

---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Substanzen

Substanz	Hersteller	Ort	Land
DMEM	Gibco	Karlsbad	D
PDS	First Link	Brockmoor	UK
Sukrose	Serva	Heidelberg	D
Dulbecco's Phosphatpuffer (D-PBS)	Bio Whittaker	Walkersville, MD	USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom	Berlin	D
BFGF	Roche	Mannheim	D
Puromycin	Sigma	St. Louis, MO	USA
Trypsin- EDTA	Biochrom	Berlin	D
DNase I	Roche	Mannheim	D
Fibronektin (Bovine Plasma)	Invitrogen	Karlsbad	D
Gentamycin	Biochrom	Berlin	D
Penicillin G	Biochrom	Berlin	D
RPMI 1640 Medium	Biochrom	Berlin	D
Streptomycin	Biochrom	Berlin	D
Collagenase/Dispase	Sigma	St. Louis, MO	USA
Collagenase CLS2	Sigma	St. Louis, MO	USA
Mikrotiterplatten (96-Well, Flachboden)	Nunc	Roskilde	DK
Transwellfilter (0.4 und 3.0 $\mu\text{m}$ )	Costar	St. Louis, MO	USA
Percoll	Amersham	Uppsala	S
Collagen IV	Sigma	St. Louis	USA

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>
Rabbit anti-Claudin 5	Zytomed	Berlin	D
Maus anti-Occludin	Zytomed	Berlin	D
Ziegen Serum	DAKO	Glastrup	DK
Alexa Fluor633 goat anti-mouse IgG	Zytomed	Berlin	D
Alexa Fluor594 chicken anti-rabbit IgG	Zytomed	Berlin	D
Dako Fluorescent Mounting Medium	DAKO	Glastrup	DK
Paraformaldehyd	Sigma	St. Louis, MO	USA
DMSO	Sigma	St Louis, MO	USA
MTT Reagent	Sigma	St. Louis, MO	USA
Triton X	Sigma	St. Louis	USA
LDH –Kit	Roche	Mannheim	D
Trypsin	Biochrom	Berlin	D
Heparin	Braun	Melsungen	D
DAPI (Diamino- Phenylidole)	Sigma	Deisenhofen	D
Trypanblaulösung	Biochrom	Berlin	D
v.Willebrand- Faktor rabbit anti-human IgG	DAKO	Glastrup	DK
GFAP goat anti-rabbit (FITC)	Sigma	Deisenhofen	D
Hydrokortison	Sigma-Aldrich	Deisenhofen	D
Diaminobenzidin	DAKO	Carpinteria, CA	USA
Eosin	Merck	Darmstadt	D
Essigsäure	Merck	Darmstadt	D
Ethanol 96%	Merck	Darmstadt	D
Formalin	Merck	Darmstadt	D
Hämatoxylin	Merck	Darmstadt	D
Hartparaffin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen	D
Isopropanol	Merck	Darmstadt	D
Kaninchen-Peroxidase-Antiperoxidase	DAKO	Carpinteria	USA

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>
(PAP)			
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen	D
Kupfersulfat	Merck	Darmstadt	D
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen	D
Natriumcarboxymethylcellulose	Sigma-Aldrich	Deisenhofen	D
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt	D
Neoclear (Xylolersatz)	Merck	Darmstadt	D
Neomount	Merck	Darmstadt	D
Objektträger	DAKO	Carpinteria	USA
Anti-Kaninchen-Immunglobulin vom			
Schwein	DAKO	Carpinteria	USA
Schweineserum	DAKO	Carpinteria	USA
Sulfadiazin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen	D
Atovaquon	Glaxo- Smithkline	London	UK
RO-20-1724	Sigma-Aldrich	Deisenhofen	D
CPT-cAMP	Sigma-Aldrich	Deisenhofen	D
Ringer- Hepes	Sigma-Aldrich	Deisenhofen	D

### 3.2 Geräte

Gerät	Hersteller	Ort	Land
UV Turnable Absorbance Detektor $\lambda = 254 \text{ nm}$	Waters	Überlingen	D
Autosampler (Modell 717)	Waters	Eschborn	D
Coulter LS 230	Coulter Electronics	Miami	USA
Hauptsäule (Spherisorb C1) $L \times D = 125 \times 4 \text{ mm}$ Partikelgröße: $5 \mu\text{m}$	Waters	Eschborn	D
Integrator (Modell 3396 III)	Hewlett Packard	Bad Homburg	D
Isokratische Pumpe (Modell 510)	Waters	Eschborn	D
Malvern Zetasizer IV	Malvern Instruments	Herrenberg	D
Micron LAB	APV Deutschland GmbH	Lübeck	D
Mikrotom (Modell HM 400)	Microm GmbH	Heidelberg	D
Ultraturrax T 25	Janke & Kunkel	Staufen	D
Vakuumkonzentrator (Modell CON- 1000)	Fröbel	Lindau	D
Vorsäule (Xterra RP 18) $L \times D = 20 \times 4 \text{ mm}$ Partikelgröße: $3,5 \mu\text{m}$	Waters	Eschborn	D

---

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>
Millipore Widerstandsmessgerät	Millipore	Bedford	USA
Elektrode Chopstik	Millipore	Bedford	USA
Elektrode 12 Well Chamber	Millipore	Bedford	USA

---

## **3.3 Methoden**

### **3.3.1 In-vitro-Untersuchungen**

#### **3.3.1.1 Untersuchungen mit Zellen der BHS**

Sämtliche Arbeitsschritte wie Zellpräparation, Auftauen von Zellen, Beschichten der Kulturplatten, Aussäen der Zellen und Medienwechsel wurden unter aseptischen Arbeitsbedingungen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

##### **3.3.1.1.1 Kultivierung von Endothelzelllinien**

Tiefgefrorene Endothelzellen (86, 97) (bend3, RBE4) wurden schnell im Wasserbad aufgetaut, mit 10% FCS angereichertem Medium verdünnt und in die Kulturgefäße übertragen. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zelllinien wurden zwischen 3 und 10 Mal passagiert und nach dem Erreichen der Konfluenz für Experimente verwendet. Ein Teil der Zellen der ersten Passage wurden wieder eingefroren. Das Einfriermedium bestand aus FCS und 10% DMSO, und es wurden 10 Mio. Zellen/ml in Kryo-Röhrchen mittels eines „Cryo Freezing Container“ bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) umgelagert.

