

„Apolipoprotein E-Peptid-modifizierte Wirkstoffträgersysteme –
Untersuchungen zur Aufnahme in Endothelzellen und Makrophagen“

DISSERTATION

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

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

vorgelegt von

Eik Leupold
aus Berlin

August 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2005 bis Februar 2009 unter der Leitung von Dr. Margitta Dathe am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin und während eines Gastaufenthaltes von April bis August 2007 an der Mount Sinai School of Medicine (MSSM) in New York City angefertigt. Das Projekt wurde durch die DFG (Forschergruppe 463) und den DAAD finanziert.

1. Gutachter: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Bienert

Disputation am: 01.12.2009

Danksagung

Dr. Margitta Dathe danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für ihre umfassende Unterstützung dieser Arbeit sowie für ihre jederzeitige Offenheit für Fragen und Ideen. Insbesondere gilt ihr mein Dank für ihre Förderung meines Forschungsaufenthaltes in New York und die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf internationalen Konferenzen vorstellen zu können.

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Michael Bienert für seine fachliche Unterstützung und die Übernahme des Gutachtens bedanken. Besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting für die Anfertigung des Gutachtens und für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Heike Nikolenko für ihre tatkräftige Unterstützung und für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken. Ihre Kompetenz und Hilfsbereitschaft geht weit über das hinaus, was man erwarten kann und darf. Marianne Dreißigacker danke ich für ihre unschätzbare administrative Hilfe.

Dr. Michael Beyermann, Dr. Stephan Pritz und Dr. Irene Coin danke ich für ihren fachlichen Rat bei allen Fragen zur Peptidsynthese. Besonderer Dank gilt vor allem Khalid Abu Ajaj, Dagmar Krause und Annemarie Klose für die Synthese und Reinigung der in dieser Arbeit verwendeten Peptide. Außerdem danke ich ihnen für ihre Unterstützung bei meinen eigenen Synthesen. Heike Stephanowitz möchte ich dabei für die MS-Analyse einer Vielzahl von Syntheseprodukten danken. Für die Unterstützung bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie möchte ich mich bei Dr. Burkhard Wiesner und Jenny Eichhorst bedanken.

Bei Prof. Dr. Zahi A. Fayad möchte ich mich für die fruchtbare Kooperation und die Möglichkeit, als Gastwissenschaftler in seiner Arbeitsgruppe an der Mount Sinai School of Medicine zu arbeiten, bedanken. Prof. Dr. Willem J. M. Mulder danke ich für die erfolgreiche Kooperation sowie die intensiven und überaus fruchtbaren Diskussionen. Dr. Karen Briley-Saebo, Dr. Venkatesh Mani und Dr. David Cormode danke ich für ihre freundliche Aufnahme in New York, ihre Hilfsbereitschaft sowie für die kompetente und schnelle Einführung in die Magnetresonanztomographie. M33 bis M40 und M75 bis M91 möchte ich für ihren ultimativen Einsatz für die Wissenschaft danken.

Schließlich möchte ich mich bei allen meinen Freunden und meiner Familie für ihr Verständnis und ihre Unterstützung bedanken. Insbesondere möchte ich mich meiner Frau Susann für ihre Liebe und ihren Rückhalt danken. Ohne sie wäre diese Arbeit vermutlich nie vollendet worden.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I. | Einleitung | 1 |
| 1. | Die Plasmamembran – Target und Barriere..... | 1 |
| 1.1. | Aufbau und Funktion | 1 |
| 1.2. | Transportmechanismen | 3 |
| 1.2.1. | Passiver Transport..... | 4 |
| 1.2.2. | Aktiver Transport..... | 4 |
| 2. | Überwindung der Plasmamembran..... | 11 |
| 2.1. | Chemische Veränderung der Wirkstoffe..... | 11 |
| 2.2. | Transfer unter Verwendung von Trägerstrukturen..... | 11 |
| 2.2.1. | Aufnahme-vermittelnde Strukturen | 11 |
| 2.2.2. | Integration in synthetische Trägerstrukturen..... | 13 |
| 3. | Targeting mittels Apolipoprotein E-abgeleiteter Peptide | 16 |
| 3.1. | Struktur und Funktion von Apolipoprotein E | 16 |
| 3.2. | Interaktion mit dem LDL-Rezeptor | 18 |
| 3.3. | Apolipoprotein E-abgeleitete Peptide | 18 |
| 3.3.1. | Apolipoprotein E-abgeleitete Peptide zum Targeting von Liposomen | 19 |
| 3.3.2. | Apolipoprotein E-Peptid-Mizellen..... | 19 |
| 4. | Anwendungsbereiche für Apolipoprotein E-basierte Trägersysteme | 20 |
| 4.1. | Die Blut-Hirn-Schranke | 20 |
| 4.1.1. | Aufbau | 21 |
| 4.1.2. | Spezielle Barrierefunktion | 21 |
| 4.2. | Arteriosklerose | 23 |
| 4.2.1. | Verlauf der Krankheit | 23 |
| 4.2.2. | Bedeutung der frühzeitigen Diagnose..... | 24 |
| 4.2.3. | Aktuelle Diagnoseverfahren | 25 |
| II. | Zielsetzung dieser Arbeit | 28 |
| III. | Materialien und Methoden | 30 |
| 1. | Geräte | 30 |
| 2. | Arbeitsmittel | 31 |
| 2.1. | Chemikalien | 31 |
| 2.2. | Medien und Pufferlösungen | 33 |
| 2.3. | Lipide | 34 |
| 2.4. | Peptide | 34 |
| 2.5. | Antikörper..... | 35 |
| 2.6. | Zelllinien..... | 36 |
| 2.7. | Tiermodelle..... | 36 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3. | Methoden | 37 |
| 3.1. | Synthese, Reinigung und Charakterisierung der Peptide | 37 |
| 3.2. | Peptid-Liposomen Komplexe | 38 |
| 3.2.1. | Herstellung der Liposomen | 38 |
| 3.2.2. | Adsorption dipalmitoylierter Peptide an Liposomen | 39 |
| 3.3. | Kovalente Kopplung von A2 an PEG-Lipid-Mizellen..... | 39 |
| 3.4. | Charakterisierung der Peptid-Komplexe | 40 |
| 3.4.1. | Dynamische Lichtstreuung | 40 |
| 3.4.2. | UV/ VIS-Spektroskopie | 41 |
| 3.4.3. | Fluoreszenzspektroskopie | 42 |
| 3.4.4. | Zirkulardichroismus | 44 |
| 3.4.5. | Bestimmung der Relaxivität..... | 45 |
| 3.5. | Zellkultur | 46 |
| 3.5.1. | Allgemeine Verfahrensweisen zur Kultivierung | 46 |
| 3.5.2. | Zelllinien-spezifische Verfahrensweisen | 46 |
| 3.6. | Untersuchung der Zytotoxizität | 47 |
| 3.7. | Internalisierungsuntersuchungen | 47 |
| 3.7.1. | Konfokale Laserscanning-Mikroskopie | 47 |
| 3.7.2. | Zytometrie..... | 48 |
| 3.7.3. | Untersuchung des Aufnahmemechanismus | 49 |
| 3.8. | In vivo Versuche zum Targeting arteriosklerotischer Veränderungen..... | 50 |
| 3.8.1. | Bestimmung der Bioverteilung und Blut-Halbwertszeit | 51 |
| 3.8.2. | Magnetresonanztomographie | 52 |
| 3.8.3. | Lokalisation in arteriosklerotischen Plaques | 53 |
| 3.9. | Statistische Auswertungsmethoden..... | 53 |
| IV. | Ergebnisse und Diskussion | 54 |
| 1. | Apolipoprotein E-abgeleitete Peptide mit alternativen Palmitoylierungspositionen | 54 |
| 1.1. | Charakterisierung der Peptid-Liposomen-Bindung | 55 |
| 1.1.1. | Assoziationszustand unter physiologischen Bedingungen..... | 55 |
| 1.1.2. | Stabilität der Peptid-Liposomen-Bindung..... | 57 |
| 1.1.3. | Einfluss der Liposomen-Bindung auf die Sekundärstruktur der Peptide | 59 |
| 1.1.4. | Integrität der Liposomen..... | 61 |
| 1.2. | Untersuchungen an Hirnkapillarendothelzellen | 62 |
| 1.2.1. | Zytotoxische Wirkung | 62 |
| 1.2.2. | Internalisierung Apolipoprotein E-Peptid-markierter Liposomen | 64 |
| 1.3. | Zusammenfassung..... | 67 |
| 2. | Fluoreszenzeigenschaften Carboxyfluorescein-markierter Apolipoprotein E-Peptide | 68 |
| 2.1. | Einfluss der Trägerstruktur | 69 |
| 2.2. | Einfluss des pH-Wertes..... | 70 |
| 2.3. | Zusammenfassung und Bedeutung für die weiteren Untersuchungen | 71 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3. | Internalisierungsuntersuchungen an Endothelzellen der Blutgefäße | 72 |
| 3.1. | Apolipoprotein E-Peptid-basierte Trägersysteme | 72 |
| 3.2. | P2fA2- und Rhodamin-markierte Liposomen..... | 75 |
| 3.3. | Charakterisierung des Internalisierungsmechanismus | 76 |
| 3.3.1. | Beteiligung von HSPG..... | 76 |
| 3.3.2. | Wirkung von Endozytose-Inhibitoren..... | 78 |
| 3.3.3. | Beteiligung spezifischer Zellkomponenten..... | 81 |
| 3.4. | Zusammenfassung..... | 84 |
| 4. | Anwendung Apolipoprotein E-abgeleiteter Peptide für die Diagnose von arteriosklerotischen Veränderungen | 86 |
| 4.1. | Charakterisierung Gadolinium-markierter PEG-Lipid-Mizellen | 86 |
| 4.1.1. | Kopplung des Apolipoprotein E-Peptids an PEG-Lipid-Mizellen..... | 86 |
| 4.1.2. | Größenbestimmung und Lagerbeständigkeit | 87 |
| 4.1.3. | Relaxivität..... | 88 |
| 4.2. | In vitro Internalisierung: Vergleich von Makrophagen und Endothelzellen | 88 |
| 4.3. | Bioverfügbarkeit | 90 |
| 4.3.1. | Blut-Halbwertszeit | 90 |
| 4.3.2. | Bioverteilung | 91 |
| 4.4. | In vivo Magnetresonanztomographie arteriosklerotischer Plaques..... | 92 |
| 4.5. | Lokalisierung in arteriosklerotischen Plaques..... | 94 |
| 4.6. | Zusammenfassung..... | 95 |
| V. | Zusammenfassung/ Summary | 97 |
| 1. | Apolipoprotein E-abgeleitete Peptide mit alternativen Palmitoylierungspositionen | 97 |
| 2. | Internalisierungsuntersuchungen an Endothelzellen der Blutgefäße | 98 |
| 3. | Anwendung Apolipoprotein E-abgeleiteter Peptide für die Diagnose von arteriosklerotischen Veränderungen | 100 |
| VI. | Literatur..... | 102 |
| VII. | Anhang | 113 |
| 1. | Wissenschaftliche Veröffentlichungen | 113 |
| 1.1. | Publikationen | 113 |
| 1.2. | Vorträge | 114 |
| 1.3. | Poster | 114 |
| 2. | Lebenslauf | 116 |

I. Einleitung

Die Voraussetzung für einen erfolgreichen Einsatz von Wirkstoffen, sowohl in der biologischen Forschung als auch in der pharmazeutischen Anwendung, ist die Verfügbarkeit am Wirkort. Besonders bei intrazellulären Zielstrukturen stellt die Plasmamembran der Zellen dabei ein wesentliches Hindernis dar. Die Anwendung zahlreicher potentieller Therapeutika scheitert daran, dass sie aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften nicht oder nur mit geringer Geschwindigkeit die Plasmamembran permeieren und damit nicht in hinreichend hoher Konzentration in der Zelle verfügbar sind.

Liposomen und mizellare Trägerstrukturen bieten die Möglichkeit, integrierte Wirkstoffe unabhängig von deren physiko-chemischen Eigenschaften in vivo zu transportieren. Allerdings ist die Anwendung von Trägerstrukturen häufig durch eine geringe Zielspezifität beeinträchtigt. Dies kann aber durch eine Funktionalisierung mit speziellen Liganden, die im Idealfall sowohl ein Targeting der entsprechenden Zellen als auch die Aufnahme in diese vermitteln, überwunden werden.

Für die Entwicklung solcher Trägersysteme sind Kenntnisse über den Zusammenhang von Trägereigenschaften und der Art und Weise, wie diese die Erkennung der zellulären Zielstrukturen und die nachfolgende Internalisierung beeinflussen, unabdingbar.

1. Die Plasmamembran – Target und Barriere

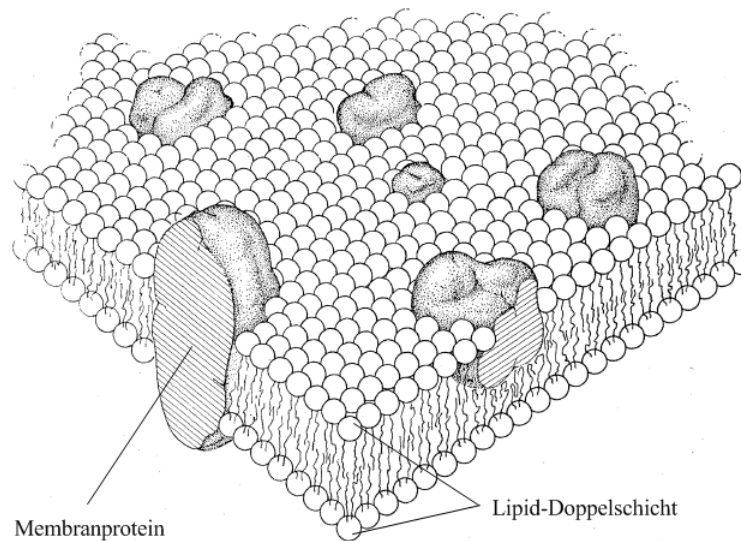
1.1. Aufbau und Funktion

Die Plasmamembran stellt die äußere Begrenzung der Zelle dar und ist für die lebenswichtige Aufrechterhaltung der Zell-inneren Homöostase von essentieller Bedeutung. Eine wichtige Funktion der Plasmamembran ist die selektive Vermittlung von Transportprozessen.

Die Grundstruktur der Plasmamembran bildet eine Lipid-Doppelschicht mit einer Dicke von 5-8 nm. In diese sind Membranproteine und Polysaccharide eingelagert (siehe Abbildung 1&2). Die genaue Zusammensetzung der Plasmamembran ist abhängig von Zellart und –zustand.

Der Anteil der Lipide an der Gesamtmasse der Plasmamembran beträgt ca. 50%. Die Phospholipide Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin sowie Sphingomyelin stellen zusammen ca. 50-60% der Gesamtlipidmenge dar. Weitere 40% machen Glykolipide und Cholesterol aus (Cooper 2000). Die Lipid-Doppelschicht bildet für die meisten wasserlöslichen Moleküle eine undurchlässige Barriere.

Abbildung 1 Flüssik-Mosaik-Modell der Plasmamembran, modifiziert aus (Singer und Nicolson 1972)

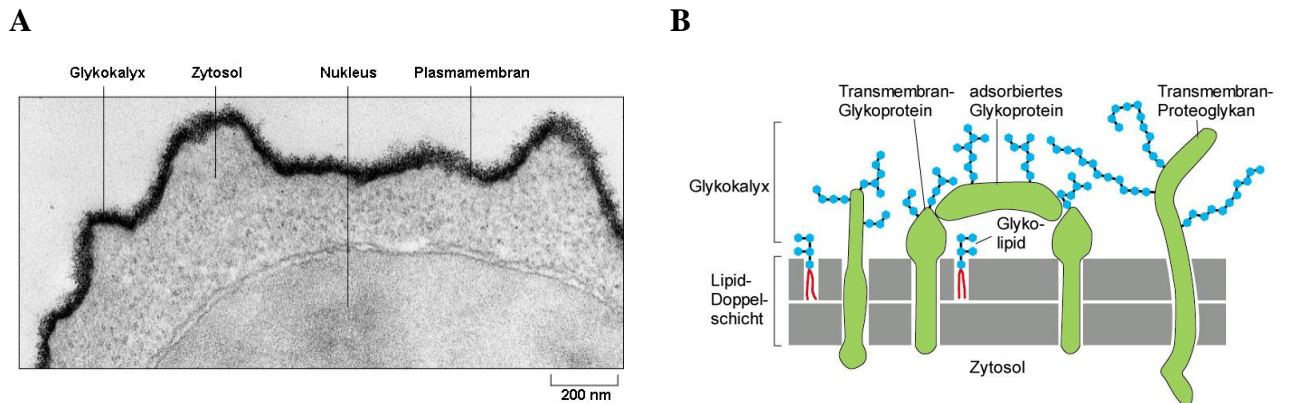


Proteine bilden einen Anteil von ca. 50% der Gesamtmasse der Plasmamembran und haben eine entscheidende Bedeutung für deren Funktionalität. Integrale Membranproteine sind meist über eine oder mehrere Transmembranhelices, bestehend aus jeweils 20-25 hydrophoben Aminosäuren in α -helikaler Konformation, in die Membran integriert. Die Verankerung in der Membran kann weiterhin über kovalent gekoppelte Fettsäurereste (z.B. Palmitoyl- und Myristylsäure) oder Prenylketten (z.B. Farnesyl-Reste) und auf der extrazellulären Seite über Oligosaccharide (z.B. Phosphatidylinositol) erfolgen. Proteine können darüber hinaus indirekt über Wechselwirkungen mit integralen Membranproteinen mit der Plasmamembran assoziiert sein. Diese werden als Periphere Membranproteine bezeichnet (Alberts et al. 2002).

Die extrazelluläre Seite der Plasmamembran von allen eukaryotischen Zellen ist von einer Kohlenhydrathülle umgeben, die als Glykokalyx bezeichnet wird (siehe Abbildung 2). Sie besteht aus Oligosaccharidketten, die kovalent an Lipide (Glykolipide) und integrale Membranproteine (Glykoproteine) gebunden sind, sowie aus Proteoglykan assoziierten Polysaccharidketten (siehe Kapitel I.1.2.2.). Die Polysaccharidketten sind strukturell äußerst vielfältig. Sie bestehen aus 50 bis 150 Einheiten 1-4 verknüpftem N-Acetylglukosamin, Glukonsäure oder Iduronsäure und sind umfangreich modifiziert (bspw. Sulfonierung) bzw. deacetyliert.

Membranen sind strukturell und funktionell asymmetrisch. Außer in den nur extrazellulär vorhandenen Kohlenhydraten unterscheiden sich die zytosolische und die extrazelluläre Seite der Plasmamembran auch in ihrer Lipidzusammensetzung. Die funktionelle Asymmetrie wird durch die definierte Orientierung der Membranproteine bedingt.

Abbildung 2 (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Rutheniumrot gefärbten Lymphozyten, deutlich erkennbar die Kohlenhydrathülle. (B) Vereinfachte Darstellung der Glykokalyx (Alberts et al. 2002)



Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell (Singer und Nicolson 1972), das die Membran als „zweidimensionale Lösung integraler Proteine ... in der Phospholipid-Doppelschicht“ beschreibt, ist die Membran hoch dynamisch und sowohl Lipide als auch Proteine sind lateral frei beweglich. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch eine deutlich eingeschränkte laterale Diffusion vieler Membranproteine. Dies deutet auf eine beträchtliche Heterogenität innerhalb der Membranstruktur hin (Jacobson et al. 1995). In der Plasmamembran existieren Lipid-Mikrodomänen, auch als „Lipid Rafts“ bezeichnet, die durch einen hohen Anteil von Cholesterol sowie verschiedener Glyko- und Sphingolipide gekennzeichnet sind (Brown und London 2000). Eine erhöhte Affinität bestimmter Membranproteine zu diesen Lipiden kann zu ihrer Anreicherung innerhalb der Mikrodomänen führen. Weiterhin führen Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett und anderen zytosolischen Proteinen sowie mit integralen Membranproteinen zur Bildung von heterogenen Proteinkomplexen. Dies bewirkt eine komplexe, definierte und gleichzeitig dynamische Strukturierung der Plasmamembran. Die Lipid-Doppelschicht wird heute als Medium verstanden, welches eine dynamische Strukturierung der Membranproteinkomplexe gestattet (Vereb et al. 2003).

1.2. Transportmechanismen

Die Barrierefunktion der Plasmamembran ist für die Aufrechterhaltung von definierten, vom extrazellulären Milieu abweichenden Bedingungen im Zytosol essentiell. Zugleich ist aber für das Überleben der Zelle ein selektiver Transport über die Plasmamembran, bspw. zur Aufnahme von Nährstoffen, um Stoffwechsel-Endprodukte auszuscheiden oder zur Regulation intrazellulärer Ionenkonzentrationen, notwendig.

1.2.1. Passiver Transport

Für den passiven Membrantransport wird keine zusätzliche Energiezufuhr benötigt. Die für den Transport erforderliche Energie stammt aus dem Konzentrationsgradienten des betreffenden Substrats und bei geladenen Molekülen vom Membranpotential, dem Nettoladungsunterschied zwischen Extra- und Intrazellularraum. Die resultierende, den Transport treibende, Kraft wird als elektrochemischer Gradient bezeichnet.

Das Spektrum an Substanzen, die in der Lage sind, die Lipid-Doppelschicht durch passive Diffusion zu überwinden, ist stark eingeschränkt. Ionen, polare Substanzen mit der Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen, sowie Moleküle mit einer Größe von mehr als 500 Da sind in der Regel von diesem Transportweg ausgeschlossen (Lipinski et al. 2001). Dennoch spielt dieser bei der zellulären Aufnahme der meisten Arzneistoffe eine wichtige Rolle.

Spezielle Membrantransportproteine mit hoher Spezifität für bestimmte Substanzen oder Klassen von Molekülen, wie Aminosäuren, Kohlenhydrate und zelluläre Metabolite, ermöglichen es der Zelle, diese durch erleichterte Diffusion aufzunehmen. Dabei bilden die Transportproteine innerhalb der Membran eine durchgängige Proteinumgebung und bieten damit den meist hydrophilen Substanzen die Möglichkeit, die Membran zu überwinden, ohne in Kontakt mit der stark hydrophoben Lipid-Doppelschicht zu kommen.

Es werden zwei Klassen von Membrantransportproteinen unterschieden. Kanalproteine interagieren nur schwach mit den Substanzen und bilden wässrige Poren, die einen schnellen Membrantransport erlauben. Carrier-Proteine binden die zu transportierenden Substanzen und durchlaufen anschließend eine Folge von Konformationsänderungen, die in einem Transmembrantransport dieser Substanzen resultieren. Carrier-vermittelte Transportprozesse spielen bei der zellulären Aufnahme von pharmakologischen Wirkstoffen nur eine untergeordnete Rolle, da sie im Vergleich zum Transport über passive Diffusion eine deutlich geringere Geschwindigkeit aufweisen und durch hohe Substanzkonzentrationen sättigbar sind (Alberts et al. 2002).

1.2.2. Aktiver Transport

Für das Überleben der Zelle ist es von großer Bedeutung, aktiv Einfluss auf die intrazellulären Bedingungen nehmen zu können. Daher müssen bestimmte Substanzen gegen den elektrochemischen Gradienten transportiert werden können. Für diesen Transport wird eine zusätzliche Energiezufuhr benötigt, welche durch Hydrolyse von ATP oder durch Kopplung an einen Ionengradienten erfolgen kann.

Aktiver Carrier-vermittelter Transport

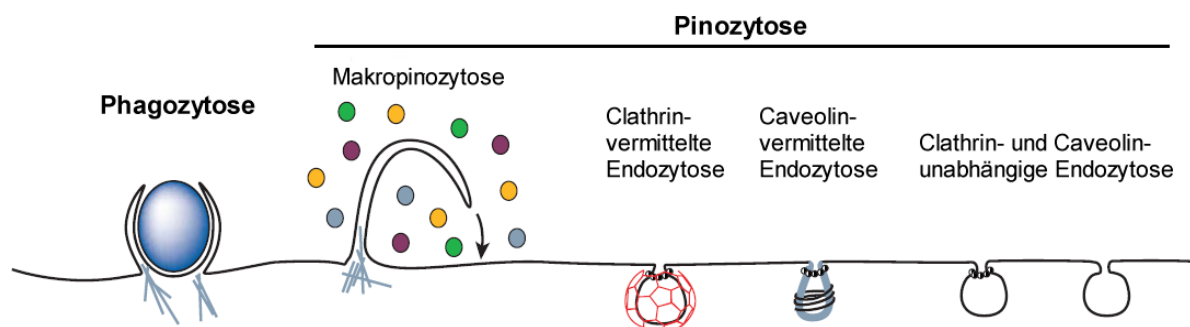
Während Kanalproteine ausschließlich einen passiven Membrantransport vermitteln, können einige Carrier-Proteine auch bestimmte Substanzen aktiv transportieren. Dazu gehören Kohlenhydrate und Aminosäuren.

Ein Beispiel für eine weit verbreitete Gruppe von aktiven Carrier-Proteinen stellen die Transporter der ABC-Familie dar, welche in eukaryotischen Zellen vorrangig Exportprozesse vermitteln. Zu dieser Transporterfamilie gehört auch der Multidrug Resistance-Transporter (MDR), welcher in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke und in vielen Krebszellen stark exprimiert wird und dadurch eine Unempfindlichkeit gegen ein breites Spektrum an Chemotherapeutika bedingt.

Endozytische Aufnahmeprozesse

Größere Partikel, wie Proteine oder Lipoproteine, werden über endozytische Mechanismen internalisiert. Unter der Bezeichnung Endozytose werden zelluläre Aufnahmeprozesse zusammengefasst, bei denen das zu internalisierende Material von einem Teil der Plasmamembran eingeschlossen wird (siehe Abbildung 3). Dabei kommt es zunächst zur Einstülpung der Membran und in der Folge zur Abschnürung des endozytischen Vesikels. Endozytische Prozesse verbrauchen Energie und sind durch spezifische Inhibitoren (Ivanov 2008) sowie durch niedrige Temperaturen (4 °C) hemmbar (Steinman et al. 1983).

Abbildung 3 Übersicht der verschiedenen Endozytosemechanismen bei eukaryotischen Zellen, modifiziert aus (Conner und Schmid 2003)



Phagozytose

Als Phagozytose wird die Aufnahme von sehr großen Partikeln bezeichnet. Dazu gehören u.a. Pathogene, Überreste apoptotischer Zellen oder arterielle Fettablagerungen (Aderem und Underhill 1999). Diese Form der Endozytose hat eine wesentliche Bedeutung für die angeborene Immunantwort und wird nur von spezialisierten Zellen, wie Makrophagen, Neutrophilen und Dendritischen Zellen, ausgeführt.

Im Gegensatz dazu kann die als Pinozytose bezeichnete, kontinuierliche Internalisierung kleinerer Vesikel bei allen eukaryotischen Zellen beobachtet werden. Es können 4 verschiedene pinozytische Aufnahmemechanismen unterschieden werden. Diese sind hoch reguliert und unterscheiden sich hinsichtlich der beteiligten zellulären Strukturen, dem Mechanismus der Vesikelbildung, der Art des internalisierten Substrats und der Größe des gebildeten Vesikels (Conner und Schmid 2003).

Makropinozytose

Makropinozytose ist verbunden mit einer intensiven, dynamischen Neuorganisation der Plasmamembran (engl. membrane ruffling). Durch die Aktin-getriebene Ausstülpung und anschließende Rückfaltung der Plasmamembran entstehen bis zu 5 µm große Vesikel, die als Makropinosomen bezeichnet werden. Große Mengen des umgebenden Mediums und an der Plasmamembran akkumulierten Substanzen werden über diesen Prozess aufgenommen. Makropinozytose wurde ursprünglich bei Makrophagen beobachtet (Lewis 1931) und kann in den meisten eukaryotischen Zellen durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren (je nach Zelltyp M-CSF, EGF, PDGF) initiiert werden (Jones 2007). Auch Pathogene wie Listerien, Salmonellen und Adenoviren nutzen Makropinozytose, um Zugang zu den Zellen zu erlangen (Francis et al. 1993; Meier et al. 2002).

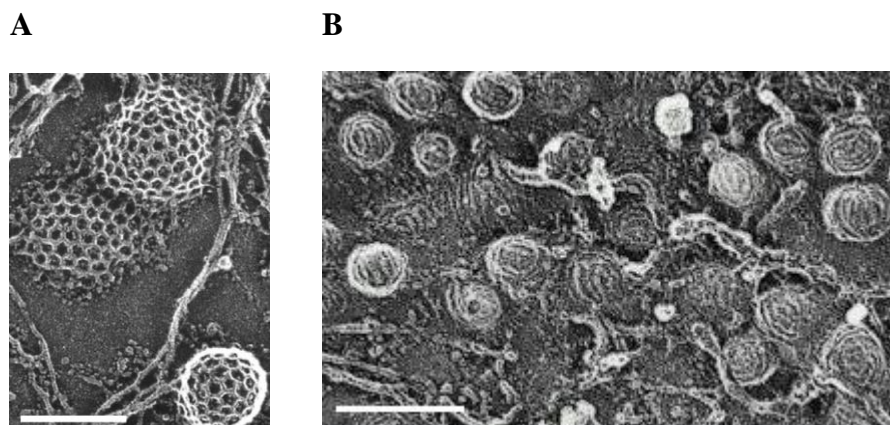
Clathrin-vermittelte Endozytose

Clathrin-vermittelte Endozytose (CME, engl. clathrin-mediated endocytosis) ist der bislang am besten charakterisierte zelluläre Aufnahmemechanismus. Zu den Funktionen der CME gehören die Aufnahme von Nährstoffen durch Internalisierung von Rezeptor gebundenen Komplexen, wie bspw. das Low density lipoprotein (LDL) und Transferrin (Traub 2003), sowie die Steuerung von Signaltransduktionsprozessen durch Regulation der membranständigen Rezeptormenge (Di Fiore und De Camilli 2001).

Clathrin besteht aus jeweils 3 kleinen und 3 großen Untereinheiten, die zusammen eine dreibeinige Struktur bilden. Diese wird als Triskelion bezeichnet. Clathrine lagern sich an der cytoplasmatischen

Seite der Membran zu einem polygonalen Netzwerk zusammen. Daraus resultiert eine einwärts gerichtete Wölbung der Membran. Diese Strukturen werden als Clathrin-beschichtete Vertiefungen (engl. clathrin-coated pits) bezeichnet (siehe Abbildung 4A). Die Bindung des Clathrin-Netzwerks an die Plasmamembran erfolgt über das Membranprotein Adaptin im Adapterkomplex AP2, welches Interaktionen mit weiteren Membranproteinen vermittelt und damit die Lokalisation bestimmter Transmembran-Rezeptoren in den Clathrin-beschichteten Vertiefungen realisiert (Schmid 1997). Im Verlauf der Endozytose muss die Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran durchbrochen werden und neu zu einem geschlossenen Vesikel mit einer Größe von ca. 120 nm fusionieren. Die dafür benötigte Energie wird durch die GTPase Dynamin bereitgestellt, welche sich während der Abschnürung des Vesikels um den Hals der Einstülpung in einem Heteroproteinkomplex anlagert (Damke et al. 1994; Sweitzer und Hinshaw 1998). Nach der Ablösung von der Membran wird die Clathrinhülle der Vesikel schnell abgelöst. Die frühen endozytotischen Vesikel (Endosomen) fusionieren miteinander und durchlaufen einen Sortierungsprozess. Einige Vesikel fusionieren mit Lysosomen. Der Inhalt dieser Vesikel wird metabolisiert. Andere werden direkt zur Plasmamembran zurück transportiert (Maxfield und McGraw 2004).

Abbildung 4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der zytosolischen Seite der Plasmamembran (A) verschiedene Stadien der Entstehung Clathrin beschichteter Vertiefungen (Higgins und McMahon 2002) (B) dichte Ansammlung von Caveolae (Rothberg et al. 1992), weiße Balken entsprechen 200 nm



Caveolin-vermittelte Endozytose

Eine weitere an zellulären Aufnahmeprozessen beteiligte Membranstruktur sind die Caveolae. Diese sind besonders stark bei Endothelzellen verbreitet und können dort bis zu 10-20 % der Zelloberfläche ausmachen. Caveolae sind bevorzugt in Cholesterol-reichen Lipid-Mikrodomänen (engl. lipid rafts) lokalisiert. Die flaschenähnliche Form der Caveolae wird durch das dimere Membranprotein Caveolin

induziert. Caveolin bindet Cholesterol und bildet in der Membran eine Haarnadel-Struktur (engl. hairpin-structure). Der auf der zytosolischen Seite befindliche N-Terminus interagiert mit weiteren Proteinen und bildet Oligomere mit anderen Caveolin Einheiten (Okamoto et al. 1998). Dies führt zur Ausbildung der charakteristischen „gestreiften“ Caveolae (siehe Abbildung 4B). Die Abschnürung der ca. 60 nm großen Vesikel (Caveosomen) erfolgt unter Beteiligung von Dynamin. Caveosomen werden vorrangig zum Golgi-Apparat oder dem Endoplasmatischen Retikulum transportiert (Le und Nabi 2003).

Die Caveolae sind im Vergleich zu den Clathrin beschichteten Vertiefungen weit weniger gut charakterisiert. Die Aufnahme von Serum Albumin wird durch in den Caveolae lokalisierte Rezeptoren (Gp60, Albondin) vermittelt (Schnitzer und Oh 1994). Aufgrund der Lokalisation von verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren in den Caveolae wird eine Beteiligung an der Kompartimentierung und Regulation verschiedener Signaltransduktionswege vermutet (Thomas und Smart 2008). Allerdings zeigen Caveolin-1 Knockout Mäuse, bei denen keine morphologisch nachweisbaren Caveolae vorhanden sind, auch keinen offenen Phänotypus. Kleinere gewebespezifische Fehlentwicklungen ermöglichten zwar einen wichtigen Einblick in die Funktion der Caveolae (Razani et al. 2002), eine obligatorische Funktion der Caveolae an den Aufnahmeprozessen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Weitere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Caveolin eine negativ-regulatorische Funktion besitzen könnte (Le et al. 2002).

Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose

Es gibt Hinweise auf die Existenz zumindest eines weiteren Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytosemechanismus. HeLa-Zellen, welche eine temperatursensitive Form von Dynamin exprimieren, zeigen nach Umstellung der Temperatur von 30 auf 38 °C keine pinozytotische Aktivität. Diese normalisiert sich innerhalb von 30-60 min, allerdings wird dabei ein anderer Clathrin- und Dynamin-unabhängiger Mechanismus aktiviert (Damke et al. 1995). Es ist bisher nicht bekannt, welche zellulären Strukturen an diesem Aufnahmemechanismus beteiligt sind. Wahrscheinlich werden mehrere Mechanismen unter diesem Begriff zusammengefasst. So konnten pinozytotische Aufnahmeprozesse beobachtet werden, die unter Beteiligung von Dynamin erfolgen, während andere unabhängig von Dynamin aktiv sind (Lamaze et al. 2001). Eine verlässliche Differenzierung zwischen Clathrin- und Caveolin-unabhängiger Endozytose und Makropinozytose gestaltet sich schwierig, da im Gegensatz zu anderen endozytotischen Aufnahmemechanismen bisher keine spezifischen Marker auf den Vesikeln bekannt sind. Allein der Terminus „Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose“ beinhaltet streng genommen auch die Makropinozytose.

Endozytose als Mittel für einen effizienten Wirkstofftransport?

In der Regel gelten endozytotische Aufnahmemechanismen für den Wirkstofftransport in die Zelle als ineffizient. Zum Einen ist die Transportgeschwindigkeit im Vergleich zur Diffusion durch die Plasmamembran deutlich geringer und endozytierte Vesikel machen nur einen kleinen Teil des Zellvolumens aus, wodurch die zelluläre Gesamtkonzentration gering ist (Guillot et al. 1990). Das Erreichen von therapeutisch wirksamen Wirkstoffkonzentrationen wird zusätzlich erschwert, wenn die Wirkstoffe nach der endozytotischen Aufnahme in Lysosomen lokalisiert sind. Lysosomen besitzen einen niedrigen pH-Wert und eine hohe enzymatische Aktivität, die einen Abbau der Wirkstoffe bewirken kann. Meist erfolgt nur eine begrenzte Freisetzung von Wirkstoffen aus den Lysosomen (Pillay et al. 2002).

Demgegenüber steht die Möglichkeit, Wirkstoffe – durch Ansteuerung bestimmter, Endozytose vermittelnder Rezeptoren – in definierte Gewebe und Zellen zu dirigieren und damit dessen relative Konzentration am gewünschten Zielort zu erhöhen. Eine Möglichkeit wäre die Inkorporation der Wirkstoffe in mit zielsteuernden Strukturen versehene Träger. Damit kann die Verteilung des Wirkstoffes im Körper aufgrund seiner physiko-chemischen Eigenschaften umgangen werden (siehe Kapitel I.2.2. Transfer unter Verwendung von Trägerstrukturen).

In den letzten Jahren wurden darüber hinaus vermehrt Anstrengungen unternommen, durch endozytotische Prozesse internalisierte Substanzen dem lysosomalen Abbau zu entziehen. Dabei kommen Strategien zur Anwendung, die von verschiedenen Pathogenen, wie dem Influenza Virus oder Plasmodien, im Verlauf der Evolution entwickelt wurden (Sibley 2004; Smith und Helenius 2004). Dazu gehören bspw. Polymere, die induziert durch den niedrigen lysosomalen pH-Wert mit der Membran der Lysosomen fusionieren (Oliveira et al. 2007) oder Poren bilden (Provoda und Lee 2000) und dadurch den Wirkstoffen Zugang zum Zytosol ermöglichen.

Rolle der zellulären Heparansulfat-Proteoglykane

Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) sind ein Hauptbestandteil der Glykokalyx und sind ubiquitär an der Oberfläche eukaryotischer Zellen vorhanden. Heparansulfat (HS) kann an verschiedene Proteine gekoppelt vorliegen. Es können zwei Proteinfamilien unterschieden werden, die permanent Heparansulfat tragen, Syndekane und Glypikane. Syndekane sind Transmembranproteine, die 2-3 Polysaccharidketten tragen. Die zytoplasmatische Domäne ist hochkonserviert und interagiert mit verschiedenen zytoplasmatischen Proteinen, u.a. F-Aktin und Aktin-bindende Proteine (Saunders et al. 1989). Glypikane sind über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Plasmamembran assoziiert und vermehrt in Cholesterol-reichen Lipid-Mikrodomänen lokalisiert. HS ist strukturell äußerst vielfältig. Es besteht aus 50 bis 150 Einheiten 1-4 verknüpftem N-Acetylglukosamin, Glukonsäure oder Iduronsäure und ist umfangreich modifiziert (bspw. Sulfonierung) bzw. deacetyliert.

Die Saccharidsequenz und das Modifizierungsmuster sind hoch variabel aber spezifisch für bestimmte Zelltypen (Kato et al. 1994).

HSPGs sind an der Steuerung verschiedener Funktionen, wie der morphologischen Entwicklung, der Reparatur von Gewebeschäden und der Immunabwehr, beteiligt. Sie fungieren dabei als Ko-Rezeptoren und modulieren eine Reihe von Ligand-Rezeptor-Interaktionen (Esko 1991). HS interagiert mit einem großen Spektrum extrazellulärer Liganden (Bernfield et al. 1999). Aufgrund seiner ubiquitären Verbreitung, der hohen strukturellen Redundanz und der negativen Ladung des HS wird im Allgemeinen von eher unspezifischen Interaktionen mit kationischen Substanzen ausgegangen. Einige Liganden, bspw. bestimmte Wachstumsfaktoren (FGF, TGF- β), binden hingegen selektiv an bestimmte HS-Sequenzen (Lindahl et al. 1998).

Aufgrund ihrer anionischen Natur können HSPGs eine Reihe kationischer Moleküle auf der Plasmamembran akkumulieren, die in der Folge internalisiert werden (Belting et al. 2006). Die Art der daran beteiligten HSPGs und die bei der Aufnahme aktivierten Mechanismen sind allerdings weitgehend unbekannt. Für Zell-penetrierende Peptide (engl. cell-penetrating peptides, CPPs) bspw. werden verschiedene Aufnahmewege diskutiert. Eine Möglichkeit stellt die unspezifische Aufnahme der adsorbierten CPPs über Makropinozytose aufgrund des natürlichen Turn-overs des HSPGs dar. Die Transporteffizienz dieser adsorptiven Endozytose kann sehr hoch sein (Shen et al. 1992). Dieser Aufnahmeweg wird bspw. für Fluoreszenz-markiertes Tat-Peptid (Kaplan et al. 2005) sowie für CPP-Konjugate, wie okta-Arginin-markierte Liposomen (Khalil et al. 2006), als sehr wahrscheinlich angesehen.

Die Aufnahme der an den HSPGs adsorbierten CPPs könnte auch durch spezifische Rezeptoren vermittelt werden. So wurde für das Tat-Peptid eine Clathrin-vermittelte Internalisierung nach Adsorption durch HSPGs demonstriert (Richard et al. 2005). Die Beteiligung von Clathrin an der Aufnahme lässt auf die Aktivierung spezifischer Rezeptorstrukturen schließen.

Des Weiteren wird die Möglichkeit diskutiert, dass HSPGs induziert durch definierte Interaktionen mit bestimmten Liganden direkt deren Aufnahme einleiten könnten (Poon und Garipey 2007). Diese Theorie wird u.a. durch die Stimulation der Endozytose durch Oligomerisierung von Syndekanen (Fuki et al. 1997) und die deutliche Steigerung der Aufnahmeeffizienz durch Erhöhung der Anzahl Aufnahme-vermittelnder Strukturen (Kawamura et al. 2006) unterstützt. Darüber hinaus könnte die Interaktion mit HSPGs eine gewisse Selektivität der Aufnahmewege vermitteln. Gleichzeitig könnte damit die große Heterogenität der bei der Aufnahme von CPPs beobachteten Mechanismen erklärt werden (Khalil et al. 2006; Nakase et al. 2007).

