

Charakterisierung von Cu/Nanocarrier-Komplexen im zellulären System

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

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität

vorgelegt von

Susanne Fehse

aus Berlin

Dezember 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Multhaup sowie von Prof. Dr. Markus Wahl im Zeitraum von Dezember 2007 – Dezember 2014 am Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereiches Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Wahl
2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

Disputation am: 25.03.2015

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	5
SUMMARY	6
1. EINLEITUNG	9
1.1 Alzheimer Krankheit	9
1.1.1 Biochemische und molekularbiologische Grundlagen	9
1.1.2 Einfluss von Cu auf die Alzheimer Krankheit	13
1.2 Therapeutische Ansätze in der Alzheimer Krankheit	16
1.2.1 Aktuelle Therapien	16
1.2.2 Cu-Zugabe als therapeutischer Ansatz	18
1.2.3 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke als essentieller Faktor	19
1.3 Nanocarrier	20
1.3.1 In dieser Arbeit verwendete dendritische Nanocarrier: CMS, CSNP1 und CSNP2	22
1.4 Zielsetzung	23
2 ERGEBNISSE	25
2.1 Cu-Beladung der NPs	25
2.2 Metall-Bindungsstudien der NPs	25
2.3 Toxizität der Cu/NP-Komplexe	28
2.3.1 Toxizität auf SH-SY5Y-Zellen	29
2.3.2 Toxizität auf HEK293T-Zellen	30
2.3.3 Toxizität auf HBMEC-Zellen	31
2.4 Zelluläre Cu/NP-Aufnahme	31
2.4.1 Zelluläre Cu-Aufnahme nach Cu/NP-Inkubation	31
2.4.2 Zelluläre NP-Aufnahme nach Cu/NP-Inkubation	33
2.5 Einfluss von Cu/NP oder Zn/NP auf den zellulären Zn-Level	33
2.6 Analyse des zellulären Aufnahmemechanismus von Cu/NP	35
2.7 Zelluläre Cu-Bioverfügbarkeit: Cu-Detektion mittels des MRE-GFP-Konstrukts	36
2.8 pH-abhängige Cu-Freigabe aus dem Cu/NP-Komplex	38
2.9 Analyse der APP-Prozessierung nach Cu/NP-Behandlung	39

2.10 Analyse des Transports von Cu/NP-Komplexen über die Bluthirnschranke	42
2.10.1 Etablierung eines HBMEC-Mono-Zell-Modells der Bluthirnschranke	43
2.10.2 Bluthirnschrankengängigkeit von Cu/NP-Komplexen	49
2.10.3 Vergleichende Permeabilitätsanalysen der Testsubstanzen und Cu/NPs	50
2.11 Auswirkungen von Cu/CSNP1 im Tierversuch	51
2.11.1 Überlebensrate und Gewichtsanalyse	51
2.11.2 Leberanalyse	53
2.11.3 Analyse des Cu-Levels des Blutes	55
2.11.4 Analyse des Cu-Levels des Hirns	56
2.11.5 Analyse des A β -Levels im Hirn	57
2.12 Kurzzusammenfassung der Ergebnisse	59
3 DISKUSSION	61
3.1 Cu-Bindungseigenschaften der NPs	61
3.2 Zelluläre Cu/NP Aufnahme	62
3.3 Cu-Bioverfügbarkeit nach Cu-Freigabe	64
3.4 Fehlender Einfluss auf die APP-Prozessierung	67
3.5 Überwindung der Bluthirnschranke	68
3.5.1 Erfolgreiche Etablierung eines HBMEC-Mono-Zell-Modells als Modell der Bluthirnschranke	68
3.5.2 Potential der Cu/NPs zur Überwindung der Bluthirnschranke	70
3.6 Cu/CSNP1 im Tierversuch	72
3.7 Zur Pharmakokinetik der Cu/NP-Komplexe	74
3.8 Ausblick: Potential der Cu/NP-Komplexe in der Therapie der Alzheimer Krankheit	75
4 MATERIAL UND METHODEN	76
4.1 Allgemeine Angaben	76
4.1.1 Geräte	76
4.1.2 Materialien	78
4.1.3 Chemikalien, Medien, Medienzusätze und Pufferlösungen	78
4.1.4 Nanocarrier CMS, CSNP1 und CSNP2	78
4.1.5 Software	79
4.1.6 Statistik	79

4.2 Analytische Methoden	80
4.2.1 Spektroskopische Messungen	80
4.2.1.2 pH-abhängige Cu-Freigabe aus den NP-Komplexen	80
4.2.1.3 Metall-Bindungsstudien mittels Zentrifugalfiltration	81
4.2.2 ICP-MS-Analysen	81
4.3 Molekularbiologische Methoden	82
4.3.1 Chemische Transformation	82
4.3.2 Plasmidpräparation	83
4.3.3 PCR zur Genotypisierung von APPPS1-Mäusen	83
4.3.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	83
4.3.5 ELISA	84
4.3.3 SDS-PAGE und Western Blot	85
4.4 Zellbiologische Methoden	86
4.4.1 Zellkultivierung der Zelllinien HBMEC, HEK293T und SH-S5Y5	86
4.4.2 Kryogene Lagerung der Zelllinien	87
4.4.3 Toxizitätsassay	88
4.4.4 Mikroskopische Aufnahmen	89
4.4.4.1 Immunfluoreszenz-Analysen	89
4.4.5 Intrazellulärer Cu-Level	89
4.4.6 Transportstudien	90
4.4.7 Analyse der Cu-Bioverfügbarkeit mittels des MRE-GFP Detektionssystem	90
4.4.8 Analyse der APP-Prozessierung	91
4.4.9 Permeabilitäsanalysen mittels des HBMEC-Mono-Zell-Modells der Bluthirnschranke	92
4.5 Tierbiologische Methoden	93
4.5.1 APPPS1-Mäuse	93
4.5.2 APPPS1-Zucht	94
4.5.3 Gewebeverdau	94
4.5.4 Tierversuch mit Cu/CSNP1-Komplexen	95
4.5.5 Abschlussuntersuchung der Versuchstiere	96
4.5.6 Aufbereitung der Hemisphären für ELISA und Western Blot	97
4.5.7 Leberfixierung, -einbettung und HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) der Leberschnitte	97
5 LITERATURVERZEICHNIS	98

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	112
6.1 Ein- und Drei-Buchstabencode der Aminosäuren	115
6.2 Ein-Buchstabencode der DNA-Basen	115
7 ANHANG	116
7.1 Publikationen	116
7.2 Lebenslauf	118
7.3 Danksagung	119

Zusammenfassung

In der neurodegenerativen Alzheimer Krankheit (AD) ist neben anderen Einflüssen Kupfer (Cu) ein starker Einflussfaktor. Im Gehirn von AD-Patienten kommt es zu einer gestörten Cu-Homöostase. Cu beeinflusst die Expression, Lokalisierung und Prozessierung von „amyloid precursor protein“ (APP), aus dem durch proteolytische Spaltung toxische Amyloid- β -Peptide ($A\beta$) entstehen können, die als ursächlich für die AD angesehen werden. Von daher ist die Verabreichung von Cu(II) ein potenzieller therapeutischer Ansatz und die Auswirkungen einer Cu(II)-Gabe auf die AD-Symptomatik wurden bereits in mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht. In der vorliegenden Arbeit werden drei Nanopartikel (NPs) näher charakterisiert, die mit Cu(II)-Ionen beladen werden können und damit ein Vehikel für eine Cu-basierte Therapie darstellen könnten. Diese NPs wurden strukturell in ihren chemischen Eigenschaften untersucht und in zellulären Systemen sowie im Mausmodell getestet.

Alle drei NPs weisen eine dendritische Kern-Hülle-Architektur auf. Bei CMS („core-multishell NP“) wird Cu(II) im Polyethylenimin-Kern (Freedman et al.) gebunden. Bei den beiden strukturell gleich aufgebauten, sich aber in der Größe unterscheidenden „core-shell NPs“ (CSNPs) hingegen erfolgt die Cu(II)-Bindung in der N¹,N¹,N²-Trimethylethan-1,2-diamin-Hülle (TMEDA).

Zu den untersuchten Eigenschaften der NPs gehören die Cu(II)-Bindekapazität, die Cu(II)-Bindespezifität, die pH-abhängige Cu-Freigabe und die zelluläre Toxizität. Darauf aufbauend konnte gezeigt werden, dass eine Cu/NP-Behandlung im Zellkultur-System zu gesteigerten zellulären Cu-Konzentrationen und größtenteils zu einer erhöhten Cu-Bioverfügbarkeit führt. Zudem wurde der Effekt auf die APP-Prozessierung *in vitro* untersucht. Mit Hilfe eines eigens etablierten *in vitro*-Modells der Bluthirnschranke (BBB) konnte gezeigt werden, dass die beiden Cu/NP-Komplexe Cu/CMS und Cu/CSNP₁ mutmaßlich die BBB passieren können, während Cu/CSNP₂ diese Barriere nicht überwinden kann. Aufgrund aussichtsreicher Eigenschaften wie erhöhter Cu-Bioverfügbarkeit und BBB-Gängigkeit wurde Cu/CSNP₁ im Tierversuch mit AD-Mäusen getestet. Die erhofften positiven Auswirkungen, wie erhöhte Cu-Konzentrationen im Gehirn oder verringerte $A\beta$ -Konzentrationen, ließen sich jedoch nicht beobachten.

Insgesamt zeigten sich *in vitro* vielversprechende Eigenschaften der Cu/NP-Komplexe in Hinblick auf eine mögliche therapeutische Behandlung der AD, allerdings wurden auch Defizite in den zellulären Auswirkungen der Cu/NPs festgestellt. Die dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können genutzt werden, die NPs dank der vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus, ihrer Größe und ihrer Ladung zielgerichtet weiterzuentwickeln.

Summary

In the neurodegenerative Alzheimer's disease (AD) copper (Cu) has a big impact, among other factors. In the brain of AD patients an imbalanced Cu homeostasis was detected. Furthermore, Cu influences expression, localization and processing of amyloid precursor protein (APP). Proteolytic cleavage of APP can result in the generation of toxic amyloid- β peptides ($A\beta$), which are seen as the cause for AD. Therefore Cu(II) treatment is seen as a potential therapeutic approach and was already investigated in several *in vitro* and *in vivo* studies. On this background three different nanoparticles (NPs), that can bind Cu(II) ions were analyzed as a part of this thesis. The NPs were examined with regard to their chemical properties and their behavior in cellular systems as well as in a mouse model.

The three NPs are composed of a dendritic core-shell architecture. The core-multishell NP (CMS) is able to bind Cu(II) within the polyethylenimine (PEI) core. In contrast, the Cu(II) binding of the two core-shell NPs (CSNPs) takes place in the N^1,N^1,N^2 -trimethylethane-1,2-diamine (TMEDA) shell. CSNP1 and CSNP2 have an identical composition, but differ in their size.

The characteristics of the Cu/NP complexes like Cu(II)-binding capacity, Cu(II)-binding specificity, pH-dependent Cu release and cellular toxicity were analyzed. Additionally, it was revealed that Cu/NP treatment leads to an increase of the cellular Cu level and for the most parts to an increased cellular Cu bioavailability. Furthermore, the influence of the APP cleavage was investigated *in vitro*. Establishing an *in vitro* model of the blood-brain barrier (BBB) it could be revealed, that the two NPs Cu/CMS and Cu/CSNP1 have the ability to cross the BBB, whereas the Cu/CSNP2 is not able to pass this barrier. Due to these promising results, e.g. Cu bioavailability and BBB-crossing ability, Cu/CSNP1 was tested in an AD-mouse model. Unfortunately, no positive effects like increased Cu levels in the brain or decreased $A\beta$ levels were detected.

In general, many promising properties of the Cu/NP complexes were determined *in vitro* that support a therapeutic approach for AD. On the other hand, a couple of deficits were found regarding the cellular effects of the Cu/NPs. The findings of this thesis will help to optimize the NPs due to the large array of possibilities to change their composition, size and charge, and could overall lead to a prospective development for this therapeutic approach easing AD.

1. Einleitung

1.1 Alzheimer Krankheit

Weltweit waren im Jahr 2006 ungefähr 26,6 Millionen Menschen von der Alzheimer Krankheit (AD = Alzheimer's Disease) betroffen und nach Schätzungen wird bis zum Jahr 2050 die Zahl der Alzheimer Patienten auf 106 Millionen steigen (Brookmeyer et al., 2007). Diese große Zahl an Erkrankten erfordert die Erforschung der Hintergründe dieser Krankheit und darauf basierend die Entwicklung neuer Therapien.

1.1.1 Biochemische und molekularbiologische Grundlagen

Die AD zeichnet sich durch einen drastischen und fortschreitenden Abfall der kognitiven Leistungen und insbesondere durch einen starken Gedächtnisverlust aus. Im Verlauf kann es zu einem kompletten Persönlichkeitsverlust kommen und/oder zu einem starken körperlichen Zerfall wie Gewichtsverlust, Bettlägerigkeit oder Inkontinenz („About Alzheimer's Disease: Symptoms“, National Institute of Aging, USA, Stand 04.09.2014). Erstmals wurde diese Krankheit im Jahre 1906 von dem Neuropathologen Alois Alzheimer anhand seiner Patientin Auguste D. beschrieben (Alzheimer, 1907). Schon bald wurden ähnliche Fälle dokumentiert und die AD wurde als eigenständige Krankheit anerkannt (Berchtold and Cotman, 1998).

Das Altern wird als der größte Risikofaktor angesehen, da die häufigsten AD-Fälle ab einem Alter von 65 Jahren auftreten (Brookmeyer et al., 1998, Bermejo-Pareja et al., 2008, Reitz and Mayeux, 2014). Pathologische AD-Merkmale sind fortschreitende Atrophie des Gehirns (Abb. 1) und extrazelluläre amyloide Ablagerungen (Plaques) (Alzheimer, 1907, Holtzman et al., 2011).

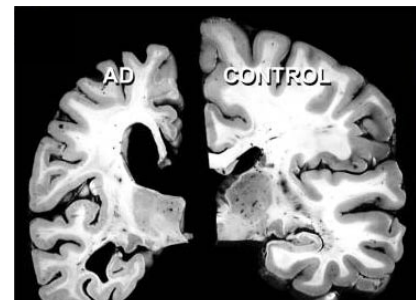


Abb.1: Atrophie im AD-Hirn im Vergleich zu gesunden Gehirn (Holtzman et al., 2011).

Die amyloiden Plaques bestehen überwiegend aus A β -Peptiden (Glennner and Wong, 1984, Masters et al., 1985). Diese wiederum sind Prozessierungsprodukte des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP = „amyloid precursor protein“) bei der amyloidogenen Spaltung (Kang et al., 1987). Dabei wird APP zunächst durch die β -Sekretase (BACE = „ β -site cleaving enzyme“) in ein kurzes C-terminales (β -CTF = „ β -c-terminal fragment“) und in großes N-terminales Fragment ($sAPP\beta$ = „soluble APP- β “) gespalten (Haass and Selkoe, 1993, Vassar et al., 1999) (Abb. 2). Das β -CTF-Fragment wird anschließend sequenziell von der γ -Sekretase gespalten und es entstehen

verschieden lange A β -Peptide sowie die intrazelluläre Domäne (AICD = „APP intracellular domain“) (Wang et al., 1996) (Abb. 2). Die freigesetzten A β -Peptide werden dabei nach ihrer Peptidlänge benannt, wie A β ₄₂ für ein Peptid mit 42 Aminosäuren (AS). Während A β ₄₀ am häufigsten auftritt, ist das A β ₄₂-Peptid als Hauptbestandteil der A β -Plaques ein zentraler Bestandteil der Amyloid-Hypothese (Hardy and Selkoe, 2002). Obwohl diese amyloidogene APP-Prozessierung als grundlegender AD-Mechanismus angesehen wird, findet sie nur zu ca. 10% statt.

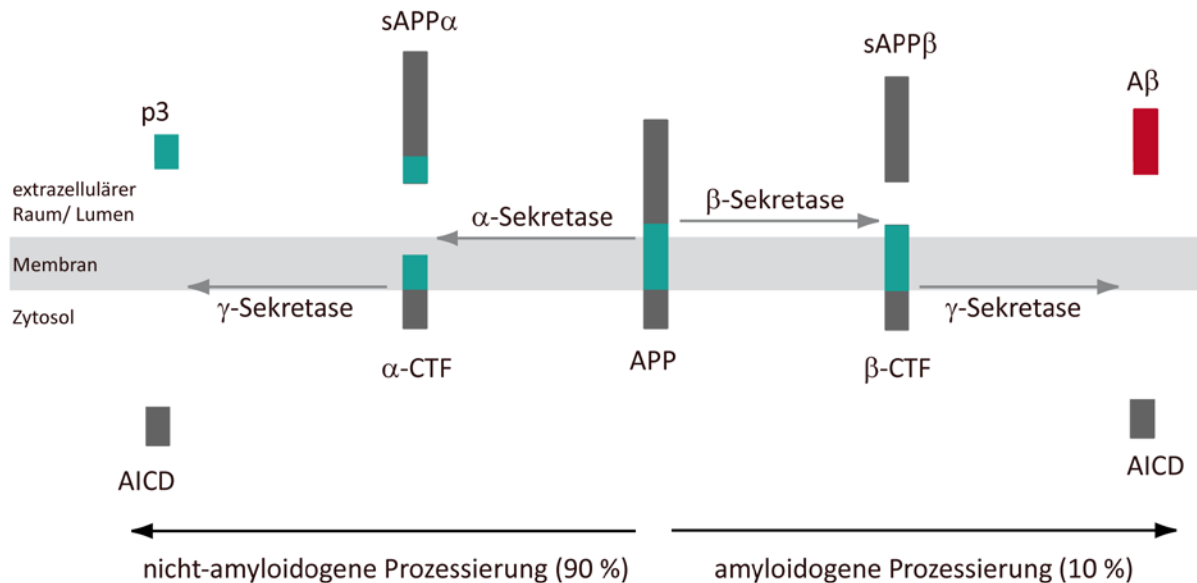


Abb. 2: Prozessierungswege des APPs. Bei der amyloidogenen Spaltung entstehen durch β - und γ -Sekretase zunächst die Fragmente sAPP β (extrazellulär) und β -CTF (membranständig) sowie anschließend AICD (intrazellulär) und A β (extrazellulär). Die nicht-amyloidogene Spaltung führt durch die α -Sekretase zu sAPP α (extrazellulär) und α -CTF (membranständig) und darauffolgend durch die γ -Sekretase zu AICD (intrazellulär) und p3 (extrazellulär).

Neben der amyloidogenen Prozessierung existiert die viel häufiger vorkommende nicht-amyloidogene Prozessierung des APPs. Hierbei wird APP durch die α -Sekretase in extrazelluläres sAPP α („soluble APP- α “) und membranständiges α -CTF („ α -C-terminal fragment“) gespalten (Postina et al., 2004) (Abb. 2). Die γ -Sekretase spaltet α -CTF weiter in das p3-Fragment und AICD (Haass et al., 1993) (Abb. 2).

Obwohl die A β -Plaques ein Charakteristikum der AD sind, korreliert die Menge an Plaques nicht mit der Schwere der Krankheit. Dies stellte eindrucksvoll Schwester Mary als Teilnehmerin der Nonnenstudie unter Beweis, die höchste Werte in kognitiven Tests kurz vor ihrem Tod mit 101 Jahren aufwies, jedoch im *post mortem* analysierten Hirn eine Vielzahl an A β -Plaques aufwies (Snowdon, 1997). Zudem wurde in transgenen AD-Mäusen Neurodegeneration vor dem Entstehen der ersten A β -Plaques beobachtet (Schmitz et al., 2004). Aufgrund dessen richtete sich

der Fokus auf die löslichen, niederen A β -Oligomere. So korrelieren lösliche A β -Spezies besser mit dem Krankheitsverlauf als die Menge von A β -Plaques (Snowdon, 1997, McLean et al., 1999, Wang et al., 1999, Naslund et al., 2000).

Die Atrophie des AD-Gehirns wird als unmittelbare Ursache der Demenz angesehen (Holtzman et al., 2011). Bislang ist in diesem Zusammenhang die neurotoxische Wirkungsweise der A β -Peptide noch nicht genau geklärt (Hardy and Selkoe, 2002). Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass A β , insbesondere A β ₄₂ als niederes Oligomer nicht jedoch als Monomer oder in fibrillärer Form toxisch wirkt (Walsh et al., 2002, Walsh and Selkoe, 2007, Harmeier et al., 2009). Durch die Zugabe von A β -Dimeren und -Trimeren wurde in Hippocampuschnitten eine reduzierte Dichte an dendritischen Dornen, Komponenten der postsynaptischen Zelle, induziert, wodurch ein Verlust an aktiven Synapsen angenommen wird (Shankar et al., 2007). Zusammengefasst wird vermutet, dass im frühen Stadium der AD zunächst eine Schädigung der Synapsen und im späteren AD-Stadium ein Neuronenverlust auftritt (Castellani et al., 2008).

Unter Berücksichtigung der toxischen Wirkung von niederen A β -Oligomeren stellt die Aggregation von A β möglicherweise einen Schutzmechanismus dar (Giuffrida et al., 2009, Wisniewski et al., 2011). Die Aggregation der hydrophoben A β ₄₀- und A β ₄₂-Peptide in Form von Oligomeren, Fibrillen und Plaques wird durch die Umlagerung von der α -helikalen- zu einer β -Faltblatt-Struktur im wässrigen Milieu begünstigt (Simmons et al., 1994, Xu et al., 2005).

Während die amyloidogene APP-Prozessierung im gesunden Gehirn zu lediglich 10% stattfindet, erfolgt zu 90% die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung. Aufgrund dessen ist es von großem Interesse, die bisher noch nicht hinreichend geklärte physiologische Funktion von APP und dessen Spaltprodukten besser zu verstehen. Generell kommt APP im menschlichen Körper unter anderen in den drei Isoformen von 695 AS (APP₆₉₅), 751 AS (APP₇₅₁) und 770 AS (APP₇₇₀) Länge vor (Selkoe et al., 1988). Die APP₆₉₅-Isoform kommt ausschließlich in neuronalem Gewebe vor (Wertkin et al., 1993). APP ist ein 110 – 130 kDa großes Typ-I-Transmembranprotein, das aus einer relativ großen N-terminalen, extrazellulären Domäne (Ektodomäne), einer Transmembransequenz (TMS) und einem relativ kleinen C-terminalen, intrazellulären Bereich aufgebaut ist (Kang et al., 1987, Selkoe et al., 1988, Weidemann et al., 1989). Im C-Terminus befindet sich die Konsensussequenz zur Clathrin-vermittelten Internalisierung (Chen et al., 1990). In der Transmembransequenz ist zum großen Teil die A β -Sequenz lokalisiert. Die meisten funktionellen und strukturellen Domänen sind in der Ektodomäne angeordnet. Dort befinden sich unter anderem zwei Heparin-bindende Domänen (HBD), die „loop“-Region, eine Kollagen-

indende Domäne sowie eine Kupfer(Cu)- und eine Zink(Harmeier et al.)-Bindungsstelle (Kang et al., 1987, Bush et al., 1993, Multhaup et al., 1994, Beher et al., 1996, Rossjohn et al., 1999).

Aufgrund der Lokalisierung an der Zelloberfläche, der Heparin- und Kollagenbindungsstellen und der Ausbildung von Homodimeren wird für APP eine Funktion als Zelloberflächenrezeptor oder in der Vermittlung von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen diskutiert (Kang et al., 1987, Breen et al., 1991, Chen and Yankner, 1991, Soba et al., 2005, Kaden et al., 2009). Für das Spaltprodukt sAPP α wurde gezeigt, dass es neuroprotektiv wirkt (Furukawa et al., 1996). Interessanterweise gibt es für das als neurotoxisch angesehene A β 42 neue Erkenntnisse, die zeigen, dass in pikomolaren Konzentrationen eine Steigerung der synaptischen Plastizität und Lernfähigkeit erreicht werden kann (Puzzo and Arancio, 2013). Möglicherweise ermöglicht dies einen völlig neuen Blickwinkel auf die Bewertung der amyloidogenen APP-Prozessierung.

Viele molekularbiologischen Zusammenhänge der Ursachen der AD wurden durch genetische Veränderungen in Patienten mit familiären AD-Mutationen (FAD = „familiar AD“) erforscht. FAD-Patienten umfassen eine Gruppe von weniger als 5% der AD-Fälle, bei denen die Krankheit vor dem 65. Lebensjahr auftritt (Piaceri et al., 2013). FADs haben die Gemeinsamkeit, dass sich die ausgeprägte AD-Symptomatik auf Mutationen in einzelnen Proteinen, wie APP, PS2 oder PS1, der katalytischen Untereinheit der γ -Sekretase, zurückführen lässt (St George-Hyslop, 2000, Piaceri et al., 2013). Als Beispiel kann die „swedish mutation“ (sw) im APP genannt werden, bei der ein K596N/M597L AS-Austausch (nach APP695-Transkriptnummerierung) vorliegt und die Krankheit mit ungefähr 55 Jahren auftritt (Mullan et al., 1992). Auch Patienten mit Down Syndrom weisen eine stark erhöhte Wahrscheinlichkeit für AD auf, da das APP-Gen auf dem bei diesen Patienten dreifach vorliegenden Chromosom 21 liegt (Kang et al., 1987, Gyure et al., 2001).

Neben genetischen Faktoren werden im Zusammenhang mit der AD auch Entzündungsprozesse oder oxidative Stressreaktionen kontrovers entweder als vorgelagerte Ursache oder als nachgelagerte Folge der Amyloid-Kaskade diskutiert (Mrak and Griffin, 2007, Castellani et al., 2008, Galimberti and Scarpini, 2011).

Vielfach werden bei AD-Patienten neben A β -Plaques auch intrazelluläre Tau-Aggregate entdeckt (Holtzman et al., 2011). Dabei handelt es sich um krankhaft abgelagerte Tau-Proteine in Form von Neurofibrillen, die innerhalb der Zelle Störungen der Stabilität und des Transports auslösen können (Zempel and Mandelkow, 2014). Aufgrund des Vorkommens von Tau-Aggregaten in anderen neurodegenerativen Erkrankungen ist die spezifische Bedeutung dieser Aggregate für die AD noch nicht ausreichend geklärt (Hardy and Selkoe, 2002, Goedert and Spillantini, 2006).

Diese Erkenntnisse zusammengenommen zeigen auf, dass die AD-Pathologie komplex ist und kausale Zusammenhänge teils noch nicht hinreichend erforscht sind.

1.1.2 Einfluss von Cu auf die Alzheimer Krankheit

Ein weiteres Kennzeichen der AD ist eine gestörte Cu-Homöostase im Gehirn. Ein erster Hinweis, dass Cu in die AD-Vorgänge involviert ist, lieferte eine Studie, in der im Gehirn – insbesondere im Hippocampus – von AD-Patienten erniedrigte Cu-Level detektiert wurden (Deibel et al., 1996). Dieses wird seitdem kontrovers diskutiert. So gibt es Studien, die bezüglich des Cu-Levels im Liquor (CSF = „cerebrospinal fluid“) keine Unterschiede zwischen AD-Patienten und gesunden Personen feststellen können (Basun et al., 1991, Gerhardsson et al., 2008) oder gar von einem erhöhten Cu-Level bei AD-Patienten sprechen (Hozumi et al., 2011). Möglicherweise sind diese Unterschiede methodischer Natur. So ist bereits bekannt, dass die Cu-Konzentrationen in den einzelnen Hirnregionen stark variieren (Harrison et al., 1968) und somit die Betrachtung des Gehirns als Ganzes in Hinblick auf den Cu-Level nicht aussagekräftig ist. Zudem wurde festgestellt, dass in Hirnregionen wie dem Hippocampus, die für das Lernen und Gedächtnis zuständig sind, ein starkes Vorkommen von A β -Plaques herrscht, weswegen diese Hirnregionen für die AD-Erforschung besonders interessant sind (Mattson et al., 1999, Parihar and Hemnani, 2004, Duyckaerts et al., 2009). Im Hippocampus findet der Übergang von Kurz- zum Langzeitgedächtnis statt (Lynch et al., 1990, Bliss and Collingridge, 1993). Ein Absterben der Neuronen in diesem Gehirnareal könnte den in der AD vorkommenden Gedächtnisverlust erklären (Mormino et al., 2009).

Ein Faktor, der die Cu-Homöostase im Gehirn beeinflussen kann, ist die Cu-Akkumulation in den A β -Plaques. In verschiedenen AD-Mäusen – genetisch modifizierte Mäuse, die eine AD-Pathologie entwickeln – wurden in A β -Plaques höhere Cu-Mengen gefunden (Bourassa et al., 2013). *In vitro* Studien konnten zeigen, dass A β 42-Aggregate Cu-Ionen aus Albumin herauslösen können, welches u.a. als Cu-Transportprotein fungiert (Jiang et al., 2013). Diese Cu-bindenden Eigenschaften erklären sich aus einer Cu-Bindungsstelle (CuBD) im A β -Peptid (Nakamura et al., 2007). Generell scheinen die Eigenschaften der A β -Peptide (im Bereich von μ M) von der Anwesenheit oder Abwesenheit von Cu abhängig zu sein (Huang et al., 2004) (Abb. 3). So konnte zum Beispiel durch Chelatoren die A β 40-Oligomerisierung unterbunden oder die A β -Aggregation in den Plaques rückgängig gemacht werden (Atwood et al., 1998, Cherny et al., 1999). Ob die Cu-Akkumulation in A β -Plaques oxidativen Stress durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = „reactive oxygen species“), wie H₂O₂, mittels Fenton-ähnlicher

Reaktionen auslösen kann, wird noch kontrovers diskutiert (Huang et al., 1999, Nadal et al., 2008). Das Wissen um einen möglichen Cu-Mangel im AD-Gehirn und die Cu-Akkumulation in den A β -Plaques könnten zu dem Schluss führen, dass innerhalb der neuronalen Zellen ein niedrigerer Cu-Level vorhanden ist.

Die gestörte Cu-Homöostase im AD-Gehirn führt direkt zu der Fragestellung, ob Cu die biochemische und zellbiologische Prozessierung des APPs beeinflussen kann. Dabei ist zu beachten, dass neben der eben erwähnten Cu-Bindungsstelle in der A β -Sequenz eine zweite Cu-Bindungsstelle in der Ektodomäne des APPs vorhanden ist (Hesse et al., 1994). Tatsächlich zeigte sich nach Cu-Gabe bei APP695-transfizierten CHO-1 Zellen eine erniedrigte A β -Produktion und eine gesteigerte Produktion von p3 und sAPP α (Borchardt et al., 1999). Dies bedeutet nichts anderes als die Stimulierung der nicht-amyloidogenen Prozessierung zulasten der amyloidogenen Prozessierung durch Cu-Zugabe (Borchardt et al., 1999) (Abb. 3). Dieses Ergebnis gab den Startpunkt für die Erforschung therapeutischer Ansätze hinsichtlich der AD mittels Cu, da hier erstmals eine Reduzierung der A β -Menge durch Cu beobachtet wurde. Dieser Zusammenhang konnte in einer anderen Studie bestätigt werden, in der durch einen erzeugten Cu-Mangelzustand die A β -Sekretion deutlich erhöht war, während der APP-Level gleich blieb (Cater et al., 2008).

Die Cu-Bindungsstelle in der APP-Ektodomäne ist für die zellulären Prozesse essentiell wichtig. Die N-terminale Cu-Bindungsstelle ist in der Lage, eine Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) durchzuführen (Multhaup et al., 1996). Aufgrund dieser Cu-Bindungsstelle wird die Funktion von APP als Cu-Transporter diskutiert (Barnham et al., 2003, Treiber et al., 2004). So führt eine Überexpression von APP in Hefezellen zu einem erniedrigten intrazellulären Cu-Level, was für eine Cu-Efflux-Funktion sprechen würde (Treiber et al., 2004). Passend dazu führt die Überexpression von APP Δ CuBD, dessen Cu-Bindungsstelle deletiert wurde, zu erhöhten Cu-Leveln (Treiber et al., 2004). *In vivo* konnten diese Funktion in einem APP695sw-überexprimierenden AD-Mausmodell bestätigt werden, welches deutlich weniger Cu in der Hirnmasse zeigt, während Zn, Fe, Co und Mn unbeeinflusst blieben (Maynard et al., 2002). Auch in einem anderen transgenen AD-Mausmodell, welches APP695sw/ind („indian mutation“ = V642F) überexprimiert, wurde ein signifikant niedrigerer Cu-Level im Gehirn festgestellt (Phinney et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurde in APP-Knock-out-Tieren deutlich erhöhte Cu-Level im den untersuchten Hirnarealen gefunden, während die Zn- und Fe-Level unbeeinflusst blieben (White et al., 1999).

Bei Inaktivierung dieser Cu-Bindungsstelle mittels Austausch der Histidine 147, 149, 151 durch Asparagine ist in HEK293T-Zellen der Transport vom ER zum Golgi gestört, die APP-Spaltung deutlich reduziert und es gibt Indizien für eine veränderte APP-Oligomerisierung (Spoerri et al.,

2012). Die Cu-Bindungsstelle könnte auch entscheidend für die Dimerisierung von APP sein. Es konnte gezeigt werden, dass Cu die APP-Dimerisierung erhöht, was wiederum zur Folge hat, dass mehr A β extrazellulär vorliegt (Noda et al., 2013). Die gleiche Studie konnte auch zeigen, dass dieser Effekt durch Chelatoren umgekehrt werden kann (Noda et al., 2013). Dass eine Dimerisierung von APP, in diesem Fall forciert durch eine K624C-Mutation (nach APP695-Nummerierung), in SH-SY5Y-Zellen prinzipiell höhere A β -Level zur Folge hat, konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Scheuermann et al., 2001). Allerdings muss erwähnt werden, dass es eine Gegenthese gibt, der zufolge die Cu-Bindung die APP-Monomerisierung vermittelt (Kong et al., 2008).

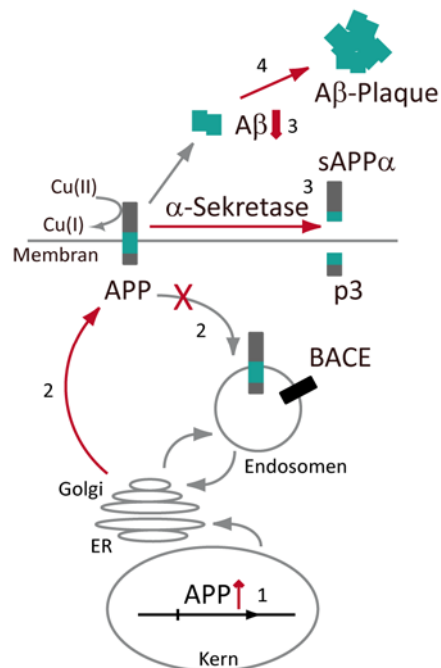


Abb. 3: Auswirkungen von intrazellulärem Cu-Überschuss auf APP-Metabolismus in schematischer Darstellung. Verstärkte bzw. herabgesetzte Prozesse sind mit roten Pfeilen bzw. Kreuzen markiert. Erhöhte Cu-Level führen zu einer gesteigerten APP-Expression (1) (Armendariz et al., 2004), verstärkten APP-Verlagerung an die Zelloberfläche (2) (Acevedo et al., 2011), verringerten APP-Internalisierung(2) (Acevedo et al., 2011), verstärkten Spaltung durch die α -Sekretase (3) (Borchardt et al., 1999), erniedrigter A β -Produktion (3) (Borchardt et al., 1999) sowie erhöhter A β -Aggregation(4) (Bourassa et al., 2013).

Bei Cu-Überschuss wird mehr APP an der Zelloberfläche gehalten, mutmaßlich durch verringerte APP-Internalisierung (Hung et al., 2009, Acevedo et al., 2011) (Abb. 3). Diese Internalisierung ist Voraussetzung dafür, dass APP in den Endosomen von BACE gespalten werden kann (Koo and Squazzo, 1994). Somit könnte der Umkehrschluss gezogen werden, dass bei Cu-Mangel mehr APP endozytiert und folglich gespalten wird (Abb. 3).

Auch die Genexpression des APPs wird durch Cu beeinflusst. Bei Cu-Mangel wurde in MNK (Menkes Protein) überexprimierenden Fibroblasten, welche erniedrigte intrazelluläre Cu-Level aufweisen, eine geringere APP-Expression und ein geringerer APP-Proteinlevel festgestellt (Bellingham et al., 2004) (Abb. 3). Im Gegenzug konnte in genetisch modifizierten Fibroblasten, die deutlich gesteigerte Cu-Level aufweisen, eine verstärkte APP-Expression detektiert werden (Armendariz et al., 2004) (Abb. 3).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die genauen biochemischen und molekularbiologischen Hintergründe des Einflusses von Cu in der AD bisher noch nicht hinreichend geklärt sind und in diesem Bereich noch viel Forschungsarbeit notwendig ist, um ein vollständiges Bild zu erhalten.

Da Cu ein essentielles Spurenelement ist, kann sich eine gestörte Cu-Homöostase auf eine Vielzahl zusätzlicher zellulärer Prozesse auswirken (Harris, 2003). In der äußersten Ausprägung können aus einem veränderten Cu-Metabolismus schwerwiegende Krankheiten resultieren, z.B. Menkes- oder Wilson-Krankheit (Woimant and Trocello, 2014).

1.2 Therapeutische Ansätze in der Alzheimer Krankheit

1.2.1 Aktuelle Therapien

Sämtliche etablierte therapeutische Ansätze haben keine Heilung der Alzheimer Krankheit zur Folge, sondern lindern kurzzeitig die Symptome. An möglichen Therapien wird bereits seit dreißig Jahren geforscht und von unzähligen Ansätzen haben nur vier Ansätze eine Zulassung erhalten (Schneider et al., 2014). Aufgrund der Vielzahl an nicht erfolgreichen klinischen Studien rückt zunehmend die Suche nach einer zuverlässigen Diagnostik in den Vordergrund (Schneider et al., 2014). Der fehlende Durchbruch in der AD-Therapie führt dazu, dass zunehmend die bisher bekannten molekularen Ursachen in Frage gestellt werden.

Es ist wichtig zu wissen, dass *de facto* die AD-Diagnose eine Ausschlussdiagnose ist. So werden bei ersten Symptomen zunächst andere Demenzen wie die Parkinson-Krankheit u.a. ausgeschlossen und es erfolgt die Einordnung z.B. nach Kriterien des „Clinical Dementia Rating“ (CDR) (McKhann et al., 1984, McKhann et al., 2011). CDR basiert auf einem standardisierten Interview und ist dementsprechend anfällig für subjektive Einflüsse (Rockwood et al., 2000). Eine Verifizierung durch das Vorkommen von A β in Form von löslichen Produkten oder Plaques kann erst *post mortem* stattfinden. Als AD-Biomarker gilt momentan die A β ₄₂-Menge oder das A β ₄₀/A β ₄₂-Verhältnis im CSF (Holtzman, 2011, Waragai et al., 2012). Niedrigere A β ₄₂-Level sprechen für eine erhöhte AD-Symptomatik, unter der Annahme, dass mehr A β ₄₂ in Fibrillen und Plaques eingelagert wird (Holtzman, 2011).

Ein therapeutischer Ansatz basiert auf Acetylcholin-Esterase-Inhibitoren, die eine Verminderung des Abbaus des Neurotransmitters Acetylcholin durch die Acetylcholin-Esterase bewirken. Acetylcholin vermittelt die Reizweiterleitung am synaptischen Spalt auf das Neuron, was zu einer längeren Stimulation des Neurons führen soll und somit dem Verlust von cholinergen Neuronen

entgegen wirken könnte (Mikiciuk-Olasik et al., 2007). In klinischen Studien könnte damit zumindest eine Verbesserung der AD-Symptomatik erzielt werden (Zemek et al., 2014, Shinagawa and Shigeta, 2014). Tatsächlich hat dieser Ansatz die einzigen Substanzen hervorgebracht, die momentan für die AD-Therapie zugelassen sind (Schneider et al., 2014).

Ein weiterer vielverfolgter Ansatz ist die Verwendung von γ -Sekretase-Inhibitoren (GSIs). Durch die reduzierte enzymatische Aktivität der γ -Sekretase sollen weniger A β -Peptide gebildet werden. Viele bisher in klinischen Studien getesteten GSIs zeigten keine Verbesserung der Symptome und führten zu gravierenden Nebenwirkungen, z.B. weißer Hautkrebs (Mikulca et al., 2014, Schneider et al., 2014). Diese Nebenwirkungen sind auf die Vielzahl an γ -Sekretase-Substraten zurückzuführen, insbesondere auf die Prozessierung von Notch (Henley et al., 2014).

Aufgrund der starken Nebenwirkungen der GSIs werden zunehmend γ -Sekretase-Modulatoren (GSMs) untersucht, die Spaltungseigenschaften positiv in Hinblick auf eine geringere A β -Produktion beeinflussen sollen (Mitani et al., 2012). Hierbei wird bereits eine Wirksubstanz in einer klinischen Studie Phase II untersucht (Green et al., 2009, Schneider et al., 2014). Bei getesteten β -Sekretase-Inhibitoren, die ebenfalls die A β -Menge reduzieren sollen, konnte bisher in klinischen Studien keine Verbesserung der Symptome gezeigt werden (Mikulca et al., 2014). Auch Substanzen, die zu einer Aktivierung der α -Sekretase führen und somit die nicht-amyloidogene Prozessierung fördern, befinden sich momentan in klinischen Studien, wobei die Ergebnisse noch ausstehen (Schneider et al., 2014).

Ein momentan vielfach verfolgter Ansatz ist die Immuntherapie, bei welcher entweder durch die Injektion des A β -Antigens die Immunreaktion stimuliert oder durch Zugabe von monoklonalen Antikörpern die A β -Menge reduziert werden soll (Panza et al., 2014). Bisher ist bei diesem Ansatz noch kein hinreichend positives Resultat in verschiedenen klinischen Studien zu erkennen (Jindal et al., 2014, Schneider et al., 2014).

Neben den schon erwähnten Ansätzen gibt es eine Vielzahl weiterer, die nicht primär mit der A β -Entstehung in Verbindung gebracht werden. So wird z.B. der Einfluss von Vitamin B, die Insulingabe oder gar die Wirksamkeit von Cannabinoiden diskutiert (Aso and Ferrer, 2014, Schneider et al., 2014), wobei die Insulingabe tatsächlich im klinischen Versuch hinsichtlich der AD-Symptomatik untersucht wurde (Craft et al., 2012).

1.2.2 Cu-Zugabe als therapeutischer Ansatz

Seitdem in Experimenten mit CHO-Zellen gezeigt werden konnte, dass die Zugabe von CuCl_2 zur Stimulation der nicht-amyloidogenen Prozessierung und somit zu einer Reduktion der $\text{A}\beta$ -Menge führt (Borchardt et al., 1999), wird erforscht inwieweit dieser Effekt als therapeutischer Ansatz genutzt werden könnte. Dazu wurden zunächst verschiedene Mausstudien durchgeführt. Transgenen APPsw-Mäusen wurde CuSO_4 im Trinkwasser *ad libitum* verabreicht, was in einem erhöhten Cu-Level im Gehirn und einem verringerten $\text{A}\beta$ -Level im ZNS nicht jedoch in einer Reduktion der $\text{A}\beta$ -Plaques resultierte (Bayer et al., 2003). In APP751SL-Mäusen führt die orale Cu-Clioquinol-Behandlung, wobei Clioquinol (CQ) als Cu-Transporter agiert, zu einer höheren Überlebensrate (Schafer et al., 2007). Überraschenderweise wurde bei den behandelten Tieren kein Effekt auf die APP-Prozessierung festgestellt, obwohl höhere Cu-Level im Gehirn gemessen wurden (Schafer et al., 2007). In einer weiteren Mausstudie wurde der Cu-Level u.a. im Gehirn genetisch erhöht, indem APP695sw/ind-Mäusen mit TxJ/J („toxic-milk mice“) gekreuzt wurden, welche durch einen mutierten ATPase7b-Transporter erhöhte zelluläre Cu-Level aufweisen (Phinney et al., 2003). Bei den tgAPP/TxJ/J-Nachkommen wurden erniedrigte $\text{A}\beta_{40}$ - und $\text{A}\beta_{42}$ -Level sowie weniger $\text{A}\beta$ -Plaques festgestellt (Phinney et al., 2003). Die Behandlung mit dem Cu-(gtsm)-Komplex, einer bis(Thiosemicarbazon)-Verbindung, führte in SY5Y-Zellen zu einem erhöhten intrazellulären Cu-Level und in transgenen AD-Mäuse, die humanes APP (K670N, M671L) und humanes PS1 (ΔE9) aufweisen, zu einer reduzierten $\text{A}\beta$ -Oligomerisierung sowie zu einer verbesserten kognitiven Leistung im „Y-maze“ Test (Crouch et al., 2009). Insgesamt sind die biochemischen Vorgänge, welche die positive Wirkung von Cu auf die $\text{A}\beta$ -Produktion der behandelten Tiere haben, noch nicht vollständig geklärt.

Die Ergebnisse der Tierversuche waren derart überzeugend, dass die Cu-Therapie in einer klinischen Studie am Menschen getestet wurde. In dieser wurde Cu-Orotat oral Patienten über einen Zeitraum von 12 Monaten gegeben. Leider zeigten sich keine positiven Effekte auf die kognitive Leistung der AD-Patienten (Kessler et al., 2008a). Lediglich die $\text{A}\beta_{42}$ -CSF-Level, die als AD-Biomarker gehandelt werden, wurden in der Verumgruppe stabilisiert, während sie in der Placebogruppe weiter absanken (Kessler et al., 2008b). Möglicherweise war die Studiendauer zu kurz oder die Patienten zu alt, um einen Effekt auf die Krankheit bewirken zu können. Eventuell passierte nicht genügend Cu-Salz die Bluthirnschranke und somit gelangte zu wenig Wirksubstanz ins Gehirn.

Abschließend ist darauf hinzuweisen, dass dieser therapeutische Ansatz der Cu-Behandlung auch in der Theorie nur wirken kann, wenn er sehr frühzeitig, also noch vor dem ersten Auftreten von

Symptomen, durchgeführt wird. Insofern ist es unabdingbar, dass eine zuverlässige Frühdiagnostik entwickelt wird. Auch für andere therapeutische Ansätze ist eine solche Frühdiagnostik sehr wichtig, weswegen sehr intensiv daran geforscht wird.

