

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Mikroverkapselte Proteine

FITC-BSA. Das verwendete Fluoresceinisothiocyanat-gekoppelte bovine Serumalbumin besaß ein Fluorophor-zu-Protein-Verhältnis von 10:1 und wurde von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen (A9771-250mg, Charge 041K7535, hergestellt aus BSA A4378, Sigma).

BSA. Ausgangssubstanz zur Herstellung von FITC-BSA bei Sigma. Bezogen von Sigma (A4378, Taufkirchen, Deutschland). Reinheit > 97 %, Fettsäuregehalt 0,1-1 %.

Bioabbaubare Polymere

Resomer[®] RG 502 H. Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) 50:50 mit freien Carboxyl-Endgruppen, bezogen von Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Deutschland), wurde im Rahmen dieser Arbeit als Standardpolymer eingesetzt. Verwendet wurden die Chargen 1005072 (inhärente Viskosität [i. V.] 0,18 dl/g) und 1006825 (i. V. 0,19 dl/g).

Resomer[®] RG 503 H. Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) 50:50 mit freien Carboxyl-Endgruppen von Boehringer Ingelheim (i. V. 0,32-0,44 dl/g).

Resomer[®] RG 503. Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) 50:50 mit veresterten Carboxyl-Endgruppen von Boehringer Ingelheim (i. V. 0,32-0,44 dl/g).

Resomer[®] LR 706. Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) 70:30 mit veresterten Carboxyl-Endgruppen von Boehringer Ingelheim (i. V. 3,3-4,2 dl/g).

Resomer[®] L 210. Poly(L-Lactid) mit veresterten Carboxyl-Endgruppen von Boehringer Ingelheim (i. V. 3,3-4,3 dl/g).

PHB-co-HV. Poly(3-Hydroxybuttersäure-co-3-Hydroxyvaleriansäure) mit einem Hydroxyvaleriansäureanteil von 11,9 % (m/m) von Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) [Produkt-nummer 403121, Charge 13915CO].

Stabilisatoren/Oberflächenmodifizierung von Mikropartikeln

PVA. Polyvinylalkohol, Mowiol® 4-88 (Kuraray Specialities Europe, Frankfurt a. M., Deutschland), mit einem Deacetylierungsgrad von 88 % und einer Viskosität von 3,5-4,5 mPa·s.

CTAB. Cetyltrimethylammoniumbromid von Merck (Darmstadt, Deutschland).

Chitosan. Produktnummer 90/200/A1 von Hepe GmbH (Queis, Deutschland), mit einem Deacetylierungsgrad von 90 % und einer Viskosität von 170 cps.

DEAE-Dextran. Dextran mit Diethylaminoethylfunktionen am C 6, von Pharmacia (Uppsala, Schweden) mit einem Molekulargewicht von $2 \cdot 10^6$ Da.

Charakterisierung der Mikropartikel

MTP. Die zur Quantifizierung von Detergenzien eingesetzten 96 Well Rotilabo® Mikrotiterplatten wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Cibacron Brilliant Red 3B-A. Zur Quantifizierung von Chitosan genutzter Farbstoff (Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), Synonym: Reactive Red 4.

LAL-Test. Die Prüfung auf Bakterien-Endotoxine erfolgte mit dem Pyrotell®-Kit der Pyroquant Diagnostik GmbH (Mörfeld-Walldorf, Deutschland) mit einer Empfindlichkeit λ von 0,06 Endotoxin Einheiten pro Milliliter (EU/ml).

Weitere Chemikalien. Alle verwendeten Lösungsmittel, Puffer und sonstigen Chemikalien besaßen Analysenqualität. Die Zusammensetzung der Reagenzien wird bei der Beschreibung der Methode erläutert.

Charakterisierung des Modellproteins

Bradford-Assay. Die Proteinquantifizierung nach Bradford erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Die verwendeten 96 Well Rotilabo® Mikrotiterplatten wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Lowry-Assay. Das Folin-Ciocalteu-Reagenz stammte von Merck (Darmstadt, Deutschland) und die 96 Well Rotilabo® Mikrotiterplatten von Roth (Karlsruhe, Deutschland). Die Zusammensetzung des Natriummaleat-Puffers wurde von Rauen 1964 beschrieben.

2. Material und Methoden

BCA-Assay. Der in ersten Experimenten verwendete, kommerziell erhältliche BCA-Kit stammte von Sigma (Taufkirchen, Deutschland). Die verwendeten 96 Well Rotilabo[®] Mikrotiterplatten wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Silber-Dithizon-Assay. Dithizon wurde von Merck (Darmstadt, Deutschland), Triton X-100 von der Acris Feinchemikalien GmbH (Heidelberg, Deutschland) und die Rotilabo[®] Mikrotiterplatten von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

ELISA. Für den enzymgekoppelten Immunsorptions-Assay wurden die folgenden Materialien eingesetzt: Rotilabo[®] Mikrotiterplatten (Roth, Karlsruhe, Deutschland), phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland), flüssige Fischgelatine (Kat.Nr. 22156, Charge 14821, Serva Elektrophoresis, Heidelberg, Deutschland), Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte BSA-Antikörper (R1048HRP, Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland), Tabletten mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB, Sigma, Taufkirchen, Deutschland).

Proteasen und Proteaseinhibitoren. In Proteolyseexperimenten wurden Trypsin (20.000 U/g, Merck, Darmstadt, Deutschland) und Proteinase K (13,7 U/mg, Sigma, St. Louis, USA) eingesetzt. Als Proteaseinhibitoren wurde der Protease Inhibitor Cocktail P 2714 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) sowie Complete Mini und Complete Mini EDTA-frei (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bei Untersuchungen zur Lagerstabilität von FITC-BSA eingesetzt.

PAGE. In der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden im Auftragepuffer Glycerol (frei von DNase, RNase und Protease; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und Bromphenolblau (Natriumsalz, Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland), sowie 1 mm dicke 10 Well 4-20 % Tris-Glycin-Gradienten-Gele (Novex Electrophoresis GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland) eingesetzt. Für die SDS-PAGE wurden Rotiphorese Gel 30 (37,5 : 1, 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid, Roth, Karlsruhe, Deutschland), Ammoniumpersulfat (APS, Roth), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, Roth), zwei Marker (Protein Ladder 10-200 kDa, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland; BenchmarkTM Prestained Protein Ladder, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Wie bei der Methodenbeschreibung näher erläutert, wurde zur Gelfärbung unter anderem Coomassie[®] Brilliant Blue R-250 (Serva Feinbiochemica GmbH & Co) und ein kommerziell verfügbarer Silber-Färbe-Kit (Silver Stain Kit, Art.Nr. 5197, Merck, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Zur Geltrocknung wurden Cellophanpapiere und Geltrocknungsrahmen von Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder der Novex Electrophoresis GmbH (Frankfurt a. M., Deutschland) genutzt.

2. Material und Methoden

SEC. Die Größenausschlusschromatographie wurde auf einer Waters HPLC-Anlage (Eschborn, Deutschland; Waters 515 Pumpen, Waters 717 plus Autosampler, Waters 474 Fluoreszenzdetektor [Exzitation 495 nm, Emmission 525 nm], Waters 996 Photodiode array [280 nm]) mit einer SynChropak GPC 300 A Säule (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt.

Weitere Chemikalien. Alle verwendeten Lösungsmittel, Puffer und sonstigen Chemikalien besaßen Analysenqualität. Die Zusammensetzung der Reagenzien wird bei der Beschreibung der Methode erläutert.

Materialien in der Zellkultur

Medien. Als Elutriationsmedium für die Monozyten-Isolierung wurde HBSS (Hanks Basal salt solution, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) unter Zusatz von 1 % BSA verwendet. Die Zellkultur erfolgte in komplettem RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute), bestehend aus RPMI 1640 unter Zusatz von 1 % L-Glutamin, 10 µg/ml Gentamicin und 2,5 % autologem Serum (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien).

MTP. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 6 Well oder 24 Well TC-Mikrotiterplatten für die Zellkultur (tissue culture) von der Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen, Deutschland) oder von Nunc (Wiesbaden, Deutschland).

Zytokine. In der Kultivierung von Monozyten bzw. der Generierung von dendritischen Zellen wurden Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF; Sargramostim, Berlex, Richmond, USA), Interleukin 4 (IL-4; CellGenix, Freiburg, Deutschland), Tumornekrose Faktor α (TNF α), IL-1 β , IL-6 (alle von RD Systems, Wiesbaden, Deutschland) sowie Prostaglandin E₂ (PGE₂; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) verwendet.

Antikörper. Die Untersuchung von Zellen durch direkte Immunfluoreszenz-Methoden erfolgte nach Färbung der Zellen mit monoklonalen fluoreszenzmarkierten Maus-anti-Human Antikörpern (s. Tab. 10). Das zur Blockierung verwendete Kaninchenserum stammte von der Biochrom AG (Berlin, Deutschland). Als Farbstoffe wurden Phycoerythrin (PE; Emission 585 nm) und ein Phycoerythrin-Cyanin-Konjugat (Pc5; Em. 670 nm) verwendet (sofern nicht anders angegeben), so dass es keine Störung durch die FITC-Fluoreszenz (Em. 530 nm) der FITC-BSA beladenen Mikropartikel gab. Die Antikörper zur Isotypenkontrolle stammten von Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland).

2. Material und Methoden

Vitalität der Zellen und Lokalisation der Mikropartikel. Die Vitalität von Zellen wurde mit dem Farbstoff Propidiumiodid (Stammlösung 50 µg/ml, BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien) geprüft, der sich in die DNA toter Zellen einlagert. Cytochalasin D (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) hemmt die Bildung intakter Mikrofilamente und damit die Phagozytose. Trypanblau (Stammlösung 0,4 %, Sigma) färbt das Zytoplasma toter Zellen und löscht bei intakten Zellen extrazelluläre, aber nicht intrazelluläre FITC-Fluoreszenz.

Tab. 10: Übersicht der verwendeten fluoreszenzmarkierten Maus-anti-Human Antikörper

Zell-antigen	Farbstoff	Vorkommen	Funktion	Klon	Hersteller
HLA-DR ^a	PE ^b	APCs ^c	MHC II ^d Molekül, Antigenpräsentation	B8.12.2, IgG2b	Beckmann Coulter ^e
CD 1a	Pc5 ^f	iDCs ^g , Langerhans-Z., nicht: Monozyten	MHC I ^d ähnl. Molekül, Antigenpräsentation	BL6, IgG1	Beckmann Coulter
CD 14	Pc5	myelomonozyt. Zellen	Rez. für Komplex aus LPS ^h und LBP ⁱ	RMO52, IgG2a	Beckmann Coulter
CD 80	PE	DCs, Monozyt., Makrophag.; auch B-Z.	costimulatorisches Molekül (B 7.1)	L307.4, IgG1	BD Pharmingen ^j
CD 83	Pc5	Reife DCs	unbekannt	HB15a, IgG2b	Beckmann Coulter
CD 86	PE	DCs, Makrophagen, aktivierte B-Zellen	costimulatorisches Molekül (B 7.2)	23331, IgG1	BD Pharmingen
CD 209 DC-SIGN ^k	PE	DCs	Interaktion mit T-Zellen, bindet u.a. virale Glykoproteine	AZND1, IgG2b	Beckmann Coulter

^ahumanes Leukozytenantigen (HLA; Bezeichnung für menschliche MHC-Komplexe, s. ^d; hier DR-Gene von MHC II); ^bPhycoerythrin; ^cAntigenpräsentierende Zelle; ^dmajor histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex), Gruppe von Genen, die für MHC-Moleküle vom Typ I (auf APCs^c) und Typ II (auf fast allen Körperzellen) kodieren und so das individuelle Erkennen von körpereigenen und körperfremden Strukturen vermitteln; ^eBeckmann Coulter, Krefeld, Deutschland; ^f Phycoerythrin-Cyanin-Konjugat; ^gdendritische Zelle; ^hLipopolysaccharide, ⁱLPS-bindendes Protein; ^jBD Pharmingen, Erembodegem, Belgien; ^kdendritic cell-specific ICAM3-grapping non-integrin.

