

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Inflammation-induced brain endothelial activation leads to
uptake of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles via
sulfated glycosaminoglycans

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dominique Berndt
aus Blankenburg (Harz)

Datum der Promotion: 07.12.2018

Inhaltsverzeichnis

<u>ABSTRACT</u>	<u>1</u>
<u>KURZFASSUNG</u>	<u>2</u>
<u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	<u>3</u>
<u>AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG</u>	<u>4</u>
<u>AUSZUG JOURNAL SUMMARY LIST</u>	<u>5</u>
<u>DRUCKEXEMPLAR DER PUBLIKATION</u>	<u>6</u>
<u>LEBENS LAUF UND PUBLIKATIONS LISTE</u>	<u>17</u>
<u>DANKSAGUNG</u>	<u>18</u>

A b s t r a c t

Based on our previous data on the presence of very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles (*VSOP*) on brain endothelial structures during experimental autoimmune encephalomyelitis (*EAE*), we investigated the mechanisms of *VSOP* binding on inflamed brain endothelial cells *in vivo* and *in vitro*. After intravenous application, *VSOP* were detected in brain endothelial cells of *EAE* animals at peak disease and prior to clinical onset. *In vitro*, inflammatory stimuli increased *VSOP* uptake by brain endothelial bEnd.3 cells, which we confirmed in primary endothelial cells and in bEnd.3 cells cultured under shear stress. Transmission electron microscopy and blocking experiments revealed that during inflammation *VSOP* were endocytosed by bEnd.3. Modified sulfated glycosaminoglycans (GAG) on inflamed brain endothelial cells were the primary binding site for *VSOP*, as GAG degradation and inhibition of GAG sulfation reduced *VSOP* uptake. Thus, *VSOP*-based MRI is sensitive to visualize early neuroinflammatory processes such as GAG modifications on brain endothelial cells.

K u r z f a s s u n g

Basierend auf unseren früheren Arbeiten über das Auftreten von Eisenoxid-Nanopartikeln (Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles *VSOP*) auf zentralnervösen Endothelstrukturen im Rahmen einer Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (*EAE*) bei Mäusen untersuchen wir in dieser Arbeit die Mechanismen der VSOP-Bindung auf entzündeten Hirnendothelzellen *in vivo* als auch *in vitro*. Nach intravenöser Verabreichung konnten VSOP in Hirnendothelzellen von *EAE*-Mäusen zum Krankheitsmaximum als auch vor dem Auftreten von klinischen Symptomen nachgewiesen werden. *In vitro* erhöhten entzündliche Stimuli die VSOP-Aufnahme in der murinen bEnd.3-Hirnendothelzelllinie, was wir bei Primärzellen und auch bei bEnd.3-Zellen unter Flussbedingungen bestätigen konnten. Transmissionselektronenmikroskopie und die Blockade von molekularen Oberflächenstrukturen zeigten ferner, dass VSOP unter entzündlichen Bedingungen von den bEnd.3-Zellen mittels Endozytose aufgenommen werden. Modifizierte sulfatierte Glykosaminoglykane (*GAG*) waren dabei die vorrangige Bindungsstelle für die Nanopartikel, da die VSOP-Aufnahme nach *GAG*-Degradation und Unterdrückung der Sulfatierung abnahm. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass VSOP-basierte Magnetresonanztomographie helfen kann, frühe neuroinflammatorische Veränderungen wie zum Beispiel *GAG*-Modifikationen auf Hirnendothelzellen darzustellen.

E i d e s s t a t t l i c h e V e r s i c h e r u n g

Ich, Dominique Berndt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Inflammation-induced brain endothelial activation leads to uptake of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles via sulfated glycosaminoglycans.*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

01.06.2017

_____ Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung

Publikation: *Berndt D, Millward JM, Schnorr J, Taupitz M, Stangl V, Paul F, Wagner S, Wuerfel JT, Sack I, Ludwig A, Infante-Duarte C. Inflammation-induced brain endothelial activation leads to uptake of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles via sulfated glycosaminoglycans. Nanomedicine. 2017*

Konzept/Fragestellung/Design

- Gemeinsam mit der Betreuerin

Experimenteller Teil

- *In vivo*-Teil: Immunisierung und Monitoring der Mäuse, Präparation und histologische Aufarbeitung der Hirne zu ca. 50%.
- *In vitro*-Teil: Eigenständige Durchführung sämtlicher *in vitro*-Arbeiten mit Endothelzellen nach initialer Protokolloptimierung unter statischen sowie Flussbedingungen und anschließender phenanthrolinbasierter Eisenquantifikation; Vorbereiten der Proben für die MPS-Messungen und die TEM; Mithilfe bei der Primärzellengewinnung

Statistik

- Eigenständig.

