

# **Apolipoprotein E - abgeleitete Peptide als Vektoren zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke**

## **D I S S E R T A T I O N**

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Ines Sauer**  
aus Großenhain

Berlin, September 2004

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Bodmeier
2. Prof. Dr. M. Bienert

Disputation am:

17.11.2004

*für meinen Vater*

Wer sie nicht konnte,  
Die Elemente,  
Ihre Kraft  
Und Eigenschaft,  
Wäre kein Meister  
Über die Geister.

J. W. v. Goethe, Faust I

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom März 2001 bis zum September 2004 am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin angefertigt.

Ich möchte mich bei allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, recht herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. M. Dathe und Herrn Prof. M. Bienert am FMP, die meine Arbeit zu jeder Zeit und in jeglicher Hinsicht voll unterstützten. Herrn Prof. R. Bodmeier danke ich für die Bereitschaft, für mich als Betreuer an der Freien Universität Berlin zu fungieren, sowie für das Interesse an meiner Forschungsarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Frau H. Nikolenko für ihre Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Auch den anderen Mitarbeitern der Abteilung Peptidchemie, insbesondere Herrn Dr. E. Krause, Herrn Dr. J. Oehlke, Herrn Dr. M. Beyermann und Herrn Dr. H. Berger, möchte ich für die zahlreichen interessanten Gespräche und wertvollen Anregungen danken. Bei Frau D. Krause, Frau A. Klose und Frau H. Lerch bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Synthese und Charakterisierung der verwendeten Peptide. Frau M. Dreißigacker gebührt mein Dank für ihre unschätzbare Hilfe auf administrativer Ebene. Ich bedanke mich bei allen Doktoranden aus Raum A.2.01 für die gute Atmosphäre und die moralische Unterstützung.

Bei Frau I. Dunay und Herrn Prof. O. Liesenfeld bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit. Herrn Dr. H. Scharnagl danke ich für die Charakterisierung der Gehirnkapillarendothelzellen. Für die Gastfreundschaft während meines Aufenthaltes am Gladstone-Institut an der Universität von Kalifornien, San Francisco, USA, bedanke ich mich bei Herrn Prof. K. Weisgraber und Frau M. Balestra. Herrn Dr. T. Innerarity danke ich für die wertvollen Diskussionen. Mein Forschungsaufenthalt in San Francisco wurde ermöglicht durch die großzügige Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mich unterstützt und mit großem Verständnis begleitet haben.

Tudo está bem quando termina bem.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Die Blut-Hirn-Schranke</b>	<b>9</b>
1.1.1 Aufbau	9
1.1.2 Barrierefunktion	10
1.1.3 Transportprozesse	11
<b>1.2 Arzneistofftransport über die Blut-Hirn-Schranke</b>	<b>14</b>
1.2.1 Erhöhung der Lipophilie	14
1.2.2 Hemmung von Effluxmechanismen	14
1.2.3 Chemische Transportsysteme	15
1.2.4 Methoden zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke	15
1.2.5 Physiologische Transportmechanismen	16
1.2.6 Vektor-vermittelter Transport	16
1.2.7 Vesikuläre Arzneistofftransportsysteme	18
<b>1.3 Liposomen</b>	<b>19</b>
1.3.1 Aufbau und Zusammensetzung	20
1.3.2 Herstellung und Charakterisierung	21
1.3.3 Wechselwirkung mit Zellen und <i>in vivo</i> Verhalten	22
1.3.4 <i>Drug Targeting</i> mit liposomalen Konjugaten	23
<b>1.4 Apolipoprotein E und ApoE-abgeleitete Peptide</b>	<b>27</b>
1.4.1 Vorkommen, Struktur und Funktion	27
1.4.2 Interaktion mit dem LDL-Rezeptor	29
1.4.3 ApoE und LDL-Rezeptoren im Gehirn und an der Blut-Hirn-Schranke	30
1.4.4 ApoE-abgeleitete Peptide	31
<b>2 Aufgabenstellung</b>	<b>34</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Geräte und Materialien</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Arbeitsmittel</b>	<b>36</b>
3.2.1 Chemikalien und Reagenzien	36
3.2.2 Medien und Pufferlösungen	38
3.2.3 Lipide	39
3.2.4 Zellen und Antikörper	42
<b>3.3 Methoden</b>	<b>43</b>
3.3.1 Design, Herstellung und Charakterisierung der Peptide	43
3.3.2 Liposomenpräparation und Charakterisierung	46
3.3.3 Herstellung und Charakterisierung der adsorptiven Komplexe	48
3.3.4 Herstellung und Charakterisierung der kovalenten Komplexe	54
3.3.5 Zellkultur	56
3.3.6 Untersuchung der LDL-Rezeptor-Expression	58
3.3.7 Untersuchung der Zytotoxizität	58
3.3.8 Internalisierungsuntersuchungen	59
3.3.9 LDL-Rezeptor-Bindung	60
3.3.10 Untersuchung des Internalisierungsmechanismus	62
3.3.11 Proteinbestimmungsmethoden	64
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>4.1 Herstellung und Charakterisierung von ApoE-Peptid-Liposomen</b>	<b>65</b>
4.1.1 Adsorptive Bindung der ApoE-Peptide an Liposomen	65
4.1.2 Kovalente Bindung der ApoE-Peptide an sterisch stabilisierte Liposomen	77
4.1.3 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse	79

