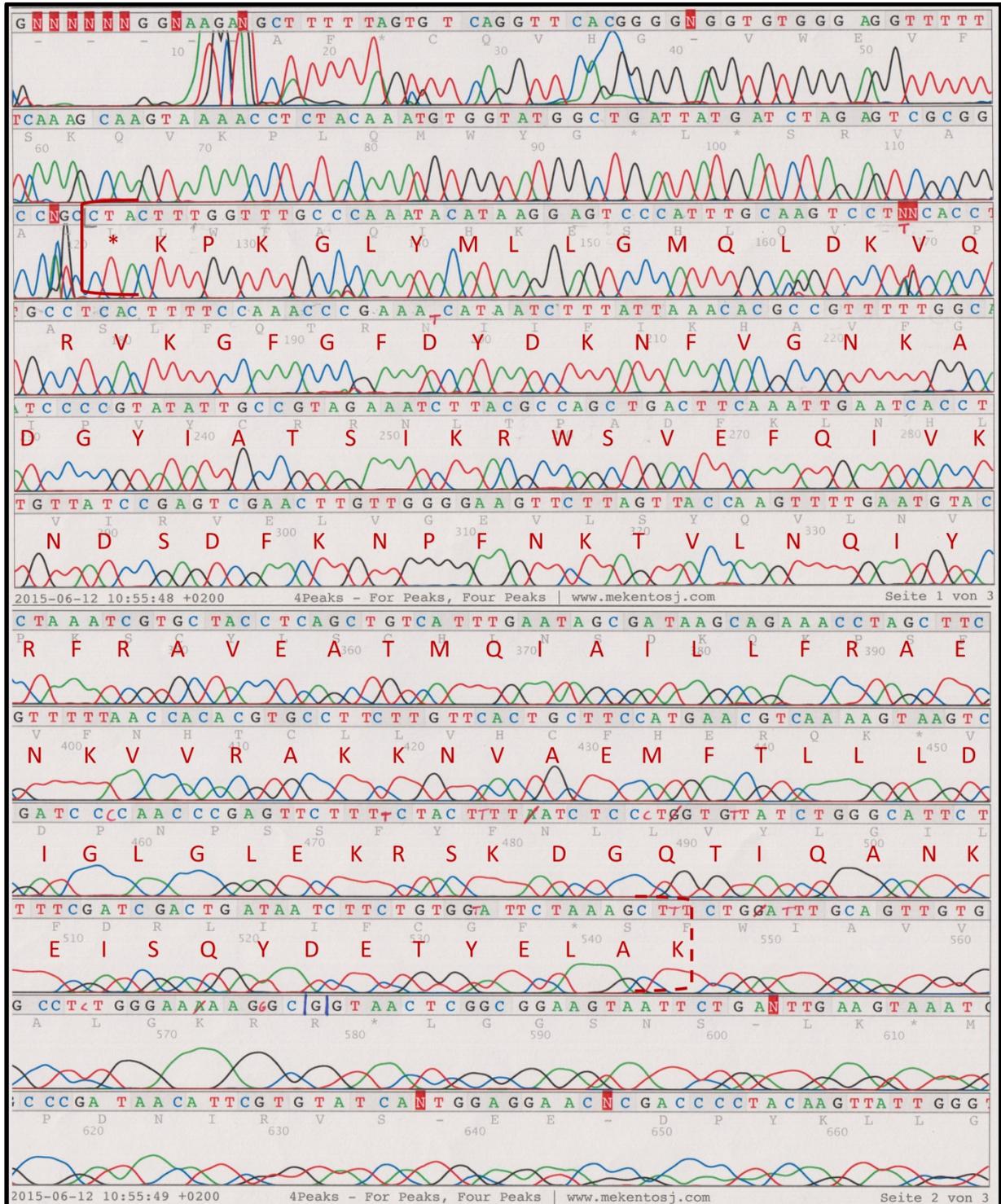
**Abb. Anhang 1 Sequenzierung des Saporingsens – forward**

Darstellung der mit dem Forward-Primer (3'-5') erhaltenen DNA-Sequenz. Die durchgezogene rote Klammer signalisiert den Beginn des Saporingsens (ATG: Startcodon). Die gestrichelte Klammer markiert den Punkt, an der eine eindeutige Analyse der Basenpaare nicht mehr einwandfrei möglich war. Die Analyse wurde dann mit der Reverse-Sequenz (Abb. Anhang 2) fortgeführt.



