

OBERFLÄCHENMODIFIZIERTE PROTEINBELADENE
MIKROPARTIKEL FÜR DAS TARGETING DENDRITISCHER ZELLEN

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

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

vorgelegt von

CHRISTIAN WISCHKE
geboren in Erfurt

August, 2006

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. H.-H. Borchert

2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. R.H. Müller

Disputation am: 13.11.2006

Vorwort	1
1 Einleitung und Zielstellung	2
1.1 Proteinbeladene Mikropartikel	2
<u>1.1.1 PLGA</u>	2
Synthese	3
Polymerabbau und Metabolisierung	5
Polymererosion und Wirkstofffreigabe	6
<u>1.1.2 Herstellung proteinbeladener Mikropartikel</u>	7
<u>1.1.3 Organische Lösungsmittel</u>	10
<u>1.1.4 Stabilität von Proteinen bei der Mikroverkapselung und Freisetzung</u>	13
Proteinkonformation und die Reaktivität der Seitenketten	13
Proteinstabilität während der Mikroverkapselung	14
Proteinstabilität unter Freisetzungsbedingungen	18
1.2 Stabilisierung und Modifizierung der Mikropartikeloberfläche	20
<u>1.2.1 Anionische PLGA-Mikropartikel</u>	21
Polyvinylalkohol	21
Andere Stabilisatoren für anionische Mikropartikel	23
<u>1.2.2 Kationisch modifizierte PLGA-Mikropartikel</u>	24
Derivatisierung des Matrixpolymers	24
Mischungen von PLGA und kationischen Polymeren	25
Adsorption grenzflächenaktiver Moleküle	25
Chitosan	26
Auswahl von Methoden zur Oberflächenmodifizierung	28
1.3 Mikromischer zur Herstellung von Mikropartikeln	28
Einteilung, Aufbau und Einsatz von Mikromischern	28
Beschreibung des verwendeten Mikromischers	30
1.4 BSA als Modellprotein	32
1.5 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	35
Grundlagen der Fluorimetrie	35
Intrinsische Fluoreszenz von Proteinen	36
Fluoreszenzmarkierung von BSA	37
Eigenschaften von Fluorescein und Prinzipien der Fluoreszenzlöschung	39
1.6 Dendritische Zellen – immunologische Funktion	41
1.7 Tumorstabilisierung mit dendritischen Zellen	45
	III

1.8	Zielstellung	47
2	Material und Methoden	49
2.1	Materialien	49
	Mikroverkapselte Proteine	49
	Bioabbaubare Polymere	49
	Stabilisatoren/Oberflächenmodifizierung von Mikropartikeln	50
	Charakterisierung der Mikropartikel	50
	Charakterisierung des Modellproteins	50
	Materialien in der Zellkultur	52
	Pipetten	53
2.2	Herstellung von Mikropartikeln	54
	Primäremulgierung	54
	Sekundäremulgierung	55
	Evaporation, Waschen, Lyophilisation, Lagerung	56
	Herstellung unter aseptischen Bedingungen	56
2.3	Charakterisierung der Mikropartikel	57
	Tröpfchengröße der Primäremulsion	57
	Größe der Mikropartikel	57
	Oberflächenladung der Mikropartikel	58
	Dynamische Viskosität der W ₂ -Phasen	58
	Konzentrationsbestimmung von PVA, Chitosan und DEAE-Dextran	59
	Proteinverteilung im Mikropartikel (CLSM)	61
	Ultrastruktur der Mikropartikel (REM)	61
	Glasübergangstemperatur (DSC)	62
	Restlösungsmittel	62
	Verkapselungseffizienz	64
	Freisetzungstests	65
	Endotoxine (LAL-Test)	65
2.4	Charakterisierung von FITC-BSA	66
	Auswahl der Pufferlösung	66
	Fluorimetrie	67
	Proteinassays	68
	ELISA	70
	Lagerstabilität, Einfluss von pH-Wert und Proteasen	71
	Gelelektrophorese (PAGE)	72

