



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Darstellung und Charakterisierung von PEI-modifizierten
Mikropartikeln und deren Interaktion mit gesundem und
entzündetem Endothel“

verfasst von

Alexandra Schlögl

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

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

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor und Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die Möglichkeit und Realisierung dieser Diplomarbeit bedanken. Ersterem gilt auch mein besonderer Dank für hilfreiche Anmerkungen und Anregungen.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an Frau Mag. Dr. Xue-Yan Wang für Ihre kompetente Hilfe bei der experimentellen Arbeit und beim Verfassen meiner Diplomarbeit.

Mein tiefster Dank gilt meinen lieben Eltern, die mir ermöglicht haben diesen Weg zu gehen, immer Verständnis in schwierigen Studienzeiten hatten und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Zu guter Letzt danke ich meinem Freund, der nie Zweifel an meinen Fähigkeiten hatte und meinen Studienkolleginnen, meinen Freundinnen, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
2	GRUNDLAGEN	9
2.1	Drug Targeting	9
2.1.1	Polyethylenimin (PEI)	10
2.2	Endothelzellen	11
2.2.1	E-Selektin	12
3	MATERIALIEN	13
4	METHODEN	14
4.1	Zellkultur	14
4.1.1	Allgemeine Methoden	14
4.1.2	Induktion der Entzündung von Endothelzellen	16
4.1.2.1	Expression von E-Selektin	16
4.1.2.2	Internalisierung von E-Selektin	16
4.1.2.3	Internalisierung des E-Selektin-Antikörper-Komplexes	17
4.2	Flowzytometrie	19
4.3	PEI-modifizierte Mikropartikel	20
4.3.1	Oberflächenmodifikation mit PEI	20
4.3.2	Charakterisierung	21
4.3.3	PEI-Quantifizierung	22
4.4	Partikel-Zell-Interaktion	24
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	25
5.1	Endothelzellen	25
5.1.1	Kultivierung und Charakterisierung	25
5.1.2	Durchflusszytometrische Analyse von Endothelzellmonolayern	26
5.1.3	Induktion der Entzündung von Endothelzellen	33
5.1.3.1	Expression von E-Selektin	33
5.1.3.2	Internalisierung von E-Selektin	42
5.1.3.3	Internalisierung des E-Selektin-Antikörper-Komplexes	44
5.2	PEI-modifizierte Mikropartikel	50
5.2.1	Oberflächenmodifikation mit PEI	50
5.2.2	Charakterisierung der PEI-modifizierten Polystyrolpartikel	54
5.2.3	PEI-Quantifizierung	55

5.3	Partikel-Zell-Interaktion	57
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	60
6.1	Deutsch	60
6.2	Englisch.....	61
7	ANHANG A.....	63
8	LITERATURVERZEICHNIS	70
9	CURRICULUM VITAE	73

1 EINLEITUNG

Der therapeutische Einsatz von Mikro- und Nanopartikeln als Arzneistoffträger gewinnt immer mehr an Bedeutung. Um einen zielgerichteten Transport von Wirkstoffen zu bestimmten Zellen im Körper zu erreichen, muss die Oberfläche dieser partikulären Arzneistoffformulierungen modifiziert werden, damit sie mit dem Gewebe interagieren. Das Ziel besteht darin, Arzneistoffe selektiv zum gewünschten Wirkort zu transportieren und dort anzureichern. Dadurch könnte die Dosis für denselben therapeutischen Effekt reduziert und Nebenwirkungen oder sogar Toxizität vermindert werden [1,2].

Derzeit werden neben spezifischen, biorekognitiven Mechanismen auch unspezifische, ionische Wechselwirkungen zur Interaktion genutzt. Aufgrund der überwiegend negativ geladenen Zelloberfläche aller Zelltypen in multizellulären Organismen [3], sollte die Bindungsrate von positiv geladenen Arzneistoffträgern an Zellen durch elektrostatische Anziehungskräfte erhöht sein [4,5]. Um dies zu überprüfen, werden in der vorliegenden Arbeit Polyethylenimin (PEI)-modifizierte und somit positiv geladene Mikropartikel hergestellt und anschließend ihre Bindungseffizienz an Endothelzellmonolayern, als Modell für Blutgefäße, untersucht. Dabei liegt ein spezielles Augenmerk auf der Partikelbindungsrate von entzündeten im Vergleich zu gesunden Endothelzellen.

Als Ausgangsmaterial werden fluoreszenzmarkierte, carboxylierte Polystyrol-Mikropartikel mit 1 μm Durchmesser verwendet, deren negative Oberflächenladung durch Bindung von PEI umgepolt werden soll. Obwohl die in der Arbeit verwendeten Polystyrolpartikel nicht biokompatibel und folglich therapeutisch nicht einsetzbar sind, eignen sie sich dennoch aufgrund ihrer funktionalisierbaren Oberfläche und ihrer engen Größenverteilung für grundlegende Versuche. Da PEI-modifizierte Mikropartikel eine hohe Tendenz zur Agglomeration aufweisen, soll auch das Herstellungsverfahren optimiert werden, um in weiterer Folge stark positiv geladene und damit stabile Partikel zu erhalten. Zur Beurteilung des Ausmaßes der Oberflächenmodifikation sollte

darüber hinaus eine Methode zur Quantifizierung der Partikel-assoziierten PEI-Menge entwickelt werden.

Ein weiteres wichtiges Thema dieser Arbeit ist die humane Endothelzellkultur. Da derzeit noch keine molekularen Unterschiede zwischen gesundem und entzündetem Endothel bekannt sind, eine zielgerichtete Therapie von entzündetem Gewebe aber von größter Bedeutung wäre, sollte ein in-vitro Modell für entzündetes Gewebe etabliert werden. Damit stellen die Auslösung einer Entzündung, das Erkennen der dadurch verursachten Änderungen an der Zelloberfläche und die Charakterisierung möglicher Zielstrukturen einen weiteren Fokus dieser Arbeit dar.

Um die physiologischen Gegebenheiten besser nachzuahmen, werden ausschließlich Untersuchungen an konfluenten Endothelzellmonolayern durchgeführt. Für die flowzytometrische Analyse soll daher auch ein Protokoll zur Isolierung viabler Einzelzellsuspensionen entwickelt werden.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Drug Targeting

Der selektive Transport von Arzneistoffen zum gewünschten Wirkort und in weiterer Folge die gezielte Anreicherung und/oder Freisetzung des Wirkstoffes wird als Drug Targeting bezeichnet. Das Ziel besteht darin, erwünschte Wirkungen zu erhöhen, während unerwünschte minimiert oder toxische Nebenwirkungen verhindert werden sollen. Da durch die Anreicherung am Zielort die Verteilung des Wirkstoffes in der Peripherie vermindert wird, ist eine vergleichbare Wirkung bei verringerter Dosis zu erwarten [1,2].

Das Targeting eines Arzneistoffes kann durch mehrere Strategien erreicht werden, wobei passives, aktives und physikalisches Targeting unterschieden werden [1,2].

Für passives Targeting werden physiologische Gegebenheiten des Organismus genutzt, um eine Anreicherung am Wirkort zu erreichen. Beispielsweise kann bei Entzündungen und in initialen Stadien der Tumorentwicklung der EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect) ausgenutzt werden, da die Durchlässigkeit der Blutgefäße in pathologisch verändertem Gewebe erhöht ist. Dadurch können geeignete Formulierungen das erkrankte Gefäßendothel durchdringen und sich erleichtert im Interstitium anreichern.

Beim aktiven Targeting werden Arzneistoffe oder Arzneistoffträger an einen Liganden gekoppelt, der spezifisch an bestimmte Strukturen auf der Zelloberfläche bindet. So können biorekognitive Liganden für spezifische Rezeptoren oder Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von erkranktem Gewebe für diesen Zweck eingesetzt werden [1,2].

Physikalisches Targeting nutzt zur Wirkstofffreisetzung am gewünschten Zielort eine physikalische Maßnahme wie erhöhte Temperatur oder Änderung des pH-Wertes im erkrankten Gewebe aus [2].

2.1.1 Polyethylenimin (PEI)

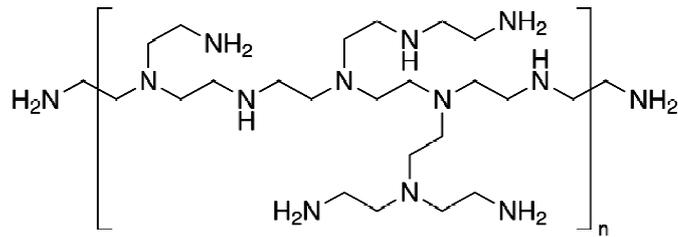


Abbildung 1: Polyethylenimin, verzweigt [6].

Polyethylenimin (PEI) ist ein polymeres Molekül, das in linearer als auch verzweigter Form synthetisiert wird. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wird verzweigtes PEI mit einer Molmasse von 10000 Da zur Oberflächenmodifikation von Polystyrol-Mikropartikeln verwendet. Verzweigtes PEI weist primäre, sekundäre sowie tertiäre Aminogruppen auf und hat daher basischen Charakter. Da jedes dritte Atom des PEI-Rückgrates einen Amin-Stickstoff darstellt, weist es eine hohe Dichte kationischer Ladungen [7] und beträchtliche Pufferkapazität [8] auf.

Im Bereich der Nanotechnologie, speziell zur Entwicklung oberflächenmodifizierter Mikro- und Nanopartikel gewann PEI an Interesse. Die Oberfläche dieser partikulären Arzneistoffträger soll chemisch und strukturell verändert werden, damit sie mit dem Gewebe interagieren. Neben spezifischen, biorekognitiven Mechanismen können andererseits nicht-spezifische, ionische Wechselwirkungen zur Interaktion ausgenutzt werden. Aufgrund der negativ geladenen Zelloberfläche von eukaryontischen Zellen in multizellulären Organismen [3], sollten positiv geladene Arzneistoffträger durch elektrostatische Anziehungskräfte vermehrt an die negativ geladene Zelloberfläche binden. Um eine positive Partikeloberfläche zu erhalten, kann die negativ geladene Oberfläche von Partikeln durch elektrostatische Wechselwirkungen für die Adsorption von PEI genutzt werden [9,10].

In den letzten Jahren erlangte PEI im Bereich der Gentherapie eine bedeutende Rolle. Die Gentherapie beschäftigt sich mit der therapeutischen Nutzung von Genen zur Behandlung zahlreicher, schwerwiegender Erkrankungen. Aufgrund der Ladung und Größe können Nucleinsäuren kaum Zellmembranen durchdringen. Als Konsequenz daraus ist der Erfolg der Gentherapie von

Vektoren abhängig, die therapeutisch aktive Gene in die Zelle transportieren können. Neben viralen Vektoren zeigt PEI unter den nicht-viralen Vektoren, in-vitro als auch in-vivo, vielversprechende Ergebnisse für den Gentransport [7,11].

2.2 Endothelzellen

Endothelzellen sind spezialisierte Zellen, welche die Innenseite von Blut- und Lymphgefäßen auskleiden und für zahlreiche physiologische Funktionen essentiell sind. Einerseits sind sie für den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe verantwortlich, andererseits regulieren sie durch Synthese von Stickstoffmonoxid, Endothelin und Prostacyclin den Gefäßtonus und somit den Blutdruck. Glattwandige Transcytosevesikel stellen ein besonderes Charakteristikum an der Oberfläche von Endothelzellen dar. Des Weiteren spielt der Von-Willebrand-Faktor, der in cytoplasmatischen Weibel-Palade-Körpern gespeichert wird, bei der Thrombozytenaggregation und beim Wundverschluss eine essentielle Rolle. Das Gefäßendothel beeinflusst durch Regulation von Gerinnungsprozessen die Fließeigenschaften des Blutes. Außerdem spielt es bei Entzündungsprozessen und in der Angiogenese eine wichtige Rolle [12].

Zur in-vitro Kultivierung können primäre sowie immortalisierte Endothelzellen eingesetzt werden. Ein Beispiel für primäre Endothelzellen sind HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), die nur für begrenzte Zeit kultivierbar sind und aus der Hauptvene der Nabelschnur postnatal innerhalb weniger Stunden isoliert werden [12].

HUVECTert, eine immortalisierte Zelllinie, sind HUVEC, welche mittels humaner Telomerase Reverser Transkriptase immortalisiert wurden [13] und über einen wesentlich längeren Zeitraum kultivierbar sind als Primärzellen.

2.2.1 E-Selektin

E-Selektin gehört neben P- und L- Selektin zu den Selektinen, sogenannten Ca^{2+} -abhängigen, zuckerbindenden Proteinen, welche sich in ihrer Aminosäurestruktur nur in der zuckerbindenden und komplementregulatorischen Domäne unterscheiden, allerdings an der Oberfläche verschiedener Zellen auftreten. E-Selektin kommt vermehrt im aktivierten Endothel vor, während L-Selektin von Leukozyten und P-Selektin von Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert wird. P- und L- Selektine sind für die Thrombozyten- bzw. Leukozytenadhäsion am Blutgefäßendothel bei Gefäßschädigung oder entzündlichen Prozessen verantwortlich [14].

Ebenfalls bekannt als CD62E, LECAM-2 oder ELAM-1 wird E-Selektin speziell von Endothelzellen gebildet. Zu den wichtigsten Domänen der Primärstruktur von E-Selektin gehören eine C-Typ lektinartige Domäne sowie eine epidermal growth factor-ähnliche Domäne, welche die Interaktion mit Leukozyten vermitteln [14].

E-Selektin wird von Endothelzellen nicht konstitutiv exprimiert, sondern erst nach Stimulation durch inflammatorische Substanzen wie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$). Das an der Zelloberfläche exprimierte E-Selektin wird nach Zytokinstimulation durch Endozytose internalisiert und in den Lysosomen abgebaut, was zu einer Abnahme der E-Selektin Moleküle an der Zellmembran führt. Vier Stunden nach Zytokinstimulierung wird die maximale Expression erreicht und diese sinkt dann signifikant, sodass E-Selektin 24 Stunden später nicht mehr nachgewiesen werden kann [14].

3 MATERIALIEN

- ❖ HUVEC (human umbilical vein endothelial cells): Primäre humane Endothelzellen, die aus der Nabelschnur isoliert werden und freundlicherweise von Dr. Renate Hofer-Warbinek (Institut für Gefäßbiologie und Thromboseforschung, Zentrum für Physiologie und Pharmakologie, Medizinische Universität Wien) zur Verfügung gestellt wurden
- ❖ HUVEctert: durch humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) immortalisierte HUVEC
- ❖ EndoPrime[®] Kit (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) bestehend aus 500 ml EndoPrime Basismedium, 5 ml EndoPrime Supplement (x100), 1 ml EndoPrime EGF(2,5 µg/ml), 1 ml EndoPrime VEGF (250ng/ml) und 25 ml Endoprime FBS
- ❖ Mouse Anti-Human CD62E (E-selectin) FITC IgG₁, (SouthernBiotech, Birmingham, USA)
- ❖ Rekombinanter humaner TNF-alpha (R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA)
- ❖ Fluoreszenzmarkierte Polystyrolpartikel (Fluoresbrite[®] carboxylate microspheres, 1µm Durchmesser), (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland)
- ❖ Polyethylenimin (PEI), MG 10000 g/mol, verzweigt, (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland)
- ❖ Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Alle anderen verwendeten Reagenzien sind von analytischer Reinheit.

4 METHODEN

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeine Methoden

Subkultivierung von Endothelzellen:

Sobald mehr als 80% der Bodenfläche einer Zellkulturflasche mit Zellen bedeckt ist, werden die Zellen subkultiviert. Endothelzellen benötigen eine modifizierte Wachstumsfläche, sodass die Zellkulturflaschen vor der Kultivierung 30 Minuten mit 6 ml steriler 1%iger Gelatinelösung in Aqua bidest. im Laminar Air Flow (LAF) beschichtet werden und danach der Überstand abgesaugt wird.

Zur Subkultivierung wird das Nährmedium aus den Zellkulturflaschen mit den adhären Zellen abgesaugt und danach die Zelloberfläche zweimal mit je 2 ml PBS-Puffer gewaschen und der Puffer abgesaugt. Danach werden 2 ml 0,25%ige Trypsin-EDTA Lösung in eine Ecke der Zellkulturflasche pipettiert, möglichst ohne die Zellen mit der Lösung in Kontakt zu bringen. Nach Verschließen der Zellkulturflasche wird unter einem entsprechend eingestellten Mikroskop die Trypsin-EDTA Lösung durch Schwenken horizontal über den Zellrasen verteilt und die Ablösung der Zellen von der Oberfläche beobachtet. Sobald sich 80-90% der länglichen Endothelzellen abgerundet, aber noch nicht abgelöst haben, was an leuchtenden, sich nicht bewegendem Punkte erkennbar ist, wird der Überstand sofort im LAF abgesaugt und die Zellkulturflasche mit der Kante in die Hand geschlagen, um die anhaftenden Zellen von der Oberfläche mechanisch zu lösen. Durch Zugabe von 6 ml EndoPrime[®]-Medium und anschließendes, mehrmaliges Schwenken wird die Trypsinaktivität auf die Zellen inhibiert und damit der Ablösungsprozess auf der gesamten Wachstumsfläche gestoppt. Anschließend werden die abgelösten Zellen mehrmals resuspendiert und gleichzeitig die Wachstumsfläche gespült, um bestehende Zellagglomerate in Einzelzellen überzuführen und eventuell noch anhaftende Zellen von der Oberfläche zu lösen.

Zur Weiterkultivierung werden 13,0 bis 14,0 ml EndoPrime[®]-Nährmedium in die Gelatine-beschichtete Zellkulturflasche eingebracht und je nach Teilungsaktivität der Zellen mit 1,0 bis 2,0 ml Zellsuspension angeimpft. Die verschlossene Zellkulturflasche wird horizontal geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung

der Zellen zu gewährleisten. Nach mikroskopischer Kontrolle wird die Kulturflasche im Brutschrank nochmals horizontal geschwenkt und das Nährmedium nach 24 Stunden Inkubation erstmals gewechselt.

Kultivierung von Endothelzellmonolayern:

Da Endothelzellen eine modifizierte Wachstumsfläche benötigen, werden die für die Zellmonolayerzüchtung verwendeten 96-well Mikroplatten vor Aussaat der Zellen mit 50 µl einer sterilen 1%igen Gelatinelösung in Aqua bidest. pro well 30 Minuten lang im LAF beschichtet und danach der Überstand abgesaugt.

Nach Subkultivierung der Zellen wird die Zellzahl der Zellsuspension im Hämocytometer bestimmt und anschließend mit EndoPrime[®]-Medium so verdünnt, dass 17.000 Zellen pro 160 µl Medium vorliegen. Danach werden je well 160 µl Zellsuspension eingebracht und zur homogenen Verteilung der Zellen mehrmals resuspendiert. Nach Kontrolle unter dem Mikroskop werden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert und nach 24 Stunden mikroskopisch überprüft, ob die Zellschicht konfluent ist. Wenn dies nicht der Fall ist, wird das Medium gewechselt und bei 37°C weiter inkubiert.

Durchflusszytometrische Analyse von Endothelzellmonolayern

Um Zellen, die in 96-well Platten kultiviert wurden, flowcytometrisch analysieren zu können, werden diese in Einzelzellen dissoziiert. Nach Absaugen des Überstandes und Waschen mit jeweils 100 µl PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺ werden zur Dissoziation der Zellschichten pro well 50 µl 0,25%ige Trypsin-EDTA Lösung zugesetzt, 60 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Zum Stoppen der Trypsinaktivität werden pro well 100 µl EndoPrime[®]-Medium zugesetzt und mehrmals resuspendiert, um möglichst viele Zellen von der Wachstumsfläche zu lösen. Danach werden die Zellsuspensionen aus sechs wells in einem Röhrchen vereinigt, mit 500 µl partikelfreiem PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺ verdünnt, mehrmals resuspendiert und sofort im Durchflusszytometer analysiert.

4.1.2 Induktion der Entzündung von Endothelzellen

4.1.2.1 Expression von E-Selektin

Um in Endothelzellen eine Entzündung zu induzieren, wird eine Lösung von 10 ng TNF- α /ml EndoPrime[®]-Medium hergestellt. Nach Absaugen des Überstandes von konfluenten Zellmonolayern in 96-well Platten werden pro well 50 μ l TNF- α -Lösung zugesetzt und die Platten vier Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wird die TNF- α -Lösung abgesaugt und einmal mit jeweils 100 μ l PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. Das Ausmaß der Entzündung wird durch Immunfluoreszenzfärbung von E-Selektin bestimmt. Dazu werden pro well 50 μ l Lösung des Fluorescein-markierten E-Selektin-Antikörpers (1 μ l Stammlösung in 49 μ l EndoPrime[®]-Medium) zugesetzt und eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach der Antikörper-Inkubation werden die Zelllayer zweimal mit jeweils 100 μ l PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben in Einzelzellen dissoziiert und anschließend flowzytometrisch analysiert.

4.1.2.2 Internalisierung von E-Selektin

E-Selektin wird von Endothelzellen nicht konstitutiv exprimiert, sondern erst durch Stimulation mit inflammatorischen Substanzen wie TNF- α . Das an der Zelloberfläche exprimierte E-Selektin wird nach der Zytokinstimulation durch Endozytose internalisiert und in den Lysosomen abgebaut, was zu einer Abnahme der E-Selektin Moleküle an der Zellmembran führt [14].

