



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Entwicklung von Photosensitizer-Konjugaten und
Evaluierung im Caco-2 Modell“

verfasst von

Ingrid Marlis Kaniak

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Dieser Dank gilt vor allem

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth, der durch sein Engagement meine Neugier für die praktische Arbeit mit Zellkulturen in Rahmen der Diplomarbeit am Institut für pharmazeutische Technologie geweckt hat.

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung des Diplomarbeitsthemas, für die fachliche Unterstützung und die aufmunternden Worte sowie für die schnelle Korrektur.

Meiner Betreuerin Mag. Elisabeth Engleder für die Zeit, die sie sich für mich genommen hat.

Der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und das humorvolle Arbeitsklima.

Eva, die mich durch alle Höhen und Tiefen der praktischen Arbeit begleitet hat.

Stephanie, die mir stets ein offenes Ohr schenkt und mit der mich seit Jahren eine tiefe Freundschaft verbindet.

Stephan, der mich immer unterstütz hat und mich in Stunden der Verzweiflung wieder aufgebaut hat.

Meinen Eltern, die mir das Studium in Wien ermöglicht haben.

Allen Freunden und Kollegen durch die meine Studienzeit unvergesslich wurde.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	7
2. GRUNDLAGEN	8
2.1 Photodynamische Therapie.....	8
2.1.1 Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR-Effekt)	9
2.2 Photosensitizer	9
2.2.1 Jablonski-Termschema	10
2.2.2 Energieübertragung.....	11
2.2.3 Zelltod	11
2.3. Charakteristika der eingesetzten Photosensitizer	12
2.3.1. Porphyrine	12
2.3.2 5,10,15,20-tetrakis(meso-hydroxyphenyl)porphyrin (mTHPP)	13
2.3.3 5,10,15,20-tetrakis(meso-hydroxyphenyl)porphyrin-Komplex mit PSSNa (mTHPP-PSSNa)	13
2.3.4 5-(4-Carboxyphenyl)-10, 15, 20-triphenyl-21,23H-porphyrin (TPP)	13
2.3.5 5,10,15,20-Tetrakis(4-Carboxyphenyl-21,23H-porphyrin (TCPP).....	14
2.4. Caco-2-Modell	15
2.5. Wheat Germ Agglutinin (WGA).....	15
3. MATERIALIEN	16
4. METHODEN.....	17
4.1. Konjugationstechniken	17
4.1.1 Kopplung mittels Mixed Anhydride-Methode.....	17
4.1.2 Kopplung mittels Carbodiimid	17
4.1.3 Dialyse	17
4.2 Zellkulturtechniken.....	18
4.2.1 Subkultivierung von Caco-2-Zellen	18
4.2.2 Bestimmung der Zellzahl	18
4.2.3 Mikrotiterplatten	19

4.2.4	FlexiPERM-System.....	19
4.3	Färbemethoden.....	19
4.3.1	DNA-Detektion mit DAPI-dilactat	19
4.3.2	DNA-Detektion mit Hoechst 33342.....	19
4.3.3	Detektion von Fluorescein-markiertem Wheat Germ Agglutinin (f-WGA)	20
4.3.4	Detektion der tight junctions	20
4.3.5	Bestimmung der Zellviabilität.....	20
4.4	Aktivierung der Photosensitizer.....	20
5.	ERGEBNISSE.....	21
5.1	5,10,15,20-Tetrakis(meso-hydroxyphenyl)porphyrin (mTHPP) und mTHPP-Polystyrolsulfat-Natrium.....	21
5.1.1	Interaktion von mTHPP- und mTHPP-PSSNa mit Caco-2-Monolayern.....	21
5.2	5-(4-Carboxyphenyl)-10, 15, 20-triphenyl-21,23H-porphyrin (TPP)	33
5.2.2	Caco-2 Bindungsstudie von TPP-WGA-Konjugat und TPP	35
5.3	5,10,15,20-Tetrakis(4-Carboxyphenyl)-21,23H-porphyrin (TCPP)	39
5.3.3	Belegungsrate von WGA mit TCPP.....	54
5.3.4	Caco-2 Bindungsstudie von TCPP-WGA-Konjugaten mittels Mikroskopie.....	60
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
7.	LITERATURVERZEICHNIS	70
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	72
9.	CURRICULUM VITAE	74

1. EINLEITUNG

Photodynamische Therapie (PDT) in Form von Lasertherapie wird vorrangig in der Dermatologie zur Behandlung von oberflächlichen und gut zugänglichen Tumoren eingesetzt [LIT]. Darüber hinaus erweitert sich das Anwendungsgebiet der PDT durch den Einsatz von photosensibilisierenden Substanzen, die gezielt an ihren Wirkort transportiert werden können. Durch die Kombination von drei harmlosen Komponenten, Licht, Sauerstoff und einem photoaktiven Agens (Photosensitizer) kann ein toxischer Effekt ausgelöst werden, der spezifisch auf die Tumorzelle wirken kann. Nach der Applikation eines Photosensitizers soll dieser lokal, bevorzugt an seinem Wirkort, mit Laserlicht aktiviert werden und durch die Bildung von Singulett Sauerstoff in der Zelle Apoptose auslösen. Die Besonderheit der PDT liegt in ihrer Selektivität. Durch die lokale Anreicherung des Photosensitizers in mutierten Zellen und durch gezielte Bestrahlung kann der Wirkort genau eingegrenzt und dadurch die Nebenwirkungsrate entschieden verringert werden. Der Nachteil der Photosensitizer gestützten Therapie liegt in der Kurzlebigkeit und der geringen Penetrationstiefe [LIT] des gebildeten reaktiven Sauerstoffes. Aus diesem Grund muss ein Photosensitizer gewisse Kriterien erfüllen, um optimal in der PDT eingesetzt werden zu können. Löslichkeit und Stabilität einer therapeutisch eingesetzten Photosensitizerlösung sind, neben einer geringen Dunkeltoxizität und einer hohen Quantenausbeute bei der Singulett-Sauerstoffgenerierung nur ein Teil der zu erfüllenden Anforderungen. Zusätzlich spielen auch die selektive Anreicherung im Tumorgewebe, die von der Lipophilie des Photosensitizers abhängt, und die Absorptionswellenlänge, die für die Penetrationstiefe des anzuregenden Lasers ins Gewebe entscheidend ist, eine wichtige Rolle. Da diese Faktoren vor einem therapeutischen Einsatz erfüllt sein sollen, liegt das Hauptaugenmerk der derzeitigen Forschung in der entsprechenden Modifikation von Photosensitizern, um die oben genannten Kriterien zu erfüllen. [1,2]

Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden drei Photosensitizer aus der Porphyrin-Familie modifiziert und im Zellkulturmodell getestet. Als etabliertes in-vitro Zellmodell wird eine dem humanen Dünndarmepithel ähnliche Zelllinie, die Caco-2 Zellen, verwendet. Zunächst soll 5,10,15,20-tetrakis(meso-hydroxyphenyl)porphyrin (mTHPP) und dessen wasserlöslicher Komplex (mTHPP-PSSNa) mit 13 Molekülen Natriumstyrolsulfat hinsichtlich der Stabilität in Lösung und Interaktion mit Caco-2-Zellen untersucht werden. Die Caco-2 Bindungsstudien werden quantitativ mittels Fluorimetrie und

qualitativ mikroskopisch ausgewertet. Zudem soll der zytotoxische Effekt auf die Zellen nach Bestrahlung mit Weißlicht untersucht werden. Um abzuklären, ob mTHPP und mTHPP-PSSNa in die Zelle aufgenommen wird oder nur an die Zelloberfläche bindet, werden Kolokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkiertem WGA (Wheat Germ Agglutinin) und Antikörperfärbungen bestimmter Zellkompartimente durchgeführt.

Bei 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-21,23H-porphyrin (TPP) und 5,10,15,20-Tetrakis(4-Carboxyphenyl)-21,23H-porphyrin (TCPP) soll im Rahmen dieser Arbeit durch kovalente Kopplung mit WGA eine verbesserte Wasserlöslichkeit und eine gesteigerte Bioadhäsion an die Zelloberfläche erzielt werden. WGA, das Weizenkeimlektin aus *Triticum vulgare*, interagiert über seine Sialinsäure- und N-Acetyl-D-Glucosamin-spezifischen Zuckerbindungsstellen mit der Glykokalyx von Caco-2 Zellen. Daher könnte diese Modifikation zu einer erhöhten Photosensitizerkonzentration an der Zelloberfläche führen. [3]

TPP soll mittels Mixed-Anhydride-Methode aktiviert und mit WGA modifiziert werden und so zu einer verbesserten Zelloberflächeninteraktion führen. TCPP soll über die Carbodiimidmethode kovalent an WGA gekoppelt und hinsichtlich ihrer Interaktion mit Caco-2-Monolayern quantitativ und qualitativ untersucht werden. Zusätzlich soll der zytotoxische Effekt nach Weißlichtbestrahlung untersucht werden.

2. GRUNDLAGEN

2.1 Photodynamische Therapie

Wie zu Beginn erwähnt, ist die photodynamische Therapie eine selektive Methode, die gegen Tumorzellen eingesetzt wird. Diese Selektivität der PDT beruht darauf, dass Photosensitizer durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge Singulett-Sauerstoff generieren und gezielt in Tumorzellen Apoptose auslösen können. Dies unterscheidet die auf Photosensitizer gestützte PDT grundlegend von herkömmlichen Chemo- und Bestrahlungstherapien, die auch gesunde Zellen und das Immunsystem beeinträchtigen. Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Zellen nicht nur durch ihre stark erhöhte Teilungsrate und den gesteigerten Energiebedarf, sondern auch durch ihren Zellmetabolismus. Die verstärkte Kumulation des Photosensitizers im Tumorgewebe wird auf den sogenannten EPR-Effekt (siehe 2.1.1.) zurückgeführt. Jedoch ist der genaue Mechanismus der erhöhten Anreicherung in pathologisch verändertem Gewebe nicht vollständig geklärt. [2,4]

2.1.1 Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR-Effekt)

Der EPR-Effekt ist eine Form des passiven Drug Targetings in stark proliferierendem Gewebe, wobei durch eine erhöhte Permeabilität und Retention von nanoskaligen Wirkstoffen eine höhere Anreicherung erzielt werden kann. Aufgrund des erhöhten Nährstoff- und Sauerstoffbedarfs von Tumorzellen ist die Neoangiogenese verstärkt und es kommt zu einer Hypervaskularisierung. Diese neugebildeten Blutgefäße weisen aufgrund ihres schnellen Wachstums entscheidende physiologische Defekte im Endothel und in der Basalmembran auf und zeigen eine erhöhte Permeabilität. Die zusätzliche Einschränkung der lymphatischen Drainage führt zu einer erhöhten Retention, die ebenfalls eine Wirkstoffanreicherung im entarteten Gewebe fördert. [20]

2.2 Photosensitizer

Photosensitizer sind Moleküle, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und dadurch Singulett-Sauerstoff generieren können. Hierbei handelt es sich um Chromophore mit zumeist einem makrozyklischen Tetrapyrrol als Grundgerüst. Die wichtigste Gruppe sind die Porphyrine, die auch als „Photosensitizer der 1. Generation“ bezeichnet werden. Daneben werden auch Chlorine, Phthalocyanine, Thiazin-Farbstoffe und δ -Aminolävulininsäure (ALA) - sogenannte „Photosensitizer der 2. Generation“ - in der PDT eingesetzt. Sie reichern sich besonders rasch im Tumorgewebe an. Der Nachteil dieser Photosensitizer liegt in einer erheblich längeren Photosensibilisierung von etwa 2 Tagen. Die Absorption von Licht und somit von Energie erfolgt bei beiden Gruppen durch konjugierte Doppelbindungen. Der genaue Mechanismus dieser Energieaufnahme und die Energiezustände des Moleküls werden im Jablonski-Termschema (Abbildung 2.2.1) erklärt. [2,3]

2.2.1 Jablonski-Termschema

Die Valenzelektronen eines Moleküls können sich in verschiedenen Energieniveaus befinden. Vor einer Energiezufuhr sind die Elektronen im Grundzustand. Durch Aufnahme von Photonen (Lichtenergie) werden Elektronen in ein höheres Energieniveau gehoben, den „angeregten Zustand“. Hier werden Singulettzustände ohne Spinumkehr und Triplettzustände mit Spinumkehr unterschieden. Der Grundzustand (S_0) ist ein Singulettzustand mit entgegengesetzten Spins. Nach Energieaufnahme befindet sich das Molekül ohne Spinumkehr im angeregten S_1 -Zustand. Die Rückkehr vom angeregten Zustand in den Grundzustand kann entweder direkt und damit ohne Spinumkehr oder über eine Spinumkehr erfolgen. Bei direkter Rückführung wird die Energie der Valenzelektronen, die sich im S_1 -Zustand befinden, über Lichtemission (Fluoreszenzstrahlung) abgegeben. Kommt es zu einer Energieabgabe über Spinumkehr, spricht man von Phosphoreszenz. In diesem Fall wird durch Energieaufnahme/-abgabe eine Änderung der Spinrichtung im Triplettzustand hervorgerufen, was auch als „intersystem crossing“ bezeichnet wird. Photosensitizer mit einer Tetrapyrrolgrundstruktur besitzen eine besonders hohe intersystem-crossing-Rate. Ob ein angeregtes Molekül unter Abgabe von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz in seinen Grundzustand übergeht, hängt von der Lage der Energieniveaus ab und wird durch die Übergangswahrscheinlichkeit der Quantentheorie bestimmt. [5]

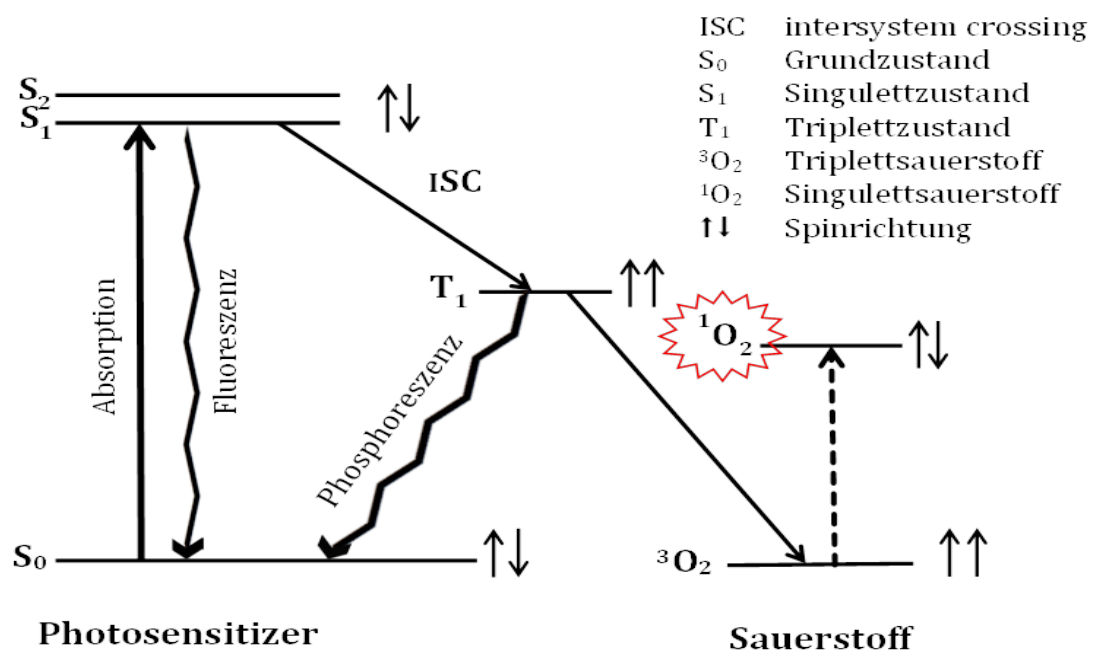


Abbildung 2.2.1: Jablonski-Termschema. Energieübertragung vom Photosensitizer auf Sauerstoff (Typ-2-Reaktion).

2.2.2 Energieübertragung

Die Energie des angeregten Photosensitizers im Triplettzustand kann jedoch nicht nur durch Phosphoreszenz über das eigene Molekül abgegeben, sondern auch auf andere Moleküle übertragen werden. Hierbei wird zwischen Typ-1- und Typ-2 Reaktion unterschieden. Erfolgt die Elektronenübertragung auf ein anderes benachbartes Molekül durch eine Redoxreaktion unter Bildung freier Radikale, handelt es sich um eine Typ-1-Reaktion. Bei Typ-2-Reaktionen hingegen wird die Energie aus dem Triplettzustand auf molekularen Triplett-Sauerstoff (Grundzustand, $^3\text{O}_2$) übertragen. Dabei entsteht eine hochreaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), der Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), der wiederum mit nahezu allen Biomolekülen reagieren und diese durch Oxidation in ihrer Funktion stark beeinflussen kann. Jedoch ist das Wirkungsspektrum des Singulett-Sauerstoffs durch seine kurze Lebensdauer (2 μs in wässrigem Milieu) und der Penetrationstiefe des Lichtes, welches abhängig von der Wellenlänge und bei hohen Wellenlängen bis zu 1cm beträgt, beschränkt. Aus diesem Grund ist eine gezielte Lokalisation der Photosensitizer erforderlich. Übersteigt der durch ROS hervorgerufene oxidative Defekt die Reparaturmöglichkeiten der Zelle, tritt entweder nach Schädigung von Zellorganellen der programmierte Zelltod (Apoptose) oder bei Schäden der Plasmamembran Nekrose ein. [4,5]

2.2.3 Zelltod

Zelltod tritt einerseits zur Beibehaltung der Gesamtzellzahl oder nach Einwirkung externer Faktoren auf. Grundsätzlich wird zwischen Apoptose - dem programmierten Zelltod - und Nekrose - dem traumatischen Zelltod - unterschieden. Apoptose ist einer der best-kontrollierten Abläufe im Organismus und kann durch interne und externe Faktoren ausgelöst werden, wobei keine Schädigung der Nachbarzellen auftritt. Der programmierte Zelltod wird beispielsweise durch UV- oder ionisierende Strahlen, Zytostatika, einen Mangel an Wachstumsfaktoren, Virusinfektionen oder Radikalsauerstoff induziert. Morphologisch kommt es bei der Apoptose zunächst zum Schrumpfen der betroffenen Zelle und zur Kondensation des Chromatins. Die Plasmamembran schwillt blasenförmig an, was auch als „blebbing“ bezeichnet wird. Dann wird die DNA im Zellkern aufgespalten und in der Folge der Nucleus fragmentiert. Die Zelle schrumpft und zerfällt schließlich in apoptotische Partikel, die aus

Zellmembranbestandteilen sowie DNA-Fragmenten bestehen und in der Folge von Makrophagen vollständig phagozytiert werden. Der Vorteil des programmierten Zelltodes besteht darin, dass durch den Vorgang keine Entzündungsreaktionen wie bei der Nekrose, dem traumatischen Zelltod, der unter anderem durch thermische Belastung wie extreme Hitze bzw. Kälte oder chemische Faktoren wie Toxine verursacht werden kann, ausgelöst wird. Photosensitizer können aber ebenso durch Anlagerung an die Zellmembran und anschließender Aktivierung eher den nekrotischen als den gewünschten apoptotischen Zelltod fördern. Tritt Nekrose ein, kommt es durch den Verlust der Membranintegrität und des osmotischen Gradienten zum Flüssigkeitseintritt, der zum Platzen der Zelle führt. Damit gelangt das Zytoplasma in den Extrazellulärraum, wodurch eine im Rahmen einer PDT unerwünschte Immunreaktion im umliegenden Gewebe hervorgerufen wird. [6,7,19]

2.3. Charakteristika der eingesetzten Photosensitizer

2.3.1. Porphyrine

Porphyrine sind Tetrapyrrole, die auch bei verschiedenen Stoffwechselprozessen im menschlichen Körper eine wichtige Rolle spielen (z.B. Hämoglobin). Das Grundgerüst (Porphin) besteht aus vier stickstoffhaltigen, aromatischen Ringen die über Methinbrücken miteinander verbunden sind. Die Nummerierung erfolgt zuerst entlang des äußeren Ringes von eins bis zwanzig. Anschließend werden die vier Stickstoffe mit 21, 22, 23, 24 benannt und die vier Methinbrücken in meso-Position mit 5, 10, 15, 20 nummeriert. Alle beschriebenen Derivate des Porphyrins haben ihr Absorptionsmaximum bei 420 nm und ein Fluoreszenzmaximum bei 650 nm. [8, 9]

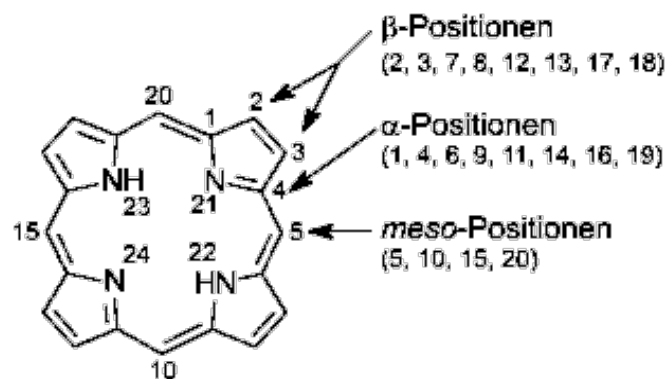


Abbildung 2.3.1: Grundgerüst der Porphyrine. [8]

2.3.2 5,10,15,20-tetrakis (meso-hydroxyphenyl) porphyrin (mTHPP)

Der erste verwendete Photosensitizer mTHPP besitzt im Vergleich zur Porphyrin-Grundstruktur zusätzlich vier Hydroxyphenylgruppen in meso-Position. Die Verbindung hat ein Molekulargewicht von 678,73 g/mol und ist zu 1mg/ml löslich in 96%igem Ethanol (EtOH).

