
4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 In-vitro-Untersuchungen mit Zellen der BHS

4.1.1. Etablierung des Kokultur-Modells

Da Untersuchungen der Blut-Hirn-Schranke in In-vivo-Modellen eine Aufklärung detaillierter Transportmechanismen oder Interaktionen zwischen Molekülen und Zellen nicht erlauben, bieten sich In-vitro-Modelle der Blut-Hirn-Schranke für solche Analysen an. Hierzu stehen eine Reihe von Zelllinien und frisch isolierte Zellen aus Gehirnen unterschiedlicher Tierspezies zur Verfügung (15, 23, 77, 99). Diese Zellen können entweder in Monokulturen oder in Kokulturen (Transwell-System) eingesetzt werden. Inwieweit sich diese Zellen und Systeme für pharmazeutische, immunologische oder mikrobiologische Untersuchungen eignen, ist bisher nicht vergleichend untersucht.

4.1.1.1 Isolierung und Kultivierung von primären Rattenendothelzellen

Hirnendothelzellen wurden anhand unterschiedlicher in der Literatur belegter Isolierungsmethoden (23) vergleichend untersucht (siehe 3.3.1.1.5.1), um insbesondere eine Methode zu etablieren, anhand derer eine höchstmögliche Reinheit der Endothelzellkultur erzielt wird.

Für die Isolierung von Kapillar-Endothelzellen aus der Ratte wurde soweit wie möglich nur graue Substanz verwendet, weil das in der weißen Substanz enthaltene Myelin die Isolierung der Endothelzellen behindert (15, 77). Besonderer Wert wurde auf die sorgfältige Entfernung der Hirnhäute gelegt, um eine Verunreinigung der Hirnendothelzellen mit Endothelzellen der Gefäße - die die Hirnhäute durchziehen - zu

vermeiden. Bei der Auswahl der Isolierungsmethode wurde die Verwendung einer enzymatischen Methode einem rein mechanischen Verfahren vorgezogen, da so eine bessere Abtrennung benachbarter Zellen von den Kapillaren gegeben ist. Sämtliche Isolierungsschritte erfolgten in einem Medium, das alle für die Versorgung der Zellen essenziellen Nährstoffe enthielt.

Die Hirnendothelzellen fanden sich nach manueller Entfernung der Hirnhäute, Verdau und Dichtegradienten-Zentrifugation entweder einzeln oder in Zellklustern in der Interphase. Die mit Trypanblau überprüfte Vitalität der Endothelzellen lag bei über 90%. Insgesamt konnten aus 10 Rattenhirnen ca. 10^6 Hirnendothelzellen isoliert werden, die auf 36 Transwell-Filter verteilt worden waren. Die Kultivierung von Hirnendothelzellen erfolgte mit 20% Rinderserum, das sich für diesen Zelltyp bewährt hat (25). Durch Zugabe des Pgp-Inhibitors Puromycin konnte die Kontamination mit Perizyten und Gliazellen weiter minimiert werden (Abb. 10, 11). Da eine dauerhafte Anheftung der Zellen auf den Transwellfiltern erforderlich war, wurde initial der Effekt von Kollagen und Fibronectin auf die Adhäsion der Zellen an Plastik überprüft (Tab. 1).

Tab. 1: Anheftung von primären Hirnendothelzellen auf Transwellfiltern in Abhängigkeit von der Beschichtung mit Kollagen und/oder Fibronectin

Anheftung	keine	gering	mäßig	stark
Kollagen G		+		
Kollagen Typ 4			+	
Fibronectin	+			
Kollagen Typ 4 + Fibronectin				+

Das Wachstum der Hirnendothelzellen ging dabei von Zellklustern aus, die sich innerhalb der ersten 24 Stunden auf dem Boden der Kulturgefäße abgesetzt hatten. Nach zwei Tagen waren die ersten Monolayer-„Inseln“ zu beobachten, die schließlich in den folgenden Tagen zu einer konfluenten Schicht zusammenwuchsen. In Kultur ließen die Zellen eine charakteristische, spindelförmige Morphologie mit zentral liegende Zellkernen und eng benachbarten Fibroblasten-ähnlichen Zellen erkennen (Abb. 11). In der Wachstumsphase der Zellmonolayer bis zur Konfluenz ohne Puromycinbehandlung war eine Kontamination

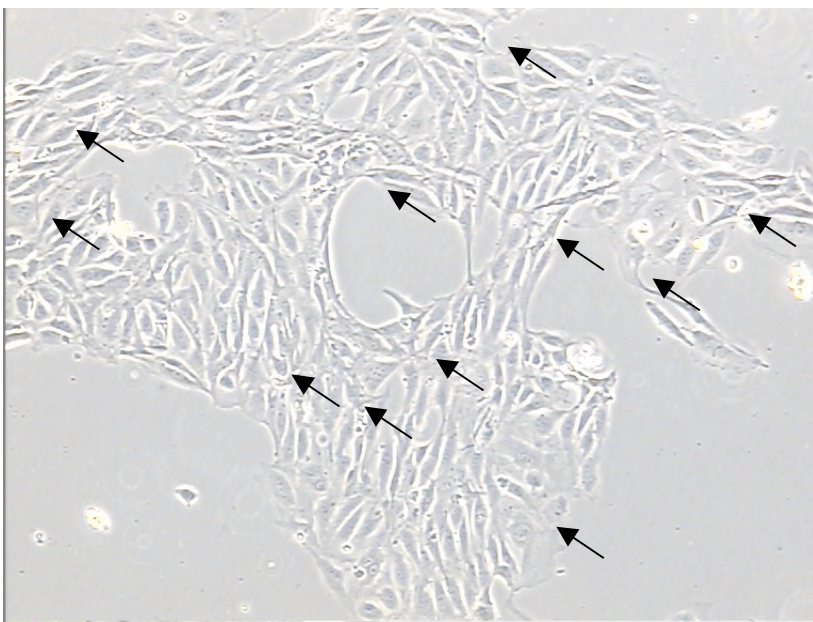


Abb. 10: Perizytenkontamination in der Endothelzellkultur ohne Puromycinbehandlung (Pfeile zeigen multipolare Perizyten an)

mit Perizyten zu erkennen. Diese waren mikroskopisch als längliche, polymorphe und multipolare Strukturen zu erkennen (Abb. 10).