Die „entzündeten Zellmonolayer“ in 96-well Platten werden nach Absaugen des Überstandes mit jeweils 100 μ l PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen, anschließend 50 μ l EndoPrime[®]-Medium pro well zugesetzt und 30, 60, 90, 120 oder 150 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird das überstehende Medium abgesaugt und membrangebundenes E-Selektin durch Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Dazu werden pro well 50 μ l Lösung des Fluorescein-markierten E-Selektin-Antikörpers (1 μ l Stammlösung in 49 μ l EndoPrime[®]-Medium) zugesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zusätzlich

werden entzündete Zellen unmittelbar nach der Zytokinstimulation mit Antikörper-Lösung inkubiert, um das Ausmaß der E-Selektin-Expression direkt nach der Entzündung zu detektieren. Nach der Antikörper-Inkubation wird der Überstand abgesaugt, die Zellschichten zweimal mit jeweils 100 µl PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben in Einzelzellen dissoziiert und flowzytometrisch analysiert.

4.1.2.3 Internalisierung des E-Selektin-Antikörper-Komplexes

Die „entzündeten Zellmonolayer“ werden nach Absaugen des Überstandes mit jeweils 100 µl PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und das infolge der Entzündung exprimierte E-Selektin mit dem fluoreszenzmarkierten E-Selektin-Antikörper detektiert. Dazu werden pro well 50 µl E-Selektin-Antikörperlösung (1 µl Stammlösung in 49 µl EndoPrime[®]-Medium) zugesetzt und eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit jeweils 100 µl PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ werden pro well 50 µl EndoPrime[®]-Medium zugesetzt und 30, 60, 90 oder 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellschichten noch einmal mit jeweils 100 µl PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, in Einzelzellen dissoziiert und anschließend flowzytometrisch analysiert. Um das Ausmaß der E-Selektin-Expression unmittelbar nach Entzündung zu detektieren werden Zellen nach Antikörper-Zusatz, die nicht mit EndoPrime[®]-Medium inkubiert wurden, als Vergleich verwendet.

Da der Zellstoffwechsel bei 4°C minimiert ist und demzufolge keine E-Selektin-Internalisierung stattfinden sollte, wurde der Versuch als Kontrolle zusätzlich wie oben beschrieben durchgeführt, wobei die Inkubationstemperatur mit EndoPrime[®]-Medium auf 4°C gesenkt wurde.

Nach der flowzytometrischen Analyse wird zur Zellsuspension das entsprechende Volumen Monensin-Stammlösung (1,5 mg/ml in Ethanol) zugesetzt, um eine Endkonzentration von 13,53 µg/ml zu erreichen, gut resuspendiert und nach dreiminütiger Inkubation nochmals im Durchflussscytometer analysiert. Monensin, ein selektives Ionophor, bewirkt durch Austausch von Protonen gegen Natriumionen, eine Neutralisation des pH-Wertes

in den Lysosomen. Bei der Endozytose verhindert Monensin die Internalisierung zwar nicht, jedoch kann der intrazelluläre Abbau von internalisierten Liganden durch Inaktivierung von lysosomalen Enzymen bei neutralem pH-Wert verhindert werden [15]. Die Quantenausbeute von Fluorescein ist stark vom pH-Wert abhängig und fällt unterhalb von pH 7 stark ab. Daher sollte durch Neutralisation des lysosomalen pH-Wertes die ursprüngliche Fluoreszenzintensität nach Monensin-Zusatz wiederhergestellt werden, falls der Farbstoff in Form eines Konjugates im Lysosom angereichert wurde.

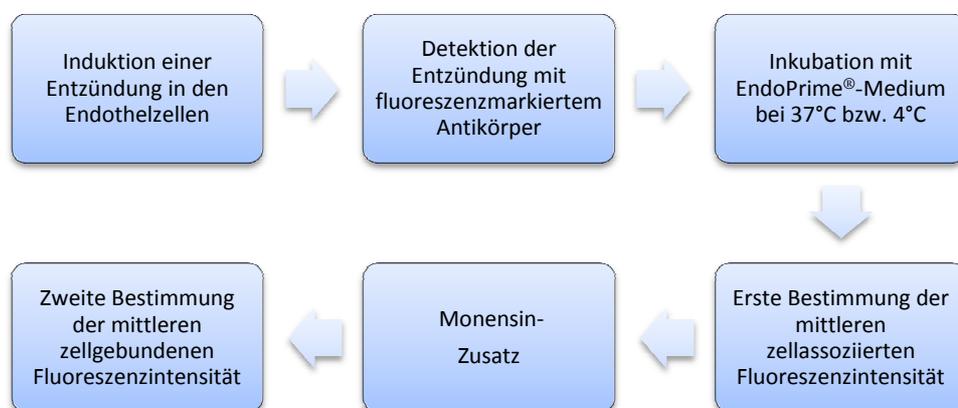


Abbildung 2: Schema des Versuchsprotokolles zur Erfassung der Internalisation des E-Selektin-Antikörper Komplexes

4.2 Flowzytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von Zellen und Partikeln und bietet den Vorteil, dass jede Zelle einzeln charakterisiert werden kann. Mit dem Beckman Coulter Gallios Flow Cytometer™ (6 Farben, 2 Laser) können Aussagen über Zahl, Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität der Einzelzellen durch Streuung des eingestrahlten Laserlichtes getroffen werden. Die verwendeten Messgrößen sind die Intensität des Vorwärtsstreulichtes (Forward Scatter, FS), welche linear mit der Partikelgröße zunimmt und die Intensität des Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SS), die Aussagen über die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen erlaubt. Je glatter die Oberfläche, desto kleiner und je rauer die Oberfläche, desto höher ist das Messsignal des Seitwärtsstreulichtes. Neben der Streuung des Lichtes können auch Fluoreszenzfarben im Durchflusszytometer gemessen werden. Die Intensität des Fluoreszenzsignals spiegelt das Ausmaß der Bindung fluoreszenzmarkierter Liganden an jeder einzelnen Zelle wieder. Die Einstellungen des Gerätes erfolgen durch Eichung auf die viabile Population der Zelllinie, mit der die Versuche durchgeführt werden.

Bei der Messung sollte die Verdünnung der Zellsuspension so gewählt werden, dass pro Sekunde ungefähr 100 Zellen detektiert werden. Nach jeder Messung wird mit partikelfreiem PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gespült.

4.3 PEI-modifizierte Mikropartikel

4.3.1 Oberflächenmodifikation mit PEI

Als Ausgangsmaterial wurden fluoreszenzmarkierte, carboxylierte Polystyrol-Mikropartikel mit 1 µm Durchmesser verwendet, deren negative Oberflächenladung mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI) (verzweigt, MG: 10000 g/mol) umgepolt werden sollte, um eine positive Oberflächenladung zu erhalten.

Probenvorbereitung:

PEI wird gegen Aqua dest. in einer semipermeablen Cellulosemembran (MWCO 2000, ZelluTrans ROTH®, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) erschöpfend dialysiert, um die als Stabilisator enthaltenen NH_4^+ -Ionen zu entfernen, da diese bei der Oberflächenmodifikation der Mikropartikel die elektrostatische Bindung von PEI antagonisieren würden.

Die zur Synthese verwendeten Eppendorfgefäße werden vor Verwendung mit PEI beschichtet. Dazu werden diese mit dialysierter PEI-Lösung gefüllt, zehn Minuten auf einer Schüttelapparatur geschwenkt und anschließend mit Aqua dest. gewaschen. Dadurch sollen mögliche Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Partikeln und der negativ geladenen Kunststoffoberfläche verhindert werden und in weiterer Folge reproduzierbarere Ergebnisse bei der Herstellung bzw. eine höhere Stabilität der PEI-modifizierten Partikel erzielt werden.

Ausführung:

100 µl PEI-Lösung (5 mg/ml in 100mM Phosphatpuffer pH 5,8) werden in einem PEI-beschichteten Eppendorfgefäß vorgelegt, im Ultraschallbad 100 µl einer Suspension der Polystyrolpartikel (10 mg/ml in Aqua dest.) tropfenweise zugesetzt und 20 Minuten lang inkubiert.

Anschließend werden 1,3 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 5,8 zugesetzt, im Ultraschallbad resuspendiert und die Partikelsuspension danach bei 14000 UpM bei 4°C drei Minuten zentrifugiert. Nach Abheben des Überstandes werden die Partikel zweimal mit jeweils 1,5 ml Aqua dest. gewaschen. Dazu werden die Partikel nach Zugabe von Aqua dest. im Ultraschallbad gut resuspendiert,

anschließend zentrifugiert und nach Abheben des Überstandes in 100 µl Aqua dest. resuspendiert. Daraufhin werden die Partikel ein zweites Mal mit PEI behandelt. Hierfür werden wie im ersten Schritt 100 µl PEI-Lösung (5 mg/ml in 100 mM Phosphatpuffer pH 5,8) in einem PEI-beschichteten Eppendorfgefäß vorgelegt, tropfenweise 100 µl Suspension der bereits mit PEI-behandelten Partikel zugesetzt und 20 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Danach werden die Partikel einmal mit 1,3 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 5,8 und anschließend noch zweimal mit jeweils 1,5 ml 20 mM HEPES-Puffer pH 7,0 gewaschen. Bei jedem Waschschrift wird die Partikelsuspension jeweils nach Zusatz der Waschflüssigkeit resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand abgehoben. Schließlich werden die Partikel in 1 ml 20 mM HEPES-Puffer pH 7,0 resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C unter Lichtausschluss.

4.3.2 Charakterisierung

Zur Charakterisierung der PEI-modifizierten Mikropartikel wird das Zeta-Potential mit dem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, England) bestimmt. Als Vergleich dienen unbehandelte, negativ geladene Mikropartikel.

50 µl Suspension der PEI-modifizierten Partikel bzw. 5 µl Stammsuspension (10 mg/ml in Aqua dest.) der unbehandelten Partikel werden in 2 ml Aqua dest. aufgenommen, im Ultraschallbad resuspendiert und anschließend das Zeta-Potential bestimmt.

Um Unterschiede in der Oberflächenladungsdichte und damit im Zeta-Potential zu bestimmen, empfiehlt es sich in einem Medium mit geringer Ionenstärke wie destilliertem Wasser zu messen, da die zu detektierenden Unterschiede durch Kompression der diffusen Schicht umso geringer werden, je höher die Salzkonzentration und damit die Leitfähigkeit des Messmediums ist [16].

Zusätzlich wird zur Charakterisierung der Partikeloberfläche an Hand der elektrophoretischen Mobilität das Zeta-Potential der PEI-modifizierten Partikel bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 3,7/4,4/5,6/6,7/7,7/8,6/9,4/10,6) bestimmt. Dazu wird eine Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-maleat Pufferlösung pH 5,4-

8,4 hergestellt [17] (Tabelle 1) und vor Gebrauch 1:100 mit Aqua dest. verdünnt, damit die Leitfähigkeit im gewünschten Bereich von $\leq 0,9$ mS/cm liegt. Danach werden 50 μ l Partikelsuspension in 2 ml dieser Pufferlösung gut resuspendiert und, falls nötig, der pH-Wert durch Säure- bzw. Laugezusatz korrigiert. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird nochmals der pH-Wert überprüft und das Zeta-Potential im Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, England) bestimmt.

Tabelle 1: Herstellung einer Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-maleat Pufferlösung pH 5,4 - 8,4. 25 ml 0,2 M Tris-Maleat werden mit x ml 0,2 M NaOH versetzt und mit Aqua dest. auf 100,0 ml aufgefüllt.

pH	x ml 0,2 M NaOH
5,4	5,4
6,4	18,5
7,4	27
8,4	40,5

4.3.3 PEI-Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Partikel-gebundenen PEI-Menge soll der Bradford-assay, der eine quantitative Bestimmung von Aminogruppen erlaubt, entsprechend adaptiert werden.

Reagens: 100 mg Brilliant Blue G werden in 50 ml Ethanol gelöst, 100 ml 85%ige Phosphorsäure zugesetzt und mit Aqua dest. auf 1000,0 ml verdünnt.

Die Lösung ist blau-bräunlich, klar und bei 4°C unter Lichtschutz zwei Wochen haltbar. Das Reagens reagiert mit freien Aminogruppen unter der Bildung eines blauen Farbstoffes, dessen Extinktion 5-50 Minuten stabil ist. Wegen beträchtlicher Schwankungen innerhalb dieses Zeitraumes sollte jedoch ein konstanter Zeitabstand zwischen der Zugabe des Reagens und der Messung eingehalten werden [18].

Ausführung: Während des Herstellungsprozesses von PEI-modifizierten Partikeln werden die Überstände nach Zusatz von Phosphatpuffer pH 5,8 und anschließender Zentrifugation gesammelt. 350 μ l Reagens werden mit 50 μ l

Überstand gut durchmischt und die Extinktion nach 1 Minute bei 595 nm bestimmt (Infinite M200, Tecan, Grödig, Österreich). Anhand der gemessenen Extinktion wird mittels einer zuvor erstellten Eichgerade die freie PEI-Konzentration (C_2) in den Überständen bestimmt. In weiterer Folge wird die Partikel-assoziierte PEI-Menge über Gleichung (1) ermittelt, wobei C_1 die eingesetzte PEI-Konzentration (5 mg/ml) und C_2 die detektierte PEI-Konzentration wiedergibt und C_p der eingesetzten Partikelkonzentration (10 mg/ml) entspricht.

$$\text{PEI – Gehalt} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mg Partikel}} \right) = \frac{(C_1 - C_2)}{C_p} \quad (1)$$

PEI-Eichgerade: 350 µl Reagens werden mit 50 µl PEI-Lösung (0,156 - 0,625 mg/ml in 100 mM Phosphatpuffer pH 5,8) gut durchmischt und die Extinktion nach 1 Minute bei 595 nm bestimmt.

4.4 Partikel-Zell-Interaktion

Alle Zelltypen multizellulärer Organismen weisen eine geladene Zelloberfläche auf. Negative Ladungen werden vorwiegend durch Sialinsäurereste und Phosphatkopfgruppen der Phospholipide verursacht, während positive Ladungen auf ϵ -Aminogruppen der Lysinseitenketten von Membranproteinen zurückzuführen sind. Zwar unterliegt die Verteilung dieser Ladungsträger in der Membran einer örtlichen und zeitlichen Dynamik, jedoch kann davon ausgegangen werden, dass bei allen eukaryontischen Zellen die anionischen Gruppen überwiegen [3].

Dies führt zur Annahme, dass positiv geladene Partikel bevorzugt an die negativ geladene Zelloberfläche binden. Um dies zu überprüfen, wurde die Bindungseffizienz der positiv geladenen Mikroartikel im Vergleich zu negativ geladenen Mikroartikeln an konfluenten Endothelzellmonolayern untersucht. Die Partikelbindungsstudie wurde mit entzündeten sowie nicht-entzündeten Endothelzellen durchgeführt.

Ausführung:

Die konfluenten Zellmonolayer in 96-well Platten werden nach Absaugen des überstehenden Mediums mit jeweils 100 μ l PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, pro well 100 μ l Partikelsuspension (20, 40 und 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) zugesetzt und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes werden die Zellschichten zweimal mit jeweils 100 μ l PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, pro well 100 μ l PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ zugesetzt und anschließend die zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Exzitation: 440nm; Emission: 480nm; Infinite M200, Tecan, Grödig, Austria) bestimmt.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Endothelzellen

5.1.1 Kultivierung und Charakterisierung

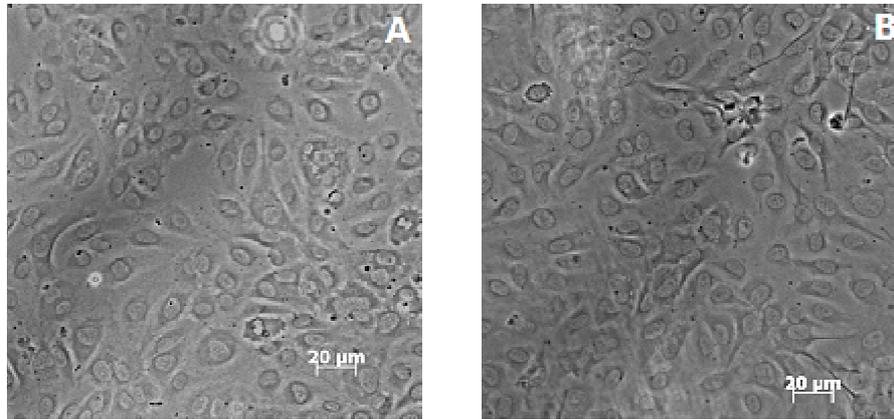


Abbildung 3: Mikroskopische Differentialinterferenzkontrastbilder von HUVEC (A) und HUVECtert (B).

Die Kultivierung von HUVEC sowie HUVECtert war anfangs unproblematisch. Später traten jedoch bei der Kultivierung Kontaminationen mit Bakterien auf. Dies äußerte sich dadurch, dass das Nährmedium in den Zellkulturflaschen nicht mehr klar, sondern trüb war. Daher wurde 5 ml Antibiotika-Lösung (Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B, 100x) pro 500 ml EndoPrime[®]-Medium zugesetzt und zur Kultivierung verwendet. Um zu kontrollieren, ob der Antibiotika-Zusatz Einfluss auf das Zellwachstum ausübt, wurden parallel Zellen ohne Antibiotika weiterkultiviert. Da keine Unterschiede im Wachstum und auch keine morphologischen Veränderungen der Zellen beobachtet werden konnten, wurde der Zusatz von Antibiotika beibehalten.

Bei der Subkultivierung von HUVEC und HUVECtert wuchsen die Zellen rasch an und bildeten konfluente Zellmonolayer aus (Abb. 3). Auch bei der Züchtung von Zellmonolayern in 96-well Platten wuchsen die Zellen rasch an und bildeten für Zellversuche geeignete Monolayer aus.

Obwohl HUVEC als primäre Zelllinie nur begrenzt über 2-8 Passagen subkultivierbar sind, bildeten auch Zellen, die bis zu 15-20 Subkultivierungsschritte durchliefen, rasch adhärente und konfluente Zellrasen aus. Zellen die weit länger subkultiviert wurden, zeigten ein verlangsamtes Wachstum und morphologische Veränderungen. Letztere äußerten sich dadurch,

dass die Zellen nicht mehr ihre ursprünglich rundliche, sondern eine längliche Form aufwiesen.

HUVECtert, eine immortalisierte Zelllinie, konnten über einen wesentlich längeren Zeitraum subkultiviert werden und zeigten erst nach ungefähr 40 Subkultivierungsschritten eine verlangsamte Wachstumsrate.

5.1.2 Durchflusszytometrische Analyse von Endothelzellmonolayern

Um physiologische Gegebenheiten zu berücksichtigen und um Zellverluste zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit die Experimente ausschließlich an Endothelzellmonolayern in 96-well Platten und nicht an Einzelzellen in Suspension durchgeführt. Da eine durchflusszytometrische Analyse jedoch nur an Einzelzellen möglich ist, wurde ein geeignetes Protokoll zur Dissoziation der adhärenen Zellrasen entwickelt. Für diesen Zweck werden üblicherweise Trypsin-EDTA Lösung oder EDTA-Lösung in PBS-Puffer eingesetzt. Trypsin, ein proteinspaltendes Enzym, kann auch antigene Strukturen verändern und führt daher möglicherweise zu einer falschen Beurteilung der Expression von Zelloberflächen-Molekülen. Um die bestgeeignete Methode herauszufinden, wurde sowohl mit Trypsin-EDTA- als auch mit EDTA-Lösung ein Protokoll zur Darstellung von Einzelzellsuspensionen entwickelt und anschließend miteinander verglichen.

Darstellung von Einzelzellsuspensionen mit Trypsin-EDTA:

In den folgenden Untersuchungen an HUVEC und HUVECtert wurden die Monolayer unterschiedlich lange mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Um zu überprüfen, ob Trypsin-EDTA in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer die E-Selektin-Expression beeinflusst, wurde zuvor eine Entzündung in den Zellen induziert und mit einem Fluorescein-markierten Antikörper gegen E-Selektin detektiert. Zusätzlich wurden Zellen, die mit oder ohne Antikörper inkubiert wurden, flowzytometrisch analysiert.

➤ HUVEC

Tabelle 2: Einfluss der Inkubationsdauer mit Trypsin-EDTA auf die Viabilität und E-Selektin- Expression von gesunden und entzündeten HUVEC-Monolayern. Die Entzündung wurde durch TNF- α (10 ng/ml, Inkubation 4 Stunden) induziert und an Hand von E-Selektin durch Detektion mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) verifiziert. Anschließend wurden die Zelllayer mit Trypsin-EDTA in Einzelzellen dissoziiert (n=1).

Trypsin-EDTA-Inkubationszeit	Lebende Zellen (%)			Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität		
	Ohne TNF- α , ohne AK	Ohne TNF- α , mit AK	Mit TNF- α , mit AK	Ohne TNF- α , ohne AK	Ohne TNF- α , mit AK	Mit TNF- α , mit AK
10 Sekunden	42,5	28,6	63,5	0,213	0,306	4,57
30 Sekunden	63,4	60,6	70,8	0,216	0,423	3,24
1 Minute	66,9	72,9	68,6	0,210	0,328	3,64
5 Minuten	67,0	74,4	68,8	0,202	0,385	3,42
10 Minuten	67,4	75,3	69,8	0,203	0,414	3,98
30 Minuten	65,2	73,0	69,9	0,216	0,633	4,40

Die Durchflusszytometrie (Tabelle 2) ergab, dass HUVEC-Monolayer durch Behandlung mit Trypsin-EDTA, entsprechend einer Zellviabilität von bis zu 75,3%, in Einzelzellen dissoziiert wurden. Eine 10 Sekunden lange Inkubation mit Trypsin-EDTA ergab nur 28,6%, 42,5% bzw. 63,5% viable Zellen, was auf eine unzureichende Ablösung der adhärennten Zelllayer und damit eine zu kurze Inkubationsdauer zurückzuführen ist. Bereits eine Erhöhung der Inkubationsdauer auf eine Minute ergab mit 66,9%, 72,9% bzw. 68,6% eine deutliche Zunahme an viablen Zellen. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit auf 5, 10 oder 30 Minuten bewirkte tendenziell keine weitere Zunahme an lebenden Zellen.

