



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Binding characteristics of different plant lectins to endothelial cells and erythrocytes for drug delivery purposes.“

verfasst von

Martina Führinger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

*„Im Grunde sind es die Verbindungen mit Menschen, die dem Leben seinen
Wert geben“*

Wilhelm von Humboldt (1767-1835)

*Ich möchte mich herzlich bei Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Unterstützung und
die Möglichkeit in der Zellkultur zu arbeiten bedanken.*

*Mein Dank gilt ebenfalls Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth, der mein Interesse an der
Zellkultur geweckt hat.*

*Ich bedanke mich bei meiner Betreuerin Mag. Xueyan Wang für die kompetente und
sachliche Betreuung während der gesamten Arbeitszeit.*

*Weiters möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe und meinen zwei Kommilitoninnen
Silvia und Sophie für die heiter gestalteten Arbeitstage bedanken.*

*Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir nicht nur eine unbeschwerte Studienzeit
ermöglichten, sondern mir auch immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Akronyme	6
I. Einleitung	8
II. Ergebnisse und Diskussion	14
III. Anhang A – wissenschaftliche Publikationen	19
IV. Anhang B – erweiterte Untersuchungen	51
1. Entwicklung von Oberflächen-modifizierten Triamcinolonacetonid-hältigen PLGA-Mikropartikel	51
1.1. Einleitung	51
1.2. Methoden	53
1.2.1. Herstellung von Triamcinolonacetonid-hältigen PLGA-Mikropartikeln	53
1.2.2. Charakterisierung der TAAc-PLGA-Mikropartikel	54
1.2.3. Freisetzungsuntersuchung von TAAc-PLGA-Mikropartikeln	56
1.2.3.1. Geschlossenes System	56
1.2.3.2. Offenes System	56
1.2.4. Modifikation der Partikeloberflächen	57
1.3. Resultate	58
1.3.1. Charakterisierung von TAAc-PLGA-Mikropartikeln	58
1.3.2. Freisetzung von TAAc aus PLGA-Mikropartikeln	59
1.3.3. Modifikation der Partikeloberflächen	60
2. Zellkultur und Humanalbumin-Bindungsstudie	62
2.1. Einleitung	62
2.2. Methoden	64
2.2.1. Subkultivierung von Endothelzellen	64
2.2.2. Bindung von Humanalbumin an Endothelzellmonolyer	64
2.3. Resultate	66

3. Entwicklung eines <i>in-vitro</i> – Modelles des Blutgefäßes	68
3.1. Einleitung	68
3.2. Methoden	71
3.2.1. Erythrozyten unter Flussbedingungen	71
3.2.1.1. Herstellung der Kanalstrukturen	71
3.2.1.2. Blutpräparation und Versuchsdurchführung	71
3.2.2. Auswirkung unterschiedlicher Puffersysteme auf Endothelzellen und Erythrozyten	72
3.2.2.1. Herstellung der verwendeten Pufferlösungen	73
3.3. Resultate	75
3.3.1. Erythrozyten unter Flussbedingungen	75
3.3.2 Auswirkung unterschiedlicher Puffersysteme auf Endothelzellen und Erythrozyten	76
4. Zusammenfassung	47
4.1. Deutsch	80
4.2. Englisch	81
Anhang C	83
Literaturverzeichnis	92
Curriculum Vitae	97

Abkürzungsverzeichnis und Akronyme

ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintriphosphat
CR	consensus repeats
DBA	Dolichus biflorus agglutinin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EuAB	Europäisches Arzneibuch
F/P-Ratio	Fluoreszenz-Protein-Verhältnis
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FITC-HSA	Fluorescein-Isothiocyanat-humanes Serumalbumin
gp60	60-kDa Glycoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMEC	human dermal microvascular endothelial cells
HPLC	high pressure liquid chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
HUVEctert	immortalized human umbilical vein endothelial cell
IDT	Interdigitaltransducer
IL-1	Interleukin-1
LCA	Lens culinaris agglutinin
mosm	Milliosmol

MW _____ Mittelwert

PBS _____ phosphat buffered saline

PDMS _____ Poly(dimethylsiloxan)

PEI _____ Polyethylenimin

PLGA _____ Poly-(DL-lactid-co-glycolid)

pmol _____ Picomol

PNA _____ Peanut agglutinin

SLE^x _____ Sialyl Lewis x

STL _____ Solanum tuberosum lectin

TAAC _____ Trimacinolonacetamid

TNF- α _____ Tumornekrosefaktor- α

tPA _____ Gewebefibrinolyseaktivator

UEA-I _____ Ulex europaeus isoagglutinin I

UpM _____ Umdrehungen pro Minute

vWF _____ Von Willebrand-Faktor

WGA _____ Wheat germ agglutinin

ξ -Potential _____ Zetapotential

I. Einleitung

Das Wissen über physiologische Veränderungen während des Krankheitsgeschehens trägt deutlich zum Verständnis und zur Erkennung neuer Therapiemöglichkeiten bei. So ist bekannt, dass Verletzungen oder entzündliche Prozesse die Eigenschaften des Endothels beeinflussen, indem z.B. Weibel-Palade-Körper verstärkt apikal als auch basolateral sezerniert werden. Sie enthalten zum Großteil Van Willebrand-Faktor (vWF), aber auch Adhäsionsmoleküle, die an der Leukozytenrekrutierung und ihrer Fortbewegung an venösen Gefäßwänden beteiligt sind. Die Adhäsionsmoleküle der Leukozyten selbst sind in den Leukozytenmikrovilli konzentriert. Mit diesen können sie in die Glycokalyx der Endothelzelle vordringen und sich dort verankern. Im nächsten Schritt wandern sie auf parazellulärem oder transzellulärem Weg in das benachbarte Gewebe ein (siehe Abb. 1) [1]. Die Präsentation von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen wird durch Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Lipopolysaccharide (LPS) forciert und spielt daher im Krankheitsgeschehen eine tragende Rolle. Im Gegensatz dazu ist es möglich, durch Anwendung von Glukokortikoiden die Expression von Adhäsionsmolekülen zu inhibieren und damit die Leukozytenwanderung zu unterbinden, wobei jedoch die genauen Wirkmechanismen nicht zur Gänze geklärt sind [2].

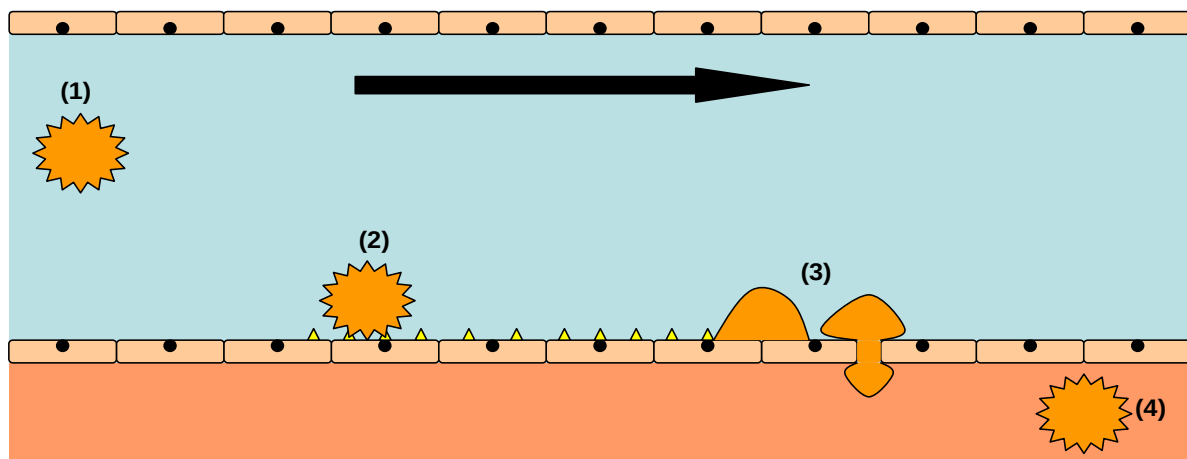


Abb. 1: Längsschnitt eines Blutgefäßes. Leukozyten, die sich im Gefäßlumen befinden (1), verankern sich mit Hilfe der an Endothelzelloberflächen exprimierten Adhäsionsmoleküle an der Gefäßwand. Durch reversible Interaktion können sich diese Zellen rollend mit dem Blutstrom (Pfeil) entlang der Gefäßwand fortbewegen (2) und in das benachbarte Gewebe einwandern (3). Im Gewebe erfüllen sie ihren Teil der Immunreaktion (4) [1].

Die Gruppe der Selektine gehört zu jenen Strukturen, deren Expression an der Zelloberfläche von inflammatorischen Molekülen reguliert wird. Sie bestehen aus einem Kalzium-abhängigen, Typ I transmembranen Glykoprotein mit einer extrazellulären Lektin-ähnlichen Domäne und werden nach dem Ort ihrer Expression klassifiziert:

- E-Selektin – aktiviertes Endothel
- P-Selektin – Blutplättchen und Endothel
- L-Selektin – Lymphozyten

Selektine erlauben die Adhäsion zwischen Leukozyten und Blutplättchen mit dem vascularen Endothel während einer Entzündung oder Gewebeschädigung. Sie sind fähig, sialylierte, fucosylierte und sulfatierte Glykane von Glykoproteinen, Glykolipiden oder Proteoglykanen zu erkennen, und die initiale Bindung von frei fließenden Leukozyten an die Gefäßwand durch reversible Adhäsion zu vermitteln. Dies erlaubt den Zellen in den Gefäßen in Fließrichtung zu rollen. Die physiologische Expression von Selektinen ist streng kontrolliert, um entzündliche Reaktionen in Grenzen zu halten.

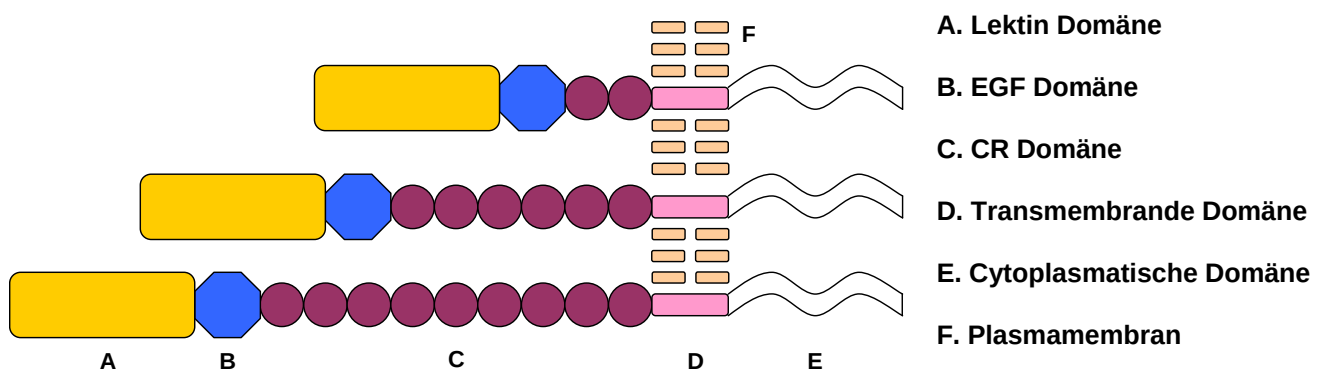


Abb. 2: Selektinstruktur. Die Selektinstruktur umfasst eine N-terminale Lektin-ähnlichen Domäne in gelb dargestellt, gefolgt von einer EGF-Domäne (blau). Die anschließenden Motive (consensus repeats CR, violett) wiederholen sich zweimal bei L-Selektin, sechsmal bei E-Selektin oder neunmal bei P-Selektin und sind Komplement-bindenden Molekülen ähnlich. Mit einer transmembranen Domäne (rosa) sind sie in der Plasmamembran verankert und schließen mit einer cytoplasmatischen Domäne ab [4].

E-Selektin (64kDa), auch bekannt als CD62E, ELAM-1, LECAM-2 ist von besonderem Interesse, da es speziell von Endothelzellen gebildet wird. Die primäre Struktur von E-Selektin besteht aus mehreren Domänen: eine aminoternale Lektin-ähnliche Domäne, gefolgt von einer epidermal growth-factor (EGF)-ähnlichen Domäne und sechs wiederholenden Motiven aus jeweils 60 Aminosäuren, ähnlich zu denen, die in manchen Komplement-bindenden Proteinen gefunden wurden (siehe Abb. 2). Die Lektin-ähnliche Domäne und die EGF-ähnliche Domäne vermitteln die Interaktion mit Leukozyten, während die Aufgabe der complement binding-like Regionen noch nicht genau bekannt ist; möglicherweise dienen sie als Platzhalter, um die anderen zwei Domänen von der Zelloberfläche fern zu halten. E-Selektin ist nicht konstitutiv auf Endothelzellen vorhanden, seine Expression wird durch inflammatorische Moleküle, wie TNF- α , IL-1 oder bakterielle Lipopolysaccharide stimuliert. Die Expression erreicht ihr Maximum 4 Stunden nach Cytokinstimulation und fällt danach sehr schnell ab. Dabei wird E-Selektin nach und nach durch Endozytose internalisiert und in Lysosomen abgebaut, so dass es nach 24 Stunden nicht mehr detektierbar ist [3].

Pathologische Einflüsse von E-Selektin	
E-Selektin und Entzündung	Die Expression von E-Selektin auf dem Endothel während akuter oder chronischer Entzündung hat Einfluss auf die Rekrutierung von Immunzellen durch Interaktion mit deren Liganden auf ihrer Oberfläche.
E-Selektin und Tumor-Vaskularisation	E-Selektin wurde auf Endothelzellen von kleinen Blutgefäßen nachgewiesen, die an Kolonkarzinome angrenzen.
E-Selektin und Metastasierung	Die Adhäsion von Tumorzellen auf vascularem Endothel am Zielorgan ist ein Schlüsselschritt in der Kaskade der Metastasierung. Vermutlich ist die Interaktion von SLE ^x zu E-Selektin ein wichtiger Mediator der Adhäsion, ähnlich wie bei Immunzellen.

Tabelle 1: Pathologische Einflüsse von E-Selektin. Quelle: E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. Jubeli E, Moine L, Vergnaud-Gauduchon J, Barratt G [3].

Wie oben bereits erwähnt enthalten Selektine eine extrazelluläre Lektin-ähnliche Domäne. Lektine sind Proteine, die hauptsächlich in Pflanzen, aber auch in wenigen Tierarten zu finden sind. Ihre biologische Aufgabe ist nicht genau bekannt, vermutlich dienen sie als Schutz vor Fraßfeinden, mikrobiologischem Befall und zu Transport und Lagerung von Kohlenhydraten in Pflanzen. Eine charakteristische Eigenschaft von ihnen ist, dass sie spezifische Kohlenhydrate reversibel binden können [5]. Anhand dieser Eigenschaft können sie in fünf Gruppen eingeteilt werden:

- Glucose / Mannose-bindende Lektine – LCA (Lens culinaris Agglutinin)
- Galactose / N-Acetyl-D-Glucosamin-bindende Lektine – Ricinus communis Agglutinin I und II
- N-Acetylglucosamin-bindende Lektine – WGA (Wheat germ Agglutinin) und STL (Solanum tuberosum Agglutinin)
- L-Fukose-bindende Lektine – UEA-I (Ulex europeus Isoagglutinin I) [6]
- Sialysäure-bindende Lektine

Diese Zuckerarten kommen unter anderem auf der Zelloberfläche von roten Blutkörperchen vor. Die Bindung von Lektinen an Erythrozyten kann Aggregatbildung zur Folge haben, daher auch der Name Haemagglutinine oder Phytoagglutinine [7]. Die Fähigkeit Kohlenhydrate spezifisch zu binden, wird unter anderem dazu benutzt, die Zuckerstrukturen verschiedener Zelloberfläche zu charakterisieren [5].

Diese Arbeit beschäftigt sich in Anhang A mit der Charakterisierung der Zelloberfläche von Endothelzellen, insbesondere der Zuckerstrukturen, vor und nach einer Entzündung. An Hand der Fähigkeit von Lektinen spezifische Kohlenhydrate zu erkennen, soll nicht nur das Wissen über die vorhandenen Kohlenhydrate auf der Oberfläche von Endothelzellen erweitert werden, sondern auch die Frage geklärt werden, ob es möglich ist, die durch einen entzündlichen Vorgang exprimierten Strukturen für eine gezielte Therapie zu nutzen. Durch die Entwicklung einer zielgerichteten Arzneiform könnten durch Interaktion mit dem Endothel Arzneistoffe wie Glukokortikoide im betreffenden Gewebe angereichert und somit eine Reduktion der Nebenwirkungen zur Folge haben. Da sich entzündliche Prozesse im Körper in den Geweben abspielen und Arzneistoffe zum Großteil über die Blutbahn zu ihrem Bestimmungsort gelangen, soll weiters die Verträglichkeit von vielversprechenden Lektinen auf Erythrozyten untersucht werden.

In Anhang B werden folgende Themen behandelt:

- **Modifikationen der Oberfläche von TAAc hältigen PLGA-Mikropartikeln**

Es soll eine verbesserte Interaktion der Partikeln mit den Endothelzellen erzielt werden. Dazu werden Möglichkeiten zur Oberflächenmodifikation, wie die Änderung der Oberflächenladung durch Beschichtung mit kationischen Molekülen, untersucht.

- **Zellkultur und Zellcharakterisierung**

Es wird hier die Kultivierung der verwendeten Endothelzellen erläutert und die Zelloberfläche weiter charakterisiert. Es soll über Bindungsstudien von HSA an Endothelzellen das Vorhandensein von gp60, einem 60-kDa Glykoprotein, bestimmt werden.

- **Entwicklung eines *in-vitro* – Modelles für Blutgefäße**

Weiters wird im Anhang B der Frage nachgegangen, ob es möglich ist, ein *in-vitro* – Modell des Blutgefäßsystems zu entwickeln. Das beinhaltet nicht nur die Beobachtung von roten Blutkörperchen unter Flussbedingungen, sondern auch die künftige Kombination von Endothelzellen und Blutzellen in einem System. Ziel ist es, das Verhalten von Erythrozyten in Kanalstrukturen unter dynamischen Bedingungen zu

charakterisieren und ein Puffersystem zu finden, das den physiologischen Notwendigkeiten beider Zellarten gerecht wird.

II. Ergebnisse und Diskussion

1. Charakterisierung der Lektinbindung von Endothelzelloberflächen

Um die Lektinbindung an Endothelzellen zu untersuchen, wurden sechs pflanzliche Lektine (WGA, STL, UEA-I, LCA, PNA, DBA) mit unterschiedlicher Zuckerspezifität ausgewählt. Für die Bindungsstudien wurden alle drei Zellarten – HUVEC, HUVEctert und HMEC – bis zur Konfluenz kultiviert und mit einer Dilutionsreihe der verwendeten Analyten bei 4°C 30 Minuten lang inkubiert. Bei dieser Temperatur sinkt die metabolische Aktivität der Zellen auf ein Minimum, sodass es möglich ist, nur die Bindung der Lektine an den äußeren Strukturen der Zelle zu beobachten. Zusätzlich wurden HUVEC und HUVEctert vorher mit TNF- α versetzt, um eine Entzündung auszulösen. HMEC sind von dieser Behandlung ausgeschlossen, da sie keine Reaktion auf TNF- α zeigten. Ermittelt wird die relative zellassoziierte-Fluoreszenz der Lektine, welche zwecks Auswertung mit der F/P (molar) Ratio der einzelnen Lektine korreliert wird. Aus den erhaltenen Sättigungskurven von aktivierten und nicht aktivierten Endothelzellen wird die 50%-Bindungskapazität abgeleitet. Sie gibt die Menge an Lektin an, die benötigt wird, um 50% der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Sättigung zu erreichen.