2. Überwindung der Plasmamembran
- 2.1. Chemische Veränderung der Wirkstoffe

Die chemische Modifizierung von Wirkstoffen ausgehend von definierten Leitstrukturen im Rahmen der Arzneistoffentwicklung stellt eine elegante Methode zur Verbesserung der zellulären Aufnahme dar. Dabei werden die physiko-chemischen Eigenschaften dahingehend verändert, dass ein direkter Membrantransport über die Lipid-Doppelschicht durch passive Diffusion ermöglicht wird. Eine Anpassung der Eigenschaften an die von Lipinsky definierten Regeln (Lipinski et al. 2001) ist jedoch nur begrenzt möglich, da die chemische Struktur des Wirkstoffes in erster Linie auf die Erkennung der entsprechenden Targetstrukturen angepasst sein muss.

- 2.2. Transfer unter Verwendung von Trägerstrukturen

Trägerstrukturen ermöglichen den Transport von Wirkstoffen unabhängig von ihren physiko-chemischen Eigenschaften. Das zu transportierende Molekül (engl. Cargo) wird mit Molekülen oder Partikeln (Träger, engl. Carrier), welche die Internalisierung des Cargos ermöglichen, verknüpft.

Während klassische Arzneiformen keinen Einfluss auf die Körperverteilung der Wirkstoffe haben, können bestimmte Trägerstrukturen die Wirkstoffe direkt zum Zielgewebe transportieren (engl. drug targeting) und dort die Wirkstoffe kontrolliert freisetzen (engl. controlled release). Dadurch werden dessen Bioverfügbarkeit und somit seine therapeutische Effizienz erhöht und gleichzeitig die systemischen Nebenwirkungen reduziert, woraus eine Erhöhung der therapeutischen Sicherheit resultiert.

Der ideale Träger besitzt eine hohe Spezifität für das Zielgewebe, eine hohe Resistenz gegenüber metabolischem Abbau bzw. der Erkennung durch das Immunsystem, ist nicht toxisch, zeigt nur minimale Nebenwirkungen und kann eine ausreichende Menge des Wirkstoffs transportieren.

- 2.2.1. Aufnahme-vermittelnde Strukturen

Spezifische Liganden und Antikörper

Die kovalente Kopplung von Wirkstoffen an spezifische, Aufnahme-vermittelnde Liganden, bspw. Transferrin, stellt eine Möglichkeit dar, die Aufnahme biologisch aktiver Moleküle zu vermitteln. Alternativ können auch Antikörper, die in ihrer Antigenbindungsstelle das Epitop bestimmter Liganden nachbilden und damit spezifisch bestimmte Rezeptorstrukturen binden, eingesetzt werden. Der Vorteil dieser Strategie liegt in der, je nach Art des angesprochenen Rezeptors, hohen Target-

Spezifität. Diese ist besonders für die Tumorthherapie von Bedeutung, bei der Antikörper-Toxin-Konjugate eingesetzt werden, wobei die Funktion der Antikörper in der Regel nicht die Aufnahmevermittlung sondern das Targeting bestimmter Zellen bzw. die Interaktion mit bestimmten Signalrezeptoren ist (McDonagh et al. 2006). Nachteile sind neben dem hohen Kostenaufwand vor allem die geringe Haltbarkeit dieser Präparationen und die hohe Immunogenität von Antikörpern. Des Weiteren ist eine Verdrängung durch natürliche Liganden zu beachten, die eine Applikation von relativ hohen Wirkstoffmengen erforderlich macht.

Verschiedene Antikörper-basierte Arzneimittel wurden bereits durch die amerikanische Zulassungsbehörde (FDA, engl. Food and Drug Administration) zugelassen. Zu diesen gehören unter anderem Avastin[®], Roche Pharma AG (anti-VEGF) und Herceptin[®], Roche Pharma AG (anti-ERBB2).

Zell-penetrierende Peptide

Zell-penetrierende Peptide (engl. cell-penetrating peptides, CPPs) sind in der Lage, die Plasmamembran unterschiedlicher Zellen zu überwinden und den Transport nicht-Membran-gängiger Moleküle zu vermitteln. Sie bestehen in der Regel aus 9 bis 30 Aminosäuren und sind meist stark kationisch (Zorko und Langel 2005).

Es sind ca. 100 verschiedene CPPs bekannt. Penetratin gehört zu den am besten charakterisierten CPPs und leitet sich von der Zell-penetrierenden Sequenz des Antennapedia-Proteins ab (Joliot et al. 1991). Ein weiteres weit verbreitetes CPP ist das Tat-Peptid. Dieses basiert auf dem Tat-Protein (engl. transactivator of transcription) des HIV-1 (Frankel und Pabo 1988). Das verkürzte Peptid besteht aus der basischen Region sowie der Kern-Lokalisations-Sequenz des Proteins (Vives et al. 1997).

Durch Kopplung Zell-penetrierender Peptide konnten verschiedenste Moleküle effizient in Zellen eingeschleust werden (Reviews: (Fischer et al. 2005; Vives 2005). Dazu gehören Peptide (Prochiantz 1996), Proteine (Tunnemann et al. 2006), Oligonukleotide (Astria-Fisher et al. 2002), Peptidnukleinsäuren (Wolf et al. 2006) und Trägerstrukturen wie Liposomen (Torchilin et al. 2001) und polymere Nanopartikel (Lewin et al. 2000).

Der Internalisierungsmechanismus der CPPs ist umstritten. Ursprünglich wurde eine direkte Passage durch die Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran postuliert (Derossi et al. 1994; Vives et al. 1997). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Fixierung der Zellen in früheren mikroskopischen Untersuchungen eine artifizielle Verteilung der Peptide in Zytosol und Nukleus resultierte (Richard et al. 2003). Darüber hinaus lieferte diese Studie einen klaren Beweis für die Beteiligung endozytotischer Prozesse an der Aufnahme von Tat- und nona-Arginin-Peptiden.

Für Tat-Fusionsproteine werden verschiedene endozytotische Mechanismen diskutiert. Es wurde sowohl Caveolin-vermittelte Endozytose (Fittipaldi et al. 2003) als auch Makropinozytose (Wadia et al. 2004) vorgeschlagen. Unter Verwendung spezifischer Endozytose-Inhibitoren wurde für das Tat-Peptid eine Clathrin vermittelte Aufnahme demonstriert (Richard et al. 2005), während gleichzeitig

eine Aufnahme über Makropinozytose beobachtet wurde (Kaplan et al., 2005). Für verschiedene CPPs wird ein Aufnahmemechanismus unter Beteiligung von HSPGs diskutiert (Tyagi et al. 2001; Marty et al. 2004; Richard et al. 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass Penetratin sowie Tat- und Oligoarginin-Peptide in lebenden, nichtfixierten Zellen zumindest teilweise energieunabhängig internalisiert werden (Thoren et al. 2003). Eine Beteiligung von Energie-abhängigen und -unabhängigen Mechanismen wurde auch für die Aufnahme des amphipathischen Modellpeptides KLA vorgeschlagen (Oehlke et al. 2004).

2.2.2. Integration in synthetische Trägerstrukturen

Eine Reihe verschiedener Trägersysteme wurde für die Forschung sowie für diagnostische und therapeutische Anwendungen entwickelt. Diese unterscheiden sich in ihrer Struktur und in der Art und Herkunft der verwendeten Materialien. Neben Kohlenstoff, Silizium und anderen Metall-basierten nanopartikulären Trägern bilden Trägersysteme aus biologischen Materialien, wie Lipiden, Laktat oder polymeren Kohlenhydraten, einen Schwerpunkt der aktuellen Entwicklung. Die Anwendung physiologisch abbaubarer Trägersysteme ist für eine effektive Freisetzung des Wirkstoffs am Zielort und eine möglichst hohe Verträglichkeit vorteilhaft (De Jong und Borm 2008).

Polymere Träger

Polymere gehören zu den am weitesten verbreiteten Trägersystemen. Arzneistoffe können über kovalente und adsorptive Kopplungsmechanismen eingelagert werden. Polymer-Arzneistoff-Konjugate zeichnen sich durch ihre Depotwirkung aus. Die kontinuierliche Freisetzung der Wirkstoffe resultiert in einer verlangsamten Pharmakokinetik mit wesentlich verminderten systemischen Nebenwirkungen. Ein Beispiel stellt die Integration des Zytostatikums Paclitaxel in Poly-(D,L-laktat-co-glukonsäure)-Nanopartikel dar. Diese zeigten in einem Tiermodell eine erhöhte Zytotoxizität gegen Tumorzellen (Win und Feng 2006).

Dendrimere

Dendrimere bilden eine Klasse von Trägern, die gegenüber linearen Polymeren entscheidende Vorteile bieten. Die zyklische Synthese und die daraus resultierende stark verästelte Struktur der Dendrimere ermöglichen die Herstellung von Partikeln mit einer hohen Dichte an reaktiven Gruppen mit einer leicht steuerbaren und gut definierten Größe (bis zu 10 nm) und einfach zu modifizierenden Oberflächeneigenschaften. Damit ist es möglich, die Verteilung und die Pharmakokinetik inkorporierter Wirkstoffe zu beeinflussen (Cheng et al. 2007). Die Struktur der Dendrimere ermöglicht die Inkorporation der Wirkstoffe auf unterschiedliche Arten. Neben der kovalenten Kopplung können

die Wirkstoffe in die Struktur eingelagert und an der Oberfläche adsorbiert werden (D'Emanuele und Attwood 2005).

Polyethylenglykol-modifizierte Träger

Ein großer Nachteil vieler partikulärer Trägersysteme ist die schnelle Elimination aus dem Blutkreislauf. Die Halbwertszeit von Wirkstoffen und von Trägerstrukturen kann durch die Kopplung von Polyethylenglykol (PEG) deutlich erhöht werden. PEG bildet dabei eine hydratisierte Hülle um die Träger. Dadurch wird deren Löslichkeit erhöht und sie werden vor den Komponenten des Retikuloendothelialen Systems abgeschirmt (Abuchowski et al. 1977).

Amphipathische PEG-Blockcopolymere assoziieren in wässrigem Milieu spontan zu PEG-Mizellen, die einen hydrophoben Kern und eine hydrophile PEG-Hülle aufweisen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Halbwertszeit im Blutkreislauf und eine hohe Stabilität aus. Die Stabilität von Mizellen wird durch die kritische Mizell-bildene Konzentration (CMC, engl. critical micellar concentration) charakterisiert. Diese liegt für PEG-Mizellen im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-7} M und ist damit ca. 1.000fach geringer als bei Tensid-Mizellen (La et al. 1996).

Lipid-basierte Trägersysteme

Ein Vorteil lipid-basierter Trägersysteme ist die oft hohe Biokompatibilität. Sie bestehen vorrangig aus Phospholipiden und Cholesterol. Da diese gleichzeitig Hauptkomponenten der Plasmamembran sind, bedingt dies eine geringe in vivo Toxizität und Immunogenität.

Lipid-basierte Nanopartikel (SLN, engl. solid lipid nanoparticles) besitzen den Vorteil, dass sie im Vergleich zu anderen nanopartikulären Trägersystemen einfach und in großen Mengen hergestellt werden können (Mehnert und Mäder 2001). SLNs wurden für verschiedene Indikationen, vorrangig gegen verschiedene Tumorerkrankungen, und in verschiedenen Darreichungsformen, u.a. parenteral und oral getestet (Joshi und Müller 2009). Ein wesentliches Problem ist die physikalische Stabilisierung dieser energiereichen Systeme. So müssen Tenside zugesetzt werden, um eine Aggregation und/ oder Gelbildung zu verhindern.

Liposomen

Liposomen gehören zu den am besten charakterisierten Trägersystemen. Es handelt sich um kolloidale Vesikel, die durch spontane Selbstassoziation von amphiphilen Molekülen, in der Regel Phospholipiden, im wässrigen Milieu entstehen. Dabei wird der wässrige Innenraum durch eine in sich abgeschlossene Lipid-Doppelschicht von der äußeren Phase getrennt (Huang 1969). Die einfache Inkorporation hydrophiler Wirkstoffe in das wässrige Lumen, sowie die Möglichkeit, hydrophobe

Wirkstoffe in der Lipidphase zu binden, machen Liposomen zu einem universell einsetzbaren Wirkstoffträger.

Liposomen werden nach ihrer Größe und Anzahl der Lipid-Doppelschichten eingeteilt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Einteilung der Liposomen

| Bezeichnung | Laminarität | Durchmesser |
|--------------------------------------|-------------|---------------|
| SUV (engl. small unilaminar vesicle) | einfach | 20 bis 100 nm |
| LUV (engl. large unilaminar vesicle) | einfach | größer 100 nm |
| MLV (engl. multilaminar vesicle) | mehrfach | größer 100 nm |

Liposomen mit einem Durchmesser von bis zu 200 nm sind als Arzneiform für die parenterale Applikation sehr gut geeignet und können durch das stark fenestrierte Endothel peripherer Kapillargefäße auch in die Gewebe gelangen (Simone et al. 2008). Die physikalischen Eigenschaften von Liposomen wie Membranfluidität, Größe und Ladung variieren in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung und der Herstellungsart. Die Membranfluidität und damit auch die Stabilität der Liposomen ist sowohl von der Kopfgruppe als auch von Länge und Sättigungsgrad der Fettsäurereste abhängig. Unterhalb ihrer Phasenübergangstemperatur befinden sich die Phospholipide in einem geordneten Zustand, während die Lipid-Doppelschicht oberhalb der Phasenübergangstemperatur eine erhöhte Fluidität aufweist. Die Phasenübergangstemperatur kann durch die Einlagerung von Cholesterol in die Lipid-Doppelschicht oder durch eine Erhöhung des Anteils ungesättigter Lipide verringert werden (Alberts et al. 2002).

Eine Erhöhung der Halbwertszeit im Blutkreislauf und der Lagerbeständigkeit kann durch die Integration von Polyethylenglykol(PEG)-modifizierten Lipiden in die Liposomen erreicht werden (Klibanov et al. 1990). Die PEG-Ketten schirmen die Liposomen ab, so dass nur verringerte Interaktionen mit den Bestandteilen des Blutplasmas und Zellen des Immunsystems auftreten. Dadurch erhöht sich die Plasmahalbwertszeit dieser Liposomen deutlich. Diese werden als sterisch stabilisierte oder auch als Stealth-Liposomen bezeichnet.

Verschiedene liposomale Arzneistoffträgersysteme wurden bereits durch die amerikanische Zulassungsbehörde (FDA, engl. Food and Drug Administration) zugelassen. Zu diesen gehören unter anderem Myocet[®], Zeneus Pharma; und Doxil[®], Johnson & Johnson, (Doxorubicin) sowie DaunoXome[®], Gilead Pharmaceuticals, (Daunomycin) zur Behandlung von Tumorerkrankungen und AmBisome[®], Gilead Pharmaceuticals, (Amphotericin B) zur Behandlung von Mykosen.

3. Targeting mittels Apolipoprotein E-abgeleiteter Peptide

Die meisten Trägersysteme besitzen eine geringe Targetspezifität. Ein erfolgreiches passives Targeting konnte bisher vor allem für Tumore und Infektionsherde realisiert werden. Dieses basiert auf einer erhöhten Permeabilität der Kapillaren und einem verringerten Abtransport über das Lymphgefäßsystem in den betroffenen Geweben (EPR, engl. enhanced permeation and retention effect) (Iwai et al. 1984).

Für ein Gewebe spezifisches, aktives Targeting ist die Modifizierung der Trägerstrukturen mit zielortspezifischen Vektoren erforderlich (Torchilin 1985). Als Vektoren werden hauptsächlich Proteine, bspw. Antikörper, und Peptide verwendet, die spezifische Zelloberflächenstrukturen, z.B. Rezeptoren, erkennen.

Für ein erfolgreiches aktives Targeting müssen spezifische Oberflächendeterminanten auf den Zielzellen bekannt sein, wie bspw. Adhäsionsmoleküle in Entzündungsarealen und tumorspezifische Antigene. Diese sollten nur in dem betreffenden Gewebe exprimiert werden oder müssen sich zumindest quantitativ vom übrigen Organismus unterscheiden, wie bspw. die erhöhte Low Density Lipoprotein-Rezeptor (LDLr)-Expression in den Kapillarendothelien der Blut-Hirn-Schranke oder den in arteriosklerotischen Veränderungen lokalisierten Makrophagen.

3.1. Struktur und Funktion von Apolipoprotein E

Lipoproteine dienen dem Transport von wasserunlöslichen Lipiden, vornehmlich Cholesterol und verschiedenen Triglyceriden, im Blutkreislauf. Es handelt sich um Aggregate aus Lipiden und Proteinen mit einem hydrophoben Kern aus Cholesterinestern und Triglyceriden, der von hydrophilen Anteilen, bestehend aus verschiedenen Apolipoproteinen, Phospholipiden und den Hydroxylgruppen von unverestertem Cholesterol, umhüllt ist.

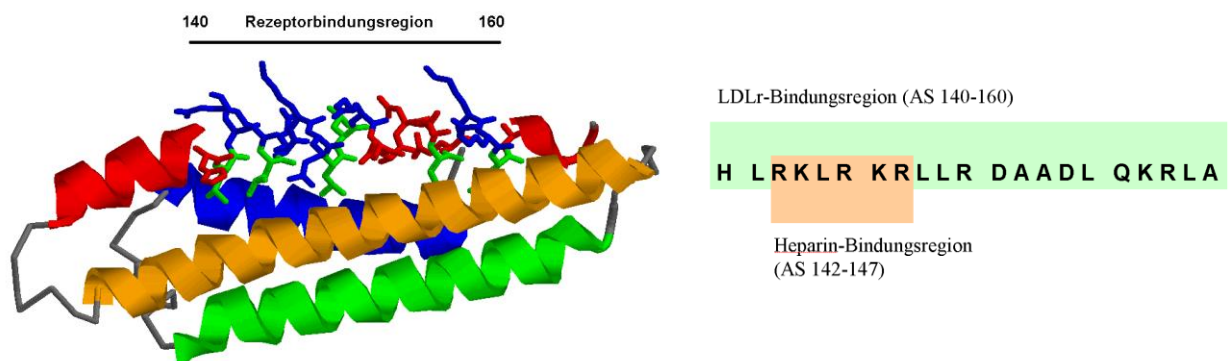
Apolipoprotein E (ApoE) besitzt als stabilisierende Proteinkomponente von Chylomikronen und Very-Low-Density-Lipoproteinen spezifische Funktionen bei der Regulation des Lipidstoffwechsels und bei der Vermittlung von Rezeptorinteraktionen.

ApoE ist ein 34,2 kDa großes Protein (299 Aminosäuren) (Rall et al. 1982), dessen Plasmakonzentration im Normalfall zwischen 3 und 7 mg/dl liegt (Mahley et al. 1984). Es ist aus zwei α -Helix-reichen Domänen aufgebaut (siehe Abbildung 5). Die 22 kDa große N-terminale Domäne (AS 1-191) ist für Rezeptorinteraktionen verantwortlich und enthält die Low Density Lipoprotein Rezeptor-Bindungsregion, während die Integration in die Lipoproteine über den C-Terminus erfolgt (Wetterau et al. 1988). Es existieren drei verbreitete Isoformen, von denen nur ApoE3 und ApoE4

durch den LDLr erkannt werden, während ApoE2 mit der Typ III-Hyperlipoproteinämie assoziiert wird (Mahley et al. 1999).

ApoE ist neben Apolipoprotein B ein Ligand des LDLr und dem als LDLr-assoziiertes Protein (LRP) bezeichneten Rezeptors. Zusätzlich ist ApoE in der Lage, mit anderen Lipoprotein-Rezeptoren, wie bspw. dem VLDL-Rezeptor oder dem ApoE-Rezeptor, zu interagieren.

Abbildung 5 N-Terminus von ApoE4, die LDLr-Bindungsregion auf Helix 4, dargestellt in rot, mit den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin in blau und die hydrophobe Aminosäure Leucin in grün (Protein Data Bank, DOI 10.2210/pdb1gs9/pdb)



Die LDLr-Bindungsregion ist in einer stark konservierten Region der Helix 4 (AS 140 bis 160) lokalisiert (Weisgraber et al. 1983; Weisgraber 1994). Dieser Bereich zeichnet sich durch eine hohe Dichte an basischen Aminosäuren aus, über die eine, vor allem durch elektrostatische Wechselwirkungen geprägte, Interaktion mit der anionischen Bindungsdomäne des LDLr erfolgt (Brown und Goldstein 1986). Die Affinität von ApoE für den LDLr wird durch die Assoziation mit den lipophilen Lipoproteinen deutlich erhöht (Innerarity et al. 1979).

Die basischen Aminosäuren der LDLr-Bindungsregion stellen gleichzeitig eine hochaffine Heparin-Bindungsstelle dar (AS 142 bis 147) (Cardin et al. 1986; Weisgraber et al. 1986). Dabei interagieren diese über elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Sulfat- und Carboxylatgruppen des Heparins. HSPG stellt eine in vivo vorhandene Heparin-artige Struktur dar, mit der ApoE-haltige Lipoproteine interagieren können. HSPG spielt bei der Aufnahme von Chylomikron-Remnants, die auch über den LDLr bzw. LRP internalisiert werden können, eine wichtige Rolle (Ji et al. 1994).

3.2. Interaktion mit dem LDL-Rezeptor

Zur Familie der LDL-Rezeptoren gehören neben dem LDLr auch der als LDLr-assoziertes Protein (LRP) bezeichnete Rezeptor LRP1b, Megalin (auch als LRP-2 bezeichnet), der VLDL-Rezeptor und der ApoE Rezeptor 2 (Strickland et al. 2002). Der LDLr ist ein aus 839 AS bestehendes Transmembranprotein, dessen Cystein-reiche, extrazelluläre N-terminale Domäne die Bindungsregion für ApoE und ApoB100 besitzt, während Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett über den C-Terminus erfolgen.

Die Hauptfunktion des LDLr besteht in der Aufnahme Cholesterol-reicher Lipoproteine über einen Clathrin-vermittelten endozytotischen Mechanismus (Brown und Goldstein 1986).

Der LDLr wird ubiquitär auf allen Zellen exprimiert. Das Expressionsniveau ist sehr variabel und hängt vom Zelltyp und der extrazellulären Cholesterinkonzentration ab. Die Expression kann auf bis zu 100.000 Rezeptoren pro Zelle hochreguliert werden, um die Versorgung der Zelle sicherzustellen (Goldstein et al. 1983).

Lipoproteine, die ApoE enthalten, zeigen im Vergleich zu ApoB-haltigen Lipoproteinen eine deutlich verringerte Plasmahalbwertszeit. Ein Grund hierfür ist die im Vergleich zu ApoB100 um 20 bis 25fach erhöhte Affinität von ApoE zum LDLr (Mahley et al. 1984). Da bis zu vier ApoE-Moleküle gleichzeitig mit einem Rezeptormolekül interagieren können, zeigen Lipoproteine, auf denen mehrere ApoE-Moleküle vorhanden sind, eine erhöhte Gesamtaffinität (Avidität) zum Rezeptor (Pitas et al. 1979; Weisgraber 1994).

3.3. Apolipoprotein E-abgeleitete Peptide

Die LDLr-Bindungsregion von ApoE konnte auf den Sequenzbereich 140 bis 160 der 4. Helix der N-terminalen Domäne eingegrenzt werden. Für eine effektive Bindung an den LDLr wurden weiterhin die Bildung einer amphipathischen α -Helix, welche mindestens zwei Bereiche basischer Aminosäuren besitzt, postuliert (Dyer et al. 1995). Das ApoE-Peptid der Sequenz AS 141-155 zeigt keine Bindungsaktivität. Es besitzt zwar die kationischen Ladungen der Bindungsdomäne, bildet aber keine α -helikale Konformation. Eine Erhöhung der LDLr-Affinität konnte durch eine Oligomerisierung der Sequenz erreicht werden. Während das Tandemdimer (141-155)₂ eine α -helikale Struktur aufweist und den LDL-Rezeptor mit einer Affinität von ca. 1 % der von LDL-Partikeln bzw. ApoB100 bindet, ist die Affinität des Trimers im Vergleich zum Dimer bereits 20-fach erhöht (Dyer und Curtiss 1991; Weisgraber 1994). Die Zunahme der Bindungsaffinität wird auf die Stabilisierung der α -helikalen Konformation zurückgeführt. Die erhöhte Affinität könnte allerdings auch durch eine mögliche Mehrfachbindung erklärt werden.

Eine Interaktion ist auch mit anderen Rezeptoren der LDLr-Familie möglich. Bspw. konnte eine Bindung des ApoE-Peptides (141-155)₂ an den LRP1-Rezeptor, der Bereiche mit einer hohen Sequenzhomologie zum LDLr besitzt, demonstriert werden (Croy et al. 2004).

Des Weiteren konnten auch Wechselwirkungen mit HSPGs nachgewiesen werden. Ein Zweidomänen-Peptid aus dem ApoE-Peptid (AS 141-150) und einer Lipid-bindenden, amphipathischen Helix vermittelt die endozytotische Aufnahme von LDL-Partikeln. Die Bindung an die Zelloberfläche erfolgt dabei über elektrostatische Wechselwirkungen des ApoE-Peptides mit dem zellulären HSPG (Datta et al. 2000).

3.3.1. Apolipoprotein E-abgeleitete Peptide zum Targeting von Liposomen

Bisherige Untersuchungen zum Targeting von Liposomen mittels ApoE-abgeleiteten Peptiden konzentrierten sich vor allem auf die Kopplungsstrategien. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Methoden zur Herstellung von Liposomen mit sowohl adsorptiv als auch kovalent gebundenen Peptiden getestet und die Interaktion dieser Komplexe an Endothelzellen von Hirnkapillaren charakterisiert. Neben der kovalenten Kopplung ermöglichte die Modifizierung des A2-Peptides mit Acylketten eine stabile Verankerung in der Lipid-Doppelschicht der Liposomen (Sauer et al. 2006).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die ApoE-Peptide in der Lage sind, eine effektive Aufnahme der Liposomen in Gehirnkapillarendothelzellen zu vermitteln. Eine nähere Untersuchung des Internalisierungsmechanismus an humanen Fibroblasten, in denen der LDLr stark exprimiert wird, zeigte, dass die A2-Peptide im Vergleich zum nativen Liganden LDL nur eine geringe Affinität zum LDLr aufweisen. Das Heparansulfat-Proteoglykan-Gerüst (HSPG) der Zellmembran konnte als eine wesentliche Komponente für die Internalisierung der ApoE-Peptid-Liposomen identifiziert werden (Sauer et al. 2005).

3.3.2. Apolipoprotein E-Peptid-Mizellen

Die Kopplung der hydrophoben Palmitoyl-Reste an das hydrophile Peptid vermittelt Tensid-Eigenschaften. Das N-terminal dipalmitoylierte ApoE-Peptid (P2A2-2) bildet in wässrigem Milieu definierte Assoziate mit einem Stokes Radius von 5,3 nm. Der große hydrophile Peptidanteil als Kopfgruppe begünstigt dabei die Bildung von Mizellen. Die kritische Mizell-bildende Konzentration (CMC, englisch: critical micellar concentration) konnte weder mittels kalorimetrischer Methoden (mikromolare Empfindlichkeit), noch mittels Fluoreszenz-basierter Methoden (nanomolare Empfindlichkeit) bestimmt werden und muss daher als Sub-nanomolar bezeichnet werden. Darüber hinaus stellt P2A2-2 ein sehr effektives Detergenz dar. Bis zu sieben Lipidmoleküle pro Peptid

(Lipid/ Peptid-Verhältnis, C_{LP}) können in einer Mizelle assoziiert sein. Damit stellen P2A2-Mizellen einen möglichen Träger für sehr hydrophobe Wirkstoffe dar. Bei einem C_{LP} größer 80 liegen Liposomen mit integrierten ApoE-Peptid vor. Es wurde ein Phasendiagramm erstellt, das sich in Abhängigkeit von den Lipid- (POPC) und Peptidkonzentrationen (P2A2-2) in drei Bereiche - Peptidmizellen, Übergangsbereich und Liposomen - unterteilt (Keller et al. 2005).

Die definierten Grenzen dieser Bereiche gestatten es, durch die Wahl des Konzentrationsverhältnisses von P2A2-2 und POPC zwischen kleinen Peptidmizellen mit einer hohen Peptiddichte und großen ApoE-Peptid-markierten Liposomen zu differenzieren.

4. Anwendungsbereiche für Apolipoprotein E-basierte Trägersysteme

Zwei Bereiche, in denen der Einsatz von ApoE-Peptid-basierten Trägersystemen vielversprechend erscheint, sind zum einen der Transport über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) aufgrund der erhöhten Expression des LDLr in den Kapillarendothelien der BHS. Ein zweiter Anwendungsbereich, der von ApoE-basierten Trägersystemen profitieren könnte, ist die Diagnostik von Arteriosklerose. Im Verlauf der Entwicklung von arteriosklerotischen Veränderungen dringen Makrophagen in die Gefäßwände ein und nehmen große Mengen oxidierten LDLs auf. Damit stellen sie ein Ziel für ApoE-Peptid-modifizierte Träger dar.

4.1. Die Blut-Hirn-Schranke

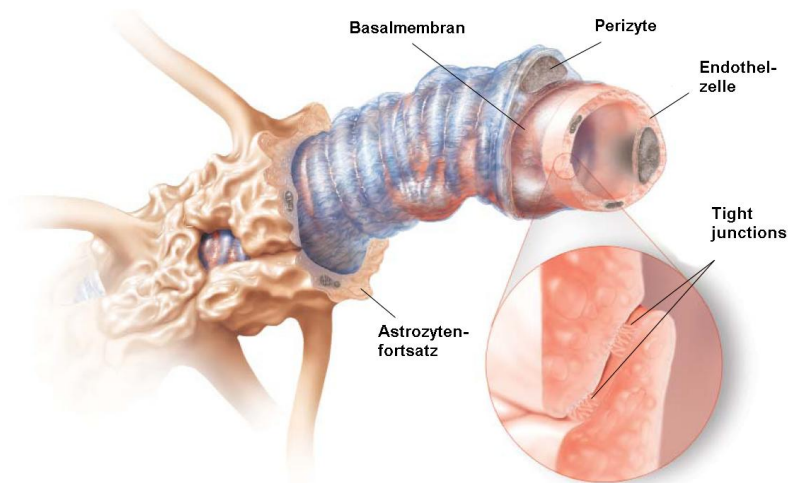
Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stellt die physiologische Barriere zwischen dem Zentralen Nervensystem (ZNS) und dem Blutkreislauf dar. Ihre Funktion ist die Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn. Dies dient dem Schutz des Gehirns vor schwankenden Bedingungen und Botenmolekülen des Blutes sowie vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern und Toxinen, verhindert aber gleichzeitig die Anwendung zahlreicher hochwirksamer Therapeutika.

Die Existenz der Blut-Hirn-Schranke ist seit dem späten 19. Jahrhundert bekannt. Paul Ehrlich beobachtete bei Versuchen mit Anilin-Farbstoffen, dass nach intravenöser Injektion in Ratten alle Organe bis auf das Gehirn angefärbt wurden (Ehrlich 1885). Mit der Etablierung der Elektronenmikroskopie in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts konnte die Barrierefunktion den Kapillarendothelzellen der zerebralen Gefäße zugeordnet werden.

4.1.1. Aufbau

Die Innenwand der Hirnkapillaren wird von den Endothelzellen gebildet. Diese sind von einer Basalmembran umgeben, die eine Stützfunktion erfüllt. An der abluminalen Oberfläche sind die Kapillaren des ZNS mit Astrozytenfortsätzen besetzt (siehe Abbildung 6). Astrozyten gehören zu den Gliazellen und sind für die physiologische Funktion der Blut-Hirn-Schranke von Bedeutung. Es wird angenommen, dass sie die spezifischen Eigenschaften der BHS in den Endothelzellen induzieren (Janzer und Raff 1987). Weiterhin befinden sich auf der Basalmembran Perizyten und Neuronen. Die genaue Funktion der Perizyten an der BHS ist bisher nicht bekannt.

Abbildung 6 Darstellung einer Hirnkapillare, modifiziert aus (Miller 2002)



Die Hirnkapillaren sind im Gegensatz zu peripheren Kapillaren nicht fenestriert. Kontinuierliche Zell-Zell-Verbindungen, die als Tight Junctions (engl. „dichte Verbindungen“, lat. zonula occludens) bezeichnet werden, versiegeln die luminalen Seite der Kapillaren und verursachen damit eine strikte Trennung des Hirninterstitiums vom Blutkreislauf (Goldstein und Betz 1983).

4.1.2. Spezielle Barrierefunktion

Spezielle Eigenschaften der BHS ermöglichen es ihr, die Funktion als physiologische Barriere zum Schutz des Gehirns auszuüben. Die außerordentlich dichten Tight Junctions zwischen den benachbarten Endothelzellen der Hirnkapillaren schränken die parazelluläre Diffusion von niedermolekularen Substanzen stark ein und leisten damit einen wesentlichen Beitrag für die Barrierefunktion der BHS. Die geringe Durchlässigkeit der Kapillarendothelschicht wird durch einen

äußerst hohen trans-endothelialen Widerstand (TEER) von bis zu 2.000 Ω cm² verdeutlicht (Crone und Olesen 1982).

Ein Transport über die BHS kann daher nur transzellulär erfolgen. Theoretisch können kleine lipophile Moleküle über passive Diffusion in das Gehirn gelangen, praktisch spielt die direkte Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Hierbei wird ein weiterer Mechanismus aktiv, der zur Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke beiträgt. Die an der luminalen Seite der Endothelzellen aktive Effluxpumpe MRP1 oder P-Glykoprotein (PGP), ein Mitglied der ABC-Transporterfamilie (ATP-binding-cassette Transportproteine), sorgt effektiv für den Rücktransport von lipophilen Stoffen ins Lumen der Hirnkapillaren (Tatsuta et al. 1992). Neben PGP werden noch weitere Multi Drug Resistance-associated Proteine (MRP) (Seetharaman et al. 1998; Zhang et al. 2003) sowie Transporter der SLC-Klasse (engl. solute class carrier) (Girardin 2006) als Efflux-Transporter in den Endothelzellen der Hirnkapillaren exprimiert. Die große Zahl von aktiven Effluxtransportern stellt die Ursache für die geringe Permeabilität kleiner, lipophiler Arzneistoffe dar. Nur 5% der 1999 in der CMC-Datenbank (engl. comprehensive medicinal chemistry) aufgeführten Wirkstoffe sind Hirn-gängig (Ghose et al. 1999).

Zusätzlich zeigen die Endothelzellen der Hirnkapillaren eine hohe metabolische Aktivität. Unter anderem können eingetretene Stoffe schnell durch eine Reihe von Cytochrom P450 Mono-Oxygenasen inaktiviert werden (el-Bacha und Minn 1999).

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn und dessen Versorgung mit Nährstoffen verfügen die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke über zahlreiche spezifische Transportsysteme, die einen selektiven und kontrollierten Stoffaustausch über das Kapillarendothel ermöglichen.

Essentielle Nährstoffe gelangen über spezielle Transportproteine in die Endothelzellen der Hirnkapillaren und überwinden so die BHS. Glukose wird über den Glut-1-Transporter passiv mit dem Konzentrationsgefälle aufgenommen (Goldstein und Betz 1983). Für Aminosäuren sind verschiedene Transportsysteme an der BHS bekannt, die jeweils für eine Gruppe von Aminosäuren mit ähnlichen physiko-chemischen Eigenschaften eine gewisse Spezifität zeigen. Zu diesen gehört bspw. das L-System für große, neutrale und aromatische Aminosäuren und das A-System für kleine neutrale Aminosäuren, die aus dem Gehirn in das Kapillarlumen transportiert werden (Pardridge und Oldendorf 1975; Betz und Goldstein 1978).

Große Moleküle und Molekülkomplexe wie das Cholesterol-reiche Low-Density Lipoprotein (LDL) (Dehouck et al. 1997), das Eisen-transportierende Transferrin (Fishman et al. 1987) sowie Insulin (Pardridge et al. 1985) werden Rezeptor-vermittelt in die Kapillarendothelzellen aufgenommen und über Transzytose vesikulär durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert.

4.2. Arteriosklerose

Als Arteriosklerose (auch Atherosklerose) wird die krankhafte, langsame Verdickung der Arterienwände und die damit einhergehende Verengung der arteriellen Blutgefäße bezeichnet, an der Prozesse wie die Einlagerung von Blutfetten und Cholesterin, die Neubildung von Bindegewebsstrukturen, die Entstehung von Thromben und Entzündungsprozesse beteiligt sind (Lusis 2000). Arteriosklerose und auf dieser beruhende sekundäre Störungen wie Thrombosen, Ischämien, Herzinfarkte und Schlaganfälle stellen die Haupttodesursache in der westlichen Welt dar (Naghavi et al. 2003).

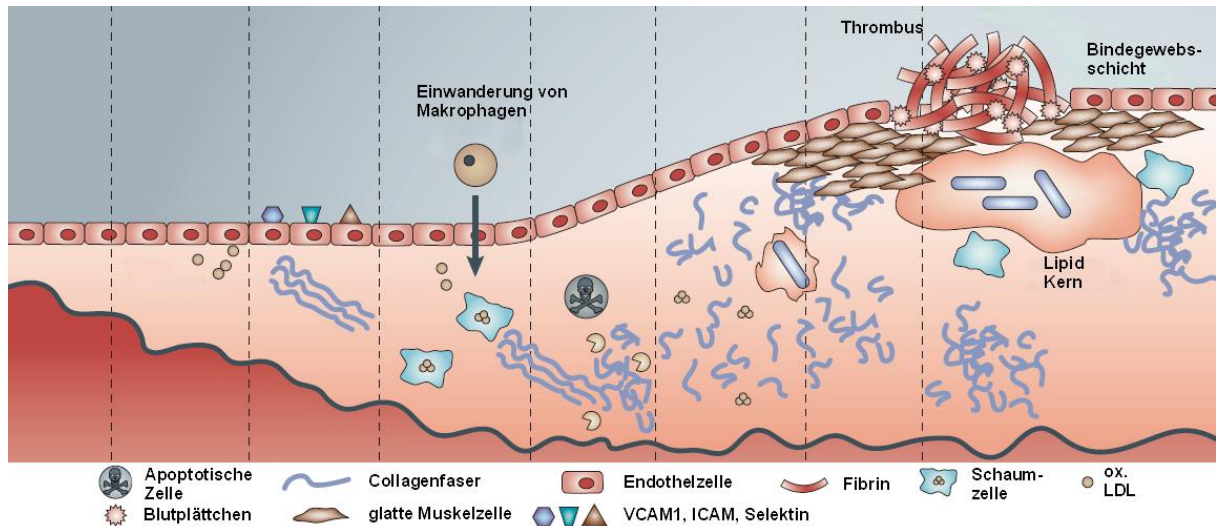
4.2.1. Verlauf der Krankheit

Welche Vorgänge die Entwicklung arteriosklerotischer Veränderungen auslösen, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Es werden zwei Hypothesen diskutiert. Nach der „Response-to-injury“-Hypothese ist eine Verletzung des Arterienendothels (Intima) für die Initiierung der Vorgänge verantwortlich. Die morphologischen Schädigungen können dabei durch Traumata, mechanische Verletzungen, biochemische Schädigungen durch bakterielle Toxine, einen Angriff durch Viren oder durch Antigen-Antikörper-Reaktionen hervorgerufen werden (Ross 1976). Die „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“-Hypothese sieht in der oxidativen Modifizierung von LDL, der raschen Aufnahme durch Makrophagen und in der folgenden Entzündungsreaktion, welche durch die Einwanderung der Makrophagen in die Intima hervorgerufen wird, die eigentliche Ursache für die Initiierung des arteriosklerotischen Geschehens (Goldstein und Brown 1977).

Im weiteren Verlauf differenzieren die Makrophagen, bedingt durch die Aufnahme großer Mengen oxidierten LDLs, zu Schaumzellen (engl. foam cells) (siehe Abbildung 7). Die Entzündungsreaktion dringt tiefer in die Arterienwand ein und weitet sich bis zum Bereich der glatten Muskelzellen aus (Media). Es erfolgt eine vermehrte Einlagerung von Collagen und eine Einwanderung von glatten Muskelzellen in den Bereich der Intima. Die Schaumzellen sterben ab und bilden einen Cholesterolreichen Lipidkern (engl. lipid core), der unter einer dünnen Bindegewebschicht (engl. fibrous cap) aus Collagen und glatten Muskelzellen lokalisiert ist (Lusis 2000).

Die entstandenen arteriosklerotischen Plaques können aufbrechen und Thromben auslösen, die den Gefäßdurchmesser der Arterien weiter verringern. Diese können sich im weiteren Verlauf ablösen und sekundäre Stenosen in anderen Bereichen verursachen.

Abbildung 7 Stark vereinfachte Darstellung der Entwicklung arteriosklerotischer Plaques; ausgehend von gesundem Endothel (links), über die Einwanderung von Makrophagen, der Bildung von Schaumzellen bis zur Entwicklung eines fortgeschrittenen Plaque mit Thrombus; modifiziert aus (Choudhury et al. 2004)



4.2.2. Bedeutung der frühzeitigen Diagnose

Eine der Ursachen für die hohe Zahl Arteriosklerose bedingter Todesfälle ist der äußerst langsame Verlauf der Krankheit. Die arterielle Verengung entwickelt sich sehr langsam und bleibt über Jahre und Jahrzehnte frei von Symptomen. Die Krankheit bleibt in dieser Phase häufig unerkannt. Eine Diagnose erfolgt meist erst bei deutlichen Symptomen einer Gefäßverengung oder -verschlusses (Stenose), der sich in Abhängigkeit von der Lage im Blutkreislauf in Ischämien, Thrombosen, Angina Pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall oder unter Umständen dem plötzlichen Tod äußert. Für eine effektive und kostengünstige Therapie und der Erhaltung eines möglichst hohen Maßes an Lebensqualität für den Patienten ist es dann in der Regel zu spät.

Mit dem Ziel die Ursachen und Risikofaktoren von Arteriosklerose zu bestimmen, wurde 1948 mit der Framingham-Studie die wichtigste epidemiologische Studie in den USA begonnen (Dawber et al. 1951). Auf Basis der in dieser Studie identifizierten Faktoren, zu denen neben einer genetischen Disposition, männliches Geschlecht, erhöhte Cholesterinwerte, ein erhöhter Blutdruck und ein erhöhter Glukosespiegel zählen, wurde ein Score-Wert zur Bestimmung des individuellen Risikos, einen Herzinfarkt innerhalb der nächsten 10 Jahre zu erleiden, erstellt. Diese Berechnung bietet aufgrund ihrer empirischen Natur nur grobe Anhaltspunkte, welche Personengruppen stärker beobachtet werden sollten. Zudem scheint die Framingham-Studie nach neueren Erkenntnissen, das

Risiko deutlich unterzubewerten. So treten zwei Drittel aller Herzinfarkte bei Individuen mit einem mittleren Risikowert auf (Brindle et al. 2005).