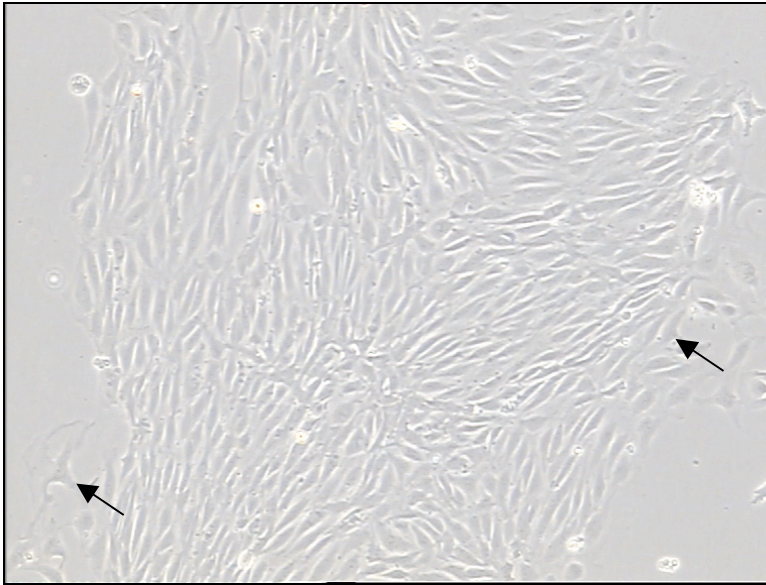


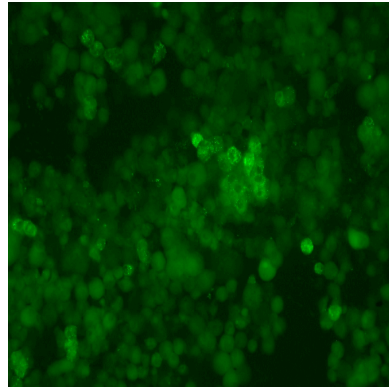
Abb. 11: Minimierung der Perizytenkontamination nach Behandlung der Endothelzellkultur mit Puromycin (Pfeile zeigen multipolare Perizyten an)

4.1.1.2 Immunhistochemische Charakterisierung von primären Rattenendothelzellen und primären Rattenastrozyten

Für die Charakterisierung von kultivierten primären Rattenendothelzellen wurde die Expression des endothelzellspezifischen Proteins vWF untersucht. Mehr als 95% der gewonnenen und kultivierten Zellen exprimierten den für Endothelzellen charakteristischen vWF (Abb. 12). Die Expression des vWF ist an der typischen punktförmigen Grünfluoreszenz im Zytosolbereich sämtlicher Zellen zu erkennen (Abb. 12). In Kontrollschnitten von Mäusehirnen wurde ebenfalls die Expression von vWF mit charakteristischer Lokalisation in den Gefäßwänden beobachtet. Die Präparation von Astrozyten ergab eine Population von Zellen, die zu mehr als 90% GFAP exprimierten. Die Expression ließ sich an der typischen Grünfluoreszenz im gesamten Zytoskelett beobachten. Schnitte von Mäusehirnen, die als Positivkontrolle gefärbt worden waren, zeigten ebenfalls eine charakteristische Verteilung GFAP-positiver Zellen in Nachbarschaft zu Gefäßendothelzellen (Abb. 12).

Faktor VIII

Kultivierte Hirnendothelzellen



GFAP

Kultivierte Astrozyten

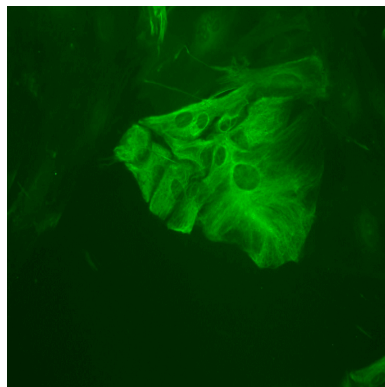
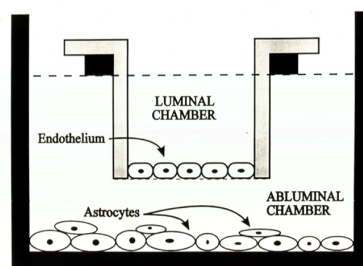


Abb. 12: Immunhistologische Charakterisierung von primären Hirnendothelzellen und Astrozyten mittels vWF und GFAP nach Isolierung aus Rattenhirnen

Neben den oben genannten Methoden zur Charakterisierung wurden die Hirnendothelzellkulturen darüber hinaus durch Färbung von *tight junction*-Proteinen charakterisiert (siehe 4.1.5).

4.1.1.3 Etablierung des Kokultur-Modells

Zur Etablierung des Kokulturmodells wurden initial Versuche mit Endothelzelllinien durchgeführt. Mit der aus der Maus stammenden Zelllinie bend3, welche zu Beginn unserer Arbeiten nicht detailliert charakterisiert gewesen war, konnte ein konfluenter Monolayer erzielt werden. Die Werte des TEER waren allerdings für die Durchführung von Transportstudien nicht ausreichend. Vergleichend wurde die Ratten-Endothelzelllinie RBE4 herangezogen, die bereits in Studien zur Passage der BHS angewandt wurde (16, 77, 99). Mit dieser Zelllinie konnten wir maximale TEER von $80 \Omega \times \text{cm}^2$ erreichen (siehe 4.1.1.4.2). Aus diesen Gründen wurde in weiterführenden Experimenten trotz des aufwendigen Gewinnungsprozesses und der gegenüber Zelllinien deutlich geringeren Ausbeute mit primären Rattenendothelzellen gearbeitet. Parallel dazu etablierten wir die Präparation von primären Rattenastrozyten, da in einem Kokultur-System unter Verwendung von Endothelzellen plus Astrozyten oder auch Astrozyten-konditioniertem Medium höhere TEER erreichen werden können. Im Kokultur-System wurden primäre Ratten - Endothelzellen im Transwell-Filter ausplattiert, während primäre Rattenastrozyten auf dem Boden von 12-Well-Platten angezüchtet wurden (Abb. 13).