1.2.3 Überwindung der Bluthirnschranke als essentieller Faktor

Die Bluthirnschranke (BBB = „blood-brain barrier“) stellt eine physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Zentralnervensystem (ZNS) dar (Abbott et al., 2006). Sie reguliert die Aufnahme von Nährstoffen und sorgt für die Rückführung von Stoffwechselprodukten (Abbott et al., 2006). Zudem schützt sie das Gehirn vor Schwankungen der Blutzusammensetzung und natürlich auch vor neurotoxischen Substanzen (Abbott et al., 2006). Während die BBB im gesunden Gehirn ein optimales Milieu gewährleistet, stellt sie für eine Vielzahl an Wirkstoffen eine unüberwindliche Barriere dar. So scheitern etwa 98% der potenziellen Neuropharmaka an der BBB (Pardridge, 2007). Aufgrund dessen gibt es für eine Vielzahl an neurologischen Erkrankungen keine medikamentösen Therapien (Ghose et al., 1999, Lipinski, 2000). So bleibt die Entwicklung von BBB-gängigen Wirkstoffen eine große Herausforderung.

Hauptbestandteil der BBB ist die Endothelzellschicht, die zusätzlich über spezielle Verbindungselemente – die „tight junctions“ (TJs) – eine komplett geschlossene Barriere bildet (Abbott et al., 2006) (Abb. 4). Wichtige TJs-Proteine, welche den interzellulären Endothelzellspalt schließen, kommen aus der Claudin- und ZO-Proteinfamilie („zonula occludens“) (Abbott et al., 2006, Goncalves et al., 2013). Aufgrund dieses Aufbaus wird zwischen einem trans- und parazellulären Transport von Substanzen unterschieden. Der transzelluläre Transport findet wahrscheinlich hauptsächlich über Rezeptorvermittelte Mechanismen statt, wie die Transferrinaufnahme, und erfolgt eher für größere Proteine und Makromoleküle (Abbott et al., 2006, Leitner and Connor, 2012). Im Unterschied dazu ermöglicht die parazelluläre Permeabilität eher einen Austausch von Ionen und niedermolekularen Substanzen (< 1 kDa) über spezielle Kanäle in den TJs – die sogenannten „gap junctions“ (GJs) (Abbott et al., 2006, Eugenin et al., 2012). Die Endothelzellbarriere wird durch einen Zellverband aus Astrozyten

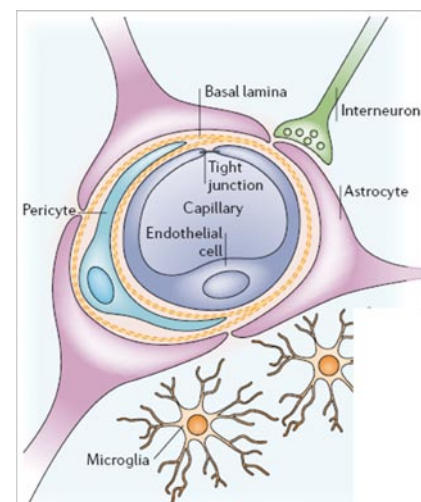


Abb. 4: Darstellung der Bluthirnschranke (BBB). Die Endothelzellbarriere der Kapillargefäße vermittelt den regulierten Stoffwchelaustausch. Unterstützt wird diese Barriere durch einen Zellverbund aus Astrozyten und Perizyten. Abbildung modifiziert (Abbott et al., 2006).

und Perizyten stabilisiert und beeinflusst (Cabezas et al., 2014) (Abb. 4). Zusammen mit den angrenzenden Neuronen bilden diese eine neurovaskuläre Einheit (Abbott et al., 2006, Cabezas et al., 2014). Zusätzlich ist die Endothelzellschicht von einer Basallamina aus extrazellulärer Matrix umgeben, in die Perizyten eingebettet sind und an die Fortsätze der Astrozyten andocken (Abbott et al., 2006) (Abb. 4). Insgesamt stellt die BBB einen komplexen Zellverbund dar (Abb. 4).

Neben einer Vielzahl an Strategien zur Überwindung der BBB und des Erreichens therapeutisch wirksamer Konzentrationen im Gehirn liegt der Fokus heutzutage unter anderem auf modifizierbaren Transportmolekülen wie Nanocarriern (Upadhyay, 2014). Momentan sind sämtliche Ansätze eines nanopartikulären Wirkstofftransports noch im Stadium der präklinischen Forschung (Costantino, 2010).

1.3 Nanocarrier

Verbünde von bis zu einigen tausend Atomen oder Molekülen werden im Allgemeinen als Nanopartikel (NP) bezeichnet. In der Regel liegt ihre Größe nach IUPAC-Definition („International Union of Pure and Applied Chemistry“) zwischen 1 und 100 nm. Der Begriff Nanocarrier umfasst eine Gruppe von NPs, die zusätzlich eine Transportfunktion z.B. von Medikamenten übernehmen können.

Interessanterweise ist die Entdeckung und Verwendung von NPs keine Erfindung der modernen Wissenschaft. Gold-NP beispielsweise wurden bereits im neunten Jahrhundert in Mesopotamien für einen glitzernden Effekt bei der Verzierung von Töpferwaren eingesetzt (Reiss, 2010). In der modernen Wissenschaft stieg spätestens seit den 1970er Jahren die Forschung auf dem Gebiet der NPs stetig an und in NPs wird heute ein sehr großes Potential in vielen Bereichen wie Technik, Medizin etc. gesehen (Kreuter, 2007, Holzinger et al., 2014).

NPs weisen andere chemische und physikalische Eigenschaften auf als größere Partikel oder Festkörper mit vergleichbarer atomarer Zusammensetzung. Als Beispiel kann hier Gold aufgeführt werden, welches als Festkörper einen Schmelzpunkt von 1.064°C aufweist und die typisch goldgelbe Farbe zeigt. Gold-NP hingegen weisen einen Schmelzpunkt von ca. 550°C (bei 1,5 nm NP-Größe) auf und zeigen eine tiefrote Färbung in Lösung (Schmid, 1994, Kreibitz, 1995, Schäfer, 2009). Zudem konnte für Gold-NP eine stärkere katalytische Aktivität nachgewiesen werden. So

steigt bei Gold-NPs kleiner als 4 nm die CO-Oxidation pro Goldatom an der Oberfläche deutlich an (M. Haruta et al., 1993).

Es ist zu betonen, dass unter dem Begriff NP alle kleinsten Teilchen gleich welcher chemischen Zusammensetzung zusammengefasst werden. Dies bedeutet, dass sowohl rein metallische NPs (z.B. Goldpartikel), Metall- und Halbmetalloxide (z.B. Siliziumdioxid), Halbleiter (z.B. Cadmiumselenid) oder Kohlenstoffhaltige NPs gemeint sein können. Damit erklärt sich das weite Wirkungsspektrum der NPs. Gold-NPs könnten in der Krebsdiagnostik und -therapie sowie beim Gentransport eine wichtige Rolle spielen (Shah et al., 2014). Siliziumdioxid wird bereits seit mehr als vier Jahrzehnten als Lebensmittelzusatzstoff E551 eingesetzt, um z.B. die Rieselfähigkeit bei Kochsalz zu erhalten (Baltes, 2007). Cadmiumselenid wird aufgrund von Fluoreszenzeigenschaften, die durch die Partikelgröße beeinflusst werden können, ein hohes Potential in Solarzellen zugeschrieben (Norris and Bawendi, 1996, Early and Nesbitt, 2013).

Kohlenstoffhaltige NPs können in Fullere, Rußpartikel, SUVs („small unilamellar vesicles“) und Dendrimere unterteilt werden. Bei den Fulleren handelt es sich um sphärische oder röhrenförmige „Hohlmoleküle“, deren Wirkungsspektrum, wie beispielsweise in der HIV-Therapie, der Datenspeicherung oder der Veränderung von Materialeigenschaften noch näher untersucht werden muss (Harrison and Atala, 2007, Chawla et al., 2010). Rußpartikel sind Produkte von Verbrennungsprozessen und industriell hergestellter Ruß wird hauptsächlich als Füllstoff in der Gummiindustrie verwendet. Die zu den Liposomen zählenden SUVs sind aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut und weisen einen Durchmesser < 100 nm auf. Eines von unzähligen SUV-Beispielen in der Medizin ist liposomales Doxorubicin, welches in der Brustkrebstherapie eingesetzt wird (Harris et al., 2002). Dendritische NPs sind in der Regel aus einem multifunktionalen Kern und davon ausgehend regelmäßig verzweigten dreidimensionalen Strukturen mit definierten Endgruppen aufgebaut.

In den Modifizierungsmöglichkeiten bei den dendritischen NPs wird ein hohes Potential für eine verbesserte Wirksamkeit einer medizinischen Substanz gesehen u.a. hinsichtlich einer erhöhten Verweildauer im Blut, einer verbesserten BBB-gängigkeit oder eines zielgerichteten Transports an den Zielort (Gillies, 2005, Kreuter, 2007, De Jong and Borm, 2008). So konnte beispielsweise für dendritische Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide)-NPs (PLGA-NPs), welche verschiedene therapeutische Substanzen binden können, eine relativ gute BBB-gängigkeit gezeigt werden (Tosi et al., 2013, Dhama et al., 2014).

Den eben beschriebenen vielfältigen Möglichkeiten der NPs stehen auch mögliche Risiken gegenüber, die im Forschungsfeld der Nanotoxikologie untersucht werden. So ist bekannt, dass

NPs potentiell die Fähigkeit haben, Zellbarrieren zu überwinden und mit subzellulären Strukturen zu interagieren (Oberdorster, 2007). Zudem besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass NPs oxidativen Stress auslösen können (Oberdorster, 2007). Dieses Gefahrenpotential muss sicherlich aufgrund der Vielfalt der chemisch unterschiedlichen NPs für jede NP-Spezies separat untersucht und sollte bei Forschungen an NPs immer berücksichtigt werden.

1.3.1 In dieser Arbeit verwendete dendritische Nanocarrier: CMS, CSNP1 und CSNP2

In dieser Arbeit wurde das Potential von mit Cu beladenen NPs als therapeutischer Ansatz zur Wiederherstellung der Cu-Homöostase im AD-Gehirn untersucht. Dazu wurden Dendrimere verwendet, die eine dendritische Kern-Hülle-Architektur aufweisen und aufgrund der in der chemischen Struktur vorhandenen Stickstoffatome Cu-Ionen komplexieren können (Abb. 5). Die in dieser Arbeit verwendeten NPs wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Haag (Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie) synthetisiert.

CMS („core-multi-shell nanoparticle“) besteht aus einem PEI-Kern (Polyethylenimin), der in der Lage ist über Stickstoffe Cu-Ionen zu binden, und zwei schützenden Hüllen aus PE (Polyethylen) und PEG (Polyethylenglycol) (Abb. 5). Chemisch betrachtet ist der Kern polar, die erste PE-Hülle unpolar und die PEG-Außenhülle hydrophil. Dies sollte eine gute Löslichkeit in H₂O bewirken. Im Gegensatz dazu bestehen die CSNPs („core-shell nanoparticles“) aus einem hyperverzweigten PG-Kern (PG = Polyglycerin) und einer TMEDA-Hülle (N¹,N¹,N²-Trimethylethan-1,2-diamin), an welcher die Cu-Ionen durch die vorhandenen Stickstoffe gebunden werden können (Abb. 5). Der PG-Kern ist hydrophil und die TMEDA-Hülle polar.

Mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 23.000 g/mol und 20.443 g/mol sind CMS und CSNP1 ähnlich schwer (Treiber et al., 2009, Quadir, 2010). Im Gegensatz dazu ist CSNP2 mit 194.500 g/mol deutlich schwerer (Persönliche Mitteilung, Markus Hellmund, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Haag, Institut für Organische Chemie, FU Berlin). Der durchschnittliche Durchmesser der NP wurde mittels DLS („dynamic light scattering“) ermittelt und liegt bei 5 nm für CMS, 4 nm für CSNP1 und 20 nm für CSNP2 (Treiber et al., 2009, Fehse et al., 2014).

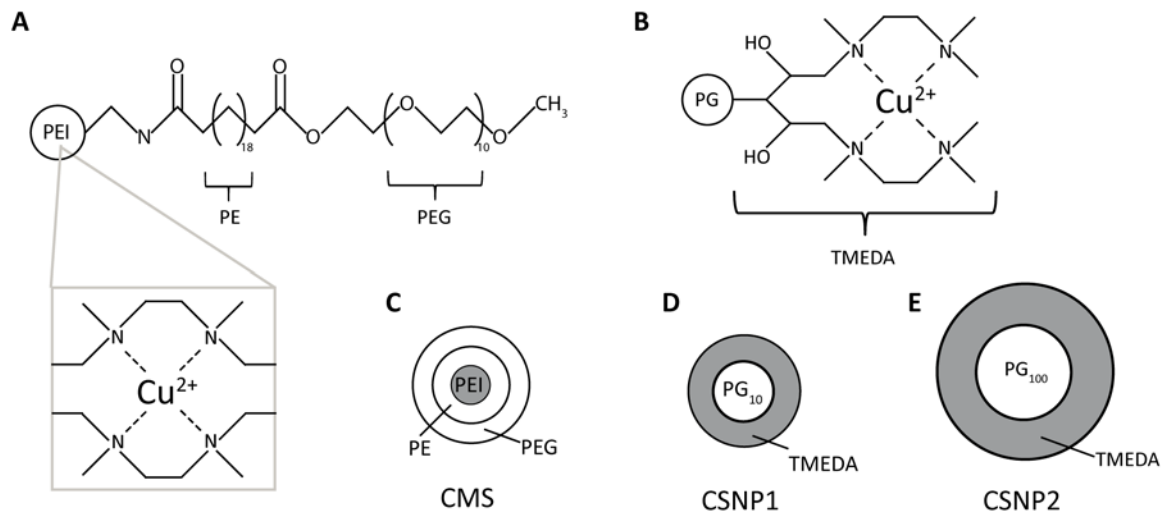


Abb. 5: Chemische und schematische Darstellung der NPs. Bei CMS besteht der Kern aus PEI (Polyethylenimin), die erste Hülle aus PE (Polyethylen) und die zweite Hülle aus PEG (Polyethylenglycol) (A, C). Bei den beiden CNSP bestehen die Schalen aus TMEDA (N',N',N'-Trimethylethan-1,2-diamin) und der Kern aus PG (Polyglycerol) (B, D, E). Unterschiede gibt es hier in der Größe des Kerns. Während CNSP1 aus PG₁₀ aufgebaut ist (D), wurde für CNSP2 PG₁₀₀ verwendet (E). Bei allen NPs könne freie Cu²⁺-Ionen aufgrund der Stickstoffe gebunden werden, die bei CMS im Kern und bei CNSP1 sowie CNSP2 in der Schale vorkommen (A, B). Die Cu-bindenden Areale sind bei den Schemata grau dargestellt.

Zusätzlich wurde das Zeta-Potential ermittelt, womit das Potential der Abscherschicht bei elektrischen Doppelschichten bei Kolloidteilchen im Vergleich zur Lösungsumgebung gemeint ist. Kolloide sind per Definition eine Dispersion nano-kleiner Teilchen eines Stoffes in einem anderen Stoff. Kolloide mit einem Zeta-Potential von weniger als -30 mV oder mehr als +30 mV werden als elektrostatisch stabil angesehen. Während für CMS kein Zeta-Potential bekannt ist, wurde für CNSP1 ein Zeta-Potential von 18,2 mV für unbeladenen NP und 12,1 mV für Cu-beladenen NP ermittelt (Quadir, 2010). Bei CNSP2 wurden als Zeta-Potential Werte von 34,7 mV für unbeladenen NP und 53,2 mV für Cu-beladenen NP herausgefunden (Persönliche Mitteilung: Markus Hellmund, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Haag, Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie).

1.4 Zielsetzung

Es gilt als etabliert, dass Cu ein starker Einflussfaktor in der AD ist: Cu beeinflusst die Prozessierung, Lokalisierung und Expression von APP, aus dem durch proteolytische Spaltung toxische A β -Peptide entstehen können. Diese wiederum sind nach der Amyloid-Hypothese für das Neuronensterben in der AD verantwortlich. Eine Cu-Gabe kann *in vitro* einen Wechsel von der amyloidogenen zur nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung und somit reduzierte A β -Level bewirken. Eine Cu-Behandlung führte auch in transgenen AD-Mäusen u.a. zu erniedrigten A β -

Leveln. Diese positiven Effekte einer Cu-Gabe konnten allerdings in einer klinischen Studie nicht bestätigt werden. Möglicherweise ist das in diesem Zusammenhang zugegebene Cu in Form von Cu-Orotat nicht geeignet, weil nicht genug Cu über die BBB gelangt.

In dieser Doktorarbeit sollte die potentielle therapeutische Wirksamkeit von speziell synthetisierten Nanopartikeln untersucht werden, die durch ihren chemischen Aufbau – das Vorhandensein von Stickstoffgruppen – in der Lage sind, Cu-Ionen zu komplexieren und somit auch zu transportieren. Dazu sollten *in vitro* Studien durchgeführt werden, die Aussagen über die Cu-Beladung, Spezifität, Toxizität, zelluläre Aufnahme, Bioverfügbarkeit der Cu-Ionen und Einfluss auf die APP-Prozessierung ermöglichen. Zudem sollte untersucht werden, ob diese mit Cu beladenen Nanocarrier über die Bluthirnschranke gelangen. Bei hinreichend positiven Ergebnissen, sollten die Cu/NP-Komplexe im Tierversuch mit AD-Mäusen auf ihre therapeutische Wirksamkeit untersucht werden. In einem möglichen Tierversuch sollte untersucht werden, inwiefern die Cu-Behandlung die AD-Symptome, wie A β -Level, positiv beeinflussen kann und ob es schädlichen Auswirkungen auf den Organismus gibt.

2 Ergebnisse

2.1. Cu-Beladung der NPs

Die verwendeten NPs weisen aufgrund ihres chemischen Aufbaus eine Vielzahl an Stickstoffgruppen auf, die potenziell in der Lage sind, Cu(II)-Ionen zu komplexieren. Zur Ermittlung der größtmöglichen Beladung mit Cu(II) wurde die Absorption der Cu/CSNP1- bzw. Cu/CSNP2-Komplexe bei gleichbleibender NP-Konzentration ($1\ \mu\text{M}$) und ansteigenden CuCl_2 -Konzentrationen bei 650 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge zeigen die Cu/NP-Komplexe ihre größte Absorption (Abb. 6). Die Absorption freier Cu(II)-Ionen wurde durch Subtraktion berücksichtigt. Für Cu/CMS wurde bereits eine Maximalbeladung von 40:1 Cu:CMS ermittelt (Treiber et al., 2008, Fehse et al., 2014).

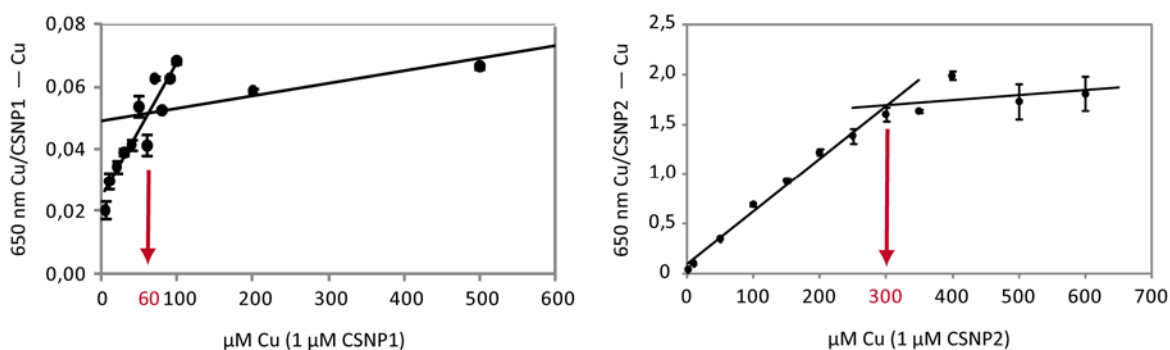


Abb. 6: Bestimmung der Cu-Beladung der NP. Bei gleichbleibender NP-Konzentration ($1\ \mu\text{M}$) wurde die Cu(II)-Konzentration stetig erhöht und letztendlich die entstehende Cu/NP-Komplexmenge durch Absorption abzüglich der Absorption freier Cu(II)-Ionen bei 650 nm vermessen. Statistik: Standardfehler, $n \geq 3$.

Die Auswertung zeigt, dass ab einem Verhältnis von 60:1 bzw. 300:1 keine Steigerung in der Absorption für den Cu/CSNP1- bzw. Cu/CSNP2-Komplex mehr zu erkennen ist (Abb. 6). Somit sind ab diesen Verhältnissen die Sättigungen der beiden NPs mit Cu(II)-Ionen erreicht. Das Verhältnis 60:1 für Cu:CSNP1 wurde in ITC-Messungen bestätigt (Quadir, 2010).

Ausgehend von den hier ermittelten sowie bereits bekannten Ergebnissen, wurde für alle weiteren Versuche mit voll beladenem Cu/NP-Komplexen gearbeitet, d.h. mit 40:1 Cu:CMS und 60:1 Cu:CSNP1 sowie 300:1 Cu:CSNP2.

2.2 Metall-Bindungsstudien der NPs

Die untersuchten NPs wurden so entworfen, dass die zur Komplexbildung zur Verfügung stehenden Aminogruppen hauptsächlich Cu(II)-Ionen binden sollen. Hier wurde untersucht,

inwiefern die Bindung anderer Metall-Ionen im Vergleich zu Cu(II)-Ionen erfolgen kann, um die Spezifität von CSNP1 und CSNP2 für Cu(II)-Ionen ermitteln zu können. Für Cu/CMS wurden diese Studien nicht durchgeführt.

Diese Bindungsstudie basiert auf der Trennung von Metall/NP-Komplexen und freien Metall-Ionen durch Zentrifugalfiltration (Abb. 7). Dazu wurden Filter mit einer Ausschlussgrenze von 10.000 g/mol verwendet. Nach Zentrifugation werden an NP gebundene Metall-Ionen in der oberen Phase gehalten, während für freie Metall-Ionen eine gleichmäßige Verteilung in der oberen und unteren Phase erfolgt (Abb. 7). CSNP1 selbst weist ein Molekulargewicht von 20.443 g/mol auf und verbleibt aufgrund dessen in der oberen Phase. Auch CSNP2 wird aufgrund eines Molekulargewichtes von 194.500 g/mol in der oberen Phase zurückgehalten. Die drei verschiedenen Metalle Cu, Zn und Mn wurden nach CSNP1- oder CSNP2-Inkubation per ICP-MS-Messungen der oberen und unteren Phase nach Zentrifugalfiltration auf eine mögliche Komplexbildung analysiert.

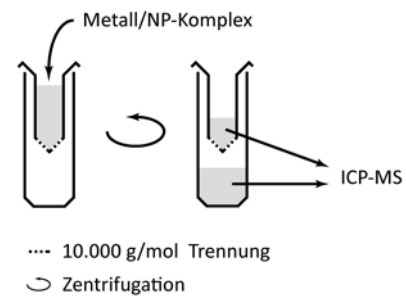


Abb. 7: Schematische Darstellung der Metall-Bindungsstudien von Metall/NP-Komplexen. Nach dem Prinzip der Zentrifugalfiltration sollten mögliche Metall/CSNP1- oder Metall/CSNP2-Komplexe in der oberen Phase zurückgehalten werden, während nicht gebundene Metall-Ionen sich gleichmäßig verteilen. Die Detektion der Metall-Ionen erfolgt mittels ICP-MS.

Die Auswertung der Kontrollstudien zeigt deutlich, dass es bei Abwesenheit des NPs, sowohl im Fall von CSNP1 also auch CSNP2, zu einer gleichmäßigen 50 : 50% Verteilung des Metallsalzes in den beiden Phasen kommt (Abb. 8 – A, B). Dies zeigt, dass sich die Metall-Ionen wie erwartet frei in der Lösung verteilen können.

Bei Anwesenheit von CSNP1 ist ein vollkommen anderes Ergebnis zu erkennen (Abb. 8 – A). Hier gibt es bei dem Cu/CSNP1-Komplex eine nahezu vollständige Lokalisation von Cu (100%) in der oberen Phase. Bei der Zugabe von Zn zu CSNP1 verbleiben 72% der Zn-Ionen in der oberen Phase. Bei der Zugabe von Mn zu CSNP1 ist eine gleichmäßige Verteilung der Mn-Ionen in den beiden Phasen zu erkennen. Somit ergibt sich für Mn/ CSNP1 ein ähnliches Bild, wie es ohne Anwesenheit von CSNP1 detektiert werden konnte. Deutlicher wird der Unterschied zwischen den einzelnen Metallen, wenn die prozentuale Verteilung der Metallmenge bei An- und Abwesenheit des NP miteinander verrechnet wird (Abb. 8 - B). Es zeigt sich, dass 100% der Cu-Ionen von CSNP1 gebunden und folglich in der oberen Phase zurückgehalten werden. Bei dem Vorhandensein von Zn-Ionen wird mit 31% ein wesentlicher kleinerer Anteil von CSNP1 komplexiert. Bei Mn-Ionen werden keine Ionen von CSNP1 gebunden. Somit konnte deutlich gezeigt werden, dass CSNP1 die

höchste Spezifität für Cu-Ionen aufweist, während bei Anwesenheit von Zn eine kleine Menge von Zn-Ionen gebunden werden kann.

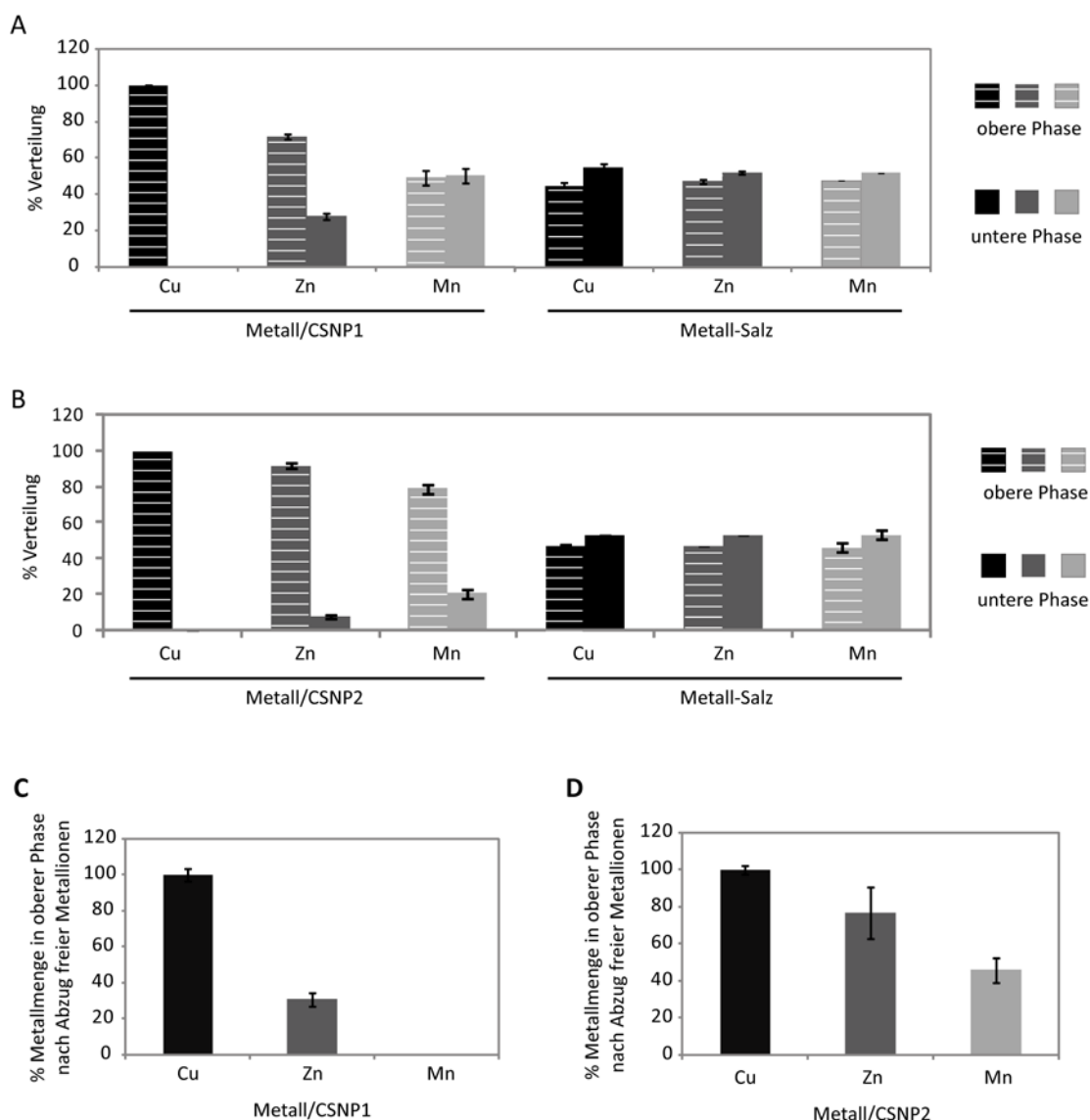


Abb. 8: Metall-Bindungsstudien von CSNP1 und CSNP2 mit Cu, Zn und Mn. Nach erfolgter Vorinkubation von 5 μM CSNP1 bzw. 1 μM CSNP2 mit 300 μM Metall-Ion und anschließender Zentrifugalfiltration erfolgte die Metallbestimmung in den einzelnen Phasen per ICP-MS. In Abwesenheit des NPs ist bei allen Metall-Ionen eine gleichmäßige 50 : 50% Verteilung in oberer und unterer Phase zu erkennen (A, B). Bei Anwesenheit von CSNP1 oder CSNP2 verbleiben 100% der Cu-Ionen und weniger Zn- und Mn-Ionen in der oberen Phase (A, B). Eine Verrechnung dieser Verteilungen ergibt, dass 100% der Cu-Ionen und ca. 31% der Zn-Ionen von CSNP1 komplexiert werden, während keine Mn-Ionen gebunden werden (C). Auch für CSNP2 zeigt sich die höchste Spezifität für Cu-Ionen (100%), während zu 77% Zn-Ionen zu 46% Mn-Ionen gebunden werden können (D). Statistik: Standardfehler, $n = 3$ (A, C), $n = 4$ (B, D).

Ein vergleichbares Ergebnis konnte für die Anwesenheit von CSNP2 ermittelt werden. Beim Cu/CSNP2-Komplex verbleiben 100% der Cu-Ionen in der oberen Phase. Bei Zn/CSNP2 und Mn/CSNP2 sind noch 92% der Zn-Ionen und 79% der Mn-Ionen in der oberen Phase zu erkennen.

Nach Verrechnung mit der Verteilung an freien Metallionen in den beiden Phasen zeigt sich für CSNP2 die höchste Spezifität für Cu-Ionen (100%), jedoch ist dieser NP auch in der Lage zu einem nicht geringen Teil auch Zn (77%) oder Mn (46%) zu binden.

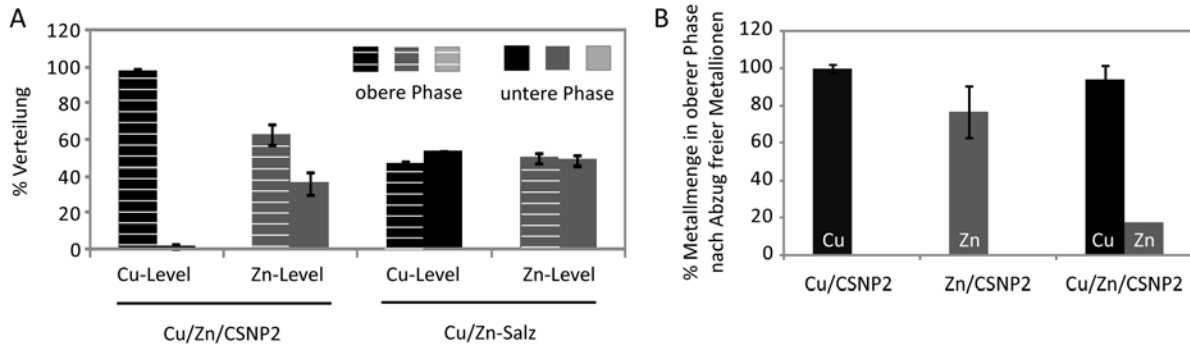


Abb. 9: Kompetitive Cu/Zn-Bindungsstudien von CSNP2. Ähnlich wie in Abb. 8 beschrieben wurden hier zusätzlich Cu- und Zn-Ionen kompetitiv zu CSNP2 gegeben. Während sich die reinen Metallsalze gleichmäßige in oberer und unterer Phase verteilen (A), zeigt sich für Cu/Zn/CSNP2 ein deutlicher Cu-Rückhalt in der oberen Phase (A). Nach der Verrechnung ergibt sich, dass hauptsächlich Cu-Ionen (95%) und zu einem sehr kleinen Teil Zn-Ionen (18%) von CSNP2 komplexiert werden (B). Statistik: Standardfehler, $n = 4$.

Die bei CSNP2 detektierte recht hohe Zn-Bindung wurde durch kompetitive Cu/Zn-Bindungsstudien näher untersucht. In Abwesenheit von CSNP2 ist bei den Cu- und Zn-Ionen eine gleichmäßige 50:50% Verteilung in oberer und unterer Phase zu erkennen (Abb. 9). In Anwesenheit von CSNP2 verbleiben 98% der Cu-Ionen und 63% der Zn-Ionen in der oberen Phase (Abb. 9). Die Verrechnung dieser Verteilungen und der Vergleich mit Cu/CSNP2 bzw. Zn/CSNP2 ergibt, dass 94% der Cu-Ionen und ca. 80% der Zn-Ionen von CSNP2 bei Einzelbeladung in der oberen Phase zurückgehalten werden. Bei kompetitiver Cu/Zn-Beladung werden 95% der Cu-Ionen und nur 18% der Zn-Ionen in der oberen Phase zurückgehalten (Abb. 9). Demnach ist für CSNP2 im Vergleich zur Zn- die Cu-Bindung deutlich stärker.

Insgesamt zeigte sich für CSNP1 und CSNP2 die stärkste Bindung für Cu-Ionen. Wenn nur Zn-Ionen zur Verfügung stehen, dann werden diese auch gebunden, allerdings ist diese Bindung nicht so stark. Im Vergleich zu CSNP1 hat CSNP2 ein größeres Potential Zn-Ionen zu binden. Im Gegensatz dazu bindet CSNP1 keine Mn-Ionen und CSNP2 bindet diese in einem sehr geringen Maße, wenn nur Mn-Ionen zu Verfügung stehen.

2.3 Toxizität der Cu/NP-Komplexe

Die Ermittlung der Toxizität von Cu/NP ist unerlässlich, um sicherzustellen, dass bei weiteren Untersuchungen mit nicht-toxischen Konzentrationen gearbeitet wird und beobachtete Effekte nicht durch Zelltoxizität beeinflusst sind.

2.3.1 Toxizität auf SH-SY5Y-Zellen

Die Toxizität bei SH-SY5Y-Zellen wurde mittels des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays (Promega) nach fünfstündiger Inkubation mit steigenden NP- oder Cu/NP-Konzentrationen ermittelt.

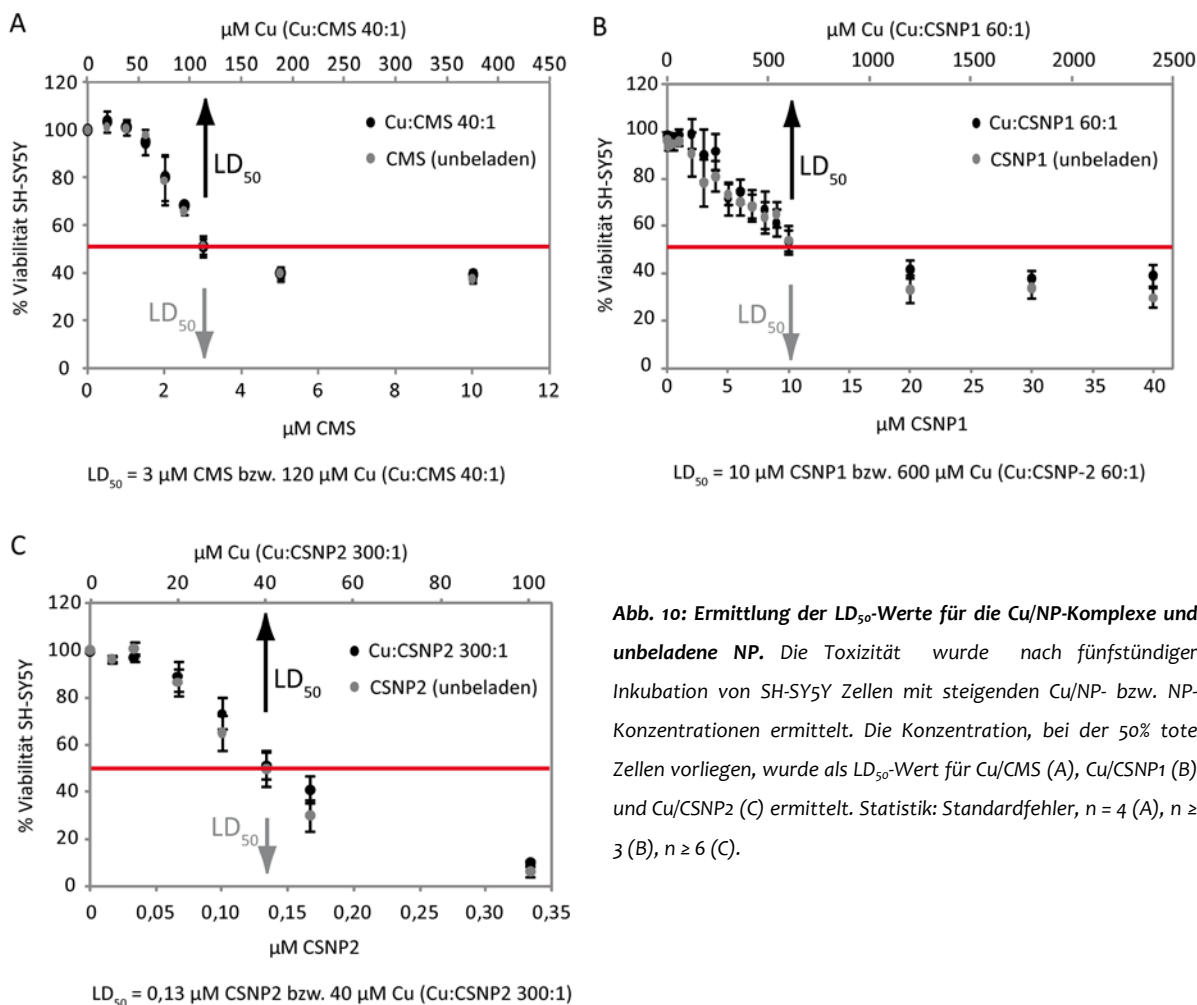


Abb. 10: Ermittlung der LD₅₀-Werte für die Cu/NP-Komplexe und unbeladene NP. Die Toxizität wurde nach fünfstündiger Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit steigenden Cu/NP- bzw. NP-Konzentrationen ermittelt. Die Konzentration, bei der 50% tote Zellen vorliegen, wurde als LD₅₀-Wert für Cu/CMS (A), Cu/CSNP1 (B) und Cu/CSNP2 (C) ermittelt. Statistik: Standardfehler, $n = 4$ (A), $n \geq 3$ (B), $n \geq 6$ (C).

Der unter den gewählten Bedingungen ermittelte LD₅₀-Wert liegt für Cu/CMS bei 120 μM (Cu:CMS 40:1) und unbeladenen CMS bei 3 μM CMS (Abb. 10). Für Cu/CSNP1 wurde ein LD₅₀-Wert von 600 μM (Cu:CSNP1 60:1) und für unbeladenen CSNP1 von 10 μM CSNP1 ermittelt (Abb. 10). Die höchste Toxizität wurde für Cu/CSNP2 mit einem LD₅₀-Wert von 40 μM (Cu:CSNP2 300:1) und 0,13 μM CSNP2 festgestellt (Abb. 10). Somit ist Cu/CSNP2 toxischer als Cu/CMS, der wiederum toxischer als Cu/CSNP1 ist. Bei allen NPs konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beladenen und unbeladenen NPs hinsichtlich der Toxizität auf SH-SY5Y-Zellen festgestellt werden.

Für die nachfolgenden Versuche wurden Konzentrationen verwendet, die mindestens 3-fach unter dem ermittelten LD₅₀-Wert liegen und daher nicht toxisch wirken sollten. Somit wurde

Cu/CMS oder CMS maximal eine Konzentration von 40 μM Cu (Cu:CMS 40:1) oder 1 μM CMS verwendet. Cu/CSNP1 wurde maximal in einer Konzentration von 120 μM Cu (Cu:CSNP1 60:1) bzw. 2 μM CSNP1 eingesetzt. Für Cu/CSNP1 liegen die verwendeten Konzentrationen mindestens 5-fach unter dem ermittelten LD_{50} -Wert. Cu/CSNP2 wurde in einer Maximalkonzentration von 10 μM Cu (Cu:CSNP2 300:1) oder 0,03 μM unbeladenen CSNP2 verwendet.

2.3.2 Toxizität auf HEK293T-Zellen

Für die Analysen der Cu-Bioverfügbarkeit (s. 11) wurden HEK293T-Zellen verwendet. Auch bei HEK293T-Zellen ist die Verwendung von nicht-toxischen Konzentrationen für valide Ergebnisse unablässig. Dazu wurden exemplarisch die bei dieser Zelllinie verwendeten Maximalkonzentrationen von beladenen und unbeladenen NPs mittels des MTS-Assays hinsichtlich der Toxizität untersucht.

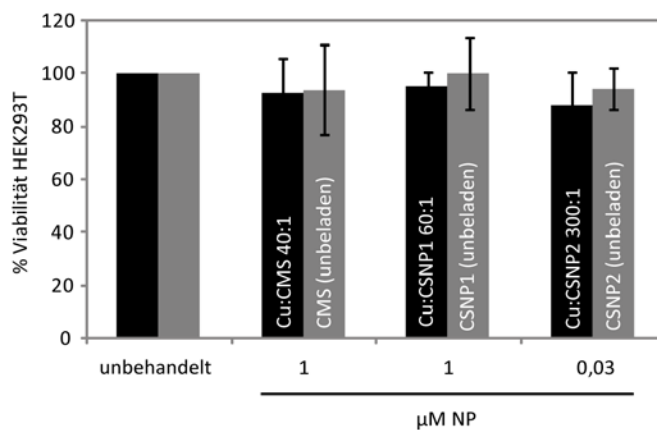


Abb. 11: Ermittlung der Toxizität der Cu/NP-Komplexe und unbeladenen NP auf HEK293T-Zellen. Die Toxizität wurde nach fünfständiger Inkubation ermittelt. Keine der untersuchten Konzentrationen 40 μM Cu (Cu:CMS 40:1) bzw. 1 μM CMS (unbeladen), 60 μM Cu (Cu:CSNP1 60:1) bzw. 1 μM CSNP1 (unbeladen) und 10 μM Cu (Cu:CSNP2 300:1) bzw. 0,03 μM CSNP2 (unbeladen) zeigt signifikante Toxizität. Statistik: Standardfehler, $n \geq 3$.

Bei den verwendeten Maximalkonzentrationen von 40 μM Cu (Cu:CMS 40:1) bzw. 1 μM CMS (unbeladen) wurden Viabilitätswerte von 93 ± 13 bzw. 94 ± 17 ermittelt (Abb. 11). Für 60 μM Cu (Cu:CSNP1 60:1) bzw. 1 μM CSNP1 (unbeladen) zeigte sich eine Viabilität von 96 ± 5 bzw. 100 ± 13 (Abb. 11). Bei 10 μM Cu (Cu:CSNP2 60:1) oder 0,3 μM CSNP2 (unbeladen) wurden Viabilitätswerte von 88 ± 12 bzw. 94 ± 8 festgestellt (Abb. 11). Insgesamt schwanken die ermittelten Viabilitätswerte mit einem Durchschnittswert von $94 \pm 10\%$ um 100% und es konnte kein Unterschied zur Kontrolle – unbeladene Zellen – erkannt werden (Abb. 11). Demnach zeigen diese Konzentrationen keinen Effekt hinsichtlich der Toxizität und die Verwendung bei den Cu-Bioverfügbarkeitsanalysen (s. 2.7) ist unbedenklich.

2.3.3 Toxizität auf HBMEC-Zellen

Bei den Untersuchungen zur BBB-Gängigkeit (s. 2.10) wurden HBMEC-Zellen verwendet. Für valide Ergebnisse, die auf nicht-toxischen Cu/NP-Konzentration basieren sollen, wurden exemplarisch die verwendeten Maximalkonzentrationen von beladenen und unbeladenen NPs mittels des MTS-Assays hinsichtlich der Toxizität untersucht.

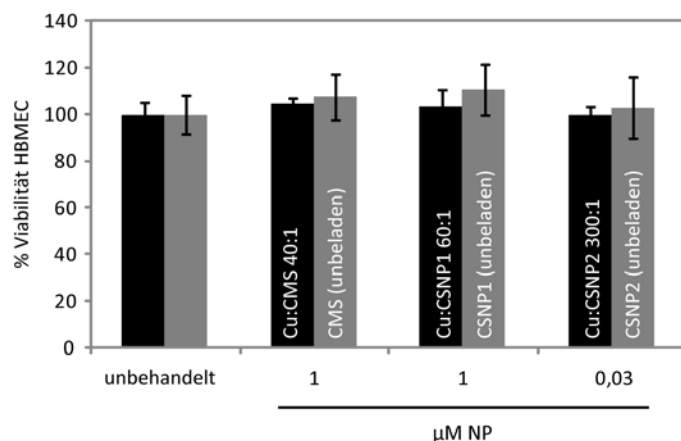


Abb. 12: Ermittlung der Toxizität der Cu/NP-Komplexe und unbeladenen NP auf HBMEC-Zellen. Nach fünfständiger Inkubation wurden für keine der untersuchten Konzentrationen 40 μM Cu (Cu:CMS 40:1) bzw. 1 μM CMS (unbeladen), 60 μM Cu (Cu:CSNP1 60:1) bzw. 1 μM CSNP1 (unbeladen) und 10 μM Cu (Cu:CSNP2 300:1) bzw. 0,03 μM CSNP2 (unbeladen) toxische Effekte beobachtet. Statistik: Standardfehler, n = 4.

