

2. MATERIAL UND METHODEN

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Für die Versuche wurden folgende Geräte verwendet:

Autoklav	Guwina Hofman, Berlin
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Differential Scanning Calorimeter DCS 821	Mettler Toledo, Gießen
Digitalthermometer	VWR Darmstadt
ELISA-Reader	Labsystems, Finnland
Emulsiflex [®] C5	Avestin, Mannheim
FACS-Calibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
Filtrationseinheit Millipore [®]	Millipore-Waters, Eschborn
Frequenz-Analysator Typ ZVRE	Fa. Rohde & Schwarz, München
Laserdiffraktometer Coulter LS 230	Coulter, Miami, FL
Magnetrührer IKAMAG [®] RCT	Janke & Kunkel, Staufen
Neubauer-Zählkammer (0,0025mm ² /0,1mm)	Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Nürnberg
Photonkorrelationspektrometer Zetasizer 4	Malvern Instruments, Malvern, UK
Pipetten, Eppendorf Reference [®]	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy [®]	Integra Bioscience, Fernwald
Schüttler IKA [®] MTS 2	Janke & Kunkel, Staufen
Sterilarbeitsbank LaminAir [®]	Heraeus, Hanau
Szintillationszähler 1450 Microbeta [™] Plus	Wallac, Freiburg
Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultraschallbad Sonorex [®] RK 100	Bandelin, Berlin
Ultra-Turrax IKA [®] T25	Janke & Kunkel, Staufen
Vortex-Gerät	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad DC3/W26	Haake, Karlsruhe
Wasser-Deionisierungsanlage Milli-Q [®]	Millipore-Waters, Eschborn
Zentrifuge Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge Megafuge[®] 1.0R

Heraeus, Hanau

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Folgende Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wurden verwendet:

[Methyl- ³ H]Thymidin	Amersham, Buckinghamshire, U.K.
1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylsiloxan	Sigma Aldrich, Deisenhofen
2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carbonsäure	Acros Organics, Belgien
4-Dimethylaminopyridin (DMAP)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Actinomycin D	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Amphotericin B	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Annexin V-FITC	Alexis, Grünberg
Betamethason	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Betamethason-17-21-dipropionat	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Betamethason-17-valerat	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Borsäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Boviner Hypophysenextrakt, BPE	Cell Systems, St. Katharinen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Cholestansonde	Magnettech, Berlin
(4,5,5,-trimethyl-1-yloxy-3-imidazoline-2-spiro-3'-(5'*-cholestane))	
Clobetasol-17-propionat	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Compritol [®] 888 ATO	Gatefossé, Saint-Priest, Frankreich
Dexamethason	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dichlormethan	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Einmalspritzen (Braun Injekt 5 und 10 ml)	VWR, Darmstadt
Epidermaler Wachstumsfaktor, human (hEGF)	Cambrex Bio Science, Verviers,

Essigsäure, konzentriert	Belgien
Ethanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	VWR, Darmstadt
FACS Clean	Sigma Aldrich, Deisenhofen
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen, Falcon	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Filtermembran, Nylon, 0,22 µm, Ø 47mm	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Fluticason-17-propionat	GlaxoSmithKline, Hamburg
FuGene [®] 6	Roche Diagnostics, Basel
Gentamicinsulfat	Biochrom, Berlin
Hydrocortison	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure, HEPES	Gibco BRL, Karlsruhe
Imidazol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Insulin	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Isopropanol	VWR, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Keratinozytenbasalmedium (KBM)	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Miglyol [®] 812	Caelo, Minden
Mometason-17-fuorat	Essex, München
Multititterplatten (6-, 96-Loch, Flachboden)	Biochrom, Berlin
Multititterplatten Falcon (24-Loch, Flachboden)	VWR, Darmstadt
Murine Fibroblasten (Wildtyp und S1P ₃ KO)	Klinikum Benjamin Franklin, Berlin (Herr Prof. Dr. Zidek)

N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natronlauge (NaOH) 1N	VWR, Darmstadt
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm [®] M	Brand GmbH + Co., Wertheim
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Poloxamer [®] 188	BASF, Ludwigshafen
Prednicarbat	Aventis Pharma, Bad Soden
Prednisolon	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Propidiumiodid (PI)	Alexis, Grünberg
Reaktionsgefäße Safe-Lock (0,5, 1,5, 2ml)	Biochrom, Berlin
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin
Szintillationsflüssigkeit Optiphase [®]	Wallac, Freiburg
tert-Butyldimethylsilylchlorid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tetrabutylammoniumfluorid Trihydrat	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tetrahydrofuran (THF)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Biochrom, Berlin
Vancomycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Renner, Dannstadt
Zelllinie A549	MDC, Berlin-Buch (Frau Dr. Fichtner)
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Biochrom, Berlin

2.1.3 Nährmedien und Lösungen

Die im Folgenden aufgeführten Nährmedien und Lösungen wurden für die Anzucht und Kultivierung eingesetzt. Für die Experimente diente ein entsprechendes Basalmedium. Die Herstellung erfolgte unter aseptischen Bedingungen.

2.1.3.1 Zellkulturmedien

Keratinocytenbasalmedium (KBM)

Serumfreies Keratinocytenmedium	500 ml
hEGF	0,1 µg/ml
Insulin	5 µg/ml
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicinsulfat	50 µg/ml

Keratinocytenwachstumsmedium (KGM)

Serumfreies Keratinocytenmedium	500 ml
BPE	30 µg/ml
hEGF	0,1 µg/ml
Hydrocortison	0,5 µg/ml
Insulin	5 µg/ml
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicinsulfat	50 µg/ml

Fibroblastenbasalmedium (FBM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	500 ml
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 Einheiten/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml

Fibroblastenwachstumsmedium (FGM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	500 ml
FKS	7,5 %
Glutamin	2 mM
Penicillin	100 Einheiten/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml

Für die Kultivierung der murinen Fibroblasten wurde 10 % FKS verwendet, das Basalmedium blieb unverändert.