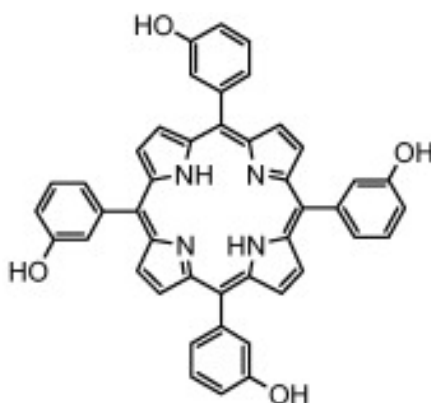


Abbildung 2.3.2: Chemische Struktur von mTHPP. [10]

2.3.3 5,10,15,20-tetrakis(meso-hydroxyphenyl)porphyrin-Komplex mit PSSNa (mTHPP-PSSNa)

Um die Wasserlöslichkeit zu verbessern wurde mTHPP mit Natriumpolystyrolsulfat komplexiert. Pro mTHPP-Molekül sind 13 Moleküle Natriumstyrolsulfat mit einem Molekulargewicht von jeweils 206,2 g/mol vorhanden. Daraus ergibt sich für den mTHPP-PSSNa-Komplex ein Molekulargewicht von 3359,33 g/mol.

Der mTHPP-PSSNa-Komplex wurde für diese Diplomarbeit freundlicherweise von Jun. Prof. Dr. Marc Schneider, Department of Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

2.3.4 5-(4-Carboxyphenyl)-10, 15, 20-triphenyl-21,23H-porphyrin (TPP)

TPP mit einem Molekulargewicht von 6587,76 g/mol ist im Vergleich zu mTHPP lipophiler. Die Verbindung besitzt in Position 5, 10, 15 und 20 je eine Phenylgruppe, wobei der Phenylrest am C5 zusätzlich eine Carboxylgruppe in para-Position aufweist. Auf Grund der konjugierten Doppelbindungen ist das Porphyrinderivat TPP dunkelrot gefärbt. Studien ergaben eine Löslichkeit von 1 mg/ml in Dimethylformamid (DMF) und Dimethylsulfoxid (DMSO), dagegen ist TPP in derselben Konzentration in Wasser, EtOH, Methanol (MeOH) und Tetrahydrofuran (THF) unlöslich.

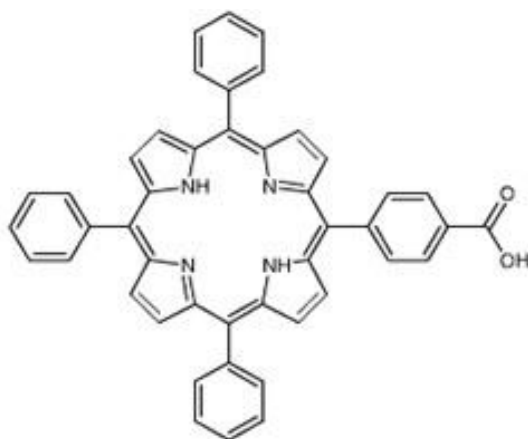


Abbildung 2.3.4: Chemische Struktur von TPP. [11]

2.3.5 5,10,15,20-Tetrakis (4-Carboxyphenyl-21,23H-porphyrin (TCPP)

TCPP ist violett gefärbt und besitzt im Vergleich zu TPP in jeder meso-Position einen 4-Carboxyphenylrest. Dies führt zu einer erhöhten Hydrophilie und zu einer Löslichkeit von 1mg/ml in 20 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 9 (HEPES-9) bzw. von 1 mg/7ml in isotonem 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 (iso-HEPES-7,4). Eine Stabilität der Lösungen ist auch nach pH-Wert Justierung auf 6,9 gewährleistet. TCPP ist in Wasser, EtOH, MeOH, DMF, THF und 1,2-Dimethoxyethan in einer Konzentration von 1 mg/ml unlöslich. Spektroskopisch wird die Absorption bei 415 nm und die Fluoreszenzemission bei 650 nm detektiert.

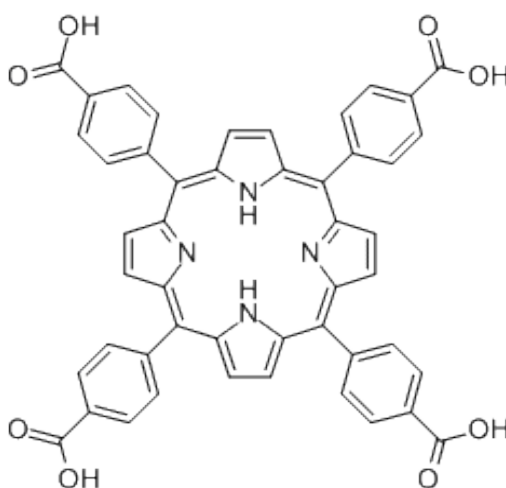


Abbildung 2.3.5: Chemische Struktur von TCPP. [12]

2.4. Caco-2-Modell

Caco-2 Zellen, eine anerkannte, etablierte Zelllinie für das humane Dünndarmepithel, wurden 1974 aus dem primären Colonkarzinom eines kaukasischen Mannes isoliert. Es handelt sich um adhärente Zellen, die zunächst in Kolonien wachsen und schließlich Monolayer bilden. Die Caco-2-Zelllinie wird sowohl für Transportuntersuchungen als auch für Cytotoxizitätstests verwendet. Die Zellen wurden in Roswell Park - Memorial Institut 1640 (RPMI) Zellkulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), sowie L-Glutamin- (200 mM; 400 µl) und Gentamycinzusatz (2 ml; 1g/9,09ml Aqua. dest.) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Subkultivierung wird der adhärente und konfluente Monolayer gespalten und die Zellen erneut ausgesät. Das Erreichen der Konfluenz ist von Bedeutung, da die Zellen erst dann differenzieren und in weiterer Folge morphologisch und funktional den Enterozyten des humanen Darmepithels entsprechen. [13]

2.5. Wheat Germ Agglutinin (WGA)

WGA ist ein pflanzliches Lektin, welches aus Weizenkeimen (*Triticum vulgare*) isoliert wurde. Lektine sind Proteine, die zumindest eine nicht-katalytische Domäne besitzen mit der sie an Mono- und Oligosacchariden binden. WGA ist ein wasserlösliches, dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von 36 kDa und besitzt zwei idente Untereinheiten mit je 171 Aminosäuren, sowie 4 homologe Domänen. Interaktionen mit Zelloberflächen erfolgen über N-Acetylglucosamin- und Sialinsäurereste, die Teilstrukturen der Glykokalyx sind. [14]

In dieser Arbeit soll WGA mit Photosensitizern gekoppelt werden, um eine erhöhte Hydrophilie und eine bessere Anhaftung an die Zelle zu erreichen, woraus möglicherweise auch eine Aufnahme in die Zelle resultiert.

3. **MATERIALIEN**

Alle verwendeten Reagenzien, Substanzen und Puffer wurden analysenrein bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

- 20 mM HEPES/NaOH pH7,4 (HEPES-7,4)
- 20 mM HEPES/NaOH pH 9 (HEPES-9)
- Isotoner 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 (iso-HEPES-7,4)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) mit Calcium und Magnesium 0,003 M pH 7.2-7.3 (Waschpuffer)
- PBS mit 1% bovinem Serumalbumin
- RPMI-1640 Medium mit Gentamycin nach Roswell Park – Memorial Institut
- RPMI-1640 Medium ohne Phenolrot
- TripLE™ Select 12563
- 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung
- Tributylamin (TBA)
- Chlorameisensäurebutylester (IBF)
- Dimethylformamid (DMF)
- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC)
- N-Hydroxysuccinimid (NHS)

4. METHODEN

4.1. Konjugationstechniken

4.1.1 Kopplung mittels Mixed Anhydride-Methode

Mittels der sogenannten Mixed Anhydride-Methode soll eine Bindung von Carbonsäuren an Amine über die Bildung eines Amids ermöglicht werden. Durch Isobutylformiat und der Base Tributylamin wird aus der Carbonsäureteilstruktur ein asymmetrisches Anhydrid (mixed anhydride) generiert, welches in wässriger Lösung bevorzugt mit primären Aminen reagiert. Über diese entstehende Amidbindung sollen Carboxylatgruppen der Photosensitizer mit den Aminogruppen des WGA kovalent verknüpft werden. [15]

4.1.2 Kopplung mittels Carbodiimid

Eine weitere Methode zur Ausbildung einer Amidbindung ist die Carbodiimidmethode. Durch die Reaktion der Carboxylgruppe des Photosensitizers mit dem N-substituierten Carbodiimid (EDAC) entsteht ein reaktiver Ester als Zwischenprodukt (O-Acylisoharnstoff). Um die Bildung des unerwünschten N-Acylisoharnstoffs zu verhindern und die Stabilität dieses Zwischenproduktes zu erhöhen, wird N-Hydroxysuccimid (NHS) der Reaktion hinzugefügt. Der stabile NHS-Ester soll bevorzugt mit den freien Aminogruppen von WGA eine kovalente Amidbindung bilden. Während der Reaktion ist ein pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5 zu gewährleisten, da die Reaktion im Sauren durch Protonierung der Aminogruppen von WGA zum Stillstand kommt. [16]

4.1.3 Dialyse

Unter Dialyse versteht man ein Verfahren, um niedermolekulare Komponenten durch eine Membran von höhermolekularen abzutrennen. Die eingesetzte semipermeable Membran besitzt eine Ausschlussgrenze (Molecular weight cut off), die angibt, ab welcher Masse Moleküle die aus Cellulose bestehende Barriere nicht passieren können. Der Austausch zwischen der zu dialysierenden Flüssigkeit innen und dem Dialysemedium außen erfolgt durch Gleichgewichtseinstellung. Ein mehrmaliges Einstellen dieses Gleichgewichtes durch Wechseln des Dialysemediums führt zur Reinigung von ungewünschten niedermolekularen Komponenten. Dialyseschläuche mit einem Cut Off von 12 kDa ermöglichen eine unbehinderte Diffusion des nicht-

gebundenen Photosensitizer mit einem Molekulargewicht unter 1000 durch die Membran, während WGA (MG: 36 kDa) und WGA-Photosensitizer-Konjugate durch die Membran im Dialyseschlauch zurückgehalten werden.

Die Probelösung wird in rehydratisierte Dialyseschläuche gefüllt, an beiden Seiten mit Klammern geschlossen und für die Dialyse in ein geeignetes Becherglas mit Dialysepuffer (HEPES-7,4) gegeben. Die Porphyrin-Analyse im Dialysemedium erfolgt fluorimetrisch bei 650 nm und zeigt das Ende der Dialyse an, sobald die RFI des Dialysemediums der des eingesetzten HEPES entspricht. [17]

Vor Beginn der Dialyse werden die trockenen Membranen rehydratisiert und gereinigt. Dafür werden die Schläuche zur Entfernung von Schwermetall Ionen zunächst in einer 0.5 M EDTA-Lösung 30 Minuten und anschließend viermal 30 Minuten mit destilliertem Wasser gekocht. Rehydratisierte Dialyseschläuche werden in 0,9%iger NaCl-Lösung im Kühlschrank gelagert.

4.2 Zellkulturtechniken

4.2.1 Subkultivierung von Caco-2-Zellen

Die Caco-2-Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen und weiter kultiviert. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um adhärenzte Zellen, die durch Passagieren subkultiviert werden. Nach Aussäen der Zellen und Erreichen von 80% Konfluenz werden mittels Triple Select, einem proteolytischen Enzym, die Zellen von der Gewebekulturflasche abgelöst und 15 bis 20 Minuten bei 37°C inkubiert, um eine vollständige Trennung der Zellen zu erreichen. Anschließend wird die Enzymaktivität und damit der Spaltvorgang durch Zugabe von RPMI-Medium gestoppt und die Zellen zentrifugiert. Das Zellpellet wird in frischem RPMI-Medium homogen suspendiert und die Zellen tropfenweise erneut ausgesät.

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Caco-2 Zellen werden in einer definierten Zellzahl ausgesät. Mittels Buerker-Tuerk Zählkammer werden die Zellen gezählt und nach Ermittlung der Zellzahl pro Milliliter wird die für die jeweilige Studie erforderliche Zellzahl durch Verdünnen eingestellt. [13]

4.2.3 Mikrotiterplatten

Im Rahmen dieser Arbeit werden für Zellbindungs- und Internalisationsstudien 96-Well-Platten mit Flachboden der Firma Greiner verwendet. Um bei jeder Studie von einer gleichen Zellzahl ausgehen zu können werden pro Well 17000 Caco-2 Zellen in 160 µl RPMI-Medium ausgesät und bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers im Inkubator bei 37°C kultiviert. Die Detektion der fluoreszierenden Komponenten erfolgt mit einem Mikrotiterplatten-Fluorimeter (Infinite™ 200, Tecan Group Ltd., Grödig, Österreich).

4.2.4 FlexiPERM-System

Zur mikroskopischen Visualisierung der Zellbindung und Internalisation der Photosensitizer-Konjugate werden Caco-2 Zellen im FlexiPERM System auf Deckgläsern kultiviert. Autoklavierbare Silikon-FlexiPERM micro 12 (Greiner, Kremsmünster, Österreich), die bis zu 12 Parallelversuche ermöglichen, werden vor Verwendung zwei Stunden in 70% EtOH desinfiziert und anschließend unter sterilen Bedingungen getrocknet. Die Deckgläser werden ebenso desinfiziert. Pro Well werden 17000 Zellen in 160 µl RPMI-Medium ausgesät und in einer sterilen Petrischale im Inkubator bis zur Konfluenz kultiviert. [18]

4.3 Färbemethoden

4.3.1 DNA-Detektion mit DAPI-dilactat

DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die DNA toter Zellen anfärbt und nach Anregung bei 358 nm als blaue Fluoreszenz bei 460 nm detektiert wird. Um die Zellviabilität während der Studien zu beurteilen, werden die Zellen mit DAPI in einer Konzentration von 0,1 mg/ml Aqua dest. 15 Minuten bei 37°C gefärbt. [19]

4.3.2 DNA-Detektion mit Hoechst 33342

Hoechst 33342 (2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole-trihydrochloride) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an Adenin- und Thyminreiche Regionen der DNA lebender bzw. toter Zellen anlagert und dadurch die Zellkerne fluoreszenzmikroskopisch sichtbar macht. Nach Anregung bei 358 nm fluoresziert der Farbstoff bei 460 nm blau. Um die Zellkerne der Caco-2 Zellen sichtbar

zu machen, werden sie mit einer Lösung von 0,05 mg Hoechst 33342/ml Aqua destillata und einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37°C angefärbt.

4.3.3 Detektion von Fluorescein-markiertem Wheat Germ Agglutinin (f-WGA)

Für den Nachweis von Internalisationswegen wird f-WGA, das sich nachweislich in Lysosomen anreichert [LIT], eingesetzt. Fluoreszenzmikroskopisch ist f-WGA nach Exzitation bei 485 nm im grünen Farbbereich durch seine Fluoreszenz bei 520 nm detektierbar.

4.3.4 Detektion der tight junctions

Mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung können durch den primären Antikörper ZO-1, der mit dem tight junction-assoziiertem Protein ZO-1 (Zona occludens 1) interagiert und dem sekundären Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC) markierten Antikörper (Ziege-Anti-Maus-Antikörper) Zellgrenzen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

4.3.5 Bestimmung der Zellviabilität

Zur weiteren Evaluierung der Zellviabilität wird Propidiumiodid eingesetzt, das selektiv mit der DNA toter Zellen interagiert. Nach Anregung bei 488 nm wird Propidiumiodid im roten Bereich von 620-650 nm sichtbar.

4.4 Aktivierung der Photosensitizer

Um die verwendeten Photosensitizer zu aktivieren, wurden sie mit Weißlicht einer leistungsstarken EXFO-Lampe x-cite®120 bestrahlt. Mittels Radiometer wurde die Bestrahlungsstärke kontrolliert und auf eine Intensität von 20 mW/cm² eingestellt. Die Bestrahlungsdauer wurde auf eine Minute festgelegt.

5. ERGEBNISSE

5.1 5,10,15,20-Tetrakis(meso-hydroxyphenyl)porphyrin (mTHPP) und mTHPP-Polystyrolsulfat-Natrium

5.1.1 Interaktion von mTHPP- und mTHPP-PSSNa mit Caco-2-Monolayern

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die Modifikation von mTHPP mit Polystyrolsulfat-Natrium (PSSNa) neben einer erhöhten Wasserlöslichkeit auch eine verstärkte Interaktion mit Caco-2-Zellen bewirkt. Dazu werden zunächst Vorversuche durchgeführt.

Stammlösungen der Photosensitizer:

Bei den Untersuchungen werden mTHPP und mTHPP-PSSNa miteinander verglichen. Dafür werden zunächst Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. mTHPP wird in 96%igem Ethanol, mTHPP-PSSNa in destilliertem Wasser gelöst.

Die Stammlösungen werden für die Zellversuche mit farblosem RPMI-Medium auf eine Konzentration von 3 µmol/l verdünnt. Beide Lösungen zeigen das Absorptionsmaximum bei 420 nm. Nach Anregung bei 420 nm und Emissionsscan über einen Bereich von 460-800 nm zeigen sowohl mTHPP als auch mTHPP-PSSNa Fluoreszenzmaxima bei 650 nm und bei 720 nm, wobei das Höhere bei 650 nm liegt und in allen weiteren Versuchen zur Detektion verwendet wird. Alle Versuche werden in farblosem Zellkulturmedium durchgeführt, da RPMI durch den pH-Indikator Phenolrot für photometrische und fluorimetrische Bestimmungen nicht geeignet ist.

Stabilität der Lösungen und Reproduzierbarkeit der Bestimmungsmethode:

Vor Beginn der Caco-2-Studien wird die Stabilität der Lösungen und Reproduzierbarkeit der Detektion von mTHPP und mTHPP-PSSNa untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind voneinander stark abweichend. Bei gleicher molarer Konzentration unterscheiden sich die Intensitäten der Fluoreszenzmaxima deutlich, sodass angenommen wird, dass mTHPP in wässrigem Milieu zumindest teilweise ausfällt. Durch Zentrifugieren der Probelösung (mTHPP in farblosem Medium) wird dies bestätigt. Auch bei mTHPP-PSSNa sind Schwankungen der Fluoreszenzintensitätsmaxima zu beobachten. Diese sind zwar geringer als bei mTHPP,

aber dennoch nicht zu vernachlässigen. Hier kann jedoch eine verminderte Löslichkeit in wässrigem Milieu ausgeschlossen werden. Anhand einer Verdünnungsreihe im Bereich von 3,00000 - 0,09375 μmol mTHPP (gelöst in 96%igem EtOH)/ml farblosem Medium ist eine Zunahme der Absorptions- und der relativen Fluoreszenzintensität mit steigender Konzentration zu beobachten. Die Maxima der 3 $\mu\text{molaren}$ Lösungen unterscheiden sich auch hier von vorangegangenen Messungen.

Trotz der kaum vergleichbaren Ergebnisse der Vorversuche wird die Interaktion von mTHPP und mTHPP-PSSNa mit Caco-2-Monolayern untersucht.

5.1.2 Caco-2 Bindungsstudie von mTHPP- und mTHPP-PSSNa durch Fluorimetrie

In der Folge sollte im Vergleich mit wasserunlöslichem mTHPP geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß die Modifikation von mTHPP mit PSSNa die Interaktion mit dem Caco-2-Monolayer beeinflusst. Zusätzlich sollte der Einfluss unterschiedlicher Inkubationstemperaturen und Inkubationszeiten erfasst werden.

Als Inkubationstemperaturstufen werden 4°C und 37°C gewählt, um einen möglichen Einfluss der Zellaktivität auf die Interaktion zwischen Photosensitizer und Caco-2-Monolayer zu erkennen. Die relative Fluoreszenzintensität bei 650 nm wird nach 30, 60, 120, 180, 240 und 300 Minuten nach Anregung bei 420 nm detektiert.