Es wurde in einer Studie mit 15 bis 34 jährigen Personen, die zuvor durch Unfall, Mord oder Selbstmord zu Tode kamen und bis dahin symptomfrei waren, gezeigt, dass arteriosklerotische Veränderungen bereits verstärkt bei 20 bis 30 jährigen Individuen auftreten (McGill und McMahan 1998). Zudem wird das Risiko, das von arteriosklerotischen Plaques ausgeht, nicht ausschließlich durch die Größe der Plaques bestimmt, sondern auch durch deren Beschaffenheit. Plaques mit einem relativ großen Lipidkern, einer dünnen Bindegewebsschicht und einer hohen Dichte von Makrophagen zeigen eine erhöhte Disposition zur Bildung von Thromben, die sekundär Gefäßverschlüsse bilden und dadurch zu akuten Ischämien führen können (Virmani et al. 2000).

Die operative Behandlung akuter Stenosen durch Bypassoperationen, Aufweitung der Gefäße und Einbringung von Stents ist aufwendig, kostenintensiv und mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität des Patienten verbunden. Zudem führt die invasive Behandlung der bereits vorgeschädigten Gefäße häufig innerhalb kurzer Zeit zu erneuten Gefäßverschlüssen (Chesebro und Fuster 1986; Bavry und Bhatt 2008). Die vielversprechendste Behandlungsstrategie liegt daher in einer frühzeitigen Diagnose bzw. der Prävention. Eine Senkung der Cholesterinwerte, des Blutdrucks und des Glukosespiegels kann durch vermehrte Bewegung (Ausdauersport) und eine bewusste Ernährung oder durch pharmakologische Mittel erreicht werden. Zu diesen gehört der Einsatz von Blutdruck senkenden Mitteln (ACE-Hemmer, Betablocker) und eine Senkung des Cholesterinspiegels durch Statine (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase Inhibitoren) sowie eine Behandlung mit Gerinnungshemmern (bspw. Acetylsalicylsäure).

4.2.3. Aktuelle Diagnoseverfahren

Die langsame Entwicklung der arteriellen Veränderungen bietet allerdings auch die Chance einer frühzeitigen Diagnose.

Markermoleküle im Blut

Versuche, die enge Verknüpfung von Arteriosklerose und Entzündungsprozessen zu nutzen, um über die Bestimmung von bestimmten Markermolekülen (bspw. CRP, engl. C-reaktives Protein oder BNP, engl. brain natriuretic peptide) im Blut eine Korrelation des Risikos akuter arteriosklerotischer Vorfälle zu ermitteln, waren bisher erfolglos. Die ARIC-Studie (engl. Atherosclerosis Risk in Communities) konnte unter Auswertung von 19 Markermolekülen in 15.792 Personen im Vergleich zu klassischen Risikofaktoren (siehe Framingham-Studie) keine signifikante Erhöhung der Vorhersage einer Erkrankung der koronaren Herzgefäße innerhalb von 5 Jahren aufzeigen (Folsom et al. 2006).

Invasive bildgebende Methoden

Die vorhandenen diagnostischen Möglichkeiten können arteriosklerotische Veränderungen nur in vorangeschrittenen Stadien diagnostizieren. So bietet die Angiographie die Möglichkeit, mit Hilfe optischer Bildgebungsverfahren (bspw. Röntgenstrahlung, Magnetresonanztomographie) und spezieller Kontrastmittel, die über einen Katheter direkt in die zu untersuchenden Gefäße eingebracht werden, den Gefäßinnenraum auf Verengungen zu untersuchen. Ein Nachteil dieser Methoden stellen mögliche allergische Reaktionen auf das Kontrastmittel dar. Ohne Kontrastmittel kommt die intravaskuläre Sonographie aus (IVUS, engl. intravascular ultrasound), bei der die Gefäßdurchmesser mittels eines Katheters durch Ultraschall bestimmt werden. Beide Methoden haben jedoch den Nachteil, dass die eingebrachten Katheter Verletzungen des Gefäßendothels verursachen oder zur Bildung von Thromben und in der Folge zu Gefäßverschlüssen führen können.

Magnetresonanztomographie

Mit neuen Verfahren für die optische Bildgebung konnten vielversprechende Ansätze für die frühzeitige Diagnose entwickelt werden. Eine nicht-invasive Methode zur hochauflösenden bildlichen Darstellung unterschiedlicher arterieller Gefäße ist die Magnetresonanztomographie. Diese ermöglicht die Visualisierung und Differenzierung unterschiedlicher Gewebe ohne den Einsatz von ionisierender Strahlung. Die Methode nutzt starke Magnetfelder und elektromagnetische Impulse, um bestimmte Atomkerne anzuregen, ihrerseits ein elektromagnetisches Signal auszusenden. Dieses wird genutzt, um ein Bild zu generieren. Die räumliche Auflösung erfolgt dabei durch Modulation der eingesetzten Magnetfelder. In der Regel werden die Protonen von Wassermolekülen angeregt, woraus eine Differenzierung nach dem Wassergehalt der jeweiligen Gewebe resultiert.

Mit Hilfe der Magnetresonanztomographie konnten bereits arteriosklerotische Veränderungen und deren Zusammensetzung in Tiermodellen (Skinner et al. 1995) sowie in Aorta (Fayad et al. 2000) und Halsschlagader (Toussaint et al. 1996) beim Menschen untersucht werden. Die magnetresonanztomographische Abbildung der Koronararterien ist aufgrund der geringen Größe sowie der relativ langen Messzeit und der starken Bewegung durch Herzschlag und Atmung schwierig und erfordert den Einsatz spezieller Techniken zur Beobachtung und Abstimmung der Messung auf die Bewegungen des Thorax (Fayad et al. 2000).

Der Einsatz spezifischer Kontrastmittel ermöglicht eine Steigerung der Signalintensität bei möglichst geringem Einsatz von Signalmolekülen. Dadurch kann die Effizienz der Magnetresonanztomographie bei der Diagnose von arteriosklerotischen Veränderungen erhöht werden. Insbesondere die Charakterisierung der genauen Zusammensetzung von arteriosklerotischen Plaques wird dabei angestrebt. Die Bestimmung der Makrophagendichte ist dabei von Interesse, da diese einen Parameter für die Instabilität der Plaques darstellt (Virmani et al. 2000). Verschiedene Gadolinium-basierte mizellare Kontrastmittel mit Antikörpern zum Targeting wurden bisher getestet und demonstrieren das

Potential spezifischer Kontrastmittel zur Bestimmung von Makrophagen in arteriosklerotischen Plaques (Amirbekian et al. 2007; Mulder et al. 2007).

II. Zielsetzung dieser Arbeit

Der Einsatz von ApoE-Peptid-basierten Trägersystemen erscheint aufgrund der potentiellen Interaktion mit den Rezeptoren der LDLr-Familie für verschiedene Bereiche aussichtsreich. Dazu gehört die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Diese ist eine Herausforderung für die Arzneistoffentwicklung. Die erhöhte Expression des LDLr in den Endothelzellen der Hirnkapillaren könnte einen Transport der ApoE-Peptid-basierten Träger über die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen. Ein weiteres Einsatzgebiet könnte die Diagnose von Arteriosklerose darstellen. Ein erfolgreiches Targeting von frühen arteriosklerotischen Veränderungen könnte eine Basis für eine effektive Therapie darstellen. Im Verlauf der Entwicklung arteriosklerotischer Plaques wandern Makrophagen in das Endothel der arteriellen Gefäße ein und nehmen große Mengen oxidiertes LDL auf. Die Makrophagen exprimieren LRP- und Scavenger-Rezeptoren und stellen damit ein mögliches Target für ApoE-Peptid-basierte Trägersysteme dar.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Der erste Abschnitt behandelt die Entwicklung neuer ApoE-Peptid-basierter Trägersysteme und deren Charakterisierung mit Hinblick auf eine mögliche Anwendung zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Zu diesem Zweck wurden qualitative und quantitative Internalisierungsuntersuchungen an Endothelzellen der Hirnkapillaren und der großen Gefäße durchgeführt.

Schwerpunkte dieses Abschnitts waren dabei:

- Die Optimierung der Eigenschaften von ApoE-Peptid-basierten Trägersystemen. Dabei soll der Einfluss der Palmitoylierungsposition auf das Assoziationsverhalten und die Interaktion mit Liposomen bestimmt werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sollen mit der Aufnahmeeffizienz von mit diesen Peptiden markierten Liposomen korreliert werden.
- Die Erarbeitung quantitativer Methoden zur Bestimmung der Aufnahmeeffizienz von ApoE-Peptid-basierten Trägersystemen in Endothelzellen.

- Die Internalisierung von unterschiedlichen Lipid-Peptid-Präparationen soll an Hirnkapillarendothelzellen (b.End3) im Vergleich zu den Endothelzellen großer Gefäße (BAEC) untersucht werden. Dabei sollen freies Peptid, Peptidmizellen und mit Peptid beladene Liposomen hinsichtlich der Aufnahmeeffizienz und möglicher mechanistischer Differenzen charakterisiert werden.
- Abschließend soll eine mögliche Beteiligung des LDLr an der Internalisierung der ApoE-Peptid-basierten Trägersysteme näher untersucht werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit widmet sich der Anwendung von ApoE-Peptid-modifizierten Trägersystemen als spezifische Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie zur Untersuchung von frühen arteriosklerotischen Veränderungen. Hierfür wurden Gadolinium-gelabelte PEG-Lipid-Mizellen mit ApoE-Peptid modifiziert und in vivo an einem Mausmodell für Arteriosklerose untersucht.

Folgende Schwerpunkte bilden diesen Teilbereich:

- Die Herstellung und Charakterisierung von Gadolinium-markierten und ApoE-Peptid-modifizierten PEG-Lipid-Mizellen.
- Die Eignung dieser Partikel für eine in vivo Anwendung soll untersucht werden. Dazu soll in vitro die Aufnahme an Makrophagen (RAW264.7) und in vivo die Bioverteilung bestimmt werden.
- Die spezifische Kontrastverstärkung arteriosklerotischer Plaques durch ApoE-Peptid-modifizierte PEG-Lipid-Mizellen in der Magnetresonanztomographie soll an einem Mausmodell für Arteriosklerose bestimmt werden.

III. Materialien und Methoden

1. Geräte

Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Geräte

| Methode | Gerätetyp | Hersteller |
|---|------------------------------------|------------------------------|
| Brutschrank | IG 150 | Jouan (Deutschland) |
| Dynamische Lichtstreuung (Mizellen) | Zetasizer Nano ZS; 532 nm Laser | Malvern (USA) |
| Dynamische Lichtstreuung (Liposomen) | N4Plus | Beckman Coulter (USA) |
| Konfokale Laserscanning-Mikroskopie | LSM 510 | Zeiss (Deutschland) |
| Liposomenpräparation | MiniExtruder | Avestin (Canada) |
| | Labsonic L | B.Braun (Deutschland) |
| Fluoreszenzspektroskopie | FP-6500 | Jasco (Japan) |
| | LS 50B | Perkin Elmer (USA) |
| Hochleistungschromatographie (analytisch) | LC-10AD | Jasco (Japan) |
| Hochleistungschromatographie (präparativ) | LC-8A | Shimadzu (Japan) |
| Hochvakuumpumpe | D1,6B | Leybold AG (Deutschland) |
| Magnetresonanztomographie | 9.4T MR system | Bruker (USA) |
| Massenspektrometrie (ESI-) | TSQ 700 | Finnigan (Deutschland) |
| Massenspektrometrie (LC-) | LCT Premier XE | Waters (USA) |
| Massenspektrometrie (MALDI-TOF-) | Voyager-DE STR | Perspective Biosystems (USA) |
| Mikrotiterplatten Reader | Safire | Tecan (Schweiz) |
| Mikrotom | HM 560 | Microm (Deutschland) |
| Peptidsynthese-Automat | 433A PS | Applied Biosystems (USA) |
| Sterilbank | 1200 | BDK (Deutschland) |
| Rotationsverdampfer | Rotavapor | Büchi (Schweiz) |
| Relaxivitätsbestimmung | Minispec | Bruker (Deutschland) |
| UV/ VIS-Spektroskopie | V-550 | Jasco (Japan) |
| Zellzählung | Casy 1 | Innovatis AG (Deutschland) |
| Zentrifugation | 3K30 (Nr.12154) | Sigma (Deutschland) |
| | 5804R (A-4-44) | Eppendorf (Deutschland) |
| Zirkulardichroismus-Spektroskopie | J-720 | Jasco (Japan) |
| Zytometrie (FACS) | FACSCalibur | BD Biosciences (USA) |

2. Arbeitsmittel

2.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, insofern nicht anders angegeben, in der höchsten Reinheitsstufe eingesetzt.

Tabelle 3 Übersicht der eingesetzten Chemikalien

| Kurzbezeichnung | Substanz | Hersteller |
|------------------------|---|--|
| Acetanhydrid | | Sigma (Deutschland) |
| ACN | Acetonitril | J.T. Baker (Deutschland) |
| Aminosäuren | geschützte Aminosäuren zur Peptidsynthese | Novabiochem (Deutschld.), GLS (China) |
| Ascorbinsäure | | J.T. Baker (Deutschland) |
| BSA | Rinder-Serumalbumin | Biochrom (Deutschland) |
| Calcein | | Fluka (Deutschland) |
| Chloroform | | J.T. Baker (Deutschland) |
| Chlorpromazin | ≥ 98% | Sigma (Deutschland) |
| Cytochalasin D | ≥ 98% | Sigma (Deutschland) |
| DIC | Diisopropylcarbodiimid | Fluka (Deutschland) |
| Digitonin | | Sigma (Deutschland) |
| DIPEA | N-Ethyl-Diisopropylamin | Fluka (Deutschland) |
| DMF | N,N-Dimethylformamid | J.T. Baker (Deutschland) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | Sigma (Deutschland) |
| 2-Deoxyglukose | | Serva (Deutschland) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure | Merck (Deutschland) |
| Essigsäure | | J.T. Baker (Deutschland) |
| Ethanol | | J.T. Baker (Deutschland) |
| Diethylether | | J.T. Baker (Deutschland) |
| Fluos | 5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxy-succinimidester | Sigma (Deutschland) |
| FKS | Fötales Kälber Serum | Biochrom (Deutschland) |
| Glukose | D(+)-Glukose | Sigma (Deutschland) |
| Glutamin | N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin, 200 mM | Biochrom (Deutschland) |
| Heparin | Heparin, Natrium-Salz (170 Units/mg) | Sigma (Deutschland) |

| Kurzbezeichnung | Substanz | Hersteller |
|------------------------|--|----------------------------------|
| Heparinase | Heparinlyase I | Sigma (Deutschland) |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure | Aldrich (Deutschland) |
| HOBt | N-Hydroxy-benzotriazol | Fluka (Deutschland) |
| Hydrazin | | Sigma (Deutschland) |
| Methanol | | J.T. Baker (Deutschland) |
| MPS | 3-Tritylsulfanylpropionsäure | Bachem (Deutschland) |
| Molybdat | Ammoniummolybdat-tetrahydrat | Fluka (Deutschland) |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid | Sigma (Deutschland) |
| NaCl | Natriumchlorid | Laborchemie Apolda (Deutschland) |
| NaF | Natriumfluorid | Sigma (Deutschland) |
| NaN ₃ | Natriumazid | Sigma (Deutschland) |
| NaOH | Natriumhydroxid | J.T. Baker (Deutschland) |
| Nystatin | | Sigma (Deutschland) |
| Palmitinsäure | | Fluka (Deutschland) |
| Perchlorsäure | Perchlorsäure 70-72% | Merck (Deutschland) |
| Phenol | | Fluka (Deutschland) |
| Piperidin | Piperidin 99% | Aldrich (Deutschland) |
| PLL | Poly-L-Lysin, MW 15.000 – 30.000 | Sigma (Deutschland) |
| PLL-Beschichtung | Poly-L-Lysin, MW > 300.000; 0,1mg/ml | Sigma (Deutschland) |
| Pronase E | aus Streptomyces griseus, ca. 4 units/mg | Sigma (Deutschland) |
| Propidiumjodid | | Sigma (Deutschland) |
| Pyruvat | Na-Pyruvat, 100 mM | Biochrom (Deutschland) |
| Schwefelsäure | | Merck (Deutschland) |
| TBTU | N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)-methylen]-N-methylmethanaminium tetrafluoroborat N-oxid | aus eigener Herstellung |
| TentaGel-S-RAM | Harz für die Festphasenpeptidsynthese | Rapp Polymere (Deutschd.) |
| TFA | Trifluoressigsäure | Riedel de Haen (Deutschd.) |
| TFE | Trifluorethanol | Fluka (Deutschland) |
| Triisopropylsilan | | Fluka (Deutschland) |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan | Merck (Deutschland) |
| Triton X-100 | Oktylphenylpolyethylenglykoether | Serva (Deutschland) |
| Trypanblau | 0,5% (w/v) in physiolog. NaCl-Lsg. | Biochrom (Deutschland) |

2.2. Medien und Pufferlösungen

Alle Medien und Pufferlösungen wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt, bzw. anschließend unter Verwendung eines 0,22 µm Filters sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Medien und Pufferlösungen

| Kurzbezeichnung | Zusammensetzung |
|--|--|
| Antibiotika | Penicillin/ Streptomycin (10.000 IE/ 10.000 µg/ml), Gibco (USA) |
| BAEC-Medium | Earle`s-MEM mit 10% (v/v) FKS, 1% (v/v) Glutamin und 1% (v/v) Antibiotika (Penicillin/ Streptomycin) |
| b.End3-Medium | Earle`s-MEM mit 10% (v/v) FKS, 1% (v/v) Glutamin und 1% (v/v) Antibiotika (Penicillin/ Streptomycin) |
| Beschichtungs-Lösung PLL | 25 µg/ml PLL in Aqua bidest., steril |
| BSA-Lösung | 1% (w/v) BSA in DPBS |
| Calcein in Tris pH 7,4 | 80 mM Calcein, 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,4 |
| DPBS | Dulbecco`s Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung, Gibco (USA) |
| DPBSG | 0,1% (w/v) Glucose in DPBS |
| Earle`s MEM | Earle`s Minimal Essentielles Medium, Gibco (USA) |
| Einbettungsmedium | Tissue Tek (USA) |
| Heparin in DPBS | 0,1% (w/v) Heparin in DPBS |
| Hepes-Puffer pH 6,5 | 10 mM Hepes, 154 mM NaCl, pH 6,5 |
| MTT-Lösung | 5 mg/ml MTT in DPBS |
| Phosphat-Puffer nach Sørensen pH 5 , 6 & 7,4 | 10 mM KH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ |
| RAW264.7-Medium | RPMI-Medium mit 10% (v/v) FKS, 1% (v/v) Na-Pyruvat 1% (v/v) Glutamin und 1% (v/v) Antibiotika (Penicillin/ Streptomycin) |
| RPMI-Medium | RPMI 1640, Gibco (USA) |
| SlowFade Gold Medium | Invitrogen (USA) |
| Tris-Puffer pH 7,4 | 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,4 |
| Tris/ NaCl-Puffer pH 7,4 | 10 mM Tris, 154 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,4 |
| Tris/ NaF-Puffer pH 7,4 | 10 mM Tris, 154 mM NaF, 0,1 mM EDTA, pH 7,4 |
| Triton-Lösung | 10% (v/v) Triton in Aqua bidest. |
| Trypsin/ EDTA | 0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS, Gibco (USA) |

2.3. Lipide

Gd-DTPA-BSA stammte von Gateway Chemical Technology (USA). Alle weiteren Lipide wurden von Avanti Polar Lipids (USA) in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe bezogen.

Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Lipide

| Abkürzung | Bezeichnung | MW [g/mol] |
|------------------|--|-------------------|
| DiBr-PSPC | 1-Palmitoyl-2-stearoyl-(6,7)-dibromo- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin | 919,9 |
| Gd-DTPA-BSA | Gadolinium-diethylene-triamin-pentaacetylsäure-bis(stearylamid) | 1068,0 |
| POPC | 1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin | 760,1 |
| POPG | 1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol | 771,0 |
| Mal-PEG-DPPE | 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanol-amin-N-[maleimid(polyethylenglykol)-2000] (Ammoniumsalz) | 2819,4 |
| PEG-DPPE | 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanol-amin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-2000] (Ammoniumsalz) | 2731,4 |
| Rhod-DPPE | 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanol-amin-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Ammoniumsalz) | 1233,0 |

2.4. Peptide

Für die Untersuchungen wurde das von Apolipoprotein E abgeleitete Tandemdimer A2 (AS 141-150 ApoE) verwendet. Die adsorptive Bindung an Liposomen und die Bildung von Peptidmizellen wurde durch Kopplung von Palmitoylresten an unterschiedlichen Positionen ermöglicht. Für die kovalente Kopplung wurde A2 N-terminal mit Mercaptopropionsäure modifiziert (HS-A2). Zur fluoreszenzspektroskopischen Detektion wurden mit 5(6)-Carboxyfluorescein (Fluo, f) modifizierte Peptidderivate hergestellt. Alle Peptide sind N-terminal acetyliert bzw. acyliert und C-terminal amidiert.

Tabelle 6 Übersicht über die verwendeten Peptide in Ein-Buchstaben-Aminosäuren Code
Großbuchstaben - L-Aminosäuren, Kleinbuchstaben - D-Aminosäuren;
Pal – Palmitoylrest, Flou – Carboxyfluorescein, Mps – Mercaptopropionsäure

| Abkürzung | Sequenz (Lot-Nr.) | MW [g/mol] |
|-----------|---|------------|
| P2A2-1 | <i>Pal-K(Pal)WG LRKLR KRLLR LRKLR KRLLR-NH₂</i> (<i>Kh ApoE-03-02</i>) | 3530,9 |
| P2A2-2 | <i>Pal-WK(Pal)G LRKLR KRLLR LRKLR KRLLR-NH₂</i> (<i>DK 359</i>) | 3530,9 |
| A2P2 | <i>LRKLR KRLLR LRKLR KRLLR GK(Pal)WK(Pal)-NH₂</i> (<i>Kh ApoE-11-01</i>) | 3701,0 |
| PA2P | <i>Pal-WG LRKLR KRLLR LRKLR KRLLR GGK(Pal)-NH₂</i> (<i>Kh ApoE-12-01</i>) | 3773,0 |
| fA2 | <i>Fluo-G LRKLR KRLLR LRKLR KRLLR-NH₂</i> (<i>Kh ApoE-15-01</i>) | 3098,2 |
| P2fA2 | <i>Pal-K(Pal)WK(Fluo)G LRKLR KRLLR LRKLR KRLLR-NH₂</i> (<i>Kl 180105</i>) | 4019,3 |
| P2fa2 | <i>Pal-K(Pal)WK(Fluo)G lrklr krllr lrklr krllr-NH₂</i> (<i>Kl 200207</i>) | 4019,3 |
| HS-A2 | <i>Mps-WG LRKLR KRLLR LRKLR KRLLR-NH₂</i> (<i>DK 960</i>) | 3014,6 |

2.5. Antikörper

Anti-LDLr IgG (Calbiochem, Bestellnummer: LP02):

- monoklonaler Antikörper (Klon 15C8)
- verdrängt 50-70% des Rezeptor-gebundenem LDL
- Reaktivität: Rind, Mensch, Maus
- Isotyp: Maus IgG_{2a}
- Referenzen: (van Driel et al. 1987; Duvillard et al. 2003)

IgG_{2a}-Isotyp Kontrolle (Invitrogen, Bestellnummer: MG2a00):

- polykolonaler Antikörper
- Isotyp: Maus IgG_{2a}

Anti-CD68 IgG (AbD Serotec, Bestellnummer: MCA1957A647):

- monoklonaler Antikörper (Klon FA-11)
- Alexa Fluor 647 konjugiert
- Reaktivität: Maus
- Isotyp: Maus IgG_{2a}
- Referenzen: (Ramprasad et al. 1996)

IgG_{2a}-Alexa Fluor 647 Isotyp Kontrolle (AbD Serotec, Bestellnummer: MCA1212A647):

- polykolonaler Antikörper
- Alexa Fluor 647 konjugiert
- Isotyp: Maus IgG_{2a}

2.6. Zelllinien

BAEC:

- Immortalisierte Rinder Aortenendothelzellen (im Haus)
- Referenz: (Halle et al. 1980)

b.End3:

- Immortalisierte Hirnkapillarendothelzellen der Maus (ECACC 96091929)
- Referenz: (Omidi et al. 2003)

RAW264.7:

- Immortalisierte Makrophagenzellen der Maus (ECACC 91062702)
- Referenz: (Ralph und Nakoinz 1977; Raschke et al. 1978)

2.7. Tiermodelle

ApoE^{-/-} defiziente Mauslinie:

- B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA, Bestellnummer: 002052)
- Basislinie: C57BL/6
- Referenz: (Piedrahita et al. 1992)

3. Methoden

3.1. Synthese, Reinigung und Charakterisierung der Peptide

Die Peptide wurden durch Khalid Abu Ajaj, Dagmar Krause und Annemarie Klose in der Peptidsynthese-Gruppe von Dr. Michael Beyermann am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) hergestellt.

Die Synthese erfolgte mittels Fmoc (N-(9-Fluorenyl)-methoxycarbonyl)-Chemie nach dem Prinzip der Festphasen-Synthese an TentaGel-S-RAM-Harz (Rapp Polymere, Deutschland) mit einem automatischen Peptidsynthesizer (433A, Applied Biosystems) (Beyermann und Bienert 1992; Coin et al. 2007). Die funktionellen Gruppen der Seitenketten waren mit entsprechenden Schutzgruppen versehen: Die Guanidinfunktion des Arginins war durch Pbf- (Pentamethyldihydro-benzofuran-5-sulfonyl-) und die Aminogruppen der Seitenketten von Lysin und Tryptophan waren durch Boc- (tert-Butyloxycarbonyl-) geschützt. Die Kupplungseffizienz und damit die Endausbeute der Peptide wurde durch Doppelkupplungen erhöht.

Synthese der Rohpeptide

Die Synthese erfolgte zyklisch. Die Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäure (5 Eq.) erfolgte mit dem Kupplungsreagenz TBTU (4,9 Eq.) und DIPEA (10 Eq.) in DMF. Die anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 20% (v/v) Piperidin in DMF.

Seitenkettenmodifizierungen innerhalb der Peptide

Modifizierungen der Seitenketten erfolgten mit Hilfe eines Dde-geschützten Fmoc-Lysins (N-Fmoc-N-1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-ethyl-L-Lysin). Die Dde-Gruppe wurde mit 2% (v/v) Hydrazin in DMF entfernt.

Acetylierung der N-terminalen Aminofunktion von A2P2

Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe erfolgte die Acetylierung durch Acetanhydrid (7 Eq.) und DIPEA (2 Eq.) in DMF.

Fluoreszenzmarkierung von fA2, P2fA2 und P2fa2

Die Fluoreszenzmarkierung der zuvor entsprechend entschützten Peptide erfolgte mit 5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester (1,5 Eq.) in DMF für ca. 3-4 Stunden.

Palmitoylierung von P2A2-1, P2A2-2, A2P2, PA2P, P2fa2 und P2fa2

Die zuvor entsprechend geschützten Peptide wurden mit Palmitinsäure (2 Eq.) und mit den Kupplungsreagenzien DIC und HOBt (2 Eq.) in DMF über Nacht modifiziert.

Kopplung von Mercaptopropionsäure an HS-A2

Das zuvor entsprechend geschützte Peptid wurde mit Mercaptopropionsäure (2 Eq.) und mit den Kupplungsreagenzien DIC und HOBt (2 Eq.) in DMF für 3 h modifiziert.

Abspaltung der Peptide vom Harz und Entfernung der Seitenschutzgruppen

Die Abspaltung der Peptide erfolgte mit 10% (w/v) Phenol, 5% (v/v) Triisopropylsilan und 5% (v/v) Wasser in TFA über 3 h.

Das Rohpeptid wurde anschließend mit Ether präzipitiert und aus 10% (v/v) Essigsäure/ Wasser lyophilisiert. Die Reinigung der Rohpeptide erfolgte mittels präparativer Umkehrphasen-Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) über eine Polyencap A300 Säule und einen linearen Gradienten von 16 bis 64% (v/v) Acetonitril (ACN) in 0,1% (v/v) TFA in Wasser über 70 min.

Die Reinheit der Peptide wurde mittels analytischer RP-HPLC an einer ProntoSil 300-5-C18 Säule bestimmt. Die weiteren Bedingungen entsprachen denen der präparativen RP-HPLC. Die erhaltenen Peptide hatten eine Reinheit von > 95%. Die molaren Massen der Peptide wurden mittels Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) bzw. Matrix-unterstützte-Laserdesorption-Ionisation-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) verifiziert.

3.2. Peptid-Liposomen Komplexe

3.2.1. Herstellung der Liposomen

Die Liposomenpräparation erfolgte durch Hydrierung von Lipidfilmen. Je nach Art der Liposomen wurden die Lipidsuspensionen weiter behandelt.

Die Lipidfilme wurden hergestellt, indem die Lipide in Chloroform/ Methanol (2:1) gelöst und in den entsprechenden molaren Verhältnissen gemischt wurden. Anschließend wurde das Lösungsmittel verdampft. Die vollständige Trocknung des Lipidfilms wurde durch Anlegen eines Hochvakuums für ca. 8 h erreicht. Die Hydrierung der Lipidfilme erfolgte durch intensives Vortexen in den entsprechenden Pufferlösungen für ca. 5 min (Torchilin und Weissig 2003).

Herstellung von SUVs

Kleine unilamellare Vesikel (SUVs) wurden durch Ultraschallbehandlung der Lipidsuspension hergestellt. Die Lipidkonzentrationen lagen bei 20 bis 50 mM. Die Lipidsuspension (1-2 ml) wurde dazu in einem Eiswasserbad positioniert und für 20 bis 25 min mittels eines Ultraschallstabs unter Stickstoffbegasung beschallt. Der dabei entstandene Titanabrieb wurde durch Zentrifugation (5 min, 6000 g) entfernt (Torchilin und Weissig 2003).

Herstellung von LUVs

Große unilamellare Vesikel (LUVs) wurden durch Extrusion der Lipidsuspension hergestellt. Die Lipidkonzentrationen lagen in einem Bereich von 10 bis 40 mM. Die Lipidsuspension (0,5-1 ml) wurde mittels eines Avestin-MiniExtruders durch zwei entgegengesetzt gestapelte Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 100 nm extrudiert (35 Wiederholungen) (Torchilin und Weissig 2003).

Für die Farbstofffreisetzungsexperimente wurden LUVs mit Calcein in selbst-quencher Konzentration (80 mM in Tris-Puffer pH 7,4) hergestellt. Das nicht eingeschlossene Calcein wurde mittels Gelfiltration über eine Sephadex-G50-Säule entfernt.

3.2.2. Adsorption dipalmitoylierter Peptide an Liposomen

Die Peptid-Liposomen Komplexe wurden hergestellt, indem die entsprechenden dipalmitoylierten Peptide bei den gewünschten Lipid/ Peptid-Verhältnissen mit den zuvor präparierten Liposomen gemischt und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden, um die Integration der Peptide in die Lipid-Doppelschicht der Liposomen zu gestatten.

3.3. Kovalente Kopplung von A2 an PEG-Lipid-Mizellen

Die PEG-Lipid-Mizellen wurden durch Hydrierung von Lipidfilmen präpariert. Diese wurden zuvor hergestellt, indem die Lipide in den entsprechenden molaren Verhältnissen in Chloroform/ Methanol (2:1) gemischt und anschließend das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer entfernt wurde. Die vollständige Trocknung des Lipidfilms wurde durch Anlegen eines Vakuums bei einer Temperatur von 65 °C für ca. 15 min erreicht. Die Hydrierung der Lipidfilme (4 mM Gesamtlipid in 10 ml) erfolgte durch intensives Rühren bei 65 °C in den entsprechenden vortemperierten Pufferlösungen, bis eine klare Lösung entstand (ca. 15 bis 30 min) (Mulder et al. 2007).

Für die Kopplung von HS-A2 wurden PEG-Lipid-Mizellen einer Lipidzusammensetzung von Mal-PEG-DPPE, PEG-DPPE, Gd-DTPA-BSA und Rhod-DPPE in einem molaren Verhältnis von

20:30:49:1 in HEPES-Puffer pH 6,5 hergestellt. Als Kontrolle wurden PEG-Lipid-Mizellen ohne gekoppeltes Peptid mit einer Lipidzusammensetzung von PEG-DPPE, Gd-DTPA-BSA und Rhod-DPPE in einem molaren Verhältnis von 50:49:1 in DPBS präpariert.

Unmittelbar nach der Herstellung der Maleimid-PEG-Lipid-Mizellen erfolgte die Kopplung des Thiol-modifizierten ApoE-Peptides (HS-A2). Zu diesem Zweck wurde das zuvor in HEPES-Puffer pH 6,5 gelöste HS-A2 zu den Maleimid-PEG-Lipid-Mizellen hinzugefügt. Um eine möglichst vollständige Kopplung des eingesetzten Peptides zu erreichen, lag die Maleimid-Funktion der PEG-Mizellen in 2fachen Überschuss vor (3,6 mM Gesamtlipid (entsprechen 720 μM Mal-PEG-DPPE) mit 360 μM HS-A2 in 11ml). Das Reaktionsgemisch wurde für 48 Stunden bei Raumtemperatur und unter Schutzgas aufbewahrt, um die Ausbildung der Thioether-Brücke zwischen dem Peptid und der Maleimid-Funktion des PEG-PE zu ermöglichen.

Anschließend wurden die A2-PEG-Lipid-Mizellen zweimal für mindestens 8 h gegen einen 50fachen Überschuss an DPBS dialysiert (MWCO: 10.000 Da). Dadurch sollte die Abtrennung des nichtgebundenen Peptides und eine Umpufferung der A2-PEG-Lipid-Mizellen erreicht werden. Die Größenverteilung der PEG-Lipid-Mizellen wurde mittels DLS und die gebundene Peptidmenge mittels UV/ VIS-Spektroskopie bestimmt. Zum Abschluss wurden die PEG-Lipid-Mizell-Präparationen durch einen 0,22 μm Filter sterilfiltriert.

3.4. Charakterisierung der Peptid-Komplexe

3.4.1. Dynamische Lichtstreuung

Die verschiedenen Partikel wurden mittels Dynamischer Lichtstreuung charakterisiert. Dabei wurde die Größenverteilung der Partikel bei einer Konzentration von 100 μM bestimmt und daraus der mittlere Partikeldurchmesser sowie der Polydispersitätsindex bestimmt. Der Polydispersitätsindex ist ein Maß für die Größenverteilung, wobei 0 für eine monodisperse und 1 für eine polydisperse Verteilung stehen.

Bei der Dynamischen Lichtstreuung wird die Geschwindigkeit, mit der sich die Partikel aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung in Lösung bewegen, anhand von kleinen Fluktuationen in der Streuintensität bestimmt. Aus der Geschwindigkeit lässt sich der Diffusionskoeffizient der Partikel ermitteln, aus dem mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius berechnet werden kann. Diese Gleichung gilt streng genommen nur für kugelförmige Partikel, weshalb es bei größeren Abweichungen in der Partikelform zu Ungenauigkeiten in den bestimmten Radien kommt.

Korrelationsfunktion: $\int I(t)I(t+\tau)dt = B + Ae^{-2q^2D\tau}$ mit $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\Theta}{2}\right)$

Stokes-Einstein-Gleichung: $R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$

| | | | |
|-----------|-------------------------------|----------|---------------------------|
| I(t)dt | Änderung der Streuintensität | B | Basislinie |
| A | Amplitude der Streuintensität | q | Streuvektor |
| D | Diffusionskoeffizient | τ | Zeitintervall |
| π | Pi | n | Brechungsindex der Lösung |
| λ | Wellenlänge des Lasers | Θ | Streuwinkel |
| R_H | hydrodynamischer Radius | k | Boltzmann-Konstante |
| T | absolute Temperatur | η | Viskosität der Lösung |

3.4.2. UV/ VIS-Spektroskopie

Die Peptiddichte an den A2-PEG-Mizellen wurde UV/ VIS-spektroskopisch bestimmt. Da die Absorption einer verdünnten Lösung nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz direkt proportional zu der Konzentration des absorbierenden Stoffes und der Schichtdicke bei einer bestimmten Wellenlänge ist, kann die Konzentration des A2-Peptides anhand der Absorption der Tryptophan-Seitenkette bei 280 nm bestimmt werden. Da der Extinktionskoeffizient von HS-A2 nicht bekannt ist, wurde zuvor eine Kalibrationsgerade mit HS-A2 in DPBS erstellt. Die Absorptionen der Kalibrationsgerade wurden gegen DPBS korrigiert, während die Absorption der A2-PEG-Lipid-Mizellen gegen PEG-Lipid-Mizellen gleicher Lipidkonzentration in DPBS korrigiert wurden.

| | | |
|-----------------------|------------|---|
| Küvette: | 105.200-QS | 10mm Schichtdicke (180 μ l Volumen) |
| Bandbreite: | 1 nm | |
| Wellenlänge: | 350-250 nm | |
| Datenabstand: | 0,5 nm | |
| Scan-Geschwindigkeit: | 200 nm/min | |

3.4.3. Fluoreszenzspektroskopie

Aufnahme der Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenzeigenschaften von Fluophoren sind stark von der Polarität der Umgebung abhängig (van Holde et al. 1998). Da dies für die Interpretation der Ergebnisse der Aufnahmeuntersuchungen von Bedeutung ist, wurden die Fluoreszenzeigenschaften der Carboxyfluorescein-markierten Peptide charakterisiert. Hierfür wurden Fluoreszenzspektren von fA2, von mizellaren P2fA2 und von P2fA2-POPC-SUVs bei einer Peptidkonzentration von 0,5 μM in DPBS aufgenommen. Die Lipidkonzentration wurde auf ein Lipid/ Peptid-Verhältnis (C_{LP}) von 1.000 eingestellt. Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Fluoreszenz zu untersuchen, wurden Fluoreszenzspektren in Phosphat-Puffer pH 5, 6 und 7,4 aufgenommen. Zum Vergleich wurden zusätzlich Fluoreszenzspektren von 0,1% Rhodamin-markierten SUVs ($C_L = 500 \mu\text{M}$) aufgenommen (Leupold et al. 2009).

| | |
|--------------------------|--|
| Fluoreszenzspektrometer: | Jasco FP-6500 |
| Küvette: | 4×4 mm Fluoreszenz |
| Anregungswellenlänge: | 488 nm (Carboxyfluorescein) bzw. 543 nm (Rhodamin) |
| Emissionswellenlänge: | 500-600 nm (Carboxyfluorescein) bzw. 550-650 nm (Rhodamin) |
| Scan-Geschwindigkeit: | 200 nm/min |
| Spaltbreiten (Ex/ Em): | 3 nm/ 5 nm |
| Sensitivität: | Medium (Spektren) bzw. Gering (pH-Abhängigkeit) |

Umverteilungsexperimente

Um die Stabilität der ApoE-Peptid-Verankerung in der Lipid-Doppelschicht zu ermitteln, wurde die Umverteilung der Lipopeptide von DiBr-PSPC-haltigen Liposomen auf quencherfreie POPC-SUVs bestimmt. Das DiBr-PSPC Lipid quencht die Tryptophan-Fluoreszenz und führt zu einer deutlichen Verringerung der Fluoreszenzintensität. Bei Zugabe eines Überschusses an quencherfreien Liposomen kommt es zur Umverteilung der Peptide von Quencher-haltigen zu Quencher-freien Liposomen. Dies ist mit einer Erhöhung der Tryptophan-Fluoreszenzintensität verbunden.

Um eine quantitative Aussage über die Vollständigkeit der Umverteilung zu gestatten, wurden zusätzliche Kontrollen eingeführt, die eine Quantifizierung und damit den direkten Vergleich der Ergebnisse ermöglichten. Dazu wurden zunächst die Fluoreszenzeigenschaften der ApoE-Peptide bei den Parametern bestimmt, die zu Beginn der Umverteilung ($I_{gequench}$) und bei einer theoretisch vollständigen Umverteilung ($I_{teil-gequench}$) gegeben sind. Die Umverteilungsexperimente der einzelnen Peptide wurden nach diesen Daten normiert.

Die Umverteilungsexperimente wurden gestartet, indem ein Überschuss an POPC – SUVs jeweils zu an DiBr-PSPC/ POPC (40/ 60) – SUVs gebundenem Peptid gegeben wurde. Die Endkonzentrationen im Reaktionsansatz betragen 2 µM Peptid, 2 mM DiBr-PSPC/ POPC (40/ 60) – SUVs und 4 mM POPC – SUVs (Sauer et al. 2006).

Normierung:
$$I(\%) = 100 \times \frac{I - I_{gequench}}{I_{teil-gequench} - I_{gequench}}$$

mit I Fluoreszenzintensität bei Umverteilung
 $I(\%)$ relative Umverteilung

| | |
|--------------------------|---|
| Fluoreszenzspektrometer: | Jasco FP-6500 |
| Küvette: | 4×4 mm Fluoreszenz |
| Anregungswellenlänge: | 280 nm |
| Emissionswellenlänge: | 300-450 nm |
| Scan-Geschwindigkeit: | 1.000 nm/min |
| Spaltbreiten (Ex/ Em): | 1 nm/ 10 nm |
| Sensitivität: | Hoch |
| Anzahl der Spektren: | über 1 h in 5 min Abstand, für P2A2-2 über 8 h in 10 min Abstand |

Farbstofffreisetzungsversuche

Da amphipathische Peptide die Lipidmembran bei ausreichend hoher Konzentration permeabilisieren können, wurde die Wirkung der dipalmitoylierten ApoE-Peptide auf die liposomale Integrität untersucht. Hierfür wurden mit Calcein in selbst-quenchender Konzentration (80 mM in Tris-Puffer pH 7,4) beladene POPC-LUVs (25 µM Lipid) mit variablen Peptidkonzentrationen inkubiert. Die Peptidzugabe führt zu einer Konzentrations-abhängigen Farbstofffreisetzung, die mit einer Fluoreszenzerhöhung verbunden ist. Für die Auswertung wurde die nach 5 min erreichte Fluoreszenzintensität (I) erfasst. Anschließend erfolgte die vollständige Permeabilisierung der Liposomen durch Zugabe von Triton X-100 (0,4% im Ansatz), um die Fluoreszenzintensität bei vollständiger Calcein-Freisetzung zu ermitteln ($I_{100\%}$) (Dathe et al. 2002).