**Abb. 13: Kokultur von Hirnendothelzellen und Astrozyten im Transwell-System.
Prinzip des Transwell-Systems**

Tab. 2 zeigt eine Übersicht über die unterschiedlichen Komponenten des Kokultursystems, die im Rahmen der Optimierung im Vergleich zur Monokultur primärer Rattenendothelzellen getestet wurden.

Tab. 2: Effekt unterschiedlicher Optimierungsschritte im Rahmen der Etablierung der Kokultur im Vergleich zur Monokultur primärer Zellen

Faktoren	Zunahme des TEERs	Endothelzellen		
		Reinheit	Wachstum	Adhäsion am Filter
1. Astrozyten-konditioniertes Medium	+		+	
2. Kokultur mit primären Astrozyten	++		+	
3. sechs- vs. zwei-wöchige Kultur von Astrozyten	+++		+	
4. frische Endothelkultur vs. 1. oder höhere Passagen	+			
5. Zugabe des Wachstumsfaktors bFGF			+	+
6. Zugabe von cAMP und RO	++			
7. Zugabe von Hydrocortison	++			
8. Zugabe von Puromycin	+	++		
9. Zugabe von serumfreiem Medium	-			
10. Kollagen-Behandlung des Filters	+		+	++
11. Mediumwechsel			+	
12. Widerstandsmessung bei 37°C vs. RT	+			

+ : gesteigert, - : herabgesetzt

4.1.1.4 Analyse der Schrankenfunktion

Nach Etablierung der Isolierungsmethode und Auswahl der geeigneten Hirnendothelzellen sollten, kultivierte Hirnendothelzellen auf ihre Eignung als Modellsystem für den Transport von Arzneistoffen durch die BHS untersucht werden. Das herausragende Merkmal der BHS ist die dichte Verbindung der Endothelzellen untereinander und die äußerst geringe parazelluläre Permeation. Deshalb wurden Kulturen von Hirnendothelzellen zunächst auf die Permeabilität von fluoreszierenden Substanzen hin untersucht, da diese nahezu ausschließlich parazellulär diffundieren. Dabei wurden die Kultur- und die oben genannten Bedingungen so modifiziert, dass eine möglichst geringe Permeation dieser Substanzen auftrat. Als weiterer Parameter neben der Permeabilität wurde der TEER untersucht.

4.1.1.4.1 Mikroskopische Untersuchungen

Endothelzellen zeichneten sich durch eine charakteristische, ausgeprägt spindelförmige Morphologie mit zentral liegenden Zellkernen aus; in direkter Nachbarschaft fanden sich Zellen Fibroblasten-ähnlicher Morphologie (Abb. 10; 11).

Der Zellmonolayer war bis zur Konfluenz ohne Puromycinbehandlung mit Perizyten kontaminiert. Letztere ließen sich durch eine längliche, polymorph-multipolare Form einfach erkennen; darüber hinaus führte die Kontamination mit Perizyten zu einer typischen Löcherbildung im Zellrasen (Abb. 11).



Abb. 14: Astrozytenkultur nach 6 Wochen Kokultivierung in 12-Well-Platten

Als Problem stellte sich die Intransparenz des Filtermaterials heraus. So war bei Verwendung von Polycarbonat-Filtern eine optische Kontrolle des Zellmonolayers im Transwell unmöglich. Unter Verwendung der Polyestermembran “Costar Transwell-Clear Filters” mit einer Porengröße von 0,4 μm ließen sich die Zellen mikroskopisch gut darstellen (Abb. 16). Im Gegensatz dazu war das Wachstum der Zellen auf Filtern mit einer Porengröße von 3 μm die z.B. für die Parasitentransmigration notwendig ist optisch ebenfalls nicht zu überprüfen (Abb. 15).

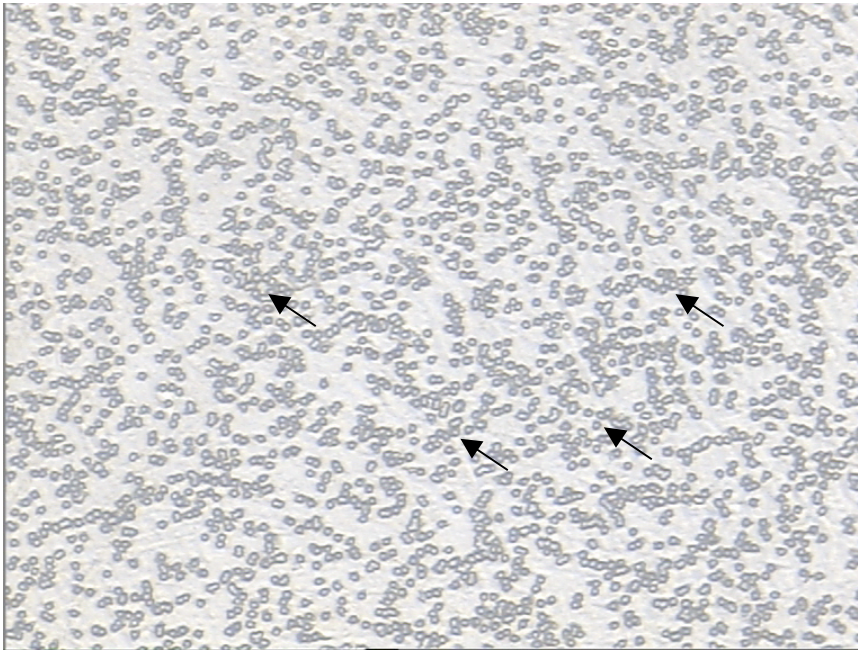


Abb. 15: Zellrasen primärer Hirnendothelzellen auf Polyester-Transwellfilter (3 µm Porengröße; Pfeile zeigen Poren an). Der Zell-Monolayer ist im Hintergrund nur schwer auszumachen

Somit wurde das Zellwachstum in allen Versuchen anhand einer Vergleichsgruppe mit Transwell-Filtern der Porengröße 0,4 µm kontrolliert.