---

### 3.3.1.1.2 Gewinnung von primären Rattenendothelzellen

Die Isolierung der Kapillar-Endothelzellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Deli et al. (25) sowie einer von Blasig et al. (15, 77) beschriebenen mechanisch-enzymatischen Methode. Zehn Tage alte Wistar-Ratten (10 Tiere) wurden mit Halothan® anästhetisiert. Der Kopf wurde mit einer Schere abgetrennt und mit Ethanol desinfiziert. Nach dem Eröffnen der Schädel-Kalotte wurde mit einem neuen sterilen Besteck das Gehirn präpariert und in PBS auf Eis gelagert. Das Kleinhirn wurde mit einer Pinzette entfernt, beide Hälften des Großhirns wurden separat auf Chromatographiepapier gerollt, um die Meningen zu entfernen. Anschließend wurde der Plexus choroideus mit einer Pinzette entfernt und das Hirngewebe in einer Petrischale mit 1 ml DMEM auf Eis gesammelt. Nach dem Zerkleinern mittels zweier Skalpelle wurden die 1 mm<sup>3</sup> großen Stückchen in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 18 ml DMEM und CLS2 (Endkonzentration: 1mg/ml) sowie mit 300 µl Dnase I (1mg/ml) 1,5 Stunden lang bei 37°C geschüttelt (350 U/min, KM-Akku Schüttler). Nach Inkubation der Hirnsuspension wurden 10 ml DMEM zugegeben und bei 4 °C mit 1000 g 8 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, die Hirnzellen wurden in 25 ml 20% BSA in DMEM resuspendiert und erneut zentrifugiert (4 °C, 1000 g, 20 min). Die oben schwimmende Myelinschicht und das BSA wurden abpipettiert und das rote Zellpellet mit den Mikrokapillaren in ein neues 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zugabe von 13,5 ml DMEM, Collagenase/ Dispase (Endkonzentration 1 mg/ml) und 100 µl DNase I (1 mg/ml) wurde die Suspension 1 h bei 37 °C 350 U/Min geschüttelt, mit 10 ml DMEM versetzt und erneut zentrifugiert (700g 6 min). Ein Dichtegradient wurde durch Zentrifugation einer 33%igen Percoll-Lösung vorbereitet (Beckmann TI-60-Rotor, 4 °C, 30.000 g, 1 h). Das Pellet wurde in 2 ml DMEM resuspendiert und vorsichtig auf den Percoll-Gradienten aufgetragen. Durch Zentrifugation (4°C, 1000 g, 10 min ohne Bremse) zeigte sich eine pinkfarbene obere Mediumschicht sowie im Pellet rote Perizyten und Erythrozyten. Die weißlich-trübe Interphase, die die Kapillar-Endothelzellen enthält, wurde mit einer langen Kanüle aufgenommen (ca. 10 - 12 ml), in 25 ml DMEM gegeben und zentrifugiert (Beckmann-Tischzentrifuge, 4 °C, 1000 g, 10 min). Die Endothelzellen wurden daraufhin in 15 ml DMEM gewaschen und bei 700 g für 8 min zentrifugiert. Nach

---

einer erfolgreichen Präparation von 10 Ratten konnten so circa  $10^7$  Endothelzellen gewonnen werden. Diese wurden entweder sofort auf einem Transwell-Filter ausplattiert oder in Zellkulturflaschen kultiviert.

### **3.3.1.1.3 Isolierung von Astrozyten und Generierung von Astrozyten-konditioniertem Medium**

Astrozyten von neugeborenen Ratten wurden nach Dermietzel et al. (26) wie folgt isoliert. Vier bis fünf Tage alte Wistar-Ratten wurden dekapitiert, die Köpfe mit 70% EtOH abgetupft und mit sterilem Besteck die Schädelkalotte eröffnet. Der Großhirnkortex wurde entnommen und in sterilem PBS in einer Petrischale auf Eis gelagert. Die Meningen wurden sorgfältig mit zwei Uhrmacherpinzetten unter einem Binokular-Mikroskop auf Eis abgezogen und der Plexus choroideus sowie das Kleinhirn restlos entfernt. Die Gehirnmasse wurde mit 10 ml einer 0,1%igen Trypsin-Lösung gemischt und im Brutschrank bei 37°C für 30 min inkubiert. Die angedauten Gehirne wurden mit warmem PBS auf 20 ml aufgefüllt und bei 500 g für 7 min bei RT zentrifugiert. Der Trypsin-haltige Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 5 ml DNase I-Lösung (100  $\mu$ l/ml in DMEM) versetzt, für 3 min inkubiert und anschließend zweimal mit DMEM gewaschen. Danach wurde das Pellet durch ein Nylonsieb mit einer Maschenweite von 60  $\mu$ m passiert, nach Homogenisieren auf zwei 25 cm<sup>2</sup> Falcon® Zellkulturflaschen aufgeteilt und im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz (ca. 10 – 12 Tage) wurden die Zellen zur Entfernung von weniger gut anhaftenden, kontaminierenden Zellen für 1 h auf dem Schüttler bei 37 °C geschüttelt. Zur Kokultivierung mit Endothelzellen wurden die Astrozyten auf dem Boden einer 12-Well-Platte ausplattiert und 4 Wochen lang inkubiert. Zur Gewinnung des Astrozyten-konditionierten Mediums wurden die Astrozyten auf Endothel-Zellkulturmedium umgestellt. Das so erhaltene Astrozyten konditionierte Medium wurde nach drei Tagen abgenommen, durch eine 0,2  $\mu$ m Membran steril filtriert



---

und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Zur Kultivierung der Endothelzellen wurde das Astrozyten-konditionierte Medium im Verhältnis 1:1 mit frischem Endothel-Zellkulturmedium gemischt. Die Astrozytenkulturen wurden sechs Wochen lang zur Gewinnung des Astrozyten-konditionierten Mediums genutzt, wobei alle drei Tage ein Mediumwechsel erfolgte.