Durch Auftragung der nach der Fluoreszenz bei maximaler Freisetzung normierten Werte gegen die entsprechenden Lipid/ Peptid-Verhältnisse (C_{LP}) kann für die jeweiligen Peptide eine Freisetzungskurve erstellt werden, aus der mittels eines einfachen sigmoidalen Fittes das

Lipid/ Peptid-Verhältnis der halbmaximalen Freisetzung bestimmt werden kann. Dieser Wert entspricht einem „EC₅₀-Wert“.

Normierung:
$$F(\%) = 100 \times \frac{I - I_{0\%}}{I_{100\%} - I_{0\%}}$$
 mit F(%) prozentuale Freisetzung

| | |
|--------------------------|----------------------|
| Fluoreszenzspektrometer: | Perkin Elmer LS 50B |
| Küvette: | 10×10 mm Fluoreszenz |
| Anregungswellenlänge: | 490 nm |
| Emissionswellenlänge: | 520 nm |
| Spaltbreiten (Ex/ Em): | 3 nm/ 3 nm |

3.4.4. Zirkulardichroismus

Die Sekundärstruktur der ApoE-Peptide wurde CD-spektroskopisch untersucht. Zirkulardichroismus (engl. circular dichroism, CD) beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht durch Moleküle, deren Absorptionszentren chiral beeinflusst werden. Der Fern-UV-Bereich (170-250 nm) eines Peptid-Spektrums wird vor allem durch den Beitrag der Peptidbindungen bestimmt und enthält damit Informationen über die Sekundärstruktur (z.B. α -Helix, β -Faltblatt) (van Holde et al. 1998).

Es wurden CD-Spektren der dipalmitoylierten ApoE-Peptide bei einer Peptidkonzentration von 20 μ M in Tris /NaF-Puffer pH 7,4, in 50% Trifluorethanol (TFE) und in Gegenwart von POPC-SUVs bei einem Lipid/ Peptid-Verhältnis (C_{LP}) von 200 aufgenommen.

Die dargestellten Spektren geben die molare Elliptizität pro Aminosäurerest ($[\Theta]_{MRW}$) als Funktion der Wellenlänge wieder. Die Helizität der ApoE-Peptide wurde nach Chen et al. berechnet (Chen und Yang 1971).

Berechnung der Helizität:
$$H = \frac{[\Theta]_{MRW222} + 2340}{-30300}$$

$[\Theta]_{MRW222}$ molare Elliptizität pro Aminosäurerest bei 222 nm

| | |
|------------------|-------------|
| CD-Spektrometer: | Jasco J-720 |
| Küvette: | 1 mm |
| Spektrum: | 260-195 nm |
| Bandbreite: | 1 nm |

| | |
|-----------------------|-----------|
| Response: | 1 s |
| Scan-Geschwindigkeit: | 50 nm/min |
| Wiederholungen: | 20 |

3.4.5. Bestimmung der Relaxivität

Magnetresonanzkontrastmittel dienen der Kontrastverstärkung in der Magnetresonanztomographie (MRT) und werden zur Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten eingesetzt. Besonders paramagnetische Atome und Moleküle, die aufgrund ungepaarter Elektronen in den äußeren Orbitalen ein magnetisches Moment besitzen, werden dabei verwendet (Weishaupt et al. 2006). Das dreiwertige Gadolinium-Ion (Gd^{3+}) mit seinen sieben einzeln besetzten Orbitalen weist mit die stärksten paramagnetischen Eigenschaften auf. In der Magnetresonanztomographie wird nicht das paramagnetische Kontrastmittel direkt beobachtet, sondern dessen Einfluss auf die umgebenden Protonen. Gd^{3+} bewirkt eine Beschleunigung der longitudinalen Relaxation und dadurch eine Erhöhung des MR-Signals bei T1-gewichteten Sequenzen.

Die Stärke eines MR-Kontrastmittels wird durch dessen Relaxivität bestimmt. Diese ist ein Maß für die Relaxationszeitverkürzung und ist von der Larmor-Frequenz der Protonen, der Temperatur, der Konzentration der paramagnetischen Substanz sowie weiterer Faktoren, wie bspw. die Zugänglichkeit für Wasser (Protonen), abhängig. Die Relaxivität der PEG-Lipid-Mizellen wurde bestimmt, indem die longitudinalen Relaxationszeiten (T1) von PEG-Lipid-Mizellen mit Gd^{3+} -Konzentrationen von 0 bis 0,5 mM in dest. H_2O bei 60 MHz mit Hilfe eines Bruker Minispec bei 40 °C bestimmt wurden. Dazu wurden Inversion-Regenerations Sequenzen mit 15 Wiederholungen genutzt und die T1-Werte mit einem monoexponentiellen Fit der Signalintensität gegen die Zeit (s) bestimmt. Die longitudinale Relaxivität (r_1) wurde anschließend mittels eines linearen Fits der $1/T_1$ -Werte ($1/T_1 = R_1$) gegen die entsprechenden Gd^{3+} -Konzentrationen bestimmt (Briley-Saebo et al. 2006).

$$R_1 = r_1 c_{Gd} + R_{1m}$$

| | | |
|-----|----------|--|
| mit | R_1 | Relaxationsrate der entsprechenden Gd^{3+} -Konzentration (s^{-1}) |
| | R_{1m} | Relaxationsrate ohne Gd^{3+} (s^{-1}) |
| | c_{Gd} | Gadolinium-Konzentration (mM) |
| | r_1 | Relaxivität ($s^{-1} mM^{-1}$) |

3.5. Zellkultur

3.5.1. Allgemeine Verfahrensweisen zur Kultivierung

Zellen wurden in FKS mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zelldichte betrug ca. 1×10^6 Zellen/ml. Tiefgefrorene Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut, sofort in 30 ml Medium pipettiert und in Zellkulturflaschen (75 cm²) überführt. Nach 24 h wurde das Medium ausgetauscht und die Kultivierung, wie für den jeweiligen Zelltyp beschrieben, fortgesetzt. Nach Erreichen einer 80%-igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelt (für RAW264.7, siehe Kapitel III.3.5.2.). Anschließend wurde die Zellkulturflasche für 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37 °C erwärmt. Bei beginnender Ablösung der Zellen wurde durch leichtes Klopfen der Zellkulturflasche das Ablösen der Zellen unterstützt. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml Medium resuspendiert. Nach dem Auszählen der Zellen erfolgte die Aussaat in der gewünschten Dichte. Für die Experimente wurden nur Zellen bis Passage 20 verwendet. Weiterhin wurden Zellen nach dem Auftauen mindestens zweimal passagiert, bevor sie für entsprechende Aufnahmeexperimente eingesetzt wurden.

Für mikroskopische Untersuchungen der Zellen wurden mit Poly-L-Lysin beschichtete Glas-Deckgläschen (Durchmesser 30 mm) präpariert. Diese wurden mit ca. 1 ml Beschichtungs-Lösung PLL für 1 h unter der Sterilbank inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgenommen und die Deckgläschen unter der Sterilbank getrocknet. Die Beschichtung erfolgte in der Regel auf Vorrat. Die Deckgläschen wurden bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.5.2. Zelllinien-spezifische Verfahrensweisen

Maus-Hirnendothelzelllinie (b.End3)

Die Eigenschaften der b.End3-Zelllinie sind beschrieben worden (Omidi et al. 2003). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in b.End3-Medium bei 37 °C und 5% CO₂. Mediumwechsel und Passage mit 1/10- bis 1/40-Verdünnung erfolgten abwechselnd je einmal wöchentlich.

Rinder-Aortenendothelzelllinie (BAEC)

Die BAEC-Zelllinie wurde von Halle et al. etabliert (Halle et al. 1980). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in BAEC-Medium bei 37 °C und 5% CO₂. Mediumwechsel und Passage mit 1/20- bis 1/40-Verdünnung erfolgten abwechselnd je einmal wöchentlich.

Maus-Makrophagenzelllinie (RAW264.7)

Die RAW264.7-Zelllinie wurde von (Ralph und Nakoinz 1977; Raschke et al. 1978) charakterisiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RAW264.7-Medium bei 37 °C und 5% CO₂. Die Passage mit 1/20- bis 1/40-Verdünnung erfolgte zweimal wöchentlich. Dabei wurde diese Zelllinie nicht trypsiniert, sondern durch Schaben von der Kulturflasche gelöst. Das weitere Vorgehen entsprach der bereits beschriebenen Prozedur (siehe Kapitel III.3.5.1.).

3.6. Untersuchung der Zytotoxizität

Die Toxizität der ApoE-Peptide wurde mittels MTT-Test bestimmt. Dieser Test nutzt die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase lebender Zellen sowie zelluläres NADH und NADPH zur Bestimmung der zellulären Vitalität (Mosmann 1983; Berridge und Tan 1993). Das schwachgelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) dringt in die Zellen ein. Der Tetrazoliumring wird durch Dehydrogenasen geöffnet und das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan kristallisiert aus. Nach Solubilisation kann dieses photometrisch bestimmt werden.

24 h vor Versuchsdurchführung wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen je Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und bei Standardbedingungen kultiviert. Die Peptide und Peptid-markierte Liposomen wurden in verschiedenen Konzentrationen (0,1 bis 25 µM Peptid) in DPBSG verdünnt zu den Zellen gegeben und für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der MTT-Test durchgeführt. Dazu wurden 180 µl Medium und 20 µl des MTT-Reagenzes (5 mg/ml) pro Well zugegeben. Die Bildung des Farbstoffes erfolgte über 4 h im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂). Die Zellen und das Formazan wurden mit 100 µl DMSO pro Well gelöst. Anschließend wurde die photometrische Bestimmung des blauen Formazans mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei der Wellenlänge 550 nm mit der bei 650 nm bestimmten Absorption als Referenz durchgeführt. Die prozentual angegebene Zellvitalität bezieht sich auf mit DPBSG behandelte Zellen (Kontrolle), für die eine Vitalität von 100% angenommen wurde. Für jede Konzentration wurden drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

3.7. Internalisierungsuntersuchungen

3.7.1. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die intrazelluläre Lokalisation der Fluoreszenz-markierten ApoE-Peptide und ApoE-Peptid-markierten Liposomen wurde mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht. 24 h vor Versuchsdurchführung wurden jeweils 8×10^4 Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen lagen zum Zeitpunkt der

Untersuchungen semikonfluent vor. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit DPBSG gewaschen. Anschließend erfolgte die Beladung mit den Peptiden bzw. Peptid-markierten Liposomen in DPBSG für 1 h bei 37 °C (Brutschrank) bzw. 4 °C (Kühlschrank). Nach Ablauf der Beladungszeit wurden die Zellen mit eiskaltem DPBSG gewaschen, mit DPBSG überschichtet und bis zur Untersuchung auf Eis gehalten (< 30 min).

Um sicherzustellen, dass die Zellen nach der Beladungszeit noch über eine intakte Zellmembran verfügten, wurde ein Tropfen (ca. 50 µl) 0,5% (w/v) Trypanblaulösung direkt auf die Zellen pipettiert. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff, der nicht in das Zellinnere von lebenden Zellen eindringt. Durch Bindung an Membranproteine erhöht sich seine Fluoreszenzaktivität deutlich (Durlu und Tamai 1997). Damit kann die Integrität der Zellmembran dargestellt werden. Bei Membran-geschädigten Zellen ist der Farbstoff im Zytoplasma nachweisbar. Dadurch ist eine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen möglich.

Die CLSM Untersuchungen wurden mit einem LSM 510 konfokalen Laserscanning-Mikroskop und einem Plan-Neofluar 100×/1.3 Öl-Objektiv durchgeführt. Carboxyfluorescein-markierte Proben wurden mit einem 200 mW Argon-Laser (488 nm) bei 10% Intensität angeregt und die Fluoreszenz wurde mit einem BP505–530 Emissionsfilter detektiert. Rhodamin-markierte Proben wurden mit einem 15 mW Helium-Neon-Laser (543 nm) bei 10% Intensität angeregt und die Fluoreszenz wurde mit einem LP560 Emissionsfilter detektiert. Trypanblau wurde mit einem 15 mW Helium-Neon-Laser (633 nm) und 30% Intensität angeregt und die Fluoreszenz wurde mit einem LP650 Emissionsfilter detektiert. Das Pinhole war für alle Aufnahmen auf 300 µm eingestellt und die Anregung der verschiedenen Fluophore erfolgte sequenziell, um eine mögliche Fluoreszenzüberlagerung zu unterbinden.

3.7.2. Zytometrie

Die quantitative Untersuchung der Aufnahme Fluoreszenz-markierter A2-Peptide und A2-Peptid-markierter Liposomen wurde mittels Zytometrie (FACS, engl. Fluorescence-activated cell sorting) durchgeführt. Dazu wurden 24 h vor Versuchsdurchführung $1,2 \times 10^5$ Zellen je Well in 6-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen lag ein semikonfluenten Zellrasen vor. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 37 °C DPBSG gewaschen. Anschließend erfolgte die Beladung mit den Peptiden bzw. Peptid-markierten Liposomen in DPBSG für 1 h bei 37 °C (Brutschrank) bzw. 4 °C (Kühlschrank). Nach Ablauf der Beladungszeit wurden die Zellen mit eiskaltem DPBSG gewaschen. Um die Fluoreszenz von an der Zelloberfläche haftenden Peptiden zu minimieren und gleichzeitig die Zellen von den 6-Well-Platten abzulösen, wurden diese mit je 1 ml 0.1% (w/v) Pronase E in DPBS mit 0,5 mM EDTA für 5 min bei 4 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,7 ml 1% (w/v)

BSA in DPBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (4 min, 4.500g bei 4 °C; für RAW264.7: 2.000g). Das Zell-Pellet wurde bis zur Messung auf Eis gehalten (< 30 min). Direkt vor der Messung wurden die Zellen je nach Zelldichte in 0,5 bis 1,0 ml eiskaltem 1% (w/v) BSA in DPBS resuspendiert. Zu je 0,5 ml Zellsuspension wurden 8 µl 0,5% (w/v) Trypanblau-Lösung gegeben, um die extrazelluläre Fluoreszenz weiter zu verringern (Van Amersfoort und Van Strijp 1994).

Die Fluoreszenzanalyse wurde mit einem FACSCalibur Zytometer durchgeführt. Für mit Fluorescein-markierten Proben beladene Zellen wurde ein 530/30 nm Emissionsfilter (FL1) mit 500 V Detektor-Spannung für fA2 bzw. 550 V für P2fA2 und Transferrin verwendet. Mit Rhodamin-markierten Liposomen inkubierte Zellen wurden mit einem 585/42 nm Emissionsfilter (FL2) und einer Detektor-Spannung von 550 V analysiert.

Die Vitalität der Zellen für die Analyse wurde anhand der Lichtstreuungseigenschaften bestimmt. Die entsprechenden Streuungseigenschaften wurden zuvor mit Hilfe von Propidiumjodid, einem DNA/RNA-Farbstoff, der von lebenden Zellen ausgeschlossen wird, durch „Backward-Gating“ der Propidiumjodid-negativen Zellen bestimmt (Krishan 1990; Pollack und Ciancio 1990). Es wurden mindestens 10.000 Zellen je Probe untersucht und jedes Experiment wurde wenigstens einmal mit Doppel- oder Dreifachbestimmung wiederholt.

3.7.3. Untersuchung des Aufnahmemechanismus

Blockieren von HSPG

Die Beteiligung des Heparansulfat-Proteoglykan-Gerüsts (HSPG) an der Internalisierung von A2-Peptiden und A2-Peptid-markierten Liposomen wurde sowohl durch Behandlung der Zellen mit Heparinase als auch durch Zugabe von Kompetitoren der HSPG-Peptid-Interaktion bestimmt. Heparinase I spaltet partiell die 1,4-D-glykosidische Bindung der Heparanseitenketten und verhindert somit die Bindung kationischer Liganden an das negativ geladene, Membran-ständige HSPG. Die Zellen wurden vor der Beladung mit Heparinase I einer Aktivität von 10 Units/ml in DPBSG für 2 h bei 37 °C vorinkubiert. Zellen ohne Heparinase-Behandlung dienten als Vergleich.

Des Weiteren wurden Aufnahmeexperimente in Gegenwart von Heparin als strukturgleichem Kompetitor des HSPG und in Gegenwart von polykationischem PLL als Kompetitor zu kationischen HSPG-Liganden durchgeführt. Dabei wurden die Zellen während der Beladung mit A2-Peptiden, A2-Mizellen bzw. A2-Peptid-markierten Liposomen mit 20 µg/ml Heparin bzw. 0,05 µM PLL koinkubiert.

Die Aufnahmeuntersuchungen mittels CLSM erfolgten wie bereits beschrieben (siehe Kapitel III.3.7.2.).

Pharmakologische Endozytoseinhibitoren

Zur Untersuchung der endozytotischen Mechanismen wurde die Wirkung verschiedener Endozytoseinhibitoren auf die Internalisierung der einzelnen A2-Peptid-basierten Trägerstrukturen bestimmt.

Bei nicht phagozytierenden Zellen basieren alle endozytotischen Prozesse auf der Aktivität des zellulären Aktin-Netzwerks. Daher wird Cytochalasin D, das eine Depolymerisation von F-Aktin bewirkt (Flanagan und Lin 1980; Goddette und Frieden 1986), zur Bestätigung von Endozytose als aktiven Aufnahmeprozess eingesetzt. Chlorpromazin verhindert die Bildung des Clathrin-Netzwerks an der Plasmamembran und inhibiert damit die Clathrin-vermittelte Endozytose (Wang et al. 1993). Die Caveolin-vermittelte Endozytose kann durch den Einsatz von Nystatin unterdrückt werden, das die Formierung von Caveolinen an der Zelloberfläche durch Komplexierung des Cholesterols in der Plasmamembran unterbindet (Rothberg et al. 1992).

Die Zellen wurden dazu zunächst für 30 min bei 37 °C mit den entsprechenden Inhibitoren vorinkubiert. Die Konzentrationen waren 2 µg/ml Cytochalasin D, 10 µg/ml Chlorpromazin bzw. 25 µg/ml Nystatin in DPBSG. Die Beladung der Zellen mit den A2-Peptiden bzw. den A2-Peptid-markierten Liposomen erfolgte anschließend in Anwesenheit der Inhibitoren bei entsprechenden Konzentrationen.

Die Charakterisierung der Aufnahme mittels CLSM und FACS erfolgte wie bereits beschrieben (siehe Kapitel III.3.7.2.).

Anwendung spezifischer Antikörper

Um zu untersuchen, ob der LDL-Rezeptor an der Internalisierung der ApoE-Peptide und ApoE-Peptid-markierten Liposomen beteiligt ist, wurden Aufnahmeexperimente mit einem anti-LDLr Antikörper durchgeführt. Dieser konkurriert mit LDL bzw. den A2-Peptiden um die Bindung an den LDLr (van Driel et al. 1987; Duvillard et al. 2003). Als Kontrolle wurde ein unspezifisches Antikörpergemisch des gleichen Isotyps eingesetzt. Die Zellen wurden bei der Beladung mit den A2-Peptiden bzw. A2-Peptid-markierten Liposomen mit dem anti-LDLr IgG bzw. dem Kontroll IgG bei einer Konzentration von 3 µg/ml koinkubiert.

Die Charakterisierung der Aufnahme mittels FACS erfolgte wie bereits beschrieben (siehe Kapitel III.3.7.2.).

3.8. In vivo Versuche zum Targeting arteriosklerotischer Veränderungen

Die Tierversuche wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fayad an der Mount Sinai School of Medicine, New York, durchgeführt und wurden zuvor von dem örtlichen Ethik-Komitee genehmigt. 6 Monate alte ApoE^{-/-} Mäuse wurden vor Durchführung der Versuche für mindestens 16 Wochen auf

einer Fett- und Cholesterol-reichen Diät gehalten (21% Fett und 0.15% Cholesterol, D01022601, Research Diets, USA).

Für die intravenöse Injektion der Kontrastmittel, die magnetresonanztomographische Untersuchung und die Entnahme von Blut und Gewebeproben wurden die Versuchstiere zuvor mit 4% (v/v) Isofluoran in Sauerstoff betäubt. Die Narkose wurde während der jeweiligen Behandlung mit 1,5 bis 2% (v/v) Isofluoran in Sauerstoff aufrechterhalten.

Es wurden keine negativen klinischen Effekte, wie bspw. Verhaltensauffälligkeiten oder Tod, aufgrund der Applikation der Kontrastmittel während der Untersuchungen festgestellt.

3.8.1. Bestimmung der Bioverteilung und Blut-Halbwertszeit

Für den Einsatz von MR-Kontrastmitteln und die spätere Betrachtung der Ergebnisse ist ein Kenntnis der Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Bedeutung. Um diese zu bestimmen, wurden die A2-markierten PEG-Lipid-Mizellen und die entsprechenden Kontroll-PEG-Lipid-Mizellen mit einer Gd^{3+} -Menge von 50 $\mu\text{mol}/\text{Kg}$ Körpergewicht mit Hilfe eines Mikrokatheters in die Schwanzvene von 6 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen injiziert.

Blut-Halbwertszeit

Zur Bestimmung der Halbwertszeit der PEG-Lipid-Mizellen im Blut wurde den Versuchstieren zu verschiedenen Zeitpunkten geringe Blutmengen (<10 μl) entnommen. Die Gd^{3+} -Konzentrationen als Maß für die Konzentration der PEG-Lipid-Mizellen wurde extern bei der Firma Cantest (Kanada) mittels ICP-MS bestimmt. Die Halbwertszeit wurde mit einem monoexponentiellen Fit der Gd^{3+} -Konzentrationen gegen die Zeit berechnet.

Bioverteilung

24 h nach der Applikation der A2-PEG-Lipid-Mizellen wurden die Versuchstiere durch Herzpunktion getötet und anschließend mit PBS perfusioniert. Aorta, Leber, Milz, Lunge, Herz und Nieren wurden entnommen, gereinigt und von Fett befreit. Anschließend wurde das Gewicht der feuchten Organe bestimmt. Die Gd^{3+} -Menge in den Geweben als Maß für die Konzentration der PEG-Lipid-Mizellen wurde extern bei der Firma Cantest (Kanada) mittels ICP-MS bestimmt und relativ zum Gewicht der Organe betrachtet.

3.8.2. Magnetresonanztomographie

Die magnetresonanztomographischen Untersuchungen zur Bestimmung der Effizienz der ApoE-Peptid-markierten PEG-Lipid-Mizellen als spezifisches Kontrastmittel zur Signalverstärkung arteriosklerotischer Veränderungen wurden mit Hilfe eines 9.4 T Kleintier Systems (Bruker, USA) durchgeführt. A2-Peptid-markierte PEG-Lipid-Mizellen bzw. entsprechende Kontroll-PEG-Lipid-Mizellen wurden mit einer Gd^{3+} -Menge von 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ Körpergewicht mit Hilfe eines Mikrokatheters in die Schwanzvene von 6 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen injiziert. MRT-Aufnahmen der Aorta wurden vor sowie 6, 24, 48 und 72 h nach Applikation der Kontrastmittel aufgenommen. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in eine 30 mm Sende- und Empfangs-Spule mit einer Kleintierhalterung platziert. Die Körpertemperatur wurde während der Messung mit einem Heizaggregat konstant bei 37 °C gehalten.

Eine T1-gewichtete Spin-Echo-Sequenz, bei der das Blut mit negativem Kontrast dargestellt wird (engl. black blood spin echo sequence), wurde für die Darstellung der abdominalen Aorta genutzt (Repetitionszeit (TR) 800 ms, Echozeit (TE) 8,6 ms, Abbildungsbereich 3,0×3,0 cm). Dabei wurden 16 bzw. 22 kontinuierliche axiale Schnitte mit einer Schichtdicke von je 500 μm aufgenommen. Aufgrund der retroperitonealen Lokalisation der abdominalen Aorta ist diese relativ zur Wirbelsäule statisch positioniert. Daher ist keine Einstellung der Messequenz nach der Atmung nötig und die einzigartige anatomische Struktur der Wirbel kann zum Positionsabgleich der einzelnen MR-Scans genutzt werden.

Die Signalintensitäten wurden mit Hilfe der eFilm Workstation Software (Merge Healthcare) bestimmt. Die Signalverstärkung (SV) in Bereichen mit anatomisch veränderten Wandbereichen der abdominalen Aorta wurde je Versuchstier in fünf Schnittebenen nach folgendem Schema berechnet (Briley-Saebo et al. 2006). Um Intensitätsunterschiede der einzelnen MR-Scans auszugleichen, wurde die Signalverstärkung über das Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) berechnet und nach der Signalintensität des Muskelgewebes der Wirbelsäule normiert.

$$SRV = \frac{SI}{SD_{Rauschen}} \quad SV\% = 100 \times \left[\left(\frac{SRV_{Wand} / SRV_{Muskel}}{SRV_{Wand=t0} / SRV_{Muskel=t0}} \right) - 1 \right]$$

| | | | |
|-----|-------------------------------|-----------------|--|
| SRV | Signal-Rausch-Verhältnis | $SD_{Rauschen}$ | Standardabweichung des Hintergrundsignals |
| SI | Signalintensität [a.u.] | $SRV_{X=t0}$ | Signal-Rausch-Verhältnis des betreffenden Bereichs vor Applikation des Kontrastmittels |
| SV% | prozentuale Signalverstärkung | | |

3.8.3. Lokalisation in arteriosklerotischen Plaques

Um ein erfolgreiches Targeting der arteriosklerotischen Veränderungen nachzuweisen, wurden Aorten von zuvor mit PEG-Lipid-Mizellen behandelten Mäusen mittels CLSM untersucht. Zu diesem Zweck wurden ApoE-Peptid-markierte PEG-Lipid-Mizellen bzw. entsprechende Kontroll-PEG-Lipid-Mizellen mit einer Gd^{3+} -Menge von 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ Körpergewicht in die Schwanzvene von 6 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen injiziert. 24 h bzw. 72 h nach der Applikation der PEG-Lipid-Mizellen wurden die Versuchstiere durch Herzpunktion getötet und anschließend mit PBS perfusioniert. Die abdominale Aorta wurde isoliert, in Tissue Tek (USA) Gefrierschnittmedium eingebettet und bei -80 °C gelagert.

10 μm Schnitte wurden auf Objektträgern mit 4% (v/v) Paraformaldehyd für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gespült und mit 0,5% (w/v) BSA in PBS für 45 min geblockt. Nach dem Blocken wurden die Schnitte mit Alexa Fluor 647-konjugierten anti-CD68 IgG (AbD Serotec, USA) oder einem entsprechenden Kontroll-Antikörper für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Schnitte 2mal mit PBS gespült wurden, erfolgte die Einbettung in SlowFade Gold Medium (Invitrogen, USA) mit DAPI für die Färbung der Zellkerne.

Die CLSM Untersuchungen wurden mit einem LSM 510 konfokalen Laserscanning-Mikroskop und einem LD-Achroplan 40 \times /0,6 corr Objektiv durchgeführt. DAPI wurde mit einem 2 W Argonionen-Laser (364 nm) bei 10% Intensität angeregt und die Fluoreszenz wurde mit einem BP385–470 Emissionsfilter detektiert. Rhodamin wurde mit einem 15 mW Helium-Neon-Laser (543 nm) bei 50% Intensität angeregt und die Fluoreszenz mit einem LP560 Emissionsfilter detektiert. Alexa Fluor 647 wurde mit einem 15 mW Helium-Neon-Laser (633 nm) bei 8% Intensität angeregt und die Fluoreszenz mit einem LP650 Emissionsfilter detektiert. Die Anregung der verschiedenen Fluophore erfolgte sequenziell, um eine mögliche Fluoreszenzüberlagerung zu unterbinden.

3.9. Statistische Auswertungsmethoden

Die Datenauswertung erfolgte unter Verwendung der Programme Excel (Microsoft), SigmaPlot (Systat Software), LSM Image Browser (Zeiss), FCS Express (DeNovo Software) und eFilm Workstation (Merge Healthcare). Zur Beschreibung der Daten wurden bei Normalverteilung die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichungen (SD) berechnet. Unterschiede wurden als signifikant klassifiziert und in Diagrammen mit * markiert, wenn mittels Student's t-Test ein p-Wert kleiner als 0,05 berechnet wurde.

IV. Ergebnisse und Diskussion

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Der erste Abschnitt (Kapitel 1 bis 3 des Ergebnisteils) behandelt die Entwicklung neuer ApoE-Peptid-basierter Trägersysteme und deren Charakterisierung im Hinblick auf eine mögliche Anwendung zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Dabei stehen die Erkennung und die Aufnahme der Trägersysteme durch die Endothelzellen der Hirnkapillaren und der Vergleich mit den Endothelzellen der großen Gefäße im Mittelpunkt der Untersuchung. Es soll geklärt werden, inwieweit morphologische Unterschiede der Endothelzellen in Verbindung mit den variablen Eigenschaften der Trägersysteme als Grundlage für ein spezifisches Targeting dienen können.

Der zweite Teilbereich dieser Arbeit (Kapitel 4 des Ergebnisteils) behandelt die Anwendung von ApoE-Peptid-modifizierten Mizellen als spezifische Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie zur Untersuchung von frühen arteriosklerotischen Veränderungen in den Gefäßwänden großer Arterien.

1. Apolipoprotein E-abgeleitete Peptide mit alternativen Palmitoylierungspositionen

In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass die Kopplung von zwei Palmitoyl-Resten eine stabile adsorptive Bindung von ApoE-abgeleiteten Peptiden an die Lipid-Doppelschicht von liposomalen Strukturen vermittelt (Sauer et al. 2006).

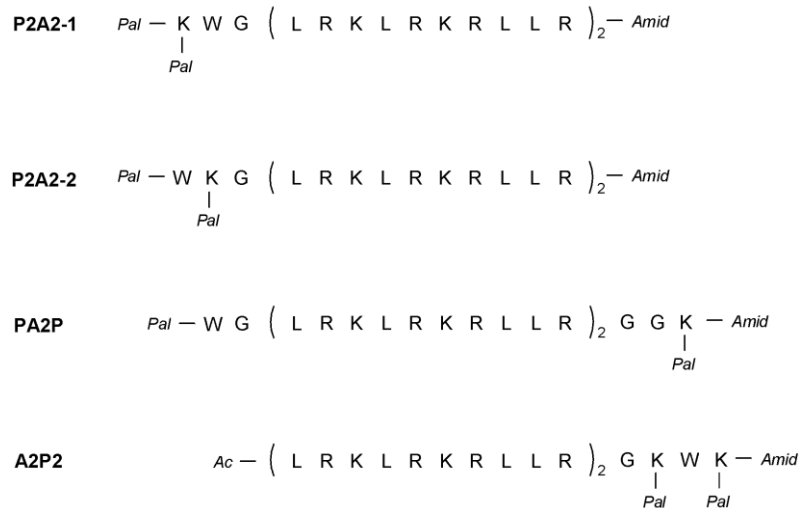
In dieser Arbeit soll zunächst der Einfluss der Palmitoylierungsposition auf die Interaktion mit der Lipid-Doppelschicht charakterisiert werden. Dabei soll neben der Stabilität der Peptid-Lipid-Wechselwirkung auch der Einfluss auf die Sekundärstruktur und die Integrität der liposomalen Lipid-Doppelschicht untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden ApoE-Peptide mit unterschiedlichen Palmitoylierungspositionen synthetisiert (siehe Abbildung 8).

Alle Peptide sind N-terminal acyliert und C-terminal amidiert. Die Aminosäuresequenz des A2-Peptides (AS 141-150 von Apolipoprotein E, (LRK LRK RLLR)₂) bleibt konstant. Die Palmitoylierung erfolgt über eine Amid-Bindung an kurze Linkersequenzen, welche einen Tryptophanrest als Fluoreszenzmarker enthalten (siehe Abbildung 8). Dies soll eine Beobachtung der Interaktion von A2 mit der Lipid-Doppelschicht ermöglichen.

Die Nomenklatur der Peptide richtet sich nach den Palmitoylierungspositionen. Es wurden zwei N-terminal dipalmitoylierte A2-Peptide synthetisiert. P2A2-1 (MW: 3530,9 g/mol) ist an Lys1 in Position α und ϵ palmitoyliert. P2A2-2 (MW: 3530,9 g/mol) entspricht dem bereits beschriebenen Peptid P2A2 (Sauer et al. 2006) und trägt Palmitoylreste an den Positionen Trp1 und ϵ -Lys2. PA2P (MW: 3773,0 g/mol) ist sowohl N-terminal an Position Trp1 als auch C-terminal an Position ϵ -Lys26

palmitoyliert. Das C-terminal dipalmitoylierte A2P2 (MW: 3701,0 g/mol) trägt an den Positionen ϵ -Lys22 und ϵ -Lys24 einen Palmitoylrest. Die molaren Massen der Peptide wurden mittels ESI-MS bzw. MALDI-TOF-MS verifiziert.

Abbildung 8 Übersicht der ApoE-abgeleiteten Peptide mit verschiedenen Palmitoylierungspositionen in Ein-Buchstaben-Aminosäuren-Code; (Pal, Palmitoylrest; Ac, Acetylrest)



1.1. Charakterisierung der Peptid-Liposomen-Bindung

1.1.1. Assoziationszustand unter physiologischen Bedingungen

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass P2A2-2 (früher P2A2) unter physiologischen Bedingungen hoch definierte, diskförmige Peptidmizellen bildet. Diese besitzen ein hohes Potenzial für den Einsatz als Trägerstruktur für hydrophobe Wirkstoffe (Keller et al. 2005).

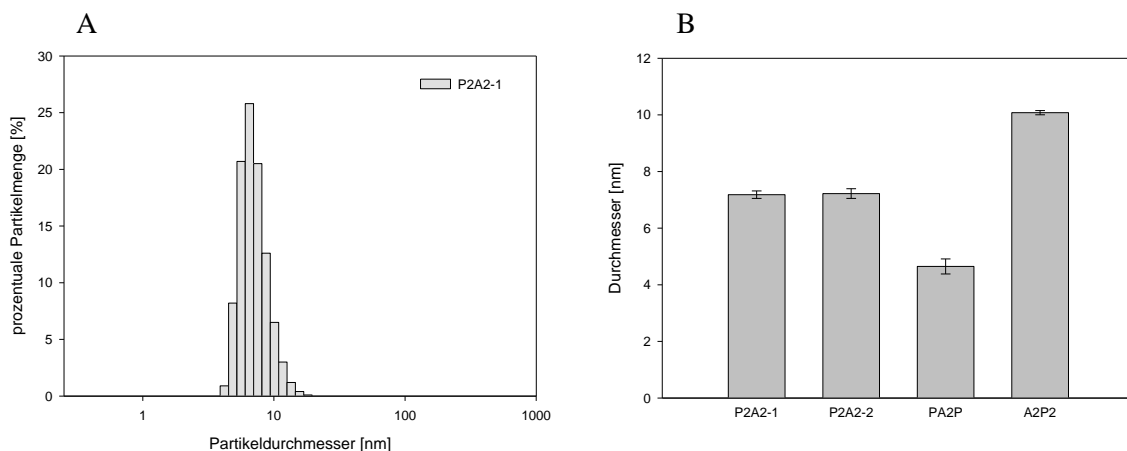
Alle Lipopeptide sind, trotz der durch die Palmitoylketten vermittelten hydrophoben Eigenschaften, in Phosphat-Puffer pH 7,4 bei einer Peptidkonzentration von 100 μ M vollständig löslich. Die verschiedenen Peptidlösungen wurden mittels Dynamischer Lichtstreuung untersucht und der Hydrodynamische Durchmesser bestimmt (siehe Abbildung 9).

Alle Peptide assoziieren bei physiologischen Bedingungen zu definierten Strukturen mit einem Polydispersitätsindex im Bereich von 0,1 bis 0,3. Der für P2A2-2 bestimmte Durchmesser ist mit $7,22 \pm 0,17$ nm geringer als der durch Dr. Sandro Keller ermittelte Durchmesser von $10,5 \pm 0,60$ nm. Ursachen für diese Abweichung sind zum einen in der unterschiedlichen apparativen Ausstattung zu suchen. Zum anderen wurden die Partikelgrößen in diesem Fall in Abhängigkeit von der Partikelanzahl und nicht nach der Streuungsintensität bestimmt. Da die gemessene Streuungsintensität von der Partikelgröße mit einem Exponenten von 6 abhängig ist, bewirken bereits sehr geringe

Größenveränderungen sehr große Änderungen der Streuungsintensität (große Partikel streuen stärker). Die Umrechnung der Streuungsintensität zur Partikelanzahl bewirkt eine Verschiebung zu geringeren Größen. Dieser zusätzliche Berechnungsschritt ist zwar unter Umständen mit einem größeren Fehler verbunden, dafür erlaubt die gewählte Darstellung, die Partikelgrößen und deren Veränderung direkt zu erfassen.

P2A2-1, bei dem beide Palmitoylgruppen an das N-terminale Lysin gekoppelt sind, bildet Strukturen mit einem Hydrodynamischen Durchmesser von $7,18 \pm 0,13$ nm. Es ist kein signifikanter Größenunterschied im Vergleich zum N-terminal in Position 1 und 3 palmitoyliertem P2A2-2 zu erkennen. A2P2 assoziiert dagegen zu Strukturen mit einem größeren Durchmesser von $10,08 \pm 0,07$ nm. Die C-terminale Palmitoylierung bewirkt entweder die Bildung von Mizellen, die aus einer größeren Anzahl von Peptiden aufgebaut sind, oder von weniger dicht gepackten Peptidmizellen. Im Gegensatz dazu bildet PA2P Strukturen mit einem deutlich kleineren Hydrodynamischen Durchmesser von $4,65 \pm 0,27$ nm.

Abbildung 9 Größenverteilung der ApoE-Peptid-Mizellen nach Partikelanzahl unter physiologischen Bedingungen (100 μ M Peptid in DPBS pH 7,4) (A) Histogramm-Plot von P2A2-1 (B) Durchschnittliche Größenverteilung (Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)



Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass der Hydrodynamische Durchmesser von der Partikelform beeinflusst wird. Dieser wird unter der Annahme kugelförmiger Objekte berechnet. Eine wesentliche Abweichung von dieser Form resultiert in einer fehlerhaften Größenbestimmung. Dies ist gerade bei PA2P zu bedenken. Weiterhin muss ein möglicher Einfluss der Peptidkonzentration auf den Assoziationszustand berücksichtigt werden. Die Partikelgröße wurde bei einer Peptidkonzentration von 100 μ M bestimmt. Auf Grund der zu geringen Signalintensität konnte diese nicht bei der für die Zellaufnahmeuntersuchungen relevanten Konzentration von 1 μ M bestimmt werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse stellen daher nur Anhaltspunkte für mögliche strukturelle Unterschiede der Peptidassoziate dar.

1.1.2. Stabilität der Peptid-Liposomen-Bindung

Die Stabilität der Lipid-Peptid-Interaktion ist für den Einsatz der Lipopeptide zum Targeting von Liposomen von großer Bedeutung. Zu diesem Zweck werden die Fluoreszenzeigenschaften des in der Linkersequenz der A2-Peptide enthaltenen Tryptophans für einen Fluoreszenzlöschungs-Assay genutzt.

Da der ursprüngliche Assay nur die rein qualitative Beobachtung der Umverteilung erlaubte, ohne die Möglichkeit einer quantitativen Aussage über deren Vollständigkeit zu gestatten, wurden zusätzliche Kontrollen eingeführt, die eine Quantifizierung und damit den direkten Vergleich der Ergebnisse ermöglichen. Dazu wurden zunächst die Fluoreszenzeigenschaften der ApoE-Peptide bei den Parametern bestimmt, die zu Beginn der Umverteilung (gequencht, mit Ausgleich der Konzentrationsänderung bei Zugabe des Überschusses an POPC-SUVs) und bei Gleichverteilung (teil-gequencht) gegeben sind (siehe Tabelle 7).

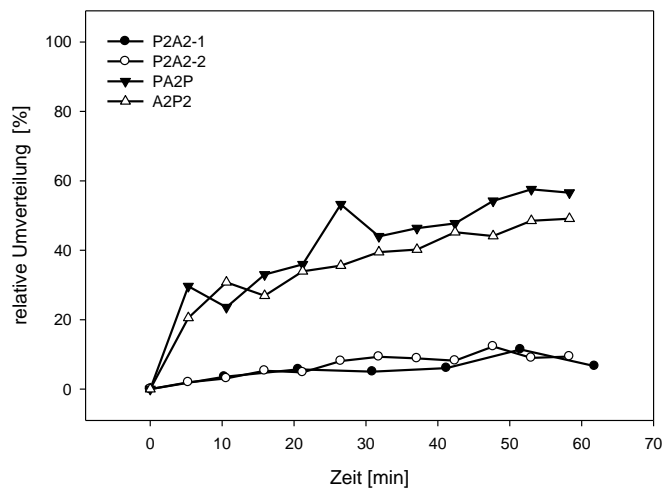
Tabelle 7 Fluoreszenzeigenschaften der dipalmitoylierten Peptide in Tris-Puffer pH 7,4; 2 μ M Peptid gebunden an 2 mM DiBr-PSPC/ POPC (40/ 60) –SUVs (gequencht) bzw. 2 mM DiBr-PSPC/ POPC (40/ 60) –SUVs und 4 mM POPC –SUVs (teil-gequencht), $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$

| Peptid | λ_{max} [nm] | Fluoreszenzintensität [a.u.] | | |
|---------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|-----------|
| | | gequencht | teil-gequencht | Differenz |
| P2A2-1 | 345 | 291,2 | 364,4 | 73,2 |
| P2A2-2 | 343 | 418,4 | 646,3 | 227,9 |
| PA2P | 343 | 321,1 | 372,0 | 50,9 |
| A2P2 | 339 | 420,8 | 584,9 | 164,1 |

Die Lage der Fluoreszenzmaxima im Bereich von 345 bis 339 nm deutet auf eine Positionierung der Tryptophane in einer hydrophoben Umgebung hin. Tryptophane, die von Palmitoylresten umgeben sind, wie dies bspw. bei P2A2-2 und A2P2 der Fall ist, interagieren deutlich stärker mit der Lipid-Doppelschicht. Dies zeigt sich an den weiter zu kleineren Wellenlängen verschobenen Fluoreszenzmaxima und der erhöhten Fluoreszenzintensität. Die geringe Differenz in der Fluoreszenzintensität von gequenchem und umverteiltem PA2P zeigt einen geringen Einfluss der Bindung an DiBr-SUVs. Dies deutet auf eine sehr schwache, möglicherweise unvollständige Bindung an die Lipid-Doppelschicht, hin.