Praktische Durchführung:

Die Stammlösungen von mTHPP und mTHPP-PSSNa werden mit farblosem Medium auf eine Konzentration von 3 μmol eingestellt. Der konfluente Caco-2-Monolayer wird einmal mit Waschpuffer (160 μl isotoner 0,003M PBS mit Calcium und Magnesium pH 7,4/well) gewaschen. Danach werden 160 μl Probelösung bzw. 160 μl farbloses RPMI-Medium/well 30, 60, 120, 180, 240 oder 300 Minuten bei 4°C bzw. 37°C inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen Photosensitizers durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer und Zugabe von je 160 μl /well farblosem RPMI-Medium wird die RFI bei 420/650 nm bestimmt.

Tabelle 5.1: Zellossoziierte RFI von mTHPP und mTHPP-PSSNa nach Inkubation mit Caco-2-Monolayern nach 30, 60, 120, 180, 240 und 300 Minuten bei 4°C bzw. 37°C.

Der Leerwert der Monolayer wurde von den Messwerten nicht abgezogen.

Probelösung/Inkubationsdauer (Minuten)	Inkubationstemperatur 4°C				Inkubationstemperatur 37°C				Mittlere RFI 37°/4° (gerundet)
	RFI-Bestimmung			Mittelwert	RFI-Bestimmung			Mittelwert	
	1.	2.	3.		1.	2.	3.		
mTHPP/30	110	100	84	98 ± 11	273	249	246	256 ± 12	3
mTHPP/60	137	129	146	137 ± 7	614	193	326	378 ± 176	3
mTHPP/120	188	163	175	175 ± 10	719	786	607	704 ± 74	4
mTHPP/180	143	122	121	129 ± 10	1744	1522	1739	1668 ± 103	13
mTHPP/240	398	178	175	177 ± 2	5617	5245	7121	5994 ± 811	34
mTHPP/300	272	220	223	238 ± 24	2840	3154	3362	3119 ± 215	13
mTHPP-PSSNa/30	2636	2021	1714	2124 ± 383	2685	3052	2639	2792 ± 185	1
mTHPP-PSSNa/60	3288	1874	3295	2819 ± 668	5041	6209	5499	5583 ± 481	2
mTHPP-PSSNa/120	3669	4747	6976	5131 ± 1377	9362	10545	11448	10452 ± 854	2
mTHPP-PSSNa/180	6745	6877	7852	7158 ± 494	12557	11574	13603	12578 ± 828	2
mTHPP-PSSNa/240	7613	6393	5662	6556 ± 805	22752	18650	26322	22575 ± 3135	3
mTHPP-PSSNa/300	8865	6897	6009	7257 ± 1193	13131	15018	12253	13467 ± 1154	2
Monolayer in RPMI-Medium	75	72	71	73 ± 2	71	79	77	76 ± 3	1

Wie die in Tabelle 5.1 angeführten Messwerte belegen, ist die zellassoziierte mittlere Fluoreszenzintensität von mTHPP-PSSNa sowohl bei 4°C als auch bei 37°C deutlich höher als jene von mTHPP.

Bei Inkubation des Caco-2-Monolayers bei 4°C ist die Fluidität der Zellmembran reduziert, sodass Energie-abhängige Transportprozesse weitgehend unterdrückt werden. Zusätzlich ist der Stoffwechsel der Zellen auf das lebensnotwendige Minimum gesenkt, sodass metabolische Prozesse stark eingeschränkt werden. Dementsprechend spiegeln die gemessenen Fluoreszenzintensitäten nur die Menge an Plasmamembran-gebundenem Photosensitizer wider. Unter Berücksichtigung der Autofluoreszenz der Monolayer binden bei 4°C nur geringste Mengen mTHPP an die Zellmembranen, die jedoch mit der Verlängerung der Expositionsdauer auf fünf Stunden bis zum etwa sechsfachen steigen. Die geringe, aber mit der Inkubationsdauer steigende Zellbindung von mTHPP dürfte die relative Lipophilie dieses Photosensitizers widerspiegeln.

Im Gegensatz dazu gewährleistet eine Umgebungstemperatur von 37° bei Zellen optimale Bedingungen für Energie-abhängige Transportprozesse, die Fluidität der Zellmembran sowie die metabolische Aktivität erreichen ihr Optimum. Dementsprechend stellen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten die Summe aus Membran-gebundenem und in die Zellen aufgenommenem Photosensitizer dar. Bereits nach einer Inkubation von 30 Minuten ist die zellassoziierte Fluoreszenzintensität von mTHPP etwa siebenmal höher als jene bei 4° und sie steigt auf den bis zu 18fachen Wert nach fünf Stunden.

Vorausgesetzt, dass einmal Membran-gebundener Photosensitizer nicht wieder ins umgebende RPMI-Medium freigesetzt wird und eine lineare Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und Photosensitizer-Konzentration besteht, entspricht die Differenz aus den Messwerten nach Inkubation bei 37° und 4° der Menge an internalisiertem Photosensitizer. Aufgrund dieser Ergebnisse wird der lipophile Photosensitizer mTHPP zwar nur geringfügig an die Membran gebunden, jedoch bemerkenswert hohe Mengen in die Zellen aufgenommen.

Bei mTHPP-PSSNa ist bei 4°C und 37°C nach 30 Minuten Inkubation kaum ein Unterschied zwischen den gemessenen Fluoreszenzintensitäten feststellbar. Mit zunehmender Inkubationsdauer erhöhen sich beide Werte. Bei 4°C steigt die gemessene Fluoreszenzintensität auf das Vierfache an, bei 37°C sogar auf das Fünffache. Da bei 4°C

die RFI-Werte um das 28fache höher sind als die Autofluoreszenz der Monolayer und die Autofluoreszenz im Bereich der Standardabweichung verschwindet, wird mTHPP-PSSNa an die Zelloberfläche gebunden, wobei die gebundene Photosensitizer-Menge innerhalb von fünf Stunden auf das Siebenfache steigt. Bei 37°C-Inkubation, wo Membran-gebundenes und internalisiertes mTHPP-PSSNa fluorimetrisch erfasst werden, besteht nach 30-minütiger Inkubation kein signifikanter Unterschied zur 4°C-Inkubation, was auf eine noch nicht messbare Internalisation hinweist. Mit verlängerter Inkubation nimmt jedoch die zellassoziierte Fluoreszenzintensität auf das bis zu Fünffache zu und ist jeweils höher als die zellgebundene Fluoreszenzintensität. Damit wird auch der Photosensitizer-Komplex internalisiert, wobei die bei 37°C bis zu etwa dreifach höhere RFI auf eine geringere Internalisation von mTHPP-PSSNa verglichen mit mTHPP hinweist. Aufgrund der Ergebnisse der 4°C-Inkubationen wird der hydrophile mTHPP-PSSNa stärker an die Plasmamembran gebunden als das lipophilere mTHPP. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind nach 30 Minuten um das 81fache höher als bei mTHPP, sinken jedoch auf das 43fache nach fünf Stunden. Trotz dieses zeitlich bedingten Abfalles interagiert insgesamt mehr wasserlösliches mTHPP-PSSNa als wasserunlösliches mTHPP mit der Plasmamembran. Ähnliche Ergebnisse zeigt auch die 37°C-Inkubation, wo mTHPP-PSSNa entsprechend der gemessenen Werte mTHPP überlegen ist. Bereits nach 30 Minuten ist die berechnete Menge an internalisiertem mTHPP-PSSNa um das Vierfache höher als jene von mTHPP und steigt nach einer Stunde auf das 12fache. Danach sinkt die RFI stündlich ab, bis nach 5 Stunden nur mehr das Doppelte des mTHPP-Wertes vorliegt.

Zusätzlich zeigt diese Versuchsreihe, dass mTHPP aufgrund seiner geringen Hydrophilie zwar nur in geringer Menge an die Plasmamembran gebunden wird, die Aufnahme in die Zelle durch die hohe Lipophilie begünstigt wird, wie das RFI-Verhältnis 37°C/4°C von maximal 13 zeigt. Demgegenüber wird das hydrophile mTHPP-PSSNa in wesentlich höherem Ausmaß an die Zellmembran gebunden, jedoch aufgrund seiner Hydrophilie aber in geringerem Ausmaß als die Membran-gebundenen Menge erwarten lässt, internalisiert wie das RFI-Verhältnis 37°C/4°C von maximal 3 zeigt. Insgesamt wird jedoch wesentlich mehr Photosensitizer-Komplex an die Zellen gebunden und auch internalisiert, wenn auch nur ein geringerer Anteil des initial Plasmamembran-gebundenen Komplexes internalisiert wird.

Anhand dieses Versuchs kann gezeigt werden, dass die Modifikation von mTHPP mit PSSNa nicht nur die Wasserlöslichkeit, sondern auch die Interaktion mit dem Caco-2-Monolayer verbessert. Aufgrund dieses positiven Ergebnisses werden weitere qualitative Versuche zur Untermauerung dieser quantitativen Untersuchungen an Caco-2 Monolayern durchgeführt.

5.1.3 Caco-2 Bindungsstudie von mTHPP und mTHPP-PSSNa anhand von Mikroskopie

Zur Visualisierung der Wechselwirkung der beiden Photosensitizer mit Caco-2 Zellen sollen diese durch ihre Eigenfluoreszenz sichtbar gemacht werden und gleichzeitig durch spezifische Färbung Zell-eigener Strukturen wie Zellkernen, Lysosomen und Zellmembranen an bzw. in der Zelle lokalisiert werden. Die Versuche sollen an Caco-2-Monolayern, die auf Objektträgern im FlexiPERM-System kultiviert werden, nach Inkubationszeiten von zwei, fünf und 24 Stunden bei 37°C durchgeführt werden. Zusätzlich soll mittels DAPI, welches die DNA toter Zellen markiert, die Zellviabilität während der Versuche beurteilt und die Toxizität der Photosensitizer nach deren Aktivierung mit Weißlicht erfasst werden.

Praktische Durchführung:

Der konfluente Caco-2-Monolayer wird einmal mit Waschpuffer gewaschen, anschließend werden pro well 160 µl Probelösung (3 µM mTHPP, 3µM mTHPP-PSSNa, jeweils in farblosem RPMI-Medium, oder farbloses RPMI-Medium als Leerwert) zugegeben und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Für die zusätzliche Zellkernfärbung werden 15 Minuten vor Inkubationsende je 8 µl DAPI (0,1mg/ml Aqua dest.)/well zugesetzt. Durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer wird ungebundener Photosensitizer bzw. überschüssiges DAPI entfernt und für folgende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit 160 µl/well farblosem RPMI-Medium überschichtet.

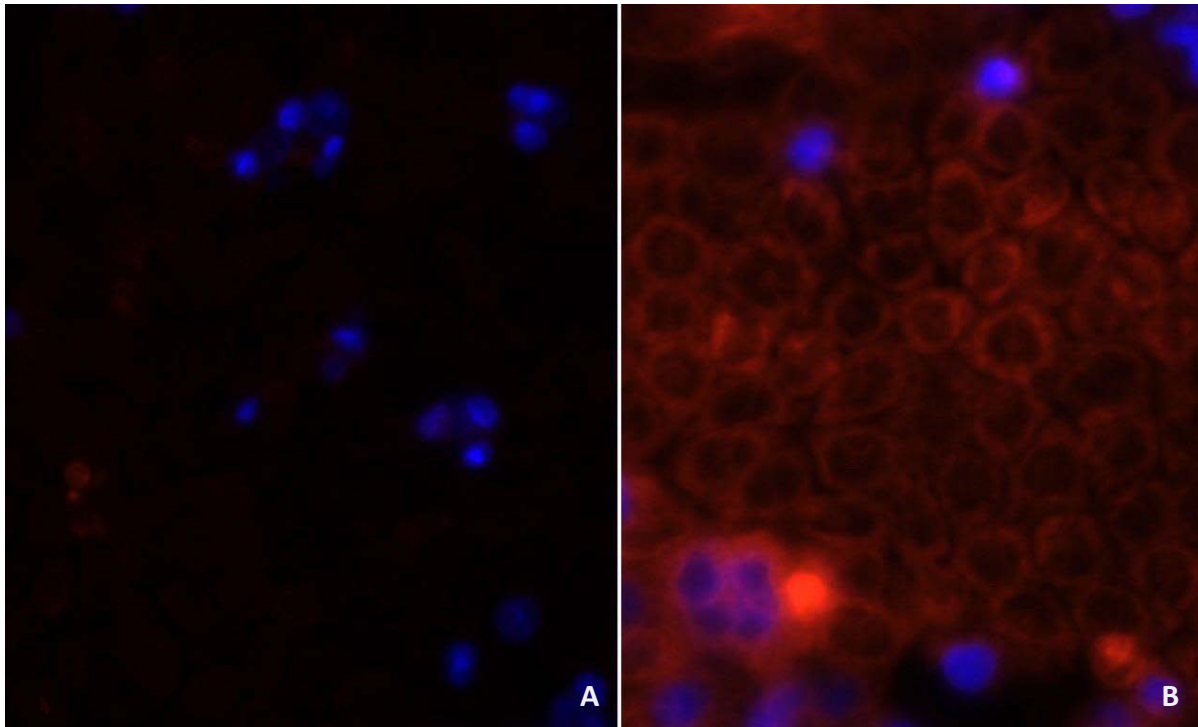


Abbildung 5.1.3.1: Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich von mTHPP (A; rot) und mTHPP-PSSNa (B: rot) nach 2 Stunden Inkubation mit Caco-2-Monolayern und Färbung der Zellkerne (blau).

Das lipophile mTHPP besitzt nur eine geringe Fluoreszenzintensität und zeigt eine geringe Bindung, jedoch keine Internalisation nach zwei Stunden Inkubation mit Caco-2 Monolayern bei 37°C (Abb. 5.1.3.1 A). Dadurch werden die Ergebnisse der vorangegangenen quantitativen Versuche bestätigt. Im Gegensatz dazu wird nach gleicher Inkubationsdauer mit dem hydrophilen mTHPP-PSSNa eine gleichmäßig hohe Fluoreszenzverteilung über den gesamten Caco-2-Monolayer sichtbar (Abb. 5.1.3.1 B), die aus einer vergleichsweise höheren Wirkstoff-Zellinteraktion resultiert.

Da, nach Inkubation mit mTHPP-PSSNa, die Bindung an die Zelloberfläche gut erkennbar ist, werden weitere Versuche durchgeführt, um eine auf die Bindung folgende Internalisation bzw. Anreicherung in bestimmten Zellkompartimenten visualisieren zu können.

Durch die beschriebenen Versuche wird bewiesen, dass sowohl mTHPP als auch mTHPP-PSSNa ohne Aktivierung durch Weißlicht keinen toxischen Effekt auf die Zellen ausübt.

Weitere Studien sollen - nach erfolgter Bindung der Photosensitizer an die Zelloberfläche - deren Toxizität und damit Wirksamkeit in Caco-2-Zellen nach Aktivierung mit Weißlicht deutlich machen. Um höhere Bindungsraten und damit erhöhte Sichtbarkeit von mTHPP zu erzielen wird die Inkubationszeit mit beiden Photosensitizern auf fünf bzw. 24 Stunden verlängert.

Praktische Durchführung:

Der konfluente Caco-2-Monolayer wird einmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend pro well 160 µl Probelösung (3µM mTHPP, 3 µM mTHPP-PSSNa in farblosem RPMI-Medium) oder 160 µl farbloses RPMI-Medium als Leerwert zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von fünf beziehungsweise 24 Stunden bei 37°C wird ungebundener Photosensitizer durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt und mit 160 µL farblosem RPMI-Medium/well für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung überschichtet.

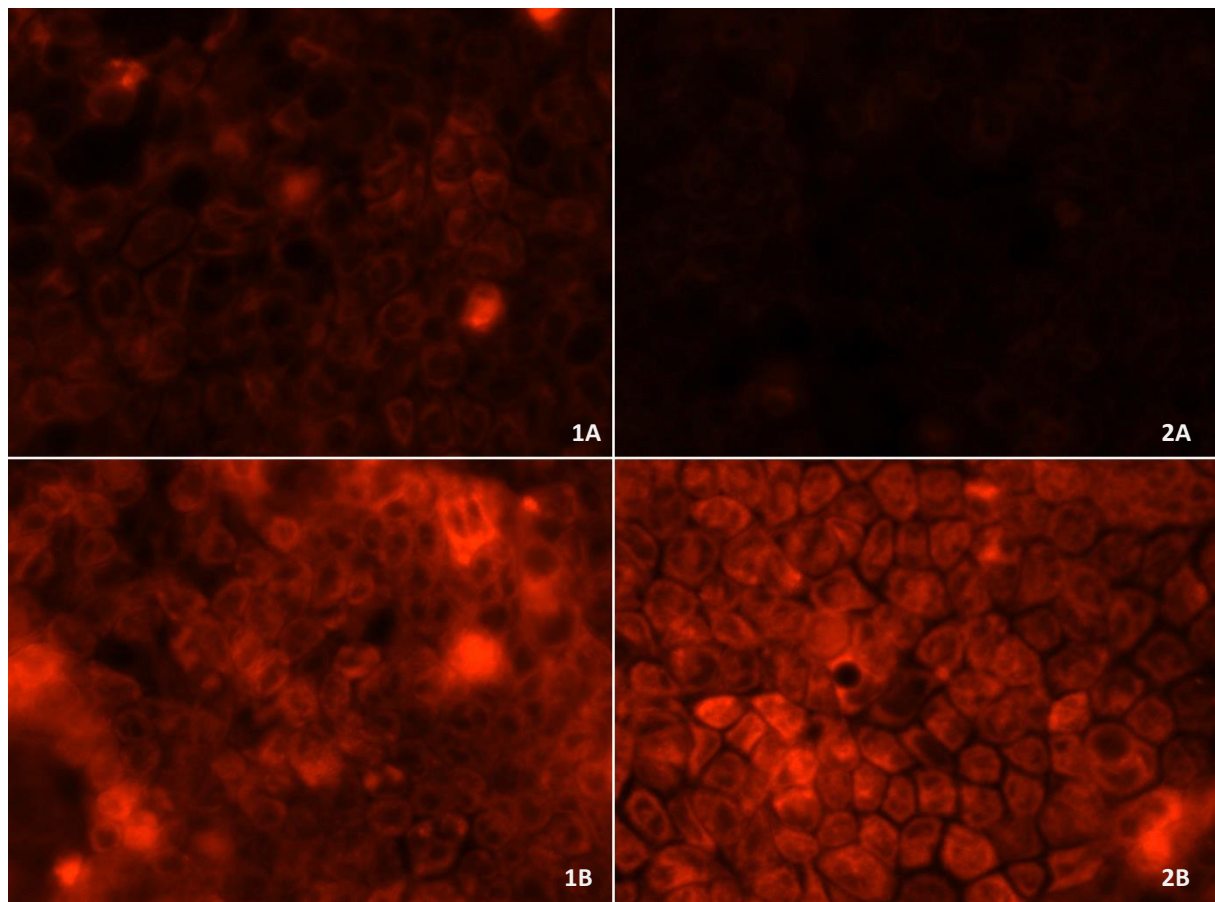


Abbildung 5.1.3.2: Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der Zellassoziation von mTHPP-PSSNa (1) und mTHPP (2) nach 5-stündiger- (A) bzw. 24-stündiger Inkubation (B) mit Caco-2-Monolayern.

Die Bewertung der Fluoreszenzintensitäten in Abbildung 5.1.3.2 ergibt, dass mTHPP-PSSNa (1A) nach fünf Stunden mit den Zellen assoziiert ist, während mTHPP (2A) keine nennenswerte Zellinteraktion zeigt, auch wenn eine geringfügig höhere Intensität als nach zwei Stunden (Abb. 5.1.3.1, A) sichtbar ist. Nach 24 Stunden Inkubation zeigen sowohl mTHPP (Abb. 5.1.3.2, 2B) als auch mTHPP-PSSNa (Abb. 5.1.3.2, 1B) etwa gleich intensive Fluoreszenzen.

Nach diesem Zwischenergebnis werden die Präparate für die Toxizitätsstudie mit Weißlicht (20 J/cm^2) eine Minute lang bestrahlt und nach einer Stunde Inkubation bei Tageslicht und 37°C mikroskopisch bewertet.