Aus den Daten geht hervor, dass die zellgebundene Lektinkonzentration proportional mit der Menge eingesetzten Lektins bei allen verwendeten Endothelzellen ansteigt, unabhängig davon, ob die Zellen mit TNF- α behandelt wurden oder nicht. Ebenfalls ist durch einen exponentiellen Verlauf der Bindungskurven eine Sättigung der Bindungsstellen ab einer Konzentration von 25pmol Lektin /50 μ l zu erkennen.

Die stärkste Zell-Lektin Interaktion mit Endothelzellen zeigten WGA und UEA-I, gefolgt von STL und LCA. PNA und speziell DBA interagierten mit der Zelloberfläche nur sehr gering, die ermittelten Werte lagen nur knapp über der Autofluoreszenz der Zellen. Die Reihenfolge der Lektinbindungsraten ist zwischen den einzelnen Endothelzellsubtypen nur gering. So steht bei HMEC und HUVEctert WGA an oberster Stelle und bei HUVEC UEA-I. Nach Einwirkung von TNF- α steigen die zellgebundenen Lektinmengen von WGA bei der primären Zelllinie um 23.67% und von UEA-I bei HUVEctert um 3.88%; die restlichen Lektine zeigen die Tendenz im gesättigten Bereich zu sinken. Gründe für diese Abnahme der zellgebundenen Lektine an der Zelloberfläche könnten sein:

- **Verringerung der Zellzahl während der Inkubation mit TNF- α** – ausgelöst durch einen möglichen toxischen Effekt des inflammatorischen Agens. Ein durchgeführter Zellproliferationstest (CyQuant®) konnte diese Hypothese allerdings nicht bestätigen. Es ergaben sich keine Anhaltspunkte, dass die Inkubation mit TNF- α zu einer Abnahme der Zellzahl führt.
- **Modulationen der Zelloberfläche** – Nigel J. Klein et al. stellten die Hypothese auf, dass die Zugabe von TNF zu einem Umbau der Glycosaminoglykane der Zelloberfläche von HUVEC führt [8]. Da Lektine die Fähigkeit besitzen, mit verschiedensten Kohlenhydraten der Zelloberfläche zu interagieren und diese aufgrund eines möglichen Metabolismus der Oberflächenstrukturen während inflammatorischer Prozesse abgebaut werden, könnte die Abnahme im gesättigten Bereich eine Konsequenz davon sein. Das würde auch bedeuten, dass ein Einwirken von TNF- α von mehr als 4 Stunden zu einem vermehrten Umbau dieser Strukturen und somit zu noch niedrigeren Werten führen müsste.

Um die Bindung von WGA, UEA-I und LCA auf die inflammatorisch aktivierten Endothelzellen genauer charakterisieren zu können, wurde die gleiche Prozedur mit niedrigeren Lektinkonzentrationen im Bereich von 0-12,5pmol/50 μ l durchgeführt und die spezifische Bindung an Endothelzellen bestimmt. Diese drei Lektine wurden ausgewählt, da sie hohe Aktivität und unterschiedliche Affinitäten zu Kohlenhydraten aufweisen. In diesem Konzentrationsbereich sind jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Bindungsrate von WGA und UEA-I zwischen aktivierten und nicht aktivierten Zellen zu erkennen, nur LCA zeigt bei Entzündung erniedrigte Werte. Interessanterweise zeigt die UEA-I-Kurve in allen Fällen einen steileren Verlauf als jene von WGA, die sich in einer 50%-Bindungskapazität von 5,91pmol/50 μ l (UEA-I) und 8,88pmol/50 μ l (WGA) ohne Aktivierung und 3,40pmol/50 μ l (UEA-I) und 15,29pmol/50 μ l (WGA) bei Aktivierung widerspiegelt.

Die höchste spezifische Bindung wiesen mit über 90% WGA und UEA-I unabhängig von der Aktivierung der Endothelzellen auf, die Interaktion von LCA mit der Zelloberfläche konnte mit D-Mannose nur zu rund 80% inhibiert werden. Zwischen aktivierten und nicht aktivierten Zellen zeigte dieser Versuch nur geringe Unterschiede. So beträgt die IC₅₀ bei WGA 0,002 μ mol/50 μ l Chitotriose für beide, gesunde und entzündete HUVEC und 0,003 μ mol/50 μ l bzw. 0,002 μ mol/50 μ l für HUVEctert. Betreffend UEA-I ergaben sich ähnliche Werte, nur der

IC50-Wert bei LCA sank deutlich von 8,345µmol/50µl D-Mannose auf 2,005µmol/50µl durch die Entzündung.

Die Lektinbindungsrate wurde auch von Einzelzellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Aufgrund der geringen Viabilität der Endothelzellen in Einzelzellsuspension beschränkt sich diese Untersuchung auf nicht-aktivierte HUVEC und HUVECTert und einer Verdünnungsreihe der Analyten von 0 bis 6,25pmol/50µl. Da STL ähnliche Zuckerspezifität wie WGA aufweist, wurde die Oberflächeninteraktion von STL durchflusszytometrisch nicht bestimmt. Das Lektinbindungsmuster der Einzelzellsuspensionen war in der gleichen Reihenfolge wie bei den entsprechenden aktivierten Endothelzellen. Die Lagerung in Einzelzellsuspension scheint für Endothelzellen ein Stressmediator zu sein, der zu ähnlichen Reaktionen wie die Behandlung mit TNF-α führt.

An Hand der Zuckerspezifität der Lektine kann aus diesen Versuchen das Kohlenhydratmuster der Endothelzelloberfläche abgeleitet werden. Die hohe Bindungsrate von UEA-I lässt auf fukosereiche Strukturen auf dem Endothel schließen. Endothelzellen exprimieren wie Erythrozyten auch ABH-Antigene entsprechend der Blutgruppe des Spenders auf ihrer Zelloberfläche [9]. Die H-Substanz besitzt einen freien Fukoserest, an den UEA-I binden kann [10]. Wieviel von dieser Interaktion des UEA-I allein den ABH-Antigenen zuzuordnen ist, kann mit diesen Experimenten nicht ermittelt werden. Zudem scheint auch ein Unterschied zwischen Primärlinie und immortalisierten Zellen zu bestehen, da UEA-I mit den primären Zellen stärker interagiert als WGA. Diese Interaktion nimmt jedoch durch Stimulierung mit TNF-α ab, während gleichzeitig die WGA-Bindungsrate ansteigt. Dagegen bewirkt bei den immortalisierten Zellen der Einfluss von TNF-α eine Abnahme der WGA-Interaktion, aber gleichzeitig steigt jene mit UEA-I. Der Vergleich der Bindungsraten von WGA (Spezifität auf Chitotriose, Chitobiose und Sialinsäure) und STL (Spezifität auf Chitotriose und Chitobiose) lässt dank der ähnlichen Affinitäten weitere Rückschlüsse auf die Kohlenhydratmuster der Zelloberfläche zu [6]. Mit WGA lässt sich durch Vorhandensein von Sialinsäure als zusätzlichem Angriffspunkt eine höhere Interaktionsrate mit der Zelloberfläche erzielen als mit STL. Interessant ist, wie oben bereits erwähnt, dass die Interaktion der HUVEC mit WGA nach Inkubation mit TNF-α ansteigt, jene mit STL aber sinkt, was darauf schließen lässt, dass durch inflammatorische Prozesse spezifische Strukturen für diese beiden Lektine einem Umbau unterliegen. Generell kann eine Modulation der

Zelloberfläche durch Einsatz von TNF- α beobachtet werden. Da aber die Lektin-Zell-Wechselwirkung im Falle von UEA-I bei HUVEctert und im Falle von WGA bei HUVEC nach Einsatz von TNF- α nur geringfügig steigt und bei allen anderen Lektinen vermindert ist, kann nicht auf ein gezieltes Targeting auf entzündetes Gewebe und im speziellen auf E-Selektin geschlossen werden.

Eine Visualisierung der Zelloberflächen-gebundenen Lektine bei einer Konzentration von 12,5pmol Lektin /50 μ l bei 4°C zeigte keine homogene Verteilung der Fluoreszenz auf der Zelloberfläche, sondern eine punktförmige. Dieses Phänomen tritt bei allen verwendeten Lektinen auf. Fluoreszenzaufnahmen in verschiedenen Ebenen von Einzelzellen mit Fluorescein-markiertem WGA bei 4°C bestätigten diese punktförmige Verteilung auf der Zelloberfläche.

2. Charakterisierung der Lektinbindung an Erythrozyten

Wie bereits oben erwähnt, können Lektine in Kontakt mit Blut Aggregatbildung auslösen. Daher soll die Verträglichkeit von Lektinen, speziell von WGA, mit roten Blutkörperchen genauer untersucht werden. Aliquote einer Verdünnungsreihe von Fluorescein-markiertem WGA werden mit Vollblut, das zuvor mit Antikoagulantien versetzt wurde, 10 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und Proben davon mikroskopisch beurteilt. WGA wurde deshalb eingesetzt, da es hohe Affinität und Spezifität zu humanen Endothelzellen besitzt. Zwar trifft dies auch auf UEA-I zu, aber UEA-I löst aufgrund der Wechselwirkung mit freien Fukoseresten in der H-Substanz bei Blutgruppe 0 bereits starke Aggregatbildung aus. Für die Bewertung der Inkubate wurden 8 Stichproben mit je 12 Werten bei jeder Konzentrationsstufe aus einer Zählkammer herangezogen und alle Einzelzellen sowie Aggregate ausgezählt. Aggregate sind definiert als ungeordnete Cluster von mehr als 4 Zellen. Alle Zusammenlagerungen mit linearer Form wurden dem Rouleaux-Effekt zugeordnet und aufgrund ihrer Reversibilität nicht als Aggregat gewertet [11].

Diese Experimente ergaben, dass die Konzentrationen 200, 50 und 40pmol WGA/50µl eine deutliche Clusterbildung bewirken, während 30pmol/50µl als kritische Konzentration angesehen werden kann. Bei dieser Menge an WGA ist die niedrigste Anzahl an Clustern zu beobachten, alle Inkubate mit geringeren WGA-Konzentrationen waren frei von vernetzten Erythrozyten. Diese Untersuchung ist unter statischen Bedingungen durchgeführt worden. Es ist jedoch möglich, dass unter dynamischen Bedingungen es den roten Blutkörperchen durch den hydrodynamischen Fluss erschwert wird, sich miteinander zu verbinden und die Zahl der Aggregate ab 30pmol WGA/50µl weiter abnimmt. Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen bestätigten diese Interaktion von WGA mit der Zelloberfläche und die dadurch ausgelöste Clusterbildung. Es konnte eine deutliche Fluoreszenzintensität in den Clustern bei 200pmol WGA /50µl detektiert werden, aber bei niedrigen Konzentrationen, speziell 10 und 5pmol WGA /50µl war keine Fluoreszenz mehr sichtbar. WGA hat zwar die Fähigkeit mit der Erythrozytenoberfläche zu interagieren, aber eine Konzentration von 20pmol/50µl scheint nicht auszureichen, um die Zellen zu vernetzen. Daher kann diese Lektinkonzentration als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zur möglichen parenteralen Anwendung von Lektinen in drug delivery Systemen herangezogen werden.

III. Anhang A – wissenschaftliche Publikation

Author's contributions

I hereby declare to have significantly contributed to the present manuscript. As part of my diploma thesis, I was involved in the experiments, the analysis and interpretation of the data describing the characterization of the glycosylation pattern of human endothelial cells via plant lectin binding and competitive inhibition.

Lectin-mediated biorecognition: Glycosylation pattern of human endothelial cells and erythrocyte-agglutinating effects of wheat germ agglutinin

Xue-Yan Wang¹, Martina Führinger¹, Renate Hofer-Warbinek², Michael Wirth¹, Franz Gabor¹

¹Department of Pharmaceutical Technology & Biopharmaceutics, Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria

¹Department of Vascular Biology and Thrombosis Research, Center for Physiology and Pharmacology, Medical University of Vienna, Vienna A-1090, Austria

To be submitted to Glycobiology

Corresponding author:

Franz Gabor

Department of Pharmaceutical Technology & Biopharmaceutics

Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria

Phone: +43-1-4277-55406

Fax: +43-1-4277-9554

Email: franz.gabor@univie.ac.at

Abstract

In the present study, six fluorescein-labeled plant lectins with different carbohydrate specificity were used to elucidate the glycosylation pattern of endothelial cells before and after inflammation. Independent from the cell type the highest binding rates to endothelial monolayers were observed in case of wheat germ agglutinin (WGA) and *Ulex europaeus* isoagglutinin I indicating high numbers of accessible sialyl and fucosyl-residues at the cell surface. Upon TNF- α induced inflammation, in primary HUVEC additional sialic acid structures were disclosed as indicated by increasing WGA-binding rates. In general, the lectin binding capacity of macrovascular endothelial cells was significantly higher than that of microvascular ones. Inhibition tests with complementary sugars confirmed the specificity of lectin-binding to endothelial monolayers. Interestingly, WGA-erythrocyte interaction studies revealed that no agglutination of erythrocytes occurs up to the threshold of 15.88 $\mu\text{g WGA mL}^{-1}$. Thus, low amounts of WGA might be compatible with the circulatory system offering a promising approach towards therapeutic application of WGA-grafted drug delivery systems such as microcarriers, which might be beneficial to prolong the residence time and improve efficacy of poorly bioavailable drugs.

Keywords

Endothelial cells / Erythrocytes / Glycocalyx / Lectins / Wheat Germ Agglutinin (WGA)

Introduction

The vascular endothelium lines the entire interior surface of more than 60,000 miles of blood vessels in the human circulatory system [1]. This thin cell layer mediates a high number of physiological functions such as exchange of substances between blood and tissues, synthesis of nitric oxide, endothelin and prostacyclin for adjustment of vascular tone and blood pressure, as well as regulation of coagulation, inflammatory processes and angiogenesis. The surface of endothelial cells is coated with a glycocalyx, which contains different domains with specific carbohydrate residues [2] and is negatively charged [3]. According to electron microscopic studies with fixed samples, the glycocalyx is a fine network of different glycoproteins of 50-100 nm in thickness [4], whereas direct intravital microscopy revealed a thickness of 400-500 nm [5]. In addition, it is suggested that the glycocalyx decelerates the flow at the surface of the endothelial cells contributing to the asymmetric flow profile of blood [6-8].

The glycans decorating the surface of endothelia in different vascular beds from varying species including humans have been identified in several studies [1]. Smolkova et al demonstrated that Concanavalin A (ConA), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Lycopersicon esculentum* agglutinin (LEA), *Ricinus communis* agglutinin (RCA) and wheat germ agglutinin (WGA) bound to all endothelial beds of rat microvasculature; however, *Griffonia simplicifolia* lectin I and *Helix pomatia* agglutinin interacted with certain beds [9, 10]. Lectin binding studies in early developmental chicken embryos showed that ConA, LCA and WGA specifically interact with vascular endothelium, but only LCA retained its ability to interact with endothelial cells upon further development [11]. An examination of *Ulex europaeus* isoagglutinin I (UEA-I) binding to the endothelial cells of human vasculature demonstrated that UEA-I is a specific marker for endothelial layers in human tissues as well as human tumors of endothelial origin [12-14]. Alroy et al. and Roussel et al. screened the binding of a set of lectins to 15 species including non-mammalian animals (e.g. chicken), mammalian animals (e.g. pig, goat and rabbit) and humans. The results revealed that the lectin binding pattern corresponding to the carbohydrate pattern decorating the surface of endothelial cells is a unique signature of different vascular beds and species. Additionally they ascertained an evolutionary development [15, 16].

Although several studies focused on the binding characteristics of different lectins to endothelial cells, a systematic study with human endothelium prior and after inflammation is still missing. Therefore, the aim of this work was to elucidate the binding characteristics and specificity of six plant lectins with different carbohydrate specificity. The selected plant lectins were wheat germ agglutinin (WGA) from *Triticum vulgare* binding to N-acetyl-D-glucosamine and sialic acid, the lectin from furze seeds (*Ulex europaeus* isoagglutinin I, UEA-I) interacting with α -L-fucose-containing carbohydrates,

Solanum tuberosum lectin (STL) from potato tubers binding to N-acetyl-D-glucosamine, lentil lectin from *Lens culinaris* (LCA) recognizing galactosaminyl-/α-mannosyl-residues, *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) from horse gram and peanut agglutinin (PNA) both interacting with galactosamine and its N-acetyl-derivative. Additionally, three different cell types are investigated: (i) primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) isolated from human umbilical cords by treatment with collagenase Type I, (ii) human umbilical vein endothelial cells immortalized with human telomerase reverse transcriptase (HUVECtert) [17] and (iii) immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) [18]. At this, primary HUVEC and HUVECtert represent macrovascular cells, whereas HMEC-1 are of microvascular origin. Moreover, another focus is set on the erythrocyte agglutinating activity of WGA which currently excludes this lectin from parenteral drug delivery concepts and has been already subject of some lectin-cell interaction studies [19-23]. Here, the objective was to evaluate whether it is reasonable or not to develop lectin-grafted drug delivery carriers for parenteral administration.

Materials and methods

Materials

The fluorescein-labeled lectins from *Triticum vulgare* (wheat germ agglutinin, molar ratio fluorescein/protein (F/P) = 4.5), *Solanum tuberosum* (STL; F/P = 3.2), *Ulex europaeus* (UEA-I, isoagglutinin I; F/P = 2.7), *Lens culinaris* (LCA; F/P = 3.7), *Arachis hypogaea* (PNA; F/P = 5.1) and *Dolichos biflorus* (DBA; F/P = 2.1) were purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). Human fibronectin was acquired from BD Bioscience (Bedford, USA). Recombinant Human TNF- α was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Heparin sodium salt was from Sigma-Aldrich. All other chemicals were of analytical grade.

Cell Culture

In the present work, three different types of endothelial cells, HUVEC, HUVEctert and HMEC were used. All tissue culture flasks used for cultivation were coated with a 1% (w/v) aqueous solution of gelatin for 30 min prior to seeding the cells. All cells were cultivated in EndoPrime® Medium (EndoPrime Kit, PAA, Linz, Austria) supplemented with Bio Whittaker® Pen/Strep/Amphotericin B (final concentration 1% (v/v); Lonza, Basel, Switzerland) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ / 95% air atmosphere and subcultured twice a week using 0.25% trypsin-EDTA solution. The cells were used for the experiments between passage 3 to 18 (HUVEC), 14 to 46 (HUVEctert) or 27 to 40 (HMEC).

For lectin binding studies and competitive sugar inhibition endothelial cell monolayers were grown in 96-well microplates. For fluorescence microscopy cell monolayers were cultivated on glass cover slips combined with the flexiPERM micro 12 system. The seeding density was for both cultivation systems 1.7×10^4 single cells/160 μ L per well. Cells were cultivated under standard cell culture conditions until a confluent monolayer had been formed.

Lectin binding capacity of endothelial cells

To determine the lectin binding capacity of endothelial cells, single cells (HUVEC and HUVEctert) and monolayers (HUVEC, HUVEctert and HMEC) were investigated.