Abb. 16: Primäre Endothelzellen kultiviert auf Polyester-Transwellfilter (0,4 µm Porengröße). Der Zell-Monolayer ist im Hintergrund gut auszumachen

4.1.1.4.2 Physikalische Untersuchungen

Die Messung des TEER erfolgte an auf Filtereinsätzen kultivierten Hirnendothelzellen mit dem Millicell-ERS-Gerät. Anfangs wurden „Chop Stick“-Elektrodensysteme zur Messung verwendet; im weiteren Verlauf wurde die „Endohm-12-Chamber“ angewendet. Die Kammermethode ist der „Chop-Stick“-Methode überlegen, weil unter Verwendung von „Chop Sticks“ die Messungen durch den Transwellfilter große Unterschiede zeigten. Messungen des Widerstandes wurden vergleichend in Mono- und Kokulturen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass primäre Ratten-Hirnendothelzellen deutlich höhere Widerstände als die Zelllinien erreichten. Primäre Hirnendothelzellen der Ratte wiesen nach insgesamt 6 Tagen Kultur (inkl. 3 Tagen Kokultur mit Astrozyten) TEER bis zu 350 $\Omega \times \text{cm}^2$ auf, während die Widerstandswerte in Kulturen von Endothelzelllinien speziesunabhängig stets unter 100 $\Omega \times \text{cm}^2$ lagen (Abb. 17).

Interessanterweise war der TEER von primären Rattenendothelzellen deutlich geringer ($< 150 \Omega \times \text{cm}^2$), wenn diese nach der Präparation passagiert, nicht aber direkt auf dem Transwellfilter ausplattiert wurden.

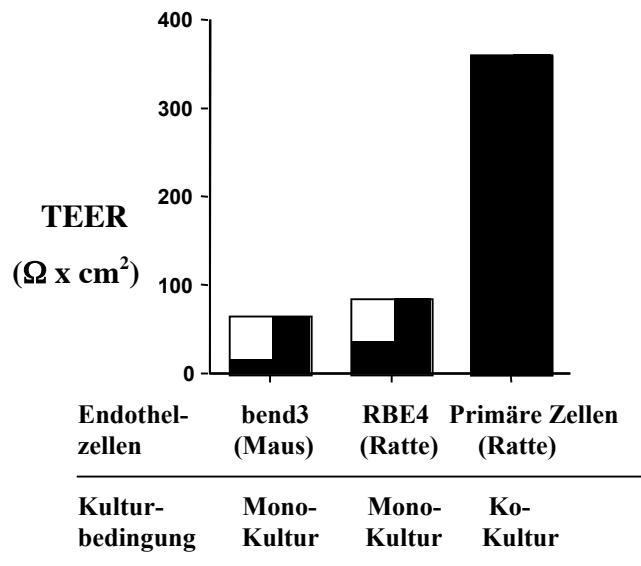


Abb. 17: Einfluss verschiedener Zellspezies und Kulturbedingungen (Mono- vs. Kokultur) auf der TEER

4.1.1.4.3 Chemische Untersuchungen

Ein wichtiges Kriterium bei Untersuchungen der parazellulären Permeabilität ist, dass die Testsubstanz nicht Ligand von Efflux-Transportern, Endothelrezeptoren oder Substrat endothelialer Enzyme ist. Wir verwendeten daher Na-Fluorescein als Testsubstanz für die Bestimmung der Permeabilität des Zellrasens. Nach Zugabe von Na-Fluorescein auf die apikale Seite des Filters (obere Kammer) wurde nach 1 und 4 Stunden auf der basolateralen Seite (untere Kammer) des Filters die Konzentration von Na-Fluorescein bestimmt. Die Permeabilität im Kokulturmodell betrug bei Verwendung von primären Rattenendothelzellen und primären Astrozyten innerhalb der ersten Stunde $3,6 \pm 0,04 \times 10^{-6}$ cm/s, innerhalb der ersten 4 Stunden $5,8 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Endothelzell-Monolayer bis zu 4 Stunden in serumfreier Ringer-Hepes-Lösung keine Störung der Permeabilität aufweist und somit eine ausgeprägte Integrität aufweist.

4.1.2 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse

Erstes Ziel der vorliegenden Dissertation war es, geeignete Zellen für Untersuchungen der Blut-Hirn-Schranke in-vitro zu finden, anhand derer sowohl der Transport von antiparasitären Substanzen als auch die Parasitentmigration getestet werden kann. Initial wurden deshalb Zelllinien aus der Maus und Ratte mit primären Zellen aus Rattenhirn verglichen. Da viele für die Charakterisierung der Zellen notwendigen Reagenzien nur im Maussystem vorliegen, wurde die Hirnendothelzelllinie bend3 kultiviert. Diese Linie wurde 1989 durch Transfektion mit einem Onkogen des Polyoma-Virus generiert (114, 115). Diese Autoren führten jedoch keine detaillierten Untersuchungen zum TEER oder der Ausstattung der Zelle mit Oberflächenrezeptoren durch. Initiale Versuche mit bend3 ergaben zwar konfluente Monolayer, die TEER lagen jedoch nie im ausreichenden Bereich. Omid et al. (86) berichteten kürzlich, dass