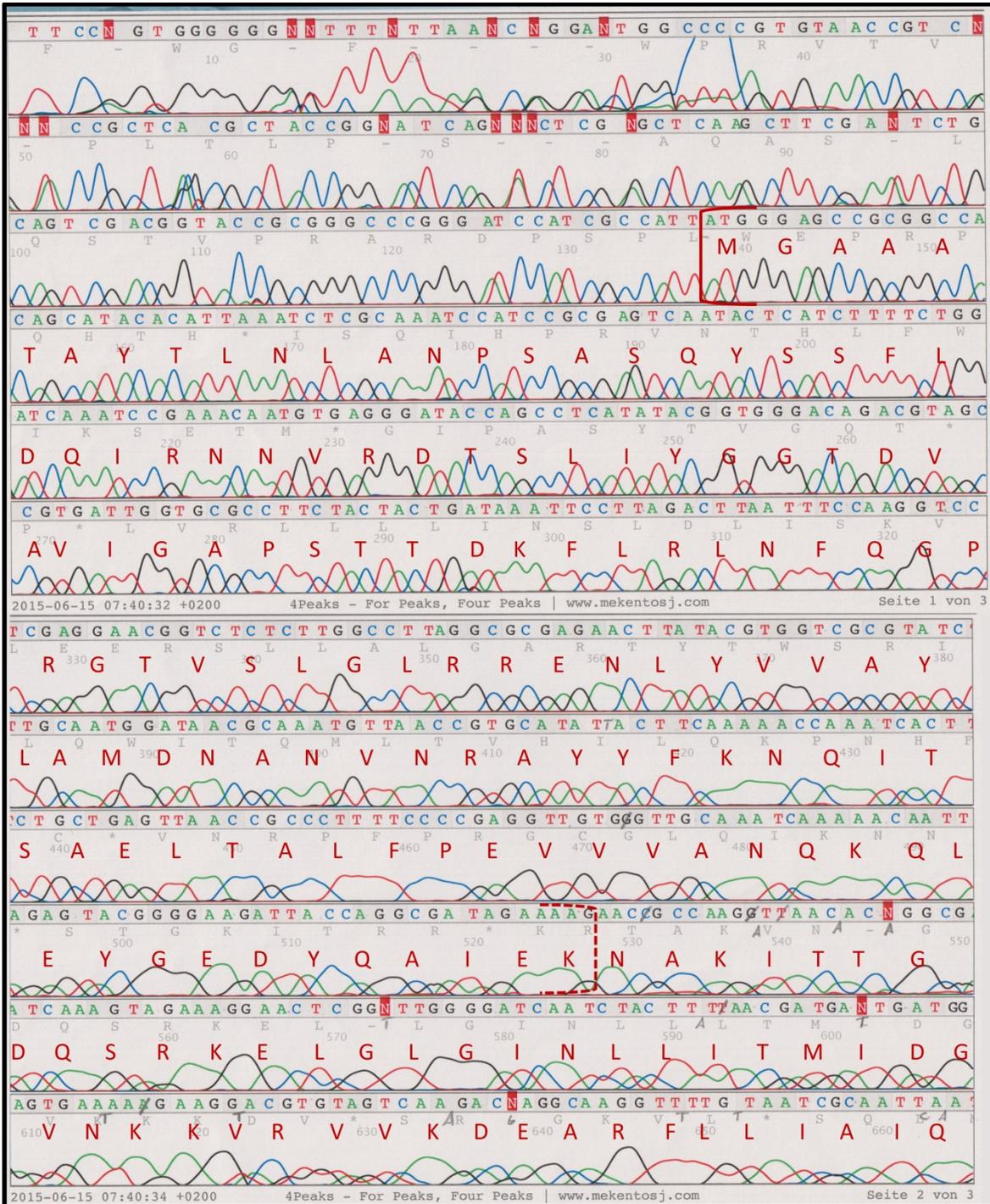
**Abb. Anhang 2 Sequenzierung des Saporingsens – reverse**

