

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

Tabelle 3.1 zeigt eine Aufstellung der verwendeten Geräte. Die Herkunft der verwendeten Materialien ist in Tabelle 3.2 ausgewiesen.

Tabelle 3.1: Geräte

Anwendung	Gerät	Firma
Circulardichroismus-Spektroskopie	J-720	Jasco, Japan
Dynamische Lichtstreuung	N4Plus	Coulter Corp., USA
ESI-Massenspektrometrie	TSQ 700	Finnigan, Deutschland
Liposomenextrusion	Extruder	Lipex Biomembranes, Kanada
Fluoreszenzspektroskopie	FP-6500	Jasco, Japan
Fluoreszenzspektroskopie	LS 50B	Perkin Elmer, USA
HPLC, präparativ	LC-8A	Shimadzu, Japan
HPLC, analytisch	LC-10AD	Jasco, Japan
Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	LSM 510	Zeiss, Deutschland
MALDI-TOF-Massenspektrometrie	Voyager-DE STR	Perseptive Biosystems, USA
Mikrotiterplatten-Auslesung	Safire	Tecan, Schweiz
Titrationsskalorimetrie	VP-ITC	MicroCal, USA
Peptidsynthese	433A PS	Applied Biosystems, USA
UV/VIS-Spektroskopie	V-550	Jasco, Japan

Tabelle 3.2: Materialien

Material	Firma
Einmalküvetten, Kunststoff	Sarstedt, Deutschland
PD10 Sephadex G25/Fine Säule	Amersham, USA
Polycarbonatmembranen	Nucleopore, Deutschland
Sephadex G50/Medium	Pharmacia, Schweden
Sterilisationsfilter 0,22 µm Porengröße	Sartorius, Deutschland
Vivaspin Konzentrationseinheit MWCO 10 kD	Sartorius, Deutschland
Zellkulturmaterialien	TPP, Deutschland

3.2 Arbeitsmittel

3.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Es wurden die in Tabelle 3.3 aufgeführten Chemikalien und Reagenzien verwendet.

Tabelle 3.3: Chemikalien und vorgefertigte Reagenzien

Bezeichnung	Substanz	Hersteller
Acetanhydrid		J.T.Baker, D
ACN	Acetonitril	J.T.Baker, D
Alpha-Medium		Biochrom, D
Aminosäuren	geschützte Aminosäuren zur Peptidsynthese	Novabiochem, CH
Antibiotikum	Penicillin/Streptomycin (10 000 IE/10 000 µg/ml)	Biochrom, D
Ascorbinsäure	Ascorbinsäure L+	J.T.Baker, D
bFGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor	Roche Diagnostics, D
BSA	Rinder-Serumalbumin	Biochrom, D
BSA-Standard	Coomassie Plus-200 Protein Assay	Pierce, USA
Calcein		Fluka, D
Chloroform		J.T.Baker, D
Collagen RT	Collagen, aus Rattenschwanz	Roche, D
DIC	Diisopropylcarbodiimid	Fluka, D
DIPEA	N-Ethyl-Diisopropylamin	Fluka, D
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium gepuffert mit NaHCO ₃ gepuffert mit HEPES	Biochrom, D Gibco, USA
DMF	N,N-Dimethylformamid	J.T.Baker, D
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma, D
DOG	2-Deoxyglucose	Serva, D
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, D
Essigsäure		J.T.Baker, D
Ethanol absolut		J.T.Baker, D
Ether	Diethylether	J.T.Baker, D
Fluos	5(6)-Carboxyfluoreszein-N-hydroxy- succinimidester	Sigma, D
FBS	Fetales Bovines Serum	Biochrom, D
Glucose	D(+)-Glucose	Sigma, D
Glutamin	N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin, 200 mM	Biochrom, D
Ham's F10		Biochrom, D
Heparin	Heparin, Natrium-Salz (170 USP Einheiten/mg)	Sigma, D
Heparinase I	Heparinlyase I (aus <i>Flavobacterium heparinum</i>)	Sigma, D

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure	Aldrich, D
HOBT	N-Hydroxy-Benzotriazol	Fluka, D
LDS	Lipid-freies Serum	Biowest, F
LPDS	Lipoprotein-freies Serum	aus eigener Herstellung
MEM	Minimal Essentielles Medium, Earle's	Biochrom, D
Methanol		J.T.Baker, D
MPS	3-Tritylsulfanylpropionsäure	Bachem, D
Molybdat	Ammoniummolybdat-tetrahydrat	Fluka, D
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid	Sigma, D
Myristinsäure		Fluka, D
NaCl	Natriumchlorid	Laborchemie Apolda, D
NaF	Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, D
Na[¹²⁵ I]	Natriumiodid, 100 mCi/ml	Amersham, USA
NaN ₃	Natriumazid	Sigma, D
NaOH	Natriumhydroxid	J.T.Baker, D
Palmitinsäure		Fluka, D
PBS (w)	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung mit Ca/Mg	Biochrom, D
PBS (wo)	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung ohne Ca/Mg	Biochrom, D
PDS	Plasma-abgeleitetes Serum	FirstLink, UK
Perchlorsäure	Perchlorsäure 70-72 %	Merck, D
Phenol		Fluka, D
Phosphat-Standard	Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck, D
Piperidin	Piperidin 99%	Aldrich, D
PLL	Poly-L-Lysin, Hydrobromid Zellversuche: MW 15 000 - 30 000 Beschichtung : MW >300 000	Sigma, D
Coomasssie-Reagenz	Coomassie Plus-200 Protein Assay	Pierce, USA
Schwefelsäure		Merck, D
TBTU	N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)-methylen]-N-methylmethanaminium tetrafluoroborat N-oxid	aus eigener Herstellung
TentaGel RAM	Harz zur Peptidsynthese an der Festphase	Rapp Polymere, D
TFA	Trifluoressigsäure	Riedel de Haen, D
TFE	Trifluorethanol	Fluka, D
Triisopropylsilan		Fluka, D
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, D
Triton X-100	Oktylphenylpolyethylenglykoether	Serva, D
Trypanblau	Trypanblau, 0,5 % in physiolog. NaCl-Lsg.	Biochrom, D
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin, 0.02% EDTA in PBS (wo)	Biochrom, D
Wasser	Aqua destillata	aus eigener Herstellung

3.2.2 Medien und Pufferlösungen

Tabelle 3.4 listet alle Medien, Pufferlösungen und andere Reagenzien auf, die für die Zellkultur, Liposomenpräparation und sonstige Zwecke verwendet wurden. Alle verwendeten Puffer und Zellkultur-Medien wurden nach der Herstellung unter Verwendung von 0,22 µm Porenfilter sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.4: Medien und Pufferlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung		
BaG13-Medium	FBS bzw. LPDS		50 ml
	DMEM	ad	500 ml
b.End3-Medium	Antibiotikum		5 ml
	Glutamin		5 ml
	FBS		50 ml
	MEM	ad	500 ml
Beschichtungs-Lösung Collagen	Collagen (Stock 2 mg/ml)		3,3 ml
	Aqua bidest., steril	ad	10 ml
Beschichtungs-Lösung PLL	PLL (Stock 0,1 mg/ml)		2,5 ml
	Aqua bidest., steril	ad	10 ml
BSA/PBS	BSA		0,2 g
	PBS (w)	ad	100 ml
Calcein/TRIS pH 7,4 Puffer	Calcein		80 mM
	TRIS		10 mM
	EDTA		0,1 mM
	Aqua bidest., pH 7,4		
Collagen-Stock-Lösung	Collagen RT		20 mg
	0,2 % Essigsäure (v/v)	ad	10 m
Energiedepletions-Lösung	2-Deoxyglucose		25 mM
	NaN ₃		10 mM
	PBS (w)		
Glucose/PBS	Glucose		1 g
	PBS (w)	ad	1000 ml
Heparin/PBS	Heparin		10 g
	PBS (w)	ad	1000 ml
HEPES/NaCl pH 7 Puffer	HEPES		10 mM
	NaCl		140 mM
	Aqua bidest., pH 7		
MTT-Reagenz	MTT		50 mg
	PBS (w/o)	ad	10 ml
RBMEC-Medium	bFGF (1 µg/ml)		0,5 ml
	PDS		100 ml
	DMEM	ad	500 ml

RBE4-Medium	Antibiotikum	5 ml
	bFGF (1 µg/ml)	0,5 ml
	Glutamin	5 ml
	FBS	50 ml
	Alpha-Medium Ham's F10	aa ad 500 ml
TRIS pH 7,4 Puffer	TRIS	10 mM
	EDTA	0,1 mM
	Aqua bidest., pH 7,4	
TRIS/NaCl pH 7,4 Puffer	TRIS	10 mM
	NaCl	154 mM
	EDTA	0,1 mM
	Aqua bidest., pH 7,4	
TRIS/NaF pH 7,4 Puffer	TRIS	10 mM
	NaF	154 mM
	EDTA	0,1 mM
	Aqua bidest., pH 7,4	
Triton-Lösung	Triton X-100	10 ml
	Aqua bidest.	ad 100 ml

3.2.3 Lipide

Zur Herstellung von Liposomen wurden die in Tabelle 3.5 aufgeführten Lipide verwendet.

Tabelle 3.5: Lipide zur Herstellung von Liposomen

Abk.	Bezeichnung	MW	Hersteller
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin	760,1	Avanti Polar Lipids USA
Chol	Cholesterol	386,7	Sigma Deutschland
PEG-PE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin-N-[Methoxy(Polyethylenglykol)-2000]	2731,4	Avanti Polar Lipids USA

Zusätzlich wurden die folgenden Lipidderivate zur Fluoreszenzmarkierung, für die Peptidkopplung und für spektroskopische Untersuchungen eingesetzt:

Fluoreszenz-markiertes Lipid

Die Liposomen wurden mit Lissamine[®] Rhodamin B 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin, Triethylammonium-Salz (Rhod-PE, MW 1333,8 g/mol, Abbildung 3.1) von Molecular Probes (Niederlande) markiert.