konfluente Monolayer der bend3-Zellen ohne Zugabe von Modulatoren des cAMP TEER von unter $100 \Omega \times \text{cm}^2$; auch bei Zugabe von cAMP und Kokultivierung mit C6 Astroglia stieg der TEER von bis zu $130 \Omega \times \text{cm}^2$ zu messen, so dass auch diese Autoren von einer Nutzung dieser Zelllinie für Permeabilitätsuntersuchungen abrieten (23). Als weitere Zelllinie wurde die gut charakterisierte Rattenhirnendothelzelllinie RBE4 (97) untersucht, die zur Durchführung von Transportstudien an der Blut-Hirn-Schranke mit dem SV-40-Virus transfiziert worden war. Der TEER war auch in Versuchen mit dieser Zelllinie in unseren Händen nicht ausreichend, leider fanden sich in der Literatur keine Angaben zum TEER der RBE4-Kultur. Als Konsequenz aus den oben beschriebenen Problemen der immortalisierten Zellen etablierten wir daraufhin eine Methode zur Isolierung von primären Endothelzellen aus Rattengehirnen (86). Im Vergleich zu den Zelllinien ergab sich zwar eine deutlich geringere Ausbeute an Zellen bei erheblich größerem technischen Aufwand, mit TEER-Werte von $350 \Omega \times \text{cm}^2$. Diese sprechen für eine intakte Barriere der Hirnendothelzellen im Transwellssystem, was in Transportstudien unter Verwendung von Na-Fluorescein bestätigt werden konnte. Auch in anderen Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen wurde die Überlegenheit von primären Zellen gegenüber den bisher bekannten Zelllinien berichtet (23).

Weitere Optimierungen des Kokultur-Modells ergaben sich durch die Verwendung von Puromycin, einem Substrat der Effluxpumpe P-gp (99). Puromycin als hoch toxische Substanz wird von allen beteiligten Zellen aufgenommen, jedoch als Substrat der Effluxpumpe P-gp wieder aus der Zelle heraustransportiert. In solchen Zellen, die nur wenig P-gp besitzen, wirkt Puromycin zytotoxisch wie im Falle der kontaminierenden Perizyten oder Astrozyten (23). Auch in unserem In-Vitro-Modell führte die Zugabe von Puromycin über einen Zeitraum von zwei Tagen zu einer Abtötung kontaminierender Zellen und nachfolgend zu einer Erhöhung des TEER.

Interessanterweise hatte die Passage der primären Hirnendothelzellen der Ratte im Gegensatz zur direkten Aussaat auf die Transwellfilter einen negativen Effekt auf den TEER. Die Passage von primären bovinen (32, 84) wie auch primären Schweine-Zellen (68) hat im Gegensatz dazu keinen negativen Effekt auf den TEER. Deli et al. (23) berichteten kürzlich, dass der negative Effekt der Passagierung von primären Hirnendothelzellen sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen beobachtet wurde, da Zellen

beider Spezies bei Passagierung ihre Hirnendotheleigenschaften gleichermaßen verlieren. Auch die Vorbehandlung der Filter mit Kollagen und Fibronectin stellte sich als essentiell heraus, um eine dauerhafte Anheftung der Zellen zu erreichen (M. Deli, pers. Mitteilung). Unter Verwendung von Kollagen und Fibronectin wird vermutlich eine dem Hirngewebe ähnliche Matrix geschaffen, an der die Hirnendothelzellen haften können (108). Endothelzellen des Gehirns können Fibronectin über den $\alpha 5\beta 1$ -Integrinrezeptor binden (110). Neben den oben beschriebenen chemischen und Passage-Effekten wurden auch unterschiedliche Meßmethoden des TEER verglichen. Dabei zeigte sich die Messkammer-Methode der Messung mittels „Chop Sticks“ überlegen. Ein Grund hierfür ist vermutlich, dass die Messung in der Kammer eine gleichzeitige Erfassung des Widerstandes auf der gesamten Oberfläche des Filters erlaubt, während in der „Chop Stick“-Methode der Widerstand zwischen zwei Einzelpunkten auf der Filteroberfläche bestimmt wird. Dies führt zu großen Ungenauigkeiten in der Messung (32).

Die in der vorliegenden Arbeit in-vitro erreichten TEER-Werte von mehr als $100 \Omega \times \text{cm}^2$ liegen im Vergleich zur internationalen Literatur im oberen Bereich (15, 47). Dies gilt auch für die in Passageuntersuchungen bestimmten Permeabilitätswerte (93).

Für die geplanten Passageuntersuchungen an der BHS eignen sich somit primäre Hirnendothelzellen in Kokultur mit primären Rattenastrozyten am besten. Nur diese gewährleisten, dass eine intakte Barriere für Passageuntersuchungen im Modell der BHS vorliegt.

4.1.3 Interaktion von Nanosuspensionen mit Endothelzellen

Nach Etablierung der Kokultur von Endothelzellen und Astrozyten wurde die Interaktion von Antiparasitika-Nanosuspensionen mit Endothelzellen im oberen Kompartiment des Transwell-Systems untersucht. Initial wurden zytotoxische Effekte anhand des MTT- und LDH-Test ausgeschlossen. Weder in Zellkulturmedium verdünnte Nanosuspensionen von Atovaquon noch die Atovaquon-Reinsubstanz wiesen in Konzentrationen, die den bei Patienten erreichbaren Konzentrationen ($15\text{-}30 \mu\text{g/ml}$) im Serum entsprechen, einen zytotoxischen Effekt auf Endothelzellen auf (Abb. 18). Das stärkste Abnehmen der

Viabilität (ca. 11%) traten bei 3 $\mu\text{g/ml}$ der Atovaquon-Reinsubstanz oder der Atovaquon-Nanosuspensionen auf (Abb. 18).