Generell sind starke Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten zwischen den einzelnen Lipopeptiden zu erkennen. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Fluoreszenzdifferenzen würden die Auswertung der Umverteilungsuntersuchungen deutlich verfälschen. Daher ist eine entsprechende Normierung der ermittelten Umverteilungskinetiken notwendig.

Abbildung 10 Relative Umverteilung in Tris-Puffer pH 7,4; 2 μ M Peptid gebunden an 2 mM DiBr-PSPC/POPC (40/60) –SUVs, Start der Kinetik durch Zugabe von 4 mM POPC –SUVs



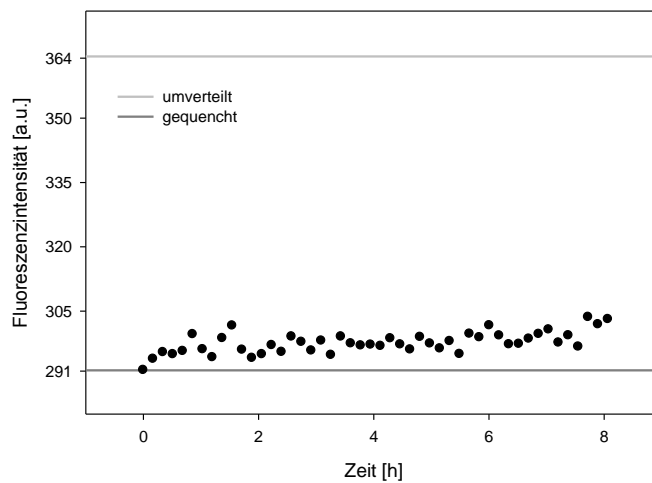
In Abbildung 10 ist erkennbar, dass die beiden N-terminal dipalmitoylierten ApoE-Peptide P2A2-1 und P2A2-2 sehr fest in der Lipid-Doppelschicht der Liposomen verankert sind. Nach 1 h Inkubation mit einem zweifachen Überschuss an POPC-Liposomen sind nur ca. 10% der Peptide umverteilt. Im Gegensatz dazu sind PA2P und das C-terminal dipalmitoylierte A2P2 nur schwach an die Liposomen gebunden. Es sind bereits ca. 60 bzw. 50% der Peptide nach 1h umverteilt.

Die relativ starken Schwankungen der Fluoreszenzintensität sind auf die gewählten Messparameter zurückzuführen. Diese wurden so eingestellt, dass eine möglichst geringe Signalverfälschung durch Photobleaching erfolgte. Dafür musste gleichzeitig eine verringerte Signalqualität hingenommen werden.

Um die Stabilität der Verankerung über einen längeren Zeitraum zu beobachten, wurde die Umverteilung von P2A2-1 über einen Zeitraum von 8 h untersucht (siehe Abbildung 11). Nur ca. 15% der Peptide waren nach 8 h umverteilt.

Zu beachten ist, dass die Tryptophanfluoreszenz im Bereich der Peptidlinker nur eine Aussage über die Bindung des Peptids im Bereich der Linkersequenz an die Liposomen erlaubt. Inwieweit das Gesamtpeptid mit der Lipid-Doppelschicht interagiert, lässt sich unter anderem CD-spektroskopisch durch die Ermittlung der durch die Lipid-Interaktion induzierten Sekundärstruktur der Peptide feststellen.

Abbildung 11 Umverteilung von P2A2-1; in Tris-Puffer pH 7,4; 2 μ M P2A2-1 gebunden an 2 mM DiBr-PSPC/POPC (40/60) –SUVs, Start der Kinetik durch Zugabe von 4 mM POPC –SUVs



1.1.3. Einfluss der Liposomen-Bindung auf die Sekundärstruktur der Peptide

Für eine effektive Bindung an den LDLr wurde die Bildung einer amphipathischen α -Helix postuliert (Dyer et al. 1995). Mit Hilfe des Zirkulardichroismus wurde untersucht, inwieweit die A2-Peptide mit der Lipid-Doppelschicht von POPC-Liposomen interagieren und welchen Einfluss die Palmitoylierungsposition auf die Sekundärstruktur der Peptide hat. Die CD-Untersuchungen wurden unter annähernd physiologischen Bedingungen (Tris/ NaF-Puffer pH 7,4), in Anwesenheit des strukturinduzierenden Lösungsmittels Trifluorethanol (TFE) und gebunden an POPC-SUVs, durchgeführt.

Unter physiologischen Bedingungen zeigen alle Peptide bis auf PA2P nur eine schwach ausgeprägte Sekundärstruktur. Die CD-Spektren deuten auf hoch flexible, ungeordnete Peptidsequenzen in den Mizellen hin. PA2P hingegen zeigt unter physiologischen Bedingungen ein CD-Spektrum, dass durch sein Doppelminimum bei 208 und 216 nm eindeutig eine α -helikale Struktur des Peptids zeigt. Dies deutet darauf hin, dass PA2P in wässrigem Milieu wesentlich stärker strukturierte Assoziate bildet, als einseitig N- oder C-terminal dipalmitoylierte ApoE-Peptide.

Bei Zugabe von 50% TFE zeigen alle Peptide eine Helizität von ca. 50 bis 60% und besitzen damit das Potential zur Bildung einer amphipathischen α -Helix. Die N-terminal modifizierten Peptide P2A2-1 und P2A2-2 zeigen eine leicht erhöhte Helixneigung (ca. 60%). Dies könnte auf den Einfluss der N-terminalen Linkersequenz zurückzuführen sein.

Abbildung 12 CD-Spektren von P2A2-1; 20 μ M P2A2-1 in Tris/ NaF-Puffer pH 7,4), 50% Trifluorethanol (TFE) und POPC (bzw. POPG)-SUVs bei einem Lipid/ Peptid-Verhältnis von 200

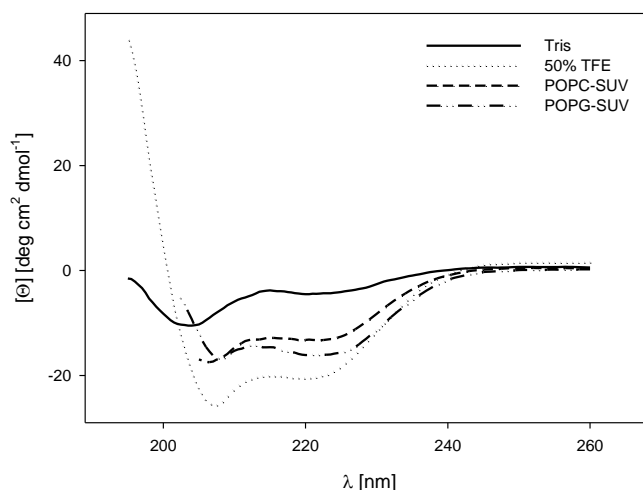


Tabelle 8 Übersicht der Helizitäten nach (Chen und Yang 1971) unter verschiedenen Bedingungen; in Tris/ NaF-Puffer pH 7,4, mit 50% Trifluorethanol (TFE) bzw. gebunden an POPC (bzw. POPG)-SUVs bei einem Lipid/ Peptid-Verhältnis von 200

| Peptid | Helizität [%] | | | |
|---------------|---------------|---------|----------|----------|
| | Tris | 50% TFE | POPC-SUV | POPG-SUV |
| P2A2-1 | 8 | 61 | 37 | 44 |
| P2A2-2 | 4 | 56 | 28 | / |
| PA2P | 17 | 47 | 33 | / |
| A2P2 | 8 | 48 | 21 | / |

Durch Bindung an POPC-SUVs erhöht sich die Helizität aller Peptide. Dies zeigt, dass tatsächlich eine Interaktion dieser Peptide mit der Lipid-Doppelschicht der Liposomen erfolgt und dass diese Interaktion eine α -helikale Konformation der Peptide induziert. Allerdings wird das Gesamtsignal auch durch die Stärke der Liposomenbindung beeinflusst. So kann eine mittlere Helizität einerseits durch eine starke Bindung, durch die aber nur eine geringe Helizität des Peptides induziert wird, bedingt sein. Andererseits kann durch die Bindung eine hohe Helizität vermittelt werden, während gleichzeitig das Peptid mit geringer Affinität an die Lipid-Doppelschicht bindet und damit im Mittel

nur ein geringer Anteil des Gesamtpeptids tatsächlich mit der Lipid-Doppelschicht interagiert. Dies wäre bspw. im Fall von PA2P denkbar.

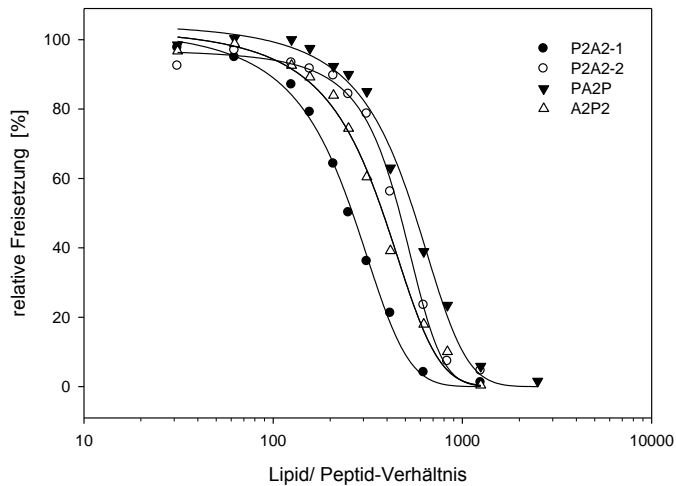
P2A2-1 zeigt mit ca. 37% die höchste Helizität bei Interaktion mit POPC-SUVs. Bei einer Bindung an POPG-SUVs erhöht sich die Helizität auf ca. 44%. Dies beruht auf einer stärkeren Interaktion des kationischen Peptides mit der negativ geladenen POPG-Lipid-Doppelschicht. Die Helizität des strukturell sehr ähnlichen P2A2-2 ist mit 28% bei Interaktion mit POPC-SUVs deutlich geringer.

1.1.4. Integrität der Liposomen

Für die erfolgreiche Anwendung von Liposomen als Wirkstoffträger ist die Möglichkeit, Wirkstoffe dauerhaft inkorporieren zu können, entscheidend. Der Integrität der liposomalen Lipid-Doppelschicht kommt dabei gerade für die luminale Einlagerung von hydrophilen Wirkstoffen eine maßgebliche Bedeutung zu. Da die amphipathischen Lipopeptide die Lipidmembran bei ausreichend hoher Konzentration permeabilisieren können, gleichzeitig aber eine möglichst hohe Peptiddichte für ein erfolgreiches Targeting angestrebt wird, wurde die Wirkung der dipalmitoylierten ApoE-Peptide auf die liposomale Integrität untersucht.

Hierfür wurden mit Calcein in selbst-quencher Konzentration beladene POPC-Liposomen mit variablen Peptidkonzentrationen inkubiert und die Fluoreszenz der Proben im Anschluss daran ermittelt. Durch Auftragung der nach der Fluoreszenz bei maximaler Freisetzung normierten Werte gegen die entsprechenden Lipid/ Peptid-Verhältnisse (C_{LP}) kann für die jeweiligen Peptide eine Freisetzungskurve erstellt werden, durch die mittels eines einfachen sigmoidalen Fittes das Lipid/ Peptid-Verhältnis der halbmaximalen Freisetzung bestimmt werden kann (siehe Abbildung 13). Dieser Wert entspricht einem „EC₅₀-Wert“. Da die Freisetzung bei einer bestimmten Peptidkonzentration natürlich direkt von der eingesetzten Lipidmenge abhängig ist, muss die Freisetzung für eine aussagekräftige Auswertung in Abhängigkeit des Lipid/ Peptid-Verhältnisses (C_{LP}) bestimmt werden. Alle dipalmitoylierten ApoE-Peptide zeigen eine relativ hohe Membran-störende Aktivität. Dabei ist das Störungspotential des N-terminal dipalmitoylierten P2A2-1 mit einer halbmaximalen Freisetzung bei einem C_{LP} von 234 relativ gering, besonders im Vergleich zu dem strukturell sehr ähnlichen P2A2-2, das bereits bei einem C_{LP} von 468 eine halbmaximale Freisetzung bewirkt. Ursache hierfür könnte eine unvorteilhafte sterische Orientierung der Palmitoylreste bei P2A2-2 sein. Obwohl bisherige Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von PA2P relativ instabil ist und die Möglichkeit besteht, dass PA2P nicht vollständig an POPC-Liposomen bindet, besitzt dieses Peptid die höchste Membran-störende Aktivität. Die halbmaximale Calcein-Freisetzung erfolgt bereits bei einem C_{LP} von 503. A2P2 besitzt mit einer halbmaximalen Freisetzung bei einem C_{LP} von 340 nur ein mäßiges Störungspotential.

Abbildung 13 Freisetzung von Calcein aus POPC Liposomen durch dipalmitoylierte ApoE-Peptide; 25 μ M Lipid (POPC-LUVs mit luminal 80 mM Calcein) in Tris-Puffer pH 7,4



| Peptid | Freisetzung bei C_{LP} | |
|---------------|--------------------------|-------------|
| | Beginn | halbmaximal |
| P2A2-1 | 625 | 234 |
| P2A2-2 | 833 | 468 |
| PA2P | 1250 | 503 |
| A2P2 | 1000 | 340 |

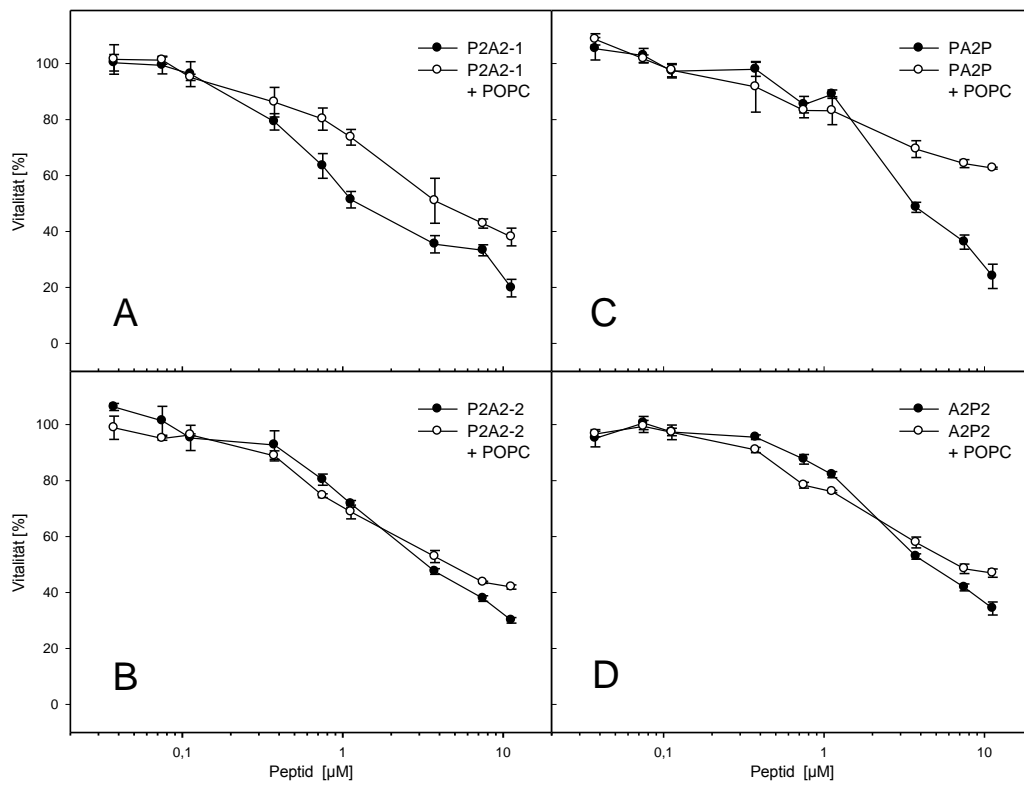
Da für die erfolgreiche Anwendung von ApoE-Peptid-markierten Liposomen nicht nur das Lipid/ Peptid-Verhältnis (C_{LP}) der halbmaximalen Freisetzung relevant ist, sondern gerade der Bereich der beginnenden Freisetzung entscheidend ist, wurden auch diese Lipid/ Peptid-Verhältnisse (C_{LP}) bestimmt (siehe Tabelle in Abbildung 13). Diese sollten im Hinblick auf einen möglichen späteren Einsatz als Wirkstoffträger für die Herstellung von ApoE-Peptid-Liposomen nicht unterschritten werden.

1.2. Untersuchungen an Hirnkapillarendothelzellen

1.2.1. Zytotoxische Wirkung

Nachdem bereits an POPC-Liposomen gezeigt wurde, dass die dipalmitoylierten A2-Peptide eine relativ hohe Membran-störende Aktivität besitzen, muss davon ausgegangen werden, dass diese auch nicht zu vernachlässigende toxische Effekte auf lebende Zellen zeigen. Da die Kenntnis der zytotoxischen Eigenschaften der Träger für die folgenden Internalisierungsuntersuchungen von Bedeutung ist, wurde die toxische Wirkung auf Hirnendothelzellen der Maus untersucht. Zu diesem Zweck wurden MTT-Tests sowohl mit den verschiedenen dipalmitoylierten A2-Peptiden als auch mit den entsprechenden Peptid-Liposomen-Komplexen durchgeführt (siehe Abbildung 14).

Abbildung 14 Toxizitätsbestimmung an b.End3 Zellen; 30 min Inkubation in DPBSG pH 7,4 bei 37 °C; A2-Peptid-Mizellen und A2-Peptid-markierte POPC-LUVs ($C_{LP}=1.000$)



Die Lipopeptide zeigen an b.End3 Zellen eine vergleichbare Zytotoxizität im mikromolaren Konzentrationsbereich. Dies deutet darauf hin, dass der zytotoxische Effekt vornehmlich auf dem kationischen Peptidanteil beruht. Es wurde außerdem bereits gezeigt, dass POPC bis zu einer Konzentration von 15 mM keine nennenswerte Toxizität gegenüber b.End3-Zellen aufweist (Dathe et al. 2006). Außerdem ist kein Einfluss des Lipid/ Peptid-Verhältnisses im Bereich von 500 bis 1.000 zu beobachten.

Dennoch gibt es Unterschiede im Toxizitätsmuster der verschiedenen Peptide. Während die Toxizitätsmuster der Peptid-Liposomen-Komplexe für die N-terminal dipalmitoylierten P2A2-1 und P2A2-2 sowie für das C-terminal dipalmitoylierte A2P2 im Rahmen der experimentellen Genauigkeit identisch sind, zeigt das nicht Lipid-assoziierte, mizellare P2A2-1 im Vergleich zu den anderen beiden Peptiden und den Peptid-Liposomen-Komplexen eine erhöhte Toxizität (siehe Abbildung 14 A und vergleiche 14 B&D). Da P2A2-1 im Gegensatz zu P2A2-2 und A2P2 an Lys1 in Position α und ϵ palmitoyliert ist, deutet dies auf einen möglichen Einfluss der Palmitoylierungsposition hin. Da die erhöhte Toxizität von P2A2-1 nicht mit dessen Membran-störender Aktivität korreliert und zudem kein Größenunterschied zwischen P2A2-1 und P2A2-2 mittels der Dynamischen Lichtstreuung feststellbar war, beruht dieser Effekt auf einer anderen, nicht näher bestimmten Interaktion mit der hoch komplexen zellulären Plasmamembran. PA2P zeigt deutliche Abweichungen in seinem

Toxizitätsmuster gegenüber den anderen ApoE-Peptiden. Während die Toxizität der Peptid-Liposomen-Komplexe und des freien Peptids bis zu einer Peptidkonzentration von 1 μM wesentlich geringer ist, steigt die toxische Wirkung bei höheren Konzentrationen freien Peptids überproportional stark an.

Möglichen Einwänden bezüglich der 30 min Inkubationszeit kann man entgegensetzen, dass die zu erwartenden toxischen Effekte amphipathischer Peptide vornehmlich auf einer akuten Störung der Integrität der Plasmamembran beruhen. Eine mögliche Aktivierung apoptotischer oder anderer zum Zelltod führenden Signalkaskaden erfolgt ebenso in einem engen zeitlichen Rahmen.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde für die folgenden Internalisierungsuntersuchungen an Gehirnkapillarendothelzellen eine maximale Peptidkonzentration von 1 μM festgelegt, die eine Zellvitalität von mindestens 75% gewährleistet.

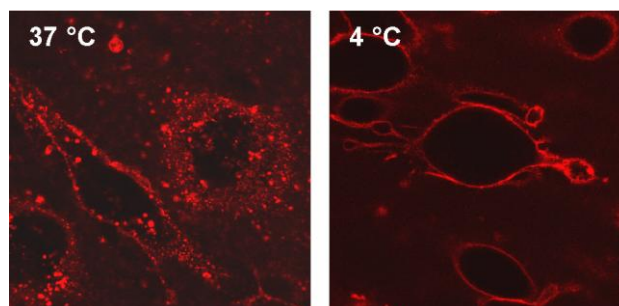
1.2.2. Internalisierung Apolipoprotein E-Peptid-markierter Liposomen

In dem folgenden Abschnitt wird die Eignung der verschiedenen Lipopeptide untersucht, die zelluläre Aufnahme von Liposomen zu vermitteln.

Qualitative Untersuchung der Internalisierung

Zunächst wurde dazu die Aufnahme Rhodamin-markierter Peptid-Liposomen-Komplexe an Hirnkapillarendothelzellen der Maus (b.End3) mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht. Die Bedingungen für die Aufnahmeuntersuchungen leiten sich aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Stabilität der Liposomen und den Toxizitätsuntersuchungen ab. Es wurden Peptidkonzentrationen von jeweils 1 μM und 1 mM 0,1% Rhodamin POPC-LUVs eingesetzt. Dies entspricht einem Lipid/ Peptid-Verhältnis von 1.000.

Abbildung 15 CLSM-Aufnahmen von b.End3 Zellen inkubiert mit 1 μM P2A2-2 gebunden an 1mM 0,1% Rhodamin-POPC-LUVs für 30 min in DPBSG; Trypanblau-Färbung



Alle dipalmitoylierten A2-Peptide sind in der Lage, eine effiziente Internalisierung Rhodamin-markierter Liposomen zu vermitteln. Die vesikuläre Lokalisation im Zellinneren sowie die Unterdrückung der Aufnahme bei 4 °C lässt auf einen aktiven endozytotischen Aufnahmeprozess schließen (siehe Abbildung 15). Der Ausschluss von Trypanblau bestätigt die Integrität der Zellmembran und die Vitalität der Zellen. Peptid-freie Liposomen werden nicht internalisiert. Anhand der CLSM Aufnahmen ist allerdings keine Differenzierung bezüglich der Aufnahmeeffizienz zwischen den verschiedenen Peptiden möglich.

Quantitative Aufnahmeuntersuchungen

Im Vergleich zur konfokalen Laserscanning-Mikroskopie bietet die Zytometrie (FACS) die Möglichkeit, die Fluoreszenz einer großen Anzahl von Zellen zu quantifizieren. Damit ist es möglich, die Aufnahmeeffizienz verschiedener Fluoreszenz-markierter Proben zu vergleichen. Allerdings unterliegt diese Methode bestimmten Einschränkungen. Zwei gerade für FACS-basierte Aufnahmeuntersuchungen relevante Punkte sind die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen sowie die fehlende Möglichkeit, zwischen zellinterner und membranständiger Fluoreszenz zu unterscheiden. Diese Einschränkungen können jedoch durch Anpassung der experimentellen Vorgehensweise umgangen werden.

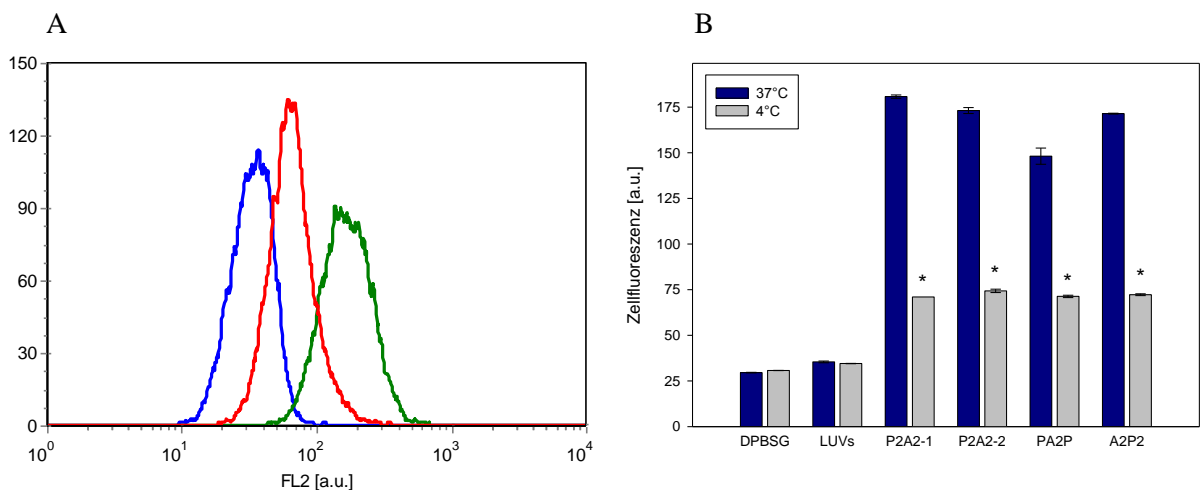
Durch Voruntersuchungen mit Propidiumjodid als Fluoreszenzmarker zur Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen sowie dem Einsatz verschiedener Zell-schädigender Prozeduren (Schaben, Einfrieren und Behandlung mit 50 µg/ml Digitonin) war es möglich, die unterschiedlichen Streuungseigenschaften vitaler und toter Zellen im FACS zu bestimmen und auf dieser Basis zwischen diesen zu differenzieren.

Der zentrale und häufig angeführte Kritikpunkt beim Einsatz der Zytometrie zur Quantifizierung von zellulären Internalisierungsprozessen ist die nicht vorhandene Möglichkeit, zwischen zellinterner und membranständiger Fluoreszenz zu unterscheiden (Wadia et al. 2004; Holm et al. 2006). Gerade dies führte in der Vergangenheit zu Fehlinterpretationen bezüglich der Aufnahmeeffizienz und der zu Grunde liegenden Aufnahmemechanismen verschiedener Partikel. Daher wurden für die Aufnahmeuntersuchungen in dieser Arbeit FACS und CLSM kombiniert. Von Bedeutung für die Auswertung der quantitativen Untersuchungen sind die für alle Experimente durchgeführten Kontrollen bei 4 °C. Bei dieser Temperatur erfolgt eine Unterdrückung aktiver Aufnahmeprozesse. Dies kann durch Auswertung der CLSM-Bilder bestätigt werden. Daher kann angenommen werden, dass das bei 4 °C im FACS beobachtete Fluoreszenzsignal nahezu vollständig von auf der Zelloberfläche befindlichen Peptiden und/ oder Liposomen stammt. Bei 37 °C dagegen tragen sowohl membranständige Fluoreszenz als auch die Fluoreszenz internalisierter Partikel zum Signal bei. Es kann daher angenommen werden, dass die im FACS beobachtete Signaldifferenz zwischen den Aufnahmeuntersuchungen bei 4 ° und 37 °C dem zellinternen Fluoreszenzsignal entspricht. Der einfache proteolytische Verdau extrazellulärer Strukturen durch Trypsin oder Pronase E ist nicht

ausreichend, um an der Zelloberfläche adsorbierte Partikel vollständig zu entfernen (Richard et al. 2003). Dieser konnte aber erfolgreich zur Verringerung der unspezifischen membranständigen Fluoreszenz eingesetzt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Zytometrie bei sorgfältiger Versuchsplanung und unter Beachtung der gegebenen Einschränkungen hervorragend für die quantitative Auswertung der zellulären Aufnahme Fluoreszenz-markierter Proben geeignet ist.

Abbildung 16 FACS-Auswertung von b.End3 Zellen nach 30 min Inkubation mit 1µM Peptid gebunden an 1 mM 0,1% Rhodamin-POPC in DPBSG, 10.000 Zellen je Probe analysiert
(A) Histogramm-Plot; P2A2-1 gelabelte LUVs bei 37 °C (grün) und 4 °C (rot), ungelabelte LUVs (blau)
(B) Mittlere Zellfluoreszenz aus jeweils 3 Versuchen mit Standardabweichung



Für die quantitative Charakterisierung der Eignung der Lipopeptid-vermittelten Internalisierung von Liposomen wurde die Aufnahme Rhodamin-markierter Liposomen an Hirnkapillarendothelzellen der Maus (b.End3) mittels FACS untersucht. Die Aufnahmeuntersuchungen wurden mit 1 mM 0,1% Rhodamin-markierten POPC-LUVs, an die 1 µM Peptid gebunden war, durchgeführt. Dies entspricht einem Lipid/ Peptid-Verhältnis von 1.000 (siehe Abbildung 16).

Die Ergebnisse der zytometrischen Untersuchung bestätigten die Resultate der konfokalen Mikroskopie. Alle adsorptiv gebundenen dipalmitoylierten Peptide vermitteln die Aufnahme von Liposomen in Maushirnkapillarendothelzellen. Es ist weiterhin eine deutliche Adsorption der Peptid-Liposomen-Komplexe an die Plasmamembran zu beobachten (siehe 4 °C Kontrollen). Nicht Peptid-markierte Liposomen als Kontrolle werden nicht internalisiert. Es ist auch keine Membranassoziation unmarkierter Liposomen zu erkennen (siehe Abbildung 16 B, Vgl. mit DPBSG).

Die durch PA2P vermittelte Aufnahme ist im Vergleich zu den anderen Peptiden geringer. Dies ist durch die weniger stabile Assoziation dieses Peptides an die Liposomen erklärbar.

1.3. Zusammenfassung

Das Ziel der vorangegangenen Untersuchungen war, den Einfluss der Palmitoylierungsposition auf die Stabilität der adsorptiven Kopplung an Liposomen und deren Einfluss auf die Sekundärstruktur der Peptide bei Interaktion mit der Lipid-Doppelschicht näher zu charakterisieren. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sollten im Anschluss mit der Effizienz dieser Peptide bei der Aufnahmevermittlung von Liposomen korreliert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 Übersicht der Wechselwirkungen dipalmitoylierter ApoE-Peptide mit POPC-Liposomen und Hirnendothelzellen (b.End3)

| Peptid | Helizität der Peptide [%] | Stabilität der Verankerung | Halbmaximale Freisetzung [C_{LP}] | Toxizität bei 1 μ M A2 [%] | zelluläre Aufnahme |
|---------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| P2A2-1 | 37 | ++ | 234 | 20 | +++ |
| P2A2-2 | 28 | ++ | 468 | 30 | +++ |
| PA2P | 33 | + | 503 | 15 | ++ |
| A2P2 | 21 | + | 340 | 20 | +++ |

Alle dipalmitoylierten ApoE-Peptide erfüllen die an sie gestellten Anforderungen. Sie binden an POPC-Liposomen und sind in der Lage, eine Aufnahme dieser in Hirnendothelzellen zu vermitteln.

Das N-terminal an Lys1 in Position α und ϵ palmitoylierte P2A2-1 zeigt von den untersuchten Lipopeptiden die besten Eigenschaften für die adsorptive Kopplung an Liposomen. Es zeichnet sich durch eine stabile Bindung an POPC-Liposomen aus, die sich in einer geringen Umverteilung und einer hohen durch Liposomenbindung induzierten Helizität zeigt. Gleichzeitig besitzt P2A2-1 eine moderate membranstörende Aktivität. Das strukturell sehr ähnliche P2A2-2 bindet zwar auch sehr stabil an Liposomen, zeigt aber eine deutlich ausgeprägtere membranstörende Aktivität und eine geringere Helizität. Dies könnte durch eine unvorteilhafte sterische Orientierung des Peptidanteils relativ zu den Palmitoylresten im Vergleich zu P2A2-1 erklärt werden.

Die Helizität zeigt keinen Einfluss auf die Vermittlung der zellulären Aufnahme von Liposomen, siehe P2A2-2 und PA2P. Dagegen ist ein deutlicher Einfluss der Stabilität der Peptid-Liposomen-Komplexe auf die Aufnahmevermittlung zu erkennen.

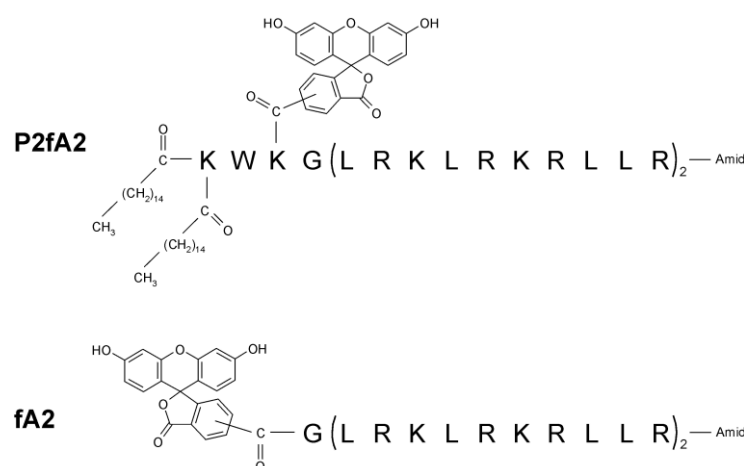
2. Fluoreszenzeigenschaften Carboxyfluorescein-markierter Apolipoprotein E-Peptide

Mit dem Ziel, die Aufnahme von mizellaren ApoE-Peptiden mittels CLSM und FACS zu untersuchen, wurden zwei Carboxyfluorescein-markierte Peptide synthetisiert (siehe Abbildung 17).

Das dipalmitoylierte P2fA2 (MW: 4019,3 g/mol) orientiert sich an der Grundstruktur von P2A2-1. Über ein zusätzlich an Position 3 eingeführtes Lysin wurde 5(6)-Carboxyfluorescein über eine Amid-Bindung an die ϵ -Aminogruppe gekoppelt. Als monomeres Kontrollpeptid wurde das über ein Glycin N-terminal mit 5(6)-Carboxyfluorescein modifizierte fA2 (MW: 3098,2 g/mol) synthetisiert.

Um festzustellen, inwieweit der zusätzlich eingefügte Fluorophor das Assoziationsverhalten von P2fA2 unter physiologischen Bedingungen beeinflusst, wurde der Hydrodynamische Durchmesser mittels Dynamischer Lichtstreuung in DPBS bestimmt. Da aufgrund der apparativen Ausstattung keine Lichtstreuung an Carboxyfluorescein-markierten Proben gemessen werden kann, wurde P2fA2 bei unserem Kooperationspartner an der Mount Sinai School for Medicine untersucht (Vucic et al. 2009). P2fA2 assoziiert zu definierten Strukturen mit einem Dispersionsindex von 0,141 und einer Größe von 9,75 nm. Damit sind die von P2fA2 gebildeten Strukturen geringfügig größer als die durch P2A2-1 geformten Mizellen mit einer Größe von ca. 7,2 nm. Es ist aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit beider Peptide davon auszugehen, dass auch P2fA2 unter physiologischen Bedingungen Mizellen bildet.

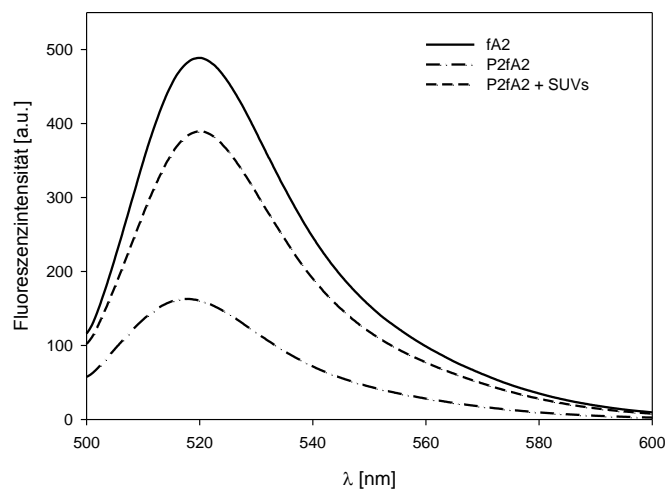
Abbildung 17 Übersicht der 5(6)-Carboxyfluorescein markierten Apo E-Peptide in Ein-Buchstaben-Aminosäuren-Code



2.1. Einfluss der Trägerstruktur

Im Verlauf der Aufnahmeuntersuchungen mit den hier vorgestellten Carboxyfluorescein-markierten Peptiden ergaben sich Hinweise, dass diese sich in ihren Fluoreszenzeigenschaften unterscheiden. Da dies einen entscheidenden Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse FACS-basierter Aufnahmeuntersuchungen hat, wurden die Fluoreszenzeigenschaften der verschiedenen Peptidpartikel näher charakterisiert. Hierfür wurden Fluoreszenzspektren von fA2 sowie von mizellarem P2fA2 und liposomal gebundenem P2fA2 aufgenommen (siehe Abbildung 18). Um die Bestimmung der Fluoreszenz möglichst wenig durch Lichtstreuungsprozesse zu stören, wurden POPC-SUVs verwendet. Die Lipidkonzentration wurde entsprechend den folgenden Aufnahmeuntersuchungen auf ein Lipid/ Peptid-Verhältnis (C_{LP}) von 1.000 eingestellt.

Abbildung 18 Fluoreszenzspektren Carboxyfluorescein-markierter ApoE-Peptide; 0,5 μM fA2, 0,5 μM P2fA2 und 0,5 μM P2fA2 gebunden an POPC-SUVs mit C_{LP} von 1.000 gebunden in DPBS pH 7,4; $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$

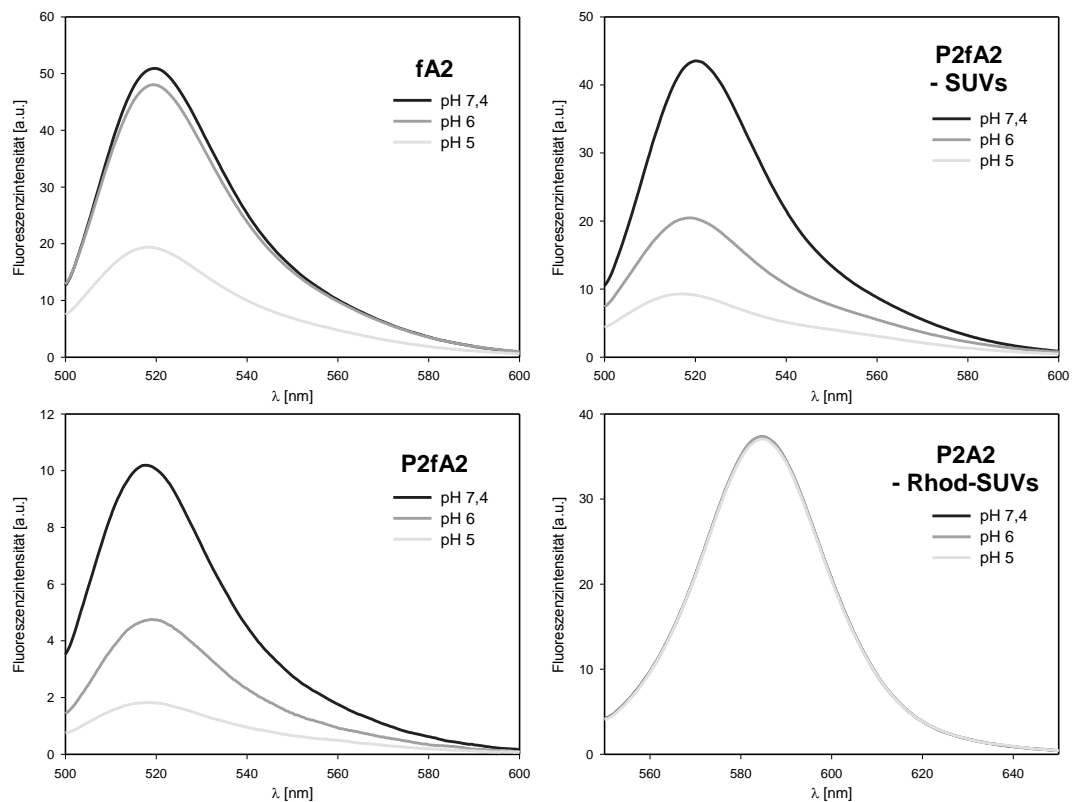


P2fA2 zeigt im Vergleich zu fA2 bei identischer Konzentration von Peptid und Fluorophor eine deutlich verringerte Fluoreszenzintensität von ca. 30% (bestimmt bei 520 nm). Dies ist vermutlich auf einen Selbstquenchungseffekt des Carboxyfluoresceins in der mizellaren Struktur von P2fA2 zurückzuführen. Durch Bindung des P2fA2 an POPC-Liposomen mit einem C_{LP} von 1.000, die mit der Dissoziation der Peptid-Mizellen verbunden ist, steigt die Fluoreszenzintensität auf ca. 80% der Fluoreszenzintensität von fA2 an.

2.2. Einfluss des pH-Wertes

Da die ApoE-Peptid vermittelte Internalisierung von Liposomen über einen endozytotischen Mechanismus erfolgt, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass diese über den lysosomalen Weg verwertet werden. Die Degradation der internalisierten Partikel wird dabei durch eine Absenkung des intravesikulären pH-Wertes initialisiert. Da der pKa-Wert von Carboxyfluorescein bei 6,5 liegt und eine pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften von Carboxyfluorescein bekannt ist (Weinstein et al. 1986), wurden die Fluoreszenzeigenschaften der Carboxyfluorescein-markierten Peptide in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht, um festzustellen, wie stark sich die Kopplung an die Peptide und die Assoziation an Liposomen auf die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften auswirkt. Dazu wurden die Fluoreszenzspektren der A2-Peptide und Peptid-Liposomen-Komplexe bei jeweils konstanter Peptid- bzw. Fluorophor-Konzentration untersucht (siehe Abbildung 19).