For monolayer experiments, confluent monolayers of HUVEC, HUVEctert and HMEC were washed with PBS buffer supplemented with Ca²⁺ and Mg²⁺ after removal of the culture medium. Subsequently, the cell monolayers were incubated with 50 μ L lectin solution (1.56 – 100 pmol, serial dilutions in the same buffer) each well for 30 minutes at 4°C. After removal of unbound lectins by three washing steps with cold buffer, the relative cell-associated fluorescence (RFI) was determined

in a fluorescence microplate reader (TECAN, Infinite M200, Austria) at 485/525 nm. Monolayer samples incubated with buffer alone served as a control for autofluorescence of cells and microplates. In case of inflamed endothelial tissue (HUVEC and HUVEctert), the monolayers were activated with TNF- α (0.5 ng/50 μ L in cell culture medium) at 37°C for 4 hours. After removal of TNF- α by washing, the lectin binding capacity of inflamed endothelial cells was determined as described above for healthy cells. For comparability of the results, the read outs were related to an apparent conjugation number of 1mol fluorescein per mol lectin.

Specificity of the lectin-cell interaction

Competitive inhibition experiments using the complementary carbohydrates were performed to estimate the specificity of the lectin-cell interaction. After washing the confluent endothelial cell monolayer with cold PBS buffer supplemented with Ca²⁺ and Mg²⁺, the cells were incubated with 25 μ L of the complementary carbohydrate in buffer (see Table 2) and 25 μ L of the corresponding lectin in the same buffer (12.5 pmol/well) for 30 min at 4°C. The monolayer samples were washed three times with 100 μ L pre-cooled buffer and analyzed by fluorimetry. The acquired RFI values were related to control samples without carbohydrates, representing 100% lectin binding. For comparison of the data, IC₅₀ values, defined as the amount of corresponding sugar necessary for 50% inhibition of lectin binding, were calculated from inhibition curves (not shown).

Cell microscopy

To visualize the cytoadhesion of different lectins in endothelial tissue, monolayer grown on slides assembled with the flexiPERM micro 12 system were incubated with 12.5 pmol lectin /50 μ L PBS buffer supplemented with Ca²⁺ and Mg²⁺ per well at 4°C for 30 min. After removal of unbound lectins by three washing steps with cold buffer, the cells were fixed in ice cold methanol for 10 min at -20°C (100 μ L/well). After rehydration in PBS containing 1% (v/w) BSA (100 μ L/well) for 20 minutes at room temperature the monolayer were washed twice with the same buffer. Then, 100 μ L solution of 0.5 μ g Hoechst 3334 in PBS/ 1% BSA were added and incubated for 30 minutes at 37°C. Finally, the cells were washed twice with the same buffer and fluorescence images were acquired with a Zeiss Axio Observer.Z1 (Zeiss, Göttingen, Germany).

Evaluation of the interaction between WGA and erythrocytes from different blood groups

Blood samples were collected from healthy donors (blood groups O, A and B) using VACUETTE® blood collection tubes (3.5 mL 9NC Coagulation sodium citrate 3.2%; Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austria) and used immediately. To analyze the effects of WGA on erythrocyte agglutination, 19 µL blood samples were mixed with 1 µL solution of fluorescence labeled WGA (end concentration between 1.975-125 µg mL⁻¹ in distilled water) and incubated for 10min at 37°C. For analysis within the measurement range of the flow cytometer, the blood-lectin sample was diluted 20000-fold in two steps, first 100-fold and second 200-fold. The gates were set properly to determine single cells, cell debris, and cell aggregates. Samples without WGA served as a control and the assays were done in triplicate.

To visualize the effect of WGA on erythrocytes, the lectin-blood mixture incubated for 10 min as above was diluted 150-fold in order to avoid observation of pseudo-aggregates of erythrocytes due to the high concentrated samples. Immediately, for each concentration of the lectin at least 30 images were taken at the same magnification using a Zeiss Axio Observer.Z1 (Zeiss, Göttingen, Germany). The numbers of aggregates and single cells were counted manually and the average number of aggregates of each image was calculated. An aggregation was defined as an unarranged cluster of more than 2 cells

Inhibition experiments using chitotriose as a carbohydrate complementary to WGA were performed to verify the specificity of the lectin-binding to the erythrocyte surface. Briefly, 19 µL freshly drawn blood were mixed with 1 µL chitotriose solution (0.1 - 0.8 µmol mL⁻¹), and then with 1 µL WGA-solution (end concentration 125 µg mL⁻¹). After 10min incubation at 37°C and proper dilution the sample was analyzed by flow cytometry.

Results

Lectin binding capacity of endothelial cells

Six fluorescein-labeled plant lectins with different carbohydrate specificities were chosen to investigate the glycosylation pattern of endothelial cells. Additionally, HUVECs and HUVEctert were activated with TNF- α to estimate changes in lectin binding pattern upon inflammation. HMEC-1, however, failed to be inflamed by TNF- α treatment (data not shown). As displayed in Figure 1, independent from carbohydrate specificities of the lectins, the cell-bound fluorescence intensity increased with the lectin concentration in all three types of cells with and without TNF- α activation. The resulting binding curves leveled off between the concentrations of 12.5 and 100 pmol lectin indicating saturation of accessible carbohydrates. However, for all types of monolayers, DBA and PNA yielded very low RFIs which were scarcely higher than the autofluorescence of endothelial cells.

As demonstrated in Figure 1A and 1B, in case of HUVECs, the cell-associated fluorescence intensities followed the order: UEA-I > WGA ~ STL ~ LCA >> PNA > DBA. In contrast, in case of HUVEctert, the lectin-binding rate decreased as follows: WGA > UEA-I > STL >> LCA >> PNA > DBA. Although the lectin binding capacity was most pronounced in case of WGA and UEA-I for both cell types, the WGA binding rate to immortalized endothelial cells was higher than that of UEA-I. In contrast, UEA-I binding exceeded that of WGA in primary cells. Moreover, the cell-associated RFI of LCA was significantly lower on immortalized cells than on primary cells as indicated by only half RFI in case of HUVEctert as compared to HUVEC at 100 pmol LCA per well. Interestingly, there was an increasing LCA binding capacity of primary endothelial cells, and even saturation was not observed up to 100 pmol LCA. Furthermore, STL exhibited similar binding rates to both cell types. In contrast to primary and immortalized macrovascular endothelial cells, the HMEC-1 cell line originating from microvascular tissue showed significantly lower binding rates of the six plant lectins following the order: WGA > UEA-I ~ STL > LCA >> PNA ~ DBA. For instance, at the highest concentration of lectins the cell-associated fluorescence intensities of WGA, UEA-I and STL decreased to half of those of primary cells, and in case of LCA it decreased even to 12.5%.

Inducing inflammation of endothelial cells by pretreatment with TNF- α resulted in decreasing binding rates of most of the lectins as compared to healthy cells. In case of inflamed HUVEC at 100 pmol lectin/well the cell-associated RFI of UEA-I, STL, and LCA decreased by about 51%, 28%, and 42%, respectively (Fig. 1A and 1D); in case of immortalized HUVEctert, the binding rates of WGA, STL, and LCA decreased by about 23%, 31%, and 26%, respectively (Fig.1B and 1E). In contrast, the cell-associated fluorescence of WGA to inflamed HUVEC increased by about 24% as compared to healthy

endothelial cells; thus the order of binding capacity of lectins was altered according to: WGA > UEA-I ~ STL ~ LCA >> PNA > DBA. Similarly, in case of HUVECTert a reversed ranking of WGA and UEA-I was observed changing the lectin-binding order to UEA-I > WGA > STL > LCA >> PNA ~ DBA. At this, after activation with TNF- α , only the fluorescence of cell-associated UEA-I slightly increased by about 4% at 100 pmol per well. In order to elucidate the changes in lectin binding upon inflammation in more detail binding studies were repeated with lectins of high binding capacity at a lower concentration range from 1.56 to 12.5 pmol each well. Interestingly, no significant differences in RFI of WGA and UEA-I were detectable between inflamed and non-inflamed HUVEC and HUVECTert (Fig. 2). However, LCA-binding to HUVEC decreased slightly by about 16%.

The results of saturation analysis of lectin binding to endothelial cells were confirmed qualitatively by fluorescence microscopy (Fig. 3). Due to the strong interaction of the cell surfaces with WGA, UEA-I and STL, the apical membranes of HUVEC monolayer were intensely stained. In accordance with the rather weak interaction of PNA and DBA with the cells, fluorescent staining was not observed. Moreover, due to the temperature of pre-incubation with lectins (at 4°C), the metabolic activity of cells was minimized. Therefore, internalization of cell-bound lectins was not observed. HUVECTert and HMEC-1 yielded similar images like HUVEC (pictures not shown). Additionally, no signs of lectin mediated cytotoxicity were observed at the concentrations applied.

Specificity of the lectin-cell interaction

The specificity of the interaction between plant lectins and human endothelial cell was verified by competitive inhibition with complementary carbohydrates (Table 1). Depending on the amount of the complementary carbohydrate added, the carbohydrate binding domain of the lectin is blocked partially and inhibited from binding to the cell membrane. Due to their high binding capacity to endothelial cells WGA, UEA-I and LCA were chosen for inhibition experiments.

Generally, an increasing concentration of corresponding carbohydrate led to a decrease of lectin binding to the cell surface (Table 2). At the highest carbohydrate concentration applied, the extent of specific binding of all three lectins exceeded 80%. Whereas less than 10% of WGA and UEA-I binding to the endothelial glycocalyx was due to non-specific interactions, this extent increased to about 20% in case of LCA indicating lower specificity.

In case of microvascular HMEC-1 cells, the inhibition rates of both, WGA and UEA-I, were slightly lower than those of macrovascular HUVEC and HUVECTert exhibiting a similar level of specific binding. LCA, however, exhibited almost the same specificity of interaction with all types of

endothelial cells. Inflammation of HUVEC and HUVEctert provoked no significant difference in inhibition of WGA and UEA-I binding as indicated by a mean IC_{50} of $0.0024 \pm$ (WGA) and $0.1000 \pm$ (UEA-I). Interestingly, after inflammation of HUVEC, the IC_{50} value of LCA decreased significantly to 24% of that of non-inflamed tissue.

Evaluation of the interaction between WGA and erythrocytes from different blood groups

Due to the high affinity and specificity of the interaction between WGA and endothelial cells as observed above, the effect of WGA on agglutination of erythrocytes was investigated. UEA-I also exhibited high affinity to endothelial cells. However, due to its blood-group specificity in contrast to WGA, which is non-specific for any blood group [24], it was excluded from the agglutination tests.

Upon incubation with increasing amounts of WGA, the percentage of aggregated erythrocytes of the whole population increased concurrently independent of the blood group (Fig. 4). According to flow cytometric analysis in presence of $31.25 - 125 \mu\text{g WGA mL}^{-1}$ more than 1% of the whole blood cells were aggregated. This percentage was significantly higher than that of control samples and independent from the blood group. The same results were obtained by directly counting the number of cell aggregates on microscopic images. At the highest WGA-level ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$) huge aggregates were clearly observed (Figure 5). With decreasing amounts of WGA the size of the erythrocytes clumps concurrently decreased, but still several small aggregates were observed. At $31.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA, at least 2.1 aggregates were detected on each image in the case of blood groups A and O, and at least 0.5 aggregates were observed in case of blood group B (Table 3). In contrast, up to a WGA-concentration of $15.88 \mu\text{g mL}^{-1}$, an almost constant amount of $0.13 \pm 0.06\%$ aggregated blood cells independent from the blood group was determined. This value was not significantly different from the control samples without WGA amounting to $0.13 \pm 0.03\%$ (Fig. 4). Moreover, microscopic analysis yielded similar results (Table 3). About 0.1 ± 0.2 aggregates of blood cells per image were observed in presence of $\geq 15.88 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA as compared with 0.0 ± 0.2 aggregates in controls without lectin.

Interestingly, on microscopic images of blood group A in presence of $15.88 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA a very few doublets were observed (Figure 6). However, these clumps cannot be clearly distinguished from pseudo-aggregates, which might be due to overlapping of two cells or the rouleau effect of blood cells [25]. Although the aggregation was reversible, these pseudo-aggregates were scored as aggregates to adhere to strict criteria. At the next concentration level of $7.94 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA no

aggregation was observed like in control samples without WGA. The microscopic images of cells from blood group B and O revealed the same results (data not shown).

Discussion

In order to systematically characterize the glycosylation pattern of human endothelial cells, binding studies with a panel of lectins with different carbohydrate specificities were performed using their fluorescein-labeled analogues. For quantitative comparability of the results and to elucidate the sugar pattern of endothelial cells, it is assumed that each lectin binds only one specific carbohydrate residue. For instance, WGA is a dimeric protein containing four hevein domains as binding pockets for carbohydrates [26]. However, due to steric inaccessibility and different carbohydrate affinities [27], the molar binding ratio between WGA and glycosyl residues on the cell membrane can be limited to 1:1 even in case of cell monolayers. Additionally, the CyQuant® test assessing the cell number of the monolayer revealed no significant difference in cell numbers for all types of endothelial monolayers under investigation (supplementary appendix: Figure 2). Moreover, the RFI was related to an apparent fluorescein/protein ratio of 1:1. Altogether, the ratios of detected RFI between different lectins represent the difference in glycosylation pattern of human endothelial cell monolayer.

According to the results, the glycocalyx of endothelial cells is characterized by high amounts of N-acetylglucosamine, sialic acid, fucosyl- and mannosyl residues and minor amounts of galactosamine- and N-acetyl-galactosamine-residues. These quantitative fluorimetric results are confirmed qualitatively by fluorescence microscopy (Fig. 3). The membrane of endothelial cells was intensely stained by WGA and UEA-I, followed by STL and LCA, whereas PNA and DBA-staining was almost invisible. However, the glycosylation patterns of macrovascular HUVECs and HUVEctert varied slightly probably due to immortalization. In the case of HUVECs, the carbohydrate pattern followed the order: fucose > N-acetylglucosamine and sialic acid ~ mannose >> galactosamine > N-acetyl-galactosamine. In contrast, HUVEctert contain about 5% less fucosyl residues than N-acetylglucosamine and sialic acid, as well as an approximately 46% lower amount of mannosyl structures than their primary cells. Interestingly, although WGA and STL possess similar carbohydrate specificity, the binding rate of WGA to the HUVEctert was significantly higher than that of STL. This might be due to the presence of sialic acid residues, which exclusively interact with WGA and not STL. Thus, the higher content of sialic acid residues might be due to immortalization. Comparison of the glycosylation pattern of macrovascular HUVECs and HUVEctert with HMEC-1 cell line of microvascular origin reveals a considerably lower lectin affinity to HMEC-1. HMEC-1 cells contain about 50% of fucosyl, N-acetylglucosamine and sialic acid residues, and rather less than 20% mannosyl structures at their surface as compared to HUVEC.

Nigel J. Klein postulated that inflammation by TNF- α leads to an alteration in the glycosylation pattern on the endothelial cell surface [28]. According to the increase in WGA binding and the decrease in STL binding inflammation of primary macrovascular HUVEC provokes appearance of about 24% more sialic acid residues. However, in HUVEctert no numerical alteration of sialic acid structures was observed. In case of UEA-I, only after TNF- α activation of HUVEctert the binding rates slightly increased by about 4 $\pm$ % indicating easier accessible fucosyl residues. In HUVEC, however, the number of accessible fucosyl residues decreased by about 51% upon inflammation. Additionally, mannosylation corresponding to LCA-binding was decreased in both inflamed HUVEC and HUVEctert. At the first sight this observation is contradictory to results of increased mannose-mediated Concanavalin A (ConA)-binding after TNF- α stimulation [29-32]. However, it should be considered, although both ConA and LCA are mannose-binding legume lectins [26], that ConA possesses the strongest affinity to D-mannose at all [33]. Moreover, for a high affinity binding between LCA and glycans the presence of one fucosyl residue and two α -mannosyl residues are necessary [34]. Consequently, an increase in ConA binding not absolutely means an increase of LCA binding. Moreover, a decrease in LCA binding might not be only due to decreased mannosylation, but might also originate from reduced fucosyl residues. This additive effect might provoke the 42% decrease of LCA binding to inflamed HUVEC together with the 51% decrease of fucosylation in comparison to a 26% decrease of LCA binding to inflamed HUVEctert together with a 4% increase in fucosyl residues. In addition, although Chacko and Scott both have reported increased LCA binding to endothelial cells after TNF- α stimulation, it should be considered that human aortic endothelial cells and HUVEC purchased from ATCC were used in their studies [31, 32]. Since these two types of endothelial cells might be different from the HUVEC used in present study, which were isolated immediately after birth from the umbilical vein and represent macrovascular cells, the glycosylation patterns might differ.

According to competitive inhibition tests using complementary carbohydrates, WGA and UEA-I exhibited the highest binding specificity yielding up to 95% inhibition. In case of LCA the maximum level of inhibition was up to 83% indicating higher contribution of non-specific binding. However, the affinity of lectins to the glycocalyx on the surface of endothelial cells is quite different. According to the IC₅₀ values, WGA possesses the highest binding affinity being up to 50-fold and 4000-fold higher than that of UEA-I and LCA, respectively (Table 2). Interestingly, after inflammation the binding specificity and binding affinity of WGA and UEA-I were not altered; however, in case of LCA, the IC₅₀ value decreased significantly after TNF- α activation representing an increased binding affinity to glycosylated moieties on the cell surface of HUVECs.

Due to the outstanding binding rate and binding affinity of WGA to endothelial cells especially after inflammation, it might be beneficial for therapy to develop WGA-grafted microcarriers as drug delivery systems for parenteral administration. However, Carlier, Stinissen and Peumans already discussed in 1982 [35] that wheat germ agglutinin represents a plant lectin that agglutinates human and animal erythrocytes. Nevertheless, it might be interesting to elucidate in detail the prerequisites, especially the dose of WGA necessary for red blood cell agglutination. Flow cytometry and microscopic evaluation confirmed that $15.88 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA is the limiting concentration for the agglutination of erythrocytes. Independent from the blood group no cell aggregates were observed up to this WGA concentration as compared to whole blood alone. Furthermore, Delmotte et al. reported that the minimum concentration of WGA required to agglutinate horse blood is $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA [36], which is in the range of the observed threshold of $15.88 \mu\text{g mL}^{-1}$ human blood. According to a rough calculation this limiting concentration of WGA corresponds to binding of 50000 WGA molecules per erythrocyte. Considering the maximum WGA-density at the surface of $3 \mu\text{m}$ PLGA-microparticles (unpublished data), agglutination of erythrocytes is supposed to occur only when the ratio between erythrocytes and microparticles exceeds 4. As administration of such extraordinary high amounts of WGA-grafted microparticles is neither reasonable nor required for efficacy, the concept of using WGA for prolonged drug delivery might be feasible. Moreover, it should be considered that this study was performed under static conditions. However, *in vivo* flow conditions are prevailing attaining shear rates up to 4000 s^{-1} , which might strongly reduce the agglutination tendency of erythrocytes, immediately strongly dilute the applied dose, and consequently might even increase this limiting concentration of WGA. Nevertheless, it should be also considered that factors like age and gender might affect such agglutination process.