Bei den verwendeten Maximalkonzentrationen von 40 μM Cu (Cu:CMS 40:1) bzw. 1 μM CMS (unbeladen) wurden Viabilitätswerte von 104 ± 3 bzw. 108 ± 10 ermittelt (Abb. 12). Für 60 μM Cu (Cu:CSNP1 60:1) bzw. 1 μM CSNP1 (unbeladen) zeigte sich eine Viabilität von 104 ± 7 bzw. 111 ± 11 (Abb. 12). Bei 10 μM Cu (Cu:CSNP2 60:1) oder 0,3 μM CSNP2 (unbeladen) wurden Viabilitätswerte von 100 ± 4 bzw. 103 ± 13 beobachtet (Abb. 12). Demnach schwanken die ermittelten Viabilitätswerte für HBMEC-Zellen ohne signifikanten Unterschied um den Kontrollwert von 100% und die verwendeten Konzentrationen zeigen keine toxischen Effekte (Abb. 12). Die Verwendung dieser Konzentrationen für die Analysen zur Überwindung der BBB (s. 2.10) ist unbedenklich.

2.4 Zelluläre Cu/NP-Aufnahme

2.4.1 Zelluläre Cu-Aufnahme nach Cu/NP-Inkubation

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, inwieweit es zu einer zellulären Aufnahme der Cu/NP-Komplexe kommt. Hierfür wurden zunächst SH-SY5Y Zellen mit ansteigenden Cu/NP-Konzentrationen behandelt und anschließend erfolgte die Bestimmung des zellulären Cu-Levels mittels ICP-MS-Messungen. Unter Berücksichtigung der vorhandenen Zellzahl konnte eine Berechnung des Cu-Gehalts pro Zelle erfolgen.

Bei allen untersuchten NPs führte eine fünfständige Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit Cu/NP-Komplexen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des zellulären Cu-Levels. So führte die Inkubation mit 40 μM Cu (Cu:CMS 40:1) zu einer Erhöhung des zellulären Cu-Levels auf 167 fg/Zelle (Abb. 13). Bei CSNP1 lag die zelluläre Cu-Konzentration nach einer Inkubation mit 10 μM Cu (Cu:CSNP1 60:1) bei 37,9 fg/Zelle und konnte durch die Inkubation mit 100 μM Cu (Cu:CSNP1 60:1) auf 486,0 fg/Zelle gesteigert werden (Abb. 13). Somit ist bei CSNP1 durch eine Inkubation mit der 10-fachen Menge eine Steigerung auf den 10-fachen Cu-Level möglich. Für CSNP2 konnte durch die Inkubation von 10 μM Cu (Cu:CSNP2 300:1) eine Steigerung des zellulären Cu-Levels auf 38,5 fg/Zelle erreicht werden (Abb. 13). Im Vergleich dazu fand bei einer um 50% reduzierten Cu-Konzentration, bei 5 μM Cu (Cu:CSNP2 300:1), mit 17,4 fg/Zelle nur eine circa halb so hohe Steigerung des zellulären Cu-Levels statt (Abb. 13).

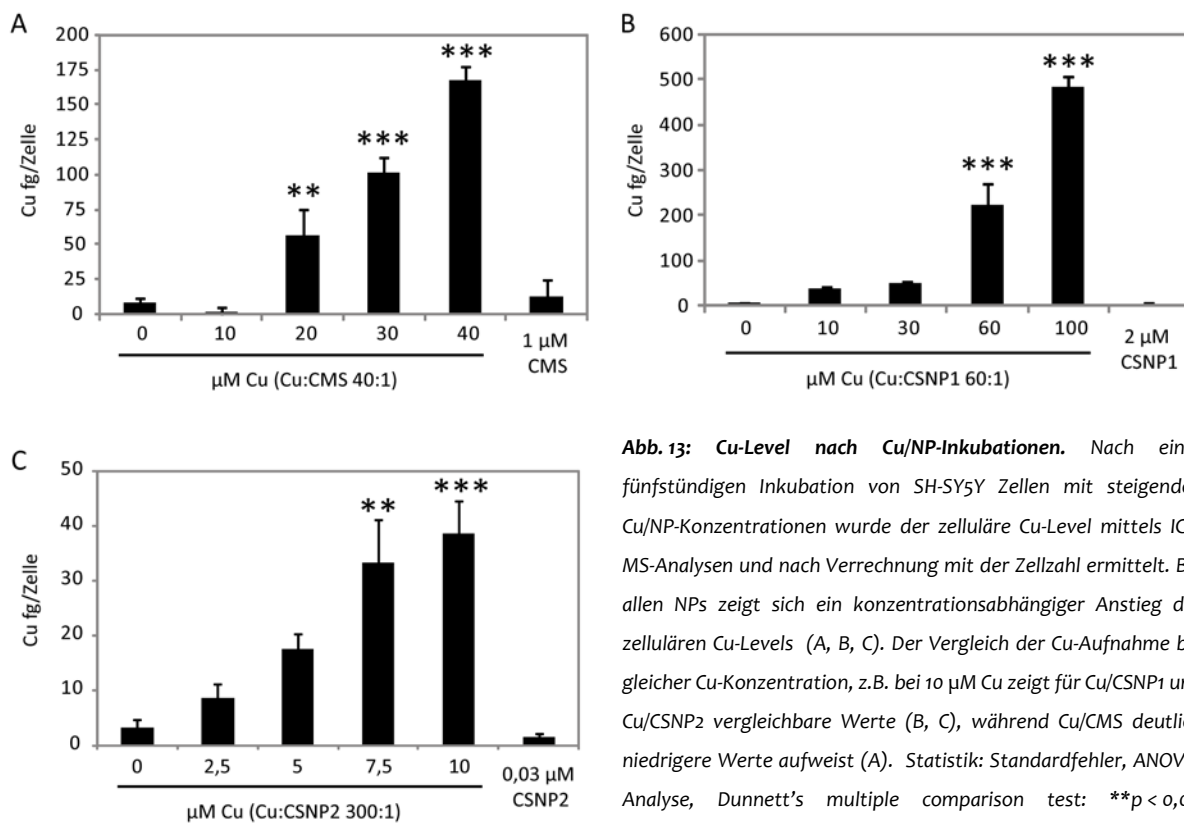


Abb. 13: Cu-Level nach Cu/NP-Inkubationen. Nach einer fünfständigen Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit steigenden Cu/NP-Konzentrationen wurde der zelluläre Cu-Level mittels ICP-MS-Analysen und nach Verrechnung mit der Zellzahl ermittelt. Bei allen NPs zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg des zellulären Cu-Levels (A, B, C). Der Vergleich der Cu-Aufnahme bei gleicher Cu-Konzentration, z.B. bei 10 μM Cu zeigt für Cu/CSNP1 und Cu/CSNP2 vergleichbare Werte (B, C), während Cu/CMS deutlich niedrigere Werte aufweist (A). Statistik: Standardfehler, ANOVA-Analyse, Dunnett's multiple comparison test: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n \geq 4$ (A), $n \geq 5$ (B, C).

Der Vergleich der Inkubation von 10 μM Cu in den jeweiligen Cu:NP-Verhältnissen auf den Cu-Level (Cu fg/Zelle) zeigt 2 für Cu/CMS, 38 für Cu/CSNP1 und 39 für Cu/CSNP2 (Abb. 13). Folglich ist die Cu-Aufnahme bei gleicher Cu-Konzentration für Cu/CSNP1 und Cu/CSNP2 vergleichbar und effektiver als bei Cu/CMS.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Cu-beladenen NPs bei allen untersuchten NPs zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung des zellulären Cu-Levels führt. Eine Untersuchung der Bioverfügbarkeit der aufgenommenen Cu-Ionen erfolgt in Abschnitt 2.7.

2.4.2 Zelluläre NP-Aufnahme nach Cu/NP-Inkubation

Neben den ICP-MS-Analysen wurde eine Fluoreszenzanalyse durchgeführt. Hierfür wurden SH-SY5Y Zellen mit CMS-Cy3, CSNP1-FITC oder CSNP2-CY3 inkubiert.

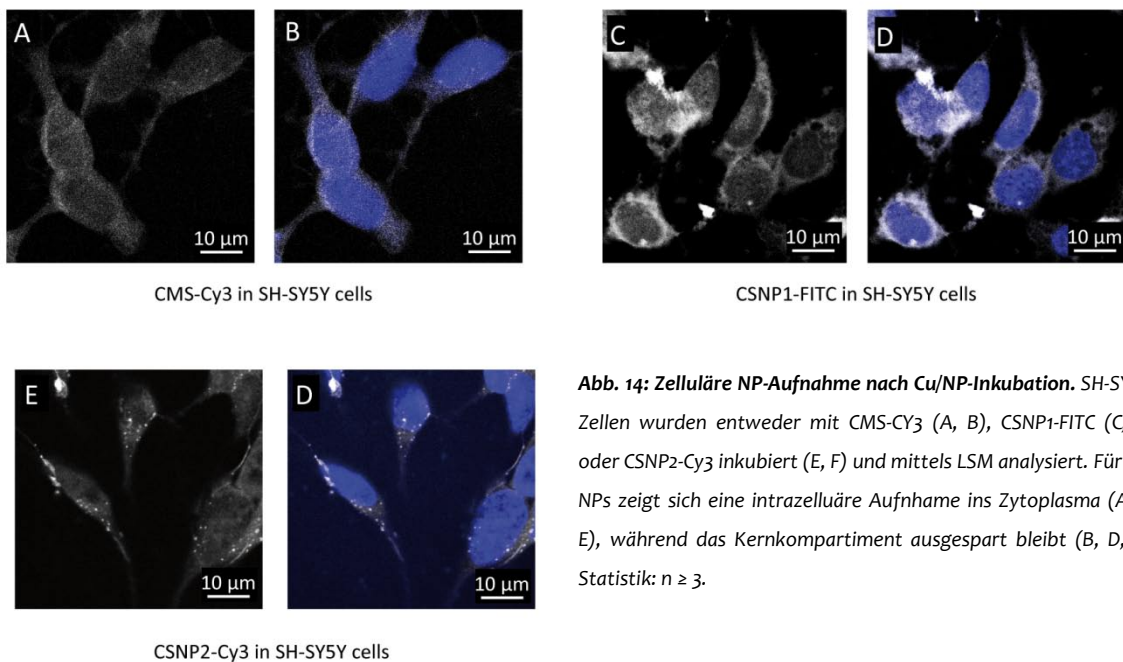


Abb. 14: Zelluläre NP-Aufnahme nach Cu/NP-Inkubation. SH-SY5Y-Zellen wurden entweder mit CMS-Cy3 (A, B), CSNP1-FITC (C, D) oder CSNP2-Cy3 inkubiert (E, F) und mittels LSM analysiert. Für alle NPs zeigt sich eine intrazelluläre Aufnahme ins Zytoplasma (A, C, E), während das Kernkompartiment ausgespart bleibt (B, D, F). Statistik: $n \geq 3$.

Für CMS-Cy3 zeigt sich deutlich eine Lokalisierung des NPs innerhalb der Zelle, nicht jedoch innerhalb des Nucleus (Abb. 14). Ähnliches zeigt sich für CSNP1-FITC, wo deutlich zu erkennen ist, dass dieser NP intrazellulär vorhanden ist, jedoch nicht in den Kern geht (Abb. 14). Und auch für CSNP2-Cy3 wurde eine Lokalisation des NPs im Zytoplasma beobachtet, während im Zellkern keine NPs detektiert wurden (Abb. 14). Somit konnte für alle NPs die intrazelluläre Aufnahme gezeigt werden.

2.5 Einfluss von Cu/NP oder Zn/NP auf den zellulären Zn-Level

Es konnte gezeigt werden, dass der CSNP1 in geringem Maße in der Lage ist neben Cu- auch Zn-Ionen zu binden (Abb. 15). Im Gegensatz dazu zeigte sich für CSNP2 eine deutlich höhere Zn-Bindung, die allerdings bei Konkurrenz von Cu- und Zn-Ionen zulasten der Cu-Bindungen in den Hintergrund tritt (Abb. 15). Zur Untersuchung dieser Zn-Bindungs Kapazität auf die Auswirkung

des zellulären Zn-Level wurden SH-SY5Y Zellen mit unterschiedlich beladenem CSNP1 oder CSNP2 inkubiert und anschließend der Metall-Spiegel mittels ICP-MS analysiert. Dabei wurden folgende Kombinationen untersucht: unbeladener NP, Cu/NP, Zn/NP und Cu/Zn/NP. Bei der letzten Kombination konkurrieren die beiden Metall-Ionen um die Bindungsstellen des NPs.

Für CSNP1 zeigte die Behandlung der SH-SY5Y-Zellen, dass der Zn-Level unabhängig von der Metallbeladung unverändert bei durchschnittlich 465 fg/Zelle bleibt (Abb. 15). Weder eine Zn/CSNP1- noch eine Cu/Zn/CSNP1-Behandlung führten zu einem erhöhten Zn-Level im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 15). Anders war es bei dem zellulären Cu-Level, wo sowohl die Cu/CSNP1- als auch die Cu/Zn/CSNP1-Inkubation zu einem stark erhöhten Cu-Level führten (Abb. 15). Die CSNP1- und Zn/CSNP1-Behandlungen zeigten hingegen keine Veränderung im Cu-Level (Abb. 15).

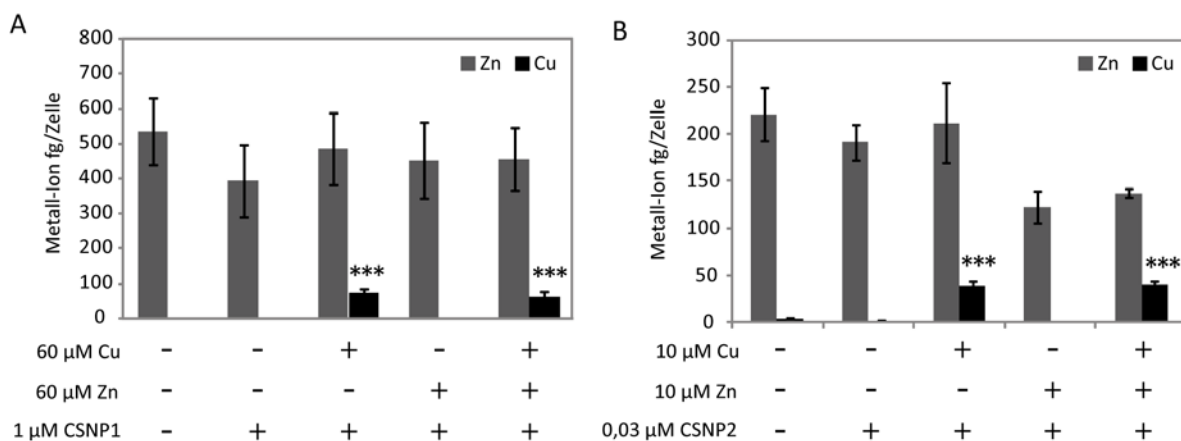


Abb. 15: Zn- und Cu-Level nach zellulärer Metall/CSNP1- oder Metall/CSNP2-Behandlung. SH-SY5Y Zellen wurden nach einstündiger Inkubation mit verschieden beladenem CSNP1 oder CSNP2 – unbeladen, Cu, Zn oder Cu/Zn – mittels ICP-MS auf ihren Cu- und Zn-Level analysiert. Bei beiden NPs zeigte sich der Zn-Level unbeeinflusst von der Metall/NP-Behandlung der Zellen. Im Unterschied dazu konnte nur bei Vorhandensein von Cu, wie der Cu/NP- oder der Cu/Zn/NP-Inkubation, eine deutliche Steigerung des Cu-Level erreicht werden. Somit transportiert sowohl CSNP1 also auch CSNP2 ausschließlich Cu- und keine Zn-Ionen in SH-SY5Y Zellen. Statistik: Standardfehler, ANOVA-Analyse, Dunnett's multiple comparison test: *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle, $n \geq 5$.

Für CSNP2 wurde ein ähnliches Ergebnis ermittelt. Die Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit verschieden beladenen CSNP2 u.a. die Zn/CSNP2- sowie die Cu/Zn/CSNP2-Inkubation zeigte keine signifikanten Schwankungen um einen durchschnittlichen Zn-Level von 177 fg/Zelle (Abb. 15). Im Gegensatz dazu führte sowohl die Cu/CSNP2- als auch die Cu/Zn/CSNP2-Behandlung mit durchschnittlich 40 fg Cu/Zelle zu einem ca. 12-fach erhöhten Cu-Level im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit 3 fg Cu/Zelle (Abb. 15). Die CSNP2- und Zn/CSNP2-Inkubationen zeigten keine Veränderung im Cu-Level (Abb. 15).

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass sowohl CSNP1 als auch CSNP2 spezifisch Cu-Ionen in die Zelle transportieren, während kein Transport von Zn-Ionen erfolgt. Gleichzeitig konnte kein Effekt der Cu-Behandlung oder der Behandlung mit unbeladenem NP auf den Zn-Level festgestellt werden. Somit beeinflusst die Cu-Behandlung den Zn-Level nicht.

Für Cu/CMS wurden diese Analysen nicht durchgeführt, da u.a. die Zn-Bindung wie für die anderen beiden NP nicht näher untersucht wurde. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Zn-Level von der Cu-Behandlung – Cu/CMS und CMS – nicht beeinflusst wird (Treiber et al., 2009).

2.6 Analyse des zellulären Aufnahmemechanismus von Cu/NP

Für die zelluläre Aufnahme von Substanzen existiert eine Vielzahl an Transportwegen, wie z.B. die Caveolea- und Clathrin-abhängige Endozytose (Doherty and McMahon, 2009, Parkar et al., 2009). Diese Transporte sind in der Regel energieabhängig und können folglich durch herabgesetzte Temperaturen inhibiert werden. So sollte bereits bei 16°C Umgebungstemperatur eine Reduzierung des aktiven Transports erfolgen und bei 4°C sollte dieser nahezu vollständig unterbunden sein (Bahhady et al., 2007). Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob von den Cu/CSNP1- oder Cu/CSNP2-Komplexen ein solcher energieabhängiger Transportmechanismus genutzt wird. Dazu wurde der Cu-Gehalt der SH-SY5Y-Zellen nach einer halbstündigen Cu/NP-Inkubation bei der jeweiligen Temperatur mittels ICP-MS ermittelt.

Zur Verifizierung dieser Methode wurde die zelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Transferrin nach halbstündiger SH-SY5Y-Inkubation bei den Temperaturen 37°C und 4°C analysiert. Transferrin wird über spezifische Transferrin-Rezeptoren in die Zelle aufgenommen und unterliegt einem aktiven, energieabhängigen Transportmechanismus (Aisen, 2004). Bei der Auswertung ist zu erkennen, dass bei 37°C eine deutlich erhöhte Transferrinmenge (354% Transferrinfluoreszenz im SH-SY5Y-Lysat) in den Zellen vorhanden ist und dass die Transferrinmenge bei 4°C (88 ± 13% Transferrinfluoreszenz im SH-SY5Y-Lysat) wieder das Ausgangsniveau un behandelter Zellen (100% Fluoreszenz im SH-SY5Y-Lysat) erreicht (Abb. 16 – A). Somit konnte gezeigt werden, dass wie erwartet die Transferrinaufnahme einem temperaturabhängigen Aufnahmeprozess unterliegt.

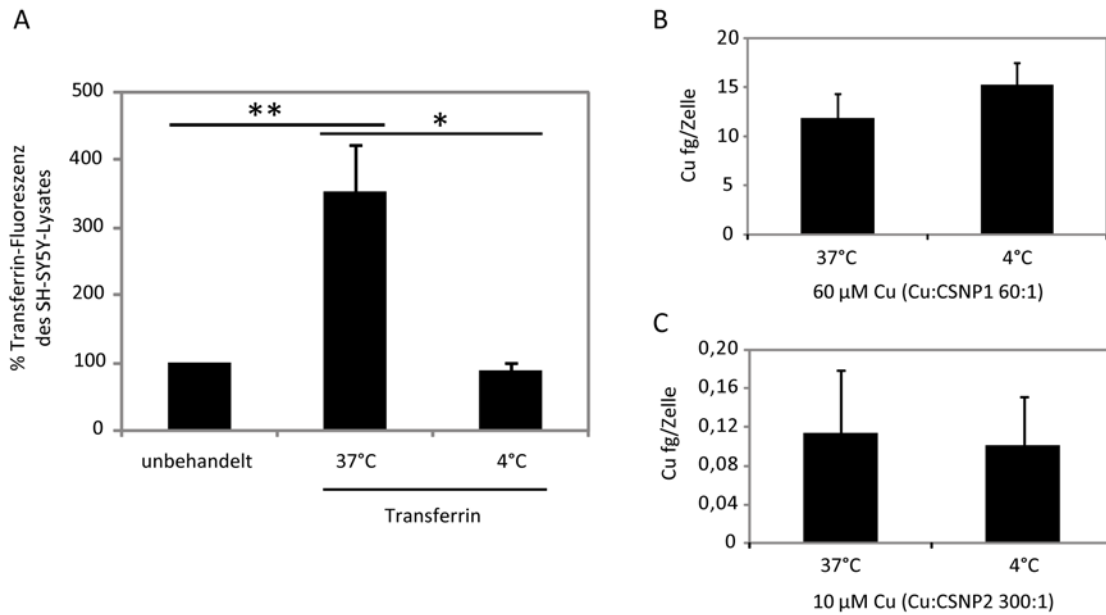


Abb. 16: Temperaturabhängige Transportanalysen von Transferrin sowie Cu/CSNP1 und Cu/CSNP2. Nach einer Vorinkubation bei der jeweiligen Temperatur erfolgte die Analyse der Aufnahme der Analyten nach einer halbstündigen Inkubation bei der jeweiligen Temperatur. Bei der Positivkontrolle zeigte sich im Vergleich zu 37°C bei 4°C eine deutlich reduzierte Transferrinaufnahme (A). Im Gegensatz dazu zeigt sich sowohl bei Cu/CSNP1 also auch bei Cu/CSNP2 kein Unterschied im Cu-Level zwischen den beiden untersuchten Temperaturen (B, C). Statistik: Standardfehler, Shapiro-Wilk-Test, ANOVA-Analyse, Dunn's Multiple Comparison Test (B), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n \geq 7$ (A), $n = 6$ (B), $n = 4$ (C).

Nun wurde der Cu-Level in SH-SY5Y-Zellen mittels ICP-MS-Analysen nach halbstündiger Cu/CSNP1- oder Cu/CSNP2-Inkubation bei den Temperaturen 37°C und 4°C untersucht. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den Cu-Leveln bei den verschiedenen Temperaturen festgestellt werden (Abb. 16 – D,C). Dieser bleibt bei durchschnittlich 15,1 fg/Zelle (Cu/CSNP1) oder 0,108 fg/Zelle (Cu/CSNP2) unabhängig von der Temperatur.

Somit ist weder die Cu/CSNP1- noch die Cu/CSNP2-Aufnahme temperaturabhängig und diese unterliegen somit auch nicht einem energieabhängigen Transport. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass der Transport beider NPs passiv erfolgt. Für Cu/CMS wurde in Transportstudien bereits ein aktiver Transport festgestellt (Treiber et al., 2009).

2.7 Zelluläre Cu-Bioverfügbarkeit: Cu-Detektion mittels des MRE-GFP-Konstrukts

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung mit Cu/NP-Komplexen zu einer Erhöhung des zellulären Cu-Levels führt (s. 2.4.1). Wichtig ist nun die Analyse, ob die an die NPs gebundenen Cu(II)-Ionen auch in der Zelle freigegeben werden und dort bioverfügbar sind. Diese Bioverfügbarkeit des Cu wird mittels eines MRE-GFP-Reporterkonstruktes untersucht.

Das Prinzip der Cu-Detektion basiert dabei auf einer indirekten Kaskade (Abb. 17), die bereits in Balamurugan and Schaffner, 2006, beschrieben wurde. In der Zelle freigesetztes Cu verdrängt Zn-Ionen, die an Metallothionein (MT) gebunden sind. Die nun freien Zn-Ionen lösen eine Rekrutierung von MTF-1 („metal transcription factor 1“) in den Zellkern aus. Dort lagert sich MTF-1 über die Zinkfinger-Domänen an sogenannte MREs („metal response elements“) an, welche dann eine erhöhte Expression des fusionierten GFP-Proteins zur Folge haben. Die Freisetzung des Cu korreliert dabei mit der Expression des GFP-Proteins.

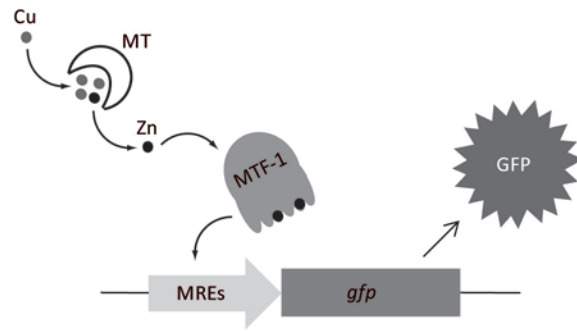


Abb. 17: Schematische Darstellung des Cu-Detektionsprinzips mittels des MRE-GFP-Reporter-konstruktes. Das Detektionsprinzip ist indirekt. Eine Erhöhung des zellulären Cu-Levels führt über MT, Zn-Ionen, MTF-1 und MREs zu einer erhöhten Expression des fusionierten GFP-Proteins.

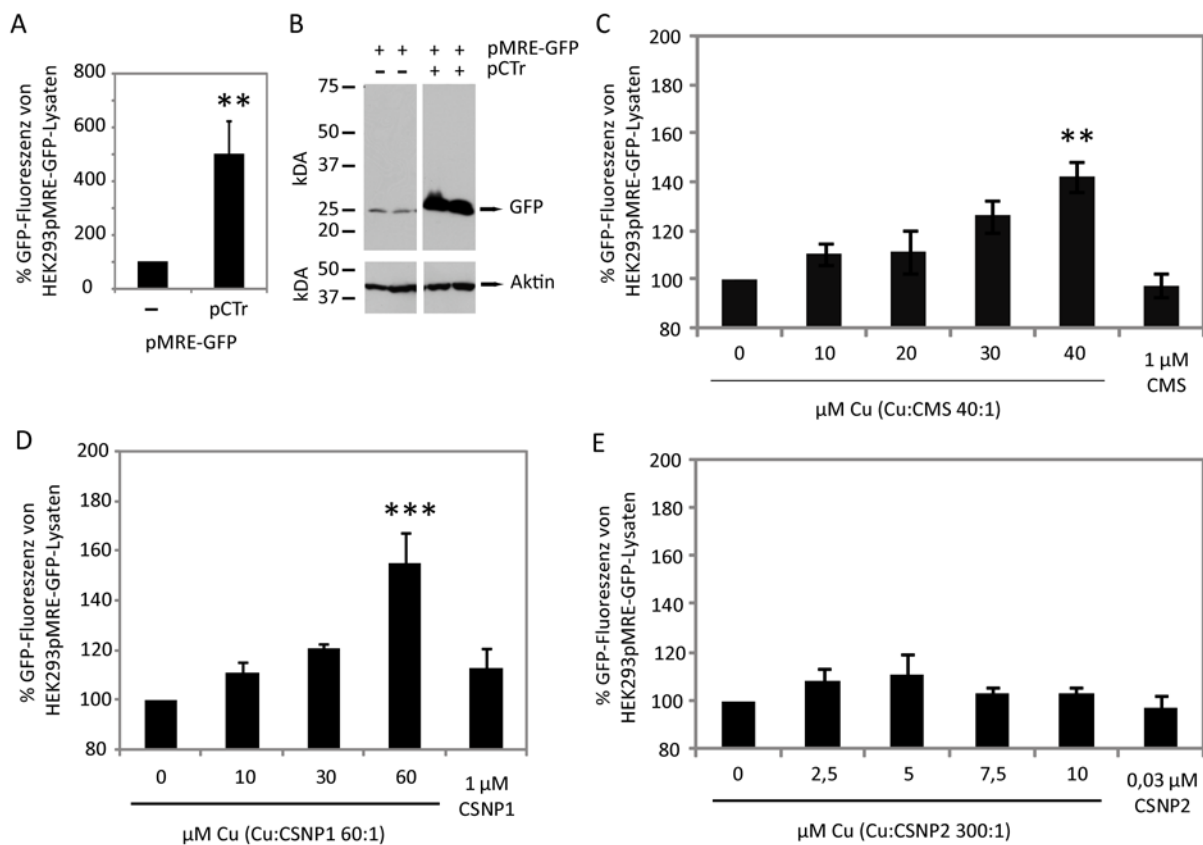


Abb. 18: Etablierung des MRE-GFP-Reporterkonstrukts mit pCTr und GFP-Expression von HEK293TpMRE-GFP-Lysaten in Abhängigkeit steigender Cu/NP-Konzentrationen. Die Expression von CTR als Positivkontrolle gemeinsam mit MRE-GFP hat einen erhöhten zellulären Cu-Level zur Folge (A) und zu einer deutlich erkennbaren GFP-Bande bei gleichbleibender Aktinbande (B). Eine fünfständige Inkubation von HEK293TpMRE-GFP führt bei einer Cu/CMS- und Cu/CSNP1-Inkubation nicht jedoch bei Cu/CSNP2 zu einer erhöhten GFP-Fluoreszenz und folglich zu einer konzentrationsabhängigen Cu-Freigabe. Es ist kein signifikanter Anstieg der GFP-Fluoreszenz durch Zugabe des unbeladenen NP detektierbar (D, E). Statistik: Standardfehler, Students t-Test (A), Kruskal-Wallis Test und anschließend Dunn's multiple comparison test (C, D, E): ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n \geq 10$ (A), $n \geq 6$ (C), $n \geq 4$ (D) oder $n = 7$ (E).

Zunächst wurde dieses Cu-Detektionsprinzip etabliert. Dazu wurde die intrazelluläre GFP-Expression nach einer transienten Expression von pMRE-GFP und pCTr (Ctr = Copper transporter) in Hek293T-Zellen mittels Fluoreszenzmessungen und Western Blot analysiert. Die Expression von pCTr führt zu einer Expression von CTr, was einen erhöhten Cu-Import und somit einen erhöhten zellulären Cu-Level zur Folge hat. Die transiente Expression beider Konstrukte führt zu einer fünffach erhöhten GFP-Expression bei den Fluoreszenzmessungen der Zellysate bzw. zu einer deutlichen GFP-Bande im Western Blot bei gleichbleibender Aktinbande (Abb. 18). Damit konnte gezeigt werden, dass dieses Cu-Detektionsprinzip in der verwendeten Zelllinie funktioniert und zur Analyse verwendet werden kann.

Nun konnte die Analyse der Cu-Freisetzung in Abhängigkeit von Cu/NPs-Komplexen erfolgen. Dazu wurde die GFP-Expression von Hek293T-Zellen, die transient pMRE-GFP exprimieren, nach fünfstündiger Inkubation mit steigenden Cu/NP-Konzentrationen untersucht. Bei Cu/CMS-Inkubation führt die höchste untersuchte Konzentration von 40 μM Cu (Cu:CMS 40:1) zu einer Steigerung der GFP-Fluoreszenz um 43% (Abb. 18). Die Verwendung von 10, 30 und 60 μM Cu (Cu:CSNP1 60:1) resultiert in einer Steigerung um 11%, 21% und 55% der GFP-Fluoreszenz (Abb. 18). Da die GFP-Fluoreszenz mit der GFP-Expression und letztendlich mit dem intrazellulären Cu-Level korreliert, zeigt sich sowohl bei der Cu/CMS-Inkubation als auch bei der Cu/CSNP1-Behandlung eine konzentrationsabhängige Cu-Freigabe. Im Gegensatz dazu ist bei der Cu/CSNP2-Inkubation keine Steigerung der GFP-Fluoreszenz und somit auch keine erhöhte Bioverfügbarkeit der Cu-Ionen zu erkennen. Die zelluläre Behandlung mit unbeladenen NPs führt bei 1 μM CMS, 1 μM CSNP1 und 0,03 μM CSNP2, der jeweils höchsten verwendeten NP-Konzentration bei der entsprechenden Cu/NP-Inkubationen, wie erwartet zu keiner signifikanten Erhöhung der GFP-Fluoreszenz.

Zusammenfassend kann eine Erhöhung der GFP-Fluoreszenz und folglich Cu-Freigabe mit zugeführten Cu-Ionen aus dem Cu/CMS und Cu/CSNP1-Komplex nicht jedoch aus dem Cu/CSNP2-Komplex erreicht werden.

2.8 pH-abhängige Cu-Freigabe aus dem Cu/NP-Komplex

Es konnte bereits gezeigt werden, dass es zu einer zellulären Cu-Freigabe aus dem Cu/CMS- und Cu/CSNP1-Komplex kommt (s. 2.7). Nun wird analysiert, inwiefern ein möglicher Mechanismus der Cu-Freigabe der pH-Abhängigkeit unterliegt. Der pH-Wert innerhalb der Zelle liegt bei ca. 7,4 und

mit den Lysosomen gibt es Bereiche in der Zelle, die mit 4,5 – 5 einen deutlich niedrigeren pH-Wert aufweisen. Zur Untersuchung wurde die Menge des Komplexes bei verschiedenen pH-Werten analysiert.

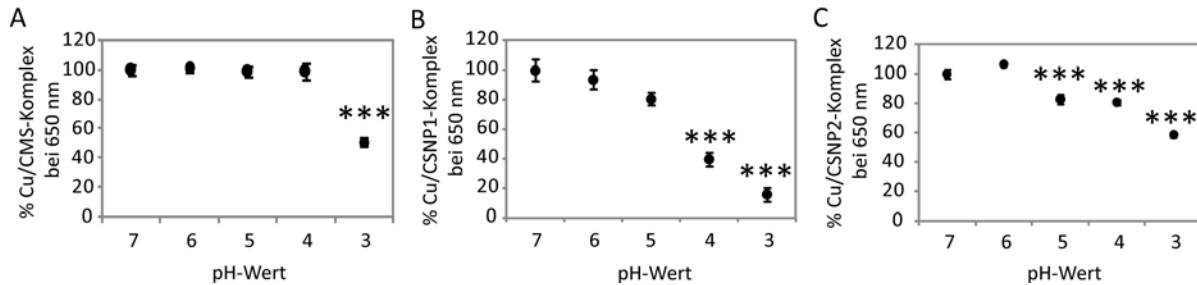


Abb. 19: pH-abhängige Cu-Freigabe aus den Cu/NP-Komplexen. Zur Analyse wurde das Absorptionsmaximum bei 650 nm genutzt und die untersuchten pH-Werte wurden in einer Natriumacetat-Lösung stabilisiert. Die Absorption freier Cu-Ionen bei 650 nm wurde von den ermittelten Absorptionswerten subtrahiert. Für Cu/CMS zeigt sich erst bei pH 3 eine deutliche Reduzierung der Komplexmenge, während bei Cu/CSNP1 bereits bei pH 5 eine leichte und bei noch saureren pH-Werten eine deutliche Verminderung der Komplexmenge zu erkennen ist. Statistik: Standardfehler, ANOVA-Analyse, Dunnett's multiple comparison test: *** $p < 0,001$, $n = 5$ (A), $n = 4$ (B).

Die Cu/NPs-Komplexe weisen bei 650 nm ein spezifisches Absorptionsmaximum auf (s. 4.2.1), welches zur Detektion der Menge des bestehenden Komplexes genutzt wurde. Als Ausgangsbasis (100%) wurde die Menge bei einem pH-Wert von 7 betrachtet. Der Cu/CMS-Komplex zeigte sich über den gesamten pH-Bereich recht stabil, erst bei pH 3 war eine deutliche Reduzierung der Cu/CMS-Komplexmenge auf ca. 50% zu beobachten (Abb. 19). Demzufolge erfolgt hier erst bei einem sehr niedrigen pH-Wert eine Cu-Freisetzung. Für Cu/CSNP1-Komplexe hingegen ergab sich über den gesamten analysierten pH-Bereich mit saurer werdenden pH-Werten eine Verminderung der Cu/NP-Komplexmenge. Bei pH 5 ist noch eine Menge von 81% vorhanden und diese sank weiter auf 40% bei pH 4 und letztendlich bei pH 3 auf 16% der Ausgangswerte (Abb. 19). Dies bedeutet gleichzeitig eine Freisetzung der gebundenen Cu-Ionen bereits bei physiologischen pH-Werten. Bei Cu/CSNP2 gibt es bei pH 5 eine signifikante Reduktion der Cu/NP-Komplexmenge um 83% (Abb. 19). Bei saureren pH-Werten ist eine weitere Verminderung der Cu/CSNP2-Komplexmenge zu beobachten, bis maximal um 58% bei pH 3 (Abb. 19). Folglich kann auch bei Cu/CSNP2 eine Cu-Freigabe aufgrund eines sauren pH-Wertes erfolgen. Zusammenfassend ist Cu/CSNP1 deutlich pH-sensitiver als Cu/CSNP2 und Cu/CMS.

2.9 Analyse der APP-Prozessierung nach Cu/NP-Behandlung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *in vitro* durch einen Cu-Überschuss die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung stimuliert und die amyloidogene Prozessierung reduziert wird (Borchardt et al., 1999). Nach den vorherigen, vielversprechenden Ergebnissen der Analyse der

Cu-Bioverfügbarkeit nach Cu/NP-Behandlung wurde nun untersucht, inwieweit eine Cu/NP-Behandlung Auswirkungen auf die APP-Prozessierung und somit auf die Menge der gebildeten A β -Spezies hat. Dazu wurden SH-SY5Y-APP Zellen nach fünfstündiger oder 24-stündiger Inkubation mit steigenden Cu/CSNP1-Konzentrationen mittels ELISA- sowie Western Blot-Untersuchungen analysiert.

Für Cu/CMS zeigten die ELISA-Auswertungen, dass keine der verwendeten Cu-Konzentrationen von 10, 20 und 40 μ M Cu (Cu:CMS 40:1) zu einer Veränderung der untersuchten A β -Spezies – A β 38, A β 40 und A β 42 – nach einer fünfstündigen Cu/CMS-Inkubation führt (Abb. 20). Bei einer 24-stündigen Inkubation mit den gleichen Cu/CMS-Konzentrationen wurde ein ähnliches Ergebnis beobachtet; die verschiedenen A β -Level blieben unverändert (Daten nicht gezeigt).

Bei den ELISA-Auswertungen für Cu/CSNP zeigt sich, dass keine der untersuchten A β -Spezies – A β 38, A β 40 und A β 42 – nach einer fünfstündigen Inkubation in den Konzentrationen 10, 40 und 60 μ M Cu (Cu:CSNP1 60:1) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aufweist (Abb. 20). Auch bei der Detektion des A β_{ges} -Levels wiederholt sich dieses Ergebnis (Abb. 21). Bei 24-stündiger Inkubation mit den gleichen Konzentrationen zeigt sich ein ähnliches Resultat, denn auch hier konnte kein Effekt auf die verschiedenen A β -Level detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

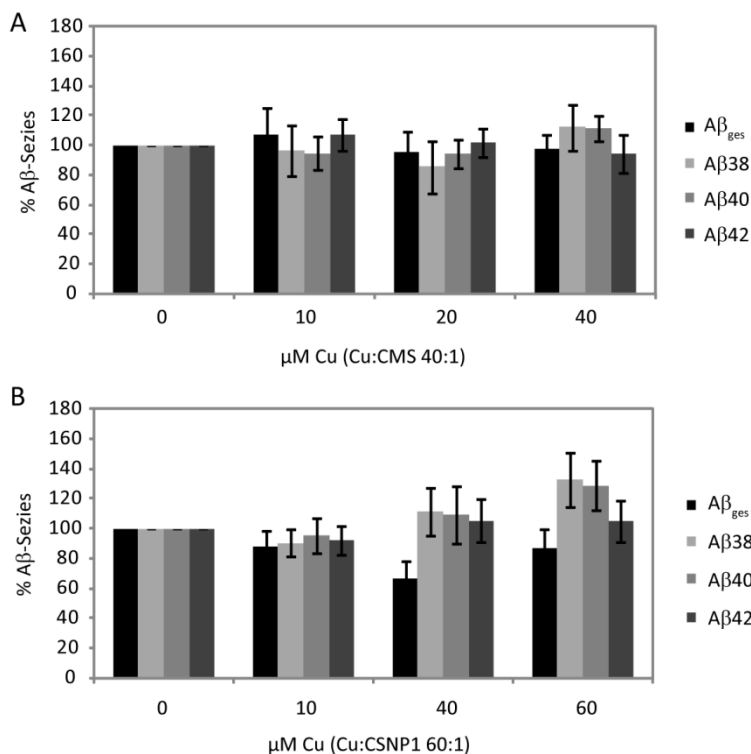


Abb. 20: Quantifizierung der A β -Spezies nach Cu/CMS oder Cu/CSNP1-Inkubation. Nach fünfstündiger Inkubation von SH-SY5Y Zellen, die stabil APP überexprimieren, mit steigenden Cu/NP-Konzentrationen konnten mittels ELISA-Analyse die Level der untersuchten A β -Spezies – A β_{ges} , A β_{38} , A β_{40} und A β_{42} – bestimmt werden. Bei Cu/CMS zeigten die Level der verschiedenen A β -Spezies keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (A). Auch bei Cu/CSNP1 konnte hinsichtlich der untersuchten A β -Level kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle detektiert werden (B). Statistik: Standardfehler, ANOVA-Analyse; n \geq 3.

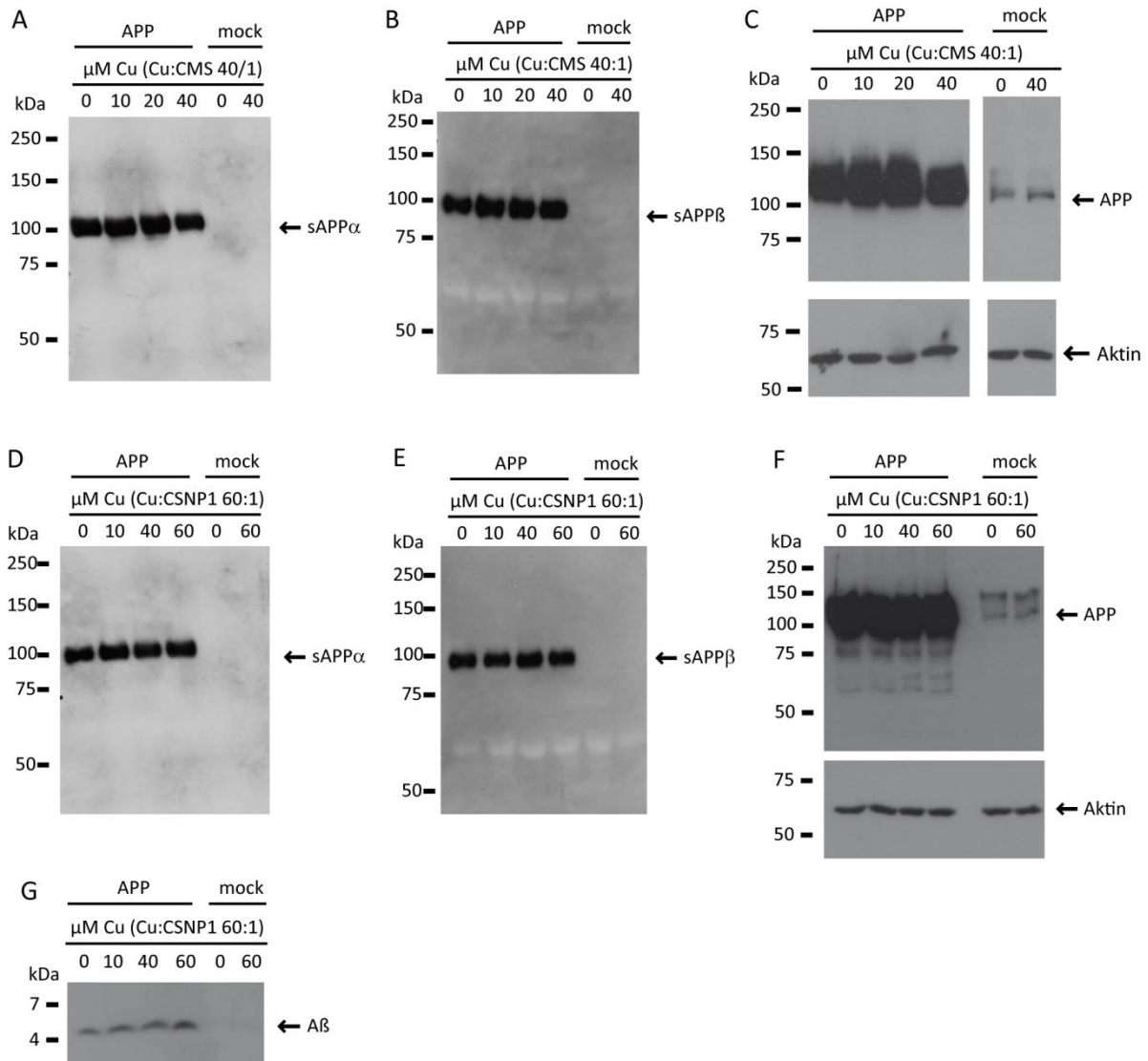


Abb. 21: APP-Prozessierung nach Cu/CMS- oder Cu/CSNP1-Inkubation. Im Überstand von SH-Sy5Y-APPZellen, kann nach fünfständiger Inkubation mit steigenden Cu/CMS- oder Cu/CSNP1-Konzentrationen sowohl bei sAPP α (A, D) und sAPP β (B, E) als auch bei APP (C, F) und bei A β (D) kein Unterschied zur Kontrolle detektiert werden. Durchführung der Western Blots mit 1. Antikörper WO₂ (A, C, D, F, G) bzw. antiAPP β (B, E) und antiAktin (C, F). n = 4.

Im Western Blot wurden die sAPP α - und sAPP β -Level nach Cu/CMS-Inkubationen analysiert. Steigende Cu/CMS-Konzentrationen – 10, 20 und 40 μ M Cu (Cu:CMS 40:1) – führen zu keiner Veränderung der sAPP α - bzw. sAPP β -Level im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 21). Auch die APP-Level bleiben bei den verschiedenen Cu/CMS-Konzentrationen unverändert (Abb. 21). Somit wurden die oben ermittelten ELISA-Ergebnisse bestätigt. Auch eine 24-stündige Cu/CMS-Inkubation resultierte nicht in veränderte sAPP α -, sAPP β -, APP- und A β -Level (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der sAPP α - und sAPP β -Level im Western Blot nach Cu/CSNP1-Inkubationen bestätigt die oben ermittelten Ergebnisse bezüglich der Menge A β -Spezies. Auch bei steigenden Cu/CSNP1-Konzentrationen – 10, 40 und 60 μ M Cu (Cu:CSNP1 60:1) – bleibt der sAPP α - bzw. sAPP β -Level im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Abb. 21). Ähnliches zeigt sich bei den APP-Leveln im Lysat und bei den A β -Leveln im Medium, wo keine Veränderung in Abhängigkeit der verschiedenen Cu/CSNP1-Konzentrationen detektiert werden konnte (Abb. 21). Auch bei 24-stündiger Cu/CSNP1-Inkubation konnten keine veränderten sAPP α -, sAPP β -, APP- und A β -Level festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach Cu/CMS- oder Cu/CSNP1-Behandlung weder ein quantitativer Effekt auf die Bildung der A β -Spezies noch ein qualitativer Effekt auf die Bildung der sAPP-Level gezeigt werden kann. Demnach scheint es durch die Cu/NP-Inkubation keinen Effekt auf die APP-Prozessierung zu geben. Für Cu/CSNP2 wurden diese Analysen nicht durchgeführt, da bei diesem NP-Komplex keine Steigerung der Cu-Bioverfügbarkeit detektiert wurde.