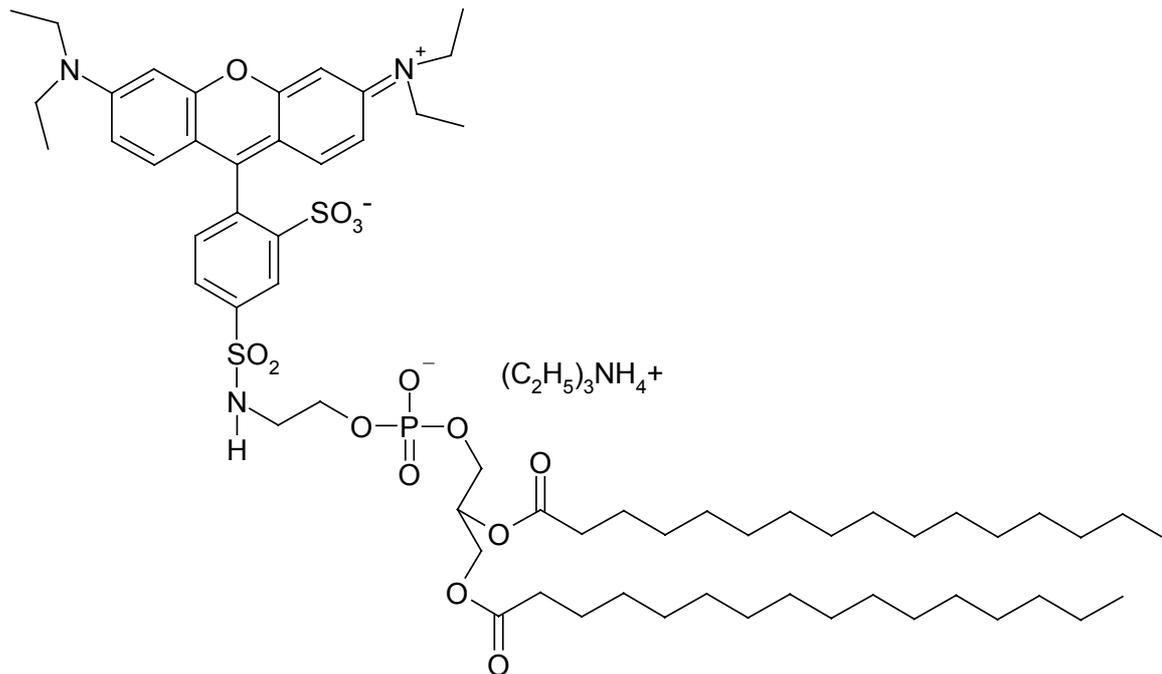


Abbildung 3.1: Rhod-PE: Lissamine® Rhodamin B 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin, Triethylammonium-Salz, MW 1333,8 g/mol

Linkerlipid zur kovalenten Peptidkopplung

Zur kovalenten Kopplung des Thiol-modifizierten ApoE-Peptides HS-A2 an sterisch stabilisierte Liposomen wurde 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin-N-[Maleimid (Polyethylenglykol)-2000], Ammonium-Salz (Mal-PEG-PE, MW 2819,4 g/mol, Abbildung 3.2.) von Avanti Polar Lipids (USA) eingesetzt.

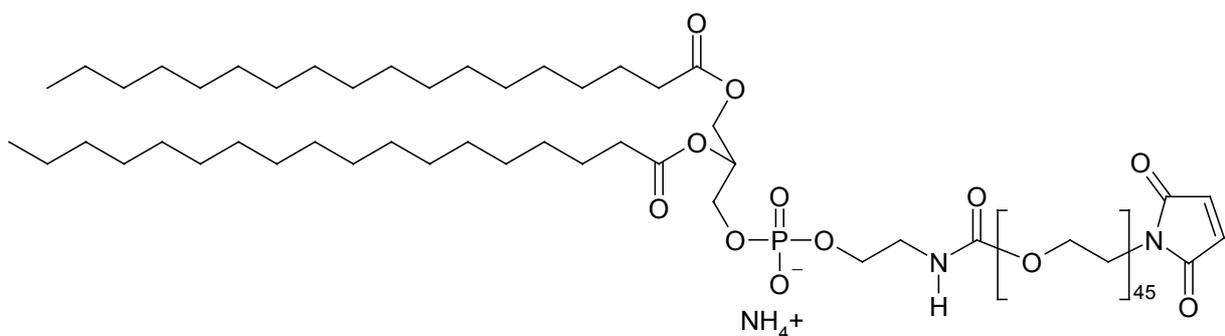


Abbildung 3.2: Mal-PEG-PE: 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin-N-[Maleimid (Polyethylenglykol)-2000], Ammonium-Salz, MW 2819,4 g/mol

Lipide zur Fluoreszenzlöschung

Für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Wechselwirkung von ApoE-Peptiden mit Liposomen wurden Lipidderivate mit unterschiedlichen Fluoreszenzlöschern von Avanti Polar Lipids (USA) verwendet (Abbildungen 3.3 bis 3.5).

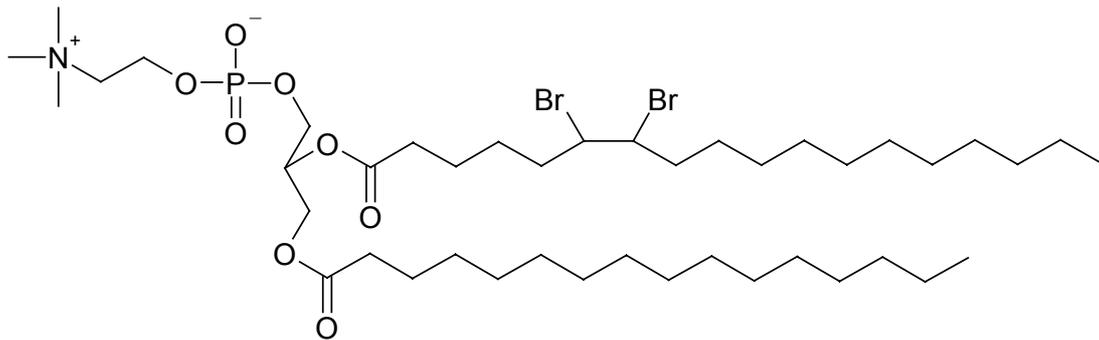


Abbildung 3.3: DiBr-PSPC: 1-Palmitoyl-2-Stearoyl-(6,7)-dibromo-*sn*-glycero-3-Phosphatidylcholin, MW 919,9 g/mol

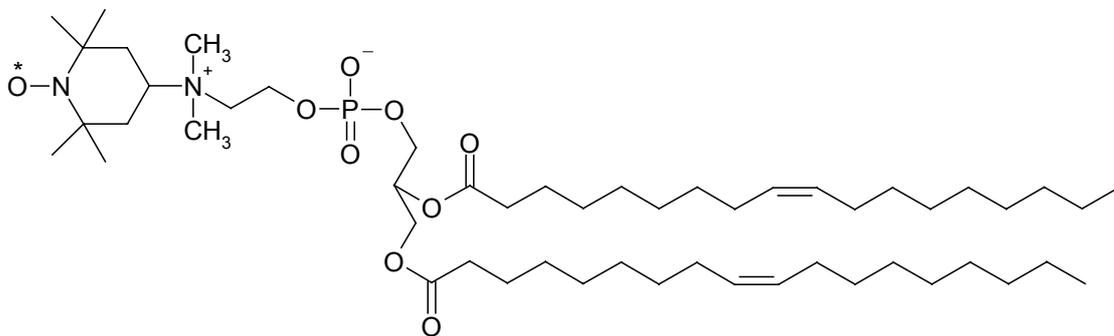


Abbildung 3.4: Tempo-DOPC: 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidyl-(TEMPO)-cholin, MW 925,3 g/mol

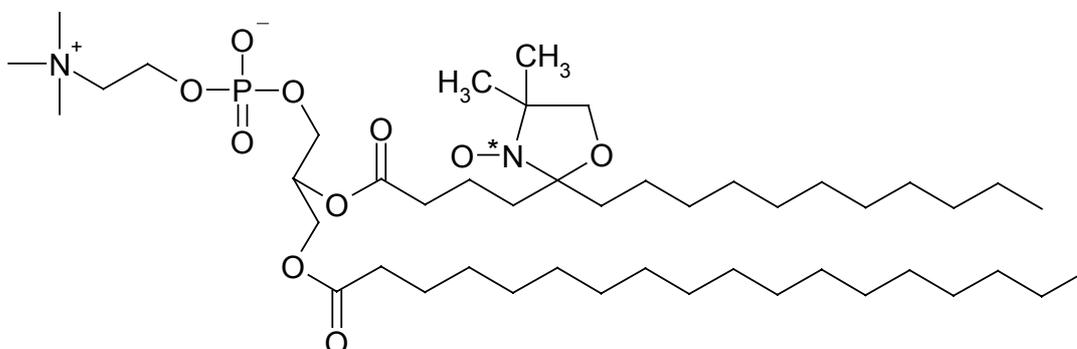


Abbildung 3.5: Doxyl-5-PSPC: 1-Palmitoyl-2-Stearoyl-(5-DOXYL)-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin, MW 862,2 g/mol

3.2.4 Zellen und Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Zelltypen gearbeitet (Tabelle 3.6):

Tabelle 3.6: Verwendete Zellen

Bezeichnung	Typ	Spezies	Besonderheit
BaG13	Fibroblastenzellen	Mensch	primär
b.End3	Gehirnkapillarendothelzellen	Maus	immortalisiert
RBE4	Gehirnkapillarendothelzellen	Ratte	immortalisiert
RBMEC	Gehirnkapillarendothelzellen	Ratte	primär

Die Zelllinie BaG13 sowie der Anti-LDL-Rezeptor-Antikörper wurden von Herrn Prof. K. Weisgraber, Gladstone Institute for Cardiovascular Disease, San Francisco, USA, zur Verfügung gestellt.

Die RBMEC-Zellen wurden von Frau I. Dunay, Institut für Infektionsmedizin, AG Prof. Liesenfeld, Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin, präpariert und ebenso wie die b.End3-Zellen zur Verfügung gestellt.

Herr Dr. Blasig vom Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, hat die Zelllinie RBE4 bereitgestellt.