Außerdem zeigten die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse, dass HUVEC nach Stimulation mit TNF- α , entsprechend einer zellgebundenen Fluoreszenzintensität von bis zu 4,57, E-Selektin exprimieren. Zellen, die weder mit TNF- α noch mit Antikörper inkubiert wurden, zeigten mit einer relativen Fluoreszenzintensität (RFI) $\leq 0,216$ eine geringe Autofluoreszenz. Die RFI von Zellen, die nicht mit TNF- α jedoch mit Antikörper behandelt wurden, wiesen eine geringfügig höhere RFI von $\leq 0,633$ auf, welche die Summe aus Autofluoreszenz und unspezifischer Antikörperbindung widerspiegelt. Darüber hinaus führten unterschiedliche Trypsin-EDTA Inkubationszeiten zu Schwankungen der detektierten zellassozierten Fluoreszenzintensitäten von entzündeten Zellen. Möglicherweise

wird exprimiertes E-Selektin durch die proteolytische Aktivität von Trypsin degradiert, sodass Unterschiede in der E-Selektin-Expression und damit in der zellgebundenen Fluoreszenzintensität detektiert wurden. Dementsprechend ergab eine kurze, 10 Sekunden lange Inkubation mit Trypsin die höchste zellgebundene RFI. Im Gegensatz dazu nahm jedoch die Fluoreszenz der Zellen mit steigender Trypsin-EDTA Inkubationsdauer nicht kontinuierlich ab, sondern betrug nach 30-minütiger Inkubation immer noch 96,3% des Ausgangswertes. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass es durch Bildung von Antikörperaggregaten mit inhärenter Fluoreszenz zu den detektierten Schwankungen kam.

Da der Anteil an lebenden Zellen in der Suspension bei Erhöhung der Trypsin-EDTA Inkubationszeit tendenziell nicht weiter anstieg, wurde in allen weiteren Versuchen zur Darstellung viabler Einzelzellen eine Trypsin-EDTA Inkubationsdauer von 1 Minute gewählt, wobei gleichzeitig aufgrund der zellschädigenden Wirkung von Trypsin-EDTA die Einwirkdauer auf die Zellen möglichst kurz gehalten wurde.

➤ HUVECTert

Tabelle 3: Einfluss der Inkubationsdauer mit Trypsin-EDTA auf die Viabilität und E-Selektin- Expression von gesunden und entzündeten HUVECTert-Monolayern. Die Entzündung wurde durch TNF- α (10 ng/ml, Inkubation 4 Stunden) induziert und an Hand von E-Selektin durch Detektion mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) verifiziert. Anschließend wurden die Zelllayer mit Trypsin-EDTA in Einzelzellen dissoziiert (n=1).

Trypsin-EDTA-Inkubationszeit	Lebende Zellen (%)			Mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität		
	Ohne TNF- α , ohne AK	Ohne TNF- α , mit AK	Mit TNF- α , mit AK	Ohne TNF- α , ohne AK	Ohne TNF- α , mit AK	Mit TNF- α , mit AK
10 Sekunden	46,7	53,5	63,0	0,332	0,345	5,86
30 Sekunden	60,0	55,7	63,4	0,352	0,454	2,80
1 Minute	66,4	75,9	67,0	0,302	0,836	1,79
5 Minuten	67,2	78,5	65,3	0,304	0,398	1,91
10 Minuten	64,8	82,2	71,3	0,280	0,465	2,20
30 Minuten	64,8	78,4	66,9	0,307	0,720	3,02

Wie die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, wurden auch HUVECtert-Monolayer durch Behandlung mit Trypsin-EDTA, entsprechend einer Zellviabilität von bis zu 82,2 %, von der Wachstumsfläche gelöst und in Einzelzellen dissoziiert. Während 10 Sekunden Inkubation mit Trypsin-EDTA nicht ausreichend sind, um alle adhären Zellen zu dissoziieren, liegen nach einer Trypsin-EDTA Inkubationszeit von einer Minute 66,4%, 75,9% bzw. 67,0% viabile Einzelzellen vor. Wie bereits bei HUVEC beobachtet, traten auch bei HUVECtert-Monolayern nach einer Inkubationszeit von einer Minute kaum Unterschiede in der Lebendzellzahl auf, sodass nach 5, 10 oder 30 Minuten Trypsin-EDTA-Behandlung annähernd gleiche Anteile viabler Zellen vorlagen wie nach der einminütigen Inkubation.

Auch HUVECtert-Monolayer exprimieren nach Entzündung mit TNF- α , entsprechend einer mittleren zellgebundenen Fluoreszenzintensität $\leq 5,86$, E-Selektin, während Zellen die weder mit TNF- α noch mit Antikörper behandelt wurden mit einem Wert $\leq 0,352$ nur eine geringe Autofluoreszenz zeigten. Gesunde HUVECtert-Monolayer, die mit Antikörper inkubiert wurden, zeigten eine geringfügig höhere Fluoreszenzintensität $\leq 0,836$, welche die Summe aus Autofluoreszenz der Zellen und unspezifische Antikörperbindung darstellt (Tabelle 3). Nach Induktion der Entzündung variierten auch bei HUVECtert die detektierten zellgebundenen Fluoreszenzintensitäten nach unterschiedlich langer Behandlung mit Trypsin-EDTA, jedoch wesentlich deutlicher als bei HUVEC. So entsprach die Fluoreszenzintensität von Zellen, die 30 Sekunden mit Trypsin-EDTA behandelt wurden, nur 47,8% der 10-sekündigen Inkubation und auch nach einer Inkubationszeit von 1, 5 oder 10 Minuten fluoreszierten die Zellen deutlich schwächer. Dies beruht wie bereits oben erwähnt möglicherweise darauf, dass Trypsin den E-Selektin-Antikörperkomplex degradiert und so die tatsächliche Fluoreszenzintensität fälschlicherweise vermindert. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Entzündung dieser immortalisierten Endothelzellen aufgrund ihrer erhöhten Empfindlichkeit ungleichmäßig ausfiel und sich daraus beträchtliche Schwankungen in den Fluoreszenzintensitäten ergaben. Auch die Bildung von Antikörperaggregaten könnte eine mögliche Ursache dafür gewesen sein.

Da die Zellviabilität ab einer Inkubationszeit von einer Minute tendenziell nicht weiter anstieg und um die Einwirkdauer aufgrund der zellschädigenden Wirkung

von Trypsin-EDTA möglichst kurz zu halten, wurden HUVECtert in allen weiteren Versuchen eine Minute lang mit Trypsin-EDTA behandelt.

Darstellung von Einzelzellsuspensionen mit EDTA-Lösung:

Im folgenden Versuch wurden unterschiedliche EDTA-Konzentrationen (0,1%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 5% oder 10% in PBS-Puffer) eingesetzt. Dazu wurden die Zelllayer mit 50 µl EDTA-Lösung/well versetzt und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl an lebenden Zellen flowzytometrisch quantifiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen, die mit PBS-Puffer ohne EDTA behandelt wurden, herangezogen.

Tabelle 4: Prozentanteil lebender Einzelzellen nach 30 Minuten Inkubation der Monolayer mit 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1%, 5% oder 10% EDTA in PBS-Puffer im Vergleich zu PBS-Puffer (n=1).

EDTA-Konzentration (%)	Anteil lebender Zellen (%)	
	HUVEC	HUVECtert
0 (PBS-Puffer)	15,8	58,8
0,1	66,9	73,9
0,25	66,2	74,2
0,5	61,0	69,5
1	58,7	78,4
2	61,7	74,2
5	22,1	42,1
10	13,8	18,3

Die flowzytometrische Untersuchung (Tabelle 4) ergab, dass HUVEC bzw. HUVECtert durch Behandlung mit EDTA-Lösung von der Wachstumsfläche gelöst und in Einzelzellen dissoziiert wurden. Nach Behandlung mit 0,1%iger und 0,25%iger EDTA-Lösung war der Anteil an lebenden HUVEC mit ungefähr zwei Dritteln am höchsten, während nach Inkubation mit PBS-Puffer ohne EDTA aufgrund der geringen Dissoziation der Monolayer nur 15,8% viabile Zellen detektiert wurden. Auch 0,5%ige-2%ige EDTA-Lösungen waren für die Dissoziation der Zelllayer geeignet, da etwa 60% viabile Zellen in Suspension vorlagen. Im Gegensatz dazu ergaben höher konzentrierte EDTA-Lösungen von 5% oder 10% nur 22,1% bzw. 13,8% viabile Einzelzellen. In diesem hohen Konzentrationsbereich dürfte EDTA als Komplexbildner für Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen nicht nur zum Funktionsverlust von Zelladhäsionsproteinen führen, sondern auch zur Zellschädigung durch Entzug dieser lebensnotwendigen Ionen.

Auch aus HUVECtert Monolayern konnten mit 0,1%iger-2%iger EDTA-Lösung 70%-80% viabile Zellen isoliert werden. Verglichen dazu war die Zellüberlebensrate bei einer EDTA-Konzentration von 5% oder 10%, mit einer Viabilität von 42,1% bzw. 18,3%, sehr niedrig.

Daher konnten Endothelzellmonolayer durch Behandlung mit EDTA-Lösung in PBS-Puffer von der Wachstumsfläche gelöst und in viabile Einzelzellen dissoziiert werden. Eine ausreichende Anzahl an viabilen Einzelzellen aus HUVEC und HUVECtert Monolayern wurde mit 0,1%iger-1%iger EDTA-Lösung erzielt, sodass dieser Konzentrationsbereich im folgenden Experiment näher untersucht wurde. Um mögliche Zellverluste aufgrund der zellschädigenden Wirkung von EDTA einzuschränken, wurde die Inkubationsdauer auf 5 Minuten gesenkt. Als Vergleich diente eine Inkubationszeit von 30 Minuten.

Tabelle 5: Prozentanteil lebender HUVEC- bzw. HUVECtert-Einzelzellen nach 5 bzw. 30 Minuten Inkubation der entsprechenden Monolayer mit 0,1%, 0,5%, 1% oder 5% EDTA in PBS-Puffer (n=1).

	Anteil lebender Zellen (%)	
	HUVEC	HUVECtert
0.1% EDTA 30 min Inkubation	62,3	75,2
0.5% EDTA 30 min Inkubation	62,0	68,1
1% EDTA 30 min Inkubation	61,4	72,8
0.1% EDTA 5 min Inkubation	67,1	80,0
0.5% EDTA 5 min Inkubation	62,7	75,4
1% EDTA 5 min Inkubation	66,9	71,6
5% EDTA 5 min Inkubation	62,9	72,0

Wie in Tabelle 5 ersichtlich, ergab eine 30minütige Behandlung mit 0,1%iger-1%iger EDTA-Lösung kaum Unterschiede in der Ausbeute an viabilen HUVEC bzw. HUVECtert Einzelzellen. Durch Reduktion der Inkubationszeit auf 5 Minuten war der Anteil an lebenden HUVEC oder HUVECtert nach Behandlung mit 0,1%iger EDTA-Lösung, entsprechend einem Wert von 67,1% bzw. 80,0%, höher als bei allen anderen untersuchten Konzentrationen und auch höher als bei 30-minütiger Inkubation. Daher wurden in allen weiteren Untersuchungen die Zelllayer 5 Minuten lang mit 0,1%iger EDTA-Lösung zur Darstellung von Einzelzellsuspensionen behandelt.

HUVECtert zeigten eine tendenziell höhere Zellviabilität als HUVEC. Möglicherweise ist die Adhärenz dieser immortalisierten Endothelzellen schwächer als jene von Primärzellen sodass HUVECtert Monolayer leichter in Suspension überführt werden können.

In den vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass zur Darstellung von Einzelzellsuspensionen aus Monolayern Trypsin-EDTA und EDTA-Lösung in PBS-Puffer eingesetzt werden können. Um zu beurteilen zu können, welche Methode geeigneter ist und ob Trypsin eine Veränderung der E-Selektin-Expression bewirkt, wurden die Monolayer nach Entzündung mit TNF- α und Antikörper-Inkubation mit Trypsin-EDTA bzw. EDTA-Lösung behandelt.

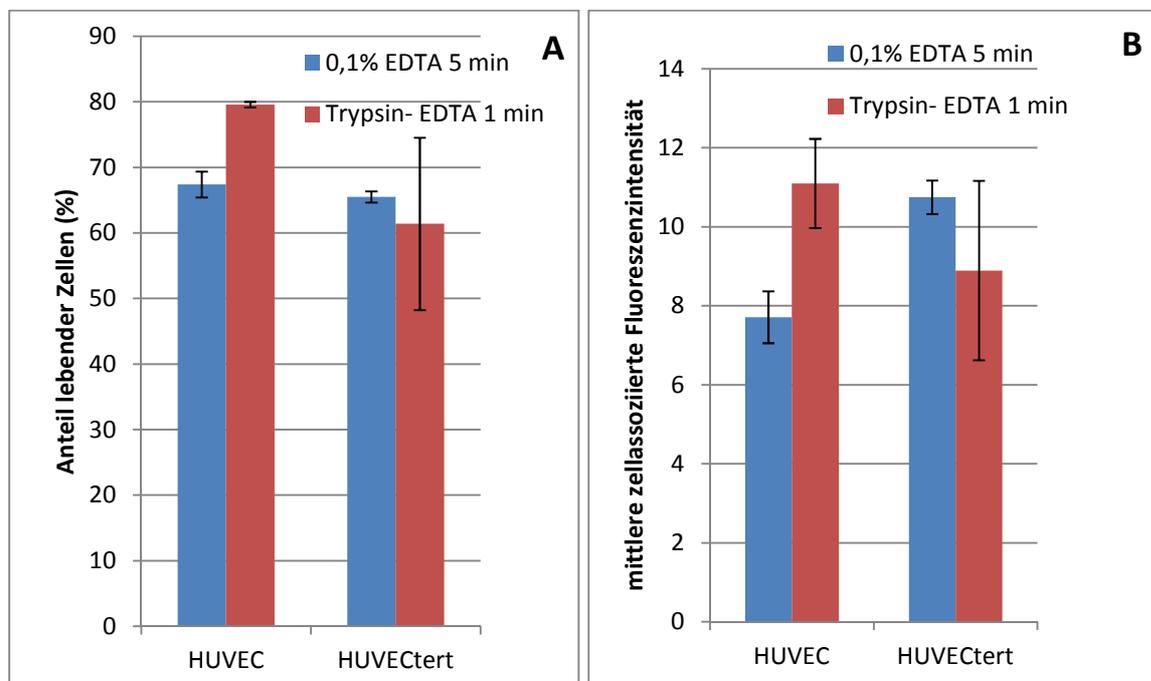


Abbildung 4: Prozentanteil lebender HUVEC- bzw. HUVECtert-Einzelzellen (A) und mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität der lebenden HUVEC- bzw. HUVECtert-Einzelzellen (B) nach Entzündung mit TNF- α (10 ng/ml, Inkubation 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde). Anschließend wurden die Zellschichten mit 0,1%iger EDTA-Lösung in PBS-Puffer (5 Minuten Inkubation) oder mit 0,25%iger Trypsin-EDTA-Lösung (1 Minute Inkubation) in Einzelzellen dissoziiert (n=2).

Die flowzytometrische Analyse (Abbildung 4A) zeigte, dass der Anteil an lebenden HUVEC mit 79,6% nach Inkubation mit Trypsin-EDTA deutlich höher war als nach Inkubation mit EDTA-Lösung, während bei HUVECtert keine signifikanten Unterschiede in der Viabilität detektiert wurden.

Wie in Abbildung 4B ersichtlich, fluoreszierten HUVEC nach Behandlung mit Trypsin-EDTA mit einer RFI von 11,1 deutlich intensiver als Zellen die mit EDTA-Lösung „gespalten“ wurden. Dadurch konnte eine Beeinträchtigung von exprimiertem E-Selektin und des E-Selektin-Antikörperkomplexes durch Trypsin weitgehend ausgeschlossen werden. Die detektierten Unterschiede in den zellassozierten Fluoreszenzintensitäten nach Spaltung mit Trypsin bzw. EDTA dürfte demnach auf der Isolierung einer geringeren Anzahl lebender, fluoreszierender Zellen nach „Spaltung“ mit EDTA-Lösung beruhen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung konnte bei HUVECtert kein wesentlicher Unterschied in der zellgebundenen Fluoreszenzintensität und damit in der E-Selektin-Expression festgestellt werden.

Da der Anteil an viablen HUVEC-Einzelzellen nach Behandlung mit Trypsin-EDTA deutlich höher war und eine verminderte Expression von E-Selektin bzw. Degradation des E-Selektin-Antikörperkomplexes ausgeschlossen werden konnte, wurde Trypsin-EDTA weiterhin zur Isolierung von Einzelzellsuspensionen eingesetzt.

5.1.3 Induktion der Entzündung von Endothelzellen

5.1.3.1 Expression von E-Selektin

Durch Behandlung mit TNF- α kann eine Entzündung von Endothelzellen induziert werden, die sowohl qualitativ mikroskopisch nach Immunfluoreszenzfärbung von E-Selektin als auch quantitativ in Suspensionskulturen flowzytometrisch nachweisbar ist. Jedoch nimmt die Zahl an viablen Zellen in der Suspension nach Induktion einer Entzündung stark ab. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Endothelzellen eine Wachstumsfläche für ihre Lebensfähigkeit benötigen, sodass Untersuchungen an Zellen in Suspension zu einer Einschränkung der Lebendzellzahl führen. Um Zellverluste weitgehend zu vermeiden und um die physiologischen Gegebenheiten besser nachzuahmen, wurde in der vorliegenden Arbeit deshalb die Entzündung an konfluenten Zellmonolayern induziert.

Da sowohl die Inkubationsdauer als auch die Konzentration von TNF- α die entscheidenden Parameter bei der Induktion einer Entzündung darstellen, sollten zur in-vitro Generierung eines entzündeten Endothels TNF- α Konzentration und Inkubationszeit variiert werden. Zur Evaluierung wurde das Ausmaß der E-Selektin-Expression mit Hilfe eines Fluorescein-markierten E-Selektin-Antikörpers flowzytometrisch quantifiziert.

Optimierung der Inkubationsdauer mit TNF- α :

➤ HUVEC

In der folgenden Untersuchung wurden HUVEC-Monolayer 2 oder 4 Stunden mit TNF- α inkubiert und die Entzündung mit E-Selektin-Antikörper, im Vergleich zu gesunden Zellen, detektiert. Als zweite Negativkontrolle dienten gesunde Zellen, die mit Antikörper behandelt wurden.

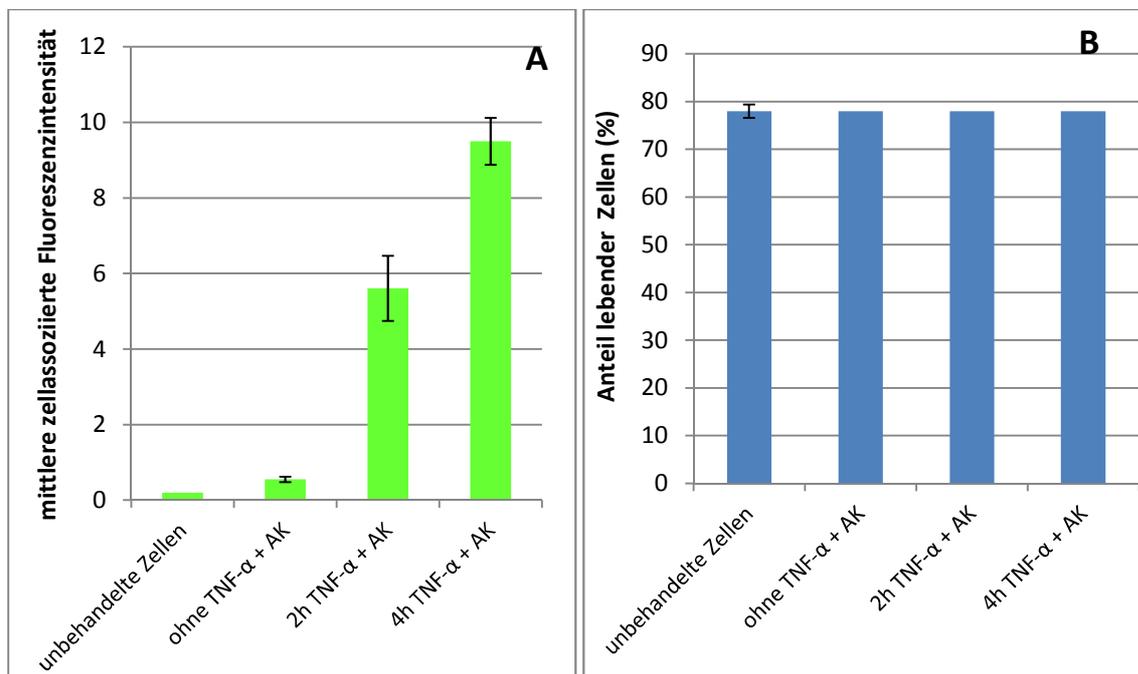


Abbildung 5: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm) von lebenden HUVEC-Einzelzellen (A) sowie Prozentanteil lebender HUVEC-Einzelzellen (B) nach Entzündung mit TNF- α (50 ng/ml, Inkubation 2 oder 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen mit oder ohne Antikörper-Zusatz.

