

Transportstudien von Nanopartikeln an verschiedenen
Blut-Hirn Schranke Modellen *in-vitro*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

Vorgelegt im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische
Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Von
Anke Schwedat
(Stuttgart)

Frankfurt am Main, 2006

Meiner Familie und
insbesondere meinem Opa

Vom Fachbereich Chemie/Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer Haus in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. v.Briesen erstellt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Kreuter danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, unter seiner Anleitung im Rahmen des BMBF-Projektes innerhalb einer multidisziplinären Arbeitsgemeinschaft auf dem Gebiet der Nanotechnologie zusammenzuarbeiten, sowie für die Begutachtung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn PD. Dr. Hagen von Briesen**, der die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte. Danke auch für seine stete Ansprechbarkeit, für die wertvollen Anregungen und für das Gewähren von ausreichendem wissenschaftlichem Freiraum zum selbständigen Arbeiten.

Allen früheren und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Briesen möchte ich für das gute Betriebsklima und der immer freundlichen Zusammenarbeit ganz herzlich danken. Ein Dankeschön geht an **Frau Karin Becker- Peters, Frau Roswitha Seyd, Herrn Abdellatif Bouazzaoui, Herrn Norbert Dinauer, Herrn Sebastian Steiniger, Frau Beta Sanchez und Frau Silvia Brachatz** für wertvolle Anregungen und tatkräftige Unterstützung. Bei **Roswitha Seyd** möchte ich mich insbesondere für die verständnisvolle Einarbeitung in die Zellkultur und mein Thema bedanken.

Am Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Frankfurt möchte ich **Herrn Dr. Klaus Langer** für seine wissenschaftlichen Beiträge in zahlreichen Diskussionen danken. Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus **Frau Kerstin Michaelis, Herrn Sebastian Dreis und Alexander Bootz** für die Herstellung der Nanopartikelpräparationen und für die konstruktive Zusammenarbeit ohne die diese Arbeit in der entstandenen Form nicht möglich gewesen wäre. Bei **Alexander Bootz** bedanke ich mich noch für die Einarbeitung, die Anregungen und Diskussionen auf dem Gebiet der konfokalen Mikroskopie.

Frau **Michaela Stoll** danke ich für zahlreiche aufbauende Gespräche, schöne Mittagspausen und ihr immer offenes Ohr. Dann möchte ich noch bei allen übrigen **Mitarbeitern des Georg- Speyer Hauses** bedanken, die zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei **meiner Familie** für die finanzielle und moralische Unterstützung bedanken. Lieben Dank auch an meinen Freund **Rui Galao**.

1	Einleitung.....	1
1.1	Blut-Hirn-Schranke	1
1.1.1	Aufbau und Funktion der BHS.....	2
1.1.2	Transportmechanismen an der BHS	3
1.1.2.1	Carrierproteine	4
1.1.2.2	Passiver Transport	5
1.1.2.3	Exportproteine.....	6
1.1.3	Endozytose	6
1.1.3.1	Rezeptorvermittelte Endozytose	7
1.1.3.1.1	LDL-Rezeptor	8
1.1.3.1.2	ApoE.....	10
1.1.3.1.2.1	Vorkommen, Struktur und Funktion.....	11
1.1.3.1.2.2	ApoE und der LDL-Rezeptor im Gehirn und an der BHS ...	12
1.1.3.2	Nicht-rezeptorvermittelte Endozytose	13
1.1.3.3	Exozytose und Transzytose.....	13
1.2	Modellsysteme zur Untersuchung des Arzneistofftransports an der BHS ...	14
1.2.1	In-vivo	14
1.2.1.1	Brain uptake index.....	14
1.2.1.2	Gehirnperfusion	15
1.2.1.3	Capillary Depletion-Methode	15
1.2.1.4	Mikrodialyse.....	15
1.2.1.5	Tail flick Test.....	16
1.2.2	In-vitro.....	16
1.2.2.1	Isolierte Kapillaren	16
1.2.2.2	Zellkulturmodelle.....	17
1.2.2.2.1	Kapillar-Endothelzellen (Primärzellen)	17
1.2.2.2.2	Zelllinien.....	18
1.3	Überwindung der Blut-Hirn-Schranke.....	18
1.3.1	Öffnung der zellulären Barriere	19
1.3.2	Erhöhte Lipophilie.....	19
1.3.3	Sequenzieller Metabolismus.....	20
1.3.4	Carrierproteine	20
1.3.5	Chimäre Proteine.....	20
1.3.6	Partikuläre Trägersysteme.....	21

1.3.6.1	Liposomen	22
1.3.6.2	Nanopartikel	22
1.3.6.2.1	Polybutylcyanoacrylat (PBCA)-Nanopartikel	23
1.3.6.2.2	Humanes Serumalbumin-Nanopartikel	24
1.3.6.2.2.1	Spezifisches Drug Targeting durch oberflächenmodifizierte Nanopartikel.....	24
1.4	Ziel der Arbeit.....	26
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Zellkultur.....	27
2.1.1	Mycoplasmen-PCR	27
2.1.2	Kultivierung von Zelllinien.....	29
2.1.2.1	Vorbereitung der Zellkulturgefäße	32
2.1.2.2	Allgemeines Verfahren zur Kultivierung.....	32
2.1.3	Isolierung und Kultivierung von Kapillarfragmenten	33
2.1.4	Kultivierung von BCECs	37
2.1.5	Charakterisierung von Endothelzellen anhand endothelzellspezifischer Marker	38
2.1.5.1	von Willebrand Faktor (vWF).....	39
2.1.5.2	ZO-1.....	39
2.1.5.3	TEER	40
2.2	LDL-Rezeptornachweis mittels FACS-Analyse	41
2.3	Nachweis der Bindung von ApoE an die Zellen	42
2.4	Herstellung und Charakterisierung von Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel..	43
2.4.1	Leere Nanopartikel	44
2.4.2	Fluoreszenzmarkierung	44
2.5	Herstellung und Charakterisierung von humanen Serumalbumin-Nanopartikeln (HSA-NP)	45
2.5.1	Leeres Partikelsystem.....	45
2.5.2	Modifikation.....	46
2.5.2.1	Pegylierung.....	46
2.5.2.2	Avidin-Biotin Bindung.....	46
2.5.2.3	Kovalente Bindung	47

2.6	Intrazelluläre Aufnahme und Verteilung von PBCA-Nanopartikeln	47
2.6.1	Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	48
2.6.2	Transportuntersuchung über die in vitro BHS.....	48
2.6.3	TEER- Messungen	49
2.7	Intrazelluläre Aufnahme und Verteilung von HSA-Nanopartikeln.....	50
2.7.1	Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	50
2.7.2	Quantifizierung der zellulären Aufnahmen	50
2.7.2.1	Bindung von Nanopartikeln an unterschiedliche Zellen	51
2.7.2.2	Präinkubationen als Nachweis spezifischer Bindung	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Etablierung eines in-vitro Modells der Blut-Hirn-Schranke	54
3.1.1	Charakterisierung der isolierten Zellen	55
3.1.1.1	Endothelzellspezifische Marker.....	57
3.1.1.2	Transendothelial electrical resistance (TEER) –Werte.....	57
3.2	Modellzelllinien für ein in-vitro Modell der Blut-Hirn-Schranke.....	59
3.3	Einfluß von Polybutylcyanoacrylat-(PBCA) Nanopartikeln auf Primärzellen	60
3.4	Transportuntersuchungen mit Nanopartikeln am Transwell-System	61
3.5	Substanztransport über die in-vitro Blut-Hirn-Schranke.....	64
3.6	Untersuchung der Zellspezifität von oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln	68
3.6.1	Bestimmung der LDL-Rezeptor-Expression auf verschiedenen Zellen	70
3.6.1.1	Etablierung von Kulturbedingungen für eine optimierte Rezeptorexpression	71
3.6.1.1.1	Kultivierung der Zellen über 24 Stunden in serumfreien Medium..	71
3.6.1.1.2	Serumvergleich.....	73
3.6.2	Zell-Sorting	75
3.6.3	Bindungsstudien von HSA-Nanopartikeln	76
3.6.3.1	Spezifität der Bindung.....	77
3.6.3.1.1	FACS-Analyse	77
3.6.3.2	Zelllinien	78
3.6.3.3	Primärzellen.....	82
3.7	ApoE-Bindung auf hochexprimierenden HepG2-LDLII	84

3.8	Nachweis einer spezifischen Bindung der Nanopartikel mittels unterschiedlichen Präinkubationen.....	87
3.9	Testung von Nanopartikeln mit unterschiedlich modifiziertem ApoE als Ligand	88
3.10	Untersuchungen zu alternativen Mechanismen	90
4	Diskussion	93
4.1	Etablierung eines in-vitro Modells der Blut-Hirn-Schranke	93
4.2	Nanopartikel im in-vitro System.....	95
4.2.1	PBCA-Nanopartikel	95
4.2.2	HSA-Nanopartikel	96
4.2.3	Transport von Nanopartikeln	96
4.2.4	Substanztransport im <i>in-vitro</i> Modell	97
4.3	Zellspezifisches Targeting mit ApoE-modifizierten Nanopartikeln	99
4.3.1	Bindung von freiem Liganden ApoE	101
4.3.2	Nachweis der Spezifität der ApoE-PEG-HSA-NP Bindung	102
4.4	Alternative Mechanismen	103
5	Zusammenfassung	105
6	Literaturverzeichnis	109
7	Lebenslauf.....	118
8	Präsentationen	119

1 Einleitung

Zu den schwersten Erkrankungen, die das Gehirn betreffen, gehören Gehirntumore. Betroffen sind vor allem Kinder bis zum 10. Lebensjahr und Erwachsene zwischen dem 60. und 75. Lebensjahr. Weil das Gehirn auch die Sinne, Gefühle und das Gedächtnis kontrolliert, können Tumore des Gehirns weitreichende Konsequenzen für den ganzen Organismus haben. Zumeist sind diese Tumore weitgehend therapieresistent und führen deshalb häufig in wenigen Monaten zum Tod des Patienten. Neben der Operation ist die Bestrahlung die wichtigste Behandlungsmethode. Chemotherapeutika können bei Hirntumoren nur selten eingesetzt werden, da die meisten zur Krebsbehandlung verwendeten Medikamente nur schlecht ins Gehirn gelangen. Ursache dafür ist eine der wichtigsten und undurchlässigsten physiologischen Barrieren im Organismus, die "Blut-Hirn-Schranke".

1.1 Blut-Hirn-Schranke

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde durch den deutschen Pharmakologen, Physiologen und Mikrobiologen Paul Ehrlich eine Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Gehirn entdeckt. Er injizierte Vitalfarbstoffe in die Wirbeltierblutbahn und konnte die Farbstoffe schnell in allen Organen, ausgenommen dem Gehirn, wiederfinden (Ehrlich, 1885). Edwin Goldmann, ein Student Paul Ehrlichs, injizierte später Trypanblau in die Zerebrospinalflüssigkeit und erreichte damit eine Färbung des Gehirns, nicht aber des umliegenden Gehirngewebes (Goldmann, 1909).

Dieses Experiment und folgende Studien von Romanowsky 1891, welcher einen anderen Farbstoff (Preußisch Blau) als Reagenz nutzte, führten zur Definition des Begriffes „Blut-Hirn-Schranke“ (BHS). Ende der 60er Jahre des 19. Jahrhunderts wurde schließlich der Aufbau der BHS durch elektronenmikroskopische Aufnahmen aufgeklärt (Miller, 2002).

1.1.1 Aufbau und Funktion der BHS

Die aus den Gehirn- Endothelzellen geformten Kapillaren bilden den Grundbaustein der BHS und unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch durch metabolische Besonderheiten von den peripheren Kapillaren. Daher kommt auch die besondere Funktion als Schranke.

Die Endothelzellen der Gehirnkapillaren werden von Astrozyten, Mikrogliazellen, Perizyten und Nervenenden umgeben, die essentiell für die Differenzierung der Endothelzellen und die Aufrechterhaltung der spezifischen Barrierefunktionen sind (Abott, 2002; Brightman, 1992; Rubin and Staddon, 1999). Astrozyten bilden den strukturellen Rahmen der Neuronen und bedecken mit ihren Endfüßen komplett die Kapillare (Lo et al., 2001). Sie sezernieren wichtige Wachstumsfaktoren und exprimieren verschiedene Transportsysteme wie zum Beispiel den Glukose-Transporter GLUT 1 (Janzer and Raff, 1987). Mikrogliazellen und Perizyten, welche von mononukleären Blutmakrophagen stammen, erhöhen zusätzlich die allgemeinen BHS- Eigenschaften und die modulatorischen Signalwege (Zenker et al., 2003).

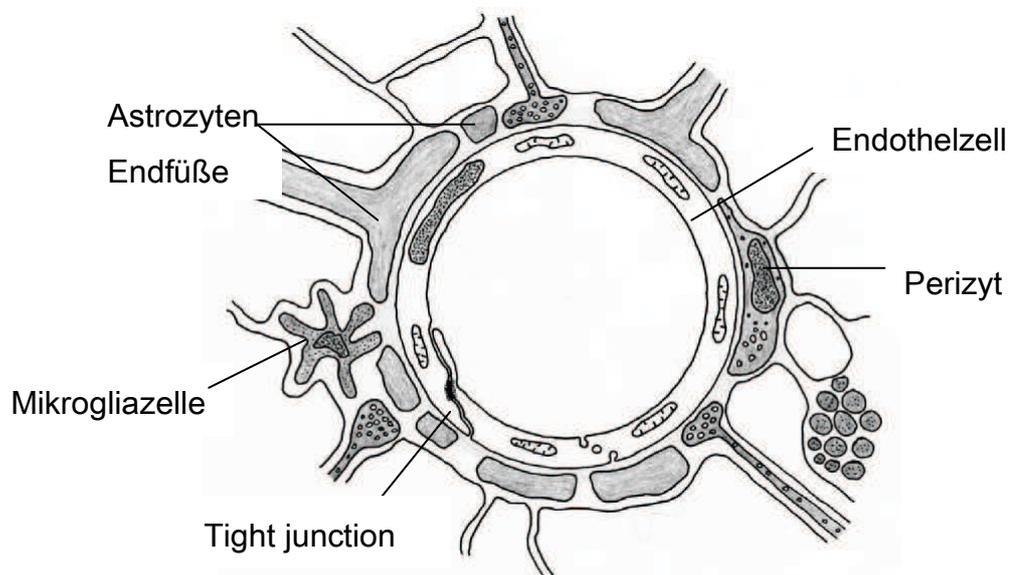


Abb.1: Schematische Darstellung der BHS-bildenden Zellen. Die Endothelzellen sind über *tight junctions* verbunden und umgeben von Peri- und Astrozyten, welche für die Aufrechterhaltung der Schrankeneigenschaften verantwortlich sind. Mikrogliazellen sind Teil des Immunsystems (Begley, 2004)

Menschliche Gehirnkapillaren haben insgesamt eine Länge von über 600 km und bedecken eine Fläche von 12 m² (Misra et al., 2003; Miller, 2002).

Verschiedene Transmembranproteine, wie Occludin und Claudin, bilden durch komplexe Interaktionen spezifische interzelluläre *tight junctions*, welche die Kapillaren komplett auskleiden und so auch den parazellulären Fluss hemmen (Kniesel and Wolburg, 2000). Im Gegensatz zu anderen Organen und dem Blutkreislauf ergibt sich die hohe Selektivität des Gehirns aus einem extrem hohen transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) von bis zu über 1000 Ohm x cm² (Butt et al., 1990). Diese Endothelzell-Eigenschaften resultieren in einer hochselektiven Permeabilität dieser Barriere, welche das Gehirn gegenüber fremden und toxischen Substanzen sowie auch gegen Neurotransmitter und Hormone schützen soll (van Asperen et al., 1997). Zusätzlich gewährleistet diese eingeschränkte Permeabilität auch ein konstantes Milieu, welches für die komplexen neuronalen Funktionen des Gehirns essentiell ist. Nur kleine lipophile Substanzen sind in der Lage die BHS durch passive Diffusion zu überwinden. Um aber die Aufnahme von polaren, für das Gehirn wichtige Substanzen zu ermöglichen, findet man an der Blut-Hirn-Schranke verschiedene Transportproteine (Begley, 2003). Diese aktiven Transportmechanismen beinhalten Transporter für Glucose und Aminosäuren und rezeptorvermittelte Systeme für bestimmte Peptide, wie zum Beispiel Insulin oder Transferrin (Begley, 1996). Die komplexe BHS verfügt außerdem über andere spezifische Mechanismen wozu zum einen eine große Anzahl an Enzymen und zum anderen eine hohe Dichte an Mitochondrien zählen (Misra et al., 2003; Brownlees and Williams, 1993).

1.1.2 Transportmechanismen an der BHS

Das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke ist ein großes Anliegen in der Chemotherapie von primären oder sekundären Gehirntumoren. Bisher wird eine erfolgreiche Chemotherapie durch verschiedene Transporter und Effluxpumpen der BHS, wie zum Beispiel P-Glykoprotein 170 oder das *Multidrug Resistance Related Protein*, behindert (Fellner et al., 2002; Kemper et al., 2004b). Eine Alternative zu dem herkömmlichen Ansatz einer Chemotherapie ist die selektive Anreicherung von Zytostatika mittels spezifischen Transportsystemen an der BHS.

Eine Vielzahl solcher rezeptorvermittelter Transportsysteme für den Peptid- und Proteintransport sind an der BHS lokalisiert.

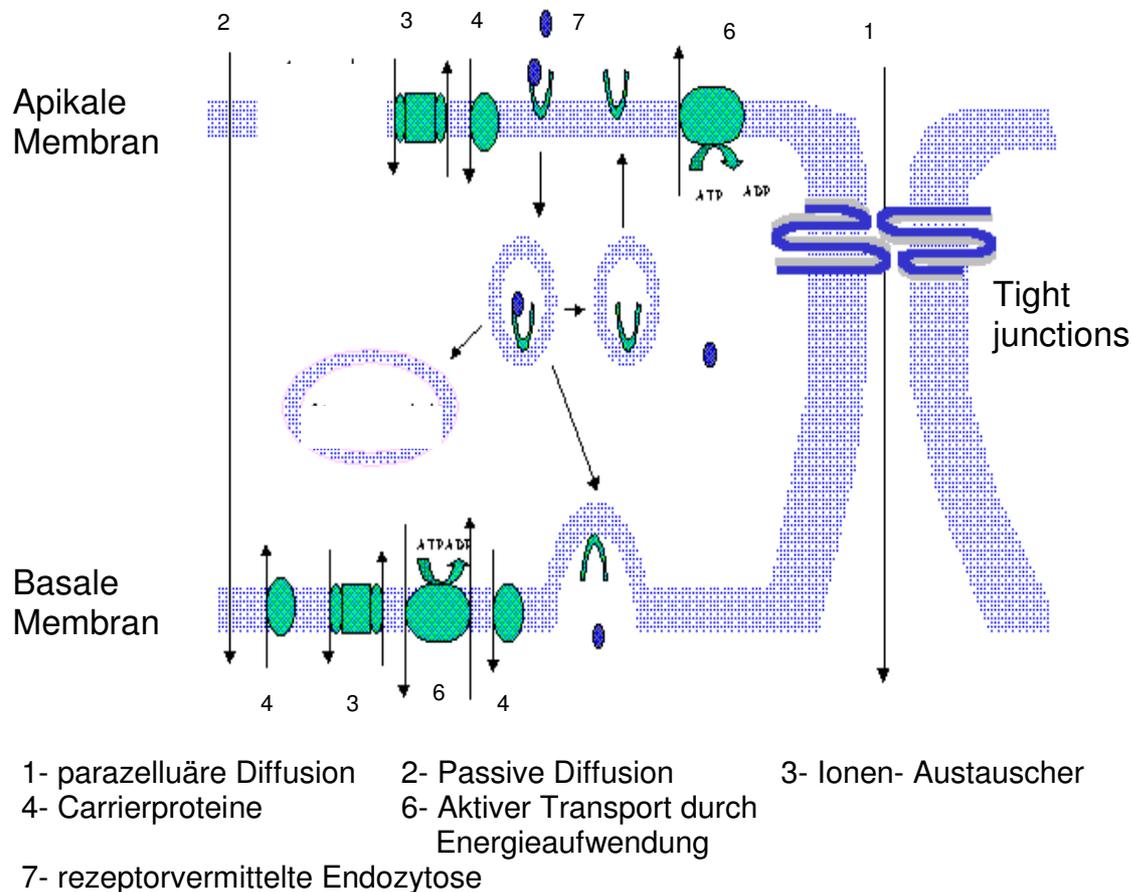


Abb.2: Transportmechanismen der Blut-Hirn-Schranke (<http://users.ahsc.arizona.edu/davis/bbbtransport.htm>, About the blood- brain barrier; Transport on the blood- brain barrier (BBB))

1.1.2.1 Carrierproteine

Für das Gehirn nötige Nährstoffe und andere endogene Substanzen gelangen über spezielle in der Zellmembran lokalisierte Transportproteine in das Zytosol. Dieser Transport kann sowohl passiv als auch aktiv sein. Man spricht von einem aktiven Transport, wenn eine Substanz gegen ein Konzentrationsgefälle unter Aufwendung von Energie transportiert wird. Die benötigte Energie wird in der Regel durch Hydrolyse von ATP gewonnen. Die wichtigsten Membran-Transportproteine (Carrierproteine) der Kapillar-Endothelzellen sind die für Glukose und Aminosäuren.

Glucose ist die Hauptenergiequelle des Gehirns, während Aminosäuren als Bausteine der Proteinbiosynthese benötigt werden.

Somit muss die kontinuierliche und ausreichende Versorgung des Gehirns mit Glukose und Aminosäuren durch die Kapillar-Endothelzellen sichergestellt werden.

Glucose wird durch ein Protein der GLUT Transporterfamilie passiv mit einem Konzentrationsgefälle transportiert (Pardrige et al., 1990). An der BHS existieren zudem noch Transportproteine für neutrale und basische Aminosäuren (W.M. Pardrige und W. H. Oldendorf, 1975), ebenso wie für verschiedene andere Substanzen.

1.1.2.2 Passiver Transport

Unter passivem Transport versteht man die Diffusion von Molekülen durch eine Lipid-Doppelmembran und somit auch durch eine Zellschicht ohne Aufwendung von Energie. Die Diffusionsrate ist direkt proportional zum Gradienten, ist nicht absättigbar und kann nicht durch andere Stoffe gehemmt werden. Die Geschwindigkeit und somit die Diffusionsrate hängt von mehreren Parametern, wie Molekulargewicht, Form oder Ladung der diffundierenden Substanz ab. Generell diffundiert ein Molekül umso schneller durch Membranen, je kleiner und lipophiler es ist.

Fick'sches Gesetz: Die Geschwindigkeit der Diffusion q ist

proportional dem Konzentrationsgradient ($C_2 - C_1$),

proportional der Oberfläche A ,

proportional dem Verteilungskoeffizienten VK ,

proportional einer Diffusionskonstanten k ,

umgekehrt proportional der Diffusionsstrecke d .

$$q = k \cdot A/d \cdot VK (C_2 - C_1)$$

1.1.2.3 Exportproteine

Einige Substanzen, welche durch ausreichende Lipophilie eigentlich hirngängig sein sollten, erreichen dieses nicht. Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass diese Moleküle in die Endothelzellen hinein gelangen, dort jedoch teilweise von membranständigen Carrierproteinen erkannt und aktiv wieder aus der Zelle transportiert werden. Diese Transportproteine werden auch Exportproteine genannt. Dazu zählen das P-Glykoprotein (PgP), das *breast cancer related protein* (BCRP) und das *multidrug resistance proteine* (MRPs) (D.J. Begley, 2003; Regina et al., 1998; Seetharaman et al., 1998)

1.1.3 Endozytose

Als Endozytose wird die Aufnahme extrazellulärer Stoffe in Vesikel aus der Zellmembran bezeichnet. Die Aufnahme von großen Partikeln, wie Bakterien oder abgestorbenen Zellen, bezeichnet man als Phagozytose. Dabei umschließt die Zellmembran den an die Zelloberfläche gebundenen Festkörper durch Membranausstülpungen, bis er sich im Zellinneren befindet. Phagozytose spielt eine wesentliche Rolle für das Immunsystem. Nur wenige spezialisierte Zelltypen sind zur Phagozytose befähigt, z.B. Makrophagen, Granulozyten oder Perizyten. Die unspezifische Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeit und darin gelöster Moleküle im Rahmen der kontinuierlichen Regeneration der Zellmembran wird Pinozytose genannt. Ihr Ausmaß ist abhängig vom Zelltyp. Die Endothelzellen der BHS verfügen nur über eine geringe Pinozytoseaktivität. Die Endozytose von Molekülen beobachtet man bei den meisten Zelltypen, wobei primär zwischen rezeptorvermittelter und nicht-rezeptorvermittelter Endozytose unterschieden wird.

1.1.3.1 Rezeptorvermittelte Endozytose

Verschiedene Proteine der Zellmembran haben eine spezifische Affinität zu Polypeptiden, Polysacchariden, Glykolipiden, Proteinen oder anderen Molekülen (A. L. Hubbard, 1989) und werden als Rezeptoren bezeichnet.

An Rezeptoren bindende Moleküle nennt man Liganden. Die rezeptorvermittelte Endozytose beinhaltet die Immobilisierung der zirkulierenden Liganden an der Zelloberfläche, gefolgt von deren Internalisierung und dem Abbau. Nachdem ein Ligand an seinen Rezeptor gebunden hat, wird der entstandene Komplex internalisiert. Das entstandene intrazelluläre Vesikel wird als Endosom bezeichnet. Die Endosomen werden verschiedenen Prozessen und Kompartimenten zugeführt. Viele physiologische Liganden, wie LDL (*low density lipoprotein*), Transferrin oder EGF (*epithelial growth factor*) werden so in die Zelle aufgenommen.

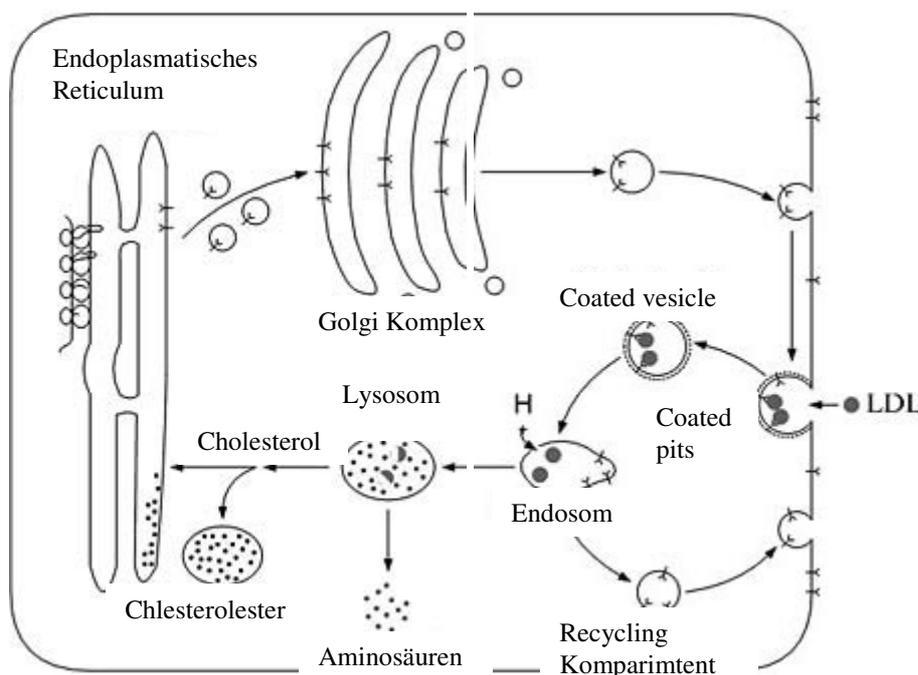


Abb.3: LDL-Rezeptor: Internalisierung und Recycling.

(<http://www.iemrams.spb.ru:8100/english/molgen/fh-en/cell-path.htm>, nach F.M. Zakharova, Department of molecular genetics, Institute of experimental medicine russian academy of medical sciences, St. Petersburg, Russia)

1.1.3.1.1 LDL-Rezeptor

Die LDL-Rezeptor-Familie besteht aus Zelloberflächenrezeptoren, welche extrazelluläre Liganden erkennen und diese für einen Abbau in Endosomen internalisieren. Ein Prototyp dieser LDL-Rezeptorfamilie ist der LDL-R, ein aus 839 AS bestehendes transmembranales Glykoprotein. Die Rezeptorfamilie spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Funktionen des Körpers. Es gibt sieben, für diese Rezeptorfamilie charakteristische Eigenschaften:

- 1 Expression an der Zelloberfläche
- 2 Extrazelluläre Liganden-Bindungsstelle aus komplementären *Repeats*
- 3 Bereitstellung von Ca^{2+} für die Ligandenbindung
- 4 Erkennung von RAP (*receptor associated protein*) und ApoE (Liganden für die Rezeptorbindungsstelle)
- 5 Eine EGF homologe Domäne
- 6 Membranüberspannende Domäne
- 7 Rezeptorvermittelte Endozytose verschiedener Liganden

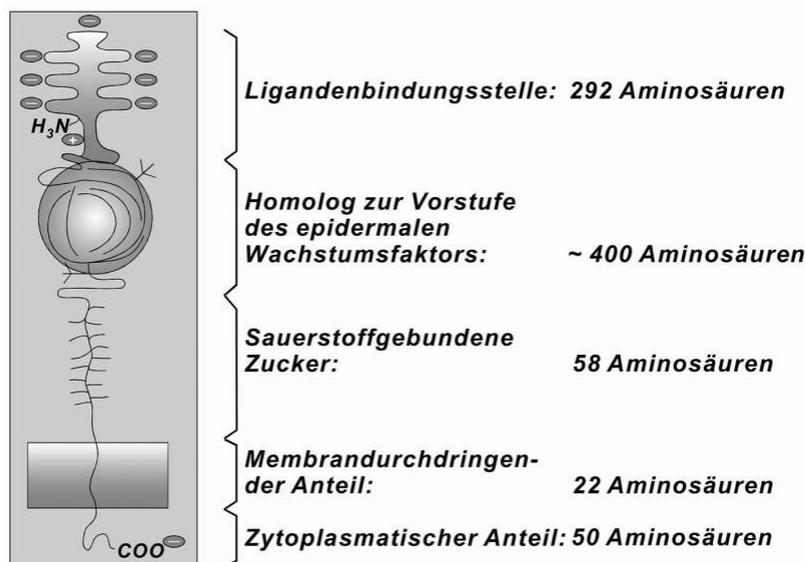
Die LDL-Rezeptoren bestehen aus fünf Domänen mit individuellen Funktionen:

1. die cysteinreiche Liganden-Bindungsstelle am N-Terminus, welche die komplementären Motivwiederholungen beinhalten und so das LDL binden ,
2. das epidermale Wachstumsfaktor-Homolog EGF, zuständig für die Abtrennung des Liganden,
3. eine sauerstoffbindende Zuckerdomäne, die als Spacer dient,
4. eine membranüberspannende Domäne und
5. ein cytoplasmatischer Rest, welcher an der Internalisierung des LDL-Partikels in *Coated Pits* (spezielle Teile der Zellmembran zur Internalisierung von Makromolekülen) beteiligt ist (Brown und Goldstein, 1986).

Es gibt neun Mitglieder dieser Rezeptorfamilie: der LDL-Rezeptor, LRP, Megalin, VLDL-Rezeptor, apoER2 und sorLA/LRP11, LRP1b, MEGF7, LRP5/6.

Jedes Mitglied wird in verschiedenen Geweben exprimiert und hat ein weites Feld an bindenden Liganden. Fünf dieser Mitglieder sind in der Lage Lipoproteine zu binden: LDL-R, VLDL-R, Megalin, LRP und apoER3 (M.M. Hussain, D.K. Strickland und A. Bakillah, 1999). Im Gegensatz zu der Ligandenbindungsstelle ist die Rezeptorbindungsstelle in vielen Rezeptoren jedoch nicht sequenzhomolog. Man vermutet, dass eine positiv elektrostatisch geladene Oberfläche und nicht primär die Sequenz die Rezeptorbindungsdomäne beeinflusst. Die LDL-Rezeptor-Expressionslevel einer Zelle sind stark abhängig vom Cholesterolangebot.

Bei Cholesterol-Mangel wird die Expression des Rezeptors nach oben reguliert, um die Aufnahme zu steigern und die Versorgung der Zelle sicher zu stellen (Goldstein et al., 1983).



Derfler K Journal für Kardiologie 2002; 9 (7-8): 304-306. ©

Abb. 4: Schematische Abbildung der 5 Abschnitte eines LDL- Rezeptors (Derfler K., 2002)

Tissue	LDL-R	LRP	Megalin	VLDL-R	ApoER2	SorLa/LR11	LRP1b
Leber	xxx	xxx	-	-	-	xx	-
Gehirn	x	xxx	-	x	xxx	xxx	xx
Herz	x		-	xxx	-		-
Intestine	x	x					
Nieren	x	x	xxx	x	-	x	-
Muskulatur	x		-	xxx			
Fettgewebe				xxx			
Adrenalin	xxx	xx	-	x		x	
Lunge	x	xxx	xx	x	-		-
Plazenta	x	x	x	x	xx		-
Ovarien	x	x	x	xx	x	xx	
Testis	x	x	-	xx	x	xx	

Abb. 5: Expression der LDL-Rezeptoren in verschiedenen Geweben (N.S. Chung, K.M.Wasan, 2003)

Apolipoprotein E, natürlicher Ligand des LDL-Rezeptors, hat nur im lipidassoziierten Zustand die richtige Konformation für die Bindung an den LDL-Rezeptor (Innerarity et al., 1979), wobei die Konformation und damit die Rezeptoraffinität von der Lipidzusammensetzung der Lipoproteine moduliert wird (Weisgraber, 1994).

1.1.3.1.2 ApoE

Apolipoprotein E (ApoE) wurde zuerst von Shore et al. 1973 beschrieben und ursprünglich als das „Arginin-reiche Apoprotein“ bezeichnet. ApoE ist ein Mitglied der heterogenen Gruppe von Apolipoproteinen, die in zehn Klassen (A–J) eingeteilt werden. Apolipoproteine sind Carrierproteine, die zusammen mit Lipiden Lipoproteinpartikel bilden, die aus einer hydrophoben Hülle von Lipiden und hydrophilen Seitenketten von Aminosäuren bestehen. Als stabilisierende Proteinkomponenten der Lipoproteine besitzen sie spezifische Funktionen im Lipidtransport, in der Aktivierung bzw. Inhibierung bestimmter Enzyme des Lipidstoffwechsels und in der Rezeptorinteraktion. ApoE ist das strukturell und funktionell am besten charakterisierte Apolipoprotein. Seine Bedeutung geht weit über seine zahlreichen Funktionen im Lipidstoffwechsel hinaus.

1.1.3.1.2.1 Vorkommen, Struktur und Funktion

ApoE kommt vor allem in Triglyzerid-reichen Lipoproteinen, in Chylomikronen sowie in anderen Abbauprodukten, in *Very Low-Density-Lipoproteinen* (VLDL), und in *Intermediate Density-Lipoproteinen* (IDL), aber auch in Cholesterol-reichen *High Density-Lipoproteinen* (HDL) vor. Es wird in verschiedenen Teilen des Körpers synthetisiert. Dreiviertel des Plasma-ApoE's wird in der Leber hauptsächlich von Leber-Parenchymzellen produziert und sezerniert. Ungefähr ein Drittel der Menge des Leber ApoE's wird durch Astrozyten hergestellt. Auch das Gehirn produziert eine große Menge an ApoE. Ebenso kommt ApoE in vielen anderen Organen, wie Lunge, Niere, Milz, in Makrophagen und in der glatten Muskulatur vor (Mahley, 1988). Die normale Plasmakonzentration beträgt 3–7 mg/dl (Mahley et al., 1984).

ApoE ist ein 34,2 kDa großes helikales Protein, das aus 299 Aminosäuren besteht (Rall, Jr et al., 1982). Das ApoE-Gen liegt auf Chromosom 19 und ist 3,7 kb lang. Prinzipiell besteht ApoE aus zwei unabhängigen und unterschiedlich gefalteten, helikalen Domänen: einer globulären N-terminalen Domäne, die die LDL-Rezeptor-Bindungsregion enthält, und einem gestreckten C-Terminus, der für die Lipidbindung verantwortlich ist (Wetterau et al., 1988). In hydrophiler Umgebung und in Abwesenheit lipophiler Oberflächen bildet ApoE über einen großen Konzentrationsbereich hinweg Tetramere, die durch die Selbstassoziation des C-Terminus entstehen (Aggerbeck et al., 1988). Die LDL-Rezeptor-Bindungsregion wurde in der Helix 4 zwischen den Aminosäuren 140 bis 160 lokalisiert (Weisgraber et al., 1983) und ist eine stark konservierte Region. Dieser Bereich weist eine Ansammlung an basischen Aminosäuren auf, die für die elektrostatischen Interaktionen mit der anionischen Bindungsdomäne des Rezeptors verantwortlich und damit essentiell für die physiologische Funktion sind (Brown und Goldstein, 1986). ApoE hat viele Funktionen im Körper. Synthetisiert von der Leber als Teil von VLDL ist es am Transport von Triglyceriden ins Lebergewebe beteiligt. Involviert ist es auch im HDL und fungiert in der Cholesterolverteilung in unterschiedlichen Geweben. Außerdem spielt es eine Rolle im Lipidmetabolismus und bei der Bindung an Rezeptoren. Mit dieser rezeptorvermittelten Aufnahme beginnt die Rolle des ApoE's im intrazellulären Cholesterol-Metabolismus (z. B. Komponenten der Zellmembran). ApoE hat aufgrund seines weitverbreiteten Vorkommens noch weitere Funktionen.