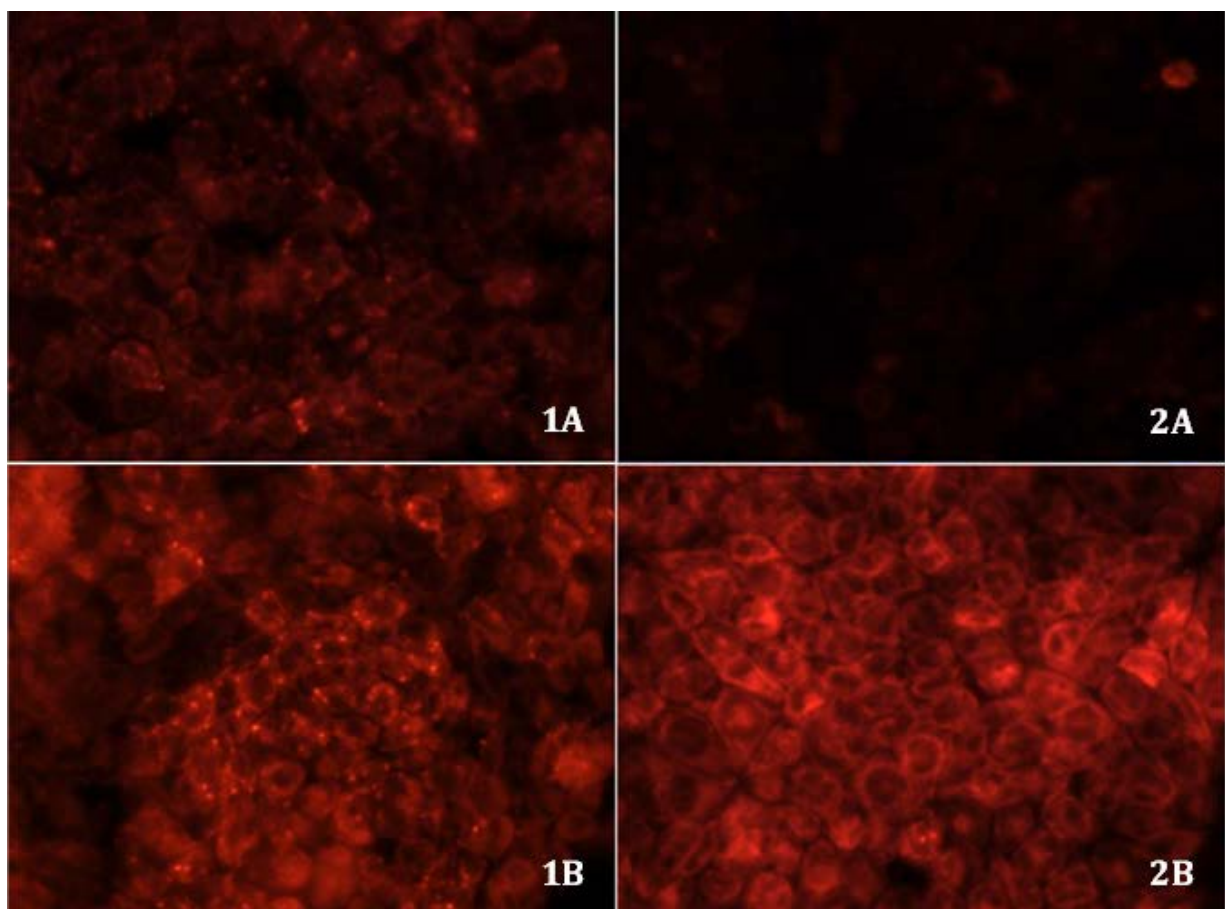


Abbildung 5.1.3.3: Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der Interaktion von mTHPP-PSSNa (1) und mTHPP (2) nach einer Minute Bestrahlung mit Weißlicht (A) und einer darauffolgenden einstündigen Inkubation bei 37°C (B).

Jene Caco-2 Monolayer, die zwei bzw. fünf Stunden mit mTHPP inkubiert wurden, zeigen nach Induktion der Wirkung des Photosensitizers durch Bestrahlung mit Weißlicht keine Änderung der Fluoreszenzverteilung (Abb. 5.1.3.2, 2A und 2B verglichen mit Abb. 5.1.3.3, 2A und 2B). Damit reicht auch die nach fünf Stunden Zell-assoziierte Menge an mTHPP nicht aus, um einen toxischen Effekt auf Caco-2 Monolayer auszuüben. Ein

anderes Bild zeigt mTHPP-PSSNa, wo nach der Bestrahlung mit Weißlicht punktuell intensivere Fluoreszenzen auftreten (Abb. 5.1.3.3, 1B). Diese punktuelle Verteilung ist bereits nach fünf Stunden erkennbar, jedoch nach 24 Stunden Inkubation mit mTHPP-PSSNa und folgender Weißlichtbestrahlung deutlich sichtbar. Als Ursache für die punktuelle Kumulation der Fluoreszenz wird angenommen, dass mTHPP-PSSNa in Lysosomen aufgenommen wird. Um diese Theorie zu verifizieren, werden Kolkalisationsversuche mit Fluorescein-markiertem WGA (f-WGA), dessen Anreicherung in den Lysosomen bewiesen ist [Literatur], durchgeführt.

Praktische Durchführung:

Um das Lektin an der Zelloberfläche zu binden, wird der konfluente Caco-2-Monolayer mit 50 µl f-WGA-Lösung (25pmol)/well 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Ungebundenes Lektin wird anschließend durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Danach werden je well 160 µl Probelösung (3 µM mTHPP oder 3µM mTHPP-PSSNa in farblosem RPMI-Medium) oder 160 µl farbloses RPMI-Medium als Leerwert zugesetzt und drei Stunden bei 37°C inkubiert, um einerseits die Internalisation des membrangebundenen Lektins, andererseits Bindung und Internalisation der Photosensitizer zu ermöglichen. Nach Entfernen des ungebundenen Photosensitizers durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer und Zugabe von je 160 µL/well farblosem Medium werden die Monolayer fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

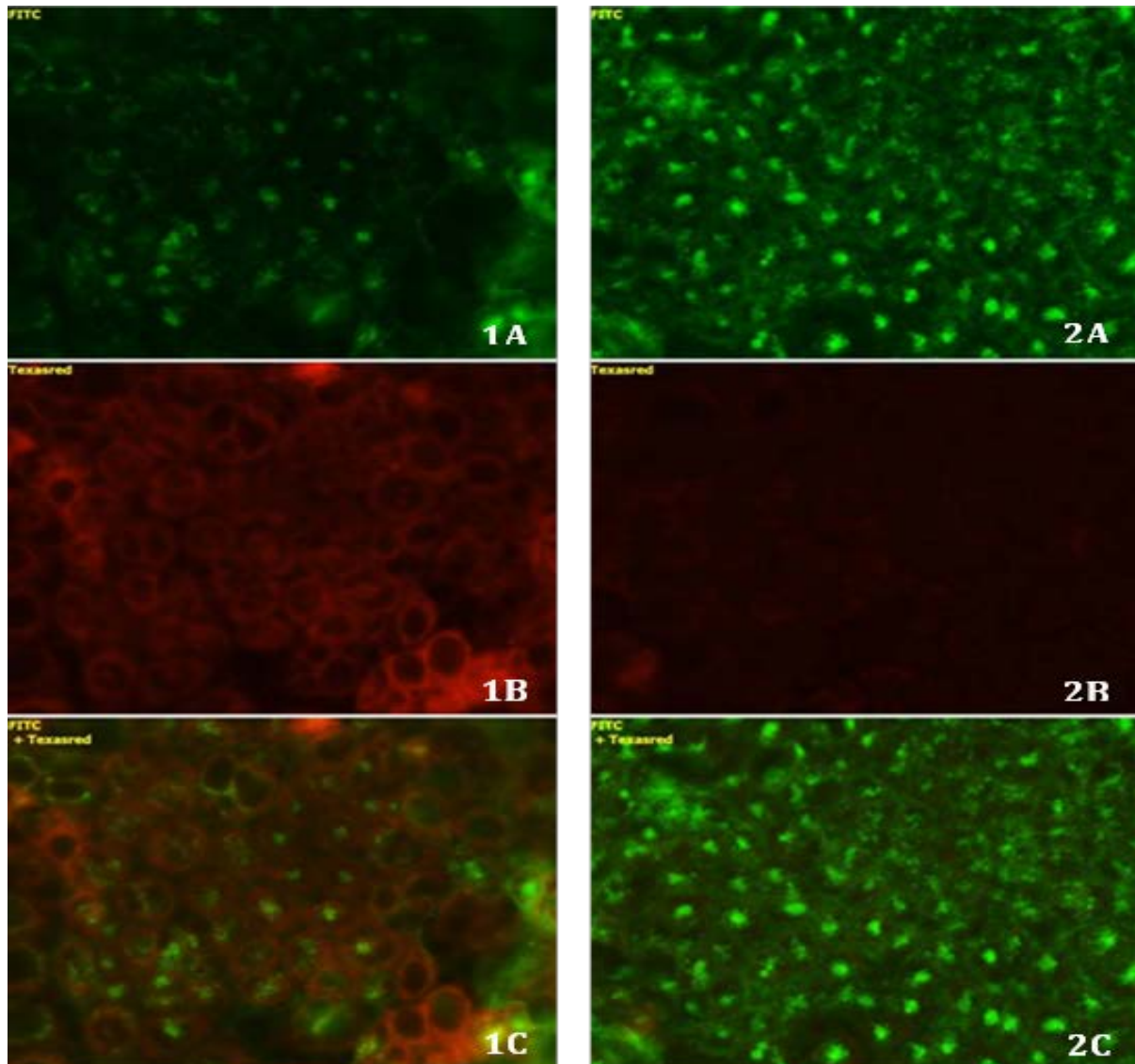


Abbildung 5.1.3.4: Fluoreszenzmikroskopie der Kolokalisation von f-WGA (grün) und mTHPP-PSSNa (1B, 1C; rot) bzw. mTHPP (2B, 2C; rot).

Die grüne Fluoreszenz in Abbildung 5.1.3.4, 1A und 2A zeigt wie erwartet die Anreicherung von f-WGA in den Lysosomen. In Übereinstimmung mit dem bereits aus Abb. 5.1.3.3 erkennbaren Verhalten ist keine Zellassoziation von mTHPP erkennbar (Abb. 5.1.3.4, 2B), während mTHPP-PSSNa deutliche Zellassoziation zeigt (Abb.: 5.1.3.4, 1B). Das Überlagern der Fluoreszenzbilder von Photosensitizer und f-WGA (Abb. 5.1.3.4, 1C und 2C) ergibt keine Kolokalisation der beiden Substanzen, sodass eine Aufnahme in Lysosomen, sowohl von mTHPP als auch von mTHPP-PSSNa, ausgeschlossen werden kann.

Da durch diesen Versuch nicht vollständig geklärt werden konnte, ob die Photosensitizer in das Zellinnere aufgenommen oder nur an die Zelloberfläche gebunden werden, sollen im Folgenden die Zellgrenzen durch indirekte Färbung des

tight junction Proteins ZO-1 sichtbar gemacht werden, um diese Fragestellung klären zu können. Zusätzlich sollte der cytoplasmatische Bereich zwischen Zellmembran und Zellkern durch Färbung der DNA im Zellkern mit dem interkalierenden Farbstoff Hoechst 33342 genauer lokalisiert werden.

Praktische Durchführung:

Die konfluenten Caco-2-Monolayer werden einmal mit Waschpuffer gewaschen, je well 160 µl Probelösung (3µM mTHPP oder 3µM mTHPP-PSSNa in farblosem RPMI-Medium) zugesetzt und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen Photosensitizers durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer werden die Zellen mit jeweils 200 µl eiskaltem Methanol 20 Minuten bei -20°C fixiert, dreimal mit je 200 µl isotonomem 0,003M PBS gewaschen und über Nacht in PBS mit 1% Rinderserum Albumin (BSA) rehydratisiert. Zur Färbung der Zellgrenzen werden je well 50 µl einer 1:100 Verdünnung eines Maus-Anti-ZO-1-Antikörpers in PBS/1% BSA zugesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 100 µl PBS/1% BSA wird mit 10 µl Fluorescein-Isothiocyant-(FITC)markiertem sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Maus-Antikörper 1:100 in Medium?) und 80 µl Hoechst 33342 (0,1mg/ml Aqua dest.) zur Färbung der Zellgrenzen bzw. Zellkerne 30 Minuten bei 37° inkubiert. Anschließend wird zweimal mit PBS gewaschen und die Präparate fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

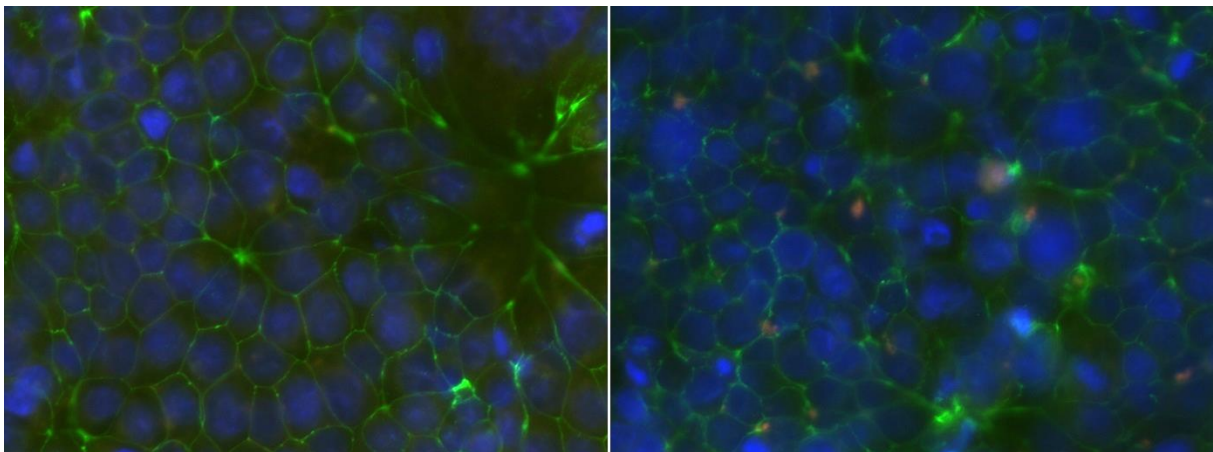


Abbildung 5.1.3.5: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von Caco-2-Monolayern nach 24 Stunden Inkubation mit mTHPP (A; rot) und mTHPP-PSSNa (B; rot) und anschließender Färbung der Zellgrenzen (grün) und Zellkerne (blau).

In den fluoreszenzmikroskopischen Bildern (Abb.5.1.3.5) sind die Zellgrenzen (grün) und Zellkerne (blau) deutlich und klar erkennbar. Allerdings sind trotz 24-stündiger Inkubation mit mTHPP bzw. mTHPP-PSSNa aufgrund der nicht erkennbaren roten Fluoreszenz keine Aussagen über die Lokalisation der Photosensitizer oder deren mögliche Aufnahme in die Zelle möglich.

5.2 5-(4-Carboxyphenyl)-10, 15, 20-triphenyl-21.23H-porphyrin (TPP)

Durch früher durchgeführte Studien ist bekannt, dass das Lektin von *Triticum vulgare* (WGA) selektiv mit bestimmten Zuckerstrukturen der Glykokalyx von Caco-2 Zellen interagiert [LIT]. Diese spezifische Bindungscharakteristik soll für eine gezielte Photosensitizer-Therapie eingesetzt werden. Mittels Mixed Anhydrid-Methode soll TPP mit WGA modifiziert und anschließend die Zell-Interaktion der hergestellten Konjugate anhand von Caco-2 Zellen untersucht werden.

5.2.1 Herstellung des TPP-WGA-Konjugates mittels Mixed Anhydrid Methode

Zur Herstellung des Aktivesters wird TPP in wasserfreiem DMF gelöst (1mg/ml), mit 5,64 µl Tributylamin-Lösung (TBA, 10 µl TBA verdünnt mit 10 µl DMF) unter Rühren zehn Minuten bei 4°C gekühlt und anschließend 4,14 µl Isobutylformiat-Lösung (IBF, 10 µl IBF verdünnt mit 10 µl DMF) zugetropft. Nach einer Reaktionszeit von weiteren 30 Minuten bei Raumtemperatur am Magnetrührer wird die aktivierte Photosensitizerlösung zu 300 µl WGA-Lösung (1 mg/ml HEPES-9) langsam zugegeben und der pH-Wert zwischen acht und neun konstant gehalten. Das Kopplungsprodukt wird nach 2-stündiger Reaktionszeit mittels Dialyse bei einer Ausschlussgrenze von 12000 Da gereinigt (2 mal 1 Liter HEPES-9).

Trotz der Bildung eines braunen Niederschlages während der Dialyse wird nach deren Beendigung das Kopplungsprodukt mittels Dünnschichtchromatographie charakterisiert. Die Auswertung der mit Kieselgel beschichteten DC-Platten führt auch bei Einsatz unterschiedlich polarer Fließmittel (siehe Tab. 5.2.1.1) zu keinen eindeutigen Unterschieden in der Wanderungstrecke von aktiviertem und WGA-gekoppeltem TPP.

Fließmittel	MeOH (ml)	Aqua dest. (ml)	NH ₃ (ml)	Verhältnis
I	75	25	-	4:1:0
II	75	10	15	15:2:3
III	80	25	-	16:5:0
VI	70	30	20	7:3:2

Tabelle 5.2.1.1: Fließmittelzusammensetzung der DC-Systeme zur Trennung von aktiviertem und WGA-konjugiertem TPP.

Aus diesem Grund und durch die Niederschlagsbildung während der Dialyse wird angenommen, dass die eingesetzte Menge TPP in wässriger Lösung ausfällt. Vorversuche zeigten, dass eine Erhöhung des DMF Anteils über 25% zu einer Koagulation von WGA führt. Deshalb soll ausgehend von einer TPP-Lösung in DMF (1mg/ml) eine Verdünnungsreihe mit DMF/HEPES-9 hergestellt werden, um die Löslichkeit des Photosensitizer in einer wässrigen Pufferlösung mit 25% DMF zu ermitteln. Zur Sicherstellung der Löslichkeit werden alle Probelösungen bei Raumtemperatur bei 8000 Upm sieben Minuten zentrifugiert und optisch auf vorhandenen Niederschlag geprüft. Um die Bildung von Agglomeraten während der Dialyse ausschließen zu können, werden Probelösungen mit und ohne Niederschlag dialysiert und anschließend ihre relative Fluoreszenzintensität (RFI) ermittelt. Weiters soll mittels Zetasizer der Polydispersitätsindex (PDI) bestimmt werden, um das Vorliegen einer homogenen Lösung zu gewährleisten.

TPP (µg/ml) in 25%DMF/75% HEPES-9		Niederschlag nach 8000 Upm / 7min	Dialyse (24 h) gegen 25% DMF/75% HEPES-9	RFI nach Dialyse bei 420/660 nm	PDI
Probelösung A	31,25	NS-Bildung	nein	-	-
Probelösung B	25,00	geringer NS	ja	17134	0,525
Probelösung C	12,50	geringerer NS	nein	-	-
Probelösung D	6,25	kein NS	ja	20940	0,35

Tabelle 5.2.1.2: Verdünnungsreihe von TPP in DMF/HEPES-9 (25+75).

Wie aus Tabelle 5.2.1.2 ersichtlich ist, kann die Bildung eines Niederschlages nur bei Probelösung D ausgeschlossen werden. Nach der Dialyse von Probelösung B und D ist die im Vergleich geringere RFI der konzentrierteren Lösung auffallend. Der höhere PDI der Probelösung B lässt ebenfalls darauf schließen, dass hier keine Lösung, sondern eine Suspension vorliegt und Agglomerate gebildet wurden. Dies erklärt auch die niedrigere RFI der konzentrierteren Lösung, da durch Agglomeratbildung eine Abnahme der Fluoreszenzintensität hervorgerufen werden kann.

5.2.2 Caco-2 Bindungsstudie von TPP-WGA-Konjugaten und TPP

Im folgenden Versuch soll untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die Kopplung von TPP an WGA im Vergleich zu gelöstem TPP die Interaktion mit Caco-2 Zellen beeinflusst.

Herstellung der Probelösungen:

In der folgenden Studie werden zwei Kopplungsprodukte mit einer Reaktionszeit von zwei beziehungsweise 24 Stunden mit TPP-Lösungen verglichen. Um eine Niederschlagsbildung zu vermeiden und damit eine Quantifizierung zu ermöglichen, werden als Vergleichslösungen, ausgehend von einer 1mg/ml Lösung in DMF, mit Konzentrationen von 3,125, 1,563 und 0,781 µg TPP/ml in HEPES-7,4 hergestellt. Die RFI von allen Probelösungen werden bei 420nm/650nm (Exzitation/Emission) bestimmt.

TPP (µg/ml)	RFI-Bestimmung			MW
	1.	2.	3.	
12,5	3314	3310	3343	3322 ± 15
6,25	2026	2071	2056	2051 ± 19
3,125	1196	1190	1186	1191 ± 4
1,5625	704	697	717	706 ± 8
0,78125	444	432	456	444 ± 10

Tabelle 5.2.2: RFI einer TPP-Verdünnungsreihe in HEPES-7,4/DMF (75+25).