Die Durchflusszytometrie (Abbildung 5A) ergab, dass HUVEC nach Entzündung mit TNF- α , entsprechend einer mittleren zellassozierten Fluoreszenzintensität von bis zu $9,5 \pm 0,62$, signifikant um das 17-fache mehr E-Selektin exprimieren als gesunde Zellen, die mit einer RFI von $0,55 \pm 0,07$ nur eine geringe Fluoreszenz zeigten, welche auf die Autofluoreszenz der Zellen sowie eine vernachlässigbare unspezifische Antikörper-Bindung zurückzuführen ist. Auch Zellen, die weder mit TNF- α noch mit Antikörper inkubiert wurden, besaßen eine mittlere zellgebundenen Fluoreszenzintensität von $0,2 \pm 0$, die der geringen Autofluoreszenz der Zellen und keiner E-Selektin bedingte Fluoreszenz entsprach. Die E-Selektin-Expression und damit die Stärke der Entzündung war von der TNF- α Inkubationsdauer abhängig, da die mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität nach vierstündiger Inkubation 1,7mal höher war als nach zweistündiger Inkubation.

Die Induktion der Entzündung durch TNF- α übte bei den untersuchten Inkubationszeiten keinen negativen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen aus, da der Anteil an lebenden Zellen sowohl nach zwei- als auch nach vierstündiger Inkubation 78% betrug und jener nicht entzündeter Zellen entsprach (Abb. 5B).

Da die vorhergehende Untersuchung bestätigt hat, dass HUVEC nach Zytokinstimulation E-Selektin exprimieren und die TNF- α Inkubationsdauer einen möglichen kritischen Parameter bei der Induktion der Entzündung darstellt, sollte im nächsten Versuch überprüft werden, ob die Expression von E-Selektin bei Erhöhung der TNF- α Inkubationszeit weiter ansteigt.

Dazu wurden HUVEC 4, 6, 8 oder 24 Stunden mit TNF- α behandelt und die Entzündung mit E-Selektin-Antikörper, im Vergleich zu gesunden Zellen mit Antikörper-Inkubation als Negativkontrolle, detektiert.

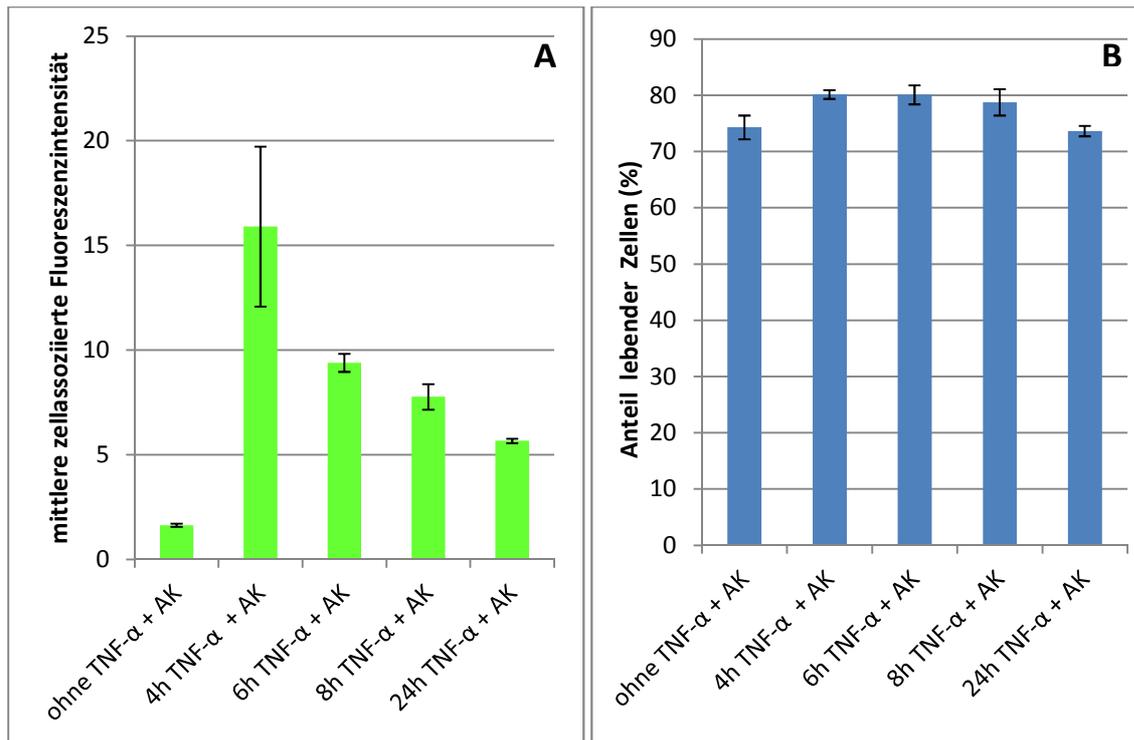


Abbildung 6: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm) von lebenden HUVEC-Einzelzellen (A) und Prozentanteil lebender HUVEC-Einzelzellen (B) nach Entzündung mit TNF- α (50 ng/ml, Inkubation 4, 6, 8 oder 24 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen mit Antikörper-Zusatz.

Wie in Abbildung 6A ersichtlich, bestätigte die Untersuchung, dass HUVEC nach Behandlung mit TNF- α , entsprechend einer mittleren zellassozierten Fluoreszenzintensität von bis zu $15,9 \pm 3,82$, signifikant 9,7-mal mehr E-Selektin exprimieren als nicht entzündete Zellen, die mit einer RFI von $1,64 \pm 0,08$ nur eine geringe Fluoreszenz zeigten. Nach vierstündiger Inkubation mit TNF- α wurde die maximale E-Selektin-Expression erreicht und diese nahm mit steigender Inkubationsdauer nach 24 Stunden auf ein Drittel des Maximalwertes ab. Aus der Literatur ist bekannt, dass an der Zelloberfläche exprimiertes E-Selektin durch Endozytose internalisiert wird und es dadurch zur Abnahme von E-Selektin an der Zellmembran kam. Zusätzlich nahm der Anteil an lebenden Zellen mit zunehmender TNF- α Inkubationsdauer tendenziell ab. So waren nach 24 Stunden Inkubation mit TNF- α 73,7% der Zellen viabil, während der Anteil an lebenden Zellen nach der vierstündigen Inkubation mit einem Wert von 80,2% deutlich höher war (Abb. 6B). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass TNF- α als Entzündungsfaktor die Zellen nicht nur entzündet und demzufolge schädigt, sondern sie zum Teil so stark beeinträchtigt, dass sie absterben.

Da HUVEC, die 4 Stunden mit TNF- α behandelt wurden eine signifikante E-Selektin-Expression zeigten und keine Einschränkung in der Zellviabilität beobachtet werden konnte, wurde diese Inkubationsdauer in allen weiteren Untersuchungen beibehalten.

➤ HUVEctert

Um eine Entzündung auch an immortalisierten Endothelzellen zu induzieren, wurden diese 2, 4 oder 6 Stunden mit TNF- α behandelt und E-Selektin mit Fluorescein-markiertem Antikörper nachgewiesen. Als Referenz wurden gesunde Zellen, die mit Antikörper inkubiert wurden, herangezogen.

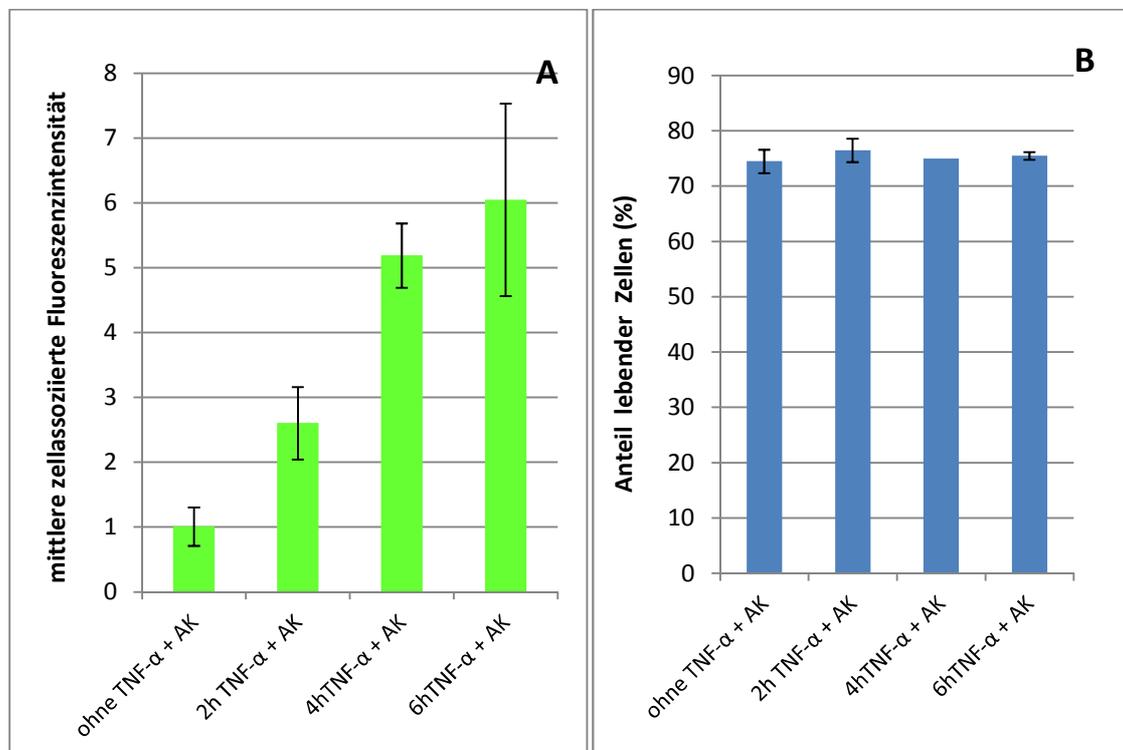


Abbildung 7: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm) von lebenden HUVEctert-Einzelzellen (A) und Prozentanteil lebender HUVEctert-Einzelzellen (B) nach Entzündung mit TNF- α (50 ng/ml, Inkubation 2, 4 oder 6 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen mit Antikörper-Zusatz (n=2).

Die Untersuchung (Abbildung 7A) ergab, dass HUVEctert nach Inkubation mit TNF- α , entsprechend einer mittleren zellassoziierten Fluoreszenzintensität von bis zu $6,05 \pm 1,48$, signifikant sechsmal mehr E-Selektin exprimieren als gesunde Zellen, welche mit einer RFI von $1,01 \pm 0,3$ nur eine geringe und keine E-Selektin bedingte Fluoreszenz zeigten. Das Ausmaß der E-Selektin-Expression nahm mit

der TNF- α -Inkubationsdauer zunächst zu, da die mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität nach 4 Stunden TNF- α dem doppelten Wert der zweistündigen Inkubation entsprach. Zellen die 4 oder 6 Stunden mit TNF- α inkubiert wurden zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied in der E-Selektin-Expression, da die zellassozierte Fluoreszenzintensität nur geringfügig von $5,19 \pm 0,49$ auf $6,05 \pm 1,48$ anstieg.

Die Überlebensrate der Zellen war nahezu unabhängig von der Inkubationsdauer und nahm nur geringfügig von 76,5% nach zweistündiger auf 75,5% nach sechsstündiger Inkubation ab (Abb. 7B).

Da Zellen, die 4 Stunden mit TNF- α behandelt wurden eine deutliche E-Selektin-Expression zeigten und im Vergleich zur sechsstündigen Inkubation keine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität detektiert werden konnte, wurden in allen weiteren Versuchen HUVECTert vier Stunden mit TNF- α inkubiert. Verglichen mit primären Endothelzellen (Abb. 5, Abb. 6) exprimieren HUVECTert nach Entzündung mit TNF- α unter identen Bedingungen weniger E-Selektin, da letztere deutlich schwächer fluoreszierten. Möglicherweise ist die reduzierte Empfindlichkeit von HUVECTert gegenüber TNF- α auf die Immortalisierung zurückzuführen.

Optimierung der TNF- α -Konzentration:

Um die TNF- α Menge zu optimieren, wurden HUVEC bzw. HUVECTert 4 Stunden mit TNF- α in einer Konzentration von 1, 10, 25 oder 50 ng/ml behandelt. Die Entzündung wurde mit E-Selektin-Antikörper nachgewiesen und mit gesunden Zellen, die nur mit Antikörper behandelt wurden, verglichen.

➤ HUVEC

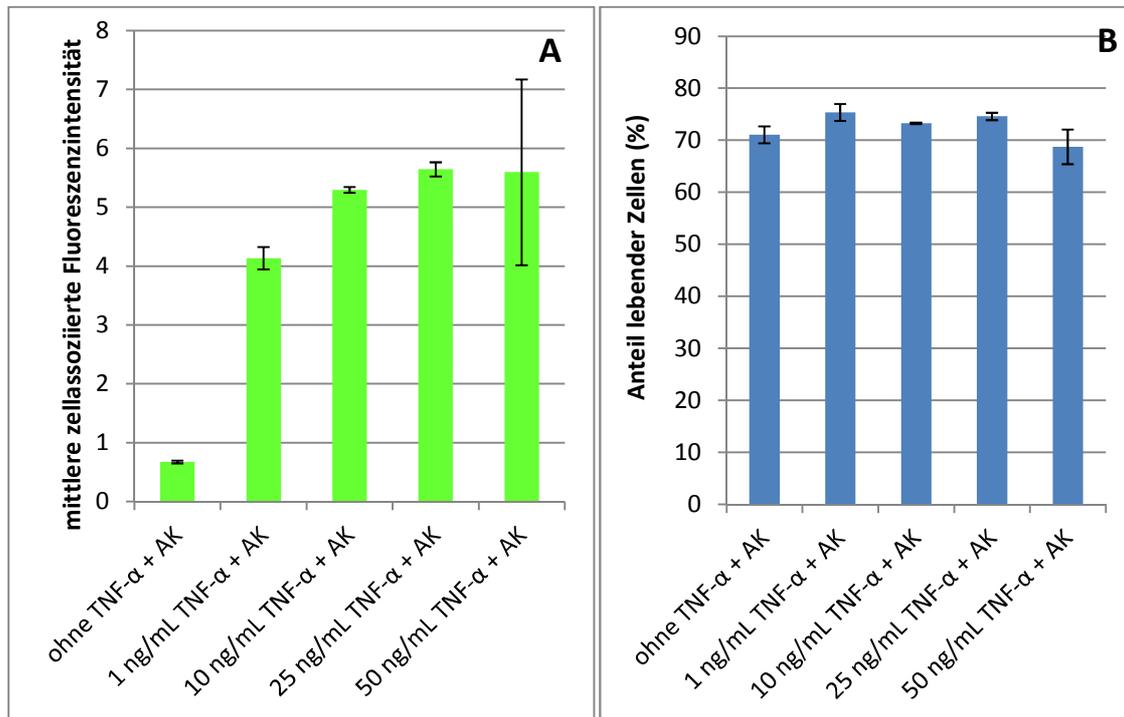


Abbildung 8: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm) von lebenden HUVEC-Einzelzellen (A) und Prozentanteil lebender HUVEC-Einzelzellen (B) nach Entzündung mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen (Inkubation 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen mit Antikörper-Zusatz (n=2).

Wie in Abbildung 8A ersichtlich, nahm die Expression von E-Selektin an der Zellmembran von HUVEC-Monolayern durch Induktion mit TNF- α , entsprechend einer mittleren zellgebundenen Fluoreszenzintensität von bis zu $5,65 \pm 0,12$, zu. Im Gegensatz dazu zeigten nicht stimulierte Zellen mit einer RFI von 0,68 nur eine geringe Autofluoreszenz. Bereits 1 ng/ml TNF- α bewirkte eine signifikante Expression von E-Selektin, die sich im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen in einer sechsfachen RFI manifestierte. Monolayer, die mit 10 oder 25 ng/ml TNF- α behandelt wurden, zeigten einen geringen Unterschied in der E-Selektin-Expression und auch nach Inkubation mit 50 ng/ml TNF- α wurde keine weitere Zunahme in der Fluoreszenzintensität festgestellt, wobei der Anteil an lebenden Zellen gleichzeitig deutlich auf 68,8% abnahm (Abb. 8B). Wie bereits erwähnt, beruht dies möglicherweise darauf, dass TNF- α nicht nur eine Entzündung der Zellen hervorruft, sondern in zu hohen Mengen Zellen schädigt und sie zum Teil absterben.

Da TNF- α in einer Konzentration von 10 oder 25 ng/ml kaum Unterschiede in der E-Selektin-Expression bei gleichzeitig hoher Viabilität der Zellen bewirkte, wurden HUVEC in allen folgenden Untersuchungen, um Zellverluste weitgehend zu vermeiden, mit 10 ng/ml TNF- α behandelt.

➤ HUVEctert

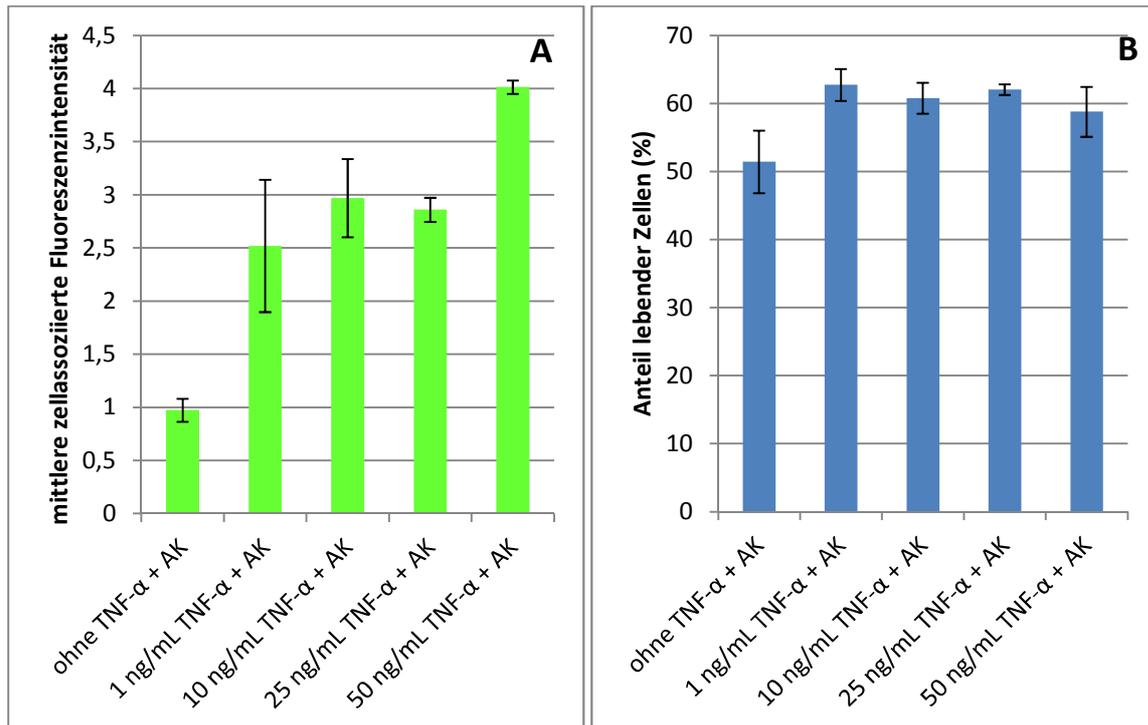


Abbildung 9: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden HUVEctert-Einzelzellen (A) und Prozentanteil lebender HUVEctert-Einzelzellen (B) nach Entzündung mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen (Inkubation 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen mit Antikörper-Zusatz (n=2).

Die in Abbildung 9A dargestellten Ergebnisse zeigten, dass HUVEctert nach Induktion einer Entzündung mit TNF- α , entsprechend einer mittleren zellgebundenen Fluoreszenzintensität bis zu $4,02 \pm 0,06$, E-Selektin exprimieren, während nicht behandelte Zellen mit einer RFI von $0,97 \pm 0,11$ nur eine geringe Fluoreszenz entsprechend der Autofluoreszenz der Zellen aufwiesen. Dabei verursachte die Variation der Konzentrationen von TNF- α zwischen 1, 10 oder 25 ng/ml kaum Unterschiede in der E-Selektin-Expression, da die zellassozierte Fluoreszenzintensität im Mittel nur vernachlässigbar von $2,52 \pm 0,62$ auf $2,86 \pm 0,11$ zunahm und auch der Anteil an lebenden Zellen annähernd gleich war (Abb.

9B). Im Vergleich dazu nahm die Lebendzellzahl nach Inkubation mit 50 ng/ml TNF- α ab, während die zellassoziierte Fluoreszenzintensität gleichzeitig auf $4,02 \pm 0,06$ anstieg.

In allen weiteren Untersuchungen wurde daher eine Entzündung mit 10 ng/ml TNF- α induziert, da die Zellen eine deutliche E-Selektin-Expression zeigten und die Anzahl an lebenden Zellen verglichen mit 1 ng/ml TNF- α nur im Mittel geringfügig abnahm. Außerdem sollten für Vergleichszwecke die Parameter möglichst jenen von HUVEC entsprechen.