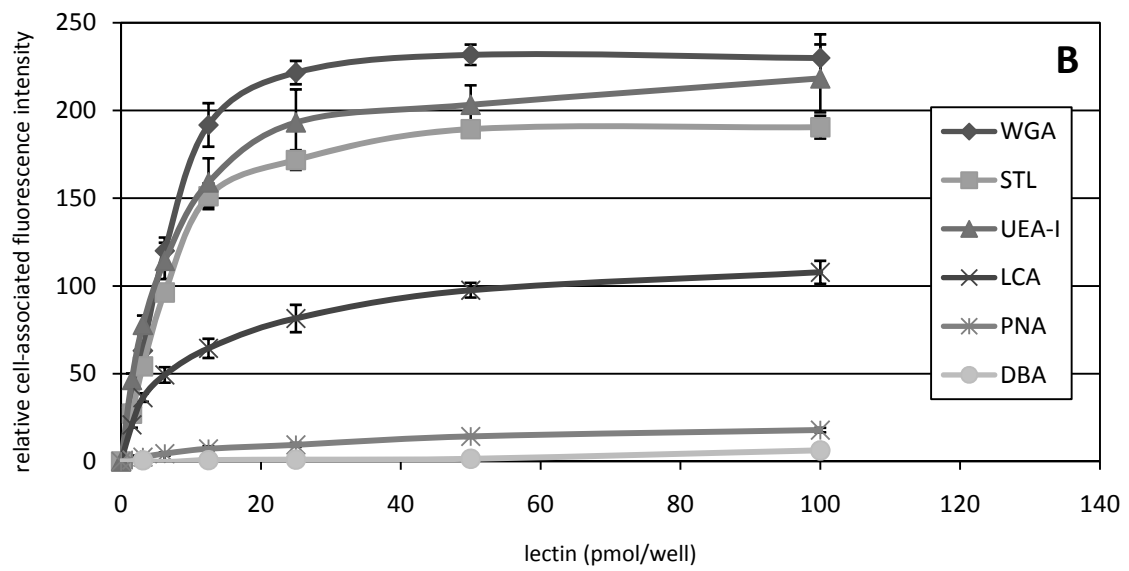
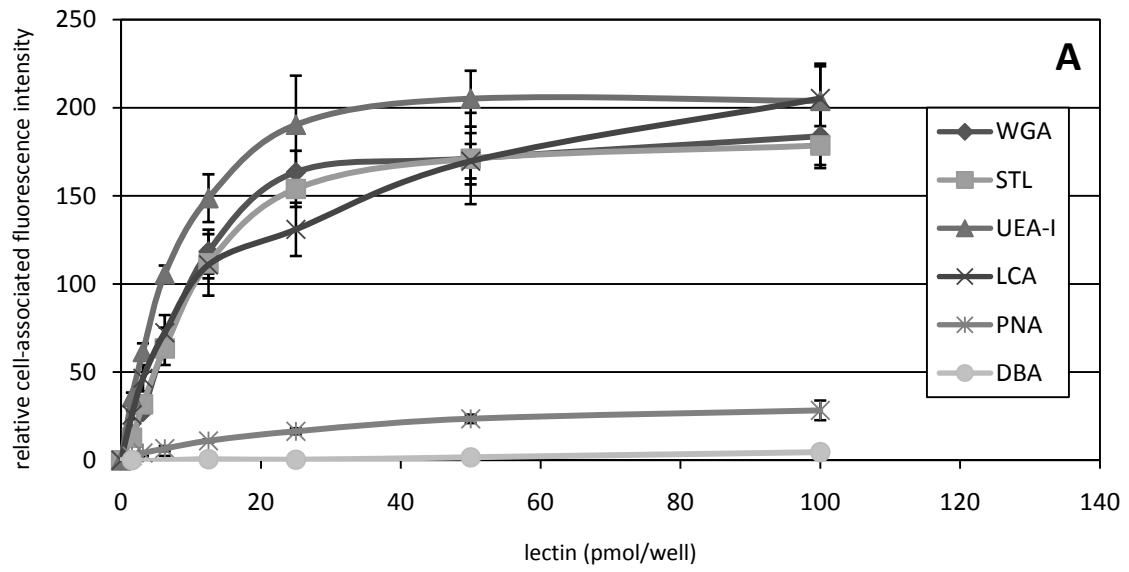
To sum up, this study confirms that sialic acid, N-acetylglucosamine, and fucosyl residues are predominant structures in the glycocalyx of endothelial cells. Especially, upon inflammation by $\text{TNF-}\alpha$ stimulation the increase of sialic acid structures leads to increasing WGA-binding to primary HUVEC. Moreover, the sugar inhibition study proved high specificity of the interaction between WGA and endothelial cells. In addition, up to a concentration of $15.88 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA exerted no agglutinating effects on blood cells. Thus, this threshold might be the maximum amount for administration of WGA for targeted drug delivery. All in all, the high binding rate and affinity of WGA to endothelial cells, as well as its rather high concentration necessary to agglutinate erythrocytes open new perspectives for glycotargeting in pharmaceuticals.

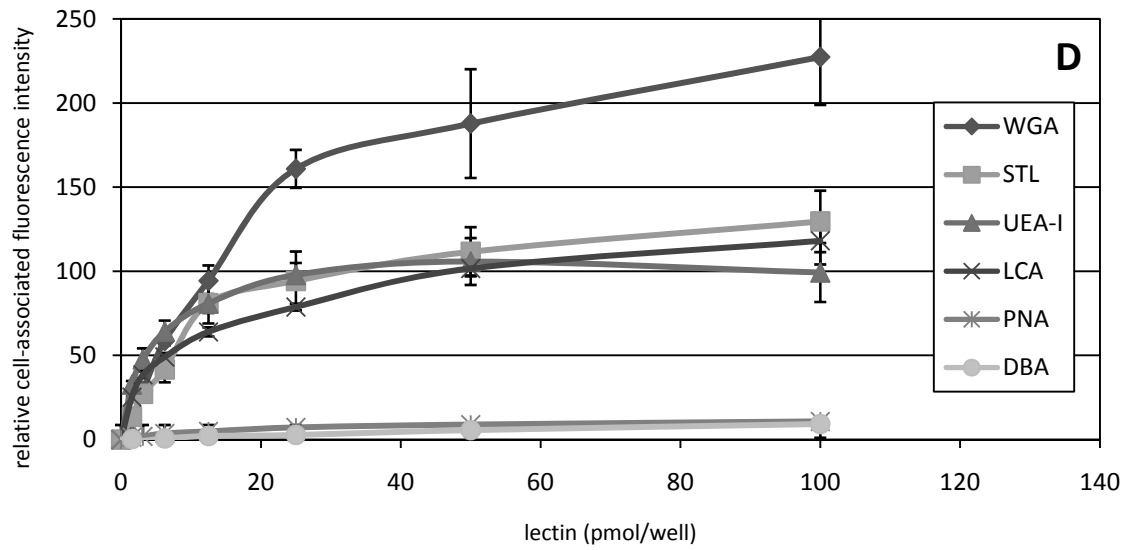
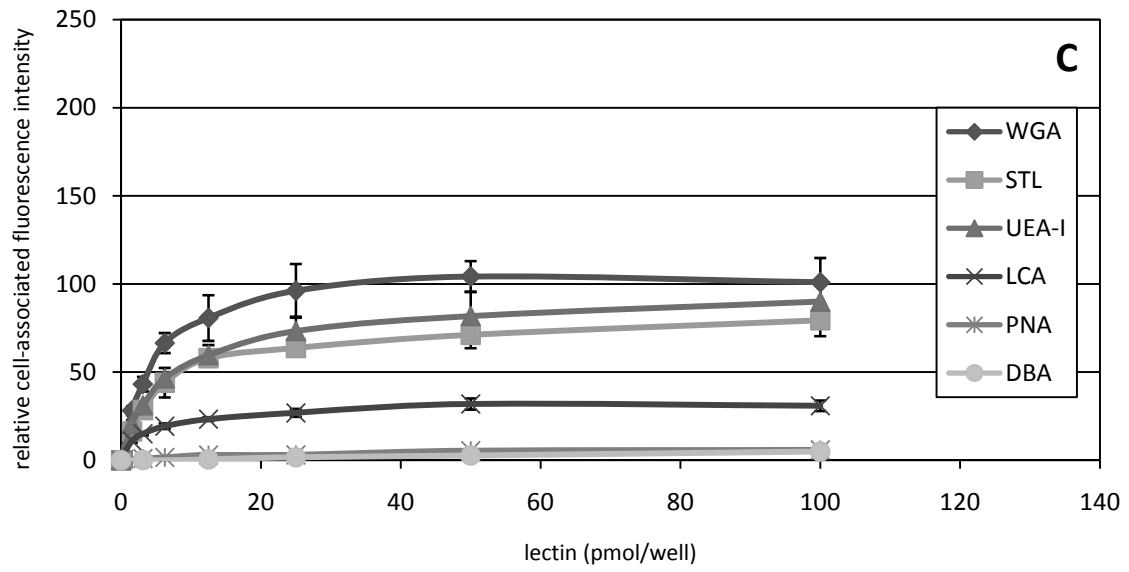
References

- [1] Scott DW, Patel RP. 2013. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: Implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology* 23:622-633.
- [2] Skutelsky E, Rudich Z, Danon D. 1975. Surface charge properties of the luminal front of blood vessel walls: An electron microscopical analysis. *Thromb Res.* 7:623–634.
- [3] Simionescu M, Simionescu N, Palade GE. 1982. Differentiated microdomains on the luminal surface of capillary endothelium: Distribution of lectin receptors. *J Cell Biol.* 94:406–413.
- [4] Squire JM, Chew M, Nneji G, Neal C, Barry J, Micheal C. 2001. Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering? *J. Struct. Biol.* 136:239-255.
- [5] Vink H, Duling BR. 1996. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ. Res.* 79:581-589.
- [6] Gao L, Lipowsky HH. 2009. Measurement of solute transport in the endothelial glycocalyx using indicator dilution techniques. *Ann. Biomed. Eng.* 37:1781-1795.
- [7] Potter DR, Damiano ER. 2008. The hydrodynamically relevant endothelial cell glycocalyx observed *in vivo* is absent *in vitro*. *Circ. Res.* 102:770-776.
- [8] Smith ML, Long DS, Damiano ER, Ley K. 2003. Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules *in vivo*. *Biophys. J.* 85:637-645.
- [9] Smolkova D, Zavadka A, Bankston P, Lutsyk A. 2001. Cellular heterogeneity of rat vascular endothelium as detected by HPA and GS I lectin-gold probes. *Med. Sci. Monit.* 7:659-668.
- [10] Laitinen L. 1987. *Griffonia simplicifolia* lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem J.* 19:225-234.
- [11] Jilani SM, Murphy TJ, Thai SN, Eichmann A, Alva JA, Iruela-Arispe ML. 2003. Selective binding of lectins to embryonic chicken vasculature. *J. Histochem. Cytochem.* 51:597-604.
- [12] Holthofer H, Virtanen I, Kariniemi AL, Hormia M, Linder E, Miettinen A. 1982. Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab. Invest.* 47:60-66.
- [13] Miettinen M, Holthofer H, Lehto VP, Miettinen A, Virtanen I. 1983. Ulex europaeus I lectin as a marker for tumors derived from endothelial cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 79:32-36.

- [14] Ordonez NG, Batsakis JG. 1984. Comparison of *Ulex europaeus* I lectin and factor VIII-related antigen in vascular lesions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108:129-132.
- [15] Roussel F, Dalion J. 1988. Lectins as markers of endothelial cells: Comparative study between human and animal cells. *Lab. Anim.* 22: 135-140.
- [16] Alroy J, Goyal V, Skutelsky E. 1987. Lectin histochemistry of mammalian endothelium. *Histochemistry.* 86:603-607.
- [17] Schiller HB, Szekeres A, Binder BR, Stockinger H, Leksa V. 2009. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor limits cell invasion by controlling α V β 3 integrin expression and proteolytic processing of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Mol. Biol. Cell.* 20:745-756.
- [18] Edes EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summer S, Bosse DC, Lawley TJ. 1992. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 99:683-690.
- [19] Gabor F, Stangl M, Wirth M. 1998. Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines Caco-2, HT-29 and HCT-8. *J. Control. Rel.* 55:131-142.
- [20] Gabor F, Klausegger U, Wirth M. 2001. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. *Int. J. Pharm.* 221:35-47.
- [21] Toegel S, Harrer N, Plattner VE, Unger FM, Viernstein H, Goldring MB, Gabor F, Wirth M. 2007. Lectin binding studies on C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocytes provide a basis for new tissue engineering and drug delivery perspectives in cartilage research. *J. Control. Release* 117:121-129.
- [22] Plattner VE, Wagner M, Ratzinger G, Gabor F, Wirth M. 2008. Targeted drug delivery: Binding and uptake of plant lectins using human 5637 bladder cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70:572-576.
- [23] Plattner VE, Ratzinger G, Engleder ET, Gallauner S, Gabor F, Wirth M. 2009. Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells upon differentiation and its impact on lectin-mediated drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73:324-330.
- [24] Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G, Montreuil J. 1981. Specificity of Twelve Lectins Towards Oligosaccharides and Glycopeptides Related to N-Glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* 117:41-55.
- [25] Samsel RW, Perelson AS. 1984. Kinetics of rouleau formation: II Reversible Reactions. *Biophys. J.* 45:805-824.

- [26] Van Damme EJM, Peumans WJ, Puzstai A, Bardocz S. 1997. *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. 1st ed. Chichester (UK): John Wiley & Sons.
- [27] Rini JM. 1995. Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:551-77.
- [28] Klein NJ, Shennan GI, Heyderman RS, Levin M. 1992. Alteration in glycosaminoglycan metabolism and surface charge on human umbilical vein endothelial cells induced by cytokines, endotoxin and neutrophils. *J. Cell Sci.* 102:821-832.
- [29] García-Vallejo JJ, Van Dijk W, Van Het Hof B, Van Die I, Engelse MA, Van Hinsbergh VW, Gringhuis SI. 2006. Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor- α results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. *J. Cell Physiol.* 206:203-10.
- [30] Peng Y, Li J, Geng M. 2010. The glycan profile of endothelial cells in the presence of tumor-conditioned medium and potential roles of beta-1,6-GlcNAc branching on HUVEC conformation. *Mol. Cell Biochem.* 340:143-52.
- [31] Chacko BK, Scott DW, Chandler RT, Patel RP. 2011. Endothelial surface N-glycans mediate monocyte adhesion and are targets for anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands. *J. Biol. Chem.* 286:38738-47.
- [32] Scott DW, Chen J, Chacko BK, Traylor JG Jr, Orr AW, Patel RP. 2012. Role of endothelial N-glycan mannose residues in monocyte recruitment during atherogenesis. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 32:e51-9.
- [33] Goldstein IJ, Poretz RD. 1986. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ, editors. *The lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Orlando (USA): Academic Press. p. 33-247.
- [34] Kornfeld K, Reitman ML, Kornfeld R. 1981. The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant. *J. Biol. Chem.* 256:6633-40.
- [35] Peumans WJ, Stinissen HM, Carlier AR. 1982. A genetic basis for the origin of six different isolectins in hexaploid wheat. *Planta.* 154:562-568.
- [36] Monsigny M, Roche AC, Sene C, Maget-Dana R, Delmotte F. 1980. Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? *Eur. J. Biochem.* 104:147-153.





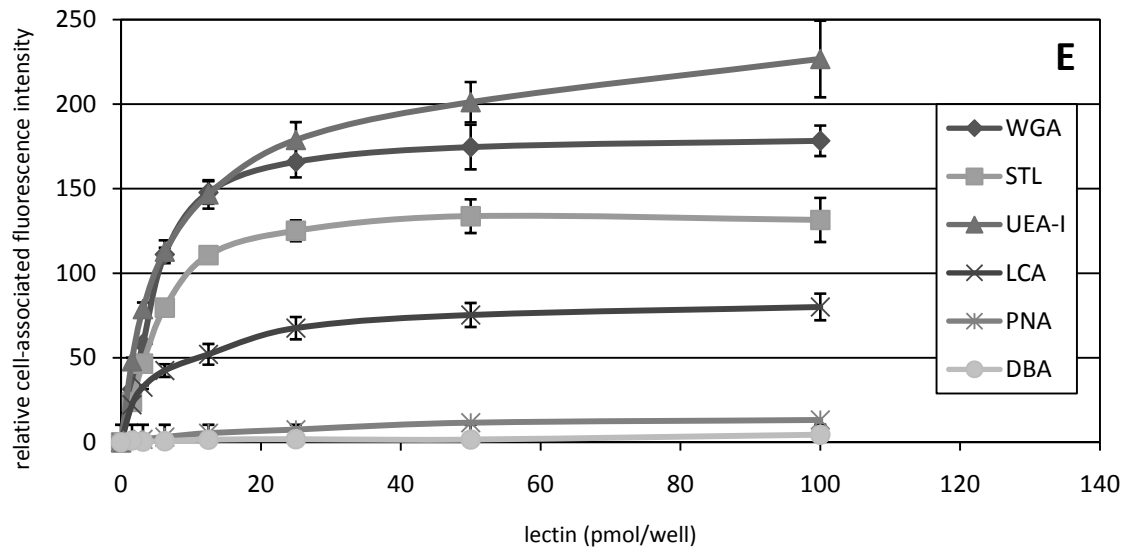


Figure 1: Lectin binding (1.56 – 100 pmol/well, serial dilutions) to endothelial monolayers at 4°C. The fluorescein-labeled lectins associated with the cell surface were related to an apparent F/P ratio of 1 (mean±SD, n=6). Monolayers of primary HUVECs(A), HUVEctert(B) and HMEC(C), as well as inflamed primary HUVECs(D) and HUVEctert(E) after TNF- α activation (0.5 ng/well over 4 hours at 37°C prior lectin binding).

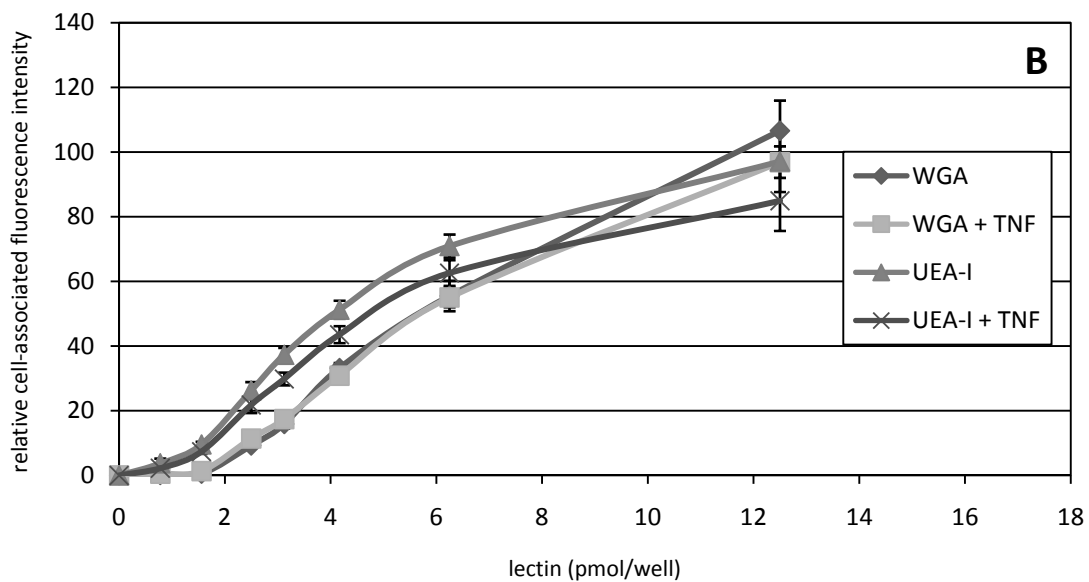
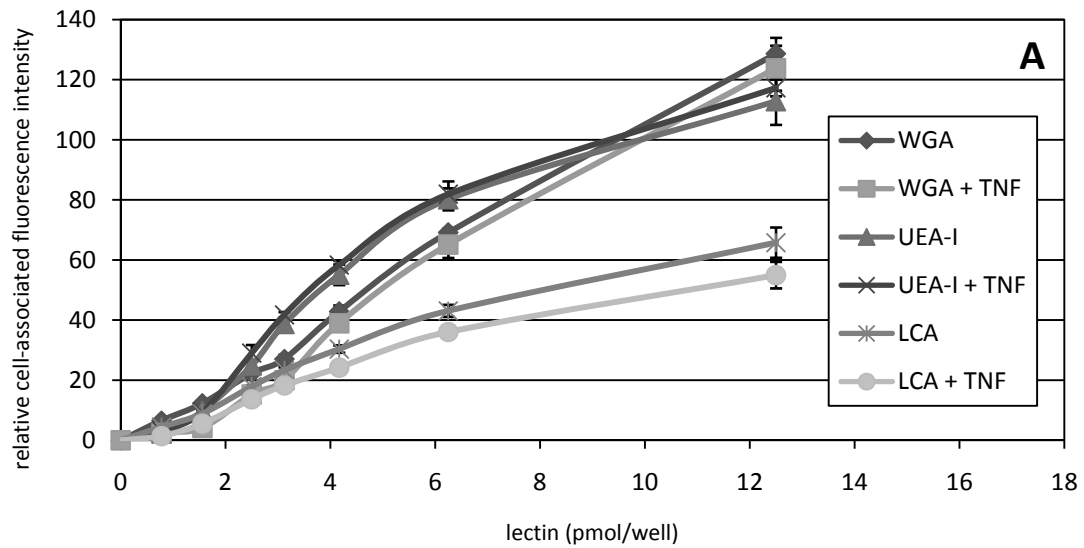


Figure 2: Lectin binding (1.56 – 12.5 pmol/well, serial dilutions) to endothelial cell monolayers at 4°C. The fluorescein-labelled lectins associated with the cell surface were related to an apparent F/P ratio of 1 (mean±SD, n=6). Monolayers of primary HUVECs(A) and HUVECTert(B) with and without TNF- α activation (0.5 ng/well over 4 hours at 37°C prior lectin binding).