Abbildung 19 Fluoreszenzspektren Carboxyfluorescein-markierter ApoE-Peptide und Rhodamin-markierter Liposomen; 0,5 μM Peptid \pm POPC- / 0,1% Rhodamin-POPC-SUVs bei $C_{L/P}$ von 1.000 in 10 mM Phosphat-Puffer nach Sørensen, pH 5, 6 oder 7,4; Carboxyfluorescein: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, Rhodamin: $\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$



Die Fluoreszenzeigenschaften der Carboxyfluorescein-markierten A2-Peptide zeigen eine deutliche pH-Abhängigkeit, die zusätzlich durch die Peptid-Kopplung und Assoziation mit Liposomen beeinflusst wird. Im Vergleich zu pH 7,4 bleibt die Fluoreszenzintensität des monomeren fA2 auch bei pH 6 noch weitgehend stabil. Bei pH 5 sinkt sie jedoch auf ca. 40% der Intensität, die bei pH 7,4 gemessen wurde. Im Vergleich dazu ist die Fluoreszenzintensität von P2fA2 sogar noch stärker pH-abhängig. Sowohl P2fA2-Mizellen als auch liposomal gebundenes P2fA2 zeigen bereits bei pH 6 eine relativ zu pH 7,4 auf 50% verringerte Fluoreszenzintensität, die bei einer weiteren Absenkung des pH-Wertes auf ca. 20% sinkt.

Dagegen bleiben die Fluoreszenzeigenschaften der Rhodamin-markierten POPC-Liposomen bei pH-Werten von 7,4 bis 5 stabil. Es ist keine Änderung in diesem pH-Bereich zu beobachten.

2.3. Zusammenfassung und Bedeutung für die weiteren Untersuchungen

Die Fluoreszenzeigenschaften des Carboxyfluoresceins sind stark vom Assoziationszustand der ApoE-Peptid-basierten Träger abhängig. Dabei zeigen die P2fA2-Mizellen eine deutlich reduzierte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu monomerem fA2. Die Fluoreszenzintensität von liposomal gebundenem P2fA2 erreicht nur ca. 80% der Intensität von fA2. Die großen Unterschiede in den Fluoreszenzeigenschaften erschweren die Möglichkeit eines quantitativen Vergleichs der Aufnahmeeffizienz zwischen den unterschiedlichen ApoE-basierten Trägerstrukturen. Darüber hinaus verhindert die starke Abhängigkeit der Carboxyfluorescein-Fluoreszenz von den Umgebungsbedingungen, wie dem pH-Wert, eine verlässliche Normierung der Fluoreszenzsignale und damit den Vergleich der Aufnahmeeffizienz unterschiedlicher Träger.

Zusammenfassend muss an dieser Stelle festgestellt werden, dass der Einsatz von Carboxyfluorescein für die Charakterisierung und den Vergleich der Internalisierung unterschiedlicher Peptid-basierter Trägerstrukturen nur bedingt geeignet ist. Die Fluoreszenzeigenschaften aller Fluophore sind zu einem gewissen Grad durch die umgebenden Bedingungen bestimmt. Die Verwendung eines weniger stark beeinflussbaren Fluorophors wäre von Vorteil. In diesem Zusammenhang wäre der Einsatz von Rhodamin, das in seinen Fluoreszenzeigenschaften zumindest keine pH-Abhängigkeit zeigt, für die Fluoreszenzmarkierung von ApoE-Peptiden zu bedenken. Möglich wäre auch die Verwendung von alternativen Markern wie bspw. Radionukliden. Der Einsatz gut etablierter Methoden wie CLSM und FACS bei der Untersuchung der zellulären Aufnahme ist damit nicht möglich. In diesem Bereich besteht zukünftiger Forschungsbedarf.

Für die folgenden Aufnahmeuntersuchungen muss eine quantitative Charakterisierung der Internalisierung auf Vergleiche unterschiedlicher Aufnahmebedingungen jeweils einer ApoE-Peptid-basierten Trägerstruktur beschränkt werden. Zudem muss die Lokalisation der Carboxyfluorescein-

markierten Peptide und der mögliche Einfluss der Umgebungsbedingungen bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden.

3. Internalisierungsuntersuchungen an Endothelzellen der Blutgefäße

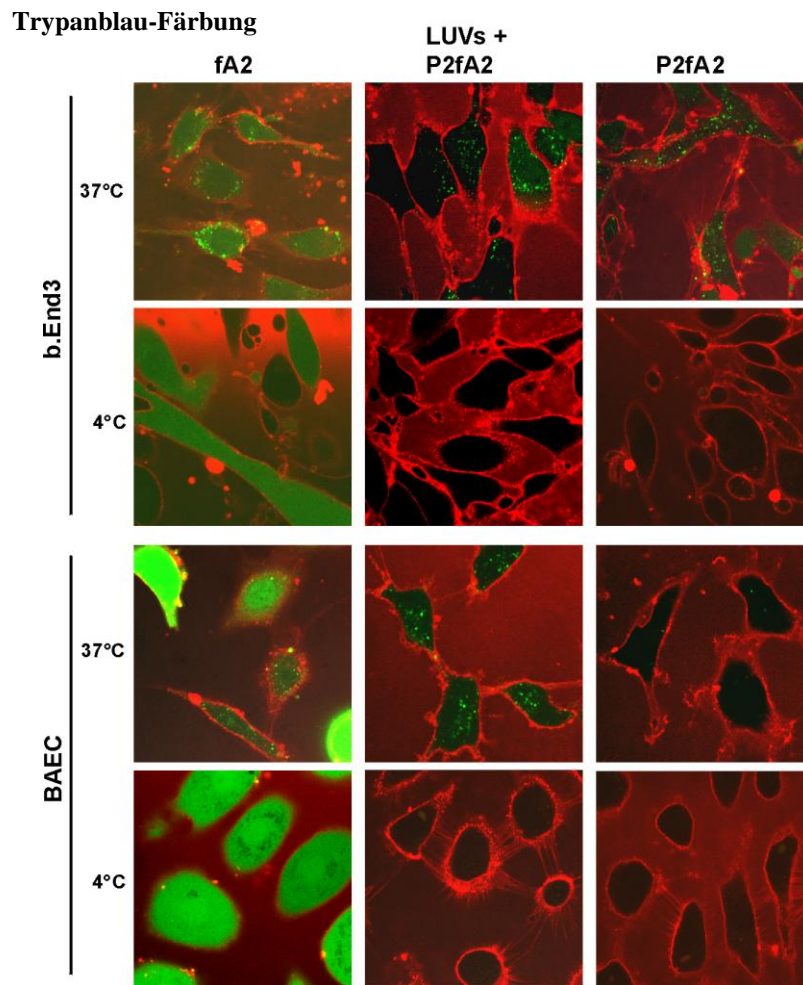
Im folgenden Abschnitt wird die Internalisierung verschiedener ApoE-Peptid-basierter Trägersysteme an Endothelzellen der Blutgefäße hinsichtlich ihrer Aufnahmeeffizienz und möglicher mechanistischer Differenzen untersucht. Diese Zellen treten als erste in Kontakt mit intravenös applizierten Wirkstoffpräparationen und sind daher für eine Untersuchung von besonderem Interesse. Die Aufnahme in die Endothelzellen stellt den ersten Schritt für eine Verteilung in den betreffenden Geweben dar, wobei eine erfolgte Aufnahme in die Endothelzellen nicht notwendigerweise auch eine nachfolgende Gewebsverteilung bedeutet. Da die Entwicklung der verschiedenen ApoE-Peptid-basierten Träger im Hinblick auf eine mögliche Anwendung zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durchgeführt wurde, werden die Untersuchungen an Hirnkapillarendothelzellen (b.End3 (Omidi et al. 2003)) als Beispiel für Endothelzellen von Kapillargefäßen und an Aortenendothelzellen (BAEC (Halle et al. 1980)) als Beispiel für Endothelzellen großer Gefäße untersucht.

3.1. Apolipoprotein E-Peptid-basierte Trägersysteme

Die Internalisierung von monomerem fA2, P2fA2-Mizellen und P2fA2-markierten Liposomen an Hirnkapillarendothelzellen (b.End3) und Aortenendothelzellen (BAEC) wurde mittels CLSM und FACS untersucht.

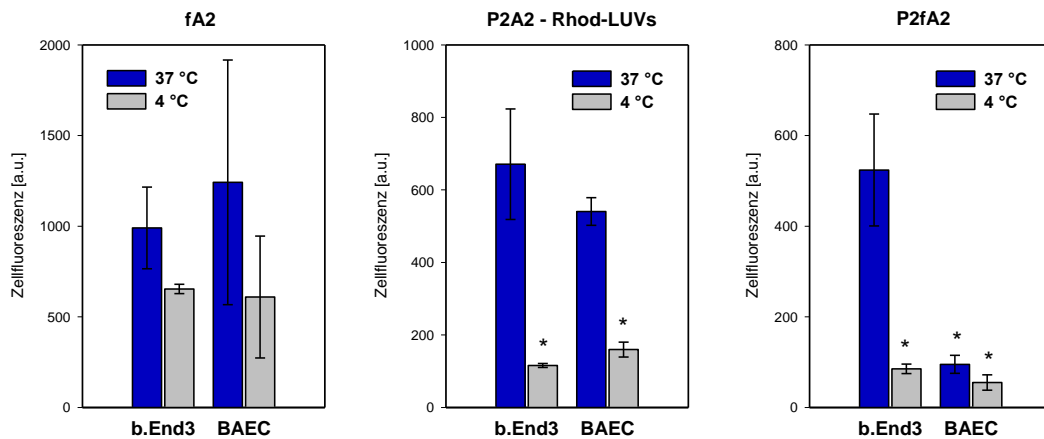
Zuvor wurde die Zytotoxizität der verschiedenen Carboxyfluorescein-markierten Peptide gegenüber beiden Zelllinien bestimmt. fA2, P2fA2 und liposomal gebundenes P2fA2 zeigen gegen b.End3-Zellen vergleichbare toxische Wirkungen, wie sie bereits für P2A2-1 beobachtet wurden. Deutliche Unterschiede werden dagegen in der Wirkung auf BAEC-Zellen gefunden. fA2 und P2fA2-Mizellen zeigen bis zu einer Peptidkonzentration von 3 µM und einer Inkubationszeit von 30 min nahezu keine toxische Aktivität. Bei höheren Peptidkonzentrationen steigt diese stark an. Die Vitalität der BAEC Zellen bei 10 µM Peptid liegt bei 20%. Liposomal gebundenes P2fA2 zeigt bereits bei geringeren Peptidkonzentrationen eine erhöhte toxische Wirkung auf BAEC-Zellen. Die Vitalität beträgt bei 1 µM Peptid nur 50%.

Abbildung 20 CLSM-Aufnahmen von b.End3 und BAEC Zellen inkubiert mit 2 μM fA2, 1 μM P2fA2 bzw. 1 μM P2fA2 gebunden an POPC-LUVs bei C_{LP} von 1.000 für 1 h in DPBSG;



Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zwischen den Aufnahmeuntersuchungen zu ermöglichen, werden für die Aufnahmeuntersuchungen Peptidkonzentrationen von jeweils 2 μM im Fall von fA2 bzw. 1 μM bei mizellarem P2fA2 und P2fA2 gebunden an 1 mM POPC-LUVs eingesetzt. Dies entspricht einem C_{LP} von 1.000. Die Vitalität der betrachteten Zellen wird bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie durch Ausschluss von Trypanblau und bei der Zytometrie durch Auswahl der Zellen anhand der Streueigenschaften, die zuvor als charakteristisch für vitale Zellen bestimmt wurden, sichergestellt.

Abbildung 21 FACS-Auswertung von b.End3 und BAEC Zellen inkubiert mit 2 μM fA2, 1 μM P2fA2 bzw. 1 μM P2A2 gebunden an 0,1% Rhodamin-POPC-SUVs bei C_{LP} von 1.000 für 1 h in DPBSG (jeweils 10.000 Zellen/ Probe analysiert, angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Versuchen mit jeweils 3 Wiederholungen)



Monomeres fA2

Monomeres fA2 wird effizient in b.End3 und BAEC Zellen aufgenommen (siehe Abbildung 20). Bei 37 °C ist sowohl ein vesikuläres Aufnahmemuster als auch eine homogene intrazelluläre Carboxyfluorescein-Fluoreszenz zu erkennen. Die Intensitäten der beiden Fluoreszenzmuster sind sehr variabel. Bei 4 °C ist keine vesikuläre Fluoreszenz zu beobachten. Gleichzeitig bleibt die gleichmäßige zelluläre Fluoreszenz auch bei niedrigen Temperaturen erhalten. Dies zeigt sich auch in den Ergebnissen der FACS-Untersuchung (siehe Abbildung 21). Die für beide Zelllinien nach Inkubation mit fA2 sehr hohen Fluoreszenzintensitäten mit einer hohen Variabilität bleiben auch bei 4 °C bestehen.

Da ein Austritt von fA2 aus den intrazellulären Vesikeln als Quelle für die zelluläre Fluoreszenz ausgeschlossen und gleichzeitig die Integrität der Plasmamembran durch den Ausschluss von Trypanblau bestätigt werden kann, deutet dies auf die Aktivität eines nicht energieabhängigen und sehr effizienten Aufnahmemechanismus für fA2 hin.

Die gleichmäßige zelluläre Fluoreszenz ist kein Artefakt, wie es bei frühen Aufnahmeuntersuchungen mit CPPs durch die Fixierung der Zellen beobachtet wurde (Richard et al. 2003). Ähnliche Beobachtungen wurden in jüngster Zeit auch mit Tat-Peptid an Myoblasten (Tunnemann et al. 2006) sowie mit Penetratin, nona-Arginin (R9) und Tat-Peptid an HeLa-Zellen (Duchardt et al. 2007) gemacht. Der Mechanismus dieser schnellen Aufnahme, die als Transduktion bezeichnet wird, ist bisher unklar. Diskutiert wird eine mögliche Bildung von membran-gängigen Ionenpaar-Komplexen

mit negativ geladenen Membranbestandteilen und eine anschließende Internalisierung, getrieben durch das Membranpotential der Zellen (Rothbard et al. 2005; Henriques et al. 2007).

P2fA2-markierte Liposomen

P2fA2 vermittelt die Aufnahme von Liposomen sowohl in b.End3 als auch BAEC Zellen (siehe Abbildung 20 & 21). Die bei 37 °C zu beobachtende vesikuläre Fluoreszenz tritt bei 4 °C nicht auf. Eine diffuse, intrazelluläre Fluoreszenz wird nicht beobachtet. Die Ergebnisse der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie werden durch die FACS-Untersuchungen bestätigt. Das Fluoreszenzmuster und die Temperaturabhängigkeit sprechen für einen aktiven endozytotischen Aufnahmemechanismus.

Für das Tat-Peptid und Penetratin wurde nach der Kopplung an größere Proteine bzw. Liposomen Endozytose als vorherrschender Aufnahmemechanismus beobachtet (Console et al. 2003; Tunnemann et al. 2006).

P2fA2-Mizellen

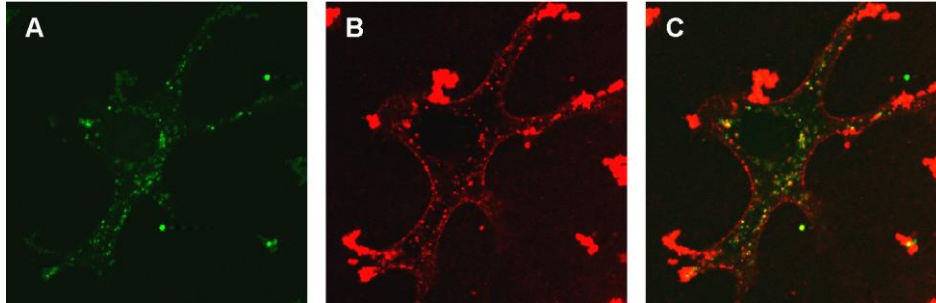
b.End3 Zellen, die mit mizellarem P2fA2 bei 37 °C inkubiert wurden, zeigen eine intensive vesikuläre Fluoreszenz, die bei niedrigen Temperaturen nicht zu beobachten ist (siehe Abbildung 20). Dies deutet auf einen aktiven Endozytoseprozess hin. Die Aufnahme der P2fA2-Mizellen in BAEC Zellen ist dagegen drastisch reduziert. Dies zeigt sich auch in den Ergebnissen der zytometrischen Untersuchung (siehe Abbildung 21).

Der in Anbetracht der durchaus vergleichbaren Aufnahme von P2fA2-markierten Liposomen bemerkenswerte Unterschied in der Internalisierungseffizienz von P2fA2-Mizellen veranlasste uns dazu, mögliche Unterschiede in den jeweils aktivierten Aufnahmemechanismen näher zu untersuchen.

3.2. P2fA2- und Rhodamin-markierte Liposomen

Die Integrität der ApoE-Peptid-Liposomen Komplexe bei der zellulären Aufnahme ist für die weiteren Untersuchungen von Bedeutung. Deshalb wurden Aufnahmeuntersuchungen mit P2fA2- und Rhodamin-Lipid-markierten Liposomen durchgeführt. Die Lokalisation von zellulärer Peptid- und Lipid-Fluoreszenz liefert Informationen über den intrazellulären Zustand der Peptid-Liposomen-Komplexe und gibt Hinweise auf deren Zustand zum Zeitpunkt der Internalisierung.

Abbildung 22 CLSM Aufnahme von b.End3 Zellen inkubiert für 2h bei 37°C mit 1 µM P2fA2 gebunden an 1 mM 0,1% Rhod-PE POPC LUVs in DPBSG (A) Peptidsignal (Carboxyfluorescein) (B) Lipidsignal (Rhodamin) / Trypanblau (C) Überlagerung von A & B



Die CLSM-Aufnahme von Fluoreszenz-doppelmarkierten Peptid-Liposomen-Komplexen zeigt eine Kolokalisation von Carboxyfluorescein- und Rhodaminfluoreszenz. Das ist ein deutlicher Hinweis für die Aufnahme intakter Komplexe. Die analoge Nutzung von Carboxyfluorescein-Fluoreszenz des P2fA2 und der Rhodamin-Fluoreszenz der Liposomen zur Auswertung der Aufnahme von A2-Peptid-markierten Liposomen ist damit möglich.

3.3. Charakterisierung des Internalisierungsmechanismus

Die Ergebnisse der bisherigen Aufnahmeuntersuchungen mit ApoE-abgeleiteten Peptiden zeigen, dass die Internalisierung von Peptidmizellen und Peptid-markierten Liposomen über Endozytose erfolgt. Dennoch sind klare Unterschiede in der vermittelten Aufnahmeeffizienz zu erkennen, die auf die Aktivierung unterschiedlicher endozytotischer Mechanismen hindeuten. Daher sollen im folgenden Abschnitt die zugrunde liegenden Aufnahmemechanismen charakterisiert werden.

3.3.1. Beteiligung von HSPG

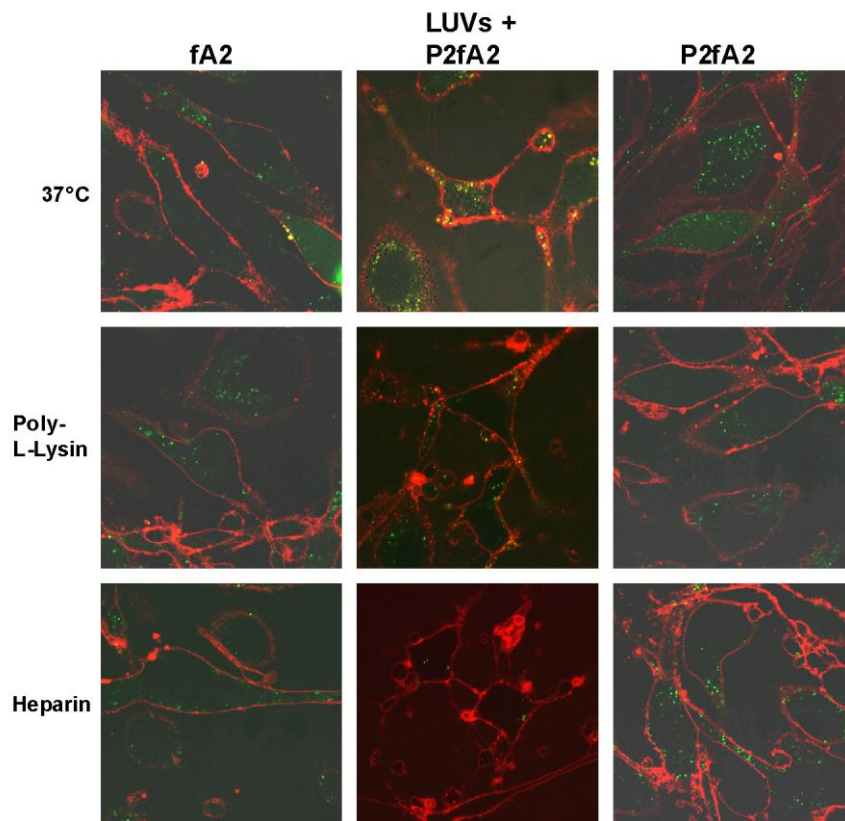
An der Internalisierung von ApoE-Peptid-markierten PEG-Liposomen in humane Fibroblasten sind die zellulären Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) beteiligt (Sauer et al. 2005). Um die Rolle des zellulären HSPG-Gerüsts auf die Internalisierung der verschiedenen ApoE-Peptid-basierten Trägerstrukturen zu prüfen, wurden Hirnendothelzellen (b.End3) mit Heparinase I und verschiedenen Kompetitoren der Peptid-HSPG-Interaktion behandelt (siehe Abbildung 23).

CLSM-Studien zeigen, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit 10 U/ml Heparinase I für 2 h eine deutliche Reduzierung der Internalisierung von mit P2A2-markierten 0,1% Rhodamin POPC-LUVs

bei einem C_{LP} von 1.000 bewirkt, während nahezu kein Einfluss auf die Aufnahme von P2fA2-Mizellen zu beobachten ist.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden Versuche mit Substanzen, die Wechselwirkungen der ApoE-Peptide mit den HSPGs kompetitiv unterdrücken, durchgeführt (siehe Abbildung 23). Die Koinkubation mit Heparin als Analogon der zellulären HSPGs bzw. mit Poly-L-Lysin als polykationisches Gegenion zeigten entsprechende Ergebnisse. Die Aufnahme von P2A2-markierten POPC-LUVs bei einem C_{LP} von 1.000 wurde stark verringert, während die Aufnahme von monomerem fA2 und von P2fA2-Mizellen kaum beeinträchtigt wurde (Leupold et al. 2008).

Abbildung 23 CLSM Aufnahme von b.End3 Zellen inkubiert für 30 min bei 37°C mit 1 μ M fA2 bzw. 1 μ M P2fA2 und 1 μ M P2fA2 gebunden an 1 mM 0,1% Rhod-PE POPC LUVs in DPBSG; Koinkubation mit 20 μ g/ml Heparin oder 0,05 μ M Poly-L-Lysin



Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die bereits an humanen Fibroblasten (BaG13) beobachtete Beteiligung des zellulären HSPG-Gerüsts an der Internalisierung von ApoE-Peptid-markierten Liposomen. Gleichzeitig ist die Aufnahme von monomerem ApoE-Peptid und Peptid-Mizellen in einem deutlich geringeren Maße von HSPG abhängig. Dies kann als weiterer Hinweis auf einen unterschiedlichen Internalisierungsmechanismus der Peptid-Mizellen und Peptid-markierten Liposomen angesehen werden. Allerdings könnte auch die aus der hohen Peptiddichte in den Mizellen

resultierende starke Konzentration kationischer Ladungen den abschirmenden Effekt der Kompetitoren einschränken. Dies kann jedoch nicht den geringen Effekt der Kompetitoren auf die Internalisierung von monomerem fA2 erklären.

HSPGs fungieren als Korezeptoren und modulieren eine Reihe von Ligand-Rezeptor-Interaktionen (Esko 1991). Dazu gehören u.a. die Aufnahme von Lipid-assoziiertem Apolipoprotein E und von Apolipoprotein E-markierten Liposomen (Mahley und Ji 1999; Datta et al. 2000). Aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, der hohen strukturellen Redundanz und der negativen Ladung der Heparansulfate wird im Allgemeinen von eher unspezifischen Interaktionen ausgegangen. Aufgrund ihrer anionischen Natur können HSPGs eine Reihe kationischer Moleküle auf der Plasmamembran akkumulieren, die in der Folge internalisiert werden (Belting et al. 2006). Die Internalisierung von ApoE-Peptid-markierten Liposomen über vornehmlich unspezifische HSPG-vermittelte Wechselwirkungen korreliert mit dem bereits ermittelten fehlenden Einfluss der Peptidhelizität bei der Aufnahmevermittlung von Liposomen.

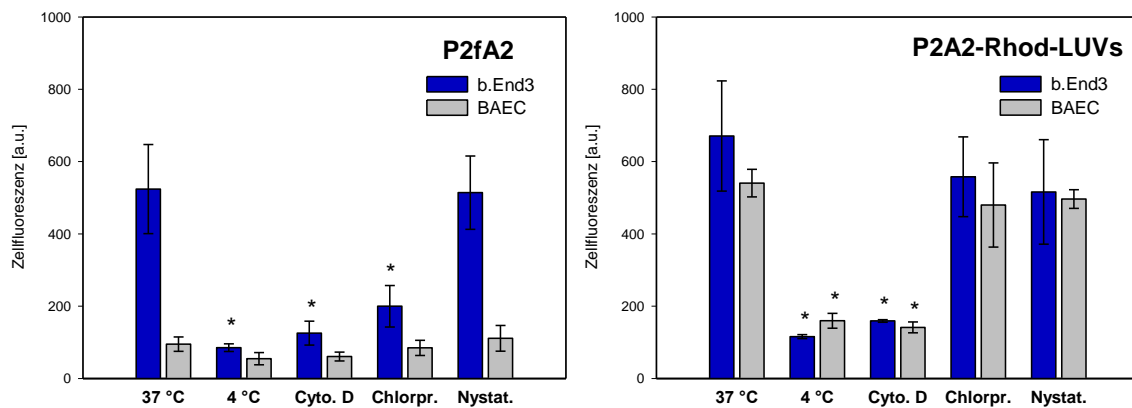
3.3.2. Wirkung von Endozytose-Inhibitoren

Die Ergebnisse der bisherigen Aufnahmeuntersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die Internalisierung von Peptidmizellen und Peptid-markierten Liposomen über unterschiedliche endozytotische Mechanismen erfolgt. Aus diesem Grund wird die Wirkung verschiedener Endozytose-Inhibitoren auf die Internalisierung der einzelnen Trägerstrukturen untersucht.

fA2 wird neben einem endozytotischen Aufnahmeprozess auch über einen passiven Prozess internalisiert, der sich in einer diffusen zellulären Verteilung der Fluoreszenz mit sehr variabler Intensität zeigt. Diese überlagert das Fluoreszenzsignal der endozytotischen Aufnahme. Die daraus resultierenden geringen Signalunterschiede bei der Anwendung von Endozytose-Inhibitoren und die hohen Standardabweichungen verhindern eine Auswertung der zytometrischen Messungen für monomeres fA2.

Die quantitativen Aufnahmeuntersuchungen mittels FACS wurden mit mizellarem P2fA2 bzw. P2A2 gebunden an 1 mM 0,1% Rhodamin POPC-LUVs mit einem Lipid/ Peptid-Verhältnis (C_{LP}) von 1.000 durchgeführt (siehe Abbildung 24). Die Vitalität der betrachteten Zellen wurde durch Auswahl der Zellen anhand der Streueigenschaften, die zuvor als charakteristisch für vitale Zellen bestimmt wurden, gewährleistet.

Abbildung 24 FACS-Auswertung von b.End3 und BAEC Zellen inkubiert mit 1 μ M P2fA2 bzw. 1 μ M P2A2 gebunden an 0,1% Rhodamin-POPC-SUVs bei C_{LP} von 1.000 für 1 h in DPBSG mit 2 μ g/ml Cytochalasin D, 10 μ g/ml Chlorpromazin bzw. 25 μ g/ml Nystatin (jeweils 10.000 Zellen/ Probe analysiert, angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Versuchen mit jeweils 3 Wiederholungen)



P2A2-markierte Liposomen

P2A2-1 vermittelt die Aufnahme von Liposomen bei 37 °C sowohl in b.End3 als auch BAEC Zellen. Die Aufnahme wird durch Cytochalasin D deutlich verringert. Das Fluoreszenzsignal entspricht dem bei 4 °C beobachteten Signal. Damit konnte bestätigt werden, dass die Internalisierung von Peptid-markierten Liposomen über Endozytose erfolgt. Dagegen haben weder Chlorpromazin noch Nystatin einen Einfluss auf die Internalisierung. Daraus folgt, dass der endozytotische Aufnahmeprozess weder über Clathrin noch über Caveolin vermittelt wird. Diese Ergebnisse werden durch die konfokale Fluoreszenzmikroskopie bestätigt.

P2fA2-Mizellen

b.End3 Zellen, die mit mizellarem P2fA2 bei 37 °C inkubiert wurden, zeigen eine intensive Fluoreszenz, die durch Cytochalasin D und bei niedrigen Temperaturen unterdrückt wird. Dies bestätigt die Aktivität eines Endozytoseprozesses. Während die Aufnahme durch Chlorpromazin ebenfalls deutlich verringert wird, zeigt Nystatin keinen Effekt. Daraus folgt, dass die Internalisierung von P2fA2-Mizellen im Gegensatz zu P2A2-markierten Liposomen über einen Clathrin-vermittelten Prozess stattfindet (Leupold et al. 2009). Die Aufnahme in BAEC Zellen ist dagegen sehr gering. Die eingesetzten Endozytose-Inhibitoren zeigten keine signifikante Wirkung. Diese Ergebnisse werden durch die konfokale Fluoreszenzmikroskopie bestätigt.

Eine Clathrin-vermittelte Aufnahme wurde für ein mit einem Stearyl-Rest modifiziertes octa-Arginin-Peptid in Maus Fibroblasten (NIH/3T3) berichtet (Khalil et al. 2004). Der Assoziationszustand des Peptids unter physiologischen Bedingungen wurde nicht näher charakterisiert. Dennoch ist eine Mizellare Struktur sehr wahrscheinlich.

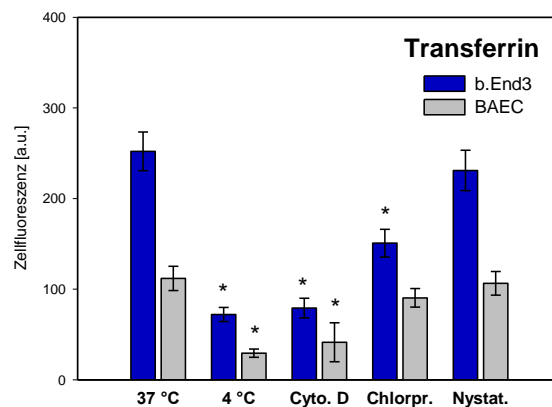
Der Unterschied in den von Peptidmizellen und Peptid-markierten Liposomen aktivierten Endozytosemechanismen könnte auf der unterschiedlichen Größe der Partikel beruhen. Während die Peptid-Mizellen eine Größe von ca. 10 nm besitzen, weisen die Liposomen einen zehnfach größeren Durchmesser von ca. 100 nm auf. Des Weiteren könnte auch die Peptiddichte auf der Partikeloberfläche eine Rolle spielen. Die Peptid-Mizellen sind durch eine Peptiddichte von $5,4 \times 10^{-4}$ Peptide/Å² charakterisiert. Im Gegensatz dazu ist die Peptiddichte auf der Liposomenoberfläche mit $3,2 \times 10^{-5}$ Peptide/Å² zehnfach geringer.

Es konnte keine Beteiligung von Caveolin an der endozytotischen Aufnahme von Peptidmizellen oder Peptid-markierten Liposomen festgestellt werden, obwohl Caveolae einen beträchtlichen Teil der Zelloberfläche von Endothelzellen ausmachen und die Expression von Caveolin in b.End3 und BAEC Zellen nachgewiesen wurde (Omidi et al. 2003; Radel et al. 2007). Außerdem wurde eine Caveolin-vermittelte Endozytose für die Aufnahme von Tat-Fusionsproteinen in HeLa-Zellen beschrieben (Ferrari et al. 2003; Fittipaldi et al. 2003).

Die verringerte Aufnahmeeffizienz von P2fA2-Mizellen in BAEC Zellen im Vergleich zu b.End3 Zellen könnte auf einer generellen Defizienz oder zumindest einer stark verminderten Aktivität von Clathrin-vermittelter Endozytose beruhen. Eine weitere Möglichkeit könnte eine Inaktivität von spezifischen Strukturen oder Mechanismen in BAEC Zellen darstellen. Um dies zu prüfen, wurde die Aufnahme von Transferrin in b.End3 und BAEC Zellen untersucht. Die Internalisierung von Transferrin gilt als klassisches Beispiel für eine Clathrin-vermittelte Endozytose (Miller et al. 1991). Transferrin wird effizient in b.End3 Zellen internalisiert. Die Aufnahme wird bei 4 °C und durch Cytochalasin D unterdrückt. Dies und die CLSM-Untersuchung bestätigen die Aufnahme von Transferrin in b.End3 Zellen über einen endozytotischen Mechanismus. Während die Aufnahme durch Chlorpromazin deutlich verringert wird, zeigt Nystatin keinen Effekt. Dies zeigt die Wirksamkeit der hier angewendeten Endozytose-Inhibitoren und bestätigt die Aktivität von Clathrin-vermittelter Endozytose in b.End3 Zellen. Die Aufnahme von Transferrin in BAEC Zellen ist dagegen deutlich reduziert. Die Internalisierung kann durch eine Inkubation bei niedrigen Temperaturen und durch Koinkubation mit Cytochalasin D weiter verringert werden. Dies bestätigt, dass ein endozytotischer Aufnahmeprozess aktiv ist. Es konnte kein signifikanter Einfluss von Chlorpromazin auf die Aufnahme beobachtet werden.

Dies deutet auf eine generelle Defizienz der hier verwendeten BAEC-Zelllinie für Clathrin-vermittelte Endozytose hin und stellt eine mögliche Erklärung für die stark verringerte Aufnahme von P2fA2-Mizellen in dieser Zelllinie dar.

Abbildung 25 FACS-Auswertung von b.End3 und BAEC Zellen inkubiert mit 250 nM Transferrin für 1 h in DPBSG mit 2 µg/ml Cytochalasin D, 10 µg/ml Chlorpromazin bzw. 25 µg/ml Nystatin (jeweils 10.000 Zellen/ Probe analysiert, angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Versuchen mit jeweils 3 Wiederholungen)

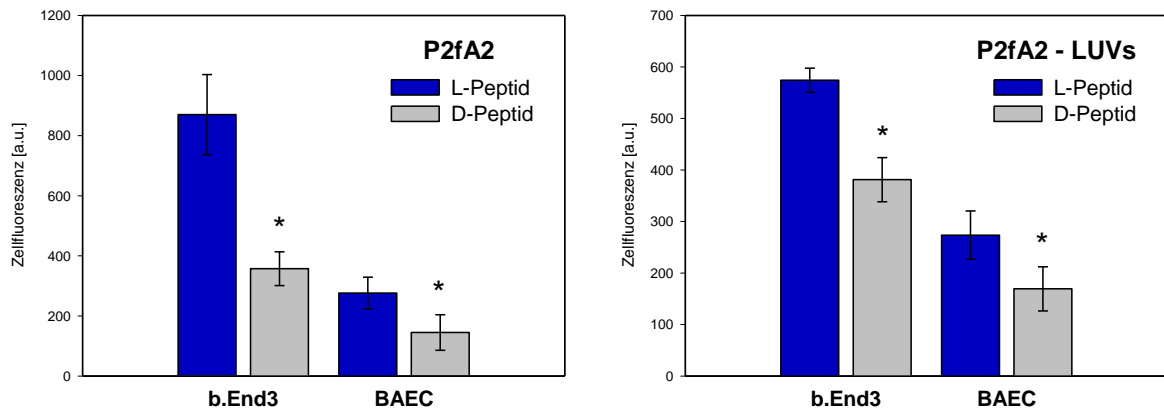


3.3.3. Beteiligung spezifischer Zellkomponenten

Aufnahme des all-D-ApoE-Peptids

Inwieweit die Unterschiede in den Aufnahmemechanismen von ApoE-Peptid-Mizellen und ApoE-Peptid-markierten Liposomen auf Interaktionen mit unterschiedlichen Komponenten der Plasmamembran beruhen, wird in diesem Abschnitt untersucht. Zunächst sollte dabei die Beteiligung von extrazellulären Membranproteinen bei der Aufnahme untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Carboxyfluorescein-markiertes Stereoisomer von P2fA2 aus den entsprechenden D-Aminosäuren synthetisiert (P2fa2). Mögliche Interaktionen des all-L-Peptids P2fA2 mit den ebenfalls aus L-Aminosäuren aufgebauten und damit stereospezifischen Membranproteinen und Rezeptoren kann das all-D-Peptid P2fa2 aufgrund seiner isomeren Struktur nicht eingehen (Alberts et al. 2002).

Abbildung 26 FACS-Auswertung von b.End3 und BAEC Zellen inkubiert mit 1 μ M P2fA2/ P2fa2 frei und gebunden an POPC-LUVs bei C_{LP} von 1.000 für 1 h in DPBSG (jeweils 10.000 Zellen/ Probe analysiert, angegeben sind Mittelwerte verringert um 4 °C Kontrolle und Standardabweichungen aus 2 Versuchen mit jeweils 3 Wiederholungen)



Das Mizellare Stereoisomer P2fa2 und P2fa2-markierte Liposomen werden sowohl in b.End3 als auch in BAEC Zellen internalisiert. Daraus folgt, dass die Aufnahme beider Strukturen nicht ausschließlich über spezifische Rezeptorstrukturen erfolgt (siehe Abbildung 26).

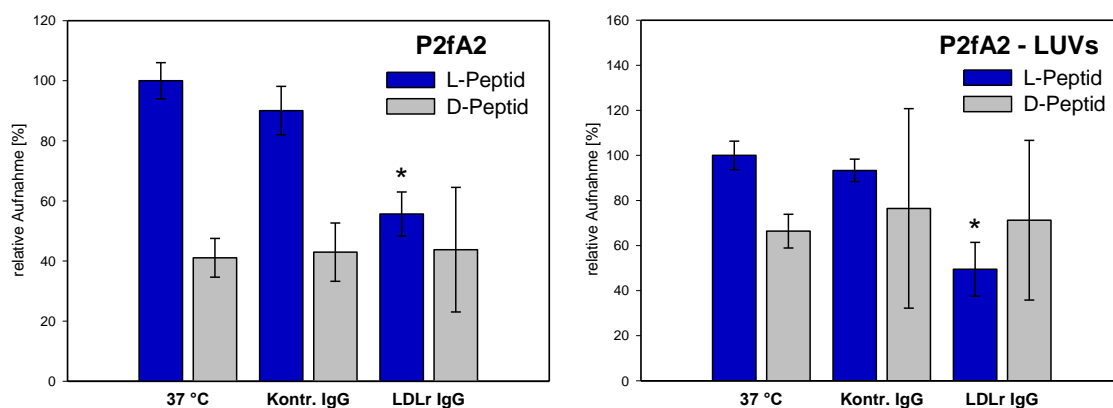
Die Fluoreszenzintensität von Zellen, die mit P2fa2 inkubiert wurden, beträgt ca. 40% der Fluoreszenzintensität, die bei Zellen beobachtet wird, die mit P2fA2 bei sonst gleichen Bedingungen beladen wurden. Aufgrund der deutlich geringeren Fluoreszenzintensität der P2fa2-Mizellen (ca. 54%) im Vergleich zu P2fA2-Mizellen ist allerdings keine eindeutige Aussage über die Beteiligung spezifischer Rezeptorstrukturen bei der Internalisierung von ApoE-Peptid-Mizellen möglich. Die Aufnahme von P2fa2-markierten Liposomen beträgt ca. 60% der Aufnahme von P2fA2-markierten Liposomen. Da die Fluoreszenzintensität der beiden Peptid-Liposomen-Komplexe vergleichbar ist, kann zumindest von einer teilweisen Beteiligung spezifischer Membrankomponenten bei der Aufnahme von ApoE-Peptid-markierten Liposomen ausgegangen werden. Neben dem LDLr könnte auch LRP1 an der Aufnahme beteiligt sein. Für beide Rezeptoren wurden bereits Interaktionen mit ApoE-Peptiden gezeigt (Dyer et al. 1995; Croy et al. 2004).

Beteiligung des LDLr

Die Clathrin-vermittelte Aufnahme der ApoE-Peptid-Mizellen deutet auf eine Rezeptor-vermittelte Internalisierung hin. Weiterhin legt die hohe ApoE-Peptiddichte ($5,4 \times 10^{-4}$ Peptide/Å²) der Mizellen und die mögliche Mehrfachbindung von LDL an den LDLr (Pitas et al. 1979) die Vermutung nahe, dass der LDLr an der Internalisierung von ApoE-Peptid-Mizellen beteiligt sein könnte. Um dies zu

untersuchen, wurden Aufnahmeuntersuchungen an b.End3 und BAEC Zellen mit ApoE-Peptid-Mizellen und ApoE-Peptid-markierten Liposomen in Anwesenheit eines LDLr spezifischen Antikörpers durchgeführt. Für den Antikörper wurde eine ca. 60%ige Verdrängung von LDLr-gebundenem LDL beschrieben (van Driel et al. 1987; Duvillard et al. 2003).

Abbildung 27 FACS-Auswertung von b.End3 Zellen inkubiert mit 1 μ M P2fa2/ P2fa2 frei und gebunden an POPC-LUVs ($C_{L/P}$ 1.000), \pm 3 μ g/ml anti-LDLr IgG/ Kontroll-IgG für 1 h in DPBSG (jeweils 10.000 Zellen/ Probe analysiert, angegeben sind Mittelwerte verringert um 4 °C Kontrolle und Standardabweichungen aus 2 Versuchen mit jeweils 3 Wiederholungen)



Bei b.End3 Zellen zeigte die zytometrische Untersuchung eine signifikante Verringerung der Aufnahme von P2fa2-Mizellen bei Koinkubation mit dem anti-LDLr IgG (siehe Abbildung 27). Der Kontrollantikörper des entsprechenden Isotyps zeigte keinen Einfluss auf die Aufnahme. Es wurde kein Einfluss des anti-LDLr IgG auf die Internalisierung von P2fa2-Mizellen beobachtet. Vergleichbare Effekte wurden auch für ApoE-Peptid-markierte Liposomen und bei BAEC Zellen ermittelt. Allerdings konnten bei BAEC Zellen, die mit P2fa2-Mizellen und P2fa2-Liposomen behandelt wurden, aufgrund der geringen Aufnahme und der hohen Standardabweichung der zellulären Fluoreszenz keine verlässlichen Aussagen über den Einfluss der Antikörper ermittelt werden.