Pipetten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im eigenen Haus mit den folgenden Kolbenhubpipetten gearbeitet, die einmal jährlich durch Kontrollwägungen auf ihre Pipettiergenauigkeit überprüft wurden: Eppendorf 0,5-10 µl, Eppendorf 10-100 µl, Eppendorf Research 100-1000 µl, Eppendorf Research 500-5000 µl und Eppendorf Multipette (Eppendorf, Hamburg,

Deutschland). Die verwendeten Mehrkanalpipetten 25-200 μl und 50-300 μl stammen von Dunn Labortechnik GmbH (Asbach, Deutschland; hergestellt von Capp A/S, Odense, Dänemark).

2.2 Herstellung von Mikropartikeln

Primäremulgierung

Als W_1 -Phase wurde eine Lösung von 10 mg/ml FITC-BSA in 10 mM Tris-Puffer pH 7,0 verwendet, die im Vorfeld unter sterilen Bedingungen hergestellt, aliquotiert und bei $-48\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert wurde. Das Matrixpolymer (5 % (m/m) Resomer RG 502 H, sofern nicht anders angegeben) wurde in einer sterilen 10 ml Polypropylen-Spritze ohne Kolben in Dichlormethan gelöst (O-Phase). 200 μl der W_1 -Phase wurden zu 4 g der O-Phase pipettiert und unter Bildung der W_1/O -Primäremulsion mit einer der folgenden Methoden dispergiert (entspricht einer 1%igen Beladung mit FITC-BSA). Im Rahmen der Untersuchungen zu CTAB-modifizierten Mikropartikeln wurde die W_1 -Phase durch PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) ersetzt und die Primäremulgierung stets mit dem Ultra-Turrax[®] durchgeführt.

Rotor-Stator-Homogenisator. Mit Hilfe des S 25 N-10 G Mikrostabes eines Ultra-Turrax[®] T 25 Homogenisators (Jahnke & Kunkel, Staufen, Deutschland) wurde die Primäremulgierung für 60 Sekunden bei 24.000 U/min in der Polypropylenspritze ausgeführt.

Ultraschall. Die Dispergierung erfolgte in der Polypropylenspritze unter Kühlung in einem Wasserbad durch einen Sonopuls[®] HD 70 (Bandelin, Berlin, Deutschland) Hochleistungs-Desintegrator mit einer MS 73 Sonotrode für 60 Sekunden bei maximaler Leistung.

Hochdruckhomogenisation. Zunächst wurde eine Präemulgierung mit dem Ultra-Turrax[®] durchgeführt, anschließend wurde in 3 Zyklen die Probe in den druckluftbetriebenen EmulsiFlex[®] B3 (Avestin Inc., Ottawa, Kanada) eingesaugt und durch langsames Öffnen des Spaltes innerhalb von 30 Sekunden wieder aus dem Kolben-Spalt-Homogenisator entlassen. Die Druckluft wurde auf 1,5, 2,5 oder 3,5 bar eingestellt, was einem hydraulischen Druck von 300, 500 bzw. 700 bar entspricht. Die in dem Homogenisator vorhandenen Viton[®]-Dichtungen wurden durch das hochresistente Kalrez[®] ersetzt.

Sekundäremulgierung

Der experimentelle Aufbau für die Sekundäremulgierung ist in Abbildung 18 dargestellt. Nach der Primäremulgierung wurde die Polypropylenspritze auf einer Spritzenpumpe (Typ 540200, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) befestigt und über HPLC-Anschlüsse mit einem Einlass des Mikromischers (s. Abschnitt 1.3 und Abb. 12) verbunden. Der andere Einlass des Mikromischers wurde mit einer Masterkron 4 HPLC-Pumpe (Kronwald, Sinsheim, Deutschland) verbunden, die die externe Wasserphase (W_2) transportierte. Die Flussrate von W_2 wurde während der Prozessoptimierung im Bereich von 5 bis 25 ml/min verändert, anschließend wurden 25 ml/min verwendet. Die Flussrate für die W_1/O -Phase betrug stets $1/25$ der Flussrate von W_2 . Die resultierende $W_1/O/W_2$ -Sekundäremulsion wurde in einem Becherglas auf einem Magnetrührer aufgefangen.

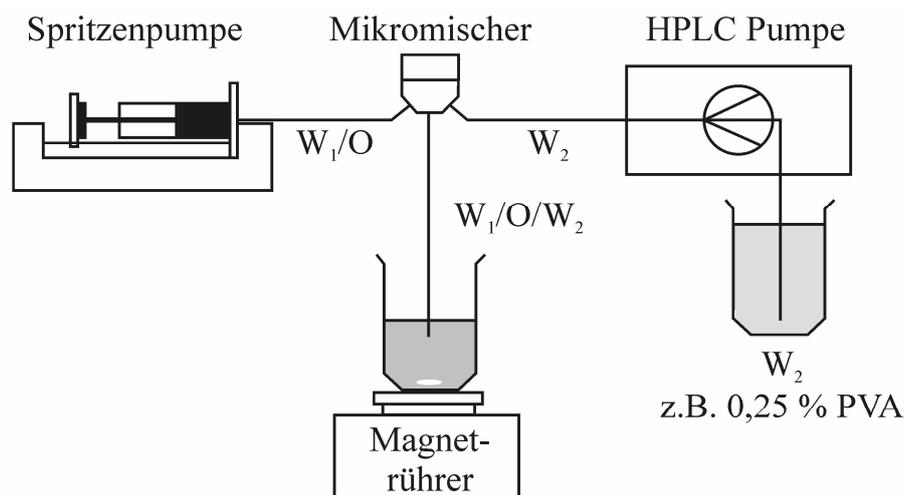


Abb. 18: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Sekundäremulgierung.

Die W_2 -Phase enthielt als Stabilisator 2,5 mg/ml PVA. Für die Herstellung von oberflächenmodifizierten Mikropartikeln wurden stattdessen 2,5 mg/ml CTAB oder Mischungen von 2,5 mg/ml PVA mit 1,5 mg/ml Chitosan oder 5 mg/ml DEAE-Dextran verwendet. Bei der Herstellung der Chitosan-Lösung wurden pro ml W_2 -Phase 1,5 μ l Essigsäure zugegeben, über Nacht gerührt und anschließend filtriert. In Stabilitätsuntersuchungen an CTAB-modifizierten Mikropartikeln wurde die Sekundäremulgierung in einigen Fällen mit dem Ultra-Turrax[®] (Modell TP 18-10, S 18 N-19 G Stab, 20.000 U/min, 1 min) durchgeführt, da die Viskosität einiger Polymerlösungen zu hoch für den Mikromischer war.

Evaporation, Waschen, Lyophilisation, Lagerung

Die Verdampfung des Lösungsmittels erfolgte bei Raumtemperatur unter Normaldruck. Hierfür wurde die Sekundäremulsion auf einem Magnetrührer über 3 Stunden unter Lichtschutz gerührt. Nach vollständiger Evaporation wurden die Proben aus dem Becherglas in verschraubbare 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon[®], Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt und die Mikropartikel bei maximal 6.200xg abzentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde entfernt und die Partikel wurden in 6 ml Aqua dest. (pro 200 mg Matrixpolymer) resuspendiert (1. Waschschrift). Nach dreimaligem Waschen wurden die Mikropartikel erneut abzentrifugiert, resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Die Lyophilisation erfolgte in einer Alpha 1-4 Gefriertrocknungsanlage (Christ, Osterode, Deutschland) über 20 h. Die gefriergetrockneten Mikropartikel wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Herstellung unter aseptischen Bedingungen

Die Herstellung von Mikropartikeln für Zelleexperimente erfolgte unter aseptischen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Werkbank (LB-48-C, Heraeus, Hanau, Deutschland), um sicher zu gehen, dass möglicherweise beobachtete immunologische Effekte nicht auf eine mikrobielle Kontamination der Proben zurückzuführen sind. Durch Autoklavieren (Autoklav Typ 26, Melag, Berlin, Deutschland) wurden alle verwendeten Verbrauchsmaterialien sterilisiert (2 bar, 121 °C, > 15 min).

Für die Zerstörung der bevorzugt an Glasoberflächen haftenden bakteriellen Endotoxine, speziell Lipopolysaccharide (LPS), ist diese Behandlung jedoch nicht ausreichend. Durch Heißluftsterilisation unter drastischen Bedingungen lassen sich hingegen solche LPS effektiv zerstört (Tsuji und Lewis 1978a und b). Die Ph. Eur. schlägt zur Depyrogenisierung von Glasgefäßen eine Behandlung bei 250 °C über 30 min oder 200 °C über 60 min vor. Da bei 250 °C Zersetzungsreaktionen der Teflonummantelung von ebenfalls zu sterilisierenden Rührkernen zu erwarten ist, erfolgte die Heißluftsterilisation (Umluft-Trockenschrank, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 220 °C über 4 h (incl. Anheizphase und Ausgleichszeit).

Für die Herstellung aller Wasserphasen und als Waschwasser wurde abgekochtes (15 min) MilliQ-Wasser verwendet, das nach eigenen Untersuchungen einen Endotoxingehalt

von $< 0,06$ EU/ml enthielt (LAL-Test). Der Mikromischer und die HPLC-Pumpe wurden vor Benutzung mit diesem Wasser ausgiebig durchspült.

2.3 Charakterisierung der Mikropartikel

Tröpfchengröße der Primäremulsion

Die Bestimmung der W_1 -Tröpfchengröße erfolgte durch Photonenkorrelationsspektroskopie (N4 plus, Coulter, Krefeld, Deutschland). Nach der Herstellung der Primäremulsion wurde diese in einer Quarzküvette mit Dichlormethan verdünnt, bis eine für die Messung geeignete Trübung der Probe vorlag. Die Auswertung erfolgte durch die Coulter N4M Software Version 11.14 mit den folgenden Einstellungen: Dichlormethan Brechungsindex 1,4235; Viskosität 0,43 cP; Messwinkel 90° ; Dauer Einzelmessung 30 s; Messmodus Unimodal $< 2\%$ CV. Für jede Probe wurde eine Sechsfachbestimmung durchgeführt und der arithmetische Mittelwert berechnet. Innerhalb der sechs Messungen war nur bei den Proben, die mit dem Ultra-Turrax[®] hergestellt wurden, ein systematischer Anstieg der Tröpfchengröße zu verzeichnen. Die hier festgestellte Koaleszenz dürfte mit der Situation bei der Mikropartikelherstellung vergleichbar sein, da die Tröpfchengrößenmessung in etwa so lange dauerte wie sonst die Sekundäremulgierung.

Größe der Mikropartikel

Die Größe der Mikropartikel wurde durch Laserdiffraktometrie (LS 230, Coulter, Krefeld, Deutschland) ermittelt und als Volumen-gewichtete Partikelgrößenverteilung mit der LS 3.19 Software ausgewertet. Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung bei einer Messzeit von jeweils 60 s. Um auch sehr kleine Teilchen erfassen zu können, wurden neben der Beugungsmessung durch Verwendung der PIDS-Technik (Polarization Intensity Differential Scattering) auch Streuungssignale zur Berechnung der Partikelgröße einbezogen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte sowohl nach der Fraunhofer-Näherung als auch der Mie-Theorie (Brechungsindex Wasser 1,33; realer Brechungsindex der PLGA-Partikel 1,44; imaginärer Brechungsindex 0,01; nach Schalper 2002).