2.10 Analyse des Transports von Cu/NP-Komplexen über die Bluthirnschranke

Wichtig für einen möglichen therapeutischen Einsatz von Cu/NP-Komplexen ist deren Potential zur Überwindung der BBB, denn letztendlich soll der therapeutische Wirkungsort das Gehirn sein.

Um dieses zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Modell der BBB basierend auf HBMEC-Zellen (human brain microvascular endothelial cells) etabliert und anschließend die Transportfähigkeit der Cu/NP-Komplexe über dieses BBB-Mono-Zell-Modell analysiert. Die Permeabilitätsanalysen erfolgten in einem sogenannten „transwell system“, bei welchem zwischen einer oberen (luminalen) Kammer und einer unteren (abluminalen) Kammer eine lückenlose Barriere aus einem HBMEC-„Monolayer“ gebildet wurde (Abb. 22).

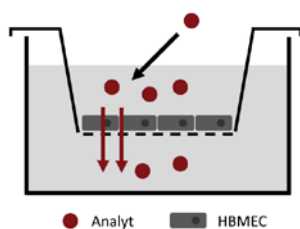


Abb. 22: Schematische Darstellung des *in vitro* Modells der BBB basierend auf HBMEC-Zellen. Die Zellen werden auf speziellen Membranen in einem „transwell system“ ausgesät und bilden dann die Barriere zwischen der luminalen (oberen) und abluminalen (unteren) Kammer aus.

2.10.1 Etablierung eines HBMEC-Mono-Zell-Modells der Bluthirnschranke

Zur Validierung dieses Modells wurden gängige Untersuchungen über die Ausbildung der speziellen Verbindungselemente (TJs), des Transendothelialen Widerstandes (TEER = „transendothelial electrical resistance“) sowie der Permeabilitätsfähigkeit der Testsubstanzen Evans Blue Albumin (Ziebarth and Wang), Natrium-Fluorescein (NaFl), Propidiumlodid (PI) und ¹⁴C-Sucrose unternommen. Mit diesen Analysen kann die Ausbildung eines vollständigen HBMEC-„Monolayers“ überprüft werden.

2.10.1.1 Detektion der Zell-Zell-Kontakte mittels ZO1-Immunfluoreszenz

Ein typisches Kennzeichen der BBB sind die TJs zwischen den Endothelzellen. Dabei handelt es sich um durchgängige Zell-Zell-Kontakte, die eine weitgehend undurchlässige Barriere bilden und auch keinen passiven Ionentransport zulassen (s. 1.2.3). Mittels einer Immunfluoreszenzanalyse kann die Ausbildung dieser TJs visualisiert werden. Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der ZO1 detektiert, welches ein für Endothelzellen typisches Zellmembranprotein und in die Ausbildung der TJs involviert ist (Siddharthan et al., 2007, Balbuena et al., 2011). Zudem erfolgt die Immunfluoreszenzuntersuchung der Zellen mit anti-vWF (von Willebrand Faktor). Bei vWF handelt es sich um einem gängigen Marker für Endothelzellen (Jaffe, 1977).

Nach Aussaat der HBMEC-Zellen konnte mittels der ZO1-Immunfluoreszenz (Abb. 23) eine durchgehende Lokalisation von ZO1 an den Zell-Zell-Kontakten detektiert werden (Abb. 23). Somit konnte eine typische Ausbildung der TJs zwischen den einzelnen Endothelzellen gezeigt werden. Die anti-vWF-Färbung zeigt die für Endothelzellen typische körnige Färbung innerhalb der Zellen. Zusammenfassend wird bestätigt, dass es sich um Endothelzellen handelt und dass diese durchgehend TJs ausbilden.

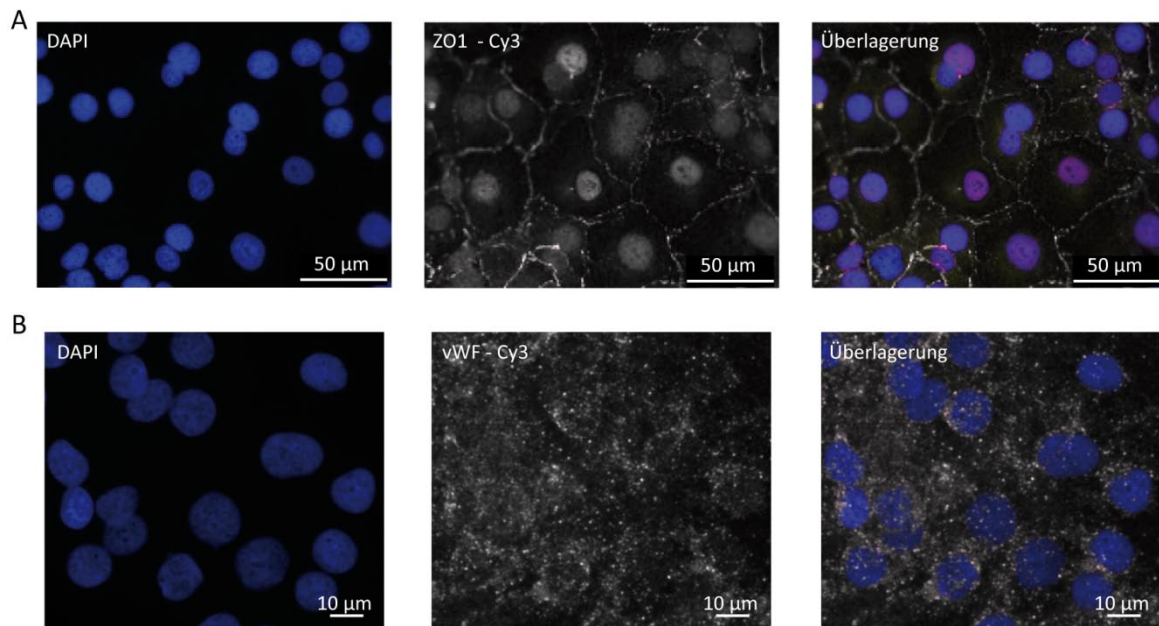


Abb. 23: ZO1- und vWF-Immunfluoreszenz von HBMEC-„Monolayer“. Die Zellen wurden mit ZO1- und vWF-Antikörpern mittels Immunfluoreszenz analysiert. Es kann ein durchgehendes Vorkommen von ZO1 an Zell-Zell-Kontakten und somit eine gute Ausbildung der TJs detektiert werden (A). Zusätzlich zeigte sich für vWF eine körnige Struktur innerhalb der Zellen, die typisch für Endothelzellen ist (B). Statistik: $n \geq 4$.

Gleichzeitig lässt sich an den Abbildungen, insbesondere an der DAPI-Färbung, erkennen, dass sich auf der Membran, genauso wie *in vivo* vorliegend, ein HBMEC-„Monolayer“ und kein „Bilayer“ oder gar „Trilayer“ bildet, was entscheidende Auswirkungen auf die Permeabilität hätte.

2.10.1.2 Ausbildung des TEER-Wertes

Die Messung des transendothelialen Widerstands (TEER – transendothelial electrical resistance) ist eine gängige Messung bei BBB-Modellen und ist ein Indiz für die Ausbildung des Zell-„Monolayers“ (Deli et al., 2003). Eine Eigenschaft der Endothelzellen der BBB bei der Ausbildung des „Monolayer“ sind die bereits beschriebenen TJs, die für einen festen Zellverbund und niedrige Durchlässigkeit für Ionen sorgen (Engelhardt and Sorokin, 2009). Bei vollständig ausgebildeten HBMEC-„Monolayer“ sollte der Ionentransport zwischen der luminalen und abluminalen Kammer minimiert und somit der elektrische Widerstand erhöht sein. *In vivo*, wie z.B. in Froschhirnen, wurden TEER-Werte von 1000 – 8000 Ωcm^2 ermittelt, während bei *in vitro* Modellen TEER-Werte ab 9 Ωcm^2 dokumentiert sind (Pardridge, 1999, Gumbleton and Audus, 2001, Deli et al., 2005).

Die Messung des TEER-Wertes erfolgt mit einer Messelektrode, die jeweils in beide Kammern taucht (Abb. 24) und üblicherweise wird die Berechnung wie folgt vorgenommen: $(\Omega_{\text{Monolayer}} - \Omega_{\text{unbewachsen}}) * 1,12 \text{ cm}^2 = \Omega \text{cm}^2$ (Cohen-Kashi Malina et al., 2009).

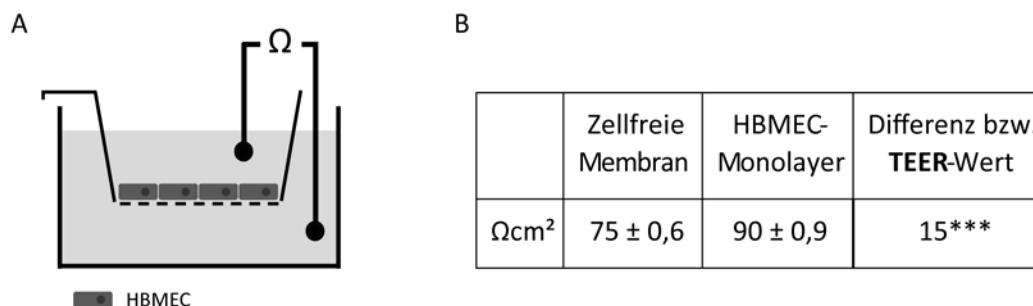


Abb. 24. Schematische Darstellung der TEER-Messung und Ermittlung des TEER-Wertes des HBMEC-Mono-Zell-Modells. Es wird der elektrische Widerstand zwischen der abluminalen und luminalen Kammer gemessen, deren Barriere durch HBMEC-Zellen gebildet wird (A). TEER-Messungen von zellfreien Membranen und HBMEC-„Monolayern“ ergeben nach einem viertägigen Wachstum einen TEER-Wert von $15 \Omega \text{cm}^2$. Statistik: Student's t-t, $***p < 0,001$, $n = 41$.

Die Ausbildung des „Monolayers“ wird zunächst über die Zeit verfolgt, indem der TEER-Wert an verschiedenen Tagen analysiert wird. Der TEER-Wert steigt von $4 \Omega \text{cm}^2$ (Tag 1), $7 \Omega \text{cm}^2$ (Tag 2), $10 \Omega \text{cm}^2$ (Tag 3) auf $15 \Omega \text{cm}^2$ (Tag 4) (Abb. 25). Demnach erreicht der TEER-Wert nach einem viertägigen Wachstum sein Maximum (Abb. 25). Dieses Maximum ist mit $15 \Omega \text{cm}^2$ trotz seines geringen Nennwertes ein signifikantes Resultat der Widerstandsmessungen von zellfreien und mit HBMEC-„Monolayer“ bewachsenen Membranen (Abb. 24).

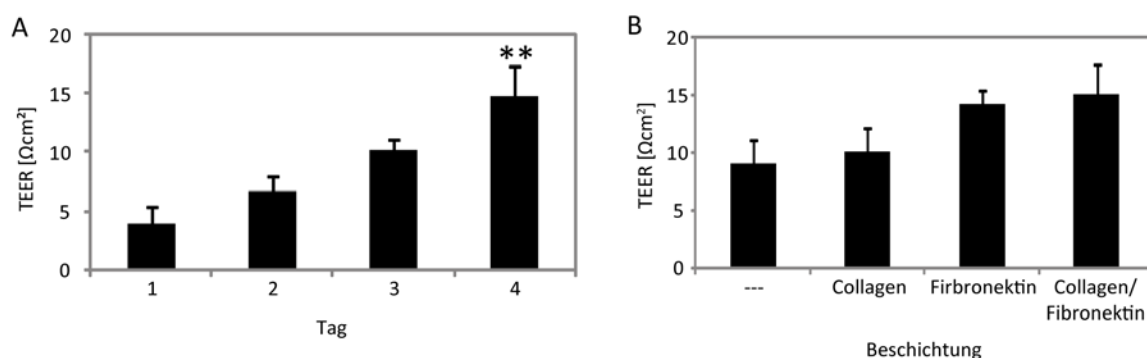


Abb. 25. TEER-Wert (Ωcm^2) von HBMEC-Mono-Zell-Modells in Abhängigkeit der Zeit sowie in Abhängigkeit verschiedener Beschichtungen. Bei der Analyse des Wachstums zeigte sich, dass der TEER-Wert ein Maximum von $15 \Omega \text{cm}^2$ nach viertägigem Wachstum erreichte (A). Beim Vergleich der verschiedenen Beschichtungen mit Collagen und Fibronektin zeigte sich mit $15,1 \Omega \text{cm}^2$ der höchste TEER-Wert bei der kombinierten Beschichtung (B). Jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant unterschiedlich zu den Einzelbeschichtungen (B). Statistik: ANOVA-Analyse, Dunnett's multiple comparison test (A), $**p < 0,01$, $n = 3$ (A), $n = 4$ (B).

Es wurde zudem untersucht, ob sich der TEER-Wert durch die Beschichtung des Filters mit verschiedenen Substanzen steigern lässt. Die Beschichtungen werden direkt auf die Membran der

verwendeten Transwell-Platten aufgebracht und sorgen für die Anheftung der Zellen. Mit einer optimalen Interaktion zwischen Beschichtung und HBMEC-Zellen kann folglich die korrekte Ausbildung des „Monolayers“ beeinflusst werden. Es wurde eine Collagen-, Fibronectin- und Collagen/Fibronectin-Beschichtung sowie unbehandelte Filter miteinander verglichen. Der TEER-Wert steigt von $9 \Omega\text{cm}^2$ (unbehandelter Filter), $10 \Omega\text{cm}^2$ (Collagen-Beschichtung), $14 \Omega\text{cm}^2$ (Fibronectin-Beschichtung) auf $15 \Omega\text{cm}^2$ (Collagen/Fibronectin-Beschichtung) (Abb. 25). Der Vergleich der verschiedenen Beschichtungen zeigt, dass die Kombination von Collagen und Fibronectin mit $15,1 \Omega\text{cm}^2$ das beste Ergebnis bzw. den höchsten TEER-Wert erzielt. Allerdings ist der Unterschied zu unbehandelten Filtern nicht signifikant (Abb. 25).

Zusammenfassend konnte für das *in vitro* Modell der BBB basierend auf HBMEC-Zellen der maximale TEER-Wert von $15 \Omega\text{cm}^2$ nach viertägigem Wachstum bei einer Collagen/Fibronectin-Beschichtung ermittelt werden. Unter diesen Bedingungen wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

2.10.1.3 Permeabilitätsstudien der Testsubstanzen EBA, NaFl, PI und ^{14}C -Sucrose

Bei den Testsubstanzen EBA, NaFl, PI und ^{14}C -Sucrose handelt es sich um Substanzen, die über verschiedene Transportwege nur in einem sehr geringen Maße über die BBB gelangen (Deli et al., 1995, Deli et al., 2005, Kuo and Lu, 2011). Als Maß für die Permeabilität der Testsubstanzen wird der PSe-Wert („permeability x surface area product“) bzw. der Pj-Wert („permeability coefficient of PI“) wie bereits beschrieben ermittelt (Deli et al., 2003, Kuo and Lu, 2011). In Kürze beschrieben, wird im HBMEC-Mono-Zell-Modell die Substanzmenge bestimmt, die sich nach definierten Zeiträumen in der abluminalen Kammer befindet, und mit der Zeit und Filterfläche verrechnet (Abb. 26). Bei einem gutausgebildeten HBMEC-„Monolayer“ sind für die verwendeten Testsubstanzen niedrige Permeabilitätswerte PSe und Pj zu erwarten.

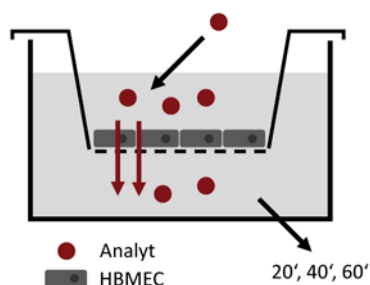


Abb. 26: Schematische Darstellung der experimentiellen Vorgängen zur Bestimmung des PSe-Wertes einer Substanz. Der Analyt wird in die luminale Kammer gegeben und hat die Möglichkeit, die HBMEC-Barriere zu passieren; nach definierten Zeiträumen wird die Analyt-Konzentration im abluminalen Kompartiment bestimmt. Durch Verrechnung der Analyt-Menge mit der Zeit und der Membranfläche wird der PSe-Wert ermittelt.

Bei EBA handelt es sich um einen an Albumin gebundenen Evans Blue Farbstoff mit einem Molekulargewicht von 67 kDa (Wolman et al., 1981). Der Transport von EBA über die BBB ist, wenn überhaupt vorhanden, unspezifisch transzellulär, da es keine spezifischen Albuminrezeptoren an der luminalen Seite gibt (Pardridge et al., 1985, Plateel et al., 1997). Die Testsubstanz NaFl hingegen liegt ungebunden vor und hat lediglich ein Molekulargewicht von 376 g/mol (Wolman et al., 1981). NaFl wird als Nachweismolekül für den parazellulären Transport gehandelt, da es sich um ein relativ kleines und hydrophiles Molekül handelt (Descamps et al., 2003) (Abb. 27). Die Testsubstanz PI ist mit 668 g/mol ein wenig größer und wird auch als Nachweismolekül für den parazellulären Transport eingeordnet (Siddharthan et al., 2007, Kuo and Lu, 2011) (Abb. 27). Sucrose ist mit 342 g/mol ein kleines Molekül und wird ebenfalls häufig als Testsubstanz verwendet (Gruenau et al., 1982, Preston, 1982) (Abb. 27).

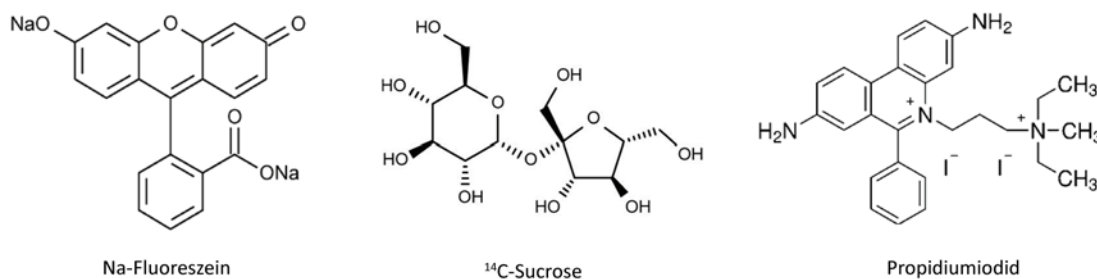


Abb. 27. Strukturformeln der Testsubstanzen NaFl (NatriumFluoreszein), ¹⁴C-Sucrose und PI (Propidiumiodid).

Bei der Auswertung der Permeabilitätsstudien zeigen sich für die einzelnen Testsubstanzen unterschiedliche PSe-Werte. So liegt die Permeabilität von EBA mit $61 \cdot 10^{-6}$ cm/min ca. 27fach unterhalb der PSe-Werte von NaFl und ¹⁴C-Sucrose (1.488 bzw. $1.720 \cdot 10^{-6}$ cm/min) (Tab. 1). Für PI konnte ein Pj-Wert von $468 \cdot 10^{-6}$ cm/min ermittelt werden (Tab. 2). Somit liegt für die verwendeten Testsubstanzen, die alle eher schlecht die BBB passieren können, bereits ein gewisser Schwankungsbereich hinsichtlich der Permeabilitätswerte vor.

A Evans Blue Albumin (Ziebarth and Wang)	
PSe * 10⁻⁶ [cm/min]	Zellen (Quelle)
61 ± 2	HBMEC
20	Maushirn-Kapillarendothelzellen/ Maus-Gliazellen (Gesuete et al., 2009)
60	Rinderhirn-Kapillarendothelzellen/ Ratten-Gliazellen (Descamps et al., 2003)
113	Maushirn-Kapillarendothelzellen/ Glioblastomzellen (Deli et al., 2003)
B NatriumFluoreszein (NaFl)	
PSe * 10⁻⁶ [cm/min]	Zellen (Quelle)
1.488 ± 146	HBMEC
530	Maushirn-Kapillarendothelzellen/ Maus-Gliazellen (Gesuete et al., 2009)
1.812	Maushirn-Kapillarendothelzellen/ Glioblastomzellen (Deli et al., 2003)
3.200	Humane Hirnkapillarendothelzellen (Muruganandam et al., 2002)
C ¹⁴C-Sucrose	
PSe * 10⁻⁶ [cm/min]	Zellen (Quelle)
1.720 ± 168	HBMEC
498	Rinderhirn-Kapillarendothelzellen/ Ratten-Gliazellen (Lundquist et al., 2002)
1.602	Primäre Humane Hirnkapillarendothelzellen/ Humane Gliazellen (Garberg et al., 2005a)
1.980	Schweinehirn-Kapillarendothelzellen (Giese et al., 1995)

Tab. 1. Permeabilitätswerte PSe der Testsubstanzen EBA, NaFl und ¹⁴C-Sucrose im Vergleich. Für das verwendete HBMEC-Mono-Zell-Modell liegt die Permeabilität PSe von EBA mit $61 * 10^{-6}$ cm/min (A) ca. 27fach unterhalb der PSe-Werte von NaFl mit $1.488 * 10^{-6}$ cm/min (B) und ¹⁴C-Sucrose mit $1.720 * 10^{-6}$ cm/min (C). Alle hier ermittelten PSe-Werte liegen innerhalb des publizierten Schwankungsbereichs der jeweiligen Testsubstanz. Statistik: Standardfehler, n = 5 (A), n = 12 (B), n = 8 (C)

Wichtig ist nun der Vergleich der Permeabilität PSe mit den Literaturwerten. Für EBA zeigt dieser Vergleich, dass diese Substanz mit $61 * 10^{-6}$ cm/min im publizierten Schwankungsbereich von 20 – $113 * 10^{-6}$ cm/min liegt (Tab. 1). Auch die Permeabilität von NaFl liegt mit $1.488 * 10^{-6}$ cm/min innerhalb der Literaturwerte von 530 – $3.200 * 10^{-6}$ cm/min und ebenso ist dies für ¹⁴C-Sucrose mit einem PSe-Wert von $1.720 * 10^{-6}$ cm/min und einem publizierten Schwankungsbereich von 498 – $1.980 * 10^{-6}$ cm/min zu beobachten (Tab. 1).

Die Permeabilität Pj von PI ist mit $468 * 10^{-6}$ cm/min ebenfalls sehr nah am Literaturwert von $480 * 10^{-6}$ cm/min (Tab. 2). Für PI wurde nur der Pj-Wert, nicht jedoch der PSe-Wert ermittelt, da für diese Substanz nur der Pj-Wert publiziert ist.

D Propidiumiodid (PI)

$P_j * 10^{-6}$ [cm/min]	Zellen (Quelle)
468 ± 7	HBMEC
480	HBMEC (Kuo and Lu, 2011)

Tab. 2. Permeabilitätswert P_j der Testsubstanz PI. Für das verwendete HBMEC-Mono-Zell-Modell konnte für PI ein P_j -Wert von $468 \pm 7 * 10^{-6}$ cm/min ermittelt werden. Damit liegt dieser P_j -Wert sehr nah an dem publizierten Permeabilitätswert. Statistik: Standardfehler, $n=4$.

Demnach zeigt sich im Vergleich mit den Literaturwerten anhand der untersuchten Testsubstanzen eine sehr gute Ausbildung des *in vitro* BBB-Modells mit den verwendeten HBMEC-Zellen. Dies spiegelt sich auch in den anderen Analysen, wie TEER-Wert (s. 2.10.1.1) und Ausbildung der TJs (s. 2.10.1.2), wider. Insgesamt konnte mit den hier verwendeten HBMEC-Zellen ein gut funktionierendes Modell der BBB erstellt werden.

2.10.2 Bluthirnschrankgängigkeit von Cu/NP-Komplexen

Nachdem das HBMEC-Mono-Zell-Model etabliert und validiert wurde (s. 2.10.1), konnte die BBB-Gängigkeit der drei Cu/NP-Komplexe bestimmt werden. Dazu wurde analog zu 2.10.1.3 das Potenzial zur Überwindung der BBB der Cu/NP-Komplexe in Form von PSe-Werten ermittelt. Die Bestimmung der Cu/NP-Komplexmenge, die im Modellsystem den HBMEC-„Monolayer“ passierte und sich in der abluminalen Kammer sammelte, erfolgte mittels ICP-MS über den Cu-Gehalt. Sofern es möglich war, wurden drei verschiedene Konzentrationen getestet, um das Ergebnis zu festigen. Dabei war gewährleistet, dass die verwendeten Cu/NP-Konzentrationen für die HBMEC nicht toxisch wirkten und somit eine intakte BBB vorlag (s. 2.3.3).

Für Cu/CMS wurden die drei Konzentrationen 20, 40 und 60 μ M Cu (Cu:CMS 40:1) untersucht. Für diese untersuchten Cu/CMS-Konzentrationen wurde die drei Einzelwerte $6.510 * 10^{-6}$ cm/min (20 μ M), $3.784 * 10^{-6}$ cm/min (40 μ M) und $3.499 * 10^{-6}$ cm/min (60 μ M) und insgesamt ein durchschnittlicher PSe-Wert von $3.600 \pm 487 * 10^{-6}$ cm/min ermittelt (Abb. 28). Die Einzelwerte schwanken um den durchschnittlichen PSe-Wert und es ist kein konzentrationsabhängiger Effekt erkennbar (Abb. 28).

Für Cu/CSNP1 wurden die drei Konzentrationen 30, 60 und 90 μ M Cu (Cu:CSNP1 60:1) untersucht. Die Auswertung zeigt, dass für die drei analysierten Cu/CSNP1-Konzentrationen ein durchschnittlicher PSe-Wert von $3.585 * 10^{-6}$ cm/min ermittelt werden konnte (Abb. 28). Dabei schwanken die drei PSe-Werte mit 4.591, 3.224 und $3.180 * 10^{-6}$ cm/min für 30, 60 und 90 μ M Cu (Cu:CSNP1 60:1) um diesen durchschnittlichen PSe-Wert und zeigen keinen konzentrationsabhängigen Effekt (Abb. 28).

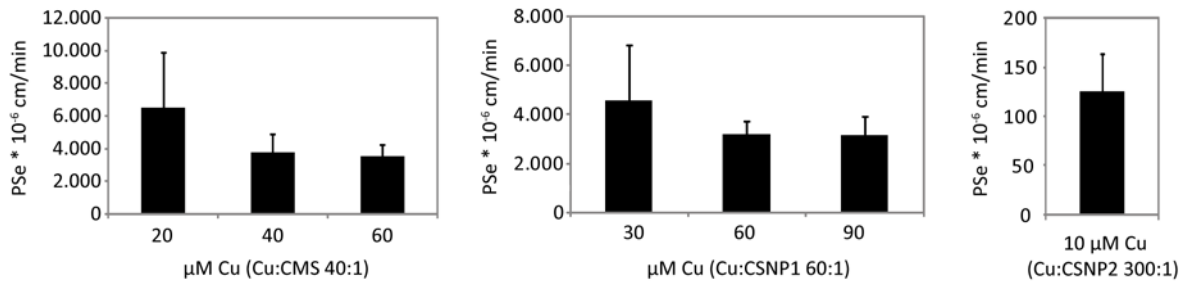


Abb. 28. PSe-Werte von Cu/CMS, Cu/CSNP1 und Cu/CSNP2. Die Ermittlung der PSe-Werte der Cu/NP-Komplexe erfolgte im HBMEC-Mono-Zell-Modell über die Bestimmung der Cu-Menge in der abluminalen Kammer mittels ICP-MS, verrechnet mit der Zeit und der Filterfläche. Für Cu/CMS, Cu/CSNP1 und Cu/CSNP2 wurden durchschnittliche PSe-Werte von $3,600 \cdot 10^{-6}$ cm/min (A), $3,585 \cdot 10^{-6}$ cm/min (B) und $126 \cdot 10^{-6}$ cm/min (C) ermittelt. Statistik: Standardfehler, ANOVA-Analyse, $n \geq 5$ (A), $n \geq 6$ (B) und $n \geq 5$ (C).

Bei Cu/CSNP2 wurde nur die Konzentration 10 μ M (Cu:CSNP2 300:1) untersucht. Diese ist bereits so niedrig, dass hier für die Messwerte das untere Detektionslimit der ICP-MS-Messmethode erreicht war. Jedoch ist diese auch die höchstmögliche basierend auf den Toxizitätsstudien (s. 2.3.1). Die Auswertung der untersuchten Cu/CSNP2-Konzentration ergibt einen PSe-Wert von $126 \cdot 10^{-6}$ cm/min (Abb. 28).

2.10.3 Vergleichende Permeabilitätsanalysen der Testsubstanzen und Cu/NPs

Nach der Ermittlung der PSe-Werte der drei Cu/NP-Komplexe ist es nun interessant, diese mit den PSe-Werten der Testsubstanzen EBA, 14 C-Sucrose und NaFl zu vergleichen. In diesem Vergleich liegt die PSe-Werte für Cu/CMS ($3,600 \cdot 10^{-6}$ cm/min) und Cu/CSNP1 ($3,585 \cdot 10^{-6}$ cm/min) ca. 60-fach über dem EBA-PSe-Wert ($61 \cdot 10^{-6}$ cm/min) und ca. 2,25-fach über den NaFl- und 14 C-Sucrose-PSe-Werten ($1,488$ und $1,720 \cdot 10^{-6}$ cm/min) (Abb. 29). Damit kann eindeutig gezeigt werden, dass diese beiden Cu/NP-Komplexe im verwendeten Modell die BBB passieren können.

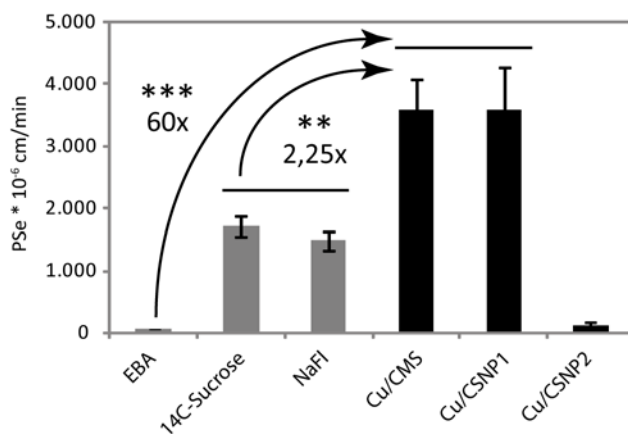


Abb. 29. Permeabilitätswerte der drei Testsubstanzen EBA, 14 C-Sucrose sowie NaFl und Cu/NPs im Vergleich. Mit PSe-Werten von $3,600$ bzw. $3,585 \cdot 10^{-6}$ cm/min für Cu/CMS bzw. Cu/CSNP1 liegen diese 60-fach über dem PSe-Wert von EBA ($61 \cdot 10^{-6}$ cm/min) und 2,25-fach über den PSe-Werten von 14 C-Sucrose sowie NaFl ($1,720$ und $1,488 \cdot 10^{-6}$ cm/min). Im Gegensatz dazu liegt der PSe-Wert von Cu/CSNP2 mit $126 \cdot 10^{-6}$ cm/min deutlich unter der PSe-Werten von 14 C-Sucrose und NaFl (***) und etwas höher als der PSe-Wert von EBA (***). Statistische Auswertung: Standardfehler, ANOVA-Analyse, Kruskal-Wallis Test, Dunn's multiple comparison test $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $n \geq 5$.

Ein anderes Ergebnis zeigt sich für Cu/CSNP2. Der ermittelte PSe-Wert ist mit $126 * 10^{-6}$ cm/min deutlich kleiner als die PSe-Werte für NaFl ($1.488 * 10^{-6}$ cm/min) und ^{14}C -Sucrose ($1.720 * 10^{-6}$ cm/min) und liegt eher im Bereich des EBA-PSe-Wertes ($61 * 10^{-6}$ cm/min) (Abb. 29). Da für alle Testsubstanzen eine schlechte BBB-Permeabilität gilt, kann somit für Cu/CSNP2 im verwendeten BBB-Modell kein Potenzial zur Überwindung der BBB ermittelt werden.

2.11 Auswirkungen von Cu/CSNP1 im Tierversuch

Insbesondere die Beobachtung, dass CSNP1 die BBB überwinden kann, war neben den vorherigen aussichtsreichen Ergebnissen so vielversprechend, dass die Wirksamkeit im Tierversuch untersucht wurde. Als transgenes Alzheimer Tiermodell wurden die gut charakterisierten APPS1-Mäuse verwendet. Diese tragen die zwei Transgene PS1-L166P und APP-KM670/671NL, die bereits im Rahmen der Mutationen der FAD bekannt sind (Radde et al., 2006). In ihrer Doppelausprägung führen diese beiden Transgene in der Maus beispielsweise zu einer frühzeitig erhöhten A β -Plaquebildung und zu einem frühzeitig erhöhten A β 42-Level (Radde et al., 2006). Diesen Tieren wurden über einen Zeitraum von vier Wochen wöchentlich Cu(II) komplexiert an CSNP1 im Verhältnis 60:1 intravenös injiziert. Dabei wurden Cu/CSNP1-Konzentrationen verwendet, die theoretisch eine Steigerung des basalen Cu-Levels im Blut (14 μM) um 5x, 10x und 15x zu Folge haben sollten (Tab. 4). Die Kontrollgruppe (K) wurde lediglich mit 0,9% NaCl behandelt.

Der hier ausgewertete Tierversuch ist der zweite Versuchsteil „Dosisfindung II“ des genehmigten Tierversuches G 0057/10. Vorrangig war der Versuchsteil „Dosisfindung I“, welcher mit einer theoretischen Steigerung des basalen Cu-Levels im Blut um 1,5x, 2,0x und 2,5x verbunden war. Leider zeigte sich dort keine Steigerung des Cu-Levels im Hirn der Versuchstiere (Daten nicht gezeigt) und dementsprechend wurden höhere Dosen im hier beschriebenen Versuchsteil „Dosisfindung II“ verwendet.

Die praktische Durchführung des Tierversuchs inklusive der Blutentnahme und des Spritzens der Testsubstanz erfolgte gemeinsam mit Sabrina Nowag (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Haag, Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie).

2.11.1 Überlebensrate und Gewichtsanalyse

Erklärtes Ziel eines Tierversuchs ist die Verwendung wirksamer Dosen, die nicht toxisch wirken. Die Überlebensrate der Tiere ist ein Indiz für die akute Toxizität der verwendeten Cu/CSNP1-Dosen. Ein Indiz für den Gesundheitszustand der Tiere während der Behandlung ist das

Körpergewicht. Dieses sollte bei adulten Tieren gleichbleibend sein und bei nicht-ausgewachsenen Tieren einer Steigerung unterliegen. Im Gegensatz dazu wird bereits eine Abnahme um 10% als dermaßen kritisch angesehen, dass das betreffende Tier aus dem Versuch entnommen werden muss (Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere, Dr. Renate Thiel, Charité – Universitätsmedizin Berlin, 2. Auflage vom 22. Juli 2009).

Bei diesem Tierversuch wurden fünf Mäuse pro Versuchsgruppe behandelt. Bei den Versuchstiergruppen 10x und 15x wöchentliche Cu-Zugabe sowie der Kontrollgruppe überlebten alle Tiere den Behandlungszeitraum von fünf Wochen, während bei der Versuchsgruppe 5x Cu-Zugabe vier von fünf Mäusen den Tierversuch überlebten (Abb. 30). Bei der zweiten Cu/CSNP1-Behandlung wurde festgestellt, dass die Maus 365 aus der 5x-Versuchsgruppe eine Gewichtsabnahme um mehr als 10% im Vergleich zur Vorwoche zeigte. Dieses Tier wurde aufgrund der starken Gewichtsabnahme sofort euthanasiert und blieb der einzige Verlust (Abb. 30). Da dieses Tier nicht der höchsten, sondern der niedrigsten Cu-Konzentration ausgesetzt war und es der einzige Verlust eines Tieres während des gesamten Versuchszeitraums war, ist nicht davon auszugehen, dass dieses Ereignis auf die Cu/CSNP1-Behandlung zurückzuführen ist. Folglich wurde dieses Tier in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

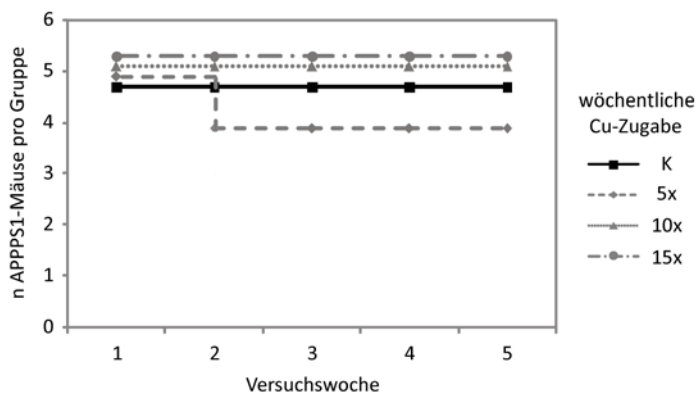


Abb. 30: Überlebenskurve der einzelnen Versuchstiergruppen über den Versuchszeitraum. Die Gruppengröße aller Gruppen lag bei $n = 5$. Eine Ausnahme bildet Gruppe 5x, wo in der zweiten Woche ein Tier (Maus 365) aus dem Versuch genommen werden musste. Folglich lag die Gruppengröße dieser Gruppe danach bei $n = 4$.

Während des gesamten Versuchszeitraums wurde das Körpergewicht der Mäuse wöchentlich notiert, um die Entwicklung der noch nicht-ausgewachsenen Tiere zu beobachten. An den fünf Messtagen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Cu behandelten Gruppen (5x, 10x und 15x wöchentliche Cu-Zugabe) und der Kontrollgruppe detektiert (Abb. 31). Auch bezüglich der Gewichtsdifferenz zwischen der Startwoche mit 17,5 g und der letzten (fünften) Versuchswoche mit 19,8 g gibt es unter den einzelnen Versuchstiergruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 31). Die durchschnittliche Gewichtszunahme während des Versuches beträgt 2,3 g (Abb. 31). Demnach ist das Wachstum der Tiere der einzelnen Versuchstiergruppen ähnlich.

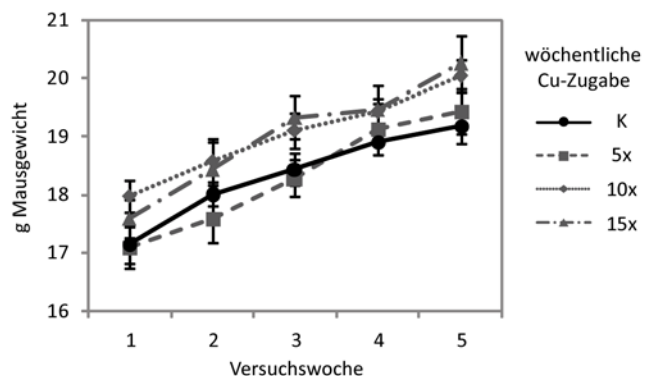


Abb. 31: Zeitliche Entwicklung des Körpergewichts der Mäuse der einzelnen Versuchsgruppen während des Tierversuchs. Die wöchentliche Analyse des Körpergewichts zeigte deutlich, dass sich das Körpergewicht der Tiere der einzelnen Versuchstiergruppen ähnlich und ohne signifikante Unterschiede entwickelt. Statistik: ANOVA-Analyse, $n = 4 - 5$.

Anhand der Überlebenskurve der einzelnen Versuchsgruppen über den Versuchszeitraum „Dosisfindung II“ konnte kein akut-toxischer Effekt der Cu/CSNP1-Behandlung festgestellt werden. Zudem konnte kein Unterschied auf das Wachstum festgestellt werden, gemessen an dem durchschnittlichen Gewicht der einzelnen Versuchstiergruppen. Insofern hat die Cu/CSNP1-Behandlung unabhängig von der Höhe der verwendeten Dosis keinen negativen Effekt auf die Gewichtsentwicklung der Tiere und mutmaßlich keinen negativen Effekt auf den Gesundheitszustand.

2.11.2 Leberanalyse

2.11.2 .1 Gewichtsbestimmung und histopathologische Analyse nach Hämotoxylin-Eosin-Färbung

Die Leber erfüllt im Organismus u.a. eine Filterfunktion, wie die Verarbeitung und den Abbau chemischer Substanzen. Cu wird über die Leber ausgeschieden und gegebenenfalls dort angereichert. Insofern ist es naheliegend, die Lebern der Versuchstiere nach Beendigung des Tierversuchs hinsichtlich etwaiger pathologischer Befunde zu untersuchen. Dazu wurde zunächst das Lebergewicht protokolliert und anschließend eine histopathologische Analyse nach einer Hämotoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) vorgenommen. Es werden dabei durch die Farbstoffe Hämotoxylin und Eosin der Kern blau und das Cytoplasma rötlich angefärbt (s. 4.5.8).

Die Auswertung der Lebergewichte nach Beendigung des Tierversuchs „Dosisfindung II“ zeigt mit 0,92 g (5x Cu), 0,97 g (10x Cu), 1,03 g (15x Cu) und 0,95 g (K) ein durchschnittliches Lebergewicht von 0,97 g und keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 32).

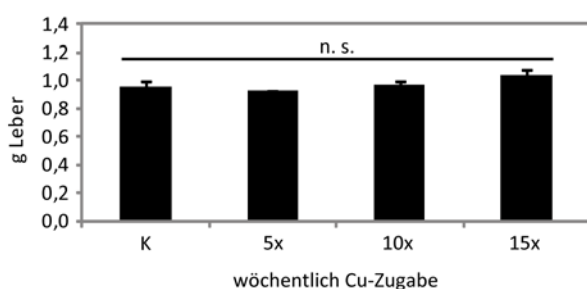


Abb. 32: Durchschnittliches Lebergewicht der einzelnen Versuchsgruppen nach Beendigung des Tierversuchs „Dosisfindung II“. Die Lebergewichte der einzelnen Versuchstiergruppen schwanken um ein durchschnittliches Lebergewicht von 0,97g ohne einen signifikanten Unterschied erkennen zu lassen. Statistik: ANOVA-Analyse; n. s. = nicht signifikant, $n = 4 - 5$.

Bezüglich der histopathologischen Leber-Analyse nach HE-Färbung wurde exemplarisch ein Leberschnitt einer Maus pro Versuchsgruppe dargestellt (Abb. 33). In allen behandelten Gruppen zeigt sich normal entwickeltes Lebergewebe. So ist das Leberparenchym mit Hepatozyten, Sinusoiden, Canaliculi biliferi und Kupffer'schen Zellen normal ausgebildet. Es gibt keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. In allen Lebern wurde zusätzlich eine diffuse Glycogenspeicherung festgestellt, was ein häufiger Befund bei Labormäusen ist und wahrscheinlich auf Fütterung *ad libitum* zurückzuführen ist. Die HE-Färbung sowie die Analyse der Leberproben wurden mit Unterstützung von Dr. Dorte von Smolinski durchgeführt (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gruber, Freie Universität Berlin, Institut für Tierpathologie).

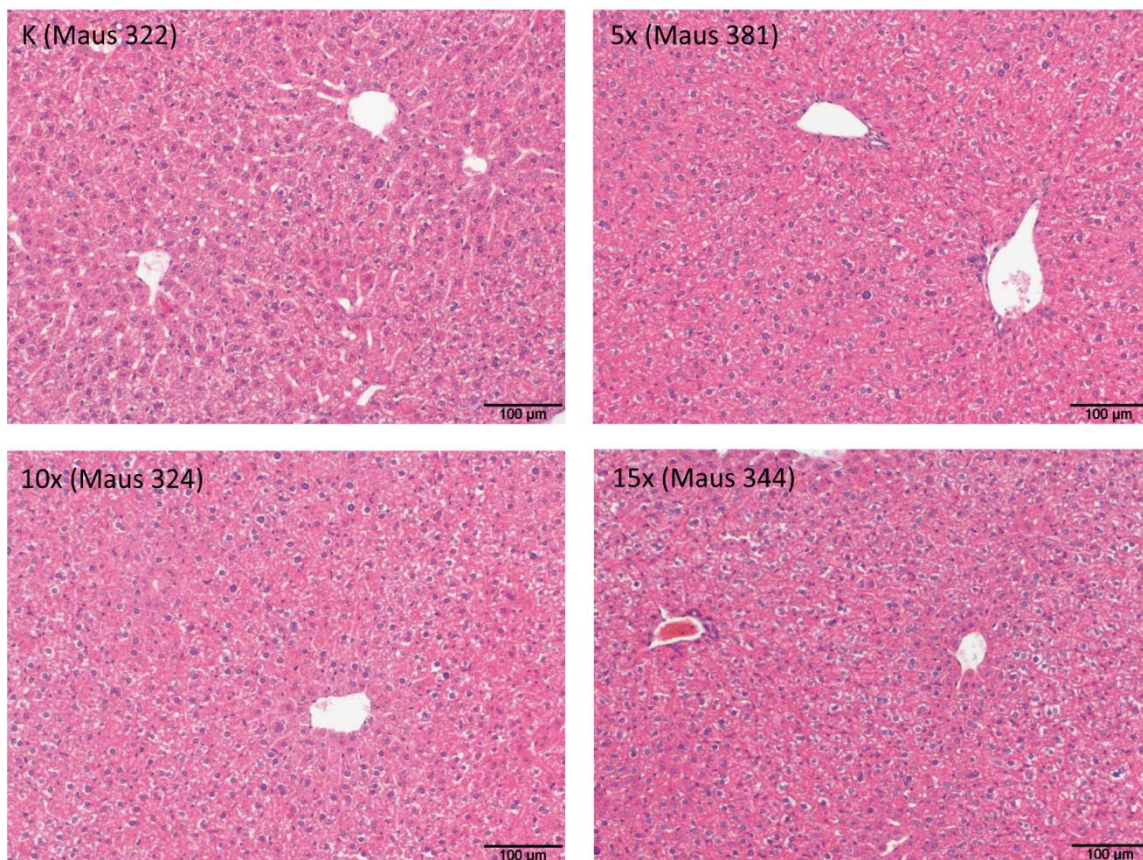


Abb. 33: Exemplarische Leberschnitte der einzelnen Versuchsgruppen nach HE-Färbung. Alle Leberschnitte zeigen unabhängig von der Versuchsgruppe ein normal entwickeltes Lebergewebe ohne pathologische Befunde. Die Abbildungen entstanden mit Hilfe von Dr. Dorte von Smolinski (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gruber, Freie Universität Berlin, Institut für Pathologie,) Statistische Auswertung: ANOVA-Analyse; n. s. = nicht signifikant, n = 4 – 5.