#### **3.3.1.1.4 Charakterisierung der Endothelzellen und Astrozyten**

Das Zellwachstum und Erscheinungsbild der Zellen wurde bei jedem Medienwechsel und vor jedem Versuch durch Betrachten der Kulturgefäße unter dem Umkehrmikroskop beurteilt. Die Endothelzell-spezifischen Markerproteine wie der von Willebrand-Faktor (vWF) wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper mit der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen. Für die Charakterisierung der Astrozyten wurde das „Glial Fibrillary Acidic Protein“ (GFAP) Protein als Marker verwendet. Hierzu wurden Gehirnendothelzellen und Astrozyten in „Chamber Slides“ bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 4 Paraformaldehyd für 30 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Antikörper gegen das zu untersuchende Protein für 30 min inkubiert. Hierbei kamen verschiedene Verdünnungen des Antikörpers, entsprechend den Herstellervorschriften zum Einsatz. Das Volumen betrug  $20\text{ }\mu\text{l}$  pro Kammer des Objektträgers. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörpern. Als Negativkontrolle wurden einige Kammern ausschließlich mit Sekundäntikörpern inkubiert. Abschließend wurden die Zellen fünfmalig mit PBS gewaschen, mit Eindeckmedium bedeckt, mit Deckgläschen versiegelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

---

### 3.3.1.1.5 Etablierung des Kokultur-Modells

#### 3.3.1.1.5.1 Kokultivierung von Astrozyten und Endothelzellen

Die Astrozyten wurden vor dem Einsatz in der Kokultur mindestens vier Wochen lang in einer 12-Well-Platte kultiviert. Jeden dritten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Endothelzellen wurden nach Präparation direkt auf dem Transwellfilter ausplattiert. Die Transwellfilter wurden am selben Tag mit 100  $\mu$ l einer Collagen Typ IV (500  $\mu$ l), Fibronektin (100  $\mu$ l) und Aqua dest. (600  $\mu$ l) beschichtet und für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie unter einer Sicherheitswerkbank mit UV-Licht bestrahlt, um mögliche Kontaminationen zu verhindern. Danach wurden die Endothelzellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und mit  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well ausplattiert. Die primären Endothelzellen wurden in den ersten zwei Tagen in einem speziellen Medium bestehend aus Puromycin 4  $\mu$ g/ml, bFGF 1  $\mu$ g/ml, und PDS (10%) kultiviert. Am dritten Tag wurde das Medium gewechselt, und die endothelzellhaltigen Transwellfilter wurden in eine astrozytenhaltige 12-Well-Platte überführt. Als Kokultur wurden beide Seiten des Transwellfilters in Endothelzell-Medium kultiviert. Die Kokultivierung dauerte weitere 3 - 4 Tage, wobei die beiden Zelltypen täglich mikroskopisch kontrolliert wurden. Der TEER der Endothelzellkultur wurde nach Konfluenz der Zellen (ca. 7 – 8 Tage) gemessen. Daraufhin wurde ein Teil des Mediums auf der apikalen Seite des Filters mit 300  $\mu$ l und auf der basolateralen Seite mit 1300  $\mu$ l Medium, das Heparin (100  $\mu$ g/ml), Hydrocortison (1  $\mu$ g/ml), das cAMP-Analogon CPT-cAMP (250  $\mu$ M) und den Phosphodiesterasehemmstoff RO-20-1724 (17,5  $\mu$ M) enthielt, vorsichtig gewechselt.

---

### **3.3.1.1.5.2 Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes**

Die Messung des TEER erfolgte an auf Filtereinsätzen kultivierten Hirnendothelzellen mit dem Millicell-ERS-Gerät mit einem „Chop Stick“-Elektrodensystem und mit der „Endohm-12-Chamber“. Das „Chop Stick“ Elektrodensystem bestand aus zwei Elektrodenhaltern, die jeweils eine Silber-/Silberchlorid-Elektrode zur Messung der Spannung und eine Silberelektrode zur Messung der Stromstärke aufwiesen. Ein Elektrodenhalter war um 2,5 mm länger ausgeführt, um bei einer direkten Messung in den Zellkulturschalen eine Verletzung des Zellmonolayers zu verhindern. Aus den gemessenen Strom- und Spannungswerten ermittelte das Messgerät den Widerstand in Ohm. Von den so erhaltenen Werten wurde der Leerwert (Widerstand des beschichteten Filters) abgezogen, und der resultierende Wert wurde mit der Filterfläche multipliziert, so dass sich der TEER in der Einheit Ohm x cm<sup>2</sup> ergab. Das Endohm-12-Chamber-Gerät stellt eine Kammer dar, in die die Filtereinsätze während der Messung kurz eingesetzt worden waren. Die obere Elektrode als Decke ermöglichte durch die Schließung des Stromkreises die Widerstandsmessung.

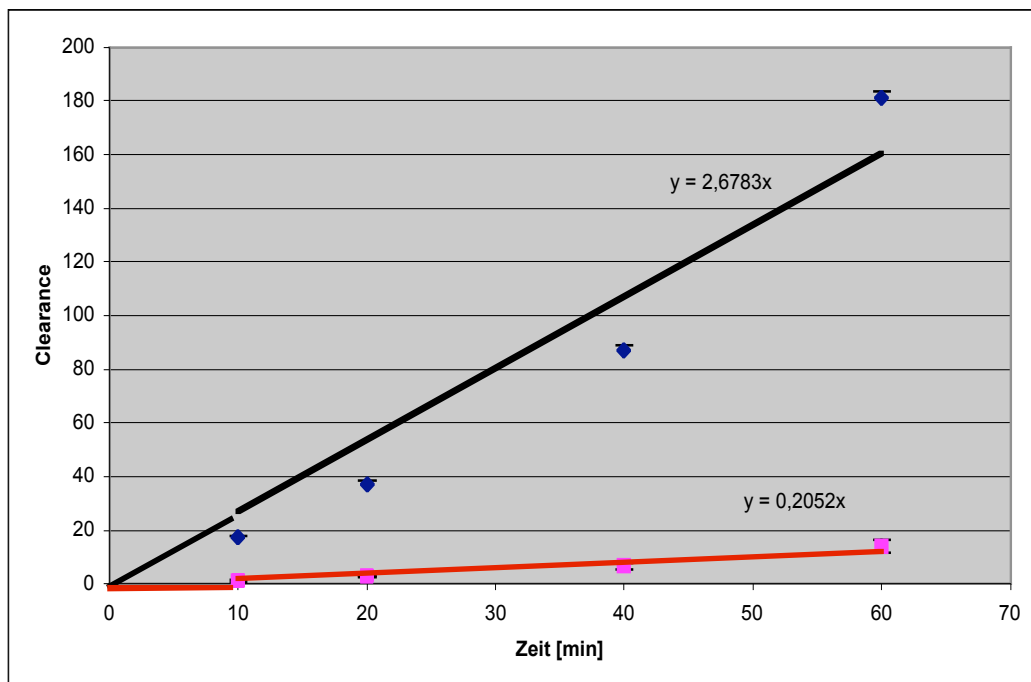
### **3.3.1.1.5.3 Messung der parazellulären Permeabilität**