3.3 Methoden

3.3.1 Design, Herstellung und Charakterisierung der Peptide

Tabelle 3.7 zeigt die Sequenzen der eingesetzten Peptide. Als Vektorpeptid wurde das Tandemdimmer der aus der LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne von ApoE-abgeleiteten Sequenz (141-150) verwendet (A2). Für die adsorptive Bindung an Liposomen wurde dieses Peptid an lipidassoziiierende Domänen geknüpft. Zur Herstellung dieser Zweidomänen-Peptide wurden eine amphipathische Helix (Q), eine transmembranale Helix (T) oder Fettsäuren wie Palmitinsäure (P) und Myristinsäure (M) verwendet. Zur fluoreszenzspektroskopischen Detektion der Peptide wurden zusätzlich Tryptophan-haltige Spacersequenzen (sp) eingebaut bzw. das Peptid N-terminal mit einem 5(6)-Carboxyfluoreszein-Derivat (Fluos, *f*) versehen. Die von Datta et al. beschriebene Sequenz AD wurde für vergleichende Untersuchungen verwendet (Datta et al. 2000). Das A2-Peptid für die kovalente Kopplung an Liposomen (HS-A2) wurde mit einem Mercaptopropionsäurerest (MPS) versehen. Grundsätzlich waren die Termina aller Peptide amidiert und acetyliert (Ac) bzw. acyliert.

Tabelle 3.7: Sequenzen der ApoE-Peptide

Abk.	Peptidsequenz	MW
ApoE-Rezeptorbindungsregion (141-150)₂		
A2	Ac-LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR-NH ₂	2726,6
<i>f</i> A2	Fluos-LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR-NH ₂	3043,0
Zweidomänen-Peptide zur adsorptiven Bindung an Liposomen		
A2Q	Ac-LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR <i>PLVED MQRQW AGLV</i> -NH ₂	4350,5
<i>f</i> A2Q	Fluos-LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR <i>PLVED MQRQW AGLV</i> -NH ₂	4666,9
A2T	Ac-LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR <i>AW LALAL ALALK ALALA LALKK</i> -NH ₂	4955,5
<i>f</i> A2T	Fluos-LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR <i>AW LALAL ALALK ALALA LALKK</i> -NH ₂	5271,9
A2P	Palmitoyl-LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR-NH ₂	2922,9
A2Psp	Palmitoyl-WAG LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR-NH ₂	3237,1
A2P2	Palmitoyl-WK(Palmitoyl)G LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR-NH ₂	3530,0
A2M	Myristoyl-LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR-NH ₂	2894,8
A2Msp	Myristoyl-WAG LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR-NH ₂	3209,0
AD	Ac-LRKLK RLLLR <i>DWLKA FYDKV AEKLV EAF</i> -NH ₂	3576,4
Peptid zur kovalenten Bindung an Liposomen		
HS-A2	HS-(CH ₂) ₂ CO-WG LRKLK RLLLR LRKLK RLLLR-NH ₂	3014,6

Peptidsynthese

Die Herstellung der Peptide erfolgte nach dem Prinzip der Festphasen-Synthese von Merrifield (Merrifield 1962) am automatischen Peptidsynthesizer 433A mittels Fmoc (N-(9-Fluorenyl)-methoxycarbonyl)-Chemie und mit TBTU als Kupplungsreagenz nach einem optimierten Standardprotokoll des Herstellers Applied Biosystems.

Der prinzipielle Ablauf der Synthese wird hier kurz erläutert: nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Harz (TentaGel-S-RAM) mit 20 % Piperidin in DMF und nachfolgendem Waschen mit DMF erfolgte die Ankupplung der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure im 10-fachen Überschuss mit dem Kupplungsreagenz TBTU/HOBT und DIPEA. Die funktionellen Gruppen der Seitenkette der Fmoc-Aminosäuren waren geschützt, um Nebenreaktionen zu vermeiden (siehe Tabelle 3.8).

Tabelle: 3.8: Aminosäuren zur Peptidsynthese

Aminosäure	MW	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code	Schutzgruppe
Alanin	89,09	Ala	A	-
Arginin	174,20	Arg	R	Pbf
Asparaginsäure	133,10	Asp	D	tert Butyl
Glutamin	146,15	Gln	Q	Trytyl
Glutaminsäure	147,13	Glu	E	tert Butyl
Glycin	75,07	Gly	G	-
Leucin	131,18	Leu	L	-
Lysin	146,19	Lys	K	Boc, Dde
Methionin	149,21	Met	M	-
Phenylalanin	165,19	Phe	F	-
Prolin	115,13	Pro	P	-
Tryptophan	204,23	Trp	W	Boc
Tyrosin	181,19	Tyr	Y	tert Butyl
Valin	117,15	Val	V	-

Bei jedem Kupplungsschritt erfolgte eine Doppelkupplung, um die Endausbeute des Peptides zu erhöhen. Nach dem wiederholten Waschen mit DMF erfolgte wiederum die selektive Deblockierung der terminalen Aminofunktion, also die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe, und die nächste Aminosäure konnte angeknüpft werden.

Die Modifizierung des N-Terminus fand manuell nach Abschluss des Peptidaufbaus am Synthesizer und Deblockierung der terminalen Aminogruppe statt. Die Acetylierung der Aminofunktion wurde mit 20 % Acetanhydrid in DMF und DIPEA für 15 Minuten durchgeführt. Fluos (5(6)-Carboxyfluoreszein-N-hydroxysuccinimidester) wurde N-terminal

zur Fluoreszenz-Markierung gekuppelt, indem 1,5 mol-Äquivalente Fluos in DMF für ca. 3 - 4 Stunden auf das Harz gegeben wurden. Die N-terminale Acylierung mit Palmitin- oder Myristinsäure erfolgte mit DIC und HOBT in DMF in äquimolaren Mengen im Überschuss über Nacht. Eine Dipalmytylierung erfolgte, indem ein Dde-geschütztes Fmoc-Lysin (N-Fmoc-N-1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-ethyl-L-Lysin) in die Peptidkette eingebaut wurde. Die Dde-Gruppe wurde zusammen mit der terminalen Fmoc-Gruppe mit 2 % Hydrazin in DMF entfernt, woraufhin die Palmytylierung an den beiden Aminofunktionen gleichzeitig stattfinden konnte.

Zum Abschluss erfolgte die Abspaltung der Peptidkette vom Harz und die gleichzeitige Entfernung der Seitenketten-Schutzgruppen. Für die Synthese aller Peptide wurde ein TentaGel-S-RAM Harz verwendet, um bei der Abspaltung C-terminal amidierte Peptide zu erhalten. Alle Peptide wurden vom Harz mit 10 % Phenol, 7 % Triisopropylsilan und 83 % TFA für 3 Stunden abgespalten, das Rohprodukt anschließend in Ether präzipitiert und über Nacht aus 10 % Essigsäure/Wasser (v/v) lyophilisiert.

Reinigung

Die Reinigung der Rohpeptide erfolgte mittels präparativer Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) (Bedingungen: Polyencap A300 Säule, linearer Gradient 20 - 80 %, Eluent B in 70 min; Eluent A: 0,1 % TFA in Wasser, Eluent B: 0,1 % TFA in 80 % ACN/20 % Wasser (v/v)).

Charakterisierung

Die lyophilisierten Endprodukte wurden mittels analytischer HPLC untersucht (Bedingungen: Polyencap A300-Säule, linearer Gradient 5 - 95 % Eluent B in 40 Minuten; Eluent A: 0,1 % TFA in Wasser, Eluent B: 0,1 % TFA in 80 % ACN/20 % Wasser (v/v)). Die erhaltenen Produkte hatten eine Reinheit von > 95 %.

Durch Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) bzw. Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) erfolgte die Bestimmung der molaren Massen der Endprodukte.

3.3.2 Liposomenpräparation und Charakterisierung

Für die Herstellung der Liposomen wurden ausschließlich zwitterionische Lipide verwendet, um die Interaktion der kationischen ApoE-Peptide mit dem LDL-Rezeptor nicht durch elektrostatische Wechselwirkung mit negativ geladenen Liposomen zu beschränken. Grundsätzlich wurden Liposomen durch Resuspendierung von Lipidfilmen präpariert. Die Lipidfilme wurden hergestellt, indem die in Chloroform gelösten Lipide in den benötigten Anteilen gemischt und anschließend das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfung und Vakuum entzogen wurde.

Herstellung von SUVs mittels Beschallung

Kleine unilamellare Vesikel wurden durch Beschallung hergestellt. Für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen enthielten die ansonsten nur aus POPC bestehenden SUVs zusätzlich verschiedene Anteile von DiBr-PSPC, Doxyl-5-PSPC und TEMPO-DOPC. Für Internalisierungsexperimente wurden die Liposomen mit dem fluoreszenzmarkierten Lipid Rhod-PE in einer Konzentration von 0,05 - 0,1 mol% versehen. Der Lipidfilm wurde durch intensives Vortexen mit TRIS/NaCl pH 7,4 bzw. TRIS/NaF pH 7,4 Puffer (für CD-spektroskopische Untersuchungen) für ca. 5 Minuten dispergiert. Die Lipidkonzentrationen lagen bei 20 - 50 mM. Anschließend wurde die Dispersion für 20 - 25 Minuten mittels eines Labsonic-L-Titanspitzen-Ultraschallgerätes unter Stickstoffbegasung im Eiswasserbad beschallt. Der Titanabrieb wurde durch Zentrifugation (5 min, 8000 U/min) entfernt.

Herstellung von Calcein-beladenen LUVs für die Farbstofffreisetzungs-Untersuchungen

Große unilamellare Vesikel bestehend aus POPC, die mit dem Farbstoff Calcein in selbst-quechender Konzentration ($c_{\text{Calcein}} = 80 \text{ mM}$) beladen waren, sind durch Extrusion hergestellt worden. Der Lipidfilm wurde mit dem Calcein/TRIS pH 7,4 Puffer dispergiert ($c_{\text{Lipid}} = 20 \text{ mM}$). Durch 8-maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Warmwasserbad und durch anschließende Extrusion durch 2 gestapelte Polycarbonatmembranen (8-mal durch die Porengröße 400 nm und nachfolgend 10-mal durch 100 nm)

wurde die Dispersion homogenisiert. Das nicht eingeschlossene Calcein wurde abschließend mittels Gelfiltration über eine Sephadex-G50/Medium-Säule entfernt (Fry et al. 1978).