Die Ergebnisse lassen auf eine zumindest teilweise Beteiligung des LDLr an der Internalisierung sowohl von ApoE-Peptid-Mizellen als auch von ApoE-Peptid-markierten Liposomen schließen. Dies ist in Anbetracht der Ergebnisse zu den Aufnahmemechanismen unerwartet. Eine Aktivierung unterschiedlicher Aufnahmemechanismen nach Interaktion mit einem definierten Rezeptor erscheint unwahrscheinlich. Aufgrund der starken Größenunterschiede zwischen Liposomen und Peptidmizellen bzw. LDL sollte diese Möglichkeit jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zudem widerspricht dies

früheren Ergebnissen, nach denen der LDLr nicht an der Bindung und Internalisierung von ApoE-Peptid-markierten PEG-Liposomen beteiligt ist (Sauer et al. 2005). Allerdings wurden diese Ergebnisse mit anderen Trägern, bei denen das A2-Peptid keine helikale Konformation aufwies, an einem anderen Zellsystem und mit Hilfe eines anderen Antikörpers ermittelt (Simmons et al. 1997). Eine weitere Charakterisierung der Spezifität des Antikörpers und weitergehende Untersuchungen der LDLr-Beteiligung zum Beispiel mit molekularbiologischen Methoden sollten vor einer abschließenden Aussage durchgeführt werden.

3.4. Zusammenfassung

Die verschiedenen A2-Peptid-Präparationen zeigen ein deutlich unterschiedliches Internalisierungsverhalten. Freies Peptid wird über zwei Mechanismen, aktive Endozytose und passive Transduktion, aufgenommen, während die Internalisierung von Peptid-Mizellen und Peptid-markierten Liposomen ausschließlich über aktive endozytotische Prozesse erfolgt. Deutliche Unterschiede in der Aufnahmeeffizienz von Peptid-Mizellen zwischen b.End3 und BAEC, die für Liposomen nicht festgestellt wurden, und die deutlich verringerte Abhängigkeit von zellulärem HSPG bei der Aufnahme von ApoE-Peptid-Mizellen im Vergleich zu ApoE-Peptid-markierten Liposomen, ließen die Aktivität unterschiedlicher Mechanismen vermuten.

Die Charakterisierung der Aufnahmemechanismen mit pharmakologischen Inhibitoren bestätigte die Aktivierung unterschiedlicher endozytotischer Mechanismen. Im Gegensatz zu den Liposomen, die wahrscheinlich über Makropinozyose in b.End3 und BAEC Zellen aufgenommen werden, erfolgt die Aufnahme von Peptid-Mizellen über Clathrin-vermittelte Endozytose. Durch Untersuchung der Aufnahme von Transferrin konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Clathrin-vermittelten Endozytose in BAEC Zellen deutlich reduziert bzw. inaktiv ist. Damit konnte die verringerte Aufnahme von A2-Peptid-Mizellen in BAEC Zellen geklärt werden. Inwieweit dies die Möglichkeit einer gewissen Zielselektivität bei der Ansteuerung von Hirnendothelzellen bzw. der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke bietet, muss noch gezeigt werden. Dazu müssten zunächst weitere, nach Möglichkeit, primäre Zelllinien bezüglich der Aufnahmeeffizienz untersucht werden.

Durch Untersuchung der Internalisierung von all-D-Peptiden konnte gezeigt werden, dass an der Aufnahme ApoE-Peptid-markierter Liposomen zumindest teilweise Komponenten beteiligt sind, welche die Peptid-Liganden stereospezifisch erkennen. Die Ergebnisse für die Peptid-Mizellen waren aufgrund stark unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten zwischen mizellaren all-D- und all-L-Peptiden nicht aussagekräftig. Generell stellt die stark von den Umgebungsbedingungen abhängige Fluoreszenzintensität des Carboxyfluoresceins ein ernstes Hindernis für den quantitativen Vergleich unterschiedlicher Partikelformulierungen dar (siehe dazu Kapitel IV.2.).

Weiterhin sprechen die Ergebnisse für eine Beteiligung des LDLr an der Internalisierung sowohl von Peptid-Mizellen als auch von Peptid-markierten Liposomen. Allerdings scheint eine Aktivierung unterschiedlicher Aufnahmemechanismen nach Interaktion mit einem definierten Rezeptor unwahrscheinlich, sollte aber in Anbetracht der starken Größenunterschiede zwischen Liposomen und Peptidmizellen nicht ausgeschlossen werden.

Es muss erwähnt werden, dass der in vivo Einsatz von ApoE-Peptid-Mizellen aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit von Interaktionen mit verschiedenen Plasmabestandteilen ausgeschlossen ist. Dennoch können die hier erlangten Ergebnisse als Grundlage für das Design von kleinen (ca. 10 nm) und mit einer hohen Peptiddichte im Bereich von 5×10^{-4} Peptide/Å² versehenen Partikeln gesehen werden. Diese könnten bspw. auf Basis von Dendrimeren entwickelt werden.

4. Anwendung Apolipoprotein E-abgeleiteter Peptide für die Diagnose von arteriosklerotischen Veränderungen

Der zweite Teil dieser Arbeit untersucht die Anwendung von ApoE-abgeleiteten Peptiden für die Entwicklung neuer spezifischer Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie zur Untersuchung von frühen arteriosklerotischen Veränderungen. Diese Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe „Imaging Laboratories“ von Prof. Dr. Fayad an der Mount Sinai School of Medicine, New York, durchgeführt.

4.1. Charakterisierung Gadolinium-markierter PEG-Lipid-Mizellen

Polyethylenglykol(PEG)-modifizierte Lipide bilden in wässriger Umgebung sehr stabile Mizellen mit CMCs im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-7} M. Die Lipide fungieren dabei als kurze, extrem hydrophobe Bausteine, die den hydrophoben Kern der Mizellen bilden, während die hydrophilen PEG-Ketten eine hydratisierte Hülle bilden und stabilisierend wirken (Lukyanov et al. 2002).

Paramagnetische PEG-Lipid-Mizellen wurden bereits erfolgreich als Kontrastmittel zur Signalverstärkung von arteriosklerotischen Veränderungen in der Magnetresonanztomographie angewendet (Mulder et al. 2007). Dabei wurden monoklonale Antikörper gegen den Scavenger Rezeptor Typ I (MSR-A, CD204) zum Targeting von Maus-Makrophagen verwendet. Dieser Rezeptor ist an der Aufnahme von oxidiertem LDL im Verlauf der Umwandlung von Makrophagen in Schaumzellen, einem wichtigen Schritt bei der Entwicklung arteriosklerotischer Veränderungen, beteiligt (Brown und Goldstein 1983). Da neben dem Scavenger-Rezeptor auch der LDLr stark auf den Makrophagen exprimiert ist, erscheint die Anwendung von ApoE-Peptiden zum Targeting von arteriosklerotischen Veränderungen vielversprechend. Peptide haben gegenüber Antikörpern mehrere Vorteile: geringere Kosten, größere Lagerbeständigkeit und eine verringerte Immunogenität.

4.1.1. Kopplung des Apolipoprotein E-Peptids an PEG-Lipid-Mizellen

Die PEG-Lipid-Mizellen mit einer Lipidzusammensetzung von Mal-PEG-DPPE, PEG-DPPE, Gd-DTPA-BSA und Rhod-DPPE in einem molaren Verhältnis von 20:30:49:1 wurden durch Hydratisierung der Lipidfilme in HEPES-Puffer pH 6,5 präpariert. Die Kontroll-PEG-Lipid-Mizellen ohne gekoppeltes Peptid hatten eine Lipidzusammensetzung von PEG-DPPE, Gd-DTPA-BSA und Rhod-DPPE in einem molaren Verhältnis von 50:49:1 in DPBS.

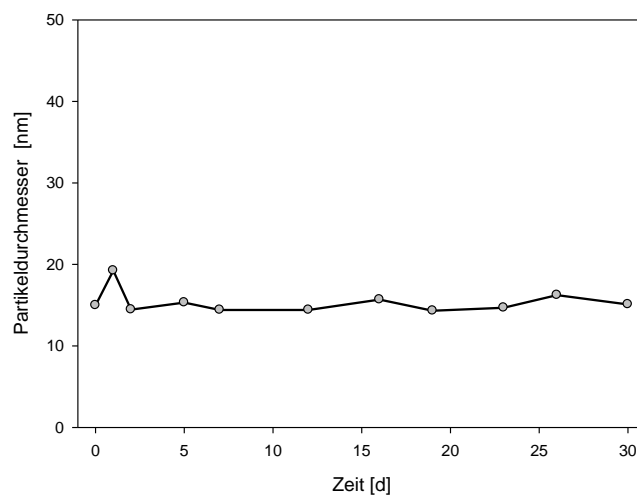
Die kovalente Kopplung der Peptide erfolgte über die terminale Maleimid-Funktion des Mal-PEG-DPPE und dem Thiol-modifizierten Peptid (HS-A2) unter Ausbildung eines Thioethers. Nach der Abtrennung ungebundener Peptide mittels Dialyse wurde die gebundene Peptidmenge UV/ VIS-spektroskopisch anhand der Absorption des Tryptophanrestes in der Linkersequenz des ApoE-Peptids bei 280 nm bestimmt. Dazu wurde eine Kalibrationsgerade mit HS-A2 in DPBS erstellt. Die Absorptionswerte der Kalibrationsgerade wurden gegen DPBS korrigiert, während die Absorption der A2-PEG-Lipid-Mizellen gegen PEG-Lipid-Mizellen gleicher Lipidkonzentration in DPBS korrigiert wurden.

Um eine möglichst hohe Besetzungsdichte des Peptids auf den PEG-Lipid-Mizellen zu erreichen, wurde für die Kopplung eine Peptidmenge gewählt, die einem Gesamtlipid/ Peptid-Verhältnis (C_{LP}) von 10 entspricht. Es wurde eine Kopplungseffizienz von ca. 80% ermittelt. Dies entspricht einem Lipid/ Peptid-Verhältnis (C_{LP}) von 12 in den A2-PEG-Lipid-Mizellen.

4.1.2. Größenbestimmung und Lagerbeständigkeit

Die Charakterisierung der PEG-Lipid-Mizellen mittels DLS bei ca. 100 μ M Gesamtlipid in PBS zeigte definierte Strukturen mit einem Hydrodynamischen Durchmesser im Bereich von 14 bis 15 nm und einem Dispersionsindex zwischen 0,2 und 0,3. Es war kein signifikanter Größenunterschied zwischen ApoE-Peptid-markierten ($d = 14,5 \pm 3,1$ nm) und unmarkierten PEG-Lipid-Mizellen ($d = 14,7 \pm 0,5$ nm) zu beobachten. Dies ist durch die geringe Größe des HS-A2 und die hohe Flexibilität der PEG-Hülle der Mizellen zu erklären. Es sind keine Unterschiede in der Bioverteilung von ApoE-Peptid-markierten und unmarkierten PEG-Lipid-Mizellen aufgrund der Partikelgröße zu erwarten.

Abbildung 28 Untersuchung der Lagerbeständigkeit von PEG-Lipid-Mizellen mittels DLS; Lagerung bei 4 mM (Gesamtlipid) PEG-Lipid-Mizellen und Raumtemperatur in DPBS



Zur Bestimmung der Lagerbeständigkeit wurde der Hydrodynamische Durchmesser einer PEG-Lipid-Mizellpräparation mit einer Gesamtlipidkonzentration von 4 mM in PBS, die bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss gelagert wurde, über 30 Tage beobachtet (siehe Abbildung 28). Innerhalb dieses Zeitraums wurden die präparierten PEG-Lipid-Mizellen für die in vivo Untersuchungen verbraucht. Für die Messung wurden jeweils 50 µl in 2000 µl PBS verdünnt (entspricht 95,3 µM Gesamtlipid). Dabei war keine signifikante Veränderung der Größenverteilung und der Partikelgröße innerhalb von 30 Tagen zu beobachten.

4.1.3. Relaxivität

Die Stärke eines MR-Kontrastmittels wird durch dessen Relaxivität bestimmt. Diese ist ein Maß für die Relaxationszeitverkürzung der benachbarten Protonen und ist von der Larmor-Frequenz der Protonen, der Temperatur, der Konzentration der paramagnetischen Substanz sowie die Zugänglichkeit für Wasser (Protonen), abhängig. Gadoliniumionen (Gd^{3+}) bewirken eine Beschleunigung der longitudinalen Relaxation und dadurch eine Erhöhung des MR-Signals bei T1-gewichteten Sequenzen.

Sowohl für ApoE-Peptid-markierte ($10,4 \pm 1,6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) als auch für unmarkierte PEG-Lipid-Mizellen ($9,9 \pm 0,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) wurden im Rahmen der Standardabweichung vergleichbare longitudinale Relaxivitäten ermittelt. Damit ist ein Vergleich des Einflusses beider Partikel auf die T1-Signalintensität arteriosklerotischer Veränderungen in der Magnetresonanztomographie möglich.

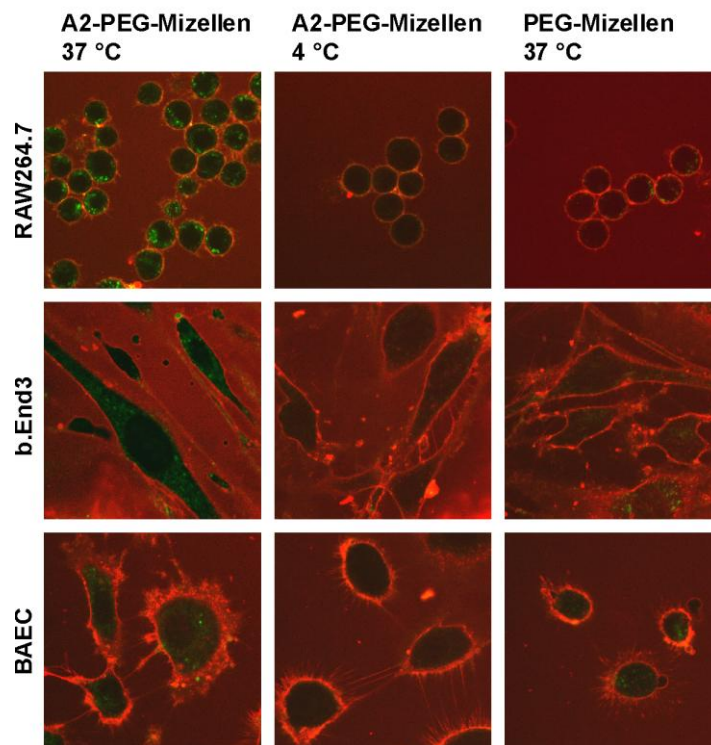
4.2. In vitro Internalisierung: Vergleich von Makrophagen und Endothelzellen

Im Vorfeld der Anwendung von ApoE-Peptid-modifizierten PEG-Lipid-Mizellen als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie sollte zunächst die Eignung dieser Partikel zur Untersuchung von frühen arteriosklerotischen Veränderungen untersucht werden. Dazu wurde die Internalisierung von ApoE-Peptid-markierten und unmarkierten PEG-Lipid-Mizellen an Makrophagen (RAW264.7) im Vergleich zu Endothelzellen (b.End3 und BAEC) charakterisiert.

Zuvor wurde die Zytotoxizität der verschiedenen PEG-Lipid-Mizellen gegenüber den Zelllinien untersucht. Dabei zeigen sich deutliche Unterschiede in der Wirkung auf b.End3 und BAEC Zellen im Vergleich zu den bereits untersuchten ApoE-Peptid-Mizellen und ApoE-Peptid-markierten Liposomen. Die Toxizität der ApoE-Peptide wird durch die Kopplung an die PEG-Lipid-Mizellen deutlich verringert. Bis zu einer Konzentration von 10 µM A2 ist kein toxischer Effekt zu beobachten.

Bei der maximalen untersuchten Peptidkonzentration von 15 μM betrug die Vitalität von b.End3, BAEC und RAW264.7 noch ca. 90%. Dies kann möglicherweise durch eine Abschirmung der ApoE-Peptide durch die PEG-Ketten der Lipid-Mizellen erklärt werden. Die endständige Kopplung der Peptide sollte diesem Effekt entgegenwirken. Allerdings könnte die durch die Carboxygruppen des DTPA hervorgerufene anionische Ladung der Mizellen eine Annäherung der kationischen Peptide an den Kern der Mizellen bewirken und damit zu einer verstärkten Abschirmung durch die PEG-Ketten führen.

Abbildung 29 CLSM-Aufnahmen von RAW264.7, b.End3 und BAEC Zellen inkubiert mit PEG-Lipid-Mizellen bei 1 mM Gesamtlipid (10 μM Rhodamin, $\pm 82,5 \mu\text{M}$ A2) in DPBSG; Trypanblaufärbung



Im Vergleich zu P2fA2-Mizellen und P2fA2-markierten Liposomen ist die Aufnahmeeffizienz der A2-PEG-Mizellen deutlich geringer. Für die Aufnahmeuntersuchungen wurden die Zellen daher mit A2-PEG-Lipid-Mizellen bzw. PEG-Lipid-Mizellen mit einer Gesamtlipidkonzentration von 1 mM (entspricht: 500 μM PEG-DPPE, 490 μM Gd-DTPA-BSA und 10 μM Rhodamin-DPPE, $\pm 82,5 \mu\text{M}$ A2) für 30 min inkubiert. Die Aufnahme wurde mittels CLSM untersucht. Die Vitalität der betrachteten Zellen wurde durch Ausschluss von Trypanblau sichergestellt. Ein zuverlässiger quantitativer Vergleich von Zellen, die sich in ihrer Größe und Granularität stark unterscheiden, wie dies bei Endothelzellen und Makrophagen der Fall ist, mittels FACS ist nicht möglich, da diese Eigenschaften einen Einfluss auf das zytometrische Signal haben.

Es ist eine deutlich höhere Aufnahme von ApoE-markierten PEG-Lipid-Mizellen in Makrophagen im Vergleich zu den Endothelzellen zu beobachten (siehe Abbildung 29). Die Internalisierung erfolgt über einen aktiven endozytotischen Mechanismus, wie an der Temperaturabhängigkeit der Aufnahme und dem vesikulären Fluoreszenzmuster zu erkennen ist. Weiterhin zeigt die im Vergleich deutlich verringerte Aufnahme von unmarkierten Kontroll-PEG-Lipid-Mizellen, dass die Aufnahme durch das A2-Peptid vermittelt wird. Auch zwischen den Endothelzellen ist eine Differenzierung der Aufnahmeeffizienz zu erkennen. Die geringere Aufnahme in BAEC Zellen deckt sich mit den Ergebnissen, die zuvor für die A2-Peptid-Mizellen ermittelt wurden. Ein vergleichbarer Aufnahmemechanismus ist vorstellbar, da beide Partikel sowohl in der Größe als auch in ihrer hohen Peptiddichte Ähnlichkeiten aufweisen.

Die stark erhöhte Aufnahmeeffizienz der ApoE-markierten PEG-Lipid-Mizellen in Makrophagen gegenüber den Endothelzellen stellt eine Basis für die folgenden in vivo Versuche dar.

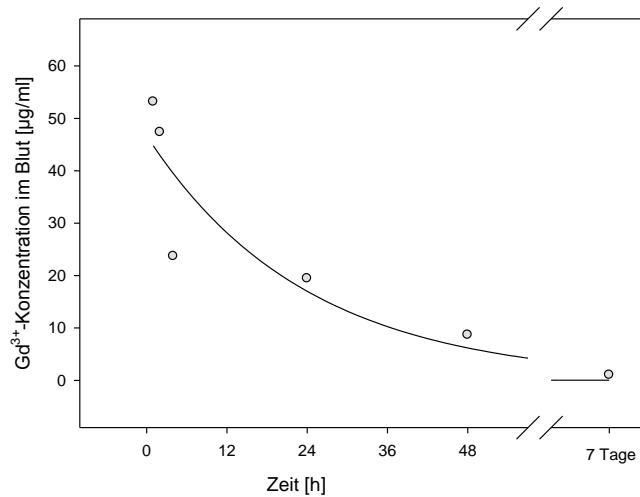
4.3. Bioverfügbarkeit

Für den Einsatz von MR-Kontrastmitteln und die spätere Betrachtung der Ergebnisse ist die Kenntnis der Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Bedeutung. Zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit wurden entsprechende Proben genommen und die Gd^{3+} -Konzentration bestimmt. Damit ist keine Aussage über die Anwesenheit intakter PEG-Lipid-Mizellen möglich. Die Gd^{3+} -Menge kann aber als Hinweis für die Verteilung von Wirkstoffen verstanden werden, die lipophil in die entsprechenden Träger inkorporiert sind. Die Ergebnisse können aufgrund Wirkstoff-spezifischer Abbau- und Ausscheidungsprozesse nicht generalisiert werden.

4.3.1. Blut-Halbwertszeit

Die Halbwertszeit im Blut ist ein Maß für die Verweildauer der Wirkstoffe im Körper und ist ein wichtiger Parameter für den in vivo Einsatz von Kontrastmitteln. Zur Bestimmung der Blut-Halbwertszeit wurden ApoE-Peptid-markierte PEG-Lipid-Mizellen mit einer Gd^{3+} -Menge von 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ Körpergewicht mit Hilfe eines Mikrokatheters in die Schwanzvene von 6 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen injiziert und Blutproben zu bestimmten Zeitpunkten entnommen. Die Gd^{3+} -Konzentrationen wurden bestimmt und die Halbwertszeit mittels eines monoexponentiellen Fits der Gd^{3+} -Konzentration gegen die Zeit bestimmt.

Abbildung 30 Bestimmung der Plasmahalbwertszeit von A2-PEG-Lipid-Mizellen nach Applikation von 50 $\mu\text{mol Gd}^{3+}$ / kg Körpergewicht in 6 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen



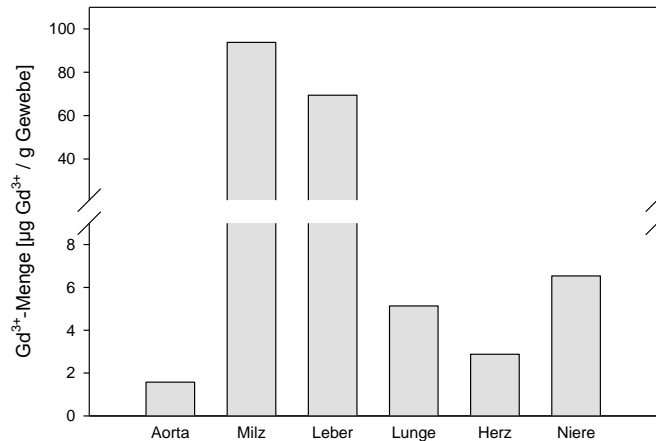
Im Vergleich zu Gd³⁺-markierten Liposomen, $t_{1/2} = 3,5$ h, zeigt an PEG-Mizellen assoziiertes Gd³⁺ eine deutlich höhere Halbwertszeit im Blut, $t_{1/2} = 16,5$ h (Referenz: Vucic, Leupold et al.; *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.* in Revision). Dies lässt auf eine Zirkulation von intakten PEG-Lipid-Mizellen schließen, bei denen die Degradation und die Ausscheidung durch die PEG-Ketten verringert wird. Eine Verlängerung der Blut-Halbwertszeit aufgrund einer Interaktion mit Blut-Bestandteilen ist unwahrscheinlich.

Die hohe Blut-Halbwertszeit der PEG-Lipid-Mizellen ist von Vorteil für die in vivo Anwendung. Die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit Makrophagen, die mit arteriosklerotischen Veränderungen assoziiert sind, ist dadurch deutlich erhöht. Andererseits steigt damit auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Gd³⁺-DTPA-Komplexe zerfallen und toxische freie Gadoliniumionen in die Blutbahn gelangen.

4.3.2. Bioverteilung

Zur Beurteilung der Targetspezifität von Kontrastmitteln bzw. zur Beurteilung möglicher toxischer Nebenwirkungen sind Informationen über eine Anreicherung dieser in bestimmten Organen von Bedeutung. Zu diesem Zweck wurden 6 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen A2-PEG-Lipid-Mizellen mit einer Gd³⁺-Menge von 50 $\mu\text{mol/ Kg}$ Körpergewicht injiziert. 24 h nach der Applikation der A2-PEG-Lipid-Mizellen wurden die Versuchstiere getötet und anschließend Aorta, Leber, Milz, Lunge, Herz und Nieren entnommen. Anschließend wurde die Gd³⁺-Menge in den Geweben als Maß für die Konzentration der PEG-Lipid-Mizellen mittels ICP-MS bestimmt.

Abbildung 31 Bestimmung der Bioverteilung von Gd^{3+} nach Applikation von A2-PEG-Lipid-Mizellen; 50 $\mu\text{mol } Gd^{3+}/\text{kg}$ Körpergewicht in 6 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen



In der Aorta wird nur eine vergleichsweise geringe Gd^{3+} -Menge (1,6 $\mu\text{g}/\text{g}$ Gewebe) beobachtet. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Untersuchung an relativ jungen Tieren mit nur gering ausgeprägten arteriosklerotischen Veränderungen durchgeführt wurde. Eine höhere Gd^{3+} -Menge ist in gut durchbluteten Organen, wie der Lunge (5,1 $\mu\text{g}/\text{g}$ Gewebe) und den Nieren (6,5 $\mu\text{g}/\text{g}$ Gewebe), zu finden. In der Leber, die an verschiedenen Abbauprozessen beteiligt ist, wurde eine sehr hohe Gd^{3+} -Menge festgestellt (69,4 $\mu\text{g}/\text{g}$ Gewebe). Die höchste Gd^{3+} -Menge wurde in der Milz (93,8 $\mu\text{g}/\text{g}$ Gewebe) beobachtet. Da diese wesentliche Funktionen des Immunsystems erfüllt, ist aufgrund des Targetings von Makrophagen als Bestandteil des Retikuloendothelialen Systems (RES) eine erhöhte Gd^{3+} -Menge in der Milz zu erwarten.

4.4. In vivo Magnetresonanztomographie arteriosklerotischer Plaques

Die magnetresonanztomographischen Untersuchungen zur Bestimmung der Effizienz von ApoE-Peptid-markierten PEG-Lipid-Mizellen als Kontrastmittel zur Signalverstärkung arteriosklerotischer Veränderungen wurden nach Applikation von PEG-Lipid-Mizellen mit einer Gd^{3+} -Menge von 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ Körpergewicht in ApoE^{-/-} Mäusen durchgeführt.

Es wurden keine Anzeichen einer toxischen Wirkung von A2-PEG-Lipid-Mizellen oder unmarkierten PEG-Lipid-Mizellen festgestellt.

T1-gewichtete MRT-Aufnahmen der Aorta wurden vor sowie 6, 24, 48 und 72 h nach Applikation der Kontrastmittel aufgenommen (siehe Abbildung 32). Bereiche, in denen eine heterogene Verdickung

der Gefäßwände zu erkennen war, sind auf arteriosklerotische Veränderungen zurückzuführen (Fayad et al. 1998) und wurden für die folgenden Untersuchungen ausgewählt.

Abbildung 32 MRT-Bilder von arteriosklerotischen Veränderungen vor sowie 6, 24, 48 und 72 h nach Applikation von PEG-Lipid-Mizellen mit 50 $\mu\text{mol Gd/ kg}$ Körpergewicht in ApoE^{-/-} Mäusen

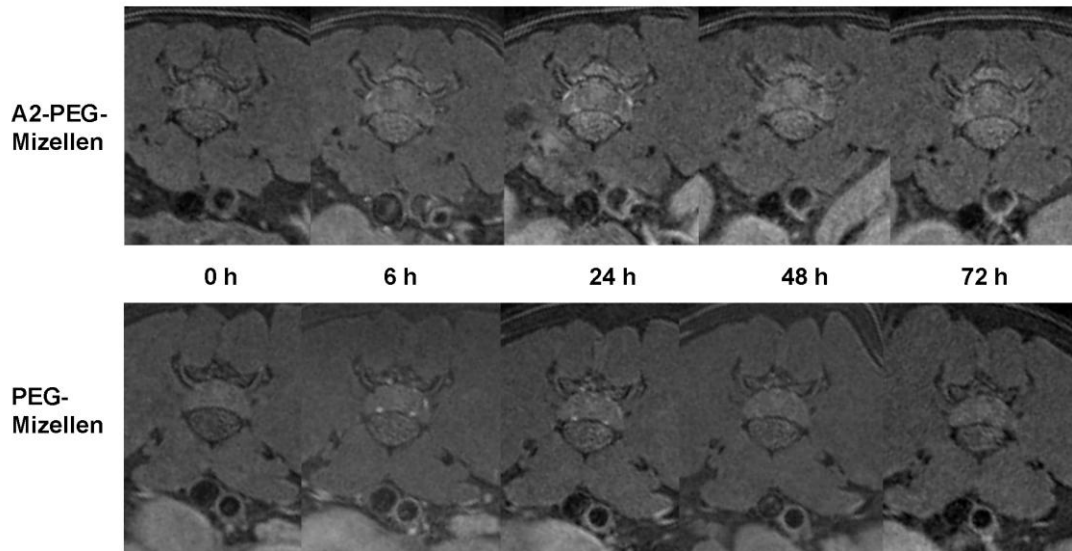
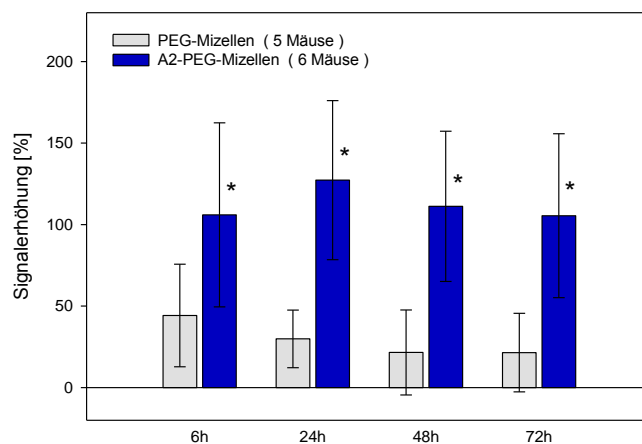


Abbildung 33 Signalverstärkung von arteriosklerotischen Veränderungen 6, 24, 48 und 72 h nach Applikation von PEG-Lipid-Mizellen mit 50 $\mu\text{mol Gd/ kg}$ Körpergewicht in ApoE^{-/-} Mäusen, abgeleitet aus MRT siehe (Briley-Saebo et al. 2006)



Die Aortenbereiche mit morphologisch veränderten Gefäßwänden zeigen eine deutlich erhöhte Signalintensität im MRT nach Applikation von A2-PEG-Lipid-Mizellen im Vergleich zu den Kontrollaufnahmen vor Applikation der A2-PEG-Mizellen (siehe Abbildung 33). Die quantitative

Auswertung der Signalintensitäten nach (Briley-Saebo et al. 2006) zeigt eine hohe, langanhaltende Intensitätsverstärkung in diesen Bereichen. Die stärkste Erhöhung ($129 \pm 46\%$; $n = 6$ Mäuse) ist 24 h nach der Applikation von A2-PEG-Lipid-Mizellen festzustellen. Die Verabreichung von unmarkierten PEG-Lipid-Mizellen führt zu einer Signalintensitätssteigerung von $30 \pm 15\%$ ($n = 5$ Mäuse). In morphologisch unveränderten Bereichen ist keine signifikante Intensitätserhöhung des MRT-Signals durch A2-PEG-Lipid-Mizellen erkennbar. Nach 72 h ist für A2-PEG-Lipid-Mizellen noch eine Signalerhöhung von $105 \pm 50\%$ ($n = 6$ Mäuse) zu beobachten.

Die langanhaltende Signalverstärkung durch A2-PEG-Lipid-Mizellen ist vermutlich auf zwei Effekte zurückzuführen. Zum einen erlaubt es die geringe Größe der PEG-Lipid-Mizellen, durch passive Diffusion in die arteriosklerotischen Veränderungen einzudringen (Briley-Saebo et al. 2006). Die Anreicherung der PEG-Lipid-Mizellen in Plaques ermöglicht anschließend die Akkumulation in den Makrophagen und bewirkt damit eine erhöhte Retention des Gadoliniums in den arteriosklerotischen Plaques. Allerdings ist zu bedenken, dass die anhaltende Anreicherung von Gadolinium auch zu toxischen Effekten führen kann, die unter Umständen eine Destabilisierung der Plaques bewirken könnten.

Die erreichte MR-Signalverstärkung ist deutlich höher als bei Lipid-Mizellen, die mit einem Antikörper gegen den Macrophage Scavenger Receptor A (MSR-A) markiert wurden, $79 \pm 10\%$ (Amirbekian et al. 2007). Gründe dafür könnten eine Verringerung der unspezifischen Interaktionen mit Blut-Bestandteilen sein. Eine höhere Aufnahme in Makrophagen, möglicherweise aufgrund von Interaktionen mit verschiedenen Rezeptorstrukturen (MSR-A, LDLr) und weiteren sehr aktiven unspezifischen Internalisierungsprozessen, könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Zudem könnte die im Vergleich zu den Antikörpern sehr hohe Peptiddichte auf den A2-PEG-Lipid-Mizellen die Aufnahme erhöhen.

Es konnte gezeigt werden, dass ApoE-Peptid-markierte PEG-Lipid-Mizellen eine sehr hohe Verstärkung der Signalintensität arteriosklerotischer Plaques vermitteln und damit hervorragend für eine Anwendung als Kontrastmittel für die MRT geeignet sind.

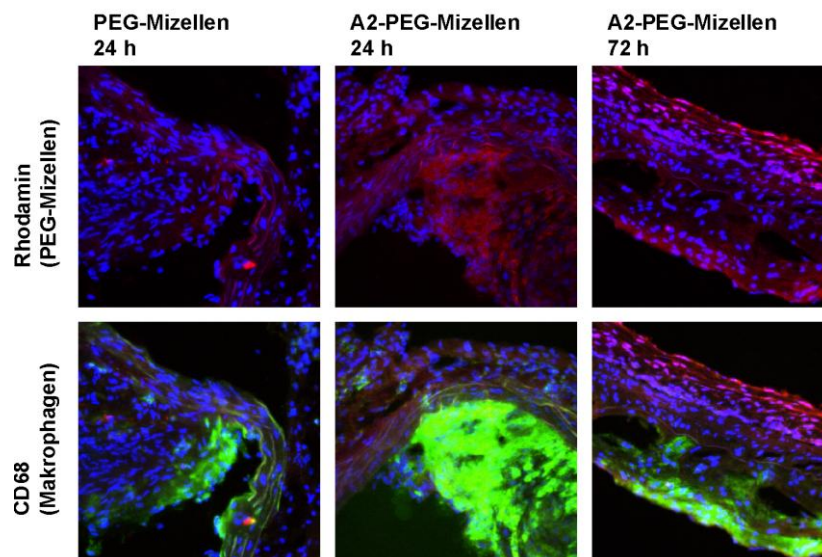
4.5. Lokalisierung in arteriosklerotischen Plaques

Um ein erfolgreiches Targeting der arteriosklerotischen Veränderungen mit den A2-Peptid-markierten PEG-Lipid-Mizellen nachzuweisen, wurden die Aorten von ApoE^{-/-} Mäusen 24 bzw. 72 h nach Applikation von PEG-Lipid-Mizellen mit einer Gd³⁺-Menge von 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ Körpergewicht mittels CLSM untersucht. Um neben den Rhodmin-markierten PEG-Lipid-Mizellen auch die Makrophagen lokalisieren zu können, wurden die entsprechend präparierten Aorten-Schnitte mit einem Alexa Fluor 647-konjugierten Makrophagen-spezifischen anti-CD68-Antikörper behandelt.

Arteriosklerotische Plaques, die von Mäusen stammen, die zuvor mit A2-PEG-Lipid-Mizellen behandelt wurden, zeigen sowohl 24 h als auch 72 h nach der Applikation eine deutliche Rhodamin-Fluoreszenz (siehe Abbildung 34). Dies lässt auf die Akkumulation von A2-PEG-Lipid-Mizellen schließen. Dagegen ist nahezu keine Rhodamin-Fluoreszenz in arteriosklerotischen Plaques zu erkennen, die aus Tieren isoliert wurden, denen 24 h zuvor unmarkierte PEG-Lipid-Mizellen injiziert wurden. Dies unterstützt die Ergebnisse der MRT-Untersuchungen, nach denen ein *in vivo* Targeting von arteriosklerotischen Plaques mittels ApoE-Peptid-markierter, paramagnetischer PEG-Lipid-Mizellen erfolgreich ist.

Weiterhin konnte eine Kolo-kalisation von Rhodamin-Fluoreszenz und Makrophagen 24 h und 72 h nach Applikation der A2-PEG-Lipid-Mizellen beobachtet werden. Dies zeigt, dass die im MRT beobachtete Signalverstärkung durch ein erfolgreiches Targeting der Makrophagen in den arteriosklerotischen Plaques erzielt wurde. Die nur schlecht lokalisierte, schemenhafte Fluoreszenz von PEG-Lipid-Mizellen und Makrophagen ist vermutlich auf die Fixierung der Aortenschnitte zurückzuführen.

Abbildung 34 CLSM Bilder von ApoE^{-/-} Maus Aorten nach Applikation von PEG-Lipid-Mizellen, markiert mit 8,4 µmol A2 und 1 µmol Rhodamin/ kg Körpergewicht



4.6. Zusammenfassung

Die hier vorgestellten ApoE-Peptid-markierten PEG-Lipid-Mizellen bieten eine einfache Herstellung und eine hohe Lagerbeständigkeit verbunden mit einer sehr guten Signalverstärkung von

arteriosklerotischen Plaques in der MRT. Die erreichte MR-Signalverstärkung ist deutlich höher als bei Lipid-Mizellen, die mit einem Antikörper gegen den MSR-A markiert wurden (Amirbekian et al. 2007). Dies begründet sich vermutlich in einer höheren Aufnahme in Makrophagen, möglicherweise aufgrund von Interaktionen mit verschiedenen Rezeptorstrukturen (MSR-A, LDLr) und weiteren sehr aktiven unspezifischen Internalisierungsprozessen. Untersuchungen der Aorten zeigen eine Kolokalisation von A2-PEG-Lipid-Mizellen und Makrophagen. Die Signalverstärkung im MRT wird demnach durch ein erfolgreiches Targeting der Makrophagen in den arteriosklerotischen Plaques erzielt. Für die Untersuchungen wurden relativ junge Mausmodelle für arteriosklerotische Veränderungen verwendet, da gerade im Anfangsstadium der Makrophagengehalt der Plaques ein wichtiges Merkmal darstellt.

Die Gesamtlipidkonzentration der PEG-Lipid-Mizellen im Serum der Versuchstiere nach Applikation liegt im Bereich von 10^{-3} M. Damit wird die CMC für PEG-Lipide (10^{-5} bis 10^{-7} M) deutlich überschritten und es ist von intakten PEG-Lipid-Mizellen in vivo auszugehen. Zudem lassen die hohe Plasmahalbwertszeit sowie die Kolokalisation von Gd^{3+} (siehe MRT) und Rhodamin (siehe CLSM) in den arteriosklerotischen Plaques auf die Anwesenheit von intakten PEG-Lipid-Mizellen schließen.

Das erfolgreiche Targeting früher arteriosklerotischer Veränderungen bietet die Möglichkeit zur Entwicklung von effektiven Therapeutika. Dabei könnten Zytostatika, wie bspw. Paclitaxel, als Wirkstoff eingesetzt werden, die bereits erfolgreich an drug-eluting-stents adsorbiert wurden und dort die Restenose verhindern (Schömig et al. 2007). Natürlich müssen mögliche adverse Effekte bedacht werden, die durch das Targeting des Retikuloendothelialen Systems entstehen.

V. Zusammenfassung/ Summary

1. Apolipoprotein E-abgeleitete Peptide mit alternativen Palmitoylierungspositionen

Das Ziel der vorangegangenen Untersuchungen war, den Einfluss der Palmitoylierungsposition auf die Stabilität der adsorptiven Kopplung an Liposomen und deren Einfluss auf die Sekundärstruktur der Apolipoprotein E-abgeleiteten Peptide bei Interaktion mit der Lipid-Doppelschicht näher zu charakterisieren.

Es zeigt sich, dass alle untersuchten dipalmitoylierten ApoE-Peptide effektiv an Liposomen binden und in der Lage sind, eine Aufnahme dieser in Hirnendothelzellen zu vermitteln. Das N-terminal an Position 1 dipalmitoylierte P2A2-1 zeigte optimale Eigenschaften für die adsorptive Kopplung an Liposomen. Es zeichnet sich durch eine stabile Bindung an POPC-Liposomen aus, die sich in einer geringen Umverteilung und einer hohen, durch Liposomenbindung induzierten Helizität zeigt. Gleichzeitig besitzt P2A2-1 eine moderate membranstörende Aktivität. Aufnahmeuntersuchungen zeigten, dass die Helizität der Peptide im Gegensatz zur Stabilität der Peptid-Liposomen-Komplexe keinen Einfluss auf die Vermittlung der zellulären Aufnahme von Liposomen hat.

In der Literatur werden vorrangig kovalente Kopplungsstrategien zur Funktionalisierung von Liposomen beschrieben. Die adsorptive Bindung von Peptiden an Liposomen über sogenannte Lipidanker, nach dem Vorbild von peripheren Membranproteinen, die über Palmitoyl- oder Myristylketten an die Plasmamembran gebunden sind, stellt eine elegante Methode zur Funktionalisierung von Liposomen dar. Der Vorteil dieser Kopplungsmethode liegt vor allem in der einfachen Herstellung der Peptid-Liposomen-Komplexe. Im direkten Vergleich mit der kovalenten Funktionalisierung von Liposomen wird die chemische Modifikation der Peptide von der Bindung an die Liposomen-Komplexe (Kopplung an die Liposomen) in die vorhergehende Synthese des Peptides verlagert. Eine oft als nachteilig angeführte limitierte Stabilität der adsorptiven Komplexe gegenüber der kovalenten Bindung ist nicht gegeben. Die kovalente Kopplung eines Peptides an Liposomen stellt streng genommen nur die „adsorptive Bindung mittels eines Lipidankers“ dar. Dies entspricht der hier vorgestellten adsorptiven Kopplung durch zwei räumlich angenäherte Fettsäurereste.