2.11.2.2 Analyse des Cu-Gehalts der Leber

Als weitere Untersuchung erfolgte die Analyse der Cu-Level in der Leber mittels ICP-MS-Messungen. Der durchschnittliche Cu-Level liegt bei 4,40 µg/g Leber und es konnte zwischen den

behandelten Gruppen (5x, 10x und 15x wöchentliche Cu-Zugabe) und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 34). Somit gibt es keine Anzeichen für die Akkumulation von Cu in der Leber.

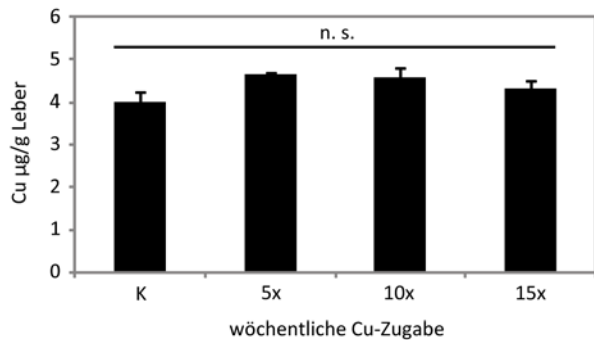


Abb. 34: Durchschnittliche Cu-Level der Lebern der Versuchstiergruppen. Die ermittelten Cu-Werte in den Lebern der Tiere der einzelnen Versuchstiergruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Statistik: Standardfehler, ANOVA-Analyse, n. s. = nicht signifikant, n = 4 – 5.

Insgesamt waren die Leberschnitte der verschieden behandelten Versuchstiergruppen ohne besonderen Befund, d. h. es wurde kein Hinweis auf eine toxische Schädigung gefunden. Zusammen mit der Analyse des Lebergewichts und des Cu-Level, welche beide ebenfalls unauffällig waren, ergibt sich keine toxische Wirkung der Cu/CSNP1-Behandlung auf die Leber.

2.11.3 Analyse des Cu-Levels des Blutes

Der therapeutische Ansatz des Tierversuchs „Dosisfindung II“ beinhaltet eine angestrebte Erhöhung des Cu-Levels im Hirn, die auch im Blut messbar sein sollte. Insofern wurde der Cu-Gehalt des Blutes der Versuchstiere über den gesamten Versuchszeitraum analysiert. Dazu wurde den Tieren jeweils vor der wöchentlichen Cu/CSNP1-Injektion über die Schwanzvene Blut entnommen und dieses per ICP-MS auf den Cu- und Zn-Gehalt untersucht.

Die Analyse dieser Blutproben zeigte eine Schwankung um 11,6 µM Cu im Blut bei Versuchsende (Abb. 35). Die Werte für die einzelnen Versuchsgruppen liegen bei 12,2, 11,2, 11,7 und 11,5 µM Cu im Blut für eine wöchentliche Behandlung mit 0,9% NaCl, 5x, 10x und 15x Cu (Abb. 35). Folglich konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Auch bei der Analyse des Zn-Gehaltes des Blutes gibt es über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei mit Cu/CSNP1 behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe (Abb. 35). Hier schwanken die Werte um 88,3 µM Zn im Blut (Abb. 35).

Zusammenfassend konnte keine Steigerung des Cu-Levels im Blut nach Cu/CSNP1-Behandlung nachgewiesen werden. Auch hinsichtlich des Zn-Gehaltes im Blut konnte keine Auswirkung aufgrund der Behandlung festgestellt werden.

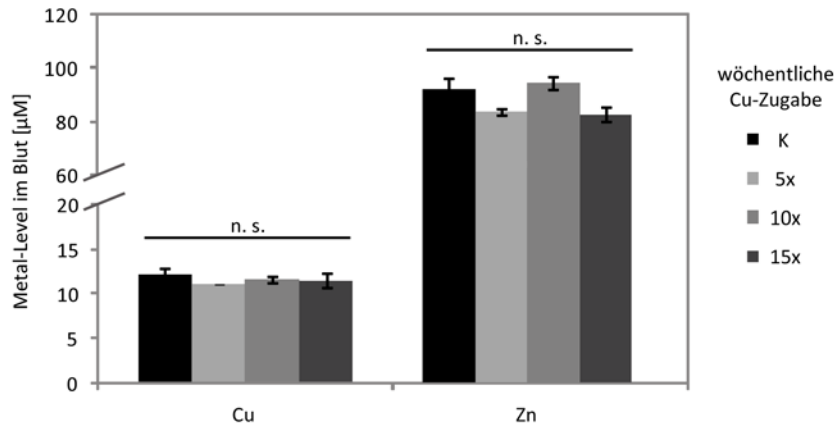


Abb. 35: Durchschnittlicher Cu-Level im Blut bei den einzelnen Versuchsgruppen bei Versuchsende. Sowohl bei den Cu- als auch bei den Zn-Leveln wurde zwischen den Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied ermittelt. Statistik: ANOVA-Analyse; n. s. = nicht signifikant, n = 4 – 5.

2.11.4 Analyse des Cu-Levels des Hirns

Letztendlich soll durch die Cu/CSNP1-Behandlung eine Steigerung des Cu-Levels im Gehirn erreicht werden. Zur Untersuchung dieses Cu-Gehalts wurden ICP-MS-Analysen homogenisierter Gehirne durchgeführt und der Cu- sowie Zn-Level bestimmt.

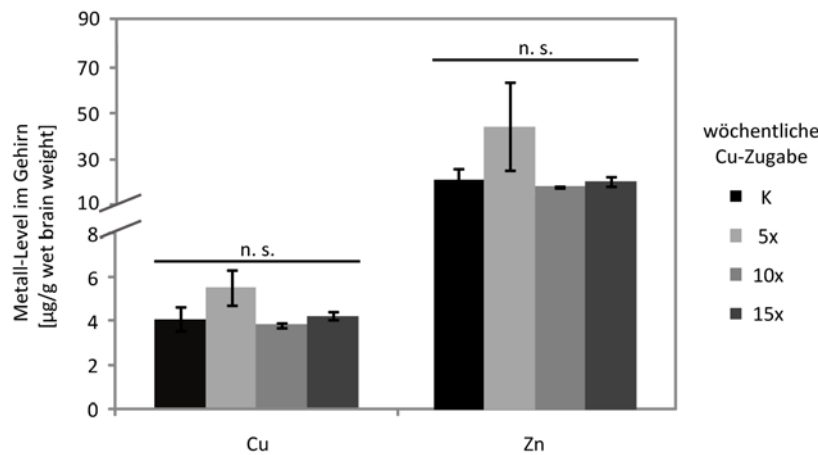


Abb. 36: Metall-Level-Analyse der Gehirne der Versuchstiere. Bei beiden untersuchten Metallen, Cu und Zn, konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Statistik: ANOVA-Analyse, n. s. = nicht signifikant, n = 4 – 5.

Die ICP-MS-Analyse zeigt für den Cu-Level im Gehirn eine Schwankung um 4,4 µg/g „wet brain weight“ und wie in der Abbildung 36 zu erkennen ist keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (K) und den behandelten Gruppen (5x, 10x und 15x Cu). Auch bei dem Zn-Level ist zwischen den behandelten Gruppen kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abb. 36). Hier liegt der durchschnittliche Wert bei 25,9 µg/g „wet brain weight“. Somit führt die Cu/CSNP1-Behandlung in keiner der verwendeten Dosen zu einer Veränderung des Cu- oder Zn-Spiegels im Gehirn.

2.11.5 Analyse des A β -Levels im Hirn

Die verwendeten APPS1-Mäuse haben aufgrund ihres Genotyps eine deutlich erhöhte Menge an A β im Gehirn. In diesem Abschnitt wurde die Auswirkung der Cu/CSNP1-Behandlung auf die A β -Level im Gehirn analysiert. Da das A β -Peptid sehr hydrophob ist und stark zur Aggregation neigt, werden bei der Aufarbeitung des Hirnhomogenates verschiedene Lösungsmittel oder Detergenzien zugesetzt, um die Peptide in Lösung zu halten und der Analyse zugänglich zu machen. Es entstehen jeweils vier Fraktionen – TBS, Triton-X, SDS und Ameisensäure (Kawarabayashi et al., 2001).

Die Analyse der vier Fraktionen der Hirnhomogenate der Tiere des Tierversuchs „Dosisfindung II“ auf die A β ₄₀-Menge zeigt, dass die Werte der TBS-Fraktionen um 0,05, der Triton-X-Fraktionen um 0,08, der SDS-Fraktionen um 0,23 und der Ameisensäure-Fraktionen um 5,35 $\mu\text{g/g}$ wet weight schwanken (Abb. 37). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (K) und den behandelten Gruppen (5x, 10x und 15x wöchentliche Cu-Zugabe) gezeigt werden (Abb. 37).

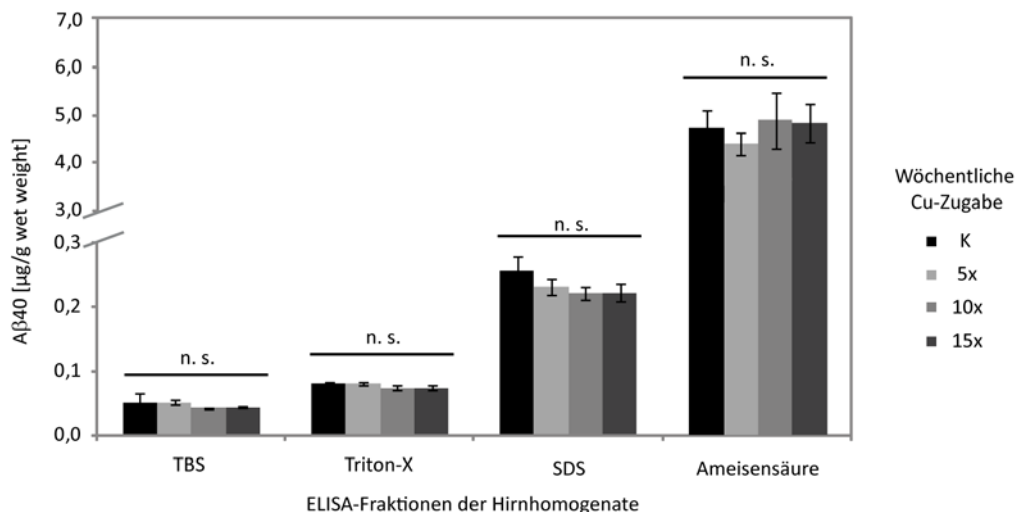


Abb. 37: ELISA-Analyse der A β ₄₀-Level der verschiedenen Fraktionen der Hirnhomogenate. Bei keiner der untersuchten Fraktionen, TBS-, Triton-X-, SDS- sowie Ameisensäure-Fraktion, gab es einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des A β ₄₀-Level zwischen den behandelten Gruppen (5x, 10x und 15x wöchentliche Cu-Zugabe) und der Kontrollgruppe (K). Statistik: ANOVA-Analyse; n. s. = nicht signifikant, n = 4 – 5.

Bei der ELISA-Analyse ebendieser Fraktionen der Hirnhomogenate der Tiere aus dem Tierversuch „Dosisfindung II“ liegen die A β ₄₂-Werte der TBS-Fraktionen bei 0,06, bei den Triton-X-Fraktionen bei 0,12, bei den SDS-Fraktionen bei 1,06 und bei den Ameisensäure-Fraktionen bei 39,06 $\mu\text{g/g}$ „wet brain weight“ (Abb. 38). Zwischen den behandelten Gruppen (5x, 10x und 15x wöchentliche Cu-Zugabe) und der Kontrollgruppe (K) gibt es bei keiner Fraktion einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der A β ₄₂-Menge. (Abb. 38)

Insgesamt konnte bezüglich der A β 40- und A β 42-Level im Hirn in keiner der untersuchten Fraktionen ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit Kupfer behandelten Gruppe detektiert werden. Es wurde folglich keine Auswirkung der Cu/CSNP1-Behandlung auf die A β -Level festgestellt.

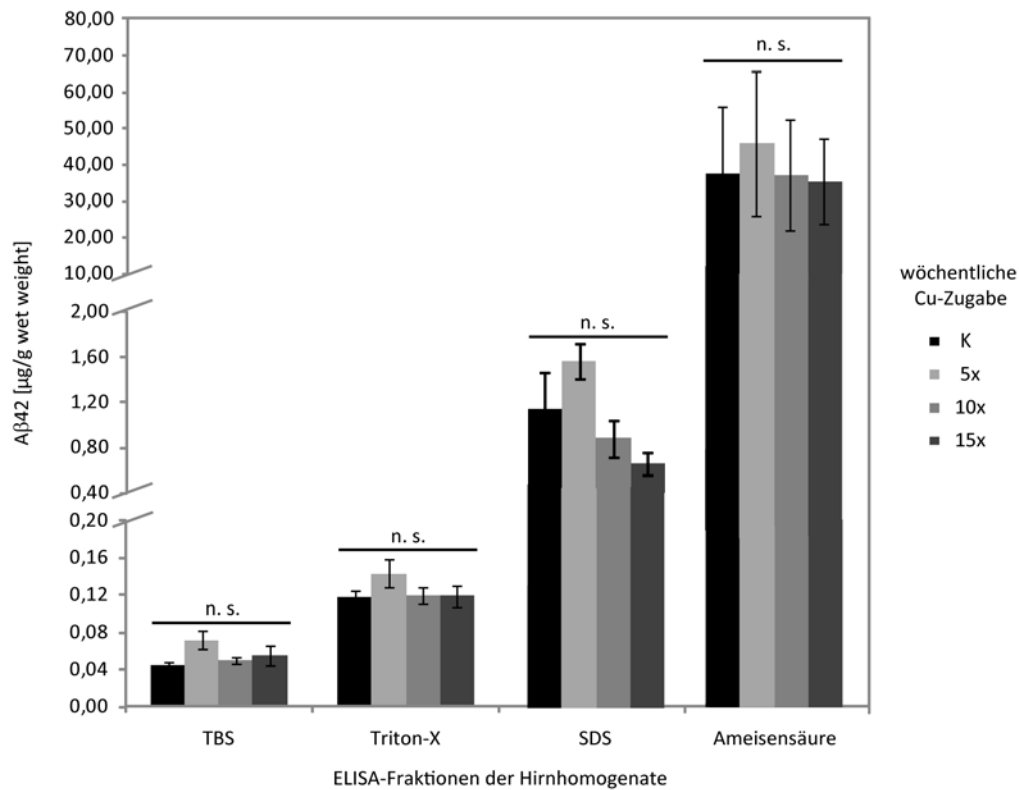


Abb. 38: ELISA der A β 42-Level der verschiedenen Fraktionen der Hirnhomogenate. Innerhalb der untersuchten Fraktionen, wie der TBS-, der Triton-X-, SDS- und der Ameisensäure-Fraktion konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des A β 42-Levels zwischen den behandelten Gruppen festgestellt werden. Folglich zeigte sich insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen (5x, 10x und 15x wöchentliche Cu-Zugabe) und der Kontrollgruppe (K). Statistik: ANOVA-Analyse, n. s. = nicht signifikant; n = 4 – 5.

Zusammen mit den anderen Ergebnissen des Tierversuchs, wie gleichbleibendem Cu-Gehalt in der Leber und im Gehirn sowie unveränderter Gewichtsentwicklung und Überlebensrate unabhängig von der Dosierung, ergibt sich für Cu/CSNP1 im untersuchten nicht-toxischen Konzentrationsbereich kein Hinweis auf eine therapeutische Wirksamkeit.

2.12 Kurzzusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden wurden die Ergebnisse in einer Übersichtstabelle zusammengefasst.

	CMS	CSNP1	CSNP2
Cu-Beladung (Cu:NP)	40:1 *	60:1	300:1
Höchste Bindungsspezifität für Cu-Ionen	n. d.	√	√
Toxizität bei SH-SY5Y: LD50	120 μM Cu (Cu:CMS 40:1)	600 μM Cu (Cu:CSNP1 60:1)	40 μM Cu (Cu:CSNP2 300:1)
	3 μM CMS	10 μM CSNP1	0,13 μM CSNP2
Zelluläre Cu-Aufnahme	√	√	√
Zelluläre NP-Aufnahme	√	√	√
Einfluss auf Zn-Level	X *	X	X
Zelluläre Cu/NP-Aufnahme	Aktiv *	Passiv	Passiv
Cu-Bioverfügbarkeit	√	√	X
pH-abhängige Cu-Freigabe	(v)	√	(v)
Einfluss auf die APP-Prozessierung	X	X	n. d.
BBB-Gängigkeit	√	√	X
Effekt im AD-Mausmodell	n. d.	X	n. d.

Tab. 3: Übersichtstabelle der Ergebnisse. Legende: √ = positives Ergebnis, (v) = teilpositives Ergebnis, X = negatives Ergebnis, n. d. = nicht durchgeführt, *bereits in vorherigen Studien ermittelt (Treiber et al., 2009)

Generell korreliert die Cu-Kapazität der NPs mit der Anzahl der Cu-Bindestellen (Tab. 3). Sowohl CSNP1 als auch CSNP2 haben die höchste Bindespezifität für Cu-Ionen (Tab. 3). In Toxizitätsanalysen zeigte sich, dass CSNP2 toxischer als CMS ist, welcher wiederum toxischer als

CSNP₁ ist (Tab. 3). Dabei konnte zwischen mit Cu beladenen und unbeladenen NPs kein Unterschied festgestellt werden (Tab. 3). Alle Cu/NPs-Komplexe sind in der Lage die zellulären Cu-Level zu erhöhen und der Zn-Level wird von der Cu/NP-Behandlung nicht verändert (Tab. 3). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass fluoreszenz-markierte NPs unmittelbar von den Zellen aufgenommen werden (Tab. 3). Bei den beiden CSNPs wurde eine passive zelluläre Aufnahme festgestellt (Tab. 3). Für Cu/CMS und Cu/CSNP₁ konnte eine Steigerung der Cu-Bioverfügbarkeit, nicht jedoch ein Einfluss auf die APP-Prozessierung gezeigt werden (Tab. 3). Für Cu/CSNP₂ hingegen zeigte sich keine erhöhte Cu-Bioverfügbarkeit (Tab. 3). Von den drei NPs ist bei Cu/CSNP₁ die Cu-Freigabe pH-sensitiv (Tab. 3). Nach erfolgreicher Etablierung eines HBMEC-Mono-Zell-Modells der BBB konnte gezeigt werden, dass Cu/CMS und Cu/CSNP₁ mutmaßlich die BBB überwinden können, während Cu/CSNP₂ diese Barriere nicht passieren kann (Tab. 3).

Aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften, wie erhöhte Cu-Bioverfügbarkeit und BBB-gängigkeit, wurde Cu/CSNP₁ im Tierversuch mit AD-Mäusen getestet. Leider wurden keine positiven Auswirkungen festgestellt, wie erhöhte Cu-Level im Blut oder Gehirn sowie verringerte A β -Level (Tab. 3). Allerdings konnte eine gute Verträglichkeit ermittelt werden, da bei den Versuchstieren die Gewichtsentwicklung und Leberbefunde normal waren.

3 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften und Auswirkungen der drei mit Cu beladenen NPs – CMS, CSNP1 und CSNP2 – im zellulären System untersucht.

3.1 Cu-Bindungseigenschaften der NPs

Die Cu-Bindung erfolgt bei CMS im PEI-Kern über sekundäre und tertiäre Amine. Bei CSNP1 und CSNP2 findet die Cu-Bindung in der TMEDA-Hülle über tertiäre Amine statt. In dieser Arbeit konnte für CSNP2 mit 300:1 Cu:NP die höchste Cu-Beladung gezeigt werden, gefolgt von 60:1 für Cu:CSNP1 und 40:1 für Cu/CMS. Die unterschiedlichen Cu-Beladungen ergeben sich aus der Größe der einzelnen NPs. So wurde für CSNP2 ein ca. 10-mal größerer Kern im Vergleich zu CSNP1 verwendet. Folglich weist CSNP2 eine größere Hülle mit einer größeren Anzahl an möglichen TMEDA-Bindungsstellen für Cu-Interaktion verglichen zu CSNP1 auf. Auch beim Vergleich von CSNP2 und CMS spielt der Größenunterschied eine entscheidende Rolle. CSNP2 ist im Durchmesser ca. 4x größer als CMS und demzufolge stehen bei CSNP2 mehr Aminogruppen für die Cu-Bindung zu Verfügung. Der Unterschied zwischen CSNP1 und CMS lässt sich wahrscheinlich durch die Lokalisation der verwendeten Stickstoffgruppen erklären. Beide NPs sind ähnlich groß, aber die Aminogruppen im CMS-Kern scheinen für die Cu-Bindung tendenziell weniger gut zugänglich sein als die Aminogruppen in der CSNP1-Hülle. Folglich kann durch eine Größenmodifikation der Kern- bzw. Hüllenstrukturen die Cu-Bindekapazität variiert werden.

Die Cu(II)-Beladung der in dieser Arbeit untersuchten NPs ist mit 40:1 – 300:1 Cu:NP deutlich größer als die bisher verwendeten Cu(II)-Chelatoren wie CQ oder gtsm mit einer Stöchiometrie von 1:2 Cu:CQ oder 1:1 für Cu:gtsm (Di Vaira et al., 2004, Crouch et al., 2009). Demzufolge können mit den hier untersuchten NPs höhere Cu(II)-Mengen transportiert werden und es besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit, gesteigerte Cu-Konzentration in Zielgeweben zu erreichen.

Zusätzlich konnte ich zeigen, dass CSNP1 und CSNP2 eine höhere Affinität für Cu(II)-Ionen im Vergleich zu Zn-Ionen haben. Für reines PEI wurde ein vergleichbares Ergebnis beobachtet (Takagishi, 1985). Somit scheint für alle drei NPs die Stabilität der Komplexbindung mit der Elektronegativität der Metallionen nach der Irving-Williams-Reihe (stark verkürzt: $Mn(II) < Cu(II) > Zn(II)$) zu korrelieren (Irving, 1948). Insofern haben die verwendeten Aminstrukturen – PEI-Kern

oder TMEDA-Hülle – ein großes Potential im untersuchten therapeutischen Ansatz der Cu/NP-Komplexe spezifisch wirksam zu sein.

3.2 Zelluläre Cu/NP Aufnahme

In dieser Arbeit wurde die Toxizität der Cu/NP-Komplexe sowohl im beladenen als auch im unbeladenen Zustand ermittelt. Dabei wurde eine absteigende Toxizitätsreihe für CSNP2 bzw. Cu/CSNP2 > CMS bzw. Cu/CMS > CSNP1 bzw. Cu/CSNP1 festgestellt. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass alle Cu/NP-Komplexe zellulär aufgenommen werden. Ein Faktor, der sowohl die zelluläre NP-Aufnahme als auch die Toxizität beeinflusst, ist die Ladung der NPs. Dies erklärt sich aus dem Membranaufbau, wo an der Außenseite asymmetrisch neutrale Phospholipide oder Sphingomyeline mit Cholin- (keine Nettoladung) oder Ethanolamingruppen (negative Nettoladung) angeordnet sind (Krol, 2012). Demzufolge können positiv geladene NPs über elektrostatische Wechselwirkungen direkt mit der Membran interagieren und dort über transiente Löcher in der Membran – Nanoporation (Abb. 39) – in die Zelle gelangen (Yu et al., 2011, Krol, 2012). Die genauen Mechanismen der Nanoporation sind noch nicht geklärt. Bei einer größeren Menge an NPs kommt es zu einer massiven Zerstörung der Membran durch unzählige

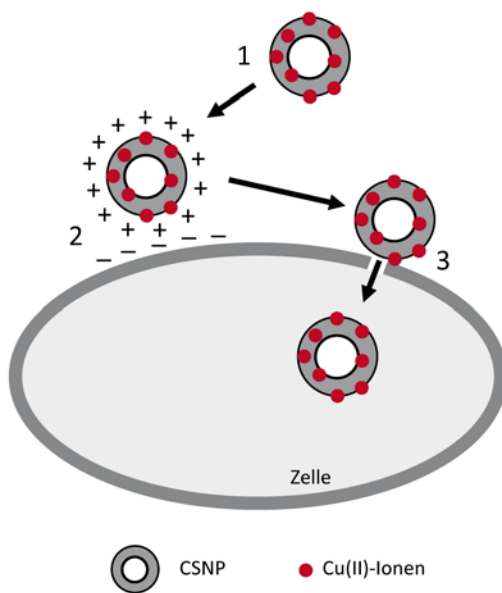


Abb. 39: Schematische Darstellung der vermuteten zellulären Cu/NP-Aufnahme. Die mit Cu(II)-Ionen beladenen NPs (1) werden wahrscheinlich über elektrostatische Wechselwirkungen an der Zelloberfläche gehalten (2) und könnten mittels Nanoporation (Diallo et al.) in die Zelle gelangen.

Löcher und folglich zu einem Verlust der Membranintegrität und des Membranpotentials und damit zum Zelltod (Krol, 2012). Vergleicht man die ermittelten Ladungspotentiale der NPs, ist Cu/CSNP2 mit 53,2 mV positiver als Cu/CSNP1 mit 12,1 mV. Auch beim Vergleich der Toxizität zeigt sich, dass Cu/CSNP2 toxischer ist als Cu/CSNP1. Insofern ist der Zusammenhang der Toxizität mit der Ladung plausibel unter der Annahme: Je positiver die Ladung, desto toxischer der NP. Für CMS liegen keine Daten zum Ladungspotential vor, daher kann hier nur spekuliert werden. Cu/CMS ist toxischer als Cu/CSNP1, allerdings haben beide NPs eine ähnliche Größe. Unter der Annahme eines kausalen Zusammenhangs zwischen Toxizität und Ladung müsste Cu/CMS ein größeres Zeta-Potential als Cu/CSNP1 aufweisen.

Der eben beschriebene Zusammenhang zwischen Toxizität und Ladung offenbart eine Modifizierungsmöglichkeit. Generell limitiert die Toxizität die Cu/NP-Inkubationskapazität. Eine Möglichkeit die Toxizität zu verringern, ist die Generierung von NPs, die eine nicht so stark positive Ladung aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen einer positiven Ladung und der Toxizität ein kausaler Zusammenhang besteht (Frohlich, 2012, Punnoose et al., 2014). Zudem konnte gezeigt werden, dass anionisch dendritische NPs weniger toxisch als chemisch vergleichbar aufgebaute kationische dendritische NPs sind (Malik et al., 2000, Chen et al., 2004). Zusätzlich zur Gesamtladung kann die Oberflächenstruktur entscheidend sein. Beim Vergleich von ähnlich großen (4 – 5 nm) und geladenen (-31 – -38 mV) Gold-NPs mit entweder streifenförmig angeordneten oder homogen verteilten Oberflächenstrukturen (Sulfonat- und Thiolgruppen) zeigten sich unterschiedliche zelluläre Aufnahmeeigenschaften (Verma et al., 2008); während beide NPs in die Zelle gelangen können, bilden erstere im Unterschied zu letzteren keine transienten Membranlöcher aus (Verma et al., 2008). Bei einer möglichen Modifizierung der äußeren NP-Ladung ist jedoch zu beachten, dass NPs mit einer negativeren Ladung keine Toxizität auslösen, weil sie schlicht nicht mehr zellulär aufgenommen werden. So zeigte sich für NPs, die elektrisch neutral waren, keine zelluläre Aufnahme mehr (Goda et al., 2010).

Die sich im Rahmen der Nanoporation bildenden Membranlöcher erklären auch das in dieser Arbeit ermittelte Ergebnis der passiven zellulären Aufnahmeeigenschaft für Cu/CSNP1 und Cu/CSNP2. Wenn diese NPs sich über elektrostatische Wechselwirkungen ihre eigenen Zugänge zur Zelle schaffen können, sind sie nicht auf energieabhängige zelluläre Transportsysteme wie die Clathrin- oder die Caveolae-vermittelte Endozytose angewiesen. Für Cu/CMS konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass es einer aktiven zellulären Aufnahme unterliegt (Treiber et al., 2009). Für Cu/CMS müssten in diesem Zusammenhang weitere Forschungen über die zelluläre Aufnahme dieses NPs durch zelluläre Endozytosemechanismen erfolgen. Dies ist sicherlich interessant im Hinblick auf die vielfältig möglichen Modifikationen der NPs für einen optimalen therapeutischen Ansatz.

Interessanterweise zeigte sich für keinen der untersuchten Cu/NP-Komplexe ein Unterschied in der Toxizität zwischen beladenen und unbeladenen NP. Dies bedeutet, dass die beobachtete Toxizität nicht durch die Cu-Ionen vermittelt wird. Es wird oft vermutet, dass Cu-Ionen eine Fenton-ähnliche Reaktion durchlaufen, die einhergeht mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“ = ROS), die wiederum Membranschädigungen auslösen (Rubino and Franz, 2012). Offenkundig liegt die Ursache der Toxizität eher in der durch die NPs vermittelten Nanoporation. Trotz dieses Effektes haben die in dieser Arbeit untersuchten

NPs das Potential wirksamer zu sein als in vergleichbaren Konzentrationen bisher eingesetzter Cu(II)-Chelatoren. So wurden Cu(II)-gtsm-Komplexe in einer Konzentration von 25 μM bei SH-SY5Y-Zellen eingesetzt (Crouch et al., 2009). Dies liegt mindestens 4-fach unter der Cu-Konzentration, die in dieser Arbeit für beispielsweise Cu:CSNP1 verwendet wurde.

Durch die Behandlung mit Cu/NP-Komplexen konnte ich zeigen, dass der intrazelluläre Cu-Level drastisch erhöht werden kann. Ein hoher intrazellulärer Cu-Level ist nicht per se toxisch. So ist in Fibroblasten, die einen mutierten inaktiven ATPase7A-Transporter aufweisen, der Cu-Level bis zu 5-fach erhöht und dennoch wurden keine Anzeichen für oxidativen Stress gefunden (Armendariz et al., 2004). Auch APP-überexprimierende HEK293T Zellen weisen einen mindestens 2-fach erhöhten Cu-Level auf und zeigen dennoch normales Zellwachstum (Suazo et al., 2009). Vermutlich ist ein hoher intrazellulärer Cu-Level nicht toxisch, weil das Cu innerhalb der Zelle aufgrund der reduzierenden Umgebung und der intensiven Kontrolle durch die Cu-Chelatorproteine als Cu(I) vorliegt. Insofern sind im Rahmen der Cu/NP-Therapie durch die Cu-Ionen mutmaßlich keine schädlichen Effekte zu erwarten, sobald diese Partikel innerhalb der Zelle lokalisiert sind. Diese Annahme deckt sich mit der Erkenntnis, dass die Toxizität der Cu/NP-Komplexe nicht durch Cu vermittelt wird.

3.3 Cu-Bioverfügbarkeit nach Cu-Freigabe

Ich konnte zeigen, dass in Zellen, die mit Cu/NP-Komplexen inkubiert wurden, die aufgenommenen Cu-Ionen tatsächlich bioverfügbar waren (Abb. 40). Dies ist ein essentieller Bestandteil des therapeutischen Ansatzes, bei dem Cu an NPs gebunden in die Zelle transportiert und dort in zellulären Prozessen wirksam sein soll.

In diesem Zusammenhang könnte es interessant sein, in weiterführenden Studien die Auswirkungen einer Cu/NP-Gabe auf die zellulären Prozesse im Allgemeinen zu erforschen. So ist bekannt, dass eine CuSO_4 -Inkubation eine erhöhte Expression von Cu-transportierenden Proteinen wie CTr und MT bewirkt (Gao et al., 2014). In anderen Studien wiederum konnte gezeigt werden, dass Cu-Transporter, wie ATPase7B, bei erhöhtem Cu-Level

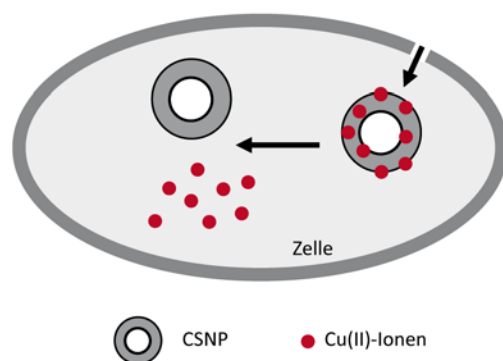


Abb. 40: Schematische Darstellung der intrazellulären Cu-Freigabe. Die Freigabe der Cu(II)-Ionen erfolgt über noch nicht näher geklärte Mechanismen.

anders innerhalb der Zelle lokalisiert sind (La Fontaine et al., 2001).

Ein möglicher Mechanismus der Cu-Freigabe aus dem NP-Komplex könnte auf dem pH-Wert basieren. Ich konnte zeigen, dass bei allen Cu/NP-Komplexen mit saureren pH-Werten eine Cu-Freigabe erfolgt und bei Cu/CSNP1 bereits bei physiologischen pH-Werten Cu freigesetzt wird. Die pH-Abhängigkeit der Cu-Freigabe der NPs scheint auf der Protonierung der Stickstoffgruppen zu basieren. Stickstoffatome haben eine hohe Elektronegativität und liegen auch in Bindung mit C-Ketten mit einer negativen Teilladung vor. In saurer Umgebung könnten die vorliegenden H^+ an diese Stickstoffe binden, so die Cu-Komplexbindung schwächen bzw. auflösen, was eine Cu-Freigabe zur Folge hätte.

Vielfach wird erwähnt, dass Stickstoffe, die in keiner Komplexbindung involviert sind, bereits bei physiologischen pH-Werten in protonierter Form vorliegen können. So werden für reines PEI Werte zwischen 30 – 90% des Anteils der protonierten Amine bei pH 7,4 diskutiert (Ziebarth and Wang, 2010). Für TMEDA sind keine solchen Werte bekannt, demzufolge gibt es nur die hypothetische Annahme, dass auch hier ein Großteil der Amine bei diesem pH-Wert protoniert vorliegen. Gestützt wird diese Annahme durch Cadverine, zu TMEDA ähnlich aufgebaute Moleküle, die bei pH 7,4 fast vollständig protoniert vorliegen (http://www.chem.wisc.edu/courses/116/OtherDoc/pKas_of_Organic_Acids_and_Bases.pdf). Bei noch niedrigeren pH-Werten erhöht sich der Protonierungsanteil, sofern dies noch möglich ist. Dieser Umstand könnte bedeuten, dass einmal in saurer Umgebung freigesetzte Cu-Ionen nicht erneut gebunden werden, da die entscheidenden Komplexpartner durch die Protonierung keine Cu-Bindung mehr eingehen können. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Erkenntnis, dass bei dem NP „G5“, der einen TMEDA-Kern und eine PAMAM-Hülle („poly(amido amine)“) aufweist, bei pH 5 keine Cu-Bindung mehr stattfindet (Diallo et al., 2004).

Tatsächlich gibt es in der Zelle Kompartimente, die einen niedrigeren pH-Wert aufweisen und somit diesen Cu-Freigabemechanismus ermöglichen könnten. Dazu gehören Lysosomen, Endosomen und Golgi (Asokan and Cho, 2002, Maeda and Kinoshita, 2010). Im Golgi-Kompartiment liegen pH-Werte von 6,2 – 7 vor, in Endosomen liegt der pH-Wert bei 5,5 – 6,0 und in den Lysosomen herrscht mit einem pH von 5,0 eine noch saurere Umgebung (Asokan and Cho, 2002). Sollten die NPs diese sauren Kompartimente erreichen, könnte dort eine solche pH-abhängige Cu-Freigabe erfolgen.

Der Mechanismus einer gezielten, pH-abhängigen Wirkstofffreisetzung wurde bereits in mehreren Studien untersucht (Shen and Ryser, 1981, Ulbrich and Subr, 2004, He et al., 2013).

Insbesondere bei der Tumormedikation ist dieser Effekt dadurch interessant, dass im extrazellulären Milieu von Tumorgewebe leicht acide Bedingungen herrschen (Ulbrich and Subr, 2004, Xu et al., 2009). Als Beispiel sei hier ein NP „1“ genannt, der einen Kern aus PG und eine Hülle aus PEG aufweist, die wiederum durch pH-sensitiven Verlinkungen verbunden sind (Xu et al., 2009). Dieser NP kann die therapeutisch wirksame Substanz Doxorubicin binden und pH-abhängig wieder freisetzen (Xu et al., 2009). In Mausstudien konnte eine Anreicherung dieses NPs in Tumorgewebe gezeigt werden (Xu et al., 2009). Neuere Ansätze einer pH-abhängigen Wirkstofffreisetzung basieren auf neuen chemischen Ausgangsstoffen wie der Tanninsäure (Nowag and Haag, 2014). Diese ist tendenziell in der Lage, Cu-Ionen pH-sensitiv zu verkapseln und hat den Vorteil, durch die vorhandenen Esterbindungen bioabbaubar zu sein (Nowag and Haag, 2014). Dies zeigt, dass viel Potential in diesem pH-sensitiven Mechanismus steckt.

Eine weitere Möglichkeit, wie die Cu-Freigabe erfolgen könnte, ist der Redox-Status der Umgebung. In Lysosomen, Endosomen und Endoplasmatischen Retikulum (ER) herrschen eher oxidierende Bedingungen vor, während in Mitochondrien, im Kern und im Zytoplasma eher reduzierende Bedingungen vorliegen (Hung et al., 2011, Kaludercic et al., 2014). Unter der im letzten Kapitel geschlussfolgerten Annahme, dass die NPs über Nanoporation in die Zelle gelangen, ist es folglich wahrscheinlich, dass die Cu/NP-Komplexe zunächst ins Cytosol gelangen. Unter den dortigen reduzierenden Bedingungen würde freigesetztes Cu(II) sofort in Cu(I) umgewandelt werden. Dieses wiederum würde sogleich von den zelleigenen Cu-Chelatoren wie SOD (Superoxid-Dismutase) oder MT gebunden werden, um die Entstehung von ROS zu verhindern (Rubino and Franz, 2012). Die Bindung von Cu(I) erfordert aufgrund seines d^{10} -Zustandes nach LFSE („ligand field stabilization energy“) andere geometrische Präferenzen als die von Cu(II) (Rubino and Franz, 2012). Da Proteine im zellulären System eher auf die Bindung von Cu(I) ausgerichtet sind, werden mutmaßlich nur freigesetzte Cu-Ionen gebunden, die ihren Oxidationsstatus von Cu(II) auf Cu(I) geändert haben. So weisen viele Cu-Chelatoren ein CXXC-Motiv auf, welches eine zweizählige Cu-Bindung vermittelt (Rubino and Franz, 2012). Dies wiederum deutet an, dass einmal freigesetzte Cu-Ionen nicht erneut von den NPs gebunden werden, da diese auf eine oktaedrische Cu(II)-Bindung optimiert sind. Somit bleiben die Cu-Ionen mutmaßlich bioverfügbar. Diese Hypothese unterstützt das Potential der therapeutischen Cu/NP-Nutzung.

Ein Faktor, der einen weiterführenden Einblick in die Mechanismen der Cu-Freigabe liefern könnte, ist der K_d -Wert der Cu-Bindung. Für die in dieser Arbeit analysierten NPs waren Versuche, diese Bindungskonstante mittels ITC-Messungen zu ermitteln, leider nicht erfolgreich. Vermutlich

liegt dies daran, dass durch die große Cu-Bindungskapazität der NPs sehr viele Cu(II)-Ionen nach und nach binden und so kein auswertbares ITC-Messergebnis zustande kommt. Bei Vorliegen des K_d -Wertes könnte eine Einordnung der Cu-Bindung im Vergleich zu Cu-Proteinen, wie SOD oder APP, oder bekannten spezifischen Cu-Chelatoren erfolgen. Generell ist anzunehmen, dass der K_d -Wert für die NPs niedriger ist als für starke Cu-Chelatoren wie EDTA mit einem Cu(II)- $K_d = 10^{-12}$ oder SOD mit einem $K_d = 6 * 10^{-15}$ (Rae et al., 1999, Atwood et al., 2000). Nur so kann überhaupt eine intrazelluläre Cu-Freigabe erfolgen. Zusätzlich sind im Rahmen des therapeutischen Cu/NP-Ansatzes die Cu-Bindungskonstanten der im Blut vorhandenen Cu-Transporter Ceruloplasmin oder Albumin zu beachten. Cu wird von Ceruloplasmin oder Albumin mit einem $K_d = 10^{-7}$ oder $K_d = 7 * 10^{-17}$ gebunden (Lau and Sarkar, 1971, Orena et al., 1986). Hier müsste in weiteren Studien überprüft werden, inwieweit die Cu/NP-Komplexe in dieser Umgebung das Cu weiterhin binden können, um Aussagen über die Plasmastabilität machen zu können. Ein sinnvoller molekularer NP-Aufbau muss hier den Balanceakt schaffen, die Cu(II)-Ionen im Blut fest genug zu binden, aber wiederum innerhalb der Zelle eine Cu-Freigabe zuzulassen.

3.4 Fehlender Einfluss auf die APP-Prozessierung

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine Cu/NP-Inkubation nach einer zellulären Aufnahme zu einer erhöhten Cu-Bioverfügbarkeit führt, war es umso überraschender, dass sich kein Effekt auf die APP-Prozessierung feststellen ließ. Da die Cu-Freigabe eindeutig gezeigt wurde, ist es denkbar, dass die Cu-Ionen nicht am richtigen Ort innerhalb der Zelle freigesetzt werden.

Basierend auf dem Wissen, dass eine Cu-Zugabe nachweislich die APP-Prozessierung derart beeinflussen kann, dass weniger A β -Peptide gebildet werden (Borchardt et al., 1999, Cater et al., 2008), wurde dieser therapeutische Ansatz mit Cu/NP-Komplexen durchgeführt. In einer vorherigen Studie konnte gezeigt werden, dass dieser positive Effekt auf die APP-Spaltung prinzipiell auch mit Cu beladenen NPs erreicht werden kann (Treiber et al., 2009). Durch eine Cu-Beladung des NPs „CS-Glu“, welcher einen PEI-Kern und eine Gluconolacton-Hülle aufweist, wurde ein reduzierender Einfluss auf die A β -Level in APP-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen erreicht (Treiber et al., 2009). Allerdings zeigte sich dieser positive Einfluss nicht für die anderen drei untersuchten mit Cu-beladenen NPs (Treiber et al., 2009). Zudem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die untersuchten NPs unterschiedliche intrazelluläre Lokalisierungen aufweisen. Während „CS-Glu“ die Tendenz hat, sich in Mitochondrien, Lysosmen, Peroxisomen

oder im Kern anzureichern, können sich die anderen NPs eher in den Endosomen oder an der Plasmamembran anlagern (Treiber et al., 2009). Da die APP-Prozessierung in der Zelle an der Plasmamembran und in den Endosomen stattfindet, ist der positive Befund für „CS-Glu“ durchaus überraschend. Aber es scheint sicher zu sein, dass die zelluläre Lokalisierung entscheidend ist, die mögliche Einflussnahme auf die APP-Prozessierung zu ermöglichen.

Um Gewissheit zu erlangen, dass die Cu-Ionen zwar in der Zelle, jedoch an anderer Stelle als der subzellulären Orte der APP-Prozessierung freigesetzt werden, müsste diese subzelluläre Lokalisierung der NPs nach der zellulären Aufnahme mittels Zellmarkern in weiterführenden Studien untersucht werden. Dies ist auch entscheidend für eine mögliche Weiterführung des therapeutischen Ansatzes der Cu/NP-Komplexe.

3.5 Überwindung der Bluthirnschranke

Wie schon in der Einleitung beschrieben ist es eine kritische Angelegenheit, therapeutisch wirksame Substanzen erfolgreich über die BBB zu transportieren (Pardridge, 2007). Aus diesem Grund gibt es für viele neurodegenerative Erkrankungen keine Medikamente (Ghose et al., 1999, Lipinski, 2000).

3.5.1 Erfolgreiche Etablierung eines HBMEC-Mono-Zell-Modells als Modell der Bluthirnschranke

In dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Mono-Zell-Modell der BBB basierend auf HBMEC-Zellen etabliert. Prinzipiell sind solche *in vitro* Zellkulturmodelle, bei denen Endothelzellen der Hirnkapillaren eine geschlossene Zellbarriere bilden und der Transport einer Substanz von einer Seite auf die andere Seite der Zellbarriere quantifiziert wird, ein oft genutztes Verfahren, das Transportpotential über die BBB zu ermitteln (Deli et al., 2005, Palmer and Alavijeh, 2013).

Dazu wurde zunächst die Ausbildung einer vollständig geschlossenen Zellschicht über die TJs mittels der Anfärbung des TJ-Proteins ZO1 in Immunfluoreszenzanalysen bestätigt. Das von mir detektierte Vorhandensein eines an keiner Stelle unterbrochenen Zell-Zell-Kontaktes wurde in einer vergleichbaren Immunfluoreszenzanalyse mit HBMEC-Zellen ebenfalls so gesehen (Siddharthan et al., 2007). ZO1 ist ein zuverlässiger Marker für die korrekte Ausbildung dieser Verbindungselemente (Kevil et al., 1998). Demzufolge konnte im verwendeten HBMEC-Mono-Zell-

Modell der korrekte Aufbau der TJs und die damit verbundene Vollständigkeit des HBMEC-„Monolayers“ bestätigt werden.