Verglichen mit HUVEC (Abb. 8A) konnte eine Entzündung an HUVECtert grundsätzlich schwerer hervorgerufen werden. So fluoreszierten letztere nach Stimulation mit TNF- α unter identen Bedingungen weniger intensiv als Primärzellen. Die weniger ausgeprägte „Entzündbarkeit“ von HUVECtert ist möglicherweise, wie bereits erwähnt, auf die reduzierte Empfindlichkeit dieser immortalisierten Endothelzellen gegenüber TNF- α zurückzuführen. Aufgrund dessen fiel die Expression von E-Selektin bei HUVECtert wahrscheinlich nicht nur geringer, sondern auch unregelmäßiger aus, da die zellgebundene Fluoreszenzintensität mit zunehmender TNF- α Konzentration diskontinuierlich anstieg, während bei HUVEC eine nahezu lineare Zunahme beobachtbar war.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen bestätigt, dass HUVEC sowie HUVECtert nach Stimulation mit TNF- α E-Selektin exprimieren und sowohl die Inkubationsdauer als auch Konzentration kritische Parameter bei der Induktion der Entzündung sind. An den primären Endothelzellen konnte eine ausgeprägtere Entzündung, wahrscheinlich bedingt durch ihre erhöhte Empfindlichkeit, hervorgerufen werden als bei HUVECtert.

Aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse werden zur in-vitro Generierung eines entzündeten Endothels HUVEC sowie HUVECtert in allen weiteren Untersuchungen 4 Stunden mit 10 ng/ml TNF- α behandelt, da die Zellen eine deutliche E-Selektin-Expression aufwiesen und Zellverluste weitgehend vermieden wurden.

5.1.3.2 Internalisierung von E-Selektin

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass E-Selektin nicht konstitutiv von Endothelzellen exprimiert wird, sondern erst nach Stimulation mit TNF- α . Laut Literatur wird das an der Zelloberfläche exprimierte E-Selektin nach Zytokinstimulation durch Endozytose internalisiert und in den Lysosomen abgebaut [14]. Dies war die Grundlage, um weitere Untersuchungen durchzuführen und membranständiges E-Selektin nach Beendigung des Zytokinstimulus flowzytometrisch zu quantifizieren.

Die folgenden Versuche an HUVEC bzw. HUVECtert wurden wie in Kapitel 4.1.2.2 beschrieben durchgeführt. Um E-Selektin zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zytokinstimulation zu detektieren, wurden die Endothelzell-Monolayer nach Entzündung mit TNF- α 0, 30, 60, 90, 120 oder 150 Minuten lang mit EndoPrime[®]-Medium inkubiert und E-Selektin anschließend mit einem Fluorescein-markierten Antikörper detektiert.

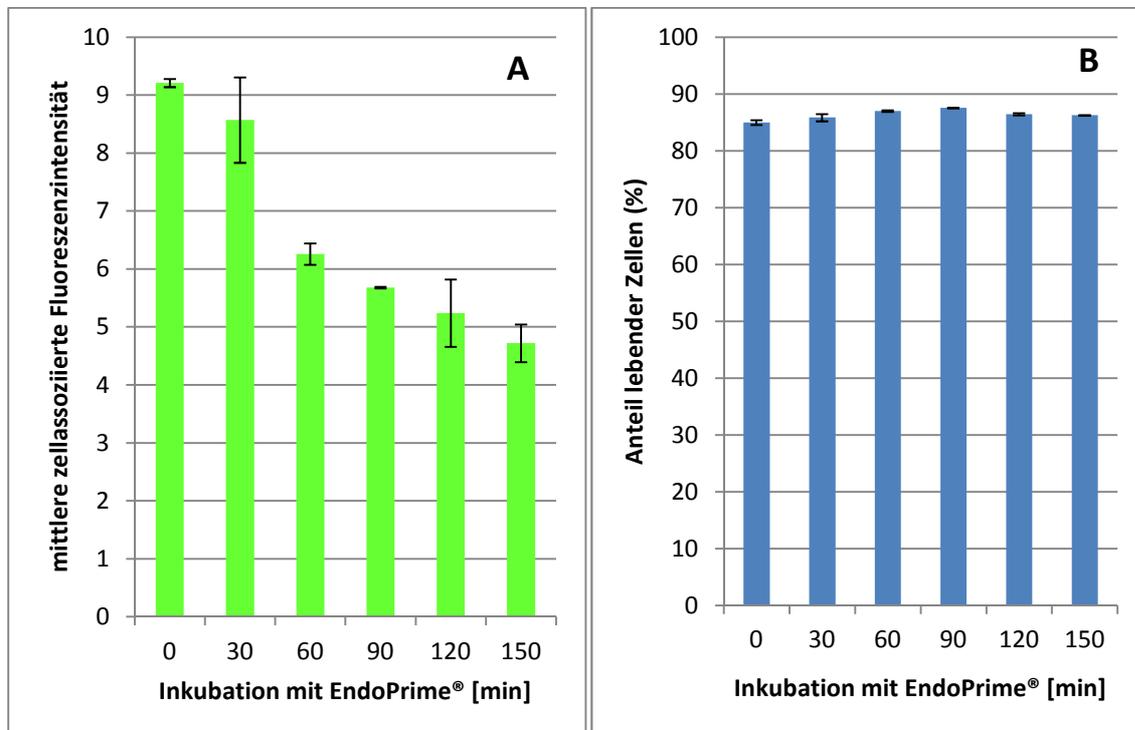


Abbildung 10: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender HUVEC-Einzelzellen (A) und Prozentanteil lebender HUVEC-Einzelzellen (B) nach Entzündung mit TNF- α (10 ng/ml, Inkubation 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (1 Stunde Inkubation) 0, 30, 60, 90, 120 oder 150 Minuten nach Zytokinstimulation (n=2).

Die in Abbildung 10A dargestellten Ergebnisse zeigten, dass HUVEC nach Entzündung mit TNF- α , entsprechend einer mittleren zellgebundenen Fluoreszenzintensität von $9,21 \pm 0,07$, E-Selektin exprimieren und nach Beendigung des Zytokinstimulus möglicherweise internalisieren, da die mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität mit der Zeit nahezu linear abnahm und nach 150 Minuten nur noch etwa die Hälfte der E-Selektin-Menge detektiert werden konnte.

Gleichzeitig war, wie aus Abbildung 10B ersichtlich, die Überlebensrate der Zellen mit einer durchschnittlichen Viabilität von 85% bis 88% relativ hoch und blieb mit zunehmender EndoPrime[®]-Inkubationsdauer unverändert.

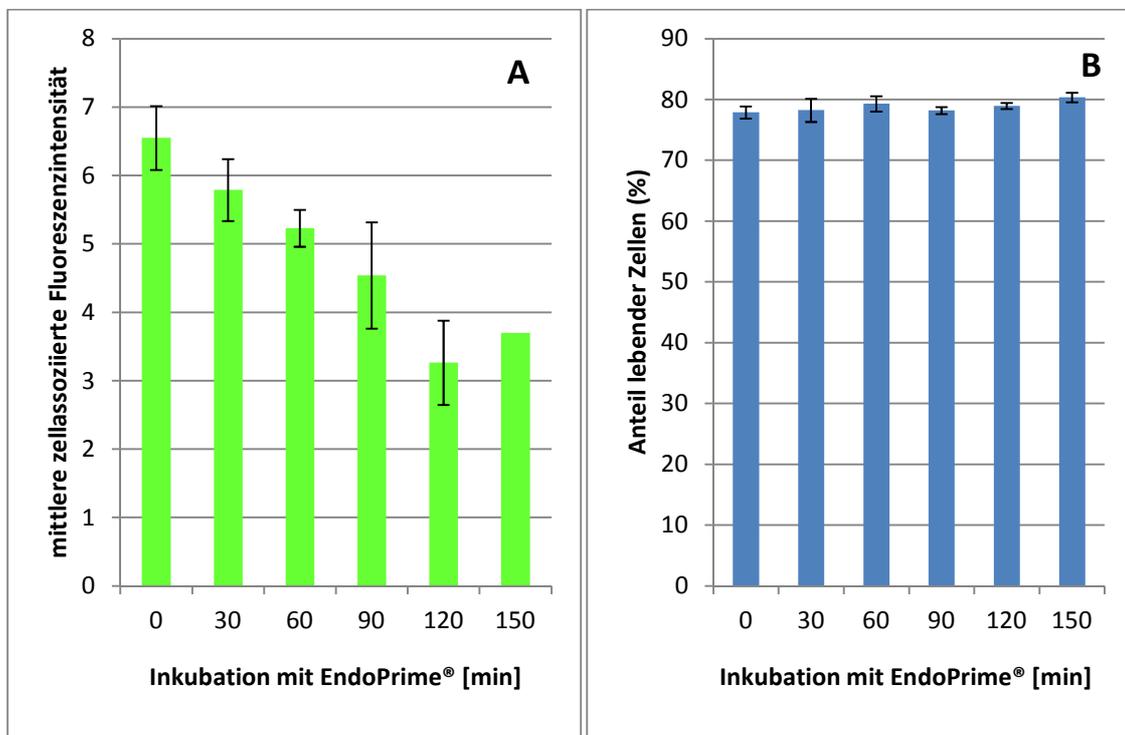


Abbildung 11: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender HUVECtert-Einzelzellen (A) und Prozentanteil lebender HUVECtert-Einzelzellen (B) nach Entzündung mit TNF- α (10 ng/ml, Inkubation 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (1 Stunde Inkubation) 0, 30, 60, 90, 120 oder 150 Minuten nach Zytokinstimulation (n=2).

Die flowzytometrische Analyse (Abbildung 11A) ergab, dass exprimiertes E-Selektin auch von HUVECtert nach Beendigung des Zytokinstimulus möglicherweise internalisiert wurde, da die ursprüngliche zellgebundene Fluoreszenzintensität von $6,55 \pm 0,47$ auf etwa die Hälfte abnahm. Außerdem zeigten die Ergebnisse erneut, dass eine Entzündung an immortalisierten Endothelzellen schwerer induziert werden kann, da das Ausmaß der E-Selektin-

Expression unmittelbar nach der Induktion der Entzündung um 28,9% geringer war als bei Primärzellen (Abb. 10A).

Der Anteil an lebenden Zellen war mit 78% - 80% generell hoch und unabhängig von der Nachinkubationsdauer (Abb. 11B).

5.1.3.3 Internalisierung des E-Selektin-Antikörper-Komplexes

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass Endothelzellen nach Entzündung mit TNF- α E-Selektin exprimieren und nach Ende der Zytokinstimulierung möglicherweise internalisieren. In weiterer Folge sollte die Internalisierung von E-Selektin in Form des Antikörper-Konjugates und der Abbau in den Lysosomen mit Hilfe von Monensin untersucht werden. Monensin, ein selektives Ionophor, bewirkt durch Austausch von Protonen gegen Natriumionen die Neutralisation des pH-Wertes in den ursprünglich sauren Lysosomen [15]. Zusätzlich ist die Quantenausbeute von Fluorescein vom pH-Wert abhängig und nimmt unterhalb von pH 7 stark ab. Daher sollte durch Neutralisation des lysosomalen pH-Wertes die ursprüngliche Fluoreszenzintensität nach Monensin-Zusatz wiederhergestellt werden, falls sich der Farbstoff und damit der E-Selektin-Antikörperkomplex im Lysosom angereichert hat.

Entsprechend dem in Kapitel 4.1.2.3 angeführten Protokoll wurden HUVEC bzw. HUVECTert nach Stimulierung mit TNF- α und Zusatz von Fluorescein-markiertem Antikörper gegen E-Selektin unterschiedlich lang mit EndoPrime[®]-Medium bei 37°C inkubiert. Nach der flowcytometrischen Analyse wurde der Zellsuspension Monensin zugesetzt und nochmals im Durchfluscytometer analysiert. Als Kontrolle wurde die Antikörper-Konzentration im Überstand nach Inkubation mit EndoPrime[®]-Medium (siehe Anhang Tabelle 22) anhand einer zuvor erstellen Eichgerade (siehe Anhang Abbildung 18) bestimmt (Ex/Em 485/525, Infinite M200, Tecan, Grödig, Austria) und damit ausgeschlossen, dass E-Selektin-Antikörper im überstehenden Medium vorlag.

Da der Zellstoffwechsel bei 4°C minimiert ist und demzufolge keine E-Selektin-Internalisierung stattfinden sollte, wurde der Versuch als Kontrolle nochmals durchgeführt, wobei die Inkubationstemperatur mit EndoPrime®-Medium auf 4°C gesenkt wurde. Dabei stellte anfänglich die stark reduzierte Anzahl an viablen Zellen in Suspension ein Problem dar. Vorversuche haben gezeigt, dass die Zelloberfläche nach Behandlung mit Reagenzien, die auf 4°C temperiert waren, kaum von der Wachstumsfläche gelöst wurden und dadurch eine geringe Zahl an Einzelzellen in Suspension vorlagen. Das Problem konnte durch Erwärmen des Waschpuffers sowie der Trypsin-EDTA Lösung auf 37°C behoben werden. Zusätzlich wurde die Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet.

➤ HUVEC

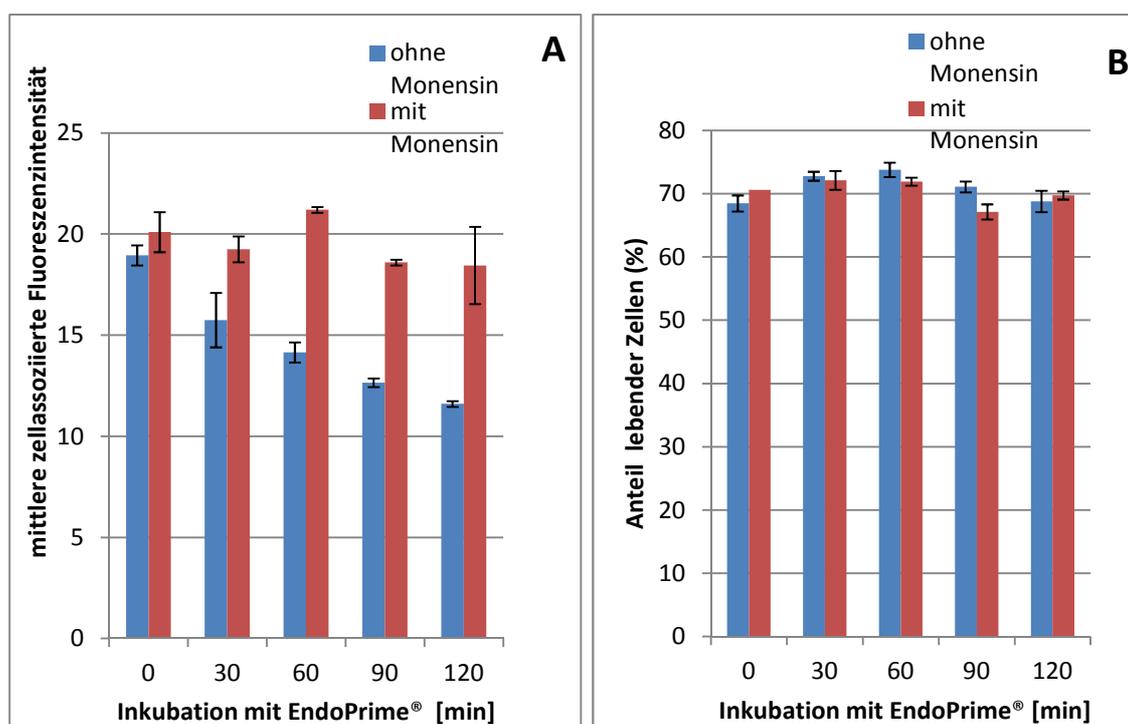


Abbildung 12: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender, entzündeter HUVEC-Einzelzellen (A) und Prozentanteil lebender, entzündeter HUVEC-Einzelzellen (B) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) nach weiterer Inkubation bei 37°C mit EndoPrime®-Medium mit und ohne Monensin-Zusatz (n=2).

Die Durchflusszytometrie (Abbildung 12A) ergab, dass an der Zelloberfläche exprimiertes E-Selektin nach Zytokinstimulation in Form eines Antikörper-Konjugates bei 37°C internalisiert wurde, da die mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität nach 120 Minuten insgesamt auf 61,2% des ursprünglichen

Wertes abnahm, nach Zusatz von Monensin jedoch wieder 91,8% der ursprünglichen Fluoreszenzintensität detektiert wurden. Damit konnte nachgewiesen werden, dass sich der Farbstoff in Form eines E-Selektin-Antikörperkomplexes teilweise im Lysosom anreicherte und nach Zusatz von Monensin durch Neutralisation des lysosomalen pH-Wertes die ursprüngliche Fluoreszenzintensität nahezu wiederhergestellt wurde. Der Anteil an viablen Zellen lag mit über zwei Dritteln vor und nach Monensin-Zusatz generell in einem akzeptablen Bereich (Abb. 12B).

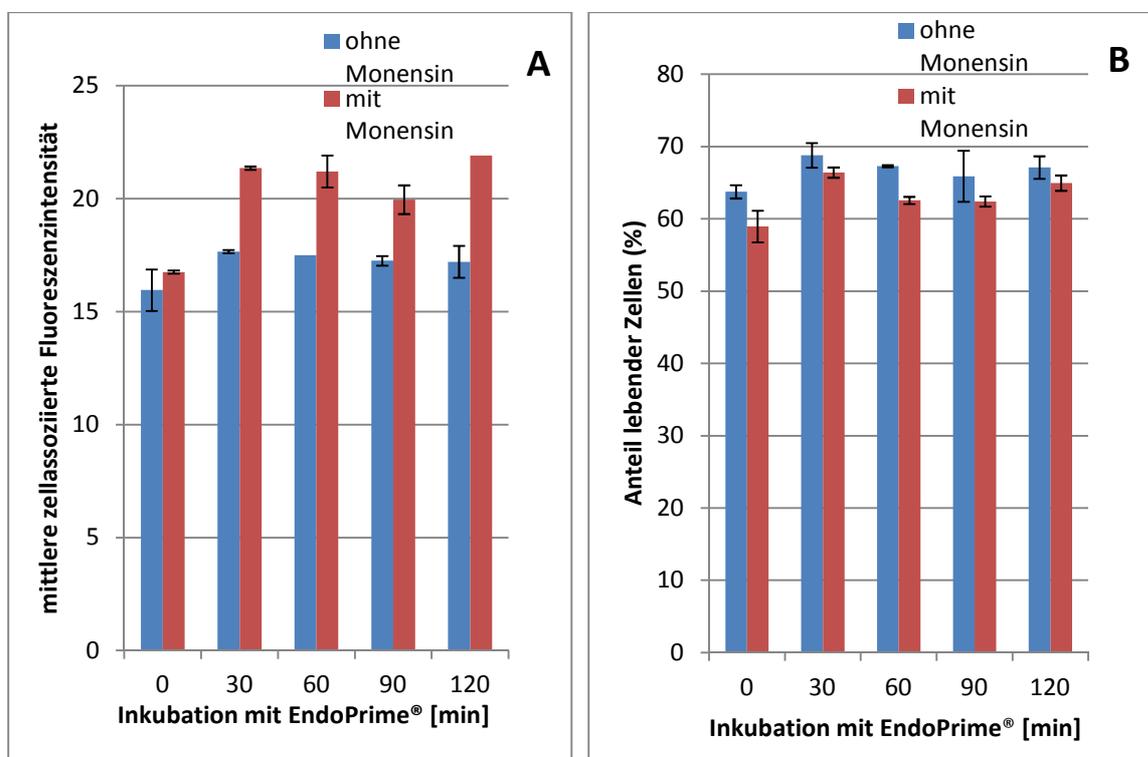


Abbildung 13: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender, entzündeter HUVEC-Einzelzellen (A) und Prozentanteil lebender, entzündeter HUVEC-Einzelzellen (B) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde bei 37°C) nach weiterer Inkubation bei 4°C mit EndoPrime®-Medium mit und ohne Monensin-Zusatz (n=2).

Der Kontrollversuch zeigte (Abb. 13A), dass HUVEC nach Entzündung mit TNF- α , entsprechend einer mittleren zellgebundenen Fluoreszenzintensität von 16 E-Selektin exprimieren, jedoch bei minimierten Zellstoffwechsel nicht in die Zelle aufnehmen, sodass die zellgebundene Fluoreszenzintensität trotz verlängerter Nachinkubationsdauer nicht abnahm und nach 120 Minuten 107,8 % des ursprünglichen Wertes entsprach. Interessanterweise fluoreszierten Zellen, die

mit Monensin inkubiert wurden grundsätzlich intensiver als vor Monensin-Zusatz. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Monensin selbst ein Fluoreszenzsignal gibt, oder dass E-Selektin als Antikörper-Konjugat während der Antikörper-Inkubation bei 37°C teilweise internalisiert wurde und sich in den Lysosomen anreicherte, wodurch nach Zusatz von Monensin eine grundsätzlich intensivere aber konstante Fluoreszenz beobachtet wurde.

Der Anteil an lebenden Zellen, welcher durchschnittlich zwischen 60% bis 70% lag, war vor Zusatz von Monensin tendenziell etwas höher als nach Inkubation mit Monensin (Abb. 13B). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Zellsuspensionen ohne Monensin sofort analysiert wurden und erst nach Inkubation mit Monensin ein weiteres Mal im Durchflusszytometer untersucht wurden, sodass die Viabilität der Zellen durch das verlängerte Vorliegen in Suspension eingeschränkt wurde.