Bei Verwendung der Fraunhofer-Näherung werden sehr kleine Teilchen mathematisch nicht mit erfasst. Die Mindestteilchengröße sollte das Fünffache der Wellenlänge des im Messgerät verwendeten Lasers betragen (LS 230: 750 nm Laser; Mindestteilchengröße für Fraunhofer: $\sim 4 \mu\text{m}$; nach Müller und Schuhmann 1996). Da die Mehrheit der hier gezeigten Partikelgrößenverteilungen auch Teilchen $< 4 \mu\text{m}$ aufwies, wurde für alle dargestellten Proben die Mie-Theorie verwendet, selbst wenn im Einzelfall nach Fraunhofer hätte ausgewertet werden dürfen. Während die Partikelgrößenverteilungen nach Fraunhofer meist Gauß-Verteilungen ergaben, zeigte sich bei der Auswertung nach Mie häufig eine Schulter bei kleinen Partikelgrößen.

Oberflächenladung der Mikropartikel

Die Oberflächenladung der Mikropartikel wurde über Laser-Doppler-Anemometrie im Zetasizer 4 (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland) bestimmt. Bei den hergestellten Mikropartikeln handelt es sich nicht um rein elektrostatisch stabilisierte Teilchen. Daher ist die vom Zetasizer 4 und vergleichbaren Geräten zur Berechnung des Zetapotenzials verwendete Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung nicht anwendbar, die errechneten Zetapotenziale sind also nur eine Näherung. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die im Zetasizer gemessene elektrophoretische Mobilität als Maß für die Oberflächenladung herangezogen. Die Mikropartikel wurden in MilliQ-Wasser suspendiert und bis zu einer für die Messung benötigten Trübung verdünnt. Gegebenenfalls wurde der pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt, anschließend wurde die Leitfähigkeit der Proben durch Zusatz von NaCl auf $50 \mu\text{S/cm}$ standardisiert. Die Proben wurden mit einer 10 ml Polypropylenspritze in den Zetasizer 4 eingegeben, von jeder Probe wurden mindestens 3 Messungen durchgeführt.

Dynamische Viskosität der W_2 -Phasen

Die kinematische Viskosität der W_2 -Phasen wurde an einem Ubbelohde Kapilarviskosimeter mit hängendem Kugelniveau bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt (Durchsichtthermostat CT 1450 mit AVS 350, Schott, Hofheim a. Ts., Deutschland). Die Dichte der Proben wurde am Densimeter DMA 38 (Paar, Graz, Österreich) ermittelt. Aus den Medianen von kinematischer Viskosität und Dichte wurde die dynamische Viskosität errechnet.

Konzentrationsbestimmung von PVA, Chitosan und DEAE-Dextran

PVA. Die Konzentration von PVA im Waschwasser wurde mit der in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen Methode bestimmt (Finley 1965, Joshi et al. 1979, Sahoo et al. 2002), die aufgrund der geringen Probenvolumina an die Durchführung in Mikrotiterplatten (MTP; Rotilabo®) adaptiert wurde. Hierbei wurden 125 µl der Probe mit 75 µl einer 0,65 M Borsäurelösung, 25 µl Iod-Kaliumiodid-Reagenz (0,025 M I₂ und 0,075 M KI) und 25 µl Wasser auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (Easyshaker EAS 2/4, SLT-Labinstruments, Crailsheim, Deutschland) gemischt. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 690 nm mit einem Plattenphotometer (EAR 400 AT, SLT-Labinstruments) ermittelt. Auf jeder Platte wurde eine Kalibrierfunktion im Konzentrationsbereich von 5 bis 100 µg/ml mitgeführt, wie beispielhaft in Abbildung 19 dargestellt. Für die Konzentrationsbestimmung von Rest-PVA in lyophilisierten Mikropartikeln wurden 2 mg Mikropartikel mit 2 ml 0,5 M NaOH versetzt, im Ultraschallbad hydrolysiert, mit 1 M HCl neutralisiert und anschließend wie oben beschrieben untersucht. Die Kalibrierfunktionen von PLGA mit verschiedenen Konzentrationen von PVA zeigten nach der NaOH-Behandlung denselben Verlauf wie die Kurven von unbehandeltem PVA, folglich wird die analytische Methode weder durch hydrolysiertes PLGA noch die Einwirkung von NaOH auf PVA gestört.

Chitosan. Die Konzentration von Chitosan im Waschwasser der Mikropartikelherstellung wurde über die in Abschnitt 1.2.2 erläuterte Farbstoff-Bindung bestimmt (Muzzarelli 1998), wobei durch Modifizierung der Reagenzienkonzentration die Sensitivität erheblich gesteigert wurde (s. Abb. 20). Fünf Teile der Probe wurden in einem Reagenzglas mit einem Teil einer

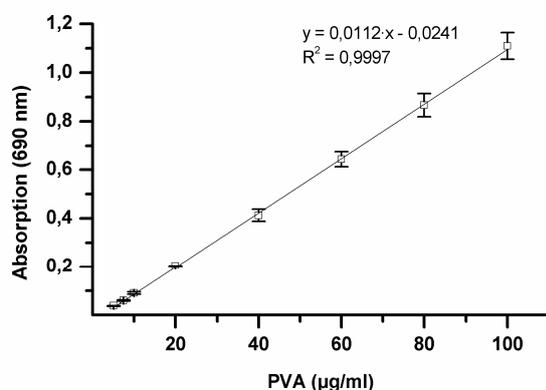


Abb. 19: Kalibrierfunktion der kolorimetrischen Quantifizierung von PVA (\bar{x} und R einer Dreifachbestimmung auf einer MTP).

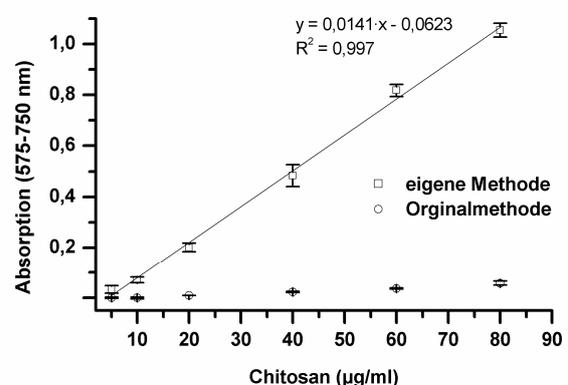


Abb. 20: Kalibrierfunktion der Chitosanquantifizierung nach Original- und eigener Methode (\bar{x} und R von 4 unabhängigen Einzelbestimmungen).

2. Material und Methoden

Lösung von 0,9 mg/ml Cibacron Brilliant Red 3B-A in 0,3 M Glycin-HCl Puffer pH 3,2 versetzt, gemischt und sofort die Absorptionsdifferenz von 575 und 750 nm gegen den Blindwert vermessen (UV-2101 PC, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, USA).

DEAE-Dextran. Die polarimetrische Quantifizierung von DEAE-Dextran in Wasser (214 MC Polarimeter, Perkin Elmer, Mailand, Italien; 2 cm Küvetten, 20 °C, D-Linie des Natriumlichtes $\lambda = 589,3$ nm) ergab nicht die nötige Empfindlichkeit (s. Abb. 21). Daher wurde zur Quantifizierung von DEAE-Dextran die sensitivere Methode nach Roberts 1983 verwendet (s. Abb. 22), die die folgenden Schritte umfasste: (1) Fällung von Dextran als Kupferkomplex im Alkalischen, (2) Abtrennung des Überstandes und Waschen des Präzipitates, (3) Auflösen des Komplexes in verdünnter Schwefelsäure, (4) Hydrolyse von Dextran zu Glucose unter Einwirkung von Hitze und konzentrierter Schwefelsäure, (5) Dehydratisierung von Glucose zu 5-Hydroxymethylfurfural, das unter Einfluss der Schwefelsäure weiter zu Furfural und Formaldehyd zerfällt, (6) Kondensation von Formaldehyd mit zugegebenem Phenol zu einem Triphenylmethanfarbstoff, der photometrisch quantifiziert werden kann. Es wurden 2 ml der Probelösung in einem Glas-Zentrifugenröhrchen mit 0,4 ml NaOH-Reagenz (2,5 M NaOH gesättigt mit NaSO_4) und 0,4 ml frisch hergestelltem Kupferreagenz (0,15 % CuSO_4 , 1,5 % Natriumcitrat, 12,5 % NaSO_4) versetzt und exakt 5 min im siedenden Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen wurde das Präzipitat abzentrifugiert (20 min, 4.300xg, Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland), nach Abtrennen des Überstandes in 2 ml Waschlösung (5 T. Aqua dest., 1 T. NaOH-Reagenz, 1 T. Kupferreagenz) resuspendiert, erneut abzentrifugiert und nach Abtrennen des Überstandes im kopfüber auf Filterpapier

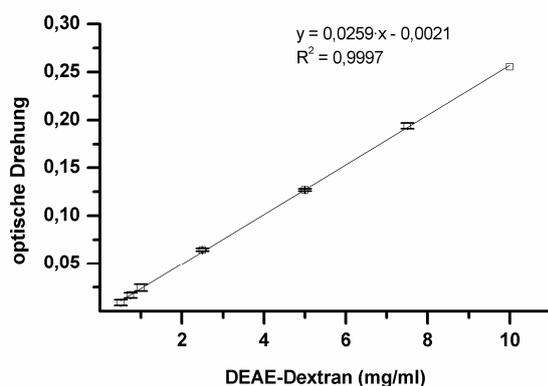


Abb. 21: Polarimetrische Quantifizierung von DEAE-Dextran (\bar{x} und R von 2 unabhängigen Einzelbestimmungen).

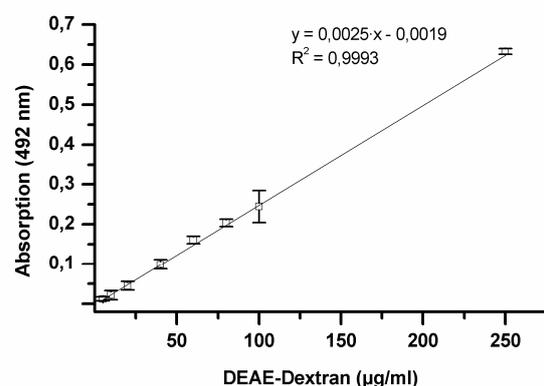


Abb. 22: Kolorimetrische Quantifizierung von DEAE-Dextran (MTP, Befüllung 300 µl, \bar{x} und R von 3 unabhängigen Einzelbestimmungen).

2. Material und Methoden

abgestellten Röhrchen getrocknet. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 0,4 ml 1 M H_2SO_4 versetzt, die entstandene Lösung in einen 2 ml Maßkolben gefüllt und mit Aqua dest. aufgefüllt. Hiervon wurden 0,4 ml in ein Glasröhrchen pipettiert, mit 0,2 ml 5 % Phenol-lösung und 2 ml konzentrierter H_2SO_4 versetzt, exakt 2 min im siedenden Wasserbad inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Absorption (s. Abb. 22) wurde in Rotilabo[®] Mikrotiterplatten bei 492 nm bestimmt (EAR 400 AT).

Proteinverteilung im Mikropartikel (CLSM)

Die Verteilung des Modellproteins FITC-BSA im Inneren der Mikropartikel wurde anhand des Fluoreszenzmarkers durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM; LSM 510 meta, Axiovert 100, Zeiss, Jena, Deutschland) bestimmt. Die suspendierten Mikropartikel wurden auf ein Deckgläschen aufgebracht, an der Luft getrocknet und mit einem zweiten Deckgläschen bedeckt. Fluorescein wurde mit einem 488 nm Argon-Laser angeregt.