Die Eignung von primären Hirnendothelzellen als Modell für den Transport durch die BHS ist von der Zelldichte abhängig. Deswegen wurden Transport-Experimente mit parazellulär diffundierendem Na-Fluorescein (376 Da) in Kollagen- und Fibronectin- beschichteten „Transwell-Clear“-Filtereinsätzen durchgeführt. Die Endothelzellen wurden auf 1 cm<sup>2</sup> großen Einsätzen in 12-Well-Platten kultiviert. Die Polyester-Filter hatten eine Porengröße von 0,4 µm. Die Experimente wurden 1 Tag nach dem Erreichen der Konfluenz gestartet. Die Zellen wurden dreimal mit 37 °C-warmem PBS gewaschen. Auf der apikalen Zellseite (Donorkompartiment) wurden 500 µl Ringer-Hepes mit 10 ng/ml Na-Fluorescein, auf der basolateralen Seite (Akzeptorkompartiment) 1500 µl Ringer-Hepes eingesetzt. Die Inkubation der Zellkulturplatten erfolgte inkubiert auf einem Schüttler (500 Upm, 37 °C). Zu definierten Zeitpunkten (15, 30, 45, 60 min, und 4 Stunden) wurden die kompletten

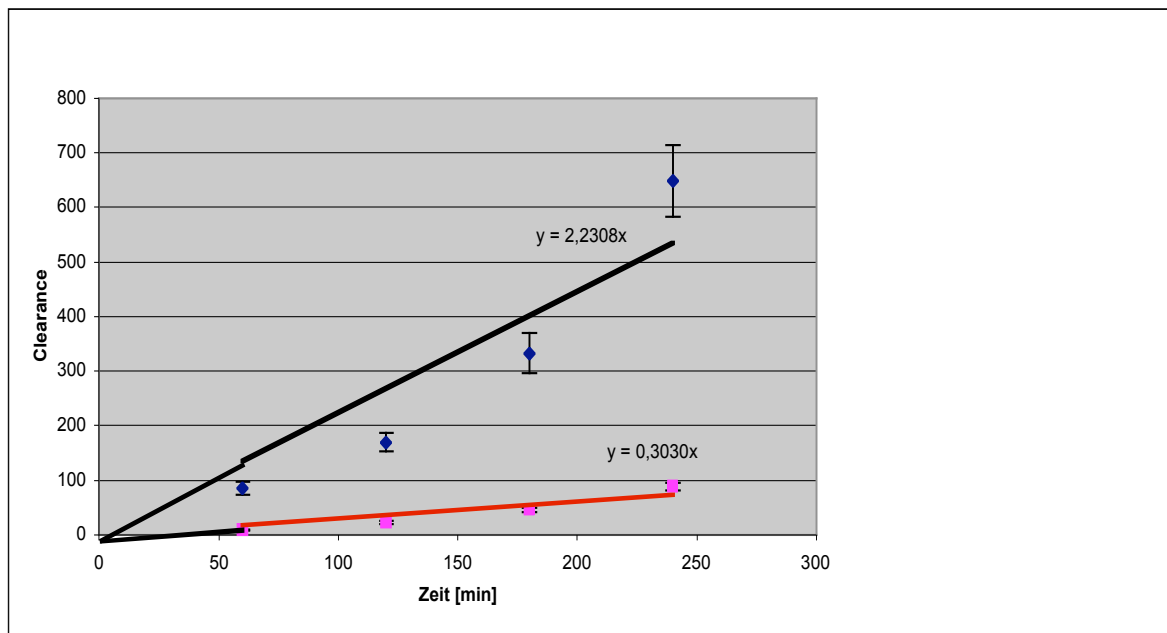
Filtereinsätze mit der Inkubationslösung entnommen und in einer frischem 37°C-warmen Ringer-Hepes-Lösung in 12-Well-Platten umgesetzt. Die in der vorherigen Zellkulturplatte verbliebenen Proben wurden wie bei den Transport-Experimenten im Diffusionskammer-System mit dem Shimadzu RF-5000 Fluorimeter (Emission 525 nm, Exzitation 440 nm) gemessen. Zur Auswertung wurden erneut die prozentuale Transportrate und der Endothelial-Permeabilitäts-Koeffizient (PS) berechnet (Abb. 6;7). Die Messungen wurden nach einem Protokoll von M. Deli (Szeged, Ungarn) durchgeführt.

$$\text{Clearance (l)} = [\text{concentration}_{\text{abluminal}}] \times [\text{volume}_{\text{abluminal}}] \times [\text{concentration}_{\text{luminal}}]^{-1}$$

$$\text{PS}_{\text{endothelial}}^{-1} = \text{PS}_{\text{total}}^{-1} - \text{PS}_{\text{insert}}^{-1}$$



**Abb. 6: Clearance von Na-Fluorescein durch Transwellfilter mit einer Filterporengröße von 0.4 µm (1 Stunde Messzeit). Rot: Clearance im Filter ohne Zellen, schwarz: Clearance im Filter mit Hirndothelzellen**



**Abb. 7: Clearance von Na-Fluorescein durch Transwellfilter mit einer Filterporengröße von  $0.4 \mu\text{m}$  (4 Stunden Messzeit). Rot: Clearance im Filter ohne Zellen, schwarz: Clearance im Filter mit Hirnendothelzellen**

### 3.3.1.1.6 Isolierung von Mikrokapillaren

Die Mikrokapillaren wurden mechanisch nach der Methode von Bauer et al. (10) unter Berücksichtigung einer Modifikation von Deli et al. (24) isoliert. Die Mäuse wurden mit Halothan anästhesiert. Unter kardialer Perfusion mit PBS wurde das Blut aus den Gefäßen entfernt. Die Präparation des Gehirns erfolgte in gekühltem Sukrosepuffer (0.32 M) in einer Petrischale. Die Meningen und das Kleinhirn wurden auf Filterpapier entfernt. Der Kortex wurde mit einem Skalpell in ca.  $1 \text{ mm}^3$ -große Stückchen geschnitten. Die Gehirnmasse wurde mit der dreifachen Menge Sukrosepuffer (8 ml) suspendiert und in einem Glas-Homogenisator (20 ml) mit Teflon-Pistill (0,25 mm Spaltbreite) mit sieben drehenden Auf- und Ab-Bewegungen auf Eis homogenisiert. Das so gewonnene Homogenat wurde für 10 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und 1000 g zentrifugiert. Überstand inklusive Myelinschicht wurden entfernt und das Pellet in dreifacher Sukrosemenge auf Eis gekühlt homogenisiert. Die pinkfarbenen Mikrokapillaren waren nach erneuter Zentrifugation gut