➤ HUVEctert

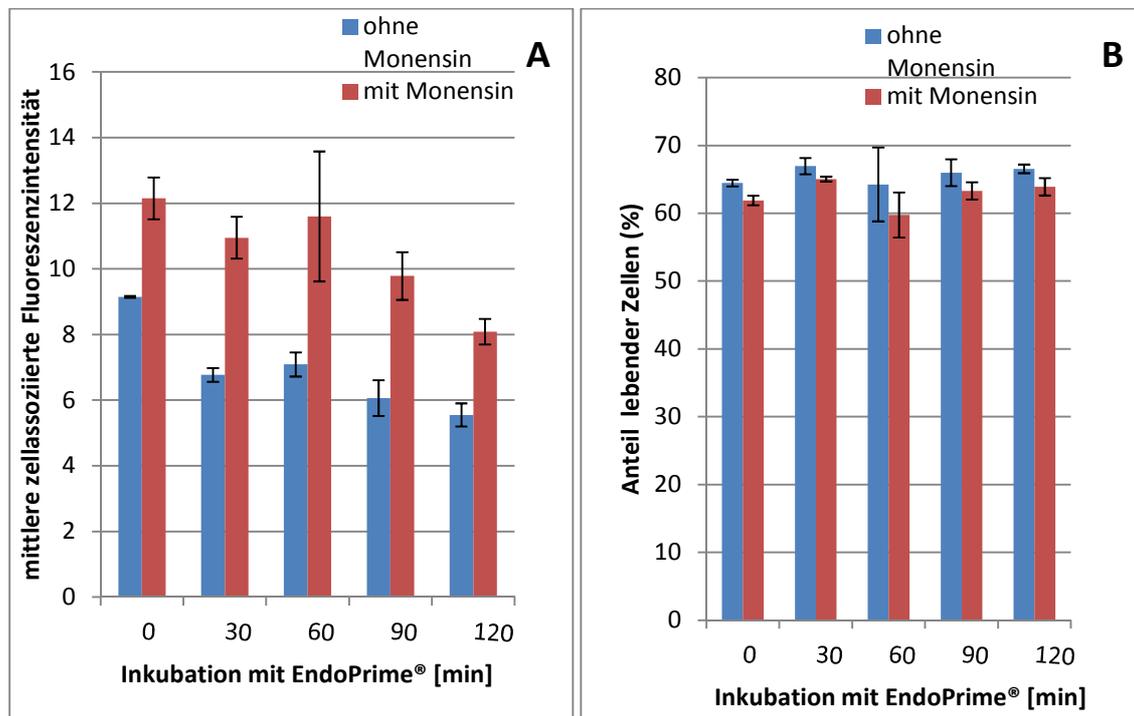


Abbildung 14: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender, entzündeter HUVEctert-Einzelzellen (A) und Prozentanteil lebender, entzündeter HUVEctert-Einzelzellen (B) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) nach weiterer Inkubation bei 37°C mit EndoPrime®-Medium mit und ohne Monensin-Zusatz (n=2).

Auch HUVECtert, exprimierten E-Selektin nach Zytokinstimulation und internalisierten das Zelladhäsionsmolekül bei 37°C, da die mittleren zellassozierte Fluoreszenzintensität von $9,15 \pm 0,03$ nach 120 Minuten nur noch 60,7% der ursprünglichen Fluoreszenzintensität betrug (Abb. 14A). Durch Zusatz von Monensin nahm die zellgebundene Fluoreszenzintensität zu, jedoch wurden nur 66,5% der anfänglichen Fluoreszenzintensität erreicht. Wie auch Primärzellen fluoreszierten HUVECtert nach der Inkubation mit Monensin grundsätzlich intensiver als vor Monensin-Zusatz, jedoch nahm die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Zeit deutlich ab. Durch Bestimmung der Antikörper-Konzentration im überstehenden EndoPrime[®]-Medium (siehe Anhang Tabelle 22) konnte ausgeschlossen werden, dass die Abnahme der zellgebundenen Fluoreszenzintensität durch eine denkbare Dissoziation des Selektin-Antikörper-Komplexes verursacht wurde, da im Überstand keine nennenswerte Fluoreszenz detektiert werden konnte. Eine prinzipielle Problematik von HUVECtert besteht darin, dass sie infolge der Immortalisierung dedifferenzieren können und damit möglicherweise zellspezifische Funktionen verloren gehen und so in-vivo Bedingungen schlecht widerspiegeln. Dementsprechend zeigten die vorhergehenden Untersuchungen nach Induktion der Entzündung Unterschiede in der E-Selektin-Expression im Vergleich zu Primärzellen. Zum einen fiel die Entzündung deutlich schwächer und zum anderen wahrscheinlich durch ihre reduzierte Empfindlichkeit auch unregelmäßiger aus als bei HUVEC. Möglicherweise differiert auch der Abbau von internalisierten Strukturen bei diesen immortalisierten Endothelzellen.

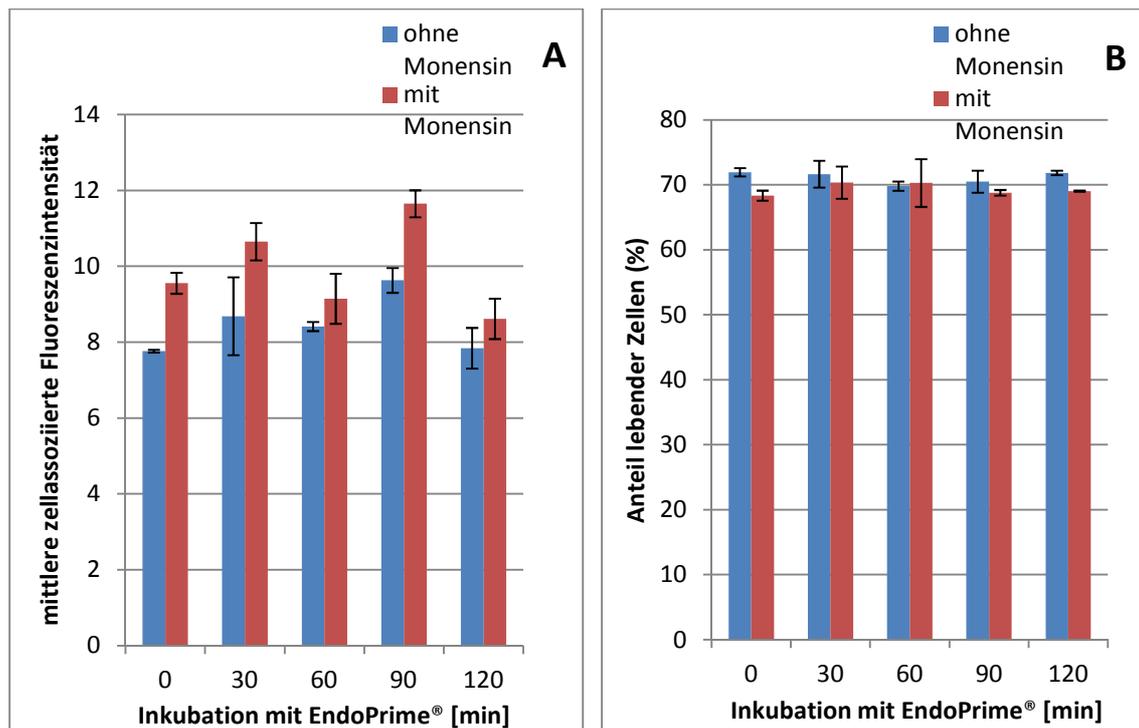


Abbildung 15: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender, entzündeter HUVECtert-Einzelzellen (A) und Prozentanteil lebender, entzündeter HUVECtert-Einzelzellen (B) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde bei 37°C) nach weiterer Inkubation bei 4°C mit EndoPrime®-Medium mit und ohne Monensin-Zusatz (n=2).

Der Kontrollversuch (Abb.15A) bei 4°C zeigte, dass E-Selektin von HUVECtert bei minimiertem Zellstoffwechsel nicht internalisiert wurde, da die zellassozierte Fluoreszenzintensität nach 120 Minuten 100,9% des ursprünglichen Wertes von $7,77 \pm 0,04$ entsprach. Die detektierten Schwankungen in der Fluoreszenz sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass HUVECtert als immortalisierte Endothelzellen unempfindlicher gegenüber TNF- α sind und dadurch die Entzündung schwächer aber auch unregelmäßiger als bei Primärzellen ausfällt. Nach Zusatz von Monensin war die zellgebundene Fluoreszenzintensität zu allen Zeitpunkten höher als ohne Monensin-Zugabe. Die hierfür bei HUVEC erwähnten möglichen Ursachen könnten auch bei HUVECtert eine Rolle spielen. Die detaillierte Untersuchung der beträchtlichen Schwankungen der mittleren zellgebundenen Fluoreszenzintensitäten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zytokinstimulation sowie die Ursache für die additive Fluoreszenz von Monensin überstieg den Rahmen der vorliegenden Arbeit und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Die Zellviabilität lag grundsätzlich mit etwa 70% im akzeptablen Bereich (Abb. 15B), wobei auch hier der Anteil an viablen Zellen nach Zusatz von Monensin geringfügig abnahm.

5.2 PEI-modifizierte Mikropartikel

5.2.1 Oberflächenmodifikation mit PEI

Um den Einfluss der Partikeloberflächenladung auf die Zell-Interaktion zu untersuchen, wurden durch Adsorption von niedermolekularem PEI positive Ladungen an der carboxylierten Oberfläche von Polystyrolpartikeln mit 1 μm Durchmesser eingeführt (Tabelle 6). Obwohl die in dieser Arbeit eingesetzten Polystyrolpartikel nicht bioabbaubar und somit therapeutisch nur beschränkt einsetzbar sind, eignen sie sich dennoch aufgrund ihrer engen Größenverteilung sowie einer infolge von Carboxylgruppen gut funktionalisierbaren Oberfläche für grundlegende Untersuchungen der Partikel-Zell-Interaktion.

Die Adsorption von PEI an die Partikeloberfläche ist vom pH-Wert und der Ionenstärke des verwendeten Mediums abhängig. Einerseits sollte der pH-Wert niedrig genug sein, um eine ausreichende Protonierung der Aminogruppen zu gewährleisten und andererseits ausreichend basisch, um die Ionisierung der Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche aufrecht zu erhalten. Außerdem liegt das Polymer in Abhängigkeit von der Salzkonzentration in unterschiedlichen Konformationen vor. In salzfreiem Wasser zeigt PEI eine flache Konformation, was zu einer „charge-to-charge“ Neutralisation und einem neutralen Zeta-Potential führt, wohingegen PEI in Anwesenheit von Salz in Form von „loops and tails“ adsorbiert wird und zu stark positiv geladenen, knäuelartigen Kolloiden führt [10]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit 100 mM Phosphatpuffer pH 5,8 als Immobilisationsmedium eingesetzt. Um stark positiv geladene Partikel und damit eine hohe Stabilität zu erreichen, wurde die Beschichtung mit PEI in zwei Schritten durchgeführt. Der Ladungszustand der Partikel wurde in destilliertem und damit elektrolytarmen Wasser bestimmt, um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erhalten. So wird eine Kompression der diffusen Schicht durch

hohe Salzkonzentrationen vermieden, was als Folge Unterschiede zwischen detektierten Zeta-Potentialen verringern würde [16].

Tabelle 6: Charakteristika von 1 µm Polystyrolpartikeln vor und nach der Oberflächenmodifikation mit PEI und ihre Stabilität in nicht beschichteten Eppendorfgläsern. Die Leitfähigkeit (SD ≤ 0,01) gibt die Fähigkeit des Dispersionsmediums an, elektrischen Strom zu leiten und ist von der Ionen-Konzentration abhängig (n=3).

	Polystyrolpartikel	Mittlerer Partikeldurchmesser [nm]	PdI	Zeta-Potential [mV]	Leitfähigkeit [mS/cm]
Unmittelbar nach Herstellung	PEI-modifiziert	666,9 ± 84,6	0,4 ± 0,2	44,9 ± 1,8	0,025
	unbehandelt	737,3 ± 83,9	0,2 ± 0,1	-43,8 ± 0,2	0,004
Tag 1	PEI-modifiziert	737,2 ± 128,0	0,3 ± 0,1	31,5 ± 2,0	0,030
	unbehandelt	700,9 ± 86,0	0,3 ± 0,1	-35,7 ± 0,9	0,006
Tag 2	PEI-modifiziert	654,9 ± 154,5	0,4 ± 0,2	36,7 ± 0,6	0,025
	unbehandelt	732,1 ± 134,8	0,3 ± 0,1	-41,0 ± 0,4	0,003
Tag 3	PEI-modifiziert	655,6 ± 106,5	0,4 ± 0,2	33,1 ± 1,6	0,029
	unbehandelt	693,3 ± 128,1	0,3 ± 0,2	-38,6 ± 0,3	0,011
Tag 6	PEI-modifiziert	730,0 ± 184,8	0,4 ± 0,3	1,3 ± 1,2	0,028
	unbehandelt	682,7 ± 145,2	0,3 ± 0,2	-43,1 ± 1,2	0,003

Die in Tabelle 6 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass Polystyrolpartikel unmittelbar durch die Oberflächenmodifikation mit PEI ein deutlich ins Positive verschobenes Zeta-Potential von $+44,9 \pm 1,8$ mV aufwiesen, während unbehandelte Partikel, entsprechend einem Zeta-Potential von $-43,8 \pm 0,2$ mV, durch eine negative Oberflächenladung charakterisiert sind. Bereits einen Tag nach Herstellung sank das Zetapotential auf $+31,5 \pm 2,0$ mV und betrug nach einer Lagerungszeit von 6 Tagen nur noch 2,9% des ursprünglichen Wertes. Die Instabilität der positiv geladenen Partikel beruht möglicherweise auf elektrostatischen Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Gefäßoberfläche, da diese Interaktionen die Dissoziation der oberflächlich gebundenen PEI-Schicht begünstigen und zur Abnahme des Zeta-Potentials führen könnten. Eine andere mögliche Ursache für die eingeschränkte Stabilität der Partikel wäre, dass auch zwei Beschichtungsschritte zur Oberflächenmodifikation nicht ausreichen und damit die Partikeloberfläche nur unvollständig mit PEI beschichtet wurde. Zur Charakterisierung der Agglomerationstendenz kann der Polydispersitätsindex (PdI) herangezogen werden. Der PdI ist laut Literatur [19] ein Parameter, der die Größenverteilung von Partikeln mit einem Wert von 0 bis 1 wiedergibt. Ein PdI <

0,1 beschreibt monodisperse Partikel, während bei einem Pdl zwischen 0,1 - 0,5 Partikel mit geringer Variation in der Größe vorliegen und ein Pdl > 0,5 eine sehr breite Größenverteilung repräsentiert. Entsprechend einem PDI \leq 0,4 lag die Größenverteilung der Partikel unmittelbar nach der Oberflächenmodifikation und auch später in einem akzeptablen Bereich.

Optimierung der Oberflächenmodifikation:

➤ Variation der Beschichtungsschritte mit PEI

Aus der vorhergehenden Untersuchung wurde ersichtlich, dass die Lagerungsstabilität von PEI-modifizierten Partikeln stark eingeschränkt war. Um zu überprüfen, ob zwei Beschichtungsschritte mit PEI zur Absättigung der Partikeloberfläche ausreichen, oder ob die Oberflächenladung nach mehrmaligem „Coating“ weiter zunimmt, wurden Polystyrolpartikel in der nächsten Untersuchung zusätzlich vier- bzw. sechsmal mit PEI behandelt.

Tabelle 7: Charakteristika von 1 μ m Polystyrolpartikeln nach 2, 4 oder 6-maliger Beschichtung und die Leitfähigkeit der Dispersion in Aqua dest. (n=3).

Beschichtungsschritte mit PEI	Mittlerer Partikeldurchmesser [nm]	Pdl	Zeta-Potential [mV]	Leitfähigkeit [mS/cm]
2	1303 \pm 90,5	0,21 \pm 0,03	54,2 \pm 0,5	0,01 \pm 0,008
4	1271 \pm 26,9	0,15 \pm 0,11	47,9 \pm 2,1	0,02 \pm 0,012
6	1322 \pm 41,0	0,12 \pm 0,07	56,3 \pm 1,5	0,06 \pm 0,002
unbehandelte Polystyrolpartikel	1142 \pm 1,4	0,07 \pm 0,00	-30,7 \pm 0,4	0,01 \pm 0,014

Die Analyse ergab (Tabelle 7), dass Partikel, die zwei-, vier oder sechsmal mit PEI beschichtet wurden, kaum Unterschiede im Zeta-Potential und damit in der Oberflächenladung aufwiesen. Daher waren zwei Beschichtungsschritte mit PEI zur Absättigung und Umkehr der negativ geladenen Partikeloberfläche ausreichend und weitere Beschichtungsschritte ergaben keine Verbesserung der Parameter. Die Polydispersitätsindizes \leq 0,21 zeigten, dass die Größenverteilung in einem akzeptablen Bereich lag und die Partikel eine geringe Agglomerationstendenz aufwiesen. Auch die mittleren Partikelgrößen, welche nach der Oberflächenmodifikation durchschnittlich zwischen 1250 – 1350 nm lagen, zeigten nach 2, 4 oder 6 Beschichtungsschritten kaum Unterschiede,

während unbehandelte Polystyrolpartikel einen um 12,4%, 10,4% bzw. 13,6% geringeren Durchmesser aufwiesen. Die Zunahme der Partikelgröße infolge der Adsorption von PEI an der Oberfläche war ein weiterer Beweis für die Oberflächenmodifikation.

Da das Zeta-Potential und der Durchmesser von Partikeln, die öfter als zweimal mit PEI inkubiert wurden, nicht weiter anstieg, wurden in der Folge zur Oberflächenmodifikation immer zwei Beschichtungsschritte mit PEI beibehalten.

➤ Herstellung und Lagerung in PEI-beschichteten Gefäßen

Ausgehend von der Vermutung, dass die Instabilität von PEI-modifizierten, positiv geladenen Partikeln durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Kunststoffoberfläche der Gefäße verursacht wird, sollte das Herstellungsprotokoll in der Weise geändert werden, dass die zur Herstellung und Lagerung verwendeten Eppendorfgefäße zuvor mit PEI beschichtet wurden, um die Gefäßoberfläche mit PEI abzusättigen.

Tabelle 8: Charakteristika von 1 µm Polystyrolpartikeln vor und nach Oberflächenmodifikation mit PEI und deren Stabilität in PEI-beschichteten Eppendorfgefäßen (n=3).

	Polystyrolpartikel	Mittlerer Partikeldurchmesser [nm]	PdI	Zeta-Potential [mV]	Leitfähigkeit [mS/cm]
Unmittelbar	PEI-modifiziert	1303 ± 1,4	0,21 ± 0,001	54,2 ± 0,36	0,009 ± 0,014
	unbehandelt	1142 ± 90,5	0,07 ± 0,029	-30,7 ± 0,53	0,010 ± 0,008
Tag 1	PEI-modifiziert	1181,5 ± 14,8	0,23 ± 0,003	48,6 ± 0,36	0,006 ± 0,005
	unbehandelt	1145 ± 26,9	0,09 ± 0,127	-35,1 ± 0,56	0,014 ± 0,010
Tag 2	PEI-modifiziert	1193 ± 43,8	0,24 ± 0,214	50 ± 0,92	0,005 ± 0,003
	unbehandelt	1129 ± 22,6	0,09 ± 0,108	-34,4 ± 0,15	0,006 ± 0,002
Tag 3	PEI-modifiziert	1192 ± 17,0	0,25 ± 0,209	54,3 ± 0,78	0,015 ± 0,011
	unbehandelt	1137 ± 7,1	0,27 ± 0,059	-34,6 ± 0,06	0,005 ± 0,0003
Tag 6	PEI-modifiziert	1200 ± 55,2	0,07 ± 0,065	53,3 ± 0,55	0,007 ± 0,005
	unbehandelt	1033,3 ± 60,4	0,12 ± 0,140	-30,4 ± 0,53	0,011 ± 0,012
Tag 15	PEI-modifiziert	1141,5 ± 48,8	0,15 ± 0,001	50,2 ± 0,81	0,007 ± 0,003
	unbehandelt	1100 ± 12,7	0,12 ± 0,095	-26,0 ± 0,42	0,004 ± 0,001

Wie in Tabelle 8 ersichtlich, konnten unter optimierten Bedingungen, entsprechend einem Zeta-Potential von +54,2 ± 0,36 mV, stark positiv geladene PEI-modifizierte Polystyrolpartikel hergestellt werden, deren Zeta-Potential mit einem Wert von +50,2 mV bis zu 15 Tage nach Herstellung konstant blieb.

Entsprechend einem Pdl von 0,21, zeigten die Partikel unmittelbar nach der Oberflächenmodifikation eine geringe Variation in ihrer Größe und auch nach Lagerung in PEI-beschichteten Eppendorfgefäßen nahm die Agglomerationstendenz, entsprechend einem PDI $\leq 0,25$, praktisch nicht zu. Somit konnte die Vermutung, dass ionische Interaktionen zwischen den positiven Partikeln und der negativen Gefäßoberfläche zu einer eingeschränkten Stabilität führen, bestätigt werden. Durch Ladungsumkehr der Gefäßoberflächenladung mittels PEI-Absättigung konnte eine deutlich höhere Lagerungsstabilität erzielt werden. Daher wurden zur Herstellung und Lagerung weiterhin PEI-beschichtete Eppendorfgefäße verwendet.