Ultrastruktur der Mikropartikel (REM)

Die Ultrastruktur der Mikropartikel wurde mittels hochauflösender Rasterelektronenmikroskopie (REM) an einem Feldemissionsgerät (S-4000, Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Krefeld, Deutschland) untersucht. Lyophilisierte Mikropartikel wurden mittels leitfähiger, beidseitig klebender Folien auf Aluminium-Probenteller aufgebracht (Plano, Wetzlar, Deutschland) und mit etwa 10 nm Gold beschichtet (SCD030 Sputter, Balzers, Liechtenstein). Um Aussagen über die Ultrastruktur des Partikelkerns zu erhalten, wurden die Mikropartikel in einzelnen Experimenten in lösungsmittelfreiem Alleskleber eingebettet, auf den Probenteller aufgebracht und nach Trocknung mit einer Rasierklinge geschnitten. Weiterhin wurde versucht, durch ein Kryo-Bruch-Verfahren einzelne Proben aufzuschließen. Hierfür wurde in ein Polyesterol-Gefäß flüssiger Stickstoff gefüllt, darin ein Messingblock mit Probe gekühlt und diese mit einem ebenfalls vorgekühlten Messing-Stößel bearbeitet. Außerdem erfolgte eine Nassvermahlung von Proben in einem Eppendorfgefäß mit einer Schwingmühle (20 Schwingungen/s, zweimal 10 min, MM 2000, Retsch GmbH, Haan, Deutschland), wofür eine Mischung von Glaskügelchen verschiedener Größe verwendet wurde (1 mm und 4 mm).

Glasübergangstemperatur (DSC)

Der Einfluss der Proteinbeladung oder Oberflächenmodifizierung auf die Eigenschaften des Matrixpolymers wurde anhand der Glasübergangstemperatur durch Dynamische Wärmestrom-Differenzkalorimetrie (engl. DSC) bestimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten Matrixpolymere sind amorph und gehen bei Erwärmung in einer endothermen Reaktion aus diesem spröden, glasartigen in einen gummiartigen Zustand über. Anhand der Glasübergangstemperatur T_g , dem Wendepunkt der sigmoiden Umwandlungskurve, kann dieser Prozess beschrieben werden. Wird das zu untersuchende Polymer vor der Messung lange Zeit unterhalb der T_g gelagert (das ist der Regelfall), tritt bei der ersten Messung oft ein endothermer Relaxationspeak auf. Daher werden die Proben wieder abgekühlt, erneut erwärmt und die T_g erst bei der zweiten Messung ermittelt.

Für die DSC-Untersuchungen wurden 5-8 mg der Mikropartikel in 40 μ l Aluminiumtiegel eingewogen (TG 50 Thermobalance, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland), die Tiegel mit einem Deckel verschlossen und dieser zum Ermöglichen des Druckausgleichs einmal durchstoßen. Der Proben Tiegel sowie ein unbefüllter Referenztiegel wurden in den Ofen des Mettler Toledo DSC 821[°] Kalorimeters eingesetzt und mit der STAR[®] Software (Mettler Toledo) das Temperaturprogramm gestartet. Bei 15 °C beginnend wurde mit einer Heizrate von 5 °C/min bis auf 95 °C erhitzt, dann mit 10 °C/min bis auf 15 °C abgekühlt und erneut mit 5 °C/min auf 95 °C aufgeheizt. Da die STAR[®] Software keine exakte Erfassung des Wendepunktes ermöglichte, wurden die Daten exportiert und in Origin[®] durch Kurvenanpassung nach dem Boltzmann-Modell analysiert. Grundsätzlich können mittels DSC auch Aussagen zur Nativität von Proteinen getroffen werden (Kang und Singh 2003), jedoch waren mit dem zur Verfügung stehenden DSC-Gerät solche Untersuchungen nicht möglich.

Restlösungsmittel

Die Restlösungsmittelbestimmung durch Gaschromatographie (GC) wurde bei Mikropartikeln durchgeführt, die durch Primäremulgierung mit dem Ultra-Turrax[®] hergestellt wurden. Nach den üblichen Waschrufen wurden die Mikropartikelsuspensionen in GC-Headspace-Vials pipettiert und darin lyophilisiert. Anschließend wurden die Gefäße verbördelt und bis zur Messung 4 Tage bei 4 °C gelagert. Der Gehalt an Dichlormethan wurde an einer GC-6890N

2. Material und Methoden

Headspace-Anlage (Agilent, Waldbronn, Deutschland) mit einer 30 Meter HP5MS Säule bestimmt, die Detektion erfolgte im SIM-Modus (selective ion monitoring) an einem Massenspektrometer (Hewlett-Packard MS-5970, Agilent). Die Auswertung erfolgte mit der Chemstation-Software (Agilent). Gemäß Temperaturprogramm wurde im SIM-Modus (Trägergas Helium 1,5 ml/min) zunächst für 2 min auf 40 °C temperiert, dann mit 40 °C/min bis auf 150 °C erhitzt, diese Temperatur für 2 min gehalten und anschließend wieder abgekühlt. Als Referenzen wurden im SIM-Modus ein leeres (Luft-gefülltes) Vial und eine Lösung von 1 ppm Dichlormethan in Wasser verwendet.

Beim SIM-Modus nimmt das an die GC gekoppelte Massenspektrometer kein Gesamtspektrum auf, sondern analysiert nur die Intensität der zuvor eingestellten Massenzahlen. So können mehr Scans in einer bestimmten Zeit durchgeführt und damit die Empfindlichkeit gesteigert werden. Die Verwendung des SIM-Modus war nötig, da im Scan-Modus (gesamtes Massenspektrum) der Dichlormethanpeak der Proben verglichen mit den Peaks von Luft und Wasser sehr klein war. In Voruntersuchungen im Scan-Modus zeigten sich im Massenspektrum des Dichlormethanpeaks (s. Abb. 23a) die Masse-Ladungs-Verhältnisse $m/z = 84$ (Molekulargewicht von DCM, M^+) sowie $m/z = 49$ (Fragment nach Verlust von einem Chlor, $M^+ - 35$) besonders intensiv. Als interner Standard und damit als Bezugsgröße für die Quantifizierung wurde $m/z = 30$ verwendet, was kein Fragment von Dichlormethan darstellt, sondern aus dem Isotopenstickstoff $^{15}\text{N}_2$ des Gasraums über der Probe (= Luft) stammt. In den SIM-Untersuchungen wurden ausschließlich $m/z = 30$, 49 und 84 detektiert (s. Abb. 23b) und die Flächen unter der Kurve (AUC) berechnet. Das Verhältnis

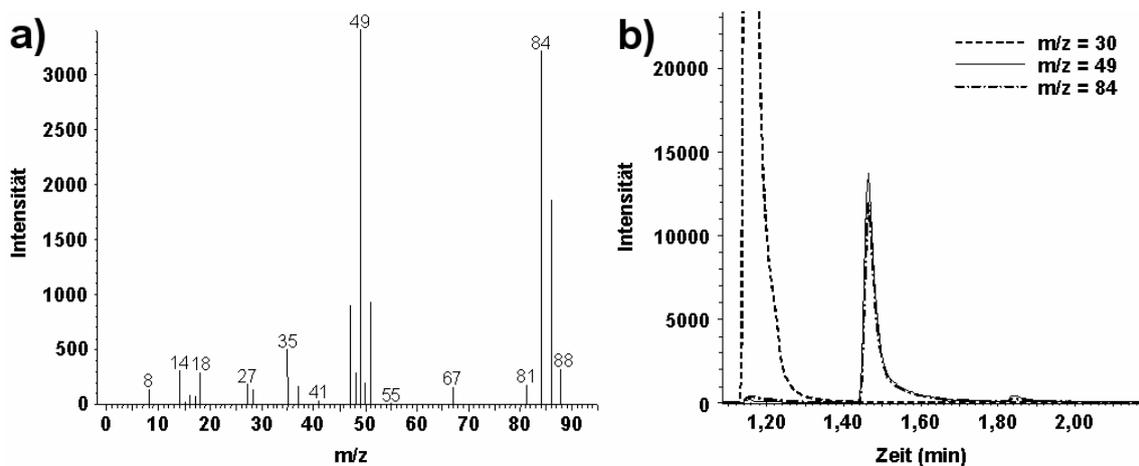


Abb. 23: Quantifizierung von Dichlormethan mittels Gaschromatographie. (a) Massenspektrum von Dichlormethan (Scan-Modus). (b) Gaschromatographische Trennung eines Dichlormethan-Standards (1 ppm) im SIM-Modus, erfasst wurden nur $m/z = 30$, 49, und 84.

2. Material und Methoden

der AUC von $m/z = 84$ und $m/z = 30$, dividiert durch die Masse (g) der eingesetzten Probe wurde zur Auswertung herangezogen (standardisierte AUC). Die Dichlormethankonzentration der Proben wurde aus dem Verhältnis der AUC von Probe und 1 ppm Standard berechnet.

Verkapselungseffizienz

Die Bestimmung der Verkapselungseffizienz von FITC-BSA durch Hydrolyse des PLGA mit 0,1 M NaOH und anschließender fluorimetrischer Quantifizierung des FITC-BSA scheiterte an mangelnder Reproduzierbarkeit. Daher wurde für die Bestimmung der Verkapselungseffizienz von FITC-BSA eine Methode angewandt, die ursprünglich für die Probenvorbereitung von mikroverkapselten Proteinen zur HPLC-Analytik beschrieben wurde (Jiang et al. 2003). Im Vergleich zur Zweiphasen-Extraktionsmethode besitzt diese Technik den Vorteil des Fehlens einer Grenzfläche (s. Abschnitt 1.1.4) und verglichen mit Verfahren, die durch mehrfaches Waschen mit organischen Lösungsmitteln das PLGA entfernen, den Vorteil der geringeren Anzahl von Arbeitsschritten. 10 mg lyophilisierte Mikropartikel wurden in einem Glas-Zentrifugenröhrchen in 500 μl einer Mischung aus 90 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure und 9,9 % Wasser im Ultraschallbad gelöst. Das PLGA wurde durch Zusatz von 750 μl 0,1 % Trifluoressigsäure ausgefällt und nach erneuter Ultraschallbehandlung durch Zentrifugation abgetrennt (2.800xg, 10 min, Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der klare Überstand wurde abpipettiert und die Differenz der UV-Absorption von 275 und 400 nm ermittelt (UV-2101 PC, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, USA). Zur Kalibrierung wurde am jeweiligen Messtag in analoger Weise reines PLGA statt der Mikropartikel eingewogen, gelöst und vor dem Fällungsschritt mit unterschiedlichen Volumina einer Stammlösung von FITC-BSA versetzt (s. Abb. 24).

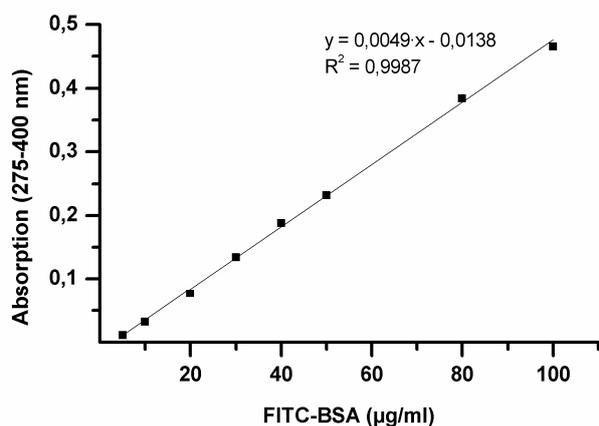


Abb. 24: Beispiel einer Kalibrierfunktion zur Bestimmung der Verkapselungseffizienz von FITC-BSA.

2. Material und Methoden

Anhand der ermittelten Kalibrierfunktion wurde die Konzentration von FITC-BSA errechnet, auf die eingewogene Masse an Mikropartikeln standardisiert und als prozentualer Anteil des Protein-Sollgehaltes (meist 10 µg/mg Mikropartikel) angegeben.