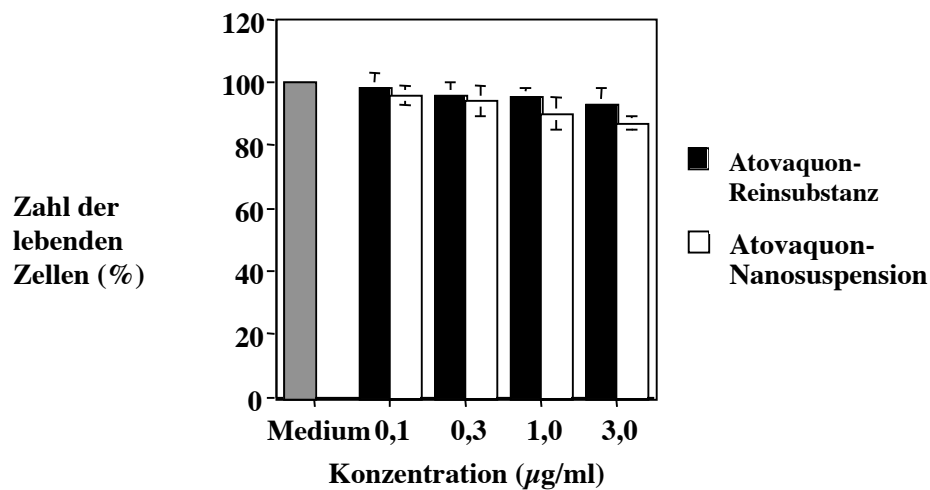


Abb. 18: Zytotoxische Effekte von Atovaquon-Reinsubstanz und Atovaquon-Nanosuspensionen auf primäre Rattenendothelzellen gemessen im MTT-Test nach 1 Stunde Inkubationszeit.

Mittels LDH-Test wurde der zytotoxische Effekt von Atovaquon-Nanosuspensionen in primären Endothelzellen, primären Astrozyten und einer Makrophagen-Zelllinie verglichen. Zytotoxische Effekte stellten sich nach Inkubation von Atovaquon-Nanosuspensionen auch bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen in keiner dieser Zellen ein (Tab. 4).

Tab. 4: Zytotoxische Effekte von Atovaquon-Nanosuspensionen auf primäre Rattenendothelzellen und primäre Rattenastrozyten sowie Makrophagen im LDH-Test

Konzentration von Atovaquon-Nanosuspensionen	lebende Zellen nach 1h Inkubation (%)		
	3 µg/ml	1 µg/ml	0,3 µg/ml
Primäre Rattenendothelzellen	86,4	84,3	93,2
Primäre Rattenastrozyten	81,5	88,7	96,9
Makrophagen-Zelllinie (J774)	84,1	86,6	89,7

Die in LDH-Test nachweisbare Zytotoxizität der Atovaquon-Reinsubstanz auf in Tab. 4 genannten Zellen unterschied sich nicht signifikant von den Atovaquon-Nanosuspensionen (Daten nicht gezeigt). Nach Ausschluß zytotoxischer Effekte wurde vor Testung der Passage der gewünschten Substanzen durch das Transwell-Kokultursystem die Passage durch Transwellfilter in einem zellfreien System getestet. In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob Unterschiede in der Passage von Atovaquon-Reinsubstanz und Atovaquon-Nanosuspensionen durch die Filter ohne Zellen bestanden (Tab. 5). Die Passage der Reinsubstanz fiel dosisunabhängig höher aus als die der Nanosuspensionen. Bei steigenden Wirkstoffkonzentrationen war die Passage erniedrigt, was vermutlich durch eine Adhäsion an der Polyester membran und Aggregation im Medium bedingt ist.

Tab. 5: Passage von Atovaquon-Reinsubstanz und Atovaquon-Nanosuspensionen durch zellfreie Transwellfilter (Porengröße 0,4 μm)

Formulierung und Dosis	Konzentration* ($\mu\text{g/ml}$)	Passage in %
Reinsubstanz		
1 $\mu\text{g/ml}$	0,18 – 0,21	39,3
3 $\mu\text{g/ml}$	0,33 – 0,50	26,7
Nanosuspension		
1 $\mu\text{g/ml}$	n.d.** – 0,18	16,0
3 $\mu\text{g/ml}$	n.d.** – 0,15	6,0

*: Konzentrationen wurden nach Passage in der unteren Transwellkammer per HPLC gemessen

** : n.d., nicht detektierbar

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss der Porengröße des Transwell-Filters auf die Passage untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die Passage der Atovaquon-Nanosuspensionen bei einer Porengröße von 3,0 μm im Vergleich zu 0,4 μm um den Faktor 6 erhöht, während die Passage der Reinsubstanz unverändert bleibt. Auch das Schütteln der Kulturplatten während der Versuchsdurchführung führte zu einer deutlich gesteigerten Passage durch die Transwell-Filter. In zukünftigen Untersuchungen wird deshalb beim Schütteln der Kulturplatten auf konstante Bedingungen (Zahl der Umdrehungen und Orbit der verwendeten Kreisschüttlers) geachtet. Weiterführende Untersuchungen werden die Untersuchung der Passage im Transwellfilter mit Hirnendothelzellen und in Kokultur zum Ziel haben.

4.1.4 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse

Ein In-vitro-System zur Testung der Passage von Therapeutika wurde etabliert. Leider erwies sich dieses Modellsystem als nicht uneingeschränkt geeignet für Passage-Untersuchungen. Als großes Problem stellte sich insbesondere die Testung von Nanosuspensionen heraus, da diese bei Passageuntersuchungen des Transwellfilters dosisunabhängig passierten. Wir vermuten, dass selbst in einem zellfreien Transwellssystem Nanosuspensionen zur Adhäsion an Plastik und Aggregation in Medium neigen. Die Substanzmenge im unteren Kompartiment korrelierte nicht mit der in das obere Kompartiment gegebenen Menge. Diese Beobachtung galt insbesondere für Nanosuspensionen von Atovaquon, nicht aber für die Reinsubstanz selbst. Grund hierfür ist vermutlich das auf den Nanosuspensionen befindliche Tween 80, das an den Kunststoff des Filters bindet. Die Passage von Nanopartikeln wurde in der Vergangenheit bereits erfolgreich in Kokultur-Modellen getestet, allerdings handelte es sich dabei um Polysaccharidpartikel ohne Tenside auf der Oberfläche (35). Untersuchungen zur Passage von mit Tween 80-beladenen Nanopartikeln oder –Suspensionen durch die BHS wurden ausschließlich in-vivo durchgeführt (1). Darüber hinaus liegen Studien zur Aufnahme, nicht aber Passage von Tween 80-beladenen Partikeln in einem Monokultursystem mit bovinen Hirnendothelzellen vor (90). Tween 80-beschichtete Partikel wurden von diesen Zellen um ein Vielfaches effektiver aufgenommen als unbeschichtete Kontrollpartikel (90). Aus diesen Untersuchungen wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Aufnahme von Tween 80-beladenen Partikeln in das Gehirn vom LDL-Rezeptor auf Hirnendothelzellen über die Bindung von Apolipoprotein-E vermittelt wird (69).