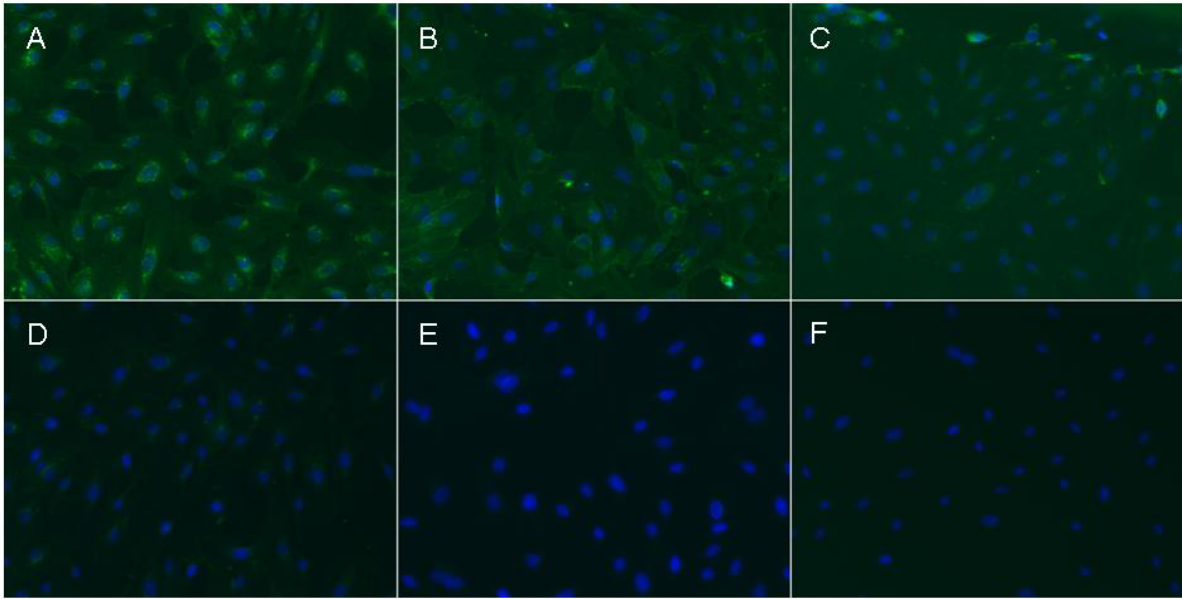


Figure 3: Fluorescence images of confluent primary HUVEC monolayer pre-incubated with fluorescein-labeled lectins (green) at 4°C for 30 min (A-F). The nuclei of cells were counterstained with Hoechst 3334 in blue. To compare fluorescence images, the length of exposure was correlated with the F/P-ratio of each lectin: WGA – 1.2sec (A), UEA – 1.7sec (B), STL – 2.0sec (C), LCA – 3.7sec (D), PNA – 5.1sec (E), DBA – 2.1sec (F).

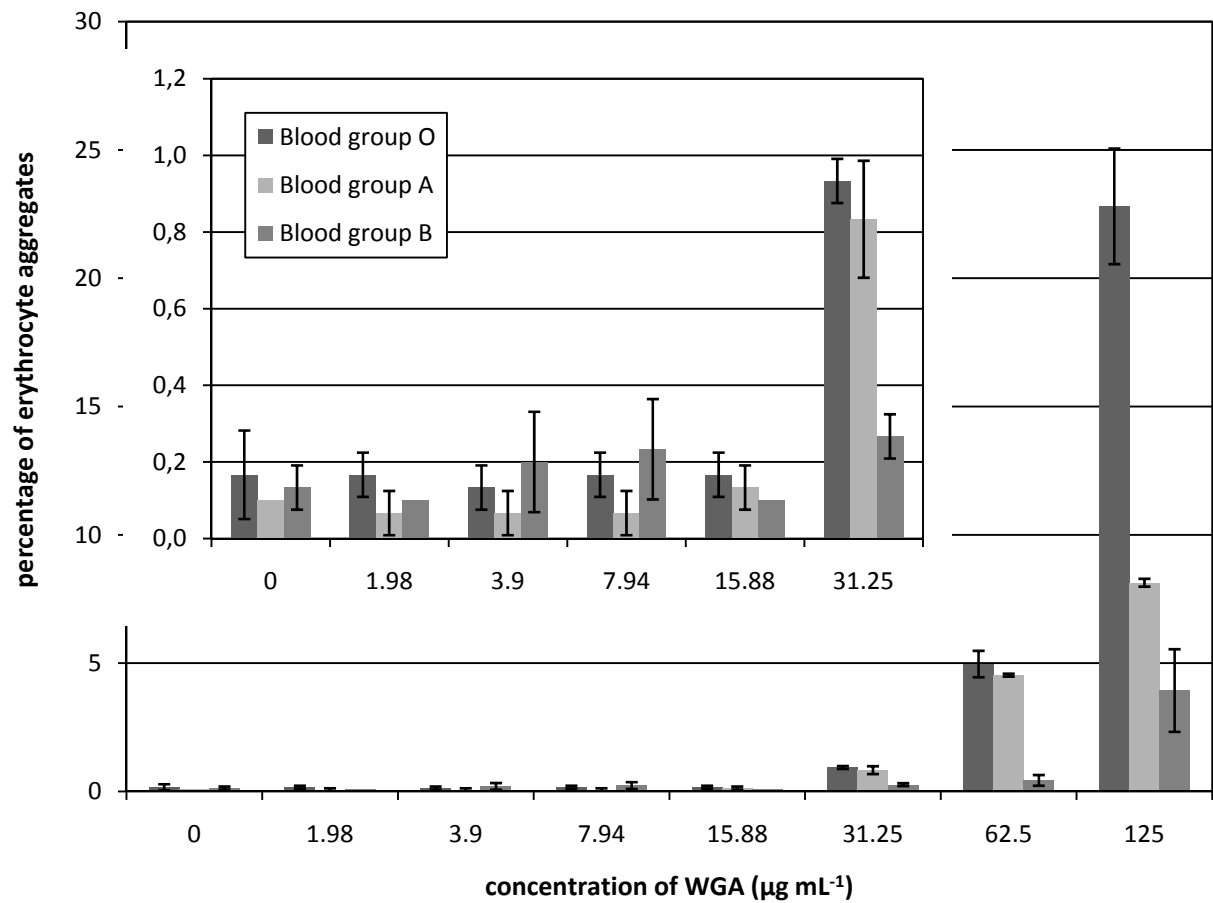


Figure 4: Percentage of aggregates in each sample related to the whole population including single cells, cell debris and cell aggregation determined by flow cytometry. Whole blood was incubated with WGA for 10min at 37°C before analysis of the diluted sample. The insert is a magnification of the results obtained in the range of 0 to 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ WGA (n = 3).

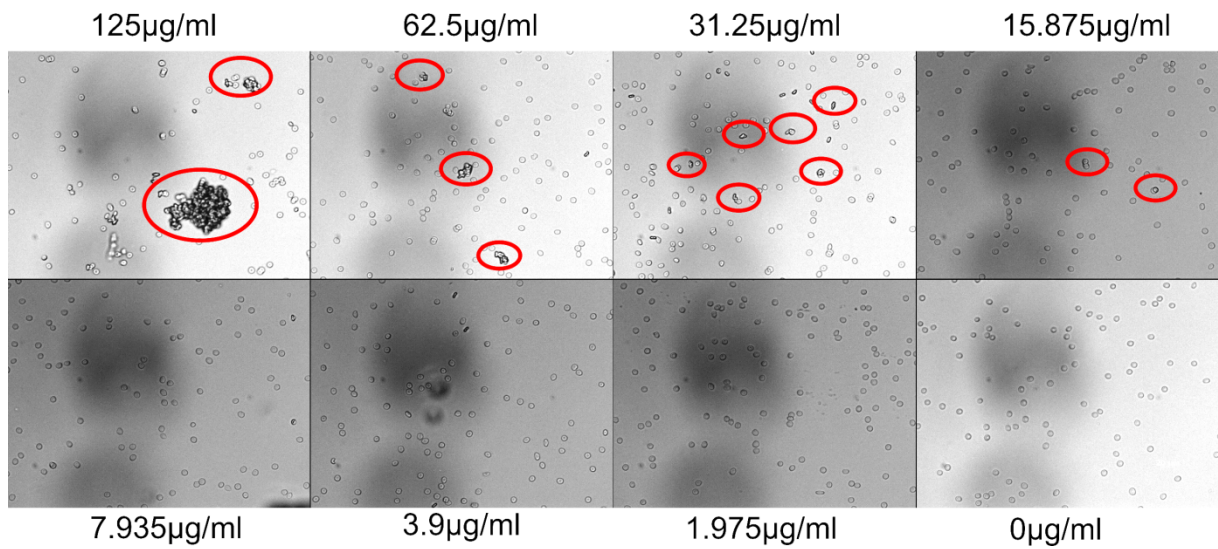


Figure 5: Microscopic images of erythrocytes from blood group A in presence of increasing amounts of WGA. Freshly drawn blood was incubated with WGA solution for 10min at 37°C. and the images were acquired after 150-fold dilution. Samples without WGA solution served as a control. Red circles indicate agglomerates of blood cells. The huge grey shadows are dirt in the light pass of microscope, and are not aggregates of cells.

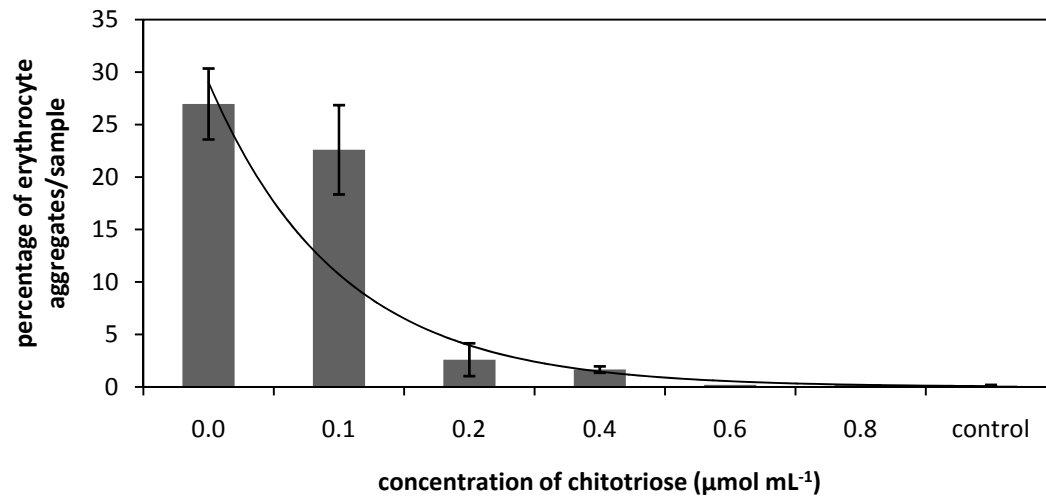


Figure 6: Competitive inhibition of WGA-binding to erythrocytes of blood group O by addition of increasing amounts of the complementary carbohydrate chitotriose. Blood samples without addition of sugar and WGA served as controls (mean $\pm$ SD, n=3).

Table 1

Lectin	Molecular Weight (Da)	F/P	Carbohydrate specificity	Inhibitory sugar	Sugar added (μmol/sample)
WGA	36,000	2.9	N-acetyl-D-glucosamine, sialic acid	Chitotriose	0.0005-0.01
UEA-I	63,000	2.7	α-L-fucose	L-fucose	0.05-5
LCA	49,000	3.8	α-mannose, α-glucose, α- N-acetyl-D-glucosamine	D-mannose	0.25-30
STL	100,000	3.1	N-acetyl-D-glucosamine	Chitotriose	n.d.
PNA	110,000	5.2	β-D-galactose-N-acetyl-D-glucosamine, β-D-galactosamine, galactose	D-galactosamine	n.d.
DBA	120,000	2.2	α- N-acetyl-D-galactosamine, galactose	N-acetyl-D-galactosamine	n.d.

Table 1: Characteristics of plant lectins and concentrations of complementary sugars applied in the inhibition assays (F/P = fluorescein/protein ratio; n.d.= not determined).

Table 2: Competitive inhibition of lectin binding (12.5pmol/reaction) to endothelial monolayer by the addition of increasing amounts of complementary carbohydrate.

		HUVEC prim	HUVEC prim + TNF- α	HUVEC tert	HUVEC tert + TNF- α	HMEC 2
Lectin + inhibitory sugar	Sugar (μ mol/sample)	Inhibition %				
WGA + Chitotriose	0.01	95.31 $\pm$ 0.56	94.47 $\pm$ 2.65	94.08 $\pm$ 0.51	94.32 $\pm$ 1.0	91.16 $\pm$ 0.91
	0.005	83.05 $\pm$ 1.41	82.42 $\pm$ 2.77	82.19 $\pm$ 0.77	86.30 $\pm$ 1.11	73.65 $\pm$ 2.59
	0.002	41.68 $\pm$ 1.82	42.31 $\pm$ 4.06	38.54 $\pm$ 1.73	48.36 $\pm$ 5.66	27.11 $\pm$ 4.37
	0.001	22.94 $\pm$ 1.81	21.39 $\pm$ 4.09	16.64 $\pm$ 1.98	22.16 $\pm$ 3.83	14.10 $\pm$ 4.39
	0.0005	14.36 $\pm$ 3.15	16.54 $\pm$ 4.31	9.69 $\pm$ 3.11	9.21 $\pm$ 5.30	7.24 $\pm$ 6.28
	IC ₅₀ (μ mol)	0.002	0.002	0.003	0.002	0.003
UEA-I + L-Fucose	5	93.18 $\pm$ 0.21	93.75 $\pm$ 1.31	95.55 $\pm$ 0.98	94.28 $\pm$ 1.30	92.56 $\pm$ 1.10
	1	90.00 $\pm$ 1.86	91.51 $\pm$ 0.77	92.10 $\pm$ 1.19	92.17 $\pm$ 1.28	89.50 $\pm$ 0.88
	0.5	81.36 $\pm$ 2.68	81.48 $\pm$ 1.62	86.01 $\pm$ 1.70	83.32 $\pm$ 1.76	78.41 $\pm$ 2.44
	0.25	70.91 $\pm$ 1.67	66.13 $\pm$ 1.94	70.57 $\pm$ 2.80	69.46 $\pm$ 1.27	64.41 $\pm$ 3.23
	0.1	52.88 $\pm$ 3.42	47.84 $\pm$ 3.50	50.86 $\pm$ 1.88	48.00 $\pm$ 2.30	40.55 $\pm$ 1.97
	0.05	36.67 $\pm$ 5.09	30.09 $\pm$ 5.66	28.06 $\pm$ 4.06	32.42 $\pm$ 4.82	28.74 $\pm$ 3.33
	IC ₅₀ (μ mol)	0.094	0.101	0.097	0.109	0.144
LCA + D-Mannose	30	80.58 $\pm$ 0.73	81.11 $\pm$ 1.22	83.08 $\pm$ 1.10	80.39 $\pm$ 1.91	82.08 $\pm$ 1.86
	10	55.43 $\pm$ 0.93	81.25 $\pm$ 1.27	60.68 $\pm$ 1.32	60.08 $\pm$ 1.50	68.60 $\pm$ 1.56
	5	34.63 $\pm$ 1.04	71.53 $\pm$ 1.23	46.44 $\pm$ 1.12	44.53 $\pm$ 1.37	43.16 $\pm$ 3.33
	1	6.21 $\pm$ 2.1	33.61 $\pm$ 2.64	19.58 $\pm$ 2.83	9.94 $\pm$ 1.10	15.41 $\pm$ 1.95
	0.5	2.17 $\pm$ 1.18	21.66 $\pm$ 1.05	9.64 $\pm$ 1.13	7.84 $\pm$ 2.04	9.24 $\pm$ 2.39
	0.25	0.31 $\pm$ 1.77	8.61 $\pm$ 1.46	1.92 $\pm$ 2.85	1.81 $\pm$ 2.34	3.07 $\pm$ 4.24
	IC ₅₀ (μ mol)	8.345	2.005	5.946	6.381	6.024

Endothelial monolayers were incubated with lectin (12.5 pmol/well) and serial dilutions of complementary carbohydrate for 30min at 4°C. Data are presented as percentage of inhibition (mean $\pm$ SD, n=3) in comparison to the positive control without carbohydrates, representing 100% binding or 0% inhibition. IC₅₀ values represent the amount of corresponding sugars needed to half-inhibit lectin binding to the cell surface.

Table 3

Number of cell aggregates in whole blood samples after WGA-incubation

	Blood group A	Blood group B	Blood group O
Concentration of lectin ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Number of cell aggregates / image		
125	14.0 $\pm$ 3.7	10.4 $\pm$ 5.2	2.5 $\pm$ 1.4
62.5	8.6 $\pm$ 3.6	6.1 $\pm$ 1.7	0.9 $\pm$ 0.8
31.25	2.1 $\pm$ 0.9	2.1 $\pm$ 1.2	0.5 $\pm$ 0.8
15.88	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.6	0.1 $\pm$ 0.3
7.94	0.1 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.7	0.0 $\pm$ 0.2
3.9	0.0 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.0
1.98	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 0.1
control	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.2

Freshly drawn blood was mixed with WGA-solution and incubated for 10min at 37°C. Microscopic images were acquired immediately after 150-fold dilution. The average number of cell aggregates was calculated after manually counting (mean $\pm$ SD, n=30).

Supplementary Appendix

Figure S1. Lectin binding studies to endothelial single cells

To study lectin binding, single cells were harvested by trypsination, collected by centrifugation and resuspended in PBS buffer supplemented with Ca^{2+} and Mg^{2+} to reach a final concentration of 5×10^6 cells mL^{-1} . Afterwards 50 μL single cell suspension were added to 50 μL lectin solution in precooled buffer (0.8 - 6.25 pmol, serial dilutions) and incubated for 5 min. at 4°C . Unbound lectins were removed by washing twice with 400 μL cold buffer each. Finally, 100 μL cell suspension was diluted with 500 μL pre-cooled particle free buffer and the cell-bound mean fluorescence intensity (MFI) was determined flow cytometrically at 488/525 nm (Epics XL-MCL analytical flow cytometer, Beckman Coulter, Miami, USA). A forward versus side scatter gate was used to confine the analysis to the single cell population and a minimum of 5000 cells was accumulated for each analysis. For estimation of autofluorescence, control samples containing unlabelled cells were included in all experiments.