Herstellung von sterisch stabilisierten Liposomen (SSL) mittels Extrusion

Für die Herstellung von SSL wurden die Lipide POPC, Cholesterol, PEG-PE, Mal-PEG-PE und Rhod-PE im Verhältnis 64 : 30 : 2,5 : 2,5 : 1 (mol/mol) in Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) gemischt und ein Lipidfilm unter Entzug des Lösungsmittels hergestellt. Der Lipidfilm wurde mit einem HEPES/NaCl pH 7 Puffer hydriert ($c_{\text{Lipid}} = 10 \text{ mM}$) und anschließend 8 Einfrier-Auftau-Zyklen (siehe oben) und der Extrusion (8-mal bei 100 nm und nachfolgend 10-mal bei 50 nm Porengröße) unterworfen.

Charakterisierung der Liposomen

Die Liposomen wurden mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) charakterisiert. Dabei wurde eine Größenverteilung bestimmt, woraus der mittlere Durchmesser der Hauptpopulation sowie der Polydispersitätsindex ermittelt wurden (Tabelle 3.9). Der Polydispersitätsindex ist ein Maß für die Breite der Größenverteilung, wobei der Wert 0 für eine monodisperse und der Wert 1 für eine polydisperse Verteilung stehen.

Tabelle 3.9: Partikelgrößen und Verteilung

	POPC-SUV	Calcein-POPC-LUV	SSL
Mittlerer Durchmesser (nm)	30 ± 10	90 ± 20	75 ± 10
Polydispersitätsindex	0,3 - 0,6	< 0.1	< 0.1

Bei SUVs wurde die Lipidkonzentration aus der eingewogenen Lipidmenge und dem zugesetzten Puffervolumen berechnet. Bei Extrusions-Liposomen wurde die Lipidkonzentration durch eine Phosphatanalyse bestimmt (Boettcher et al. 1961).

Grundsätzlich wurden alle Liposomenpräparation unter Argon, Lichtausschluss und bei 4 °C aufbewahrt. SUVs wurden maximal 3 Tage lang verwendet. Die mit Extrusion hergestellten LUVs und SSLs wurden ca. 2 Wochen lang verwendet, wobei durch Bestimmung der Liposomengröße und Größenverteilung mittels Dynamischer Lichtstreuung die Integrität der Liposomen vor Verwendung überprüft wurde.

3.3.3 Herstellung und Charakterisierung der adsorptiven Komplexe

Von den Zweidomänen-Peptiden zur adsorptiven Kopplung an Liposomen wurden Stocklösungen in TRIS/NaCl pH 7,4 Puffer zu 0,1 mM angefertigt. Ein geeignetes Volumen der Peptid-Stocklösung wurde mit POPC-SUVs bzw. -LUVs im gewünschten Lipid : Peptid-Verhältnis durch Vortexen gemischt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert, um die Adsorption und Insertion der Peptide in die Lipidbilayer zu erlauben. Direkt im Anschluss erfolgte die Weiterverwendung der Liposomen. Die Interaktion der Peptide mit den Liposomen wurde mit folgenden Methoden untersucht:

Circulardichroismus-Spektroskopie (CD)

Die Sekundärstruktur und damit die helikalen Strukturanteile der ApoE-Peptide wurden mit der CD-Spektroskopie untersucht. Grundlage des Circulardichroismus ist die unterschiedliche Absorption von rechts- und linkszirkular-polarisiertem Licht im UV/VIS-Bereich durch optisch aktive Moleküle (Cotton 1896). Die CD-Charakteristik von Peptiden wird vor allem durch die Eigenschaften der Amidgruppen mit Absorptionsbanden zwischen 220 nm und 190 nm bestimmt. Die Asymmetrie von Sekundärstrukturen induziert einen zusätzlichen CD, der in charakteristischen Spektren, z.B. für eine α -Helix, zum Ausdruck kommt. In Abbildung 3.6 ist die molare Elliptizität einer α -helikalen und einer ungeordneten Struktur eines Peptides als Funktion der Wellenlänge dargestellt (Reed und Reed 1997). Sequenzmodifikationen oder Veränderung der Umgebungsbedingungen eines Peptides führen zu Konformationsänderungen und damit zu unterschiedlichen CD-Spektren.

Für die CD-Untersuchungen der ApoE-Peptide in wässriger Pufferlösung, im Struktur-induzierenden Lösungsmittel Trifluorethanol (TFE) und in Gegenwart von Liposomen wurden entsprechende Aliquote der Peptid-Stocklösung in TRIS/NaF pH 7,4 Puffer, TFE bzw. in POPC-SUVs verdünnt und anschließend Spektren zwischen 195 und 260 nm bei Raumtemperatur aufgezeichnet. Die Peptidkonzentration betrug zumeist 10 - 50 μ M. Der TFE-Gehalt lag bei 50 % (v/v) und das Lipid : Peptid-Verhältnis wurde von 100 bis 1000 variiert. In der Regel wurden pro Probe 6 Spektren aufgezeichnet, gemittelt und geglättet, wobei die Spektren der korrespondierenden Peptid-freien Lösungen anschließend abgezogen wurden, um Streueffekte zu eliminieren. Die aufgezeichneten Spektren geben die molare

Elliptizität pro Aminosäurerest als Funktion der Wellenlänge wieder. Die Helizität der ApoE-Peptide wurde nach Chen berechnet (Chen et al. 1972):

$$h[\%] = \frac{[\Theta]_{222\text{nm}} - [\Theta]_{222\text{nm}}^{0\%}}{[\Theta]_{222\text{nm}}^{100\%} - [\Theta]_{222\text{nm}}^{0\%}} \cdot 100$$

wobei $[\Theta]_{222\text{nm}}$ die gemessene molare Elliptizität pro Aminosäurerest bei 222 nm ist und $[\Theta]_{222\text{nm}}^{0\%}$ bzw. $[\Theta]_{222\text{nm}}^{100\%}$ die Elliptizitäten einer ungeordneten Struktur (0 % Helizität) und einer kompletten Helix (100 % Helizität) bei 222 nm wiedergeben.

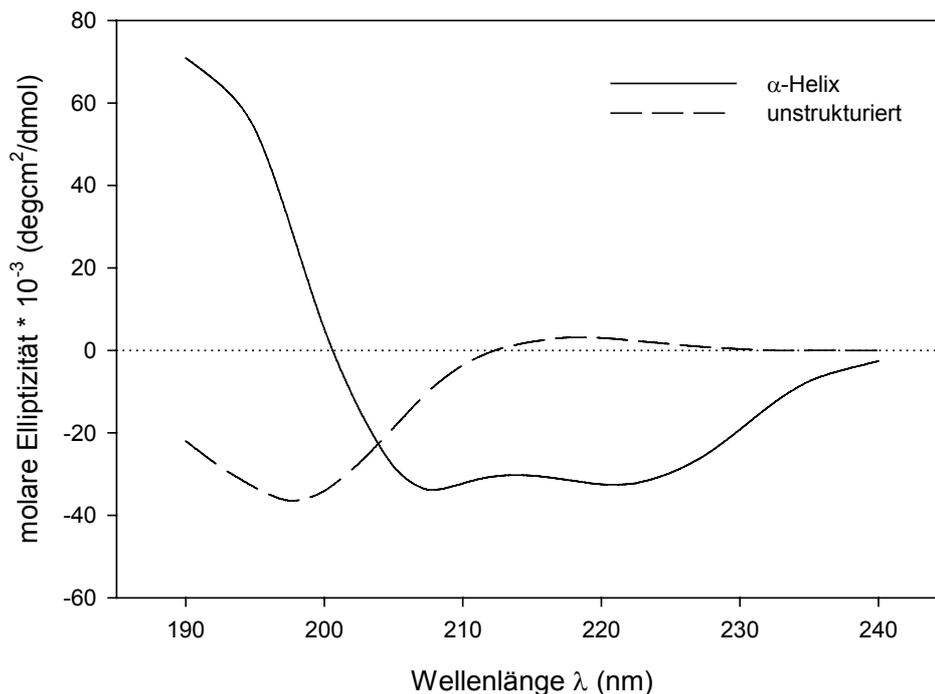


Abbildung 3.6: Charakteristische CD-Spektren für eine α -helikale und ungeordnete Struktur eines Peptides (nach Reed et al.)

Farbstofffreisetzungsversuche (Dye release)

Mittels Farbstofffreisetzungsversuchen an Calcein-beladenen POPC-LUVs wurde die Membran-permeabilisierende Aktivität der ApoE-Peptide untersucht (Dathe et al. 2002). Die Liposomen enthielten den Farbstoff in einer selbst-quencheden Konzentration. Bei der Peptid-induzierten Permeabilisierung der Liposomen kam es zum Ausfluss des eingeschlossenen Farbstoffes, was fluoreszenzspektroskopisch als *Dequenching* und damit als Zunahme der Fluoreszenzintensität erfasst wurde.

Dazu wurde die Calcein-LUV-Suspension ($c_{\text{Lipid}} = 25 \mu\text{M}$) in eine Küvette mit der vorgelegten Peptid-Lösung ($c_{\text{Peptid}} = 5 \text{ nM} - 5 \mu\text{M}$, in TRIS/NaCl pH 7,4) injiziert. Die auf Raumtemperatur temperierte Mischung ($v_{\text{Gesamt}} = 2,5 \text{ ml}$) wurde konstant gerührt und die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität, hervorgerufen durch die Peptid-induzierte Vesikelpermeabilisierung, mit einem LS 50B, Perkin Elmer, Fluorimeter (Anregung $\lambda_{\text{Ex}} = 490 \text{ nm}$, Emission $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$) aufgezeichnet. Für die Auswertung wurde die nach 5 Minuten erreichte Fluoreszenzintensität (I) erfaßt. Anschließend erfolgte die vollständige Permeabilisierung der Liposomen durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ Triton-Lösung, um die Fluoreszenzintensität korrespondierend zu 100 % Calcein-Freisetzung zu ermitteln ($I_{100\%}$). Die prozentuale Farbstofffreisetzung $F(\%)$ nach 5 Minuten wurde folgendermaßen berechnet:

$$F [\%] = \frac{I - I_{0\%}}{I_{100\%} - I_{0\%}} \cdot 100$$

wobei $I_{0\%}$ die Fluoreszenzintensität der Calcein-haltigen LUVs vor Peptidzugabe darstellt. Die prozentuale Freisetzung $F(\%)$ wurde als Funktion der Peptidkonzentration dargestellt. Aus den erhaltenen Dosis-Wirkungskurven wurde die Peptidkonzentration berechnet, die eine 50 % ige Calcein-Freisetzung hervorrief (EC_{50}), anhand derer die Membranpermeabilisierende Aktivität der ApoE-Peptide verglichen wurde.