Darstellung der mit dem Reverse-Primer (5'-3') erhaltenen DNA-Sequenz. Die durchgezogene rote Klammer signalisiert das Ende des Saporingsens (CTA: komplementäres Stoppcodon). Die gestrichelte Klammer markiert den Punkt, an der eine eindeutige Analyse der Basenpaare nicht mehr einwandfrei möglich war. Die Analyse ergänzt die Analyse des Forward-Primers (Abb. Anhang 1)



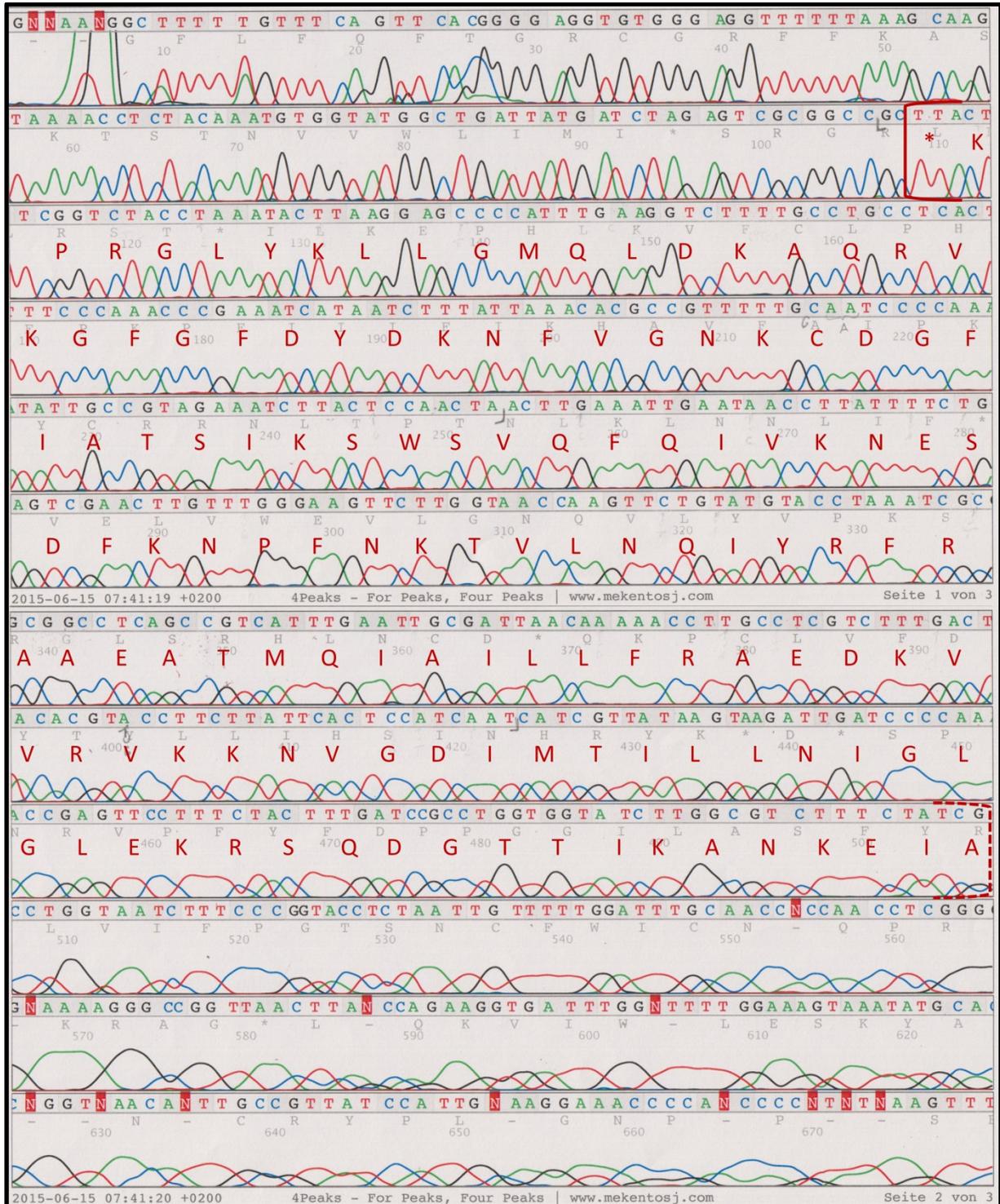
**Abb. Anhang 3** Sequenzierung des Dianthin-Gens