Single endothelial cells are highly sensitive and viability decreases upon external stimuli in comparison to monolayers. Thus flow cytometric analysis of lectin binding was performed only with non-activated primary HUVEC and HUVEctert in the concentration range of 0.8-6.25pmol lectin/ 2.5×10^5 cells (Figure S1, $\text{SD} \leq 2.84$, $n=3$). STL was excluded because of binding characteristics similar to WGA. In case of primary HUVEC single cells lectin binding was highest in case of WGA exhibiting a RFI up to 28.59 ± 0.64 , followed by UEA-I > LCA >> PNA ~ DBA (Figure S1A). In case of HUVEctert, the lectin interaction was highest in case of UEA-I in the concentration range between 0.8 to 3.125 pmol. However, at the concentration of 6.25pmol the RFI of both WGA and UEA-I was about 25, followed by LCA >> DBA ~ PNA. In contrast, UEA-I exhibited a higher binding rate to endothelial monolayers of primary HUVEC in the same concentration range (Figure 2A). This might be due to differences in accessible binding area between single cells and monolayers. While the lectins have the access to the whole cell membrane in the case of single cells, only the apical face of cell monolayers or roughly a sixth is available for the interaction with lectins.

Moreover, as demonstrated by fluorescence microscopic images of WGA-binding (12.5pmol/ 2.5×10^5 cells) to single primary HUVECs (30 min incubation-time at 4°C , Figure S1C), a homogeneous distribution of cell bound WGA throughout the entire membrane of primary HUVECs was observed. Due to the temperature level during preincubation with lectins (at 4°C), the metabolic activity of cells was minimized. Therefore, no internalization of cell-bound lectins was observed. HUVEctert and HMEC-1 revealed the similar profiles like primary HUVECs (data not shown). No sign of lectin mediated cytotoxicity was observed in the concentration tested.

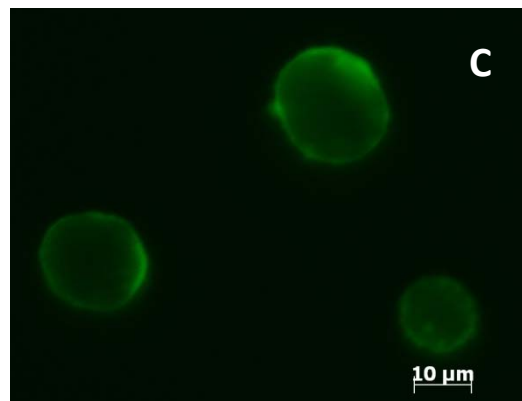
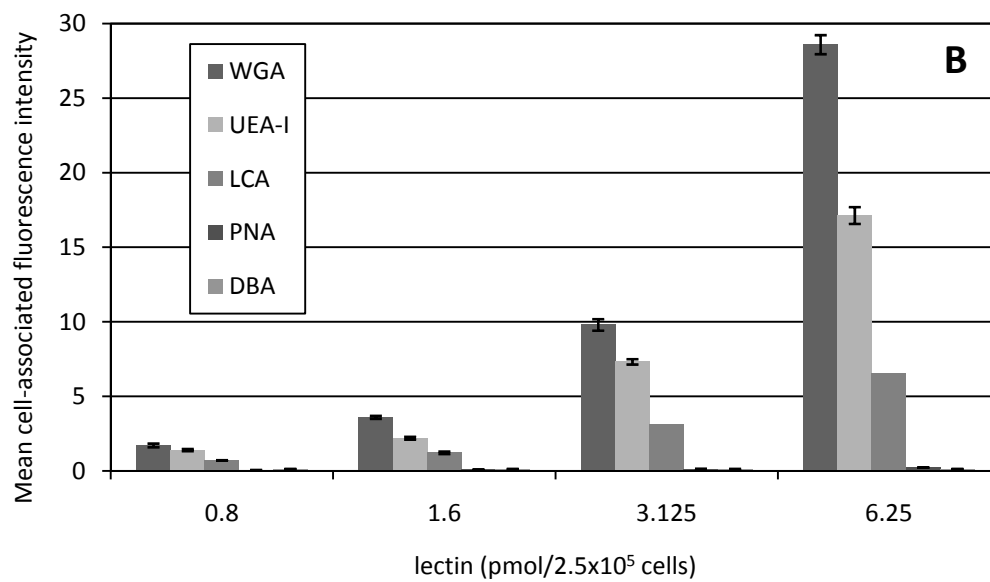
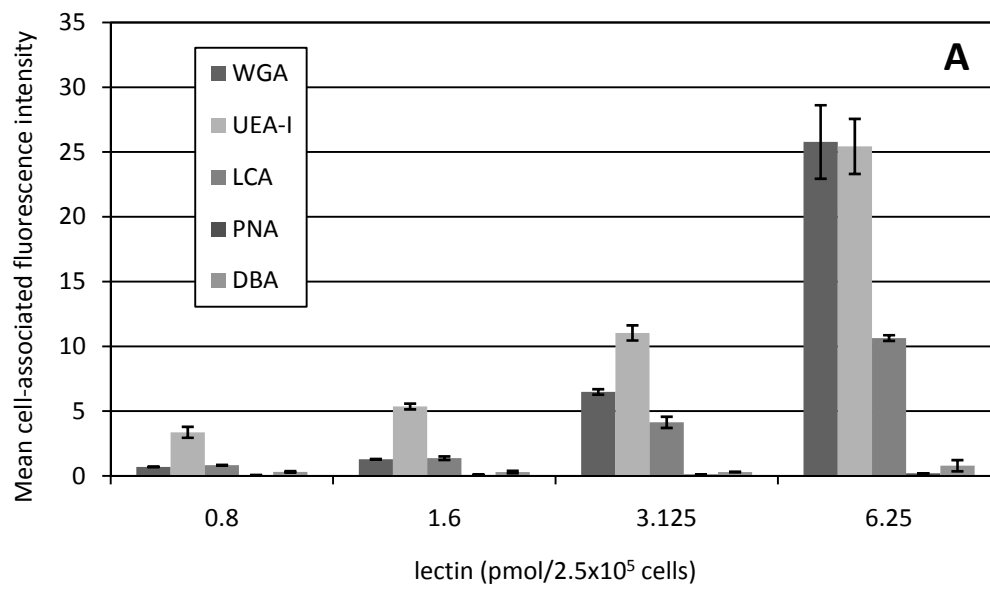
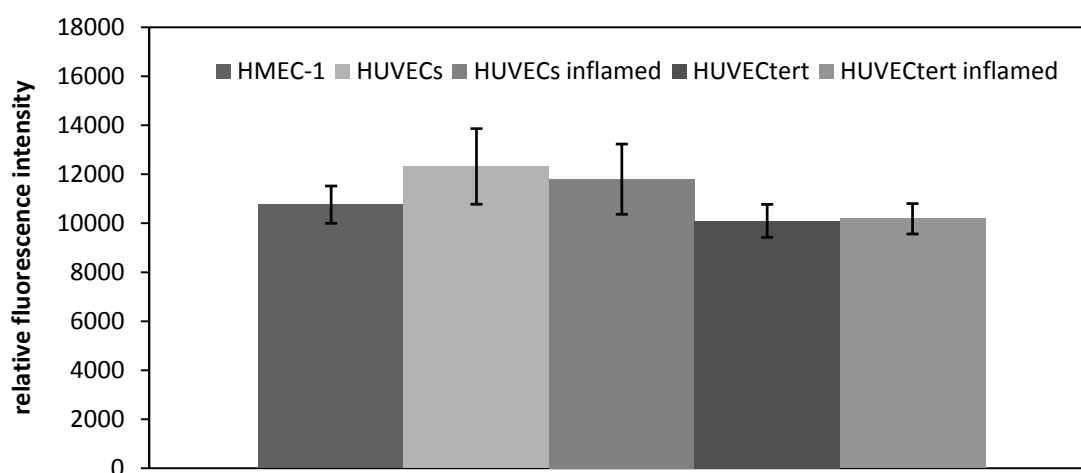


Figure S2. CyQuant® cell proliferation test

To estimate of the cell number of activated and non activated endothelial cells, a cell proliferation test (CyQuant®) was performed. For that purpose, endothelial cells were seeded in 96-well microplates at a density of 1.7×10^4 single cells/160 μ L per well and cultivated at 37°C in humidified 5% CO₂ / 95% air atmosphere until confluency. After removal of the medium, 50 μ L reagent I (25 μ L 20mM HEPES pH 7 and 25 μ L Celllytic-M) were added to confluent monolayers with or without TNF- α activation. In case of inflamed cells, the monolayers were preincubated with TNF- α at a concentration of 0.5 ng/50 μ L in cell culture medium for 4 hours at 37°C. After 15 min. incubation at room temperature 150 μ L reagent II containing CyQuant GR (0.33%), Celllysis buffer (5.0%) and distilled water (95%) were added and the RFI was determined in a microplate reader (excitation: 485nm; emission: 535 nm). Samples of reagents without cells served as a control. As shown in figure S2, no significant changes in cell number during inflammation could be observed. (n=18, SD $\leq$ 1544.37)



IV. Anhang B – erweiterte Untersuchungen

1. Entwicklung von Oberflächen-modifizierten Triamcinolonacetonid-hältigen PLGA-Mikropartikeln

1.1. Einleitung

Der Vorteil von PLGA als Material zur Herstellung von Arzneistoffträgern ist, dass diese Substanz ein biokompatibles und bioabbaubares Polymer darstellt. Im wässrigen Milieu zerfällt PLGA durch Spaltung der Esterbindungen zunächst in Oligomere, und schließlich weiter in Monomere. Katalysiert wird dieser Zerfall durch freie Carboxylgruppen, die bereits vorhanden sind oder während des Abbaus entstehen. Als Endprodukte bilden sich Milchsäure und Glykolsäure, die in den Zitratzyklus eingeschleust, oder im Falle der Glykolsäure auch direkt renal eliminiert werden können [12]. Der Sinn einer Modifikation der Oberfläche solcher PLGA-Partikeln liegt darin, die Wechselwirkung zwischen Arzneiform und Zielgewebe zu verstärken, um eine lokale Anreicherung und damit eine höhere Konzentration des Wirkstoffes am Zielort zu erreichen. Weiters wäre dadurch eine Dosisreduktion des eingesetzten Wirkstoffes möglich. Da das für die Partikelherstellung verwendete PLGA 503H endständige freie Carboxylgruppen und somit eine negativ geladene Partikeloberfläche besitzt, ist eine ausgeprägte Interaktion mit der ebenfalls negativ geladenen Zelloberfläche des Endothels nicht zu erwarten. Die Ladung der Zelloberfläche wird durch Proteoglycane bestimmt, die als Ankerplätze für eine oder mehrere Glycosaminoglycan-Ketten dienen. Diese Ketten tragen unter anderem Sulfat- und Carboxylgruppen, die in ihrer ionischen Form die negative Ladung hervorrufen. Diese negative Ladung der extrazellulären Matrix hat den Zweck, Ionen einzufangen und dadurch einen osmotischen Gradienten hervorzurufen. Wasser fließt aus den umgebenden Geweben nach und wird in der Matrix fixiert, wodurch ein hydrophiles Kompartiment entsteht [13]. Demzufolge könnte die Wechselwirkung zwischen Mikropartikeln und Endothelzellen durch eine Verschiebung der Oberflächenladung der Partikel in den positiven Bereich wie durch Coating mit kationischen Molekülen erhöht werden. Eine weitere Möglichkeit, die Affinität der Partikel zum Endothel zu erhöhen, besteht darin, diese mit Liganden zu dotieren, die gezielt mit Strukturen auf dem Endothel interagieren. Beispielsweise interagiert humanes Serumalbumin spezifisch mit einem 60-kDa Glycoprotein (gp60) auf der Endothelzelloberfläche. Was Albumin als Linker zwischen Arzneiform und gp60 interessant macht ist, dass die Bindung von Albumin an den

gp60-Rezeptor Endozytose auslösen und damit den Transfer der Vesikel zur basolateralen Membran mit anschließender Exozytose vermitteln kann [14]. Damit wäre nicht nur eine lokale Anreicherung des Wirkstoffes, sondern auch eine erhöhte Transportrate ins angrenzende Gewebe bei entsprechender „Kleinheit“ der Partikel möglich.

1.2. Methoden

1.2.1. Herstellung von Triamcinolonacetonid-hältigen PLGA-Mikropartikeln

Triamcinolonacetonid-hältige Mikropartikel werden mittels Emulsions-Evaporations-Technik hergestellt. 20mg mikronisiertes Triamcinolonacetonid (TAAc, Korngröße < 30µm, Fa. Fagron GmbH und Co. KG, Barsbüttel, Deutschland) und 30mg Poly(DL-lactid-co-glycolid) (PLGA, Fa. Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) 503 H werden nacheinander unter Rühren in 4ml Ethylacetat bei 4°C gelöst und danach 2µl Bodipy-Lösung (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, Konzentration 1mg/ml in Ethylacetat, Fa. Invitrogen Corp. California, USA.) zugesetzt. Nach seitlichem Einlaufen lassen von 12ml einer 0,05%igen (g/v) wässrigen Lösung von Polyvinylalkohol 44-88 wird durch Dispergieren mit einem Ultraturrax (Gerätetype, IKA, Stufe 3) fünf Minuten lang unter Kühlung in einem 4°C kalten Wasserbad eine Emulsion hergestellt. Anschließend wird diese Emulsion in 148ml 0,05%ige wässrige PVA-Lösung unter Rühren schnell und ohne Tropfen einfließen gelassen und über Nacht bei Raumtemperatur bei 600 UpM am Magnetrührer gerührt, wobei das gesamte Ethylacetat verdampft.

Die Mikropartikeln werden durch wiederholtes Waschen mit 20mmol HEPES Puffer pH 7 gereinigt. Dazu wird die in vier Aliquote aufgeteilte Suspension mit Puffer jeweils auf etwa 40ml aufgefüllt und bei 3200 UpM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Partikeln werden in 30ml neuen Puffer im Ultraschallbad bei höchster Intensität 10 Minuten lang unter Kühlung resuspendiert. Die Suspension wird wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Dieser Waschvorgang wird insgesamt dreimal wiederholt. Beim letzten Waschvorgang werden die Partikelsuspensionen wie oben beschrieben im Ultraschallbad in etwa 20ml Puffer resuspendiert und alle Aliquote in einem 100ml Messkolben vereinigt, mit HEPES Puffer pH 7 auf 100,0ml aufgefüllt und erneut auf vier Aliquote aufgeteilt. Die nicht sofort verwendeten Aliquote werden unter Lichtschutz bei -80°C tiefgefroren.

1.2.2. Charakterisierung der TAAc-PLGA-Mikropartikeln

Größenverteilung

Die Größenverteilung wird von einem Aliquot der hergestellten Charge mittels Laserdiffraktometrie mit dem Mastersizer 3000 (Malvern, Worcestershire, England) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Veränderung des Beugungsmusters eines Lasers durch eine Partikelsuspension. Trifft Licht auf ein Teilchen, wird es in einem typischen Muster gebeugt und es entstehen Wellenberge und Wellentäler in einem bestimmten Abstand, der als Beugungswinkel bezeichnet wird. So entstehen bei großen Partikeln hohe Wellenberge mit kleinem Beugungswinkel, bei kleinen Partikeln hingegen niedrige Wellenberge mit großem Beugungswinkel. Da sich in einer Suspension viele Partikeln mit unterschiedlicher Größe befinden, überlagern sich die einzelnen Beugungsmuster und eine Interferenz entsteht. Anhand dieser Interferenzmuster kann unter Anwendung der Mie-Theorie die Partikelgröße berechnet werden. Die erhaltenen Werte werden als Verteilungskurve angegeben, die Informationen über die Verteilung der Partikelgrößen und damit die Homogenität einer Suspension bietet [15,16]. Folgende Parameter werden für die hergestellte Mikropartikel-Charge angegeben:

- volumenbezogener Mittelwert D[4,3]
- oberflächenbezogener Mittelwert D[3,2]
- Homogenität („Uniformity“)
- Dv 90/50/10 – definiert die Größe, die von 10% / 50% / 90% der Mikropartikel nicht überschritten wird.

Gehaltsbestimmung von TAAc und PLGA

Die Einbaurate von TAAc wird mittels HPLC bestimmt. Dazu wird 1,0ml Partikelsuspension in HEPES-Puffer pH 7 10 Minuten bei 14000 UpM und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, die verbleibenden Partikeln in 1ml Acetonitril (ACN) gelöst und nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert. 500µl des klaren Überstandes und auch eine 1:5 Verdünnung desselben in ACN werden jeweils in ein HPLC-Vial eingebracht. Analysiert werden die Proben mit Agilent® Technologies HPLC System Serie 1100 mit quaternärer HPLC Pumpe, UV-Diodenarray Detektor und Autosampler. Über eine Nucleosil® 100-5C 18 Säule werden die Proben bei 20°C aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von 254nm gegenüber

360nm als Referenz detektiert. Ein Gemisch aus 90% ACN und 10% Wasser dient dabei als mobile Phase. Das erhaltene Chromatogramm wird anhand eines externen Standards (Eichgerade von TAAc, siehe Anhang C, Tabelle 8) ausgewertet und das Ergebnis in Prozent bezogen auf die eingesetzte Menge angegeben.

Der Gehalt an PLGA wird indirekt nach Lyophilisation bestimmt. Zunächst werden drei Aliquote von jeweils 2,0ml Partikelsuspension zehn Minuten bei 14000 UpM / 4°C zentrifugiert, durch zweimaliges Waschen der Mikropartikel mit jeweils 2ml destilliertem Wasser Pufferrückstände entfernt und die verbleibenden Partikel in 1,0ml destilliertem Wasser resuspendiert. Vor der Lyophilisation wird die Probe bei -80°C für 30 Minuten tiefgefroren. Die anschließende Haupttrocknung erfolgt im Vakuum bei -30°C für 12 Stunden, die Nachtrocknung bei -50°C für 3 Stunden. Die Menge an PLGA ergibt sich durch Subtrahieren der eingebauten Menge an TAAc vom Gesamtgewicht der Mikropartikel pro Milliliter, das Ergebnis wird ebenfalls in Prozent bezogen auf die eingesetzte Menge an PLGA angegeben.

Zeta-Potential

Das Zeta-Potential ist jenes Potential, das zwischen einem Partikel und dem umgebenden Dispersionsmittel besteht. Diese, auch als elektrochemisches Potential bezeichnete Ladungsdifferenz, resultiert aus der Ladung des Partikels selbst und der Anlagerung von Ionen an der Partikeloberfläche. Wird an eine Dispersion eine elektrische Spannung angelegt, dann wandern die enthaltenen Partikel gemäß ihrer Oberflächenladung zu den entsprechenden Elektroden. Anhand der elektrophoretischen Mobilität der Partikel kann unter Berücksichtigung der Smoluchowski-Näherung das Zeta-Potential berechnet werden [15].

Zur Bestimmung des Zeta-Potentials der Mikropartikel wird 1,0ml Partikelsuspension bei 14000 UpM / 4°C 5 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abgehoben und die verbleibenden Partikel in 1,0ml destilliertem Wasser 5 Minuten am Ultraschallbad resuspendiert und in die Meßzelle eingebracht.