Dynamische Lichtstreuung

Die Integrität der ApoE-Peptid-Liposomen wurde mittels Dynamischer Lichtstreuung untersucht (siehe Kapitel 3.3.2). Als Ergebnisparameter wurden dabei der mittlere Partikeldurchmesser und der Polydispersitätsindex herangezogen.

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die Interaktion der Tryptophan-haltigen ApoE-Peptide mit Liposomen wurde mit der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Der Chromophor Tryptophan besitzt von der Polarität der Umgebung abhängige Fluoreszenzeigenschaften, weshalb er als Marker bei der Untersuchung der Bindung, der Positionierung und der Stabilität der Verankerung von Peptiden an Lipidbilayern verwendet werden kann.

Der fluoreszenzspektroskopische Nachweis der Bindung von Tryptophan-haltigen ApoE-Peptiden an Liposomen erfolgte durch die Beobachtung einer Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums von Tryptophan (λ_{\max} in Puffer = 355 nm), zumeist einhergehend mit einer Intensitätszunahme. Dazu wurden Fluoreszenzspektren der ApoE-Peptide in TRIS/NaCl pH 7,4 Puffer ($c_{\text{Peptid}} = 2 \mu\text{M}$) und in Gegenwart von POPC-SUVs ($c_{\text{Lipid}} = 2 \text{ mM}$) bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ im Emissionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 300 - 500 \text{ nm}$ aufgezeichnet und die beobachteten Maxima und Intensitäten verglichen. Die aufgezeichneten Spektren und die aller weiteren Untersuchungen wurden einer Korrektur gegen die Peptidfreie Liposomen-Puffer-Mischung unterzogen und dabei die Streuungsbeiträge der Liposomen subtrahiert.

Als weitere Methode zum Nachweis der Peptidbindung an Liposomen wurde ein Fluoreszenzlöschungs-Assay mittels Verwendung des die Tryptophan-Fluoreszenz quenchenden Lipidderivates DiBr-PSPC durchgeführt. Die Löschung der Fluoreszenz ist eine Funktion der Kollisionshäufigkeit und damit des Abstandes zwischen Quencher und Chromophor (Ren et al. 1999) und kann also nur erfolgen, wenn das Peptid sich in der Nähe des DiBr-Lipides befindet. Befindet sich das Peptid in Lösung, hat DiBr-PSPC keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität. Im lipidgebundenen Zustand nimmt jedoch die Fluoreszenzintensität mit der Erhöhung der DiBr-PSPC-Konzentration deutlich ab. Es wurden POPC-SUV-Liposomen hergestellt, wobei die Konzentration von DiBr-PSPC in den POPC-SUVs schrittweise erhöht wurde (DiBr-PSPC = 0 - 60 mol%). Stocklösungen der ApoE-Peptide in Tris/NaCl pH 7,4 Puffer wurden hergestellt ($c_{\text{Peptid}} = 100 \mu\text{M}$) und zusammen mit der Liposomensuspension ($c_{\text{Lipid}} = 5 \text{ mM}$) in eine 4 x 4 mm-Quarzküvette pipettiert, so dass eine Endkonzentration von $c_{\text{Peptid}} = 2 \mu\text{M}$ und $c_{\text{Lipid}} = 2 \text{ mM}$ ($c_{\text{L}}/c_{\text{P}} = 1000$) vorlag. Anschließend wurden bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ Fluoreszenzspektren im Emissionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 300 - 500 \text{ nm}$ aufgezeichnet. Die Fluoreszenzintensitäten im Maximum wurden als Funktion des DiBr-PSPC-Gehaltes der Liposomen dargestellt.

Die Bestimmung der Lokalisation der ApoE-Peptide in der Lipidbilayer erfolgte mit der Parallax-Methode (Chattopadhyay und London 1987). Hierbei wurden Lipidderivate verwendet, die an der Kopfgruppe und an Position 5 an der Acylkette mit fluoreszenzlöschenden Nitroxidradikalen markiert waren, deren Abstand zum Zentrum der Bilayer bekannt ist. Aufgrund der Abhängigkeit der Fluoreszenzquenchung von der Entfernung des Tryptophans zum Quencher kann aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der Abstand des Tryptophans zum Bilayerzentrum berechnet werden. Das Ausmaß der Fluoreszenzquenchung berechnet sich nach folgender Formel (London und Feigenson 1981):

$$F/F_0 = e^{\left[\left(\frac{-\pi c}{70} \right) (R_0^2 - X^2 - z^2) \right]}$$

F und F_0 sind die Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Quenchers; R_0 ist der kritische Quenchungsabstand eines Tryptophan-Doxyl-Paares, der 12 Å beträgt. X ist die minimal erlaubte laterale Distanz und z die Differenz des Abstandes von Chromophor und Quencher zum Zentrum der Lipidbilayer. c ist der molare Anteil des Quenchers, womit $c/70$ die Anzahl der Quencher-moleküle pro Å ist unter der Annahme, dass eine Lipidkopfgruppe eine Fläche von 70 Å² einnimmt. Für die Untersuchungen wurden POPC-Lipidfilme mit variierenden Anteilen der Doxyl-5- bzw. TEMPO-markierten Lipide hergestellt ($c_{\text{Label}} = 0 - 40 \text{ mol\%}$). Die ApoE-Peptide wurden in Ethanol gelöst ($c_{\text{Peptid}} = 120 \text{ }\mu\text{M}$), zu dem Lipidfilm gegeben und gevortext, bis sich der Lipidfilm vollständig gelöst hatte. Danach wurde TRIS pH 7,4 Puffer dazugegeben und die Lösung für ca. 2 Minuten gevortext, wobei sich spontan Liposomen mit gebundenem ApoE-Peptid bildeten. Die Lipidkonzentration lag bei $c_{\text{Lipid}} = 200 \text{ }\mu\text{M}$ und die Peptidkonzentration bei $c_{\text{Peptid}} = 2 \text{ }\mu\text{M}$ ($c_L/c_P = 100$). Anschließend wurden Fluoreszenzspektren in einer 10x10 mm-Quarzküvette aufgezeichnet ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300 - 480 \text{ nm}$) und für die weitere Auswertung mit der korrespondierenden Peptid-freien Liposomen-Puffer-Lösung korrigiert. Eine detaillierte Beschreibung des methodischen Vorgehens und der durchgeführten Berechnungen befindet sich bei Dathe et al. (Dathe et al. 2004).

Die Stabilität der Verankerung der ApoE-Peptide in der Lipidbilayer konnte durch Untersuchung der Umverteilung der an DiBr-PSPC-haltigen Vesikeln gebundenen ApoE-Peptid-Moleküle auf quencherfreie POPC-SUVs bestimmt werden. Bei Zugabe eines Überschusses von quencherfreien Liposomen kommt es in Abhängigkeit vom Ausmaß der Umverteilung der Peptide von Quencher-haltigen zu Quencher-freien Liposomen zu einer Erhöhung der Tryptophan-Fluoreszenzintensität. Für die Untersuchungen wurden SUVs mit 40 mol% DiBr-PSPC in POPC ($c_{\text{Lipid}} = 5 \text{ mM}$) und ohne Quencher (100 mol% POPC, $c_{\text{Lipid}} = 40 \text{ mM}$) sowie Stocklösungen der ApoE-Peptide ($c_{\text{Peptid}} = 200 \text{ }\mu\text{M}$) in TRIS/NaCl pH 7,4 Puffer hergestellt. Die gewählten Bedingungen beruhten auf der Beobachtung, dass bei einer Quencher-Konzentration von 40 mol% DiBr-PSPC in POPC-SUVs die Tryptophan-Fluoreszenzintensität der ApoE-Peptide auf die Hälfte der Fluoreszenzintensität von der an POPC-SUVs gebunden Peptiden abfällt und damit ein ausreichender Fluoreszenzanstieg bei Umverteilung zu erwarten war. Zum Zeitpunkt Null wurde zu der Mischung aus der Peptidlösung und den DiBr-PSPC-Liposomen ($c_{\text{Peptid}} = 2 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{\text{Lipid}} = 2 \text{ mM}$) in einer

10 x 10 mm-Quarzküvette POPC-SUVs zugegeben, so dass eine POPC-Endkonzentration von 3,8 mM in der Küvette vorlag. Im Abstand von 5 bis 10 Minuten wurden über einen Zeitraum von 80 Minuten die Tryptophan-Fluoreszenzen in den jeweiligen Emissionsmaxima der ApoE-Peptide bestimmt ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) und als Funktion der Zeit dargestellt.

Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Bestimmung der Lipidaffinität der ApoE-Peptide erfolgte mit der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC). Dabei werden die bei Bindung der Peptide an Liposomen auftretenden Enthalpieänderungen bestimmt, wobei das Kalorimeter in isothermer Betriebsart die freiwerdende oder gebrauchte Wärme durch elektrische Kompensation misst, die notwendig ist, um das thermische Gleichgewicht zwischen der Probenzelle und einer mit Wasser oder Puffer gefüllten Referenzzelle wiederherzustellen. Die Messkurve, also die zeitabhängige Aufzeichnung der notwendigen elektrischen Regelleistung, gibt die auftretende Wärmetönung der Reaktion pro Injektion wieder. Aus der Bindungsisotherme, d.h. der integralen Darstellung der Reaktionswärmen pro Stoffmenge des injizierten Bindungsreaktanten (kcal/mol) in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses der beiden Bindungspartner (mol/mol), lassen sich der Verteilungskoeffizient K_p , die molare Bindungsenthalpie ΔH und das minimal notwendige molare Verhältnis der Bindungspartner für eine vollständige Bindung berechnen. Thermodynamisch betrachtet stellt die Bindung von Peptiden an Liposomen ein Verteilungsgleichgewicht des Peptides zwischen zwei Phasen dar; der wässrigen Phase und der Lipidmembranphase. Unter der Bedingung, dass sich das Ausmaß der Peptidbindung linear zur Peptidkonzentration an der Liposomenoberfläche verhält, ergibt sich für den Verteilungskoeffizienten K_p :

$$R = K_p \cdot c_M$$

wobei R das molare Verhältnis von gebundenem Peptid zu Lipid und c_M die Peptidkonzentration an der Liposomenoberfläche ist, die wiederum von der Peptidkonzentration in der wässrigen Phase, von der Ladung des Peptides und vom elektrostatischen Potential der Liposomenoberfläche abhängig ist. Da das Potential der Liposomenoberfläche nach der Gouy-Chapman-Theorie bestimmt werden kann (McLaughlin 1989), lässt sich c_M berechnen. Eine detaillierte Beschreibung des Bindungsmodells findet sich unter (Wieprecht et al. 1999). Bei der kalorimetrischen Untersuchung der exothermen Bindungsreaktion zwischen ApoE-Peptiden und POPC-SUV in TRIS/NaCl pH 7,4 Puffer erfolgte die Titration des Peptides in

der Probenzelle ($c_{\text{Peptid}} = 0,01 - 0,02 \text{ mM}$, $v_{\text{Probenzelle}} = 1,4 \text{ ml}$) mit 16 Injektionen à $20 \mu\text{l}$ der POPC-SUV-Suspension ($c_{\text{Lipid}} = 50 \text{ mM}$) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ unter kontinuierlicher Erfassung der auftretenden Wärmetönung. Bei jeder Liposomeninjektion wurde freies Peptid an die Liposomen gebunden. Die pro Injektion auftretende Wärmetönung sank mit jeder Injektion, da immer weniger freies Peptid für die Bindung zur Verfügung stand. Am Ende der Titration wurde nur noch die Mischungswärme der beiden Flüssigkeiten gemessen. Als Kontrolle wurde die Liposomenlösung in eine mit Puffer gefüllte Probenzelle injiziert, wobei die Mischungswärmen registriert wurden. Obige Messwerte wurden um diese Mischungswärmen korrigiert. Aus den korrigierten Reaktionswärmern wurden Bindungsisothermen generiert und daraus die hydrophoben Bindungskonstanten der Peptide auf der Grundlage des oben beschriebenen Bindungsmodells bestimmt (Seelig 1997).

3.3.4 Herstellung und Charakterisierung der kovalenten Komplexe

Unmittelbar nach der Herstellung der SSLs erfolgte die Kopplung des Thiol-modifizierten ApoE-Peptides (HS-A2) an die Oberfläche der sterisch stabilisierten Liposomen. Das Peptid wurde zuvor in HEPES/NaCl pH 7 Puffer gelöst ($c_{\text{Peptid}} = 0,1 \text{ mM}$) und im gewünschten Volumen zur Liposomendispersion dazugegeben. Das Lipid : Peptid-Verhältnis bei der Kopplungsreaktion lag bei 200. Das Liposomen-Peptid-Gemisch, i.d.R. ein Volumen von 2 ml, wurde durchmischt und für 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um die Ausbildung der Thioether-Brücke zwischen dem Peptid und der Maleimid-Funktion des PEG-PE zu ermöglichen (Abbildung 3.7).

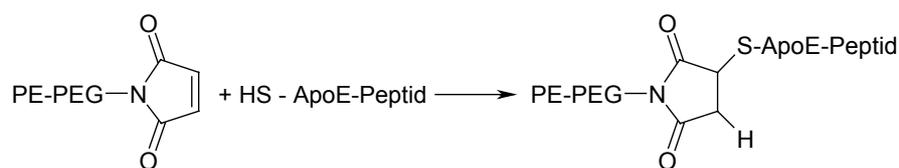


Abbildung 3.7: Kopplung des Thiol-modifizierten ApoE-Peptides HS-A2 an die terminale Maleimid-Funktion des Mal-PEG-PE-Lipidderivates

Anschließend erfolgte die Abtrennung des nichtgebundenen Peptides mittels Größenausschlusschromatographie über eine PD10 Sephadex G25/Fine-Säule mit HEPES/NaCl pH 7 Puffer als Eluent. Der Nachweis, dass die chromatographische Trennung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen von ungebundenem Peptid erfolgreich war, erfolgte mittels Zentrifugation der Liposomensuspension in einer Vivaspin-Konzentrationseinheit mit einem

molekularen Ausschlussgewicht von 10 kDa (Bedingungen: 100 μ l Liposomen, $c_{\text{Lipid}} = 5$ mM, 180 Minuten bei 12 000 U/Minute, 10 °C). Dabei wurde die Liposomensuspension zumindest teilweise in eine flüssige und eine feste Phase getrennt. Anschließend erfolgte die chromatographische (HPLC) und massenspektrometrische Untersuchung des erhaltenen Filtrates. Mit beiden Methoden konnte kein Peptid im Filtrat nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle erfolgte mit dem ungebundenen HS-A2 Peptid (Bedingungen: 100 μ l Peptid, $c_{\text{Peptid}} = 10 - 1000$ μ M, 60 Minuten bei 12 000 U/min, 10 °C). Mittels Phosphatanalyse wurde im Anschluss an die chromatographische Reinigung die Lipidkonzentration nach Boettcher bestimmt ((Boettcher et al. 1961), siehe Kapitel 3.4.2). Die so hergestellten ApoE-Peptid-PEG-Liposomen wurden wie folgt charakterisiert:

Dynamische Lichtstreuung

Die Integrität der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen wurde mittels Dynamischer Lichtstreuung untersucht (siehe Kapitel 3.3.2). Zur Charakterisierung wurden dabei der mittlere Partikeldurchmesser und der Polydispersitätsindex herangezogen.

Nachweis und Quantifizierung der ApoE-Peptid-Kopplung an PEG-Liposomen

Der qualitative Nachweis der erfolgreichen Thioladdition des HS-A2-Peptides an die terminale Maleimid-Funktion des PEG-Lipides erfolgte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Die Quantifizierung der gebundenen Peptidmenge wurde auf der Grundlage der Tryptophan-Fluoreszenz vorgenommen. Emissionsspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm im Bereich von 300 bis 450 nm aufgezeichnet. Die Fluoreszenzintensität im Emissionsmaximum bei 350 nm wurde mit der Fluoreszenzintensität des freien Peptides HS-A2 als Standard verglichen. Aufgrund der geringen Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums des lipidgebundenen Peptides gegenüber dem ungebundenen, freien Peptid in wässriger Lösung (λ_{max} in Puffer = 355 nm), was mit einer Umgebungs- und/oder Konformationsänderung des Chromophors Tryptophan erklärt werden kann, konnte mit dieser Methode nur eine ungefähre Abschätzung der gebundenen Menge des HS-A2 Peptides und damit der Besetzungsdichte der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen erfolgen.

3.3.5 Zellkultur

Vorbehandlung der Zellkulturgefäße

Abhängig vom geplanten Versuch wurden Zellkulturgefäße aus Polystyrol in verschiedenen Größen verwendet. Die Kultur der RBE4-Zellen erfolgte in collagenisierten Kulturgefäßen. Für mikroskopische Untersuchungen wurden mit Poly-L-Lysin beschichtete Glas-Deckgläschen (Durchmesser 30 mm) verwendet. Die Beschichtung wurde wie folgt durchgeführt: Auf die Deckgläschen wurde ca. 1 ml der Beschichtungs-Lösung gegeben und 1 Stunde offen in der Sterilwerkbank stehen gelassen. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgenommen und die Schale zum Trocknen erneut stehen gelassen. Zellkulturflaschen wurden beschichtet, indem ca. 200 µl der Beschichtungslösung mit einem Zellschaber auf der Wachstumsfläche gleichmäßig verteilt wurden. Anschließend erfolgte die Trocknung in der Sterilwerkbank. Die Beschichtung erfolgte i.d.R. auf Vorrat, wobei die Gefäße bei 4 °C gelagert und direkt vor der Aussaat der Zellen mit PBS (w) gewaschen wurden.

Allgemeine Verfahrensweisen zur Kultivierung

Tiefgefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, sofort in 50 ml erwärmtes Medium pipettiert und bei 1500 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach dem Absaugen des Überstandes in 2 ml Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen pipettiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium ausgetauscht und die Kultivierung wie für den jeweiligen Zelltyp beschrieben fortgesetzt.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde der Zellrasen mit auf 37 °C temperiertem PBS (wo) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA behandelt. Der Zellrasen wurde komplett mit der temperierten Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und auf der Heizplatte gewärmt (37 °C). Bei beginnender Ablösung der Zellen (mikroskopische Beobachtung) wurde das Trypsin/EDTA bis auf einen Rest von ca. 0,5 ml abgesaugt und das Ablösen der Zellen durch leichtes Klopfen der Zellkulturflasche gegen die Handinnenfläche unterstützt. Der Boden der Zellkulturflasche wurde anschließend mit einem definierten Volumen des temperierten Mediums gewaschen und die Zellen dabei suspendiert. Nach dem Auszählen der Zellen (Casy Counter) erfolgte die Aussaat in die jeweiligen Zellkulturgefäße in der gewünschten Dichte.

BaG13 (primäre humane Fibroblastenzellen)

BaG13-Zellen wurden zur Untersuchung der LDL-Rezeptor-Bindung und Aufnahme der Peptide und Liposomen verwendet und kultiviert wie beschrieben (Arnold et al. 1992). Einmal wöchentlich erfolgte eine Passage und ein zusätzlicher Mediumwechsel. Es wurden 14 000 Zellen pro Well in 12-Well-Mikrotiterplatten (12 x 22 mm) ausgesät und für 7 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 10 % CO₂ kultiviert, wobei 48 Stunden vor einem geplanten Experiment ein Mediumwechsel erfolgte. Das FBS-haltige Medium wurde dann entweder gegen LPDS/LDS-haltiges ausgetauscht, um die LDL-Rezeptor-Expression zu steigern, oder es wurde mit dem normalen FBS-haltigen Medium weiter kultiviert. Die Hochregulation der LDL-Rezeptor-Expression mit LPDS/LDS-haltigem Medium ist sehr effektiv; in der Literatur werden Zahlen genannt von ca. 10 000 Rezeptoren pro Zelle für eine normale und 70 000 bis 100 000 Rezeptoren pro Zelle für eine hochregulierte Expression (Innerarity et al. 1986).

b.End3 (immortalisierte Maus-Gehirnkapillarendothelzellen)

Die Eigenschaften der b.End3-Zelllinie sind kürzlich beschrieben worden (Omidi et al. 2003). Die verwendeten Kulturbedingungen wurden von I. Dunay etabliert. Alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel, und es wurde 2-mal wöchentlich passagiert. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden 16 000 Zellen/ml in b.End3-Medium auf PLL-beschichteten Deckgläschen (Durchmesser 30 mm) ausgesät und für 3 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum Zeitpunkt der CLSM-Untersuchungen lag Semikonfluenz vor.