A549-Basalmedium (ABM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	500 ml
Penicillin	100 Einheiten/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml

A549-Wachstumsmedium (AGM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	500 ml
FKS	10 %
Penicillin	100 Einheiten/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml

2.1.3.2 Lösungen für die Isolierung von Keratinozyten und Fibroblasten

Einfriermedium

DMSO	10 % (v/v)
FKS	10 % (v/v)
in DMEM	

Für die Zelllinie A549 wurde der DMSO-Gehalt auf 5 % (v/v) reduziert.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

KCl	0,2 g/l
NaCl	8,0 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l
in Aqua bidest	

Stopmedium:

FKS	10 %
in DMEM	

Transportmedium

Gentamicinsulfat	50 µg/ml
Vancomycin	50 µg/ml
in DMEM	

Trypsin-EDTA-Lösung

Trypsin	1,67 mg/ml
EDTA	0,67 mg/ml
in PBS	

2.1.3.3 Lösungen für die Apoptosebestimmung

Annexin V-Bindungspuffer (pH 7,4)

HEPES/NaOH	10 mM
NaCl	140 mM
CaCl ₂	2,5 mM

in Aqua bidest

Im Anschluss erfolgte eine Sterilfiltration des Puffers.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellisolierung und -kultivierung

Keratinocyten und Fibroblasten. Primäre Keratinocyten und Fibroblasten wurden aus Vorhaut, die bei der Zirkumzision von 1-6 jährigen Jungen in der chirurgischen Ambulanz von Dr. Jung, Dr. Knoblauch, Dr. Schildknecht sowie dem St. Josefs Krankenhaus Berlin anfiel, gewonnen und in unserem Labor kultiviert. Die Haut wurde direkt nach der OP im Transportmedium bei 4 °C ins Labor geliefert und anschließend für 1 h mit Trypsinlösung inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Stopmedium beendet, Keratinocyten, die sich dabei teilweise abgelöst haben, wurden mit einer stumpfen Pinzetten von der Hautoberseite abgeschabt und bei 250 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes, Resuspendierung der Pellets in kalter PBS-Lösung und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in KGM resuspendiert und in Zellkulturflaschen mit vorgewärmtem Medium eingesät. Zur Gewinnung von Fibroblastenkulturen wurden die Hautstücke nochmals für 1 h in Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C eingelegt und anschließend wiederum in Stopmedium und PBS geschwenkt. Nach Zentrifugation erfolgte die Einsaat der Fibroblasten in FGM. Keratinocytenkulturen wurden bei maximal 70 % Konfluenz der Zellen im Verhältnis 1:3 verbreitert, Kulturen der 2.-4. Passage wurden für die Versuche verwendet.

Fibroblasten wurden alle zwei Wochen im Verhältnis 1:4 passagiert. Für die Versuche dienten Fibroblasten der 2.-6. Passage.

Murine Fibroblasten. Wild-Typ und S1P₃-KO Fibroblasten wurden aus Mäusehaut unter den gleichen Bedingungen wie humane Fibroblasten isoliert.

Zelllinie A549. Die Kultivierung erfolgte in DMEM unter Zusatz von FKS, Penicillin und Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt.

2.2.2 Viabilitätsbestimmung

Die Überprüfung der Zellviabilität erfolgte mittels einer modifizierten Version des MTT-Tests nach Pagé et al. (Page et al., 1988). Dazu wurden 5×10^4 Zellen pro Loch in eine 24-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf Basalmedium umgesetzt und im Anschluss daran mit den GC stimuliert. Nach 44 h erfolgte die Zugabe von 50 µl MTT-Lösung pro Loch für weitere 4 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Die Dehydrogenasen der Mitochondrien vitaler Zellen bilden dabei enzymatisch aus MTT das blau gefärbte Formazan (Abb. 5), das nach Absaugen des Überstandes in 200 µl DMSO gelöst wurde. Um eine vollständige Lösung zu gewährleisten wurde die Platte 5 min bei 300 rpm geschüttelt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem ELISA-Reader bei 540 nm photometrisch gegen reines DMSO als Leerwert; als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen.

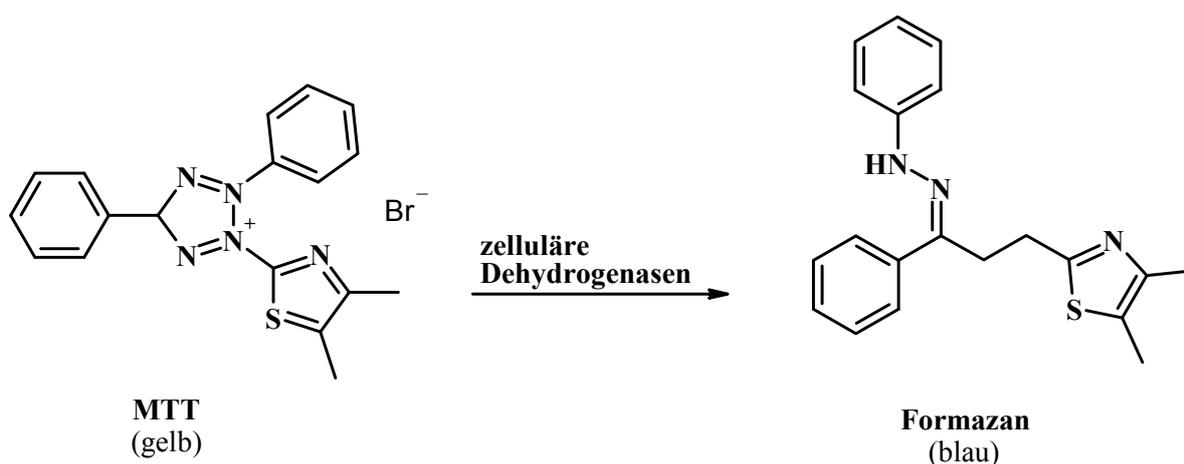


Abb. 5: MTT wird durch zelluläre Dehydrogenasen zum Formazan reduziert (schematisch)

2.2.3 Proliferationsassay

Es wurden 5×10^4 Zellen pro Loch in einer 24-Loch-Platte ausgesät und in Wachstumsmedium über Nacht anwachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Basalmedium mit GC stimuliert. Nach 24 h wurde $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]-Thymidin pro Loch (spezifische Aktivität $35,0 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$) zugesetzt und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS und 5 %iger eiskalter Trichloressigsäure gewaschen. Das Präzipitat wurde durch eine einstündige Inkubation mit $200 \mu\text{l}$ NaOH (0,3 N) unter Schütteln gelöst. $190 \mu\text{l}$ des Lysats wurden entnommen und mit 1,8 ml OptiPhase - Szintillationsflüssigkeit in Eppendorf-Gefäßen bis zur vollständigen Phasenmischung mit dem Vortex-Gerät behandelt. Die durch Radioaktivität hervorgerufene Fluoreszenz des Szintillationscocktails wurde schließlich im β -Counter ermittelt.

2.2.4 Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde die Apoptose- und Nekroserate bestimmt. Phosphatidylserin wird in der frühen Phase der Apoptose zur Außenseite der Plasmamembran der Zelle transloziert (Vermes et al., 1995), damit diese Zellen von Makrophagen erkannt und beseitigt werden können (Fadok et al., 1992). Zellen dieser frühen Phase können durch Färbung mit FITC - gekoppeltem Annexin V, das selektiv an PS bindet, gefärbt und quantifiziert werden (Annexin V^+/PI). Wegen des Verlusts der Membranintegrität bei spätapoptotischen und nekrotischen Zellen können diese zusätzlich mit Propidiumiodid (PI) angefärbt werden (Annexin V^+/PI^+). Frühapoptotische Zellen verfügen noch über eine undurchlässige Zytoplasmamembran, so dass eine PI Färbung ausgeschlossen ist. Durch die Doppelfärbung ist eine Einteilung in frühapoptotische und spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen möglich.

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden 10^5 Fibroblasten in 6-Loch-Platten je Vertiefung ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium gegen das entsprechende Basalmedium ausgetauscht und die Zellen mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert. 24 h nach der Stimulation wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert und 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit $0,5 \text{ ml}$ Annexin V Bindungspuffer gewaschen und in $200 \mu\text{l}$ resuspendiert. Zur Anfärbung der Zellen wurde für 10 min mit Annexin V und im Anschluss daran für weitere 2 min mit PI inkubiert. Die angefärbten Zellen wurden dann mittels der Durchflußzytometrie quantifiziert.

Vor der Quantifizierung musste, wie in *Abb. 6* dargestellt, eine Einstellung des Zytometers nach Größe der Zellen (Forwardscatter) und Granularität (Sidewardsscatter) erfolgen. Anhand von viablen, ungefärbten Zellen wurde die Hauptpopulation ausgewählt (*Abb. 6, A*). Um nur tatsächlich gefärbte Zellen zu erkennen, erfolgte eine Einstellung der FL2- und FL1-Achsen einer ungefärbten Zellpopulation anhand ihrer Eigenfluoreszenzintensität. Dabei sollten sich möglichst alle Zellen im linken unteren Quadranten befinden (*Abb. 6, B*). Zur Unterscheidung der Fluoreszenzemission von Annexin V-FITC (525 nm, FL1) und von PI (575 nm, FL2) musste eine Kompensation jeweils einfach angefarbter Zellen erfolgen (*Abb. 6, C, D*). Doppeltgefärbte viable Zellen sollten möglichst wenige Signale außerhalb des linken unteren Quadranten zeigen (*Abb. 6, E*). Erst nachdem diese Grundeinstellungen erfolgt waren, konnten die Proben vermessen werden.

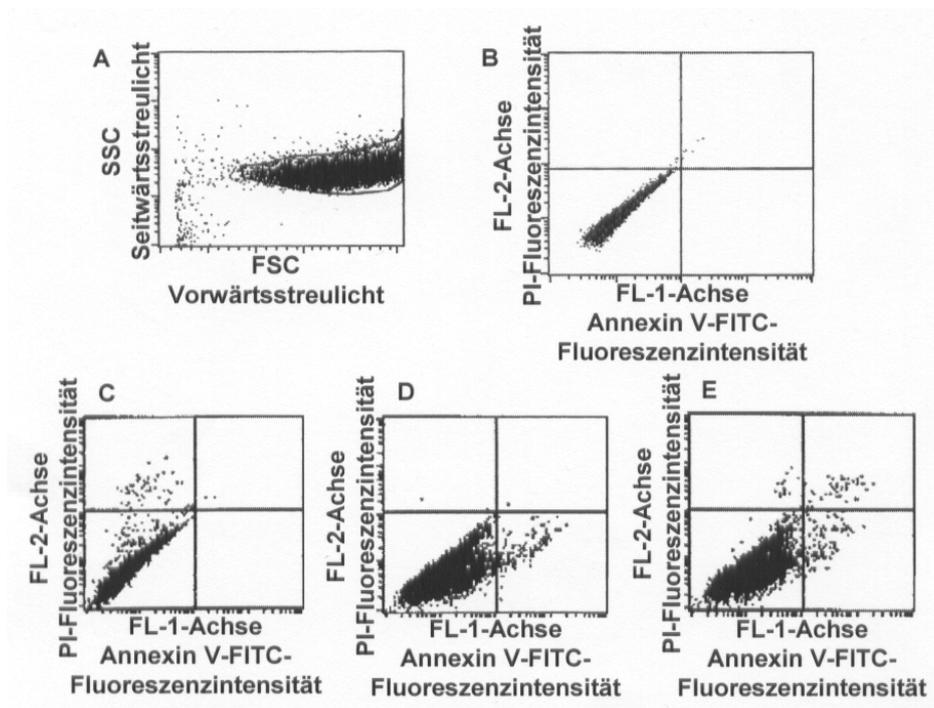


Abb. 6: Grundeinstellungen der Durchflußzytometrie anhand einer viablen Fibroblastenpopulation. A: Auswahl der Hauptzellpopulation nach Größe und Granularität B: Einstellung der ungefärbten Zellpopulation anhand FL1- und FL2- Detektion C: Einstellung PI-einzelgefärbter Zellen D: Einstellung Annexin V-FITC-einzelgefärbter Zellen E: Einstellung doppelt gefärbter Zellen