Dazu gehören die Modulation der zellulären Immunantwort (Mahley, 1988), Hemmung der Thrombozytenaggregation (Riddell et al., 1997), Regulation der Steroidhormonsynthese (Reyland et al., 1991) und die Beeinflussung von Wachstum und Differenzierung von Neuronen, wobei ApoE insbesondere bei Reparatur- und Remyelinisierungsprozessen nach Nervenzelltraumen eine wichtige Rolle spielt (Poirier, 1994). Weiterhin wurde schon frühzeitig diskutiert, dass die Interaktion von Lipoproteinen mit der Zellmembran der arteriellen Gefäße einen Beitrag zur Artherosklerose- assoziierten Cholesterolablagerung liefert (Srinivasa et al., 1972).

1.1.3.1.2.2 ApoE und der LDL-Rezeptor im Gehirn und an der BHS

Das Gehirn verfügt über ein autarkes System für die Synthese und den Transport von Lipiden und Cholesterol. Die Anwesenheit von verschiedenen Lipoproteinen, Apolipoproteinen und deren Rezeptoren im Gehirn wurden nachgewiesen (Pitas et al., 1987). Damit ist das Gehirn in der Lage, die Cholesterol- und Lipid-Homöostase eigenständig aufrechtzuerhalten. Störungen dieser Homöostase haben pathologische Auswirkungen und werden unter anderem im Zusammenhang mit der Alzheimerschen Krankheit und anderen neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert (Danik et al., 1999). Das Gehirn besitzt darüber hinaus die Möglichkeit, essentielle Lipide aus dem Plasma aufzunehmen. Dabei spielt insbesondere der LDL-Rezeptor an der BHS, der auf der luminalen Membran des Gehirnkapillarendothels anwesend ist, eine wichtige Rolle (Meresse et al., 1989). Interessanterweise ist die LDL-Rezeptor-Expression auf dem Gehirnkapillarendothel hochreguliert (Dehouck et al., 1994), wohingegen die Expression auf dem Endothel großer Gefäße herunterreguliert ist (Kenagy et al., 1984; Vasile et al., 1983).

Für die Expressionsregulation an der BHS scheinen die Astrozyten eine wichtige Rolle zu spielen. ApoE als Ligand des LDL-Rezeptors ist prinzipiell in der Lage, den Transport von Lipoproteinen über die BHS zu vermitteln. Die Datenlage hierzu ist jedoch unzureichend. Mehrfach konnte gezeigt werden, dass Lipoproteine die BHS passieren können (Urien et al., 1987; Goti et al., 2000; Balazs et al., 2004). Die Beteiligung von ApoE bleibt jedoch unklar; Sicher scheint aber, dass ApoE für den Erhalt der BHS-Funktionen wichtig ist.

Ob ApoE dabei einen LDL-Rezeptor-abhängigen Aufnahmemechanismus initiiert, oder die Bindung der Partikel an das Gehirnkapillarendothel vermittelt und der Arzneistoff folglich aufgrund des Konzentrationsgefälles durch die BHS diffundiert, geht aus diesen Arbeiten nicht klar hervor. ApoE scheint jedoch ursächlich beteiligt zu sein. Die Überexpression des LDL-Rezeptors am Gehirnkapillarendothel im Vergleich zum Endothel großer Gefäße, der transzytotische Transportweg über die BHS und ApoE als hochaffiner Ligand des LDL-Rezeptors ergeben ein viel versprechendes Konzept, das für eine Verbesserung des Arzneistofftransportes über die BHS mittels eines Vektor-Träger-Systems genutzt werden könnte, wobei ApoE oder davon abgeleitete rezeptoraktive Peptide als Vektoren fungieren könnten.

1.1.3.2 Nicht-rezeptorvermittelte Endozytose

Nicht jede Aufnahme von Makromolekülen ist an die Existenz eines Rezeptors gekoppelt, so können elektrostatisch geladene Makromoleküle z.B. von der Zellmembran adsorbiert werden. Diese Art der Internalisierung wird auch adsorptive Endozytose genannt. Da die Verteilung der Oberflächenladung nicht gleichmäßig ist, können nur Moleküle in einem bestimmten Bereich des isoelektrischen Punktes adsorbiert werden. Allgemein werden kationische Moleküle besser adsorbiert. Dies hängt mit der hauptsächlich negativen Ladung der Zellmembran aufgrund der kohlenhydratreichen Glykoproteine zusammen. In welchem Ausmaß diese Adsorption und die anschließende Endozytose stattfinden, ist zelltypabhängig. Beispiele für so aufgenommene Moleküle an der BHS sind kationisiertes Albumin (A.K. Kumagai, J.B. Pardrige und W.M Eisenberg, 1987) und Histon (W.M. Pardrige, D. Triguero und J. Buciak, 1989).

1.1.3.3 Exozytose und Transzytose

Moleküle können auch durch einen Vesikeltransport wieder aus der Zelle ausgeschleust werden. Im Zytosol liegende Vesikel fusionieren dabei mit der Zellmembran und setzen so in ihnen gespeicherte Stoffe frei. Dieser als Exozytose bezeichnete Prozess wird durch eine Sequenz von Protein- Protein- Wechselwirkungen gesteuert.

In polarisierten, als zelluläre Barriere fungierenden Zellen, ist eine kontrollierte Folge von Endo- und Exozytose für den Transport von wichtigen Molekülen essentiell. So wird ein Zu- und Abtransport von wichtigen Molekülen in oder vom Gewebe gewährleistet. Diese Art des Transports durch eine Zellschicht hindurch wird Transzytose genannt (K.E. Mostov und N.E. Simister, 1985). Transzytose wurde an der BHS u.a. auch für LDL (Dehouck et al., 1997), Transferrin (Broadwell et al., 1996) und kationisiertes Albumin (K.R. Smith und R.T. Borchardt, 1989) beschrieben.

1.2 Modellsysteme zur Untersuchung des Arzneistofftransports an der BHS

In den letzten Jahren wurden verschiedene Techniken und Modelle zur Untersuchung von Transportprozessen an der Blut-Hirn-Schranke entwickelt. Generell unterscheidet man zwischen *in-vivo* und *in-vitro* Modellen.

1.2.1 In-vivo

1.2.1.1 Brain uptake index

Der brain uptake index (BUI) wird durch schnelle Injektion einer Mischung aus radioaktiv markierter Test- und Referenzsubstanz in die innere Carotis-Arterie ermittelt (W.H. Oldendorf, 1970). Nach 5-15 Sekunden wird das Versuchstier decapitiert, das Gehirn entnommen und die Radioaktivität bzw. die Konzentration der beiden injizierten Substanzen im Gehirn gemessen. Der BUI wird aus dem Verhältnis von Test- zu Referenzsubstanz im Gehirn und der Injektion (W.M. Pardrige, 1995) berechnet. Aufgrund der kurzen Versuchszeit ist dieses Verfahren nur für Substanzen geeignet, die die BHS schnell überwinden. Hydrophile Substanzen, die nur sehr langsam in das Gehirn aufgenommen werden (z.B. Peptide und Proteine), können mit dieser Methode nicht untersucht werden (Fenstermacher et al., 1981).

1.2.1.2 Gehirnperfusion

Bei dieser Methode wird eine Carotis-Arterie mit Medium und radioaktiv markierter Testsubstanz perfundiert. Anschließend wird das Gehirn entnommen, homogenisiert und die Radioaktivität gemessen. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem fehlenden Blutfluss, so dass die Metabolisierung der Testsubstanz durch Blutbestandteile minimiert werden kann und zudem noch die Möglichkeit einer optimierten Perfusatzusammensetzung besteht (Tamai und Tsuji, 1996). Diese Technik wurde hauptsächlich für die Untersuchung von Ratten und Meerschweinchen entwickelt (Takasato et al., 1984; Zlokovic et al., 1986). Die übliche Perfusionszeit beträgt in der Ratte 30 Sekunden, während im Meerschweinchen, aufgrund der nicht verzweigten Carotis-Arterie, Zeiten bis zu 20 Minuten möglich sind (B.V. Zlokovic, 1990).

1.2.1.3 Capillary Depletion-Methode

Um bei der im Gehirn gemessenen Arzneistoffmenge zwischen Arzneistoff in den Kapillaren und im Extrazellularraum des Gehirns unterscheiden zu können, wurde die *Capillary Depletion*-Methode speziell zur Untersuchung des Transports von Makromolekülen an der BHS via Transzytose von Triguero et al. 1990 entwickelt. Es handelt sich hierbei um eine kombinierte Methode aus Gehirnperfusion nach Takasato mit anschließender *Capillary Depletion*. Hierbei wird das Gehirn nach dem Experiment homogenisiert und durch eine Dextran-Dichte-Zentrifugation in Kapillaren (Pellet) und Hirngewebe (Überstand) fraktioniert (Triguero et al., 1990).

1.2.1.4 Mikrodialyse

Eine Methode, den Arzneistofftransport in den Extrazellularraum des Gehirns zu messen, ist die Mikrodialyse (Terasaki et al., 1991). Hierbei wird ein Dialyseschlauch in das Gehirn implantiert und perfundiert. Nach Injektion der Testsubstanz werden Proben des Perfusats gesammelt und analysiert. Mit dieser Methode sind, je nach Implantation des Schlauches, im Gehirn vielseitige Untersuchungen auch über lange Versuchszeiten (mehrere Stunden) möglich (de Lange, 1995).

1.2.1.5 Tail flick Test

Der *Tail flick Test* wird zur Untersuchung der Sensibilität von Nagern auf Temperaturveränderungen verwendet. Schmerzstillende Substanzen wie z.B. Dalargin können so auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Das Versuchstier wird in eine konische Polypropylen-Röhre mit einer Öffnung für den Schwanz gesetzt.

Eine Variante dieses Testes ist die Exponierung des Schwanzes unter einer Hitzelampe und die Messung der Zeit bis eine Reaktion des Tieres durch Wegziehen des Schwanzes erfolgt. Eine andere Variante ist die Wasserimmersionsmethode, bei der der Schwanz des Versuchstieres zu einem Drittel in ca. 52 °C heißes Wasser gehalten wird. Gemessen wird die Zeit bis dieser wieder aus dem Wasser entfernt wird. Beide Methoden werden zur Untersuchung von spinalen Beeinflussungen des Gehirns verwendet.

1.2.2 In-vitro

Da die *in-vivo*-Situation an der BHS komplex ist, und darüber hinaus weitere Faktoren die Untersuchung der Transportmechanismen erschweren können, wurden verschiedene *in-vitro*-Modelle zur Untersuchung des Arzneistofftransports in das Gehirn etabliert. Dabei unterscheidet man zwischen Primärkulturen und Zelllinien.

1.2.2.1 Isolierte Kapillaren

Die Entwicklung von Methoden zur Isolierung von Kapillaren aus dem Gehirn von Versuchstieren erlaubte erstmals die gezielte Untersuchung von Transportprozessen an der BHS *in-vitro*. Die zur Verfügung stehenden Protokolle zur Isolierung und Aufreinigung der Kapillaren sind vielfältig. Mit ihnen wurden zahlreiche Studien zur Physiologie, Biochemie und Entwicklungsbiologie der BHS durchgeführt.

Vorteil dieses Modells ist, dass der intakte Gewebeverband nicht erst zerstört und später in Kultur wieder zu einem konfluenten Monolayer herangezüchtet werden muss.

Der Verband bleibt intakt, ist der *in-vivo*-Situation also sehr ähnlich (de Boer und Breimer, 1996; Joó, 1985). Allerdings lässt sich mit diesem Modell nicht eindeutig differenzieren, ob die beobachtete Aufnahme in die intakten Kapillarfragmente von der basolateralen (Hirnseite) oder der apikalen (Blutseite) Membran erfolgt (Tamai und Tsuji, 1996).

1.2.2.2 Zellkulturmodelle

1.2.2.2.1 Kapillar-Endothelzellen (Primärzellen)

Neben den isolierten Kapillaren werden Gehirn-Kapillar-Endothelzellen (BCECs; *brain capillary endothelial cells*) als Hauptbestandteil der BHS als Zellkulturmodell verwendet. Sie können aus den Gehirn-Kapillaren isoliert und in Kultur gehalten werden. Es wurde bereits die Kultivierung von primären oder passagierten BCECs aus Maus (de Bault et al., 1979), Ratte (Bowman et al., 1981), Rind (Rubin et al., 1991), Mensch (Biegel et al., 1995) und Schwein (Mischek et al., 1989) beschrieben. Die Isolierung der Zellen erfolgt durch mechanische und enzymatische Dispergierung, gefolgt von Filtrations- und Zentrifugationsschritten. Die Zellen wachsen in unterschiedlich vorbehandelten Kulturgefäßen in einer einzigen Zellschicht heran. Diese Monolayer weisen viele der charakteristischen Eigenschaften der BHS *in-vivo* auf. So konnte gezeigt werden, dass primäre BCECs aus Rinderhirn *tight junctions*, eine geringe Pinozytoseaktivität und ein polarisiertes Wachstum aufweisen (Audus et al., 1987). Auch das Vorkommen charakteristischer Enzyme und Proteine, wie der alkalischen Phosphatase oder des von-Willebrand-Faktors wurde demonstriert (Audus et al., 1986).

Neben der Präparation aus Rinderhirnen hat sich die Präparation von Schweinehirnen durchgesetzt. Material dieser beiden Spezies ist relativ einfach auf Schlachthöfen zu bekommen und eine große Zahl von Zellen (mehr als 10 Mio. Zellen pro Hirn) kann isoliert werden. Dagegen lassen sich aus 6 - 10 Rattenhirnen maximal 5 Mio. Zellen gewinnen (Lechardeur et al., 1997). Menschliches Hirnmaterial steht nur in geringer Menge zur Verfügung, da das Gewebe aus Biopsien stammt (1,0 - 1,8 g).

Darüber hinaus stammen die Gewebeproben aus unterschiedlichen Hirnregionen, was eine Vergleichbarkeit der Experimente erschwert. Zudem erfordert die Arbeit mit lebendem humanem Gewebe wegen der erhöhten Infektionsgefahr besondere Sicherheitsvorkehrungen. Da die Zellen im Laufe der Kultur langsam dedifferenzieren und die typischen Eigenschaften der BHS verlieren, sind Primärkulturen passagierten Zellen vorzuziehen.

1.2.2.2 Zelllinien

Zelllinien werden entweder durch Immortalisierung normaler Zellen oder aus Tumorgewebe gewonnen. Immortalisierte Zellen sind derart verändert, dass spontan aus einer Primärzelllinie eine permanent wachsende Zelllinie entsteht. Sie haben gegenüber isolierten Primärzellen den Vorteil, dass sie sich über längere Zeiträume passagieren lassen, ohne ihre Eigenschaften zu verlieren oder wesentlich zu verändern. Bei Untersuchungen der Blut-Hirn-Schranken Eigenschaften dient neben den endothelzellspezifischen Markern vor allem der transendotheliale elektrische Widerstand der Charakterisierung und Beurteilung der Zellen. Dieser war in Zelllinien für ein *in-vitro* Modell bisher aber im Vergleich zu primär isolierten Gehirn-Kapillar-Endothelzellen nur abgeschwächt zu messen. Während Primärzellen einen Wert von bis zu 1000 $\Omega \times \text{cm}^2$ erreichen, liegt der TEER-Wert bei den untersuchten Zelllinien zwischen 300 und 600 $\Omega \times \text{cm}^2$. Weiterhin sind Zelllinien im Hinblick auf ihre Enzymausstattung und Transportprotein-Funktion meist unzureichend charakterisiert.

1.3 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Verschiedene Strategien können angewendet werden, um die Permeation eines Arzneistoffs durch die BHS zu verbessern. Die Möglichkeiten reichen von Modifikationen des Arzneistoffes, die zu einer unspezifisch erhöhten Membrangängigkeit führen, bis zu spezifischen *Delivery*-Systemen. Grundsätzlich gibt es drei Ansätze für einen Arzneistofftransport ins Gehirn:

1. Invasive Strategie: Hierbei kann die Blut-Hirn-Schranke physikalisch umgangen werden, indem ein Arzneistoffträger direkt ins Gehirn implantiert wird (Frieden 1996).
2. Physiologische Strategien: Diese basieren auf der Kenntnis spezieller Transportvorgänge an der BHS.
3. Pharmakologische Strategien: enthalten Maßnahmen zur Erhöhung der Lipophilie von Arzneistoffen und den Einsatz von partikulären Trägern.

1.3.1 Öffnung der zellulären Barriere

Die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke kann durch Infusion von hypertonen Lösungen erhöht werden (Neuwelt et al., 1994). Durch eine Infusion in die Halsschlagader kommt es offensichtlich zu einer Schrumpfung der Endothelzellen durch die hyperosmotische Lösung und somit zu einem erhöhten Zug auf die interzellulären *tight junctions*, wodurch parazelluläre Kanäle frei werden. Die Folge ist ein erhöhter parazellulärer Transport von Substanzen aus dem Blut ins Gehirn (Frieden, 1996). Durch diese Methode wird die BHS unspezifisch für alle im Blut zirkulierenden Substanzen geöffnet und verliert dadurch kurzfristig ihre Schutzfunktion. Somit ist eine regelmäßige Anwendung mit einem hohen Risiko verbunden.

1.3.2 Erhöhte Lipophilie

Eine Diffusion über die BHS ist abhängig von dem Molekulargewicht und der Lipophilie der zu transportierenden Substanz. So kann die Hirngängigkeit durch das Einfügen von lipophilen Gruppen verbessert werden. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Diacetylierung von Morphin zu Heroin, die eine 25-fach erhöhte Aufnahme ins Gehirn bewirkt (Oldendorf, 1974).

1.3.3 Sequenzieller Metabolismus

Der sequenzielle Metabolismus stellt eine besondere Form der verbesserten Diffusion dar. Der Arzneistoff wird kovalent an 1,4-Dihydrotrigonellinat und zusätzlich an ein lipophiles Trägermolekül gebunden. Das entstehende lipophile Konstrukt ist dann in der Lage, zelluläre Barrieren ebenso wie die BHS zu überwinden.

Eine Rückdiffusion wird durch die Oxidation des Trigonellinats analog zur Oxidation des Coenzym NADH zu NAD⁺ verhindert. So verbleibt die Verbindung im Gehirn und kann durch Hydrolyse der Ester- oder Amidbindungen den Wirkstoff freigeben.

1.3.4 Carrierproteine

Transportproteine werden zum Beispiel für die Behandlung von Parkinson ausgenutzt. L-Dopa ist eine Vorstufe des Neurotransmitters und wird durch einen aktiven Transportweg für neutrale Aminosäuren durch die BHS in das Gehirn transportiert, wo dann die eigentliche Wirkstoffform Dopamin gebildet wird. Dopamin selbst kann die BHS nicht überwinden und wird zudem noch schnell durch Enzyme metabolisiert. Ebenso werden durch dieses Carrierprotein für neutrale Aminosäuren das Zytostatikum Melphalan, der antiepileptisch wirkende Arzneistoff Gabapentin und das Muskelrelaxans Baclofen transportiert. Diese Strategie erfordert jedoch eine hohe strukturelle Übereinstimmung mit den physiologischen Substraten und ist daher nur eingeschränkt anwendbar.

1.3.5 Chimäre Proteine

Chimäre Peptide sind Konjugate aus einem nicht an der BHS transportierten Peptidarzneistoff und einem Vektor, der den Transport in das Gehirn vermittelt (Pardrige, 1991). Als Vektoren dienen Peptide und Proteine, die an der BHS absorptiv oder rezeptorvermittelt endozytiert werden. Basierend auf diesen spezifischen Transportwegen wurden Ligandenkonjugate aus potentiellen Arzneistoffen und Peptiden bzw. Proteinen als Liganden der Rezeptoren an der BHS konzipiert, um einen Transport mittels dieser Vektoren zu ermöglichen. Die Arzneistoffe werden meist kovalent an den Träger gekoppelt.

Zunächst müssen die Ligandenkonjugate aus dem Blut durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Endothelzellen aufgenommen werden und die ca. 300 nm breiten Intrazellulärräume passieren. Anschließend müssen die Konjugate über Exozytose in die Interstitialflüssigkeit des Gehirns abgegeben werden.

Als dritter Schritt schließt sich die Spaltung der Ligandenkonjugate an. Letztlich muss dann der Arzneistoff an seinen Wirkort gelangen. Entscheidend für diese Strategie ist neben der Entdeckung geeigneter Vektoren auch die Kopplung des Arzneistoffes an den Träger, wobei die intrinsische Aktivität erhalten bleibt.

Als experimentelle Vektoren genutzt wurden bisher Insulin (Fukuta et al., 1994), Transferrin und verschiedene weitere Antikörper. Einen entsprechenden Vektor vorausgesetzt, ermöglicht diese Strategie ein selektives *Drug targeting* zum Gehirn.

1.3.6 Partikuläre Trägersysteme

Der Vorteil von partikulären Arzneistoffträgern liegt neben der hohen Transportkapazität in der Möglichkeit, über die Wahl der Trägerpolymere und der Herstellungsbedingungen der Partikel, unterschiedliche Arzneistoffe transportieren zu können (Borchardt, 1997). Die Anforderungen an ein ideales Trägersystem sind neben einer einfachen Herstellung eine hohe Beladungskapazität für Arzneistoffe unterschiedlichster Art, dem Schutz dieser Ladung vor Abbau und den Verbleib der Ladung am Zielort. Es sollte zudem noch untoxisch, biodegradierbar sein. Außerdem sollte es den Wirkstoff in aktiver Form in einer gewünschten Geschwindigkeit und in angemessener Konzentration freisetzen. Um die Spezifität des Arzneistofftransports ins Gehirn zu gewährleisten, müsste die Oberfläche der partikulären Träger funktionalisiert (Kopplung von Antikörpern oder spezifischen Liganden) oder das Konzept der differenzierenden Adsorption realisiert werden.

1.3.6.1 Liposomen

Liposomen sind kugelförmige kolloidale Vesikel, die einen wässrigen Innenraum mit einem oder mehreren Lipidbilayern umschließen. Sie bilden sich oberhalb der kritischen Mizellbildungs-Konzentration spontan, indem sich die lipophilen Molekülteile zueinander organisieren und gleichzeitig die hydrophilen Gruppen auf beiden Seiten die lipophile Schicht gegen das wässrige Medium abschirmen. Schon bald nach der erstmaligen Beschreibung der spontanen Vesikelbildung durch Bangham et al. 1965 wurde das Potential der Liposomen als Modellsystem zur Untersuchung von Biomembranen und als Arzneistoffträger erkannt. Heute sind folgende Anwendungen für liposomale Arzneistoffe beschrieben:

- Als System für Solubilisierung schlecht wasserlöslicher Substanzen
- Zur Erhöhung der Plasmahalbwertszeit von Substanzen, die in der Zirkulation schnell biotransformiert bzw. deaktiviert werden
- Zur Vermeidung toxischer Nebenwirkungen durch eine modifizierte Biodistribution
- Als System für eine verzögerte Wirkstofffreigabe und eine erhöhte Bioverfügbarkeit
- Für ein passives *Targeting* von Tumoren und Infektionsherden infolge einer erhöhten Kapillarpermeabilität
- Für ein organspezifisches *Targeting* durch liposomale Konjugate mit Vektoren, die an bestimmten Epitopen der Zielzellen binden.

1.3.6.2 Nanopartikel

Unter Nanopartikeln versteht man kleine feste Körper aus Polymeren im Größenbereich von 10 nm bis 1 µm. Diese können auf unterschiedliche Weise dargestellt und mit Arzneistoffen beladen werden (Kreuter, 1991; 1983). Die Materialien, die für ihre Herstellung verwendet werden, können synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein. Arzneistoffe können an das Trägersystem sowohl adsorptiv als auch kovalent an die Oberfläche gebunden sein, oder auch in die Partikelmatrix eingeschlossen werden (Kreuter, 1991; 1994). Als kolloiddisperses System zeigen sie *in vivo*, ähnlich wie Liposomen, eine hohe Affinität zu den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES).

Durch Adsorption von Tensiden an die Oberfläche der Nanopartikel kann die Aufnahme in das RES vermindert und die Plasmahalbwertszeit erhöht werden. Darüber hinaus konnte mit Polysorbat 80 eine erhöhte Aufnahme in kultivierte Gehirn-Kapillar-Endothelzellen festgestellt werden (Borchard et al., 1994). Nanopartikel, die mit dem Enkephalin-analogen Peptid, Dalargin, beladen waren führten nach einer Polysorbat 80- Beschichtung zu einer Analgesie in Mäusen (Kreuter et al., 1995). Dieser Effekt konnte ebenso mit dem Opioid-Rezeptor-Antagonisten Loperamid erreicht werden, der durch seine Impermeabilität an der BHS bei normaler Applikation keine analgetische Wirkung zeigt (Alyautdin et al., 1997). Im Laufe der folgenden Jahre gab es Anzeichen dafür, dass Polysorbat 80 eine Affinität zu Apolipoprotein E aufweist. Somit ist denkbar, dass die Nanopartikel durch die Beschichtung mit Polysorbat 80 im Blut Apolipoprotein E adsorbieren und über den LDL-Rezeptor ins Gehirn geschleust werden. Jedoch ist der Teil der Nanopartikel, der das Gehirn erreicht, auch nach der Polysorbat 80-Behandlung im Vergleich zu anderen Organen gering (Löbenberg et al., 1998).

1.3.6.2.1 Polybutylcyanoacrylat (PBCA)-Nanopartikel

Untersuchungen zur Entwicklung nanopartikulärer Systeme erstreckten sich in den letzten Jahrzehnten hauptsächlich auf Experimente mit Nanopartikeln aus synthetischen Polymeren, wie Polyacrylat und Polystyrol. Nanopartikel aus synthetischen Polymeren können in der Regel nur sehr langsam aus dem Körper eliminiert werden. Ausnahme bilden hierbei die Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel, welche eine sehr schnelle Biodegradation aufweisen. Sie werden sehr schnell abgebaut, jedoch entsteht bei ihrem Abbau möglicherweise toxisches Formaldehyd (Lenaerts et al., 1984; Vezin et al., 1980). Die in dieser Arbeit verwendeten Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel wurden hergestellt aus dem Butylcyanoacrylat-Monomer durch Emulsions-Polymerisation. Diese Reaktion beinhaltet die Dispersion des flüssigen Monomers in der wässrigen Phase und die Bildung von Partikeln (Kreuter J., 1994).

1.3.6.2.2 *Humanes Serumalbumin-Nanopartikel*

Das Problem der Biodegradation und der Entstehung toxischer Nebenprodukte besteht bei proteinbasierten Partikeln nicht. Daher stellen Nanopartikel auf der Basis von humanem Serumalbumin eine interessante Alternative dar. Aufgrund der definierten Primärstruktur von Proteinen bieten diese Partikel mehrere Möglichkeiten zur Oberflächenmodifikation und kovalenter Bindung von Arzneistoffen. Diese Partikel werden mittels einer etablierten Desolvatationsmethode (Weber et al., 2000) hergestellt. Albumin ist ein wasserlösliches Blutplasma Protein, welches in der Leber produziert wird und einen großen Teil der Plasmaproteine ausmacht. Die normale Albuminkonzentration im menschlichen Blut liegt zwischen 3,5 und 5,0 g/dl und macht damit ca. 60 % aller Plasmaproteine aus.

Serumalbumin koaguliert bei Hitze und ist essentiell für die Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks zwischen intravaskulären Kompartimenten und dem Körpergewebe. Zudem dient es als natürliches Transportsystem für Fettsäuren und anderen wasserunlöslichen Molekülen, darunter auch verschiedene Medikamente. So hat Serumalbumin Einfluss auf die Verteilung dieser Substanzen im Körper. Albumin ist negativ geladen, und durch die ebenfalls negative Ladung der glomerulären Basalmembran wird die Filtration von Albumin in den Urin verhindert. Aufgrund der Menge des Proteins im Blutplasma und der einfachen Aufreinigung war Serumalbumin eines der ersten, gut charakterisierten Proteine des menschlichen Körpers. Serumalbumin kann in Kultur verwendet die Stabilität von Enzymen erhöhen und vereinfacht so Experimente *in-vitro*.

1.3.6.2.2.1 Spezifisches Drug Targeting durch oberflächenmodifizierte Nanopartikel

Neben einem verbesserten Wirkstofftransport ermöglichen Nanopartikel ein spezifisches *Drug Targeting*. Darunter versteht man ein Verfahren bei dem der Transport von Arzneistoffen selektiv zu einem bestimmten Zielorgan oder-gewebe erfolgt (Akasaka et al., 1988). Es gibt unterschiedliche Formen des *Drug targeting*:

1. passives *Drug Targeting*, welches auf einer Partikelaufnahme durch das RES resultiert,
2. physikalisches *Targeting*, bei welchem der Wirkstoff unter Einwirkung von außen freigesetzt wird z. B. magnetische Nanopartikel (Widder et al., 1983) und
3. das aktive *Drug Targeting*, wobei Liganden an die Partikeloberfläche gebunden werden, um ein zellspezifisches Trägersystem zu produzieren (Dinauer et al., 2005).
Diese Art des *Drug Targetings* scheint die bisher erfolgreichste zu sein. Insbesondere im Bereich der Lektin-Bindung (Ezpeleta et al., 1999; Hussain et al., 1997) und des Antikörperinduzierten *Targetings* (Kreuter, 1994; Wartlick et al., 2004) wurden große Fortschritte gemacht.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Problem der Behandlung von Erkrankungen des Gehirns liegt im unzureichenden Arzneistoff-Transport über die Blut-Hirn-Schranke. Durch den Einsatz von nanopartikulären Strukturen als potentielle Wirkstoffträger soll untersucht werden, ob diese in der Lage sind, eine zelluläre Barriere wie die BHS zu überwinden.

Es sollen zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden.

- I. PBCA-Nanopartikeln als Transportvektoren in einem *in-vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke
- II. Transport von HSA-Nanopartikeln durch ein zelltypspezifisches *Targeting*

Bei der Testung von PBCA-Nanopartikeln als Transportvektoren soll ein *in-vitro* Zellkulturmodell etabliert werden. An diesem Modell wird der Einfluß von PBCA-Nanopartikeln auf die Zellen getestet und der Transport von fluoreszenzmarkierten PBCA-Nanopartikel, sowie freier Substanz in diesem System verfolgt und bewertet.

Unter dem Gesichtspunkt des zelltypspezifischen *Targeting* soll das Potential der Wirkstoffträger aus der Gruppe der ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikel untersucht werden. Bei der Testung von ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikeln liegt der Schwerpunkt zum einen im Auffinden eines geeigneten Systems, die effektive Aufnahme der ApoE-PEG-NP in die Zellen, sowie die Charakterisierung des beteiligten Mechanismus.

Es soll die Hypothese eines LDL-Rezeptor-vermittelten Transports von ApoE-modifizierten Nanopartikeln in Gehirn-Kapillarendothelzellen und somit einen Transport über die BHS überprüft werden.

Darüber hinaus soll das Heparansulfat-Proteoglykan auf eine mögliche Rolle bei der spezifischen Bindung von ApoE-PEG-NP untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Material

Biowizard, Kojair® Werkbank

W.H. Mahl, Kaarst

Um die Zellkulturen vor schädlichen Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu schützen, wurden alle Arbeiten mit solchen Kulturen in sterilen Werkbänken durchgeführt. Wegen der potentiellen Infektionsgefahr der primären Kulturen erfolgten die Aufarbeitung der Gehirne und die Kultivierung von Endothelzellen in Zellkulturlaboren der Sicherheitsstufe S2.

2.1.1 Mycoplasmen-PCR

Material

Lysis- Mix (PCR):

<i>0, 45 % NP40</i>	<i>45 µl</i>	<i>ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA</i>
<i>0, 45 % TWEEN® 20</i>	<i>45 µl</i>	<i>ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA</i>
<i>dH₂O</i>	<i>add 10 ml</i>	

Taq PCR Core Kit

Quiagen, Hilden

Proteinase K (10mg/ml)

ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA

Myco_f1 *5'TCC ATG TGA AGC GGT GAA ATG C 3'* *MWG, Ebersberg*

Myco_r1 *5'TGA CCA AAC ATC TCA GGA CAC G 3'* *MWG, Ebersberg*

Agarose

Appligen, Illkirch, France

TBE- Puffer:

0,5 TBE aus 5x TBE 1:10 verdünnt

54 g Trisbase

Roth, Karlsruhe

27,5 g Borsäure

Roth, Karlsruhe

4,15 g EDTA

Merck, Darmstadt

Add 1l ddH₂O

100bp Ladder

NEB, Ipswich, MA

PCR- Cyclor

Biometra, Göttingen

Gel- Kammer

Biorad, München

Um eine Kontamination mit Mycoplasmen auszuschließen, wurden sämtliche Zelllinien in einer Mycoplasmen-PCR getestet. Dafür wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen gezählt und in 50 µl ddH₂O aufgenommen. Diese Zellen wurden mittels eines Lysis-Mix (0,45 % NP₄O + 0,45 % Tween 20 ad 10ml ddH₂O) lysiert. 250 µl dieses Lysis-Mix wurden mit 5 µl Proteinase K gemischt und für 60 Minuten bei 100°C auf den Zellen inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation von 10 Minuten bei 100°C wurden die Zellproben auf Eis gelagert und in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Mastermix:	9,2 µl	ddH ₂ O
	2,5 µl	10x Puffer
	0,6 µl	dNTPs
	5 µl	je Primer
	0,125 µl	Taq Polymerase

	22,5 µl + 2,5 µl	Zell-Lysat

Programm: 94°C 2 min

94°C	30 sec	 x35
65°C	45 sec	
72°C	45 sec	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Anschließend wurden die Proben mit 3 µl Loading Solution gemischt und auf ein 1%iges TBE-Agarose-Gel aufgetragen. Als interne Kontrolle wurde ein 100bp-Ladder als Marker benutzt.