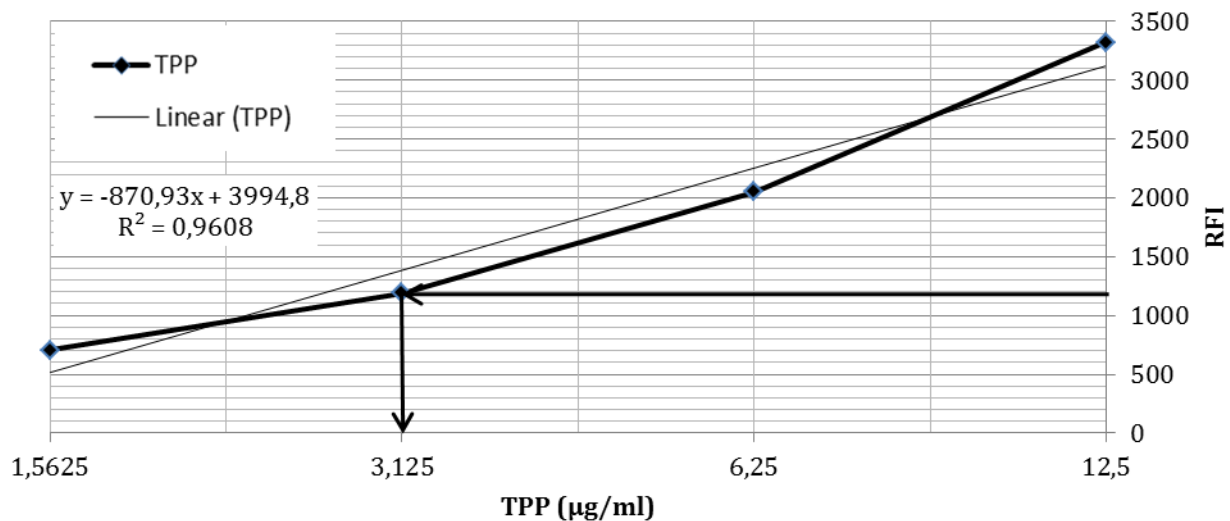


Abbildung 5.2.2: Eichgerade einer TPP-Verdünnungsreihe in HEPES-7,4/DMF (75+25).

Da die TPP-Konzentration der Konjugate durch die Herstellungs- und Reinigungsschritte nicht genau bekannt ist, wird die Fluoreszenzintensität der Probelösungen bestimmt und durch Verdünnen die RFI an jenen Wert angepasst, der einer bekannten Konzentration an TPP in den Vergleichslösungen entspricht. Da WGA in wässriger Lösung keine Fluoreszenz aufweist, kann sichergestellt werden, dass die gemessene RFI bei 420nm/650nm ausschließlich TPP entspricht. Das TPP-WGA-Konjugat mit einer Reaktionszeit von zwei Stunden wird durch eine 1:10 Verdünnung mit iso-HEPES-7,4 auf eine RFI von 1250, entsprechend einer Konzentration von 3,125 µg TPP/ml (RFI = 1200), eingestellt. TPP-WGA mit einer Reaktionszeit von 24h besitzt eine RFI von 765 und entspricht damit etwa einer Konzentration von 1,562 µg TPP/ml (RFI=700). Um weitere Korrelationen zwischen Wirkstoffkonzentration und Zellinteraktion zu untersuchen, werden sowohl von TPP-WGA 2h und TPP-WGA 24h Verdünnungen von 1:20 und 1:40 analysiert.

Praktische Durchführung:

Der konfluente Caco-2-Monolayer im well einer 96-well Mikrotiterplatte wird einmal mit 100 µl iso-HEPES-7,4 gewaschen und anschließend mit 100 µl Probelösung (TPP-WGA 2, TPP-WGA 24, deren Verdünnungen oder Vergleichslösungen von TPP bekannter Konzentration) überschichtet. Daraufhin wird sofort die RFI bei 425nm/650nm bestimmt und der Zelllayer zur Oberflächenbindung bei 4°C eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wird die RFI erneut bestimmt und ungebundener Photosensitizer bzw. ungebundenes Konjugat durch zweimaliges Waschen mit jeweils 100 µl iso-HEPES-7,4

entfernt. Danach wird die RFI der Monolayer in iso-HEPES-7,4 ein weiteres Mal bestimmt.

Tabelle 5.2.3: Caco-2-gebundene RFI von TPP-WGA und TPP.

Probelösung	Vor Inkubation					Nach Inkubation/vor Waschen					Nach Waschen				
Kopplungszeit (Stunden)/ Verdünnungsstufe	RFI- Bestimmung			MW	%	RFI- Bestimmung			MW	%	RFI- Bestimmung			MW	%
	1.	2.	3.			1.	2.	3.			1.	2.	3.		
TPP-WGA 2															
1:10	944	891	904	913 ± 20	100	972	936	946	951 ± 13	104	16	16	15	16 ± 0	1,8
1:20	571	543	222	445 ± 14	49	600	584	240	475 ± 8	52	9	10	8	9 ± 1	1,0
1:40	332	331	333	332 ± 1	36	374	376	381	377 ± 3	41	8	7	6	7 ± 1	0,8
TPP-WGA 24															
1:10	475	487	506	489 ± 11	100	525	558	590	558 ± 23	114	11	16	14	14 ± 2	2,9
1:20	275	278	282	278 ± 2	57	327	329	341	332 ± 5	68	7	9	5	7 ± 1	1,4
1:40	143	144	147	145 ± 1	30	183	178	188	183 ± 4	37	5	5	4	5 ± 0	1,0
TPP-Konzentration (µg/ml)															
3,125	492	501	524	506 ± 12	100	515	533	548	532 ± 12	105	8	7	5	7 ± 1	1,4
1,5625	211	218	220	216 ± 3	100 (43)	221	231	228	227 ± 4	105 (45)	4	5	4	4 ± 0	1,9 (0,8)
0,78125	91	89	87	89 ± 1	18/41	95	91	94	93 ± 1	18/43	3	3	3	3 ± 0	0,6/1,4
Monolayer in RPMI(farblos)	3	3	3	3 ± 0	-	5	3	5	4 ± 1	-	4	3	3	3 ± 0	-

Wie in Tabelle 5.2.3 angeführt, zeigen die Verdünnungen der TPP-WGA Konjugate als auch die der Referenzlösungen eine ihrer niedrigeren Konzentration entsprechende geringere Fluoreszenzintensität. Diese Korrelation ist sowohl vor Inkubation, nach Inkubation als auch nach dem Waschen zu erkennen, woraus eine geringe Zell-assoziierte Bindung abgeleitet werden könnte. Dagegen spricht allerdings, dass die RFI welche nach Inkubation minimal ansteigt, nach Entfernen des ungebundenen Photosensitizers bzw. Konjugates jener der Autofluoreszenz der Monolayer entspricht. Dennoch zeigt WGA modifiziertes TPP eine zwei- beziehungsweise dreifach höhere RFI. Jedoch bezogen auf die RFI vor der Inkubation kann durch die starke Abnahme nach dem Waschen auf 2,9% (TPP-WGA 24h) bzw. 1,8% (TPP-WGA 2h) eine verbesserte Zell-Interaktion mit Caco-2-Monolayern durch Konjugatbildung mit WGA ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund werden keine weiteren Versuche mit TPP-WGA-Konjugaten durchgeführt.

5.3 5,10,15,20-Tetrakis(4-Carboxyphenyl)-21,23H-porphyrin (TCPP)

In der folgenden Studie soll untersucht werden, ob eine Modifikation von TCPP mit WGA Vorteile bezüglich Hydrophilie und Zell-Interaktion gegenüber der Reinsubstanz bietet. Mittels Carbodiimid soll TCPP kovalent an die Aminogruppen des Lektins WGA gebunden werden und im Anschluss die Zell-Interaktion an Caco-2-Monolayern untersucht werden.

5.3.1 Herstellung von TCPP-WGA-Konjugaten

Um durch ein optimales molares Verhältnis eine ideale Belegungsrate von WGA mit TPP zu erzielen, werden unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Reaktanden eingesetzt (Tab. 5.3.1). Die Menge an EDAC, NHS und WGA wird auf die Menge an TCPP und die angegebene Menge in μmol auf eine 1mg/ml WGA-Lösung bezogen. Durch den Einsatz unterschiedlicher Mengen WGA soll ermittelt werden, ob ein geringerer Substitutionsgrad von WGA mit TCPP die Zell-Interaktion beeinflusst. Für die Herstellung wird TCPP in HEPES-9 gelöst und zur Aktivierung mit der entsprechenden Menge EDAC/NHS eine Stunde am Magnetrührer bei Raumtemperatur bei konstant gehaltenem pH-Wert von 7 - 8 gerührt. Anschließend wird das Produkt tropfenweise einer Lösung von WGA in HEPES-9 zugesetzt und eine Stunde später bei

Raumtemperatur durch Dialyse (Ausschlussgrenze 12000 Da) gereinigt. Die Dialyse erfolgt durch zweimaligen Mediumwechsel nach jeweils 24 Stunden in einem Becherglas mit iso-HEPES-7,4 als Dialysemedium und unter Lichtausschluss.

TCPP-WGA-Konjugate		TCPP (1mg/ml)		EDAC		NHS		WGA (1mg/ml)	
Molares Verhältnis TCPP:EDAC:NHS:WGA		mg	μmol	mg/ml	μmol	mg/ml	μmol	μl	μmol
TCPP-WGA-1	50:2000:2000:1	1,00	1,3	5,8	50,6	7,9	50,6	911	27,8
TCPP-WGA-2	50:2000:48000:1	0,25	1,3	1,5	50,6	34,9	1213	228	27,8
TCPP-WGA-3	10:400:400:1	0,20	1,3	5,8	50,6	7,9	50,6	911	27,8

Tabelle 5.3.1: Eingesetzte Mengen und molare Verhältnisse der TCPP-WGA-Konjugate.

Da angenommen wird, dass zumindest ein geringer Teil des eingesetzten Photosensitizers an WGA gebunden wird, werden die gefärbten Probelösungen trotz Bildung eines Niederschlags bei TCPP-WGA-1 und TCPP-WGA-2 in den folgenden Zellbindungsstudien eingesetzt. Als Vergleich dienen Verdünnungen (Tab. 5.3.2.2) einer Lösung von 1 mg TCPP /ml HEPES-9.

5.3.2 Caco-2-Bindungsstudien von TCPP-WGA-Konjugaten mit fluorimetrischer Auswertung

In der folgenden Studie soll die Auswirkung der WGA-Modifikation des Photosensitizers TCPP auf die Zell-Interaktion anhand von Caco-2-Monolayern untersucht werden. Da durch Verlust des nicht gebundenen TCPP während der Dialyse die genaue TCPP-Konzentration in den Konjugaten nicht bekannt ist, wird die RFI bestimmt und mittels Eichgerade (Abb. 5.3.2) auf eine definierte, vergleichbare Konzentration eingestellt.

Um die Bindung an die Zell-Oberfläche zu erfassen, wird eine Inkubationstemperatur von 4°C gewählt, da so aktive Transportprozesse durch fehlende Energie weitgehend unterdrückt werden. Die Zell-Interaktion wird über die RFI fluorimetrisch bei einer Wellenlänge von 650 nm nach Anregung bei 415 nm bestimmt (Verstärkungsfaktor - manual Gain 60). Für die Bindungsstudie werden zusätzlich Verdünnungen der Konjugate und als Kontrollen TCPP-Lösungen in definierter Konzentration eingesetzt. Des Weiteren werden Lösungen von TCPP-WGA (Kontrollen) verwendet, die auf gleiche

Weise wie die Konjugate hergestellt wurden, jedoch ohne Aktivierung von TCPP. Anhand dieser Kontrollen sollen Unterschiede zwischen möglichen Polyelektrolytkomplexen aus TCPP und WGA, die durch ionische Wechselwirkungen zwischen kationischem WGA und anionischem TCPP zustande kommen könnten und kovalenten TCPP/WGA-Konjugaten, die mittels Carbodiimid hergestellt werden, - auf die Zell-Interaktion erkennbar werden. (Tab. 5.3.2.1)

Praktische Durchführung:

Der konfluente Caco-2 Monolayer wird mit 100 µl/well iso-HEPES-7,4 gewaschen und nach Zugabe von 100 µl Probelösung/well die RFI bestimmt. Nach einer Stunde Inkubation bei 4°C wird die RFI ein weiteres Mal bestimmt und danach durch zweimaliges Waschen mit jeweils 100 µl iso-HEPES-7,4 ungebundener Photosensitizer bzw. ungebundene TCPP-WGA-Konjugate entfernt. Die Bestimmung der RFI von Zellmembran-gebundenen TCPP- bzw. TCPP-Konjugaten erfolgt nach Zugabe von jeweils 100 µl iso-HEPES-7,4.

Tabelle 5.3.2.1: Zellmembran-gebundene RFI von TCPP-WGA-Konjugaten, TCPP-WGA ohne Aktivierung (Kontrolle) und TCPP- vor und nach einstündiger Inkubation mit Caco-2 Monolayern, sowie nach anschließendem Waschen mit HEPES-7,4.

Probelösungen	Vor Inkubation					Nach Inkubation/vor Waschen					Nach Waschen				
	RFI-Bestimmungen			MW	%	RFI-Bestimmungen			MW	%	RFI-Bestimmungen			MW	%
TCPP-WGA-1	1.	2.	3.			1.	2.	3.			1.	2.	3.		
1.Charge	759	807	792	786 ± 20	100	596	628	638	621 ± 18	79	75	74	70	73 ± 2	9
Verdünnung 1:2	475	507	480	487 ± 14	62	364	396	408	389 ± 19	49	47	46	28	40 ± 9	5
Verdünnung 1:4	252	264	257	258 ± 5	33	205	211	224	213 ± 8	27	24	23	25	24 ± 1	3
2. Charge	903	857	875	878 ± 19	100	728	710	706	715 ± 10	81	95	94	98	96 ± 2	11
Verdünnung 1:2	627	608	614	616 ± 8	70	498	478	511	496 ± 14	56	66	58	59	61 ± 4	7
Verdünnung 1:4	361	342	341	348 ± 9	40	288	287	276	284 ± 5	32	34	34	33	34 ± 0	4
3. Charge	798	842	820	820 ± 18	100	652	692	687	677 ± 18	83	94	82	85	87 ± 5	11
Verdünnung 1:2	530	554	559	548 ± 13	67	434	458	474	455 ± 16	55	63	52	56	57 ± 5	7
Verdünnung 1:4	314	337	320	324 ± 10	40	258	282	272	271 ± 10	33	34	30	35	33 ± 2	4
Kontrolle	505	520	-	513 ± 8	100	438	399	-	419 ± 20	82	47	54	-	51 ± 4	10
Kontrolle 1:2	266	280	281	276 ± 7	54	207	217	215	213 ± 4	42	25	27	35	29 ± 4	6
Kontrolle 1:4	127	120	120	122 ± 3	24	105	97	89	97 ± 7	19	18	9	15	14 ± 4	3
TCPP µg/ml															
3,125	1208	1217	-	1213 ± 5	158	988	965	-	977 ± 12	127	184	171	-	178 ± 7	23
1,563	1022	1045	-	1034 ± 12	134	830	810	-	820 ± 10	106	111	116	-	114 ± 3	15
0,781	764	776	-	770 ± 6	100	553	579	-	566 ± 13	74	107	86	-	97 ± 11	13
0,391	498	498	-	498 ± 0	65	370	378	-	374 ± 4	49	61	55	-	58 ± 3	8
0,195	258	269	-	264 ± 0	34	199	204	-	202 ± 3	26	33	28	-	31 ± 3	4
Monolayer in iso-HEPES-7,4	3	3	-	3 ± 0		1	2	-	2 ± 1		1	1	-	1 ± 0	

Wie in Tabelle 5.3.2.1 ersichtlich, nimmt die zell-gebundene RFI von TCPP-Konjugaten als auch von TCPP- Verdünnungen nach einer Stunde Inkubation ab. Bei den TCPP-WGA-Konjugaten und bei der Kontrolle (TCPP-WGA ohne Aktivierung) beträgt die Abnahme rund 18%, wobei die RFI einer TCPP-Lösung von 0,781 µg/ml durch den Zellkontakt um 26% sinkt. Ein Vergleich der RFI Werte der Konjugate mit jenen der TCPP-WGA Lösung zeigt eine um 40% höhere Zellinteraktion, die geringen Bindungswert resultieren jedoch aus der niedrigen RFI der TCPP-WGA Lösung. Daraus könnte auf eine verbesserte Zellinteraktion von TCPP durch kovalente Bindung an WGA geschlossen werden. Jedoch ergibt der direkte Vergleich der Konjugate mit den entsprechend konzentrierten TCPP-Lösungen dennoch keine Verbesserung. Die Chargen 1-3 binden mit 9-11% der zugesetzten RFI etwa gleich gut wie die TCPP in einer Konzentration von 0,781µg/ml mit 13% seiner eingesetzten RFI. Eine Abhängigkeit der Zellassoziation von der eingesetzten TCPP Konzentration scheint trotz der niedrigen RFI gegeben zu sein, da mit zunehmender Verdünnung auch die RFI-Werte sinken. Um diese mögliche Wechselwirkung weiter zu beleuchten, werden in den folgenden Untersuchungen unterschiedliche molare Verhältnisse von TCPP zu WGA eingesetzt, um eine Auswirkung der WGA-Konzentration auf die Zellinteraktion zu erkennen.

5.3.2.2 Caco-2-Bindungsstudien mit TCPP-WGA-Konjugaten unterschiedlicher molarer Verhältnisse von TCPP zu WGA

Um den Einfluss der WGA Konzentration auf die Zellinteraktion bewerten zu können, werden Konjugate mit unterschiedlichen WGA-TCPP Verhältnissen (TCPP-WGA-1 und TCPP-WGA-3; Tab. 5.3.1.) in den Zell-Bindungsstudien eingesetzt. Als Kontrolle werden TCPP-WGA Lösungen verwendet, die dasselbe molare Verhältnis besitzen, jedoch TCPP vor der Kopplung nicht durch EDAC/NHS aktiviert wurde. Ein weiterer Vergleich berücksichtigt eine Variation des Syntheseprotokolls, wobei einerseits das aktivierte TCPP dem Lektin (Charge 1) oder andererseits WGA der aktivierten Photosensitizerlösung (Charge 2) zugesetzt wurde. Die TCPP Konzentration der Konjugate wird nach Herstellung anhand einer Eichgerade (Abb. 5.3.2) bestimmt, deren linearer Bereich zwischen 0,39 und 6,25µg/ml liegt. Anschließend werden die Konjugate auf eine TCPP Konzentration von 1µg/ml (RFI 3300) eingestellt, um gleiche Ausgangsbedingungen in der Zell-Interaktionsstudie zu gewährleisten. Zusätzlich werden Verdünnungen (1:2 und 1:4) der eingesetzten Probelösungen untersucht, um

eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten zu berücksichtigen. Zum direkten Vergleich mit dem Verhalten des Photosensitizers allein wird TCPP in einer Konzentration von 1,0 µg/ml und 0,5 µg/ml iso-HEPES-7,4 ebenfalls miteinbezogen. Die RFI wird bei 650 nm nach Exzitation bei 415 nm detektiert.

Praktische Durchführung:

Der konfluente Caco-2-Monolayer wird einmal mit 100 µl iso-HEPES-7,4 gewaschen und anschließend mit 100 µl Probelösung pro Well überschichtet. Nach Bestimmung der RFI wird für die Oberflächenbindung bei eingeschränkter Zellaktivität eine Stunde bei 4°C inkubiert und danach die RFI detektiert. Nach Entfernen des ungebundenen Photosensitizers bzw. Photosensitizer-WGA Konjugates durch zweimaliges Waschen mit je 100 µl iso-HEPES-7,4 wird die RFI des zellgebundenen Anteiles bestimmt. Die Ergebnisse der fluorimetrischen Bestimmungen sind in Tabelle 5.3.2.2 angeführt.

Tabelle 5.3.2: Eichgerade von TCPP.