Freisetzungstests

Die Freisetzungstests wurden unter aseptischen Bedingungen mit sterilen Materialien durchgeführt. Nach Optimierung der Durchführung wurde die folgende Vorgehensweise angewendet: Es wurden 10 mg lyophilisierte Mikropartikel in 2 ml Eppendorfgläser eingewogen und in 1,5 ml 10 mM Tris-Puffer pH 7,0 suspendiert. In einzelnen Untersuchungen wurden auch nichtlyophilisierte Mikropartikelsuspensionen bekannter Konzentration eingesetzt. Die Gläser wurden horizontal auf eine Rollwippe (RM 5 rotating mixer, Hecht, Sondheim, Deutschland) gelegt, so dass die Mikropartikelsuspension infolge der ständigen Bewegung keine Sedimentation zeigte. Die Proben auf der Rollwippe wurden unter Lichtschutz bei 37 °C inkubiert (GFL 3032 Umluft-Inkubator, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland). Zu definierten Zeiten wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 5.200xg, Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und 1,4 ml des Überstandes entnommen. Das entnommene Medium wurde durch frischen Tris-Puffer ersetzt, die Mikropartikel wurden resuspendiert und weiter bei 37 °C inkubiert. Die entnommenen Überstände wurden erneut zentrifugiert (16.000xg, Centrifuge 5415C) und die Konzentration von FITC-BSA mit verschiedenen Methoden quantifiziert (s. Abschnitt 2.4). Lösungen von 1 und 5 µg FITC-BSA/ml Tris-Puffer wurden am Tag 0 aus der FITC-BSA Stammlösung hergestellt und in Eppendorfgläser aliquotiert. Zu jedem Zeitpunkt der Probennahme wurden zwei solche Gläser entnommen, analog den Proben zentrifugiert und als Standardwerte bei der Proteinbestimmung mitgeführt.

Endotoxine (LAL-Test)

Wie in Abschnitt 2.2 erläutert, wurden die für immunologische Untersuchungen verwendeten Mikropartikel unter aseptischen Bedingungen hergestellt, um eine Kontamination mit Endotoxinen zu vermeiden. Der Gehalt von Endotoxinen in den lyophilisierten Mikropartikeln wurde durch den Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Test mit der

Gelbildungs-Grenzwert-Methode nach Ph. Eur. durchgeführt. Verdünnungsröhrchen und Spatel wurden durch Heißluftsterilisation depyrogenisiert, alle anderen Materialien und Reagenzien wie endotoxinfreie Pipettenspitzen, endotoxinfreies Limulus-Reagenz-Wasser (LRW), Lysatlösung mit einer Empfindlichkeit λ von 0,06 Endotoxin-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) und Endotoxinstandard wurden von Pyroquant (s. Abschnitt 2.1) bezogen.

Gemäß Ph.Eur. wurde die angegebene Empfindlichkeit des Lysat-Reagenzes durch Inkubation mit Endotoxinlösungen von $2 \cdot \lambda$, λ , $0,5 \cdot \lambda$ und $0,25 \cdot \lambda$ überprüft, bei jeder Untersuchung wurden Negativ- und Positivkontrollen sowie die Prüfung auf Störfaktoren durchgeführt. Die zu analysierenden Mikropartikel wurden in endotoxinfreien Eppendorfgläsern in LRW suspendiert (2 mg/ml) und für 30 min bei 37 °C in einem Horizontalschüttler inkubiert (GFL 3032, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland). 100 μ l der so erhaltenen Proben wurden (gegebenenfalls nach Verdünnung mit LRW) mit 100 μ l Lysat-Reagenz gemischt, 60 min bei 37 °C bewegungsfrei inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und durch Umdrehen des Analysenröhrchens das Auftreten (= positives Ergebnis) oder Fehlen der Gelbildung bewertet. Als Proben wurden entweder die Suspensionen der Mikropartikel oder die nach Zentrifugation (16.000xg, Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) erhaltenen Überstände beim LAL-Test eingesetzt. Die Validierung des Testes erfolgte durch Standard-Addition ($2 \cdot \lambda$). Als Methode für die Erfassung von Endotoxinen im Inneren der Partikelmatrix wurde u. a. die Hydrolyse von 2,00 mg Mikropartikel (oder Endotoxinstandard) in 2,00 ml 0,5 M NaOH (in LRW) evaluiert, wobei die Proben anschließend mit 1 M HCl (in LRW) unter pH-Kontrolle neutralisiert und analysiert wurden (vgl. Abschnitt 3.4.2).

2.4 Charakterisierung von FITC-BSA

Auswahl der Pufferlösung

Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben, ist die Fluoreszenzintensität von Fluorescein stark abhängig vom pH-Wert des Mediums, weshalb für fluorimetrische Quantifizierungen die Proteinlösungen gepuffert werden müssen. In Voruntersuchungen wurde nach dem Lösen von FITC-BSA in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ein Ausflocken des Proteins innerhalb von 1 bis 2 Wochen in verdünnten Lösungen festgestellt. Dies war inakzeptabel, da für Freisetzungstests stabile Proteinlösungen über mehrere Wochen nötig sind. Daher wurde, wie

2. Material und Methoden

vom Hersteller des FITC-BSA empfohlen, 10 mM Tris Puffer pH 7,0 als Lösungsmittel eingesetzt, wohl wissend, dass der eingestellte pH am Rande der Pufferkapazität von Tris liegt und daher einer besonderen Überwachung bedarf.

Fluorimetrie

Die Fluoreszenzintensität von FITC-BSA wurde an einem LS 50 Spektrometer (Perkin Elmer, Mailand, Italien) bestimmt. Es wurden Halbmikroküvetten verwendet, da bei Freisetzungstests nur geringe Probenvolumina zur Verfügung standen. Aufgrund der insgesamt breiten Peaks von Exzitation und Emission des FITC-BSA und ihrer spektralen Überlappung wurde eine Emissionswellenlänge gewählt, die möglichst weit vom Absorptionsbereich entfernt, aber noch ausreichend empfindlich ist (Ex. 485 nm, Spalt 4; Em. 535 nm, Spalt 4 oder 14). Die in Abbildung 25 dargestellte Kalibrierfunktion zeigt den Mittelwert von 7 Bestimmungen jeweils frisch hergestellter Verdünnungsreihen, wobei Ausreißer mittels Dixon-Test ($\alpha=5\%$) eliminiert wurden. Zur Erfassung von bis zu 100 $\mu\text{g/ml}$ FITC-BSA wurde bei einem engeren Emissionsspalt gearbeitet (Abb. 25b). Es bestand hier ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration, was, wie in Abschnitt 1.5 erläutert, durch Konzentrationslöschung erklärt werden kann.

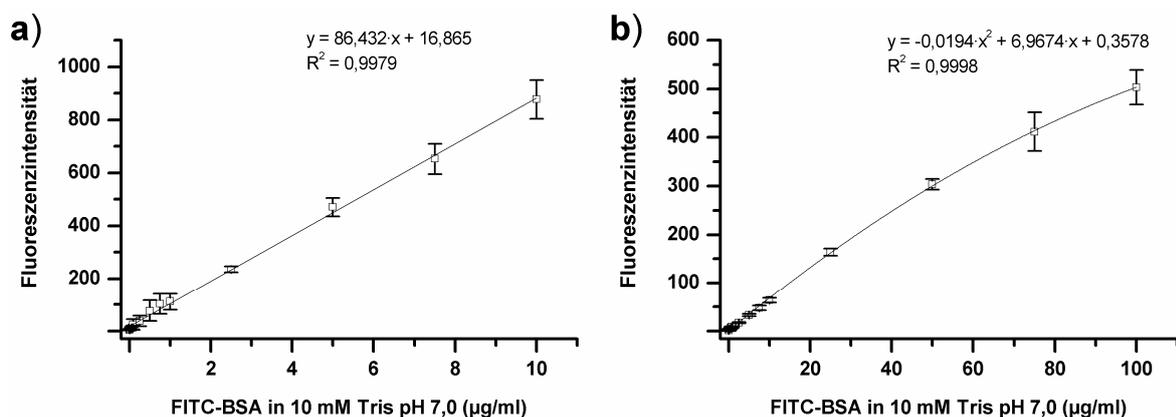


Abb. 25: Kalibrierfunktionen der fluorimetrischen Quantifizierung von FITC-BSA in 10 mM Tris-Puffer pH 7,0. (a) Lineare Kurvenanpassung bei Konzentrationen von 0,01-10 $\mu\text{g/ml}$ (Emissionsspalt 14); (b) Nicht-lineare Kurvenanpassung bei Konzentrationen von 0,1-100 $\mu\text{g/ml}$ (Emissionsspalt 4). (\bar{x} und SD von 7 unabhängigen Einzelkurven).

Proteinassays

Als Alternativverfahren zur Fluorimetrie sollte FITC-BSA mit einem Proteinassay bestimmt werden. Aufgrund der geringen zu erwartenden Proteinkonzentration in Proben aus dem Freisetzungstest wurden Methoden benötigt, die auch weniger als 10 µg/ml FITC-BSA in 10 mM Tris-Puffer nachweisen können.

Bradford-Assay. Der Bradford-Assay basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie[®] Brilliant Blue G-250 von 465 auf 595 nm nach Anbindung basischer und aromatischer Proteinseitenketten in saurem Milieu (Bradford 1976). Es wurde eine modifizierte, hochempfindliche Methode des Bradford-Assays genutzt, bei der in einer Rotilabo[®] Mikrotiterplatte zu 160 µl Proteinlösung mit einer Mehrkanalpipette 40 µl Farbstoffkonzentrat (Bio-Rad Protein Assay) zupipettiert und untergemischt wurden (Easysshaker EAS 2/4, SLT-Labinstruments, Crailsheim, Deutschland). Anschließend wurde sofort die Absorption bei 620 nm gemessen (EAR 400 AT, SLT-Labinstruments). Das Vermessen erfolgte wegen des Fehlens eines passenden Filters im Plattenphotometer außerhalb des Absorptionsmaximums und führte zu einem Empfindlichkeitsverlust von < 10 %, was in Voruntersuchungen an einem Küvettenphotometer (UV-2101 PC, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, USA) festgestellt wurde.

Lowry-Assay. Die Methode zur Quantifizierung nach Lowry et al. 1951 beruht auf der Umsetzung von Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺ in Anwesenheit von Proteinen unter alkalischen Bedingungen. Das entstandene Cu⁺ führt zur Bildung eines blauen Farbstoffs bei Umsetzung mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz. Dieses kommerziell verfügbare Reagenz ist komplex zusammengesetzt und enthält Molybdat, Wolframat, Phosphor- und Salzsäure. Der genaue Reaktionsmechanismus der Umsetzung ist unklar. Durch Umsetzung des Produktes mit Malachitgrün (Sargent 1987) soll die Empfindlichkeit gesteigert werden, so dass 4-40 µg/ml anhand der Absorption bei 690 nm quantifizierbar sind. Folgende Reagenzien wurden verwendet: Reagenz A (20 mM CuSO₄, 40 mM Citronensäure, 0,1 mM EDTA), Reagenz B (0,4 M Na₂CO₃, 0,32 M NaOH), Reagenz C (1 T. Reagenz A + 25 T. Reagenz B, jeweils frisch hergestellt), Reagenz D (Folin-Ciocalteu-Reagenz, 1 T. + 1 T. Aqua dest.), Reagenz E (120 µg/ml Malachitgrün, 2 mM EDTA, in 0,2 M Natriummaleat-Puffer). In Mikrotiterplatten wurden 60 µl Probelösung mit 60 µl Reagenz C versetzt, gemischt (Easysshaker EAS 2/4) und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das im Folgenden zuzusetzende Reagenz D ist sehr instabil unter alkalischen Bedingungen und muss nach Zugabe sofort intensiv untergemischt werden (Waterborg und Matthews 1994). Um dies zeitgleich zu ermöglichen, wurden 12 µl

2. Material und Methoden

der Lösung D an den oberen Rand der Wells pipettiert, durch Zentrifugation in Kontakt mit den bereits vorliegenden Reagenzien gebracht (10 s, Minifuge RF, Rotor NR 3471, Heraeus, Hanau, Deutschland), vermischt (Easysshaker EAS 2/4), 45 min inkubiert und bei 690 nm im Plattenphotometer vermessen (EAR 400 AT). Zur Steigerung der Sensitivität wurde anschließend die Malachitgrün-Lösung E (90 µl) zupipettiert, gemischt und abermals die Absorption bei 690 nm bestimmt.