2.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Material

<i>1x Phosphate buffered saline (PBS)</i>	<i>Biowithaker™, Verviers, Belgien</i>
<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	<i>Biowithaker™, Verviers, Belgien</i>
<i>RPMI 1640</i>	<i>Biowithaker™, Verviers, Belgien</i>
<i>Endothelial Cell Growth Medium MV</i>	<i>Promocell®, Heidelberg</i>
<i>DMEM Phenolrotfrei</i>	<i>Biowithaker™, Verviers, Belgien</i>
<i>Penicillin/Streptomycin (10 000 µg/ml)</i>	<i>Biowithaker™, Verviers, Belgien</i>
<i>L- Glutamin (200 mM)</i>	<i>Biowithaker™, Verviers, Belgien</i>
<i>MEM Non essential amino acid solution (100x)</i>	<i>Gibco™, Karlsruhe</i>
<i>Sodium Pyruvat MEM 100mM</i>	<i>Gibco™, Karlsruhe</i>
<i>Natrium Bicarbonat (7,5%)</i>	<i>Biowithaker™, Verviers, Belgien</i>
<i>Fetal bovine serum (0,02µm, steril)</i>	<i>PAN Biotech GmbH,</i>
<i>Supplement- Mix MV</i>	<i>Promocell®, Heidelberg</i>
<i>Trypsin EDTA 1x</i>	<i>Gibco™, Karlsruhe</i>
<i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i>	<i>Serva, Heidelberg</i>

<i>Trypan- Blau</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
<i>Brutschrank Cytoperm</i>	<i>Heraeus, Hanau</i>
<i>Kühlschrank, glassline</i>	<i>Liebherr, Biberach</i>
<i>Gefrierschrank, glassline</i>	<i>Liebherr, Biberach</i>
<i>Wasserbad</i>	<i>Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel</i>
<i>Casy Cellcounter</i>	<i>Schärfe System GmbH, Reutlingen</i>
<i>Vortex Genie 2™</i>	<i>Bender und Hobein, Zürich, Schweiz</i>
<i>Autoklav</i>	<i>Biomedis, Giesen</i>
<i>Mikroskop, DMIL</i>	<i>Leica, Bensheim</i>
<i>Zählkammer</i>	<i>KOVA Lasstic Hycor,</i>

<u>Zelllinie</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Herkunft</u>
<i>Caco 2</i>	<i>Humane Kolon- Adenocarcinomzellen</i>	<i>Georg- Speyer Haus Frankfurt</i>
<i>MDCK</i>	<i>Nierenzellen des Cockerspaniels</i>	<i>Georg- Speyer Haus Frankfurt</i>
<i>HeLa</i>	<i>Humane Zervixkarzinomzellen</i>	<i>Georg- Speyer Haus Frankfurt</i>
<i>293T</i>	<i>Humane, embryonale Nierenepithelzellen</i>	<i>Georg- Speyer Haus Frankfurt</i>
<i>HepG2</i>	<i>Hepatoblastomzellen</i>	<i>Georg- Speyer Haus Frankfurt</i>
<i>9L</i>	<i>Ratten-Gehirntumorzellen</i>	<i>Georg- Speyer Haus Frankfurt</i>
<i>BaG1-3</i>	<i>Humane Fibroblastenzellen</i>	<i>Molekulare Pharmakologie, Berlin</i>
<i>HDMEC</i>	<i>Humane mikrovaskuläre Hautendothelzellen</i>	<i>Promocell, Heidelberg</i>
<i>bEnd3</i>	<i>Maus- Gehirn Endothelzellen</i>	<i>ATTC</i>

Puffer und Nährmedien

<u>Zelllinien</u>	<u>Grundmedium</u>	<u>Zusätze</u>
<i>CaCo 2/ MDCK/ 9L</i>	<i>DMEM</i>	+ 10% FCS + 2% L-glutamin + 1% Pen/Strep + 1% Non essential amino acids
<i>HeLa/ 293T</i>	<i>DMEM</i>	+ 10% FCS + 2% L-Glutamin + 1% Pen/Strep
<i>HepG2/ HepG2- LDL/ HepG2 LDL II</i>	<i>RPMI 1640</i>	+ 10% FCS + 2% L-Glutamin + 1% Pen/ Strep
<i>BaGI- 3</i>	<i>DMEM</i>	+ 10% FCS + 2% L-Glutamin + 1% Pen/ Strep + 1% Natrium-Bicarbonat
<i>HDMEC</i>	<i>Endothelial Cell Growth Medium MV</i>	<i>Supplement Mix MV</i>
<i>bEnd 3</i>	<i>DMEM</i>	+ 10% FCS + 2% L-Glutamin + 1% Pen/Strep + 1% Sodium Bicarbonat

2.1.2.1 Vorbereitung der Zellkulturgefäße

Material

Kultur-, Reaktions- und Verbrauchsgefäße wurden ebenso wie Pipetten von den Firmen Costar, BD Falcon, Greiner, Gilson, Sarstedt und Codan bezogen. Die verwendeten Filtereinheiten stammten von der Firma Millipore.

Lab- Tek® Chamber Slide™ System

*Electon microscopy science,
Hatfield, PA*

Transwell-Kulturplatten

Corning Inc., Kaiserslautern

Abhängig vom geplanten Versuch wurden Zellkulturgefäße aus Polystyrol in verschiedenen Größen verwendet. Die Kultur der Primärzellen erfolgte in collagenisierten Kulturgefäßen (Coaten: siehe Absatz 2.1.3.). Für mikroskopische Untersuchungen wurden *Chamber Slides* verwendet. Transportuntersuchungen fanden im Transwell-System von Costar statt.

2.1.2.2 Allgemeines Verfahren zur Kultivierung

Kultur-, Reaktions- und Verbrauchsgefäße wurden ebenso wie Pipetten von den Firmen Costar, BD Falcon, Greiner, Gilson, Sarstedt und Codan bezogen.

Casy Counter

Schärfe System GmbH, Reutlingen

Megafuge 1.0 R

Heraeus, Hanau

Tiefgefrorene Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in erwärmtes Medium pipettiert, um die toxische Wirkung, des Einfriermediums mit DMSO, abzustoppen. Um das für die Zellen toxische Einfriermedium zu entfernen und eine weitere Kultivierung zu ermöglichen, wurden die Zellen bei 1200rpm für 10 Minuten abzentrifugiert (Megafuge 1.0 R). Das Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes im für die jeweiligen Zellen entsprechenden Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert, und es erfolgte die weitere Kultivierung nach dem Protokoll der einzelnen Zelllinien.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen wie folgt passagiert:

Die Zellen wurden mit erwärmtem PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA bedeckt und bei 37°C im Brutschrank gelöst. Es folgte das Aufnehmen der Zellen mit Medium zum Abstoppen der Trypsin- Reaktion und die Zentrifugation der Zellen für 10 Minuten bei 1200 rpm (Megafuge 1.0 R).

Mittels Casy- Counter der Firma Schärfe System GmbH wurde die genaue Zellzahl der abzentrifugierten Zellpellets bestimmt. Die Zellen konnten anschließend in gewünschter Zellzahl in Zellkulturgefäße ausgesät werden.

2.1.3 Isolierung und Kultivierung von Kapillarfragmenten

Als Ausgangsmaterial dieser Arbeit wurden sowohl Schweine-, als auch Rinderhirne verwendet. Vorteile der Verwendung von Schweinehirnen sind folgende:

1. Zwischen dem menschlichen und dem Schweinegenom besteht eine große Homologie (Gellin et al., 2000)
2. Das Schwein, wie auch der Mensch zählen zu den Omnivoren (Allesfresser), wodurch Ähnlichkeiten in diversen Stoffwechselfvorgängen der beiden Spezies bestehen (Tewes et al., 1997)
3. Bereitstellung der Schweinegehirne von einem örtlichen Metzger

Material

Dispase-Lösung (10 U/ml):

4 g Dispase II

Roche, Mannheim

200 ml PBS

5 ml HEPES Buffer solution 1M

Gibco®, Karlsruhe

Am nächsten Tag steril filtrieren

Collagenase-Lösung :

Collagenase II

Biochrom KG,

in 60 ml PBS steril filtrieren und aliquotieren

bFGF(recombinant human fibroblast growth factor-basic)- Lösung:

<i>50 000 Units Heparin Potassium Salz</i>	<i>ICN Medicals Inc., Ohio, USA</i>
<i>in 5 ml PBS lösen</i>	
<i>50 µg bFGF</i>	<i>Tebu, Offenbach</i>
<i>in 5 ml Heparin- Lösung aufnehmen</i>	

DNase I-Lösung:

<i>DNase I (0,1 U/ml)</i>	<i>Boehringer, Ingelheim</i>
<i>In 5 ml DMEM aufnehmen</i>	

<i>Percoll</i>	<i>Biochrom AG, Berlin</i>
<i>Collagen IV- Stammlösung</i>	<i>Sigma- Aldrich, Schnelldorf</i>
<i>Medium 199 with Earle´s salts</i>	<i>Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
<i>Sodium Pyruvat</i>	<i>Gibco TM, Karlsruhe</i>
<i>Gentamycin</i>	<i>Biochrom AG, Berlin</i>
<i>Foetal Calf Serum</i>	<i>PAA, Linz, Österreich</i>

<i>Vakuumpumpe</i>	<i>KNF Laborport, Freiburg</i>
<i>Shaker KS- 15</i>	<i>Edmund Bühler, Tübingen</i>
<i>Heater TH- 15</i>	<i>Edmund Bühler, Tübingen</i>
<i>Minifuge RF</i>	<i>Heraeus, Hanau</i>
<i>Megafuge 1.0 R</i>	<i>Heraeus, Hanau</i>
<i>Avant- J-20</i>	<i>Beckmann, Dreieich</i>
<i>Waage Typ 1507</i>	<i>Sartorius, Göttingen</i>

<i>Einmal Skalpell</i>	<i>Swann- Morton, Sheffield England</i>
<i>Cell Strainer (40µm)</i>	<i>BD Falcon TM, Belgien</i>
<i>Transwell- Kulturplatten</i>	<i>Corning Inc., Kaiserslautern</i>

<u>Primärzellen</u>	<u>Grundmedium</u>	<u>Zusätze</u>
<i>bBCEC/ pBCEC</i>	<i>M 199</i>	<i>+ 10% FCS</i> <i>+ 1% Gentamycin</i> <i>+ 2% L-Glutamin</i> <i>+ 1% Sodium Pyruvat</i> <i>1/1000 bFGF</i>

Die Isolierung von Hirnkapillarendothelzellen wurde erstmals von Bowman et al. 1981 beschrieben und beruht auf einer vierstufigen Grundstruktur: dem primären Enzymverdau, einem diskontinuierlichen Dichtegradienten, einem sekundären Enzymverdau und letztlich einem kontinuierlichen Dichtegradienten.

Im ersten enzymatischen Schritt macht man sich den relativ geringen Anteil von Kollagen in der extrazellulären Matrix der Kapillare zunutze. Mit der unspezifischen Protease Dispase wird die extrazelluläre Matrix fast vollständig abgebaut, während die Blutgefäße, die durch eine kollagenhaltige Basalmembran geschützt sind, unversehrt bleiben. Im zweiten enzymatischen Schritt wird die Basalmembran durch Collagenase abgebaut, was zu einer Freisetzung der Endothelzellen führt.

Frische Schweine- und Rinder-Gehirne wurden von einem lokalen Schlachter bezogen und bis zur Verarbeitung in PBS mit einem Zusatz von 1% Gentamycin aufbewahrt. Vor der Präparation wurden die Gehirnhälften gründlich mit PBS gereinigt, um eine spätere Kontamination der Kulturen mit Bakterien und Pilzen aufgrund der unsterilen Entnahme möglichst gering zu halten. Die Präparation beginnt mit der Abnahme der Hirnhaut, Entfernen des Kleinhirns, dem Plexus choriodeus und der äußeren Blutgefäße. Die freigelegte graue Substanz wird dann in kleinen Teilen vorsichtig abgenommen und zur weiteren Kapillarfragment-Isolierung herangezogen.

Protokoll

Vor der eigentlichen Präparation wurden die Percoll-Dichtegradienten hergestellt und die *Transwell*-Platten für das spätere Aufbringen der Zellen mit Collagen IV gecoatet.

Dichtegradienten:

1. Kontinuierlicher Dichtegradient:

24 ml Percoll mit 15 ml PBS mischen und 45 min bei 21 °C und 14500 x g ohne Bremse zentrifugieren (Avant J- 20, Rotor JA 12)

2. Diskontinuierlicher, stehender Dichtegradient:

20 ml Percoll gemischt mit 30 ml DMEM

Coaten:

Zum Coaten wurde Collagen IV verwendet. Die Collagen-Stammlösung wurde 1:5 mit PBS verdünnt. Es wurde dann je 200 µl zum Bedecken der Membran im Tanswell eingesetzt.

Die Menge des abgenommenen Gewebes wurde in derselben Menge Dispase-Lösung resuspendiert und 70 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler (Shaker KS-15) inkubiert. Nach 30M- 40 Minuten wurde nochmals resuspendiert. Anschließend erfolgte die Trennung von Bindegewebsbestandteilen und Kapillarfragmenten durch den diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten (Ansatz siehe Material). Dafür wurde Gewebehomogenisat in dem zuvor hergestellten diskontinuierlichen Dichtegradienten resuspendiert und 20 Minuten bei 4000 rpm und 4°C ohne Bremse zentrifugiert (Minifuge 1.0 R). Nach dem Entfernen fetthaltiger Gewebereste wurden die Kapillarfragmente, die sich in einer Schicht über dem Pellet mit den Erythrozyten befinden, abgenommen und mit 50 ml DMEM in ein neues Falcon überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 1600 rpm und 4°C (Minifuge 1.0 R). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 1 ml Collagenase-Lösung resuspendiert und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 10 Minuten wurde die Suspension erneut resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 5 ml DNase-Lösung mit anschließender 3-minütiger Inkubation bei 37°C.

Zum Beenden der enzymatischen Reaktion wurden die in der Collagenase-Lösung freigesetzten Zellen durch einen *Cell-Strainer* zusammen mit 50 ml DMEM in 50 ml Reaktionsgefäße überführt, durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 1600rpm und 4 °C (Minifuge 1.0 R) sedimentiert und der vereinigte Ansatz in 1 ml DMEM auf den vorbereiteten kontinuierlichen Percoll-Gradienten geschichtet und 10 Minuten bei 2600 rpm und 10°C ohne Bremse (Minifuge 1.0 R) zentrifugiert. Die Endothelzellen wurden hier als mittlere Bande angereichert und konnten von den Erythrozyten in der unteren Bande und der oberen fettreichen Schicht gut getrennt werden. Es folgte ein Waschschrift der Interphase mit PBS durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1100 rpm und 4°C (Minifuge 1.0 R). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in geeigneter Menge Medium aufgenommen.

2.1.4 Kultivierung von BCECs

Material

Brutschrank Cytoperm

Heraeus, Hanau

Kultur-, Reaktions- und Verbrauchsgefäße wurden ebenso wie Pipetten von den Firmen Costar, BD Falcon, Greiner, Gilson, Sarstedt und Codan bezogen.

Transwell- Kulturplatten

Corning Inc., Kaiserslautern

Primärzellen

Grundmedium

Zusätze

bBCEC/ pBCEC

M 199

+ 10% FCS

+ 1% Gentamycin

+ 2% L- Glutamin

+ 1% Natrium Pyruvat

1/1000 bFGF

BCECs wurden in M199 im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Der erste Mediumwechsel bei den Primärkulturen erfolgte 24 Stunden nach Aussaat der Zellen in Kulturflaschen und 6-, 12- und 24-*well*-Platten.

Bei Kultivierung der Zellen auf einer gecoateten Transwell-Membran erfolgte ein Mediumwechsel schon 1 Stunde nach Präparationsende und dem Aussäen der Zellen. Im Folgenden wurde das Nährmedium jeden zweiten Tag in Kultur gewechselt. Nach 3 Tagen in Kultur (75 - 80% Konfluenz) war ein Passagieren der Endothelzellen möglich. 48 Stunden vor den Rezeptoruntersuchungen (siehe Absatz 2.2., 2.3.) wurde das serumhaltige Kulturmedium gegen serumfreies Kulturmedium ausgetauscht. Bei den Transportuntersuchungen (siehe Absatz 2.6.2) wurde das Medium gegen phenolrotfreies Medium ersetzt. Die Versuche wurden standardmäßig nach 7 Tagen in Kultur durchgeführt.

2.1.5 Charakterisierung von Endothelzellen anhand endothelzellspezifischer Marker

Material

<i>Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE 300</i>	<i>Nikon, Heidelberg</i>
<i>Anti- ZO-1 (Ratte, monoklonal)</i>	<i>Chemicon, Hampshire, UK.</i>
<i>Anti-ZO- FITC (Maus, monoklonal)</i>	<i>Zymed, Karlsruhe</i>
<i>Anti vWF (Maus, monoklonal)</i>	<i>DAKO, Hamburg</i>
<i>Goat- anti rat- FITC</i>	<i>Zymed, Karlsruhe</i>
<i>Goat- anti mouse- FITC</i>	<i>Oncogene, San Diego, USA</i>
<i>Paraformaldehyd (PFA)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Methanol</i>	<i>Roth, Karlsruhe</i>
<i>Ethanol</i>	<i>Roth, Karlsruhe</i>

Die Charakterisierung sowohl der bovinen als auch der porcinen BCECs erfolgte mittels immunocytochemischer Fluoreszenzfärbung. Anhand dieser Färbung wurde die Expression des endothelzellspezifischen Marker, Von-Willebrand-Faktor (vWF), und der Nachweis zu vollständig ausgebildeten *tight junctions* in den Monolayern durch das *tight junctions*- assoziierte Protein Zonula occludens (ZO-1) nachgewiesen.

2.1.5.1 von Willebrand Faktor (vWF)

Der vWF ist ein plasmatischer Cofaktor der Blutplättchenaggregation. Er wird vom Gefäßendothel und den Megakaryozyten gebildet. Die Funktion des vWF besteht im Schutz des Faktor VIII vor unspezifischem Abbau, der Stabilisierung von Faktor VIII im Plasma, der Beeinflussung der Immunogenität von Faktor VIII und der Beeinflussung der Immunogenität von Faktor VIII. Der vWF ist ein Teil des Faktor VIII- Molekülkomplexes. Er setzt sich aus Dimer bildenden Untereinheiten von 220000 D zusammen. Aggregate aus 30 – 40 Dimeren bilden die multimere Struktur eines vWF-Moleküls, welches die Adhäsion der Thrombozyten an das Subendothel oder die Aggregation der Thrombozyten über Membranrezeptoren sichert. Damit ist der vWF ein wichtiger Faktor bei der primären Hämostase.

Protokoll:

Der postkonfluente BCEC-Monolayer wurde durch eine 15-minütige Inkubation der Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) bei 37°C fixiert. Es folgten ein Waschschriff und die eigentliche immunocytochemische Färbung. Das Präparat wurde zuerst 1 Stunde bei 37°C mit foetalen Kälberserum (FCS) inkubiert bevor die Zugabe des Primärantikörpers (235mg/l) gegen das nachzuweisende Protein in einer Verdünnung von 1:100 erfolgte. Der Antikörper inkubierte über Nacht bei 4°C. Es folgten mehrere Waschschriffe mit PBS und die Zugabe des FITC-markierten Sekundärantikörpers (Goat-anti-mouse-FITC). Auch diese Inkubation erfolgte über Nacht und wurde wiederum durch mehrere Waschschriffe mit PBS beendet. Die Visualisierung der Präparate erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop. Als Kontrollen wurden Zellen der humanen intestitiellen Epithelzelllinie CaCo-2 verwendet.

2.1.5.2 ZO-1

ZO-1 ist ein peripheres Membranprotein. Es ist assoziiert mit einem *tight junction* Protein (zonula occludens), welches an der cytoplasmatischen Oberfläche von epithelialen und endothelialen Zellmembranen gefunden werden kann. ZO-1 kommt in zwei Isoformen vor, welche die Basis der zwei unterschiedlichen Klassen von *tight junctions* bilden.

Protokoll:

Die Färbung auf das *tight junction*-assoziierte Protein ZO-1 erfolgte nach einer Fixierung der Zellen mit -20°C kaltem Methanol. Nach dem Waschen mit PBS und der Inkubation mit foetalem Kälberserum erfolgte die Behandlung der Präparate mit dem Antikörper. Im Gegensatz zu der Färbung auf den vWF wurde hierbei neben dem nicht-markierten Primärantikörper (Anti- ZO-1, Chemicon) auch ein markierter Primärantikörper (Anti- ZO- 1- FITC, Zymed) verwendet wodurch die Visualisierung schneller erfolgen konnte. Der verwendete Sekundär- Antikörper war derselbe wie bei der Färbung auf den vWF.

2.1.5.3 TEERMaterial*Endohm 12**WPI, Sarasota Florida, USA**Millicell ® ERS**Millipore**Transwell- Kulturplatten**Corning Inc., Kaiserslautern**Histamin**Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf**Hydrokortisol**Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf*

Der transendotheliale elektrische Widerstand (*transendothelial electrical resistance*, TEER) wurde an auf Filtereinsätzen kultivierten BCECs mit Hilfe eines Widerstandsmessgerätes (MILLICELL ERS) in Kombination mit einer speziell an die *Transwell*-Einsätze angepassten Kammer-Ringelektrode (ENDOHM-12) bestimmt.

Für die Messung selbst wurde die Elektrode mit TEER-Messmedium (unsupplementiertes DMEM + 25 mM HEPES) gefüllt und das zu messende *Insert* eingesetzt. Das System arbeitet mit Wechselstrom, um eine Elektrolyse des Messmediums zu verhindern. Von den so erhaltenen Werten wurde der Blindwert (Widerstand des beschichteten Filters) abgezogen, und der resultierende Wert wurde mit der Filterfläche multipliziert, so dass sich der TEER in der Einheit Ohm x cm² ergab. Die in dieser Arbeit angegebenen Werte bilden grundsätzlich den Mittelwert aus drei identisch behandelten *Inserts*.

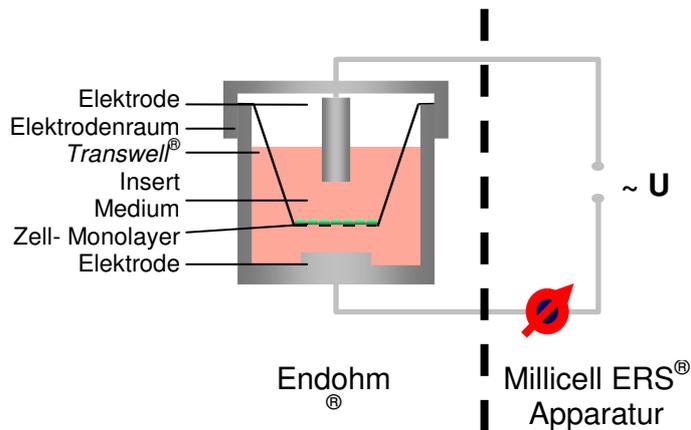


Abb.6: Schematische Darstellung der Messvorrichtung zum Bestimmen des TEER bei BCEC Monolayern

2.2 LDL-Rezeptornachweis mittels FACS-Analyse

Material

FACScan

Becton-Dickinson, Heidelberg

CellQuestPro

Becton-Dickinson, Heidelberg

LDL-R (Ab-1)

Oncogene™, San Diego, USA

Cat# LP02

Mab to Low Density LRP

Biodesign, International, Saco, Maine, USA

Mouse anti- human Lipoprotein receptor, Low Density

US Biological, Massachusetts, USA

Fluorescein Goat anti- mouse IgG

Oncogene™, San Diego, USA

PE-Goat anti-mouse IgG

Caltab Laboratories, Burlingame, Calif

Isotypkontrolle

BD Biosciences, Heidelberg

LDL-deficient serum

Orpegen, Heidelberg

Fetal bovine serum, lipid low

Biowest, Nuaille, Frankreich

Die *in-vitro* Charakterisierung des LDL-Rezeptors folgte dem Protokoll von Brockhoff (1994) mit einigen Modifikationen. Die ausplattierten Zellen wurden trypsinisiert, mit PBS gewaschen und bei 1100 rpm für 8 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Minifuge 1.0 R). In einer Zellzahl zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen wurden diese zur FACS-Analyse eingesetzt. Es wurden immer drei verschiedene Proben als Testreferenzen eingesetzt: Eine Negativkontrolle zur Prüfung der Autofluoreszenz, die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers und die Bindung des spezifischen Antikörpers zusammen mit der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers. Der Primärantikörper Anti-LDL-R I (100 µg/ml) wurde in einer Verdünnung von 1:20 zur Bindung an das Zellpellet eingesetzt. Alle Proben wurden eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal in FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS) gewaschen. Es folgte eine Resuspendierung der Zellpellets in je 20 µl Pycoerythrin-(PE) gekoppeltem *goat-anti-mouse*-Antikörper und wurde wiederum für 30 Minuten bei 4°C und Dunkelheit inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde ebenso in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt. Nach der Inkubation wurde zweimal gewaschen, die Zellen in 300 bis 500 µl PBS aufgenommen und am FACScan vermessen. Die PE-Fluoreszenz wurde bei einem Emissionsmaximum von 575nm im FL2-Kanal vermessen. Die Proben wurden im Vorwärtsscatter (Größe der Zellen) gegen den Seitwärtsscatter (Granularität der Zellen) als Population bestimmt, sodass man störende, tote Zellen oder Zellbestandteile ausschließen konnte. Es wurden pro Probe 5000 Zellen gezählt.

2.3 Nachweis der Bindung von ApoE an die Zellen

Material

RAP, human, recombinant, E.coli

Calbiochem®, Schwalbach

Cat# 553506

Apolipoprotein E, human Plasma

Calbiochem®, Schwalbach

(Mix aus ApoE 1,2 und 3)

Cat# 178468

Apolipoprotein aus Israel

(ApoE 3)

<i>Anti human- Apolipoprotein E</i>	<i>Calbiochem®, Schwalbach</i>
<i>In Ziege</i>	<i>Cat# 178479</i>
<i>PE- Swine- anti- goat IgG</i>	<i>Caltac Laboratories, Burlingame, Calif</i>

Der Nachweis der Bindung von freiem ApoE an die Zellen erfolgte ebenfalls durch eine Analyse mittels FACScan. So wurde freies ApoE der Firma Calbiochem oder das israelische ApoE auf den Zellen inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten weiter für eine anschließende FACS-Analyse vorbereitet. Die Inkubationszeiten betragen in den Versuchen 15 Minuten, 30 Minuten, eine Stunde und zwei Stunden. Die Inkubation des ApoEs erfolgte auf einer 24-well-Platte. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst und drei wells in einem FACS-Polystyrol-Röhrchen kollektiviert. Nach zwei Waschschritten mit PBS folgte die Zugabe des Primärantikörpers *Goat-anti-ApoE*, welcher für eine Stunde auf den Zellen inkubiert wurde. Nach wiederholtem Waschen mit FACS-Puffer wurde dann der Zweitantikörper *Swine-anti-Goat-PE* für 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Nach nochmaligem Waschen mit FACS-Puffer konnten die Proben dann vermessen werden.

2.4 Herstellung und Charakterisierung von Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel

Material

<i>Pluronic ® F68 (Poloxamer 188)</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>Salzsäure 0,01N</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Natronlauge 1N</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>n- Butyl-(2) cyanoacrylat (Sicomet ®6000)</i>	<i>Sichel- Werke, Hannover</i>
<i>5-(4,6 Dichloro-s-triazin-2-ylamino) fluorescein</i>	<i>Fluka, Buchs, Schweiz</i>

1000 ml Borat-Puffer pH 9:

<i>6,2 g Borsäure</i>	<i>Sigma, Steinheim</i>
<i>41,5 ml Natronlauge 1N (zur pH-Einstellung)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Auf 1000 ml Milli- Q Wasser</i>	<i>Millipore, Neu- Isenburg</i>

Analysenwaage Sartorius CP 224S

Magnetrührer RCT basic IKA

Glasfritte G2

Knick pH-Meter 766

Eppendorf Centrifuge 5415 D

Ultraschallbad Sonorex RK 31

Sartorius, Göttingen

Labortechnik, Staufen

Schott, Mainz

Knick, Berlin

Eppendorf AG, Hamburg

Bandelin electronic

GmbH & Co. KG, Berlin

2.4.1 Leere Nanopartikel

Die Herstellung der Partikel erfolgte im Biozentrum der Universität Frankfurt durch Alexander Bootz mittels der Polymerisations-Methode. 1% des Monomers n-Butyl-(2)-cyanoacrylat (BCA) wurde unter langsamen Rühren auf dem Magnetrührer zu einer 0,01 N Salzsäure-Lösung zugegeben (pH 2). Die Salzsäure-Lösung enthielt 1% Pluronic F68 als Stabilisator. Nach Zugabe des Monomers wurde die Suspension 4 Stunden gerührt und anschließend durch Zugabe von Natronlauge 1N auf einen pH-Wert zwischen 6 und 7 eingestellt. Größere Polymeragglomerate wurden mittels einer Glasfritte der Porengröße G2 (40 – 90 µm) filtriert und abgetrennt.

2.4.2 Fluoreszenzmarkierung

Die PBCA-Nanopartikel wurden durch 5-(4,6-Dichloro-s-triazin-2-ylamino) fluorescein (DTAF) markiert. Dies erfolgte durch eine Modifikation der leeren Nanopartikel: 5 ml der Nanopartikelsuspension wurden mit 5 ml einer 1%-igen Lösung von DTAF in Borat-Puffer (pH 9) gemischt und bei 500 rpm gerührt. Nach 24 Stunden wurde die Suspension durch Zugabe eines 10x Phosphat-Puffers neutralisiert. Freies DTAF wurde durch dreimaliges Waschen von den Nanopartikeln getrennt. Die Nanopartikelsuspension wurde 40 Minuten bei 16100 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit Hilfe des Vortexers und eines Ultraschallbades redispergiert. Die Stabilität der Nanopartikel bei diesem pH-Wert von 9 wurde durch photometrische Messung der Trübung bei 420 nm untersucht. Im Zeitraum von 24 Stunden konnte keine Abnahme der Trübung und somit der Partikelkonzentration festgestellt werden.

2.5 Herstellung und Charakterisierung von humanen Serumalbumin-Nanopartikeln (HSA-NP)

Material

<i>Albumin, Human Fraktion V</i>	<i>Sigma Aldrich Chemie, Schnelldorf</i>
<i>Milli-Q-Wasser</i>	<i>Millipore, Schwalbach</i>
<i>Glutaraldehyd 25%</i>	<i>Fluka, Buchs Schweiz</i>
<i>2- Iminothiolan (Traut's Reagenz)</i>	<i>Pierce, Bonn</i>
<i>Trioethanolamin</i>	<i>Fluka, Buchs Schweiz</i>
<i>NaCl</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>NeutrAvidin</i>	<i>Pierce, Bonn</i>
<i>PFP- Biotin</i>	<i>Pierce, Bonn</i>
<i>PEG- Crosslinker</i>	<i>Nektar, San Carlos CA,</i>
<i>D-Salt Column</i>	<i>Pierce, Bonn</i>

2.5.1 Leeres Partikelsystem

Die Herstellung der Partikel erfolgte im Biozentrum der Universität Frankfurt durch Kerstin Michaelis und Sebastian Dreis mittels einer etablierten Desolvationsmethode. HSA-basierte Protein-Nanopartikel wurden nach einer etablierten Desolvationsmethode von Weber et al. (2000) hergestellt. Unter ständigem Rühren wurde einer 10%-igen wässrige HSA-Lösung tröpfchenweise 8 ml Ethanol mit einer Schlauchpumpe (1 ml/min) zugegeben. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit Natronlauge auf 8,5 eingestellt. Nach Zugabe von 3 - 4 ml Ethanol war eine Trübung der Lösung erkennbar, was auf das Einsetzen der Partikelbildung hinweist. Zur Quervernetzung der erhaltenen Nanopartikel wurde anschließend eine 8%-ige Glutaraldehyd-Lösung zugegeben und die Suspension über Nacht weitergerührt. Das Aufreinigen der Nanopartikel erfolgte durch 5-faches Zentrifugieren (8 Minuten bei 16100 x g, 20°C) und anschließendes Redispergieren in Milli-Q-Wasser.

Eine Größenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung und eine Aminogruppenbestimmung der NP-Oberfläche wurden zur Charakterisierung durchgeführt.

2.5.2 Modifikation

2.5.2.1 Pegylierung

Zur Bindung von *Targeting*-Proteinen, Antikörpern oder zur Vermeidung von unspezifischer Bindung der Nanopartikel an die Zellen wurde an die Nanopartikel-Oberfläche ein PEG-*Crosslinker* gebunden. In PBS- Puffer (pH 8) redispergierte HSA-NP wurden mit der *Crosslinker*-Lösung (pH 8, 10 molarer Überschuss) gemischt. Der aminoreaktive PEG-*Crosslinker* bindet unter Mischen (1 Stunde bei 20°C und 600 rpm) an die Nanopartikel. Es folgt wiederum ein zweimaliges Waschen der Nanopartikel durch Redispergierung und Zentrifugation bei 16100 x g für 8 Minuten.

2.5.2.2 Avidin-Biotin Bindung

Um eine stabile, komplexe Bindung des *Targeting*-Proteins zu erhalten, wurde zuerst eine Biotin-Avidin-Bindung verwendet. Dazu wurde NeutrAvidin (NA) mittels 2-Iminoethanol-Lösung (Traut's Reagenz) in Triethanolamin-Puffer thioliert. Die Aufreinigung der Nanopartikel erfolgte dann an einer *D-Salt*-Säule von Pierce. Die einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und die thiolierten NeutrAvidine in Fraktion fünf und sechs wieder gefunden. Dieses thiolierte NeutrAvidin konnte somit an die thiol-reaktive Seite des an die Partikel gebundenen PEG-*Crosslinkers* gebunden werden. Dies erfolgte durch Mischen der PEG-NP-Suspension mit den thiolierten NeutrAvidin für 24 Stunden bei 20°C und 600 rpm im Eppendorf-Mixer. PFP-Biotin wurde in DMSO gelöst und zusammen mit in PBS gelöstem ApoE bei pH 7 für zwei Stunden auf dem Schüttler bei 550 rpm vermischt, über die *D-Salt*-Säule aufgereinigt und die verschiedenen Fraktionen vermessen. Die Komplexbildung mit den NA-NP erfolgte dann über Nacht. Der Überstand wurde nach Aufreinigung mittels Western Blott untersucht und so indirekt der Bindungsgrad des ApoEs an die Nanopartikel ermittelt.

2.5.2.3 Kovalente Bindung

Die kovalente Bindung des ApoEs erfolgte durch Thiolierung des zu bindenden Proteins wie in 2.5.2.2. für NeutrAvidin beschrieben. Wiederum wurde ein Größenaufschluß über *D-Salt*-Säulen und das Vermessen der Fraktion bei 280 nm durchgeführt.

2.6 Intrazelluläre Aufnahme und Verteilung von PBCA-Nanopartikeln

Material

Als konfokales Lasermikroskop wurde das Leica Mikroskop DM IRBE (Leica Mikrosysteme, Bensheim) verwendet. Die Ausstattung dieses Invertmikroskops umfasste:

- Phasenkontrasteinrichtung
- Objektive 20x / 0,4; 40x / 1,25 Öl; 63x / 1,32 Öl, 63x / 1,0 W
- Luftgekühlter Argon/Krypton- Laser

Die Steuerung des Mikroskops erfolgte mit der Software TCS-NT (Leica Microsysteme, Bensheim). Die generierten Fluoreszenzbilder wurden mit den Programmen LCS von Leica und Photo Shop weiterbearbeitet.

Isopropanol

Roth, Karlsruhe

Vectashield H 1300

Vector Laboratories, Burlingame

H 1400

Tetramethylrhodamin Concanavalin A

Invitrogen, Karlsruhe

Alexa 594

Invitrogen, Karlsruhe

Alexa 647-Con A

Invitrogen, Karlsruhe

2.6.1 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Für die konfokalmikroskopische Untersuchung der Interaktionen zwischen Nanopartikeln und kultivierten Zellen wurden die Zellen auf Deckglaskammern (4 oder 8 *Chamber Slides*) ausplattiert. Die Experimente wurden 1 bis 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz bei 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit je 1ml Medium gewaschen und für 4 Stunden mit 500 µl Medium inklusiv aufzunehmender Substanz (z.B. Nanopartikel-Lösung) inkubiert. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es erfolgte dann eine Membranfärbung wahlweise mit Tetramethylrhodamin Concanavalin A und Alexa 594. Die Färbung erfolgte durch eine zweiminütige Inkubation des Farbstoffes. Je nach *Slide*-Typ wurden die 8-*Chamber Slides* direkt unter dem CLSM (confocal laser-scanning-microscope) betrachtet, während in den 4-*Chamber Slides* zuvor noch eine Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (Inkubation 10 Minuten bei Raumtemperatur) durchgeführt wurde.

2.6.2 Transportuntersuchung über die in vitro BHS

Material

<i>Rhodamin</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
<i>Verapamil</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
<i>DMEM F12</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
<i>Fluostar Optima</i>	<i>BMG Lab Technologies, Offenburg</i>

Die Eignung der BCECs als Modell für den Transport an der BHS *in-vitro* hängt im Wesentlichen von der Zelldichte ab. Transport-Experimente mit fluoreszierenden Substanzen sind nur bei dichtem Monolayer möglich. Neben fluoreszierenden Nanopartikeln wurde noch Rhodamin als fluoreszierende Substanz zu Transportuntersuchungen eingesetzt. Rhodamin ist ein Fluoreszenzfarbstoff und zudem noch Substrat für das Exportprotein PgP (P-Glykoprotein) an der Blut-Hirn-Schranke.

Für Transport-Experimente in mit *Transwell*-Filtereinsätzen bestückten Kulturplatten wurden die Zellen auf 1 cm² großen Einsätzen in Platten mit 12 Vertiefungen kultiviert. Die Polyester-Filter wiesen eine Porenweite von 0,4 µm auf. Die Experimente wurden 1 bis 2 Tage nach dem Erreichen der Konfluenz durchgeführt. Das Volumen auf der apikalen Zellseite (Donorkompartiment) betrug 0,5 ml. Auf der basolateralen Seite (Akzeptorkompartiment) wurden 1,5 ml eingesetzt. Nach der Vorinkubation wurde das Medium aus beiden Kompartimenten abgesaugt und basolateral durch frisches Medium sowie apikal durch eine Lösung der Testsubstanz in Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellkulturplatten bei 37°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben der 2 Kompartimente entnommen und mittels des Gerätes Fluostar photometrisch (Excitation Filter: 485P, Emission Filter: 520 P) vermessen. Es wurde so zu jedem Zeitpunkt die Gesamtfluoreszenz in apikalen und basolateralen Kompartimenten bestimmt.

2.6.3 TEER- Messungen

Material

Endohm 12

WPI, Sarasota Florida, USA

Millicell @ ERS

Millipore

Transwell- Kulturplatten

Corning Inc., Kaiserslautern

Parallel zu den Untersuchungen mittels Fluostar und unter dem CLSM wurde immer auch der aktuelle TEER des Zelllayers im *Transwell*-System gemessen. So war eine Verfolgung der Veränderungen an den *tight junctions* möglich.

2.7 Intrazelluläre Aufnahme und Verteilung von HSA-Nanopartikeln

2.7.1 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Die visuelle Darstellung der fluoreszierenden Nanopartikel in der Zelle erfolgte über die konfokale Laserscanningmikroskopie. Die intrazelluläre Lokalisation von den Nanopartikelpräparationen in verschiedenen Zelllinien und Gehirn- Endothelzellen wurde unter dem CLSM untersucht. Die Zellen wurden zu diesem Zweck auf *Chamber Slides* (4 oder 8 Kammern) ausplattiert und kultiviert. Die genaue Zellzahl der ausplattierten Zellen variierte je nach Zellart. Die Experimente wurden 1- 2 Tage nach Erreichen der Konfluenz bei 37°C durchgeführt.

Die Fixierung und Färbung der Zellmembran, sowie die Vorbereitung des *Slides* erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie in 2.6.1 beschrieben.

2.7.2 Quantifizierung der zellulären Aufnahmen

Material

FACScan

Becton- Dickinson, Heidelberg

Cell Quest Pro

Becton- Dickinson, Heidelberg

FACS Polystyrol Röhrchen

Corning Inc., Kaiserslautern

Fetal bovine serum, lipid low

Biowest, Nuaillé, Frankreich

Eine quantitative Bestimmung der Bindung und Internalisierung von HSA-Nanopartikeln erfolgt mittels Durchflusszytometrie (FACS). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit einer Nanopartikellösung (500µg/ml) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die adhärent wachsenden Primärzellen und Zelllinien wurden nach der Inkubationszeit mit 150 µl Trypsin/EDTA gelöst, anschließend mit Medium gespült und drei Wells kollektiviert und in ein FACS-Polystyrol-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde dann bei 1800 rpm für 18 Minuten (Minifuge 1.0 R) abzentrifugiert.

Die Zellen wurden nochmals mit PBS gewaschen und unter gleichen Bedingungen ein weiteres Mal zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 bis 500 µl PBS resuspendiert und mit dem Gerät FACScan analysiert. Dabei erfolgte die Auswertung des FITC-Fluoreszenzsignals im FI-1 Kanal (Emissionsmaximum 525 nm) bei 5000 gezählten Zellen. Die Einstellung des Geräts erfolgte auch hier wieder über die Vermessung der Eigenfluoreszenz unbehandelter Zellen.

2.7.2.1 Bindung von Nanopartikeln an unterschiedliche Zellen

Die Bindung der Nanopartikel wurde wie in Punkt 2.6.2 mittels FACS-Analyse ermittelt. So wurden neben den ApoE-modifizierten Nanopartikeln parallel das leere Partikelsystem und das pegylierte Nanopartikelsystem getestet. Auch hier wurde das Medium der Zellen zwei Tage vor dem Versuch durch lipidfreies Medium ausgetauscht und die Zellen dann postkonfluent für vier Stunden mit 500µl der aufzunehmenden Nanopartikeln (500µg/ml) in Medium inkubiert. Nach diesen vier Stunden folgte ein Waschschrift mit PBS und die Proben konnten mit dem FACScan vermessen werden. Die Nanopartikel können durch ihre Eigenfluoreszenz im FL-1 (Emissionsmaximum 525 nm) Kanal detektiert werden.

2.7.2.2 Präinkubationen als Nachweis spezifischer Bindung

Material

LDL- R (Ab-1)

Oncongene™, San Diego, USA

Cat# LP02

Receptor associated protein RAP

Calbiochem®, Schwalbach

Human, recombinant, E. coli

Cat# 553506

Apolipoprotein E, human Plasma

Calbiochem®, Schwalbach

Mix aus ApoE 1,2, und3

Cat# 178468

Apolipoprotein E, Israel

ApoE 3

Um die Spezifität der Bindung von Nanopartikeln an die Zellen zu testen, wurden die Zellen mit verschiedenen Substanzen vorinkubiert. Anti-LDL-R-Antikörper, *receptor associated protein* und freies ApoE sind Liganden für den LDL-R und binden an die Rezeptor- Bindungsdomäne. Diese Vorinkubation soll die Bindung der Nanopartikel hemmen oder verhindern. 5 - 10µg/ml der Substanzen zur Vorinkubation wurden für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde das Medium gewechselt, die einzelnen wells mit PBS gewaschen und neues Medium mit den Nanopartikeln zugegeben. Diese wurden vier Stunden inkubiert. Die FACS-Vorbereitung und weitere Vorgehensweise deckt sich mit dem Ablauf aus 2.7.2.

3 Ergebnisse

Bis zur Durchführung der unterschiedlichen Experimente waren voneinander abweichende Kulturbedingungen nötig. In Abbildung 7 ist die allgemeine Vorgehensweise für die unterschiedlichen Versuchansätze schematisch dargestellt.

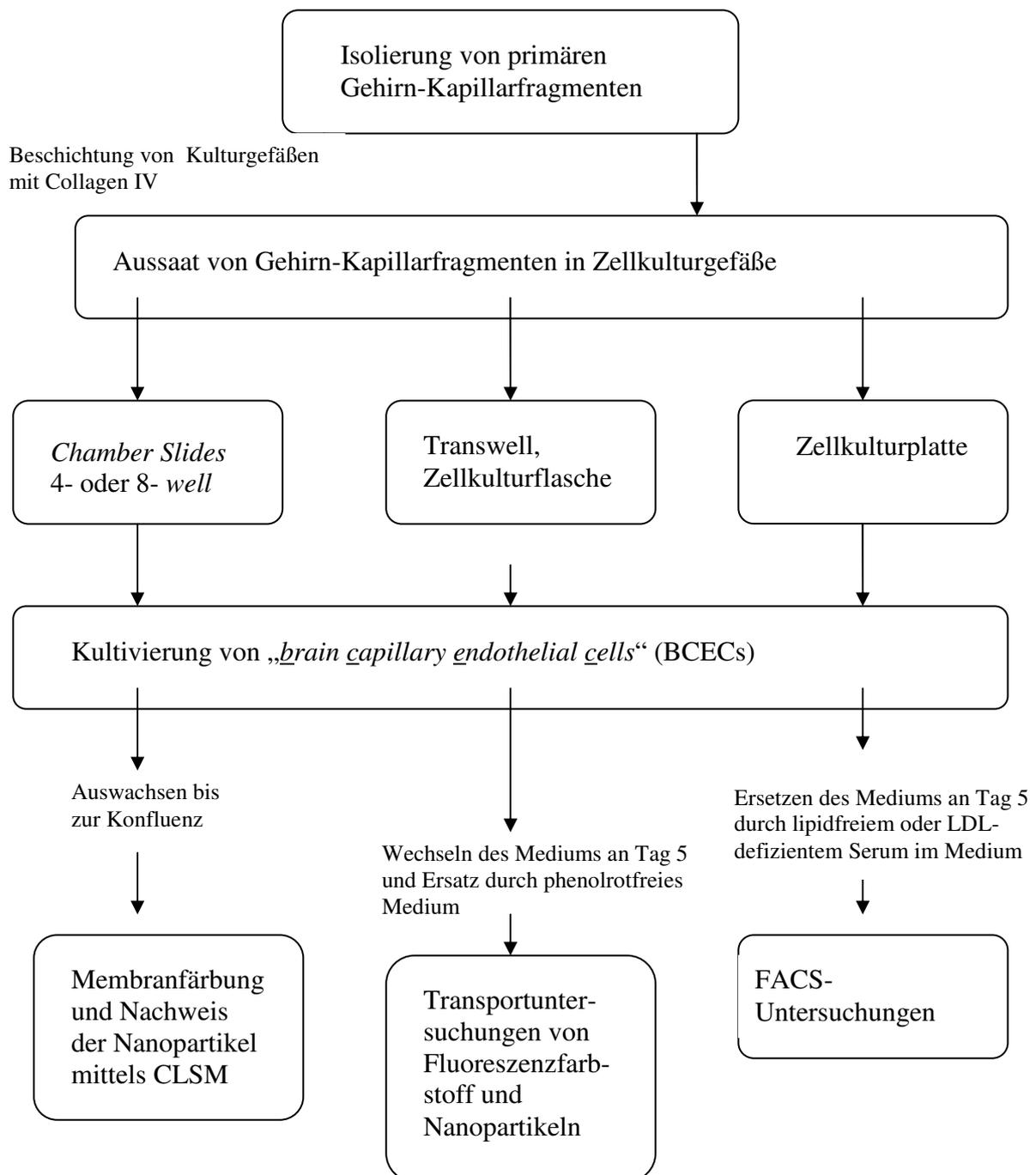


Abb. 7: Schematische Darstellung der allgemeinen Vorgehensweise zur Kultivierung der Zellen für die anschließenden Experimente.

3.1 Etablierung eines in-vitro Modells der Blut-Hirn-Schranke

Die Isolierung cerebraler Kapillarendothelzellen erfolgte durch die modifizierte Vorschrift von Bowman, der zum ersten Mal 1981 Endothelzellen aus Rattenhirnen und 1983 aus Rinderhirn isolieren konnte (Bowman et al., 1981; Bowman et al., 1983). Die Hirnhäute wurden von den Gehirnhälften entfernt, um eine Kontamination der Endothelzellen mit peripheren Blutgefäßen zu vermeiden. Anschließend wurde die kortikale graue Substanz mit dem Skalpell entfernt. Diese graue Substanz ist aufgrund des höheren Mikrokapillar-Gehalts besser durchblutet als andere Gewebe des Gehirns und wurde daher zur Isolierung von Kapillarfragmenten herangezogen (Steinhausen, 1993; Wolf et al., 1996). Die restlichen Anteile des Gehirns wurden verworfen, da der hohe Anteil an Myelin und Neuronenkernen zu einer Verunreinigung mit Oligodendrocyten führen könnte. Die graue Substanz wurde dann in einem enzymatischen Verdau mit Dispase weiterverarbeitet. Dieses Enzym ist eine neutrale, unspezifische Protease, die speziell zur Gewebedisaggregation eingesetzt wird (Matsumura et al., 1975). Im Gegensatz zu anderen Enzymen werden hierbei die Zellmembranen nicht verletzt, und die Kapillaren werden aus dem Gehirngewebe freigesetzt. Bei einer anschließenden Zentrifugation besteht das Pellet aus den Kapillaren und verdautem Hirngewebe. Die Auftrennung der zwei Fraktionen erfolgte durch einen ersten Percoll-Gradienten. Percoll ist ein kolloidales Medium aus heterogenen SiO₂-Partikeln, die mit Polyvinylpyrrolidon überzogen und gegenüber biologischem Material inert sind. Das Medium ist aufgrund seiner niedrigeren Osmolalität und Viskosität mit vielen physiologischen Pufferlösungen mischbar und somit kompatibel mit lebenden Zellen. Dadurch wird neben der Morphologie auch die Erhaltung der Zell-Funktion sichergestellt (Dalet et al., 1982). Aufgrund der geringen Dichte der lipidhaltigen Gewebestandteile konnten diese auf dem Gradienten abgezogen werden. Die Kapillaren waren in einer tiefer liegenden Bande über den Erythrozyten zu finden. Durch einen weiteren enzymatischen Verdau mit Collagenase erfolgte der Aufschluss der Kapillaren. Die extrazelluläre Matrix der Kapillaren aus Collagenen und anderen extrazellulären Proteinen wurde so, schonend ohne Beschädigung zellulärer Strukturen, aufgelöst. Kapillarendothelzellen, Gehirnkapillarfragmente, Zelltrümmer, Erythrozyten, Perizyten und Astrozyten wurden in einem zweiten Percoll-Gradienten aufgetrennt.

Während der Zentrifugation bildeten sich 3 Fraktionen: Erythrozyten waren als Pellet sichtbar, Zelltrümmer und Verunreinigungen fanden sich auf dem Gradienten schwimmend wieder, während sich die Endothelzellen in der Interphase anreicherten und so dort abgeerntet werden konnten. Nach einem weiteren Waschschrift konnten die Zellen je nach Versuchsansatz ausplattiert werden. Neben einzelnen Endothelzellen kamen diese vermehrt in kleinen Aggregationen von 2 - 5 Zellen vor. In einer anschließenden Zellzahl- Bestimmung konnten in der Regel 15 - 40 Mio Zellen pro Gehirn gezählt werden, was dem Wert in Literaturangaben (van Bree et al., 1992; Gumbleton und Audus, 2001) entspricht. Nach Aussaat der Zellen wurden diese in Kultur ihren Grundbedürfnissen entsprechend kultiviert. So waren für das Wachstum und die Differenzierung der Zellen in Kultur eine stete Versorgung mit frischem Nährmedium und das Entfernen von Verunreinigungen und toxischen Substanzen obligat. Der erste Mediumwechsel fand im *Transwell*-System nach 1 Stunde und in den restlichen Kulturgefäßen nach 24 Stunden statt. Anschließend wurde jeden zweiten Tag (Tag 3 und 5) das Nährmedium gewechselt. Die Versuche wurden dann standardmäßig 7 Tage nach Aussaat der Zellen durchgeführt.

3.1.1 Charakterisierung der isolierten Zellen

Eine Charakterisierung der kultivierten Zellen ist notwendige Voraussetzung, um die Primärzellen oder auch Zelllinien in Experimenten als Zellkulturmodell einsetzen zu können. Zellspezifische Merkmale werden dabei zur Charakterisierung herangezogen (Borchardt et al. 1996; de Boer et al., 1999).

Die Charakterisierung beinhaltete verschiedene Untersuchungen. Zellwachstum und Erscheinungsbild kultivierter BCECs (Abb. 8) sind wichtige Kriterien zur Beurteilung und Identifizierung der cerebralen Kapillarendothelzellen (Abott et al., 1992). Doch wurden neben dem äußeren Erscheinungsbild und dem Wachstum auch zellart-spezifische Eigenschaften untersucht (siehe Abb. 9).

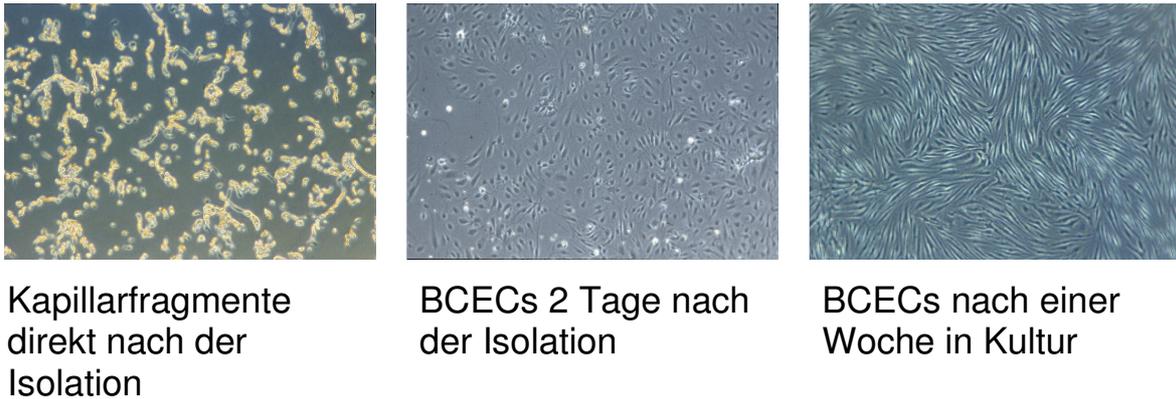


Abb.8: Ausdifferenzierung der „*brain capillary endothelial cells*“ (BCEC) nach der Isolation der Gehirn-Kapillarfragmente aus Schweingeirnen

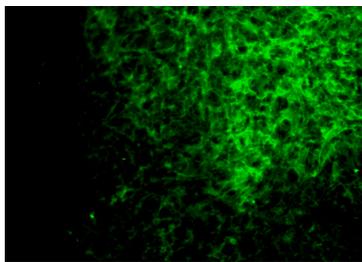
Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel. Hierbei werden in geringem Maße Zellen, die noch nicht an dem Kulturgefäß haften, entfernt. Der Großteil der präparierten Zellen adhärirt zu dieser Zeit aber schon fest an den Gefäßen. Das Zellwachstum ging vor allem von diversen Zellclustern radiär aus. So sieht man an Tag zwei nach der Isolation noch einzelne Zell-Inseln und dementsprechend kahle Stellen im Kulturgefäß, die sich im Laufe der Kultivierung aber zu einem dichten Monolayer ausbilden. Die BCECs zeigten eine schmale und langgezogene Form mit einer bauchigen Mitte, hervorgerufen durch den Zellkern. Die Enden laufen spitz aus. Die Differenzierung war mit dem Erreichen des konfluenten Monolayers abgeschlossen, und es erfolgte kein weiteres Wachstum. Bei Kultivierung über diesen Zeitpunkt hinaus sind Löcher im Monolayer und abschwimmende Zellen zu beobachten, was ebenfalls für die Stagnation des Wachstums und der Differenzierung spricht.

Tiefgefroren gehaltene BCECs zeigten nach einem Auftauen verändertes Wachstum. Im Allgemeinen dauerte das Erreichen eines Monolayers weitaus länger und wurde teilweise überhaupt nicht erreicht.

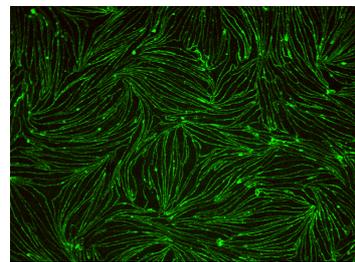
3.1.1.1 Endothelzellspezifische Marker

Spezifische Proteine wurden mittels Immunfärbemethoden in kultivierten pBCECs wie in Abb. 9 zu sehen nachgewiesen: das *tight junction* Protein ZO-1, sowie das damit verwandte β -Catenin und auch der endothelzellspezifische von-Willebrand-Faktor.

Die Färbung wurde nicht bei jedem Experiment wiederholt, man beschränkte sich später auf die Auswertung des äußeren Erscheinungsbildes und des Zellwachstums der kultivierten Zellen.



vWF



ZO- 1

Abb.9: Immuncytochemischer Nachweis des endothelzellspezifischen Marker von-Willebrand-Faktor (vWF) und dem *tight junction protein* Zonula Occludens (ZO-1)

3.1.1.2 Transendothelial electrical resistance (TEER) –Werte

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die kultivierten BCECs auf Ihre Eignung als aussagekräftiges Modell für den Transport von, an Trägersysteme gekoppelte, Arzneistoffe zu untersuchen. Charakteristisches Merkmal der BHS ist die dichte Verbindung der Endothelzellen untereinander durch *tight junctions* und somit eine geringe parazelluläre Permeation, sowie ein hoher TEER. Anhand der TEER-Messungen wurden die optimalen Bedingungen für die Kultur von BCECs auf den Filtereinsätzen des *Transwell*-Systems festgestellt und getestet.

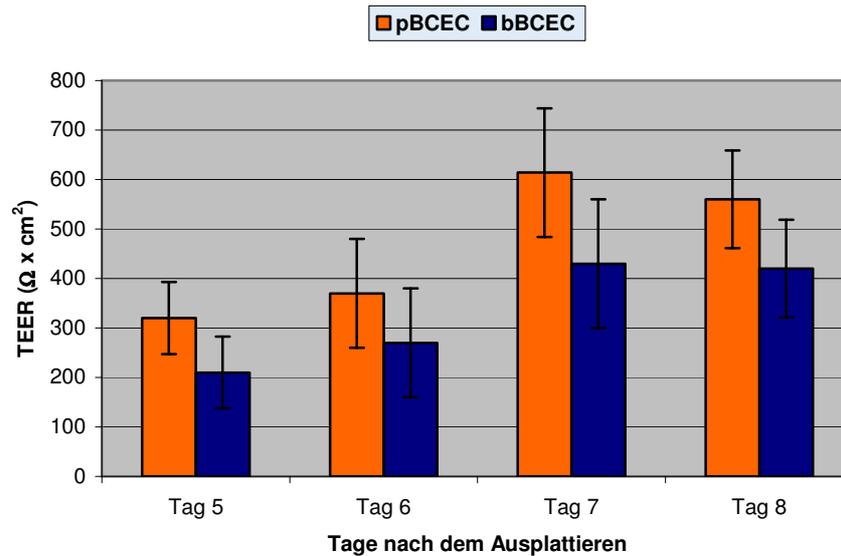


Abb.10: Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von bovinen (bBCEC) und porcinen brain capillary endothelial cells (pBCEC) über 8 Tage nach der Isolation.

Nach 7 Tagen erreichen die Zellen in diesem System die höchsten Widerstände, welche nach Tag sieben wieder abnehmen. Es wurde jeweils drei *wells* in einem Balken zusammengefasst, ihr Mittelwert berechnet und die Standardabweichung ermittelt.

In lichtmikroskopischen Beobachtungen der frisch isolierten Zellen konnte ein konfluenter Monolayer nach sieben Tagen beobachtet werden. Parallel dazu erreichten die BCECs ebenfalls nach sieben Tag ihren maximalen TEER-Wert, was für einen dichten Monolayer mit Barriereeigenschaft spricht. An den folgenden Tagen ist kein weiterer Anstieg des TEER zu beobachten. Dies korreliert mit dem im Lichtmikroskop beobachteten Zellrasen, welcher Unterbrechungen aufwies. Durch die Unterbrechung des konfluenten Monolayers ist die Ausbildung von zellverbindenden *tight junctions* nicht möglich, und somit fällt der TEER signifikant ab. Auch in diesen Experimenten konnte ein maximaler TEER von bis zu 800 Ohm x cm² gezeigt werden.

3.2 Modellzelllinien für ein *in-vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke

Neben den primären cerebralen Kapillarendothelzellen wurden für erste Versuche an einem *in-vitro* Modell auch verschiedene Zelllinien getestet (Abb. 11). Zelllinien, die in der Literatur mit ähnlichen Eigenschaften wie cerebrale Kapillarendothelzellen beschrieben werden, wurden wie die Primärzellen charakterisiert und ihre Eigenschaften auf den *Transwell*-Filtern im Zusammenhang mit dem TEER untersucht. Es wurden 2×10^5 Zellen in 0,5 ml Medium pro *Transwell*-Einsatz ausplattiert. In das untere Kompartiment wurden 1,5 ml Medium gegeben. Nach etwa fünf Tagen erreichten die Zelllinien MDCK und CaCo-2 ihren höchsten messbaren TEER. Dieser war im Gegensatz zu den primären Zellen mit Werten zwischen 250 und 400 $\Omega \times \text{cm}^2$ weitaus niedriger. In den darauffolgenden Tagen konnte keine weitere Zunahme des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) beobachtet werden. Die TEER-Werte der Zelllinien sanken an den Tagen 7, 8 und 9 stetig, in dem Zell-Monolayer waren Unterbrechungen zu beobachten, und das Experiment war somit nach Tag 6 beendet.

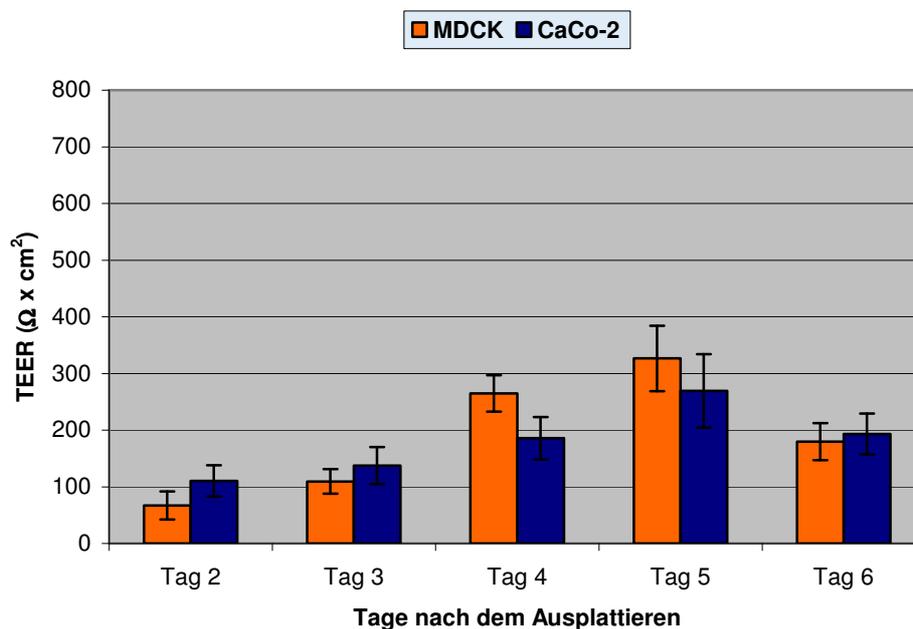


Abb.11: Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von MDCK und CaCo-2 Zellen über 6 Tage nach dem Ausplattieren.

Nach 5 Tagen erreichen die Zellen in diesem System die höchsten Widerstände, welche nach Tag 5 wieder abnehmen. Es wurde jeweils drei wells in einem Balken zusammengefasst, ihr Mittelwert berechnet und die Standardabweichung ermittelt.

3.3 Einfluß von Polybutylcyanoacrylat-(PBCA) Nanopartikeln auf Primärzellen

Nachdem die Eigenschaften der Zellen auf der Filter-Membran im *Transwell*-System getestet und optimiert wurden, konnten PBCA-Nanopartikel als Trägersubstanzen und deren Einfluss auf Primärzellen untersucht werden. Die Versuche wurden generell an Tag sieben, dem Tag mit dem voraussichtlich höchsten TEER-Wert durchgeführt. An Tag sieben wurden verschiedene Konzentrationen (10 und 50 µg/ml) an PBCA-Nanopartikeln zu den Zellen in das obere *Transwell*-Kompartiment gegeben. Über 24 Stunden wurde zu den Zeitpunkten 2, 4, 6 und 8 Stunden der TEER-Wert gemessen und mit unbehandelten Zellen (Kontrolle) verglichen. Bei diesen Experimenten wurden jeweils drei unabhängigen *wells* parallel gemessen und daraus der Mittelwert berechnet. Es ist ein deutlicher Abfall der TEER-Werte direkt nach der Nanopartikel-Zugabe zu erkennen. Diese akute Reaktion auf die Nanopartikel-Zugabe kehrt sich aber schon nach vier Stunden nach Zugabe von 10 µg/ml Nanopartikeln und nach sechs Stunden bei Zugabe von 60 µg/ml Nanopartikeln um. Dies entspricht Ergebnissen vorangegangener Arbeiten (Zenker, Dissertation 2001) in denen gezeigt werden konnte, dass ein kurzzeitiger Abfall des TEER mit einer anschließenden Regeneration einhergeht. Es ist auch ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Nanopartikel-Konzentrationen zu erkennen. 50 µg/ml PBCA-Nanopartikel haben einen akuten Einfluß auf den TEER-Wert, der sich nach sechs Stunden stetig erholt und sich nach acht Stunden vollständig regeneriert hat. Eine geringere Konzentration an PBCA-Nanopartikeln von 10 µg/ml weist einen schwächeren akuten Effekt auf, ist nach vier Stunden schon regeneriert und fällt im Anschluß leicht ab (Abb. 12).

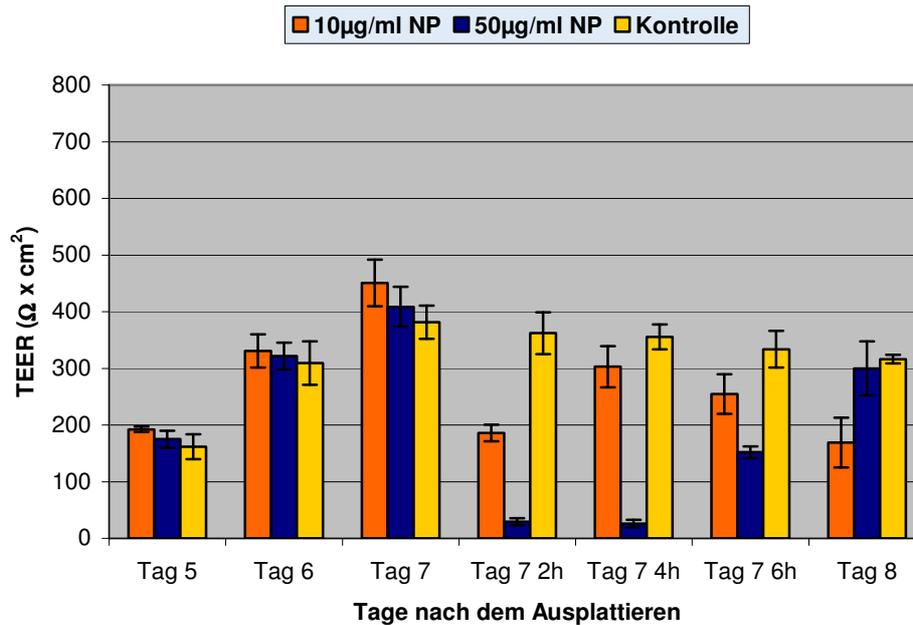


Abb.12: Einfluß von Polybutylcyanoacrylat-(PBCA) Nanopartikeln auf die Barriereigenschaften der *in-vitro* Blut-Hirn-Schranke. pBCECs wurden an Tag 7 nach dem Ausplattieren mit verschiedenen Konzentrationen an PBCA-Nanopartikeln über 24 Stunden inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde der TEER gemessen und mit der Kontrolle verglichen. Es wurden jeweils drei wells in einem Balken zusammengefasst, ihr Mittelwert berechnet und die Standardabweichung ermittelt.

3.4 Transportuntersuchungen mit Nanopartikeln am Transwell-System

Verschiedene Nanopartikelpräparationen wurden im *Transwell*-System getestet und auf ihren Transport über die *in-vitro* BHS untersucht. Um die Eignung des Systems für unsere Fragestellung zu überprüfen, wurden parallel Versuche in Collagen IV gecoateten und nicht gecoateten *Transwells* durchgeführt. Die verwendeten Nanopartikel zeichneten sich jeweils durch eine Fluoreszenz aus. So wurden die PBCA-Nanopartikel aktiv mit einem Fluorecein gelabelt, während die HSA-Nanopartikel eine Eigenfluoreszenz im selben Wellenlängen-Bereich aufwiesen. Diese Fluoreszenz wurde im FluoStar-Fluoreszenzmessgerät vermessen und verfolgt (Abb. 13- 15). So wurden jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten (2, 4, 6, 8 und 24 Stunden) Proben aus dem oberen (Blutgefäßsystem) und dem unteren (Gehirn) Kompartiment entnommen und photometrisch vermessen. Der Transport erfolgte in diesen Experimenten entgegen unserer Erwartungen nur sehr langsam. Ein grundsätzlicher Unterschied ließ sich im Vergleich der unterschiedlichen Nanopartikel-Präparationen beobachten.

Während die PBCA-Nanopartikel eine einseitige Abnahme der Fluoreszenz im Donor-Kompartiment und keine Zunahme der Fluoreszenz im Akzeptor-Kompartiment aufwiesen (Abb. 13), konnte bei den HSA-Nanopartikeln nach 24 Stunden eine vergleichbare Fluoreszenz in Donor- und Akzeptor-Kompartiment beobachtet werden. Aufgrund des sehr langsamen Transports bei den HSA-Nanopartikeln und dem nicht vorhandenen Transport bei den PBCA-Nanopartikeln, müssen wir davon ausgehen, dass ein Großteil der Nanopartikel die Filtermembran dieses *Transwell*-Systems nicht überwinden kann. Dieses *Transwell*-System ist folglich für die Untersuchung von Nanopartikel-Transport ungeeignet. Um jedoch die generelle Funktion des Systems sicher zu stellen, wurden Versuche mit freiem Fluoreszenzfarbstoff (Rhodamin) durchgeführt (Abb. 15). Diese zeigten, dass die Versuchsanordnung und auch der generelle Transport von Substanzen über das *Transwell*-System möglich sind.

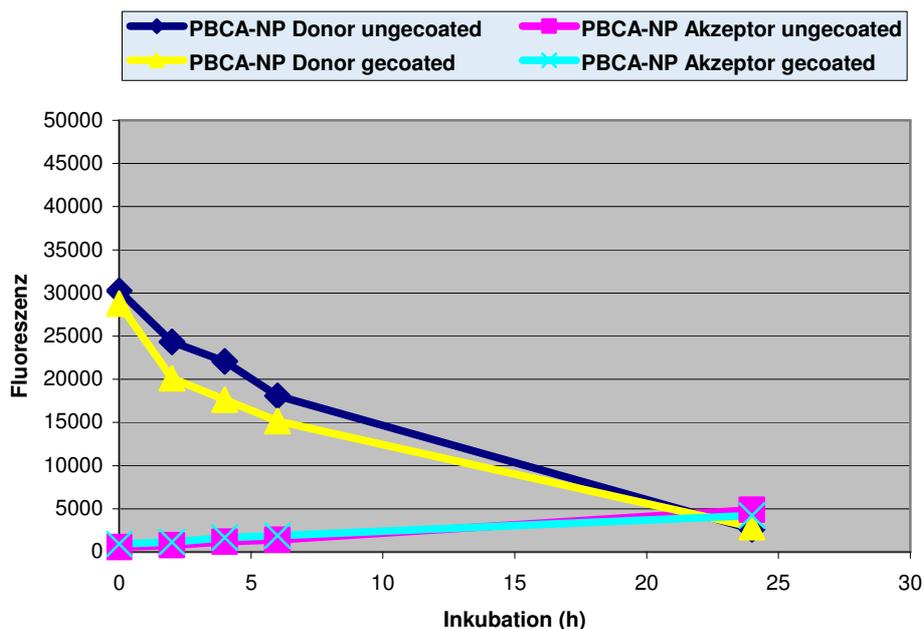


Abb.13: Transport von Polybutyl-Cyanoacrylat-Nanopartikeln (PBCA-NP) im „leeren“ Transwell-System ohne Zellmonolayer. Es erfolgte ein indirekter Nachweis fluoreszenz-markierter PBCA-NP durch Messung der Fluoreszenz in den 2 Kompartimenten (Donor ~ Blutgefäßsystem, Akzeptor ~ ZNS). Die 2 Kompartimente sind durch eine Membran der Porengröße 400 µm getrennt. Unterschieden wurden Inserts mit einem Collagen IV Coating und ungecoatete Inserts.

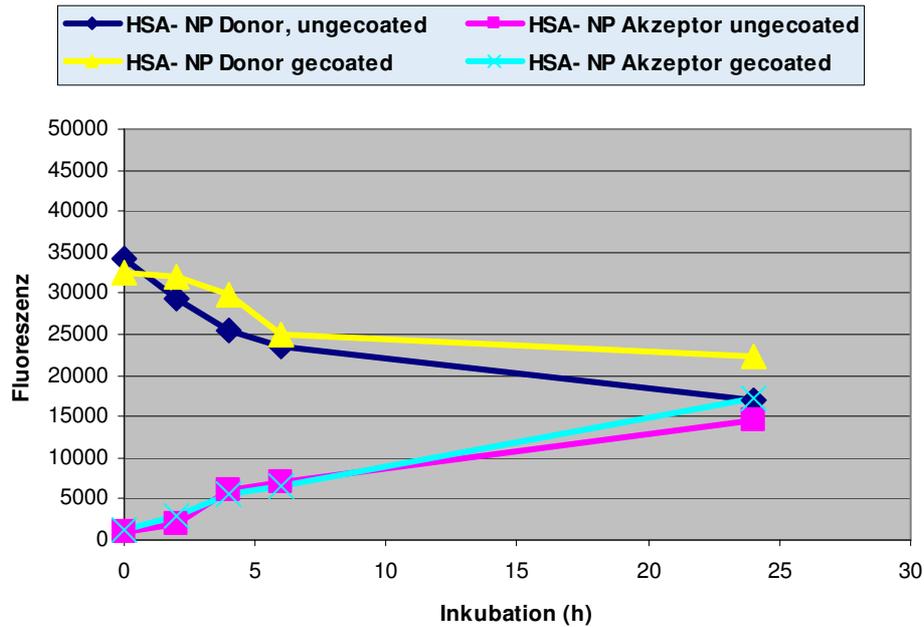


Abb.14: Transport von Humanes Serum Albumin Nanopartikeln (HSA-NP) im „leeren“ Transwell-System ohne Zellmonolayer. Es erfolgte ein indirekter Nachweis eigenfluoreszierender HSA-NP durch Messung der Fluoreszenz in den 2 Kompartimenten (Donor ~ Blutgefäßsystem, Akzeptor ~ ZNS). Die 2 Kompartimente sind durch eine Membran der Porengröße 400 μm getrennt. Unterschieden wurden Inserts mit einem Collagen IV Coating und ungecoatete Inserts.