1.2.3. Freisetzungsrates von TAAc aus Mikropartikeln

Die Freisetzung von TAAc aus PLGA-Mikropartikeln wird in zwei unterschiedlichen Systemen bei 37°C in PBS mit Calcium und Magnesium als Freisetzungsmittel untersucht:

1.2.3.1. Geschlossenes System

Zur Untersuchung der Freisetzung von TAAc aus PLGA-Mikropartikeln werden 20 Proben zu je einem Milliliter Partikelsuspension in Freisetzungsmittel herangezogen. Da die Mikropartikel in HEPES-Puffer pH 7 dispergiert vorliegen, werden sie zunächst bei 14000 UpM / 4°C 5 Minuten lang zentrifugiert und in 1ml Freisetzungsmittel aufgenommen. Alle Aliquots werden bei 37°C die nächsten 5 Tage gelagert. In jeweils zwei Aliquots wird 1, 2, 3, 4, 5, 23, 30, 47, 71 und 98 Stunden nach Versuchsbeginn der Gehalt an freigesetztem TAAc bestimmt. Dazu wird die Partikelsuspension im Aliquot zunächst bei 4°C / 14000 UpM fünf Minuten lang zentrifugiert und der klare Überstand zu gleichen Teilen mit der eingesetzten mobilen Phase gemischt, um die gleiche Lösungsmittel-Zusammensetzung wie bei der Erstellung der Eichgerade zu gewährleisten. Der TAAc-Gehalt wird wie oben beschrieben mittels HPLC ermittelt und für jeden Zeitpunkt zwei unabhängige Proben analysiert.

1.2.3.2. Offenes System

Drei Aliquots zu je einem Milliliter werden 5 Tage lang am end-over-end-Mischer bei 37°C inkubiert. Die Proben werden wie oben beschrieben (siehe 1.2.2.1) aufbereitet und analysiert, mit dem Unterschied, dass die durch Zentrifugation sedimentierten Partikel erneut in einem Milliliter Freisetzungsmittel resuspendiert und weiter bis zur nächsten Probenentnahme bei 37°C inkubiert werden. Zur Auswertung werden die erhaltenen Peakflächen jeder Probenreihe aus den drei Einzelwerten summiert und die freigesetzte Menge an TAAc in Prozent bezogen auf die Einbaureate berechnet. Aus diesen erhaltenen Werten werden der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

1.2.4. Modifikation der Partikeloberflächen

- **Oberflächencoating mit Polyethylenimin (PEI)**

100µl einer frisch bereiteten Lösung von PEI (Molgewicht: 10000, verzweigt; 5mg/ml, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) in 100mM Phosphatpuffer pH 5,8 werden in einem Eppendorf-Gefäß vorgelegt und im Ultraschallbad bei 100% Intensität und 20°C 100µl einer Partikelsuspension zugetropft. Nach 30 Minuten Beschallen folgen zwei Waschschrte mit je 1,5ml des oben genannten Phosphatpuffers. Dazu wird die Partikelsuspension bei 14000 UpM / 4°C drei Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Partikel in frischem Phosphatpuffer resuspendiert. Insgesamt wird dieser Beschichtungsprozess fünfmal durchgeführt, wobei für jeden weiteren Coating-Schritt die gewaschene Partikelsuspension erneut in 100µl Puffer aufgenommen und in PEI-Lösung wie oben beschrieben eingetropft wird.

Zur Bestimmung des Zetapotentials wird die Partikelsuspension nach dem letzten Coating-Schritt zweimal mit jeweils 1,5ml 20mM HEPES Puffer pH 7,0 gewaschen und die Partikel in 1ml destilliertem Wasser aufgenommen.

1.3. Resultate:

1.3.1. Charakterisierung von TAAc-hältigen Mikropartikeln

Größenverteilung

Die anhand der Laserdiffraktometrie bestimmte Größenverteilung liefert Informationen über die kleinsten als auch über die größten Partikel. Je näher diese zwei Werte beieinander liegen, desto homogener ist die Suspension. Die Größenverteilung wird hier mit den Werten D_v 10/50/90 angegeben. Diese Werte geben die Größe an, die von 10% / 50% / 90% der Mikropartikel nicht überschritten wird. Die Größenverteilung ist von besonderer Bedeutung, da Mikropartikel zur pharmazeutischen Anwendung intravenös appliziert werden könnten. Die dünnsten Blutgefäße im menschlichen Körper – die Kapillaren – besitzen einen Durchmesser von 6-12 μm [17]. Dieser Mindestdurchmesser der Blutkapillaren ist notwendig, um die roten Blutkörperchen mit einer Größe von etwa 7,5 μm passieren zu lassen. Um das Risiko des Verstopfens der Gefäße und die dadurch entstehende Unterversorgung mit Schädigung des Gewebes zu minimieren, ist das Ziel eine Partikelgröße unter 3 μm zu erreichen. Die Analyse ergab eine Größenverteilung von 0,738 μm bis 2,48 μm , mit einer Homogenität von 0,394, wobei 90% der Partikel eine Größe von 2,48 μm nicht überschreiten. Weiters werden ein volumenbezogener Mittelwert von 1,5 μm und ein oberflächenbezogener Mittelwert von 1,22 μm berechnet. In Tabelle 2 sind alle Werte der Partikelanalyse zusammengefasst.

Einbaurate

Die Analyse der hergestellten Partikelsuspension via HPLC ergab eine Einbaurate von 65,77 μg TAAc pro Milliliter Partikelsuspension. Dies entspricht rund 33% bezogen auf die eingesetzte Menge TAAc (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die Lyophilisation von 6ml Partikelsuspension ergab einen Trockenrückstand von 1,1mg; dies entspricht 183 μg pro ml. Daraus errechnet sich eine Einbaurate von 117,23 μg PLGA pro ml Partikelsuspension, oder 39% bezogen auf die eingesetzte Menge an PLGA (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Oberflächenladung

Die Bestimmung der Oberflächenladung der hergestellten PLGA-Mikropartikel in destilliertem Wasser ergab ein Zeta-Potential von -49,9mV, hervorgerufen durch die freien

Carboxylgruppen des eingesetzten PLGA. Diese sind Voraussetzung für das spätere Coating der Partikel, da das positiv geladene PEI mit den negativen Ladungen der Carboxylgruppen interagieren und eine Ladungsumkehr der Oberfläche in den positiven Bereich zur Folge haben kann.

D[4,3]	D[3,2]	Dv 10	Dv 50	Dv 90	Uniformity	ξ-Potential	TAAc-Gehalt	PLGA-Gehalt
1,5µm	1,22µm	0,738µm	1,36µm	2,48µm	0,394	-49,9mV	65,77µg	117,23µg

Tabelle 2: Charakterisierung der hergestellten TAAc hältigen PLGA-Mikropartikel. Die Einbaurate von TAAc und PLGA ist in µg/ml angegeben.

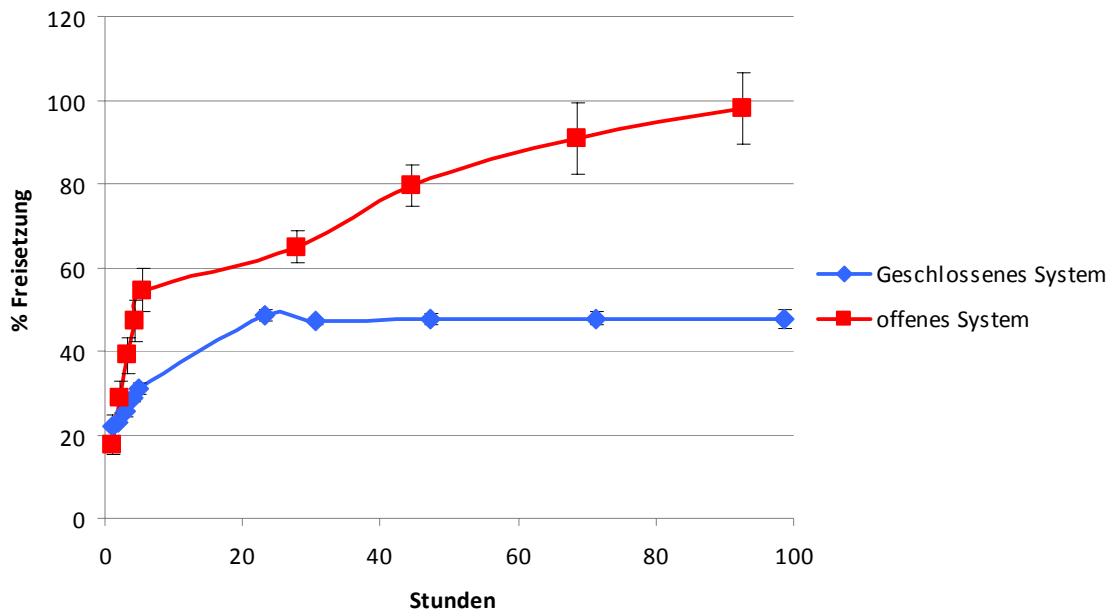
1.3.2. Freisetzung von TAAc aus PLGA-Mikropartikeln

Die Freisetzung von TAAc aus PLGA-Mikropartikeln wurde in zwei verschiedenen Systemen – einen offenen und einem geschlossenen, d.h. mit und ohne Erneuerung des Freisetzungsmediums, analysiert. Aus beiden Systemen wird aus den gebildeten Mittelwerten eine Freisetzungskurve erstellt und diese miteinander verglichen (siehe Grafik 1).

Im offenen System tritt in den ersten fünf Stunden eine erhöhte Freisetzung von TAAc (first burst effect) auf, die wahrscheinlich durch Lösung von an der Partikeloberfläche adsorbiertem TAAc bedingt ist. Nach dieser Zeit sind 54,53% des enthaltenen TAAc im Medium gelöst. Diesem steilen Anstieg der Kurve folgt ein flacher Verlauf über die nächsten 87 Stunden. Diese Phase der Freisetzung wird vermutlich hauptsächlich durch Diffusion von TAAc aus den Partikeln und deren Erosion bestimmt. Am Ende der Analyse sind 97,98% TAAc des in den Partikeln inkorporierten Wirkstoffes freigesetzt.

Im geschlossenen System steigt die Freisetzungsrates ebenfalls in den ersten fünf Stunden steil an. Rund 31% des Wirkstoffes haben sich nach der fünften Stunde aus den Mikropartikeln gelöst. Anders als beim offenen System ist bereits nach 23 Stunden kein weiterer Anstieg an TAAc im Überstand zu beobachten. Das Freisetzungsmedium scheint bei einem Gehalt von 31,31µg gelöstem TAAc pro ml, das entspricht 47,61% der Einbaurate, gesättigt zu sein und damit ist keine weitere Lösung von vorhandenem TAAc möglich. Dies mag auf die schlechte Wasserlöslichkeit des TAAc und auf die mangelnde Durchmischung des Systems zurückzuführen sein.

Freisetzung TAAc aus Mikropartikel



Grafik 1: Freisetzung von TAAc aus PLGA-Mikropartikeln in Calcium- und Magnesium hältigen PBS. ber 5 Tage werden die Partikeln bei 37°C gelagert und zu definierten Zeiten Proben entnommen. Untersucht wird die Freisetzung in einem offenen (rot) und einem geschlossenen (blau) System.

1.3.3. Modifikation der Partikeloberfläche

Um die Oberflächenladung der verwendeten PLGA-Partikeln zu verändern wurde die Methode des Partikelcoatings gewählt. Dazu wurde eine Stammlösung von PEI in 100mM Phosphatpuffer pH 5,8 verwendet und wie oben in Punkt 1.2.3 beschrieben durchgeführt. Während der gesamten Prozedur wurden nach jedem Coating-Schritt sowohl die abzentrifugierten Partikel als auch die Partikelsuspension visuell geprüft und der pH-Wert der Suspension mittels Indikatorpapier kontrolliert. Die visuelle Kontrolle ergab eine deutlich sichtbare Veränderung der Partikel. Nach den Zentrifugationsschritten, die jeder Beschichtung folgen, wurden die Partikelpellets glasiger und waren schließlich im verwendeten Puffer vollständig gelöst. Parallel dazu werden die Partikelsuspensionen mit zunehmender Zahl an Beschichtungsschritten durchscheinender, bis nur mehr eine klare Lösung vorliegt. Diese Beobachtung deutet auf eine Hydrolyse des PLGA hin. Eine anschließende Messung des ξ -Potentials ergibt zwar einen Wert von +50mV, doch ist aufgrund der klaren Lösung anzunehmen, dass kaum noch intakte Partikel vorliegen und

dieser Wert möglicherweise von freiem PEI stammt. Der Grund für diesen beschleunigten Abbau von PLGA könnte der pH-Wert sein, da basisches und stark saures Milieu die Autokatalyse des Polymers fördert [12]. Da Polyethylenimin durch die enthaltenen primären Aminogruppen alkalische Eigenschaften besitzt, weist die Stammlösung selbst einen pH-Wert von circa 10 auf. Zwar wird für die Beschichtung die Stammlösung mit Phosphatpuffer verdünnt, wodurch der pH-Wert der Lösung auf 6 sinkt, jedoch steigt während des Beschallens der Mikropartikel in der PEI-hältigen Lösung der pH-Wert erneut auf rund 10 an. Durch diese stark alkalischen Bedingungen kann die Esterhydrolyse des PLGA so weit beschleunigt werden, dass am Ende der Prozedur fast alle Partikel gelöst sind. Die Modifizierung der Partikeloberfläche mittels PEI-Beschichtung ist demnach keine geeignete Methode, um die Oberflächenladung zu beeinflussen. Alternativ könnte eine kovalente Kopplung von PEI an die freien Carboxylgruppen des PLGA versucht werden.

2. Zellkultur und Humanalbumin-Bindungsstudie

2.1. Einleitung

Endothelzellen kleiden unsere Blutgefäße in allen Geweben aus. Bei einem erwachsenen Menschen erreicht das Gewicht dieser Zellen im gesamten Körper annähernd 1 Kilogramm und eine Oberfläche von 1 bis 7m². Die Aufgabe dieser Zellen ist es den Fluss von Nährstoffen, diversen biologisch aktiven Molekülen und der Blutzellen zu regulieren. Dafür stehen dem Endothel membrangebundene Rezeptoren für u.a. Proteine wie Wachstumsfaktoren, Koagulantien sowie Antikoagulantien, Lipid-transportierende Vesikel, Metabolite wie NO und Serotonin, Hormone als auch spezifische Adhäsionsproteine, die Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen ermöglichen, zur Verfügung. Je nach der spezifischen Funktion des Endothels ist der Aufbau der Gefäßwand unterschiedlich. Man unterscheidet:

- kontinuierliche Endothelien – die einzelnen Zellen sind durch feste Verbindungen, den sogenannten *tight junctions*, verbunden. Diese Form findet sich zum Beispiel im Gehirn und der Retina [18].
- diskontinuierliche Endothelien – zwischen den Zellen befinden sich interzelluläre Lücken, die *gaps*, mit einer Größe von 0,1-1µm. Diese erlauben zelluläre Bewegungen (Diapedese), wie sie in der Leber, der Milz und im Knochenmark zu finden sind.
- fenestrierte Endothelien – besitzen ebenfalls Lücken mit einer Weite von 50-70nm, diese erleichtern die selektive Permeabilität für effiziente Absorption, Sekretion und Filterung. Sie sind u.a. in den Nieren und endokrinen Drüsen zu finden [19].

Endothelzellen, isoliert aus der Nabelschnur, bilden in der Kultur einen homogenen dichten Monolayer. Sie sind polygonale Zellen mit einer Größe von etwa 30 x 50µm, der ovale Zellkern ist zentral lokalisiert. Im Elektronenmikroskop sind bei vielen Zellen zahlreiche Bläschen und Gruben an der Oberfläche oder nahe darunter zu erkennen. Diese verteilen sich vorwiegend in der perinuclearen Region. Endothelzellen enthalten im Cytoplasma Inklusionskörper, die sogenannten Weibel-Palade-Körper [9]. Weibel-Palade-Körper enthalten neben Van-Willebrand-Faktor (vWF) unter anderem Angiopoetin-2, P-Selektin und Gewebeplasminaktivator (tPA). Das Vorhandensein von vWF ist Voraussetzung zur Bildung von Weibel-Palade-Körpern. Sie sind charakteristisch für Endothelzellen und können daher

zur Unterscheidung zu Fibroblasten und glatten Muskelzellen, die diese Strukturen nicht enthalten, dienen [20]. Ein weiteres Charakteristikum ist die Expression von Proteinen an ihrer Zelloberfläche wie ABH-Antigenen [9]. Daneben soll auch 60-kDa Glykoprotein exprimiert werden. Wie in Punkt 1.1 erwähnt könnte dieses Protein als pharmazeutisches Target genutzt werden, daher soll dessen Vorhandensein auf den verwendeten Endothelzellen untersucht werden. Neben den primären Zellen, die aus der Nabelschnur durch Behandlung mit Kollagenase Typ 1 isoliert werden, wurden auch immortalisierte Zellen mit Hilfe der humanen Telomerase reversen Transkriptase hergestellt, die als HUVECtert bezeichnet werden [20]. Die verwendeten HMEC [21] sind ebenfalls immortalisierte Zellen, die von Endothelzellen aus der Haut stammen. Der folgende Teil der schriftlichen Arbeit beschreibt die Kultivierung der verwendeten Endothelzellen und die Bindung von humanem Serumalbumin an ihrer Zelloberfläche.

2.2. Methoden

2.2.1. Subkultivierung von Endothelzellen

Die verwendeten Endothelzellen werden in EndoPrime® Medium (EndoPrime Kit, PAA, Linz, Österreich), versetzt mit Bio Whittaker® Pen/Strep/Amphotericin B (Konzentration 1% (v/v); Lonza, Basel, Schweiz) bei 37°C, 5% CO₂ Begasung und 96% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Verwendet werden 75cm² Zellkulturflaschen, die mit einer wässrigen 1% (w/v) Gelatinelösung 30 Minuten lang beschichtet wurden. Nach Bildung eines konfluenten Monolayers wird das verbrauchte Medium abgesaugt und in zwei Waschschritten mit je 2ml PBS das restliche Medium entfernt. Mit 2ml 0,25% Trypsin-EDTA werden die Zellen von der Wachstumsoberfläche gelöst, wobei dieser Vorgang mikroskopisch kontrolliert wird. Sobald sich die Zellen ablösen wird die Trypsin-Lösung abgesaugt und 6ml Medium zugesetzt. In diesem werden die Zellen resuspendiert und davon eine geeignete Menge zur weiteren Kultivierung herangezogen.

2.2.2. Bindung von Humanalbumin an humane Endothelzellen

Das verwendete Fluorescein-markierte Humanalbumin (FITC-HSA) wurde entsprechend der Produktinformation der Fa. Sigma durch Kopplung von Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) an das Protein hergestellt [22]. Das handelsübliche Produkt wird zusätzlich noch durch Dialyse gereinigt und zur Bestimmung der Menge lyophilisiert. Die F/P-Ratio wird ebenfalls, wie in der Produktinformation angegeben, photometrisch bestimmt.

Die Bindungsstudie selbst wird mit primären (HUVEC) als auch immortalisierten Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEctert) und mit immortalisierten mikrovaskularen Endothelzellen aus der Haut (HMEC) bei 4°C durchgeführt. Aus den nach Aussaat von 17000 Zellen pro Well einer 96-well Platte erhaltenen konfluenten Monolayern wird das Medium abgesaugt und die Monolayer mit albuminfreiem Medium ohne Indikator zwei Stunden bei 37°C inkubiert, um eine Interferenz des Analyten mit dem Albuminhaltigen Zellkulturmedium auszuschließen. Nach Absaugen des Mediums und Kühlung auf 4°C werden die Monolayer mit 50µl einer Verdünnungsreihe von FITC-HSA 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Verdünnungsreihe umfasst 6,25 – 100µg FITC-HSA/ml albuminfreiem Zellkultur-Medium ohne Indikator. Monolayer im gleichen Zellkulturmedium ohne Testsubstanz dienen zur Ermittlung der Autofluoreszenz der Zellen. Nach zwei

Waschschritten mit jeweils 100µl albuminfreiem Medium wird die zellassoziierte Fluoreszenz bei einer Anregung von 485nm und einer Emission von 535nm bestimmt.