RBE4 (immortalisierte Ratten-Gehirnkapillarendothelzellen)

Die Kultur der immortalisierten RBE4-Zelllinie (Roux et al. 1994) erfolgte ausschließlich in collagenisierten Zellkulturgefäßen, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel und 2-mal wöchentlich eine Passage erfolgte. Für die CLSM-Untersuchungen wurden 25 000 Zellen/ml in RBE4-Medium auf Collagen-beschichteten Deckgläschen (Durchmesser 30 mm) ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum Zeitpunkt der mikroskopischen Untersuchungen lag Semikonfluenz vor. Für die Toxizitätsuntersuchungen wurden 50 000 Zellen/Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (96 x 5 mm) ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

RBMEC (primäre Ratten-Gehirnkapillarendothelzellen)

Primäre Ratten-Gehirnkapillarendothelzellen wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben (Deli und Joo 1996). Für die CLSM-Untersuchungen wurden 20 000 Zellen/ml in RBMEC-Medium auf PLL-beschichteten Deckgläschen ausgesät und für 2 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum Zeitpunkt der mikroskopischen Untersuchungen lag Semikonfluenz vor. Für die Toxizitätsuntersuchungen wurden 10 000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (96 x 5 mm) ausgesät und für 2 Tage im Brutschrank kultiviert.

3.3.6 Untersuchung der LDL-Rezeptor-Expression

Die Untersuchung der LDL-Rezeptor-Expression und Funktion an verschiedenen Gehirnkapillarendothelzellen erfolgte durch Herrn Dr. Scharnagl an der Universitätsklinik Freiburg nach dem von Goldstein et al. beschriebenen Protokoll für LDL-Rezeptor-Bindung, Aufnahme und Degradation von ¹²⁵I-markiertem LDL (Goldstein et al. 1983) mit geringen Änderungen (März et al. 1993). Eine ausführliche Beschreibung der Methode findet sich in Kapitel 3.3.9.

3.3.7 Untersuchung der Zytotoxizität

Die Toxizität der ApoE-Peptide und ApoE-Peptid-Liposomen wurde mittels des MTT-Tests bestimmt. Dieser Test misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase lebender Zellen unabhängig vom Zellzyklus. Das schwach gelbe MTT dringt in die Zellen ein, wobei der Tetrazoliumring durch die Dehydrogenasen aufgebrochen wird und das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan kristallisiert, welches nach Solubilisation der Zellen photometrisch bestimmt wird (Mosmann 1983). Die ApoE-Peptide, Liposomen bzw. ApoE-Peptid-Liposomen wurden in verschiedenen Konzentrationen ($c_{\text{Peptid}} = 0,1 - 25 \mu\text{M}$, $c_{\text{Lipid}} = 0,5 - 3 \text{ mM}$) in Serum-freiem Medium verdünnt, in 96-Well-Mikrotiterplatten mit konfluentem Zellrasen pipettiert und für 30 Minuten bis zu 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der MTT-Test durchgeführt, wobei zu 200 μl Medium 20 μl des MTT-Reagenzes (5 mg/ml) pro Well gegeben wurden. Die Entwicklung des Farbstoffes erfolgte über 4 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) und die Lyse der Zellen mit 100 μl DMSO pro Well. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung des blauen Formazans mit

einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei der Wellenlänge 550 nm mit automatischer Subtraktion der bei 650 nm bestimmten Absorption als Referenz. Die prozentual angegebene Zellvitalität bezieht sich auf die für unbehandelte Zellen gemessene Absorption, für die eine Vitalität von 100 % angenommen wird, und ist als Funktion der Peptid- bzw. Lipidkonzentration dargestellt. Für jede Konzentration wurden 4 bis 8 Parallelbestimmungen durchgeführt.

3.3.8 Internalisierungsuntersuchungen

Die intrazelluläre Lokalisation von Rhodamin-markierten Liposomen und ApoE-Peptid-Liposomen sowie Fluoreszein-markierten Peptiden in verschiedenen Gehirnkapillarendothelzellen wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht. Die Zellen wurden zu diesem Zwecke auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 30 mm kultiviert und lagen zum Zeitpunkt der Untersuchungen semikonfluent vor. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen 2-mal mit PBS (w) gewaschen. Anschließend erfolgte die Beladung mit der Liposomen-, ApoE-Peptid-Liposomen- oder ApoE-Peptid-Lösung in Glucose/PBS für 30 Minuten bei 37 °C (Brutschrank) bzw. 4 °C (auf Eis, im Kühlschrank). Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit eiskaltem PBS 3-mal gewaschen, das Deckgläschen im Deckglas-Halter des CLSM mit 0,5 ml PBS (w) überschichtet und die mikroskopische Untersuchung der Zellen innerhalb von 10 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Fokussieren der Ebene auf die Zellmitte wurden sowohl Transmission als auch Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Die Aufnahmen wurden für die Rhodamin-markierten Proben bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm (Helium-Neon-Laser) bzw. für die Fluoreszein-markierten Proben bei 488 nm (Argon-Krypton-Laser) durchgeführt. Die optische Separierung der Fluoreszenzstrahlung erfolgte mit dichroitischen Spiegeln (Rhodamin: HFT 543, Fluoreszein: HFT 488) und mit Emissionsfiltern (Rhodamin: LP 560 nm, Fluoreszein: BP 500-530 nm) vor dem Detektor. Um sicherzustellen, dass die Zellen nach der Beladungszeit noch über eine intakte Zellmembran verfügten, wurde nach jedem Experiment eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff mit einer schwachen Fluoreszenzintensität ($\lambda_{Em} = 650 \text{ nm}$), der nicht in das Zellinnere von lebenden Zellen eindringt. Es bindet aber an Membranproteine (Durlu und Tamai 1997), wodurch seine Fluoreszenzaktivität stark erhöht wird. Damit kann sowohl die Zellmembran dargestellt werden als auch eine Unterscheidung zwischen intakten und toten Zellen erfolgen. Es wurde ein Tropfen einer 0,5 % igen Trypanblau-Lösung direkt auf die Zellen pipettiert und anschließend eine Fluoreszenzaufnahme gemacht.

3.3.9 LDL-Rezeptor-Bindung

Die LDL-Rezeptor-Bindung der ApoE-Peptide und ApoE-Peptid-Liposomen an BaG13-Zellen wurde durch mich am Gladstone Institute for Cardiovascular Disease, San Francisco, USA untersucht. Im folgenden Kapitel wird das methodische Vorgehen dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung aller Methoden befindet sich unter (Goldstein et al. 1983; Arnold et al. 1992).

Isolierung und Präparation von LPDS und ¹²⁵Iod-markierten LDL

Humanes LDL und LPDS wurde aus dem Plasma von fastenden Spendern mittels präparativer, sequentieller Ultrazentrifugation gewonnen (Havel et al. 1955). Für die Präparation von LDL wurden die Fraktionen mit der Dichte 1,019 - 1,063 kg/l und für LPDS die Fraktionen mit einer Dichte größer als 1,21 kg/l isoliert und durch umfangreiche Dialyse gereinigt (Goldstein et al. 1983). Sowohl die LDL-Suspension als auch das LPDS wurden durch einen 0,45 µm-Porenfilter filtriert. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry (siehe Kapitel 3.4.11). Während das LDL sofort zur ¹²⁵I-Markierung eingesetzt wurde, wurde das LPDS auf 40 mg Protein/ml verdünnt, bei minus 20 °C gelagert und bei Bedarf zur Herstellung von Lipoprotein-freiem Medium verwendet. Das frisch isolierte LDL wurde mit einer von Goldstein et al. modifizierten Iodmonochlorid-Methode nach MacFarlane mit ¹²⁵Iod markiert (Goldstein et al. 1983). Die erhaltene spezifische Aktivität des ¹²⁵I-LDL betrug i.d.R. zwischen 150 - 300 cpm/ng Protein.

Kultur der BaG13 Zellen

Die Kultur und Aussaat der Fibroblasten in die 12-Well-Mikrotiterplatten ist bereits im Kapitel 3.4.5 beschrieben. Für die LDL-Rezeptor-Bindungsexperimente war es besonders wichtig, dass die Zellen am Tag der Verwendung noch nicht 100 % konfluent waren, da die Expression des LDL-Rezeptors im Stadium der Konfluenz runterreguliert ist. Außerdem wurde 48 Stunden vor einem geplanten Experiment das FBS-haltige BaG13-Medium gegen LPDS-enthaltendes Medium ausgetauscht, um das LDL-Rezeptor-Expressionslevel zu erhöhen (Goldstein et al. 1983; Arnold et al. 1992).

LDL-Rezeptor-Bindungsuntersuchungen

Das Bindungsexperiment basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Verdrängung des radioaktivmarkierten LDL-Rezeptor-Liganden ^{125}I -LDL durch die zu testenden ApoE-Peptide und ApoE-Peptid-Liposomen und wurde nach dem von Goldstein et al. beschriebenen Protokoll durchgeführt (Goldstein et al. 1983).