5.2.2 Charakterisierung der PEI-modifizierten Polystyrolpartikel

Zur detaillierten Charakterisierung der Partikeloberfläche sollte an Hand der elektrophoretischen Mobilität das Zeta-Potential der PEI-modifizierten Partikel zusätzlich bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 3,7-10,6) ermittelt werden, um die optimalen Versuchs- und Lagerungsbedingungen festlegen zu können.

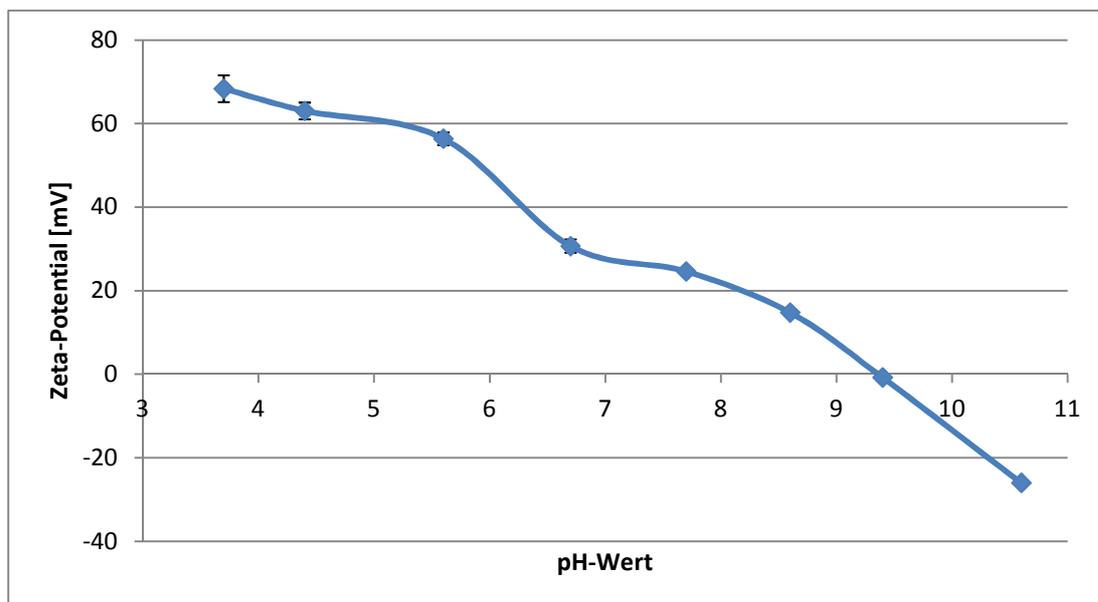


Abbildung 16: Zeta-Potential von PEI-modifizierten Partikeln in Abhängigkeit vom pH-Wert (n=3, SD \leq 3,2).

Die Anwesenheit von PEI an der Partikeloberfläche wurde durch die Analyse des Zeta-Potentials gegenüber dem pH-Wert nachgewiesen (Abbildung 16). Für die Oberflächenmodifikation wurde verzweigtes PEI verwendet, welches primäre, sekundäre sowie tertiäre Aminogruppen aufweist und daher basischen Charakter hat. Im stark sauren Milieu lagen die PEI-modifizierten Partikel, entsprechend einem Zeta-Potential von $+68,3 \pm 3,2$, in protonierter Form, als stark positiv geladene Kolloide vor. Mit steigenden pH-Wert nahm die Oberflächenladung der Partikel durch fortschreitende Deprotonierung und damit reduziertem Ionisierungsgrad immer weiter ab. Im basischen Milieu lagen die Partikel in etwa bei pH 9,4 schließlich deprotoniert und damit in Summe ungeladen, entsprechend einem neutralen Zeta-Potential, vor. Dieser pH-Wert entspricht dem isoelektrischen Punkt, an dem die Partikel aufgrund ihrer neutralen Nettoladung in wässriger Suspension im elektrischen Feld nicht mehr wandern. Nach weiterem Zusatz von Base nahm das Zeta-Potential, wahrscheinlich bedingt durch den Überschuss an frei vorliegenden Hydroxidionen, schließlich negative Werte an.

Damit zeigte das generierte Profil, welches charakteristisch für aminierte Partikel ist, dass PEI an die Partikeloberfläche adsorbiert wurde. Bei Verschiebung des pH-Wertes vom Sauren ins Basische nahm der tatsächliche Ladungszustand der Partikel durch Deprotonierung von stark positiven zu neutralen Werten ab.

5.2.3 PEI-Quantifizierung

Zur Bestimmung der Partikel-gebundenen PEI-Menge sollte der Bradford-assay, der eine quantitative Bestimmung von Aminogruppen erlaubt, entsprechend adaptiert werden. Das Prinzip dieses Nachweises besteht darin, dass der Triphenylmethanfarbstoff Brillant Blue G mit freien Aminogruppen unter Bildung eines blau gefärbten Komplexes reagiert, wodurch das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschoben wird.

Eine mit PEI erstellte Eichgerade (siehe Anhang Abbildung 19) ergab, dass die Extinktion im Konzentrationsbereich von 0,156 – 0,625 mg PEI/ml durch Reaktion des Farbstoffes mit freien Aminogruppen weitgehend linear anstieg. Ab einer

Konzentration > 0,625 mg/ml scheinen erste Sättigungseffekte aufzutreten und damit keine lineare Beziehung zwischen Absorption und Konzentration zu bestehen. Daher sollte bei der Messung berücksichtigt werden, dass die Konzentration der Probenlösung wenn nötig durch Verdünnen entsprechend angepasst wird.

In der folgenden Untersuchung wurde nach Herstellung von PEI-modifizierten Partikeln die nicht adsorbierte, freie PEI-Menge in den Phosphatpuffer-Überständen mit Hilfe dieser Nachweismethode quantifiziert und in weiterer Folge die Partikel-assoziierte PEI-Menge nach Gleichung (1) (siehe Kapitel 4.3.3) rechnerisch bestimmt.

Tabelle 10: Detektierte Extinktion (E) bei 595 nm, freie PEI-Konzentration (C₂) und Partikel-gebundene PEI-Menge nach der ersten und zweiten Beschichtung von Polystyrolpartikeln mit PEI (n=3).

	E _{595nm}	C ₂ (mg/ml)	C ₂ (mg/ml) x Faktor 15	Partikel- gebundene PEI-Menge (mg/mg Partikel)
1. PEI-Beschichtung	0,253 ± 0,01	0,305 ± 0,02	4,57 ± 0,35	0,043 ± 0,04
2. PEI-Beschichtung	0,234 ± 0,01	0,268 ± 0,02	4,02 ± 0,28	0,098 ± 0,03

Die Quantifizierung (Tabelle 10) ergab, dass PEI nach Beschichtung der Partikel in einer Konzentration von 0,305 mg/ml bzw. 0,268 mg/ml in den Überständen vorlag. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors entsprach dies einer freien PEI-Konzentration von 4,57 mg/ml nach der ersten Beschichtung und 4,02 mg/ml nach einem weiteren Beschichtungsschritt.

Diese indirekte Bestimmung der Partikel-assoziierten PEI-Menge ergab, dass nach zweifachem „Coating“ insgesamt 0,141 mg PEI pro mg Partikel adsorbiert wurden. Interessanterweise wurde bei der ersten Beschichtung nur 0,043 mg/mg adsorbiert, während im Vergleich dazu bei einer weiteren Beschichtung die doppelte PEI-Menge angelagert wurde. Demzufolge waren zwei Inkubationsschritte mit PEI zur Absättigung der Partikeloberfläche und damit für die Herstellung von stark positiven und stabilen PEI-modifizierten Partikeln erforderlich.

Eine Einschränkung der Validität dieser Quantifizierungsmethode ergibt sich aus den hohen Standardabweichungen der Partikel-assoziierten PEI-Menge, vor allem nach der ersten Beschichtung. Da der systematische Fehler bei der

Bestimmung der freien PEI-Konzentration durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor stark zunahm und die Partikel-gebundene PEI-Menge verhältnismäßig gering war, fiel dieser Fehler stark ins Gewicht. Um diese Fehlerquelle zu minimieren wäre es daher sinnvoll, die Phosphatpuffer-Überstände durch Lyophilisation zur Trockene zu bringen und den erhaltenen PEI-Rückstand zu quantifizieren. Auch die Tatsache, dass PEI-beschichtete Gefäße zur Herstellung eingesetzt wurden, könnte zu einer Verfälschung der Messergebnisse beigetragen haben. Daher sollte in weiterführenden Untersuchungen berücksichtigt werden, ob PEI nach der Beschichtung der Gefäße freigesetzt wird und dann möglicherweise in Lösung vorliegt.

Eine weitere spektrophotometrische Methode zur quantitativen Analyse von PEI besteht laut Literatur in der Bildung eines blaugefärbten Komplexes mit Cu^{2+} -Ionen, dessen Extinktion linear mit der PEI-Menge in einem Konzentrationsbereich von 5 – 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei 285 nm ansteigt [20].

5.3 Partikel-Zell-Interaktion

Um den Einfluss ionischer Wechselwirkungen auf die Partikel-Zell-Interaktion zu untersuchen wurden PEI-modifizierte und somit positiv geladene Mikropartikel hergestellt. Ausgehend von der Annahme, dass positiv geladene Partikel bevorzugt an die überwiegend negativ geladene Zelloberfläche binden, sollte ihre Bindungseffizienz an Endothelzellmonolayer als Modell für Blutgefäße untersucht werden. Dabei war von besonderem Interesse, ob Endothelzellen infolge einer Entzündung eine erhöhte Bindungsaffinität im Vergleich zu gesunden Zellen aufweisen. Als Referenz wurden unbehandelte Polystyrolpartikel herangezogen, die aufgrund ihrer carboxylierten Oberfläche eine negative Oberflächenladung aufweisen.

Da isotone Bedingungen Voraussetzung für Versuche an Zellen sind, wurden die Zellen mit einer Partikelsuspension in PBS-Puffer mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ wie in Kapitel 4.4. beschrieben inkubiert. Nach der Partikel-Inkubation wurde mikroskopisch auf Partikel-Agglomerate geprüft, da diese fälschlicherweise zur Zunahme der detektierten Fluoreszenzintensität führen würden.

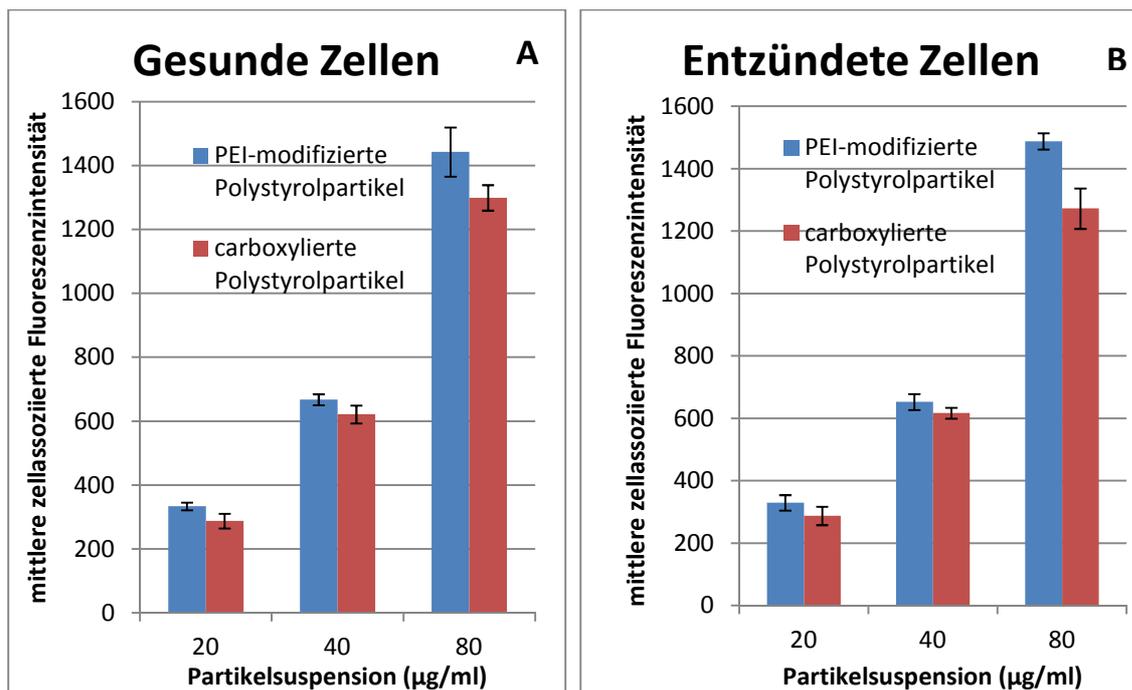


Abbildung 17: Bindung von positiv geladenen, PEI-modifizierten Polystyrol-Mikropartikeln im Vergleich zu negativ geladenen, carboxylierten Polystyrol-Mikropartikeln an gesunde HUVEC (A) oder an entzündete HUVEC (B) nach 30-minütiger Inkubation mit 20, 40 oder 80 µg Partikel/ml (n=3).

Wie in Abbildung 17A ersichtlich, wiesen PEI-modifizierte Partikel eine geringfügig höhere Bindungsrate an gesunde HUVEC auf, da die mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit 20, 40 oder 80 µg/ml Partikelsuspension um 16%, 7,5% bzw. 11% höher war als bei negativ geladenen Partikeln. Auch bei entzündeten HUVEC (Abb. 17B) wurde eine um 14,5%, 5,8% bzw. 17% erhöhte Bindungsrate von PEI-modifizierten Partikeln im Vergleich zu carboxylierten Polystyrolpartikeln beobachtet. Somit wurde die Vermutung, dass positiv geladene Partikeln vermehrt an die überwiegend negativ geladene Zelloberfläche binden bestätigt, jedoch war der Unterschied zu negativ geladenen Partikeln doch unerwartet gering. Außerdem bestand kein Unterschied in der Bindungsrate von Partikeln, weder von positiv noch negativ geladenen, zwischen entzündetem und nicht entzündetem Endothel.

Wider Erwarten waren die Bindungsraten von negativ geladenen, carboxylierten Polystyrolpartikeln im Verhältnis zu PEI-modifizierten Partikeln sehr hoch, sodass elektrostatische Wechselwirkungen eher eine geringe, andere derzeit noch unbekannte Mechanismen aber eine gewichtigere Rolle spielen.

Da die Partikelbindungsstudie entgegen den physiologischen Gegebenheiten unter stationären Bedingungen durchgeführt wurde, aber der Einfluss von hydrodynamischen Kräften - wie sie in-vivo vorherrschen - auf die Partikel-Zell-Interaktion von großem Interesse ist, könnte ein bereits etabliertes Testmodell, bei dem Flüssigkeitsströme in 3D-Mikrokanälen durch ein über akustische Oberflächenwellen betriebenes Chipsystem erzeugt werden, herangezogen werden [21].

6 ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Deutsch

Für eine zielgerichtete Therapie werden häufig partikuläre Trägersysteme eingesetzt, die den inkorporierten Arzneistoff ins erkrankte Gewebe transportieren sollen. Um den Einfluss der Ladung dieser Partikeln auf die Interaktion mit Zellen untersuchen zu können, wurden durch Adsorption von niedermolekularem Polyethylenimin (PEI) positive Ladungen an der carboxylierten Oberfläche von Polystyrolpartikeln mit einem Durchmesser von 1 μm eingeführt. Nach einigen Optimierungsschritten konnten stark positive geladene und damit lagerungsstabile Partikel hergestellt werden. Nicht nur an Hand des pH-abhängigen Zetapotentials, sondern auch durch Quantifizierung der Menge an ungebundenem, überschüssigem PEI mittels eines entsprechend adaptierten Bradford-Assays konnte die Oberflächenmodifikation bestätigt werden.

Die Bindungseffizienz der PEI-modifizierten Partikel wurde an Endothelzellmonolayern als in-vitro Modell für Blutgefäße untersucht, wobei die Bindungsrate von PEI-modifizierten Partikeln im Vergleich zu den negativ geladenen, unbehandelten Partikeln leicht erhöht war. Im Vergleich zu gesunden Endothelzellen wurde keine Änderung in der Bindungsaffinität zu entzündeten Endothelzellen beobachtet und damit ist Ladung allein als target-Prinzip für entzündetes Gewebe nicht ausreichend.

Um bessere Einblicke in die molekularen Unterschiede zwischen gesundem und entzündetem Endothel zu erhalten, wurde ein in-vitro Modell für entzündetes Gewebe entwickelt. E-Selektin wird von Endothelzellen nicht konstitutiv exprimiert, sondern erst nach Kontakt der Zelle mit inflammatorischen Stimuli und stellt daher nicht nur einen Entzündungsmarker, sondern auch eine mögliche Zielstruktur für die Therapie von entzündlichen Krankheiten dar. Durch Stimulation mit TNF- α konnte an primären (HUVEC) sowie an immortalisierten Endothelzellen (HUVEctert) eine Entzündung induziert werden, die durch einen E-Selektin-spezifischen, Fluorescein-markierten Antikörper flowcytometrisch quantifiziert wurde. Dabei zeigte sich, dass die Entzündung bei HUVEctert prinzipiell schwächer ausfiel als bei Primärzellen.

Darüber hinaus wurden die Internalisierung und der folgende lysosomale Abbau von E-Selektin mit Hilfe von Monensin nachgewiesen. So konnte nach der Zytokinstimulation neben der Expression auch die zeitliche Veränderung der E-Selektin-Dichte an der Zelloberfläche charakterisiert werden.

Um eher physiologische Gegebenheiten zu simulieren und hohe Zellverluste zu vermeiden, wurden alle Untersuchungen nicht an Einzelzellen, sondern ausschließlich an Endothelzellmonolayern durchgeführt. Da die Analytik nur durch Durchflusszytometrie möglich war, diese jedoch an Einzelzellen gebunden ist, wurde zusätzlich ein Protokoll zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen entwickelt.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit aufbauend auf der Entwicklung von Versuchsprotokollen mit humanem artifiziellem Endothel einerseits E-Selektin als mögliche Zielstruktur für die selektive Therapie von Gefäßentzündungen weiter charakterisiert werden und andererseits positive Ladung als mögliches zusätzliches Targeting-Prinzip identifiziert werden.

6.2 Englisch

Most frequently particular carrier systems are applied for targeted therapy which are aimed to shuttle the loaded drug into the diseased tissue. To investigate the influence of surface charge on the particle-cell interaction, the surface of carboxylated polystyrene particles with 1 μm in diameter was converted to a positive one by adsorption of low molecular weight polyethyleneimine (PEI). After optimization experiments strongly positive charged and storage-stable particles were obtained. The surface modification of the particles was not only confirmed by the pH-dependent zeta potential, but also by quantification of the amount of unbound PEI, which has been determined by a modified Bradford assay.

For estimation of the binding efficiency of PEI-modified particles endothelial cell monolayers were used as an in-vitro model of blood vessels. The binding rate of PEI-modified particles was slightly higher than that of non-treated particles. Additionally, the binding efficiency of healthy and inflamed tissue was similar

indicating that charge without any other altered parameter is insufficient for targeting inflamed tissue.

For a deeper understanding of the molecular differences between healthy and inflamed endothelium, a human in-vitro model simulating inflamed tissue has been developed. E-selectin is not constitutively expressed by endothelial cells, but only after stimulation with inflammatory substances. Thus, E-selectin is not only a marker for inflammation but also a potential target for treatment of inflammatory diseases. Stimulation of cells with TNF- α caused inflammation of primary endothelial cells (HUVEC) as well as immortalized endothelial cells (HUVEC_{tert}), which has been quantified flow cytometrically by an E-selectin fluorescein-labeled antibody. These assays also revealed that the inflammation of HUVEC_{tert} was less developed than that of primary cells. Furthermore, the internalization and following lysosomal degradation has been demonstrated by use of monensin. After stimulating cells that way, not only expression but also the decreasing E-selectin density at the cell surface by time was observed.

In order to approach physiological conditions and to avoid cell loss, all the studies were performed on confluent endothelial cell monolayers, that were cultivated in microplates. As flow cytometric analysis requires single cells, a protocol for dissociation of tissues was developed.

All in all, positive surface charges of particles have been identified as an additional, but non-exclusive parameter for targeting of inflammation. Moreover, ongoing from the development of experimental protocols with human artificial endothelium the potential of E-selectin to act as a target for selective therapy of vascular inflammation was further characterized.

7 ANHANG A

A 5.1.2 Durchflusszytometrische Analyse von Endothelzellmonolayern

Tabelle 10: Prozentanteil lebender HUVEC- bzw. HUVECtert-Einzelzellen und mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität der lebenden HUVEC- bzw. HUVECtert-Einzelzellen nach Entzündung mit TNF- α (10 ng/ml, Inkubation 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde). Anschließend wurden die Zellschichten mit 0,1%iger EDTA-Lösung in PBS-Puffer (5 Minuten Inkubation) oder mit 0,25%iger Trypsin-EDTA-Lösung (1 Minute Inkubation) in Einzelzellen dissoziiert (n=2).