Als eine Messgröße wurde der TEER-Wert bestimmt, der Aussagen über die Vollständigkeit des HBMEC-„Monolayers“ im Modellsystem geben soll, da bei einem vollständig ausgebildeten „Monolayer“ ein sehr geringer Ionentransport über diese Barriere stattfinden und somit ein hoher TEER-Wert erreicht werden soll. Für das verwendete Modell wurde ein signifikanter TEER-Wert von $15 \Omega\text{cm}^2$ ermittelt. Dieser hat eine ähnliche Größenordnung wie der TEER-Wert von anderen immortalisierten Zellen, wie $33 - 43 \Omega\text{cm}^2$ für humane Kapillarendothelzellen oder $40 - 50 \Omega\text{cm}^2$ für Maushirnkapillarendothelzellen (Garberg et al., 2005a, Hatherell et al., 2011). Höhere TEER-Werte weisen BBB-Modelle aus primären Schweinhirnkapillarendothelzellen mit $200 - 1.000 \Omega\text{cm}^2$ oder primären Maushirnkapillarendothelzellen mit $300 \Omega\text{cm}^2$ auf (Tilling et al., 1998, Deli et al., 2003). Das ist immer noch vergleichsweise gering im Verhältnis zu *in vivo*-Werten, wie $1850 \Omega\text{cm}^2$ im Froschhirn oder bis zu $8.000 \Omega\text{cm}^2$ im Rattenhirn (Crone and Olesen, 1982, Smith and Rapoport, 1986). Hier zeigt sich deutlich, dass bei *in vitro* Zellkulturmodellen die *in vivo* gemessenen TEER-Werte nicht erreicht werden und dass im Vergleich zwischen primären und immortalisierten Zellen erstere höhere TEER-Werte aufweisen. Somit sind die in dieser Arbeit ermittelten TEER-Werte durchaus plausibel.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für den korrekten Aufbau des BBB-Mono-Zell-Modells ist der Vergleich der Transportfähigkeit der Testsubstanzen zu publizierten Werten. In dieser Arbeit wurde für NaFl ein PSe-Wert von $1.488 * 10^{-6} \text{ cm/min}$ ermittelt. Dieser liegt innerhalb der publizierten PSe-Werte für diese Substanz von $530 - 3.200 * 10^{-6} \text{ cm/min}$ (Muruganandam et al., 2002, Deli et al., 2003, Gesuete et al., 2009). Für ^{14}C -Sucrose sind PSe-Werte von $498 - 1.980 * 10^{-6} \text{ cm/min}$ publiziert (Giese et al., 1995, Lundquist et al., 2002, Garberg et al., 2005a). Insbesondere der PSe-Wert, der in einem BBB-Modell mit humanen Zellen bestimmt wurde, liegt mit $1.602 * 10^{-6} \text{ cm/min}$ recht nahe dem in dieser Arbeit ermittelten PSe-Wert von $1.720 * 10^{-6} \text{ cm/min}$ (Garberg et al., 2005a). Für EBA liegt der in dieser Arbeit bestimmte PSe-Wert mit $61 * 10^{-6} \text{ cm/min}$ ebenfalls im publizierten Bereich von $20 - 113 * 10^{-6} \text{ cm/min}$ (Descamps et al., 2003, Deli et al., 2003, Gesuete et al., 2009). Für PI wurde in dieser Arbeit ein Pj-Wert von $468 * 10^{-6} \text{ cm/min}$ bestimmt. Dieser ist sehr ähnlich dem publizierten Pj-Wert von $480 * 10^{-6} \text{ cm/min}$, der ebenfalls in einem HBMEC-Mono-Zell-Modell der BBB ermittelt wurde (Kuo and Lu, 2011). Somit konnte insgesamt gezeigt werden, dass die Transportfähigkeiten der untersuchten Testsubstanzen gut mit den publizierten Werten übereinstimmen.

Zusammengenommen konnte durch Immunfluoreszenzanalysen, TEER-Wert- und PSe-Wert-Bestimmungen deutlich gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit entwickelte HBMEC-Mono-Zell-Modell der BBB die typischen Eigenschaften eines BBB-in vitro-Modells aufweist und somit für die Analyse der BBB-Gängigkeit der Cu/NP-Komplexes verwendet werden kann.

Obwohl die Etablierung dieses HBMEC-Mono-Zell-Modells erfolgreich war, könnte dieses Modell durch Kokultivierung mit Astrozyten noch weiter verbessert werden. So wurde gezeigt, dass durch eine solche Kokultivierung die Permeabilitätswerte der Testsubstanzen etwas erniedrigt werden und sie somit noch ein Stück mehr den tatsächlichen Transportfähigkeiten *in vivo* entsprechen (Cohen-Kashi Malina et al., 2009, Nakagawa et al., 2009).

3.5.2 Potential der Cu/NPs zur Überwindung der Bluthirnschranke

Der direkte Vergleich der im HBMEC-Mono-Zell-Modell ermittelten PSe-Werte der Cu/NPs mit denen der Testsubstanzen NaFl ($1.488 \cdot 10^{-6}$ cm/min) und 14 C-Sucrose ($1.720 \cdot 10^{-6}$ cm/min) zeigte einen um 2,25-fach besseren PSe-Wert für Cu/CMS ($3.600 \cdot 10^{-6}$ cm/min) und CS/CSNP1 ($3.585 \cdot 10^{-6}$ cm/min). Im Gegensatz dazu liegt der PSe-Wert von Cu/CSNP2 ($126 \cdot 10^{-6}$ cm/min) deutlich niedriger und eher im Bereich von EBA ($61 \cdot 10^{-6}$ cm/min). Für alle drei Testsubstanzen gilt eine eher schlechte BBB-Permeabilität. Demzufolge wurde im verwendeten BBB-Modell für Cu/CSNP2 keine BBB-Gängigkeit ermittelt, während für Cu/CMS und Cu/CSNP1 eine relativ gute BBB-Gängigkeit gezeigt wurde (Abb. 41).

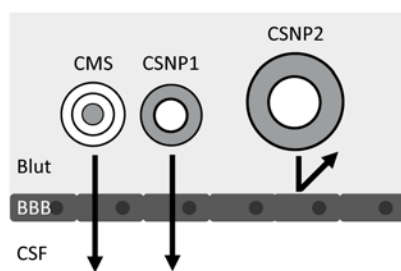


Abb. 41: Schematische Darstellung der prognostizierten Transportfähigkeit der NPs über die BBB. Die Ergebnisse des HBMEC-Mono-Zell-Modells verglichen mit publizierten Daten deuten an, dass Cu/CMS und Cu/CSNP1 nicht jedoch Cu/CSNP2 die BBB überwinden können.

Neben den untersuchten Testsubstanzen NaFl, Sucrose und EBA sind PSe-Werte für eine Vielzahl weiterer Substanzen bekannt, die in verschiedenen *in vitro* BBB-Modellen ermittelt wurden. So wurden für Koffein und Nicotin PSe-Werte von $13.782 \cdot 10^{-6}$ cm/min and $17.358 \cdot 10^{-6}$ cm/min ermittelt (Lundquist et al., 2002). Für Morphin, welches ebenfalls gut die BBB passieren kann, wurde ein PSe-Wert von $1500 \cdot 10^{-6}$ cm/min bestimmt (Lundquist et al., 2002, Garberg et al., 2005b). Für die häufig genutzte Acetylsalicylsäure (ASS) wurde ein PSe-Wert von $540 \cdot 10^{-6}$ cm/min ermittelt (Lundquist et al., 2002, Garberg et al., 2005b).

cm/min ermittelt (Lundquist et al., 2002). Somit kann vergleichend mit publizierten Daten gesagt werden, dass die BBB-Gängigkeit für Cu/CMS und Cu/CSNP1 6-fach besser als ASS und 2-fach besser als Morphin ist. Im Vergleich zu Koffein und Nikotin liegt die BBB-Transportfähigkeit für Cu/CMS und Cu/CSNP1 mindestens 4-fach darunter. Im Gegensatz dazu liegt die BBB-Gängigkeit von Cu/CSNP2 ca. 120-fach unter der von Koffein und Nikotin und zudem mindestens 4-fach unter der von ASS. Zusammengenommen bestätigen all diese Vergleiche die These, dass Cu/CMS und Cu/CSNP1 eine gute Chance haben, die BBB passieren zu können, während Cu/CSNP2 die BBB eher nicht überwinden kann (Abb. 41).

Interessant ist der deutliche Unterschied zwischen Cu/CSNP1 und Cu/CSNP2 hinsichtlich der BBB-Gängigkeit. Diese baugleichen NPs unterscheiden sich in der Größe und der Ladung. Prinzipiell begünstigt eine positive Ladung die Aufnahme über die BBB. Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich von negativ geladenen zu positiv geladenen Tripalmitin-NPs letztere bis zu 14-fach effektiver beim Überwinden der BBB sind (Lu et al., 2007, Reddy et al., 2004, Kozlovskaya and Stepensky, 2013). Da sowohl Cu/CSNP1 als auch Cu/CSNP2 eine positive Außenladung aufweisen, scheint dies nicht der entscheidende Faktor zu sein. Mutmaßlich liegt die Erklärung für das unterschiedliche Aufnahmeverhalten in der Größe. Generell wird angenommen, dass Partikel $< 1\text{nm}$ frei die BBB passieren können, während größere Partikel über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden (Bradbury, 1993, Sarin, 2010). Über die größtmögliche Partikelgröße, die noch über die BBB gelangt, gibt es keine abschließenden Ergebnisse. *In vitro* Studien zeigten, dass auch NPs mit einem Durchmesser von 50 nm, 200 nm oder auch 500 nm noch das Potential haben die BBB zu überwinden (Georgieva et al., 2011, Costantino, 2010, Hanada et al., 2014). Es ist allerdings zu beachten, dass bei solch großen Molekülen die BBB-Gängigkeit eher die Ausnahme denn die Regel ist. Einige Studien zeigen, dass kleine Moleküle wie „horseradish peroxidase“ (43 kDa, Durchmesser $\sim 6\text{ nm}$) relativ leicht die Basalmembran, welche Endothelzellen und Gliazellen trennt, durchqueren können, während dies bei größeren Makromolekülen wie Ferritin (460 kDa, Durchmesser von $\sim 10\text{ nm}$) nicht mehr möglich war (Brightman, 2002). Diese Erkenntnis könnte das unterschiedliche Aufnahmeverhalten von CSNP1 und CSNP2 erklären. Mit einem Durchmesser von 4 nm fällt CSNP1 in einen ähnlichen Bereich wie „horseradish peroxidase“, während CSNP2 mit 20 nm eher mit dem Durchmesser von Ferritin vergleichbar ist. Da beide NPs intrazellulär in SH-SY5Y-Zellen aufgenommen werden, trifft dies wahrscheinlich auch auf die HBMEC-Zellen zu und insofern könnte tatsächlich die Basalmembran die filternde Barriere sein. CMS ist von der Größe und Ladung her ähnlich wie CSNP1 aufgestellt und es ist nicht verwunderlich, dass hier ähnliche BBB-Permeabilitätswerte ermittelt wurden.

Generell gibt es einige Möglichkeiten die BBB-Gängigkeit zu verbessern, die auch bei größeren Molekülen greifen. So konnte für Albumin (~66 kDa), welches üblicherweise eher schlecht über die BBB transportiert wird, eine erhöhte BBB-Gängigkeit erreicht werden, wenn es mit einem Lipidlayer versehen war (Lockman et al., 2002). Möglicherweise können die NPs in dieser Hinsicht optimiert werden.

Wichtig ist, darauf hinzuweisen, dass es für eine medikamentöse Wirksamkeit bereits ausreichend sein kann, wenn ein geringer Anteil der Substanz die BBB passiert. So ist weniger als 4% von oral eingenommener ASS im Blut verfügbar, kann das Gehirn erreichen und ist noch in ausreichendem Maße therapeutisch wirksam (Kato et al., 2010). Andere Studien zeigen sogar, dass bei heutigen ZNS-Medikamenten nur 0,2% der Substanz das Gehirn erreichen und dort wirksam sind (Banks, 2008). Möglicherweise trifft dieser Umstand auch für Cu/CMS und Cu/CSNP1 zu. Dies müsste durch weitere Studien belegt werden.

Sollte der in dieser Arbeit untersuchte therapeutische Ansatz weiterverfolgt werden, ist zusätzlich zu beachten, dass bei der AD eine gestörte BBB vermutet wird. So konnte in einer Meta-Studie eine erhöhte Tendenz für eine permeablere BBB in AD-Patienten festgestellt werden (Farrall and Wardlaw, 2009). Auch in einem AD-Mausmodell konnte eine Störung der BBB nachgewiesen werden (Ujii et al., 2003). Zudem wird ein Zusammenhang zwischen der gestörten BBB und CAA („cerebral amyloid angiopathy“), der Anlagerung von A β -Peptiden an die Wände der Blutgefäße, diskutiert (Bell and Zlokovic, 2009, Zhang and Le, 2010, Zlokovic, 2011). Bisher ist noch nicht geklärt, ab wann die BBB permeabel wird.

In älteren Publikationen wird oft der K_{ow} (Oktanol-Wasser-Koeffizient) zur Voraussage der BBB-Gängigkeit verwendet (Buchwald and Bodor, 1998). Dieser wurde für die vorliegenden NPs bewusst nicht ermittelt, da gezeigt werden konnte, dass eine Korrelation zwischen BBB-Gängigkeit und K_{ow} nur bei Molekülen unter 400 Da existiert (Levin, 1980). Mit 20.000 – 195.000 g/mol sind die in dieser Arbeit untersuchten NPs deutlich größer und die Anwendung des in dieser Arbeit benutzten HBMEC-Mono-Zell-Modells ist deutlich aussagekräftiger.

3.6 Cu/CSNP1 im Tierversuch

In dieser Arbeit wurde der Cu/CSNP1-Komplex in verschiedenen Dosierungen im AD-Mausmodell „APPPS1“ untersucht. Leider zeigte sich weder ein Einfluss auf die Cu-Level im Blut oder Gehirn, noch konnten Auswirkungen auf die A β -Level festgestellt werden. Auch in der Leber, dem

Speicherorgan für Cu, zeigten sich keine Anzeichen für toxische Veränderungen aufgrund einer Cu-Anreicherung. Die mögliche Erklärung dafür ist, dass die Cu/CSNP1-Komplexe systematisch über die Niere ausgeschieden werden. Da im Tierversuchsaufbau das Sammeln des Mausurins nicht durchgeführt wurde, bleibt diese Erklärung spekulativ. Es ist allerdings bekannt, dass Partikel oder globuläre Proteine mit einem Durchmesser kleiner als 5,5 nm mit hoher Wahrscheinlichkeit über die Niere ausgeschieden werden (Choi et al., 2007). Mit einem größer konstruierten NP könnte dieser Ausscheidungsweg blockiert werden. Ein Ansatz dafür könnte mit Cu/CSNP2 erfolgen, der mit 20 nm groß genug ist. Allerdings ist zu beachten, dass die Leber NPs filtert, die größer als 10 – 20 nm im Durchmesser sind (Choi et al., 2007). Demzufolge sollten bei zukünftigen Cu/NP-Analysen im Tiermodell sämtliche Ausscheidungsprodukte auf Cu- oder NP-Rückstände untersucht werden.

Das in dieser Arbeit verwendete AD-Mausmodell basiert auf der Erkenntnis, dass sich Effekte der Mutationen im PS und APP addieren und es somit zu einer verstärkten AD-Symptomatik kommt (Citron et al., 1998). Es ist jedoch anzumerken, dass alle Studien mit Cu-Medikation an Mausmodellen durchgeführt wurden, bei denen das APP die sw-Mutation trägt (Bayer et al., 2003, Crouch et al., 2009). Bei Vorliegen der sw-Mutation findet die APP-Spaltung durch die β -Sekretase in sekretorischen Vesikeln statt, während die β -Spaltung von wt-APP in den Endosomen erfolgt (Haass et al., 1995). Dadurch kommt es bei der sw-Mutation viel früher und mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einer β -Spaltung und folglich zu einer erhöhten A β -Produktion (Sinha and Lieberburg, 1999). Um hier einen systematischen Fehler auszuschließen, müsste ein positiver Effekt einer Cu-Medikation generell auch in anderen AD-Mausmodellen oder anderen AD-Tiermodellen unabhängig von der sw-Mutation gezeigt werden.

Zusätzlich konnte bei der Wilson-Krankheit, einer krankhaften Cu-Akkumulation hauptsächlich in Leber-Zellen durch Mutation im Cu-Transporter ATP7B, gezeigt werden, dass die Cu-Anreicherung keineswegs kontinuierlich verläuft (Ralle et al., 2010). So erfolgt in Δ ATP7B-Hepatocyten erst eine Cu-Akkumulation im Kern und nach Veränderung der Transkription findet die Cu-Anreicherung zunächst in subzellulären und später extrazellulären Depots statt (Ralle et al., 2010). Auch bei der AD könnte der Cu-Mangel sich in sequenziellen Zellprozessen äußern. Hier müsste noch näher erforscht werden, inwieweit der zelluläre Cu-Stoffwechsel verändert ist, z.B. bezüglich der CTR- und MT-Expression. Sollten solche zeitlich aufeinander folgenden Prozesse stattfinden, könnte ein therapeutischer Cu/NP-Ansatz demensprechend angepasst werden.

3.7 Zur Pharmakokinetik der Cu/NP-Komplexe

Mit der Pharmakokinetik werden die Prozesse beschrieben, denen ein Arzneistoff im Organismus unterliegt, wie die Freisetzung („Liberation“), der Aufnahme ins Blut (Absorption), die Verteilung im Körper (Distribution), der biochemische Um- und Abbau (Metabolisierung) sowie die Ausscheidung (Exkretion). In Anbetracht des therapeutischen Ansatzes dieser Arbeit werden diese Faktoren im Folgenden kurz diskutiert.

Die intrazelluläre Freisetzung der Cu-Ionen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Allerdings muss die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass die Cu-Ionen bereits vorher ins Blut freigegeben werden könnten. Hierzu müsste eine Studie über die Plasmastabilität von Cu/NPs durchgeführt werden, um beurteilen zu können, in welchem Umfang das Cu in einer dem Blut entsprechenden Umgebung an die NPs gebunden bleibt.

Für die Aufnahme der Cu/NP-Komplexe ins Blut scheint die intravenöse Gabe am sinnvollsten zu sein. Eine orale Gabe scheint nicht sinnvoll, da die Cu/NP-Komplexe das saure Magenmilieu passieren müssen. Durch die in dieser Arbeit gezeigte pH-abhängige Cu-Freigabe besteht dort eine große Wahrscheinlichkeit, dass sich die Cu-Ionen aus den Cu/NP-Komplexen lösen. Zusätzlich müssten bei einer oralen Gabe nichttriviale Hindernisse, wie die intestinalen Membran passiert werden, was ebenfalls ein gravierendes Problem darstellt (Malik et al., 2007).

Zur Verteilung im Körper ist zu beachten, wie weit sich die Cu/NP-Komplexe im Körper verteilen und ob einzelne Organe insbesondere betroffen sind. In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Komplexe Cu/CMS und Cu/CSNP1 das Potential haben, die BBB zu überwinden. Möglicherweise könnte eine erhöhte Konzentration der Cu/NP-Komplexe im Gehirn durch eine intraarterielle anstatt einer intravenösen Injektion z.B. in die Halsschlagader erreicht werden, wie in Studien für andere Anwendungen gezeigt werden konnte (Kobayashi et al., 1987, Maeda et al., 1999). In den Mausstudien konnte ich zudem zeigen, dass Cu/CNSP1 nicht in bestimmten Organen wie Leber oder Hirn akkumuliert wird. Demzufolge gibt es keine toxischen Anreicherungen. Es könnte allerdings sein, dass die Cu/NP-Komplexe aufgrund ihrer Größe schlicht über die Niere ausgeschieden werden.

Zur Metabolisierung ist recht wenig bekannt. Zum einen ist unklar, was mit den NPs passiert, wenn die Cu-Ionen innerhalb der Zellen freigegeben werden. Eine Verstoffwechslung der NPs ist unwahrscheinlich, da innerhalb der Zelle für diese molekularen Strukturen keine Abbaumechanismen vorliegen. Hier müsste in weiteren Forschungen untersucht werden, ob es

zu einer NP-Exocytose oder zu einer intrazellulären NP-Anreicherung kommt. Zudem müsste untersucht werden, ob und welche toxischen Auswirkungen eine längere NP-Anwendung auf zellulärem Niveau hat. Es wurde beispielsweise für andere NPs zellulär-erhöhter oxidativer Stress beobachtet, welcher durch die NP-Behandlung ausgelöst wurde (Sarkar et al., 2014).

3.8 Ausblick: Potential der Cu/NP-Komplexe in der Therapie der Alzheimer Krankheit

Obwohl in dieser Arbeit viele für den therapeutischen Ansatz in der AD-Therapie positive Eigenschaften der Cu/NP-Komplexe bestimmt werden konnten, wie z.B. die Ergebnisse der Cu-Bindung, der Cu-Freigabe und der BBB-Gängigkeit, wurden auch schwerwiegende Probleme deutlich. Dazu gehören die fehlende Auswirkung auf die APP-Prozessierung und der fehlende Effekt im Tierversuch. Diese Gesichtspunkte müssten in jedem Fall näher untersucht werden. Möglicherweise könnten hierbei die vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten hinsichtlich des molekularen NP-Aufbaus hilfreich sein, um diese Defizite zu adressieren.

Insgesamt zeigen die noch offenen Fragestellungen deutlich, dass die Analyse dieses therapeutischen Ansatzes noch in den Anfängen steckt. Nichtsdestotrotz sind die Ergebnisse derart vielversprechend, dass diesbezüglich weiterführende Forschungen gerechtfertigt erscheinen.

4 Material und Methoden

4.1 Allgemeine Angaben

4.1.1 Geräte

- Autoklav Varioklav 135S (H+P, Deutschland)
- Begasungsbrutschrank Heracell 240 (Heraeus-Kendro, USA)
- Blotapparatur Trans-Blot Cell (Bio-Rad, Deutschland)
- Bunsenbrenner (Juchheim, Deutschland)
- DNA-Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur (Selbstanfertigung am ZMBH, Uni Heidelberg)
- Dot-Blot-Apparatur Minifold I Dot-Blot-System (Minifold, Schleicher & Schuell, Deutschland)
- Elektroporationsgerät GenePulser II (Bio-Rad, Deutschland)
- Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR (Cawo, Deutschland)
- Fluorometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Deutschland)
- Geldokumentation Alphamanager 2200 (Biozym, Deutschland)
- Heizblock UBD2 (Grant, UK)
- Heizschrank (Memmert, Deutschland)
- ICP-MS: Element 2 ShieldTorch system instrument (Thermo Fisher Scientific, Deutschland)
- Inkubatoren
 - Innova 4230 refrigerated incubator shaker (New Brunswick Scientific, Deutschland)
 - Brutschrank: Modell 600 (Memmert, Deutschland)
- Magnetrührer Ikamag Reo inklusive Rührmagneten (Ika-Werke, Deutschland)
- Messelektrode für TEER-Messungen (Millipore, USA)
- Messgerät Millicell ERS-2 Volt-Ohm Meter (Millipore, USA)
- Millipore water purification system, Q Gard 1 (Millipore, USA)
- Mikroskope
 - Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 135 (Zeiss, Deutschland)
 - Konfokalmikroskop: TSC PS8 (Leica, Deutschland)
- Mikrowelle (Sharp Electronics, Deutschland)
- Netzgeräte
 - Power Supply 2000/200 (Bio-Rad, Deutschland)
 - Power Supply EPS 301 (Amersham Biosciences, USA)
- PCR-Maschine: Mastercycler (Eppendorff, Deutschland)

- pH-Messgerät pH-Meter 763 Multi-Calimatic (Knick, Deutschland)
- pH-Messelektrode InLabRoutine (Mettler-Toledo, Deutschland)
- Pipettierhilfen
 - Pipetman P2, P20, P200 und P1000 (Gilson, USA)
 - Pipetboy acu (Integra Biosciences, Schweiz)
 - Multikanalpipette (Eppendorff, Deutschland)
- Photometer
 - Küvettenphotometer UltroSpec 2100 (Amersham Biosciences, USA)
 - Plattenphotometer anthos ht2 (Anthos, Deutschland)
 - Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA)
- Probenaufschlussgerät Ethos Plus (Milestone Inc., USA)
- Schüttler
 - Wippschüttler ST5 (CAT, Deutschland)
 - Tischschüttler mit Akkubetrieb (Edmund Bühler, Deutschland)
 - Überkopfschüttler Reax 2 (Heidolph, Deutschland)
- SDS-Gelapparaturen
 - Für Glycin-SDS-PAGE: Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad, Deutschland)
 - Für Tricin-SDS-PAGE: Vertikal-Elektrophorese-System für Minigele (Hofer, USA)
- Sterilwerkbank Herasafe (Heraeus, USA)
- Tankblotapparatur: Trans-Blot Cell (Bio Rad, Deutschland)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Deutschland)
- Vortexer: Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)
- Waagen
 - Feinwaage: MC1 AC120S (Sartorius, Deutschland)
 - Grobwaage: L2200P (Sartorius, Deutschland)
- Wasserbad U3 (Julabo, Deutschland)
- Zentrifugen
 - Minizentrifuge: Spectrafuge (Labnet, USA)
 - Tischzentrifuge: Centrifuge (Labnet, USA)
 - Zellzentrifuge: Megafuge 1.0 (Heraeus, USA)
 - Kühlzentrifuge: Avanti J-E Centrifuge (Beckman Coulter, Deutschland)
 - Ultrazentrifuge: L-60 Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Deutschland)
- Zellzähler: Casy Model DT Cell Counter (Roche, Schweiz)

4.1.2 Materialien

Allgemeine Plastikwaren, wie Reagiergefäße, Mikrotiterplatten, Pipettenspitzen und Zellkulturschalen, wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sarstedt (Deutschland), TPP (Schweiz), Roth (Deutschland) oder Greiner (Österreich) bezogen. Sterilfilter für größere Volumina stammten von Millipore (USA) und für kleinere Volumina von Sartorius (Deutschland).

4.1.3 Chemikalien, Medien, Medienzusätze und Pufferlösungen

Die verwendeten Chemikalien stammten sofern nicht anders angegeben von Bio-Rad (Deutschland), Fluka (Deutschland), Merck (Deutschland), Roth (Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Deutschland) und weisen die Qualitätsstufe pro analysis auf.

Zellkulturmedien, Zusätze wie Trypsin/EDAT, OptiMEM und PBS wurden sofern nicht anders angegeben von PAA (Deutschland) oder Biochrom (Deutschland) bezogen.

Nicht gesondert angegebene Puffer wurden wie bereits beschrieben hergestellt (Sambrook, 1989). Sofern nicht anders angegeben erfolgten alle Ansätze in MilliQ-Wasser.

4.1.4 Nanocarrier CMS, CSNP₁ und CSNP₂

Die drei in dieser Arbeit verwendeten NPs wurden von Mohiuddin Abdul Quadir, Sabrina Nowag und Markus Hellmund aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Haag (Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie) hergestellt.

Die Synthese für CMS wurde bereits beschrieben (Treiber et al., 2009). In Kürze, für die Verbindung des PEI-Kern mit dem mPEG-Gruppen (monomethyl Poly(Ethylenglycol)) wurden letztere zunächst mittels DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid) und HONSu (oder NHS = N-Hydroxysuccinimid) durch Bildung eines NHS-Esters aktiviert und konnten anschließend an die freien Amingruppen des PEI-Kern binden. Diese mPEG-Gruppe bestanden aus durchschnittlich 10 Glycoleinheiten. Für die Bildung fluoreszenzmarkierter NPs wurde während vor dem ersten Syntheseschritt Indocarbocyanin Carboxy Säure (ICC) in den Ansatz gegeben (Treiber et al., 2009, Quadir, 2010).

Auch die Synthese des zweiten NPs, CSNP₂, wurde bereits beschrieben (Quadir, 2010, Fehse et al., 2014). Kurz dargestellt, wurde OMPG (O-Mesylpolyglycerol) zusammen mit langsam zugefügten N,N,N-Trimethylethan-1,2,-Diamin für 4 Tage bei 120°C in DMF (N,N-Dimethylformamid) erhitzt. Das entstehende Produkt wurde mehreren Reinigungsschritten unterworfen, wie DMF-Entfernung durch Cryo-Distillation, Resuspendieren in CHCl₃, dreimaliges Extrahieren mit NaO₃, dreimaliges Waschen mit Wasser, Trocknung über MgSO₄, Konzentrierung und Dialyse in MetOH. Für die Synthese von fluoreszenzmarkierten CSNP₁-FITC für mikroskopische Aufnahmen wurde FITC mit Dibutyltin Dilaurat als Katalysator an CSNP₁ gebunden (Quadir, 2010).

Zur Synthese von CSNP₂ – eines zu CSNP₁ baugleichen, aber größeren NP – wurde prinzipiell die gleiche Synthese wie für CSNP₁, allerdings mit größeren OMPG-Mengen, durchgeführt (Persönliche Mitteilung, Markus Hellmund). Zur Herstellung von CSNP₂-CY₃ wurde CSNP₂ zunächst mit 2-Iminothiolan für 20 min und anschließend für weitere 2 h mit Indodicarbocyanin-Farbstoff (IDCC) verrührt. Das Konzentrat wurde über eine fünftägige Dialyse von ungebundenen Fluoreszenzmolekülen gereinigt.

Zur Generierung von Cu/NP-Komplexen wurden die jeweiligen NPs mit CuCl₂ in den angegebenen Konzentrationen für mindestens 1 h inkubiert, um eine stabile Komplexbindung der NPs mit Cu(II)-Ionen zu gewährleisten, bevor der eigentliche Versuch durchgeführt wurde.

4.1.5 Software

- Bildbearbeitung: Adobe Photoshop CS5, Adobe Illustrator CS5, Leica LAS AF Lite 3.3
- Datenverarbeitung: Microsoft Excel 2007
- Internetdatenbanken: Expasy, Pubmed
- Literaturverwaltung: Endnote (Endnote, USA)
- Statistik: Past Version 2.10 (Hammer et al., 2001), Graph Pad Prism (GraphPad Software, USA) genauer Graph Pad Prism 5 Demo und Graph Pad Pism 6 Demo
- Textverarbeitung, Abbildungen und Layout: Microsoft Word 2007, Adobe Illustrator

4.1.6 Statistik

Sämtliche Messreihen wurden auf ihre Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk Tests geprüft. Bei Normalverteilung der Stichproben erfolgte Auswertung durch eine „one-way“ ANOVA-

Analyse sowie ggf. durch nachfolgenden „post-hoc“ Test – oft Dunnett’s multiple comparison Test. Bei fehlender Normalverteilung wurde eine Kruskal-Wallis-Analyse und ggf. ein Mann-Whitney Test durchgeführt. Welches Verfahren im einzelnen Fall durchgeführt wurde, ist den Bildunterschriften unter den Ergebnisabbildungen zu entnehmen.

4.2 Analytische Methoden

4.2.1 Spektroskopische Messungen

Für spektroskopische Analysen der Cu/NP-Komplexe wurde zunächst ein Absorptionsspektrum von 350 – 900 nm aufgenommen, um die maximale Absorption des Cu-Komplexes zu ermitteln. Dieses Absorptionsmaximum, welches bei allen Cu/NP-Komplexen bei ca. 650 nm liegt, wurde anschließend zur relativen Quantifizierung der Cu/NP-Komplexe genutzt. Für die Kalkulation der relativen Cu/NP-Menge wurde jeweils die Absorption freier Cu-Ionen der entsprechenden Bedingung beim Absorptionsmaximum subtrahiert. Die NPs selbst haben beim Absorptionsmaximum keine erhöhte Absorption und bleiben somit unberücksichtigt. Sämtliche spektroskopischen Analysen erfolgten in Quarzküvetten (Hellma, Deutschland) mittels des Küvettenphotometers.

4.2.1.1 Cu-Beladung der NP-Komplexe

Zur Ermittlung der Cu-Beladung der Cu/NP-Komplexe erfolgte die Aufnahme der Absorption bei verschiedenen Cu:NP-Verhältnissen von 1:10 bis 1:500, wobei mit einer konstanten Konzentration von 25 μM NP oder 12,5 μM NP gearbeitet wurde. Für jede Messung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

4.2.1.2 pH-abhängige Cu-Freigabe aus den NP-Komplexen

Bei der Untersuchung der pH-abhängigen Cu-Freigabe aus dem Cu/NP-Komplexen erfolgte die OD_{650} -Messung mit 4 mM Cu (Cu:CMS-NP 40:1), 1,5 mM Cu (Cu:CSNP1 60:1) oder 3,75 mM Cu (Cu:CSNP2 300:1) in 100 mM CH_3COoNa (NaOAc) mit pH-Werten von 7 bis 3. Parallel wurde die entsprechende Cu-Konzentration in Abwesenheit des NPs vermessen und anschließend die ermittelte Absorption bei 650 nm von dem Absorptionswert des Cu/NP-Komplexes subtrahiert.

4.2.1.3 Metall-Bindungsstudien mittels Zentrifugalfiltration

Bei der Analyse der Bindungsspezifität der NPs wurde eine Zentrifugalfiltration durchgeführt. Dazu wurden zunächst im 1:60-Verhältnis 5 μM CSNP1 mit 300 μM Metallsalz oder im 1:300-Verhältnis 1 μM CSNP2 mit 300 μM Metallsalz – CuCl_2 , ZnCl_2 oder MnCl_2 (J. T. Baker, Deutschland) – inkubiert. Anschließend wurden die NP-Komplexe in AmiconUltra-Filtereinheiten (10.000 MW, 0,5 ml, Merck Millipore, Deutschland), mit einer Ausschlussgröße von 10.000 MW („molecular weight“), für 3 min bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Als Kontrolle wurden die Metallsalze ohne NP zentrifugiert. Die Trenngröße von 10.000 MW gewährleistet das Zurückhalten des NPs sowie der etwaigen gebundenen Metallionen im obigen Kompartiment, während sich ungebundene Metallionen gleichmäßig im oberen und unteren Kompartiment verteilen (s. 2.2). Die beiden nach der Zentrifugation entstandenen Phasen wurden via ICP-MS (s. 4.2.2) auf Ihren jeweiligen Metallgehalt hin analysiert und die Messwerte mit den Levels freier Metallionen verglichen.

4.2.2 ICP-MS-Analysen

Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasmaionenquelle (ICP-MS) ermöglicht die genaue Ermittlung der Konzentration von Metall-Ionen, wie Cu, Zn oder Mn. Dabei liegen die Nachweisgrenzen liegen bei 0,2 ng/l für Cu und Zn und 0,14 ng/l für Mn (Doerffel K., 1994). Das Messprinzip basiert zunächst auf der Ionisierung der chemischen Elemente in der Probe mittels eines Plasmastrahls. Die dadurch positiv geladenen Ionen werden anschließend in das Hochvakuum des Massenspektrometers extrahiert. Dort werden sie nach ihrem Masse-/Ladungsverhältnis und Energie-/Ladungsverhältnis getrennt und mit einem Sekundär-Elektronenvervielfacher detektiert (Jevsevar et al., 2010).

Für ICP-MS-Messungen erfolgte zunächst der Mikrowellen- bzw. Säureaufschluss der Proben, um alle Bestandteile vollständig in Lösung zu bringen. Dazu wurde 100 – 200 μl Probe in 69% Salpetersäure (HNO_3) in einem Gesamtvolumen von 1 ml aufgenommen. Bei Gewebeproben, wie Maushirnhälften oder Mausleberstückchen, wurde das gesamte organische Material mit 1 ml 69% HNO_3 versetzt. Anschließend wurde der Probenbehälter mit 10 ml eines 1:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$ -Gemisch gespült, um toxische Stickstoffoxide zu absorbieren. Im Probenaufschlussgerät erfolgte die Behandlung der Proben bei 170 – 210°C und 6 Bar für 60 min (Programm 5). Nach einer

anschließenden 1:10 Verdünnung der Proben wurde die eigentliche ICP-MS-Messung mit dem ICP-MS-Messgerät bei mittlerer Auflösung (> 4000) durchgeführt.

Die verdünnte Probe wurde mittels eines „cross-flow“ Zerstäubers und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,02 l/min eingeführt. Das Argonplasma wurde mit einer Rate von 15 l/min, das Kühlgas mit einer Fließrate von 0,9 l/min und das Probenaerosol-Gas-Gemisch mit einer Fließrate von 0,1 l/min eingeführt. Der Hochfrequenzgenerator zum Aufrechterhalten des Argonplasmas wurde mit 1,3 kW betrieben. Um Schwankungen in der Massenkalisierung auszugleichen, wurden im sogenannten „peak-hopping“ Modus drei Datenpunkte im Abstand von 0,01 AMU („atomic mass unit“) pro Ausschlag („peak“) sowie 300 ms pro Datenpunkt analysiert. Zudem wurden die Proben in Dreifachbestimmung vermessen. Für Cu-Messungen wurden die Isotope Cu^{63} und Cu^{65} detektiert. Bei Zn-Messungen wurde Zn^{66} und Zn^{68} und bei Mn wurde Mn^{55} detektiert. Die Standardreihe bestand aus einer 6,5% HNO_3 -Lösung, die Cu und Zn in den Konzentrationen 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 und 200 ppb („parts per billion“) sowie 2 ppb Rh^{103} als internen Standard bei allen Messungen enthielt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Chemische Transformation

Die Vervielfältigung der Plasmide erfolgte durch Retransformation in chemisch-kompetente *E. coli* DH5 α Zellen (Invitrogen, Deutschland). Dazu wurden die Zellen mit 1 μg DNA für 30 min auf Eis inkubiert und nach einem Hitzeschock von 30 sec bei 42°C im Heizblock erneut für 2 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C kultiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt in der Tischzentrifuge bei 10.000 rpm und RT für 10 min wurde das Zellpellet in 100 μl LB-Medium resuspendiert, auf LB-Amp-Platten ausplattiert und ü. N. bei 37°C im Heizschrank inkubiert.

- LB-Medium: 5 g Hefeextrakt, 10 g Pepton, 10 g NaCl
- LB-Amp-Platten: LB-Medium, 1,5% Agar, 0,1 mg/ml Ampicillin
- LB-Amp-Medium: LB-Medium, 0,1 mg/ml Ampicillin

4.3.2 Plasmidpräparation

Die Aufreinigung der verwendeten Plasmide wurde mittels des Nucleobond-Xtra-Midi-Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die dementsprechenden Bakterienkulturen wurden ü. N. in LB-Amp-Medium kultiviert. Die Zentrifugationsschritte erfolgten mit dem JA-10-Rotor (Beckman Coulter, Deutschland) in der Kühlzentrifuge, wobei 500 ml Zentrifugenröhrchen (Nalgene Labware, USA) beim ersten Zentrifugationsschritt und Falcons (Becton Dickinson, USA) bei den darauffolgenden Zentrifugationsschritten verwendet wurden.

4.3.3 PCR zur Genotypisierung von APPPS1-Mäusen

Im Rahmen der Zucht von doppelt-transgenen APPPS1-Mäusen wurde die Maus-DNA auf die Existenz des transgenen APP-Gens hin überprüft (s. 4.5.2) unter Verwendung folgender Primersequenzen: GAA TTC CGA CAT GAC TCA GG (APPCT-1F) und GTT CTG CTG CAT CTT GGA CA (APPCT-1R)

Folgender PCR-Ansatz (20 µl) wurde auf Eis zusammengegeben: 4 µl 5x Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, USA), 1,6 µl MgCl₂ 25 mM (Promega, USA), 1,6 µl 10 mM total dNTP-Mix (Bioline, UK), je 0,2 µl Primer APPCT-1F bzw. APPCT-1R (Sigma-Aldrich, Deutschland), 0,25 µl GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), 1 µl DNA-Probe (s. 4.5.3) und 11,15 µl H₂O.

Anschließend wurde folgender PCR-Zyklus 35-mal wiederholt: 1. Denaturierung bei 94°C für 30 sec, 2. „Annealing“ bei 58°C für 30 sec, 3. Elongation bei 72°C für 30 sec und finale Elongation bei 72°C für 5 min. Die Lagerung der Proben fand bei 4°C statt. Dann erfolgte die Analyse mittels DNA-Agarose-Gel (s. 4.3.4).

4.3.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der DNA-Proben wurden 2% Agarose-Gele verwendet, wobei das vorhandene RedSafe (Intron Biotechnology, Korea) später die Visualisierung der DNA mittels UV-Licht ermöglichte. Der Probenauftrag erfolgte in 6x Probenpuffer und als Standard diente der „1 kb Plus DNA Ladder“ (Invitrogen, Deutschland). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in der Elektrophoresekammer (AG Multhaupt, selbst gebaut) mit TAE-Puffer bei einer Spannung von 200 V mit Hilfe des Power Supply 2000/200.

- TAE-Puffer: 40 mM Tris, 1,142% oder 20,5 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
- Agarose-Gel: TAE-Puffer, 2% Agarose, 0,0013% RedSafe (Chembio, UK)
- Probenpuffer: 0,25% Bromphenolblau, 60% Glycerin, 0,1 mM EDTA, pH 8,

4.3.5 ELISA

Zur Quantifizierung der A β -Spezies wurde ein „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) durchgeführt. Dazu wurden die ELISA-Platten „C96 Maxisorb Nunc Immunoplates“ (Nunc, Deutschland) zunächst mit dem Fänger-AK bei RT für 4 h oder bei 4°C ü. N. beschichtet. Für die Detektion von A β gesamt wurde 1 μ g/ml 4G8 (Covance, Europa), für A β 38 4 μ g/ml BA1-13 (Covance, Europa), für A β 40 3 μ g/ml G2-10 (TGC, Schweiz) und für A β 42 5 μ g/ml G2-13 (TGC, Schweiz) verdünnt in Carbonatpuffer verwendet. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer mittels des Mikroplattenwaschgeräts „Elx405 Select Deep-Well Mikroplatten-Washer“ (BioTek, Deutschland), ein Blockierungsschritt mit StabilCoat (SurModics, USA) pro „well“ bei RT für 2 h oder bei 4°C ü. N. sowie ein weiterer Waschschrift.

Bei dem Probenauftrag wurden 50 μ l Probe bzw. Standard mit 50 μ l Detektions-AK-Lösung, hier 1:5.000 Wo-2-Biotin (TGC, Schweiz), und bei RT für 3 h oder bei 4°C ü. N. inkubiert. Die Probe bestand entweder aus konditionierten Medium von APP-überexprimierenden Zellen, die mit Cu/NP-Komplexen inkubiert worden waren (s. 4.4.5) oder aus Fraktionen von Hirnhomogenaten von APPPS1-Mäusen, die mit Cu/CSNP1 behandelt worden waren (s. 4.5.6). Der Probenauftrag erfolgte in Dreifachbestimmung. Für die A β -Standardreihe wurden die synthetischen Peptide A β 38, A β 40 und A β 42 (je Bachem AG, Schweiz), verdünnt mit ELISA-Probenpuffer, in einem Konzentrationsbereich von 100 – 2.000 pg/ml eingesetzt.

Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Enzymkonjugationsreaktion mit 1:1.000 SA-Mono-HRP (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) für A β 40 und A β _{gesamt} im SA-Mono-HRP-Enzymkonjugationspuffer oder 1:20.000 SA-Poly-HRP (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) für A β 38 und A β 40 in SA-Poly-HRP-Enzymkonjugationspuffer für 30 min bei RT sowie ein weiterer Waschschrift. Die Detektionsreaktion wurde mit 100 μ l „1-StepTM Ultra TMB ELISA-Substrat“ (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) ausgelöst und mit 50 μ l Schwefelsäure [1M] nach 1 – 10 min gestoppt. Die Farbreaktion wurde mittels des Plattenphotometers bei 450 nm gemessen.

- Carbonatpuffer: 24 mM Na₂CO₃, 76 mM NaHCO₃, pH 9,6
- ELISA-Waschpuffer: 8 mM ELISA-PBS, pH 7,4, 0,1% Tween-20

- ELISA-Probenpuffer: 80 mM PBS, pH 7,4, 1,5% BSA, 0,5% Tween-20, 0,01% Thimerosal
- ELISA-PBS 10x: 140 mM NaCl, 80 mM Na₂HPO₄, pH 7,4
- SA-Mono-HRP-Enzymkonjugationspuffer: 80 mM PBS, 0,05% Tween-20, 6% PEG
- SA-Poly-HRP-Enzymkonjugationspuffer: 8 mM PBS, pH 7,4, 5% BSA

4.3.3 SDS-PAGE und Western Blot

Für Western Blot Analysen erfolgte zunächst eine Probenenaufbereitung, indem 20 µl Probe mit Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 min im Heizblock aufgeköcht wurde. Dabei bindet Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat = SDS) als negativ-geladenes Detergenz mit einem konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis an die denaturierten Proteine. Anschließend erfolgte der Auftrag auf das Gel und somit die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde bei 180 V mit 30 mA pro 8% oder 12% Tris-Glycin-Gelen (Laemmli, 1970) in Tris-Glycin-Laufpuffer in „Mini-Protean Tetra Cell“-Apparatur (Bio-Rad, Deutschland) bzw. mit 100 mA pro 15% Tris-Tricin-SDS-Gel (anamed, Deutschland) in Tris-Tricin-Laufpuffer in „Vertikal-Elektrophorese-System“-Apparatur (Invitrogen, Deutschland) durchgeführt. Als Größenstandard wurden für Tris-Glycin-Gele Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad, Deutschland) und für Tris-Tricin-Gele SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard (Invitrogen, Deutschland) verwendet.

Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (porablot NCP, Machery-Nagel, Deutschland) erfolgte im Nassblotverfahren bei 4°C, 200 V und 400 mA für 3 h oder 180 mM ü. N. in einer Tankblotapparatur in Transferpuffer. Die Nitrocellulosemembran war dabei zwischen mehrere Filterpapiere (Whatman 3MM, Whatman, UK) eingelegt. Anschließend konnten die Proteine auf der Membran mittels Immundetektion sichtbar gemacht werden. Dazu wurde zunächst die Membran für 1 h in PBS mit 10% Magermilch blockiert und nach einem dreimaligen Waschen mit PBS für 5 min für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4°C mit dem Erst-AK inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte für mindestens 30 min die Inkubation mit dem Zweit-AK sowie nach einem erneuten Waschschrift die Detektionsreaktion mit ECL-Lösung. Die dadurch ausgelöste Chemilumineszenz-Reaktion wurde im Dunkelraum auf Röntgenfilmen (Konica Minolta Medical Film, A. Hartenstein, Deutschland) in der Entwicklermaschine detektiert.

Folgende AK in nachstehenden Verdünnungen wurden verwendet:

- Anti-Actin (Chemicon) – Maus: 1 : 3.000

- Anti-Green Fluorescent Protein (GFP) (MBL, Japan) – Kaninchen: 1 : 2.000
- Anti-sAPP β (IBL, USA) – Kaninchen: 1 : 500
- Wo2 (AG Multhaup, selbst aufgereinigt) – Maus: 1 : 10.000
- Anit-Mouse (Promega, USA): 1 : 10.000
- Anti-Rabbit (Promega, USA): 1 : 10.000

Für eine erneute Entwicklung der Membran mit einem anderen AK wurde ein „Stipping“-Protokolls angewendet. Dazu wurde die Membran für 1 h bei 55°C im Heizschrank in „Stripping“-Lösung inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS das oben beschriebene Prozedere durchgeführt.