<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen an Gehirnkapillarendothelzellen</b>	<b>80</b>
4.2.1	LDL-Rezeptor-Expression	80
4.2.2	Toxizität der ApoE-Peptid-Liposomen	81
4.2.3	Internalisierung der ApoE-Peptid-Liposomen	84
4.2.4	Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse	91
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung des Internalisierungsmechanismus</b>	<b>92</b>
4.3.1	Untersuchung der LDL-Rezeptor-Bindung	92
4.3.2	Untersuchungen zur LDL-Rezeptor-spezifischen Internalisierung	94
4.3.3	Untersuchungen zum Translokationsmechanismus	95
4.3.4	Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse	99
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen</b>	<b>120</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäure
BaG13	primäre humane Fibroblastenzellen
b.End3	immortalisierte Maus-Gehirnkapillarendothelzellen
b.FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Circulardichroismus
Chol	Cholesterol
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
BHS	Blut-Hirn-Schranke
DiBr-PSPC	1-Palmitoyl-2-Stearoyl-(6,7)-dibromo- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N-Ethyl-Diisopropylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Minimalmedium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOG	2-Deoxyglucose
Doxyl-5-PSPC	1-Palmitoyl-2-Stearoyl-(5-DOXYL)- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie
Fluos	5(6)-Carboxyfluoreszein-N-hydrosuccinimidester
Fmoc	N-(9-Fluorenyl)-methoxycarbonyl
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HOBT	N-Hydroxy-Benzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
LDL	Low-Density Lipoprotein

LDS	Lipid-freies Serum
LPDS	Lipoprotein-freies Serum
LRP	LDL-Rezeptor-assoziiertes Protein
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Flugzeit-Massenspektrometrie
Mal-PEG-PE	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin-N-[Maleimid (Polyethylenglykol)-2000], Ammonium-Salz
MEM	Minimalmedium
MPS	3-Tritylsulfanylpropionsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	molare Masse
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung pH 7,4
PEG	Polyethylenglykol
PEG-PE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin-N-[Methoxy-(Polyethylenglykol)-2000]
PGP	P-Glykoprotein
PLL	Poly-L-Lysin
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
RBE4	immortalisierte Ratten-Gehirnkapillarendothelzellen
RBMEC	primäre Ratten-Gehirnkapillarendothelzellen
RES	retikuloendotheliales System
Rhod-PE	Lissamine <sup>®</sup> Rhodamin B 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin, Triethylammonium-Salz
SSL	sterisch stabilisierte Liposomen
SUV	kleine, unilamellare Vesikel
TBTU	N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]-N-methylmethanaminium tetrafluoroborat N-oxid
Tempo-DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidyl-(TEMPO)-cholin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein
ZNS	Zentralnervensystem