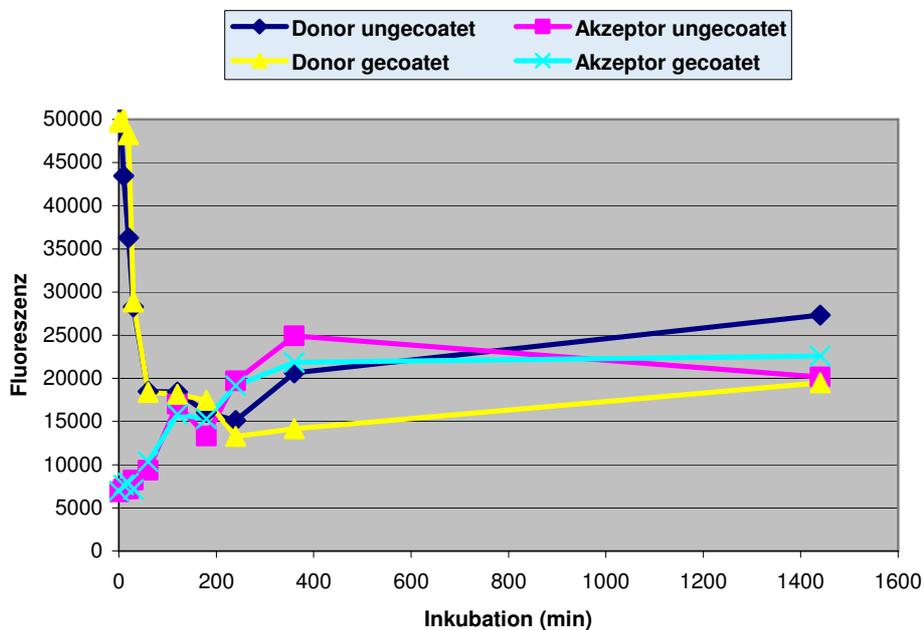
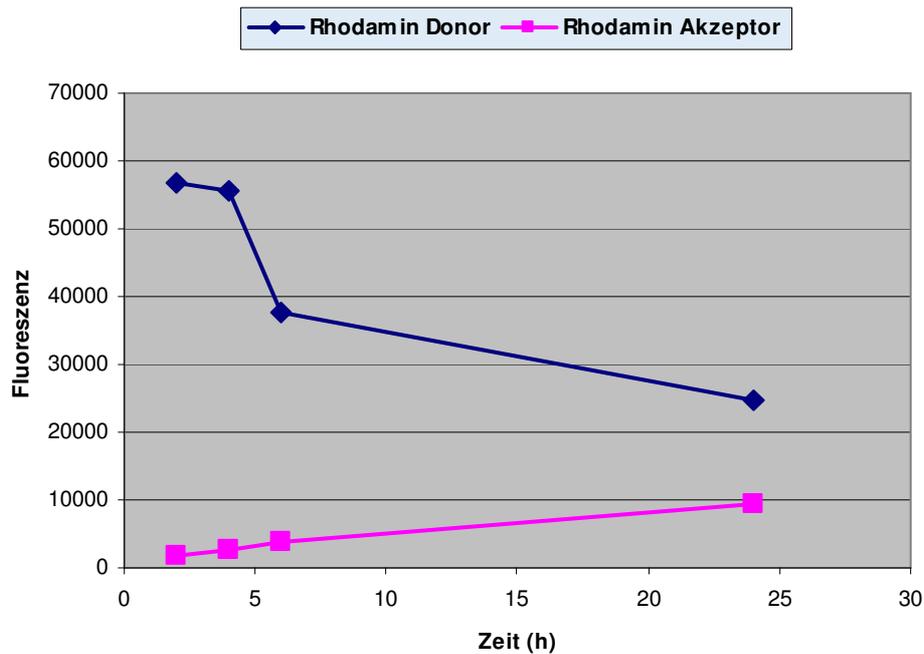


Abb.15: Transport von dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin im „leeren“ Transwell-System ohne Zellmonolayer. Es erfolgte der Nachweis des Transports durch Messung der Fluoreszenz in den 2 Kompartimenten (Donor ~ Blutgefäßsystem, Akzeptor ~ ZNS). Die 2 Kompartimente sind durch eine Membran der Porengröße 400 μm getrennt. Unterschieden wurden Inserts mit einem Collagen IV Coating und ungecoatete Inserts.

3.5 Substanztransport über die *in-vitro* Blut-Hirn-Schranke

Eine wichtige Aufgabe der BHS ist das Verhindern von unkontrolliertem Eindringen potenziell schädlicher Substanzen in das zentrale Nervensystem. Neben der Barrierefunktion durch *tight junctions* weist die BHS auch spezielle Transportsysteme wie das P-Glycoprotein (PgP) auf. Die Existenz dieses Transport-Export-Systems konnte auch in kultivierten BCECs nachgewiesen werden (Huwyler et al., 1996). Ausplattierte BCECs mit TEER-Werten zwischen 300 und 500 Ohm x cm² wurden zu diesen Experimenten verwendet. Ansonsten gleicht die Versuchsanordnung den Versuchen zum Nanopartikel-Transport in 3.4.

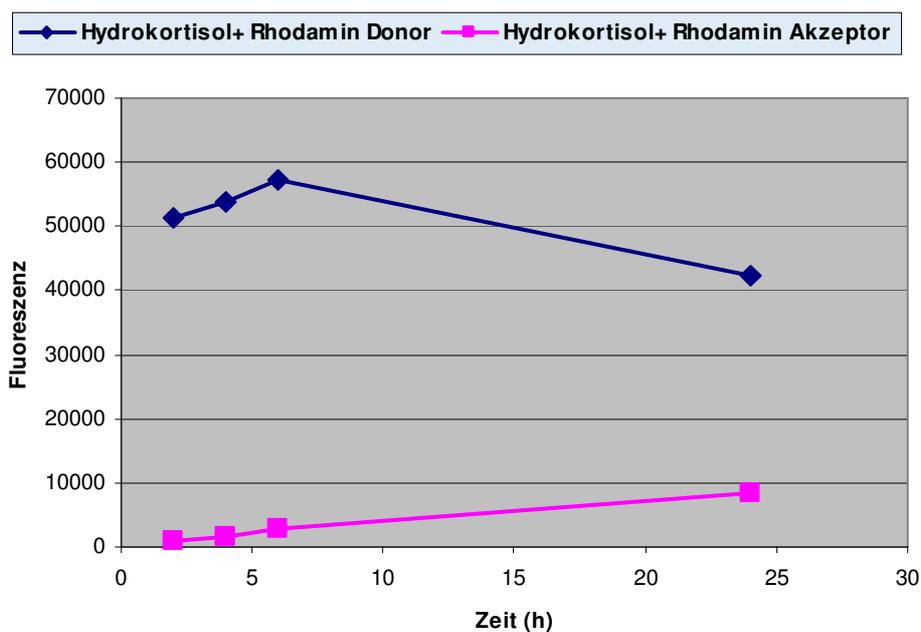
Um zu prüfen, ob der PgP-abhängige Transport von Substanzen in unserem Modell erfasst werden kann, wurde der Transport von Rhodamin 123, einem fluoreszierenden PgP-Substrat, im *Transwell* bestimmt. In Abb. 16 ist eine Abnahme der Fluoreszenz im oberen den Blutkreislauf repräsentierende Donor-Kompartiment zu beobachten, der Anstieg im unteren, das Gehirn repräsentierenden, Akzeptor-Kompartiment hingegen fällt geringer aus. Generell kann in diesem Versuchsansatz von einem Transport des Fluoreszenzfarbstoffes über die *in-vitro* Barriere gesprochen werden. Der geringe Anteil an Fluoreszenzfarbstoff im Akzeptor-Kompartiment spricht für einen die Aktivität des PgP. Die parallel aufgeführten TEER-Werte zeigen den Erhalt von Barriereigenschaften an.



Zeit (h)	0	2	4	6	24
TEER (Ωcm^2)	419	429	420	413	389

Abb.16: Transport von Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin über einen dichten *porcine brain capillary endothelial cell* (pBCEC)-Monolayer im *in-vitro* Transwell-System. Es erfolgte der Nachweis des Transports durch Messung der Fluoreszenz in den 2 Kompartimenten (Donor ~ Blutgefäßsystem, Akzeptor ~ ZNS). Die 2 Kompartimente sind durch eine Membran der Porengröße 400 μm getrennt. Die entsprechenden TEER-Werte sind zu den jeweiligen Zeitpunkten in der Abbildung mit eingefügt.

In Abb. 17 wurde vor der TEER-Messung und der Zugabe von Rhodamin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Hydrokortisol zu den Zellen gegeben. Hydrokortisol hat eine TEER-erhöhende Wirkung auf den BCEC-Monolayer, was für eine optimierte Barrierefunktion am *in-vitro* Modell spricht. Dies ist erkennbar an der aufgeführten Tabelle mit den TEER-Werten zu den entsprechenden Zeitpunkten. Der Verlauf des Fluoreszenznachweises im Donor- und Akzeptor-Kompartiment entspricht den Erwartungen. So ist der generelle Verlauf der beiden Kurven dem reinen Rhodaminversuch sehr ähnlich. Durch die Erhöhung der Barrierefunktion und dem höheren transendothelialen elektrischen Widerstand wird die passive Diffusion von Stoffen verhindert. Bei der Messung der Fluoreszenz muss auch immer berücksichtigt werden, dass ein Teil des fluoreszierenden Rhodamins 123 auch parazellulär die *in-vitro* BHS überwinden kann.



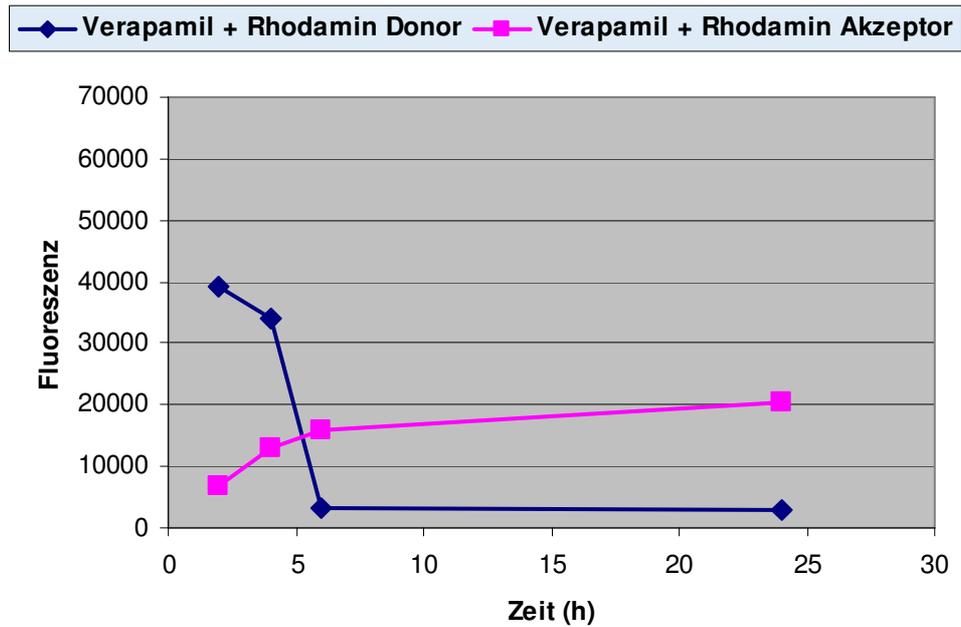
Zeit (h)	0	2	4	6	24
TEER (Ωcm^2)	478	530	493	486	453

Abb.17: Transport von Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin über einen dichten *porcine brain capillary endothelial cell* (pBCEC)-Monolayer nach einer Vorinkubation mit Hydrokortisol im *in-vitro* Transwell-System. Es erfolgte der Nachweis des Transports durch Messung der Fluoreszenz in den 2 Kompartimenten (Donor ~ Blutgefäßsystem, Akzeptor ~ ZNS). Die 2 Kompartimente sind durch eine Membran der Porengröße 400 μm getrennt. Die Zellen wurden im Donorkompartiment mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hydrokortisol vorinkubiert. Dies bedingt eine Erhöhung der TEER-Werte.

Die entsprechenden TEER-Werte sind zu den jeweiligen Zeitpunkten in der Abbildung mit eingefügt.

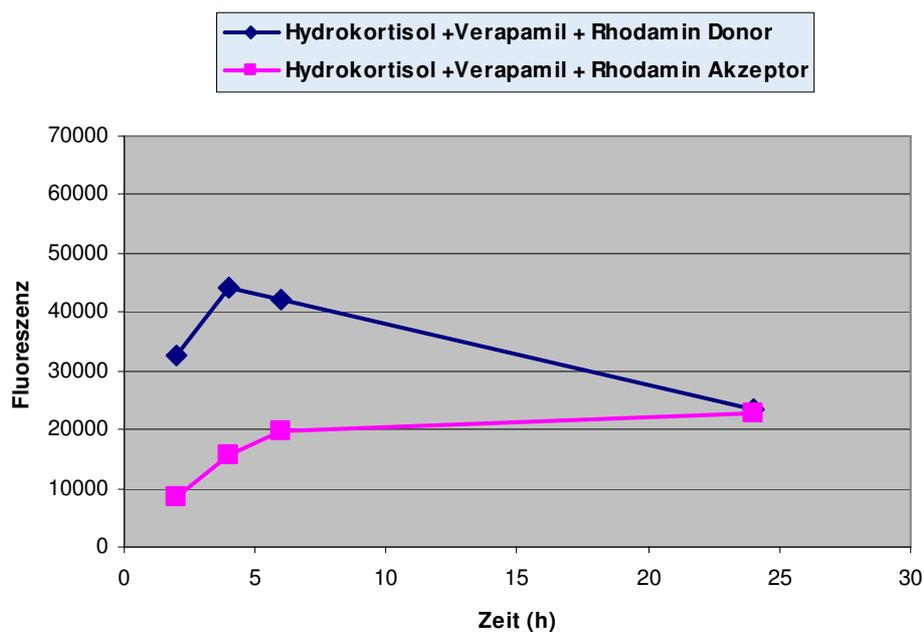
Verapamil, welches ebenfalls von PgP transportiert wird, wurde zur kompetitiven Inhibition zugesetzt (Abb.18). In den folgenden Experimenten wurde der Rhodamin-Transport nach einer Vorinkubation mit Verapamil und somit die Aktivität des PgP untersucht. So sollte der Rhodamin-Transport nach Zugabe des PgP-Hemmers Verapamil begünstigt werden. Dies konnte wie in Abb. 18 dargestellt, bestätigt werden.

Bei Vorinkubation mit dem TEER-erhöhendem Hydrokortisol und Verapamil war deutlich ein Transport des Rhodamins zu erkennen, der Angleich der Fluoreszenz in Donor- und Akzeptor-Kompartiment erfolgte aber viel langsamer als in den Experimenten ohne Hydrokortisol-Vorinkubation (Abb. 19).



Zeit (h)	0	2	4	6	24
TEER (Ωcm^2)	457	317	314	289	302

Abb.18: Transport von Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin über einen dichten *porcine brain capillary endothelial cell* (pBCEC)-Monolayer nach einer Vorinkubation mit Verapamil im *in-vitro* Transwell-System. Es erfolgte der Nachweis des Transports durch Messung der Fluoreszenz in den 2 Kompartimenten (Donor ~ Blutgefäßsystem, Akzeptor ~ ZNS). Die 2 Kompartimente sind durch eine Membran der Porengröße 400 μm getrennt. Verapamil ist ein Pgp-Hemmer und verhindert somit den Export von Pgp-Substraten wie Rhodamin. Es erfolgte eine Vorinkubation der Zellen im Donor-Kompartiment mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Verapamil. Die entsprechenden TEER-Werte sind zu den jeweiligen Zeitpunkten in der Abbildung mit eingefügt.



Zeit (h)	0	2	4	6	24
TEER (Ωcm^2)	475	397	383	397	387

Abb.19: Transport von Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin über einen dichten *porcine brain capillary endothelial cell* (pBCEC)-Monolayer nach einer Vorinkubation mit Verapamil und Hydrokortisol im *in-vitro* Transwell- System. Es erfolgte der Nachweis des Transports durch Messung der Fluoreszenz in den 2 Kompartimenten (Donor ~ Blutgefäßsystem, Akzeptor ~ ZNS). Die 2 Kompartimente sind durch eine Membran der Porengröße 400 μm getrennt. Verapamil ist ein PgP-Hemmer und verhindert somit den Export von PgP-Substraten wie Rhodamin und Hydrokortisol bedingt eine Erhöhung des TEER-Wertes. Die entsprechenden TEER-Werte sind zu den jeweiligen Zeitpunkten in der Abbildung mit eingefügt.

3.6 Untersuchung der Zellspezifität von oberflächenmodifizierten HSA-Nanopartikeln

Neben den Transportuntersuchungen über die *in-vitro* BHS, wurde parallel der Mechanismus dieses Transportes näher untersucht. Bei Untersuchungen zur Plasmaproteinadsorption von TWEEN 80 gecoateten PBCA-Nanopartikeln (Kreuter, 2002) konnte beobachtet werden, dass sich vermehrt ApoE an die Nanopartikel-Oberfläche anlagert. Man geht davon aus, dass ApoE eine wichtige Rolle in der Vermittlung des Mechanismus zum Transport von Nanopartikeln über die Blut-Hirn-Schranke spielt.

Aufgrund dieser Hypothese und der hohen Rezeptordichte an der Blut-Hirn-Schranke liegt ein rezeptorvermittelter Transportmechanismus über einen Rezeptor der LDL-Rezeptor Familie nahe. Hauptrezeptor dieser Familie ist der LDL-Rezeptor, der nachweislich an der BHS exprimiert wird. So wurde der LDL-Rezeptor auch Schwerpunkt der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

Für das Gehirn-*Targeting* wurden daher nanopartikuläre Arzneistoffträger entwickelt, die durch Desolvatation von humanem Serumalbumin entstehen und auf ihrer Oberfläche ein kovalent gebundenes Protein, ApoE, tragen. Dieses Protein ist Ligand für den LDL-Rezeptor. Im Rahmen der *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten ApoE-modifizierte HSA-Nanopartikel auf ihre zelltypspezifische Aufnahme über die Bindung des ApoE als Ligand an die Zielzellen (primäre Hirn-Kapillarendothelzellen) untersucht werden.

Dazu wurde folgende experimentelle Vorgehensweise entwickelt und durchgeführt:

1. Bestimmung der LDL-Rezeptorexpression auf verschiedenen Zelllinien zur Etablierung eines einfach handhabbaren und geeigneten Modell-Systems zur Untersuchung von LDL-R -vermittelten Transportmechanismen.
2. Bestimmung der LDL-Rezeptorexpression auf primären Hirn-Kapillarendothelzellen als Zielzellen der partikulären Aufnahme
3. Vergleich der zellulären Aufnahme von ApoE-PEG-HSA-NP in HepG2-LDL II (LDL-R hochexprimierend) Zelllinie und Primärzellen mittels FACS.
4. Inhibition der zellulären Aufnahme von ApoE-PEG-HSA-NP durch Konkurrenz mit einem Antikörper gegen die LDL-R-Bindungsdomäne oder freiem Liganden.
5. Untersuchungen des Heparinsulfat-Proteoglykan als Transportmechanismus zur Aufnahme ApoE-PEG-HSA-NP.

3.6.1 Bestimmung der LDL-Rezeptor-Expression auf verschiedenen Zellen

Die Hypothese des spezifischen Gehirn-*Targetings* mittels ApoE-PEG-HSA-NP beruht auf der Bindung des ApoE an die LDL-Rezeptoren der Gehirnkapillar-Oberfläche. Daher musste zu eingehenden Untersuchungen dieses Mechanismus eine Modellzelllinie charakterisiert und etabliert werden. Hierzu wurde der Nachweis an exprimierendem LDL-Rezeptor auf der Zelle mittels FACS-Analyse bestimmt und ausgewertet. Es wurden Zelllinien verwendet, die sich in der Arbeit mit BHS-*in-vitro* Modellen und im Vergleich mit Gehirn-Endothelzellen bewährt haben. So wurden MDCK und CaCo-2 Zellen aufgrund ihrer ähnlichen Charakteristika mit Gehirnkapillar-Endothelzellen in TEER und endothelzellspezifischen Markern gewählt. Daneben noch die HepG2-Leberzelllinie, welche aufgrund ihrer Herkunft eine hohe Dichte an LDL-Rezeptor Expression an der Oberfläche verspricht.

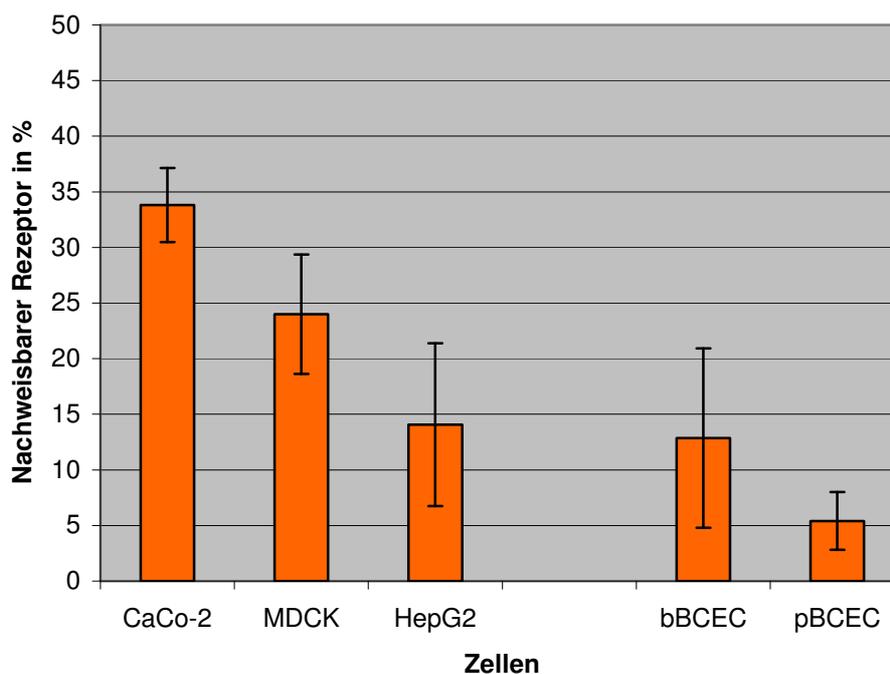


Abb.20: Nachweis der Oberflächen-Expression des LDL-Rezeptors (LDL-R) auf verschiedenen Zellen mittels Durchflusszytometrie.

1 x 10⁶ Zellen wurden mit einem Anti-LDL-Rezeptor Antikörper inkubiert und mit einem PE-gelabelten Zweitantikörper gefärbt. Der Prozentsatz an LDL-R exprimierenden Zellen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus verschiedenen Experimenten wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung ermittelt. CaCo-2: n= 4, MDCK: n= 4, HepG2: n= 6, bBCEC: n= 6, pBCEC: n= 4.

Dabei zeigte die Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie, dass der prozentuale Anteil der LDL-R exprimierenden Zellen in den verschiedenen Zellen stark differierte. Auch die LDL-R positive Leberzelllinie HepG2 zeigte in diesen Untersuchungen nur eine verhältnismäßig geringe LDL-R-Expression.

Die Unterschiede in der nachweisbaren Expression sollten auch einen Einfluss auf die Bindung und Internalisierung der ApoE-PEG-HSA-NP haben. Um diesen Mechanismus genauer zu untersuchen, sollte mit einer Zelllinie gearbeitet werden, welche einen höchstmöglichen LDL-R Nachweis zulässt (HepG2-LDL II). Die nächsten Schritte waren somit die Optimierung des LDL-Rezeptor-Nachweises.

3.6.1.1 Etablierung von Kulturbedingungen für eine optimierte Rezeptorexpression

Der geringe Nachweis der LDL-Rezeptorexpression auf verschiedenen Zellen kann unterschiedliche Gründe haben.

So ist die Spezifität des Antikörpers nicht für alle Spezies bekannt, die Kultivierung und das Passagieren kann einen Einfluß auf die Charakteristika der Zellen haben, ebenso können Zusätze im Medium störend auf die nachweisbare LDL-Rezeptorexpression einwirken. So könnten Mediumzusätze, wie lipidhaltiges Serum an die LDL-R-Bindungsdomäne binden und somit eine Bindung des Nanopartikel-Liganden ApoE vermindern und die Internalisierung einschränken. Um diese Faktoren genauer zu untersuchen, wurde eine Kultivierung der Zellen über 24 Stunden ohne Serum durchgeführt.

3.6.1.1.1 Kultivierung der Zellen über 24 Stunden in serumfreien Medium

Das Medium der Zellen wurde vor dem Experiment ($t=0$) durch Medium ohne Serum ersetzt und die Zellen über den Zeitraum von 24 Stunden beobachtet und auf ihre LDL-Rezeptorexpression hin untersucht. Zu den Zeitpunkten 2, 4, 8 und 24 Stunden wurde der Nachweis des LDL-Rezeptors mittels FACS-Analyse auf den Zellen durchgeführt. Eine Kultivierung der Zellen über mehr als 24 Stunden ist aufgrund der nötigen Versorgung der Zellen in Kultur nicht möglich.

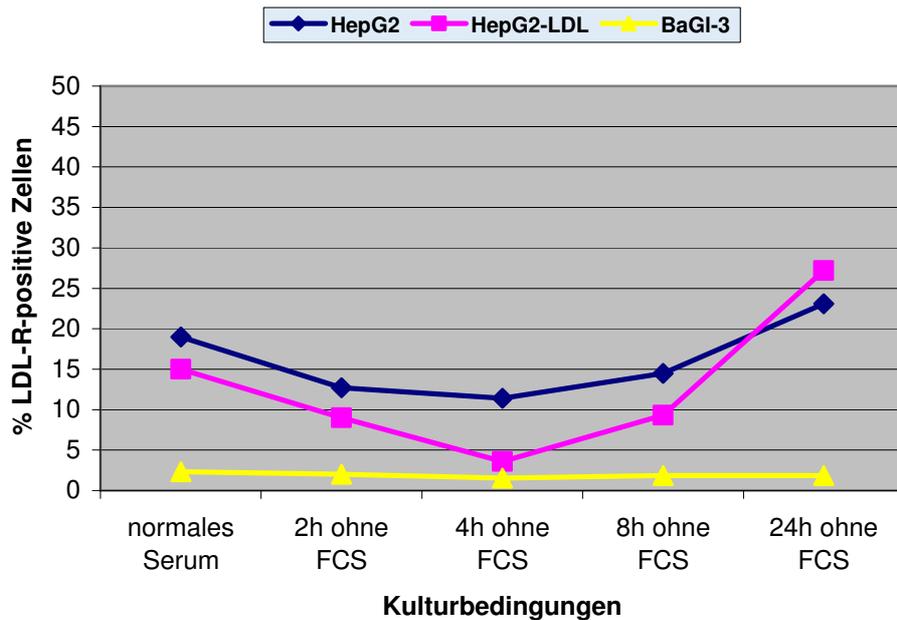


Abb.21: Nachweis des LDL-Rezeptors über 24 Stunden bei Kultivierung von verschiedenen Zellen in serumfreiem Medium. Es wurde zu den Zeitpunkten 2, 4, 8 und 24h der LDL-R mit einem Anti-LDL-R Antikörper detektiert, mittels Durchflusszytometrie untersucht und mit dem Wert bei Kultivierung in normalem Medium mit Serum verglichen.

Wie in Abbildung 21 deutlich zu erkennen, hat der Entzug des Serums einen Einfluss auf den Nachweis des LDL-Rezeptors. Während nach 4 Stunden der Nachweis an Rezeptor gegenüber der Ausgangssituation zurückgeht, kann man nach 24 Stunden einen erhöhten, mindestens aber ebenso hohen Nachweis an LDL-Rezeptor wie der des Ausgangswertes feststellen. Man kann nun davon ausgehen, dass das Serum einen Einfluß auf den Nachweis des LDL-Rezeptors an der Zelloberfläche hat. In folgenden Experimenten wird nun versucht, durch modifiziertes Serum, welches den Nährstoffbedarf der Zellen noch deckt, aber störende Lipide ausschließt, mehr LDL-Rezeptor nachzuweisen. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Seren getestet und die optimalen Bedingungen h.

3.6.1.1.2 Serumvergleich

Es wurde ein LDL-defizientes Serum verwendet, welches einen direkten Liganden des LDL-Rezeptors, LDL, nicht beinhaltet und so eine Blockierung der LDL-R Bindungsdomäne durch diesen ausschliesst. Es konnte festgestellt werden, dass eine Erhöhung des LDL-Rezeptornachweis in verschiedenen Zellen gegeben war. Dies traf aber nicht auf alle Zellen zu und im Einzelfall erbrachte diese Kultivierung nur eine sehr geringe Erhöhung des LDL-Rezeptornachweis. Die optimale Steigerung des LDL-R-Nachweises erreichte man mit einer Kultivierung in diesem Serum über 24 Stunden.

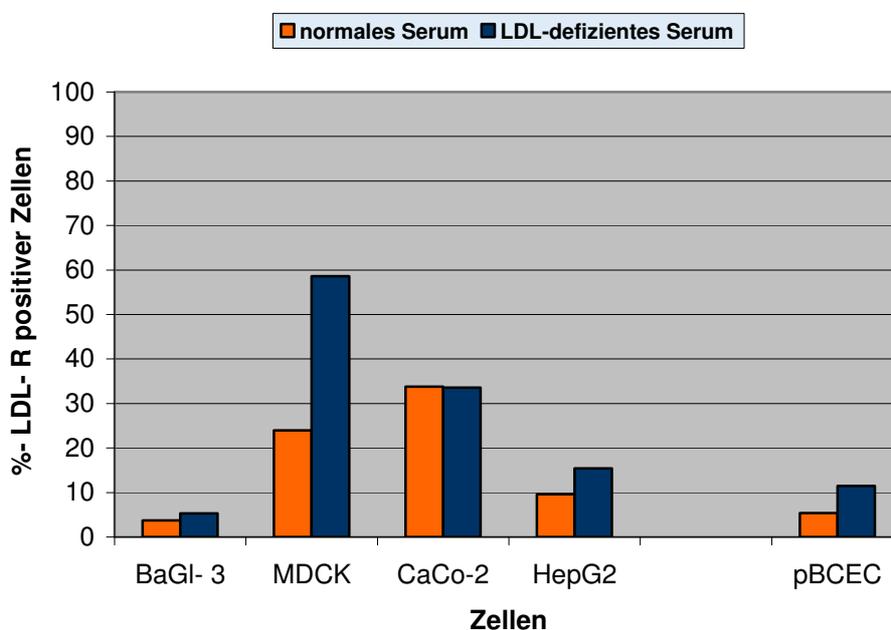


Abb.22: Vergleich des Nachweis von LDL-Rezeptoren auf verschiedenen Zellen nach Kultivierung über einen Tag in Medium mit LDL-defizientem Serum und normalem Medium.

Die Untersuchungen sind hier exemplarisch in jeweils einem Experiment aufgezeigt.

Das zweite, verwendete Serum war ein lipidfreies Serum, welches nicht nur den Liganden LDL ausschließt, sondern auch frei von zahlreichen anderen, im Serum enthaltenen Lipiden ist. Somit verringert man zusätzlich eine Blockierung des LDL-R durch im Medium enthaltene Liganden. Durch den Entzug der Lipide in Kultur über zwei Tage konnte der Nachweis von LDL-R signifikant in allen Zellen erhöht werden. In allen folgenden Versuchen wurde unter diesen Bedingungen gearbeitet.

Alle Experimente zur Rezeptorexpression und Bindung von freiem Liganden oder Nanopartikeln fanden unter lipidfreien Kulturbedingungen statt. Das Kulturmedium wurde zwei Tage vor dem Versuch durch Medium mit lipidfreiem Serum ersetzt, die Zellen zwei Tage in diesem Medium kultiviert und in das Experiment eingebracht.

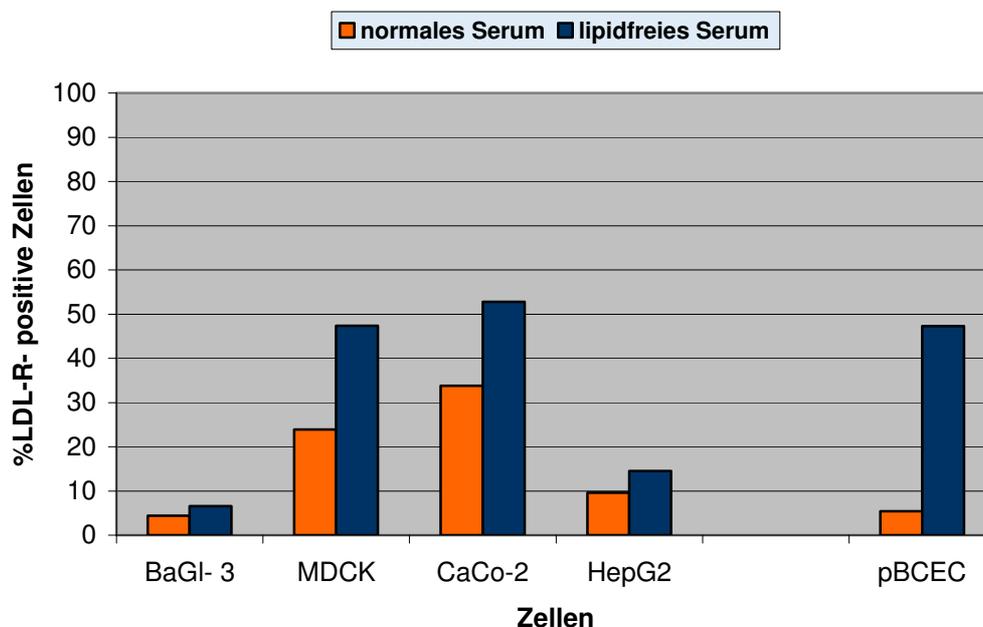


Abb.23: Vergleich des Nachweis von LDL-Rezeptoren auf verschiedenen Zellen nach Kultivierung über 48h in Medium mit lipidfreiem Serum und normalem Medium.

Die Untersuchungen sind hier exemplarisch an jeweils einem Experiment aufgezeigt.

Aus den Abbildungen 22 und 23 geht hervor, dass der LDL-Rezeptornachweis bei allen Zellen durch die Verwendung von lipidfreiem Serum stimulierbar war. Für das Ausmaß der LDL-Rezeptor-Expression wurde folgende Abstufung gefunden:

CaCo-2 > MDCK > pBCEC > HepG2 > BaGI-3.

Um den Nachweis von LDL-R an der Zelloberfläche noch weiter zu optimieren, wurden HepG2-Leberzellen in ein „Zell-*Sorting*“ eingebracht.

3.6.2 Zell-Sorting

Beim *Zell-Sorting* werden die Zellen auf ihren LDL-Rezeptor mittels Durchflusszytometrie untersucht. Nachweisbar LDL-R-positive Zellen werden detektiert und separat weiter kultiviert.

In einer nächsten FACS-Analyse sind nachweisbar mehr Zellen LDL-R-positiv. Es wurde dann ein weiterer *Sorting*-Schritt angeschlossen, sodass am Ende ein Nachweis an LDL-R von über 90 % auf den HepG2-Leberzellen gegeben war. So konnte eine Zelllinie mit stabil hohem Nachweis an LDL-R für weitere Untersuchungen des LDL-rezeptorvermittelten Transports verwendet werden.

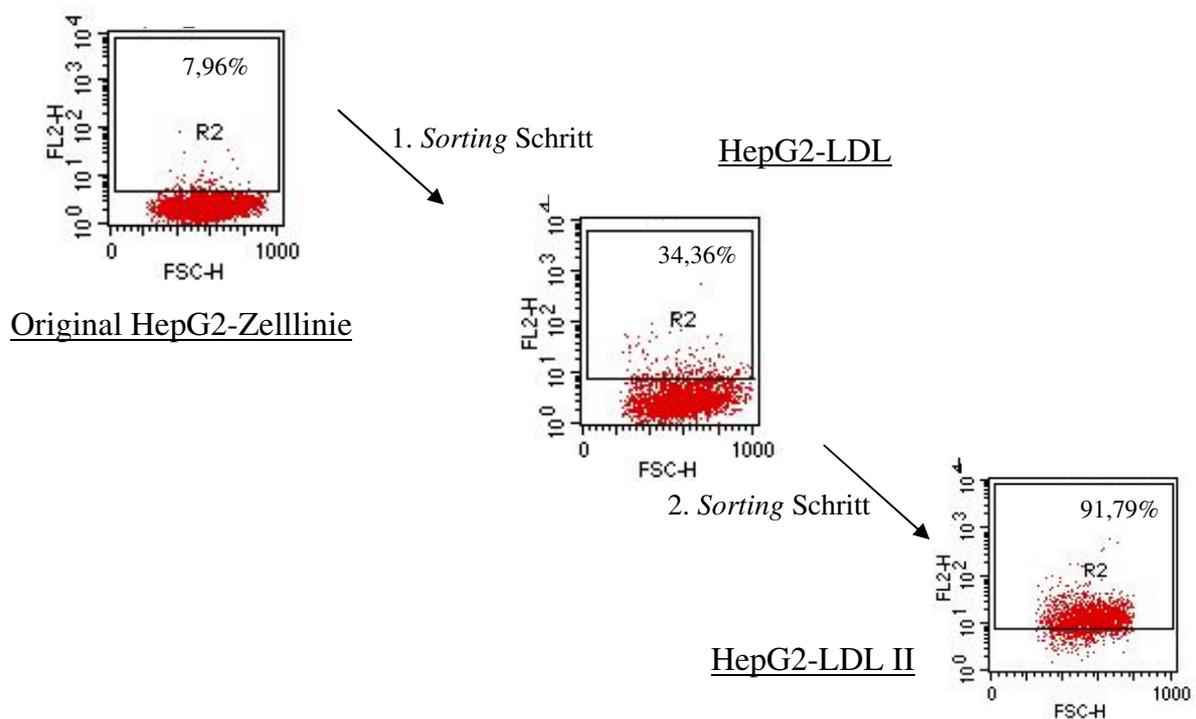


Abb.24: Effekt auf ein spezifisches Zell-*Sorting* mit HepG2-Leberzellen.