- Probenpuffer (4x): 200 mM Tris/HCl pH 6,8, 4% SDS, 40% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol
- Tris-Glycin-Laufpuffer: 25 mM Tris/ HCl, 192 mM Glycin, 1% SDS, pH 8,3
- Tris-Tricin-Laufpuffer: 100 mM Tris/ HCl, 100 mM Tricin, 0,1% SDS
- Transferpuffer: 25 mM Tris/ HCl, 192 mM Glycin, 10% oder 20% Ethanol
- ECL-Lösung: 1 ml ECL-A (0,25 mg/ml Luminol in 0,1 M Tris/HCl pH 8,6), 100 μ l ECL-B (1,1 mg/ml p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO), 0,3 μ l H₂O₂ (30%)
- “Stripping“-Lösung: 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol
- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Zellkultivierung der Zelllinien HBMEC, HEK293T und SH-SY5Y

In dieser Arbeit wurde mit HBMEC, HEK293T- und SH-SY5Y-Zellen gearbeitet. Sämtliche Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen – 5% CO₂, 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit – im Brutschrank kultiviert und abhängig vom Wachstum 2 – 3 mal pro Woche umgesetzt. Zur Umsetzung wurden die Zellen kurz mit 10 ml PBS gewaschen, nach kurzer Inkubationszeit mit 1,5 ml Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und in einer Verdünnung von 1:3 – 1:10 erneut ausgesät. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer sterilen Werkbank und mit sterilen Arbeitsmaterialien.

Die Endothelzelllinie HBMEC wurde von Prof. Dr. Kwang Sik Kim im Rahmen eines MTA (Materials Release Agreement) zur Verfügung gestellt. Diese Zellen entstanden aus primären Endothelzellen des zerebralen Cortexes von Kindern mit Epilepsie und diese Zellen wurden durch die

Transfektion mit SV40-LT („simian virus 40 large T antigen“) zu einer stabilen Zelllinie geformt (Stins et al., 1997, Stins et al., 2001). Diese Zellen wurden bis Passage 30 verwendet, da sie bis zu ebendieser Passage die typische Merkmale der Bluthirnschranke aufweisen (Stins et al., 2001).

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293T ist mit der Nummer ACC 305 in der DSMZ gelistet.

Bei der Zelllinie SH-SY5Y handelt es sich um eine humane Neuroblastoma Zelllinie, die unter der Nummer ACC 209 in der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) gelistet ist. In der Arbeit wurde auch mit den stabil transfizierten SH-SY5Y-APPwt oder SH-SY5Y-mock gearbeitet, welche das humane APP-Gen überexprimieren oder lediglich den leeren Vektor mit sich führen.

Folgende Nährmedien wurden für die jeweilige Zelllinie verwendet:

- HBMEC-Nährmedium (abgewandelt (Stins et al., 2001): RPMI 1640, 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS), 10% NU-Serum (BD, Deutschland), 1x Non essential amino acids, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-pyruvat, 1x Vitamine, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
- HEK 293T: DMEM high Glucose (4,5 g/l), 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
- SH-SY5Y: DMEM/HAM's F12, 10% (v/v) FCS, 1x Non essential amino acids, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin; Optional 100 mg/ml Zeocin

4.4.2 Kryogene Lagerung der Zelllinien

Die Lagerung der verwendeten Zellen erfolgte im Stickstofftank. Zur Überführung kultivierte Zellen in den tiefgefrorenen Zustand, wurden Zellen einer konfluent bewachsenen 10-cm-Schale nach Trypsinierung (s. 5.4.1) in 10 ml Nährmedium aufgenommen und in der Zellzentrifuge für 5 min bei 500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml Einfriermedium resuspendiert und anschließend auf 2 Kryoröhrchen (Nunc, Deutschland) aufgeteilt. Die Kryoröhrchen wurden in die mit Isopropanol befüllte Einfrierbox (Nalge Nunc, USA) gegeben und bei -80°C schonend eingefroren. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

Zur Rekultivierung der Zellen wurde diese bei Raumtemperatur zügig aufgetaut und in 10 ml Nährmedium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt in der Zellzentrifuge für 5 min bei

500 rpm zum Entfernen von DMSO-Resten wurde das Zellpellet erneut in Nährmedium aufgenommen und in Zellkulturschalen wie in 5.4.1 beschrieben kultiviert.

- Einfriermedium: 70% Nährmedium, 20% FCS, 10% DMSO

4.4.3 Toxizitätsassay

Zur Ermittlung der Toxizität der untersuchten NPs wurden zwei Toxizitätstests durchgeführt. Bei beiden basiert die Detektionsreaktion auf dem Vorhandensein von ATP, welches aus den Mitochondrien proliferierender Zellen stammt. Beim CellTiter-Glo-Assay-Kit (Promega, USA) wird die Umsetzung von Luciferin durch ATP gesteuert und das so gebildete Oxyluciferin luminesziert. Die Menge an Oxyluciferin korreliert mit den sterbenden Zellen und kann somit zur Quantifizierung genutzt werden. Beim MTT-Test wird gelbes MTT (Dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid) zu blauem Formazin durch eine indirekte Signalkaskade umgesetzt, bei der ATP notwendig ist. Die Menge des gebildeten Formazin korreliert mit sterbenden Zellen und kann photometrisch bestimmt werden. Der CellTiter-Glo Assay hat den Vorteil, dass er sensitiver ist, weil hierbei 20-mal weniger Zellen benötigt werden als bei dem MTT-Test.

Der Toxizitätstest wurde im 96-Well-Format mit 100 µl/Well im Dreifachansatz durchgeführt. Die Zellen wurden in den Konzentrationen $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml (HBMEC-Zellen), $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml (HEK-Zellen) und $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml (SH-SY5Y) ausgesät, wie unter 4.4.1 beschrieben kultiviert und am Folgetag zur Ermittlung der Toxizität verwendet. Beim Lumineszenz-Assay wurde eine weiße Platte zur Verstärkung des Lumineszenzsignals verwendet. Am Versuchstag wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS +/- gewaschen, um Mediumsrückstände und möglichst sämtliche Cu-Ionen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Cu/NP-Komplexen in verschiedenen Konzentrationen in Optimem für fünf Stunden im Inkubator inkubiert. Als letzter Schritt erfolgte die Detektionsreaktion beim Lumineszenz-Assay mit Hilfe des CellTiter-Glo-Assay-Kits nach Herstellerangaben und die Vermessung der Lumineszenz im Fluorometer. Beim MTT-Test hingegen wurde nach Ende der Inkubationszeit 10 µl MTT-Lösung pro Well zugegeben, nach mindestens einer Stunde Inkubationszeit der Überstand abgenommen und zu den verbleibenden Zellen 50 µl DMSO hinzugefügt. Die so entstehende farbliche Suspension konnte bei 595 nm im Plattenphotometer vermessen werden.

- MTT-Lösung: 5 mg/ml MTT

4.4.4 Mikroskopische Aufnahmen

Für fluoreszenzmikroskopische Analysen, wie der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten NPs in SH-SY5Y-Zellen, wurden die Zellen in einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml auf Glasplättchen (Menzel Gläser, Deutschland) ausgesät. Nach der NP-Inkubation wurden die SH-SY5Y Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit $1 \mu\text{g/ml}$ DAPI-Methanol (4',6-Diamidin-2-phenylindol) für 30 min bei RT inkubiert und so fixiert. Anschließend wurden die Glasplättchen mittels Fluoromount-G (Southern Biotech, USA) auf Objektträger (R. Langenbrinck, Deutschland) fixiert und am Folgetag konnte die mikroskopische Analyse entweder mit dem Fluoreszenzmikroskop oder mit dem Konfokalmikroskop durchgeführt werden.

4.4.4.1 Immunfluoreszenz-Analysen

Für Immunfluoreszenz-Messungen wurden HBMEC-Zellen in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml auf Glasplättchen ausgesät und für 4 Tage kultiviert (s.4.4.1).

Die Zellen wurden nach einem Waschschrift mit PBS für 20 min auf Eis mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert und erneut zweimal gewaschen. Nun erfolgte die Blockierung mit 5% FCS in PBS für 30 min und anschließend die Zugabe des primären AK 1:100 in 5% FCS in PBS für 60 min. Nach erneutem zweimaligen Waschen wurde der sekundären AK 1:100 in 5% FCS in PBS für 60 min im Dunkeln zugegeben. Danach wurden die Zellen wieder zweimal gewaschen und es erfolgte die DAPI-Färbung (s. 4.4.4) sowie die mikroskopische Analyse (s. 4.4.4).

- Primäre AK
 - Anti-ZO₁ (Cell Signaling, USA)
 - Anti-vWF (Dako, Deutschland)
- Sekundärer AK
 - Anti-Kaninchen mit Cy₃-Markierung (Invitrogen, Deutschland)
 - Anti-Kaninchen mit FITC-Markierung (Invitrogen, Deutschland)

4.4.5 Intrazellulärer Cu-Level

Zur Analyse des intrazellulären Cu-Levels wurden SH-SY5Y-Zellen in einer Konzentration von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 10-cm-Schalen ausgesät und kultiviert (s. 4.4.1). Am Folgetag wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS für 5 h mit Cu/NP-Komplexen in den angegebenen

Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS-EDTA gewaschen und in 300 µl PBS aus den Zellkulturschalen geschabt. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels des Zellzählers wurden ICP-MS-Messungen (s. 4.2.2) durchgeführt.

4.4.6 Transportstudien

Die Analyse der zellulären Aufnahme der NPs erfolgte über die Inhibierung aktiver Transportvorgänge durch Temperaturreduktion.

SH-SY5Y Zellen wurden in einer Konzentration von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 6-cm-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen bei 4 und 37° C in OptiMEM. Dazu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS für 15 min bei der jeweiligen Temperatur prä-inkubiert und anschließend erfolgte für 30 min die Cu/NP-Inkubation in den angegebenen Konzentrationen. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS-EDTA gewaschen und in 500 µl PBS abgeschabt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 200-µl-Aliquots per ICP-MS (s. 4.2.2) vermessen.

Im Kontrollansatz wurden die Zellen mit 10 µg/ml Transferrin inkubiert. Transferrin ist ein Glykoprotein und wird von der Zelle über spezielle Transferrin-Rezeptoren aktiv aufgenommen (Aisen, 2004). Bei der Transferrinkontrolle wurden die Zellen nach der Inkubationszeit zweimal mit PBS, dreimal mit „Stripping Buffer“ und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte mit 500 µl Lysepuffer die Zelllyse durch eine Inkubation für 30 min bei 4°C auf dem Schütteltisch und eine anschließende Zentrifugation der Zellsuspension in der Tischzentrifuge für 10 min bei 4°C und 10.000 rpm. Der entstehende Überstand – das Lysat – wurde unter Berücksichtigung vorhandener Filter mittels Extinktion von 485 nm bei einer Emission von 535 nm im Fluorometer vermessen.

- PBS-EDTA: 0,5 mM EDTA in PBS
- „Stripping Buffer“: 0,5 M NaCl, 0,1 M NaAcetat, pH 5,3
- Lysepuffer: 50 mM Tris/ HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% (v/v) Triton x-100, 0,2% (v/v) NP40, 1x Complete Protease Inhibitor, pH 7,5

4.4.7 Analyse der Cu-Bioverfügbarkeit mittels des MRE-GFP Detektionssystem

Das hier benutzte Messverfahren beruht auf einer indirekten Signalkaskade, bei der letztendlich eine erhöhte Cu-Freisetzung mit einer erhöhten GFP-Expression korreliert (s. 2.7).

Für diesen Versuch wurde mit zwei Plasmiden gearbeitet. Der Vektor pMRE-GFP (Abb. 42) wurde von Oleg Georgiev und Walter Schaffner für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Dieser Vektor wurde erzeugt, indem die eGFP-Sequenz aus dem Vektor peGFP-N2 gegen die Luciferase-Sequenz des Vektors pGL3-Basic Vector (Promega, USA) ausgetauscht und zusätzlich in die MCS eine 4xMRE-Sequenz eingebaut wurde (Abb. 42). Das Protein eGFP ist eine nach rot verschobene Variante des Wildtyp-GFP, mit einer Extinktion bei 488 nm und einer Emission bei 507 nm. Die eingesetzte MRE-Sequenz TGCCTC ist die stärkste unter den bekannten MREs (Culotta and Hamer, 1989, Zhang et al., 2003). Dieser Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R). Der Vektor pCTr wurde von Tobias Bethge bereitgestellt und beinhaltet die CTr-Sequenz sowie eine Amp^R .

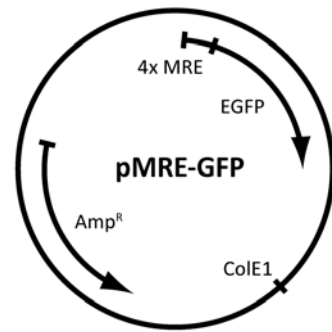


Abb. 42: Schematische Darstellung der pMRE-GFP-Konstrukts. Bei diesem Vektor ist vor der eGFP-Sequenz eine MRE-Sequenz eingebaut und es ist eine Amp^R -Sequenz vorhanden.

Die HEK293T Zellen wurden in einer Zellkonzentration von $6 \cdot 10^5$ Zellen/ml im 6-well-Format ausgesät. Am Folgetag erfolgte die transiente Transfektion mit dem MRE-GFP- und/oder hCTr-Konstrukt. Dazu wurden pro 500- μ l-Ansatz 16 μ g PEI und 4 μ g DNA in OptiMEM vermengt. Nach 20-minütiger Inkubation wurde der Transfektionsansatz für 1 h auf die Zellen gegeben und anschließend mit 2 ml Medium aufgefüllt.

Am zweiten Tag wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS der Cu/NP-Komplex bzw. unbeladener NP in ansteigenden Konzentrationen in OptiMEM zu den Zellen gegeben. Nach fünfstündiger Inkubation im Brutschrank wurde die Zellyse mit 300 μ l GFP-Lysepuffer pro Ansatz wie bereits beschrieben (s. 4.4.6) durchgeführt. Das Lysat wurde bei 485/535 nm im Fluorometer vermessen oder für eine Western Blot Analyse (s. 4.3.3) verwendet.

- GFP-Lysepuffer: 25 mM Tris-Phosphat, pH7,8, 2 mM Dithiothreitol, 10% Glycerol, 1% Triton X-100 (modifiziert (Dandekar et al., 2005))

4.4.8 Analyse der APP-Prozessierung

Die Analyse der APP-Prozessierung erfolgte mittels stabil-transfizierten SH-SY5Y-APP695-Zellen, welche ursprünglich von Carina Treiber hergestellt worden waren. Als Kontrolle dienten SH-SY5Y-Zellen, die stabil den Leervektor pCDNA3_{mock} tragen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml im 12-Well-Formt ausgesät. Nach zwei Waschschrritten mit PBS wurden die

Zellen mit Cu/NP Komplex bzw. unbeladenen NP in ansteigenden Konzentrationen für 5 h oder 24 h inkubiert. Das so konditionierte Medium wurde abgenommen und bei 4°C und 14.000 rpm für 5 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde mit 100 µl Lysepuffer die Zelllyse (s. 4.4.6) durchgeführt. Zur Lagerung wurden die Proben in Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Das konditionierte Medium sowie das Lysat wurden mittels ELISA (s. 4.3.5) und Western Blot (s. 4.3.3) auf die A β -Spezies 38, 40 und 42, die A β_{gesamt} -Menge sowie sAPP α , sAPP β und APP untersucht.

4.4.9 Permeabilitätsanalysen mittels des HBMEC-Mono-Zell-Modells der Bluthirnschranke

Die Permeabilitätsanalysen fanden in einem Transwellssystem (Transwell-Clear, PE Membrane, 12 Well, 3.0 µm, TC-Treated, Corning, USA) statt, bei dem zwei Kammern durch eine HBMEC-Zellbarriere getrennt waren. Die verwendeten HBMEC-Zellen spiegeln aufgrund ihres zellulären Ursprungs die Endothelzellbarriere der Bluthirnschranke wider (s. 4.4.1). Die zu untersuchende Substanz wurde in die obere, luminale Kammer zugeben und nach definiertem Zeitraum wurde die Menge der Substanz in der unteren, abluminalen Kammer, also nach der Passage durch die HBMEC-Barriere, bestimmt (s. 3.10). Das luminale Kompartiment hatte ein Volumen von 0,5 ml, während das abluminale Kompartiment ein Fassungsvermögen von 1,5 ml aufwies. Es handelt es sich um ein Mono-Zell-Model der Bluthirnschranke.

Zunächst erfolgte die Beschichtung der Membraneinsätze des Transwellsystems, indem eine Arbeitslösung aus 0,4 mg/ml Collagen IV (Sigma-Aldrich, Deutschland) und 0,1 mg/ml Fibronectin (Sigma-Aldrich, Deutschland) als dünner Flüssigkeitsfilm auf die einzelnen Filter aufgetragen und für 2 h inkubiert wurden. Bei der Analyse der Auswirkung der Beschichtung auf den TEER-Wert wurden diese Proteine einzeln oder in Kombination eingesetzt (s. 3.10.1.2). Anschließend wurde die HBMEC-Zellen in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml auf Filter ausgesät und kultiviert (s. 4.4.1).

Am Tag 4 erfolgte der eigentliche Permeabilitätsversuch in OptiMEM-Medium. Zunächst wurden mittels der Messelektrode die TEER-Werte der einzelnen Filter ermittelt. Die zu untersuchende Substanz wurde in die obere, luminale Kammer zugegeben und für 20 min inkubiert. Zusätzlich stand der Versuchsansatz im Inkubator auf einem kleinen Tischschüttler, um gleichmäßiges Verteilen der Substanzen zu gewährleisten. Anschließend erfolgte ein Filterwechsel in unbenutzte, abluminale Kammern (12 Well Cell Culture Cluster, Corning, USA). Dieser Vorgang wurde nach 40 und 60 min wiederholt, um den Abtransport im Hirn zu simulieren. Zum Abschluss

erfolgte eine erneute Widerstandmessung zur Kontrolle. Die einzelnen Fraktionen wurden per ICP-MS (s. 4.2.2) hinsichtlich ihres Cu-Levels analysiert. Als Kontrollen wurden nicht-bewachsende Filter, die die gleiche Prozedur durchliefen, mitgeführt. Sämtliche Versuchsschritte wie Pufferwechsel etc. mussten sehr behutsam durchgeführt werden, um Stresssituationen für die Zellen sowie ein Ablösen der Zellen zu vermeiden.

Die verwendeten Testsubstanzen EBA, NaFl und PI wurden in den Konzentrationen 200 µg/ml (in 0,1% BSA), 10 µg/ml und 250 µl/ml in der luminalen Kammer eingesetzt. Die Detektion von EBA erfolgte bei 620 nm (Patterson et al., 1992), während NaFl aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften nach einer Anregung von 490 nm bei 514 nm gemessen wurde. Die Messung von PI erfolgte nach Anregung mit UV-Licht und Quantifizierung der Emission. Zur Quantifizierung der jeweiligen Substanzen wurde stets eine Standardreihe der jeweiligen Substanz eingesetzt.

Radioaktivmarkierte ¹⁴C-Sucrose (Hartmann Analytic, Deutschland) wurde in der Konzentration von 1 µCi/ml eingesetzt. Die Vermessung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen erfolgte in Szintillationsflüssigkeit mittels des Szintillationsgerätes. Aufgrund der Ausstattung des Radioaktivlabors konnte die Inkubation des Versuchsansatzes zwar schüttelnd bei 37°C jedoch nicht unter 5% CO₂-Atmosphäre erfolgen. In der relativ kurzen Versuchsdauer von 60 min sollte die Pufferfunktion des Mediums diesen Umstand kompensieren und somit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den anderen Testsubstanzen gewährleisten.

Die Kalkulation der Permeabilität P_{Se} der eingesetzten Substanzen erfolgte wie bereits beschrieben (Deli et al., 1995). Dabei wurde die „Clearance“ berechnet, was dem Volumen (µl) der Testsubstanz entspricht, die vom luminalen zum abluminalen Kompartiment transportiert wird: $\text{Clearance (}\mu\text{l)} = (c_{\text{abluminal}} \times V_{\text{abluminal}}) / c_{\text{luminal}}$. Die „Clearance“ wird in einer Kurve über die Zeit aufgetragen und die Steigungen (PS) der unbewachsenen oder mit HBMEC kultivierten Membranen wird voneinander subtrahiert: $\text{PS}_{\text{endothelial}}^{-1} = \text{PS}_{\text{unbewachsen}}^{-1} - \text{PS}_{\text{HBMEC}}^{-1}$. Abschließend wird der Wert mit der Filterfläche von 1,12 cm² verrechnet und ergibt den P_{Se}-Wert.

4.5 Tierbiologische Methoden

4.5.1 APPPS1-Mäuse

Die hier verwendeten transgenen APPPS1-Mäuse (Stamname: B6-Tg(Thy1-APP^{swe}; Thy1-PS1 L166P)) stammen aus dem Labor von Matthias Jucker (Radde et al., 2006). Es handelt sich um

transgene Mäuse, die unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Thy1-Promoters APP_{KM670/671NL} sowie PS1_{L166P} tragen (Radde et al., 2006). Von diesen Mutationen ist bekannt, dass sie zu FAD führen (Mullan et al., 1992, Moehlmann et al., 2002). Im Fall der APPPS1-Mäuse führt der Einbau der beiden Transgene zu einer frühzeitig erhöhten A β -Plaque-Bildung und zu einem frühzeitig erhöhten A β ₄₂-Level (Radde et al., 2006).

4.5.2 APPPS1-Zucht

Für die Zucht wurden uns zwei APPPS1-Mäuse von Dr. Stefan Prokop (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Heppner, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Neuropathologie) überlassen. Die Zucht der Tiere erfolgte nach dem üblichen Prozedere. Zur Erhaltung von heterozygoten transgenen Tieren wurden die APPPS1-Mäuse mit Wildtyp-Tieren, C57BL/6 J, gepaart. Nach der Geburt wurden die Tiere nach 21 – 28 Tagen abgesetzt (van Zutphen, 1994), mit Ohrmarkierungen versehen und anhand des daraus gewonnenen Ohrgewebes mittels PCR (s. 4.3.3) nach Gewebeverdau (s. 4.5.3) genotypisiert. Die beiden Transgene werden gemeinsam vererbt, so dass zur Genotypisierung die Überprüfung auf Expression des APP-Gens ausreicht. Es wurden keine Tiere verpaart, die älter als 6 Monate waren.

Die Zucht erfolgte bis zum November 2011 im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Marienfelde, und anschließend im Tierstall Garystraße, FEM Charite-Universitätsmedizin Berlin, unter der Zucht Nummer 713. Diese Mauszucht wurde gemeinsam mit Sabrina Nowag durchgeführt.

4.5.3 Gewebeverdau

Tierisches Gewebe, wie z.B. Ohrgewebe der Ohrlochmarkierungen (s. 4.5.2), musste zur Gewinnung der DNA für die Genotypisierung verdaut werden. Dazu wurde ein Ohrlochgewebe mit 100 μ l MGB-Lysepuffer im Thermomixer für mindestens 9 h bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die Gewebesuspension vorsichtig gemixt und zur Inaktivierung der Proteinase K bei 98°C für 20 min im Thermomixer inkubiert. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt in der Tischzentrifuge bei 2.000 g für 5 min wurde 50 μ l des Überstandes 1:10 mit H₂O verdünnt, wovon 1 μ l davon für die Genotypisierungs-PCR (s. 4.3.3) verwendet werden konnte.

- MGB-Lysepuffer: 1x MGB, 720 μ g Proteinase K (Roche, Schweiz), 0,1% Triton X-100
- 10x MGB: 0,67 M Tris pH 8,8, 166 mM (NH₄)₂SO₄ (Roche, Schweiz), 65 mM MgCl₂

4.5.4 Tierversuch mit Cu/CSNP1-Komplexen

Für die Durchführung des Tierversuchs wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, da bei diesen Tieren keine so starken Schwankungen im Hormonhaushalt wie bei weiblichen Tieren vorhanden sind. Die Zuordnung der Jungtiere, die mindestens fünf Wochen alt waren, in eine der Behandlungsgruppen á fünf Mäuse erfolgte nach Zufallsauswahl. Die Behandlung umfasste eine wöchentliche 100- μ l-Injektion einer Cu/CSNP1-Dosis über einen Zeitraum von vier Wochen (Abb. 43). Die verwendeten Cu/CSNP1-Dosen sollten eine theoretische Steigerung des Cu-Levels im Blut um 0x, 5x, 10x und 15x bewirken (Tab. 4). Vor der Injektion wurde jeweils 10 – 50 μ l Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Körpergewicht bestimmt (Abb. 43). Das Blut wurde mit 3,8% Natriumcitrat-Lösung vermengt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Anschließend wurden die Blutproben bei -20°C eingefroren. Mit der Menge des entnommenen Blutes liegt man weit unter der maximal empfohlenen Menge von entnommen Blut, die bei bis zu 10% der Körpergewichts also ca. 200 μ l liegt. Zur Minimierung systematischer Fehler wurde das Prinzip der wechselnden Startgruppe angewendet. Nach 5 Wochen wurde ein letztes Mal das Gewicht ermittelt sowie Blut entnommen und anschließend das Tier durch zervikale Dislokation getötet (Abb. 43).

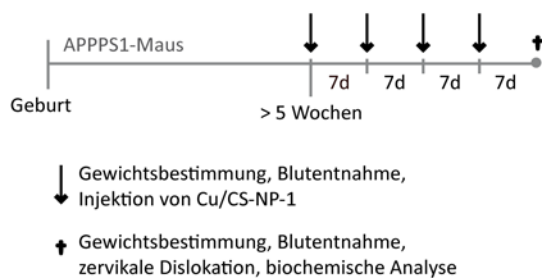


Abb. 43: Behandlungsschritte einer APPPS1-Maus im Cu/CSNP1-Tierversuch. APPPS1-Mäuse – mindestens 5 Wochen alt – wurden wöchentlich über einen Zeitraum von 5 Wochen behandelt. In den ersten vier Wochen erfolgte jeweils die Gewichtsbestimmung, Blutentnahme und Injektion von Cu/CSNP1. Zum Abschluss (5. Woche) wurden die Mäuse nach der Gewichtsbestimmung und Blutentnahme durch zervikale Dislokation getötet. Danach fand die biochemische Auswertung statt.

Der Tierversuch wurde im Tierstall Garystraße (FEM, Charité Universitätsmedizin Berlin) unter der Genehmigung G0057/10 durchgeführt. Es wurden sämtliche Richtlinien eingehalten und das Wohlbefinden des Tieres stets im Auge behalten. Die praktische Durchführung des Tierversuchs inklusive der Blutentnahme und des Spritzens der Testsubstanz erfolgte gemeinsam mit Sabrina Nowag.

Theoretische Erhöhung des Cu-Blutspiegels		Cu-Zugabe		CSNP1 -Zugabe	
Cu-Level	µM	µmol	mg/kg KGW	nmol	mg/kg KGW
5x	70	0,112	0,284	2,03	1,53
10x	140	0,252	0,640	4,20	3,43
15x	210	0,392	0,996	6,53	5,34
0x	0	0	0	0	0

Tab. 4: Eingesetzte Cu- und CSNP1-Konzentrationen im Tierversuch zur Erhöhung der Cu-Level um 5x, 10x und 15x. Der theoretische Anstieg der Cu-Level im Blut der einzelnen Versuchsgruppen nach wöchentlicher Zugabe verschiedener Cu- und CSNP1-Konzentrationen. Folgende Annahmen wurden den Berechnungen zugrunde gelegt: 14 µM Cu-Level im Blut, 2 ml Blutvolumen, 25 g Mausgewicht (Durchschnittswerte).

4.5.5 Abschlussuntersuchung der Versuchstiere

Am Ende des Tierversuchs erfolgte die Abschlussuntersuchung der Tiere. Dazu wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Dann wurde der Kopf abgetrennt und austretendes Blut aufgenommen. Es wurde das Volumen des Blutes bestimmt, dieses mit 3,8% Natriumcitrat-Lösung versetzt und für spätere ICP-MS-Analysen (s. 4.2.2) eingefroren.

Zur Präparation des Gehirns wurde die Kopfhaut aufgeschnitten und die Schädeldecke vorsichtig geöffnet, so dass das Gehirn vorsichtig entnommen werden konnte. Nach der Gewichtsbestimmung wurden die beiden Hemisphären zunächst mit Cerebellum separat in einem mit 2-Methylbutan gefüllten Becher eingefroren, der zur Kühlung in flüssigem Stickstoff taucht, und anschließend bei -80°C gelagert. Anschließend wurde eine Hirnhälfte für ICP-MS-Analysen (s. 4.2.2) und die andere für ELISA-Analysen (s. 4.3.5) verwendet.

Aus dem restlichen Teil des Mauskörpers wurde die Leber präpariert. Dazu wurde die Bauchdecke von Anus her aufgeschnitten und der untere Darm abgeschnitten, so dass die gesamten Innereien frei zugänglich sind. Nun wurde die Leber von der Galleblase und dem Zwerchfell getrennt und nach der Gewichtsbestimmung in 10 ml 4% Formalin ü. N. gelagert. Ein kleiner Teil der Leber wurde nicht in Formalin gelagert sondern gleich bei -20°C für spätere ICP-MS-Analysen (s. 4.2.2) eingefroren.

Um genetisches Material für eine etwaige spätere Genotypisierung zu haben, wurden zusätzlich die Schwanzspitzen der Tiere bei -20°C gelagert.

4.5.6 Aufbereitung der Hemisphären für ELISA und Western Blot

Für die ELISA-Untersuchungen wurden die Hemisphären einer Vier-Schritt-Extraktion unterzogen, die zum Erhalt einer TBS-, Triton X-100-, SDS- und Ameisensäure-lösliche-Fraktion führt, in denen A β -Peptide gelöst sind (Kawarabayashi et al., 2001). Dazu erfolgte zunächst die Homogenisierung der Hirnhälften ohne das Cerebellum mittels 15x Douncen in TBS-Puffer. Anschließend wurde das Homogenat für 1 h bei 4°C und 100.000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der lösliche Überstand wird als TBS-lösliche Fraktion bezeichnet. Die weiteren Extraktionsschritte erfolgten mit 1% Triton X-100-Puffer, 2% SDS-Puffer und 70% Ameisensäure sowie anschließender Ultrazentrifugation wie oben beschrieben und resultierten in die entsprechenden Fraktionen. Die Fraktionen wurden mittels ELISA (s. 4.3.5) untersucht, wobei letztendlich folgende Verdünnungen eingesetzt wurden: 1:10 der TBS-lösliche Fraktion, 1:20 der Triton X-100-löslichen Fraktion, 1:100 der SDS-löslichen Fraktion und nach der Neutralisierung (1:20) mit 1 M Trisphosphat, pH 11, 1:100 der Ameisensäure-löslichen Fraktion.

- TBS-Puffer: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6, 1x Complete (Protease Inhibitor)
- Triton X-100-Puffer: 1% Triton X-100 in TBS-Puffer
- SDS-Puffer: 2% SDS in TBS-Puffer

4.5.7 Leberfixierung, -einbettung und HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) der Leberschnitte

Nach der Präparation der Lebern und Lagerung ü. N. in 4% Formalin wurden die Proben am nächsten Tag in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, so dass die Paraffin-Einbettung erfolgen konnte. Anschließend wurden Leberschnitte gemacht und für eine HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) verwendet.

Bei der HE-Färbung werden aufgrund der Eigenschaften der Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin basophile Strukturen wie DNA im Kern und Ribosomen im ER blau und acidophile Strukturen wie Proteine des Zytoplasmas rot eingefärbt. Nach der HE-Färbung erfolgt die lichtmikroskopische Analyse.

Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. von Smolinski (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gruber, Freie Universität Berlin, Institut für Tierpathologie) durchgeführt.

5 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, N. J., RONNBACK, L. & HANSSON, E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7, 41-53.
- ACEVEDO, K. M., HUNG, Y. H., DALZIEL, A. H., LI, Q. X., LAUGHTON, K., WIKHE, K., REMBACH, A., ROBERTS, B., MASTERS, C. L., BUSH, A. I. & CAMAKARIS, J. 2011. Copper promotes the trafficking of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 286, 8252-62.
- AISEN, P. 2004. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2137-43.
- ALZHEIMER, A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, Jan; , 64:146-8.
- ARMENDARIZ, A. D., GONZALEZ, M., LOGUINOV, A. V. & VULPE, C. D. 2004. Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of Prnp and App. *Physiological Genomics*, 20, 45-54.
- ASO, E. & FERRER, I. 2014. Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. *Front Pharmacol*, 5, 37.
- ASOKAN, A. & CHO, M. J. 2002. Exploitation of intracellular pH gradients in the cellular delivery of macromolecules. *J Pharm Sci*, 91, 903-13.
- ATWOOD, C. S., MOIR, R. D., HUANG, X., SCARPA, R. C., BACCARRA, N. M., ROMANO, D. M., HARTSHORN, M. A., TANZI, R. E. & BUSH, A. I. 1998. Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem*, 273, 12817-26.
- ATWOOD, C. S., SCARPA, R. C., HUANG, X., MOIR, R. D., JONES, W. D., FAIRLIE, D. P., TANZI, R. E. & BUSH, A. I. 2000. Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42. *J Neurochem*, 75, 1219-33.
- BAHHADY, R., KIM, K. J., BOROK, Z., CRANDALL, E. D. & SHEN, W. C. 2007. Enhancement of insulin transport across primary rat alveolar epithelial cell monolayers by endogenous cellular factor(s). *Pharm Res*, 24, 1713-9.
- BALBUENA, P., LI, W. & EHRICH, M. 2011. Assessments of tight junction proteins occludin, claudin 5 and scaffold proteins ZO1 and ZO2 in endothelial cells of the rat blood-brain barrier: cellular responses to neurotoxicants malathion and lead acetate. *Neurotoxicology*, 32, 58-67.
- BALTES, W. 2007. *Lebensmittelchemie*, Springer Berlin Heidelberg.
- BANKS, W. A. 2008. Developing drugs that can cross the blood-brain barrier: applications to Alzheimer's disease. *BMC Neurosci*, 9 Suppl 3, S2.
- BARNHAM, K. J., MCKINSTRY, W. J., MULTHAUP, G., GALATIS, D., MORTON, C. J., CURTAIN, C. C., WILLIAMSON, N. A., WHITE, A. R., HINDS, M. G., NORTON, R. S., BEYREUTHER, K., MASTERS, C. L., PARKER, M. W. & CAPPAL, R. 2003. Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis. *J Biol Chem*, 278, 17401-7.
- BASUN, H., FORSELL, L. G., WETTERBERG, L. & WINBLAD, B. 1991. Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 3, 231-58.
- BAYER, T. A., SCHAFFER, S., SIMONS, A., KEMMLING, A., KAMER, T., TEPEST, R., ECKERT, A., SCHUSSEL, K., EIKENBERG, O., STURCHLER-PIERRAT, C., ABRAMOWSKI, D., STAUFENBIEL, M. & MULTHAUP, G. 2003. Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid Abeta production in APP23 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14187-92.
- BEHER, D., HESSE, L., MASTERS, C. L. & MULTHAUP, G. 1996. Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem*, 271, 1613-20.

- BELL, R. D. & ZLOKOVIC, B. V. 2009. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 118, 103-13.
- BELLINGHAM, S. A., LAHIRI, D. K., MALONEY, B., LA FONTAINE, S., MULTHAUP, G. & CAMAKARIS, J. 2004. Copper depletion down-regulates expression of the Alzheimer's disease amyloid-beta precursor protein gene. *J Biol Chem*, 279, 20378-86.
- BERCHTOLD, N. C. & COTMAN, C. W. 1998. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging*, 19, 173-89.
- BERMEJO-PAREJA, F., BENITO-LEON, J., VEGA, S., MEDRANO, M. J. & ROMAN, G. C. 2008. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *J Neurol Sci*, 264, 63-72.
- BLISS, T. V. & COLLINGRIDGE, G. L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-9.
- BORCHARDT, T., CAMAKARIS, J., CAPPAL, R., MASTERS, C. L., BEYREUTHER, K. & MULTHAUP, G. 1999. Copper inhibits beta-amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid-precursor-protein secretion. *Biochem J*, 344 Pt 2, 461-7.
- BOURASSA, M. W., LESKOVJAN, A. C., TAPPERO, R. V., FARQUHAR, E. R., COLTON, C. A., VAN NOSTRAND, W. E. & MILLER, L. M. 2013. Elevated copper in the amyloid plaques and iron in the cortex are observed in mouse models of Alzheimer's disease that exhibit neurodegeneration. *Biomed Spectrosc Imaging*, 2, 129-139.
- BRADBURY, M. W. 1993. The blood-brain barrier. *Exp Physiol*, 78, 453-72.
- BREEN, K. C., BRUCE, M. & ANDERTON, B. H. 1991. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J Neurosci Res*, 28, 90-100.
- BRIGHTMAN, M. W. 2002. The brain's interstitial clefts and their glial walls. *J Neurocytol*, 31, 595-603.
- BROOKMEYER, R., GRAY, S. & KAWAS, C. 1998. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health*, 88, 1337-42.
- BROOKMEYER, R., JOHNSON, E., ZIEGLER-GRAHAM, K. & ARRIGHI, H. M. 2007. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 3, 186-91.
- BUCHWALD, P. & BODOR, N. 1998. Octanol-water partition: searching for predictive models. *Curr Med Chem*, 5, 353-80.
- BUSH, A. I., MULTHAUP, G., MOIR, R. D., WILLIAMSON, T. G., SMALL, D. H., RUMBLE, B., POLLWEIN, P., BEYREUTHER, K. & MASTERS, C. L. 1993. A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 268, 16109-12.
- CABEZAS, R., AVILA, M., GONZALEZ, J., EL-BACHA, R. S., BAEZ, E., GARCIA-SEGURA, L. M., JURADO CORONEL, J. C., CAPANI, F., CARDONA-GOMEZ, G. P. & BARRETO, G. E. 2014. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci*, 8, 211.
- CASTELLANI, R. J., LEE, H. G., ZHU, X., PERRY, G. & SMITH, M. A. 2008. Alzheimer disease pathology as a host response. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67, 523-31.
- CATER, M. A., MCINNES, K. T., LI, Q. X., VOLITAKIS, I., LA FONTAINE, S., MERCER, J. F. & BUSH, A. I. 2008. Intracellular copper deficiency increases amyloid-beta secretion by diverse mechanisms. *Biochem J*, 412, 141-52.
- CHAWLA, P., CHAWLA, V., MAHESHWARI, R., SARAF, S. A. & SARAF, S. K. 2010. Fullerenes: from carbon to nanomedicine. *Mini Rev Med Chem*, 10, 662-77.
- CHEN, H. T., NEERMAN, M. F., PARRISH, A. R. & SIMANEK, E. E. 2004. Cytotoxicity, hemolysis, and acute in vivo toxicity of dendrimers based on melamine, candidate vehicles for drug delivery. *J Am Chem Soc*, 126, 10044-8.
- CHEN, M. & YANKNER, B. A. 1991. An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci Lett*, 125, 223-6.

- CHEN, W. J., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 265, 3116-23.
- CHERNY, R. A., LEGG, J. T., MCLEAN, C. A., FAIRLIE, D. P., HUANG, X., ATWOOD, C. S., BEYREUTHER, K., TANZI, R. E., MASTERS, C. L. & BUSH, A. I. 1999. Aqueous dissolution of Alzheimer's disease Abeta amyloid deposits by biometal depletion. *J Biol Chem*, 274, 23223-8.
- CHOI, H. S., LIU, W., MISRA, P., TANAKA, E., ZIMMER, J. P., ITTY IPE, B., BAWENDI, M. G. & FRANGIONI, J. V. 2007. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol*, 25, 1165-70.
- CITRON, M., ECKMAN, C. B., DIEHL, T. S., CORCORAN, C., OSTASZEWSKI, B. L., XIA, W., LEVESQUE, G., ST GEORGE HYSLOP, P., YOUNKIN, S. G. & SELKOE, D. J. 1998. Additive effects of PS1 and APP mutations on secretion of the 42-residue amyloid beta-protein. *Neurobiol Dis*, 5, 107-16.
- COHEN-KASHI MALINA, K., COOPER, I. & TEICHBERG, V. I. 2009. Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness. *Brain Res*, 1284, 12-21.
- COSTANTINO, L. 2010. Drug delivery to the CNS and polymeric nanoparticulate carriers. *Future Med Chem*, 2, 1681-701.
- CRAFT, S., BAKER, L. D., MONTINE, T. J., MINOSHIMA, S., WATSON, G. S., CLAXTON, A., ARBUCKLE, M., CALLAGHAN, M., TSAI, E., PLYMATE, S. R., GREEN, P. S., LEVERENZ, J., CROSS, D. & GERTON, B. 2012. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch Neurol*, 69, 29-38.
- CRONE, C. & OLESEN, S. P. 1982. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res*, 241, 49-55.
- CROUCH, P. J., HUNG, L. W., ADLARD, P. A., CORTES, M., LAL, V., FILIZ, G., PEREZ, K. A., NURJONO, M., CARAGOUNIS, A., DU, T., LAUGHTON, K., VOLITAKIS, I., BUSH, A. I., LI, Q. X., MASTERS, C. L., CAPPAL, R., CHERNY, R. A., DONNELLY, P. S., WHITE, A. R. & BARNHAM, K. J. 2009. Increasing Cu bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 381-6.
- CULOTTA, V. C. & HAMER, D. H. 1989. Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. *Mol Cell Biol*, 9, 1376-80.
- DANDEKAR, D. H., KUMAR, M., LADHA, J. S., GANESH, K. N. & MITRA, D. 2005. A quantitative method for normalization of transfection efficiency using enhanced green fluorescent protein. *Anal Biochem*, 342, 341-4.
- DE JONG, W. H. & BORM, P. J. 2008. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*, 3, 133-49.
- DEIBEL, M. A., EHMANN, W. D. & MARKESBERY, W. R. 1996. Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J Neurol Sci*, 143, 137-42.
- DELI, M. A., ABRAHAM, C. S., KATAOKA, Y. & NIWA, M. 2005. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*, 25, 59-127.
- DELI, M. A., ABRAHAM, C. S., NIWA, M. & FALUS, A. 2003. N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine increases the permeability of primary mouse cerebral endothelial cell monolayers. *Inflamm Res*, 52 Suppl 1, S39-40.
- DELI, M. A., DEHOUCK, M. P., CECHELLI, R., ABRAHAM, C. S. & JOO, F. 1995. Histamine induces a selective albumin permeation through the blood-brain barrier in vitro. *Inflamm Res*, 44 Suppl 1, S56-7.
- DESCAMPS, L., COISNE, C., DEHOUCK, B., CECHELLI, R. & TORPIER, G. 2003. Protective effect of glial cells against lipopolysaccharide-mediated blood-brain barrier injury. *Glia*, 42, 46-58.
- DHAMI, N. K., PANDEY, R. S., JAIN, U. K., CHANDRA, R. & MADAN, J. 2014. Non-aggregated protamine-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles of cisplatin crossed blood-brain

- barrier, enhanced drug delivery and improved therapeutic index in glioblastoma cells: in vitro studies. *Journal of Microencapsulation*, 31, 685-93.
- DI VAIRA, M., BAZZICALUPI, C., ORIOLI, P., MESSORI, L., BRUNI, B. & ZATTA, P. 2004. Clioquinol, a drug for Alzheimer's disease specifically interfering with brain metal metabolism: structural characterization of its zinc(II) and copper(II) complexes. *Inorg Chem*, 43, 3795-7.
- DIALLO, M. S., CHRISTIE, S., SWAMINATHAN, P., BALOGH, L., SHI, X., UM, W., PAPELIS, C., GODDARD, W. A., 3RD & JOHNSON, J. H., JR. 2004. Dendritic chelating agents. 1. Cu(II) binding to ethylene diamine core poly(amidoamine) dendrimers in aqueous solutions. *Langmuir*, 20, 2640-51.
- DOERFFEL K., G., R. AND MÜLLER, H. 1994. *Analytikum - Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen*, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie.
- DOHERTY, G. J. & MCMAHON, H. T. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78, 857-902.
- DUYCKAERTS, C., DELATOUR, B. & POTIER, M. C. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, 118, 5-36.
- EARLY, K. T. & NESBITT, D. J. 2013. Size-dependent photoionization in single CdSe/ZnS nanocrystals. *Nano Lett*, 13, 4844-9.
- ENGELHARDT, B. & SOROKIN, L. 2009. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*, 31, 497-511.
- EUGENIN, E. A., BASILIO, D., SAEZ, J. C., ORELLANA, J. A., RAINE, C. S., BUKAUSKAS, F., BENNETT, M. V. & BERMAN, J. W. 2012. The role of gap junction channels during physiologic and pathologic conditions of the human central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7, 499-518.
- FARRALL, A. J. & WARDLAW, J. M. 2009. Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging*, 30, 337-52.
- FEHSE, S., NOWAG, S., QUADIR, M., KIM, K. S., HAAG, R. & MULTHAUP, G. 2014. Copper transport mediated by nanocarrier systems in a blood-brain barrier in vitro model. *Biomacromolecules*, 15, 1910-9.
- FREEDMAN, J. H., CIRIOLO, M. R. & PEISACH, J. 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem*, 264, 5598-605.
- FROHLICH, E. 2012. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 7, 5577-91.
- FURUKAWA, K., SOPHER, B. L., RYDEL, R. E., BEGLEY, J. G., PHAM, D. G., MARTIN, G. M., FOX, M. & MATTSON, M. P. 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem*, 67, 1882-96.
- GALIMBERTI, D. & SCARPINI, E. 2011. Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe? *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, 252-66.
- GAO, C., ZHU, L., ZHU, F., SUN, J. & ZHU, Z. 2014. Effects of different sources of copper on Ctr1, ATP7A, ATP7B, MT and DMT1 protein and gene expression in Caco-2 cells. *J Trace Elem Med Biol*, 28, 344-50.
- GARBERG, P., BALL, M., BORG, N., CECHELLI, R., FENART, L., HURST, R. D., LINDMARK, T., MABONDZO, A., NILSSON, J. E., RAUB, T. J., STANIMIROVIC, D., TERASAKI, T., OBERG, J. O. & OSTERBERG, T. 2005a. In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro*, 19, 299-334.
- GARBERG, P., BALL, M., BORG, N., CECHELLI, R., FENART, L., HURST, R. D., LINDMARK, T., MABONDZO, A., NILSSON, J. E., RAUB, T. J., STANIMIROVIC, D., TERASAKI, T., ÖBERG, J. O. & ÖSTERBERG, T. 2005b. In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicology in Vitro*, 19, 299-334.
- GEORGIEVA, J. V., KALICHARAN, D., COURAUD, P. O., ROMERO, I. A., WEKSLER, B., HOEKSTRA, D. & ZUHORN, I. S. 2011. Surface characteristics of nanoparticles determine their intracellular fate

- in and processing by human blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *Mol Ther*, 19, 318-25.
- GERHARDSSON, L., LUNDH, T., MINTHON, L. & LONDOS, E. 2008. Metal concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 25, 508-15.
- GESUETE, R., STORINI, C., FANTIN, A., STRAVALACI, M., ZANIER, E. R., ORSINI, F., VIETSCH, H., MANNESSE, M. L., ZIERE, B., GOBBI, M. & DE SIMONI, M. G. 2009. Recombinant C1 inhibitor in brain ischemic injury. *Ann Neurol*, 66, 332-42.
- GHOSE, A. K., VISWANADHAN, V. N. & WENDOLOSKI, J. J. 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, 55-68.
- GIESE, H., MERTSCH, K. & BLASIG, I. E. 1995. Effect of MK-801 and U83836E on a porcine brain capillary endothelial cell barrier during hypoxia. *Neurosci Lett*, 191, 169-72.
- GILLIES, E. R., FRÉCHET, J.M. 2005. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov Today*, 10 (1): 35-43.
- GIUFFRIDA, M. L., CARACI, F., PIGNATARO, B., CATALDO, S., DE BONA, P., BRUNO, V., MOLINARO, G., PAPPALARDO, G., MESSINA, A., PALMIGIANO, A., GAROZZO, D., NICOLETTI, F., RIZZARELLI, E. & COPANI, A. 2009. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci*, 29, 10582-7.
- GLENNER, G. G. & WONG, C. W. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 120, 885-90.
- GODA, T., GOTO, Y. & ISHIHARA, K. 2010. Cell-penetrating macromolecules: direct penetration of amphipathic phospholipid polymers across plasma membrane of living cells. *Biomaterials*, 31, 2380-7.
- GOEDERT, M. & SPILLANTINI, M. G. 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science*, 314, 777-81.
- GONCALVES, A., AMBROSIO, A. F. & FERNANDES, R. 2013. Regulation of claudins in blood-tissue barriers under physiological and pathological states. *Tissue Barriers*, 1, e24782.
- GREEN, R. C., SCHNEIDER, L. S., AMATO, D. A., BEELEN, A. P., WILCOCK, G., SWABB, E. A. & ZAVITZ, K. H. 2009. Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, 302, 2557-64.
- GRUENAU, S. P., OSCAR, K. J., FOLKER, M. T. & RAPOPORT, S. I. 1982. Absence of microwave effect on blood-brain barrier permeability to [¹⁴C]sucrose in the conscious rat. *Exp Neurol*, 75, 299-307.
- GUMBLETON, M. & AUDUS, K. L. 2001. Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci*, 90, 1681-98.
- GYURE, K. A., DURHAM, R., STEWART, W. F., SMIALEK, J. E. & TRONCOSO, J. C. 2001. Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch Pathol Lab Med*, 125, 489-92.
- HAASS, C., HUNG, A. Y., SCHLOSSMACHER, M. G., TELOW, D. B. & SELKOE, D. J. 1993. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem*, 268, 3021-4.
- HAASS, C., LEMERE, C. A., CAPELL, A., CITRON, M., SEUBERT, P., SCHENK, D., LANNFELT, L. & SELKOE, D. J. 1995. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*, 1, 1291-6.
- HAASS, C. & SELKOE, D. J. 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*, 75, 1039-42.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T. & RYAN, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontology Electronica*, 4, 9pp.