Arbeiten an der Manuskripterstellung

- Eigenständige Darlegung von Methoden und Ergebnissen; Vorlage von Hintergrund und Diskussion zur detaillierteren Bearbeitung durch die Betreuerin und Koautoren

Gesamtanteil: 70%

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

Auszug Journal Summary List

2015 JCR Science Edition [Journal Title Changes](#)

Journal Summary List
 Journals from: **subject categories NANOSCIENCE & NANOTECHNOLOGY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by:

Journals 1 - 20 (of 83)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to Journal information)	ISSN	JCR Data ⁱ					Eigenfactor [®] Metrics ⁱ		
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	MAT NANOTECHNOL	1748-3387	40881	35.267	40.632	7.914	152	4.7	0.16738	17.348
<input type="checkbox"/>	2	ADV MATER	0935-9648	141386	18.960	18.862	3.325	988	5.1	0.32616	5.047
<input type="checkbox"/>	3	NANO LETT	1530-6984	129399	13.779	14.867	2.177	1260	5.1	0.36714	4.868
<input type="checkbox"/>	4	ACS NANO	1936-0851	97676	13.334	14.486	2.305	1268	3.7	0.35682	4.111
<input type="checkbox"/>	5	NANO TODAY	1748-0132	5428	13.157	19.098	1.925	40	4.7	0.01505	5.129
<input type="checkbox"/>	6	NANO ENERGY	2211-2855	6968	11.553	12.272	2.875	488	1.9	0.01793	2.624
<input type="checkbox"/>	7	ADV FUNCT MATER	1616-301X	58245	11.382	11.774	2.396	770	4.5	0.14164	3.089
<input type="checkbox"/>	8	NANO RES	1998-0124	7188	8.893	9.274	1.426	357	3.9	0.01987	2.234
<input type="checkbox"/>	9	J PHYS CHEM LETT	1948-7185	26225	8.539	7.803	1.971	771	3.0	0.11865	2.481
<input type="checkbox"/>	10	SMALL	1613-6810	30275	8.315	8.375	2.047	681	4.3	0.07724	2.180
<input type="checkbox"/>	11	NANOTOXICOLOGY	1743-5390	3466	7.913	8.137	1.814	113	3.3	0.00950	1.870
<input type="checkbox"/>	12	NANOSCALE	2040-3364	46621	7.760	7.915	1.522	2260	2.5	0.14598	1.783
<input type="checkbox"/>	13	BIOSENS BIOELECTRON	0956-5663	37000	7.476	6.675	2.436	970	4.2	0.06121	1.187
<input type="checkbox"/>	14	ACS APPL MATER INTER	1944-8244	54997	7.145	7.332	1.180	3350	2.4	0.14766	1.462
<input type="checkbox"/>	15	ADV SCI	2198-3844	255	6.000	6.400	1.535	114	0.7	0.00021	2.750
<input type="checkbox"/>	16	ENVIRON SCI-NANO	2051-8153	351	5.896	5.896	1.119	59	1.4	0.00100	1.375
<input type="checkbox"/>	17	ADV HEALTHC MATER	2192-2640	3173	5.760	6.019	1.050	262	2.2	0.01133	1.560
<input checked="" type="checkbox"/>	18	NANOMED-NANOTECHNOL	1549-9634	6594	5.671	6.922	1.566	196	4.0	0.01540	1.491
<input type="checkbox"/>	19	LAB CHIP	1473-0197	23910	5.586	5.760	1.373	483	4.6	0.05599	1.423
<input type="checkbox"/>	20	ACS PHOTONICS	2330-4022	1364	5.404	5.404	1.535	243	1.3	0.00607	2.195

Druckexemplar der Publikation

→ <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.01.010>

L e b e n s l a u f

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

P u b l i k a t i o n s l i s t e

Berndt D, Millward JM, Schnorr J, Taupitz M, Stangl V, Paul F, Wagner S, Wuerfel JT, Sack I, Ludwig A, Infante-Duarte C. Inflammation-induced brain endothelial activation leads to uptake of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles via sulfated glycosaminoglycans. *Nanomedicine*. 2017

Millward JM, Guo J, Berndt D, Braun J, Sack I, Infante-Duarte C. Tissue structure and inflammatory processes shape viscoelastic properties of the mouse brain. *NMR Biomed*. 2015

Jason Millward, Dominique Berndt, Laura Hanke, Eyk Schellenberger, Matthias Taupitz, Susanne Wagner, Angela Ariza de Schellenberger, Carmen Infante-Duarte. Application of europium-doped very small iron oxide nanoparticles to visualize neuroinflammation with MRI and fluorescence microscopy. *Submitted*

D a n k s a g u n g

Mein Dank gilt zuallererst Frau PD Dr. Carmen Infante-Duarte für die Überlassung dieser spannenden Thematik, dann aber vor allem für die durchweg konstruktive und freundschaftliche Begleitung über die Jahre. Jason Millward gilt mein Dank für die geduldige Einführung in die Laborarbeit, die anschließend immer unterhaltsamen Geschichten und die Gesellschaft während langer Abenden im Labor und natürlich all die unglaublich köstlichen Kuchen und Nachspeisen zu etlichen Gelegenheiten. Danke auch an Natascha für ihren unermüdlichen Einsatz.

Zum Schluss gilt mein immerwährender Dank meinen Eltern und meinen Großeltern für die Ermöglichung und all ihre Unterstützung auf meinem Weg bis zu dem Punkt, an dem ich mich heute befinde.