---

auf dem Boden des Röhrchens erkennbar. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 6 ml Sukrosepuffer, Zentrifugation bei 4 °C für 45 s und 100 g und die Zusammenführung der beiden Überstände. Diese wurden erneut bei 4 °C und 200 g für 135 s zentrifugiert, zweimalig in Sukrosepuffer und einmalig in PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, pH 7,4) gewaschen und erneut bei 4 °C. für 2 min bei 200g zentrifugiert. Der letzte Zentrifugationsschritt erfolgte in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 200 g. Die Kapillaren wurden entweder bei -70 °C gelagert oder sofort eingesetzt.

### **3.3.1.2 Interaktion von Nanosuspensionen mit Endothelzellen**

#### **3.3.1.2.1 Herstellung von Nanosuspensionen**

Die Herstellung und Charakterisierung der Nanosuspensionen wurde im Institut für Pharmazeutische Technologie der FU Berlin von Nadiem Bushrab durchgeführt. Um Nanosuspensionen mit möglichst kleinen Partikelgrößen und engen Größenverteilungen zu erhalten, wurde die Hochdruckhomogenisation angewendet. Dabei wurde das fein vorgemahlene Atovaquon-Pulver in wässriger Tensidlösung aus 1% Tween 80 mittels eines Rotor-Stator-Rührers (Ultraturrax T 25) suspendiert. Anschließend wurde die erhaltene Suspension in einem Hochdruckhomogenisator (Micron LAB) in eine Nanosuspension überführt. Die Homogenisation erfolgte unter 150 bar (2 Zyklen), 500 bar (2 Zyklen) und 1500 bar (20 Zyklen) (45). Die auftretenden Kavitations- und Scherkräfte reichten aus, um die Wirkstoffkristalle zu Nanopartikeln zu zerbrechen. Die Herstellung erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Die Nanosuspensionen wurden durch Thiomersal in einer Endkonzentration von 0,001% (m/v) konserviert. Eine Isoosmolarität wurde durch 2,25% (m/v) Glycerol x H<sub>2</sub>O eingestellt.

---

### 3.3.1.2.2 Charakterisierung von Nanosuspensionen

Die Teilchengröße und der Polydispersitätsindex wurden mit der Photonen-Korrelations-spektroskopie und Laserdiffraktometrie bestimmt. Der mittlere Partikeldurchmesser war  $459 \pm 2$  nm, mit einem Polydispersitätsindex von  $0.29 \pm 0.02$ ; 99% (vol/vol). Die Partikelgröße betrug  $< 2,155 \mu\text{m}$  (LD99).

### 3.3.1.2.3 Zytotoxizitätstest

Um zytotoxische Effekte der Atovaquon-Reinsubstanz und Atovaquon-Nanosuspensionen auf Endothelzellen zu untersuchen, wurde der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)-Test durchgeführt (81). MTT wird nur in lebenden Zellen zum blauen, wasserunlöslichen Formazan reduziert. Die Atovaquon-Reinsubstanz wurde in DMSO aufgenommen (1mg in 10  $\mu\text{l}$ ) und in Zellkulturmedium verdünnt. Nach einstündiger Inkubation von Endothelzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden Substanzen wurden extrazelluläre Partikel durch dreimaliges Spülen mit auf 37°C erwärmtem Kulturmedium entfernt, danach die Überstände vorsichtig dekantiert und je 50  $\mu\text{l}$  MTT-Lösung (2,5 mg/ml MTT in PBS) hinzugegeben. Nach weiteren 4 h im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) wurde das gebildete Formazan nach dem Entfernen der MTT-Lösung in DMSO gelöst. Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm im Tecan-ELISA-Reader gemessen.

Die Zahl vitaler Zellen in den unbehandelten „Wells“ wurde als Viabilität von 100% definiert. Die Angabe der Viabilität der mit den Testsubstanzen behandelten Zellen erfolgte in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Alle Experimente wurden als Sechsfachbestimmungen durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt.

---

#### **3.3.1.2.4 Passage von Nanosuspensionen durch die BHS im Kokultur-System**

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abschnitt 3.3.1.1.5.3 für Na-Fluorescein beschrieben. Unterschiedliche Konzentrationen der Atovaquon-Nanosuspensionen wurden in die apikale Kammer des Transwells pipettiert. Nach der Passage erfolgte die Messung an der basolateralen Seite mittels HPLC.

#### **3.3.1.3 Interaktion von Toxoplasma-Tachyzoiten mit Endothelzellen**

##### **3.3.1.3.1 Toxoplasma-Tachyzoiten**

Die Toxoplasma-Tachyzoiten des BK-Stammes (zur Verfügung gestellt von Prof. Janitschke, Abteilung Parasitologie des Robert Koch-Instituts Berlin) wurden aus den Bauchhöhlen von NMRI-Mäusen gewonnen, die drei Tage zuvor mit je  $1 \times 10^6$  Parasiten infiziert worden waren. Toxoplasma-Tachyzoiten des RH-Stammes, die das grünfluoreszierende Protein (GFP) exprimieren, wurden von Dr. D. Soldati, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt und in J774-Makrophagen vermehrt. Die Parasiten wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in RPMI Medium auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Primäre Rattenendothelzellen wurden in 96-Well-Platten kultiviert, ausgezählt und danach mit *T. gondii* infiziert.