- HANADA, S., FUJIOKA, K., INOUE, Y., KANAYA, F., MANOME, Y. & YAMAMOTO, K. 2014. Cell-based in vitro blood-brain barrier model can rapidly evaluate nanoparticles' brain permeability in association with particle size and surface modification. *Int J Mol Sci*, 15, 1812-25.
- HARDY, J. & SELKOE, D. J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297, 353-6.
- HARMEIER, A., WOZNY, C., ROST, B. R., MUNTER, L. M., HUA, H., GEORGIEV, O., BEYERMANN, M., HILDEBRAND, P. W., WEISE, C., SCHAFFNER, W., SCHMITZ, D. & MULTHAUP, G. 2009. Role of amyloid-beta glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity. *J Neurosci*, 29, 7582-90.
- HARRIS, E. D. 2003. Basic and clinical aspects of copper. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 40, 547-86.
- HARRIS, L., BATIST, G., BELT, R., ROVIRA, D., NAVARI, R., AZARNIA, N., WELLES, L. & WINER, E. 2002. Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 94, 25-36.
- HARRISON, B. S. & ATALA, A. 2007. Carbon nanotube applications for tissue engineering. *Biomaterials*, 28, 344-53.
- HARRISON, W. W., NETSKY, M. G. & BROWN, M. D. 1968. Trace elements in human brain: copper, zinc, iron, and magnesium. *Clin Chim Acta*, 21, 55-60.
- HATHERELL, K., COURAUD, P. O., ROMERO, I. A., WEKSLER, B. & PILKINGTON, G. J. 2011. Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J Neurosci Methods*, 199, 223-9.
- HE, X., LI, J., AN, S. & JIANG, C. 2013. pH-sensitive drug-delivery systems for tumor targeting. *Ther Deliv*, 4, 1499-510.
- HENLEY, D. B., SUNDELL, K. L., SETHURAMAN, G., DOWSETT, S. A. & MAY, P. C. 2014. Safety profile of semagacestat, a gamma-secretase inhibitor: IDENTITY trial findings. *Curr Med Res Opin*, 1-12.
- HESSE, L., BEHER, D., MASTERS, C. L. & MULTHAUP, G. 1994. The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett*, 349, 109-16.
- HOLTZMAN, D. M. 2011. CSF biomarkers for Alzheimer's disease: current utility and potential future use. *Neurobiol Aging*, 32 Suppl 1, S4-9.
- HOLTZMAN, D. M., MORRIS, J. C. & GOATE, A. M. 2011. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med*, 3, 77sr1.
- HOLZINGER, M., LE GOFF, A. & COSNIER, S. 2014. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Front Chem*, 2, 63.
- HOZUMI, I., HASEGAWA, T., HONDA, A., OZAWA, K., HAYASHI, Y., HASHIMOTO, K., YAMADA, M., KOUMURA, A., SAKURAI, T., KIMURA, A., TANAKA, Y., SATOH, M. & INUZUKA, T. 2011. Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*, 303, 95-9.
- HUANG, X., ATWOOD, C. S., HARTSHORN, M. A., MULTHAUP, G., GOLDSTEIN, L. E., SCARPA, R. C., CUAJUNGCO, M. P., GRAY, D. N., LIM, J., MOIR, R. D., TANZI, R. E. & BUSH, A. I. 1999. The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*, 38, 7609-16.
- HUANG, X., ATWOOD, C. S., MOIR, R. D., HARTSHORN, M. A., TANZI, R. E. & BUSH, A. I. 2004. Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's A beta peptides. *J Biol Inorg Chem*, 9, 954-60.
- HUNG, Y. H., ROBB, E. L., VOLITAKIS, I., HO, M., EVIN, G., LI, Q. X., CULVENOR, J. G., MASTERS, C. L., CHERNY, R. A. & BUSH, A. I. 2009. Paradoxical condensation of copper with elevated beta-amyloid in lipid rafts under cellular copper deficiency conditions: implications for Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 284, 21899-907.
- HUNG, Y. P., ALBECK, J. G., TANTAMA, M. & YELLEN, G. 2011. Imaging cytosolic NADH-NAD(+) redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metab*, 14, 545-54.

- IRVING, H., WILLIAMS, R.J.P 1948. Order of stability of metal complexes. *Nature*, 162.
- JAFFE, E. A. 1977. Endothelial cells and the biology of factor VIII. *N Engl J Med*, 296, 377-83.
- JEVSEVAR, S., KUNSTELJ, M. & POREKAR, V. G. 2010. PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnol J*, 5, 113-28.
- JIANG, D., ZHANG, L., GRANT, G. P., DUDZIK, C. G., CHEN, S., PATEL, S., HAO, Y., MILLHAUSER, G. L. & ZHOU, F. 2013. The elevated copper binding strength of amyloid-beta aggregates allows the sequestration of copper from albumin: a pathway to accumulation of copper in senile plaques. *Biochemistry*, 52, 547-56.
- JINDAL, H., BHATT, B., SK, S. & MALIK, J. S. 2014. Alzheimer disease immunotherapeutics: Then and now. *Hum Vaccin Immunother*, 10.
- KADEN, D., VOIGT, P., MUNTER, L. M., BOBOWSKI, K. D., SCHAEFER, M. & MULTHAUP, G. 2009. Subcellular localization and dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2. *Journal of Cell Science*, 122, 368-77.
- KALUDERCIC, N., DESHWAL, S. & DI LISA, F. 2014. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol*, 5, 285.
- KANG, J., LEMAIRE, H. G., UNTERBECK, A., SALBAUM, J. M., MASTERS, C. L., GRZESCHIK, K. H., MULTHAUP, G., BEYREUTHER, K. & MULLER-HILL, B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325, 733-6.
- KATO, H., YOSHIMOTO, K., KOBAYASHI, M., SAKABE, M., FUNAKI, H. & Ikegaya, H. 2010. Oral administration of ethanol with aspirin increases the concentration of salicylic acid in plasma and organs, especially the brain, in mice. *Eur J Pharmacol*, 635, 184-7.
- KAWARABAYASHI, T., YOUNKIN, L. H., SAIDO, T. C., SHOJI, M., ASHE, K. H. & YOUNKIN, S. G. 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 21, 372-81.
- KESSLER, H., BAYER, T. A., BACH, D., SCHNEIDER-AXMANN, T., SUPPRIAN, T., HERRMANN, W., HABER, M., MULTHAUP, G., FALKAI, P. & PAJONK, F. G. 2008a. Intake of copper has no effect on cognition in patients with mild Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial. *J Neural Transm*, 115, 1181-7.
- KESSLER, H., PAJONK, F. G., BACH, D., SCHNEIDER-AXMANN, T., FALKAI, P., HERRMANN, W., MULTHAUP, G., WILTFANG, J., SCHAFER, S., WIRTHS, O. & BAYER, T. A. 2008b. Effect of copper intake on CSF parameters in patients with mild Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial. *J Neural Transm*, 115, 1651-9.
- KEVIL, C. G., OKAYAMA, N., TROCHA, S. D., KALOGERIS, T. J., COE, L. L., SPECIAN, R. D., DAVIS, C. P. & ALEXANDER, J. S. 1998. Expression of zonula occludens and adherens junctional proteins in human venous and arterial endothelial cells: role of occludin in endothelial solute barriers. *Microcirculation*, 5, 197-210.
- KOBAYASHI, H., INOUE, H., SHIMADA, J., YANO, T., MAEDA, T., OYAMA, T. & SHINOHARA, S. 1987. Intra-arterial injection of adriamycin/mitomycin C lipiodol suspension in liver metastases. *Acta Radiol*, 28, 275-80.
- KONG, G. K., MILES, L. A., CRESPI, G. A., MORTON, C. J., NG, H. L., BARNHAM, K. J., MCKINSTRY, W. J., CAPPAL, R. & PARKER, M. W. 2008. Copper binding to the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *Eur Biophys J*, 37, 269-79.
- KOO, E. H. & SQUAZZO, S. L. 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*, 269, 17386-9.
- KOZLOVSKAYA, L. & STEPENSKY, D. 2013. Quantitative analysis of the brain-targeted delivery of drugs and model compounds using nano-delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 171, 17-23.
- KREIBIG, U., VOLLMER, M. 1995. *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer, Berlin.
- KREUTER, J. 2007. Nanoparticles—a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331, Pages 1–10.

- KROL, S. 2012. Challenges in drug delivery to the brain: nature is against us. *J Control Release*, 164, 145-55.
- KUO, Y. C. & LU, C. H. 2011. Effect of human astrocytes on the characteristics of human brain-microvascular endothelial cells in the blood-brain barrier. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 86, 225-31.
- LA FONTAINE, S., THEOPHILOS, M. B., FIRTH, S. D., GOULD, R., PARTON, R. G. & MERCER, J. F. 2001. Effect of the toxic milk mutation (tx) on the function and intracellular localization of Wnd, the murine homologue of the Wilson copper ATPase. *Hum Mol Genet*, 10, 361-70.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAU, S. J. & SARKAR, B. 1971. Ternary coordination complex between human serum albumin, copper (II), and L-histidine. *J Biol Chem*, 246, 5938-43.
- LEITNER, D. F. & CONNOR, J. R. 2012. Functional roles of transferrin in the brain. *Biochim Biophys Acta*, 1820, 393-402.
- LEVIN, V. A. 1980. Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J Med Chem*, 23, 682-4.
- LIPINSKI, C. A. 2000. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 44, 235-49.
- LOCKMAN, P. R., MUMPER, R. J., KHAN, M. A. & ALLEN, D. D. 2002. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm*, 28, 1-13.
- LU, W., WAN, J., SHE, Z. & JIANG, X. 2007. Brain delivery property and accelerated blood clearance of cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle. *Journal of Controlled Release*, 118, 38-53.
- LUNDQUIST, S., RENFTEL, M., BRILLAULT, J., FENART, L., CECHELLI, R. & DEHOUCK, M. P. 2002. Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo: a comparison between two in vitro cell models. *Pharm Res*, 19, 976-81.
- LYNCH, G., KESSLER, M., ARAI, A. & LARSON, J. 1990. The nature and causes of hippocampal long-term potentiation. *Prog Brain Res*, 83, 233-50.
- M. HARUTA, S. TSUBOTA, T. KOBAYASHI, H. KAGEYAMA, M.J. GENET & DELMON, B. 1993. Low-Temperature Oxidation of CO over Gold Supported on TiO₂, α -Fe₂O₃, and Co₃O₄. *Journal of Catalysis*, 144, Pages 175-192.
- MAEDA, Y. & KINOSHITA, T. 2010. The acidic environment of the Golgi is critical for glycosylation and transport. *Methods Enzymol*, 480, 495-510.
- MAEDA, Y., MATSUMOTO, K., MIZUMATSU, S., TAMIYA, T., FURUTA, T. & OHMOTO, T. 1999. Effect of intracarotid infusion of etoposide: modification of the permeability of the blood-brain barrier and the blood-tumor barrier in rat brain tumor model. *Acta Med Okayama*, 53, 5-11.
- MALIK, D. K., BABOOTA, S., AHUJA, A., HASAN, S. & ALI, J. 2007. Recent advances in protein and peptide drug delivery systems. *Curr Drug Deliv*, 4, 141-51.
- MALIK, N., WIWATTANAPATAPEE, R., KLOPSCH, R., LORENZ, K., FREY, H., WEENER, J. W., MEIJER, E. W., PAULUS, W. & DUNCAN, R. 2000. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J Control Release*, 65, 133-48.
- MASTERS, C. L., SIMMS, G., WEINMAN, N. A., MULTHAUP, G., MCDONALD, B. L. & BEYREUTHER, K. 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 4245-9.
- MATTSON, M. P., PEDERSEN, W. A., DUAN, W., CULMSEE, C. & CAMANDOLA, S. 1999. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 893, 154-75.

- MAYNARD, C. J., CAPPAL, R., VOLITAKIS, I., CHERNY, R. A., WHITE, A. R., BEYREUTHER, K., MASTERS, C. L., BUSH, A. I. & LI, Q. X. 2002. Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J Biol Chem*, 277, 44670-6.
- MCKHANN, G., DRACHMAN, D., FOLSTEIN, M., KATZMAN, R., PRICE, D. & STADLAN, E. M. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34, 939-44.
- MCKHANN, G. M., KNOPMAN, D. S., CHERTKOW, H., HYMAN, B. T., JACK, C. R., JR., KAWAS, C. H., KLUNK, W. E., KOROSHETZ, W. J., MANLY, J. J., MAYEUX, R., MOHS, R. C., MORRIS, J. C., ROSSOR, M. N., SCHELTENS, P., CARRILLO, M. C., THIES, B., WEINTRAUB, S. & PHELPS, C. H. 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7, 263-9.
- MCLEAN, C. A., CHERNY, R. A., FRASER, F. W., FULLER, S. J., SMITH, M. J., BEYREUTHER, K., BUSH, A. I. & MASTERS, C. L. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 46, 860-6.
- MIKICIUK-OLASIK, E., SZYMANSKI, P. & ZUREK, E. 2007. Diagnostics and therapy of Alzheimer's disease. *Indian J Exp Biol*, 45, 315-25.
- MIKULCA, J. A., NGUYEN, V., GAJDOSIK, D. A., TEKLU, S. G., GIUNTA, E. A., LESSA, E. A., TRAN, C. H., TERAK, E. C. & RAFFA, R. B. 2014. Potential novel targets for Alzheimer pharmacotherapy: II. Update on secretase inhibitors and related approaches. *J Clin Pharm Ther*, 39, 25-37.
- MITANI, Y., YARIMIZU, J., SAITA, K., UCHINO, H., AKASHIBA, H., SHITAKA, Y., NI, K. & MATSUOKA, N. 2012. Differential effects between gamma-secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice. *J Neurosci*, 32, 2037-50.
- MOEHLMANN, T., WINKLER, E., XIA, X., EDBAUER, D., MURRELL, J., CAPELL, A., KAETHER, C., ZHENG, H., GHETTI, B., HAASS, C. & STEINER, H. 2002. Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8025-30.
- MORMINO, E. C., KLUTH, J. T., MADISON, C. M., RABINOVICI, G. D., BAKER, S. L., MILLER, B. L., KOEPPE, R. A., MATHIS, C. A., WEINER, M. W. & JAGUST, W. J. 2009. Episodic memory loss is related to hippocampal-mediated beta-amyloid deposition in elderly subjects. *Brain*, 132, 1310-23.
- MRAK, R. E. & GRIFFIN, W. S. 2007. Common inflammatory mechanisms in Lewy body disease and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66, 683-6.
- MULLAN, M., CRAWFORD, F., AXELMAN, K., HOULDEN, H., LILIUS, L., WINBLAD, B. & LANNFELT, L. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*, 1, 345-7.
- MULTHAUP, G., BUSH, A. I., POLLWEIN, P. & MASTERS, C. L. 1994. Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP). *FEBS Lett*, 355, 151-4.
- MULTHAUP, G., SCHLICKSUPP, A., HESSE, L., BEHER, D., RUPPERT, T., MASTERS, C. L. & BEYREUTHER, K. 1996. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science*, 271, 1406-9.
- MURUGANANDAM, A., TANHA, J., NARANG, S. & STANIMIROVIC, D. 2002. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J*, 16, 240-2.
- NADAL, R. C., RIGBY, S. E. & VILES, J. H. 2008. Amyloid beta-Cu²⁺ complexes in both monomeric and fibrillar forms do not generate H₂O₂ catalytically but quench hydroxyl radicals. *Biochemistry*, 47, 11653-64.

- NAKAGAWA, S., DELI, M. A., KAWAGUCHI, H., SHIMIZUDANI, T., SHIMONO, T., KITTEL, A., TANAKA, K. & NIWA, M. 2009. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*, 54, 253-63.
- NAKAMURA, M., SHISHIDO, N., NUNOMURA, A., SMITH, M. A., PERRY, G., HAYASHI, Y., NAKAYAMA, K. & HAYASHI, T. 2007. Three histidine residues of amyloid-beta peptide control the redox activity of copper and iron. *Biochemistry*, 46, 12737-43.
- NASLUND, J., HAROUTUNIAN, V., MOHS, R., DAVIS, K. L., DAVIES, P., GREENGARD, P. & BUXBAUM, J. D. 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*, 283, 1571-7.
- NODA, Y., ASADA, M., KUBOTA, M., MAESAKO, M., WATANABE, K., UEMURA, M., KIHARA, T., SHIMOHAMA, S., TAKAHASHI, R., KINOSHITA, A. & UEMURA, K. 2013. Copper enhances APP dimerization and promotes Abeta production. *Neurosci Lett*, 547, 10-5.
- NORRIS, D. J. & BAWENDI, M. G. 1996. Measurement and assignment of the size-dependent optical spectrum in CdSe quantum dots. *Phys Rev B Condens Matter*, 53, 16338-16346.
- NOWAG, S. & HAAG, R. 2014. pH-responsive micro- and nanocarrier systems. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53, 49-51.
- OBERDORSTER, G., STONE, V., DONALDSON, K. 2007. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1, 2-25.
- ORENA, S. J., GOODE, C. A. & LINDER, M. C. 1986. Binding and uptake of copper from ceruloplasmin. *Biochem Biophys Res Commun*, 139, 822-9.
- PALMER, A. M. & ALAVIJEH, M. S. 2013. Overview of experimental models of the blood-brain barrier in CNS drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol*, 62, Unit 7 15.
- PANZA, F., SOLFRIZZI, V., IMBIMBO, B. P., TORTELLI, R., SANTAMATO, A. & LOGROSCINO, G. 2014. Amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease in the time of prevention trials: the way forward. *Expert Rev Clin Immunol*, 10, 405-19.
- PARDRIDGE, W. M. 1999. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol*, 5, 556-69.
- PARDRIDGE, W. M. 2007. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*, 12, 54-61.
- PARDRIDGE, W. M., EISENBERG, J. & CEFALU, W. T. 1985. Absence of albumin receptor on brain capillaries in vivo or in vitro. *Am J Physiol*, 249, E264-7.
- PARIHAR, M. S. & HEMNANI, T. 2004. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci*, 11, 456-67.
- PARKAR, N. S., AKPA, B. S., NITSCHKE, L. C., WEDGEWOOD, L. E., PLACE, A. T., SVERDLOV, M. S., CHAGA, O. & MINSHALL, R. D. 2009. Vesicle formation and endocytosis: function, machinery, mechanisms, and modeling. *Antioxid Redox Signal*, 11, 1301-12.
- PATTERSON, C. E., RHOADES, R. A. & GARCIA, J. G. 1992. Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *J Appl Physiol*, 72, 865-73.
- PHINNEY, A. L., DRISALDI, B., SCHMIDT, S. D., LUGOWSKI, S., CORONADO, V., LIANG, Y., HORNE, P., YANG, J., SEKOULIDIS, J., COOMARASWAMY, J., CHISHTI, M. A., COX, D. W., MATHEWS, P. M., NIXON, R. A., CARLSON, G. A., ST GEORGE-HYSLOP, P. & WESTAWAY, D. 2003. In vivo reduction of amyloid-beta by a mutant copper transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14193-8.
- PIACERI, I., NACMIAS, B. & SORBI, S. 2013. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)*, 5, 167-77.
- PLATEEL, M., TEISSIER, E. & CECHELLI, R. 1997. Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem*, 68, 874-7.
- POSTINA, R., SCHROEDER, A., DEWACHTER, I., BOHL, J., SCHMITT, U., KOJRO, E., PRINZEN, C., ENDRES, K., HIEMKE, C., BLESSING, M., FLAMEZ, P., DEQUENNE, A., GODAUX, E., VAN LEUVEN, F. & FAHRENHOLZ, F. 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*, 113, 1456-64.

- PRESTON, E. 1982. Failure of hyperthermia to open rat blood-brain barrier: reduced permeation of sucrose. *Acta Neuropathol*, 57, 255-62.
- PUNNOOSE, A., DODGE, K., RASMUSSEN, J. W., CHESS, J., WINGETT, D. & ANDERS, C. 2014. Cytotoxicity of ZnO Nanoparticles Can Be Tailored by Modifying Their Surface Structure: A Green Chemistry Approach for Safer Nanomaterials. *ACS Sustain Chem Eng*, 2, 1666-1673.
- PUZZO, D. & ARANCIO, O. 2013. Amyloid-beta peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimers Dis*, 33 Suppl 1, S111-20.
- QUADIR, M. A. 2010. *Dendritic polymers as nanoscale delivery systems for metal ion and drugs*, Berlin, Freie Univ., Diss., 2010.
- RADDE, R., BOLMONT, T., KAESER, S. A., COOMARASWAMY, J., LINDAU, D., STOLTZE, L., CALHOUN, M. E., JAGGI, F., WOLBURG, H., GENGLER, S., HAASS, C., GHETTI, B., CZECH, C., HOLSCHER, C., MATHEWS, P. M. & JUCKER, M. 2006. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep*, 7, 940-6.
- RAE, T. D., SCHMIDT, P. J., PUFAHL, R. A., CULOTTA, V. C. & O'HALLORAN, T. V. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284, 805-8.
- RALLE, M., HUSTER, D., VOGT, S., SCHIRRMEISTER, W., BURKHEAD, J. L., CAPPS, T. R., GRAY, L., LAI, B., MARYON, E. & LUTSENKO, S. 2010. Wilson disease at a single cell level: intracellular copper trafficking activates compartment-specific responses in hepatocytes. *J Biol Chem*, 285, 30875-83.
- REDDY, L. H., SHARMA, R. K., CHUTTANI, K., MISHRA, A. K. & MURTHY, R. R. 2004. Etoposide-incorporated tripalmitin nanoparticles with different surface charge: formulation, characterization, radiolabeling, and biodistribution studies. *The AAPS journal*, 6, e23.
- REISS, G., HÜTTEN, A. 2010. "Magnetic Nanoparticles". in *Sattler, Klaus D. Handbook of Nanophysics: Nanoparticles and Quantum Dots*. CRC Press. p. 2–1.
- REITZ, C. & MAYEUX, R. 2014. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*, 88, 640-51.
- ROCKWOOD, K., STRANG, D., MACKNIGHT, C., DOWNER, R. & MORRIS, J. C. 2000. Interrater reliability of the Clinical Dementia Rating in a multicenter trial. *J Am Geriatr Soc*, 48, 558-9.
- ROSSJOHN, J., CAPPAL, R., FEIL, S. C., HENRY, A., MCKINSTRY, W. J., GALATIS, D., HESSE, L., MULTHAUP, G., BEYREUTHER, K., MASTERS, C. L. & PARKER, M. W. 1999. Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol*, 6, 327-31.
- RUBINO, J. T. & FRANZ, K. J. 2012. Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *J Inorg Biochem*, 107, 129-43.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E., AND MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SARIN, H. 2010. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J Angiogenes Res*, 2, 14.
- SARKAR, A., GHOSH, M. & SIL, P. C. 2014. Nanotoxicity: oxidative stress mediated toxicity of metal and metal oxide nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 14, 730-43.
- SCHÄFER, A. 2009. *Über neue Synthesewege für ultrakleine, fluoreszente „Gold-Nanopartikel“ und deren Einbau in Materialien* Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- SCHAFER, S., PAJONK, F. G., MULTHAUP, G. & BAYER, T. A. 2007. Copper and clioquinol treatment in young APP transgenic and wild-type mice: effects on life expectancy, body weight, and metal-ion levels. *J Mol Med (Berl)*, 85, 405-13.
- SCHEUERMANN, S., HAMBSCH, B., HESSE, L., STUMM, J., SCHMIDT, C., BEHER, D., BAYER, T. A., BEYREUTHER, K. & MULTHAUP, G. 2001. Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 276, 33923-9.

- SCHMID, C. 1994. *Clusters and Colloids - From Theory to Applications*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- SCHMITZ, C., RUTTEN, B. P., PIELEN, A., SCHAFER, S., WIRTHS, O., TREMP, G., CZECH, C., BLANCHARD, V., MULTHAUP, G., REZAIE, P., KORR, H., STEINBUSCH, H. W., PRADIER, L. & BAYER, T. A. 2004. Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 164, 1495-502.
- SCHNEIDER, L. S., MANGIALASCHE, F., ANDREASEN, N., FELDMAN, H., GIACOBINI, E., JONES, R., MANTUA, V., MECOCCI, P., PANI, L., WINBLAD, B. & KIVIPELTO, M. 2014. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med*, 275, 251-83.
- SELKOE, D. J., PODLISNY, M. B., JOACHIM, C. L., VICKERS, E. A., LEE, G., FRITZ, L. C. & OLTERSODORF, T. 1988. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7341-5.
- SHAH, M., BADWAIK, V. D. & DAKSHINAMURTHY, R. 2014. Biological applications of gold nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 14, 344-62.
- SHANKAR, G. M., BLOODGOOD, B. L., TOWNSEND, M., WALSH, D. M., SELKOE, D. J. & SABATINI, B. L. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci*, 27, 2866-75.
- SHEN, W. C. & RYSER, H. J. 1981. cis-Aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers: a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate. *Biochem Biophys Res Commun*, 102, 1048-54.
- SHINAGAWA, S. & SHIGETA, M. 2014. [Acetylcholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease]. *Brain Nerve*, 66, 507-16.
- SIDDHARTHAN, V., KIM, Y. V., LIU, S. & KIM, K. S. 2007. Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res*, 1147, 39-50.
- SIMMONS, L. K., MAY, P. C., TOMASELLI, K. J., RYDEL, R. E., FUSON, K. S., BRIGHAM, E. F., WRIGHT, S., LIEBERBURG, I., BECKER, G. W., BREMS, D. N. & ET AL. 1994. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Molecular Pharmacology*, 45, 373-9.
- SINHA, S. & LIEBERBURG, I. 1999. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11049-53.
- SMALL, D. H., NURCOMBE, V., REED, G., CLARRIS, H., MOIR, R., BEYREUTHER, K. & MASTERS, C. L. 1994. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci*, 14, 2117-27.
- SMITH, Q. R. & RAPOPORT, S. I. 1986. Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium, and chloride. *J Neurochem*, 46, 1732-42.
- SNOWDON, D. A. 1997. Aging and Alzheimer's disease: lessons from the Nun Study. *Gerontologist*, 37, 150-6.
- SOBA, P., EGGERT, S., WAGNER, K., ZENTGRAF, H., SIEHL, K., KREGER, S., LOWER, A., LANGER, A., MERDES, G., PARO, R., MASTERS, C. L., MULLER, U., KINS, S. & BEYREUTHER, K. 2005. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J*, 24, 3624-34.
- SPOERRI, L., VELLA, L. J., PHAM, C. L., BARNHAM, K. J. & CAPPAL, R. 2012. The amyloid precursor protein copper binding domain histidine residues 149 and 151 mediate APP stability and metabolism. *J Biol Chem*, 287, 26840-53.
- ST GEORGE-HYSLOP, P. H. 2000. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 47, 183-99.

- STINS, M. F., BADGER, J. & SIK KIM, K. 2001. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog*, 30, 19-28.
- STINS, M. F., GILLES, F. & KIM, K. S. 1997. Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol*, 76, 81-90.
- SUAZO, M., HODAR, C., MORGAN, C., CERPA, W., CAMBIAZO, V., INESTROSA, N. C. & GONZALEZ, M. 2009. Overexpression of amyloid precursor protein increases copper content in HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 382, 740-4.
- TAKAGISHI, T., OKUDA, S., KUROKI, N. 1985. Binding of Metal Ions by Polyethylenimine and Its Derivatives. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 23.
- TILLING, T., KORTE, D., HOHEISEL, D. & GALLA, H. J. 1998. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem*, 71, 1151-7.
- TOSI, G., BORTOT, B., RUOZI, B., DOLCETTA, D., VANDELLI, M. A., FORNI, F. & SEVERINI, G. M. 2013. Potential use of polymeric nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier. *Curr Med Chem*, 20, 2212-25.
- TREIBER, C., QUADIR, M. A., VOIGT, P., RADOWSKI, M., XU, S., MUNTER, L. M., BAYER, T. A., SCHAEFER, M., HAAG, R. & MULTHAUP, G. 2009. Cellular copper import by nanocarrier systems, intracellular availability, and effects on amyloid beta peptide secretion. *Biochemistry*, 48, 4273-84.
- TREIBER, C., SIMONS, A., STRAUSS, M., HAFNER, M., CAPPAL, R., BAYER, T. A. & MULTHAUP, G. 2004. Clioquinol mediates copper uptake and counteracts copper efflux activities of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 279, 51958-64.
- UJIE, M., DICKSTEIN, D. L., CARLOW, D. A. & JEFFERIES, W. A. 2003. Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model. *Microcirculation*, 10, 463-70.
- ULBRICH, K. & SUBR, V. 2004. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Adv Drug Deliv Rev*, 56, 1023-50.
- UPADHYAY, R. K. 2014. Drug Delivery Systems, CNS Protection, and the Blood Brain Barrier. *Biomed Res Int*, 2014, 869269.
- VAN ZUTPHEN, L. F. M. 1994. *Grundlagen der Versuchstierkunde*, Gustav Fischer Verlag.
- VASSAR, R., BENNETT, B. D., BABU-KHAN, S., KAHN, S., MENDIAZ, E. A., DENIS, P., TELOW, D. B., ROSS, S., AMARANTE, P., LOELOFF, R., LUO, Y., FISHER, S., FULLER, J., EDENSON, S., LILE, J., JAROSINSKI, M. A., BIERE, A. L., CURRAN, E., BURGESS, T., LOUIS, J. C., COLLINS, F., TREANOR, J., ROGERS, G. & CITRON, M. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286, 735-41.
- VERMA, A., UZUN, O., HU, Y., HAN, H. S., WATSON, N., CHEN, S., IRVINE, D. J. & STELLACCI, F. 2008. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater*, 7, 588-95.
- WALSH, D. M., KLYUBIN, I., FADEEVA, J. V., CULLEN, W. K., ANWYL, R., WOLFE, M. S., ROWAN, M. J. & SELKOE, D. J. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416, 535-9.
- WALSH, D. M. & SELKOE, D. J. 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem*, 101, 1172-84.
- WANG, J., DICKSON, D. W., TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, V. M. 1999. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol*, 158, 328-37.
- WANG, R., SWEENEY, D., GANDY, S. E. & SISODIA, S. S. 1996. The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem*, 271, 31894-902.
- WARAGAI, M., YOSHIDA, M., MIZOI, M., SAIKI, R., KASHIWAGI, K., TAKAGI, K., ARAI, H., TASHIRO, J., HASHIMOTO, M., IWAI, N., UEMURA, K. & IGARASHI, K. 2012. Increased protein-conjugated

- acrolein and amyloid-beta40/42 ratio in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 32, 33-41.
- WEIDEMANN, A., KONIG, G., BUNKE, D., FISCHER, P., SALBAUM, J. M., MASTERS, C. L. & BEYREUTHER, K. 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 57, 115-26.
- WERTKIN, A. M., TURNER, R. S., PLEASURE, S. J., GOLDE, T. E., YOUNKIN, S. G., TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, V. M. 1993. Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9513-7.
- WHITE, A. R., REYES, R., MERCER, J. F., CAMAKARIS, J., ZHENG, H., BUSH, A. I., MULTHAUP, G., BEYREUTHER, K., MASTERS, C. L. & CAPPAL, R. 1999. Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice. *Brain Res*, 842, 439-44.
- WISNIEWSKI, M. L., HWANG, J. & BAHR, B. A. 2011. Submicromolar Abeta42 reduces hippocampal glutamate receptors and presynaptic markers in an aggregation-dependent manner. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 1664-74.
- WOIMANT, F. & TROCELLO, J. M. 2014. Disorders of heavy metals. *Handb Clin Neurol*, 120, 851-64.
- WOLMAN, M., KLATZO, I., CHUI, E., WILMES, F., NISHIMOTO, K., FUJIWARA, K. & SPATZ, M. 1981. Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol*, 54, 55-61.
- XU, S., LUO, Y., GRAESER, R., WARNECKE, A., KRATZ, F., HAUFF, P., LICHA, K. & HAAG, R. 2009. Development of pH-responsive core-shell nanocarriers for delivery of therapeutic and diagnostic agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 1030-4.
- XU, Y., SHEN, J., LUO, X., ZHU, W., CHEN, K., MA, J. & JIANG, H. 2005. Conformational transition of amyloid beta-peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5403-7.
- YU, M., ZHOU, C., LIU, J., HANKINS, J. D. & ZHENG, J. 2011. Luminescent gold nanoparticles with pH-dependent membrane adsorption. *J Am Chem Soc*, 133, 11014-7.
- ZEMEK, F., DRTINOVA, L., NEPOVIMOVA, E., SEPSOVA, V., KORABECNY, J., KLIMES, J. & KUCA, K. 2014. Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opin Drug Saf*, 13, 759-74.
- ZEMPEL, H. & MANDELKOW, E. 2014. Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends Neurosci*.
- ZHANG, B., GEORGIEV, O., HAGMANN, M., GUNES, C., CRAMER, M., FALLER, P., VASAK, M. & SCHAFFNER, W. 2003. Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol Cell Biol*, 23, 8471-85.
- ZHANG, X. & LE, W. 2010. Pathological role of hypoxia in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 223, 299-303.
- ZIEBARTH, J. D. & WANG, Y. 2010. Understanding the protonation behavior of linear polyethylenimine in solutions through Monte Carlo simulations. *Biomacromolecules*, 11, 29-38.
- ZLOKOVIC, B. V. 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*, 12, 723-38.

6 Abkürzungsverzeichnis

AD	„Alzheimer’s Disease“
AICD	„APP intracellular domain“
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzkassette
AMU	„atomic mass unit“
APP	„amyloid precursor protein“
AS	Aminosäuren
ASS	Acetylsalicylsäure
A β	Amyloid- β -Peptid
BACE	„ β -site cleaving enzyme“
BBB	„blood-brain barrier“
CAA	„cerebral amyloid angiopathy“
CDR	„Clinical Dementia Rating“
CMS	„core-multishell nanoparticle“
Co	Cobalt
CQ	Clioquinol
CSF	„cerebrospinal fluid“
CSNP	„core-shell nanoparticle“
CTr	„copper transporter“
Cu	Kupfer
CuBD	Cu-Bindungsstelle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLS	„dynamic light scattering“
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBA	Evans Blue Albumin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	„familial AD“
FCS	fötales Kälberserum

Fe	Eisen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GJs	„gap junctions“
GSIs	γ -Sekretase-Inhibitoren
GSMs	γ -Sekretase-Modulatoren
HEK293T	humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293T
HBD	Heparin-bindende Domänen
HBMEC	„human brain microvascular endothelial cells“
HE-Färbung	Hämotoxylin-Eosin-Färbung
ICC	Indocarbocyanin Carboxy Säure
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasmaionenquelle
ind	„indian mutation“
IUPAC	„International Union of Pure and Applied Chemistry“
K	Kontrollgruppe
kDa	kilo Dalton
K_{ow}	Oktanol-Wasser-Koeffizient
LFSE	„ligand field stabilization energy“
LSM	„laser scanning microscopy“
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MNK	Menkes Protein
Mn	Mangan
MREs	„metal response elements“
MT	Metallothionein
MTT	Dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid
MTF-1	„metal transcription factor 1“
MW	„molecular weight“
NaFl	Natrium-Fluorescein
NP	„nanoparticle“
OMPG	O-Mesylpolyglycerol
PAMAM	„poly(amido amine)“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ppb	„parts per billion“

PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PG	Polyglycerin
PI	Propidiumiodid
Pj	„permeability coefficient of PI“
PLGA-NPs	dendritische Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide)-NPs
ROS	„reactive oxygen species“
rpm	„revolutions per minute“
RT	Raumtemperatur
PSe	„permeability x surface area product“
sAPP α	„soluble APP- α “
sAPP β	„soluble APP- β “
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH-SY5Y	humane Neuroblastoma Zelllinie
SOD	Superoxid-Dismutase
SUVs	„small unilamellar vesicles“
SV40-LT	„simian virus 40 large T antigen“
sw	„swedish mutation“
TEER	„transendothelial electrical resistance“
TJs	„tight junctions“
TMEDA	N ¹ ,N ¹ ,N ² -Trimethylethan-1,2-diamin
TMS	Transmembransequenz
TxJ/J	„toxic-milk mice“
vWF	von Willebrand Faktor
WT	Wildtyp
Zn	Zink
ZNS	Zentralnervensystem
ZO1	„zonula occludens 1“
α -CTF	„ α -C-terminal fragment“
β -CTF	„ β -c-terminal fragment“
Δ	Deletion

6.1 Ein- und Drei-Buchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystei
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
X		alle Aminosäuren außer Prolin

6.2 Ein-Buchstabencode der DNA-Basen

C	Cytosin
T	Thymin
A	Adenin
G	Guanin

7 Anhang

7.1 Publikationen

Artikel

Fehse, S., Nowag, S., Quadir, M., Kim, K. S., Haag, R. und Multhaup, G. 2014 “Copper Transport Mediated by Nanocarrier Systems in a Blood–Brain Barrier *In Vitro* Model”, *Biomacromolecules*, 15, 1910–9.

Artikel in Vorbereitung

Fehse, S., Hellmund, M., Nowag, S., Kuppler, S., Multhaup, G. und Haag, R. Arbeitstitel: “Comparison of the transport ability over the blood-brain barrier of CSNP 1 and CSNP 2, two Nanoparticles that are identical in construction, but differ in their size”

Albrecht, R., **Fehse, S.**, Pant, K., Tzschucke C. C., Stephan, H. und Haag, R. Arbeitstitel: “Polyglycerol based Nanocarriers for the Transport of Copper over Biological Barriers”

Konferenzbeiträge

Fehse, S., Nowag, S., Quadir, M., Haag, R. und Multhaup, G. „Cellular copper import by synthetic nanocarrier systems”. 7th Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology, Potsdam, 12. – 15.10.2011, Poster

Fehse, S., Quadir, M., Haag, R. und Multhaup, G. “Cellular copper import by copper-nanocarrier complexes”. Neurad Symposium, Amsterdam (Niederlande), 15. – 16.03.2010, Poster

Fehse, S., Treiber, C., Quadir, M., Haag, R. und Multhaup, G. “Cellular Cu import by synthetic Cu/nanocarrier complexes”. 6th Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology, Berlin, 24. – 26.09.2009, Poster

Fehse, S., Quadir, M., Haag, R. und Multhaup, G. “Cellular copper import by nanocarrier systems”, Neurad 3rd Summer School, Lille (Frankreich), 18. – 21.09.2009, Vortrag

Fehse, S., Quadir, M., Haag, R. und Multhaup, G. “Targeting specific cellular sites by synthetic Cu/nanocarrier complexes”, 6th Intl. Copper Meeting: Copper and Related Metals in Biology, Alghero (Italien), 12. – 15.10.2008, Vortrag

Fehse, S., Quadir, M., Haag, R. und Multhaup, G. “Cellular Cu transport by synthetic Cu-nanocarrier complexes”, Neurad 2nd Summer School, Leuven (Belgien), 17. – 20.09.2008, Vortrag

7.2 Lebenslauf

7.3 Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Markus Wahl herzlichst für die Übernahme der Betreuung und des Erstgutachtens in unstillen Zeiten danken. Ohne Zweifel wäre ohne sein Engagement diese Arbeit nicht zu Ende geführt worden.

Bei Prof. Dr. Petra Knaus möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die aufmunternden Worte danken.

Auch bei Prof. Dr. Rainer Haag möchte ich mich herzlichst bedanken. Insbesondere seine Unterstützung bei meinen Publikationen und seine Zuversicht haben mich beeindruckt.

Und ich möchte, Prof. Dr. Gerd Multhaupt für die Vergabe des spannenden Themas und die Freiheiten, die ich bei der Bearbeitung meiner Doktorarbeit hatte, danken.

Ein herzlicher Dank gebührt auch Dr. Linda Schauenburg und Dr. Chris Weise, die mich in bemerkenswerter Weise bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben sowie nicht zuletzt diese Arbeit Korrektur gelesen haben. In diesen Zusammenhang sind auch Dr. Vivienne Engelschalt und Dr. Daniela Kaden zu nennen, die mir großen Beistand gaben.

Ein Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit basiert auf ICP-MS-Messungen. Diese wären ohne die tatkräftige Hilfe von Thomas Wons, Frank Kuppler und Gerd Buchlow nicht möglich gewesen. Danke!

Anschließend möchte ich Andrea Senge herzlichst für ihre stetige Unterstützung und die immer wieder erheitenden Gespräche danken.

Immer wieder für eine Überraschung gut und mit einem enormen Wissensschatz ausgestattet, danke ich Dr. Tobias Bethge für die stets äußerst hilfreichen Anmerkungen.

Ein souveränes, entspanntes und dennoch zielgerichtetes Arbeiten bedingt eine Atmosphäre, die nur durch dementsprechend aufgeschlossene, freundliche und kompetente Mitarbeiter entstehen kann. In diesem Sinne möchte ich auch Anke Wagner, Dr. Anne Siekhaus, Dr. Anja Harmeier, Boas Felmy, Dr. Carina Treiber, Dr. Christian Barucker, Clara Schäfer, Felix Oesterreich, Filip Liebsch, Herrmann Bayer, Karolina Bobowski, Dr. Kerstin May-Witt, Lisa Janke, Dr. Lisa Münter, Dr. Luise Richter, Lydia Alnajjar, Dr. Magnus Mayer, Michael Sonntag, Dr. Murat Eravci, Nils Niggemann, Paul Dembny, Sandra Paschkowski, Sarah Hampe, und Dr. Veit Althoff, und Dr.

Wagner danken. Vielen Dank auch an meine Mitarbeitsstudenten Tobias Bergmann und Holger Sieg.

Als hochmotivierte zuverlässige Kooperationspartner aus der Arbeitsgruppe Haag möchte ich Dr. Sabrina Nowag, Dr. Katharina Achazi, Dr. Mohiuddin Abdul Quadir und Markus Hellmund gebührend danken.

Für die Nutzung der hauseigenen Geräte und der vielfältigen Unterstützung bei alltäglichen Problemen möchte ich Dr. Carola Krause, Johanna Scholz, Katharina Hoffmann, Pia Paarmann und Sonja Niedrig danken.

Zudem ist dankend die intensive Hilfestellung hinsichtlich der Erlernung des Bluthirnschrankenmodells zu nennen, die mir Dr. Sabrina Lachenmaier gab. Ihr bewundernswertes Engagement, ihre ständige Hilfsbereitschaft sowie ihre Diskussionsbereitschaft haben mich sehr beeindruckt.

Für die umfassende Hilfe bei der Arbeit mit Tieren möchte ich Stefanie Bannecke, Claudia Abramjuk, Dr. Ines Gemeinhardt, Dr. Jörg Schnorr und Dr. Renate Thiel danken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie für viele glückliche Momente danken. Und ich möchte meinem „Mann“ Ralf-Peter Masser ganz besonders für seine unerschütterliche Zuversicht und mannigfaltige Unterstützung danken.

7.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass diese Arbeit noch an keiner anderen Universität vorgelegt wurde.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht: **Fehse, S.**, Nowag, S., Quadir, M., Kim, K. S., Haag, R. und Multhaupt, G. 2014 “Copper Transport Mediated by Nanocarrier Systems in a Blood–Brain Barrier *In Vitro* Model”, *Biomacromolecules*, 15, 1910–9.

Berlin, den 16.12.2014 Susanne Fehse