Apolipoprotein E-derived peptides with alternative palmitoylation-pattern

The objective of the study was to investigate the influence of the palmitoylation-pattern on the stability of the adsorptive peptide-liposome-complexes and the secondary structure of the Apo E-derived peptide upon binding to the liposomal bilayer.

All dipalmitoylated Apo E-peptides bind efficiently to liposomes and mediate their internalisation into brain endothelial cells. The N-terminal at position 1 dipalmitoylated P2A2-1 is ideally suited for stable

adsorptive binding to POPC-liposomes. P2A2-1 has a low redistribution-rate when bound to liposomes, a high liposome-induced helicity and a moderate membrane-disturbing activity.

No influence of the peptide-helicity on the uptake into endothelial cells was observed. The uptake-efficiency correlated with the stability of the peptide-liposome-complexes.

So far mostly covalent strategies are described for the functionalisation of liposomes. The adsorptive binding of peptides to liposomes using palmitoylic residues is an elegant method, that is easily applied. In comparison to covalent coupling of peptides to liposomes the chemical modification of the peptide is shifted to the peptide-synthesis. The stability of adsorptive peptide-liposome-complexes is comparable to covalent complexes, as the two spatial closely positioned palmitoylic residues are structurally similar to a covalently coupled lipid.

2. Internalisierungsuntersuchungen an Endothelzellen der Blutgefäße

Die Untersuchung der Internalisierung verschiedener ApoE-Peptid-basierter Trägersysteme hinsichtlich ihrer Aufnahmeeffizienz und möglicher mechanistischer Differenzen erfolgte an Endothelzellen der Blutgefäße. Diese Zellen treten als erste in Kontakt mit intravenös applizierten Wirkstoffpräparationen und sind daher für eine Untersuchung der Bioverteilung von besonderem Interesse.

Die Fluoreszenzeigenschaften des Carboxyfluoresceins sind stark von der Art der ApoE-Peptid-basierten Träger abhängig. Die großen Unterschiede in den Fluoreszenzeigenschaften unterbinden die Möglichkeit eines quantitativen Vergleichs der Aufnahmeeffizienz zwischen den unterschiedlichen ApoE-basierten Trägerstrukturen. Für die Aufnahmeuntersuchungen musste daher eine quantitative Charakterisierung der Internalisierung auf Vergleiche unterschiedlicher Aufnahmebedingungen jeweils einer ApoE-Peptid-basierten Trägerstruktur beschränkt werden. Zudem muss die Lokalisation der Carboxyfluorescein-markierten Peptide und der mögliche Einfluss der Umgebungsbedingungen bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden.

Die Ergebnisse der Aufnahmeuntersuchungen deuten auf eine komplexe Aufnahme von ApoE-Peptid-Mizellen und ApoE-Peptid-markierten Liposomen, bei der unterschiedliche stereospezifische und -unspezifische Membrankomponenten eine Rolle spielen. Neben dem LDLr könnte auch LRP1 als eine stereospezifische Komponente an der Aufnahme beteiligt sein. Für beide Rezeptoren wurden bereits Interaktionen mit ApoE-Peptiden gezeigt (Dyer et al. 1995; Croy et al. 2004). Allerdings können auch die Polysaccharid-Ketten des HSPG begrenzt stereoselektive Interaktionen eingehen (Brewer et al. 2002).

Die Aufnahme von kleinen Partikeln mit hoher Peptiddichte erfolgt, im Gegensatz von ApoE-Peptid-markierten Liposomen, über Clathrin und weitgehend unabhängig von zellulärem HSPG. Es konnten zudem Hinweise für eine Beteiligung des LDLr an der Internalisierung sowohl von ApoE-Peptid-

Mizellen als auch von ApoE-Peptid-markierten Liposomen festgestellt werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie innerhalb der Rezeptorfamilien könnten auch verschiedene Mitglieder der LDL- oder Scavenger-Rezeptorfamilie, für die Interaktionen mit LDL und modifiziertem LDL beschrieben worden sind (Adachi und Tsujimoto 2006; Pluddemann et al. 2007), an der Aufnahme der unterschiedlichen Präparationen beteiligt sein.

Nach diesen Ergebnissen wird die zelluläre Aufnahme nicht nur durch die Aufnahme-vermittelnde Struktur sondern auch von der Art der Trägerstruktur beeinflusst. Dabei könnte sowohl die unterschiedliche Größe der Partikel als auch die Peptiddichte auf der Partikeloberfläche eine Rolle spielen.

Inwieweit die hier festgestellte Präferenz der ApoE-Peptid-Mizellen bei der Aufnahme in Hirnendothelzellen für die Entwicklung von selektiven Trägersystemen genutzt werden kann, müssen zusätzliche Experimente mit weiteren Zelllinien zeigen. Der Vorteil einer bevorzugten Aufnahme der ApoE-Peptid-Mizellen in Hirnendothelzellen könnte durch eine rasche lysosomale Degradation im Anschluss an die Clathrin-vermittelte Endozytose aufgehoben werden (Maxfield und McGraw 2004).

Uptake-studies with endothelial cells of the blood-vessels

Endothelial cells of the blood vessels constitute the first contact area of intravenously applied drug formulations. To assess the transmembrane transport properties of cells lining blood capillaries and large vessels, we compared the uptake of different ApoE-peptide-based carrier-systems into brain capillary endothelial cells (b.End3) and aortic endothelial cells (BAEC).

The fluorescence-properties of carboxyfluorescein are influenced considerably by the carrier-system. The deviating fluorescence-intensities hamper the quantitative comparison of the uptake-efficiency between different ApoE-peptide-based carrier-systems. Therefore, the uptake-studies had to be limited to the characterisation of the uptake-mechanism of each carrier-system individually.

The results indicate complex uptake-patterns for ApoE-peptide-micelles and ApoE-peptide-tagged liposomes. Stereo-specific as well as –unspecific components seem to be involved. Stereo-specific components could be the LDLr or LRP1. For both receptors interactions with ApoE-derived peptides were previously shown (Dyer et al. 1995; Croy et al. 2004). However, the polysaccharide-chains of the HSPG-network can form stereo-specific interactions to a minor degree, too (Brewer et al. 2002).

The endocytotic internalisation of small ApoE-peptide-micelles with a high peptide-density on their surface is mediated by clathrin and is independent of HSPG. In contrast, liposomes tagged with ApoE-peptides are internalised by a clathrin- and caveolin-independent endocytosis.

The LDLr is involved in the uptake of both, ApoE-peptide-micelles and ApoE-peptide-tagged liposomes. Considering the differing endocytotic mechanisms by which these particles are internalised, this seems to be unlikely. However, because of the high sequence-homology in the LDLr-family, different receptors might be targeted. These results show, that the uptake-mechanism is not

only determined by the uptake-mediating ligand, but is also influenced by the carrier-type. Important factors are the size of the carrier as well as the peptide-density on the particle-surface.

The efficient internalisation of ApoE-peptide-micelles into brain-capillary endothelial cells but low uptake into endothelial cells of large vessels may provide a basis for the development of more site-specific carrier systems. Further research needs to be done in this field. However, endosomes formed after clathrin-mediated endocytosis eventually fuse with lysosomes where degradation of the internalised material occurs (Maxfield und McGraw 2004). Hence, the advantage of site specificity is likely opposed by a rather unfavorable intracellular fate of the peptide micelles.

3. Anwendung Apolipoprotein E-abgeleiteter Peptide für die Diagnose von arteriosklerotischen Veränderungen

Arteriosklerose und Arteriosklerose bedingte Folgeerkrankungen stellen die Haupttodesursache in der westlichen Welt dar (Naghavi et al. 2003). Daher ist die Entwicklung neuer Diagnosemethoden von großer Bedeutung. Die Magnetresonanztomographie bietet die Möglichkeit, Gewebe mit hoher Auflösung und Kontrast nicht-invasiv und ohne den Einsatz ionisierender Strahlung abzubilden und ist damit hervorragend für eine frühzeitige Diagnose geeignet. Der Einsatz spezifischer Kontrastmittel wird zudem die Charakterisierung der genauen Zusammensetzung arteriosklerotischer Plaques gestatten.

Die hier vorgestellten ApoE-Peptid-markierten PEG-Lipid-Mizellen bieten eine einfache Herstellung und eine hohe Lagerbeständigkeit verbunden mit einer sehr guten Signalverstärkung von arteriosklerotischen Plaques in der MRT. Die erreichte MR-Signalverstärkung ist deutlich höher als bei Lipid-Mizellen, die mit einem Antikörper gegen den MSR-A markiert wurden (Amirbekian et al. 2007). Die Signalverstärkung im MRT wird demnach durch ein erfolgreiches Targeting der Makrophagen in den arteriosklerotischen Plaques erzielt.

Gegenüber herkömmlichen unspezifischen Gd³⁺-basierten Kontrastmitteln (bspw. Gadovist[®], Magnevist[®]) stellt die auf dem Targeting von Makrophagen basierende spezifische Kontrastverstärkung von arteriosklerotischen Veränderungen durch ApoE-Peptid-markierte PEG-Lipid-Mizellen einen entscheidenden Fortschritt dar. Da die Wahrscheinlichkeit einer Ruptur von arteriosklerotischen Plaques mit deren Makrophagengehalt assoziiert wird (Virmani et al. 2000), stellen Kontrastmittel, die spezifisch Makrophagen ansteuern, eine Möglichkeit dar, die Gefährlichkeit von arteriosklerotischen Veränderungen mittels MRT zu bestimmen.

Das erfolgreiche Targeting früher arteriosklerotischer Veränderungen bietet die Möglichkeit zur Entwicklung von effektiven Therapeutika. Dabei könnten Zytostatika, wie bspw. Paclitaxel, als Wirkstoff eingesetzt werden, die bereits erfolgreich an drug-eluting-stents adsorbiert wurden und dort die Restenose verhindern (Schömig et al. 2007).

Abschließend lässt sich sagen, dass ApoE-markierte PEG-Lipid-Mizellen aufgrund ihrer einfachen Herstellung, dem kostengünstigen Peptid-basierten Targeting, der hohen Lagerbeständigkeit und nicht zuletzt der effektiven Signalverstärkung von arteriosklerotischen Plaques im MRT sehr gut als Kontrastmittel geeignet sind.

Application of ApoE-derived peptides for the diagnosis of atherosclerosis

Atherosclerosis and atherosclerosis-induced secondary disorders are the leading cause of death in the industrialized countries (Naghavi et al. 2003). Therefore, the importance of the development of accurate and sensitive diagnostic methods for this disease can not be underestimated. Due to the ability of MRI to visualize soft tissue with high resolution and contrast it is highly suitable for the non-invasive and timely diagnosis of atherosclerosis.

The application of specific contrast-agents will permit the characterisation of plaque composition. ApoE-peptide-tagged PEG-lipid-micelles target macrophages in the atherosclerotic plaques. The advantages are an easy synthesis, a long shelf-life and a high contrast-enhancement of atherosclerotic plaques in MRI. The signal-enhancement is higher than that of anti-MSR-A antibody-tagged lipid-micelles (Amirbekian et al. 2007).

Compared to standard Gd^{3+} -based contrast-agents (e.g. Gadovist[®], Magnevist[®]), signal-enhancement of atherosclerotic plaques in MRI by the targeting of macrophages constitutes a pronounced improvement. The stability of atherosclerotic plaques is correlated with its macrophage-density (Virmani et al. 2000) and thus the probability of plaque-rupture can be estimated by MRI.

The successful targeting of early atherosclerotic plaques provides the chance for an effective therapy. The application of statines, e.g. paclitaxel, as used in drug-eluting-stents, may prevent the development of advanced plaques (Schömig et al. 2007).

ApoE-peptide-tagged PEG-lipid-micelles containing Gd^{3+} are promising new contrast-agents that are excellently suited for the improved MRI based diagnosis of atherosclerosis.

VI. Literatur

- Abuchowski, A., J. R. McCoy, et al. (1977). "Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase." J Biol Chem **252**(11): 3582-6.
- Adachi, H. und M. Tsujimoto (2006). "Endothelial scavenger receptors." Prog Lipid Res **45**(5): 379-404.
- Aderem, A. und D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.
- Alberts, B., A. Johnson, et al. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science, a member of the Taylor & Francis Group.
- Amirbekian, V., M. J. Lipinski, et al. (2007). "Detecting and assessing macrophages in vivo to evaluate atherosclerosis noninvasively using molecular MRI." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 961-6.
- Astriab-Fisher, A., D. Sergueev, et al. (2002). "Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions." Pharm Res **19**(6): 744-54.
- Bavry, A. A. und D. L. Bhatt (2008). "Appropriate use of drug-eluting stents: balancing the reduction in restenosis with the concern of late thrombosis." Lancet **371**(9630): 2134-43.
- Belting, M., A. Wittrup, et al. (2006). Proteoglycans as Endocytosis Receptors for CPPs. Handbook of Cell-Penetrating Peptides, Second Edition. U. Langel, CRC Press: 219-234.
- Bernfield, M., M. Gotte, et al. (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." Annu Rev Biochem **68**: 729-77.
- Berridge, M. V. und A. S. Tan (1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." Arch Biochem Biophys **303**(2): 474-82.
- Betz, A. L. und G. W. Goldstein (1978). "Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries." Science **202**(4364): 225-7.
- Beyermann, M. und M. Bienert (1992). "Synthesis of difficult peptide sequences: A comparison of Fmoc-and BOC-technique." Tetrahedron Letters **33**(26): 3745-3748.
- Brewer, C. F., M. C. Miceli, et al. (2002). "Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions." Curr Opin Struct Biol **12**(5): 616-23.
- Briley-Saebo, K. C., V. Amirbekian, et al. (2006). "Gadolinium mixed-micelles: effect of the amphiphile on in vitro and in vivo efficacy in apolipoprotein E knockout mouse models of atherosclerosis." Magn Reson Med **56**(6): 1336-46.
- Brindle, P. M., A. McConnachie, et al. (2005). "The accuracy of the Framingham risk-score in different socioeconomic groups: a prospective study." Br J Gen Pract **55**(520): 838-45.
- Brown, D. A. und E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." J Biol Chem **275**(23): 17221-4.

- Brown, M. S. und J. L. Goldstein (1983). "Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis." Annu Rev Biochem **52**: 223-61.
- Brown, M. S. und J. L. Goldstein (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." Science **232**(4746): 34-47.
- Cardin, A. D., N. Hirose, et al. (1986). "Binding of a high reactive heparin to human apolipoprotein E: identification of two heparin-binding domains." Biochem Biophys Res Commun **134**(2): 783-9.
- Chen, Y. H. und J. T. Yang (1971). "A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism." Biochem Biophys Res Commun **44**(6): 1285-91.
- Cheng, Y., Y. Gao, et al. (2007). "Dendrimer-based prodrugs: design, synthesis, screening and biological evaluation." Comb Chem High Throughput Screen **10**(5): 336-49.
- Chesebro, J. H. und V. Fuster (1986). "Platelet-inhibitor drugs before and after coronary artery bypass surgery and coronary angioplasty: the basis of their use, data from animal studies, clinical trial data, and current recommendations." Cardiology **73**(4-5): 292-305.
- Choudhury, R. P., V. Fuster, et al. (2004). "Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis." Nat Rev Drug Discov **3**(11): 913-25.
- Coin, I., M. Beyermann, et al. (2007). "Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences." Nat Protoc **2**(12): 3247-56.
- Conner, S. D. und S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**(6927): 37-44.
- Console, S., C. Marty, et al. (2003). "Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans." J Biol Chem **278**(37): 35109-14.
- Cooper, G. M. (2000). The Cell: A Molecular Approach, Second Edition. Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc.
- Crone, C. und S. P. Olesen (1982). "Electrical resistance of brain microvascular endothelium." Brain Res **241**(1): 49-55.
- Croy, J. E., T. Brandon, et al. (2004). "Two apolipoprotein E mimetic peptides, ApoE(130-149) and ApoE(141-155)2, bind to LRP1." Biochemistry **43**(23): 7328-35.
- D'Emanuele, A. und D. Attwood (2005). "Dendrimer-drug interactions." Adv Drug Deliv Rev **57**(15): 2147-62.
- Damke, H., T. Baba, et al. (1995). "Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin." J Cell Biol **131**(1): 69-80.
- Damke, H., T. Baba, et al. (1994). "Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation." J Cell Biol **127**(4): 915-34.
- Dathe, M., S. Keller, et al. (2006). Cellular Uptake of Liposomal and Micellar Carriers Mediated by ApoE-Derived Peptides. Handbook of Cell-Penetrating Peptides, Second Edition. U. Langel.

- Dathe, M., J. Meyer, et al. (2002). "General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides." Biochim Biophys Acta **1558**(2): 171-86.
- Datta, G., M. Chaddha, et al. (2000). "The receptor binding domain of apolipoprotein E, linked to a model class A amphipathic helix, enhances internalization and degradation of LDL by fibroblasts." Biochemistry **39**(1): 213-20.
- Dawber, T. R., G. F. Meadors, et al. (1951). "Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study." Am J Public Health Nations Health **41**(3): 279-81.
- De Jong, W. H. und P. J. Borm (2008). "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards." Int J Nanomedicine **3**(2): 133-49.
- Dehouck, B., L. Fenart, et al. (1997). "A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier." J Cell Biol **138**(4): 877-89.
- Derossi, D., A. H. Joliot, et al. (1994). "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." J Biol Chem **269**(14): 10444-50.
- Di Fiore, P. P. und P. De Camilli (2001). "Endocytosis and signaling. an inseparable partnership." Cell **106**(1): 1-4.
- Duchardt, F., M. Fotin-Mleczek, et al. (2007). "A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides." Traffic **8**(7): 848-66.
- Durlu, Y. K. und M. Tamai (1997). "Transplantation of retinal pigment epithelium using viable cryopreserved cells." Cell Transplant **6**(2): 149-62.
- Duvillard, L., E. Florentin, et al. (2003). "Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy." Diabetes Care **26**(5): 1540-4.
- Dyer, C. A., D. P. Cistola, et al. (1995). "Structural features of synthetic peptides of apolipoprotein E that bind the LDL receptor." J Lipid Res **36**(1): 80-8.
- Dyer, C. A. und L. K. Curtiss (1991). "A synthetic peptide mimic of plasma apolipoprotein E that binds the LDL receptor." J Biol Chem **266**(34): 22803-6.
- Ehrlich, P. (1885). "Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus: Eine farbenanalytische Studie." Hirschwald, Berlin.
- el-Bacha, R. S. und A. Minn (1999). "Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **45**(1): 15-23.
- Esko, J. D. (1991). "Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism." Curr Opin Cell Biol **3**(5): 805-16.
- Fayad, Z. A., J. T. Fallon, et al. (1998). "Noninvasive In vivo high-resolution magnetic resonance imaging of atherosclerotic lesions in genetically engineered mice." Circulation **98**(15): 1541-7.
- Fayad, Z. A., V. Fuster, et al. (2000). "Noninvasive in vivo human coronary artery lumen and wall imaging using black-blood magnetic resonance imaging." Circulation **102**(5): 506-10.
- Fayad, Z. A., T. Nahar, et al. (2000). "In vivo magnetic resonance evaluation of atherosclerotic plaques in the human thoracic aorta: a comparison with transesophageal echocardiography." Circulation **101**(21): 2503-9.

- Ferrari, A., V. Pellegrini, et al. (2003). "Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time." Mol Ther **8**(2): 284-94.
- Fischer, R., M. Fotin-Mleczek, et al. (2005). "Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides." ChemBiochem **6**(12): 2126-42.
- Fishman, J. B., J. B. Rubin, et al. (1987). "Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier." J Neurosci Res **18**(2): 299-304.
- Fittipaldi, A., A. Ferrari, et al. (2003). "Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins." J Biol Chem **278**(36): 34141-9.
- Flanagan, M. D. und S. Lin (1980). "Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin." J Biol Chem **255**(3): 835-8.
- Folsom, A. R., L. E. Chambless, et al. (2006). "An assessment of incremental coronary risk prediction using C-reactive protein and other novel risk markers: the atherosclerosis risk in communities study." Arch Intern Med **166**(13): 1368-73.
- Francis, C. L., T. A. Ryan, et al. (1993). "Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria." Nature **364**(6438): 639-42.
- Frankel, A. D. und C. O. Pabo (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." Cell **55**(6): 1189-93.
- Fuki, I. V., K. M. Kuhn, et al. (1997). "The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro." J Clin Invest **100**(6): 1611-22.
- Ghose, A. K., V. N. Viswanadhan, et al. (1999). "A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases." J Comb Chem **1**(1): 55-68.
- Girardin, F. (2006). "Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development." Dialogues Clin Neurosci **8**(3): 311-21.
- Goddette, D. W. und C. Frieden (1986). "The kinetics of cytochalasin D binding to monomeric actin." J Biol Chem **261**(34): 15970-3.
- Goldstein, G. W. und A. L. Betz (1983). "Recent advances in understanding brain capillary function." Ann Neurol **14**(4): 389-95.
- Goldstein, J. L., S. K. Basu, et al. (1983). "Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells." Methods Enzymol **98**: 241-60.
- Goldstein, J. L. und M. S. Brown (1977). "Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis." Metabolism **26**(11): 1257-75.
- Guillot, F. L., K. L. Audus, et al. (1990). "Fluid-phase endocytosis by primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers." Microvasc Res **39**(1): 1-14.
- Halle, W., A. Mann, et al. (1980). "[In vitro cultivation and behavior of aortic endothelium cells in a low serum culture medium]." Acta Biol Med Ger **39**(11-12): 1165-75.
- Henriques, S. T., A. Quintas, et al. (2007). "Energy-independent translocation of cell-penetrating peptides occurs without formation of pores. A biophysical study with pep-1." Mol Membr Biol **24**(4): 282-93.

- Higgins, M. K. und H. T. McMahon (2002). "Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis." Trends Biochem Sci **27**(5): 257-63.
- Holm, T., H. Johansson, et al. (2006). "Studying the uptake of cell-penetrating peptides." Nat Protoc **1**(2): 1001-5.
- Huang, C. (1969). "Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics." Biochemistry **8**(1): 344-52.
- Innerarity, T. L., R. E. Pitas, et al. (1979). "Binding of arginine-rich (E) apoprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptors of fibroblasts." J Biol Chem **254**(10): 4186-90.
- Ivanov, A. I. (2008). "Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful?" Methods Mol Biol **440**: 15-33.
- Iwai, K., H. Maeda, et al. (1984). "Use of oily contrast medium for selective drug targeting to tumor: enhanced therapeutic effect and X-ray image." Cancer Res **44**(5): 2115-21.
- Jacobson, K., E. D. Sheets, et al. (1995). "Revisiting the fluid mosaic model of membranes." Science **268**(5216): 1441-2.
- Janzer, R. C. und M. C. Raff (1987). "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells." Nature **325**(6101): 253-7.
- Ji, Z. S., S. Fazio, et al. (1994). "Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem **269**(4): 2764-72.
- Joliot, A., C. Pernelle, et al. (1991). "Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 1864-8.
- Jones, A. T. (2007). "Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides." J Cell Mol Med **11**(4): 670-84.
- Joshi, M. D. und R. H. Müller (2009). "Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **71**(2): 161-172.
- Kaplan, I. M., J. S. Wadia, et al. (2005). "Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis." J Control Release **102**(1): 247-53.
- Kato, M., H. Wang, et al. (1994). "Cell surface syndecan-1 on distinct cell types differs in fine structure and ligand binding of its heparan sulfate chains." J Biol Chem **269**(29): 18881-90.
- Kawamura, K. S., M. Sung, et al. (2006). "Probing the impact of valency on the routing of arginine-rich peptides into eukaryotic cells." Biochemistry **45**(4): 1116-27.
- Keller, S., I. Sauer, et al. (2005). "Membrane-mimetic nanocarriers formed by a dipalmitoylated cell-penetrating peptide." Angew Chem Int Ed Engl **44**(33): 5252-5.
- Khalil, I. A., S. Futaki, et al. (2004). "Mechanism of improved gene transfer by the N-terminal stearylation of octaarginine: enhanced cellular association by hydrophobic core formation." Gene Ther **11**(7): 636-44.
- Khalil, I. A., K. Kogure, et al. (2006). "High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression." J Biol Chem **281**(6): 3544-51.

- Klibanov, A. L., K. Maruyama, et al. (1990). "Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes." FEBS Lett **268**(1): 235-7.
- Krishan, A. (1990). "Rapid DNA content analysis by the propidium iodide-hypotonic citrate method." Methods Cell Biol **33**: 121-5.
- La, S. B., T. Okano, et al. (1996). "Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(beta-benzyl L-aspartate) block copolymer micelles." J Pharm Sci **85**(1): 85-90.
- Lamaze, C., A. Dujancourt, et al. (2001). "Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway." Mol Cell **7**(3): 661-71.
- Le, P. U., G. Guay, et al. (2002). "Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **277**(5): 3371-9.
- Le, P. U. und I. R. Nabi (2003). "Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum." J Cell Sci **116**(Pt 6): 1059-71.
- Leupold, E., H. Nikolenko, et al. (2008). "Insight into the role of HSPG in the cellular uptake of apolipoprotein E-derived peptide micelles and liposomes." Biochim Biophys Acta **1778**(12): 2781-9.
- Leupold, E., H. Nikolenko, et al. (2009). "Apolipoprotein E peptide-modified colloidal carriers: The design determines the mechanism of uptake in vascular endothelial cells." Biochim Biophys Acta **1788**(2): 442-9.
- Lewin, M., N. Carlesso, et al. (2000). "Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells." Nat Biotechnol **18**(4): 410-4.
- Lewis, W. H. (1931). "Pinocytosis." Bull. Johns Hopkins Hosp. **49**: 17-23.
- Lindahl, U., M. Kusche-Gullberg, et al. (1998). "Regulated diversity of heparan sulfate." J Biol Chem **273**(39): 24979-82.
- Lipinski, C. A., F. Lombardo, et al. (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Adv Drug Deliv Rev **46**(1-3): 3-26.
- Lukyanov, A. N., Z. Gao, et al. (2002). "Polyethylene glycol-diacyl lipid micelles demonstrate increased accumulation in subcutaneous tumors in mice." Pharm Res **19**(10): 1424-9.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-41.
- Mahley, R. W., Y. Huang, et al. (1999). "Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes." J Lipid Res **40**(11): 1933-49.
- Mahley, R. W., T. L. Innerarity, et al. (1984). "Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function." J Lipid Res **25**(12): 1277-94.
- Mahley, R. W. und Z. S. Ji (1999). "Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E." J Lipid Res **40**(1): 1-16.
- Marty, C., C. Meylan, et al. (2004). "Enhanced heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of cell-penetrating peptide-modified liposomes." Cell Mol Life Sci **61**(14): 1785-94.

- Maxfield, F. R. und T. E. McGraw (2004). "Endocytic recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 121-32.
- McDonagh, C. F., E. Turcott, et al. (2006). "Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment." Protein Engineering, Design and Selection **19**(7): 299-307.
- McGill, H. C., Jr. und C. A. McMahan (1998). "Determinants of atherosclerosis in the young. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group." Am J Cardiol **82**(10B): 30T-36T.
- Mehnert, W. und K. Mäder (2001). "Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications." Advanced Drug Delivery Reviews **47**(2-3): 165-196.
- Meier, O., K. Boucke, et al. (2002). "Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake." J Cell Biol **158**(6): 1119-31.
- Miller, G. (2002). "DRUG TARGETING: Breaking Down Barriers." Science **297**(5584): 1116-1118.
- Miller, K., M. Shipman, et al. (1991). "Transferrin receptors promote the formation of clathrin lattices." Cell **65**(4): 621-32.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mulder, W. J., G. J. Strijkers, et al. (2007). "Molecular imaging of macrophages in atherosclerotic plaques using bimodal PEG-micelles." Magn Reson Med **58**(6): 1164-70.
- Naghavi, M., P. Libby, et al. (2003). "From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II." Circulation **108**(15): 1772-8.
- Nakase, I., A. Tadokoro, et al. (2007). "Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis." Biochemistry **46**(2): 492-501.
- Oehlke, J., G. Wallukat, et al. (2004). "Enhancement of intracellular concentration and biological activity of PNA after conjugation with a cell-penetrating synthetic model peptide." Eur J Biochem **271**(14): 3043-9.
- Okamoto, T., A. Schlegel, et al. (1998). "Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane." J Biol Chem **273**(10): 5419-22.
- Oliveira, S., I. van Rooy, et al. (2007). "Fusogenic peptides enhance endosomal escape improving siRNA-induced silencing of oncogenes." Int J Pharm **331**(2): 211-4.
- Omidi, Y., L. Campbell, et al. (2003). "Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies." Brain Res **990**(1-2): 95-112.
- Pardridge, W. M., J. Eisenberg, et al. (1985). "Human blood-brain barrier insulin receptor." J Neurochem **44**(6): 1771-8.
- Pardridge, W. M. und W. H. Oldendorf (1975). "Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids." Biochim Biophys Acta **401**(1): 128-36.

- Piedrahita, J. A., S. H. Zhang, et al. (1992). "Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4471-5.
- Pillay, C. S., E. Elliott, et al. (2002). "Endolysosomal proteolysis and its regulation." Biochem J **363**(Pt 3): 417-29.
- Pitas, R. E., T. L. Innerarity, et al. (1979). "Rate and equilibrium constants for binding of apo-E HDLc (a cholesterol-induced lipoprotein) and low density lipoproteins to human fibroblasts: evidence for multiple receptor binding of apo-E HDLc." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(5): 2311-5.
- Pluddemann, A., C. Neyen, et al. (2007). "Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands." Methods **43**(3): 207-17.
- Pollack, A. und G. Ciancio (1990). "Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation." Methods Cell Biol **33**: 19-24.
- Poon, G. M. und J. Gariepy (2007). "Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells." Biochem Soc Trans **35**(Pt 4): 788-93.
- Prochiantz, A. (1996). "Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides." Curr Opin Neurobiol **6**(5): 629-34.
- Provoda, C. J. und K. D. Lee (2000). "Bacterial pore-forming hemolysins and their use in the cytosolic delivery of macromolecules." Adv Drug Deliv Rev **41**(2): 209-21.
- Radel, C., M. Carlile-Klusacek, et al. (2007). "Participation of caveolae in [beta]1 integrin-mediated mechanotransduction." Biochemical and Biophysical Research Communications **358**(2): 626-631.
- Rall, S. C., Jr., K. H. Weisgraber, et al. (1982). "Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence." J Biol Chem **257**(8): 4171-8.
- Ralph, P. und I. Nakoinz (1977). "Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS." J Immunol **119**(3): 950-54.
- Ramprasad, M. P., V. Terpstra, et al. (1996). "Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14833-8.
- Raschke, W. C., S. Baird, et al. (1978). "Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus." Cell **15**(1): 261-7.
- Razani, B., S. E. Woodman, et al. (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." Pharmacol Rev **54**(3): 431-67.
- Richard, J. P., K. Melikov, et al. (2005). "Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors." J Biol Chem **280**(15): 15300-6.
- Richard, J. P., K. Melikov, et al. (2003). "Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake." J Biol Chem **278**(1): 585-90.
- Ross, R. (1976). "Atherosclerosis: the role of endothelial injury, smooth muscle proliferation and platelet factors." Triangle **15**(2-3): 45-51.

- Rothbard, J. B., T. C. Jessop, et al. (2005). "Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells." Adv Drug Deliv Rev **57**(4): 495-504.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell **68**(4): 673-82.
- Sauer, I., I. R. Dunay, et al. (2005). "An apolipoprotein E-derived peptide mediates uptake of sterically stabilized liposomes into brain capillary endothelial cells." Biochemistry **44**(6): 2021-9.
- Sauer, I., H. Nikolenko, et al. (2006). "Dipalmitoylation of a cellular uptake-mediating apolipoprotein E-derived peptide as a promising modification for stable anchorage in liposomal drug carriers." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1758**(4): 552-561.
- Saunders, S., M. Jalkanen, et al. (1989). "Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan." J Cell Biol **108**(4): 1547-56.
- Schmid, S. L. (1997). "Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process." Annu Rev Biochem **66**: 511-48.
- Schnitzer, J. E. und P. Oh (1994). "Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins." J Biol Chem **269**(8): 6072-82.
- Schömig, A., A. Dibra, et al. (2007). "A meta-analysis of 16 randomized trials of sirolimus-eluting stents versus paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **50**(14): 1373-80.
- Seetharaman, S., M. A. Barrand, et al. (1998). "Multidrug resistance-related transport proteins in isolated human brain microvessels and in cells cultured from these isolates." J Neurochem **70**(3): 1151-9.
- Shen, W. C., J. Wan, et al. (1992). "(C) Means to enhance penetration : (3) Enhancement of polypeptide and protein absorption by macromolecular carriers via endocytosis and transcytosis." Adv Drug Deliv Rev **8**(1): 93-113.
- Sibley, L. D. (2004). "Intracellular parasite invasion strategies." Science **304**(5668): 248-53.
- Simmons, T., Y. M. Newhouse, et al. (1997). "Human low density lipoprotein receptor fragment. Successful refolding of a functionally active ligand-binding domain produced in Escherichia coli." J Biol Chem **272**(41): 25531-6.
- Simone, E., B. S. Ding, et al. (2008). "Targeted delivery of therapeutics to endothelium." Cell Tissue Res.
- Singer, S. J. und G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Skinner, M. P., C. Yuan, et al. (1995). "Serial magnetic resonance imaging of experimental atherosclerosis detects lesion fine structure, progression and complications in vivo." Nat Med **1**(1): 69-73.
- Smith, A. E. und A. Helenius (2004). "How viruses enter animal cells." Science **304**(5668): 237-42.
- Steinman, R. M., I. S. Mellman, et al. (1983). "Endocytosis and the recycling of plasma membrane." J Cell Biol **96**(1): 1-27.

- Strickland, D. K., S. L. Gonias, et al. (2002). "Diverse roles for the LDL receptor family." Trends Endocrinol Metab **13**(2): 66-74.
- Sweitzer, S. M. und J. E. Hinshaw (1998). "Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation." Cell **93**(6): 1021-9.
- Tatsuta, T., M. Naito, et al. (1992). "Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier." J Biol Chem **267**(28): 20383-91.
- Thomas, C. M. und E. J. Smart (2008). "Caveolae structure and function." J Cell Mol Med **12**(3): 796-809.
- Thoren, P. E., D. Persson, et al. (2003). "Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells." Biochem Biophys Res Commun **307**(1): 100-7.
- Torchilin, V. P. (1985). "Liposomes as targetable drug carriers." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **2**(1): 65-115.
- Torchilin, V. P., R. Rammohan, et al. (2001). "TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8786-91.
- Torchilin, V. P. und V. Weissig (2003). Liposomes - A Practical Approach, Oxford University Press.
- Toussaint, J. F., G. M. LaMuraglia, et al. (1996). "Magnetic resonance images lipid, fibrous, calcified, hemorrhagic, and thrombotic components of human atherosclerosis in vivo." Circulation **94**(5): 932-8.
- Traub, L. M. (2003). "Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection." J Cell Biol **163**(2): 203-8.
- Tunnemann, G., R. M. Martin, et al. (2006). "Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells." Faseb J **20**(11): 1775-84.
- Tyagi, M., M. Rusnati, et al. (2001). "Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem **276**(5): 3254-61.
- Van Amersfoort, E. S. und J. A. Van Strijp (1994). "Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes." Cytometry **17**(4): 294-301.
- van Driel, I. R., C. G. Davis, et al. (1987). "Self-association of the low density lipoprotein receptor mediated by the cytoplasmic domain." J Biol Chem **262**(33): 16127-34.
- van Holde, K. E., W. C. Johnson, et al. (1998). Principles Of Physical Biochemistry, Prentice Hall.
- Vereb, G., J. Szollosi, et al. (2003). "Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8053-8.
- Virmani, R., F. D. Kolodgie, et al. (2000). "Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1262-75.
- Vives, E. (2005). "Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: "is the Trojan horse too wild to go only to Troy?"" J Control Release **109**(1-3): 77-85.

- Vives, E., P. Brodin, et al. (1997). "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus." J Biol Chem **272**(25): 16010-7.
- Vucic, E., H. M. Sanders, et al. (2009). "Well-defined, multifunctional nanostructures of a paramagnetic lipid and a lipopeptide for macrophage imaging." J Am Chem Soc **131**(2): 406-7.
- Wadia, J. S., R. V. Stan, et al. (2004). "Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis." Nat Med **10**(3): 310-5.
- Wang, L. H., K. G. Rothberg, et al. (1993). "Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation." J Cell Biol **123**(5): 1107-17.
- Weinstein, J. N., R. Blumenthal, et al. (1986). "Carboxyfluorescein leakage assay for lipoprotein-liposome interaction." Methods Enzymol **128**: 657-68.
- Weisgraber, K. H. (1994). "Apolipoprotein E: structure-function relationships." Adv Protein Chem **45**: 249-302.
- Weisgraber, K. H., T. L. Innerarity, et al. (1983). "The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding." J Biol Chem **258**(20): 12348-54.
- Weisgraber, K. H., S. C. Rall, Jr., et al. (1986). "Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3." J Biol Chem **261**(5): 2068-76.
- Weishaupt, D., V. D. Köchli, et al. (2006). Wie funktioniert MRI?, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Wetterau, J. R., L. P. Aggerbeck, et al. (1988). "Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains." J Biol Chem **263**(13): 6240-8.
- Win, K. Y. und S. S. Feng (2006). "In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation." Biomaterials **27**(10): 2285-91.
- Wolf, Y., S. Pritz, et al. (2006). "Structural requirements for cellular uptake and antisense activity of peptide nucleic acids conjugated with various peptides." Biochemistry **45**(50): 14944-54.
- Zhang, W., J. Mojsilovic-Petrovic, et al. (2003). "The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels." Faseb J **17**(14): 2085-7.
- Zorko, M. und U. Langel (2005). "Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery." Adv Drug Deliv Rev **57**(4): 529-45.

VII. Anhang

1. Wissenschaftliche Veröffentlichungen

1.1. Publikationen

“Apolipoprotein E-derived peptide containing lipid nanoparticles for molecular imaging of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice”

Vucic E.*, Leupold E.*, Mulder W.J.M., Briley-Saebo K., Amirbekian V., Sanders H.M.H.F., Nicolay K., Fischer E., Fuster V., Dathe M., Fayad Z.A.

in Revision, *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, * als gleichberechtigte Autoren

“Colloidal Drug Carrier targeted by ApoE-derived Peptides: Effect of the Carrier on the Uptake Mechanism in Vascular Endothelial Cells”

Leupold E., Nikolenko H., Dathe M.

Biochimica et Biophysica Acta (2009) 1788(2), 442-449

“Well-defined, Multifunctional Nanostructures of a Paramagnetic Lipid and a Lipopeptide for Macrophage Imaging”

Vucic E., Sanders H.M.H.F., Arena F., Terreno E., Aime S., Nicolay K., Leupold E., Dathe M., Sommerdijk N.A.J.M., Fayad Z.A., Mulder W.J.M.

Journal of the American Chemical Society (2009) 131(2), 406-407

“Incorporation of an ApoE-derived lipopeptide in high density lipoprotein MRI contrast agents for enhanced imaging of macrophages in atherosclerosis”

Chen W., Vucic E., Leupold E., Cormode D., Briley-Saebo K., Mulder W.J.M., Fisher E.A., Fayad Z.A.

Contrast Media and Molecular Imaging (2008) 3(6), 233-42

“Insight into the role of HSPG in the cellular uptake of apolipoproteinE-derived peptide micelles and liposomes”

Leupold E., Nikolenko H., Beyermann M., Dathe M.

Biochimica et Biophysica Acta (2008) 1778(12), 2781-2789

1.2. Vorträge

“Colloidal Drug Carrier targeted by ApoE-derived Peptides:

Uptake in Brain Capillary and Large Vascular Endothelial Cells”

10. Treffen der Blut-Hirn Schranke – Experten und Caco-2 Anwender, Bad Herrenalb, Mai 2008

“The ApoE-derived Peptide P2A2”

Imaging Science Laboratories von Prof. Z.A. Fayad, Mount Sinai School of Medicine,

New York, USA, April 2007

“The Uptake Mechanism of an ApoE-derived Peptide Depends on its Aggregational State”

8th MDC / FMP PhD Student Retreat, Motzen, September 2006

“The Uptake Mechanism of an ApoE-derived Peptide Depends on its Aggregational State”

10th Annual Liposome Research Days, Chapel Hill, USA, Mai 2006

“Cell Penetrating A2 Peptides”

International Symposium EU Project QLK3-CT-2002-01989, Berlin, Oktober 2005

1.3. Poster

“Molecular Imaging of Atherosclerosis using PEG-Micelles targeted by an ApoE-derived Peptide”

Leupold E., Vucic E., Mulder W.J.M., Dathe M. and Fayad Z.A.

16th Scientific Meeting of the ISMRM, Toronto, Kanada, Mai 2008

“Peptide Micelles and Modified Liposomes: Differences in their Mode of Cellular Uptake”

Leupold E., Keller S., Bienert M., Dathe M.

2nd Workshop on Biophysics of Membrane-active Peptides, Lissabon, Portugal, April 2007

“Cellular Uptake of Peptide Micelles and Liposomes”

Leupold E., Keller S., Bienert M., Dathe M.

ILS 2006 Annual Meeting: Liposome Advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery

London, GB, Dezember 2006

“The Uptake Mechanism of an ApoE-derived Peptide Depends on its Aggregational State”

Leupold E., Keller S., Nikolenko H., Bienert M., Dathe M.

Particles 2006, Orlando, USA, Mai 2006

“The Uptake Mechanism of an ApoE-derived Peptide Depends on its Aggregational State”

Leupold E., Keller S., Nikolenko H., Bienert M., Dathe M.

2nd Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology, Berlin, April 2006

“A Set of Novel Lipopeptides for Targeting of Liposomal Drug Carriers”

Leupold E., Sauer I., Nikolenko H., Bienert M., Dathe M.

GBM Herbsttagung, Berlin, September 2005

“A Set of Novel Lipopeptides for Targeting of Liposomal Drug Carriers”

Leupold E., Sauer I., Nikolenko H., Bienert M., Dathe M.

7th MDC / FMP PhD Student Retreat, Strausberg, September 2005

“A Set of Novel Lipopeptides for Targeting of Liposomal Drug Carriers”

Leupold E., Sauer I., Keller S., Gast K., Nikolenko H., Bienert M., Dathe M.

Molecular Interactions Workshop, Berlin, Juli 2005

2. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten