

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Herstellung und Charakterisierung von ApoE-Peptid-Liposomen

Hier werden die Ergebnisse zur Herstellung und Charakterisierung der ApoE-Peptid-Liposomen mit adsorptiver bzw. kovalenter Bindung der ApoE-Peptide vorgestellt. Das Ziel der Arbeiten war, stabile Konjugate herzustellen, die die Voraussetzungen für einen LDL-Rezeptor-vermittelten Aufnahmeweg in Gehirnkapillarendothelzellen erfüllen.

4.1.1 Adsorptive Bindung der ApoE-Peptide an Liposomen

Die adsorptive Verankerung der von Apolipoprotein E abgeleiteten Rezeptorbindungssequenz A2 in der Liposomenbilayer erfolgte über lipidassoziiierende Domänen, die zu diesem Zwecke an das stark kationische A2-Peptid geknüpft wurden (Kapitel 3.3.1). Für die Herstellung dieser Zweidomänen-Peptide wurden eine amphipathische Helix (Q), eine transmembranale Helix (T) oder Fettsäuren wie Palmitinsäure (P) und Myristinsäure (M) verwendet. Alle Peptide waren N-terminal acyliert und C-terminal amidiert; um die Ausbildung einer α -helikalen Konformation zu unterstützen.

Die amphipathische Helix Q wurde aus der lipidbindenden Domäne von ApoE (AS 267 - 280) entnommen (Wang et al. 1996). Transmembranale Helizes, wie die Sequenz T, durchspannen die Liposomenbilayer und ermöglichen dadurch eine feste Verankerung (Bechinger 2001; Wimley und White 2000). Zahlreiche Proteine sind auf diese Art in der Zellmembran verankert, u.a. auch der LDL-Rezeptor (Kapitel 1.4.2). Acylsäurereste sind strukturelle Determinanten für die Membranbindung und essentiell für die biologischen Funktionen zahlreicher Proteine (Janosch et al. 2004; Pool und Thompson 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl mono- als auch diacylierte A2-Peptide untersucht. Zu Vergleichszwecken wurde zusätzlich die von Datta beschriebene Sequenz AD verwendet, wobei D als amphipathische Helix die adsorptive Bindung an die Liposomen vermittelt (Datta et al. 2000). Die Herstellung der ApoE-Peptid-Liposomen erfolgte durch die spontane Assoziation während der Inkubation der Liposomen mit den Peptiden. Für die Acylketten und transmembranale Sequenz wurde eine Verankerung in der Liposomenbilayer erwartet, während bei den amphipathischen Helizes die apolare Helixoberfläche mit den Acylketten der

äußeren Lipidlayer interagiert und die kationische Oberfläche im Bereich der Lipidkopfgruppen lokalisiert war. Das A2-Peptid sollte aufgrund seiner starken positiven Ladung erwartungsgemäß nur wenig mit der elektrisch neutralen Liposomenoberfläche wechselwirken. Abbildung 4.1 zeigt eine schematische Darstellung der ApoE-Peptid-Liposomen.

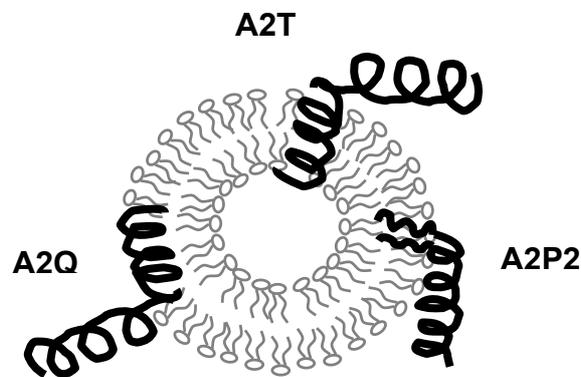


Abbildung 4.1: Schema der Verankerung der Zweidomänen-Peptide in Liposomen über eine transmembranale Helix (A2T), amphipathische Helix (A2Q) und über Acylketten (A2P2)

Nachfolgend werden die biophysikalischen Eigenschaften der Zweidomänen-Peptide und die umfangreiche Charakterisierung ihrer Wechselwirkung mit Liposomen beschrieben.

Untersuchungen zur Struktur der ApoE-Peptide

Strukturelle Voraussetzung für die Bindung von ApoE-abgeleiteten Peptiden an den LDL-Rezeptor ist die Bildung einer amphipathischen α -Helix (Dyer et al. 1995). Eine amphipathische Helix ist durch eine polare Oberfläche, gebildet durch die kationischen Aminosäurereste, und einen gegenüberliegenden hydrophoben Bereich charakterisiert. Die LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne von ApoE befindet sich in Helix 4 eines Helixbündels, in dem die hydrophoben Helixoberflächen im Inneren des Bündels lokalisiert und somit vom umgebenden hydrophilen Medium abgeschirmt sind. Bei Interaktion von ApoE mit lipophilen Grenzflächen kommt es zu einer Entfaltung des Bündels. Erst durch diese strukturelle Reorientierung wird eine Interaktion mit dem LDL-Rezeptor möglich, was zu der Erkenntnis führte, dass ApoE nur im lipidgebundenen Zustand funktionsfähig ist (Weisgraber 1994).

Inwieweit die ApoE-Peptide über eine α -helikale Konformation verfügen und damit die strukturellen Voraussetzungen für die Rezeptorbindung erfüllen, wurde mit der Circular dichroismus-Spektroskopie untersucht. Die CD-Untersuchungen der ApoE-Peptide

wurden in wässriger Pufferlösung (TRIS/NaF pH 7,4), in Anwesenheit von POPC-SUVs und in dem strukturinduzierenden Lösungsmittel Trifluorethanol (TFE) durchgeführt. TFE vermittelt eine Helixinduktion aufgrund der Verhinderung der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu den umgebenden Wassermolekülen, wodurch intramolekulare Wechselwirkungen die Strukturierung des Peptides begünstigen. TFE wird daher zur Bestimmung der Helix-Wahrscheinlichkeit verwendet. POPC-SUVs modellieren die Lipid-Eigenschaften von Lipoproteinen und wurden daher eingesetzt, um die mit der Bindung einhergehende Induktion einer α -helikalen Struktur nachzuweisen.

Abbildung 4.2 zeigt die Spektren des A2Q-Peptides. Es ist eine hauptsächlich ungeordnete Struktur des A2Q-Peptides in TRIS-Puffer zu erkennen, jedoch besitzt das Peptid ein hohes Potential zur Ausbildung einer α -helikalen Struktur, wie an dem charakteristischen Spektrum, aufgenommen in TFE, zu erkennen ist. In Gegenwart von POPC-SUVs wurde ebenfalls eine helikale Struktur induziert, was die Bindung des A2Q-Peptides an die Liposomen nachweist.

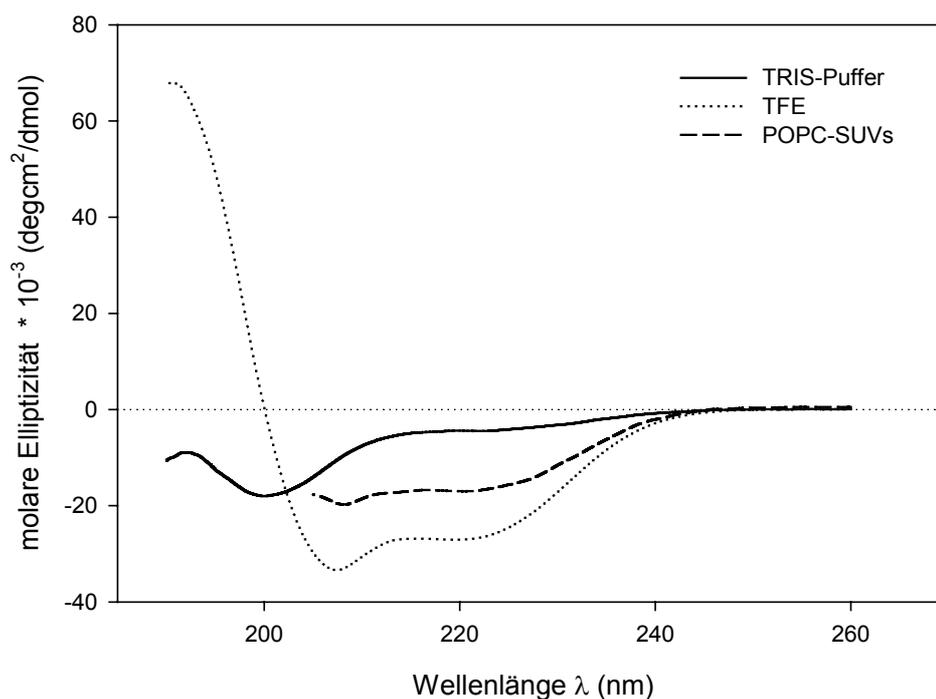


Abbildung 4.2: CD-Spektren von A2Q ($c_p = 20 \mu\text{M}$) in TRIS-Puffer, in 50 % TFE (v/v) und in Anwesenheit von POPC-SUVs ($c_L = 1 \text{ mM}$)

Zum Vergleich der helikalen Strukturanteile verschiedener Peptide bzw. eines Peptides unter verschiedenen Messbedingungen wurde die nach Chen et al. berechnete Helizität herangezogen (Chen et al. 1972). Die berechneten Helixanteile der ApoE-abgeleiteten Zweidomänen-Peptide gemessen in unterschiedlichen Medien sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Helizitäten der ApoE-Peptide nach Chen et al. (Chen et al. 1972)

ApoE-Peptide	Helizität (%) in		
	Puffer	Puffer/TFE (1/1 v/v)	POPC ($c_L/c_P = 500$)
A2	1	80	13
A2Q	7	80	48
A2T	77	100	100
A2Psp <i>A2P</i>	8	77	38 36
A2P2	16	82	36
A2Msp <i>A2M</i>	5	75	39 25
AD	54	89	63

Die CD-Untersuchungen zeigten, dass das A2-Peptid nur sehr schwach mit Liposomen interagiert. Das Peptid ist in Puffer durch das Spektrum einer ungeordneten, flexiblen Kette charakterisiert. Auch in Gegenwart von POPC-SUVs ist das Peptid wenig helikal. Jedoch bestätigte die hohe Helizität unter strukturinduzierenden Bedingungen (Puffer/TFE 1/1 v/v), dass die A2-Sequenz über ein hohes Helixpotential verfügt und somit die strukturellen Voraussetzungen für eine LDL-Rezeptor-Bindung erfüllt.

Die Anknüpfung der amphipathischen Q-Helix bzw. der Acylketten P und M an das A2-Peptid führte zu keiner Änderung der strukturellen Eigenschaften in wässriger Pufferlösung. In Gegenwart von POPC-SUVs wurde jedoch ein deutlicher Anstieg der Helizität beobachtet. Da Acylketten keinen Beitrag zum CD-Signal liefern, ist an der für A2P erreichten Helizität von 36 % erkennbar, dass dieses Peptid eine deutlich höhere Lipidaffinität besitzt als A2.

Bei A2T und AD beruhen die bestimmten Helizitäten auf Beiträgen der amphipathischen und transmembranalen Sequenzen. Der hohe Helixanteil der Peptide in Puffer ist auf die Ausbildung von Assoziaten zurückzuführen, bei der die hydrophoben Sequenzbereiche vom umgebenden hydrophilen Milieu abgeschirmt werden. In Gegenwart von POPC-SUVs kam es auch hier zu einer Erhöhung der Helizitäten, was mit einer Bindung der Peptide an die Liposomen interpretiert wird. Dies konnte durch weitere Experimente bestätigt werden.

Auch für das A2P2-Peptid wurde die Existenz von Assoziaten im wässrigen Milieu beobachtet, was mittels analytischer Ultrazentrifugation und Dynamischer Lichtstreuung bestätigt werden konnte. A2P2 bildete aufgrund seiner lipidartigen Struktur (2 Acylketten, hydrophile Peptidsequenz) mizellartige Assoziate, deren Größe ca. 60 - 70 kDa beträgt und die aus 18 - 19 Monomeren zusammengesetzt sind. Die in Gegenwart von POPC-SUVs erhöhte die Helizität verdeutlicht die Bindung des Peptides an POPC-SUVs. Die erreichte Helizität von 36 % entsprach der Strukturierung der sequenzgleichen, monoacylierten Peptide und gibt den Helixanteil der lipidgebundenen A2-Sequenz wieder.

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass die ApoE-Peptide über ihre lipid-assoziiierenden Sequenzbereiche an POPC-SUVs binden und die Bindung mit der Ausbildung einer α -helikalen Konformation der A2-Sequenz verbunden ist. Damit erfüllen die ApoE-Peptide die strukturellen Voraussetzungen für eine Bindung an den LDL-Rezeptor.

Untersuchung der membranstörenden Effekte

Voraussetzung für die weitere Anwendung der ApoE-Peptid-Liposomen war eine ausreichende Stabilität der Komplexe. Oberflächenaktive, amphipathische Peptide können bei ausreichend hohen Konzentrationen Lipidmembranen permeabilisieren und zerstören. Die durch ApoE-Peptide induzierte Liposomenpermeabilisation wurde daher mit einem Farbstofffreisetzungsversuch an Calcein-beladenen POPC-Liposomen untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind als EC_{50} -Werte in Tabelle 4.2 dargestellt und verdeutlichen die notwendige Konzentration des jeweiligen ApoE-Peptides für eine 50 % ige Freisetzung des Calceins aus POPC-LUVs.

Tabelle 4.2: Permeabilisierung von POPC-LUVs durch ApoE-Peptide ($c_L = 25 \mu\text{M}$)

ApoE-Peptide	EC_{50} (μM)	c_L/c_P
A2	0,03	800
A2Q	0,02	1250
A2T	0,04	625
A2Psp A2P	0,02 0,04	1250 625
A2P2	0,04	625
A2Msp A2M	0,01 0,02	2500 1250
AD	0,01	2500

Die EC_{50} -Werte sind vergleichsweise niedrig und sprechen für eine hohe membranstörende Aktivität der Peptide. Im Vergleich zu A2 wurde für die lipidassoziiierenden Domänen Q, T, M und P kein zusätzlicher destabilisierender Effekt beobachtet. Das heisst, dass die Rezeptorbindungsdomäne die lytische Aktivität der Zweidomänen-Peptide dominiert. Insgesamt war die Aktivität der Peptide vergleichbar mit der bereits von Datta et al. beschriebenen AD-Sequenz (Datta et al. 2000). Die EC_{50} -Werte geben die Konzentration an, bei der ein messbarer membranstörender Effekt auftritt. Das bedeutet nicht zwangsläufig, dass die Integrität der Liposomen dabei verloren geht, vielmehr kann es sich auch um eine vorübergehende Permeabilisierung handeln, wobei es unter Umstrukturierung der Liposomen (Fusion, Lyse und Neuformierung) teilweise zum Ausfluss des eingeschlossenen Calceins

kommt. Dennoch können die EC_{50} Werte als Stabilitätskriterium für die ApoE-Peptid-Liposomen herangezogen werden. Aus dem Verhältnis der eingesetzten Lipidkonzentration und den jeweiligen EC_{50} -Werten wurde das Lipid : Peptid-Verhältnis ermittelt (c_L/c_P), welches für die Herstellung von ApoE-Peptid-Liposomen nicht deutlich unterschritten werden sollte, um die Stabilität der Komplexe zu gewährleisten.

Untersuchungen zur Integrität der ApoE-Peptid-Liposomen

Mittels der Dynamischen Lichtstreuung konnte ebenfalls die Integrität der ApoE-Peptid-Liposomen untersucht werden. Bei Interaktion mit den Zweidomänen-Peptiden kam es in Abhängigkeit der Peptidkonzentration bedingt durch die Peptidinkorporierung zu Veränderungen der Größe von POPC-SUVs. Keine Änderung der Größenverteilung wurde bei einem Lipid : Peptid-Verhältnis von > 500 und nach Inkubation für 1 Stunde beobachtet.

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Da ein Großteil der Zweidomänen-Peptide die aromatische Aminosäure Tryptophan (W) enthielten, waren fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Charakterisierung der Wechselwirkungen mit Lipidbilayern möglich. Der Nachweis der Bindung der ApoE-Peptide an POPC-SUVs erfolgte durch die Beobachtung einer Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums des Tryptophans (λ_{max} : 355 nm \rightarrow 330 - 340 nm). Zumeist wird bei Bindung an Liposomen auch eine Zunahme der Fluoreszenzintensitäten beobachtet. Tabelle 4.3 zeigt die Position der Fluoreszenzmaxima und die erreichten Intensitäten der Zweidomänen-Peptide in wässriger Pufferlösung (TRIS/NaCl pH 7,4) und in Gegenwart von POPC-SUVs.

Tabelle 4.3: Darstellung der Fluoreszenzmaxima (λ_{max}) und Intensitäten (F) der ApoE-Peptide in Puffer und in Anwesenheit von POPC-SUVs ($c_L = 2$ mM, $c_P = 2$ μ M, $c_L/c_P = 1000$)

Medium ApoE-Peptide	Puffer		POPC-SUVs	
	λ_{max} (nm)	F (a.u.)	λ_{max} (nm)	F (a.u.)
A2Q	354	64	333	56
A2T	333	110	331	127
A2Psp	350	61	342	110
A2P2	344	32	342	111
A2Msp	353	59	341	102
AD	350	82	336	108

Die Peptide A2Q, AD sowie A2Msp und A2Psp zeigten ein charakteristisches Fluoreszenzmaximum für ein Tryptophan in polarer Umgebung. In Gegenwart von POPC-SUVs konnte als Folge der Bindung eine Blauverschiebung der Maxima zu kürzeren Wellenlängen und, mit Ausnahme von A2Q, auch eine deutliche Intensitätserhöhung beobachtet werden. Diese Untersuchungen bestätigten damit die bereits mit der CD-Spektroskopie erzielten Ergebnisse zur Bindung der ApoE-Peptide an Liposomen. Die Ergebnisse korrelieren mit Befunden zur Bindung anderer amphipathischer Helizes wie Magainin (Wieprecht et al. 1999), und N-terminal acylierter Peptide (Joseph und Nagaraj 1995) an neutrale Liposomen. Da im Falle von A2T und A2P2 eine hohe Eigenassoziation vorlag, bei der das Tryptophan von der wässrigen Umgebung abgeschirmt war und Fluoreszenzeigenschaften für eine apolare Umgebung zeigte, war der Nachweis der Bindung an Liposomen damit nicht möglich.

Deshalb wurde ein Fluoreszenzlöschungs-Assay unter Verwendung des Fluoreszenzquenchenden Lipidderivates DiBr-PSPC als eine weitere Methode zum Nachweis der Bindung der ApoE-Peptide an POPC-SUVs etabliert. Die Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz kann nur erfolgen, wenn sich das Peptid in der Nähe des DiBr-Lipides befindet, also in die Bilayer inkorporiert ist. Abbildung 4.3 zeigt, dass alle untersuchten Peptide eine vergleichbare Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Konzentration an DiBr-PSPC in POPC-SUVs aufweisen und damit in die Liposomenbilayer inkorporiert sind.

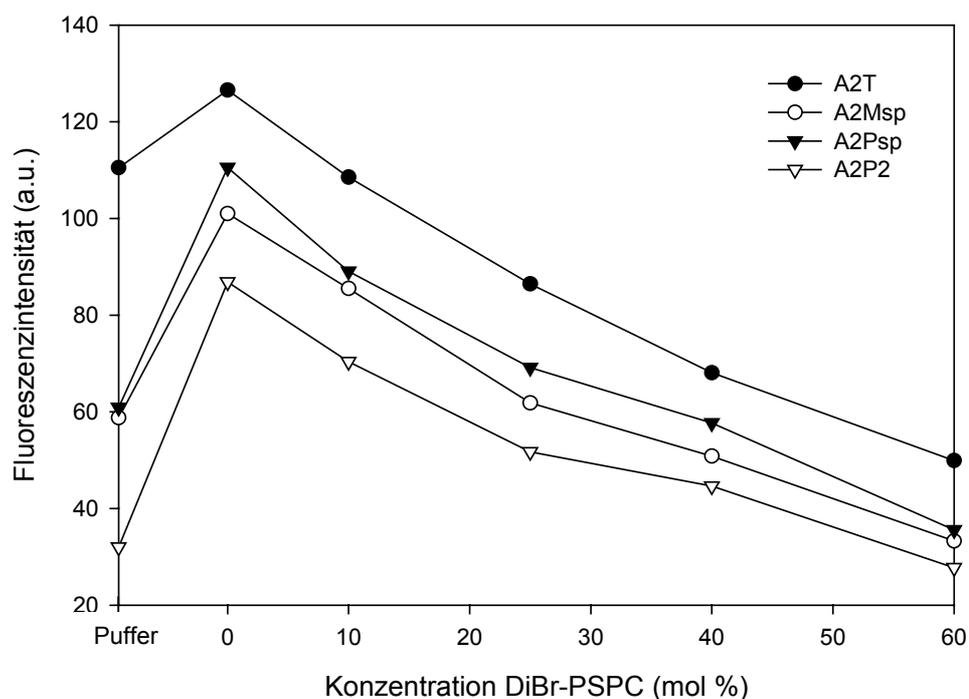


Abbildung 4.3: DiBr-PSPC-induzierte Löschung der W-Fluoreszenz von SUV-gebundenen ApoE-Peptiden ($c_p = 2 \mu\text{M}$, $c_L = 2 \text{mM}$, $\lambda_{\text{max}} \rightarrow \text{Tab.4.3}$)

Neben der erfolgreichen Bindung der ApoE-Peptide an Liposomen war insbesondere auch deren Positionierung in der Lipidbilayer von Interesse, da zu erwarten war, dass diese die Interaktion mit dem LDL-Rezeptor beeinflussen wird. Mit der Parallax-Methode erfolgte die Bestimmung der genauen Position des A2P2- und A2T-Peptides in der Bilayer von POPC-SUVs. Da sich Tryptophan bevorzugt in der Grenzschicht der hydrophilen Kopfgruppe und lipophilen Acylketten in einer Lipidlayer anlagert, wurde die höchste Quenchungseffizienz bei Einsatz von Lipidderivaten mit dem Radikal an der Kopfgruppe (TEMPO-DOPC) und in Position 5 an der Acylkette (Doxyl-5-PSPC) erreicht.

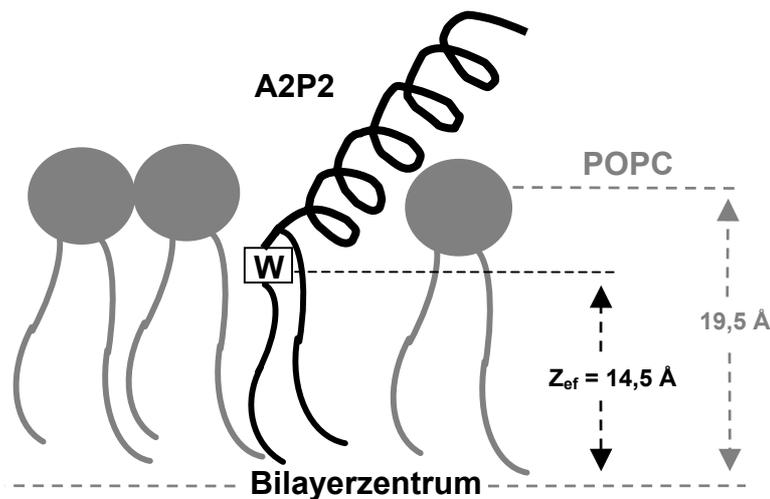


Abbildung 4.4: Positionierung des A2P2-Peptides in der Bilayer. Z_{ef} ist der Abstand des Tryptophans (W) von A2P2 zum Bilayerzentrum.

Der Abstand des Tryptophans des A2P2- und A2T-Peptides vom Bilayerzentrum betrug 14-14,5 Å (Abbildung 4.4) und entspricht damit den aus der Literatur bekannten Daten zur Lokalisation von Tryptophan in Lipidmembranen (Kachel et al. 1995). Diese Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass die LDL Rezeptor-Bindungssequenz A2 der ApoE-Peptide an der Oberfläche der Liposomen exponiert ist und somit für die Rezeptorbindung zur Verfügung stehen sollte, während die Acylketten bzw. die transmembranale Sequenz die Zweidomänen-Peptide in der Liposomenbilayer verankern.

Um Aussagen über die Stabilität der Verankerung zu gewinnen, wurde eine fluoreszenzspektroskopische Methode zur Erfassung der Umverteilung der Peptide bei Änderung des Lipid : Peptid-Verhältnisses angewendet. Dazu wurden zum Zeitpunkt 0 einer ApoE-Peptid-haltigen POPC/DiBrPSPC-Liposomendispersion unmarkierte POPC-SUVs im Überschuss zugegeben und anschließend die Tryptophan-Fluoreszenz im Maximum bestimmt. Eine Zunahme der Fluoreszenzintensität lässt auf eine Umverteilung des Peptides von fluoreszenzlöschenden DiBrPSPC-haltigen Vesikeln auf unmarkierte POPC-SUVs schließen.

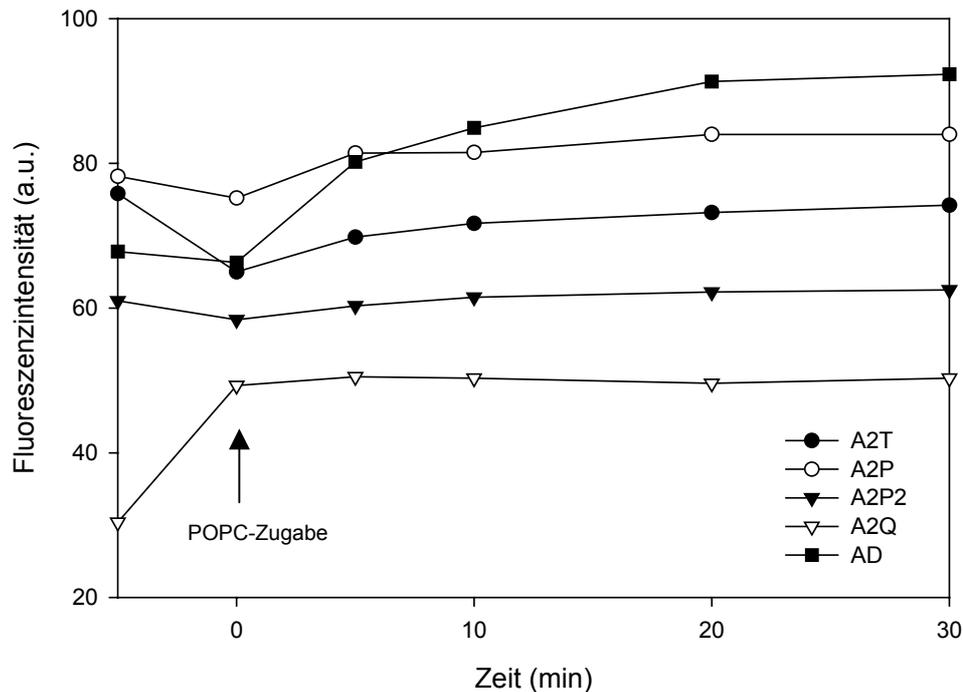


Abbildung 4.5: Zeitabhängigkeit der Tryptophan-Fluoreszenz von ApoE-Peptiden in Gegenwart von POPC/DiBrPSPC SUVs (60/40 %mol/mol) u. nach Zugabe von POPC-SUVs zum Zeitpunkt Null ($c_l/c_p = 2000$)

Aus Abbildung 4.5 geht hervor, dass es bei Zugabe von POPC-SUVs zu A2Q-Peptid-Liposomen zu einem sofortigen Anstieg der Fluoreszenzintensität kam, was darauf hindeutet, dass durch die amphipathische Helix Q des Peptides keine stabile liposomale Verankerung erreicht wird. Vergleichbare Ergebnisse wurden für das amphipathische, antibakterielle Peptid Magainin (M2a) gefunden (Wieprecht et al. 1996). Eine starke Umverteilung wurde auch für AD gefunden, allerdings über einen wesentlich längeren Zeitraum. A2P und A2T waren deutlich stabiler in der Membran verankert als die amphipathischen lipidbindenden Sequenzen. Bei dem diacylierten A2P2 kam es innerhalb von 30 Minuten zu keiner wesentlichen Umverteilung. Diese Versuche wurden bis auf 80 Minuten ausgedehnt, ohne dass eine deutliche Änderung der Fluoreszenzintensität zu bemerken war. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass dieses Peptid fest in der Liposomenbilayer verankert war.

Abschließend lässt sich zu den durchgeführten fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen bemerken, dass alle Zweidomänen-Peptide an POPC-SUVs binden und die von ApoE-abgeleitete LDL-Rezeptor-Bindungssequenz A2 auf der Liposomenoberfläche lokalisiert und für eine Interaktion mit dem Rezeptor verfügbar ist. Es gibt jedoch deutliche Unterschiede in der Stabilität der Komplexe. Für das dipalmylierte A2P2-Peptid wurden optimale Eigenschaften zur Herstellung von ApoE-Peptid-Liposomen beobachtet.

Bestimmung der Lipidaffinität der ApoE-Peptide

Die Bindung der ApoE-Peptide an liposomale Oberflächen wurde bereits qualitativ mittels CD-Spektroskopie und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen nachgewiesen. Die Bestimmung der quantitativen Bindungsparameter der ApoE-Peptide an POPC-Liposomen erfolgte mit der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC). Auf der Grundlage der Bindungskonstanten konnten dann die molaren Verhältnisse für eine vollständige Bindung der Zweidomänen-Peptide an POPC-Liposomen festgelegt werden, was für die Herstellung von stabilen ApoE-Peptid-Liposomen Voraussetzung war.

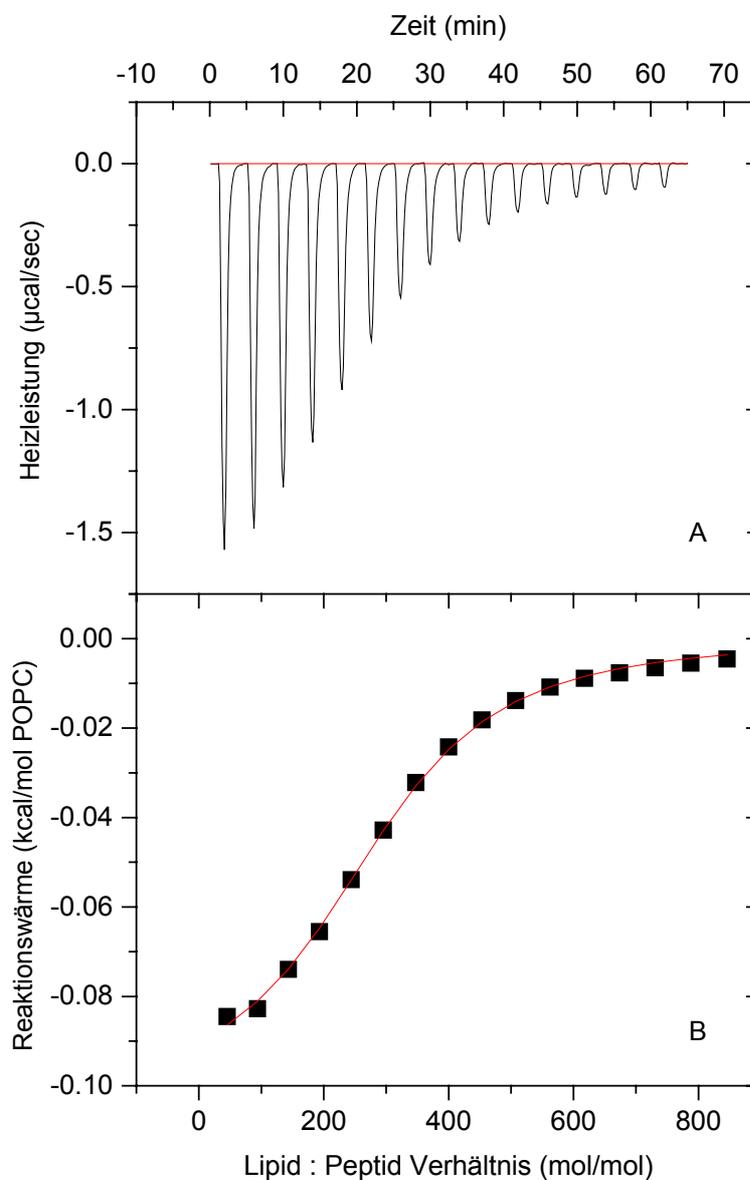


Abbildung 4.6: Titration von POPC-SUVs ($c_L = 50 \text{ mM}$) in A2Q ($c_P = 0,02 \text{ mM}$), A: Heizleistung zur Kompensation der auftretenden Wärmetönungen, B: Bindungsisotherme

Abbildung 4.6 A zeigt die Wärmetönungen aufeinanderfolgender Injektionen von POPC-SUV-Aliquoten ($c_L = 50$ mM) in die A2Q-Peptidlösung ($c_P = 0,2$ mM). In 4.6 B ist die daraus generierte Bindungsisotherme, die Darstellung der molaren Reaktionswärme als Funktion des Lipid : Peptid-Verhältnisses dargestellt. Die daraus für das A2Q-Peptid abgeleitete hydrophobe Bindungskonstante betrug 15 000 1/M. Für die untersuchten ApoE-abgeleiteten Zweidomänen-Peptide ergaben sich die in Tabelle 4.4 dargestellten hydrophoben Bindungskonstanten.

Tabelle 4.4: hydrophobe Bindungskonstanten von ApoE-abgeleiteten Zweidomänen-Peptiden

ApoE-Peptide	A2Q	A2P	A2P2	A2M	AD
Bindungskonstante K_P (1/M)	15 000	30 000	> 1 000 000	30 000	10 000

Die gefundene Abstufung der Lipidaffinitäten der ApoE-abgeleiteten Zweidomänen-Peptide

$$AD < A2Q < A2M = A2P \ll A2P2$$

bestätigte die Ergebnisse vorausgegangener spektroskopischer Untersuchungen. Für das A2-Peptid konnte aufgrund der geringen Affinität zu lipophilen Oberflächen keine Bindungskonstante an POPC-SUVs bestimmt werden. Mit der CD-Spektroskopie wurde zuvor bereits gefunden, dass A2 nicht mit Liposomen interagiert. Aufgrund der Selbstassoziation von A2T konnte für dieses Peptid mit der ITC keine Bindungskonstante bestimmt werden. Die Affinität des Mizellbildners A2P2 gegenüber POPC-SUVs war sehr hoch. Das Peptid verhält sich aufgrund seines amphiphilen Charakters mit zwei stark hydrophoben Acylketten und der kationischen A2-Sequenz wie ein Lipid, was die enorm hohe Lipidaffinität im Vergleich zu den monoacylierten Peptiden erklärt. Die Bedeutung einer zweiten Acylierung für eine hochaffine Bindung und stabile Verankerung von Peptiden in der Lipidbilayer wurde bereits beschrieben (Schroeder et al. 1997). Für A2P2 konnte zudem mit ITC-Messungen bestätigt werden, dass ab einem 100-fachen Überschuss von POPC alles Peptid liposomal gebunden war, keine Mizellen vorlagen und die Integrität der Liposomen gewahrt war. Die ApoE-Peptide mit amphipathischen Helizes A2Q und AD zeigten vergleichsweise geringe Lipidaffinitäten, wie auch für das amphipathische Magainin beschrieben ist (Wieprecht et al. 1999). Für eine adsorptive Bindung der Vektorpeptide an Liposomen scheint also das A2P2-Peptid die besten Voraussetzungen zu haben, da es über eine sehr hohe Affinität zu POPC-SUVs verfügt und stabile liposomale Komplexe bildet.

Zusammenfassende Charakteristik der ApoE-Peptid-Liposomen

Im folgenden Abschnitt werden die wesentlichen Eigenschaften der ApoE-Peptide und ApoE-Peptid-Liposomen zusammengefasst. Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über die wichtigsten Kriterien für eine stabile adsorptive Bindung der Peptide an Liposomen.

Tabelle 4.5: Charakteristik der ApoE-Peptide in Wechselwirkung mit POPC-SUVs

ApoE-Peptide	Helizität (%)	K _P (1/M)	Verankerung	EC ₅₀ (μM)
Rezeptorbindungsregion (141-150)₂				
A2	13	n.d.	n.d.	0.03
Zweidomänen-Peptide für adsorptive Bindung an Liposomen				
A2Q	48	15 000	gering	0,02
A2T	100	n.d.	mäßig	0,04
A2Psp A2P	38 36	30 000	mäßig	0,02 0,04
A2P2	36	> 1 000 000	stark	0,04
A2Msp A2M	39 25	30 000	n.d.	0,01 0,02
AD	63	10 000	gering	0,01

(n.d. = nicht bestimmt)

Das Ziel war es, stabile Komplexe aus Zweidomänen-Peptiden und Liposomen mit einer helikalen Konformation der Rezeptorbindungssequenz zu generieren. Die Hauptkriterien waren eine hohe Lipidaffinität des Peptides, die zu einer stabilen Verankerung in der Liposomenmembran führt, eine geringe membranstörende Aktivität und eine bei liposomaler Bindung induzierte Helizität der Peptide. Diese Anforderungen wurden durch das A2P2-Peptid am besten erfüllt: es wies eine hohe Lipidaffinität auf, eine nur geringe Tendenz zur Umverteilung und einen moderaten membranstörenden Effekt. Vergleichbare Eigenschaften wies das A2T-Peptid auf. Beide Peptide zeigten zudem ein hohes Helixpotential und die Induktion einer α -helikalen Struktur bei Bindung an Liposomen.

Die biophysikalischen Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass Komplexe von POPC-SUVs mit dem diacylierten A2P2-Peptid bzw. mit dem transmembranalen A2T-Peptid die Stabilitätskriterien und strukturellen Voraussetzungen für die Untersuchungen der LDL-Rezeptor-vermittelten Aufnahme an Gehirnkapillarendothelzellen erfüllen könnten. Für die weiteren Experimente wurden ApoE-Peptid-Liposomen mit einem Lipid : Peptid-Verhältnis von > 500 (mol/mol) eingesetzt. Bei diesem Verhältnis war zum einen eine ausreichende Lipidbindung des Peptides als auch eine genügende Stabilität der Liposomen gewährleistet.

4.1.2 Kovalente Bindung der ApoE-Peptide an sterisch stabilisierte Liposomen

Für die kovalente Peptidkopplung wurden sterisch stabilisierte Liposomen verwendet, wobei die Kopplung zwischen der terminalen Maleimid-Funktion des Mal-PEG-DPPE-Derivates und dem thiolreaktiven Peptid unter Ausbildung eines Thioethers erfolgte. Die Anwendung thiolreaktiver Kopplungsmethoden wurde schon erfolgreich für die Herstellung von liposomalen Konjugaten eingesetzt (Huwyler et al. 1996; Frisch et al. 1996). Abbildung 4.7 zeigt eine schematische Darstellung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen.

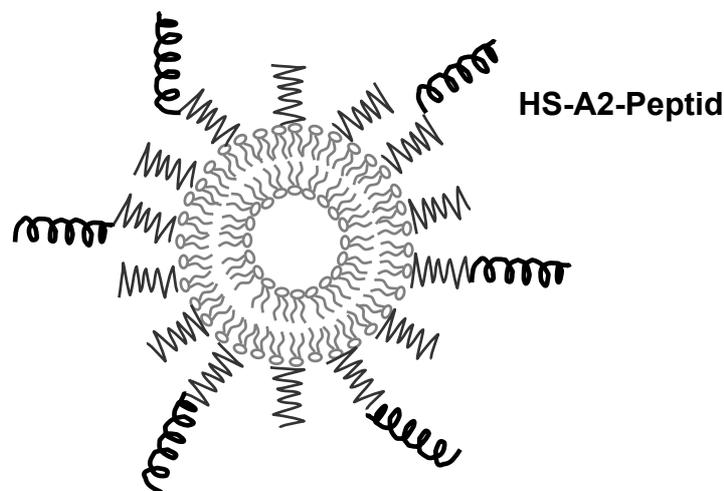


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen

Charakteristik der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen

Für die Herstellung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen wurden SSL-Liposomen mit einer Größe von (75 ± 10) nm verwendet (siehe Kapitel 3.3.2). Die Größe der Liposomen und die Partikelgrößenverteilung änderte sich nicht bzw. nur geringfügig nach erfolgter Kopplung des ApoE-Peptides, wie mittels DLS-Untersuchungen gezeigt werden konnte.

Durch die Kopplung an das terminale Ende der PEG-Ketten erfolgte eine räumliche Trennung des Peptides von der Liposomenoberfläche in einem Abstand von ca. 4 - 5 nm (Woodle et al. 1994). Dadurch wurden eine Interaktion des Peptides mit der Liposomenbilayer und daraus resultierende membranstörende Effekte (siehe Kapitel 4.1.1), die eine Veränderung der Liposomengröße induzieren könnten, vermieden. Andererseits war damit auch die Induktion einer α -helikalen Peptidkonformation verringert gegenüber den ApoE-Peptid-Liposomen mit adsorptiv gebundenen Zweidomänen-Peptiden.

Stabilitätsuntersuchungen mittels DLS bestätigten, dass die Liposomen ihre Integrität ausreichend lange bewahrten, was die Anwendung einer Präparation für einen Zeitraum von bis zu 2 Wochen ermöglichte.

Quantifizierung des gebundenen ApoE-Peptides

Nach der Abtrennung des ungebundenen Peptidanteiles von den liposomalen Konjugaten mittels Größenausschlusschromatographie konnte der Nachweis der erfolgreichen Kopplung und die Quantifizierung der gebundenen Peptidmenge erfolgen.

Der qualitative Nachweis der HS-A2-Kopplung an Mal-PEG-PE ergab sich aus der mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie erhaltenen Massenverteilung um 5800 g/mol (Mal-PEG-PE: 2819,4 g/mol, HS-A2: 3014,6 g/mol) mit der für PEG-Ketten charakteristischen Differenz von 44 Masseneinheiten.

Mittels Tryptophan-Fluoreszenz konnte die Besetzungsdichte der Liposomen mit dem gebundenen ApoE-Peptid bestimmt werden. Es wurde eine Kopplungseffizienz von ca. 50 % erreicht, was zu einem Lipid : Peptid-Verhältnis von 400 führte. Das bedeutet, dass etwa die Hälfte der eingesetzten Peptidmenge kovalent gebunden wurde. Unter der Annahme, dass Liposomen mit einem Durchmesser von 75 nm ca. 50 000 Lipidmoleküle enthalten und sich die Hälfte davon auf der äußeren Schicht der Bilayer verteilt, ergab sich bei einem Mal-PEG-PE-Gehalt von 2,5 mol % am Gesamtlipid, dass ca. 100 HS-A2-Moleküle auf der Liposomenoberfläche lokalisiert waren. Da jedoch eine, wenn auch geringe, Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums von Tryptophan von $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm (HS-A2 in wässriger Umgebung) zu $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm für das gekoppelte Peptid beobachtet wurde, lässt diese Beobachtung jedoch nur eine annähernde Abschätzung der liposomal gebundenen Peptidmenge zu. Die beobachtete Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums bei Bindung ist wahrscheinlich auf eine Konformationsänderung des Peptides zurückzuführen, bei der das Tryptophan nur noch über eine limitierte Flexibilität verfügt und somit veränderte Fluoreszenzeigenschaften zeigt.

Über die kovalente, thiolreaktive Kopplung konnten also ausreichend stabile ApoE-Peptid-PEG-Liposomen hergestellt werden, die für die weiteren Untersuchungen an Gehirnkapillarendothelzellen und zur Untersuchung des Aufnahmemechanismus eingesetzt wurden.

4.1.3 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse

Es wurde gezeigt, dass sowohl mit adsorptiver als auch mit kovalenter Kopplung der ApoE-Peptide stabile liposomale Konjugate hergestellt werden können. Damit standen zwei unterschiedliche, umfangreich charakterisierte Systeme von ApoE-Peptid-Liposomen für weitere Untersuchungen zur Internalisierung an Gehirnkapillarendothelzellen zur Verfügung. Wie aus der Literatur hervorgeht, wurden bisher hauptsächlich kovalente Kopplungsstrategien zur Funktionalisierung von Liposomen verwendet (siehe Kapitel 1.3.4). Mit der erfolgreichen Umsetzung des Konzeptes der adsorptiven Peptidbindung über lipidbindende Sequenzbereiche wurde eine einfache Methode zur Funktionalisierung von Liposomen etabliert.

Der Vorteil der adsorptiven Kopplung liegt in der einfachen Herstellungsweise, die keine chemische Modifikation der Reaktionspartner erfordert. Nachteilig ist jedoch die limitierte Stabilität dieser Komplexe und die bestehende Gefahr der Desorption des Vektors. Von Baillie et al. wurden bereits Komplexe aus Lipid-Mikroemulsionen und ApoB-abgeleiteten Peptiden hergestellt, die in Zellproliferationsstudien LDL-modellierende Eigenschaften besitzen (Baillie et al. 2002), womit das Konzept der Verwendung von Zweidomänen-Peptiden zur Lipidkopplung und zur Erzielung spezifischer Funktionen bestätigt wurde.

Für die kovalente Kopplung wurde eine bewährte Strategie verwendet, die auf die speziellen Anforderungen des ApoE-Peptid-Systems erfolgreich übertragen werden konnte. Die Thiol-Maleimido-Kopplungschemie ist bereits mehrfach für die Funktionalisierung von Liposomen eingesetzt worden (Huwyler et al. 1996; Janssen et al. 2003; Frisch et al. 1996) und war besonders in diesem Fall unkompliziert, da bereits während der Peptidsynthese ein Mercaptopropionsäurederivat (MPS) an die Peptidkette gekoppelt wurde und keine weitere Sekundärmodifikation des Vektors nötig war. Der Vorteil der kovalenten Bindung ist, dass Konjugate mit unterschiedlichen Peptidgehalten hergestellt werden können und die Gefahr der Desorption des Vektorpeptides oder der Destabilisierung der Liposomen nicht besteht.

Die Funktion der ApoE-Peptid-Liposomen hinsichtlich LDL-Rezeptor-Bindung und Internalisierung war Gegenstand der in den folgenden Kapiteln dargestellten Untersuchungen.

4.2 Untersuchungen an Gehirnkapillarendothelzellen

4.2.1 LDL-Rezeptor-Expression

Die Expression und Funktion des LDL-Rezeptors an verschiedenen Gehirnkapillarendothelzellen wurde über die Bindung, Aufnahme und Degradation von ^{125}I -markiertem LDL nach der Methode von Goldstein (Goldstein et al. 1983) in Kooperation mit Herrn Dr. Scharnagl, Universitätsklinik Freiburg, bestimmt. Es wurden primäre sowie immortalisierte Ratten-Gehirnkapillarendothelzellen (RBMEC, RBE4) als auch immortalisierte Maus-Gehirnkapillarendothelzellen (b.End3) untersucht. Zum Vergleich wurden diese Experimente auch an primären humanen Fibroblasten, die als Modellzellen für LDL-Rezeptor-Untersuchungen verwendet werden (Goldstein et al. 1983), als auch an LDL-Rezeptor-defizienten FH-Fibroblasten durchgeführt (FH - familiäre Hypercholesterolämie) (Goldstein und Brown 1979).

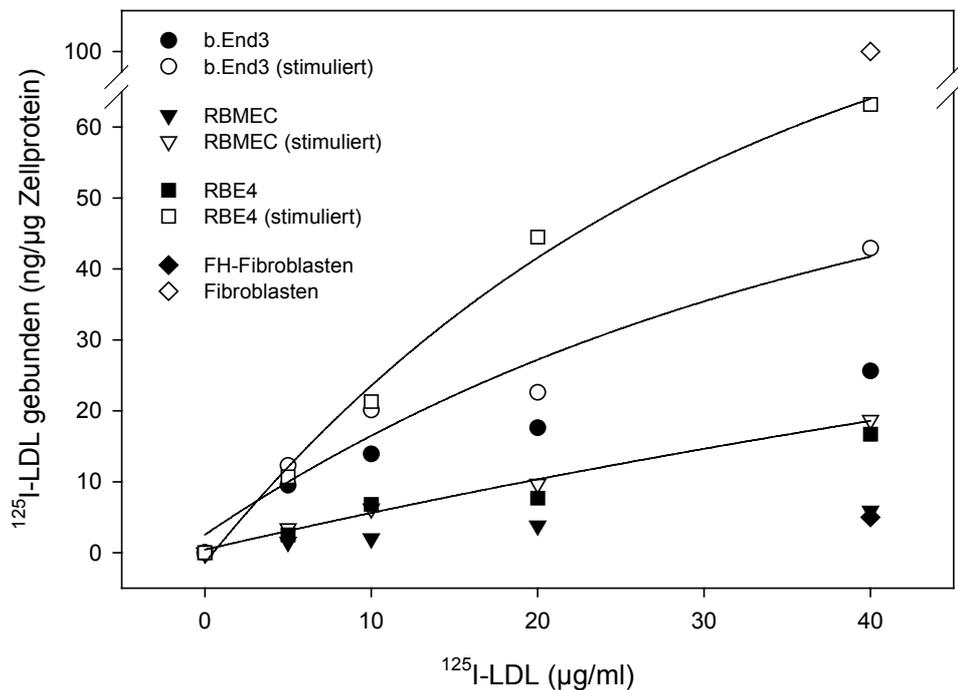


Abbildung 4.8: Bindung von ^{125}I -markiertem LDL an Gehirnkapillarendothelzellen bei stimulierter und normaler LDL-Rezeptor-Expression

Aus Abbildung 4.8 geht hervor, dass die LDL-Rezeptor-Expression bei allen Zellen durch die Verwendung von Lipoprotein-freiem Serum stimulierbar war. Durch Aufnahme- und Degradationsexperimente konnte weiterhin bestätigt werden, dass der LDL-Rezeptor in allen

Zellen funktionell exprimiert wurde. Für das Ausmaß der LDL-Rezeptor-Expression wurde folgende Abstufung gefunden: Fibroblasten > RBE4 > b.End3 > RBMEC > FH-Fibroblasten. Bei RBE4-Zellen entsprach die Expression damit in etwa der von Fibroblasten, wohingegen die LDL-Rezeptor-Besetzungsdichte auf b.End3 und RBMEC Zellen deutlich geringer war. Für RBE4- und b.End3-Zellen konnte im Rahmen dieser Untersuchungen bestätigt werden, dass die LDL-Rezeptor-Expression auf Gehirnkapillarendothelzellen deutlich höher ist verglichen mit Endothelzellen großer Gefäße (Aortenendothelzellen) (Dehouck et al. 1994). Da von Dehouck et al. bereits beschrieben wurde, dass die LDL-Rezeptor-Expression primärer Gehirnkapillarendothelzellen durch einen unbekanntem, von Astrozyten sezernierten, löslichen Faktor hochregulierbar ist, wird die hier gefundene, vergleichsweise geringe Expression auf RBMEC-Zellen verständlich. Inwiefern durch eine Co-Kultur der RBMEC-Zellen mit Astrozyten die Expression gesteigert werden kann, wird derzeit in Kooperation mit Frau I.Dunay und Herrn Dr. Scharnagl untersucht.

Mit Abschluss dieser Untersuchungen standen eine Reihe von verschiedenen Gehirnkapillarendothelzellen mit charakterisiertem LDL-Rezeptor-Expressionsstatus zur Verfügung.

4.2.2 Toxizität der ApoE-Peptid-Liposomen

Voraussetzung für die Internalisierungsuntersuchungen waren Kenntnisse über die zytotoxischen Effekte der ApoE-Peptide und ApoE-Peptid-Liposomen. Da oberflächenaktive, amphipathische Peptide aufgrund ihres Vermögens, an Lipidmembranen zu binden, grundsätzlich auch membranstörende Aktivität aufweisen und die Peptide zudem stark kationisch geladen sind, waren zytotoxische Effekte der ApoE-Peptide sehr wahrscheinlich. Deshalb wurden MTT-Tests an den verschiedenen Gehirnkapillarendothelzellen mit ApoE-Peptiden als auch mit ApoE-Peptid-Liposomen durchgeführt. Grundsätzlich bestanden zwischen den verschiedenen Zelllinien nur geringe Unterschiede im toxischen Effekt.

ApoE-Peptide

Abbildung 4.9 zeigt die Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchungen für die ApoE-Peptide an RBE4-Zellen. Die ApoE-Peptide wirkten im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich toxisch, wobei die EC₅₀-Werte (effektive Konzentration bei 50 % Zellvitalität, d.h. Überleben der Zellen) aller Peptide im Bereich von 5 - 20 µM lagen. Die lipidassoziiierenden Domänen

Q, T, P und der Fluoreszenzmarker Fluos hatten keinen nennenswerten Einfluß auf die Toxizität des A2-Peptides, was darauf hindeutet, dass der Hauptanteil des zytotoxischen Effektes durch die kationische Rezeptorbindungsdomäne von ApoE (A2) verursacht wird. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Zelllinie b.End3 erhalten, was darauf hindeutet, dass der toxische Effekt der ApoE-Peptide zellunspecific ist.

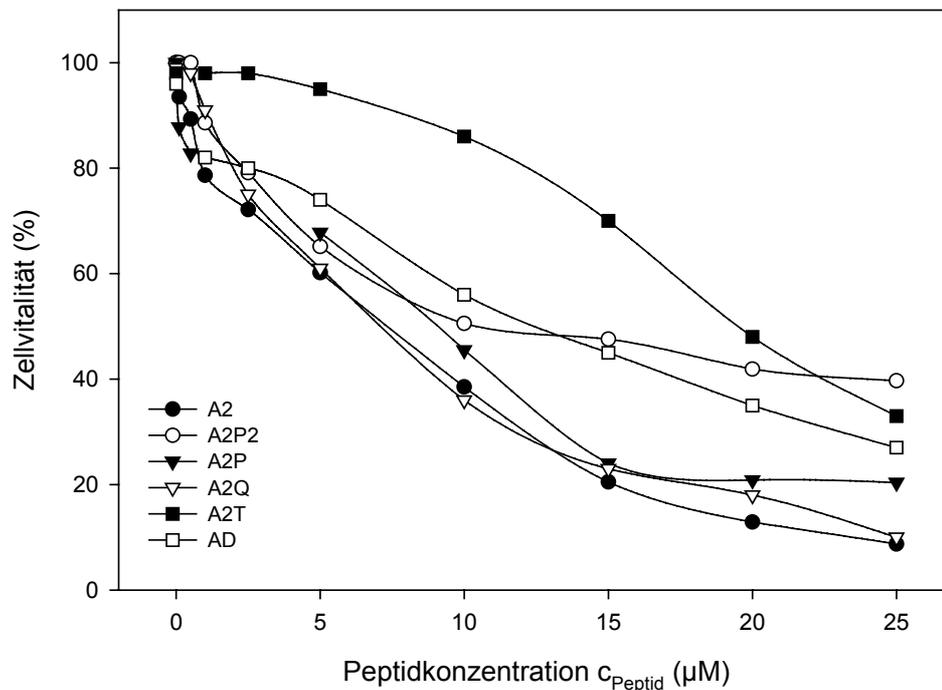


Abbildung 4.9: Zytotoxizität von ApoE-Peptiden an RBE4-Zellen nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in Serum-freiem Medium

Liposomen mit adsorptiv gebundenen ApoE-Peptiden

Der toxische Effekt der Komplexe aus ApoE-abgeleiteten Zweidomänen-Peptiden und POPC-SUVs wurde an b.End3-Zellen untersucht. Die erzielten Ergebnisse unterschieden sich nicht von denen, die für die ApoE-Peptide erhalten wurde (siehe Abbildung 4.9). POPC-SUVs selbst wiesen keinen zytotoxischen Effekt auf. Diese Ergebnisse bestätigten damit die Erwartungen, dass die ApoE-Peptide aufgrund ihrer Amphipathie und aufgrund der starken kationischen Ladung mit der Zellmembran interagieren und zytotoxisch wirken können.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnte für die weiteren Untersuchungen an Gehirnkapillarendothelzellen eine Maximalkonzentration von $c_{\text{Peptid}} = 2 \mu\text{M}$ für eine 30-minütige Inkubation festgelegt werden, bei deren Einhaltung eine Zellvitalität von mindestens 80 % gewährleistet ist.

ApoE-Peptid-PEG-Liposomen

Die Toxizität der PEG-Liposomen mit und ohne kovalent gebundenem HS-A2 Peptid wurde an RBMEC- und an RBE4-Zellen untersucht. Ebenso wurde das unkonjugierte HS-A2 Peptid untersucht, welches für die kovalente Bindung an die Maleimid-Funktion der PEG-Ketten verwendet wurde. Dessen Toxizität unterschied sich kaum von der des A2-Peptides. Wie aus Abbildung 4.10 ersichtlich ist, erhöhte die Peptidkopplung die Toxizität der PEG-Liposomen.

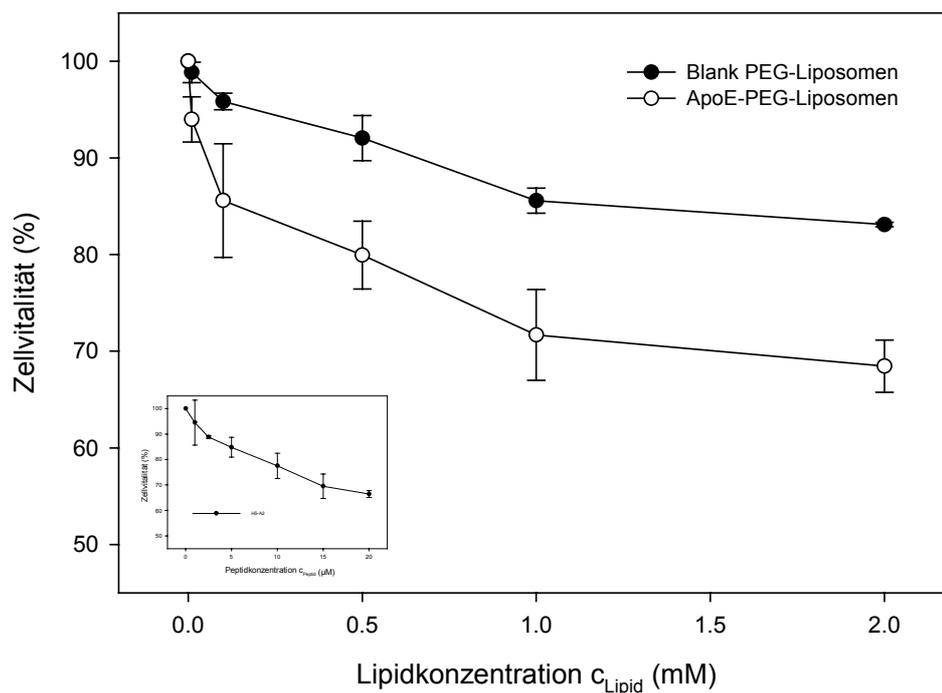


Abbildung 4.10: Zytotoxizität von PEG-Liposomen an RBMEC-Zellen nach 1 h bei 37 °C in Serum-freiem Medium, kleine Abb: HS-A2-Peptid

Unter der Annahme, dass durch die kovalente Kopplung von HS-A2 an PEG-Liposomen die toxischen Eigenschaften des Peptides nicht wesentlich beeinflusst werden, liefern die obigen Ergebnisse eine Bestätigung für die in Kapitel 4.1 getroffenen quantitativen Aussagen zur Kopplungseffizienz. Die bei einer Lipidkonzentration von $c_{\text{Lipid}} = 2 \text{ mM}$ ermittelte Peptidbedingte Reduktion der Zellvitalität auf 85 % entspricht dem Effekt einer HS-A2 Konzentration von $c_{\text{Peptid}} = 5 \text{ }\mu\text{M}$ und damit einem Lipid : Peptid Verhältnis von $c_{\text{L}}/c_{\text{P}} = 400$. Das wiederum entspricht dem Verhältnis von Lipid zu gebundenem Peptid, das bei einem Kopplungsansatz von $c_{\text{L}}/c_{\text{P}} = 200$ und einer Kopplungseffizienz von 50 % realisiert wurde. Für weitere Untersuchungen der Interaktion der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen mit Zellen wurde eine maximale Konjugatkonzentration von $c_{\text{Lipid}} = 0,5 \text{ mM}$ ($c_{\text{Peptid}} = 1,25 \text{ }\mu\text{M}$) verwendet werden, um eine mindestens 80 % ige Zellvitalität zu gewährleisten.

4.2.3 Internalisierung der ApoE-Peptid-Liposomen

Die Untersuchungen zur Internalisierung der Liposomen mit sowohl adsorptiv als auch kovalent gebundenen ApoE-Peptiden wurden an verschiedenen Gehirnkapillarendothelzellen mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die intrazelluläre Detektion von Fluorophoren, erlaubt jedoch keine Quantifizierung der Internalisierung. Es wurden sowohl Fluoreszenz-markierte Peptide (Fluoreszein) als auch Liposomen (Rhodamin) verwendet. Die Aufnahmeuntersuchungen wurden bei 37 °C und auch bei 4 °C durchgeführt, um Aussagen über den Mechanismus der Internalisierung zu erhalten.

Liposomen mit adsorptiv gebundenen ApoE-Peptiden

Die Internalisierung von Rhodamin-markierten POPC-Liposomen mit und ohne adsorptiv gebundenen ApoE-abgeleiteten Zweidomänen-Peptiden wurde an b.End3-Zellen mittels CLSM mikroskopisch untersucht.

Wie im Kapitel 4.1 dargestellt, wurden vorab die Bedingungen für eine stabile Adsorption der Zweidomänen-Peptide auf der Liposomenoberfläche geklärt, wobei Komplexe aus dem dipalmylierten A2P2-Peptid und POPC-SUVs die besten Voraussetzungen zeigten. Für die CLSM-Untersuchungen wurden A2P2-POPC-SUVs mit einem Lipid : Peptid-Verhältnis von 500 verwendet. Auf der Grundlage der Toxizitätsuntersuchungen wurde eine maximale Peptidkonzentration von $c_{\text{Peptid}} = 2 \mu\text{M}$ festgelegt, um toxische Effekte zu minimieren.

Abbildung 4.11 zeigt CLSM-Aufnahmen nach Inkubation der b.End3-Zellen mit A2P2-POPC-SUVs und Blank-POPC-SUVs. A2P2-POPC-SUVs wurden in b.End3-Zellen vesikulär internalisiert, wohingegen Peptid-freie Blank-POPC-SUVs keine Interaktion mit den Zellen zeigten. Im Zellkern wurde keine Fluoreszenz detektiert. Im Anschluss daran durchgeführte Trypanblau-Färbungen bestätigten jeweils die Intaktheit der Zellmembran. Die Aufnahme war also nicht durch einen toxischen Effekt bedingt.

Die Internalisierung der Rhodamin-markierten Liposomen wurde durch das ApoE-Peptid A2P2 vermittelt. Das Vorhandensein fluoreszierender, vesikulärer Strukturen im Zellinneren lässt auf einen endozytotischen Aufnahmeprozess schliessen, was durch die fehlende intrazelluläre Fluoreszenz bei Internalisierungsexperimenten bei 4 °C bekräftigt wurde.

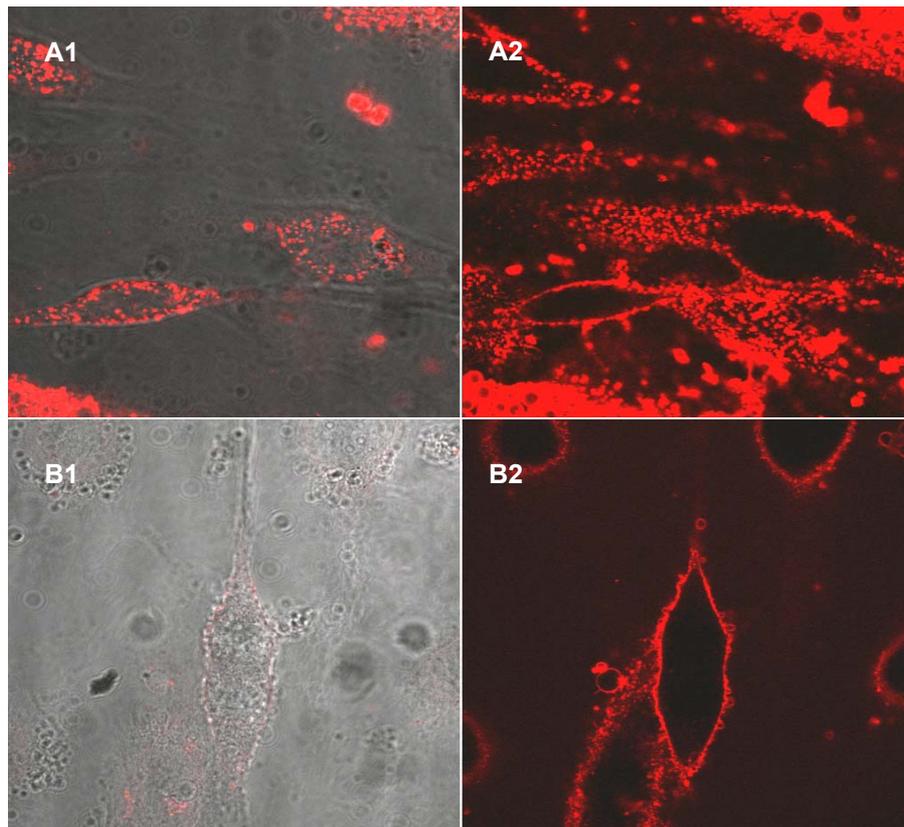


Abbildung 4.11: Internalisierung von A2P2- u. Blank-POPC-SUVs in b.End3-Zellen nach 30 min bei 37 °C ($c_{\text{Rhod}} = 0,05 \mu\text{M}$, $c_{\text{Lipid}} = 1 \text{ mM}$, $c_{\text{Peptid}} = 2 \mu\text{M}$)
A-1) A2P2-POPC-SUV, A-2) A2P2-POPC-SUV + Trypanblau-Färbung
B-1) Blank-POPC-SUV, B-2) Blank-POPC-SUV + Trypanblau-Färbung

Liposomen mit kovalent gebundenem ApoE-Peptid (ApoE-Peptid-PEG-Liposomen)

Die Internalisierung von Rhodamin-markierten ApoE-Peptid-PEG-Liposomen und Blank-PEG-Liposomen wurde an b.End3- und RBMEC-Zellen untersucht. Auch hier wurde die in den Toxizitätsuntersuchungen festgelegte Maximalkonzentration der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen berücksichtigt, um eine ausreichende Zellvitalität zu gewährleisten. Durch Trypanblau-Färbungen im Anschluss eines jeden Experimentes wurde die Intaktheit der Zellmembranen der untersuchten Zellen bestätigt.

Abbildung 4.12 zeigt CLSM-Aufnahmen nach 30-minütiger Inkubation der Zellen mit ApoE-Peptid- und Blank-PEG-Liposomen. Die Rhodamin-markierten ApoE-Peptid-PEG-Liposomen waren nach der Inkubation bei 37 °C diskontinuierlich verteilt und als vesikuläre Strukturen intrazellulär sichtbar (A1, B1). Die fehlende intrazelluläre Fluoreszenz bei Inkubation mit Blank-PEG-Liposomen (A2, B2) zeigte, dass die Internalisierung durch das kovalent an die Liposomenoberfläche gebundene ApoE-Peptid HS-A2 vermittelt wurde.

Die fehlende Aufnahme bei 4 °C und die beobachtete intrazelluläre, vesikuläre Verteilung der Fluoreszenz deuteten auch hier auf einen endozytotischen Aufnahmeprozess der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen hin.

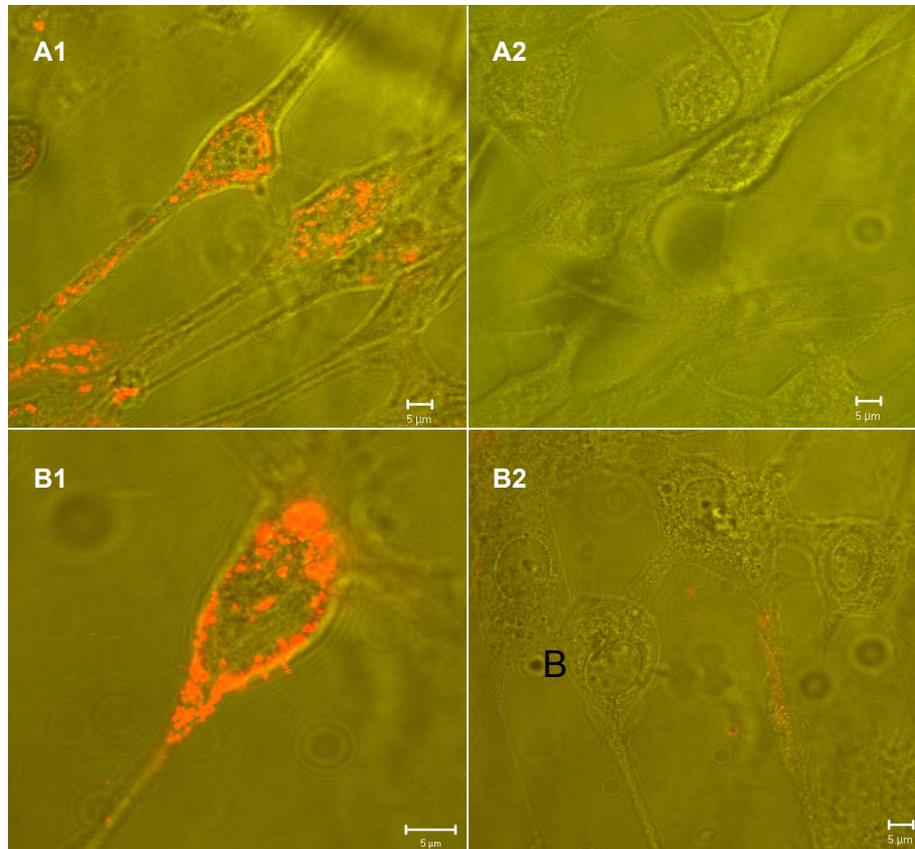


Abbildung 4.12: Inkubation von A) b.End3-Zellen und B) RBMEC-Zellen mit 1) ApoE-Peptid-PEG-Liposomen und 2) Blank-PEG-Liposomen (30 min, $c_{\text{Rhod}} = 1 \mu\text{M}$, $c_{\text{Lipid}} = 0,1 \text{ mM}$, 37 °C)

Inwieweit die Liposomen intakt internalisiert wurden, was eine Bestätigung des bereits vermuteten endozytotischen Aufnahmeweges wäre, wurde durch Fluoreszenz-Doppelmarkierung (Thöle et al. 2002; Higashi und Sunamoto 1995) der PEG-Liposomen untersucht. Dazu wurden die Liposomen, neben dem Rhodamin-Phospholipid als Membranmarker (Rhod-PE), zusätzlich mit dem in das Vesikelinnere eingeschlossene 5(6)-Carboxyfluoreszein versehen ($c_{\text{CF}} = 0,1 \text{ mM}$) und anschließend die Aufnahmeexperimente durchgeführt. Abbildung 4.13 zeigt die Internalisierung der Fluoreszenz-doppelmarkierten ApoE-Peptid-PEG-Liposomen in RBMEC-Zellen. Eine Co-Lokalisation beider Fluorophore (grün: 5(6)-Carboxyfluoreszein, rot: Rhodamin, gelb: Überlagerung beider Fluorophore) im gleichen Zellbereich spricht für die Internalisierung intakter Liposomen, was in Abbildung 4.13 an verschiedenen Stellen zu beobachten ist.

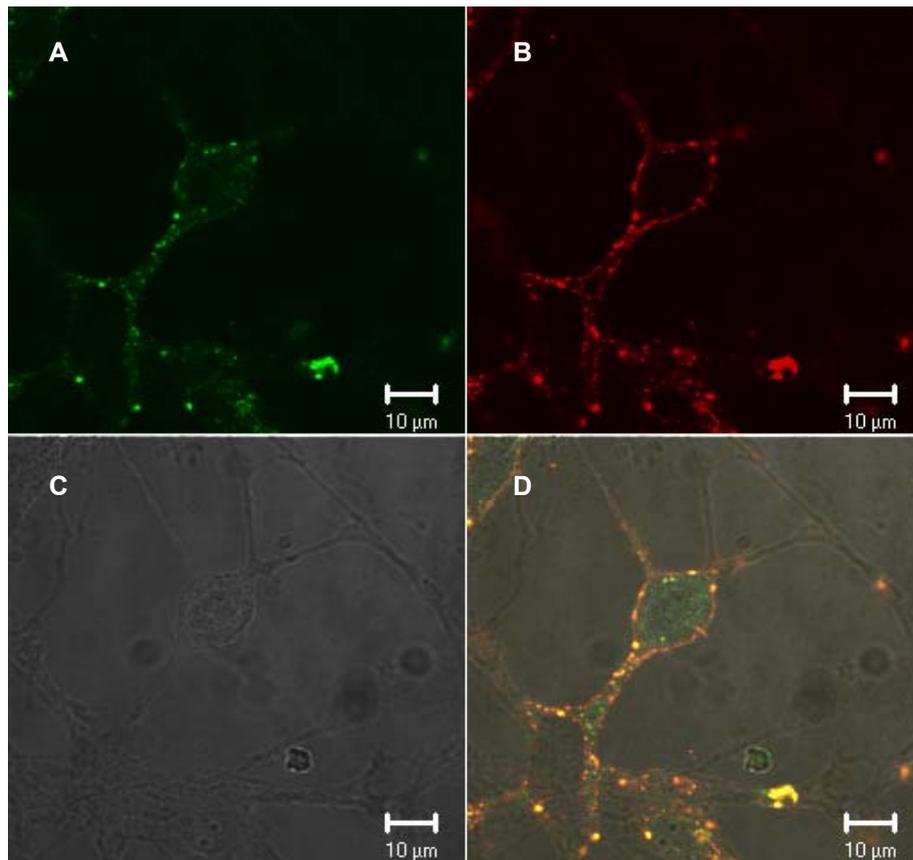


Abbildung 4.13: Internalisierung von Fluoreszenz-doppelmarkierten ApoE-Peptid-PEG-Liposomen in RBMEC-Zellen (30 min, $c_{\text{Lipid}} = 0,1 \text{ mM}$, 37°C), A) 5(6)-Carboxyfluorescein-Scan, B) Rhodamin-Scan, C) Durchlicht-Scan, D) Überlagerung von A - C

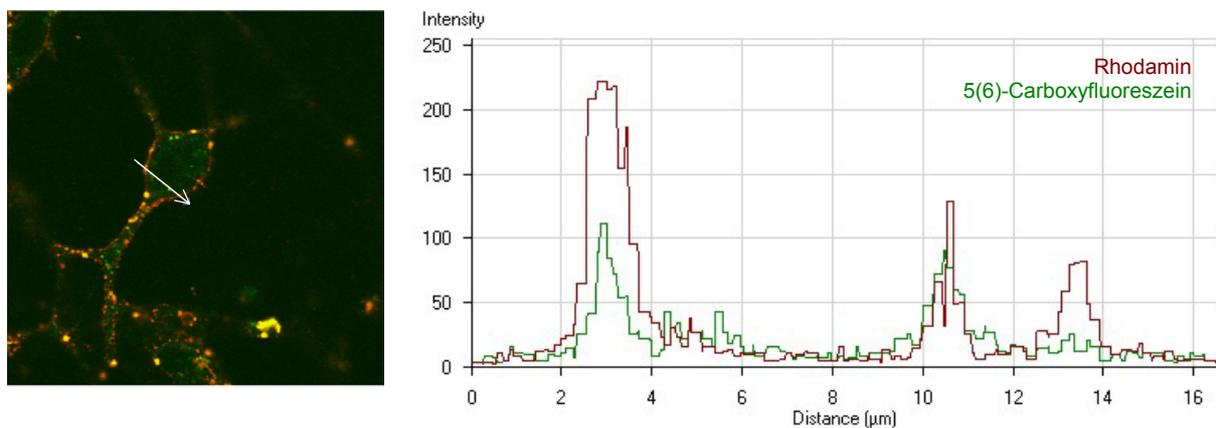


Abbildung 4.14: Rhodamin- und 5(6)-Carboxyfluorescein-Fluoreszenzintensitäten entlang einer Projektionsachse durch Abbildung 4.13 D

Die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten entlang einer Projektionsachse durch eine Zelle in Abbildung 4.14 verdeutlicht die Co-Lokalisation der beiden Fluorophore. Die Fluoreszenzintensitäten in Position 10 μm der Projektionsachse markieren ein endozytiertes Vesikel, was intakte Liposomen enthält.

Die stark fluoreszierende Kontur der Zelle in Abbildung 4.14 zeigt die Adsorption der Liposomen an der Zellmembran, was den initialen Schritt einer endozytotischen Aufnahme darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Lokalisation der Fluoreszenzfarbstoffe nur nach einem bestimmten Inkubationszeitraum (30 Minuten) betrachtet. Für das Verständnis des zeitlichen Ablaufes der endozytotischen Internalisierung mit anschließender lysosomaler Degradation wäre die Durchführung von kinetischen Untersuchungen notwendig. Die Vitalität der Zellen wurden nach jedem Experiment mit Trypanblau-Färbungen überprüft. Dabei bestätigte sich, dass toxische Effekte nicht für die intrazelluläre Lokalisation der Liposomen verantwortlich sind. Abschließend lässt sich sagen, dass die ApoE-Peptid-PEG-Liposomen zumindest teilweise intakt in Gehirnkapillarendothelzellen internalisiert wurden, wobei die Aufnahme durch das kovalent an der Liposomenoberfläche gebundene ApoE-Peptid vermittelt wurde.

ApoE-Peptide

Inwieweit die ApoE-Peptide nicht nur die Internalisierung von Liposomen vermitteln, sondern auch selbst zellulär aufgenommen werden, wurde mit den Fluoreszein-markierten ApoE-Peptiden *fA2* und *fA2T* an verschiedenen Gehirnkapillarendothelzellen untersucht. Auch hier wurde die in den Toxizitätsuntersuchungen festgelegte Maximalkonzentration der ApoE-Peptide berücksichtigt. Durch Trypanblau-Färbungen im Anschluss eines jeden Experimentes wurde die Integrität der Zellmembran und damit die Vitalität der Zellen untersucht.

Abbildung 4.15 zeigt die Aufnahme von *fA2* in RBE4-Zellen nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C. Es ist deutlich zu erkennen, dass das *fA2* Peptid in RBE4-Zellen internalisiert wurde. Die intrazelluläre Fluoreszenz ist vesikulär verteilt, was auf eine Aufnahme in Endozytosevesikel hinweist. Im Zellkern wurde keine Fluoreszenz detektiert. Dass ein toxischer Effekt für die Internalisierung verantwortlich war, konnte durch Trypanblau-Färbung ausgeschlossen werden. Abbildung 4.15 C zeigt die Integrität der Zellmembran.

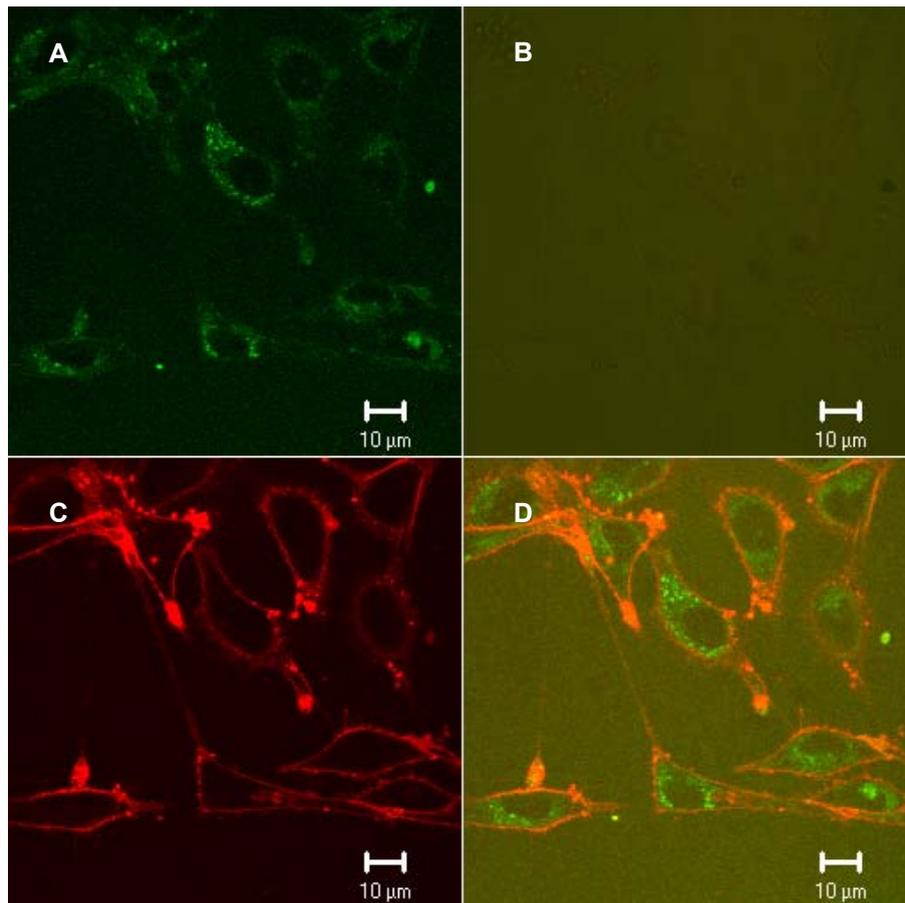


Abbildung 4.15: Aufnahme nach Inkubation von RBE4-Zellen mit *fA2*-Peptid (30 min, $c_{\text{Peptid}} = 0,1 \mu\text{M}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$), A) Fluoreszein-Scan, B) Durchlicht-Scan, C) Trypanblau-Färbung, D) Überlagerung von A - C

Bei der Durchführung der Internalisierungsuntersuchungen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ war keine intrazelluläre Fluoreszein-Fluoreszenz detektierbar. Eine Internalisierung des *fA2*-Peptides fand also nicht statt. Das Peptid scheint daher mit dem selben Energie-abhängigen, endozytotischen Aufnahmemechanismus internalisiert zu werden, der auch für die ApoE-Peptid-Liposomen gefunden wurde.

Die Internalisierungsexperimente mit dem Fluoreszein-markierten *fA2T*-Peptid wurden an b.End3-Zellen wiederholt und führten zu den gleichen Ergebnissen. Abbildung 4.16 A zeigt die Internalisierung des *fA2T*-Peptides nach 30-minütiger Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Auch hier wurde eine vesikuläre Verteilung der intrazellulären Fluoreszenz beobachtet. Anschließende Trypanblau-Färbungen bestätigten die Vitalität der untersuchten Zellen. Ebenso wurde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ keine Aufnahme des *fA2T*-Peptides beobachtet. Das *fA2T*-Peptid verfügt zwar über eine stark hydrophobe transmembranale Domäne, welche die Bildung von Assoziaten fördert (siehe Kapitel 4.1.1), wird aber offenbar ebenso effizient internalisiert wie das *fA2*-Peptid ohne lipidbindende Domäne.

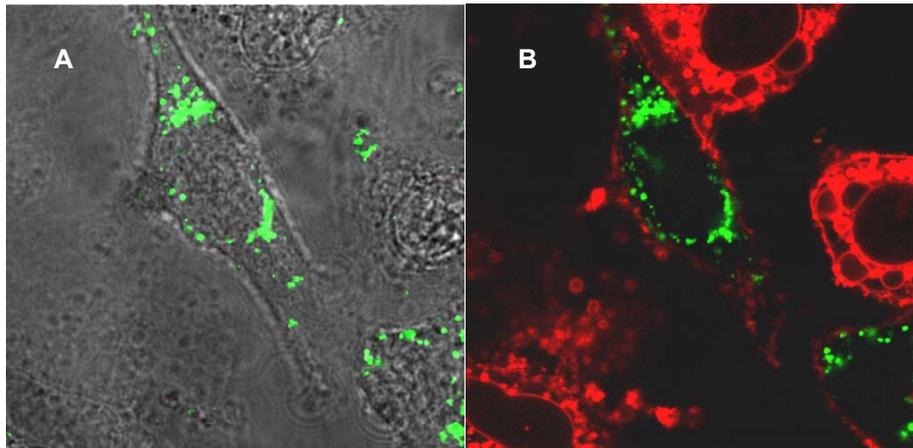


Abbildung 4.16: Aufnahme nach Inkubation von b.End3-Zellen mit *f*A2T-Peptid (30 min, $c_{\text{Peptid}} = 2 \mu\text{M}$, 37°C), A) Überlagerung Fluoreszeins- u. Durchlicht-Scan, B) Überlagerung Fluoreszeins-Scan und Trypanblau-Färbung

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass sowohl die Fluoreszenz-markierten ApoE-Peptide als auch ApoE-Peptid-Liposomen in Gehirnkapillarendothelzellen internalisiert wurden, ohne dass es zu einer toxischen Schädigung der Zellmembranen kam. Aufgrund der mikroskopisch sichtbaren Existenz von endozytotischen Vesikeln und der fehlenden Internalisierung bei 4°C handelte es sich offenbar um einen endozytotischen Aufnahmeprozess.

4.2.4 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse

Mit den in diesem Kapitel vorgestellten Untersuchungen zur LDL-Rezeptor-Expression auf verschiedenen Gehirnkapillarendothelzellen und den Toxizitätsstudien von ApoE-Peptiden und ApoE-Peptid-Liposomen wurden die Randbedingungen für die Internalisierungsexperimente geklärt. Mit den CLSM-Untersuchungen wurde gezeigt, dass ApoE-Peptid-Liposomen und auch freie ApoE-Peptide in Gehirnkapillarendothelzellen aufgenommen werden.

Voraussetzung für die LDL-Rezeptor-Erkennung und LDL-Rezeptor-vermittelte zelluläre Aufnahme der Liposomen war die Lokalisation der kationischen ApoE-abgeleiteten LDL-Rezeptor-Bindungssequenz A2 auf der Liposomenoberfläche. Die CLSM-Untersuchungen zeigten, dass die Internalisierung nicht durch eine Störung der Membranintegrität bedingt ist, die Fluoreszenz vesikulär im Zytoplasma verteilt ist und bei 4 °C keine Aufnahme stattfindet. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde ein endozytotischer Internalisierungsprozess für die ApoE-Peptid-Liposomen vermutet.

Unter Berücksichtigung der stark variierenden LDL-Rezeptor-Expression der verschiedenen Gehirnkapillarendothelzellen und der gleichzeitig beobachteten effizienten, jedoch Zelltyp-unabhängigen Internalisierung der ApoE-Peptide und ApoE-Peptid-Liposomen, lag die Schlussfolgerung nahe, dass die beobachtete Internalisierung nicht ausschließlich LDL-Rezeptor-vermittelt sein kann.

Dass Peptide die zelluläre Internalisierung von Liposomen auf verschiedenen Transportwegen vermitteln können, wurde bereits für das zellpenetrierende Tat-Peptid (Torchilin et al. 2001) und für das RGD-Peptid, ein Ligand eines Integrin-Rezeptors (Janssen et al. 2003), gezeigt. So wird für die Klasse der zellpenetrierenden Peptide neben der Membrantranslokation ohne Beteiligung endozytotischer Prozesse auch eine Involvierung des Heparansulfat-Proteoglykangerüsts diskutiert (Belting 2003; Fuchs und Raines 2004). Da die ApoE-abgeleiteten Peptide aufgrund ihrer kationischen Ladung eine wesentliche Eigenschaft mit den zellpenetrierenden Peptiden gemein haben, wurde bereits an dieser Stelle vermutet, dass ähnliche Transportmechanismen eine Rolle spielen können, wie sie für zellpenetrierende Peptide diskutiert werden. Inwieweit daher der LDL-Rezeptor an der Internalisierung von ApoE-Peptiden und ApoE-Peptid-Liposomen beteiligt ist und welche anderen Mechanismen von Bedeutung sind, war die zentrale Fragestellung weiterer Untersuchungen. Die Ergebnisse dazu werden im folgenden Kapitel dargestellt.

4.3 Charakterisierung des Internalisierungsmechanismus

Die Untersuchung des Internalisierungsmechanismus erfolgte an humanen primären Fibroblastenzellen (BaG13) als umfangreich charakterisierte Modellzellen für LDL-Rezeptor Bindungs- und Internalisierungsuntersuchungen (Goldstein et al. 1983).

4.3.1 Untersuchung der LDL-Rezeptor-Bindung

Die Wechselwirkung der ApoE-Peptide mit dem LDL-Rezeptor wurde in Konkurrenz mit ^{125}I -LDL untersucht. Abbildung 4.17 zeigt die Bindung des A2-Peptides an den LDL-Rezeptor im Vergleich zum natürlichen Liganden, dem humanen LDL.

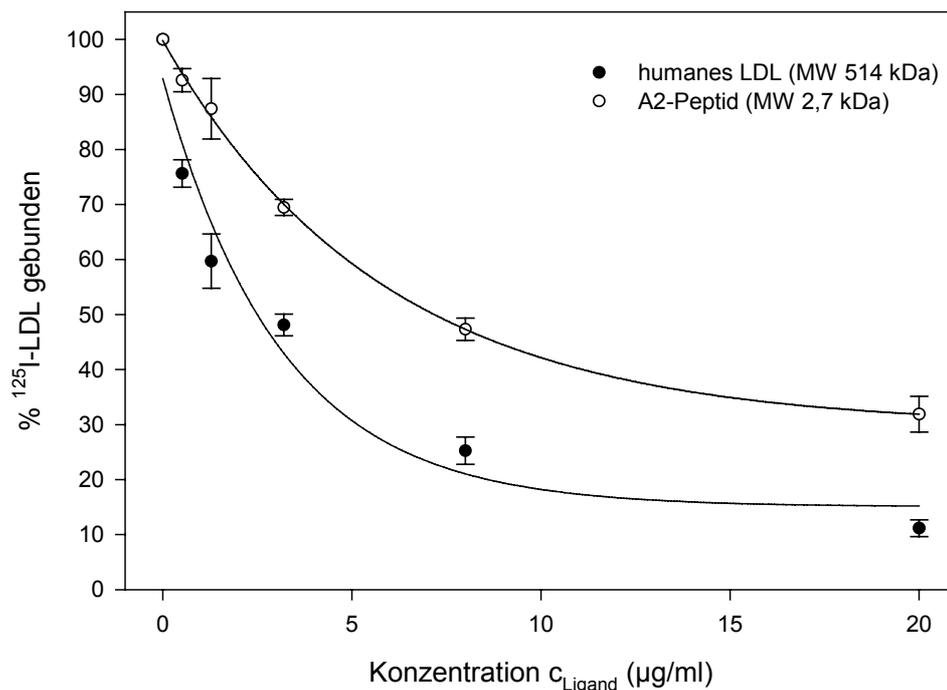


Abbildung 4.17: Bindung von A2 und LDL an den LDL-Rezeptor bei Anwesenheit von $2 \mu\text{g/ml}$ ^{125}I -LDL nach 4 Stunden Inkubation bei 4°C

Neben dem A2-Peptid wurde auch Rezeptorbindungsaktivität für das Zweidomänen-Peptid A2Q nachgewiesen. Die notwendigen Konzentrationen für eine 50 % Verdrängung des ^{125}I -LDL (IC_{50} -Werte) sind für A2 und A2Q in Tabelle 4.6 angegeben. Die IC_{50} -Werte der beiden Peptide liegen im unteren mikromolaren Bereich und waren daher etwa um Faktor 1000 größer als der vom LDL, was in Übereinstimmung mit der für das Tandemdimer der Sequenz

(141-155)₂ publizierten Rezeptoraffinität ist (Dyer und Curtiss 1991). Der für humanes LDL erhaltene IC₅₀-Wert von 5,2 nM entspricht der von Innerarity et al. bestimmten Dissoziationskonstante von K_D = 2,8 nM (Innerarity et al. 1986).

Tabelle 4.6: IC₅₀-Werte zur Verdrängung von ¹²⁵I-LDL

Kompetitor	IC ₅₀
humanes LDL	5,2 nM ± 0,9
A2	1,2 μM ± 0,3
A2Q	1,8 μM ± 0,3
A2 + POPC (c _L /c _P = 500)	1,2 μM ± 0,2
A2Q + POPC (c _L /c _P = 500)	1,1 μM ± 0,3

Die Bindung des A2Q-Peptides an POPC-SUVs erhöhte geringfügig die Affinität zum LDL-Rezeptor (Tabelle 4.6). Dieser Effekt lässt sich durch eine Zunahme der Peptid-Helizität bei Bindung an liposomale Oberflächen erklären, wie zuvor für dieses Peptid beobachtet wurde (Kapitel 4.1). Damit kommt es zu einer Stabilisierung der rezeptoraktiven Konformation, was wiederum die Affinität zum Rezeptor erhöht (Mims et al. 1994). Obwohl der Effekt hier nur schwach ausgeprägt beobachtet wurde, bestätigt dieses Ergebnis den theoretischen Ansatz zur adsorptiven Peptidkopplung. Keine Zunahme der Affinität wurde für das A2-Peptid beobachtet, welches aufgrund der fehlenden lipidbindenden Domäne nur eine schwache Bindung und damit eine geringe Strukturierung an POPC-SUVs zeigt. Die Bestimmung der LDL-Rezeptor-Affinität der Zweidomänen-Peptide mit stark hydrophoben Molekülbereichen (A2P, A2M, A2P2 und A2T) und der ApoE-PEG-Liposomen war nicht möglich, da es zu einer Interaktion zwischen den Peptiden bzw. liposomalen Konjugaten und dem ¹²⁵I-LDL kam. Diese äußerte sich in einer verstärkten unspezifischen Membranakkumulation von ¹²⁵I-LDL. Die Interaktion des AD-Peptides mit dem LDL und die resultierende verstärkte Internalisierung der AD-Peptid-LDL-Komplexe ist bereits beschrieben (Datta et al. 2000; Datta et al. 2001) und wurde sogar hinsichtlich der Behandlung von Hypercholesterolemie untersucht (Dyer et al. 1995; Garber et al. 2003; Ramprasad et al. 2002). Allerdings ist dieser Effekt auf einen LDL-Rezeptor-unabhängigen, Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG)-vermittelten Aufnahmeprozess zurückzuführen.

Die Bindung der ApoE-Peptide an den LDL-Rezeptor war die Voraussetzung für eine LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose der liposomalen Konjugate. Inwiefern die niedrigen Rezeptoraffinitäten der ApoE-Peptide einen solchen Transportweg ermöglichen, wurde in weiteren Experimenten zur LDL-Rezeptor-spezifischen Internalisierung untersucht.

4.3.2 Untersuchungen zur LDL-Rezeptor-spezifischen Internalisierung

Es wurde ein Bindungs- und Aufnahmeassay etabliert, der auf der Detektion membranassoziierter bzw. internalisierter Rhodamin-markierter Liposomen basierte. In einem ersten Experiment war die LDL-Rezeptor-Expression entweder hochreguliert bzw. entsprach dem Normalzustand. In einem weiteren Experiment wurde der LDL-Rezeptor durch einen IgG-LDL-Rezeptorfragment-Antikörper (Simmons et al. 1997) blockiert und anschließend das Bindungs- bzw. Aufnahmeexperiment mit ApoE-Peptid-PEG-Liposomen und Blank-PEG-Liposomen durchgeführt.

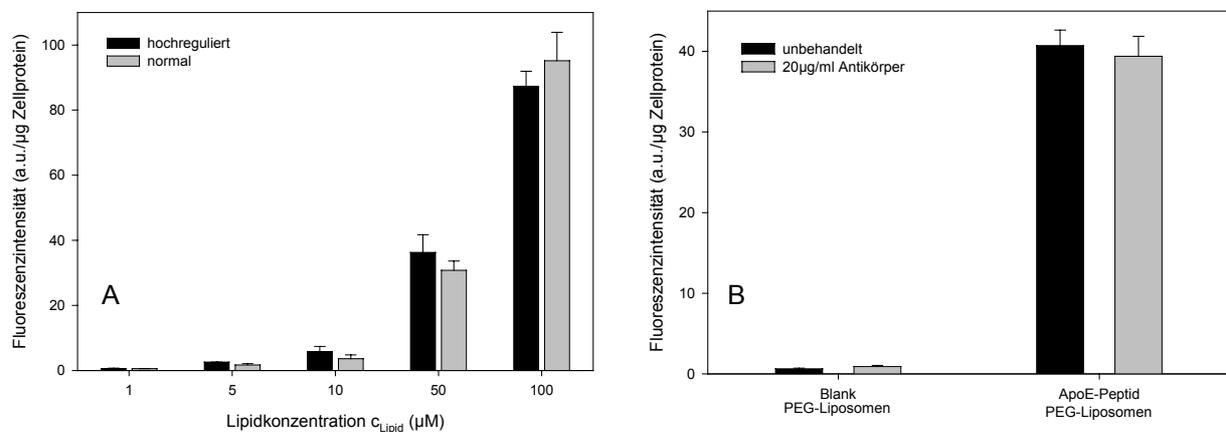


Abbildung 4.18: Bindung von PEG-Liposomen an BaG13-Zellen ($c_L = 50 \mu\text{M}$), A) mit hochregulierter bzw. normaler LDL-Rezeptor-Expression, B) mit oder ohne Antikörper

Die Bindung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen war konzentrationsabhängig, jedoch unabhängig von der LDL-Rezeptor-Expression (Abbildung 4.18 A). Die Regulation der LDL-Rezeptor-Expression ist sehr effizient (Innerarity et al. 1986), was in einem Bindungs-experiment mit ^{125}I -LDL zur Abklärung der experimentellen Bedingungen bestätigt wurde. Bei Zellen mit erhöhter LDL-Rezeptor-Expression wurde 25-mal mehr ^{125}I -LDL gebunden im Vergleich zu Zellen mit normalem Expressionslevel. Auch die Blockade des LDL Rezeptors mit dem Antikörper beeinflusste die Bindung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen nicht (Abbildung 4.18 B). Blank-PEG-Liposomen ohne ApoE-Peptid zeigten keine Membranbindung (Abbildung 4.18 B). Vergleichbare Fluoreszenzmuster wurden für die Aufnahmeuntersuchungen gefunden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der LDL-Rezeptor nicht an der Internalisierung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen in BaG13-Zellen beteiligt ist. Die Internalisierung war zwar durch das ApoE-Peptid vermittelt, offenbar wurde aber ein LDL-Rezeptor-unabhängiger Translokationsweg aktiviert.

4.3.3 Untersuchungen zum Translokationsmechanismus

Welche Membrankomponenten bei der Internalisierung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen eine Rolle spielten, war Gegenstand weiterer Untersuchungen. Aus der Literatur war bekannt, dass die bei der Interaktion des AD-Peptides mit LDL-Partikeln entstehenden Komplexe im wesentlichen über eine Heparansulfat-Proteoglykan-vermittelte Endozytose internalisiert werden (Datta et al. 2001). Das HSPG-Gerüst besteht aus in der Membran verankerten Kernproteinen, deren polyanionische Heparansulfat-Seitenketten eine starke negative Ladungsdichte auf der Zellmembran bedingen (Yanagishita und Hascall 1992). Dadurch vermag es eine Reihe von physiologischen Liganden über elektrostatische Wechselwirkungen zu binden. Das HSPG erfüllt zum einen Präsentationsfunktion, in dem es die Liganden den jeweiligen Rezeptoren in einer rezeptoraktiven Konformation präsentiert, und zum anderen kann es deren zelluläre Aufnahme durch adsorptive Endozytose vermitteln (Belting 2003). Inwieweit das HSPG für die Internalisierung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen von Bedeutung ist, wurde hier untersucht. Nach Behandlung mit Heparinase I, einem Enzym, das die 1,4-D-glykosidische Bindung der Heparansulfat-Seitenketten spaltet und damit das HSPG partiell von der Zelloberfläche entfernt (Linhardt 1999), wurde eine deutliche Reduktion der Bindung und Aufnahme von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen in Fibroblasten beobachtet.

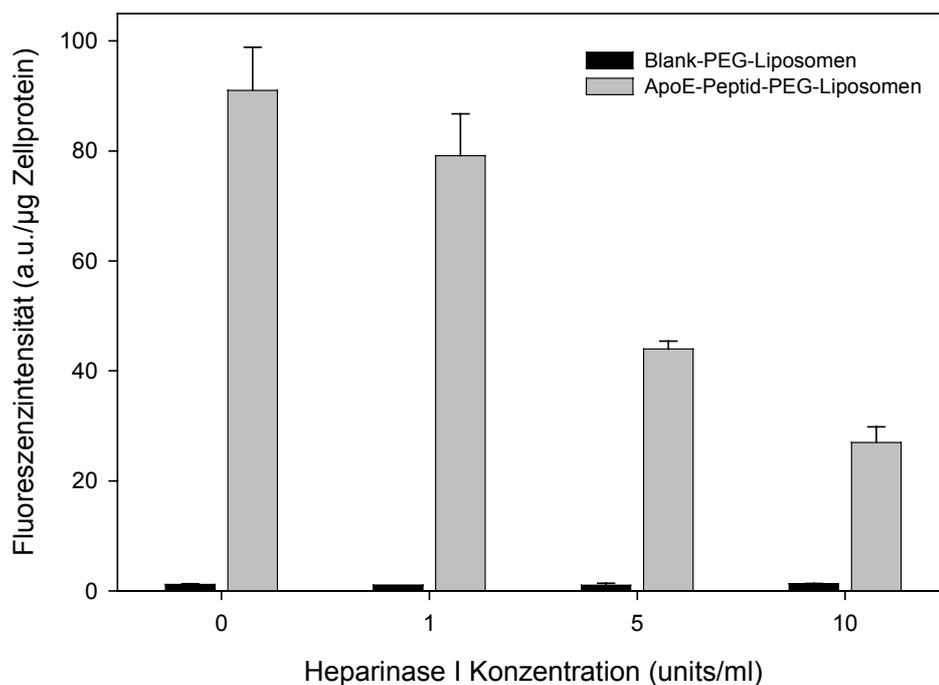


Abbildung 4.19: Bindung von Blank- und ApoE-Peptid-PEG-Liposomen ($C_{\text{Lipid}} = 100 \mu\text{M}$) an Heparinase I-vorbehandelte BaG13-Zellen

Abbildung 4.19 zeigt, dass mit ansteigender Heparinase I-Konzentration weniger ApoE-Peptid-PEG-Liposomen an die Zellmembran gebunden werden. Durch die Entfernung der anionischen Heparansulfat-Seitenketten wird dem kationischen ApoE-Peptid die Möglichkeit genommen, über elektrostatische Wechselwirkungen an die Zellmembran zu binden. Ebenso kommt es zu einer deutlichen Verminderung der Internalisierung. Abbildung 4.20 zeigt die 50 % ige Reduktion der Aufnahme von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen bei einer Lipidkonzentration von $c_{\text{Lipid}} = 100 \mu\text{M}$.

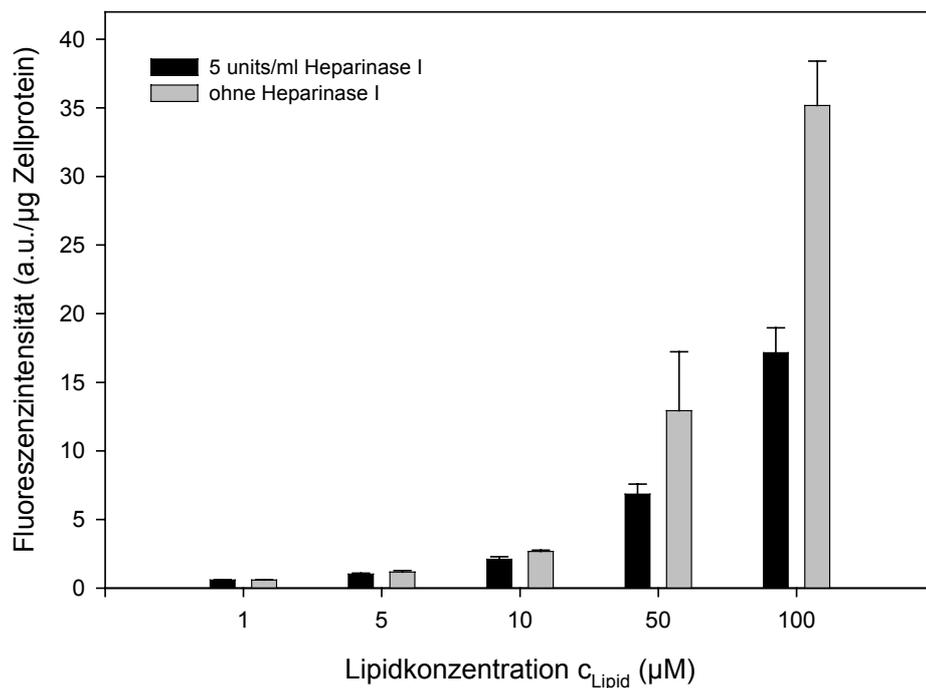


Abbildung 4.20: Internalisierung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen in BaG13-Zellen mit und ohne Vorbehandlung mit 5 units/ml Heparinase I

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Beteiligung des HSPG an der Bindung und Internalisierung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen. Da Heparinase I das HSPG jedoch nur partiell bzw. erst in sehr hohen Konzentrationen vollständig entfernt (Linhardt 1999), konnte trotz Heparinase-Behandlung zum Teil noch Internalisierung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen beobachtet werden.

Um die Rolle des HSPGs durch weitere Ergebnisse zu untermauern, wurden die Aufnahme- und Bindungsexperimente in Anwesenheit von dem polykationischen Poly-L-Lysin als Kompetitor zu kationischen HSPG-Liganden und in Anwesenheit von Heparin als strukturgleichem Kompetitor zum HSPG durchgeführt.

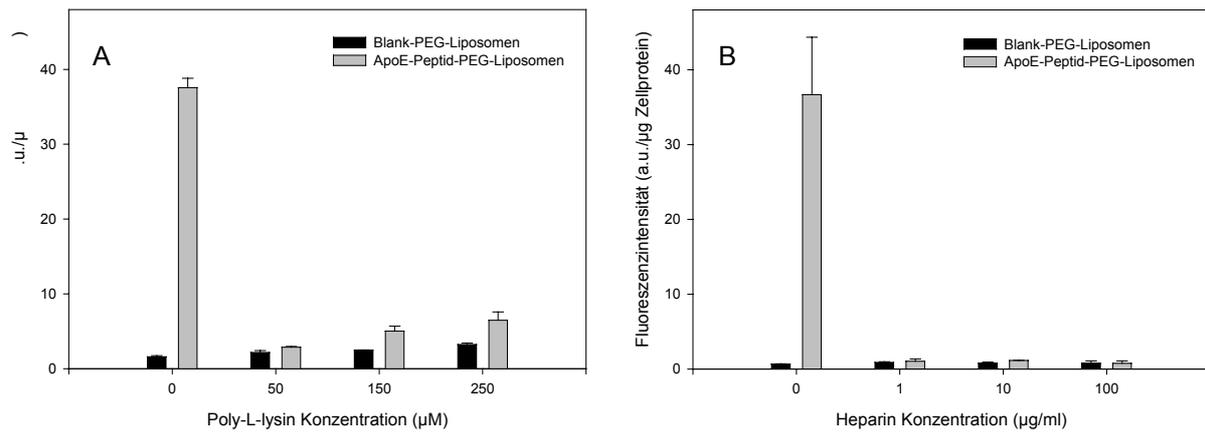


Abbildung 4.21: Internalisierung von Blank- und ApoE-Peptid-PEG-Liposomen ($c_{\text{Lipid}} = 100 \mu\text{M}$) in BaG13-Zellen, A) mit Poly-L-Lysin als Kompetitor, B) mit Heparin als Kompetitor

Wie aus den Abbildungen 4.21 A und 4.21 B hervorgeht, ist die Internalisierung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen bereits durch geringe Konzentrationen der Kompetitoren Heparin bzw. PLL fast vollständig blockiert. Bindungsuntersuchungen bei 4°C zeigten die vollständige Blockade der Membranbindung der Liposomen. Auch diese Ergebnisse bestätigen die Beteiligung des HSPG an der Membranbindung und Internalisierung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen in BaG13-Zellen.

Apolipoprotein E besitzt mehrere Heparin-Bindungsstellen, unter anderem eine im Sequenzbereich AS 142 bis 147. Die Koinzidenz mit der LDL-Rezeptor-Bindungsregion im Sequenzbereich AS 140 bis 160 (Weisgraber et al. 1986; Cardin et al. 1986) legt eine Wechselwirkung mit den Heparansulfat-Seitenketten des strukturähnlichen HSPGs nahe. Dass die von Murdoch et al. gefundene LDL-Rezeptor-ähnliche, Cystein-reiche Sequenz des Perlecans, eines Kernproteins des HSPGs, für die Interaktion mit den ApoE-Peptiden verantwortlich sein könnte (Murdoch et al. 1992), ist eher unwahrscheinlich, da die LDL-Rezeptor-Affinitäten der Peptide vergleichsweise gering waren.

Eine weitere mögliche Erklärung für die ApoE-Peptid-vermittelte Internalisierung ergibt sich aus der strukturellen Ähnlichkeit der stark kationischen ApoE-Peptide mit der Klasse der zellpenetrierenden Peptide, deren Internalisierungsmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Neben einer Interaktion mit dem schon erwähnten HSPG, beschrieben z.B. für das HIV-1 Tat-Protein (Tyagi et al. 2001) und für ein Nonaarginin-Peptid (Fuchs und Raines 2004), werden auch Energie-unabhängige Prozesse für die Internalisierung derartiger Peptide verantwortlich gemacht (Scheller et al. 1999; Vives et al. 1997). So ist für ein Peptid aus der Proteintransduktionsdomäne des HIV-1 Tat-Proteins beschrieben, dass es die intrazelluläre Aufnahme von Liposomen auch bei niedrigen Temperaturen und in Anwesenheit metabolischer Inhibitoren vermittelt (Torchilin et al. 2001).

Um zu untersuchen, ob Energie-unabhängige Translokationsprozesse bei der Internalisierung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen beteiligt sind, wurden Aufnahmeexperimente unter Energiedepletions-Bedingungen durchgeführt. Die Anwesenheit von Natriumazid und 2-Deoxyglucose führt zu einer Mangelversorgung der Zellen mit ATP und unterbindet damit jegliche Energie-abhängige, endozytotische Prozesse (Schmid und Carter 1990). Eine deutlich reduzierte Internalisierung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen wurde unter Energiemangel-Bedingungen beobachtet (Abbildung 4.22). Die nur auf ein Drittel reduzierte Aufnahme ist auf eine unvollständige Energiedepletion zurückzuführen. Offenbar spielen also Energie-abhängige Prozesse die entscheidende Rolle bei der Internalisierung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen.

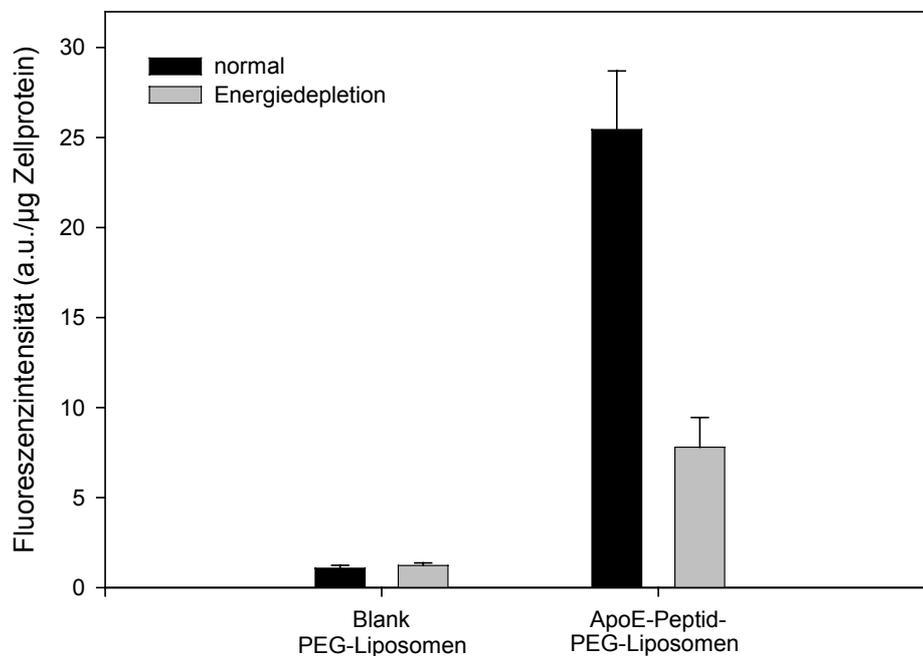


Abbildung 4.22: Internalisierung von Blank- und ApoE-PEG-Liposomen ($c_{\text{Lipid}} = 100 \mu\text{M}$) in BaG13-Zellen unter Energiedepletions-Bedingungen

Da zusätzlich keine mikroskopisch detektierbare Aufnahme der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen bei 4 °C beobachtet wurde (Kapitel 4.2), erscheint eine Energie-unabhängige Internalisierung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen sehr unwahrscheinlich. Diese Befunde unterstützen die Erklärung, dass ApoE-Peptid-PEG-Liposomen über einen HSPG-vermittelten, endozytotischen Aufnahmeweg in BaG13-Zellen internalisiert wurden.

4.3.4 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse

Obwohl für das aus der LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne von ApoE abgeleitete A2-Peptid Bindung an den LDL-Rezeptor nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Internalisierung von ApoE-Peptid-PEG-Liposomen zwar Peptid-vermittelt, aber LDL-Rezeptor-unabhängig. Als eine an Bindung und Internalisierung beteiligte Membrankomponente konnte das Heparansulfat-Proteoglykan-Gerüst identifiziert werden, welches über elektrostatische Wechselwirkungen die kationische ApoE-Peptid-PEG-Liposomen bindet und einen Energie- und Temperatur-abhängigen Aufnahmeprozess vermittelt.

Das primäre Ziel dieser Untersuchungen war es, zu testen, inwieweit auf der Oberfläche von Liposomen lokalisierte ApoE-abgeleitete Peptide eine LDL-Rezeptor-vermittelte zelluläre Aufnahme als möglichen Transportweg über die Blut-Hirn-Schranke induzieren können. Um eine LDL-Rezeptor-spezifische Translokation von liposomalen Wirkstoffträgern an der BHS zu erreichen, ist es nötig, einen geeigneten, hochaffinen Vektor zu nutzen, der möglichst eine höhere Rezeptoraffinität aufweist als der natürliche Ligand. Grundsätzlich erfüllen ApoE-haltige Lipoproteine diese Bedingung, da sie eine 20- bis 25-fach höhere Rezeptoraffinität und damit eine geringere Plasma-Halbwertszeit besitzen als ApoB-haltige LDL-Partikel (Mahley et al. 1984).

Dass ApoE-abgeleitete Peptide an den LDL-Rezeptor binden, war bereits bekannt (Dyer et al. 1995) und konnte für das A2-Peptid in dieser Arbeit bestätigt werden. Jedoch war die Rezeptoraffinität zu gering, um eine LDL-Rezeptor-abhängige Internalisierung der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen zu induzieren. Mögliche Ursachen dafür sind in der zu geringen Besetzungsdichte der Liposomen und in der unzureichenden Konformation des A2-Peptides zu finden.

Weisgraber zeigte, dass 4 oder mehr ApoE-Moleküle pro Liposom vorhanden sein müssen, um LDL als natürlichen Liganden vom LDL-Rezeptor zu verdrängen (Weisgraber 1994). Der Grund für die erhöhte LDL-Rezeptor-Affinität dieser artifiziellen Lipoproteine ist eine Multi-Rezeptorinteraktion. Je größer also die Beladungsdichte der Liposomen mit ApoE-Peptiden ist, desto höher sollte auch die LDL-Rezeptor-Bindungsaffinität sein.

Mit der von Dyer et al. untersuchten ApoE-abgeleiteten Rezeptorbindungssequenz 141-155 wurde gefunden (Dyer und Curtiss 1991), dass das lineare Tandemtrimer (141-155)₃ eine deutlich höhere Rezeptoraffinität besitzt als das entsprechende Dimer bzw. Monomer. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die durch Sequenzverlängerung erzielte Stabilisierung der α -helikalen, rezeptoraktiven Konformation zurückzuführen. Es ist zu erwarten, dass mit der

Erhöhung der Anzahl der ApoE-Peptide pro Liposom und mit einer Sequenzverlängerung bzw. Steigerung des Multimerisierungsgrades der ApoE-Peptide eine verbesserte Rezeptoraffinität der ApoE-Peptid-Liposomen erzielt werden kann.

Daneben stellt auch die Größe der Liposomen einen kritischen Parameter dar. Die Liposomengröße hat einen entscheidenden Einfluss auf die Konformation des Apolipoproteins und damit wiederum auf die Rezeptoraffinität. Es wurde berichtet, dass LDL-Partikel mit einem Durchmesser von 23 nm, im Vergleich unterschiedlich großer Partikel, maximale Rezeptorbindung zeigen (Galeano et al. 1994). Im Falle der hier verwendeten ca. 70 nm großen ApoE-Peptid-PEG-Liposomen kommt hinzu, dass das A2-Peptid an das terminale Ende der PEG-Kette geknüpft ist und damit eine Separierung sowohl von der Trägeroberfläche als auch von anderen A2-Peptiden erfolgt, was die Rezeptoraffinität zusätzlich negativ beeinflussen kann (Torchilin et al. 2001).

Das A2-Peptid ist jedoch so auf der Liposomenoberfläche exponiert, dass eine Interaktion mit dem HSPG stattfindet und eine endozytotische Aufnahme der ApoE-Peptid-PEG-Liposomen vermittelt wird.

HSPG-vermittelte Translokationsprozesse sind auch an der Blut-Hirn-Schranke von Bedeutung. Dies wurde bereits für den Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) (Deguchi et al. 2002) und kationisiertes Albumin gezeigt (Kang und Pardridge 1994; Kumagai et al. 1987; Pardridge et al. 1990b). Kationische Peptide aus der Klasse der „zellpenetrierenden Peptide“, wie z.B. das Tat-Peptid (Schwarze et al. 1999) und das Syn B-Peptid (Rousselle et al. 2001; Rousselle et al. 2000; Rousselle et al. 2002; Drin et al. 2002) sind in der Lage, den Transport eines Cargos über die BHS zu vermitteln. Eine Beteiligung des HSPG an der zellulären Aufnahme des Tat-Proteins (Tyagi et al. 2001) und der aus der Tat-Protein-transduktionsdomäne abgeleiteten Peptide (Console et al. 2003) wurde bereits nachgewiesen und ist auch für den Transport über die BHS sehr wahrscheinlich. Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz eines fehlenden selektiven Translokationsweges der Transport über die BHS verbessert werden kann. Das generelle Problem ist jedoch, dass das HSPG ubiquitär auf nahezu jeder Säugertierzellmembran vorkommt (Belting 2003). So ist zwar die BHS-Passage erhöht aber gleichzeitig auch die Aufnahme in periphere Organe. Grundsätzlich unterscheidet sich zwar das HSPG-Gerüst sowohl in der Zusammensetzung und Sulfatierung der Heparansulfat-Seitenketten als auch in den Kernproteinen zwischen unterschiedlichen Zelltypen und Geweben (Kolset und Salmivirta 1999). Inwieweit diese Tatsache jedoch für ein gezieltes *Targeting* potentieller Wirkstoffträger verwendbar ist, bleibt noch zu klären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lokalisation des A2-Peptides auf der Oberfläche von Liposomen nicht ausreichend genug scheint, um eine LDL-Rezeptor-spezifische Internalisierung auszulösen. Die untersuchten ApoE-Peptid-PEG-Liposomen sind aufgrund der geringen Rezeptoraffinität des A2-Peptides für ein *Targeting* des LDL-Rezeptors ungeeignet, sprechen aber einen anderen, sehr effizienten HSPG-vermittelten Internalisierungsweg an.

Dass neben dem HSPG noch andere Transportmechanismen bei der Internalisierung der ApoE-Peptide bzw. ApoE-Peptid-Liposomen von Bedeutung sind, kann hier nicht ausgeschlossen werden. Erst kürzlich beschrieben Croy et al. die hochaffine Interaktion des Tandemdimerpeptides (141-155)₂ mit dem LDL-Rezeptor-assoziierten Protein (LRP1) (Croy et al. 2004). Des Weiteren ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der ApoE-Peptide mit Peptiden aus der Klasse der „zellpenetrierenden Peptide“ eine Beteiligung von Transportprozessen, die für diese Peptide diskutiert werden, sehr wahrscheinlich.