##### **3.3.1.3.2 Zytotoxizitätstest**

Um die zytotoxischen Effekte von Toxoplasma-Tachyzoiten auf Endothelzellen zu untersuchen, wurde der Laktatdehydrogenase (LDH) Test durchgeführt. Die Aktivität der Laktatdehydrogenase, eines zytosolischen Enzyms, das von geschädigten Zellen in das umgebende Medium abgegeben wird, korreliert mit Schäden der Plasmamembran und



---

zeigt zytotoxische Wirkungen von Substanzen oder Mikroorganismen an, noch bevor diese mittels MTT-Test nachgewiesen werden können. Der Test ist sehr empfindlich, schon  $0,2 - 2 \times 10^4$  Zellen pro Well reichen in der Regel aus, um sichere Ergebnisse zu erhalten. Nach einstündiger Inkubation (siehe 3.3.1.3.1) wurden die extrazellulären Parasiten durch dreimaliges Spülen mit  $37\text{ °C}$  warmem Zellkulturmedium entfernt. Für die Bestimmung der LDH erfolgte aus Überstand mittels eines Testsets von Roche Diagnostik.

### **3.3.1.3.3 Interaktion mit *tight junction*-Proteinen**

Nach Auszählung der GFP Tachyzoiten erfolgte die Infektion der konfluenten primären Ratten-Endothelzellmonolayer auf den Transwellfiltern in einem Parasiten: Endothelzell-Verhältnis von 1:10. Nach einstündiger Inkubation wurden die extrazellulären Parasiten durch zweimaliges Waschen mit warmem HBSS entfernt. Nach der Fixierung mit Paraformaldehyd und Methanol ( $-20\text{ °C}$ ) folgte die Färbung der *tight junction* Proteine.

Zur besseren Darstellung des intakten Endothels wurde mit Antikörpern gegen Occludin, Claudin-5 und das *tight junction*-assoziierte Protein ZO-1 (Zonula occludens-1) eine spezifische Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt.

Freie Bindungsstellen der fixierten Transwell-Filter wurden mit 5%-igem Ziegenerum 1 Stunde lang blockiert. Nach Inkubation mit dem erste Primär-Antikörper (45 min,  $37\text{ °C}$ ) (Maus-anti-Occludin 1:100) erfolgte nach zweimaligen erneuten Waschen mit 5%-igen Block-Lösung die Färbung mit dem zweite Primär-Antikörper bei  $37\text{ °C}$  (anti-Claudin 5, oder anti-ZO-1 von Kaninchen). Nach wiederholtem Waschen wurden die Präparate mit dem Sekundär-Antikörper (Ziege anti-Maus) jeweils 45 min lang bei RT inkubiert. Die Präparate wurden zweimal mit Block-Lösung gewaschen und mit Diamino-Phenylidol (DAPI) 10 min abgedunkelt inkubiert. Nach weiteren Spülschritten wurden die Präparate mit Dako-Fluoreszenz-Eindeck-Medium eingedeckt, und mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) untersucht (Kooperation mit Salah Amasheh, Abt. Klinische Physiologie, Campus Benjamin Franklin).

---

#### **3.3.1.4 Interaktion von Toxoplasma-Tachyzoiten mit Mikrokapillaren**

Die isolierten Mikrokapillaren wurden mit Toxoplasma-Tachyzoiten inkubiert. Weil eine exakte Zellzahlbestimmung der Kapillarendothelzellen nicht möglich war, wurde mit einer konstanten Parasitenmenge gearbeitet. Die von zwei Mausgehirnen gewonnenen Mikrokapillaren wurden mit  $10^5$  Parasiten inkubiert. Nach einer oder drei Stunden Inkubation wurden die Proben mit PBS gewaschen und mit Methanol (-20 °C) fixiert. Mit diesen Präparaten folgte die immunhistologische Färbung der *tight junction*-Proteine wie bereits bei den Endothelzellen beschrieben (siehe 3.3.1.3.2).

### **3.3.2 In-vivo-Untersuchungen**

Die In-vivo-Untersuchungen wurden in den Tierlaboratorien des Instituts für Infektionsmedizin der Charité am Campus Benjamin Franklin durchgeführt. Die Versuche wurden von Lagetsi (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin) genehmigt (TVV 0014/02; TVV 244/98; TVV 218/98).

#### **3.3.2.1 Etablierung des Infektionsmodells der Reaktivierungstoxoplasmose**

Interferon-Regulatory-Factor-8 (IRF8)<sup>-/-</sup> Mäuse (früher auch als Interferon-consensus-binding-protein (ICSBP)<sup>-/-</sup>-Mäuse bezeichnet) wurden oral mit 10 Zysten *T. gondii* (ME49-Stamm) infiziert. Die Zysten des ME49-Stammes wurden aus Gehirnen von NMRI-Mäusen gewonnen, die 3-4 Monate früher mit 10 Zysten i.p. infiziert worden waren. Zwei Tage später wurden die Mäuse über 28 Tage mit 400 mg/l Sulfadiazin im Trinkwasser behandelt. Die Mäuse sind unter dieser Therapie in der Lage, Zysten im Gehirn in Analogie zur natürlichen Infektion des Menschen zu bilden, versterben aber nicht an der Infektion selbst. Das beschriebene Mausmodell basiert auf den Publikationen von Suzuki et al. (107) und Schöler et al. (102). Da die Mäuse aufgrund eines IL-12p40-Gendefekts