4.1.5 Interaktion von *T. gondii*-Tachyzoiten mit Zellen der BHS

Da neben der Passage von Antiparasitika-Nanosuspensionen auch der bislang ungeklärte Eintritt des Parasiten in das Gehirn untersucht werden sollte, wurde die Interaktion von *T. gondii* mit primären Hirnendothelzellen der Ratte analysiert. Zytotoxische Effekte von

Tachyzoiten des Parasiten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlichen Zell-Parasiten-Verhältnissen mittels des LDH-Tests bestimmt. Nach 1 Stunde Inkubationszeit und bei einem Parasiten-Endothelzell-Verhältnis von 1:1 verursachten die Parasiten bei bis zu 20% der Zellen zytotoxische Effekte (Abb. 19).

Bei einem niedrigen Parasiten-Zell-Verhältnis (das vermutlich der In-vivo-Situation näher kommt) fand sich nur eine geringe Zytotoxizität von 4%. Mit zunehmender Inkubationsdauer stieg die Zytotoxizität; diese betrug nach 3 bzw. 24 Stunden in einem 1:1-Zell-Parasiten-Verhältnis 45 und 55% (Abb. 19).

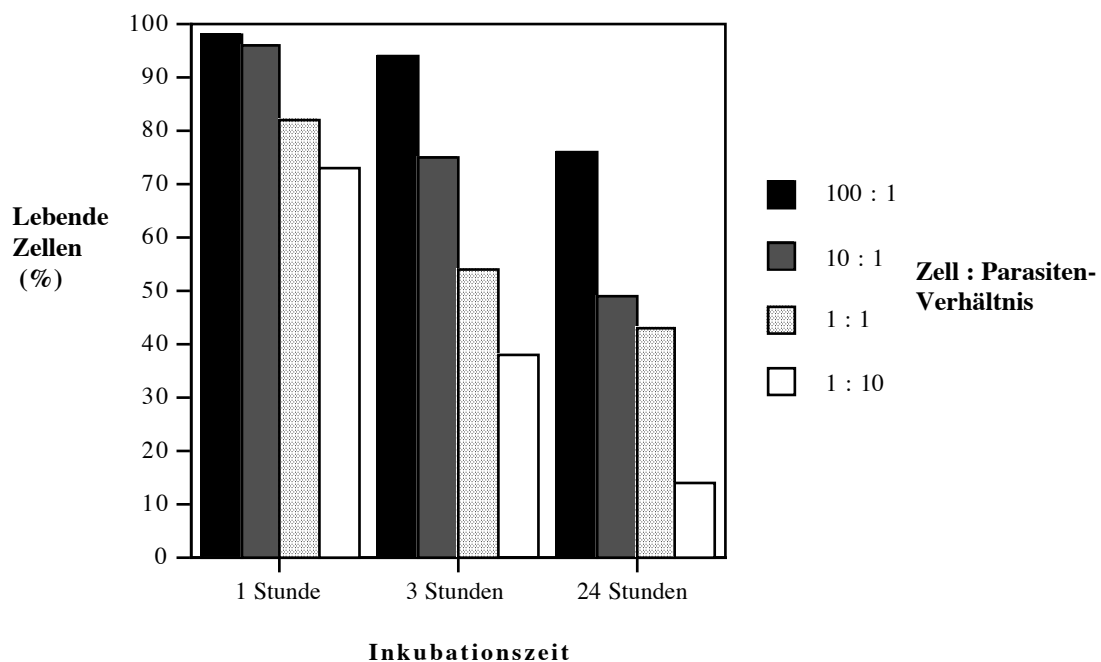


Abb. 19: Zytotoxische Effekte von *T. gondii*-Tachyzoiten auf primäre Rattenendothelzellen in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und dem Parasiten-Endothelzell-Verhältnis

Nach Ausschluss signifikanter zytotoxischer Effekte wurde die Aufnahme der Parasiten in Hirnendothelzellen mittels digitaler Laser-Scanning-Mikroskopie (AG M. Dathe, Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) untersucht. *T. gondii*-

Tachyzoiten, die GFP exprimieren, fanden sich nach Inkubation in einem Zell-Parasiten-Verhältnis von 1 : 1 innerhalb von 3 min in primären Hirnendothelzellen wieder (Abb. 20).

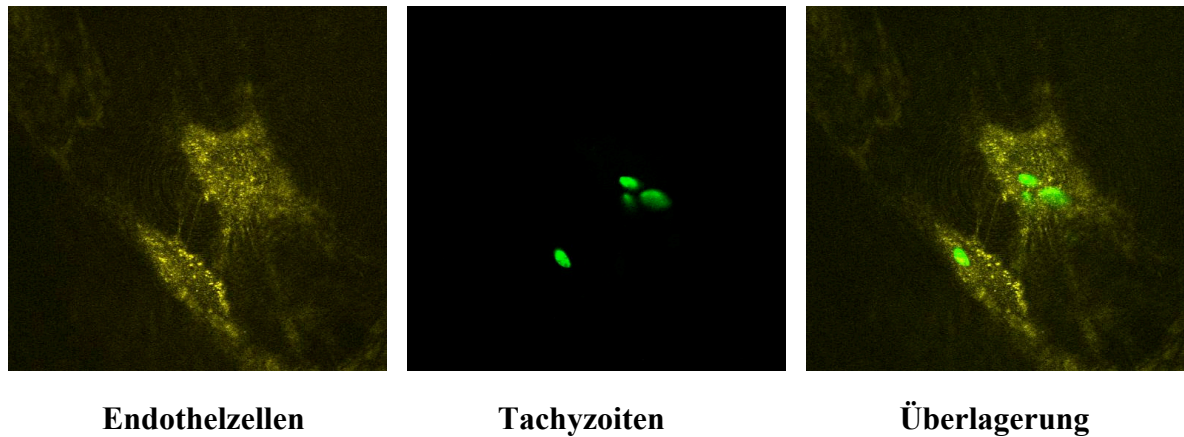


Abb. 20: Infektion von primären Hirnendothelzellen durch GFP-exprimierende *T. gondii*-Tachyzoiten