BCA-Assay. Die von Smith et al. 1985 beschriebene Methode beruht wie der Lowry-Assay auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ durch Proteine in alkalischer Lösung, die entstehenden Cu^+ -Ionen reagieren hier mit Bicinchoninsäure (BCA) unter Bildung eines farbigen Komplexes. Da mit der Standardmethode, durchgeführt mit einem kommerziell erhältlichen BCA-Kit, Proteinkonzentrationen $< 100 \mu\text{g/ml}$ nicht nachweisbar sind, wurde eine modifizierte, empfindlichere Methode angewendet (Stoschek 1990). Hierfür wurden in einer Rotilabo[®] Mikrotiterplatte 100 µl Probe mit 100 µl einer Arbeitslösung gemischt (Easysshaker EAS 2/4), die zuvor aus gleichen Teilen CuSO_4 -BCA-Lösung und alkalischer Pufferlösung (8 % Na_2CO_3 , 1,6 % NaOH , 1,6 % Natriumtartrat, eingestellt mit NaHCO_3 auf pH 11.25) hergestellt wurde. Die CuSO_4 -BCA-Lösung wurde ebenfalls frisch aus einem Teil 4 % CuSO_4 -Lösung und 25 Teilen 4 % BCA-Lösung (Dinatriumsalz) gemischt. Die Standardmethode sieht eine Inkubation (BM 200 Inkubator, Memmert, Schwabach, Deutschland) bei 60 °C über 20 min oder 37 °C über 30 min vor (vgl. Abschnitt 3.2.2). Anschließend wurde die Absorption in Ermangelung eines 562 nm Filters bei 550 nm im Plattenphotometer (EAR 400 AT) gemessen (Sensitivitätsverlust $< 5 \%$).

Silber-Dithizon-Assay. Die von Boratynski 1985 beschriebene Methode nutzt die Fähigkeit von Proteinen, in Anwesenheit von Detergenzien konzentrationsabhängig Silberionen vor der Fällung durch NaCl zu schützen. Die Silberionen im löslichen Protein-Silber-Komplex können dann mit dem Schwermetallbinder Dithizon zu einem farbigen Komplex umgesetzt werden. Im Vergleich zu anderen Silber-Proteinassays (Krystal et al. 1985) ist bei diesem Test keine Störung der Farbentwicklung durch die Chloridionen im Tris-HCl-Puffer zu erwarten, da die Fällung überschüssiger Silberionen mit Chlorid zum Testprinzip gehört. In Voruntersuchungen an BSA wurde ermittelt, dass von den vorgeschlagenen Detergenzien die empfindlichste Messung mit Triton X-100 möglich ist. Des Weiteren wurde die Methode auf einen kleineren Maßstab adaptiert und der Einfluss von Puffersalzen in der Proteinlösung auf die Farbentwicklung untersucht. Mit 10 mM Tris-Puffer pH 7 konnte im Vergleich zu Aqua dest. die Sensitivität der Methode gesteigert werden, bei 100 mM Tris war hingegen die Empfindlichkeit deutlich abgeschwächt.

2. Material und Methoden

Bei der Durchführung der Bestimmung wurden das Basisreagenz (BR; 0,6 M NaOH, 0,08 M NaCl, 0,04 M Natriumcitrat), eine Lösung von 0,1 % Triton X-100 in BR (BR-T, täglich frisch), ein Silberreagenz (SR; 0,1 % AgNO₃) und das Dithizonreagenz (DR; 0,015 % Dithizon in Aceton, während jedes Testes frisch herzustellen) benötigt. 300 µl des BR-T wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 300 µl der Proteinlösung gemischt (MS 1 Minishaker, IKA Works Inc., Wilmington, USA), mit 60 µl SR versetzt, erneut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Anschließend wurden 120 µl DR zupipettiert, es wurde gemischt, für 10 min inkubiert und bei 1.500xg für 2 min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand (300 µl) wurde in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Differenz der Absorption von 550 und 690 nm im Plattenphotometer (EAR 400 AT) bestimmt. Während der Durchführung war streng darauf zu achten, dass alle parallel gehandhabten Proben in gleicher Geschwindigkeit mit Reagenzien versetzt und genau gleich lang inkubiert wurden. Es wurde bei jedem Test eine Kalibrierfunktion mitgeführt, die zur Auswertung der parallel analysierten Proben diente. Die Steigung der Kalibrierfunktion gab eine Auskunft über die Intaktheit der Reagenzien, ihre Linearität erlaubte eine Aussage über das Gelingen der gleichmäßigen Handhabung.

ELISA

Zur hochempfindlichen Quantifizierung von FITC-BSA wurde ein Enzym-gekoppelter Immunosorptionsassay (ELISA) entwickelt. Da neben FITC-BSA keine Fremdproteine zu erwarten waren, wurde anstelle des Sandwich-Konzeptes eine einfachere Methode verwirklicht, bei der der Analyt direkt an die Mikrotiterplatte gebunden wird. Eine Herausforderung war die Blockierung der Platte zum Schutz vor unerwünschter direkter Anbindung des Antikörpers. Üblicherweise wird hierfür BSA eingesetzt, was im vorliegenden Fall verständlicherweise nicht möglich war. Des Weiteren wurden sowohl verschiedene BSA-Antikörper als auch Detektionssysteme und das Bindungsverhalten von FITC-BSA an verschiedene Mikrotiterplatten evaluiert und so das folgende Testprinzip etabliert: 100 µl einer Lösung von 5-100 ng/ml FITC-BSA in Tris-Puffer wurden in eine Rotilabo[®] Mikrotiterplatte pipettiert und bei 37 °C 40 min im Brutschrank (B 5060 EC/CO₂, Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreifach mit 300 µl PBST gewaschen (0,05 % Tween 20 (m/v) in phosphatgepufferter Salzlösung [PBS]) und mit 300 µl einer 5 proz. Lösung (v/v) von flüssiger Fischgelatine in PBS blockiert. Nach 30minütiger

2. Material und Methoden

Inkubation bei 37 °C wurde drei Mal mit 300 µl PBST gewaschen und 100 µl eines Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten BSA-Antikörpers zugegeben (1/5000 Verdünnung in 0,05 M Carbonatpuffer pH 9,6). Nach einer Inkubation bei 25 °C über 60 min wurde vier Mal mit PBST gewaschen. Eine Tablette des Chromogens Tetramethylbenzidin wurde in 10 ml von 0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer pH 5,0 gelöst und mit 25 µl 3 proz. H₂O₂ versetzt. 100 µl dieser Lösung wurden in die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption des entstandenen Chromophors bei 450 nm im Plattenphotometer (EAR 400 AT) quantifiziert (siehe Abb. 26).

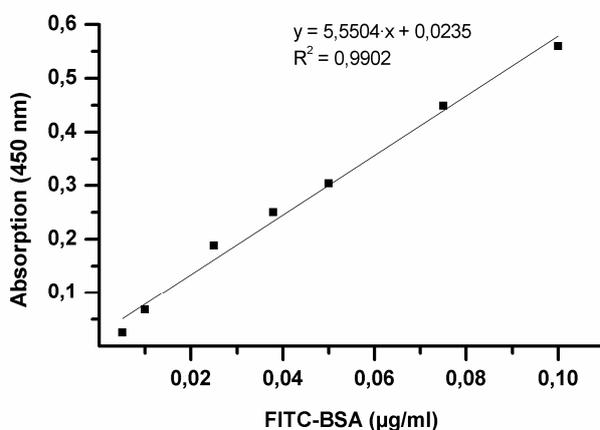


Abb 26: Typische Kalibrierfunktion von FITC-BSA im ELISA.

Lagerstabilität, Einfluss von pH-Wert und Proteasen

Um auszuschließen, dass die im Freisetzungstest bestimmten Konzentrationen von FITC-BSA durch Zersetzungsreaktionen verfälscht waren, wurden zum einen parallel zu den Mikropartikelproben auch Standardlösungen inkubiert, zu jedem Messzeitpunkt entnommen und mit den unterschiedlichen Methoden quantifiziert. Zum anderen wurden unabhängig vom Freisetzungstest höher konzentrierte Lösungen (meist 100 µg/ml) von FITC-BSA in 10 mM Tris-Puffer pH 7,0 unter aseptischen Bedingungen mit sterilen Materialien hergestellt und Aliquote in Eppendorfgefäßen bei 37 °C inkubiert (GFL 3032 Horizontalschüttler, 100 U/min, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland). In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die im Ergebnisteil beschriebenen Effekte auch bei Inkubation in Glasröhrchen auftraten und nicht auf die Wechselwirkung des Proteins mit den Polypropylengefäßen zurückzuführen waren. Aus praktischen Gründen wurden daher Eppendorfgefäße verwendet. Nach definierten Inkubationszeiten (keine Inkubation = Tag 0,

2. Material und Methoden

sowie Tag 1, 4, 7, 14 und 28) wurden die Proben entnommen und bei -40 °C bis zur analytischen Charakterisierung gelagert.

In weiteren Untersuchungen wurde neben FITC-BSA auch das für die Kopplung eingesetzte BSA verwendet sowie der pH-Wert des Tris-Puffers auf 8,0 statt 7,0 eingestellt. In einzelnen Experimenten wurde FITC-BSA unter Zusatz von Proteaseinhibitoren inkubiert. Hierfür wurden drei verschiedene Cocktails von Proteaseinhibitoren (s. Tab. 11) in Tris-Puffer gemäß den Herstellerangaben gelöst und zur Verdünnung von FITC-BSA verwendet.

Tab. 11: Zusammensetzung der Proteaseinhibitor-Cocktails, die bei Untersuchungen zur Lagerstabilität von FITC-BSA eingesetzt wurden. Die gehemmten Enzyme sind in Klammern angegeben.

Protease Inhibitor Cocktail P 2714	Complete Mini	Complete Mini, EDTA-frei
AEBSF (Serin-Proteasen)		
Bestatin (Aminopeptidasen)	komplex zusammen- gesetzt, hemmt ein breites Spektrum von Serin- Proteasen, Cystein- Proteasen	komplex zusammen gesetzt, hemmt ein breites Spektrum von Serin- Proteasen und Cystein- Proteasen
E-64 (Cystein-Proteasen)		
Leupeptin (Serin- u. Cystein-Prot.)		
Aprotinin (Serin-Proteasen)	sowie durch EDTA auch Metalloproteasen	
EDTA (Metallo-Proteasen)		

Gelelektrophorese (PAGE)

Die Stabilität von FITC-BSA wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) untersucht. Hierbei wurden die Proteine zum einen in ihrer nativen Form (native PAGE) und zum anderen unter denaturierenden Bedingungen für die Bestimmung des Molekulargewichtes (SDS-PAGE) analysiert.