HepG2 Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie sortiert und die LDL-R positiven Zellen rekultiviert. Nach mehrwöchiger Kultur der sortierten Zellen wurden diese erneut getestet, und der Nachweis des LDL-R auf diesen Zellen war signifikant erhöht. In einem zweiten *Sorting*-Schritt konnte dieser sogar auf über 90% gesteigert werden.

3.6.3 Bindungsstudien von HSA-Nanopartikeln

Zur Untersuchung der Bindung und Internalisierung von Nanopartikeln mit kovalent gebundenem ApoE wurden an verschiedenen Zellen und primären Gehirnkapillarendothelzellen, Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) durchgeführt. Die Methode der Durchflusszytometrie erlaubt im Gegensatz zur konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie eine prozentuale Quantifizierung der Bindung.

Die Herstellung der verwendeten Nanopartikel erfolgte am Institut für pharmazeutische Technologie Frankfurt durch Frau Kerstin Michaelis und Herrn Sebastian Dreis. Eine schematische Abbildung der Nanopartikel ist in Abbildung 25 dargestellt. Diese Nanopartikel zeigen in der Verbindung mit dem humanen Serumalbumin eine Eigenfluoreszenz im FITC-Bereich und konnten somit gut mit dem FACScan detektiert werden. Ein Vorteil der Eigenfluoreszenz dieser Nanopartikel liegt im tatsächlichen Nachweis der Nanopartikel und nicht etwa abgesondertem Farbstoff möglicher Fluoreszenzmarkierungen.

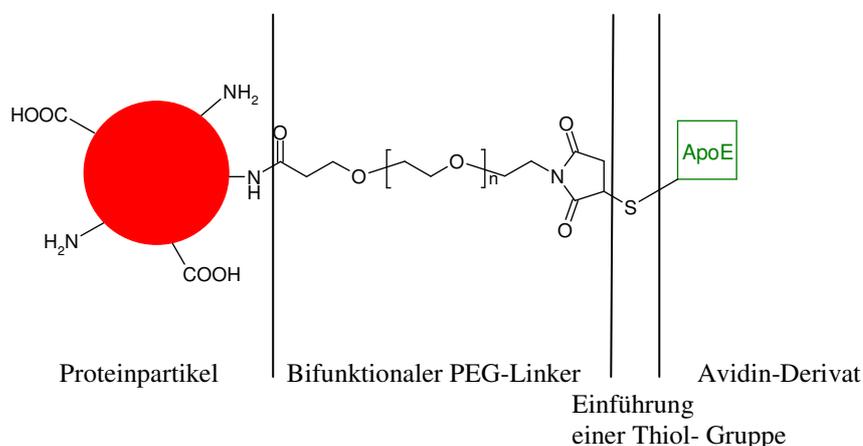


Abb.25: Schematische Darstellung eines ApoE-oberflächenmodifizierten humanen Serumalbumin Nanopartikels (ApoE-PEG-HSA-NP)

3.6.3.1 Spezifität der Bindung

Ein Merkmal von Oberflächenrezeptoren ist die ligandenvermittelte Endozytose, welche über „*coated pits*“ erfolgt, gefolgt von einem anschließenden Recycling und der Wieder-Repräsentation des Rezeptors an der Oberfläche. Bei den Untersuchungen zur Internalisierung der Nanopartikel wurden zur Spezifizierung der Bindung auch Negativkontrollen verwendet. Als Negativ-Kontrolle wurden leere, unmodifizierte HSA-NP ohne PEG-Linker und ApoE-Modifikation im Vergleich zu den ApoE-modifizierten Nanopartikeln auf den Zellen getestet.

3.6.3.1.1 FACS-Analyse

Eine prozentuale Quantifizierung der zellulären Aufnahme der Nanopartikel wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Nach der 4-stündigen Inkubation und dem Auswaschen der Nanopartikel wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mittels ihrer Eigenfluoreszenz im FITC-Kanal des FACScan vermessen. Diese Untersuchungen ergaben eine hohe Bindungsaffinität der unmodifizierten Leerpartikel an die Zellen, wobei man von einer unspezifischen Bindung ausgehen muss.

Eine geeignete Negativkontrolle sollte möglichst wenig unspezifische Bindung aufweisen. Daher wurden die Nanopartikel für eine Negativkontrolle, den ApoE-modifizierten Nanopartikeln weitestgehend angepasst. Für die Modifikation der Nanopartikel mit ApoE, wurden die leeren HSA-Nanopartikel mit einem PEG-Linker versehen. So wurden auch Leerpartikel für die Negativkontrolle mit einem PEG-Linker versehen und versucht die unspezifische Bindung der Leerpartikel durch diese Pegylierung zu erniedrigen. Aus der Abbildung 26 ist deutlich ersichtlich, dass eine Pegylierung der Leerpartikel diese Unspezifität in einen Bereich unter 1% zu verringern vermag. Unterschiedliche Konzentrationen an PEG-Linker wurden getestet, und es war eindeutig erkennbar, dass eine unspezifische Bindung der Nanopartikel an die Zelle abhängig ist vom Grad der Pegylierung. So wurde eine 100-fache Pegylierung der Nanopartikel als optimal getestet und in weiteren Versuchen als Negativkontrolle verwendet.

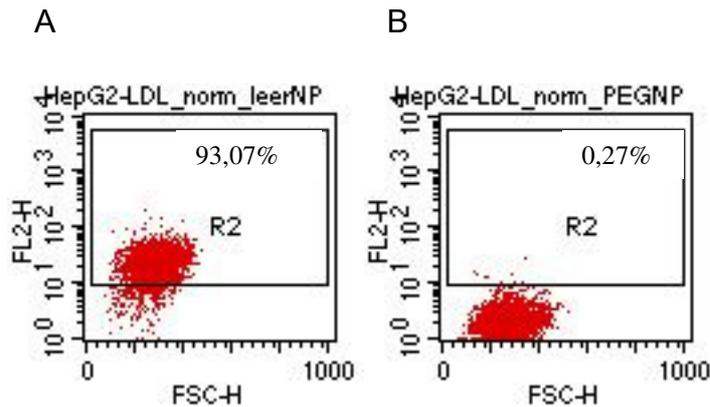


Abb.26: Bindung des leeren Nanopartikelsystems an einmal gesortete HepG2 Zellen im Vergleich zu Nanopartikeln, die mit einem PEG-Linker modifiziert sind.

Dieses Experiment dient zum Auffinden einer geeigneten Negativkontrolle mit möglichst wenig unspezifischer Bindung an Zellen.

3.6.3.2 Zelllinien

Eine prozentuale Quantifizierung der zellulären Aufnahme von ApoE-PEG-NP wurde mit Hilfe der FACS-Analyse durchgeführt. Die unterschiedlichen Zellen wurden auf 24-*well*-Platten ausgesät und nach der Inkubation mit den Nanopartikeln als 3-*well*-Kollektive in FACS-Röhrchen überführt. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Proben im FITC-Kanal durchflusszytometrisch vermessen. Wie in Abbildung 27 zu erkennen, zeigen die ApoE-modifizierten HSA-NP keine erhöhte Affinität zu den verschiedenen Zelllinien. Die Unspezifität der Negativkontrolle wird mit den spezifischen ApoE-modifizierten HSA-NP kaum überschritten.

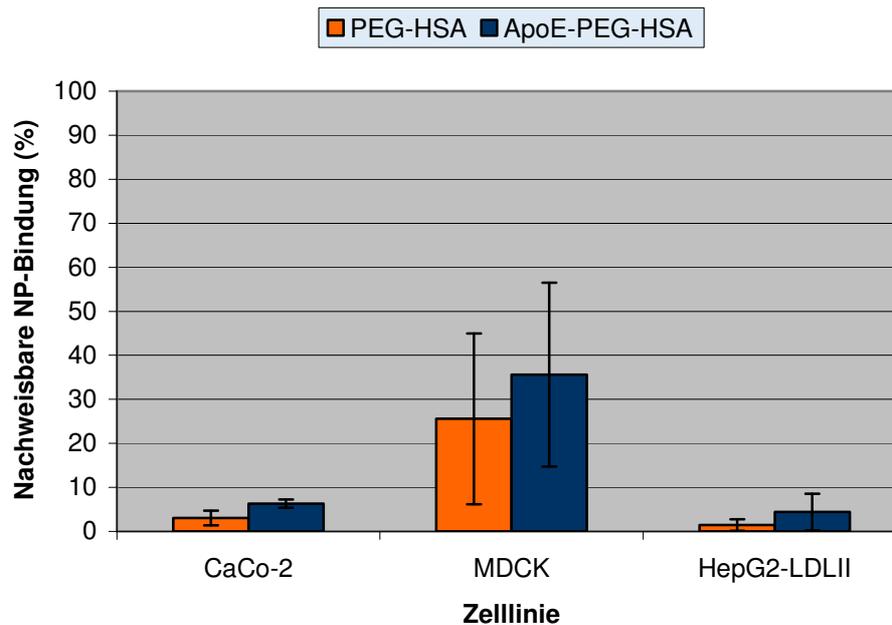


Abb.27: Nachweis der Bindung von ApoE-modifizierten HSA-NP und pegylierten HSA-NP an verschiedene Zelllinien. Der Nachweis erfolgte mittels Durchflusszytometrie durch eine indirekte Antikörper-Detektion. Aus verschiedenen Experimenten wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung ermittelt. CaCo-2: n= 3, MDCK: n=4, HepG2: n= 5.

Um die Zellaufnahme von ApoE-PEG-NP visuell mittels CLSM zu bestimmen, wurden HepG2-LDL II in 4- oder 8-*Chamber Slides* ausplattiert und vier Stunden mit den Nanopartikeln inkubiert. Die Inkubationszeit ist ausreichend für eine Bindung, wie auch Internalisierung in die Zellen. Man geht davon aus, dass der Mechanismus der Internalisierung über den LDL-Rezeptor in nur wenigen Minuten stattfindet. Durch mehrmaliges Waschen wurden die nicht gebundenen oder internalisierten Nanopartikel vom *Slide* gewaschen. Die Zellmembran wurde anschließend wahlweise mit Rhodamin Con A, ALEXA cy5 oder ALEXA 594 angefärbt. Diese Färbung ermöglichte eine Differenzierung der Zellen gegenüber Nanopartikeln oder störender Fluoreszenz und die genaue Lokalisation der Nanopartikel in oder an der zu untersuchenden Zelle. Für beide Fluoreszenzen, sowohl der TRITC-Fluoreszenz der Nanopartikel, als auch die Fluoreszenz der Zellmembran, wurden mehrere Aufnahmen in unterschiedlichen Ebenen durchgeführt und anschließend übereinander gelegt und verglichen. Deutlich zu erkennen ist die blau gefärbte Zellmembran, die eindeutig die Lokalisation der Zellen zeigt und die rot fluoreszierenden Punkte, welche Nanopartikel repräsentieren (Abbildung 28).

Das Ergebnis bei der Inkubation von leeren, pegylierten und ApoE-modifizierten Nanopartikeln mit HepG2-LDL II Zellen ist exemplarisch in Abbildung 28 zu erkennen.

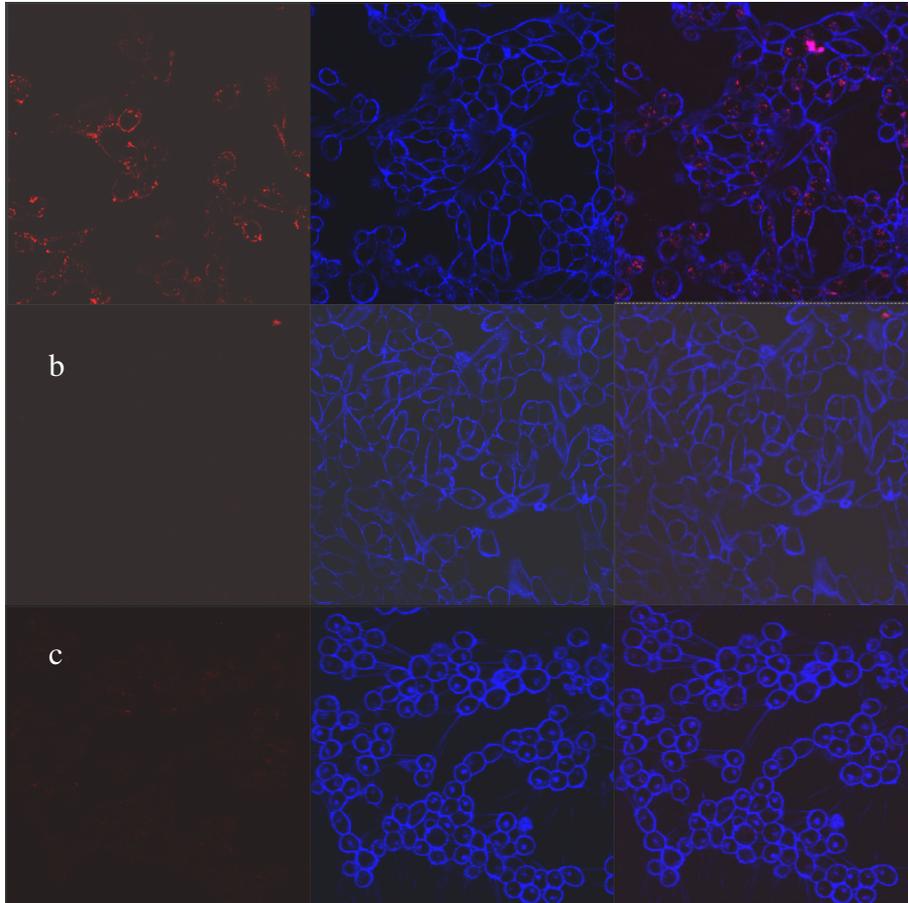


Abb.28: CLSM-Aufnahmen von LDL-R hochexprimierenden HepG2-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen HSA-Nanopartikel-Präparationen.

Blau fluoreszierend ist die ALEXA cy5 gefärbte Zellmembran zu erkennen, rot die im TRITC-Bereich fluoreszierenden HSA-Nanopartikel

- a. Inkubation mit HSA-Leerpartikeln
- b. Inkubation mit pegylierten HSA-NP
- c. Inkubation mit ApoE-modifizierten PEG-NP

Es ist eine Lokalisation der leeren HSA-Nanopartikel an der Zellmembran deutlich erkennbar (Abb. 28 a), während eine spezifische Internalisierung der ApoE-PEG-NP (Abb. 28 c) oder auch eine Bindung der pegylierten Nanopartikel (Abb. 28 b) nicht nachweisbar ist. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der vorangegangenen FACS-Analysen.

Eine Gehirn-Kapillarendothelzelllinie der Maus hingegen zeigt die erwartete Affinität der ApoE-PEG-NP an die Zelle. Die unspezifische Bindung der pegylierten Nanopartikel liegt bei dieser Zelllinie ebenfalls etwas höher. Der Unterschied und somit die höhere Bindungsaffinität der ApoE-PEG-HSA-NP ist deutlich erkennbar (Abbildung 29). Auch bietet diese Zelllinie weitere Vorteile gegenüber den zuvor getesteten Zelllinien. Die Zellen sind ursprünglich aus dem Gehirn von Mäusen und Gehirnendothelzellen sind Zielzellen für unser spezifisches Gehirn-*Targeting*. Die Nähe zu den in der Arbeitsgruppe durchgeführten Tierversuchen mit Mäusen und ihre Herkunft aus dem Gehirn machen diese Zellen als *in-vitro* Modell so attraktiv.

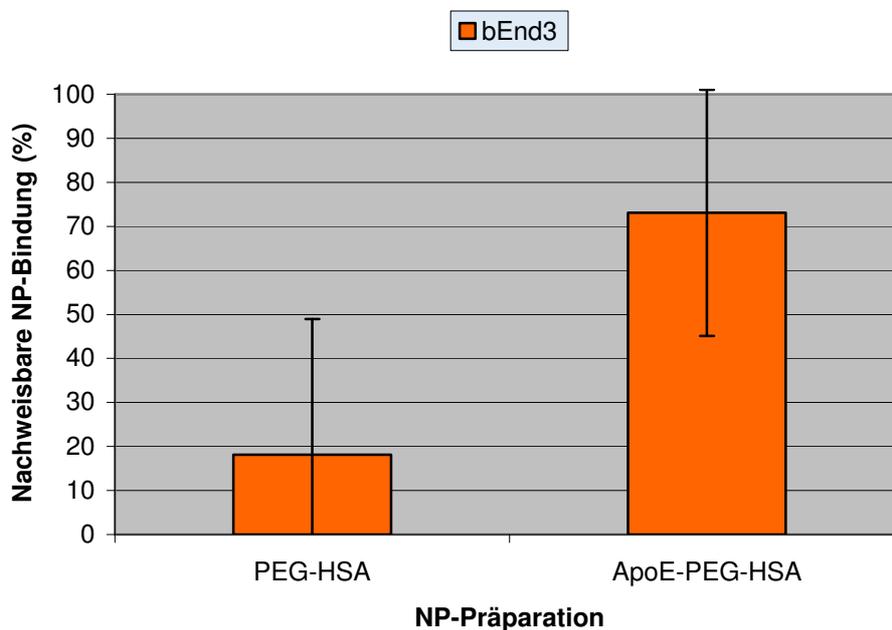


Abb.29: Nachweis der Bindung von ApoE-modifizierten HSA-NP und pegylierten HSA-NP an die Maus-Gehirn Endothelzelllinie bEnd3. Der Nachweis erfolgte mittels Durchflusszytometrie durch eine indirekte Antikörper-Detektion. Aus verschiedenen Experimenten wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung ermittelt. $n=8$; Unterschiede in den untersuchten Werten wurden mittels dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test (Siegel&Castellan, 1998; Sachs, 1992) untersucht. Statistische Signifikanz wurde definiert mit $p < 0,01$; $p=0,0086$

3.6.3.3 Primärzellen

Hauptziel waren Untersuchungen mit frisch isolierten Gehirn-Kapillarendothelzellen. Dies sind die eigentlichen Zielzellen, welche für erste Versuche aufgrund leichter Handhabung gern durch Zelllinien ersetzt werden. Auch hier wurden die Bindungsaffinität der unterschiedlichen Nanopartikel und das Potential zur Internalisierung getestet. Bei den Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie war ein eindeutiger Unterschied zwischen der Bindung der nicht modifizierten PEG-NP und der ApoE-modifizierten HSA-NP zu erkennen. Die ApoE-modifizierten Nanopartikel zeigten durchweg eine ungefähr dreifach erhöhte Affinität zu den Zielzellen gegenüber den pegylierten Vergleichs-Nanopartikeln (Abbildung 30). Man kann davon ausgehen, dass es sich um eine spezifische Bindung der HSA-Nanopartikel an die Zielzelle handelt. Auffallend ist die selektive Affinität dieser Nanopartikel auf Zellen der Gehirnkapillaren.

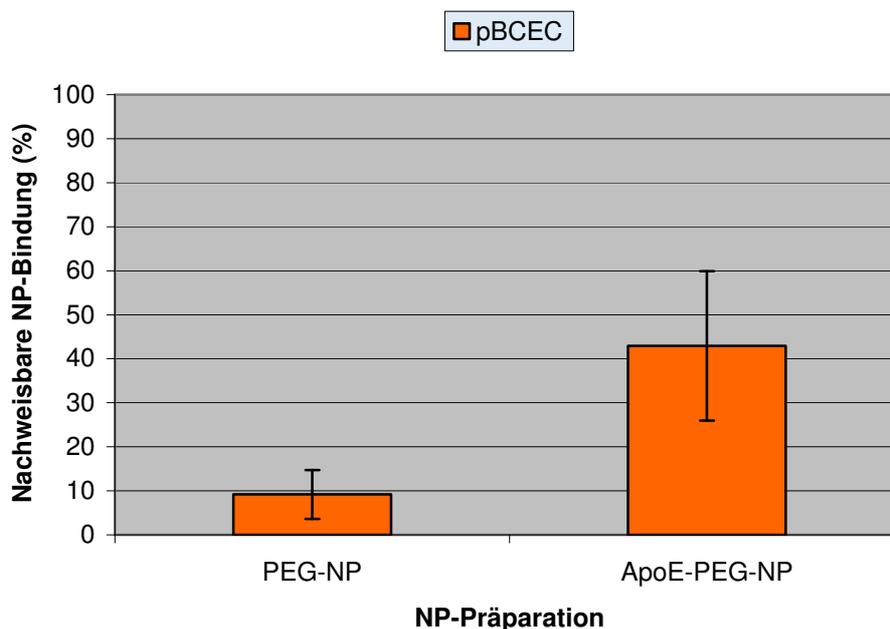


Abb.30: Nachweis der Bindung von ApoE-modifizierten HSA-NP und pegylierten HSA-NP an primäre *porcine brain capillary endothelial cells* (pBCEC). Der Nachweis erfolgte mittels Durchflusszytometrie durch eine indirekte Antikörper-Detektion. Aus verschiedenen Experimenten wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung ermittelt. $n = 8$; Unterschiede in den untersuchten Werten wurden mittels dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test (Siegel&Castellan, 1998; Sachs, 1992) untersucht. Statistische Signifikanz wurde definiert mit $p < 0,01$; $p = 0,0006$

Die Affinität der ApoE-modifizierten HSA-NP war LDL-R- und chargenunabhängig. So wurde bei jedem Experiment parallel zu der NP-Bindung auch die nachweisbare LDL-Rezeptor-Expression nachgewiesen. Diese variierte stark zwischen 10 und 50% in den einzelnen Experimenten, während die erhöhte Bindung der ApoE-modifizierten HSA-NP rezeptorunabhängig erhöht war. Um eine chargenabhängige Affinität der HSA-NP auszuschließen, wurden im Laufe dieser Arbeit ebenso verschiedene Partikelchargen getestet. Die Variation innerhalb der Chargen war nicht signifikant. Es wurde mit allen Chargen das gleiche Ergebnis gezeigt. Neben unterschiedlichen Herstellungszeitpunkten wurden auch Nanopartikel mit dem ApoE von Calbiochem, einem israelischen ApoE und dem synthetisch hergestelltem ApoE3 aus Freiburg aus der Arbeitsgruppe von Dr. Hoffmann getestet. Jedesmal konnte eine erhöhte Bindung der ApoE-modifizierten HSA-NP an Gehirn-Kapillarendothelzellen gezeigt werden.

Dasselbe Ergebnis ergaben auch die Experimente am CLSM. Es wurde hierbei eine Membranfärbung mit RhodaminConA (rot) verwendet. Die eigenfluoreszierenden Nanopartikel zeigten eine grüne Färbung. Wie in Abbildung 31 dargestellt, sind bei einer Inkubation mit pegylierten und nicht-modifizierten HSA-NP nach dem Waschen und bei Betrachtung der Zellen unter dem CLSM keine Nanopartikel in und an der Zelle detektierbar. Bei der Inkubation mit ApoE-modifizierten HSA-NP hingegen verbleiben die Partikel an bzw. in den Zellen und können nicht abgewaschen werden. Die Kolo-kalisation der Nanopartikel mit den Zellen spricht auch in diesem Fall für eine spezifische Interaktion der ApoE-modifizierten Nanopartikel mit diesen speziellen Zellen.

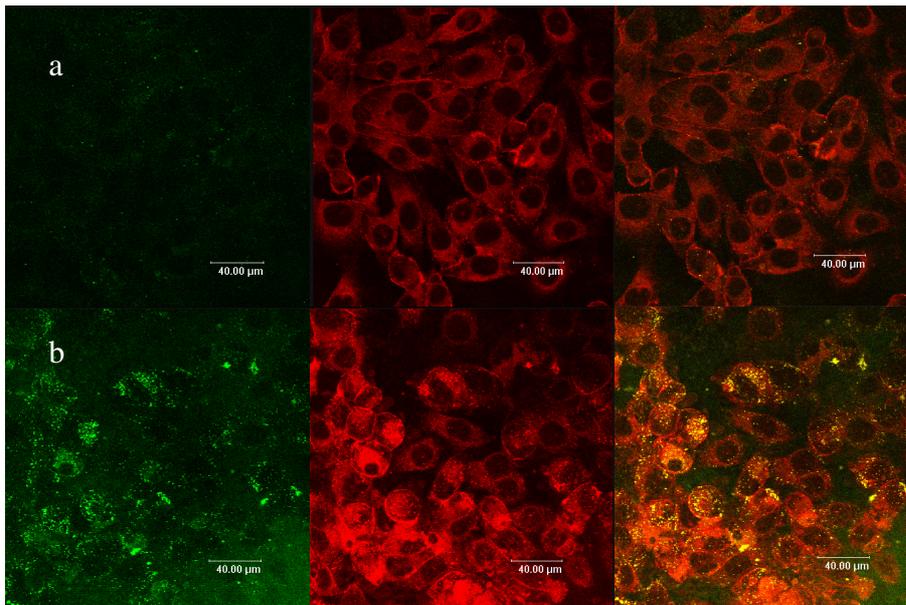


Abb.31: CLSM-Aufnahmen von primären *porcine brain capillary endothelial cells* (pBCEC) nach Inkubation mit unterschiedlichen HSA-Nanopartikel-Präparationen. Rot fluoreszierend ist die Rho ConA gefärbte Zellmembran zu erkennen, grün die im TRITC-Bereich fluoreszierenden HSA-Nanopartikel

- a Inkubation mit pegylierten HSA-Nanopartikeln (Kontrolle)
 b Inkubation mit ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikeln

3.7 ApoE-Bindung auf hochexprimierenden HepG2-LDLII

Für eine Bindung der ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikel an den LDL-Rezeptor ist eine Bindung des Liganden ApoE, der an der Oberfläche der Nanopartikel gebunden ist Voraussetzung. Diese Bindung ist der erste Schritt für eine LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose der Nanopartikel.

Um die nicht vorhandene Affinität der Nanopartikel auf HepG2-LDLII Zellen besser auswerten zu können, musste die Bindung von freiem ApoE an den Rezeptor bzw. an die Zelle untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach ihrer standardmäßigen Behandlung und Kultivierung über zwei Tage in lipidfreiem Medium mit dem freien ApoE inkubiert. Zu den Zeitpunkten 30, 60 und 120 Minuten wurden die Zellen jeweils für eine FACS-Analyse trypsiniert, mit einem Antikörper gegen das ApoE und einem gelabelten Sekundärantikörper markiert. So konnte zu jedem Zeitpunkt die aktuelle Bindung des freien ApoEs an die Zelle prozentual nachgewiesen werden (Abbildung 32).

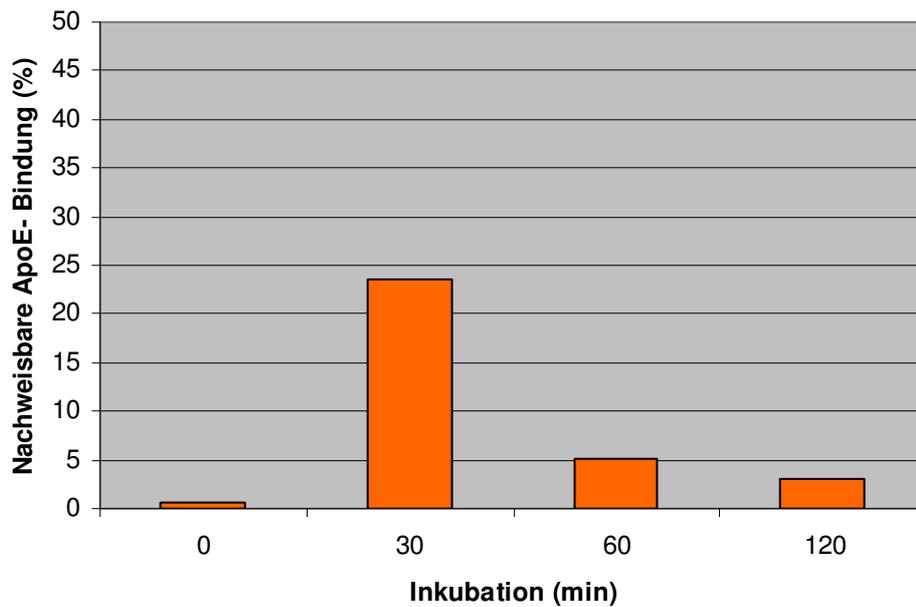


Abb.32: Nachweis der Bindung von ApoE (Calbiochem) an zweimal gesorteten HepG2 Zellen (HepG2 LDL II) über 2 Stunden. Die Untersuchungen sind hier exemplarisch an jeweils einem Experiment aufgezeigt. Der Nachweis des LDL-Rezeptors betrug bei diesem Experiment 54 %.

Es wurden zwei verschiedene ApoE-Proteine in diesen Untersuchungen getestet. So wurde stets zwischen dem reinen ApoE der Firma Calbiochem (Mischung aus ApoE 1, 2 und 3) und dem ApoE aus Israel (ApoE 3) unterschieden. Wie in Abbildung 32 zu sehen, erreichte die Bindung des ApoE von Calbiochem nach 30 Minuten die höchste prozentuale Bindung. Nach 30 Minuten wurde der Anteil des nachweislich gebundenen ApoE wieder geringer. Dies ist Indiz und Bestätigung der allgemeinen Informationen über die Präsentation und den Internalisierungsmechanismus des LDL-Rezeptors. Der LDL-Rezeptor wird nach der Bindung eines Liganden internalisiert und erst nach Verarbeitung der Komponenten im Inneren der Zelle wieder an der Oberfläche für eine weitere Bindung von neuen Liganden repräsentiert.

Fraglich ist in diesem Zusammenhang nur, warum der Bindungsnachweis trotz nachweislich hoher Rezeptorexpression (zwischen 50 und 70%) relativ gering ist und nicht über 25 - 30% gebundenem ApoE steigt. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist das große Zeitfenster und die nicht vorhandenen Informationen über die Internalisierungsgeschwindigkeit des Rezeptors.

In welchem Schritt der Internalisierung befinden sich wie viel Prozent der Zellen zum Zeitpunkt des Trypsinierens? Da dieser Vorgang sicher kein synchron ablaufender Prozess ist, wird man durch diese Experimente kein hundertprozentiges Ergebnis erreichen und kann so nur eine Tendenz für den Zeitpunkt der höchsten Bindung des freien ApoEs aufstellen. Ganz ähnlich stellen sich auch die Untersuchungen für das freie ApoE aus Israel (Abb. 33) dar. Auch mit diesem verwendeten ApoE aus Isreal erreicht man keine höheren Bindungszahlen als 25-30% gebundenem ApoE. Diese höchste Bindung geht das ApoE aber erst nach 60 Minuten mit den Zellen ein. Dieses ApoE muß also länger inkubiert werden als das ApoE der Firma Calbiochem. Das könnte dafür sprechen, dass die Bindungseffektivität geringfügig kleiner ist, die Bindung an sich aber nach 60 Minuten die gleichen Werte wie das ApoE der Firma Calbiochem aufweist.

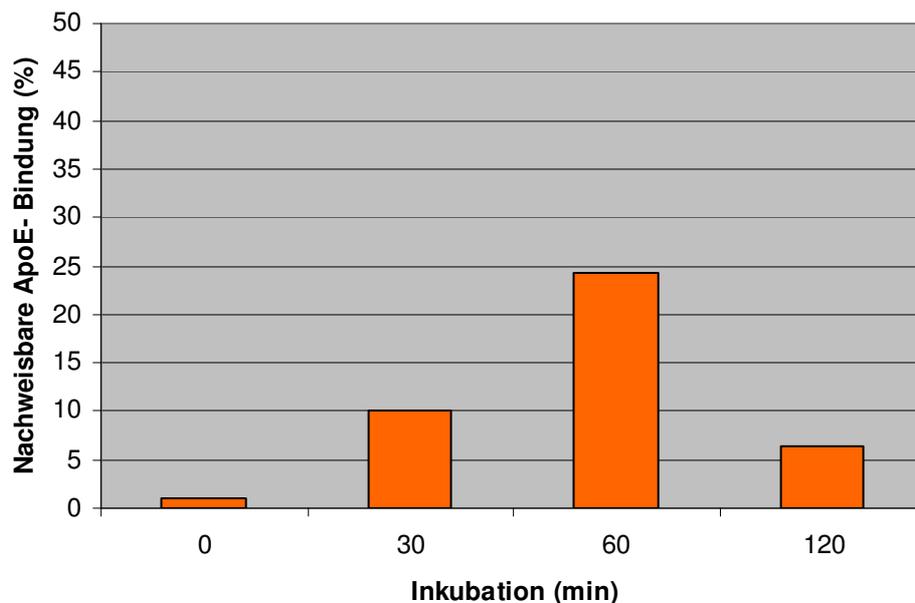


Abb. 33: Nachweis der Bindung von ApoE (Israel) an zweimal gesorteten HepG2 Zellen (HepG2 LDL II) über 2 Stunden. Die Untersuchungen sind hier exemplarisch an jeweils einem Experiment aufgezeigt. Der Nachweis des LDL-Rezeptors betrug bei diesem Experiment 54 %.

Wie aus den Abbildungen 32 und 33 ersichtlich ist, war bei diesen beiden exemplarisch dargestellten Experimenten jeweils der parallel durchgeführte LDL-Rezeptornachweis entsprechend hoch, sodass die geringe Bindung nichts mit fehlendem Rezeptor zu tun haben kann.

Nach Beurteilung und Auswertung der durchgeführten Experimente kann man davon ausgehen, dass es sich bei der Bindung von ApoE-modifizierten HSA-NP um einen ApoE-spezifischen Mechanismus an Zellen des ZNS handelt. Dafür spricht auch die Tatsache der niedrigen Nachweisbarkeit einer ApoE Bindung auf HepG2-LDLII Leberzellen.

3.8 Nachweis einer spezifischen Bindung der Nanopartikel mittels unterschiedlichen Präinkubationen

Inwiefern die niedrige Rezeptoraffinität des ApoEs einen LDL-Rezeptor abhängigen Transport ermöglicht, wurde in weiteren Experimenten zur LDL-Rezeptor-spezifischen Bindung und Internalisierung untersucht. In diesen Experimenten bestand die Aufgabe in der genauen Untersuchung der Bindung von HSA-NP an die Zellen. Die Wechselwirkung des ApoEs mit dem LDL-Rezeptor wurde in Konkurrenz mit einem Antikörper gegen die LDL-R-Bindungsdomäne und freiem ApoE untersucht. Besteht eine spezifische Bindung an den LDL-Rezeptor, kann die Bindung durch den Antikörper gegen die LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne oder zugefügtes ApoE inhibiert werden? Die folgenden Experimente sollten helfen, den genauen Mechanismus der zuvor festgestellten Bindung weiter einzugrenzen und zu charakterisieren. Dafür wurden die Zellen vor der Inkubation mit Nanopartikeln und der anschließenden FACS-Analyse einmal mit dem Antikörper gegen den LDL-Rezeptor und parallel dazu mit freiem ApoE für eine Stunde vorinkubiert. Das zu erwartende Ergebnis, von einer gehemmten Bindung bei einer angenommenen LDL-rezeptorvermittelten Endozytose ist wie in Abbildung 34 ersichtlich, nicht nachweisbar. Die Vorinkubation mit dem Antikörper hat keine Auswirkung auf die Bindung der ApoE-PEG-HSA-NP, während eine leichte Hemmung der ApoE-PEG-HSA-NP Bindung durch freies ApoE erkennbar ist. Diese Inhibition durch das freie ApoE ist allerdings unverhältnismäßig gering für einen spezifischen Mechanismus.