2.2.5 Transfektion

Um die Bedeutung der Sphingosinkinase 2 (SPHK 2) hinsichtlich der Beeinflussung der Apoptose durch FTY720 und FTY720P zu untersuchen, wurden Antisense-ODN eingesetzt. Hierbei wurde durch Hemmung der Translation die Expression des gewünschten Proteins reduziert. Antisense-ODN wurden so konstruiert, dass sie komplementär die mRNA im Bereich der Initiationsstelle binden, da auf diese Weise eine effektive Hemmung der Translation erzielt wird. Als Antisense-ODN wurde die folgende Sequenz verwendet: 5'-CAGGGGAAGAGGCAGGTCAGACA-3'. Oligonukleotide, bestehend aus identischen Nukleotiden in zufälliger Sequenz, wurden als Kontrollen eingesetzt. Als Kontroll-ODN diente 5'-TGCAAGCTCACCAACCCACATA-3'. Durch Einbau von Phosphothioat-Gruppen konnte die Halbwertszeit der ODN wesentlich verlängert werden, da nicht geschützte ODN aufgrund der im Medium enthaltenen Nukleasen sehr schnell abgebaut werden. Für Antisense Untersuchungen wurden Fibroblasten in einer Zelldichte von 10^5 Zellen in 6-Loch-Platten im entsprechenden Wachstumsmedium kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen. Die ODN (mit einer Endkonzentration von 100 - 250 nM in der Zellkultur) wurden zu einem Volumen von 100 μ l OptiMEM zugegeben und mit Fugene 6[®]-Transfektionsreagenz im Verhältnis 1:2 versehen. Nach 15 min Inkubation wurden pro Zellansatz 100 μ l des Transfektionsmix zupipettiert und die behandelten Zellen für drei Tage im Brutschrank inkubiert.

Die Reduktion der SPHK 2 Expression nach Antisense-ODN Behandlung wurde über eine Westernblot-Analyse bestimmt (Keller et al., 2007).

2.3 Synthese spingelabelter Glucocorticoide

Da mit der Cholestansonde nur eine Modellsubstanz zur Verfügung steht, sollten Arzneistoffe gelabelt und so der ESR Messung zugänglich gemacht werden. Dazu wurden PC, BMV und PD an der in Position C-11 befindlichen OH-Gruppe mit 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carbonsäure (Label) nach den folgenden Vorschriften gelabelt:

Prednicarbat. 1,00 g (2,0 mmol) PC wird in 4 ml trockenem Dichlormethan (CH_2Cl_2) gelöst und anschließend mit 0,618 g (3,0 mmol) DCC, 0,048 g (0,4 mmol) DMAP und 0,592 g (3,0 mmol) Label versetzt und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das

Lösungsmittel entfernt und der Rückstand durch Umkristallisieren aus einem Hexan/Essigester-Gemisch gereinigt. Die Ausbeute beträgt 300 mg (23%).

Betamethason-17-valerat. Da es sich bei BMV um einen Monoester handelt, muss vor der Labelung eine Schutzgruppe eingeführt werden, die im Anschluss an die Labelung wieder abgespalten wird.

Einführung der Schutzgruppe. In einem ausgeheizten und mit Argon gespülten Rundkolben wird zu einer Lösung von 0,500 g (1,05 mmol) BMV, gelöst in 0,7 ml DMF, 0,178 g (2,62 mmol) Imidazol und 0,197 g (1,31 mmol) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid gegeben und die Reaktionsmischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 5 ml CH₂Cl₂/Wasser-Gemisch (1:1) aufgenommen. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit 5 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Umkristallisieren aus einem Hexan/Essigester-Gemisch (1:3) gereinigt. Man erhält 350 mg (57%) silyliertes Produkt.

Labelung. 0,350 g (0,59 mmol) silyliertes BMV wird in 1,2 ml trockenem CH₂Cl₂ gelöst und anschließend mit 0,121 g (0,59 mmol) DCC, 0,14 g (1,15 mmol) DMAP und 0,178 g (0,96 mmol) Label versetzt und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand durch Umkristallisieren aus einem Hexan/Essigester-Gemisch (1:3) gereinigt. Man erhält 120 mg (27%) gelabeltes Produkt.

Abspaltung der Schutzgruppe. Eine Lösung von 0,120 g (0,16 mmol) gelabelten BMV in 1 ml THF wird bei 0 °C unter Argonatmosphäre innerhalb von 20 min tropfenweise mit einer Lösung von 0,135 g (0,425 mmol) Tetrabutylammoniumfluorid Trihydrat in 2 ml THF versetzt. Nach weiteren 5 min bei 0 °C werden nacheinander 4 ml Essigester und 4 ml Wasser zugegeben. Die abgetrennte organische Phase wird dreimal mit je 4 ml Wasser gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Das verbleibende Rohprodukt wird durch Umkristallisieren aus einem Hexan/Essigester-Gemisch gereinigt. Man erhält 35 mg (35%) desilyliertes Produkt.

Prednisolon. In einem ausgeheizten und mit Argon gespülten Rundkolben werden zu einer Lösung von 5,00 g (13,8 mmol) PD, gelöst in 100 ml absolutem DMF, 4,16 g (61,0 mmol) Imidazol und 5 ml (15,8 mmol) 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan gegeben und die Reaktionsmischung zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 ml Toluol/Wasser-Gemisch (1:1) aufgenommen. Die Phasen werden getrennt und die organische Phase wird einmal mit 30 ml

gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Hexan/Essigester) gereinigt. Man erhält 398 mg eines Nebenproduktes und 1,20 g (ca. 14%) einer Mischung aus mono- und bissilyliertem Produkt.

Die 1,20 g (ca. 0,145 mmol) silyliertes Produktgemisch aus dem Versuch zuvor werden in 10 ml trockenem CH₂Cl₂ gelöst und anschließend mit 0,310 g (1.50 mmol) DCC, 0,048 g (0,04 mmol) DMAP und 0,592 g (3,19 mmol) Label versetzt und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand wird durch Umkristallisieren aus einem Hexan/Essigester-Gemisch gereinigt. Man erhält 2384 mg gelabeltes Produkt.

Eine Lösung von 2 g gelabeltes Prednisolonderivat in 5 ml THF wird bei 0 °C unter Argonatmosphäre innerhalb von 20 min tropfenweise mit einer Lösung von 4 g Tetrabutylammoniumfluorid Trihydrat in 20 ml THF versetzt. Nach weiteren 5 min bei 0 °C werden nacheinander 10 ml Essigester und 10 ml Wasser zugegeben. Die abgetrennte organische Phase wird dreimal mit je 5 ml Wasser gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und eingengt. Das verbleibende Rohprodukt wird durch Umkristallisieren aus einem Hexan/Essigester-Gemisch gereinigt. Man erhält 210 mg (4,2 %) desilyliertes Produkt, das noch mit Label verunreinigt ist.