---

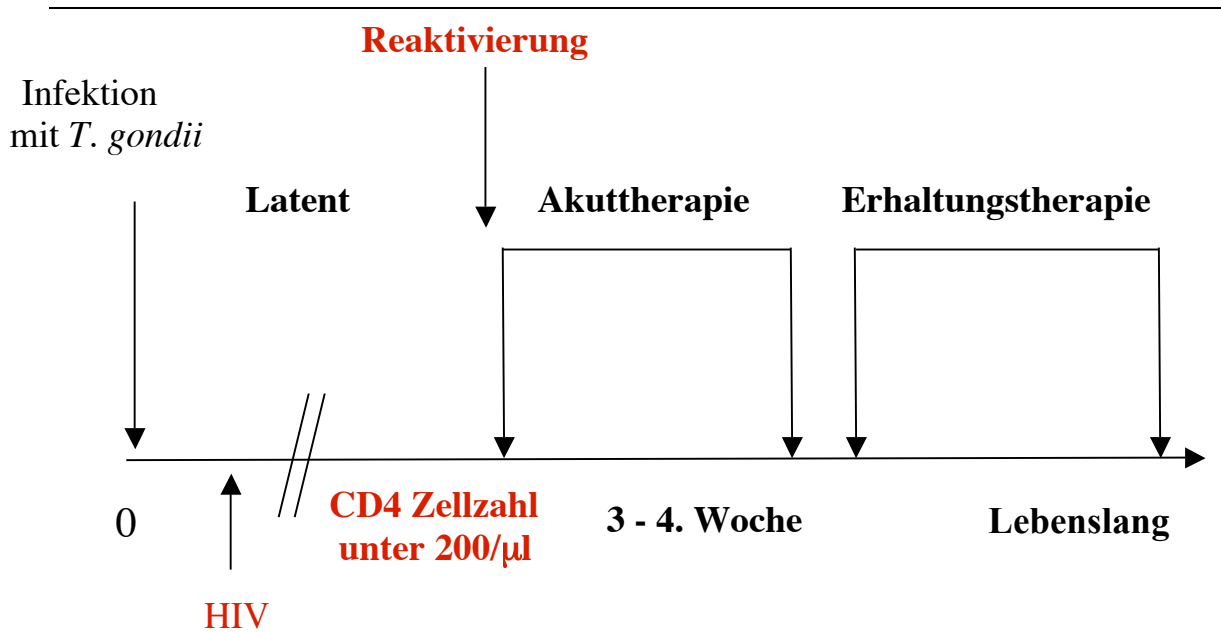
nicht in der Lage sind, IFN- $\gamma$ , welches essentiell für die Parasitenabwehr ist, unter der Infektion heraufzuregulieren, kommt es nach Absetzen der Therapie mit Sulfadiazin zu einer Reaktivierung der latenten Infektion, deren makroskopische und mikroskopische Zeichen der Reaktivierungstoxoplasmose des immunsupprimierten Menschen äußerst ähnlich sind. Zur Erläuterung zeigt Abb. 8 den Verlauf der Reaktivierungstoxoplasmose bei AIDS Patienten.

#### **3.3.2.1.1 Optimierung der akuten Therapie der mit Atovaquon-Nanosuspensionen**

Zwei Tage nach Absetzen des Sulfadiazins (in der Phase der beginnenden Reaktivierung der Toxoplasmose) wurden die IRF8<sup>-/-</sup>-Mäuse intravenös (Schwanzvene) mit 2,5, 5 und 10 mg/kg Atovaquon-Nanosuspension jeden zweiten oder mit 10 mg/kg jeden dritten Tag behandelt. Den Mäusen der Kontrollgruppe wurde i.v. PBS appliziert. Acht Tage nach Absetzen des Sulfadiazins - nachdem Kontrollmäuse erste Krankheitszeichen zeigten oder bereits vereinzelt verstorben waren - wurden Gehirn, Leber, Lunge und Serum gewonnen. Ein Teil der Organe wurde für histologische Untersuchungen in 5% Formalinlösung fixiert. Mindestens 200 mg wurden für die spätere HPLC-Analyse bei -70°C in Reaktionsgefäßen aufbewahrt. Die Versuche wurden mit Versuchsgruppen von mindestens 4 Tieren pro Gruppe durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt.

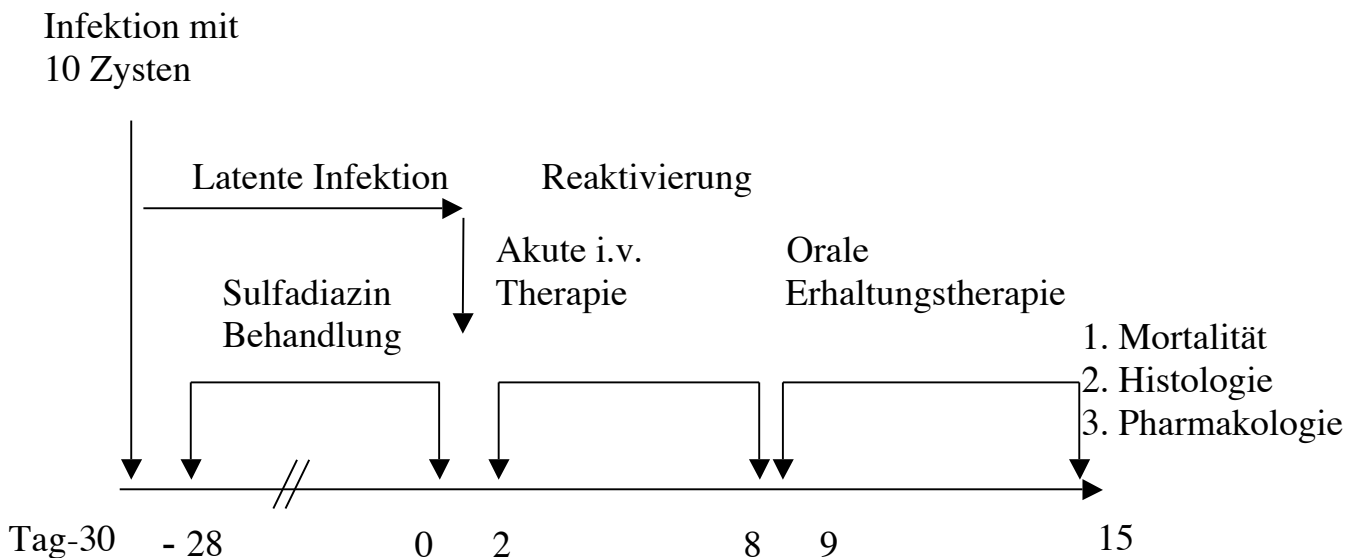
#### **3.3.2.1.2 Etablierung der Erhaltungstherapie**

Einen Tag nach Absetzen der Atovaquon-Nanosuspensionen begann die p.o.-Erhaltungstherapie der Mäuse (Abb. 9). Die Behandlung erfolgte eine Woche lang einmal täglich. Die Mäuse wurden mit Atovaquon (100 und 50 mg/kg), Pyrimethamin (0,71mg/kg) plus Sulfadiazin (30 mg/kg), Pyrimethamin (0,71 mg/kg) plus Clindamycin (35 mg/kg), Trovafloxacin (200 mg/kg) (alle Angaben pro kg Körpergewicht/Tag) und Sulfadiazin (400 mg/l Trinkwasser) behandelt.



**Abb. 8: Verlauf der Reaktivierungstoxoplasmose beim AIDS-Patienten**

Die Atovaquon-Suspension (Wellvone®) wurde mit PBS verdünnt, die anderen Antiparasitika wurden aus der pulverförmigen Reinsubstanz in dem vom Hersteller angegebenen Puffer hergestellt. Den Mäusen der Kontrollgruppe wurde p.o. PBS



**Abb. 9: Verlauf des Reaktivierungstoxoplasmose-Mausmodell**

---

verabreicht. Am Tag nach Absetzen der Erhaltungstherapie wurde, wie unter 3.3.2.1.1 beschrieben, Organe für histologische Untersuchungen und die HPLC-Analyse entnommen.