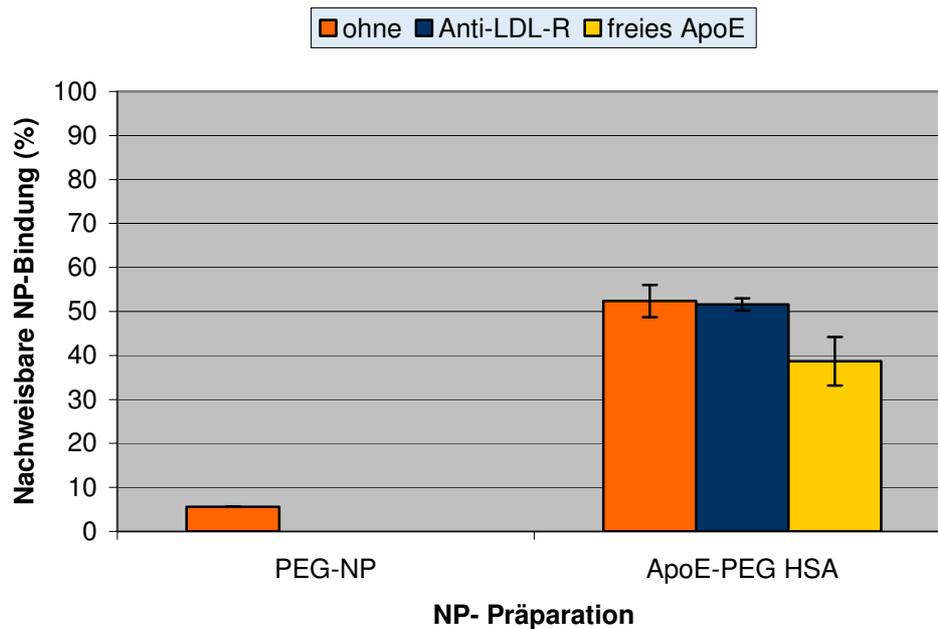


Abb. 34: Nachweis der ApoE-PEG-NP-Bindung an primäre porcine brain capillary endothelial cells (pBCEC) nach Vorinkubationen der Zellen mit dem Antikörper Anti-LDL-R und freiem ApoE.

Aus verschiedenen Experimenten wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung ermittelt, n=3

Man muss also davon ausgehen, dass die Endozytose mittels LDL-Rezeptor nicht alleiniger Mechanismus der ApoE-PEG-Nanopartikelinternalisierung ist.

Ein anderer Rezeptor oder ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen zur Internalisierung wären denkbar.

3.9 Testung von Nanopartikeln mit unterschiedlich modifiziertem ApoE als Ligand

Rezeptorvermittelte Transporte sind hochspezifisch und schon kleinste Änderungen in der Aminosäuresequenz des Liganden können große Auswirkungen bei der Liganden-Rezeptor-Interaktion haben. So ist der Rezeptor nicht mehr in der Lage, den Liganden als solchen zu erkennen und zu binden.

Aus diesem Grund und aufgrund *in-vivo* Vorversuchen wurden verschieden mutierte ApoE-Proteine in eine Bindungsuntersuchung eingefügt.

Bei den ApoE-Modifikationen handelt es sich um:

- Sendai-ApoE: Arginin an der Stelle 145 wird durch Prolin ersetzt
- 142-3-ApoE: ApoE3 mit einer Mutation an Position 142; ein Arginin wird durch ein Cystein ersetzt.

Dieses ApoE wurde uns von Dr. Hoffmann aus Freiburg zur Verfügung gestellt.

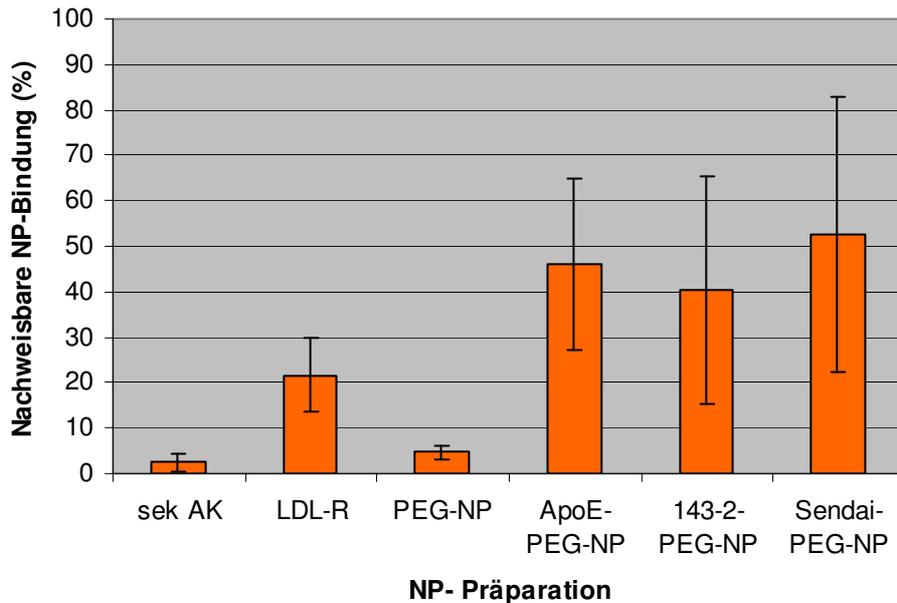


Abb. 35: Nachweis der Bindung von ApoE-HSA-NP-Modifikationen an primäre porcine brain capillary endothelial cells (pBCEC).

ApoE-PEG-NP: ApoE 3 an der Oberfläche der Nanopartikel

143-2-PEG-NP: Arg 142 → Cys

Sendai-PEG-NP: Arg 145 → Pro

Aus verschiedenen Experimenten wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung ermittelt, n=3

Wie aus Abbildung 35 ersichtlich, haben diese geringfügigen Änderungen der Aminosäuresequenz der getesteten ApoE-Varianten kaum Einfluss auf die Bindung der ApoE-modifizierten Nanopartikel an pBCECs. Dies spricht ebenfalls gegen einen LDL-R vermittelten Transport und für einen komplexen Mechanismus aus unterschiedlichen Komponenten.

3.10 Untersuchungen zu alternativen Mechanismen

Welche Membrankomponente neben dem LDL-Rezeptor bei der Bindung und Internalisierung von ApoE-modifizierten HSA-PEG-NP noch eine Rolle spielen könnte, wurde in abschließenden Experimenten untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass LDL-Komplexe auch über eine Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG)-vermittelte Endozytose internalisiert werden (Datta et al., 2000) können. Das HSPG besteht aus in der Membran verankerten Kernproteinen, deren polyanionische Heparansulfat-Seitenketten eine stark negative Ladungsdichte auf der Zellmembran bedingen (Yanagishita und Hascall, 1992). Dies ist der Grund, warum eine Reihe physiologischer Liganden über elektrostatische Wechselwirkungen an die Zellmembran binden. HSPG hat zwei Hauptaufgaben: Neben der zellulären Aufnahme von Liganden durch adsorptive Endozytose, präsentiert es Liganden in ihrer rezeptoraktiven Konformation (Belting 2003). In den folgenden Versuchen wurde das HSPG durch die Behandlung mit Heparinase I partiell von der Oberfläche entfernt. Heparinase I spaltet die 1,4-D-glykosidischen Bindungen der Heparansulfat-Seitenketten (Linhardt, 1999). Die Ergebnisse in Abbildung 36 deuten auf eine Beteiligung des HSPG an der Bindung und Internalisierung von ApoE-PEG-NP hin. Da Heparinase I das HSPG nur teilweise und nur in hohen Konzentrationen entfernt (Linhardt, 1999), muss der Mechanismus noch weiter untersucht und die Ergebnisse durch weiterführende Experimente untermauert werden.

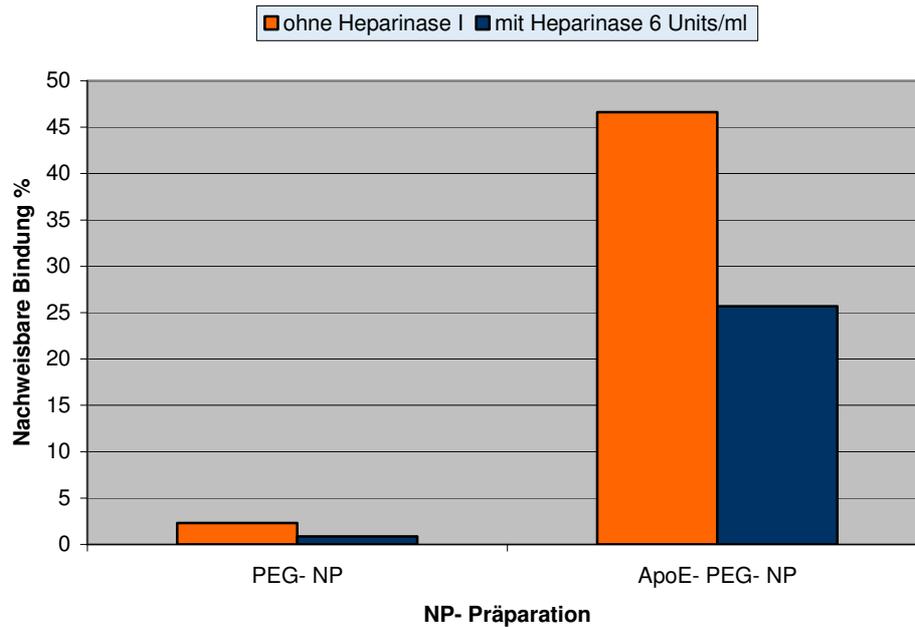


Abb. 36: Einfluss von Heparinase I (6 Units/ml) auf die Bindung von ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikeln an bEnd3 Maus-Gehirn-Endothelzellen im Vergleich zu PEG-NP.

Die Untersuchungen sind hier exemplarisch an jeweils einem Experiment aufgezeigt.

Durch die Entfernung der Heparansulfat-Seitenketten wird dem kationischen ApoE die Möglichkeit genommen über elektrostatische Wechselwirkungen an die Zellmembran zu binden. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, könnten Folgeexperimente zu Aufnahme und Bindung in Anwesenheit von polykationischen Poly-L-Lysin als Kompetitor oder Heparin als strukturgleicher Kompetitor durchgeführt werden.

In einem weiteren Ansatz wurden verschiedene Konzentrationen an Heparinase I zur Vorinkubation eingesetzt. Dabei korreliert der Bindungsunterschied von ApoE-PEG-HSA-NP mit der eingesetzten Heparinase I Konzentration (Abb. 37). Man kann somit davon ausgehen, dass das HSPG bei der Bindung der ApoE-modifizierten Nanopartikel an Gehirn-Endothelzellen eine Rolle spielt. Inwiefern noch andere Mechanismen eine zusätzliche Rolle spielen, muss in weiterführenden Experimenten getestet und bewiesen werden.

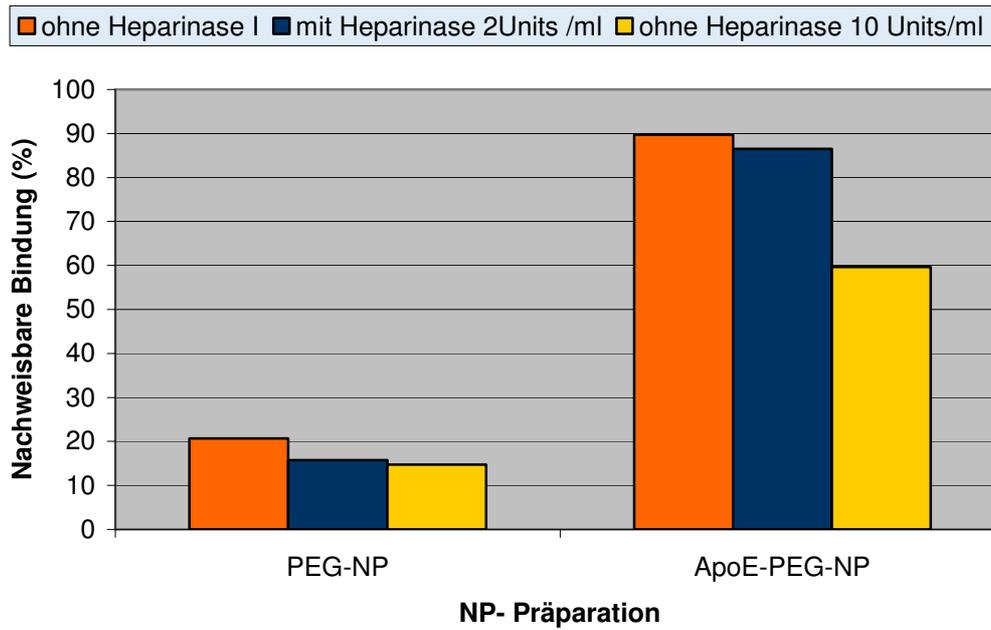


Abb. 37: Einfluss von Heparinase I (2-10 Units/ml) auf die Bindung von ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikeln an bEnd3 Maus-Gehirn-Endothelzellen im Vergleich zu PEG-NP.

Die Untersuchungen sind hier exemplarisch an jeweils einem Experiment aufgezeigt.

4 Diskussion

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine komplexe Barriere zwischen dem Blutkreislauf, der Organe und des zentralen Nervensystems. Sie schützt das Gehirn vor toxischen und schädlichen Substanzen und behindert gleichzeitig eine effektive Therapie von zahlreichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Eine große Anzahl an Medikamenten wird durch die BHS am Eintritt in das Gehirn gehindert, bzw. wenn es ihnen gelingt, diese Schranke zu überwinden, erreichen sie ihren Wirkort nur in sehr geringen Dosen. Um eine Therapie solcher Erkrankungen zu entwickeln, ist es essentiell, die generellen Prozesse an der BHS und den Einfluß verschiedener Substanzen zu identifizieren und zu untersuchen.

4.1 Etablierung eines in-vitro Modells der Blut-Hirn-Schranke

Eine Untersuchung der BHS *in-vivo* ist nur sehr schwer möglich und erfordert folgenschwere Eingriffe in das zentrale Nervensystem. So wurde ein *in-vitro* Modell dieser Barriere entwickelt, das den allgemeinen Anforderungen eines solchen Modells entspricht. So sollte ein *in-vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke die allgemeinen Eigenschaften dieser zellulären Barriere *in-vivo* widerspiegeln und auf Zugabe von unterschiedlichen Substanzen vergleichbar der *in-vivo* Situation reagieren. Das Modell sollte eine restriktive parazelluläre Barriere darstellen, einen physiologisch realistischen Aufbau zeigen und funktionale Schlüssel-Transporter exprimieren (Gumbleton und Audus, 2001). Ein gut charakterisiertes Modell sollte ein System darstellen an dem mechanische Aspekte des Transportes, ebenso wie biologische und pathologische Grundprozesse gezeigt werden können.

Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Modell entspricht einem „Zwei-Kammer-Modell“. In einem *Transwell*-System sind zwei Kompartimente durch eine Membran voneinander getrennt. Auf dieser Membran werden die Kapillarendothelzellen ausgebracht und stellen somit die Blut- Hirn Schranke dar. Die zwei, durch die Membran und die ausgebrachte Zellschicht separierten Kompartimente stellen auf der einen Seite das Blut-Kreislaufsystem und auf der anderen Seite das Gehirn dar. Dieses Modell konnte den gestellten Ansprüchen weitestgehend gerecht werden.

So konnte durch den Nachweis endothelzellspezifischer Marker (Abb. 9) und der Ermittlung des TEER-Wertes (Abb. 10) sichergestellt werden, dass wichtige Merkmale und Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke und deren Zellen auch *in-vitro* hergestellt werden können. Für das Blut-Hirn-Schranken-Modell mit isolierten und anschließend wieder zu Monolayern gezüchteten Gehirn-Endothelzellen finden sich in der Literatur verschiedene Angaben bezüglich der Endothelzell-Marker (vWF, ZO-1). So konnten einige Gruppen diese Faktoren mittels Immunfärbung in kultivierten Zellen nachweisen (Beuckmann et al., 1995), andere wiederum nicht (Mischek et al., 1989). In dem Modell der vorliegenden Arbeit mit porcinen Gehirn-Kapillar-Endothelzellen war dieser Nachweis durchgängig möglich (Abb. 9). Auch konnten charakteristische Transportmechnismen, wie das PgP, an diesem Modell belegt werden.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass Teiluntersuchungen mit Zelllinien möglich waren, sie aber die komplexen Abläufe der Primärkultur nicht ersetzen können. So waren für verschiedene Aspekte der Zellkulturuntersuchungen verschiedene Zelllinien nötig.

Während in Transportuntersuchungen MDCK und CaCo-2 Zellen höchstmögliche TEER-Werte (Abb. 11) erlangten und so die Barriereeigenschaften gut widerspiegeln, wurden in Versuchen um den rezeptorvermittelten Transport von ApoE-modifizierten Nanopartikeln, eine Leberzelllinie mit einem hohen Nachweis an LDL-R (HepG2- LDL II) bevorzugt. Um endgültige Aussagen über die Vor- und Nachteile eines solchen *in-vitro* Modelles machen zu können, wurden die Experimente schließlich mit primären *porcinen capillary endothelial cells* (pBCEC) durchgeführt.

Neben der aufwendigen Isolierung der Kapillarfragmente aus frischem Gehirn stellte das *in-vitro* Modell mit Primärzellen auch in anderen Bereichen spezielle Anforderungen. Dazu zählte eine optimale Kultivierung der Zellen, sodass die zelltypischen Charakteristika auch über einen definierten Kulturzeitraum erhalten werden konnten. Nur so ist eine Übertragung der Ergebnisse *in-vitro* auf die *in-vivo* Situation möglich. Dies war durch Kultur in Medium mit dem Wachstumsfaktor, *recombinant human fibroblast growth factor-basic* (bfgf), über einen Zeitraum von 7 - 9 Tagen gut möglich. Unter den beschriebenen Voraussetzungen war das *in-vitro* Modell mit primären porcinen Kapillarendothelzellen gut geeignet für weitere Untersuchungen der Blut-Hirn-Schranke.

4.2 Nanopartikel im in-vitro System

Nanopartikel, kolloidale Wirkstoffträger, sind geeignete Vehikel für den Transport unterschiedlicher Therapeutika (Aliautdin et al., 2003; Kreuter, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Nanopartikelpräparationen gearbeitet. Zum einen mit PBCA-NP und zum anderen mit HSA-basierten Nanopartikeln. Entscheidend für die Anwendung dieser Arzneistoffträger in einer Therapie ist neben der möglichen Verbindung zwischen Vehikel und Arzneistoff, die Toxizität, die zelluläre Aufnahme des Systems und die biologische Wirksamkeit am Wirkort.

4.2.1 PBCA-Nanopartikel

PBCA ist ein synthetisches Polymer. Welche Wirkung PBCA-Nanopartikeln auf Zellmonolayer im *in-vitro* Modell der BHS haben, wurde durch Beobachtungen des TEER-Wertes untersucht. Die präparierten Primärzellen, wie auch die verwendeten Zelllinien wiesen einen hohen transendothelialen elektrischen Widerstand auf. Wie sich dieser bei Zugabe von PBCA-Nanopartikeln in den folgenden 24 Stunden verhält, wird im Ergebnisteil in Abbildung 12 gezeigt. Die primäre Reaktion der Zellen auf die Zugabe von PBCA-Nanopartikeln ist ein akuter TEER-Abfall, der sich aber im Laufe der nächsten 8 Stunden komplett rehabilitiert und auf den Ausgangswert zurück steigt. In den angewandten Konzentrationen haben die Partikel langfristig keinen Einfluß auf die Barriereigenschaften der BHS. In höheren Konzentrationen kann man diesen Effekt nicht mehr beobachten und es kommt zur Beeinträchtigung der BHS-Eigenschaften. Daher können PBCA-Nanopartikel nur in geringen Konzentrationen eingesetzt werden. Ein weiterer Nachteil der PBCA-Nanopartikel liegt im Nachweis der Partikel in einem *in-vitro* System. So müssen diese Nanopartikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Hierbei ist eine sichere Aussage über die Herkunft der nachgewiesenen Fluoreszenz nicht möglich. So könnte die detektierte Fluoreszenz ebenso der Nachweis von freiem, nicht gebundenem Farbstoff, darstellen.

4.2.2 HSA-Nanopartikel

Die natürlichen Polymere humanes Serumalbumin (HSA) und Gelatine dagegen sind Proteine, die sich aufgrund ihrer Herkunft gut zur Anwendung im Menschen eignen. Sie zeigen keine oder nur sehr geringe Zytotoxizität. Als Protein besitzt das humane Serumalbumin in seiner Struktur primäre Aminogruppen, sowie freie Carboxylgruppen, die bei Nanopartikeln aus HSA an der Partikeloberfläche erscheinen und zur Bindung von Stoffen genutzt werden können. Zudem weisen diese HSA-basierten Nanopartikel den Vorteil der Eigenfluoreszenz auf. So sind sie im Zellkultursystem gut und sicher nachweisbar.

4.2.3 Transport von Nanopartikeln

Das *Transwell*-System für Untersuchungen des Transports an der Blut-Hirn-Schranke ist ein oftmals beschriebenes System (Franke et al., 2000; Rauh et al., 1992). So wurde auch zur Untersuchung der hier eingesetzten Nanopartikel dieses System herangezogen. Das Zwei-Kammer-System besteht aus 2 durch eine Membran getrennte Kompartimente. Das obere Donor-Kompartiment stellt den Blutkreislauf dar, während das untere Akzeptor-Kompartiment das Gehirn widerspiegeln soll. Getrennt sind die beiden Kompartimente durch eine netzartige Membran, auf die entsprechende Zellen (BCECs oder Zelllinien mit BHS-Merkmalen) ausplattiert werden.

Ein Transport der Nanopartikel wurde mittels Fluoreszenzmessung beurteilt. Es handelt sich um einen indirekten Nachweis der Nanopartikel über die Fluoreszenz im Medium der zwei Kompartimente. In das obere Kompartiment wurden die fluoreszierenden Nanopartikel zugegeben, und nach definierten Zeitabschnitten (2, 4, 6, 24 Stunden) wurden Proben des Mediums aus dem oberen und unteren Kompartiment entnommen und fluometrisch vermessen. Bei einem Transport der Nanopartikel vom „Blutkreislauf“ in das „Gehirn“ sollte die Fluoreszenz im Donor-Kompartiment abnehmen, während sich die Fluoreszenz im Akzeptor-Kompartiment stetig erhöht und beide Fluoreszenzen sich im Laufe der Zeit aneinander angleichen.

Erster Ansatz zur Beurteilung von Transport in diesem System war die Beobachtung der Fluoreszenz und somit der Nanopartikel im leeren *Transwell*-System ohne Zelllayer. Die detektierte Fluoreszenz nahm sowohl bei den PBCA-Nanopartikeln als auch bei den HSA-Nanopartikeln im Donor-Kompartiment über 24 Stunden stetig ab. Während dementsprechend die Fluoreszenz im Akzeptor-Kompartiment bei den HSA-Nanopartikeln zunahm, war kein Fluoreszenzanstieg im Akzeptor-Kompartiment der PBCA-Nanopartikel zu verzeichnen.

Obwohl die Porengröße der Membran zwischen den Kompartimenten 300 µm beträgt und somit Nanopartikel zwischen 100 und 200 µm Größe problemlos passieren können sollten, stellt diese Membran eine sichtbare Barriere für den Transport von Nanopartikeln dar. Die getesteten Nanopartikel passieren nur sehr langsam oder in geringen Mengen die *Transwell*-Filter-Membran (Abb.13 und 14).

Um ausschließen zu können, dass das verwendete *Coating* der Membran mit Collagen IV einen Einfluß auf den Transport der Nanopartikel hat, wurden Collagen IV *gecoatete* Membranen mit *ungecoateten* Membranen verglichen. Aus diesen Ergebnissen (Abb. 13 und 14) ist ersichtlich, dass kein Unterschied in Zeit, Fluoreszenz oder Transport durch das *Coating* bedingt wird. Diese beiden Untersuchungsansätze führten zu dem Ergebnis, dass dieses *Transwell*-System für die Untersuchung von Nanopartikel-Transport aufgrund der Undurchlässigkeit der Membran nicht geeignet ist. Man kann jedoch eine generelle Anwendung dieses Systems für Transportuntersuchungen nicht ausschließen.

4.2.4 Substanztransport im *in-vitro* Modell

Das Membranprotein P-Glykoprotein agiert an der BHS als aktive *drug efflux*-Pumpe. Diese transportiert aktiv eine Reihe cytotoxischer Arzneistoffe aus der Zelle oder der Zellmembran und kann so eine *multidrug resistance (MRD)* bedingen (Gottesman und Pastan, 1993; Goldstein et al., 1992, Ambudkar et al., 1999). Substrate für PgP sind in aller Regel lipophil und neutral bis kationisch (Seelig, 1998). Viele Krebs-Therapeutika, Detergentien und andere Arzneistoffe zählen zu diesen Substraten (Kusuhara et al., 1998; Schinkel et al., 1996). PgP trägt dazu bei, dass besonders empfindliche Gehirngewebe allgemein vor toxischen Substanzen geschützt werden.

PgP ist auch verantwortlich dafür, dass viele Substanzen/Arzneistoffe, obwohl sie klein und lipophil genug wären, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, diese nicht passieren können und verhindert so ein ungewolltes Eindringen von für das Gehirn schädlichen Stoffen. Es stellt somit einen wesentlichen Bestandteil der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke dar (van Asperen et al., 1997; Tamai und Tsuji, 1996; Jetté et al., 1993). Solche ABC-Transporter und die MRP-Familie sind entscheidend für Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke.

Die generelle Funktion des beschriebenen *in-vitro* Modells konnte in Experimenten zum reinen Substanztransport nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Transport von dem PgP-Substrat Rhodamin untersucht. Erster Versuchsaufbau, und die Detektion der Fluoreszenz entsprachen den Versuchen des Nanopartikel-Transports im leeren *Transwell*-System ohne Zelllayer. Man konnte beobachten, dass der Transport von Rhodamin vom oberen Kompartiment in das untere Kompartiment in dem beschriebenen Zwei-Kammer-System sehr schnell abläuft. So erfolgte nach einer schnellen Abnahme der Fluoreszenz im Donor-Kompartiment und der Fluoreszenz-Zunahme im Akzeptor-Kompartiment nach 4 Stunden schon der Ausgleich der Fluoreszenzen in beiden Kompartimenten. Für den Transport von Substanzen stellt die Membran also keine Barriere dar.

Zweiter Ansatz war die Beobachtung des Transports im Zwei-Kammer-System mit konfluentem pBCEC-Zellmonolayer auf der Membran. Es konnte neben dem Rhodamin-Transport auch der beschriebene PgP-Mechanismus (Regina et al., 1998; Huai Yun et al., 1998) nachgewiesen werden. Während die Zugabe von Rhodamin zu keinem Transport und nur einem langsamen Angleich der Fluoreszenzen in den beiden Kompartimenten über 24 Stunden führte, konnte durch Konkurrenzexperimente mit dem PGP-Hemmer Verapamil der Export-Mechanismus des PgP unterdrückt werden, und das Rhodamin konnte vergleichbar den Versuchen im leeren *Transwell* nach 4 Stunden auf der Akzeptorseite detektiert werden. Der Zelllayer und die Membran hatten in diesem Fall also keinen Einfluß mehr auf den Transport (Abb. 16 und 18). Ebenso konnte die TEER-erhöhende Wirkung und somit die verbesserte Barriere-Funktion durch Hydrokortisol (Schrot et al., 2005) auf den Zellmonolayer bestätigt und in den Versuchsaufbau aufgenommen werden. Nach Zugabe von Hydrokortisol konnte ein TEER-Anstieg der Monolayer beobachtet werden und auch der Substanztransport wurde durch die verbesserten Barriere-Eigenschaften erschwert.

Das etablierte *in-vitro* Modell ist somit ein geeignetes System für Fragestellungen des Substanztransports an der Blut-Hirn-Schranke.

Doch auch in Untersuchungen von Substanz-beladenen Nanopartikeln (z.B. mit einem Arzneistoff) könnte dieses System weitere Aufklärung bringen. So ist es möglich, dass die Nanopartikel zwar als Transporter dienen, selbst aber die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Sie würden in diesem Fall in der Zellschicht verbleiben und den Arzneistoff von dort aus an die andere Wirkort-Seite abgeben. Eine Wirkung von Arzneistoff-beladenen Nanopartikeln im Gehirn konnte anhand von Dalargin (K. Michaelis, Dissertation 2005) in Tierversuchen nachgewiesen werden. Wie die Nanopartikel-Systeme den Wirkstoff jedoch an den Wirkort transportieren, und wie dieser dort zu seiner spezifischen Wirkung kommt, ist weiterhin unbekannt und muss in weiteren Versuchsreihen untersucht und charakterisiert werden.

4.3 Zellspezifisches Targeting mit ApoE-modifizierten Nanopartikeln

Die Vorstellung des spezifischen *Drug Targetings* besteht im „Prinzip der spezifischen Bindung von Vektoren über einen Liganden an zielspezifische Transport-Mechanismen“ (Dinauer et al., 2005). Ein ideales Trägersystem für Chemotherapeutika zur Behandlung von Tumoren des Gehirns sollte durch eine hohe Selektivität der Zielzellen, in diesem Fall der Blut-Hirn-Schranken-Zellen, gekennzeichnet sein. Das bedeutet, dass diese Trägersysteme mit dem gekoppelten Wirkstoff möglichst spezifisch von den Zielzellen aufgenommen werden sollten und nur dort Wirkstoff freigesetzt wird. Erster Schritt zu diesem Ziel war die Entwicklung von Nanopartikeln auf der Basis von humanem Serumalbumin, die auf ihrer Oberfläche einen zelltypspezifischen Liganden, das ApoE, gebunden haben. Diese Nanopartikel wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Klaus Langer durch Frau Kerstin Michaelis und Herrn Sebastian Dreis hergestellt. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit in Zellkultur auf ihre Spezifität getestet. Das an der Oberfläche gebundene ApoE ist Ligand zahlreicher Rezeptoren und anderer Transportmechanismen der Blut-Hirn-Schranke (Nancy et al., 2003; Kreuter et al., 2001). Zu der wichtigsten ApoE-bindenden Rezeptorfamilie gehört die Familie der LDL-Rezeptoren.

Zu ihr zählen verschiedene Rezeptoren, welche im Gehirn und der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert sind (Abb. 5). Bei Untersuchungen zur Rolle von ApoE bei einer Bindung der Nanopartikel an die Zelle wurde der LDL-Rezeptor genauer untersucht. Er ist Hauptrezeptor der LDL-Rezeptor-Familie und wird neben anderen Organen vor allem im Gehirn und der Blut-Hirn-Schranke exprimiert.

Für aussagekräftige und reproduzierbare Untersuchungen bedarf es einer Zelllinie, bei der ein verlässlicher Nachweis des LDL-Rezeptors möglich ist. Dies konnte durch Optimierung der Kulturbedingungen einer Leberzelllinie HepG2 erreicht werden. Gründe für einen geringen Nachweis von LDL-R, auch bei laut Literatur LDL-R hochexprimierenden Zellen, können in der Kultivierung der Zellen über einen langen Zeitraum liegen. So können Zelllinien im Laufe der Kultivierung bestimmte Charakteristika verlieren oder modifizieren. Eine andere Erklärung wären störende Proteine im Kulturmedium bzw. Serum, sodass der Rezeptor durch andere Liganden belegt oder gestört wird. Untersuchungen konnten zeigen, dass man durch eine Kultivierung der Zellen ohne Serum über 24 Stunden den Nachweis an LDL-Rezeptorexpression erhöhen konnte (Abb. 21). Dies legt den Verdacht nahe, dass Serumproteine den zu untersuchenden Rezeptor störend beeinflussen. Da eine Kultivierung der Zellen ohne Serum über mehr als 24 Stunden ohne Beschädigung der Zellen nicht möglich war, wurde LDL-defizientes und lipidfreies Serum in Kultur getestet. Zwei Tage vor Versuchsdurchführung wurden die Zellen in Medien mit den LDL-defizienten oder lipidfreien Seren überführt und 48 Stunden kultiviert. In den anschließenden Experimenten konnte ein eindeutiger Anstieg des LDL-Rezeptor-Nachweises beobachtet werden (Abb. 22 und 23). Um aber Zellen mit einem optimalen LDL-Rezeptor-Nachweis für weitere Experimente zu charakterisieren und Veränderungen durch Kultivierung weiter auszuschließen, wurden im Anschluss zwei *Sorting*-Schritte durchgeführt. Das *Sorting* erfolgte durch die Detektion des LDL-R mittels eines Antikörpers und anschließendem Sortieren der Zellen durch das FACScan. Die aussortierten Zellen mit LDL-R Nachweis wurden rekultiviert, und es konnte eine Rezeptorexpression von über 90% nachgewiesen werden (Abb. 24). Dieser hohe Nachweis an LDL-R war über einen bestimmten Zeitraum aufrecht zu erhalten, nahm aber nach einigen Monaten der Zellen in Kultur wieder ab. So wurden die Versuche im Durchschnitt mit einem Nachweis an Rezeptor von 60 bis 95% durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit sollten HSA-Nanopartikeln über das gebundene ApoE an einen an der Blut-Hirn-Schranke lokalisierten Rezeptor gebunden und anschließend endocytotiert werden. Mittels FACS-Analyse und Visualisierung am CLSM konnte gezeigt werden, dass diese ApoE-modifizierten Nanopartikel eine erhöhte Affinität zu den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke aufweisen. Als Negativkontrolle wurden HSA-Nanopartikel ohne ApoE-Modifikation und ohne PEG-Linker getestet. Diese Nanopartikel zeigten jedoch eine hohe unspezifische Bindung an jede Zelle. Durch einen Pegylierungsschritt mit PEG-Linkern konnte diese unspezifische Bindung auf einen vernachlässigbaren Wert verringert werden. Die Pegylierung entspricht der Vorbehandlung des unmodifizierten Partikelsystems mit einem PEG-Linker für eine Bindung des ApoE auf der Nanopartikel-Oberfläche. Diese pegylierten Nanopartikel wurden in weiteren Versuchen als Negativkontrolle eingesetzt.

Die erhöhte Affinität der ApoE-modifizierten Nanopartikel konnte auf primären Kapillarendothelzellen und auf der Maus-Gehirn-Endothelzelllinie bEnd3 nachgewiesen werden, nicht auf den anderen getesteten Zelllinien (Abb.27). Auch die etablierte Leberzelllinie mit dem hohen Nachweis an LDL-R (HepG2- LDL II) wies keine Bindung der ApoE-modifizierten Nanopartikel auf (Abb. 27 und 28). Es scheint sich um einen ApoE-induzierten, Gehirndothelzell-spezifischen Mechanismus zu handeln, der in anderen Zellen nicht vorhanden ist. Der LDL-R als alleiniger Transportmechanismus wird jedoch unwahrscheinlich aufgrund der Ergebnisse mit den HepG2-LDLII Zellen.

4.3.1 Bindung von freiem Liganden ApoE

Um die Bindung des Liganden ApoE an den LDL-Rezeptor zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit freiem ApoE und HepG2-LDL II Leberzellen durchgeführt.

Das käuflich erworbene ApoE der Firma Calbiochem (Mix aus ApoE 1,2 und 3) zeigte nach 30 Minuten den höchsten Bindungsnachweis, während ApoE aus Israel (ApoE 3), wie auch das ApoE3 von Herrn Hoffmann das Bindungs-Maximum erst nach 60 Minuten erreichten (Abb. 32 und 33). Durchgehend lag diese Bindung nur zwischen 15 und 30%.

Eine Bindung der verschiedenen ApoEs an die Zellen konnte nachgewiesen werden, der prozentuale Bindungswert lag aber weit unter den erwarteten Bindungswerten aus den Untersuchungen mit ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikeln. Die Bindung der ApoE-modifizierten Nanopartikel lag im Gegensatz zu den 15 – 30 % des freien ApoEs durchgehend zwischen 60 und 90 %.

Grund hierfür könnte eine relativ schnelle Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes in die Zelle sein, und somit ist die Detektion des Liganden an der Zelloberfläche nicht mehr möglich, oder die Bindungsaffinität der verwendeten ApoE-Varianten ist gering.

4.3.2 Nachweis der Spezifität der ApoE-PEG-HSA-NP Bindung

Die Spezifität der ApoE-PEG-HSA-NP-Bindung wurde durch Vorinkubationen mit einem Antikörper gegen die Rezeptorbindungsstelle und der Inkubation mit freiem Liganden getestet. Bei einem LDL-rezeptorvermittelten Prozess sollte die Bindung der ApoE-modifizierten Nanopartikel reduziert bzw. gehemmt werden. So sollten die vorinkubierten Antikörper bzw. das freie ApoE die Liganden-Bindungsstelle besetzen, und die modifizierten Nanopartikel könnten nicht mehr in gleichem Maße binden.

Eine signifikante Beeinträchtigung der Bindung von ApoE-modifizierten Nanopartikeln durch die Vorinkubation war nicht zu beobachten (Abb. 34). Dieses Ergebnis macht eine ausschließliche Internalisierung über den LDL-Rezeptor unwahrscheinlich. Es muss davon ausgegangen werden, dass neben dem LDL-Rezeptor noch andere Mechanismen oder ein komplett anderes Prinzip bei der Bindung dieser Nanopartikel an die Zellen beteiligt ist.