2.4 Partikuläre Arzneistoffträger: Herstellung und Charakterisierung

2.4.1 Nanopartikuläre Arzneistoffträger

SLN, NLC und Nanoemulsion wurden nach dem Prinzip der Hochdruckhomogenisation (Mehnert and Mäder, 2001) in der Abteilung für Pharmazeutische Technologie der FU Berlin mit einem Hochdruckhomogenisator Lab 40[®] hergestellt. Das Lipid (Compritol[®], bzw. Compritol[®] + Miglyol) und der Arznei- bzw. der Modellstoff wurden in einem Glasgefäß auf einer Heizplatte auf 95 °C erhitzt und mit einer gleich warmen wässrigen Poloxamer 188-Lösung mit einem Ultraturax (8000 U/min, 30 Sek.) gemischt. Diese Präemulsion wurde im Hochdruckhomogenisator (auf 95°C temperiert) unter 500 bar in drei Zyklen homogenisiert, in silanisierte Glasgefäße überführt und im 20 °C warmen Wasserbad abgekühlt. Nanosuspensionen und Nanoemulsionen wurden bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

2.4.2 Charakterisierung von Modell- und Arzneistoffinteraktionen mit dem Träger mittels Parelektrischer- und Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie

Parelektrische Spektroskopie. Die Interaktion zwischen Modell- bzw. Arzneistoffen und den Partikeln wurde mittels PS untersucht. Diese Methode erfasst die Antwort von permanenten elektrischen Dipolmomenten auf ein elektrisches Wechselfeld, die Grundlagen sind seit 1930 bekannt. Erst seit wenigen Jahren können diese Antworten, ausgedrückt in den frequenzabhängigen Dielektrizitätskonstanten, messtechnisch verlässlich und schnell erfasst werden. Die Messgrößen Dipoldichte und -beweglichkeit beschreiben wichtige Wechselwirkungen zwischen nanopartikulären Trägern und Modell- bzw. Arzneistoffen.

Grundlagen der PS. Trotz kompensierter Gesamtladung liegen in vielen Molekülen die Schwerpunkte von positiver Ladung $+Q$ und negativer Ladung $-Q$ um den Abstand s auseinander. Dann besitzt dieses Teilchen ein permanentes elektrisches Dipolmoment \underline{p}

$$\underline{p} = Q \underline{s}$$

In einem äußeren elektrischen Feld \underline{E} möchte sich \underline{p} in Feldrichtung einstellen, weil dies der Zustand der geringsten Energie ist. Wäre dieses Bestreben allein maßgebend, würden bereits geringste Feldstärken \underline{E} alle N im Volumen V enthaltener Dipole \underline{p} zur Polarisation \underline{P}

$$\underline{P} = \sum_{i=1}^N \underline{p}_i / V$$

ausrichten. Die dipoltragenden Moleküle nehmen aber an der Wärmebewegung teil und diese will den ‚Zustand größter Unordnung‘, d.h. $\underline{P}=0$ erzwingen. Diese konkurrierenden Effekte sind für die Polarisationsantwort \underline{P} verantwortlich, die proportional zum Feld \underline{E} an der Probe ist. Dies macht die Definition der Dielektrizitätskonstanten ε sinnvoll, nämlich

$$\varepsilon = 1 + (1/\varepsilon_0) P/E.$$

Hierbei ist die Influenzkonstante $\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$ eine Naturkonstante.

Unterwerfen wir nun unsere Substanz einem Wechselfeld $\underline{E} = \underline{E}(t)$ mit der variierbaren Frequenz f , wird auch $\underline{P} = \underline{P}(t)$ zeitabhängig mit der Frequenz f . Wenn wir mit dem Feld

$$\underline{E}(t) = \underline{E}_0 \sin(2\pi ft)$$

arbeiten, enthält die Antwort $\underline{P}(t)$ den mit $\sin(2\pi ft)$ und mit dem $\cos(2\pi ft)$ antwortenden Anteil, d.h. die Dispersionsantwort $\underline{P}'(f)$ und die Absorptionsantwort $\underline{P}''(f)$:

$$\underline{P}(t) = \underline{P}'(f) \sin(2\pi ft) + \underline{P}''(f) \cos(2\pi ft).$$

Erhöhen wir kontinuierlich die Frequenz f , können anfänglich die Dipole den Feldwechsel von $\underline{E}(t)$ noch folgen, bei höheren Frequenzen schließt dies jedoch die Massenträgheit der Dipol - tragenden Moleküle aus, die Polarisationsantwort $P(t)$ geht gegen Null. Hier muss noch eine Ergänzung angebracht werden: Die sonst unpolaren Atome bilden im Feld $E(t)$ ein induziertes Dipolmoment, welches aufgrund der sehr viel geringeren Masse der Elektronenhülle erst bei sehr viel höheren Frequenzen ($\rightarrow \approx 10^{15}$ Hz) dem Feldwechsel nicht mehr folgen kann. Mit steigender Frequenz f geht also \underline{P} nicht gegen Null, sondern verharrt zunächst auf einem Zwischenwert. Da aber nur im Bereich 0,01MHz -1000MHz gemessen wird, darf dieser Wert als konstant angenommen werden. Die sehr leichten Wassermoleküle in unseren Dispersionen bzw. Emulsionen dürfen wir ebenso zu diesem Zwischenwert rechnen, da Wasser erst bei Frequenzen von etwa 18 000 MHz dem Feldwechsel nicht mehr folgen kann.

Zum besseren Verständnis wird die Polarisation $\underline{P}(t)$ über der Frequenz f halblogarithmisch aufgetragen:

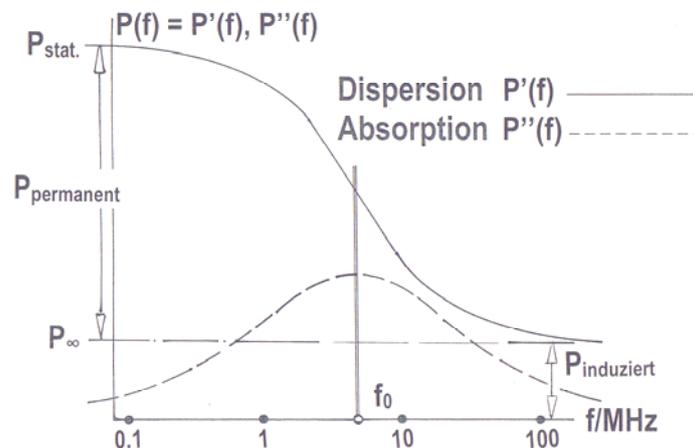


Abb. 7: Polarisation in Abhängigkeit von der Frequenz. Bei sehr tiefen Frequenzen tragen die permanenten und die induzierten Dipole zum Wert P_{stat} bei. Bei sehr hohen Frequenzen sinkt P auf den Wert P_{∞} . Im Wendepunkt der Dispersionskurve $P'(f)$ und damit zugleich im Maximum der Absorptionskurve $P''(f)$ hat die Frequenz gerade den ausgezeichneten Wert f_0 .