4.1.6 Interaktion von *T. gondii*-Tachyzoiten mit *tight junction*-Proteinen der Hirnendothelzellen

Da *tight junction*-Proteine für die Barriere-Funktion der Blut-Hirn-Schranke essentiell sind, wurde die Interaktion des Parasiten mit verschiedenen *tight junction*-Proteinen mittels immunhistologischer Färbungen von Mikrokapillaren untersucht. In Verdünnungsreihen wurden optimale Konzentrationen der Antikörper für den Nachweis der *tight junction*-Proteine Occludin, Claudin-1 und Claudin-5 bestimmt. Isolierte Mikrokapillaren zeigten ein charakteristisches Färbemuster. *Tight junction*-Proteine waren entlang der Zellgrenzen und aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Mikrokapillaren auch auf dem Zellkörper darstellbar (Abb. 21a-c). Um Einzelzellen im Verbund der Mikrokapillaren deutlicher abgrenzen zu können, wurden *tight junction*-Proteine in einer Doppelfärbung mit der DAPI- Zellkernfärbung dargestellt. Nach Inkubation mit *T. gondii* (10^4 Tachyzoiten)

konnten mikroskopisch in den Mikrokapillaren im Gegensatz zur Färbung von Hirnendothelzellen keine Parasiten nachgewiesen werden. Auch konnte mikroskopisch keine Veränderung der Färbeintensität und räumlichen Organisation der *tight junction*-Proteine Occludin, Claudin-1 und Claudin-5 sichtbar gemacht werden.

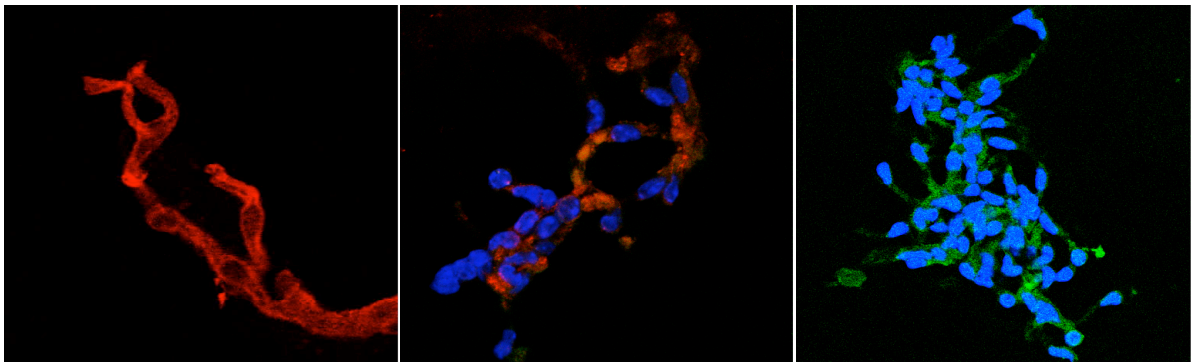


Abb. 21: Nachweis von *tight junction*-Proteinen in isolierten Mikrokapillaren. A) Claudin-1 (rot, Rhodamin-gefärbt); B) Claudin-5 (rot, Rhodamin-gefärbt), DAPI-Kernfärbung (blau); C) Occludin (grün, FITC-gefärbt), DAPI-Kernfärbung (blau)

Die Infektion von isolierten Hirnendothelzellen, die eine zentrale Rolle bei der Invasion des Gehirns durch den Parasiten darstellt, ist bislang nur unzureichend untersucht. Däubener et al. (21) berichteten, dass *T. gondii*-Tachyzoiten Hirnendothelzellen des Menschen infizieren und sich in diesen vermehren. Dieser Prozess ist durch Zugabe der Zytokine Interferon- γ und TNF- α hemmbar.

Auch ist die Interaktion des Parasiten mit *tight junction*-Proteinen bisher nicht untersucht. Barragan et al. (9) berichteten, dass das Parasitenprotein MIC2 bei der Invasion von Zellen aus den Mikronemen des Parasiten sezerniert wird, zur Hochregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf epithelialen Zelllinien führt. Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation erhobenen In-vitro-Ergebnisse zur Infektion von Hirnendothelzellen und Mikrokapillaren durch *T. gondii* stellen somit die Grundlage für weiterführende Experimente zur Aufnahme des Parasiten ins Gehirn und die Interaktion mit Zellen der Blut-Hirn-Schranke dar. Problematisch stellte sich in unseren Untersuchungen die Darstellung von Veränderungen in der Expression von *tight junction*-Proteinen dar.

Während *tight junction*-Proteine in Monolayern aus Hirnendothelzellen entlang der Zellgrenzen auch räumlich gut darstellbar waren, waren diese Proteine bei Zellen im Verbund der Mikrokapillaren nicht eindeutig entlang der Zellgrenzen zu erkennen. Dies ist vermutlich durch die dreidimensionale Struktur der Mikrokapillaren bedingt. Aus diesen Gründen werden quantitative Untersuchungen zur Expression von *tight junction*-Proteinen derzeit per Western-blot durchgeführt. Die räumliche Organisation der *tight junctions* soll zukünftig in Monolayern aus Hirnendothelzellen untersucht werden. Untersuchungen mit anderen Mikroorganismen (z.B. *Borrelia burgdorferi* (44) oder deren Bestandteilen (z.B. HIV-tat (2)) zeigten deutliche Veränderungen in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der *tight junctions*. So konnten Andras et al. (2) eine Herunterregulierung von Claudin-1, -5 und ZO-2 durch das HIV-Tat-Protein, Grab et al. (44) eine Degradation von ZO-1 durch *B. burgdorferi* nachweisen, was in beiden Fällen als Öffnung der BHS durch Pathogene gedeutet wurde.