	Lebende Zellen (%)		Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	
	HUVEC	HUVECtert	HUVEC	HUVECtert
0,1%ige EDTA-Lsg., 5 min	67,4 \pm 2,0	65,5 \pm 0,85	7,72 \pm 0,66	10,75 \pm 0,42
Trypsin- EDTA-Lsg., 1 min	79,6 \pm 0,42	61,4 \pm 13,2	11,10 \pm 1,13	8,895 \pm 2,27

A 5.1.3.1 Expression von E-Selektin

Tabelle 11: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) von lebenden, fluoreszierenden HUVEC-Einzelzellen und Prozentanteil lebender HUVEC-Einzelzellen nach Entzündung mit TNF- α (50 ng/ml, Inkubation 2 oder 4 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen mit oder ohne Antikörper-Zusatz (n=2).

	Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)
unbehandelte Zellen	0,20 \pm 0,00	78,0 \pm 1,41
ohne TNF- α + AK	0,55 \pm 0,07	78,0 \pm 0,00
2h TNF- α + AK	5,61 \pm 0,86	78,0 \pm 0,00
4h TNF- α + AK	9,50 \pm 0,62	78,0 \pm 0,00

Tabelle 12: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) von lebenden, fluoreszierenden HUVEC-Einzelzellen und Prozentanteil lebender HUVEC-Einzelzellen nach Entzündung mit TNF- α (50 ng/ml, Inkubation 4, 6, 8 oder 24 Stunden) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen mit Antikörper-Zusatz (n=2).

	Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)
ohne TNF- α + AK	1,64 \pm 0,08	74,3 \pm 2,12
4 h TNF- α + AK	15,90 \pm 3,82	80,2 \pm 0,78
6 h TNF- α + AK	9,40 \pm 0,43	80,1 \pm 1,70
8 h TNF- α + AK	7,77 \pm 0,61	78,8 \pm 2,33
24 h TNF- α + AK	5,67 \pm 0,11	73,7 \pm 0,92

Tabelle 13: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) von lebenden, fluoreszierenden HUVEctert-Einzelzellen und Prozentanteil lebender HUVEctert-Einzelzellen nach Entzündung durch 2, 4 oder 6-stündige Inkubation mit TNF- α (50 ng/ml) und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen mit Antikörper-Zusatz (n=2).

	Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)
ohne TNF- α + AK	1,01 \pm 0,30	74,5 \pm 2,12
2h TNF- α + AK	2,61 \pm 0,56	76,5 \pm 2,12
4hTNF- α + AK	5,19 \pm 0,49	75,0 \pm 0,00
6hTNF- α + AK	6,05 \pm 1,48	75,5 \pm 0,71

Tabelle 14: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) von lebenden, fluoreszierenden HUVEC-Einzelzellen und Prozentanteil lebender HUVEC-Einzelzellen nach Entzündung durch vierstündige Inkubation mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen mit Antikörper-Zusatz (n=2).

	Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)
ohne TNF- α + AK	0,68 \pm 0,02	71,1 \pm 1,63
1 ng/mL TNF- α + AK	4,14 \pm 0,19	75,4 \pm 1,63
10 ng/mL TNF- α + AK	5,30 \pm 0,05	73,3 \pm 0,14
25 ng/mL TNF- α + AK	5,65 \pm 0,12	74,6 \pm 0,71
50 ng/mL TNF- α + AK	5,60 \pm 1,58	68,8 \pm 3,32

Tabelle 15: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) der lebenden, fluoreszierenden HUVEctert-Einzelzellen und Prozentanteil lebender HUVEctert-Einzelzellen nach Entzündung durch vierstündige Inkubation mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (Inkubation 1 Stunde) im Vergleich zu nicht entzündeten Zellen mit Antikörper-Zusatz (n=2).

	Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)
ohne TNF- α + AK	0,97 \pm 0,11	51,5 \pm 4,60
1 ng/mL TNF- α + AK	2,52 \pm 0,62	62,8 \pm 2,33
10 ng/mL TNF- α + AK	2,97 \pm 0,37	60,8 \pm 2,26
25 ng/mL TNF- α + AK	2,86 \pm 0,11	62,1 \pm 0,78
50 ng/mL TNF- α + AK	4,02 \pm 0,06	58,8 \pm 3,68

A 5.1.3.2 Internalisierung von E-Selektin

Tabelle 16: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender, entzündeter HUVEC-Einzelzellen und Prozentanteil lebender, entzündeter HUVEC-Einzelzellen 0, 30, 60, 90, 120 oder 150 Minuten nach Zytokinstimulation und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (1 Stunde Inkubation) (n=2).

Inkubation mit EndoPrime®	Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen(%)
0 min	9,21 ± 0,07	85,0 ± 0,42
30 min	8,57 ± 0,74	85,9 ± 0,64
60 min	6,26 ± 0,18	87,0 ± 0,14
90 min	5,68 ± 0,01	87,6 ± 0,07
120 min	5,24 ± 0,58	86,5 ± 0,21
150 min	4,72 ± 0,33	86,3 ± 0,07

Tabelle 17: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender, entzündeter HUVECTert-Einzelzellen und Prozentanteil lebender, entzündeter HUVECTert-Einzelzellen 0, 30, 60, 90, 120 oder 150 Minuten nach Zytokinstimulation und Detektion der Entzündung mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper (1 Stunde Inkubation) (n=2).

Inkubation mit EndoPrime®	Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen(%)
0 min	6,55 ± 0,47	77,9 ± 1,00
30 min	5,79 ± 0,45	78,3 ± 1,90
60 min	5,23 ± 0,27	79,3 ± 1,30
90 min	4,54 ± 0,78	78,2 ± 0,57
120 min	3,27 ± 0,62	79,0 ± 0,49
150 min	3,70 ± 0,00	80,4 ± 0,78

A 5.1.3.3 Internalisierung des E-Selektin-Antikörper-Komplexes

Tabelle 18: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender, entzündeter HUVEC-Einzelzellen und Prozentanteil lebender, entzündeter HUVEC-Einzelzellen nach 0, 30, 60, 90 oder 120 Minuten Chase-Inkubation bei 37°C in EndoPrime®-Medium. Detektion der Entzündung durch einstündige Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper bei 37°C (n=2).

Inkubation mit EndoPrime®	Vor Zusatz von Monensin		Nach Zusatz von Monensin	
	Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)	Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)
0 min	18,95 ± 0,49	68,5 ± 1,27	20,10 ± 1,00	70,6 ± 0,00
30 min	15,75 ± 1,34	72,8 ± 0,71	19,25 ± 0,64	72,2 ± 1,48
60 min	14,15 ± 0,49	73,8 ± 1,13	21,20 ± 0,14	72,0 ± 0,64
90 min	12,65 ± 0,21	71,1 ± 0,85	18,60 ± 0,14	67,2 ± 1,20
120 min	11,60 ± 0,14	68,8 ± 1,70	18,45 ± 1,91	69,8 ± 0,64

Tabelle 19: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender, entzündeter HUVEC-Einzelzellen und Prozentanteil lebender, entzündeter HUVEC-Einzelzellen nach 0, 30, 60, 90 oder 120 Minuten Chase-Inkubation bei 4°C in EndoPrime®-Medium. Detektion der Entzündung durch einstündige Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper bei 37°C (n=2).

Inkubation mit EndoPrime®	Vor Zusatz von Monensin		Nach Zusatz von Monensin	
	Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)	Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)
0 min	15,95 ± 0,92	63,8 ± 0,92	16,75 ± 0,07	59,0 ± 2,19
30 min	17,65 ± 0,07	68,8 ± 1,70	21,35 ± 0,07	66,4 ± 0,71
60 min	17,50 ± 0,00	67,3 ± 0,14	21,20 ± 0,71	62,6 ± 0,49
90 min	17,25 ± 0,21	65,9 ± 3,54	19,95 ± 0,64	62,4 ± 0,71
120 min	17,20 ± 0,71	67,1 ± 1,56	21,90 ± 0,00	65,0 ± 1,06

Tabelle 20: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender, entzündeter HUVECTert-Einzelzellen und Prozentanteil lebender, entzündeter HUVECTert-Einzelzellen nach 0, 30, 60, 90 oder 120 Minuten Chase-Inkubation bei 37°C in EndoPrime®-Medium. Detektion der Entzündung durch einstündige Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper bei 37°C (n=2).

Inkubation mit EndoPrime®	Vor Zusatz von Monensin		Nach Zusatz von Monensin	
	Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)	Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	Lebende Zellen (%)
0 min	9,15 ± 0,03	64,5 ± 0,49	12,15 ± 0,64	61,9 ± 0,71
30 min	6,77 ± 0,21	67,0 ± 1,20	10,95 ± 0,64	65,1 ± 0,35
60 min	7,09 ± 0,37	64,3 ± 5,44	11,60 ± 2,00	59,8 ± 3,32
90 min	6,07 ± 0,54	66,0 ± 1,98	9,79 ± 0,72	63,3 ± 1,27
120 min	5,55 ± 0,35	66,6 ± 0,64	8,09 ± 0,40	63,9 ± 1,27

Tabelle 21: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (Ex/Em 485/525 nm von Fluorescein) lebender, entzündeter HUVECTert-Einzelzellen und Prozentanteil lebender, entzündeter HUVECTert-Einzelzellen nach 0, 30, 60, 90 oder 120 Minuten Chase-Inkubation bei 4°C in EndoPrime®-Medium. Detektion der Entzündung durch einstündige Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper bei 37°C (n=2).

Inkubation mit EndoPrime®	Vor Zusatz von Monensin		Nach Zusatz von Monensin	
	mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	lebende Zellen (%)	mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität	lebende Zellen (%)
0 min	7,77 ± 0,04	72,0 ± 0,64	9,56 ± 0,28	68,4 ± 0,78
30 min	8,69 ± 1,03	71,7 ± 2,05	10,65 ± 0,49	70,4 ± 2,47
60 min	8,42 ± 0,12	69,8 ± 0,71	9,15 ± 0,66	70,3 ± 3,68
90 min	9,63 ± 0,33	70,5 ± 1,70	11,65 ± 0,35	68,8 ± 0,42
120 min	7,84 ± 0,54	71,9 ± 0,35	8,62 ± 0,53	69,1 ± 0,07

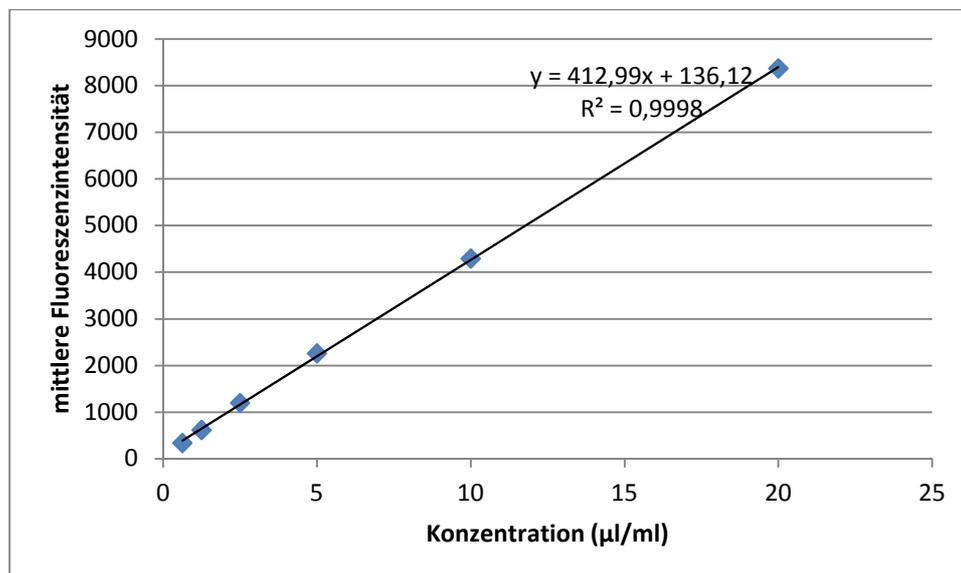
Tabelle 22: Antikörper-Gehalt nach Inkubation mit EndoPrime®-Medium bei 37°C bzw. 4°C (n=6).

EndoPrime®-Inkubationszeit	Antikörper-Konzentration (µl/ml)			
	HUVEC		HUVEctert	
	37°C	4°C	37°C	4°C
30 min	-0,353 ± 0,035	-0,383 ± 0,040	-0,245 ± 0,016	-0,336 ± 0,048
60 min	-0,285 ± 0,031	-0,394 ± 0,036	-0,252 ± 0,021	-0,257 ± 0,049
90 min	-0,263 ± 0,041	-0,381 ± 0,041	-0,223 ± 0,036	-0,305 ± 0,044
120 min	-0,183 ± 0,062	-0,378 ± 0,025	-0,178 ± 0,029	-0,164 ± 0,055

Tabelle 23: Kalibration von primärem, fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper in EndoPrime®-Medium (n=3).

Antikörper-Konzentration (µl Stammlösung/ml)	Mittlere Fluoreszenzintensität
0,625	339,3
1,25	619,6
2,5	1198,3
5	2261,0
10	4292,0
20	8368,0

Abbildung 18: Kalibrationsgerade von primärem, fluoreszenzmarkiertem E-Selektin-Antikörper in EndoPrime®-Medium (n=3).



A 5.2.2 Charakterisierung der PEI-modifizierten Polystyrolpartikeln

Tabelle 24: Charakterisierung von PEI-modifizierten Partikeln in Abhängigkeit des pH-Wertes (n=3).

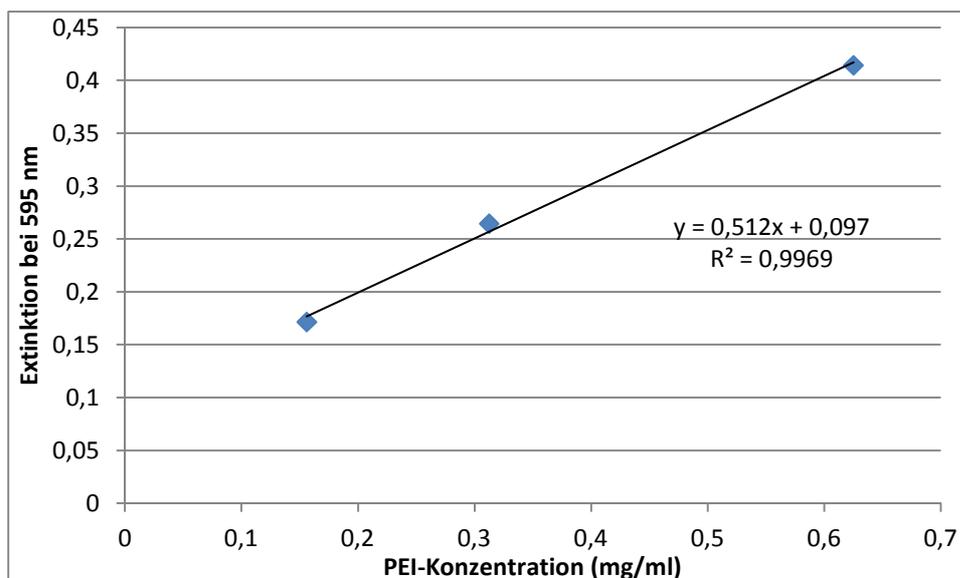
pH-Wert	mittlerer Partikeldurchmesser [nm]	Pdl	Zeta-Potential [mV]	Leitfähigkeit [mS/cm]
3,7	1201,5 ± 16,3	0,282 ± 0,10	68,3 ± 3,2	1,627 ± 0,049
4,4	1192,5 ± 6,4	0,163 ± 0,03	63,0 ± 2,0	0,536 ± 0,008
5,6	1152,0 ± 8,5	0,073 ± 0,03	56,4 ± 1,5	0,129 ± 0,003
6,7	1115,0 ± 107,5	0,257 ± 0,26	30,7 ± 1,6	0,059 ± 0,002
7,7	1228,0 ± 9,9	0,075 ± 0,10	24,6 ± 0,7	0,113 ± 0,001
8,6	1326,0 ± 41,0	0,199 ± 0,06	14,8 ± 0,5	0,158 ± 0,001
9,4	1491,0 ± 41,0	0,237 ± 0,12	-0,8 ± 0,2	0,187 ± 0,002
10,6	1381,0 ± 207,9	0,062 ± 0,08	-26,0 ± 0,4	0,213 ± 0,002

A 5.2.3 PEI-Bestimmung

Tabelle 25: Kalibration von PEI in 100 mM Phosphatpuffer pH 5,8 (n=3).

PEI-Konzentration (mg/ml)	Extinktion bei 595 nm
0,625	0,414
0,3125	0,265
0,156	0,172

Abbildung 19: Kalibrationsgerade von PEI in 100 mM Phosphatpuffer pH 5,8 (n=3).



A 5.3 Partikel-Zell-Interaktion

Tabelle 26: Bindung von PEI-modifizierten Polystyrolpartikeln im Vergleich zu unbehandelten Polystyrolpartikeln (20, 40 und 80 µg/ml in PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺, 30 Minuten Inkubation) an gesunde oder entzündete HUVEC (n=3).

Partikelsuspension (µg/ml)	Partikel	Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität	
		Gesunde Zellen	Entzündete Zellen
20	PEI-modifiziert	333,7 ± 11,7	329,7 ± 24,9
	carboxyliert	287,7 ± 23,2	288,0 ± 29,4
40	PEI-modifiziert	667,7 ± 17,2	653,0 ± 25,5
	carboxyliert	621,3 ± 28,0	617,0 ± 17,5
80	PEI-modifiziert	1442,7 ± 77,1	1488,0 ± 26,2
	carboxyliert	1299,3 ± 39,9	1272,3 ± 64,7

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S.K. Sahoo und V. Labhasetwar, Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discovery Today* 8 (2003), 1112.
- [2] P. Langguth, G. Fricker und H. Wunderli-Allenspach, *Biopharmazie*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2004, Kapitel 8.
- [3] J.N. Mehrishi und J. Bauer, Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge, *Electrophoresis* 23 (2002), 1984.
- [4] L. Thiele, B. Rothen-Rutishauser, S. Jilek, H. Wunderli-Allenspach, H.P. Merkle und E.J. Walter, Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J. Control. Release* 76 (2001), 59.
- [5] L. Thiele, J.E. Diederichs, R. Reszka, H.P. Merkle und E. Walter, Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells, *Biomaterials* 24 (2003), 1409.
- [6] www.sigmaaldrich.com
- [7] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix und J. P. Behr, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (1995), 7297.
- [8] A. von Harpe, H. Petersen, Y. Li und T. Kissel, Characterization of commercially available synthesized polyethylenimines for gene delivery, *J. Control. Release* 69 (2000), 309.
- [9] X.-Y. Wang, C. Pichl, F. Gabor und M. Wirth, A novel cell-based microfluidic multichannel setup - impact of hydrodynamics and surface characteristics on the bioadhesion of polystyrene microspheres, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 102 (2013), 849.
- [10] T. Trimaille, C. Pichot und T. Delair, Surface functionalization of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles with poly(ethylenimine) and plasmid DNA by the layer-by-layer approach, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 221 (2003), 39.
- [11] W.T. Godbey, K.K. Wu und A.G. Mikos, Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery, *J Control Release* 60 (1999b), 149.

- [12] M. Prantl, Etablierung und Charakterisierung eines artifiziellen Endothels in 3D-Mikrokanälen, Diplomarbeit, Universität Wien, 2011.
- [13] H.B. Schiller, A. Szekeres, B.R. Binder, H. Stockinger und V. Leksa, Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor 2 Receptor Limits Cell Invasion by Controlling $\alpha V\beta 3$ Integrin Expression and Proteolytic Processing of Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor, *Mol. Biol. Cell* 20(3) (2009), 745.
- [14] E. Jubeli, L. Moine, J. Vergnaud-Gauduchon und G. Barratt, E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging, *J. Control. Release* (2011), 194.
- [15] H.H. Mollenhauer, D.J. Morrè und L.D. Rowe, Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity, *Biochim. Biophys. Acta* 1031(2) (1990), 225.
- [16] R.H. Müller, Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis, Band 37, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996, Kapitel 2.
- [17] R.M.C. Dawson, D.C. Elliott, W.H. Elliott und K.M. Jones, *Data for biochemical research* (Third Edition), Oxford Science Publications, 1986.
- [18] M. Wirth, Analytik von Mitoxantron auf Sensorbasis, Dissertation, Universität Wien, 1995.
- [19] R.H. Müller und R. Schuhmann, Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Band 38, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996, Kapitel 3.
- [20] F. Ungaro, G. De Rosa, A. Miro und F. Quaglia, Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31 (2003), 143.
- [21] X.-Y. Wang, C. Fillafer, C. Pichl, S. Deinhammer, R. Hofer-Warbinek, M. Wirth und F. Gabor, A multichannel acoustically driven microfluidic chip to study particle-cell interactions, *Biomicrofluidics* 7 (2013), 044127.

9 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Alexandra Schlögl
Geburtsdatum: 30. März 1986
Geburtsort: Wien, Österreich
Staatsbürgerschaft: Österreich

Familie:

Mutter: Maria Schlögl
Vater: Mag. Johann Schlögl
Bruder: Andreas Schlögl

Ausbildung:

1992 – 1996: Volksschule Bendagasse
1996 – 2000: Schulversuch Mittelschule Anton-Krieger-Gasse, 1230
Wien
2000 – 2004: Realgymnasium Anton-Krieger-Gasse, 1230 Wien
Juni 2004: Reifeprüfung
ab Oktober 2004: Pharmaziestudium an der Universität Wien
März 2011: Beginn der Diplomarbeit am Department für
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie,
Universität Wien
SS 2012: Tutorin im Grundpraktikum Pharmazeutische
Technologie am Department für Pharmazeutische
Technologie und Biopharmazie, Universität Wien
WS 2013: Tutorin im Praktikum Industrielle
Arzneimittelherstellung am Department für
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie,
Universität Wien