Massenspektrometrie	75
Größenausschlusschromatographie	75
Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie	75
Proteolyseexperimente	76
2.5 Zelleexperimente	76
Gewinnung humaner mononukleärer Zellen (PBMCs)	77
Isolierung von Monozyten	77
Qualität der Monozyten: Reinheit, Vitalität und Lagerung	78
Immunfluoreszenz und Vitalitätsprüfung mittels Durchflusszytometrie	78
Toxizität von Detergenzien und Mikropartikeln	80
Phagozytosestudien	80
Generierung von dendritischen Zellen (MoDCs)	81
Einfluss der Mikropartikel-Phagozytose auf die Reifung von MoDCs	81
3 Ergebnisse und Diskussion	82
3.1 Mikropartikelherstellung im Mikromischer	82
Steuerung der Partikelgröße im Mikromischer	82
Beladung mit FITC-BSA, Verkapselungseffizienz und Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses	84
Homogenität der Beladung mit FITC-BSA	86
Einfluss der Partikelgröße auf die Vitalität von und die Phagozytose durch dendritische Zellen	88
Standardparameter bei der Mikroverkapselung im Mikromischer	91
3.2 Primäremulgierung mittels Ultra-Turrax®: Charakterisierung der Mikropartikel	92
<u>3.2.1 Ultrastruktur der Mikropartikel</u>	93
Rasterelektronenmikroskopie (REM)	93
Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	95
<u>3.2.2 Freisetzungstests</u>	97
Fluorimetrie	97
Proteinassays und ELISA	98
Oberflächengebundenes FITC-BSA	100
<u>3.2.3 Einfluss der Proteinverkapselung auf die Eigenschaften des Matrixpolymers</u>	102
<u>3.2.4 Restlösungsmittel</u>	103
3.3 Optimierung des Primäremulsionsverfahrens	105
Tröpfchengröße der Primäremulsion	105

Einfluss des Verfahrens zur Primäremulgierung auf die Mikropartikelgröße	106
Einfluss des Verfahrens zur Primäremulgierung auf die Verkapselungseffizienz	107
Einfluss des Verfahrens zur Primäremulgierung auf die Ultrastruktur der Partikel	108
Freisetzungstests	111
Nativität des freigesetzten FITC-BSA	113
Einfluss des Verfahrens zur Primäremulgierung auf das Matrixpolymer PLGA	114
3.4 Oberflächenmodifizierung von Mikropartikeln	116
<u>3.4.1 CTAB-modifizierte Mikropartikel</u>	116
Bisherige Untersuchungen zu CTAB und dessen Toxizität	116
Stabilität der Mikropartikel und Variation der Herstellungsbedingungen	117
Ursache der Mikropartikelaggregation	119
<u>3.4.2 Chitosan- und DEAE-Dextran-modifizierte Mikropartikel</u>	124
Auswahl funktioneller Polymere zur Oberflächenmodifizierung	124
Einfluss der Oberflächenmodifizierung auf die Partikelgröße, Ultrastruktur und Glasübergangstemperatur	125
Oberflächenladung der Mikropartikel	128
Restkonzentration an Hilfsstoffen und deren Toxizität	131
Endotoxine	133
3.5 Zellstudien	135
<u>3.5.1 Charakteristika der verwendeten Zellen</u>	135
Phagozytosefähigkeit	135
Generierung von DCs aus Monozyten	136
Reifung dendritischer Zellen	136
<u>3.5.2 Phagozytosestudien</u>	138
Überprüfung der intrazellulären Lokalisation	138
Ausmaß der Phagozytose in Abhängigkeit von den Mikropartikeleigenschaften und ihrer Konzentration	141
Vitalität in Abhängigkeit von den Mikropartikeleigenschaften und ihrer Konzentration	142
<u>3.5.3 Einfluss von PLGA-Mikropartikeln auf den Phänotyp dendritischer Zellen</u>	144
3.6 FITC-BSA als Modellprotein in der Mikroverkapselung	148
<u>3.6.1 Analytische Möglichkeiten bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Proteine</u>	148
<u>3.6.2 FITC-Markierung zur Quantifizierung von BSA unter Bedingungen des Freisetzungstests</u>	150
Freisetzungsstudien	150
Fluorimetrische Untersuchungen an FITC-BSA Standardlösungen	150

	SDS-PAGE	151
	Größenausschlusschromatographie (SEC)	154
	Massenspektrometrie (SELDI-TOF)	155
	Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie	156
	Eignung von FITC-BSA als Modellprotein bei fluorimetrischer Quantifizierung	158
	<u>3.6.3 Mechanismus des Dequenching</u>	159
	Theoretische Überlegungen	159
	Proteolyseexperimente	161
3.7	Konzept einer verbesserten DC-basierten Zelltherapie	163
4	Zusammenfassung	165
5	Summary	167
6	Literatur	169
7	Abkürzungen	195
8	Publikationen	198
9	Lebenslauf	200
10	Danksagungen	201