P. Debye drückte diese Zusammenhänge bereits 1930 (Kremer, 2002) in den später nach ihm benannten Gleichungen für die oben eingeführte Dielektrizitätskonstante $\epsilon(f)$ aus. Auch hier

ist der Einfluss der interessierenden permanenten Dipole durch $\Delta \epsilon$ und der Einfluss der hier uninteressanten induzierten Dipole durch ϵ_∞ beschrieben. Die Frequenz f_0 ist die zweite für die Wirkstoff-Träger-Interaktion wichtige Aussage. Für den Fall einer eventuell vorhandenen elektrischen Leitfähigkeit müssen wir – nur in der Absorptionsantwort – noch einen frequenzabhängigen Summanden berücksichtigen:

$$\text{Dispersion: } \epsilon'(f) = \epsilon_\infty + \Delta \epsilon / (1+f^2/f_0^2) ,$$

$$\text{Absorption: } \epsilon''(f) = k/f + \Delta \epsilon \cdot (f/f_0) / (1+f^2/f_0^2) .$$

Uns interessierende Parameter sind Dipoldichte $\Delta \epsilon$ und Dipolbeweglichkeit f_0 .

Messung von $\epsilon'(f)$ und $\epsilon''(f)$. Ein Sender speist eine elektromagnetische Welle einstellbarer Frequenz in ein offenendiges Koaxialkabel. Abgeschnittener Innen- und Außenleiter bilden einen „Kondensator“, der in die Proben eintaucht. An diesem substanzgefüllten Kondensator wird die Welle reflektiert. Ein Empfänger vergleicht die rücklaufende Welle bezüglich Amplitude und möglicher Verschiebung mit der Sendewelle (Abb. 8). Eine solche Anordnung steht in kommerziellen Frequenz-Analysatoren seit wenigen Jahren zur schnellen Messung von $\epsilon(f)$ zur Verfügung.

Es wurde ein Analysator der Firma Rohde & Schwarz benutzt, der im Frequenzbereich 0,1-100 MHz oder 1-1000 MHz die Kurven $\epsilon'(f)$, $\epsilon''(f)$ in 200 logarithmisch äquidistanten Schritten misst. Bei allen im Folgenden vorgestellten Messergebnissen und deren Deutung sind folgende Fehler zu erwarten:

$$\Delta \epsilon: \pm 5 \% \quad f_0: \pm 3 \%$$

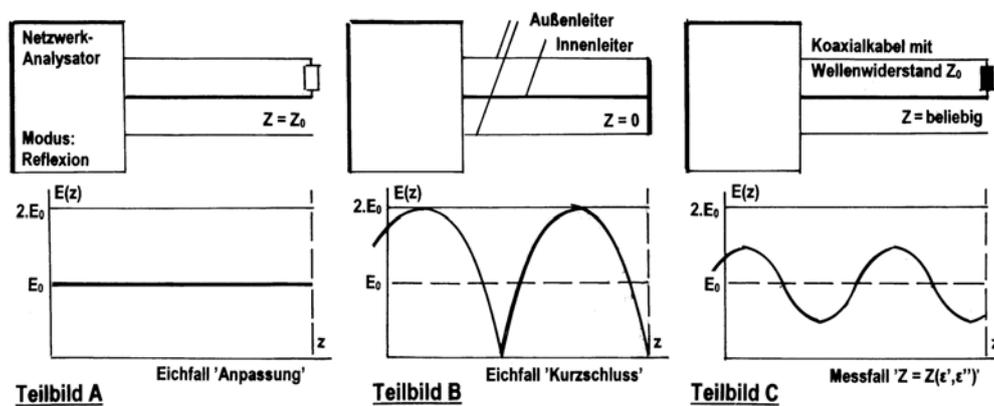


Abb. 8: Ist das Koaxialkabel mit seinem Wellenwiderstand abgeschlossen, tritt keine Reflexion auf, und die Amplitude ist über die gesamte Kabellänge konstant ($E=E_0$, A). Im Falle eines Kurzschlusses wird die gesamte Welle

in sich zurückgeworfen und wir finden eine „stehende“ Welle, deren Amplitude längs des Koaxialkabels zwischen $E=0$ und $E=2$ schwankt (E_0 , B). Bei einem beliebigen Abschluss (z.B. durch unsere Proben) tritt stets ein Zwischenbild auf: Die Amplituden längs des Kabel erreichen weder E_0 noch gehen sie auf Null zurück und die Lage des Minimums ist verschoben (C). Aus dieser eigentlichen Messung filtert der Analysator zwei Messgrößen, aus denen er für jede eingestellte Frequenz die beiden Größen Dispersion $\varepsilon'(f)$ und Absorption $\varepsilon''(f)$ errechnet.

Elektronen-Spinresonanz-Spektroskopie. Mithilfe der Elektronen-Spinresonanz-Spektroskopie (ESR) sollten die Ergebnisse der PS verifiziert werden. Da nur Moleküle mit ungepaartem Elektronenpaar ESR aktiv sind, wurde ein entsprechendes Modellmolekül sowie zu diesem Zweck gelabelte GC eingesetzt.

Grundlagen der ESR. Die ESR gehört zur Gruppe der magnetischen Resonanzmethoden. Das Spektrum entsteht nach Absorption eines bestimmten Energiebetrags, der im untersuchten System einen Übergang, z.B. eines Elektrons, von einem energetisch niedrigeren in ein energetisch höheres Niveau bewirkt. Dieser Betrag der absorbierten Energiemenge ΔE lässt sich mit

$$\Delta E = h \nu$$

h: Plancksches Wirkungsquantum

ν : Frequenz

beschreiben.