TCPP (µg/ml)	RFI-Bestimmungen			MW
	1.	2.	3.	
25,00	7751	7840	7609	7733 ± 95
12,50	8325	8461	8264	8350 ± 82
6,25	8021	8119	8238	8179 ± 60
3,13	6028	6356	6348	6352 ± 4
1,56	4283	4450	4573	4512 ± 62
0,78	2873	2912	2944	2910 ± 29
0,39	1255	1318	1292	1288 ± 26
0,20	644	637	716	666 ± 36
0,10	376	382	367	375 ± 6

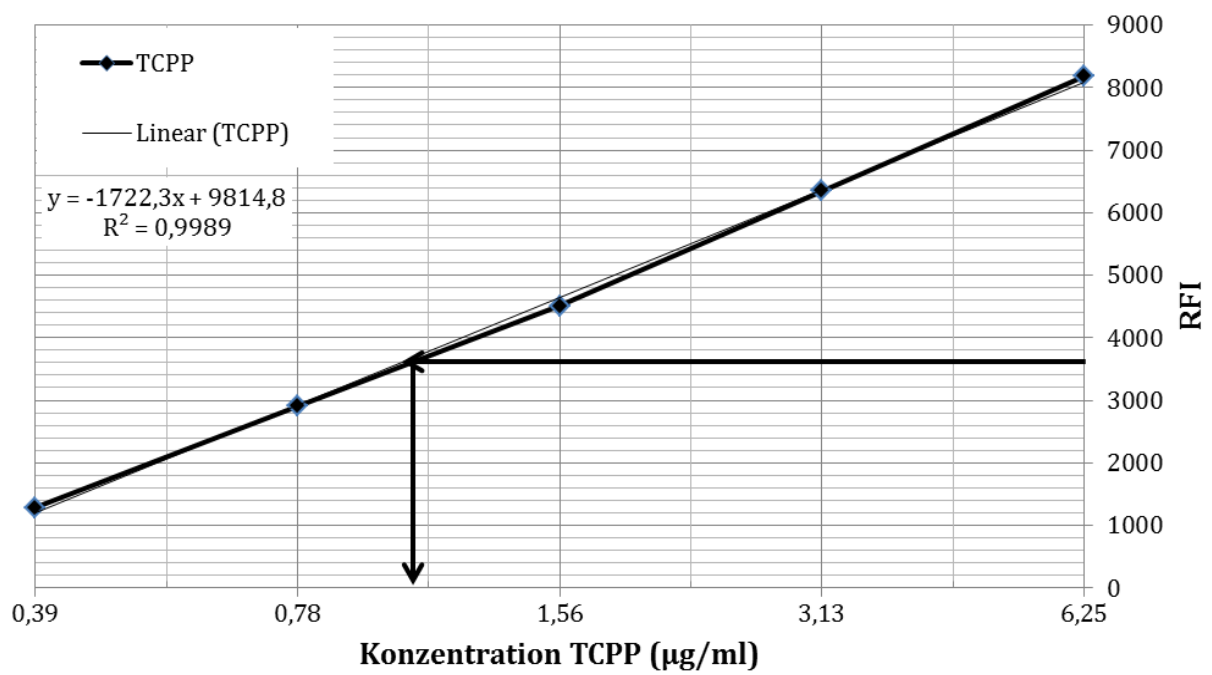


Abbildung 5.3.2: Eichgerade einer TCPP-Verdünnungsreihe in iso-HEPES-7,4.

Tabelle 5.3.2.2: Zellgebundene Fluoreszenzintensität von TCPP-WGA-Konjugaten, TCPP-WGA ohne Aktivierung (Kontrolle) und TCPP- vor und nach einstündiger Inkubation mit Caco-2 Monolayern und nach zweimaligem Waschen.

Probelösung	Vor Inkubation					Nach Inkubation/vor Waschen					nach Waschen				
	RFI-Bestimmungen			MW	%	RFI-Bestimmungen			MW	%	RFI-Bestimmungen			MW	%
	1.	2.	3.			1.	2.	3.			1.	2.	3.		
TCPP-WGA-3															
1.Charge	2008	2198	2146	2117 ± 80	100	1766	1917	1871	1851 ± 63	87	188	189	185	187 ± 2	9
Verdünnung 1:2	2104	2095	-	2100 ± 5	99	1819	1829	-	1824 ± 5	86	131	119	-	125 ± 6	6
Verdünnung 1:4	1090	1102	1134	1109 ± 19	52	952	964	992	969 ± 17	46	70	67	74	70 ± 3	3
2.Charge	3525	3648	3739	3637 ± 88	100	2789	2890	2927	2869 ± 58	79	130	130	136	132 ± 3	4
Verdünnung 1:2	1887	1937	-	1912 ± 25	53	1517	1561	-	1539 ± 22	42	76	75	-	76 ± 1	2
Verdünnung 1:4	873	870	893	879 ± 10	24	719	702	722	714 ± 9	20	33	37	36	35 ± 2	1
TCPP-WGA-1															
1.Charge	4750	5168	-	4959 ± 209	100	3801	4119	-	3960 ± 159	80	323	247	-	285 ± 38	6
Verdünnung 1:2	3277	2502	-	2890 ± 388	58	2614	2054	-	2334 ± 280	47	188	169	-	179 ± 10	4
2.Charge	3340	3152	3371	3288 ± 97	100	2437	2316	2457	2403 ± 62	73	120	117	146	128 ± 13	4
Verdünnung 1:2	1815	1750	-	1783 ± 33	54	1394	1351	-	1373 ± 22	42	51	66	-	59 ± 8	2
Verdünnung 1:4	742	724	745	737 ± 9	22	561	558	590	570 ± 14	17	23	23	23	23 ± 0	1
Kontrolle															
1.Charge (TCPP-WGA-3)	3542	3700	1507	3621 ± 79	100	2679	2845	1149	2762 ± 83	76	178	132	173	155 ± 23	4
Verdünnung 1:2	2032	1861	-	1947 ± 86	54	1589	1524	-	1557 ± 33	43	98	104	-	101 ± 3	3
2.Charge (TCPP-WGA-3)	3489	3587	1446	3538 ± 49	100	2569	2740	1081	2655 ± 86	75	145	101	125	123 ± 22	3
Verdünnung 1:2	1995	2010	-	2003 ± 8	57	1468	1453	-	1461 ± 8	41	81	81	-	81 ± 0	2
Verdünnung 1:4	955	913	976	948 ± 26	948	701	680	728	703 ± 20	20	30	37	38	35 ± 4	1
1.Charge (TCPP-WGA-1)	3063	3374	3381	3378 ± 148	100	2211	2552	2671	2478 ± 195	73	122	91	119	111 ± 14	3
Verdünnung 1:2	1562	1590	-	1576 ± 14	47	1222	1281	-	1252 ± 30	37	48	60	-	54 ± 6	2
Verdünnung 1:4	726	645	645	672 ± 38	20	592	512	539	548 ± 33	16	20	20	22	21 ± 1	1
2.Charge (TCPP-WGA-1)	3317	3133	3572	3341 ± 180	100	2531	2442	2790	2588 ± 148	77	127	122	122	124 ± 2	4
Verdünnung 1:2	1642	1619	-	1631 ± 12	49	1273	1259	-	1266 ± 7	38	65	60	-	63 ± 3	2
Verdünnung 1:4	719	701	669	696 ± 21	21	568	562	527	552 ± 18	17	28	31	29	29 ± 1	1

TCPP															
1,0 µg/ml	2894	2832	2614	2780 ± 120	100	2060	2125	1964	2050 ± 66	74	91	97	94	94 ± 2	3
0,5 µg/ml	1691	1651	1551	1631 ± 59	59	1227	1223	1104	1185 ± 57	43	63	56	42	54 ± 9	2
Monolayer in iso-HEPES-7,4	2	2	1	2	-	2	2	2	2 ± 0	-	2	3	2	2	-

Wie aus den Werten in Tabelle 5.3.2.2 ersichtlich ist, unterscheiden sich die RFI der Probelösungen trotz Einstellung auf RFI 3300 nach dem Auftragen auf den Zelllayer deutlich, obwohl der Monolayer keinen Fluoreszenzbeitrag liefert. Die Ausgangswerte von TCPP-WGA-1 sind vor Inkubation mehr als doppelt so hoch wie jene von TCPP-WGA-3 und alle RFI-Werte sinken nach einer Stunde Inkubation um 15-20%, wie bereits in vorangegangenen Versuchen beobachtet. Da die RFI-Werte aller kovalenten Konjugate nach Inkubation und Waschen um etwa 90% abnehmen, können kaum Unterschiede in der Zell-assoziierten Bindung aufgezeigt werden. Dass durch kovalente Bindung von TCPP an WGA verglichen mit einer TCPP-WGA Lösung ohne Aktivierungsschritt eine bessere Interaktion mit der Glykokalyx erzielt werden kann, zeigt die 1,5 bis 2,3fach höhere Oberflächenbindung des kovalenten Konjugates. Im Unterschied zur ersten Studie (Tab. 5.3.2.1.), bewirkt eine WGA Modifikation von TCPP eine bis zu 50% verbesserte Zell-Interaktion gegenüber dem lipophilen TCPP. Sowohl kovalente als auch durch ionische Wechselwirkungen vermittelte Konjugate besitzen eine höhere Bindungskapazität als TCPP in einer vergleichbaren Konzentration von 1µg/ml. Signifikante Unterschiede können diesbezüglich nur bei den kovalenten Konjugaten TCPP-WGA-1 und TCPP-WGA-3 mit einer 50-65% höheren Zell-Oberflächeninteraktion erzielt werden. Ebenso ist ein Einfluss der Herstellungstechnik erkennbar, da die Konjugate (1.Charge), bei denen die Lektinlösung in jene von aktiviertem TCPP getropft wurde, eine geringfügig höhere Bindungsrate zeigten als die 2.Charge, bei der WGA zur TCPP-Lösung gegeben wurde. Die kovalenten Konjugate TCPP-WGA-1 und TCPP-WGA-3, bei denen in der Synthese ein 50- bzw. 10-facher molarer TCPP-Überschuss gegenüber WGA eingesetzt wurde, zeigen keinen signifikanten Unterschied in ihrer Zellassoziation. Dies könnte einerseits auf einem zu geringen Unterschied im TCPP-Substitutionsgrad von WGA oder andererseits auf eine geringe Zellbindungsrate der Konjugate, die eine diesbezügliche Detektion erschwert, beruhen.

Im folgenden Versuch sollten die Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen bestätigt werden. Dafür werden je zwei Probelösungen gleicher Konzentration mit unterschiedlichem Herstellungsdatum verglichen und als Charge 1 und 2 bezeichnet. Da Bovines Serum Albumin (BSA) mit der Glykokalyx von Caco-2 Zellen nicht interagiert, wird ein möglicherweise auf ionischen Wechselwirkungen beruhendes Konjugat in einem molaren Verhältnis von 50:1 aus TCPP (1mg/7ml in HEPES-7,4) und BSA (1mg/ml HEPES-9) hergestellt. Dadurch sollte untersucht werden, ob es durch Bindung von TCPP an WGA, das Lektin eine Bindung an die Zelloberfläche vermittelt. Sollte eine Zell-Interaktion über TCPP allein zustande kommen, sollte auch das BSA Konjugat an die Caco-2 Monolayer binden. Zusätzlich soll beurteilt werden, ob durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer bei 4°C eine höhere Bindungsrate erzielt werden kann.

Praktische Durchführung:

Der konfluente Monolayer wird mit je 100 µl iso-HEPES-7,4 gewaschen und nach Zugabe von 100 µl Probelösung pro Well die zellassozierte RFI bestimmt. Anschließend wird je eine 96-Well-Platte 30 Minuten bzw. eine Stunde bei 4°C inkubiert und danach die RFI erneut ermittelt. Durch zweimaliges Waschen mit jeweils 100 µl iso-HEPES-7,4 werden ungebundene Photosensitizermoleküle und Konjugate entfernt. Nach Zugabe von 100 µl iso-HEPES-7,4 pro Well wird die RFI von zellgebundenen Liganden bestimmt.

Tabelle 5.3.2.3: Zellassoziierte Fluoreszenzintensitäten von TCPP-WGA-Konjugaten, Kontrollen ohne Aktivierung und TCPP vor bzw. nach 30 minütiger Inkubation mit Caco-2 Monolayern sowie nach zweimaligem Waschen.

	Vor Inkubation					nach Inkubation/vor Waschen					nach Waschen				
Probelösung	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%
	1.	2.	3.			1.	2.	3.			1.	2.	3.		
TCPP-WGA-3															
1. Charge	2195	2100	2281	2192 ± 74	100	1918	1823	1976	1906 ± 63	87	65	95	78	87 ± 9	4
2. Charge	2022	2139	2157	2106 ± 60	100	1618	1749	1804	1724 ± 78	82	101	148	143	131 ± 21	6
Verdünnung 1:2	1137	1183	526	1160 ± 23	55	899	937	430	918 ± 19	44	36	75	42	56 ± 20	3
Verdünnung 1:4	490	487	1155	489 ± 2	23	396	392	913	394 ± 2	19	26	28	58	27 ± 1	1
TCPP-WGA-1															
1. Charge	1882	1912	1925	1906 ± 18	100	1453	1490	1497	1480 ± 19	78	95	129	126	117 ± 15	6
2. Charge	1690	1697	1677	1688 ± 8	100	1236	1299	1231	1255 ± 31	74	61	62	85	69 ± 11	4
Verdünnung 1:2	897	939	949	928 ± 23	55	659	701	729	696 ± 29	41	42	42	34	39 ± 4	2
Verdünnung 1:4	405	398	410	404 ± 5	24	301	305	307	304 ± 2	18	23	19	13	18 ± 4	1
Kontrolle															
TCPP-WGA-3															
1. Charge	1919	2093	2142	2051 ± 96	100	1445	1617	1698	1658 ± 41	77	61	116	115	97 ± 26	5
2. Charge	1883	1961	2023	1956 ± 57	100	1381	1500	1550	1477 ± 71	76	116	110	101	109 ± 6	6
Verdünnung 1:2	994	1065	1074	1044 ± 36	53	721	803	838	787 ± 49	40	56	60	47	54 ± 5	3
Verdünnung 1:4	464	483	482	476 ± 9	24	359	384	388	377 ± 13	19	23	20	20	21 ± 1	1
TCPP-WGA-1															
1. Charge	2045	2195	2187	2142 ± 69	100	1449	1642	1692	1667 ± 25	74	101	143	144	129 ± 20	6
2. Charge	1623	1717	1807	1716 ± 75	100	1146	1255	1321	1241 ± 72	72	52	38	58	55 ± 3	3
Verdünnung 1:2	930	932	924	929 ± 3	54	650	674	690	671 ± 16	39	55	22	25	34 ± 15	2

Verdünnung 1:4	401	397	397	398 ± 2	23	293	295	307	298 ± 6	17	23	15	12	17 ± 5	1
TCPP-BSA															
1. Charge	2025	2141	2173	2113 ± 64	100	1580	1753	1785	1706 ± 90	81	70	107	96	91 ± 16	4
2. Charge	1861	1929	1912	1901 ± 29	100	1517	1611	1590	1573 ± 40	83	100	43	55	66 ± 25	3
Verdünnung 1:2	1061	1041	1078	1060 ± 15	56	854	839	898	864 ± 25	45	35	26	30	30 ± 4	2
Verdünnung 1:4	474	458	367	433 ± 47	23	386	380	299	355 ± 40	19	21	14	18	18 ± 3	1
TCPP (µg/ml)															
1,00	1490	1525	1544	1520 ± 22	100	1077	1164	1169	1137 ± 42	75	73	54	53	60 ± 9	4
0,50	855	858	883	865 ± 13	57	618	642	651	637 ± 14	42	23	37	30	30 ± 6	2
0,25	267	283	307	286 ± 16	19	215	220	247	227 ± 14	15	15	13	11	13 ± 2	1
Monolayer/iso-HEPES-7,4	5	4	3	4 ± 1		2	2	2	2 ± 0	-	1	0	1	1 ± 0	-

Tabelle 5.3.2.4: Zellassoziierte Fluoreszenzintensitäten von TCPP-WGA-Konjugaten, Kontrollen ohne Aktivierung und TCPP vor bzw. nach einstündiger Inkubation mit Caco-2 Monolayern und nach zweimaligem Waschen.

	Vor Inkubation					nach Inkubation/vor Waschen					nach Waschen				
Probelösungen	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%
	1.	2.	3.			1.	2.	3.			1.	2.	3.		
TCPP-WGA-3															
1. Charge	2212	2250	2359	2274 ± 62	100	1814	1859	1983	1885 ± 71	83	48	80	114	97 ± 17	4
2. Charge	2011	2204	2182	2132 ± 86	100	1492	1665	1653	1603 ± 79	75	138	194	156	163 ± 23	8
Verdünnung 1:2	1123	1183	1217	1174 ± 39	55	836	869	901	869 ± 27	41	57	85	87	76 ± 14	4
Verdünnung 1:4	522	529	536	529 ± 6	25	404	404	410	406 ± 3	19	36	27	32	32 ± 4	2
TCPP-WGA-1															
1. Charge	1935	1932	2015	1961 ± 38	100	1352	1379	1498	1410 ± 63	72	88	184	140	162 ± 22	8
2. Charge	1734	1765	1801	1767 ± 27	100	1234	1285	1383	1301 ± 62	74	107	81	91	93 ± 11	5
Verdünnung 1:2	926	991	998	972 ± 32	55	668	681	738	696 ± 30	39	50	65	36	50 ± 12	3
Verdünnung 1:4	453	412	413	426 ± 19	24	313	303	330	315 ± 11	18	19	24	12	18 ± 5	1
Kontrollen															
TCPP-WGA-3															
1. Charge	1992	2226	2217	2222 ± 5	100	1349	1568	1634	1601 ± 33	72	136	174	127	146 ± 20	7
2. Charge	1900	1904	1933	1912 ± 15	100	1232	1278	1314	1275 ± 34	67	151	138	149	146 ± 6	8
Verdünnung 1:2	993	995	1052	1013 ± 27	53	645	661	692	666 ± 20	35	70	65	65	67 ± 2	4
Verdünnung 1:4	491	488	502	494 ± 6	26	354	345	363	354 ± 7	19	28	32	23	28 ± 4	1
TCPP-WGA-1															
1. Charge	1978	2146	2184	2165 ± 19	100	1253	1455	1469	1462 ± 7	68	148	189	157	165 ± 18	8
2. Charge	1661	1638	1717	1672 ± 33	100	1083	1137	1264	1161 ± 76	69	87	53	35	70 ± 17	4
Verdünnung 1:2	898	959	940	932 ± 25	56	597	601	629	609 ± 14	36	57	58	39	51 ± 9	3
Verdünnung 1:4	401	414	407	407 ± 5	24	275	279	294	283 ± 8	17	33	25	24	27 ± 4	2

TCPP-BSA															
1. Charge	2057	2188	2275	2173 ± 90	100	1485	1593	1640	1573 ± 65	72	100	112	102	105 ± 5	5
2. Charge	1856	1965	2005	1942 ± 63	100	1376	1483	1604	1488 ± 93	77	107	74	57	79 ± 21	4
Verdünnung 1:2	1095	1110	1182	1129 ± 38	58	804	845	855	835 ± 22	43	46	48	34	43 ± 6	2
Verdünnung 1:4	470	478	485	478 ± 6	25	353	358	355	355 ± 2	18	26	23	21	23 ± 2	1
TCPP (µg/ml)															
1,00	1450	1413	1438	1434 ± 15	100	956	947	908	937 ± 21	65	89	81	101	90 ± 8	6
0,50	795	758	773	775 ± 15	54	518	475	480	491 ± 19	34	26	19	62	36	3
0,25	309	276	272	286 ± 17	20	210	210	202	207 ± 4	14	17	12	15	15 ± 2	1
Monolayer/iso-HEPES-7,4	1	1	1	1 ± 0	-	2	3	2	2 ± 0	-	3	3	2	3 ± 0	-

Wie bereits in der ersten Studie beobachtet verändert sich die RFI der Probelösungen, die zuvor auf eine Fluoreszenzintensität von 3300 eingestellt wurden, nach Auftragen auf den Zelllayer deutlich, wobei schon eine Lösung von 1 µg TCPP/ml eine Abnahme der RFI von 50% zeigt. Aus Tabelle 5.3.2.3. und 5.3.2.4. ist ersichtlich, dass eine Verlängerung der Inkubationsdauer von 30 auf 60 Minuten zu keiner signifikanten Verbesserung der Bindungsrate führt. Des Weiteren erlaubt die enorme Abnahme der zellassozierten RFI von 90-95% nach der Inkubation mit den Caco-2 Monolayern und Waschen, die in beiden Studien beobachtet wird, keinen profunden Schluss, dass die Konjugate selektiv mit den artifiziellen Dünndarmgeweben interagieren. Eine verbesserte Zell-Bindungsrate der kovalenten Konjugate gegenüber den ionischen Konjugaten, der in der vorangegangenen Studie (Tab. 5.3.2.1.) beobachtet wurde, konnte nicht bestätigt werden. Ebenso bewirkt eine Erhöhung des molaren Verhältnisses von TCPP zu WGA keine signifikante Veränderung der Zellaffinität. Die geringfügig höhere zellassozierte RFI der kovalenten TCPP-WGA Konjugate und Kontrollen gegenüber TCPP-BSA Konjugaten weisen jedoch auf eine durch WGA vermittelte verbesserte Zellinteraktion hin. Dies wird auch durch den Vergleich der kovalenten TCPP-WGA Konjugate mit TCPP ersichtlich, wo die Konjugate eine um bis zu 50% höhere Interaktion mit der Glykokalyx von Caco-2 Monolayern zeigten.