Die geringe beobachtete Erniedrigung der ApoE-PEG-HSA-NP-Bindung an die Zellen nach einer Inkubation mit ApoE spricht für einen komplexen, aus mehreren Komponenten bestehenden Transportmechanismus, in welchem der LDL-R Mechanismus eine untergeordnete Rolle spielt. Ebenso müssen die Ergebnisse aus den Bindungsstudien des freien ApoEs hinzugenommen werden. Bei einer nur geringen Bindung des freien ApoEs, kann nicht von einer großen Hemmwirkung dieses Liganden ausgegangen werden.

Am Ende der Untersuchungen wurden uns freundlicherweise zwei modifizierte ApoE-Varianten aus der Arbeitsgruppe von Dr. Hoffmann in Freiburg zur Verfügung gestellt, und diese konnten miteinander verglichen und untersucht werden (Abb. 35). Eine rezeptorvermittelte Endozytose ist ein hoch komplexer, sehr genauer Vorgang. So können schon kleinste Modifikationen am Liganden, wie ein Aminosäureaustausch, die Bindung an die Rezeptorbindungsdomäne beeinflussen, und eine Internalisierung ist nicht mehr möglich.

Auch wenn der ausschließlich über den LDL-Rezeptor-vermittelte Transport im Laufe dieser Arbeit relativ unwahrscheinlich geworden ist, ist ein rezeptorvermittelter Transport über andere Transporter nicht ausgeschlossen. Nach den Untersuchungen mussten wir jedoch feststellen, dass der Austausch von einzelnen Aminosäuren in der Bindungsdomäne des ApoEs keinen Unterschied in der Bindungsaffinität der Nanopartikel zu dem LDL-R zeigt. Diese Partikel binden in gleichem Maße, wie die Nanopartikel mit dem ursprünglich unmodifizierten ApoE, und lassen sich ebenfalls nicht durch eine Vorinkubation mit einem Antikörper gegen den LDL-Rezeptor oder freiem ApoE hemmen. Diese Ergebnisse unterstützen die aufgestellte These, dass ApoE-modifizierte Nanopartikeln einen anderen Mechanismus oder Rezeptor an der Blut-Hirn-Schranke zur Überwindung nutzen.

4.4 Alternative Mechanismen

Neben der rezeptorvermittelten Endozytose spielen in der Zelle auch zahlreiche andere Mechanismen zum Stofftransport eine wichtige Rolle.

So können neben den Rezeptoren unterschiedliche Membrankomponenten einen Transport von Nanopartikeln vermitteln. Eine dieser Komponenten könnte das Heperansulfat-Proteoglykan (HSPG) sein. Laut Literatur können LDL-Partikel über dieses Protein internalisiert werden (Datta et al. 2001). Durch seine stark anionischen Seitenketten können über elektrostatische Wechselwirkungen Liganden gebunden werden und Endozytose vermitteln. Eine Vorinkubation mit Heparinase I kann die anionischen Heparansulfat-Seitenketten entfernen. Die positiv geladenen ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikel werden in ihren elektrostatischen Wechselwirkungen gehindert und so an der Bindung mit der Zellmembran. ApoE besitzt mehrere Heparin-Bindungsstellen.

Diese weisen eine Koinzidenz mit der LDL-Rezeptor-Bindungsregion auf (Woisgraber et al., 1986). Dies legt eine Wechselwirkung mit den Seitenketten des HSPG nahe. Diese Annahme konnte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. So konnte die hohe Affinität der ApoE-PEG-HSA-NP an die Zellen durch den Enzymverdau von HSPG mit Heparinase I erniedrigt bzw. gehemmt werden. Nach der Inkubation mit Heparinase I war die Bindung der ApoE-modifizierten Nanopartikel signifikant erniedrigt. Der Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen an Heparinase I lässt eine Konzentrationsabhängigkeit vermuten.

So ist die Hemmung der ApoE-PEG-HSA NP Bindung deutliche größer bei einer Präinkubation mit 10 units/ml im Vergleich zu Konzentrationen von 2 - 5 units/ml. Murdoch et al. hat eine cysteinreiche, LDL-Rezeptor-ähnliche Sequenz in einem Kernprotein des HSPG, dem Perlecan, gefunden. Dies könnte für eine Interaktion der ApoE-Partikel verantwortlich sein (Murdoch et al., 1992). Eine mögliche weitere Erklärung wären die strukturellen Ähnlichkeiten der Nanopartikel mit zellpenetrierenden Peptiden, deren Internalisierung aber noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Sauer et al., 2005).

5 Zusammenfassung

Die Blut-Hirn-Schranke macht das Gehirn zum streng kontrollierten extraterritorialen Raum. Die sensiblen Hirnfunktionen laufen unabhängig und ungestört von den vielfältigen Prozessen der anderen Organe ab. Neben den wichtigen Funktionen dieser Barriere hält sie jedoch auch nötige Medikamente von ihrem Wirkort, dem Gehirn, fern. Die *in-vitro*-BHS soll Mechanismen aufklären und Tierversuche ersetzen. In den letzten Jahren konnte so das Bild von einem statischen Computer, Gehirn, durch das Bild eines hoch plastischen Arbeitsspeicher-Netzwerkes mit verschiedensten Verbindungen ersetzt werden.

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Bereiche gegliedert:

1. Transportstudien von Nanopartikeln und Substanzen im *Transwell*-System
2. Aufklärung von Transportmechanismen für Nanopartikel an der BHS

Die Transportuntersuchungen erfolgten in einem Zwei-Kammer-*Transwell*-System. Dieses besteht aus zwei Kompartimenten, die zum einen das Blut-Kreislauf-System und zum anderen das Gehirn darstellen sollen. Diese Kompartimente sind durch eine Membran getrennt, auf welche Gehirn-Kapillar-Endothelzellen ausgebracht werden. Membran und ausgebrachte Zellen stellen die BHS dar.

Der Transport von Nanopartikeln oder Substanzen wurde durch den Nachweis von Fluoreszenz im Medium der zwei Kompartimente nachgewiesen. Die fluoreszierenden Nanopartikel oder die fluoreszierende Substanz wurden in das obere Donor-Kompartiment gegeben und zu den Zeitpunkten 2, 4, 6 und 24 Stunden wird die Fluoreszenz in Donor- und Akzeptor-Kompartiment gemessen und beurteilt. Bei diesen Transportstudien konnte gezeigt werden, dass dieses System für den Nachweis von Nanopartikel-Transport ungeeignet ist. So benötigen die Nanopartikel zur Überwindung der Membran ohne Zelllayer schon über 24 Stunden. Die Menge der ankommenden Nanopartikel im Akzeptor-Kompartiment war sehr gering.

Substanz-Transport und BHS-charakteristische Eigenschaften lassen sich in diesem Modell jedoch gut nachweisen. So konnte die Aktivität der Efflux-Pumpe PgP anhand des Transportes von Rhodamin, einem PgP-Substrat, belegt werden. Während der Transport von Rhodamin nach Zugabe des PgP-Substrates nur eingeschränkt beobachtbar war, konnte der Transport des Rhodamins vom Donor-Kompartiment in das Akzeptor-Kompartiment nach Zugabe des PgP-Hemmers Verapamil innerhalb 4 Stunden nachgewiesen werden. Auch die TEER-erhöhende Wirkung von Hydrokortisol und somit verbesserter Barriereigenschaften der Zellschicht konnte an diesem Modell nachgewiesen werden.

Zur Aufklärung des Mechanismus eines erfolgreichen Nanopartikel-Transports über die Blut-Hirn-Schranke wurde zunächst der rezeptor-vermittelte Transport über den LDL-Rezeptor untersucht. Der LDL-R ist ein Mitglied der LDL-R-Familie welche neben anderen Organen vermehrt in Gehirn und BHS lokalisiert sind. Als Ligand fungiert bei dieser Rezeptorfamilie und insbesondere bei dem LDL-R das ApoE.

Mittels ApoE-modifizierter HSA-Nanopartikel sollte eine spezifische Bindung der Transportsysteme über den gebundenen Liganden ApoE an zielspezifische Transport-Mechanismen wie den LDL-R nachgewiesen werden. Über diesen könnten die Nanopartikel endocytiert und der Arzneistoff an seinen Wirkort gebracht werden.

Untersuchungen zu diesem Transport-Mechanismus erfolgten in verschiedenen Arbeitsschritten. So wird erst eine Optimierung des LDL-R-Nachweises auf den Zellen durchgeführt. Eine Leberzelllinie wurde auf LDL-R hin untersucht und die Rezeptorkonzentration durch Mehrfachkultivierung der Zellen optimiert. Nach 2-tägiger Kultivierung in lipidfreiem Serum und dem zweimaligen Sorten der Zellen mit einem Antikörper gegen den LDL-Rezeptor konnte ein Nachweis des Rezeptors von 70-90% erreicht werden.

Nächster Schritt war die Untersuchung der Bindung von ApoE-modifizierten Nanopartikeln an verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichem LDL-R-Nachweis, gefolgt von Untersuchungen zur Bindungsspezifität. In diesen Untersuchungen sollte die Spezifität dieser Bindung durch Präinkubationen mit einem Antikörper gegen die Liganden-Bindungsstelle und freiem ApoE nachgewiesen werden. Eine Bindung der ApoE-modifizierten HSA-Nanopartikel konnte an Endothelzellen des Gehirns nachgewiesen werden.

Sowohl die primär isolierten porcinen brain capillary endothelial cells (pBCEC), als auch die Maus-Gehirn-Endothelzelllinie bEnd3 wiesen eine prozentuale Bindung von ApoE-modifizierten Nanopartikeln von über 70% auf. Eine Bindung dieser Partikel an andere getestete Zelllinien mit BHS-Eigenschaften oder einem hohen Nachweis an LDL-R konnte nicht gezeigt werden. Eine Hemmung der Bindung von ApoE-modifizierten Nanopartikeln an Gehirn-Endothelzellen war nicht oder nur geringfügig möglich. So konnte durch eine Präinkubation mit dem Antikörper keine Reduktion der Bindung erreicht werden. Die Präinkubation mit freiem ApoE führte hingegen zu einer sehr geringen Erniedrigung der Bindungsaffinität der ApoE-modifizierten Nanopartikel. Zu beachten war hierbei noch die geringe nachweisbare Bindung von freiem ApoE an die Zellen. In Versuchen zur Bindung von freiem ApoE war eine prozentuale Bindung von freiem ApoE an die Zellen von nur etwa 20% nachweisbar. Bei einer solch geringen Bindung des freien Liganden kann also auch nicht von einer hohen Hemm-Wirkung ausgegangen werden.

Es muß nach diesen Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass ein ApoE- und Gehirn-Endothelzell-spezifischer Mechanismus am Transport von ApoE-modifizierten Nanopartikeln beteiligt ist. Der untersuchte LDL-R spielt hierbei keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle.

Abschließend wurden noch Nanopartikel mit gebundenen ApoE-Mutanten auf ihre Bindung an Zellen getestet. Die modifizierten ApoE-Liganden unterschieden sich in dem Austausch von Aminosäuren in der Ligand-Bindungsdomäne. In Bindungsuntersuchungen konnte bei diesen ApoE-Varianten kein Unterschied in deren Affinität zu Zellen aufgezeigt werden. Dieser Austausch von Aminosäuren in der Liganden-Bindungsstelle hatte keinerlei Auswirkung auf deren Bindung an die Zellen, was wiederum für einen LDL-R unabhängigen Transport-Mechanismus spricht.

Am Ende der vorliegenden Arbeit wurde noch ein alternativer Transport-Mechanismus untersucht. Das Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) als alternativer Mechanismus weist Heparin-Bindungsdomänen auf, die der LDL-R Bindungsdomäne sehr ähnlich sind und bekannterweise in der Lage sind, LDL-Partikel zu internalisieren. Heparinase I kann die anionischen Heparansulfat-Seitenketten entfernen und somit den Internalisierungsmechanismus über das HSPG beeinträchtigen.

Untersuchungen zum HSPG und eine Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Heparinase I deuteten auf eine wichtige Rolle des HSPG im Bindungs- und Internalisierungsmechanismus für ApoE-PEG-HSA-NP hin. Die Affinität der ApoE-modifizierten Nanopartikel konnte durch einen Heparinase-Enzymverdau deutlich erniedrigt werden.

Auch führte der Einsatz unterschiedlicher Heparinase I-Konzentrationen zu der Annahme, dass es sich um eine konzentrationsabhängige Beeinträchtigung des Mechanismus handelte. So erreichten 10 Units/ml eine weitaus größere Hemmung der ApoE-PEG-HSA-NP-Bindung als Konzentrationen von 2-5 Units/ml. Strukturelle Ähnlichkeiten des ApoEs mit zellpenetrierenden Peptiden sprechen dafür, dass neben dem HSPG noch andere Translokationsmechanismen von Bedeutung sein könnten.

6 Literaturverzeichnis

A

Abbott N. J.: Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability.

J Anat, 200(6):629–38.

Aggerbeck L.P., Wetterau J.R., Weisgraber K.H., Wu C.S., und Lindgren F.T.: Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains.

J Biol Chem 263 (1988), 6249-6258.

Akasaka Y., Ueda H., Takayama K., Machida Y. und Nagai T.: Preparation and evaluation of bovine serum albumin nanospheres coated with monoclonal antibodies. *Drug Des Deliv* 3 (1988)

Alyautdin RN., Kreuter J., Kharkevich DA.: Drug delivery to the brain with nanoparticles. *Eksp Klein Farmakol* 66 (2003), 65-8

Alyautdin RN., Petrov VE., Langer K., Berthold A., Kharkevich DA und Kreuter J.: Delivery of loperamide across the blood- brain barrier with polysorbate 80- coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 14 (1997), 325 – 328

Alyautdin RN., Tezikov EB., Ramge P., Kharkevich DA., Begley DJ. Und Kreuter J.: Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by adsorption to polysorbate 80- coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: an in situ brain perfusion study. *Journal of Microencapsulation* 15 (1998), 67 - 74

Audus K.L. und Borchardt R.T.: Characterization of an in vitro blood- brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. *Pharmaceutical Research* 3 (1986), 81 – 87

Audus K.L. und Borchardt R.T.: Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for the blood- brain barrier. *Annals New York Academy of Sciences* 507 (1987), 9 – 18

B

Balazs Z., Panzenboeck U., Hammer A., Sovic A., Quehenberger O., Malle E., und Sattler W.: Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood-brain barrier model. *J Neurochem* 89 (2004), 939-950

Bangham A.D., Standish M.M und Watkins J.C.: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13 (1965), 238 – 252

Begley D. J.: The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *J Pharm Pharmacol*, 48(1996):136–46.

Begley D. J.: Understanding and circumventing the blood-brain barrier. *Acta Paediatr Suppl*, 92(2003):83–91.

Belting M.: Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends Biochem Sci* 28 (2003), 145-151.

Biegel D., Spencer D.D. und Patcher J.D.: Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood- brain barrier properties in vitro.

Brain Research 692 (1995), 183 – 189

- Borchard G., Audus K.L., Shi F. und Kreuter J.:** Uptake of surfactant-coated poly-(methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics* 110 (1994), 29 – 35
- Bowman P.D., Ennis S.R., Rarey K.E., Betz A.L., Goldstein G.W.:** Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurology* 14 (1983), 396-402
- Bowman P.D., Betz A.L., Ar D., Wolinsky J.S., Penney J.B., Shivers R.R., Goldstein G. W.:** Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In vitro* 17 (1981), 353 – 362.
- Brightman, M.:** Ultrastructure of brain endothelium. *Physiology and pharmacology of the blood brain barrier. Handbook of experimental pharmacology* 103, 1–22. Springer Verlag, Berlin.
- Broadwell R.D., Baler Cairns B.J., Friden P.M., Oliver C. und Villegas J.C.:** Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium III. receptor-mediated transcytosis through the blood-brain barrier of blood-borne transferrin and antibody against the transferrin receptor. *Experimental Neurology* 142 (1996), 47 – 65
- Brown M.S. und Goldstein J.L.:** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232 (1986), 34-47.
- Brownlees J. und Williams C. H.:** Peptidases, peptides, and the mammalian blood-brain barrier. *J Neurochem*, 60(1993):793–803.
- Butt A. M., Jones H. C. und Abbott N. J.:** Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*, 429 (1990):47–62.

C

- Chung N.S., Wasan K.M.:** Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Advanced drug delivery Reviews* 56 (2004) 1315 – 1334

D

- Dalet, C.; Fehlmann, M.; Debey, P.:** Use of Percoll density gradient centrifugation for preparing isolated rat hepatocytes having long-term viability. *Analytical Biochemistry* 122 (1982), 119-123
- Danik M., Champagne D., Petit-Turcotte C., Beffert U., und Poirier J.:** Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease. *Crit Rev Neurobiol* 13 (1999), 357-407.
- Datta G., Chaddha M., Garber DW., Chung BH., Tytler FM., Dashti M., Bradley WA., Gianturco SH., Anantharamaiah GM.:** The receptor binding domain of apolipoprotein E, linked to a model class A amphipathic helix, enhances internalization and degradation of LDL by fibroblasts. *Biochemistry* 39 (2001), 213-220
- De Bault L.E., Kahn L.E., Frommes S.P. und Cancilla P.A.:** Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: isolation and preliminary characterization. *In vitro* 15 (1979), 473 – 487
- De Boer A.G. und Breimer D.D.:** Reconstitution of the blood-brain barrier in cell culture for studies of drug transport and metabolism. *Ad. Drug Deliv. Rev.* 22 (1996), 251-264.

Dehouck B., Fenart L., Dehouck M.-P., Pierce A., Torpier G. und Cecchelli R.: A new function for the LDL- receptor: transcytosis of LDL at the blood- brain barrier. *The Journal of Cell Biology* 138 (1997), 877 – 889

Dehouck B., Dehouck M.P., Fruchart J.C., und Cecchelli R.: Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol* 126 (1994), 465-473.

De Lange E.C.M., Hesselink M.B., Danhof M., De Boer A.G. und Breimer D.D.: The use of intracerebral microdialysis to determine the changes in blood-brain barrier transport characteristics. *Pharm. Res.* 12 (1995), 129-133.

Dinauer N., Balthasar S., Weber C., Kreuter J., Langer K., von Briesen H.: Selective targeting of antibody- conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T- Lymphocytes. *Biomaterials* 26 (2005), 5898 - 906

Douglas S.J., Davis S.S. und Illum L.: Nanoparticles in drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3 (1987), 233

E

Ehrlich P.: Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. *Berlin: Hirschwald, 1885*

F

Fellner S., Bauer B., Miller D. S., Schaffrik M., Fankhanel M., Spruss T., Bernhardt G., Graeff C., Farber L., Gschaidmeier H., Buschauer A. und Fricker, G.: Transport of paclitaxel (taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 110(2002):1309– 18

Fenstermacher J.D., Blasberg R.G. und Patlak C.S.: Methods for quantifying the transport of drugs across the blood-brain system. In: *Pharmacol. Ther.* 14 (1981), 217-248.

Frankde H., Galla HJ., Beuckmann CT.: Primary cultures of brain microvessels endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood- brain barrier in vitro. *Brain Res Protoc* 5 (2000), 248 - 56

Friden, P.M.: Utilization of an endogenous cellular transport system for the delivery of therapeutics across the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release* 46 (1996), 117 - 128

Fukuta M., Okada H., Iinuma S., Yanai S. und Toguchi H.: Insulin fragments as a carrier for peptide delivery across the blood- brain barrier. *Pharmaceutical Research* 11 (1994), 1681 – 1688

G

Gellin J., Brown S., Marshall Graves J. A., Rothschild M., Shook L., Womack J., Yerle M.: Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally important animals. *Mamm. Genom* 11 (2000), 140 - 144

Gliemann J.: Receptors of the low density lipoprotein (LDL) receptor family in man. Multiple functions of the large family members via interaction with complex ligands. *Biol. Chemistry* 379 (1998) 951 – 64

- Goldmann E. E.:** Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. *Beitr. Klin. Chirurg* 64 (1909), 192-265.
- Goldstein J.L., Basu S.K., und Brown M.S.:** Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 98 (1983), 241-260.
- Goti D., Hammer A., Galla H. J., Malle E. und Sattler W.:** Uptake of lipoprotein-associated alpha-tocopherol by primary porcine brain capillary endothelial cells. *J Neurochem* 74 (2000), 1374 – 1383
- Gumbleton, M.; Audus, K.L.:** Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90(2001), 1681-1698

H

- Hubbard A.L.:** Endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology* 117 (1989), 131 - 177
- Hussain M.M., Strickland D.K., und Bakillah A.:** The mammalian Low-Density Lipoprotein Receptor Family. *Annu. Rev. Nutr.* (1999), 19: 141 – 72
- Hussain M.M.:** Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family. *Front. Bioscience* 6 (2001) 417 – 28
- Huwylar J., Drewe J., Klusemann C. und Fricker G.:** Evidence for p-glycoprotein-modulated penetration of morphine-6-glucuronide into brain capillary endothelium. *British Journal of Pharmacology* (1996), 1879 – 1885

I

- Innerarity T.L., Pitas R.E. und Mahley R.W.:** Binding of arginine-rich apoprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptors of fibroblasts. *J Biol Chem* 254 (1979), 4186 – 4190

J

- Janzer R. C. und Raff M. C.:** Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325 (1987) 253–7

K

- Kemper E. M., Cleypool C., Boogerd W., Beijnen J. H. und van Tellingen O.:** The influence of the p-glycoprotein inhibitor zosuquidar trihydrochloride (LY 335979) on the brain penetration of paclitaxel in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, 53(2004b):173–8.
- Kenagy R., Bierman E.L., Schwartz S., und Albers J.J.:** Metabolism of low density lipoprotein by bovine endothelial cells as a function of cell density. *Arteriosclerosis* 4 (1984), 365-371
- Kniessel U. und Wolburg H.:** Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol*, 20 (2000) :57–76.
- Kreuter J., Shamenkov D., Petrov V., Ränge P., Cychutek K., Koch-Brandt C., Alyautdin R.:** Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J of Drug Targ* 10 (2002), 317 325

Kreuter J.: Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 47 (2001), 65 - 81

Kreuter J.: Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery.

Journal of Anatomy 189 (1996), 503 – 505

Kreuter J., Alyautdin RN., Kharkevich DA. und Ivanov AA.: Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles. *Brain research* 674 (1995), 171 – 174

Kreuter J.: Drug targeting with nanoparticles. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 19 (1994), 253

Kreuter J.: Liposomes and nanoparticles as vehicles for antibiotics. *Infeciton* 19 (1991), 224

Kreuter J.: Evaluation of nanoparticles as drug- delivery systems.III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use. *Pharm Acta Helv* 58 (1983), 242

Kumagai A. K. und Pardrige J. B., Eisenberg W. M.: Absorptive- mediated endocytosis of cationized albumin and a β -endorphin- cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (1987), 15214 – 15219

L

Lechardeur D., Schwartz B. und Scherman D.: Rat brain microvessel endothelial cells: primary cultures and immortalized differentiated cell line. *deBoer, A.G. und Sutanto, W.: Drug transport across the blood- brain barrier: new experimental strategies. Amsterdam: Harwood Scientific Publisher, 1997*

Lenaerts V., Couvreur P., Christiaens- Leyh D., Joiris E., Roland M., Rollmann B. und Speiser P.: Degradation of poly (isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* 5 (1984), 65

Linhardt R.J.: Analysis of Glycosaminoglycans with Polysaccharides Lyases. *Current Protocols in Molecular Biology; Jon Wiley & Sons, INC. (1999)*

Lo E. H., Singhal A. B., Torchilin V. P. and Abbott N. J.: Drug delivery to damaged brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 38(1-2):140–8.

Löbenberg R., Araujo L., von Briesen H., Rodgers E. und Kreuter J.: Body distribution of azidothymidin bound to hexyl- cyanoacrylate nanoparticles after i. v. injection to rats. *Journal of Controlled Release* 50 (1998), 21 – 30

M

Mahley R.: Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding role in Cell Biology. *Science* 240 (1988), 622 -640

Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall S.C., Jr., und Weisgraber K.H.: Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 25 (1984), 1277-1294.

Matsumura, T.; Yamanaka, T.; Hashizume, S.; Irie, Y.; Nitta, K.:Tissue dispersion, cell harvest and fluid suspension culture by the use of bacterial neutral protease. *The Japanese Journal of Experimental Medicine* 45 (1975), 377-382

Meresse S., Delbart C., Fruchart J.C., und Cecchelli R.: Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem* 53 (1989), 340-345.

Miller G.: Drug targeting. breaking down barriers. *Science*, 297(2002)1116–8.

Mischek U., Meyer J. und Galla H.-J.: Characterization of gamma- glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries. *Cell Tissue Research* 256 (1989), 221 - 226

Misra A., Ganesh S., Shahiwala A. und Shah S. P.: Drug delivery to the centralnervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci*, 6(2) (2003):252–73.

Mostov K.E. und Simister N.E.: Transcytosis. *Cell* 43 (1985), 389 – 390

Mutschler W.: Epimetaphyseal pseudarthrosis. *Orthopade*.25 (1996), 429 – 34

N

Nancy S. Chung, Kishor M. Wasan: Potential role of the low- density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Adv. Drug Del. Rev.* 56 (2004) 1215 – 1334

O

Oldendorf W.H.: Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain Research* 24 (1970), 372

Oldendorf W.H.: Lipid solubility and drug penetration of the blood- brain barrier. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 147 (1974), 813 – 816

P

Pardrige W.M.: Transport of small molecules through the blood- brain barrier: biology and methodology. *Advanced Drug Delivery Reviews* 15 (1995), 5 - 36

Pardrige W.M. und Oldendorf W.H.: Kinetic analysis of blood- brain barrier transport of amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 401 (1975) 128 – 136

Pardrige W.M., Triguero D. und Buciak J.: Transport of histone through the blood- brain barrier. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 252 (1989), 821 – 824

Pardrige W.M., Boado R.J. und Farrell C.R.: Brain- type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood- brain barrier. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1990), 18035 – 18040

Pardrige W.M.: Peptide drug delivery to the brain. *New York: Raven Press* (1991), 239 – 279

Pitas R.E., Boyles J. K., Lee S.H., Hui D. und Weisgraber K. H.: Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, E (LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* 262 (1987), 1435 - 1436

Poirier J.: Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17 (1994), 525-530.

R

Rall S.C., Jr., Weisgraber K.H., und Mahley R.W.: Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 257 (1982), 4171-4178.

Regina A., Koman A., Piciotti M., El Hafny B., Center M.S., Bergmann R., Couraud P.-O. und Roux F.: Mrp 1 multidrug resistance associated protein and p-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *Journal of Neurochemistry* 71 (1998), 705 – 713

Rauh J., Meyer J., Beuckmann C., Galla HJ.: Development of an in vitro cell culture system to mimic the blood- brain barrier. *Prog Brain Res* 91 (1992), 117 - 21

Reyland M.E., Gwynne J.T., Forgez P., Prack M.M., und Williams D.L.: Expression of the human apolipoprotein E gene suppresses steroidogenesis in mouse Y1 adrenal cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 8 (1991), 2375-2379.

Riddell D., Graham A., Owen J.: Apolipoprotein E inhibits Platelet Aggregation through the L-Arginin/Nitric oxide Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), 89 – 95

Roman-Goldstein S., Clunie DA., Stevens J., Hogan R., Monard J., Ramsey F., Neuwelt EA.: Osmotic blood-brain barrier disruption: CT and radionuclide imaging.

AJNR Am J Neuroradiol. 15 (1994), 581-90.

Rubin L. L. und Staddon, J. M.: The cell biology of the blood-brain barrier.

Annu Rev Neurosci, 22:11–28.

Rubin L.L., Hall D.E., Porter S., Barbu K., Cannon C., Horner H.C., Janatpour M., Liaw C.W., Manning K., Morales J., Tanner L.I., Tomaselli K.J. und Bard F.: A cell culture model of the blood- brain barrier.

The Journal of Cell Biology 115 (1991), 1725 – 1735

S

Sauer I., Dunay I.R., Weisgraber K., Bienert M. und Dathe M.; An Apolipoprotein E- Derived Peptide mediates uptake of sterically stabilized liposomes into brain capillary endothelial cells.

Biochemistry 44 (2005) 2021 - 29

Schrot S., Weidenfeller C., Schaffer T.E., Robenek H., Galla H.J.: Influence of hydrocortisone on the mechanical properties of the cerebral endothelium in vitro. *Biophys J* 23 (2005)

Seetharaman S., Barrand M.A., Maskell L. und Scheper R.J.: Multidrug resistance- related transport proteins in isolated human brain microvessels and in cells cultured from this isolates. *Journal of Neurochemistry* 70 (1998), 1151 – 1159

Smith K.R. und Borchardt R.T.: Permeability and mechanism of albumin, cationized albumin and glycosylated albumin transcellular transport across monolayers of cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Pharaceutical Research* 6 (1989), 466 – 473

Srinivasan S.R., Dolan P., Radhakrishnamurthy B., und Berenson G.S: Isolation of lipoprotein-acid mucopolysaccharide complexes from fatty streaks of human aortas.

Atherosclerosis 16 (1972), 95-104.

Steinhausen, M.: Medizinische Physiologie, 3. Auflage. *Gustav Fischer Verlag* (1993)

T

Takasato Y., Rapoport S.I. und Smith Q.R.: An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am. J. Physiol.* 247 (1984), H484-493.

Tamai I. und Tsuji A.: Drug delivery through the blood- brain barrier.

Adv. Drug Deliv. Rev. 19 (1996), 401-424.

Terasaki T., Deguchi H., Sato H., Hirai K. und Tsuji A.: In vivo transport of a dynorphin-like analgesic peptide, E-2078, through the blood- brain barrier: an application of brain microdialysis. *Pharmaceutical Research* 8 (1991), 815 – 820

Tewes, B.; Franke, H.; Hellwig, S.; Hoheisel, D.; Decker, S.; Griesche, D.; Tilling, T.; Wegener, J.; Galla, H.-J.: Preparation of endothelial cells in primary cultures obtained from the brains of 6-month-old pigs. *Drug transport across the bloodbrain barrier: in vitro and in vivo techniques, de Boer A.G. and Sutanto W., eds, Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1997), 91-97*

Triguero D., Buciak J. und Pardrige W.: Capillary depletion method for quantification of blood-brain barrier transport of circulating peptides and plasma proteins. *J. Neurochem. 54 (1990), 1882-1888.*

U

Urien S., Pinquier J.L., Paquette B., Chaumet-Riffaud P., Kiechel J.R., und Tillement J.P.: Effect of the binding of isradipine and darodipine to different plasma proteins on their transfer through the rat blood-brain barrier. Drug binding to lipoproteins does not limit the transfer of drug. *J Pharmacol Exp Ther 242 (1987), 349-353.*

V

van Asperen J., Schinkel A. H., Beijnen J. H., Nooijen W. J., Borst P. und van Tellingen

O.: Altered pharmacokinetics of vinblastine in MDR1a p-glycoprotein-deficient mice.

J Natl Cancer Inst, 88(1996):994-9.

van Bree, J.B.M.M.; de Boer, A.G.; Danhof, M.; Breimer, D.D.: Drug transport across the blood-brain barrier. II. Experimental techniques to study drug transport. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition 14(1992), 338-348*

Vasile E., Simionescu M., und Simionescu N.: Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ.

J Cell Biol 96 (1983), 1677-1689

Veizin W. R. und Florence A. T.: In vitro heterogeneous degradation of poly (n- alkyl alpha-cyanoacrylates). *J Biomed Mater Res 14 (1980), 93*

W

Wartlick H., Michaelis K., Balthasar S., Strebhardt K., Kreuter J., und Langer K.: Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody modified nanoparticles in tumor cells.

Journal of drug targeting 12 (2004), 461- 71

Weber c., Kreuter J. und Langer K.: Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. *Int. J of Pharmaceutics 196 (2000), 197 - 200*

Weisgraber K. H.: Apolipoprotein E: Structure-Funktion Relationships, in *Advances in Protein Chemistry (1994) pp. 249-369.*

Weisgraber K.H., Innerarity T.L., Harder K.J., Mahley R.W., Milne R.W., Marcel Y.L., und Sparrow J.T.: The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding. *J Biol Chem 258 (1983), 12348-12354.*

Weisgraber K.H., Rall S.C.jr, Mahley R. W., Milne R. W., Marcel Y.L., Sparrow J.T.: Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem 216 (1986), 2068- 2076*

Wetterau J.R., Aggerbeck L.P., Rall S.C., Jr., und Weisgraber K.H.: Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *J Biol Chem* 263 (1988), 6240-6248.

Widder K.J., Morris R. M., Poore G. A., Howard D. P. und Senyei A. E.: Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low- dose doxorubicin: total remission in Yoshida sarcoma- bearing rats. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19 (1983), 135

Wolf, S.; Seehaus, B.; Minol, K.; Gassen, H.G.:Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des cerebralen Mikrozirkulationssystems. *Naturwissenschaften* 83 (1996), 302-311

Y

Yanagishita M. und Hascall V.C.: Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 267 (1992), 9451-9454.

Z

Zenker D., Begley D., Bratzke H., Rubsamen-Waigmann H. und von Briesen H.: Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. *J Physiol*, 551(2003)1023–32.

Zlokovic B.V., Begley D.J., Djuricic B.M. und Mitrovic D.M.: Measurement of solute transport in the perfused guinea pig brain.

Method application to N-methyl-__aminoisobutyric acid. J. Neurochem. 46 (1986), 1444-1451.

Zlokovic B.V.: In vivo approaches for studying peptide interactions at the Blood- Brain Barrier. *Journal of Controlled Release* 13 (1990), 185 – 201

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anke Schwedat
Anschrift	Unterlandstr. 88 70378 Stuttgart schwedat@em.uni-frankfurt.de
geboren am	01. 03. 1978 in Stuttgart Bad Cannstatt
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1984 – 1988	Silcherschule Stuttgart Rot, Grund- und Hauptschule
1988 – 1997	Jörg Rathgeb Schule Neugereut, Gymnasium Abschluss: Abitur

Studium

1997 – 2001	Studium der Biologie an der Eberhard- Karls Universität Tübingen mit dem Hauptfach Humangenetik und den Nebenfächern Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie
2001 – 2002	Durchführung einer experimentellen Diplomarbeit im Molekulargenetischen Labor der Universitäts- Augenklinik Tübingen. <i>Titel der Diplomarbeit: PCRs und Einzelstrangherstellung im Multiplex- Ansatz zur Mutationsanalyse des Rhodopsingens auf DNA- Chip Basis</i>
2002 – 2006	Promotion am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg- Speyer Haus in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. von Briesen. <i>Titel der Dissertation: Die Rolle des LDL- Rezeptors bei dem Transport von ApoE- modifizierten HSA- Nanopartikeln für ein gezieltes Gehirn- Targeting: Untersuchungen in- vitro</i>

8 Präsentationen

Veröffentlichungen

A. Schwedat, S. Dreis, K. Michaelis, D. Begley, K. Langer, J. Kreuter, H. v.Briesen (2006). Transport of human serum albumin nanoparticles over the blood- brain barrier for a specific brain targeting. (in Arbeit)

K. Dietrich, S. Würtz, J. Scholl, **A. Schwedat**, E. Zrenner, T. Joos, B. Wissinger (2005). Chip- based mutation detection of heterozygous rhodopsin gene mutations implicated in retinitis pigmentosa. (submitted)

Vorträge

A. Schwedat, S. Dreis, K. Michaelis, K. Langer, J. Kreuter, H. von Briesen (2005). New results in receptor-mediated transport of nanoparticles with potential for brain targeting. 7.Blut- Hirn Schranken Expertentreffen 2005, Bad Herrenalb, Germany.

A. Schwedat, K. Michaelis, K. Langer, J. Kreuter, H. von Briesen (2004). Nanoparticles with a potential for brain targeting: Analysis in cell culture systems
6.Blut- Hirn Schranken Expertentreffen 2004, Bad Herrenalb, Germany.

Poster

A. Ambrousi, A. Bouazzaoui, H. Von Briesen, J. Kreuter, J. Kubasch, H.-E. Radunz, B.A. Sabel, **A. Schwedat**, S. Singh, S. Tanski und A. Theisen (2005). Entwicklung von PBCA- NP als Trägersystem zur Behandlung von Hirntumoren und für die Gentherapie. BMBF- Nanotechnologie Treffen 2005, Hannover, Germany

A. Schwedat, A. Bootz, D. Zenker, J. Kreuter, H. von Briesen (2003). Nanoparticles for Brain Targeting. Präsentation vor dem Wissenschaftsrat, Frankfurt a.M., Germany.

K. Dietrich, S. Würtz, **A. Schwedat**, J. Scholl, T. Joos, B. Wissinger (2002). Entwicklung eines Oligonukleotidchips zur Mutationsanalyse des Rhodopsin- Gens. Bei Dechema, Statusseminar Chiptechnologien 2003, Frankfurt a. M., Germany

K. Dietrich, S. Würtz, **A. Schwedat**, J. Scholl, T. Joos, B. Wissinger (2002). Entwicklung eines Oligonukleotidchips zur Mutationsanalyse des Rhodopsin- Gens. Bei Dechema, Statusseminar Chiptechnologien 2003, Frankfurt a. M., Germany