Native PAGE. Da die Protein-Lösungen relativ niedrig konzentriert waren (100 µg/ml), musste das Verhältnis von Protein-Lösung zu Auftrage-Puffer möglichst groß sein. Daher wurde der folgende 8fach konzentrierter Auftragepuffer eingesetzt: In 9,6 ml einer Mischung aus 10 T. Glycerol und 2 T. Wasser werden 0,969 g Tris gelöst, durch Zusatz von 165 µl 10 M HCl auf pH 8,8 eingestellt, mit 16 µl einer Bromphenolblau-Lösung (125 mg/ml) angefärbt und mit 219 µl Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration der Komponenten betrug 0,8 M Tris, 80 % Glycerol und 0,2 mg/ml Bromphenolblau. Die native PAGE wurde in einer Xcell Mini Kammer auf 1 mm dicken 10 Well Fertig-Gelen

2. Material und Methoden

durchgeführt, die einen Tris-Glycin-Gradienten (4-20 %) enthielten. Die Kammer wurde mit Laufpuffer (1,44 % Glycin, 0,29 % Tris, pH ~ 8,6) befüllt, die vorbereiteten Proben (40 µl Proteinlösung + 5 µl Auftragepuffer) mit einer Glasspritze in die Taschen des Gels gegeben und die Elektrophorese mit dem Protein-Programm der Spannungsquelle (Model 3540, Novex, Frankfurt a. M., Deutschland) bei max. 9 mA über ~ 7 h gestartet.

SDS-PAGE. Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde auf selbstgegossenen Gelen in großen Elektrophoresekammern durchgeführt, um eine große Trennstrecke und damit eine gute Auflösung der Banden zu erzielen. Zunächst wurden die Glasplatten mit 1,5 mm Spacern zusammengesetzt, bis zu einer Füllhöhe von ~ 11 cm mit dem wie folgt hergestellten Trenngel befüllt und mit 70 proz. Isopropanol beschichtet. Das 10 proz. Trenngel bestand aus 13,4 ml Rotiphorese Gel 30, 10 ml 4X Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 14 mM SDS, pH 8,8 mit HCl), 16,4 ml Aqua dest., 160 µl 25 proz. APS und 40 µl TEMED. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Isopropanol abgewaschen und verbleibendes Wasser mit Filterpapier abgetupft. Dann wurde etwa 2 cm hoch ein 6 proz. Sammelgel eingefüllt, der Gelkamm für 20 Taschen eingesetzt und das Gel abermals auspolymerisiert. Das Sammelgel wurde aus 3 ml Rotiphorese Gel 30, 3,75 ml 4X Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, 14 mM SDS, pH 6,8 mit HCl), 8,16 ml Aqua dest., 60 µl 25 proz. APS und 15 µl TEMED gemischt. Die Gelkassette wurde in die vertikale Gelkammer (V15-17, Gibco, Grand Island, USA) eingesetzt, diese mit Laufpuffer befüllt (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 3,5 mM SDS), Luftblasen entfernt und der Kamm aus der Kassette gezogen. 40 µl Probe wurden mit 10 µl 4X Mercaptoethanol-Auftragepuffer vermischt (6,25 ml 1M Tris-HCl-Puffer pH 6,8, 2 g SDS, 5,0 ml β-Mercaptoethanol, 10,0 ml Glycerol, 50 µl 2,5 proz. Bromphenolblau, 3,7 ml Aqua dest.), für 5 min bei 100 °C inkubiert (HBT 130-2, Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland), auf Eis abgekühlt und mit einer Glasspritze in die Geltaschen gefüllt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proben wurden jeweils zwei Marker mitgeführt (Protein Ladder 10-200 kDa, BenchmarkTM Prestained Protein Ladder). Mit Hilfe eines Powerpac 300 (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde die Elektrophorese bis zum Passieren des Sammelgels (~ 80 min) bei 110 V, danach über 3 h bei 150 V durchgeführt.

Dokumentation. Die Dokumentation der Gele erfolgte in der Geldokumentationsanlage 2000 (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit Hilfe der Quantity One 4.1 Software. Nach Abschluss der Elektrophoresen wurden die Gelkassetten geöffnet und anhand des Fluoreszenzmarkers die Lage der Banden von FITC-BSA im UV-Modus photographiert.

2. Material und Methoden

Nach erfolgter Färbung der Gele (s. u.) wurden diese im Auflichtmodus abermals dokumentiert.

Gelfärbung. Um die nicht fluoreszenzmarkierten Proteine, wie die Molekulargewichts-Marker und mögliche FITC-freie Proteinfragmente zu visualisieren, sollten die Proteine im Gel gefärbt werden. Die Standardmethode der Gel-Färbung durch gelöstes Coomassie[®] Brilliant Blau (CBB; 0,05 % CBB R-250, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) mit anschließender Entfärbung des Hintergrundes (29 % Ethanol, 5 % Essigsäure) war nur geeignet, die Hauptbande zu visualisieren, nicht aber die durch Fluoreszenz erkannten Nebenbanden. Daher wurden die als empfindlicher bekannten Silber-Färbetechniken eingesetzt, zum einen ein kommerziell verfügbarer Kit (s. Abschnitt 2.1) und zum anderen die von Heueskoven und Dernick 1985 beschriebene Methode. Mit den genannten Methoden konnte eine höhere Intensität der Hauptbanden erzielt werden, kleine Nebenbanden waren jedoch aufgrund einer ungleichmäßigen Hintergrundfärbung schwer auszumachen. Nachteilig waren neben dem hohen Zeitaufwand die vielen Zwischenschritte mit der jeweils erforderlichen Umbettung des Gels, welches dabei häufiger zerriss. Außerdem wurde für Silberfärbungen im Gegensatz zur Verwendung von CBB beschrieben, dass die Bandenintensität nicht in linearem Zusammenhang mit der Proteinkonzentration steht (Poehling und Neuhoff 1981).

Es wurde daher die Färbung mit kolloidalem CBB durchgeführt (Neuhoff et al. 1985 und 1988). Die von Neuhoff et al. als empfindlicher beschriebene Färbung mit CBB G-250 führte zu einer nur unwesentlich erhöhten Intensität von Nebenbanden und zu einer deutlich verstärkten Hintergrundfärbung. Deshalb wurde routinemäßig mit kolloidalem CBB R-250 nach Neuhoff et al. 1988 gefärbt. Der vorgeschlagene Waschschrift mit Trichloressigsäure wurde jedoch nicht ausgeführt, da in Vorversuchen bei den eigenen Gelen keine Vorteile dieser Behandlung festgestellt wurden. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele aus der Gelkassette entnommen und in eine verschließbare Metallwanne mit einer Mischung aus 200 T. Stammlösung 1 (2 % H_3PO_4 , 6 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 2 T. Stammlösung 2 (10 % CBB R-250) und 50 T. Methanol gelegt. Die Umspülung des Gels mit der Färbelösung wurde durch kontinuierliches Bewegen der Wanne sichergestellt (Belly Dancer, Stovall Life Science, Greensboro, USA oder Thys 2, MLW, Ilmenau, Deutschland) und die Färbung über Nacht durchgeführt.

Geltrocknung. Zunächst wurden die Gele für 30-60 min in eine Lösung von 10 % Glycerol in 20 proz. Ethanol eingelegt. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur und Normaldruck innerhalb von einer Woche nach Einspannen des Gels zwischen zwei Cellophanpapieren mit Hilfe von Geltrocknungsrahmen.

Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Untersuchungen von Proteinlösungen wurden mittels SELDI-TOF durchgeführt. Da es sich bei den Proben nur um ein Protein, nämlich FITC-BSA und seine möglicherweise vorhandenen Zersetzungsprodukte handelte, wurde nach Auftragen von 2 µl der Proben auf einen reverse phase protein chip (Bioanalyt GmbH, Potsdam, Deutschland) auf Waschstreps verzichtet. Als Matrix wurde Sinapinsäure (gesättigte Lösung in 50 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure, 49,9 % Aqua dest.) verwendet, von der zweimal 0,5 µl auf die getrocknete Probe aufpipettiert wurden. Die Messungen wurden an einem PBS II SELDI-TOF Massenspektrometer durchgeführt (CIPHERGEN Biosystems Ltd., Guildford, Großbritannien) und mit der CIPHERGEN ProteinChip[®] Software ausgewertet. Folgende Geräteeinstellungen wurden vorgenommen: Focus-Masse 66.000, Laserintensität 280, Detektorempfindlichkeit 9.

Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde auf einer Waters HPLC-Anlage durchgeführt. Als Fließmittel wurde 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit Zusatz von 0,25 M NaCl verwendet, als Flussrate wurde 0,2 ml/min eingestellt. Zunächst wurde die SynChropak GPC 300 A Säule mit Aprotinin, Cytochrom C, Myoglobin, BSA und BSA-Dimer kalibriert, so dass Molekulargewichte im Bereich von 6,5 bis 136 kDa abgedeckt wurden. Von den anschließend auf der Säule getrennten Proben wurde sowohl die Fluoreszenzintensität von FITC (Exzitation 495 nm, Emission 525 nm) als auch die Proteinkonzentration in Form der Absorption bei 280 nm bestimmt.

Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie

Der Versuchsaufbau zur Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzanisotropie wurde von Otto et al. 2003 beschrieben. 100 µl der Proteinproben (FITC-BSA in 10 mM Tris pH 7,0) wurden in Spezial-Quarzküvetten gefüllt und über ~ 20 min vermessen. Zum Vergleich wurde freies Fluorescein in Tris-Puffer über 3 min untersucht. Aufgrund der verschiedenen Messzeiten erreichten die durch single photon

2. Material und Methoden

counting erzeugten Fluoreszenzabkling-Kurven unterschiedliche Maximalwerte. Zum Erzielen einer Vergleichbarkeit wurden sie daher auf dieselbe Höhe normiert. Durch Kurvenanpassung wurde aus den Abklingkurven die mittlere Lebensdauer τ errechnet.

Proteolyseexperimente

Für Proteolyseexperimente wurden Stammlösungen von Trypsin (500 $\mu\text{g/ml}$) und Proteinase K (500 $\mu\text{g/ml}$) in 10 mM Tris-Puffer pH 7,0 hergestellt, die gemäß Tabelle 12 mit Lösungen von 25 $\mu\text{g/ml}$ FITC-BSA gemischt wurden. Die Proben wurden für 10 min, 30 min oder 24 h im Wasserbad bei $37,0 \pm 0,2$ °C inkubiert (Haake C und F 3, Berlin, Deutschland), danach kurz in Eiswasser abgekühlt und sofort fluorimetrisch vermessen (LS 50 Spektrometer, Perkin Elmer, Mailand, Italien; Ex. 485 nm, Spalt 4, Em. 535 nm Spalt 4). Es wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt, Ausreißer wurden durch den Dixon-Test ($\alpha = 5$ %) eliminiert.

Tab. 12: Zusammensetzung der Probelösungen bei Proteolyseexperimenten. Angegeben sind die pipettierte Volumina in μl .

	Ansatz					
	1	2	3	4	5	6
FITC-BSA (25 $\mu\text{g/ml}$)	750	750	750	—	750	—
Tris-Puffer 10 mM, pH 7	750	750	—	750	—	750
Proteinase K (500 $\mu\text{g/ml}$)	—	—	750	750	—	—
Trypsin (500 $\mu\text{g/ml}$)	—	—	—	—	750	750
Inkub. 37 °C	—	ja	ja	ja	ja	ja

2.5 Zelleexperimente

Die hier beschriebenen Zelleexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Julian Zimmermann (Universität Göttingen) und Dr. rer. nat. Dirk Lorenzen (DC GmbH, Institut für Tumorthherapie, Duderstadt) durchgeführt. Bei den hier beschriebenen Experimenten handelt es sich nicht um Untersuchungen an einer Zelllinie. Folglich reflektieren sie interindividuelle Unterschiede, wie sie auch bei einer möglicherweise zukünftig durchgeführten immuno-

logischen Tumorthherapie mit proteinbeladenen Mikropartikeln zu erwarten sind. Eine statistische Auswertung der Mehrfachbestimmungen war häufig nicht möglich, wie beispielsweise bei durchflusszytometrischen Histogrammen. Daher wurde von den Mehrfachbestimmungen jeweils ein repräsentatives Experiment ausgewählt und dargestellt.