In einem homogenen Magnetfeld wird für Elektronen der entartete Spin-Zustand aufgehoben, so dass ein Übergang in unvollständig besetzte Orbitale möglich wird. Das Messprinzip der ESR beruht auf der Absorption von Mikrowellenenergie beim Übergang von Elektronenspins aus einem Grundzustand in einen angeregten Zustand. Befindet sich ein Elektron in einem magnetischen Feld H , kann sich der Spinvektor parallel oder antiparallel zum angelegten magnetischen Feld H ausrichten.

Die Spinquantenzahl S eines Elektrons beträgt $\pm \frac{1}{2}$, folglich ist die Energie eines Elektrons in einem magnetischen Feld entweder mit

$$E_1 = + \frac{1}{2}g_e\beta_e H$$

oder

$$E_2 = - \frac{1}{2}g_e\beta_e H$$

zu beschreiben. Diese Energieaufspaltung eines Elektrons durch Anlegen eines magnetischen Feldes bezeichnet man als Zeeman-Aufspaltung. Die Energiedifferenz zwischen den zwei Spinzuständen des Elektrons beschreibt

$$\Delta E = E_1 - E_2 = g_e\beta_e H.$$

Die Messung dieser Energiedifferenz ist die Grundlage der ESR-Experimente. Das Anlegen eines Mikrowellenfeldes mit Quanten ($h \nu$) eines Energiebetrags gleich $g_e\beta_e H$ in senkrechter Orientierung zum Magnetfeld H bewirkt den Übergang des Elektronenspins zwischen den beiden Zuständen.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der ESR und der ebenfalls zu den magnetischen Resonanzmethoden gehörenden Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) ist bedingt durch die unterschiedlichen Massen von Kern und Elektron und die daraus resultierenden unterschiedlichen magnetischen Momente. Daraus ergeben sich Unterschiede in Bezug auf die zur Anregung erforderliche Magnetfeld-Frequenz-Kombination und auch im Zeitfenster zwischen ESR und NMR. Heute werden in der NMR Frequenzen bis 800 MHz verwendet, während in der ESR der Bereich 9 - 360 GHz dominiert.

Daraus resultieren unterschiedliche Zeitfenster und die Empfindlichkeiten der Methoden. Die Anwendung der X-Band ESR mit Frequenzen um 9 GHz gestattet es, Prozesse vom Mikrosekundenbereich bis in den Pikosekundenbereich zeitlich direkt zu verfolgen. Aus den unterschiedlichen Massen und damit unterschiedlichen magnetischen Momenten von Kern und Elektron ergibt sich eine höhere Empfindlichkeit der ESR, da die Besetzungsunterschiede der Energieniveaus im thermischen Gleichgewicht der Boltzmannverteilung folgen. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang, dass sich freie Radikale mit der ESR noch im nanomolaren Bereich nachweisen lassen.

Bezüglich der Nachweisgrenze kann die kleinstmögliche detektierbare Zahl paramagnetischer Zentren N_{\min} bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 1 durch die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$N_{\min} = \frac{3V_c k_b T_s \Gamma}{2\eta g^2 \beta_e^2 S(S+1) B_r Q_U} \left(\frac{F k_b T_d b}{P_0} \right)^{1/2}$$

V_c : Volumen des Resonators in m^3

k_b : Boltzmann-Konstante in JK^{-1}

T_s : Temperatur der Probe in K

Γ : halbe Linienbreite auf halber Höhe einer einzelnen Absorptionslinie in mT

β_e : Bohrsches Magneton

S : Spinquantenzahl

B_r : magnetische Induktion im Zentrum der Absorptionslinie in mT

Q_U : Güte des unbelasteten Resonators

T_d : Temperatur des Mikrowellendetektors in K

b : Bandbreite des gesamten Detektions- und Verstärkungssystems in s^{-1}

P_0 : Mikrowellenleistung in W

F : ein Rauschfaktor >1 (im Idealfall sollte $F=1$ gelten).

Eine Abschätzung nach obiger Gleichung unter der Voraussetzung, dass die Absorptionslinie Lorentzform besitzt, das Curiesche Gesetz gilt und keine Mikrowellensättigung eintritt, ergibt mit typischen Größen einen Wert von $N_{\min} \approx 10^{11}$ Spins. Für eine gewöhnlich verwendete Probe ergibt sich damit eine minimal nachweisbare Konzentration an paramagnetischen Zentren von $\sim 10^{-9}$ M. Solche Werte werden gern von den Herstellern handelsüblicher ESR-Spektrometer zitiert. Oft kommt es schon bei Mikrowellenleistungen über 1 mW zu einem beträchtlichen Sättigungsverhalten und so ergeben sich schnell sehr viel geringere Empfindlichkeiten.

Im Fall der Existenz eines magnetischen Moments (Kernspin $I \neq 0$) des Atomkerns kommt es zu einer Wechselwirkung mit dem ungepaarten Elektron und die Energieniveaus E_1 und E_2 spalten in Abhängigkeit von der Kernspinquantenzahl I in $2I + 1$ Übergänge auf (Abb. 9) Aufgrund der Auswahlregel, die nur Übergänge mit $\Delta M_S = \pm 1$ erlaubt (z.B. $-\frac{1}{2} \rightarrow +\frac{1}{2}$, $-1 \rightarrow 0 \rightarrow +1$), ergibt sich für ein ungepaartes Elektron am Stickstoff (^{14}N : $I = 1$) ein symmetrisches Spektrum aus drei Linien, d.h. es werden $2S(2I + 1)$ Übergänge erzeugt.