Darstellung der mit dem Forward-Primer (3'-5') erhaltenen DNA-Sequenz. Die durchgezogene rote Klammer signalisiert den Beginn des Dianthingens (ATG: Startcodon). Die gestrichelte Klammer markiert den Punkt, an der eine eindeutige Analyse der Basenpaare nicht mehr einwandfrei möglich war. Die Analyse wurde dann mit der Reverse-Sequenz (Abb. Anhang 4) fortgeführt.



**Abb. Anhang 4** Sequenzierung des Dianthingens – reverse

Darstellung der mit dem Reverse-Primer (5'-3') erhaltenen DNA-Sequenz. Die durchgezogene rote Klammer signalisiert das Ende des Dianthingens (CTA: komplementäres Stoppcodon). Die gestrichelte Klammer markiert den Punkt, an der eine eindeutige Analyse der Basenpaare nicht mehr einwandfrei möglich war. Die Analyse ergänzt die Analyse des Forward-Primers (Abb. Anhang 3).



## Publikationsverzeichnis

### Artikel in Fachzeitschriften

*Fuchs H, Niesler N, Trautner A, Sama S, Jerz G, Panjideh H, Weng A. Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies. Biomedicines. 2017 Mar 29; 5(2) – Review*

*Sama S, Jerz G, Schmieder P, Woith E, Melzig MF, Weng A. Sapofectosid - Ensuring non-toxic and effective DNA and RNA delivery. Int J Pharm. 2017 Oct 17; 534(1-2):195-205 – Research Paper*

*Sama S, Woith E, Walther W, Jerz G, Chen W, Hart SL, Melzig MF, Weng A. Targeted suicide gene transfections reveal promising results in nu/nu mice with aggressive neuroblastoma. – J Control Release 2017 – Research Paper – Accepted, In press*

*Sama S, Jerz G, Melzig MF, Weng A. Novel triterpenoid saponins from *Gypsophila elegans* M.Bieb. enabling enhanced gene delivery as sapofection agents – In revision*

### Wissenschaftliche Poster

*Sama S, Melzig MF, Weng A. Triterpensaponins as a novel transfection enhancer – Joint Natural Products Conference (GA), 2016, Kopenhagen, Dänemark*

*Sama S, Melzig MF, Weng A. Sapofectosid – a herbal pioneer in the field of non-toxic and efficient gene delivery? – European Students Conference Berlin, 2017, Berlin, Deutschland*

## Vorträge

**Sama S**, Novel transfection enhancing effect of *Gypsophila elegans* M.Bieb. – DCPS Berlin 2016, Berlin, Deutschland

**Sama S**, Triterpensaponins as a novel transfection enhancer – 2nd Minisymposium Berlin und Warsaw, 2016, Warschau, Polen

**Sama S**, Sapofectosid – an isolated triterpenoid saponin from *Saponaria officinalis* L. Ensures non-toxic and universal gene delivery – 65th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 2017, Basel, Schweiz

## Patente

**Sama S, Melzig MF, Weng A.** Novel uses of a saponin and method for its isolation - eingereicht im Europäischen Patentamt, 18.01.2018

## Stipendien

Focus Area NanoScale – Zeitraum: 01.04.2015 - 01.04.2016

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## Danksagung

Die Erstellung dieser Dissertation wäre ohne die Unterstützung einiger Leute nicht möglich gewesen, daher ist eine Erwähnung in dieser Danksagung das Mindeste an Ehre, die ihnen gebührt.