Gewinnung humaner mononukleärer Zellen (PBMCs)

Aus dem peripheren Blut freiwilliger, gesunder Spender wurden mononukleäre Zellen (PBMCs) isoliert. Dies geschah entweder durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation oder durch Leukapherese. Die Dichtegradientenzentrifugation über FicollTM erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden), indem in einem Zentrifugenröhrchen das Gradientenmaterial mit Vollblut (durch Zusatz von Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA) an der Gerinnung gehindert) überschichtet wurde. Hierbei sammeln sich die PBMCs (Monozyten, Lymphozyten) als Ring unterhalb des Plasmas, während Erythrozyten und Granulozyten als Pellet abzentrifugiert werden. Die PBMCs wurden abpipettiert und Thrombozyten sowie EDTA durch mehrfaches Waschen mit kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) entfernt. Die Leukapherese zur Isolierung von PBMCs erfolgte mit dem Standardprogramm für mononukleäre Zellen des COBE Spectra cell separators (Gambro BCT, Martinsried, Deutschland). Die Leukapherese stellte die Standardprozedur zur Zellisolierung dar, nur in ersten Experimenten (dort angegeben) wurde die Dichtegradientenzentrifugation genutzt.

Isolierung von Monozyten

Aus den durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBMCs wurden die Monozyten über die Adhärenz an Zellkulturplatten (in komplettem RPMI-Medium + 5 % autologem humanem Serum, 37 °C, 60 min) isoliert, wohingegen die Mehrheit der Lymphozyten nicht adhärte und mit PBS abgespült werden konnte.

Im Falle der Leukapherese wurden die PBMCs anschließend in Calcium- und Magnesiumfreier Hanks Basal salt solution (HBSS) suspendiert und die Monozyten durch Elutriation mit dem ELUTRA cell separation system (Gambro BCT, Martinsried, Deutschland, 2.400 rpm) gewonnen. Die zentrifugale Elutriation beruht auf dem Gegenstromprinzip in einer konisch oder vergleichbar aufgebauten Trennkammer, die sich in Richtung des Zentrums der

Zentrifugation aufweitet (Lindal 1948, McEwen et al. 1968). Wird die Kammer in dieser Richtung mit Medium durchströmt, so nimmt infolge der Aufweitung die Fließgeschwindigkeit ab und es können nur noch kleine Teilchen transportiert werden. Auf eine suspendierte Zelle wirkt nun der Flüssigkeitsstrom in die eine und die Zentrifugalkraft in die andere Richtung. Dies führt zur Konzentrierung der Zellen zu Zellfraktionen in der Trennkammer des Rotors, wobei sich größere Teilchen (höhere Masse bei gleicher Dichte) und solche mit höherer Dichte eher am zentrifugalen Ende sammeln. Durch eine schrittweise Veränderung der Flussrate (37,0-103,9 ml/min) können die Beladung, das Waschen und die Abtrennung verschiedener Zellfraktionen erfolgen. Die Monozyten wurden als letzte von 5 Fraktionen isoliert, indem die Zentrifugation gestoppt und die Trennkammer bei 103,9 ml/min entleert wurde (rotor off fraction, Berger et al. 2005).

Qualität der Monozyten: Reinheit, Vitalität und Lagerung

Die Reinheit der durch Leukapherese und Elutriation isolierten Monozyten wurde durchflusszytometrisch (s. u.) mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten monoklonalen CD 14 Antikörpers überprüft. Der Gehalt an CD 14⁺ Zellen betrug $87 \pm 8 \%$ (\bar{x} und SD) und der Gehalt an Granulozyten, bestimmt anhand des Profils von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung im Durchflusszytometer, war $< 5 \%$. Die Anteil vitaler, also Propidiumiodid-negativer Zellen (s. u.), war stets $> 95 \%$. Die isolierten Monozyten wurden entweder sofort verwendet oder unter kontrollierten Bedingungen (1 °C/min bis auf -80 °C) in 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 90 % autologem Serum (Hitze-inaktiviert, 60 min, 56 °C) eingefroren und bei -152 °C gelagert. Das Auftauen erfolgte schnell bei 37 °C, dann wurde durch langsames Zutropfen von warmem RPMI-Medium das in der Probe vorhandene DMSO ausgewaschen.

Immunfluoreszenz und Vitalitätsprüfung mittels Durchflusszytometrie

Die Färbung charakteristischer Oberflächenmarker der untersuchten Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde bei 4 °C durchgeführt. Die von den Zellkulturplatten abgeernteten und gewaschenen Zellen wurden zunächst für 5 min in einem Blockierungspuffer (0,1 % NaN₃, 0,5 % BSA, 10 % Kaninchenserum in PBS) und dann für 30 min mit den PE- oder Pc5-markierten Antikörpern (im Überschuss) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und in einem kalibrierten FACS Calibur

2. Material und Methoden

flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), ausgestattet mit einem 488 nm Argonlaser (Ion Laser Technologies, Salt Lake City, USA), analysiert. Die Kalibrierung erfolgte mit standardisierten fluoreszierenden Kügelchen (CaliBrite, Becton Dickinson). Pro Probe wurden mindestens 10.000 Ereignisse (Zellen) detektiert und mit der CellQuest Software (Becton Dickinson) ausgewertet. Anhand des Profils von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung konnten die intakten Zellen erkannt werden. Neben der spezifischen Wechselwirkung zwischen dem jeweiligen CD-Cluster und dem antigenbindenden Teil des Antikörpers ist auch eine Bindung des F_c-Teils des Antikörpers an entsprechende F_c-Rezeptoren auf den Immunzellen möglich. Durch die sogenannte Isotypenkontrolle, durchgeführt mit einem Antikörper des selben Isotyps (z. B. IgG1) wie der Testantikörper, kann das Ausmaß dieser Bindung bestimmt und bei der Auswertung der eigentlichen Probe einbezogen werden.

Die Vitalität der Zellen wurde durch Färbung mit Propidiumiodid evaluiert. Der Farbstoff durchdringt die Zellmembran toter Zellen und lagert sich in deren DNA ein, während intakte Zellen zunächst nicht angefärbt werden. Von einer Propidiumiodid-Stammlösung (50 µg/ml) wurden 10 µl zu 500 µl Zellsuspension gegeben, untergemischt und innerhalb von 1-2 min im Durchflusszytometer vermessen. Anhand des Profils von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wurden die intakten Monozyten erkannt und durch Setzen eines Fensters (Gate) für weitere Analysen ausgewählt. Innerhalb des Gates der intakten Monozyten wurden einerseits die ungefärbten vitalen und andererseits die sterbenden, Propidiumiodid-positiven Zellen erfasst und in einem Histogramm dargestellt. Die Summe der Propidiumiodid-positiven und der nicht im Gate liegenden Zellen stellt den Gesamtanteil von toten Zellen in der Probe dar. Sollte die Vitalität von Proben in Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle ermittelt werden, so wurde das für die Kontrolle gesetzte Gate auch auf die anderen Proben angewendet. Bei Messung der gleichen Zellzahl (z. B. 10.000 Ereignisse) waren bei einer Probe möglicherweise mehr Zellen anfärbbar und zusätzlich lagen mehr Zellen außerhalb des Gates. Verglichen mit der Kontrolle führte beides zu einer Reduzierung des Messereignisses „intakte, vitale Zelle“ und damit zum Ergebnis einer geringeren Vitalität für die entsprechende Probe. Alternativ wurde die Vitalität der Zellen durch Färbung mit Trypanblau (0,15 % in der Zellsuspension) oder mit der Casy[®]-Technologie (angewendet z. B. von Endl et al. 1996 und Schmut et al. 1999) überprüft.

Toxizität von Detergenzien und Mikropartikeln

Die Toxizität von entweder freiem Detergens oder von Mikropartikeln auf Monozyten wurde durch Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen untersucht. Hierfür wurden in parallelen Ansätzen frisch elutrierte oder aufgetaute Monozyten ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen in 24 Well Zellkulturplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ in komplettem RPMI-Medium mit Zusatz von 30 U/ml GM-CSF inkubiert. Nach 20 h wurden die toten Zellen im Durchflusszytometer nach Färbung mit Propidiumiodid bestimmt. Der Anteil vitaler Zellen in der Kontrollkultur ohne Testsubstanz wurde als 100 %-Wert verwendet und die Detergens- bzw. Partikel-haltigen Proben darauf bezogen.

Phagozytosestudien

Das Ausmaß der Phagozytose oberflächenmodifizierter Mikropartikel im Vergleich zu PVA-stabilisierten Mikropartikeln wurde durch Inkubation der Mikropartikel mit Monozyten (10^6 /ml) über 18 h untersucht. Die verwendeten Monozyten waren zuvor 20 h in Anwesenheit von 30 U/ml GM-CSF kultiviert worden. Neben den mit FITC-BSA beladenen Mikropartikeln wurden zur Kontrolle auch unbeladene Partikel eingesetzt, die alle durch Primäremulgierung mit dem Ultraschallstab hergestellt wurden. Infolge ihrer Beladung mit FITC-BSA fluoreszierten die Mikropartikel und nach Phagozytose auch die aufnehmenden Zellen. Das Ausmaß der Mikropartikel-Phagozytose wurde über die Anzahl der FITC-positiven Zellen quantifiziert. Hierfür wurde entweder ein Inversmikroskop (Olympus CKX41, Hamburg, Deutschland), ausgestattet mit einem Fluoreszenzmodus (Exzitation 450 nm, Emission 530 nm), oder ein Durchflusszytometer verwendet. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit Pc5-konjugierten CD 14 und PE-konjugierten HLA-DR Antikörpern markiert und so die Monozyten kenntlich gemacht. Innerhalb der vitalen Monozytenpopulation wurde nun der Anteil FITC-positiver Zellen bestimmt. In Kontrollexperimenten wurde zum einen die durch unbeladene Mikropartikel ausgelöste unspezifische Fluoreszenz und zum anderen der Einfluss des Phagozytoseinhibitors Cytochalasin D untersucht (10 µg/ml). In weiteren Untersuchungen zur Lokalisation der Mikropartikel wurde die extrazelluläre Fluoreszenz mit Trypanblau (0,15 % in Zellsuspension) gelöscht.

Generierung von dendritischen Zellen (MoDCs)

Wie in Abschnitt 1.7 erläutert, können aus Monozyten unter dem Einfluss bestimmter Zytokine die sogenannten monocyte derived dendritic cells (MoDCs) hergestellt werden. Die isolierten Monozyten wurden hierfür über 5 Tage in Anwesenheit von GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) kultiviert. Die Monozyten adhäreren, wie oben beschrieben, an Boden und Wänden der Mikrotiterplatte, die entstandenen unreifen DCs (immature, iDCs) hingegen lösen sich von der Platte ab. Die iDCs wurden aus dem Überstand entnommen und gezählt. Anschließend wurden sie durchflusszytometrisch charakterisiert, wobei die Expression der DC-Marker HLA-DR, CD 1a und CD 209, der costimulatorischen Moleküle CD 80 und CD 86 sowie des Reifungsmarkers CD 83 mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern quantifiziert wurde.

Einfluss der Mikropartikel-Phagozytose auf die Reifung von MoDCs

Die nach 5 Tagen aus Monozyten erzeugten iDCs wurden für zwei weitere Tage mit Mikropartikeln verschiedener Konzentration und Oberflächenbeschaffenheit inkubiert. Anschließend wurde der Einfluss der Mikropartikelphagozytose, visualisiert als FITC-Fluoreszenz der aufnehmenden Zellen, auf das Expressionsmuster der Oberflächenmarker und das Reifungsstadium der DCs untersucht. Als Kontrollen dienten unbehandelte iDCs sowie die durch Zusatz eines Zytokincocktails (TNF α und IL-1 β , je 10 ng/ml; IL-6 100 U/ml; PGE₂ 1 μ g/ml) ausgereiften mDCs (mature). Während dieser Experimente enthielt das Zellkulturmedium in allen Fällen weiterhin die zur Generierung von iDCs benötigten Zytokine GM-CSF und IL-4 (Berger et al. 2002).