### **3.3.2.2 Histologie**

Die Organe wurden nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80%, 96%, Isopropanol, Xylol jeweils 5 min) in Hartparaffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden Schnitte in einer Dicke von 4-5  $\mu\text{m}$  angefertigt. Sagittalschnitte der Gehirne sowie Querschnitte von Leber und Lunge wurden nach einer Standardmethode mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Dabei wurden die Schnitte nach Entparaffinisierung in absteigender Alkoholreihe zunächst 3 min mit Hämatoxylin und nach Abspülen mit Leitungswasser 2 min mit Eosin gefärbt. Nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Entellan<sup>®</sup> eingedeckt. Durch Hämatoxylin werden saure Gewebsbestandteile (wie z.B. Nukleinsäuren im Zellkern und in Ribosomen) blauviolett gefärbt, wohingegen Eosin zahlreiche Strukturen (wie z.B. Kollagenfasern, Muskelfibrillen und Zytoplasma) rot anfärbt. Diese Färbung erlaubt Aussagen über Veränderungen im Gewebe, insbesondere die Erkennung inflammatorischer Herde, charakterisiert durch das Einwandern von Leukozyten aus den Blutgefäßen in das Gewebe.

### **3.3.2.3 Immunhistologie**

Neben der H&E-Färbung wurde eine spezifische Färbung gegen *T. gondii*-Antigene oder Parasiten durchgeführt. Dazu wurden solche Organschnitte, die den H&E-gefärbten benachbart waren, mittels der Immunperoxidase-methode mit Kaninchen-anti-*T.gondii*-Antikörpern gefärbt. Die Schnitte wurden zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe (3  $\times$  Xylol, 1  $\times$  Isopropanol, 96%, 80%, 70% Ethanol) entparaffiniert und anschließend mit 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Nach Inkubation mit Schweineserum (1:10 Verdünnung in modifiziertem PBS) wurde der Kaninchen-anti-*T. gondii*-Antikörper (1:2000) zugefügt. Diese Antikörper wurden aus einem Kaninchen

---

gewonnen, das oral mit ME49-Zysten infiziert, anschließend mit 300 mg/l Sulfadiazin ab dem 3. Tag nach Infektion 10 Tage lang behandelt und 15 Tage nach der Infektion mit den *T. gondii* (BK-Stamm) “geboostert” worden war. Der so gewonnene Anti-*T. gondii*-Antikörper wurde in Vorversuchen austitriert. Nach Inkubation über Nacht im Kühlschrank wurden die Schnitte mit Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobulin (1:100 Verdünnung in modifiziertem PBS) und nachfolgend mit Kaninchen-Peroxidase-Antiperoxidase (1:100 Verdünnung in modifiziertem PBS) inkubiert. Nach Färbung mit Diaminobenzidin (0,7mg/ml) waren Antigene, freie Parasiten, Parasiten in Vakuolen und *T. gondii*-Zysten durch ihre braune Farbe unter dem Mikroskop zu erkennen. Durch kurze Inkubation mit 0,5% Kupfersulfat-Lösung (in 0,9%iger NaCl) wurde die Färbung intensiviert. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Ammoniaklösung erfolgte die Dehydrierung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (80%, 96%, 2 x 100% Ethanol, 3 x Entellan<sup>®</sup>) und Eindeckung mit Xylol.

### **3.3.2.4 Atovaquon-Konzentration in Serum und Gewebe**

#### **3.3.2.4.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Analysen**

Atovaquonkonzentrationen im Serum und Gewebe wurden mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Die Analysen wurden vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité - Campus Benjamin Franklin - (Prof. K. Borner und Dr. R. Fitzner) durchgeführt.

Gewebeproben von Gehirn, Leber und Lunge wurden an Tag 8 nach Absetzen des Sulfadiazins (24 h nach der letzten Atovaquon-Medikation) entnommen und nach Entfernen von sichtbarem Blut auf einer Analysenwaage gewogen. Die Gewebeproben wurden in 5 ml der Extraktionslösung in einem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert. 0,1 ml Serum wurden ebenfalls mit 5 ml Extraktionslösung versetzt. Nach Zugabe von 1 ml Phosphatpuffer wurden die Proben 20 min in einem rotierenden Mischer

---

extrahiert. Anschließend wurden die Organsuspensionen 10 min bei 2800 g und 10 °C zentrifugiert. Vier ml der Überstände wurden in einem Vakuum-Konzentrator bis zur Trocknung eingedampft, in der mobilen Phase (550  $\mu$ l) aufgelöst und in HPLC-Glasröhrchen überführt. Je 50  $\mu$ l der vorbereiteten Proben wurden von einem Autosampler (Modell 717, Waters) injiziert. Die Trennung erfolgte an einer Vorsäule (Xterra RP 18, Waters) und einer Hauptsäule (Spherisorb C1, Waters). Die mobile Phase wurde von einer Pumpe (Modell 510, Waters) mit einer Geschwindigkeit von 1,2 ml/min bei einem Druck von 17 MPa befördert, die Detektion erfolgte bei 254 nm in einem UV-Absorptionsdetektor (Waters). Die Detektor-Signale wurden von einem Integrator (Modell 3396 III, Hewlett Packard) registriert und integriert. Aus den Peakflächen wurden die Konzentrationen in mg/l errechnet. Die Gewebekonzentrationen wurden anschließend auf mg/kg Gewebe umgerechnet.

#### **3.3.2.4.2 Massenspektrometrie**

Weil die Atovaquon-Konzentrationen im Gehirn in einigen Versuchen unter der Nachweisgrenze der HPLC lagen, erfolgte die Analyse der Gehirnproben mit der sensitiveren MS. Die Analysen wurden von Hartmut Stocker (Labor PD Dr. M. Kurowski, Vivantes Auguste-Viktoria Klinikum Berlin) durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung des Verfahrens findet sich bei Dunay et al. (30).

#### **3.3.2.5 Statistische Analysen**

Für die statistischen Analysen wurde der ungepaarte, zweiseitige Student-*t*-Test verwendet. Zum Vergleich der