Eine Wiederholung der oben angeführten Bindungsstudie, deren Ergebnisse in Tab. 5.3.2.5. und 5.3.2.6 angeführt sind, zeigte ein konvergentes Ergebnis.

5.3.3 Belegungsrate von WGA mit TCPP

WGA ist ein dimeres Lektin und besitzt acht mögliche Bindungsstellen für Sialinsäure bzw. N-Acetyl-D-glucosamin. Im Folgenden wird die Anzahl an TCPP Molekülen berechnet, die pro WGA-Molekül gebunden sind. Die zur Herstellung des Konjugates TCPP-WGA-3 eingesetzte Menge an WGA beträgt 1300 µg, das Volumen der Konjugatlösung nach der Dialyse 3880 µl. Unter der Annahme, dass bei der Herstellung und Reinigung kein WGA verloren ging, ergibt sich daraus eine theoretische WGA-Konzentration von 0,33505 mg/ml. Für die TCPP-Gehaltsbestimmung wird das Konjugat 1:3 mit iso-HEPES-7,4 verdünnt und die RFI bestimmt, welche mit 3300 einer Konzentration von 1 µg/ml (1,2646 µmol/l) entspricht. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsschrittes ergibt der Quotient aus Molarität von TCPP (1,2646 µmol/l) und WGA (0,111684 mg/ml; 3,1023 µmol/l) eine Belegungsrate von 0,407 Molekülen

Photosensitizer pro WGA-Molekül, was bedeutet, dass etwa zehn WGA-Moleküle zwei TCPP- Moleküle tragen.

5.3.2.5: Zellassozierte Fluoreszenzintensitäten von TCPP-WGA-Konjugaten, Konjugaten ohne Aktivierung und TCPP vor bzw. nach 30-minütiger Inkubation mit Caco-2 Monolayern sowie nach zweimaligem Waschen.

	Vor Inkubation					nach Inkubation/vor Waschen					nach Waschen				
Probelösungen	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%
	1.	2.	3.			1.	2.	3.			1.	2.	3.		
TCPP-WGA-3															
1. Charge	1952	2016	2038	2002 ± 36	100	1553	1656	1688	1632 ± 58	82	98	117	116	110 ± 9	5
2. Charge	2002	2012	2122	2045 ± 54	100	1690	1713	1833	1745 ± 63	85	156	178	161	165 ± 9	8
Verdünnung 1:2	1117	1187	1190	1165 ± 34	57	945	983	960	963 ± 16	47	106	85	93	95 ± 9	5
Verdünnung 1:4	528	534	590	551 ± 28	27	442	445	468	452 ± 12	22	50	52	65	56 ± 7	3
TCPP-WGA-1															
1. Charge	1703	1707	1654	1688 ± 24	100	1205	1266	1260	1244 ± 27	74	123	92	90	102 ± 15	6
2. Charge	1755	1757	1757	1756 ± 1	100	1380	1380	1373	1378 ± 3	78	105	107	104	105 ± 1	6
Verdünnung 1:2	1015	1074	1062	1050 ± 25	60	793	803	786	794 ± 7	45	53	51	43	49 ± 4	3
Verdünnung 1:4	536	547	524	536 ± 9	31	408	411	417	412 ± 4	23	28	21	23	24 ± 3	1
Kontrollen o.A.															
TCPP-WGA-3															
1. Charge	1993	2017	2198	2069 ± 92	100	1389	1449	1692	1419 ± 30	73	138	123	102	121 ± 15	6
2. Charge	1691	1812	1888	1797 ± 81	100	1239	1295	1421	1318 ± 76	73	119	109	85	104 ± 14	6
Verdünnung 1:2	956	1017	1005	993 ± 26	55	664	721	727	704 ± 28	39	61	60	64	62 ± 2	3
Verdünnung 1:4	495	543	544	527 ± 23	29	362	376	406	381 ± 18	21	35	39	23	32 ± 7	2
TCPP-WGA-1															
1.Charge	1145	1280	1374	1266 ± 94	100	820	972	1024	939 ± 87	74	72	59	69	67 ± 6	5
2. Charge	1560	1578	1550	1563 ± 12	100	1166	1127	1149	1147 ± 16	73	61	69	54	61 ± 6	4
Verdünnung 1:2	839	822	833	831 ± 7	53	613	570	609	597 ± 19	38	33	37	39	36 ± 2	2
Verdünnung 1:4	428	420	412	420 ± 7	27	321	300	311	311 ± 9	20	20	21	22	21 ± 1	1

TCPP-BSA															
1. Charge	2284	2344	2537	2314 ± 30	100	1895	1959	2048	1967 ± 63	82	67	69	86	74 ± 9	3
2. Charge	2195	2302	2279	2259 ± 46	100	1765	1746	1800	1770 ± 22	78	55	94	83	77 ± 16	3
Verdünnung 1:2	1245	1337	1402	1328 ± 64	59	913	1011	1080	1001 ± 69	44	45	60	68	58 ± 10	3
Verdünnung 1:4	766	792	790	783 ± 12	35	568	595	588	584 ± 11	26	38	31	31	33 ± 3	1
TCPP (µg/ml)															
1,00	1398	1460	-	1429 ± 31	100	982	992	-	987 ± 5	69	99	81	-	90 ± 9	6
0,50	775	790	799	788 ± 10	55	529	552	578	553 ± 20	39	49	45	49	48 ± 2	3
0,25	319	349	748	334 ± 15	33	235	266	517	251 ± 16	24	22	17	33	24 ± 7	2
Monolayer/iso- HEPES-7,4	3	3	2	3 ± 0	-	3	3	3	3 ± 0	-	6	3	4	4 ± 1	-

Tabelle 5.3.2.6: Zellossoziierte Fluoreszenzintensitäten von TCPP-WGA-Konjugaten, Konjugaten ohne Aktivierung und TCPP vor bzw. nach einstündiger Inkubation sowie nach zweimaligem Waschen.

	Vor Inkubation					nach Inkubation/vor Waschen					nach Waschen				
Probelösungen	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%	RFI-Bestimmung			MW	%
	1.	2.	3.			1.	2.	3.			1.	2.	3.		
TCPP-WGA-3															
1. Charge	1932	2129	2168	2149 ± 20	100	1525	1681	1699	1635 ± 78	76	126	132	130	129 ± 2	6
2. Charge	2011	2134	2061	2069 ± 51	100	1641	1722	1760	1708 ± 50	83	176	182	178	179 ± 2	9
Verdünnung 1:2	1123	1163	1194	1160 ± 29	56	927	941	965	944 ± 16	46	110	97	116	108 ± 8	5
Verdünnung 1:4	556	566	563	562 ± 4	27	445	445	475	455 ± 14	22	56	60	58	58 ± 2	3
TCPP-WGA-1															
1. Charge	1605	1609	1677	1630 ± 33	100	1110	1100	1239	1150 ± 63	71	115	135	132	127 ± 9	8
2. Charge	1791	1782	1836	1803 ± 24	100	1362	1412	1419	1398 ± 25	78	128	119	119	122 ± 4	7
Verdünnung 1:2	1049	1041	1061	1050 ± 8	58	774	763	742	760 ± 13	42	63	58	73	65 ± 6	4
Verdünnung 1:4	533	550	563	549 ± 12	30	394	403	411	403 ± 7	22	32	36	30	33 ± 2	2
Kontrollen o.A.															
TCPP-WGA-3															
1. Charge	1991	2153	2147	2097 ± 75	100	1383	1503	1477	1454 ± 52	69	113	125	122	120 ± 5	6
2. Charge	1770	1776	1883	1810 ± 52	100	1201	1233	1269	1234 ± 28	68	98	103	127	109 ± 13	6
Verdünnung 1:2	1071	1007	1084	1054 ± 34	58	692	652	754	699 ± 42	39	60	74	63	66 ± 6	4
Verdünnung 1:4	530	538	534	534 ± 3	30	356	355	380	364 ± 12	20	43	32	38	38 ± 4	2
TCPP-WGA-1															
1.Charge	1233	1284	1391	1303 ± 66	100	817	865	987	890 ± 72	68	91	95	85	90 ± 4	7
2. Charge	1595	1581	1641	1606 ± 26	100	1181	1086	1124	1130 ± 39	70	67	75	95	79 ± 12	5
Verdünnung 1:2	870	848	852	857 ± 10	53	572	567	573	571 ± 3	36	44	49	40	44 ± 4	3
Verdünnung 1:4	393	422	425	413 ± 14	26	268	282	285	278 ± 7	17	27	33	29	30 ± 2	2

TCPP-BSA															
1. Charge	2266	2529	2505	2517 ± 12	100	1791	1966	1945	1901 ± 78	76	102	97	90	96 ± 5	4
2. Charge	2133	2271	2393	2332 ± 61	100	1564	1660	1732	1652 ± 69	71	87	109	116	104 ± 12	4
Verdünnung 1:2	1315	1416	1448	1393 ± 57	60	964	989	1051	1001 ± 37	43	60	59	50	56 ± 4	2
Verdünnung 1:4	816	823	826	822 ± 4	35	595	597	597	596 ± 1	26	39	40	48	42 ± 4	2
TCPP (µg/ml)															
1,00	1285	1478	1528	1503 ± 25	100	884	1001	1032	972 ± 64	65	75	69	82	75 ± 5	5
0,50	738	761	771	757 ± 14	50	504	528	556	529 ± 21	35	40	50	51	47 ± 5	3
0,25	251	273	268	264 ± 9	18	192	202	195	196 ± 4	13	14	16	18	16 ± 2	1
Monolayer/iso- HEPES-7,4	3	3	2	3 ± 0	-	3	1	3	2 ± 1	-	2	4	4	3 ± 1	-

5.3.4 Caco-2 Bindungsstudie von TCPP-WGA-Konjugaten mittels Mikroskopie

Um die Interaktion der TCPP-WGA-Konjugate mit Caco-2-Monolayern sichtbar zu machen und damit auch qualitativ beurteilen zu können, werden die folgenden Versuche mikroskopisch ausgewertet. Darüber hinaus soll die Toxizität des Photosensitizers bzw. der Konjugate nach Aktivierung mit Weißlicht untersucht werden.

In den folgenden Versuchen werden TCPP-WGA-Konjugate, die mit einem molaren Ansatzverhältnis von TCPP:WGA von 10:1 und 50:1 (TCPP-WGA-1 und TCPP-WGA-3) hergestellt wurden, mit einer Lösung von 1 µg TCPP/ml iso-HEPES-7,4 verglichen. Zur zusätzlichen Kontrolle dient ein kovalentes TCPP-BSA-Konjugat, das in einem molaren Verhältnis von 50:1 (TCPP:BSA) synthetisiert wurde. Wie bei den fluorimetrischen Studien wird auch hier die RFI der Konjugate auf 3300 eingestellt.

Praktische Durchführung:

Caco-2 Zellen werden im FlexiPERM-System auf Deckgläsern kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz mit jeweils 100 µl iso-HEPES-7,4 gewaschen. Die konfluenten Monolayer werden mit je 100 µl iso-HEPES-7,4 gewaschen, mit 100 µl Probelösung überschichtet und bei 4°C zur Bindung an die Zellmembran eine Stunde inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit jeweils 100 µl iso-HEPES-7,4 wird ungebundenes Konjugat bzw. ungebundener Photosensitizer entfernt und die Monolayer nach Zugabe von 100 µl farblosem Medium pro Well mikroskopisch ausgewertet.

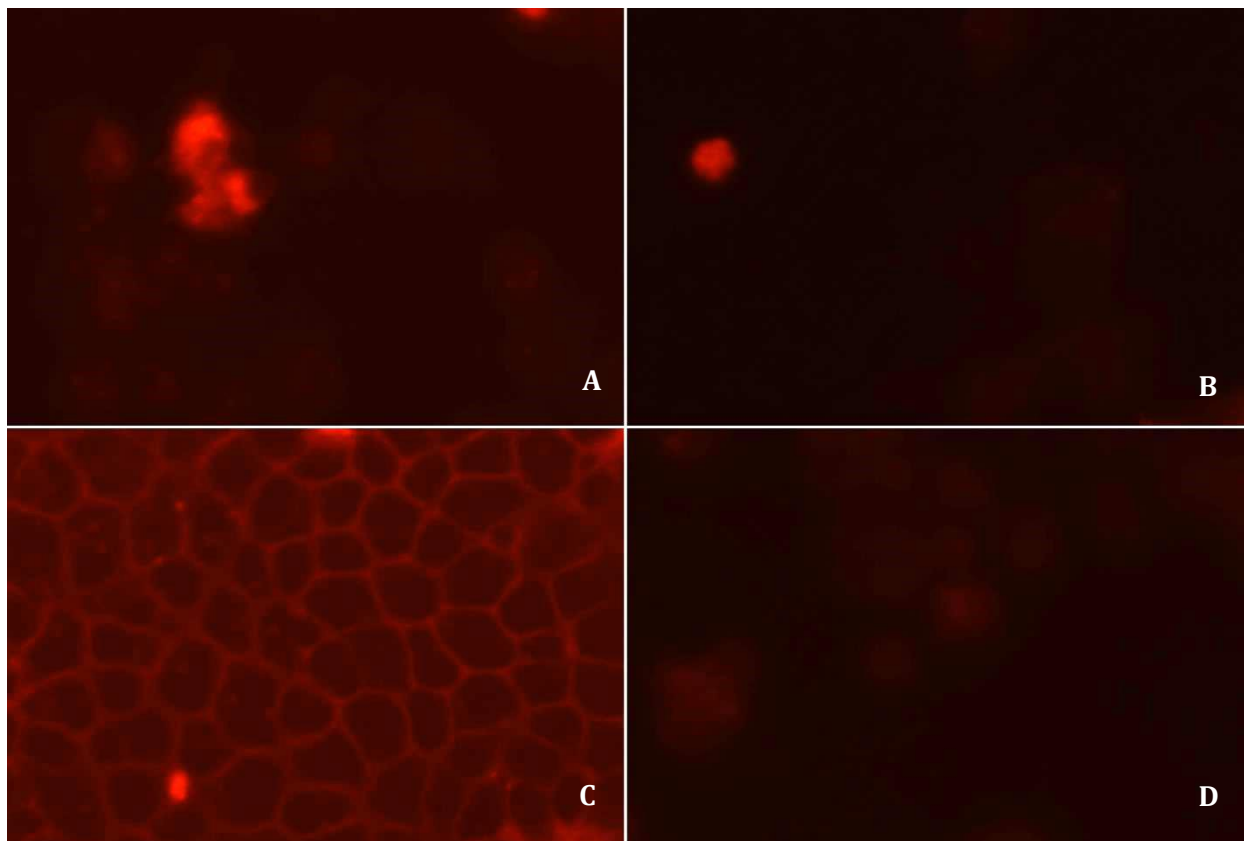


Abbildung 5.3.4.1: Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der Interaktion von TCPP (A), TCPP-BSA (B), TCPP-WGA-1 (D) und TCPP-WGA-3 (C) nach einstündiger Inkubation mit Caco-2 Monolayern bei 4°C.

Wie in Abb. 5.3.4.1. ersichtlich ist, kann auf Grund der diffusen Fluoreszenzintensität von TCPP (A) die geringe Zell-Interaktion, die bereits in den quantitativen Studien beobachtet wurde, bestätigt werden. Ein ähnliches Bild gibt TCPP-BSA (B), wobei auch hier wie bei TCPP eine nur sehr geringe Interaktion mit dem Caco-2 Monolayer vorhanden ist. Im Gegensatz dazu zeigt TCPP-WGA-3 (C) eine gut sichtbare, gleichmäßig verteilte Fluoreszenz über den gesamten Caco-2-Monolayer, sodass die Konjugation von TCPP mit WGA die Zellaffinität deutlich erhöht. Obwohl in den vorangegangenen quantitativen Studien kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen molaren Verhältnisse von TCPP und WGA nachgewiesen werden konnte, zeigt die Fluoreszenzmikroskopie eindeutig eine höhere Zellosoziation des Konjugates TCPP-WGA-3 (molares Verhältnis 10:1 TCPP:WGA) gegenüber Konjugat TCPP-WGA-1 (molares Verhältnis 50:1).

Toxizitätsstudien der Konjugate werden nach Aktivierung des TCPP-Anteiles in den obengenannten Probelösungen mit Weißlicht durchgeführt. Um eine Interaktion der Konjugate mit der Glykokalyx zu ermöglichen, werden die Monolayer eine Stunde bei 4°C inkubiert zweimal gewaschen, 100 µl farbloses RPMI-Medium zugesetzt und eine Minute lang mit Weißlicht (20 mW/cm²) bestrahlt. Die mikroskopische Bewertung erfolgt nach einer Inkubation von 30 bzw. 60 Minuten bei 37°C (siehe Abbildung 5.3.4.2).

Wie Abbildung 5.3.4.2 zeigt, sind alle Monolayer nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C intakt (A1, B1, C1, D1) und daher ist eine Dunkeltoxizität von TCPP-WGA-1, TCPP-WGA-3, TCPP oder TCPP-BSA auszuschließen. Nach Bestrahlung der Zellen verändert sich bei Inkubation mit TCPP-WGA-3 (B2) die Zellform. Die planare Zellform geht in eine kugelige über, die auf ein baldiges Ablösen der Zellen hinweist. Bei TCPP-WGA-1 (A2), TCPP (C2) und TCPP-BSA (D2) ist hingegen der intakte Monolayer auch nach Bestrahlung gut erkennbar.

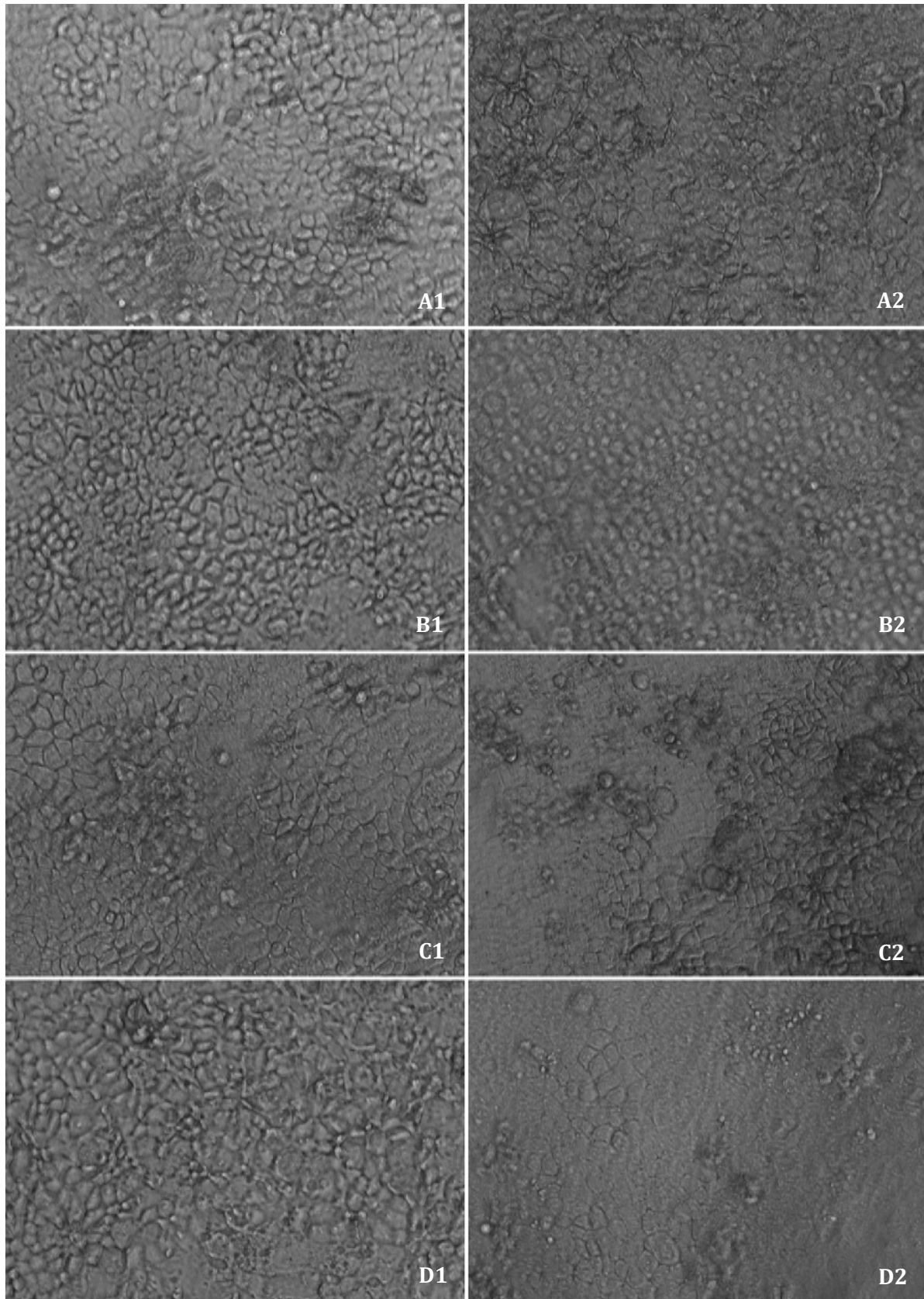


Abbildung 5.3.4.2: Caco-2 Monolayer nach einstündiger Inkubation bei 4°C (Reihe 1) mit TCPP-WGA-1 (A), TCPP-WGA-3 (B), TCPP (C), TCPP-BSA (D), sowie 30 Minuten nach Bestrahlung (Reihe 2).