Zu aller Erst möchte ich mich bei Dr. Alexander Weng bedanken, der mich von der ersten Stunde als Betreuer und erster Ansprechpartner durch die Promotion begleitet hat. Ohne seine Ideen, Tipps und Erfahrung wäre das Gelingen dieser Dissertation in diesem Maße nicht möglich gewesen. Weiterhin habe ich ihm die Isolation und Aufreinigung der Saponine zu verdanken, welche ich im Laufe der Promotion damit erst untersuchen konnte.

In demselben Maße kann ich Prof. Dr. Melzig nur meinen ausdrücklichen Dank aussprechen. Nicht nur aufgrund seiner Erfahrung, sondern auch durch seine administrative Hilfe könnte ich mir keinen besseren Doktorvater für die letzten drei Jahre vorstellen.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Fuchs danken, bei dem meine praktische Arbeit im Virchow-Klinikum im Rahmen der Promotion begann. Nicht nur durch seine, sondern auch die ungemaine Hilfe des AK Fuchs, die mich herzlich wie als ein Teil des Arbeitskreises aufnahmen, konnte eine schnelle und erfolgreiche Plasmid-Klonierung erfolgen.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Gerold Jerz, der durch die Strukturaufklärung von SO1861 und GE1741 mittels NMR es mir ermöglichte, jene Saponine als neuartige Transfektionsverstärker zu beschreiben und sie in die Struktur-Wirkungs-Beziehung miteinzubeziehen.

Ich bedanke mich weiterhin bei Prof. Walther und EPO Berlin-Buch für die Kooperation und die Durchführung der *in-vivo*-Studie.

Vielen Dank an die Mitglieder der *Focus Area Nanoscale* der FU Berlin die finanzielle Unterstützung in Form eines einjährigen Forschungsstipendiums.

Ich bedanke mich zudem vielmals an meine tollen Praktikanten/Wahlpflichtfächler Mike Sommer, Birte Dowerg, Gamze Bulut, Caecilia Heber sowie Sevin Krüger, die mir während dieser Promotion einiges an Arbeit abgenommen haben.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Lazar-Schurreit, welche mir zu einem sanften Einstieg in die Lehrveranstaltungen der pharmazeutischen Biologie verhalf. Ihre umfassende Erfahrung sowie ihre herzensgute Art war mitunter ein Grund, mich die Lehre als Tolles zu betrachten. Ebenso geht mein Dank an ihren Dr. Stefan Böttger für die entspannten gemeinsamen Lehrveranstaltungen sowie die unzähligen Mensa-Ausflüge.

Für eine stets freundschaftliche und angenehme Atmosphäre möchte ich dem AK Melzig danken. Es war mir eine Ehre, euer Kollege zu sein. Mein erster Dank geht an meinen Laborpartner Marian Bittner, mit dem ich mich stets über alles austauschen konnte, sei es im Labor über statistische Methoden oder während der Mittagspause über Transfette. Dr. Katharina Mulsow, Dr. Tina Buchholz (*Valar Dohaeris!*) und Florian Günther danke ich für eine geduldige Einweisung, die mir zu einem optimalen Start verholfen haben. Eric Woith danke ich vor allem für die Hilfe zur Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Vielen Dank an die stets verlässliche Frau Cornelia Görick für die zahlreichen Tipps, Gefallen, Gespräche in den letzten Jahren. Auch Arsenij Kokorin, Wenyan Xi, Andreas Kannegießer und Franziska Keresztes möchte ich als wichtigen Teil des Arbeitskreises nicht unerwähnt lassen.

Ich möchte meinen Freunden und meiner Familie danken, die mir wie immer ein großer Rückhalt waren. Vielen Dank an Nils und Nicola fürs Korrekturlesen der Arbeit, ihr seid spitze! Zuletzt möchte ich dir danken, Dilava. Deine Liebe, Geduld und Verständnis ist unbeschreiblich, ich bin glücklich den weiteren Lebensweg mit dir beschreiten zu dürfen.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasst habe.

.....

Datum

.....

Originalunterschrift