Die Zellmonolayer in den Mikrotiterplatten wurden auf Eis vorgekühlt und einmal mit 0,5 ml/Well eiskaltem PBS (w) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 $\mu\text{g/ml}$ ^{125}I -LDL und unterschiedlichen Konzentration (i.d.R. 0 - 20 $\mu\text{g/ml}$) des zu testenden Kompetitors für 3 - 4 Stunden bei 4 °C (auf Eis, Kühlraum) in 10 % LPDS-haltigem, HEPES-gepuffertem DME-Medium unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Waschen mit je 0,5 ml eiskaltem Puffer/Well (3-mal mit BSA/PBS, 2-mal für 10 Minuten mit BSA/PBS, 2-mal mit PBS (w)) wurden die Zellen in 2-mal 0,5 ml 0,1 N NaOH für je 10 Minuten solubilisiert, die Lösung in ein Glas-Zählröhrchen überführt und der Anteil des gebundenen ^{125}I -LDL im Gamma-Zähler bestimmt. Nach dem Zählen wurden pro Röhrchen 30 μl Zellsolubilisat entnommen und eine Proteinbestimmung nach Bradford (Kapitel 3.4.11) durchgeführt. In jedem Experiment wurde die unspezifische Bindung von ^{125}I -LDL durch Inkubation der Zellen mit einem Überschuss von unmarkiertem LDL und die 100 % Bindung von ^{125}I -LDL bei einer Konzentration von 2 μg Protein/ml bestimmt. Bei der 100 % Bindung von ^{125}I -LDL wurden normalerweise ca. 5 - 10 ng Protein/mg Zellprotein gebunden. Dieser Wert diente als interne Kontrolle. Für jede Konzentration des zu testenden Kompetitors erfolgte eine Doppelbestimmung. Jedes Bindungsexperiment wurde in einem unabhängigen Versuch mindestens einmal wiederholt. Die prozentuale Bindung B [%] wurde folgendermaßen berechnet:

$$B[\%] = \frac{I - I_{0\%}}{I_{100\%} - I_{0\%}} \cdot 100$$

wobei $I_{100\%}$ die Anzahl der Counts bei 100 % Bindung ist und $I_{0\%}$ den Wert für die unspezifische Bindung angibt. Aus der graphischen Darstellung von B [%] in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des jeweiligen Kompetitors ergab sich eine exponentiell abfallende Funktion, woraus diejenige Kompetitorkonzentration bestimmt wurde, bei der 50 % des maximal gebundenen ^{125}I -LDL verdrängt waren (IC_{50} , inhibitorische Konzentration bei 50 % Verdrängung). Anhand der IC_{50} -Werte wurden die Affinitäten der ApoE-Peptide und ApoE-Peptid-Liposomen verglichen.

3.3.10 Untersuchung des Internalisierungsmechanismus

Für die Untersuchung des Internalisierungsmechanismus der Rhodamin-markierten ApoE-Peptid-PEG-Liposomen wurde ein Mikrotiterplatten-Assay etabliert, der auf der Detektion der membrangebundenen bzw. internalisierten Rhodamin-Fluoreszenz beruht. Für diese Untersuchungen wurden BaG13-Zellen verwendet. Die Kultur der Fibroblasten und ebenso die Aussaat in 12-Well-Mikrotiterplatten erfolgte wie im Kapitel 3.3.5 beschrieben. Die Hochregulation der LDL-Rezeptor-Expression erfolgte mit LDS-haltigem Medium 48 Stunden vor einem geplanten Experiment.

Für die Bindungsexperimente wurden zu den vorgekühlten und mit 0,5 ml/Well eiskaltem PBS (w) gewaschenen Zellmonolayern unterschiedliche Konzentrationen der Liposomen ($c_{\text{Lipid}} = 0 - 1 \text{ mM}$ in HEPES-gepuffertem, Serum-freiem DMEM) gegeben und für 3 - 4 Stunden bei 4 °C (auf Eis, im Kühlraum) unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Waschen mit je 0,5 ml eiskaltem Puffer/Well (3-mal mit BSA/PBS, 2-mal für 10 Minuten mit BSA/PBS, 2-mal mit PBS (w)) wurden die Zellen in 0,5 ml 0,1 N NaOH solubilisiert und anschließend die Rhodamin-Fluoreszenzintensität des Solubilisates am Mikrotiterplatten-Lesegerät bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$ und bei der Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ vermessen. Abschließend wurde mit dem Solubilisat für jedes Well eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Kapitel 3.4.11) durchgeführt.

Aufnahmeexperimente wurden mit dem oben bereits beschriebenen Verfahren durchgeführt, wobei die gewaschenen Zellmonolayer mit den Liposomen bei 37 °C für 2 Stunden im Brutschrank (10 % CO₂) und in NaHCO₃-gepuffertem Medium inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt. Nach Durchführung der oben beschriebenen Waschschritte mit eiskaltem BSA/PBS und PBS erfolgte ein weiterer Waschschritt mit Heparin/PBS für eine Stunde bei 4 °C (auf Eis, im Kühlraum), um den Membran-gebundenen Anteil der Liposomen zu entfernen (Goldstein et al. 1983). Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut 2-mal mit PBS (w) gewaschen. Nach der Solubilisation erfolgte die fluorimetrische Vermessung zur Bestimmung der zellulär aufgenommenen Rhodamin-Fluoreszenz. Abschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Alle Ergebnisse sind als relative Fluoreszenzintensitäten pro Nanogramm Zellprotein angegeben und mit der für unbehandelte Zellen bestimmten Fluoreszenzintensität korrigiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, und es erfolgte mindestens eine Wiederholung in einem unabhängigen Experiment. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den einzelnen Experimenten.

LDL-Rezeptor-spezifische Internalisierung

Um zu untersuchen, ob der LDL-Rezeptor an der Internalisierung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen beteiligt ist, wurden Bindungs- und Aufnahmeexperimente an Fibroblastenzellen mit hoch- und runterregulierter LDL-Rezeptor-Expression durchgeführt (methodische Beschreibung der Expressionsregulation siehe Kapitel 3.3.5).

In einem weiteren Experiment wurde der LDL-Rezeptor mit dem IgG-LDL-Rezeptor-fragment-Antikörper blockiert, der mit LDL um die Bindung an den LDL-Rezeptor konkurriert (Simmons et al. 1997). Die Konzentration des Antikörpers, die notwendig war um alle LDL Rezeptoren auf den Zellen zu blockieren, wurde zuvor in einem Bindungs-experiment mit ^{125}I -LDL bestimmt und lag bei 20 $\mu\text{g/ml}$. Der Antikörper wurde in dieser Konzentration zum LDS-haltigen Medium dazugegeben und mit den Zellen für 1 Stunde bei 4 °C (auf Eis, im Kühlraum) vor Durchführung eines Bindungsexperimentes inkubiert.

Energie-abhängige Internalisierung

Für die Untersuchung der Energieabhängigkeit der Internalisierung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen wurden die Zellen mit der Energiedepletions-Lösung (siehe Tabelle 3.4) für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. Diese enthält Natriumazid als Cytochrom-oxidase-Inhibitor und 2-Deoxyglucose als Glykolyse-Hemmer, welche eine Blockade aller Energie-abhängigen zellulären Prozesse einschließlich endozytotischer Aufnahmeprozesse bewirken (Schmid und Carter 1990). Die Aufnahmeexperimente erfolgten anschließend wie oben beschrieben, wobei anstelle von Medium Energiedepletions-Lösung verwendet und die Inkubationsdauer auf 30 Minuten verkürzt wurde. Für Kontrollexperimente erfolgte der Ersatz der Energiedepletions-Lösung durch Glucose/PBS-Lösung.

HSPG-vermittelte Internalisierung

Die Beteiligung des Heparansulfat-Proteoglykan-Gerüsts (HSPG) an der Internalisierung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen wurde sowohl durch enzymatische Entfernung als auch durch Zugabe von Kompetitoren wie Heparin und Poly-L-lysin (PLL) bestimmt. Heparinase I spaltet partiell die 1,4-D-glykosidische Bindung der Heparanseitenketten (Linhardt 1999) und verhindert somit die Bindung kationischer Liganden an das negativ geladene, Membran-

ständige HSPG. Heparinase I wurde in steriler 0,15 M NaCl gelöst, in Konzentrationen von 1 - 10 Einheiten/ml zum Serum-freien Medium auf die Zellen gegeben und mit den Zellen für 2 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Mit den so vorbehandelten Zellen wurden anschließend die Bindungs- und Aufnahmeexperimente durchgeführt, wobei Zellen ohne Heparinase-Behandlung als Vergleich dienten.

Des Weiteren wurden Bindungs- und Aufnahmeexperimente in Gegenwart von Heparin als strukturgleichem Kompetitor zu den Heparansulfat-Ketten des HSPG und in Gegenwart von polykationischem PLL als Kompetitor zu kationischen HSPG-Liganden (Deguchi et al. 2002) durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen von Heparin ($c_{\text{Heparin}} = 0 - 100 \mu\text{g/ml}$) bzw. PLL ($c_{\text{PLL}} = 0 - 100 \mu\text{M}$) eingesetzt.

3.3.11 Proteinbestimmungsmethoden

Proteinbestimmung nach Lowry

Der Proteingehalt von LPDS und LDL wurde nach der Methode von Lowry (Lowry et al. 1951) bestimmt. Zusätzlich zu dem beschriebenen Standardprotokoll wurde zu jeder Probe Natriumdeoxycholat (DCA) zugegeben (Endkonzentration $c_{\text{DCA}} = 4 \text{ mM}$), um den Lipid-gebundenen Proteinanteil zu solubilisieren (Protokoll nach Innerarity, 1978).

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Zellproteinmasse erfolgte nach der Solubilisierung in 0,1 N NaOH mit einem Pierce Coomassie-Reagenz nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Dazu wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte neben einer Standardreihe von 0 - 200 $\mu\text{g/ml}$ BSA (0,2 mg/ml in NaOH) pro Well jeweils 20 - 30 μl des Zellsolubisates pipettiert. Das Volumen pro Well wurde mit 0,1 N NaOH zu 50 μl ergänzt. Anschließend wurde pro Well 200 μl des Coomassie-Reagenzes gegeben, woraufhin sich der Protein-Farbstoffkomplex entwickelte. Die photometrische Auslesung erfolgte bei der Absorptionswellenlänge von 595 nm und bei der Referenzwellenlänge von 750 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät. Die Berechnung der Zellproteinmasse basierte auf dem Intensitätsvergleich mit den Werten der Standardkurve.