Die Energieniveaus des Elektrons können also durch Überlagerung des eigentlichen Resonanzfeldes mit den Kernfeldern in folgender Weise beschrieben werden:

$$h\nu = g_e\beta_e H + m_I A$$

m_I : Kernspin (für ^{14}N mit $I = 1$ kann die Werte $-1, 0$ und $+1$ annehmen)

A : Hyperfeinkopplungskonstante (a_N isotrope Hyperfeinaufspaltung am Stickstoffkern)

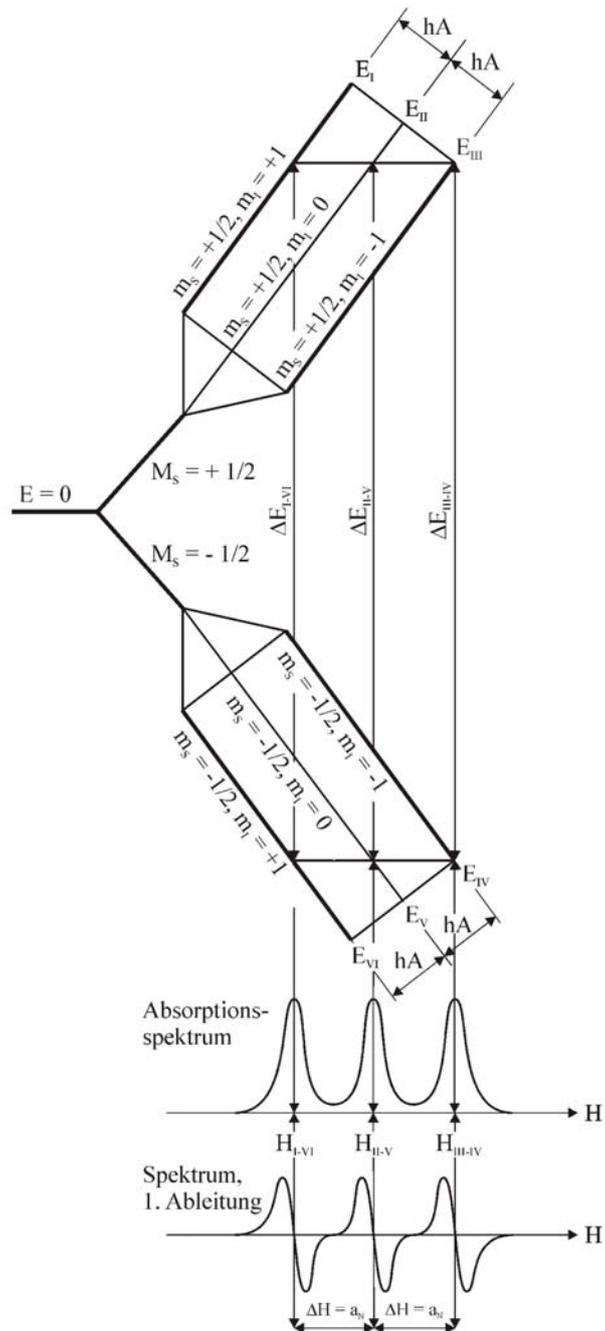


Abb. 9: Aufspaltung der Energieniveaus eines ungepaarten Elektrons ($S = 1/2$) im homogenen Magnetfeld durch Wechselwirkungen mit dem magnetischen Moment eines Stickstoffkerns ($I = 1$)

Diese Form der Aufspaltung des ESR-Signals in mehrere (gleichartige) Linien geht von einer kugelsymmetrischen Verteilung der Ladungen aus, die aber in der Natur nur selten vorkommt. Das trifft auf die in den durchgeführten Untersuchungen eingesetzten Spinsonden zu. Eine völlige Gleichartigkeit der drei Linien ist daher nur möglich, wenn keine Anisotropien auftreten können. Dies ist in der Regel gegeben, wenn sich die Spinsonden in niedrigviskosen Lösungen befinden, in denen die einzelnen Moleküle aufgrund ihrer ungeordneten Bewegung Anisotropien ausmitteln. In einem solchen Fall spricht man von einem isotropen Spektrum. Im anisotropen Fall werden sowohl der g-Faktor als auch die isotrope Hyperfeinaufspaltungskonstante durch die entsprechenden Kopplungsmatrices \hat{g} und \hat{A} ersetzt.

Diese Betrachtungen sind für die beschriebenen Vorgänge von großer Bedeutung. Da die Hyperfeinkopplungskonstante A die Wechselwirkung zwischen dem Kern- und dem Elektronenspin widerspiegelt, die energetischen Zustände im Kern aber als konstant betrachtet werden können, ist A ein empfindlicher Parameter für alle Veränderungen in der Spindichte im Molekül. Da das ungepaarte Elektron in erster Linie mit seiner Umgebung wechselwirkt, wird sich jede Veränderung in dieser Umgebung auch auf die Hyperfeinkopplungskonstante auswirken. Diesen Umstand kann man sich zur Charakterisierung von mit Spinlabeln beladenen Trägersystemen zunutze machen.

Anisotrope Spektren von Spinsondenlösungen lassen sich unter Berücksichtigung der Viskosität des Lösungsmittels interpretieren. Aus der Kenntnis heraus, dass sich anisotrope ESR-Signale von Spinsonden in Lösungen geringerer Viskosität aufgrund der Brownschen Molekularbewegung ausmitteln (es sind drei gleiche Linien gleicher Intensität zu beobachten), kann eine beginnende anisotrope Aufspaltung als Maß für die Behinderung der Rotation des Spinsondenmoleküls und damit der Viskosität des Lösungsmittels verwendet werden. Da nur die Lösungsmittelmoleküle in unmittelbarer Umgebung der Spinsonde mit dieser wechselwirken, hat diese Methode den Vorteil, dass man eine Information über die Sonde in Form einer Mikroviskosität erhalten kann. Aus dem ESR-Spektrum lässt sich die Rotationskorrelationszeit τ_R ermitteln, die über die Stokes-Einstein-Beziehung

$$\tau_R = \frac{4\pi\eta a^3}{3kT}$$

mit der Viskosität in Verbindung steht. Mit Hilfe einer empirischen Beziehung

$$\tau_R = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta B_0 \left(\sqrt{h_0/h_{-1}} - 1 \right)$$

ΔB_0 : Linienbreite der mittleren Linie

h_0 / h_{-1} : Intensität der mittleren zur Hochfeldlinie des Drei-Linien-Spektrums

lassen sich in vereinfachter Weise die Rotationskorrelationszeiten aus den ESR-Spektren ermitteln.

2.5 Statistik

Alle Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte angegeben. Als Maß für die Streuung wurde die Standardabweichung (\pm SD) angegeben. Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Der Student's t-Test wurde zur Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten herangezogen. Zuvor wurde die Homogenitäten der Varianzen mittels des F-Tests überprüft. Erwiesen sich die Varianzen als inhomogen, wurde der Welch-Test verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α wurde auf 5 % festgelegt.