Zur Beurteilung der Viabilität nach Bestrahlung werden im folgenden Versuch die Zellkerne toter und lebender Zellen gefärbt. Nachdem alle Zellkerne mit Hoechst 33342 blau gefärbt wurden, werden nur die Zellkerne toter Zellen durch Propidiumiodid rot gefärbt, da dieses nur durch die perforierte Zellwand toter Zellen diffundiert und dann mit der DNA interagieren kann. Als Vergleich werden Zellen ohne TCPP Behandlung auf die gleiche Weise gefärbt.

Praktische Durchführung:

Nach Bestrahlung, einstündiger Inkubation bei 37°C und mikroskopischer Bewertung wird zur Färbung aller Zellkerne 15 Minuten bei 37°C mit 10 µl Hoechst 33342 (0,05 mg/ml Aqua dest.) pro Well und im Anschluss zur Färbung der Kerne toter Zellen mit 50 µl Propidiumiodid (1,43 µg/ml Aqua dest.) zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 100 µl iso-HEPES-7,4 werden die Monolayer mit 100 µl farblosem RPMI-Medium überschichtet und mikroskopisch untersucht. Die abgehobene Waschflüssigkeit wird gesammelt, um darin enthaltene, abgelöste Zellen ebenfalls mikroskopisch zu erfassen.

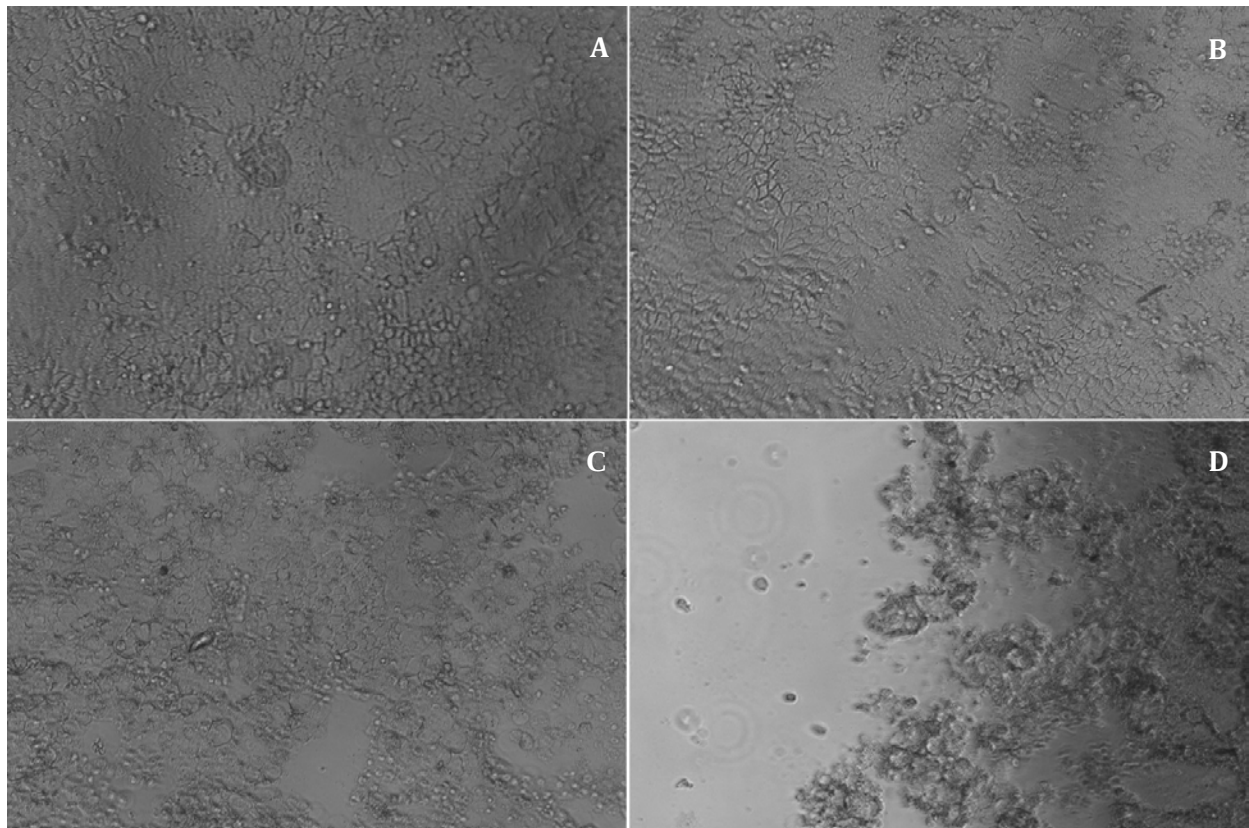


Abbildung 5.3.4.3: Caco-2 Monolayer (A), mit TCPP (B), TCPP-WGA-1 (C) und TCPP-WGA-3 (D) nach einer Minute Bestrahlung mit Weißlicht und 90 Minuten Post-Inkubation bei 37°C.

Die mikroskopischen Bilder der Monolayer nach Bestrahlung und anschließender 90 minütiger Inkubation bei 37°C in Abb. 5.3.4.3. zeigen bei unbehandelten Zellen (A) sowie Zellen, die nur mit TCPP inkubiert wurden (B) einen intakten Zelllayer. Möglicherweise auf Grund der geringen Zell-Interaktion übt der Photosensitizer allein keine toxischen Effekte auf das artifizielle Gewebe aus. Im Gegensatz dazu bewirkt TCPP-WGA-1 (C) eine Schädigung der Zellen, die durch teilweises Ablösen des Zellrasens und der kugelige Form der Zellen bestätigt wird. Noch deutlicher ist der toxische Effekt von TCPP-WGA-3 (D) zu erkennen, da hier durch die höhere Konzentration an TCPP, bedingt durch das höhere molare Ansatzverhältnis bei der Konjugatsynthese, eine erhöhte Zellinteraktion und damit eine erhöhte Toxizität gegeben ist. Das Ablösen der Zellschicht ist ein typisches Zeichen für Apoptose, die durch die Aktivierung des Photosensitizers ausgelöst wurde.

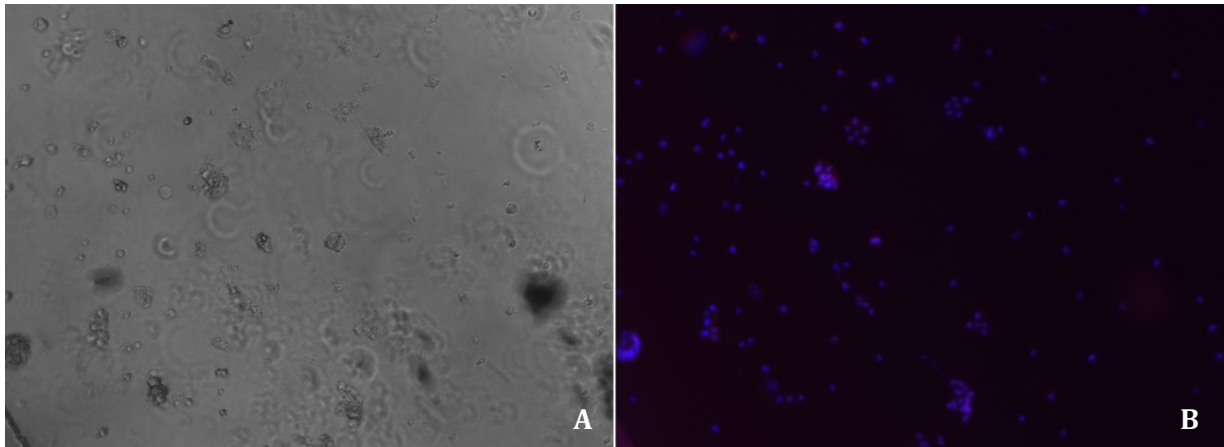


Abbildung 5.3.4.4: Mikroskopische Bilder der Waschflüssigkeit von TCPP-WGA-3. Abgelöste Zellen (A), Propidiumiodid- (rot) und Hoechst 33342 (blau)-Färbung toter Zellen (B).

Die Untersuchung der Waschflüssigkeit von TCPP-WGA-3 (Abbildung 5.3.4.4) zeigt, dass viele Zellen, die während des Waschens abgesaugt wurden, sowohl eine Färbung mit Hoechst- als auch Propidiumiodid aufweisen. Damit bestätigt die Mikroskopie der abgelösten Zellen die erst durch WGA-Konjugation erzielte Toxizität des Photosensitizers TCPP.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Photosensitizer-gestützte photodynamische Therapie stellt auf Grund ihrer hohen Selektivität eine vielversprechende Behandlungsmethode in der Tumorthherapie dar. Durch die gezielte Verabreichung von photosensibilisierenden Substanzen und deren anschließender Aktivierung durch Bestrahlung mit Licht kann direkt an Tumorzellen ein zytotoxischer Effekt hervorgerufen werden. Jedoch ist der Erfolg der photodynamische Therapie durch ungünstige chemische, physikalische und pharmakologische Eigenschaften der meist lipophilen PS begrenzt. Um einige dieser limitierenden Faktoren zu überwinden, könnten Photosensitizer mit wasserlöslichen Polymeren oder cytoadhäsiven Proteinen modifiziert werden, um Hydrophilie bzw. Zellinteraktion und damit die Effizienz zu erhöhen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Photosensitizer aus der Gruppe der Porphyrine mit Polystyrolsulfat-Natrium (PSS-Na) oder Weizenlektin (WGA) modifiziert und die Interaktion dieser Konjugate mit Caco-2 Monolayern im Vergleich zur jeweiligen Ausgangsverbindung untersucht. WGA ist ein wasserlösliches Lektin, das durch seine spezifische Interaktion mit Zuckerstrukturen der Zellmembran die Bindung und auch Aufnahme von konjugierten Wirkstoffen in die Zelle verbessern kann. mTHPP wurde mit 13 Molekülen PSS-Na komplexiert (mTHPP-PSSNa), TPP wurde mittels mixed-anhydride-Methode und TCPP mittels Carbodiimid kovalent an WGA konjugiert.

Die Modifikation von mTHPP mit PSS-Na bewirkte nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C eine signifikant erhöhte Bindung des Photosensitizers an die Zelloberfläche, die quantitativ durch eine 30-fach höhere RFI bestätigt wurde. Dieses Ergebnis konnte zusätzlich bei 37°C nach 30 minütiger Inkubation mit einer bis zu 4-fach höheren Zell-assoziierten relativen Fluoreszenzintensität (RFI) im Vergleich zu mTHPP belegt werden. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer bei 4°C und bei 37°C führte bei beiden Verbindungen zu einem deutlichen Anstieg der RFI. Dabei zeigten sowohl mTHPP als auch mTHPP-PSSNa bei 37°C eine höhere zellassoziierte Fluoreszenzintensität als bei 4°C, was auch auf eine Aufnahme der Photosensitizer in die Zellen hinweist. Diese quantitativen Ergebnisse konnten auch qualitativ durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Darüber hinaus führte die Weißlicht-Bestrahlung der mit PS

beladenen Monolayer zu punktuellen Fluoreszenzverteilungen von mTHPP-PSSNa in den Zellen, welche aber nachweislich, gestützt auf Kollokalisationsstudien mit Fluorescein-markiertem WGA, nicht durch Aufnahme in die Lysosomen zustande kommt. Des Weiteren konnte auch durch Visualisierung der Zellgrenzen mittels Färbung des tight junction Proteins ZO-1 weder für mTHPP noch für mTHPP-PSSNa eine eindeutige Aussage über eine Aufnahme in die Zelle getroffen werden.

Um die Wirkstoff – Zellinteraktion zu verbessern wurde TPP mittels mixed anhydride-Methode an WGA gekoppelt. Die anschließende Zell-Bindungsstudien der Konjugate bei 4°C ergaben keine Verbesserung der Bindungsrate durch die WGA-Modifikation. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Versuche mit TPP durchgeführt.

TCPP, das im Gegensatz zu TPP vier Carboxylgruppen besitzt, wurde durch die Carbodiimid-Methode in zwei unterschiedlich molaren Verhältnissen (1:10 und 1:50, WGA:TCPP) an WGA gekoppelt. Die fluorimetrisch ausgewerteten Bindungsstudien bei 4°C erlaubten keine Aussage über eine verbesserte Interaktion mit dem Zellmonolayer für ein bestimmtes molares Ansatzverhältnis. Als zusätzliche Kontrollen wurde einerseits eine Lösung von TCPP in Puffer, andererseits ein möglicher ionischer Komplex mit Rinderserumalbumin eingesetzt, um die Zell-Bindungskapazitäten der beiden Konjugate näher charakterisieren zu können. Die geringfügig höheren RFI-Werte der TCPP-WGA Konjugate im Vergleich zu TCCP-BSA weisen auf eine WGA-vermittelte Bindung an die Zelloberfläche hin, darüber hinaus bewies die 1,5-fach höhere zellgebundene Fluoreszenzintensität eine verbesserte Zell-Bindungskapazität von TCPP-WGA-Konjugaten im Vergleich zum lipophilen TCPP. Durch Visualisierung der Zellbindung der TCPP-Konjugate durch Mikroskopie ergab, dass nur TCPP-WGA-3 an den Zellgrenzen angereichert wird, während weder TCPP, TCPP-WGA-1 noch TCPP-BSA eine sichtbare Anlagerung zeigten. Nachdem eine Dunkeltoxizität für alle eingesetzten Probelösungen ausgeschlossen werden konnte, wurden die mit Photosensitizer behandelten Monolayer mit Weißlicht bestrahlt und bei 37°C inkubiert. Nach 60 Minuten konnte durch mikroskopische Analyse für TCPP-WGA-3 und nach 90 Minuten auch für TCPP-WGA-1 ein zytotoxischer Effekt durch Abrundung und Ablösen der adhärenen Caco-2 Zellen beobachtet werden, der zusätzlich durch Färben der Zellkerne toter Zellen bestätigt werden konnte.

Insgesamt konnte in dieser Diplomarbeit gezeigt werden, dass die Effizienz von Photosensitizern durch zwei Parameter, einerseits eine gewisse minimale Hydrophilie zum Erreichen der Zellmembran in gelöster Form, und andererseits eine gewisse minimale Lipophilie zur Anlagerung bzw. Aufnahme in die Zelle, bestimmt wird. Um dies zu erreichen, konnte die Komplexbildung mit einem hochmolekularen hydrophilen Molekül wie Polystyrolsulfat ausgenutzt werden. Um nicht nur die Hydrophilie, sondern auch die Anlagerung und Aufnahme des Photosensitizers in die Zelle zu erhöhen, wurde dieser mit hochmolekularen, cytoinvasiven Lektinen modifiziert. Beide Konzepte konnten erstmals in Ihrer Funktionalität bestätigt werden, jedoch sind noch viele und eingehendere Studien notwendig, bevor diese Photosensitizerkonjugate in der Therapie angewandt werden können.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guillard. The Porphyrin Handbook Volume 6: Applications: Past, Present and Future, 2000, 43, 160-163.
- [2] H. Driemel. Untersuchungen zur Phototoxizität des wasserlöslichen Photosensibilisators Perinaphtenon (PNS) in Zellkulturen humaner dermaler Fibroblasten (NHDF), Inaugural-Dissertation, Universität Regensburg, 2011.
- [3] M. Wirth, K. Gerhardt, C. Wurm, F. Gabor. Lectin-mediated drug delivery: influence of mucin on cytoadhesion of plant lectins in vitro. J Control Release 79, 2002, 183-191.
- [4] Jamil, Basil. Elektronenspinresonanz-Untersuchungen zur Singulett-Sauerstoff-Generierung verschiedener Photosensibilisatoren für die Photodynamische Therapie, Dissertation, Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, 2004.
- [5] <http://www.chemgapraxis.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/13/vlu/spektroskopie/theorie/jablonski.vlu.html>
- [6] W. Böcker, P. U. Heitz. Pathologie, 4. Auflage, 2008, Elsevier, Urban und Fischer Verlag, 2.6, 61-64.
- [7] F. Lang, P. Lang. Basiswissen Physiologie, 2. Auflage, 2007, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 1.6.2, 16.
- [8] http://www.porphyrin-systems.de/porphyrins/porphyr_de.htm
- [9] <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/tetrapyrrole/>
- [10] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100011004285>
- [11] http://www.triportech.com/porphyrin_ger/porphyrin1/4-carboxyphenyl-101520-triphenyl-2123h-porphyrin/index.php
- [12] http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8708722.htm

- [13] Vorlesung M. Wirth, Zellkultur als Modelle in der pharmazeutisch-technologischen Analytik.
- [14] F. Gabor, M. Wirth. Lectin-mediated drug delivery: fundamentals and perspectives, STP. Pharma Sciences 13 ,2003, 3-16.
- [15] S. R. Mikkelsen, E. Cottón. Bioanalytical Chemistry, 2004, John Wiley and Sons, Inc. (Hoboken, New Jersey), 101-102.
- [16] G.T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 2. Auflage, 2008, Part 2, 215-219.
- [17] A. Pingoud, C. Urbanke, Arbeitsmethoden der Biochemie, 1997, Walter de Gruyter & Co Berlin, 3.4, 57-59.
- [18] http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/075036_flexiPerm.pdf
- [19] S. Schmitz, Der Experimentator: Zellkultur, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 3. Auflage, 2011, 26-28, 166-168.
- [20] G. Fricker, P. Langguth, H. Wunderli-Allenspach, Biopharmazie, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA Weinheim, 2004, Kapitel 8: Drug Targeting und Prodrugs

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovines Serum Albumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
f-WGA	Fluorescein-markiertes Weizenlektin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IBF	Isobutylformiat
kDa	(Kilo) Dalton (Molekülmasse)
MeOH	Methanol
mW	(Milli)Watt (Leistung)
NH ₃	Ammoniak
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	Phosphate buffered saline
PDI	Polydisperisitätsindex
PDT	Photodynamische Therapie
PI	Propidiumiodid
PS	Photosensitizer
PSSNa	Polystyrolsulfat-Natrium
RFI	relative Fluoreszenzintensität
ROS	reaktiv oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
Upm	Umdrehungen pro Minute

RPMI-1640	Zellkulturmedium nach Roswell Park – Memorial Institut
S ₀	Grundzustand, Singulettzustand
S ₁	angeregter Singulettzustand
T ₁ , T ₂ ,..	Tripletzustand
TBA	Tributylamin
THF	Tetrahydrofuran
WGA	Wheat germ agglutinin, Weizenlektin

9. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Ingrid Kaniak
Geburtsdatum: 21.12.1984
Geburtsort: LKH Vöcklabruck
Staatsbürgerschaft: Österreich
Eltern: Mag. pharm. Marlis Kaniak
Mag. Pharm. Erich Kaniak
Geschwister: Monika, Brigitte, Gerhard, Ulrike

Ausbildung:

09/2011-04/2012 Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie
10/2003 Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien
06/2003 Abschluss der AHS Vöcklabruck mit Matura
2003-1999 Besuch der Oberstufe des Neusprachlichen Gymnasiums in Vöcklabruck
1999-1995 Besuch der Unterstufe des Neusprachlichen Gymnasiums in Vöcklabruck
1995-1991 Besuch der Volksschule Seewalchen am Attersee

Praktische Erfahrung:

Seit 03/2013 Beschäftigung bei Falken-Apotheke, 1160 Wien
02/2013 Freie Tätigkeit bei der Oberösterreichischen Apothekerkammer
Disease Management Programm „Therapie aktiv“
WS 2012 Tutor Universität Wien (Industrielle Arzneimittelherstellung)
SS 2012 Tutor Universität Wien (Industrielle Arzneimittelherstellung)
01/2012-12/2012 Seeapotheke/Drogerie, 4861 Schörfling
WS 2011 Tutor Universität Wien (Grundpraktikum Pharmazeutische Technologie)
WS 2011 Tutor Universität Wien (Anwendung von Zellkulturen in
der pharmazeutischen Technologie)
07/08/2011 Ferialarbeit Helios Apotheke, 4663 Laakirchen (Blisterabteilung)
07/08/2007 Ferialarbeit Seeapotheke/Drogerie, 4861 Schörfling