2.3. Resultate:

2.3.1. Subkultivierung von Endothelzellen

Die verwendeten HUVEC zeichnen sich durch rasches Wachstum und durch Bildung sehr dichter Monolayer aus, sodass eine Konfluenz von 100% erreicht werden konnte. Eine Subkultivierung bis zu 18 Passagen war ohne Schwierigkeiten möglich.

HUVECTert unterscheiden sich in der Zellkultur von den primären Zellen durch ein langsames Wachstum. Die Monolayer selbst erreichen eine Konfluenz von 90% bis 95% und sind sofort zu verwenden, da sie - anders als HUVEC - bei längerer Lagerung in diesem Zustand von mehr als einem Tag sich schnell von der Wachstumsfläche lösen. Die maximale Passagezahl war 46.

HMEC bilden unregelmäßige Monolayer, ebenfalls mit einer Konfluenz von etwa 95%. Ihre Wachstumsgeschwindigkeit ist HUVECTert ähnlich und auch sie lösen sich schnell von der Wachstumsfläche nach Erreichen der Konfluenz. 40 Passagen konnten bei dieser Zellart erreicht werden.

2.3.2. Bindungsstudien von Humanalbumin an Endothelzellen

Um die exprimierten Strukturen an der Zelloberfläche von Endothelzellen zu charakterisieren wurde die Bindung von HSA an ihrer Oberfläche bei 4°C untersucht. Monolayer von HUVEC, HUVECTert und HMEC wurden mit einer Verdünnungsreihe von Fluorescein-markiertem HSA in albuminfreiem Medium bei 4°C 60 Minuten lang inkubiert und anschließend die zellgebundene Fluoreszenz ermittelt. Sie entsprach bei allen drei Zelltypen weitgehend der Autofluoreszenz der Zellen. Die höchste zellgebundene Fluoreszenz mit einem Wert von rund 50 konnte bei HUVEC bei der höchsten eingesetzten Menge an HSA detektiert werden. Bei HUVECTert und HMEC lag die gemessene Fluoreszenz deutlich darunter. Bei HUVEC und HUVECTert – beide sind Endothelzellen makrovaskularen Ursprunges – könnte die Ursache für dieses Ergebnis darin liegen, dass sie die betreffenden Strukturen nicht in einem für eine Fluoreszenzdetektion ausreichenden Maß an ihrer Oberfläche exprimieren. Die Markierung von HSA mit radioaktiven Tracern wäre eine alternative Möglichkeit die Empfindlichkeit der Analysenmethode zu erhöhen und auch geringste Mengen an HSA-gebundenem 60-kDa Glykoprotein nachzuweisen. Eine Wiederholung des Experimentes mit HMEC – humanen

mikrovaskulären dermalen Endothelzellen – zeigte ebenfalls keine nennenswert höhere Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle. Es scheint, dass die Bindung von Humanalbumin an Endothelzellen, wie von Tirupathi et al. beschrieben [23,24], vorzugsweise auf Endothelzellen aus bestimmten Geweben wie Lunge oder Fettgewebe beobachtbar ist, da diese gp-60 in höherem Ausmaß bilden. Für die verwendeten Endothelzellen aus Haut und Nabelschur konnte mit der eingesetzten Analysenmethode keine eindeutige Bindung von HSA festgestellt werden. Es wären jedoch noch weitere Bindungsstudien von HSA an Endothelzellen aus verschiedensten Geweben notwendig, um beurteilen zu können, ob die Verwendung von HSA für eine zielgerichtete Arzneimitteltherapie sinnvoll wäre oder nicht.

3. Entwicklung eines *in-vitro* – Modelles für Blutgefäße

3.1. Einleitung

Das Blutgefäßsystem ist ein wichtiger Bestandteil unseres Körpers. Es ermöglicht den Transport von u.a. Nährstoffen, Gasen, Hormonen und ist an der Regulation der Körpertemperatur und des Säure-Basen-Haushaltes beteiligt. Aufgebaut sind unsere Blutgefäße, zu denen Arterien, Blutkapillaren und Venen gehören, aus drei Schichten: der Intima - bestehend aus einer Schicht Endothelzellen -, der Media - bestehend aus einer dichten Schicht glatter Muskelfasern und Bindegewebe -, und der Adventitia - verbindet durch elastische und kollagene Fasern das Gefäß mit dem Gewebe [19]. Das Blut fließt darin mit einer Geschwindigkeit von 30cm/s in den großen herznahen Arterien bis 0,02cm/s in den Kapillaren [17]. Mit rund $4,6-5,1 \times 10^{12}$ Zellen pro Liter Vollblut machen Erythrozyten den Großteil der zellulären Bestandteile des Blutes aus [19]. Intakte Zellen besitzen ein rundes, bikonkaves Äußeres mit einer typischen Vertiefung in der Mitte der Zelle. Diese kommt dadurch zustande, dass während der Differenzierung der Zellkern ausgestoßen wird [19,17], ihre Größe beträgt in etwa 7,5µm. Ein alt bekanntes Phänomen in der Transfusionsmedizin ist der Rouleaux-Effekt, dabei lagern sich Erythrozyten wie in Abb. 3 wie Geldrollen an einander. Diese Aggregate können eine Länge von zwei bis mehreren Zellen erreichen und sogar verzweigt sein. Die Bildung von Rouleaux ist u.a. abhängig von den Makromolekülen die sich im System befinden (z.B. Fibrinogen), von der Scherrate und der Temperatur. Anders als bei Thromben, die während der Blutgerinnung entstehen, ist diese Form der Aggregation reversibel, bei Erhöhung der Scherrate zerfallen die Rouleaux und die Zellen liegen wieder monodispers vor [11, 25].

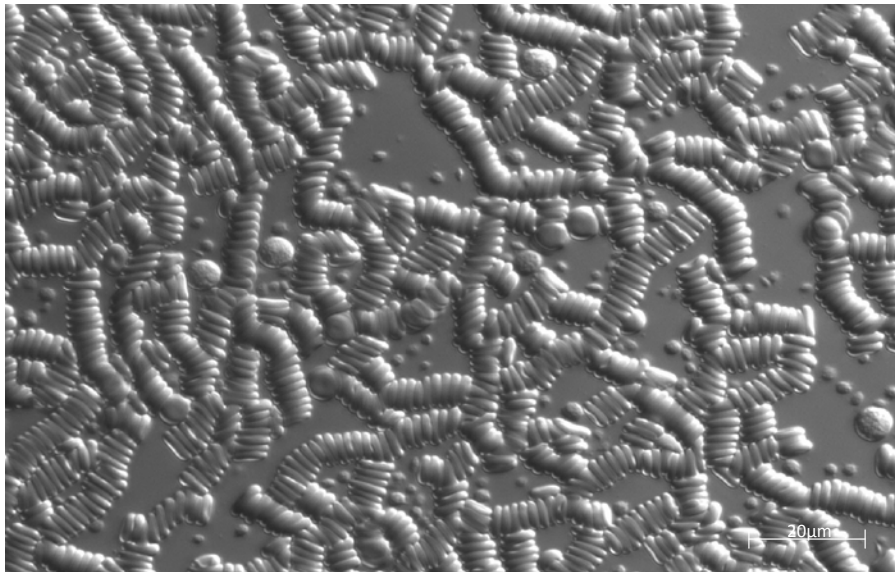
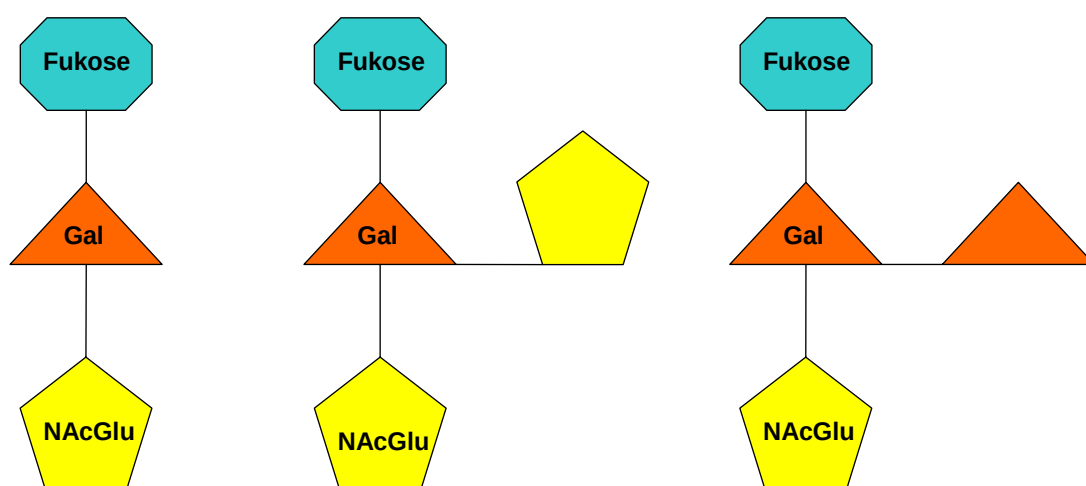


Abb. 3: Erythrozyten in Geldrollenformation. Aufgenommen mit Zeiss Axio Observer.Z1 (Göttingen, Deutschland).

Auf ihrer Oberfläche sind zahlreiche Strukturen, die antigenen Charakter besitzen können vorhanden, wie z.B. die des ABO-Systems. Die ABO-Antigene sind Glykoproteine, die ein Trisaccharid, die sogenannte H-Substanz als Grundstruktur enthalten (siehe Abb. 4). Die H-Substanz besteht aus N-Acetyl-Glucosamin (NAcGlu), D-Galaktose (Gal) und L-Fukose, gegen diese Struktur bildet das Immunsystem keine Antikörper (Blutgruppe O). Bei Blutgruppe A ist an die H-Substanz zusätzlich ein N-Acetyl-Galaktosamin und bei Blutgruppe B eine D-Galaktose angefügt. Sind beide Antigene auf Erythrozyten vorhanden, spricht man von Blutgruppe AB [10].



Blutgruppe 0

Blutgruppe A

Blutgruppe B

Abb. 4: Kohlenhydratanteil der ABO-Antigene. Gal (D-Galaktose), NAcGlu (N-Acetyl-Glucosamin [10]).

Um die Auswirkungen des Blutflusses auf das Verhalten von Arzneiformen zu imitieren und damit zu beobachten besteht in der Etablierung von *in-vitro* – Modellen des Blutgefäßes. Eine Möglichkeit, flüssige Medien in Bewegung zu versetzen, ist die Nutzung des piezoelektrischen Effektes. Bei diesem Phänomen werden durch Deformation eines piezoelektrischen Substrates, wie zum Beispiel Quarz oder Bariumtitanat, Ladungen in dessen Molekülstruktur verschoben und es entsteht ein elektrisches Feld. Umgekehrt führt das Anlegen eines elektrischen Feldes zu einer Deformation des Substrates [26]. Wird Wechselspannung an ein piezoelektrisches Substrat mittels eines Interdigitaltransducers angelegt, entstehen akustische Oberflächenwellen. Durch Einkopplung dieser Oberflächenwellen in eine Flüssigkeit bildet sich ein Druckgradient, der zu einer gerichteten Strömung im Medium führt [27]. Mit dieser Technik ist es möglich kleine Flüssigkeitsvolumina in Kanalstrukturen in Bewegung zu versetzen. Zur Etablierung eines *in-vitro* – Modelles wird in selbst hergestellten Kanalstrukturen das Verhalten der roten Blutkörperchen untersucht. Beurteilt werden die Verteilung der Zellen in den Kanalstrukturen und die Viabilität der Zellen unter Scherstress. Ein weiterer Schritt hin zu *in-vivo* – Bedingungen ist die Kombination von Erythrozyten und Endothelzellen in einem Versuchsaufbau. Die Schwierigkeit liegt darin, ein für beide Zelltypen mit ihren unterschiedlichen Eigenschaften ein gemeinsames verträgliches Puffersystem zu schaffen. In diesem *in-vivo* – Bedingungen angenäherten System wäre es möglich, nicht nur die Interaktion von Blutzellen mit Endothelzellen, sondern auch die Interaktion von eingebrachten Arzneistoffen oder Arzneistoffträgern mit Blutzellen und Endothelzellen zu erfassen.

3.2. Methoden

3.2.1. Erythrozyten unter Flussbedingungen

3.2.1.1. Herstellung der Kanalstrukturen

Die Kanalstrukturen werden aus Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) hergestellt. Für diesen Zweck werden 10g des Base mit 1g Curing Agent (Sylgard® 184 Silicone elastomer Kit, Baltres, Baden, Österreich) verrührt und diese Mischung etwa 30 Minuten im Vakuum entgast. Das PDMS wird in Gussformen aus Aluminium gegossen und der Überschuss durch Absteifen entfernt. Anschließend härtet das Material bei 120°C 2-3 Stunden lang. Die fertigen Kanäle werden aus den Formen entnommen und mit Hilfe einer Schablone auf Glasplatten mit dem oben genannten PDMS aufgeklebt und bei 100°C 30 Minuten lang fixiert. Die erhaltenen Kanäle besitzen eine Fläche von 44 x 4mm und einer Höhe von 3mm.

3.2.1.2. Blutpräparation und Versuchsdurchführung

100µl des aus der Fingerkuppe entnommenen Blutes (Nadel: Accu-Chek Softclix, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) werden mit 15µl einer Heparinlösung (1mg/ml) in CPD-Stabilisatorlösung vermischt, um die Gerinnung zu unterbinden. In den Kanalstrukturen werden je 500µl CPD-Stabilisatorlösung vorgelegt und die Anlage in Betrieb genommen. 1µl des präparierten Blutes einer 1:5 Verdünnung in CPD-Stabilisatorlösung wird pro Kanal in den Flüssigkeitsstrom eingebracht und nach 10 bzw. 30 Minuten ab Versuchsbeginn Proben gezogen, um die Zellstruktur mikroskopisch zu kontrollieren. Um die Verteilung der roten Blutkörperchen in den Kanalstrukturen beurteilen zu können wird am Versuchsende nach 30 Minuten die gesamte Anlage ausgeschaltet und die Erythrozyten 10 Minuten sedimentieren gelassen. Der gesamte Versuch wird bei Raumtemperatur mit einer Geschwindigkeit von 3000mm/s bzw. 7000mm/s, entsprechend einer Scherrate von $1,5s^{-1}$ bzw. $3,5s^{-1}$, durchgeführt. Der Versuchsaufbau umfasst einen Radiofrequenzgenerator (SMB100A, Rohde&Schwarz GmbH, Österreich), der sowohl mit einem Verstärker (LZY-1, Mini Circuits, Brooklyn, USA) als auch einem Dämpfungselement (VAT-3W2+, Mini Circuits, Brooklyn, USA) verbunden ist, und einen Verteiler (D1572-102, Werlatone, Brewster, USA), der es ermöglicht vier Kanäle parallel zu betreiben. Als Kopplungsmedium zwischen den IDT (Interdigitalelektroden) und der Glasplatte dient destilliertes Wasser. Zur mikroskopischen

Beobachtung während des Experimentes werden die vier Kanäle auf einem Zeiss Axio Observer.Z1 (Göttingen, Deutschland) positioniert.

3.2.2. Auswirkung unterschiedlicher Puffersysteme auf Endothelzellen und Erythrozyten

Die Kombination von Erythrozyten und Endothelzellen in einem System, wäre der nächste Schritt, um das *in-vitro* – Modell den *in-vivo* – Bedingungen im Blutgefäß weiter anzunähern. Die Herausforderung liegt darin, ein Puffersystem zu finden, dass den Anforderungen beider Zelltypen gerecht wird. Um die gewählten Pufferlösungen an Erythrozyten zu untersuchen wird – wie oben erwähnt – das entnommene Vollblut mit einer Heparinlösung in CPD-Stabilisator vermischt, um die Gerinnung zu hemmen. Diese stabilisierte Zellsuspension wird mit dem gleichen Volumen der zu untersuchenden Pufferlösungen gemischt und nach 10 Minuten bzw. 30 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur die Viabilität der Zellen mikroskopisch untersucht.

Die Verträglichkeit der gleichen Puffer wird ebenfalls mit den Endothelzellen untersucht. Verwendet werden sowohl HUVEC, als auch HUVECtert und HMEC, die nach Aussaat von 17000 Zellen pro Well in 96-Wellplatten zu konfluenten Monolayer kultiviert werden. Das verbrauchte Zellkulturmedium wird entfernt und pro well 100µl der jeweiligen Pufferlösung eingebracht. Die Viabilität der Zellen wird nach 10 bzw. 30 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur mikroskopisch beurteilt.

3.2.2.1. Herstellung der verwendeten Pufferlösungen:

ACD-Stabilisator: ist eine Citrat-Glucose-hältige saure Lösung, die zur Stabilisierung von Blutkonserven verwendet wird. Der Zusatz von Zitronensäure dient dazu, die Karamelisierung der zugesetzten Dextrose während der Sterilisation zu verhindern [28]. Der ACD-Stabilisator wird nach den Angaben des EuAB hergestellt [29].

Benötigten Chemikalien pro 100ml:

- 2,51g Natriumcitrat-dihydrat
- 0,73g Zitronensäure wasserfrei
- 2,45g Glucose-monohydrat

Alle Substanzen werden nacheinander in 100ml bidestilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert beträgt 5,12; die Osmolarität 373mosm.

CPD-Stabilisator: ist eine Modifikation des ACD-Puffers. Er enthält zusätzlich Phosphatsalze, welche Stoffwechselprodukte, die bei der anaeroben Glykolyse der Erythrozyten entstehen, neutralisieren können [28]. Auch dieser Stabilisator wird nach den Angaben des EuAB hergestellt [29].

Benötigte Chemikalien pro 100ml:

- 2,997g Natriumcitrat-dihydrat
- 0,299g Zitronensäure wasserfrei
- 2,55g Glucose-monohydrat
- 0,251g Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat

Alle Chemikalien werden ebenfalls in 100ml bidestilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert beträgt 5,77; die Osmolarität 414mosm.

Kalzium und Magnesium hältiger PBS 0,003M:

Benötigte Chemikalien pro 1000ml:

0,2g Kaliumchlorid

0,2g Kaliumdihydrogenphosphat

0,1g Magnesiumchlorid-hexahydrat

8,0g Natriumchlorid

0,764g Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat

Zuerst werden die oben genannten Chemikalien in 950ml bidestilliertem Wasser vollständig gelöst. Anschließend werden 50ml einer Kalziumchlorid-Stammlösung (Konzentration: 0,663g Kalziumchlorid-dihydrat in 250ml bidestilliertem Wasser) zugegeben. Der pH-Wert beträgt 7,2; die Osmolarität 257mosm.

Kalzium und Magnesium hältiger PBS 0,003M mit Glucose: dieser wird auf die gleiche Weise wie der oben genannte Puffer hergestellt und am Ende noch mit 1,28g Glucose-monohydrat pro 50ml Puffer versetzt. Der pH-Wert beträgt 7,46; die Osmolarität 383mosm.

3.3. Resultate

3.3.1. Erythrozyten unter Flussbedingungen

In den Kanalstrukturen wurden 500µl CPD vorgelegt und unter Bewegung des Systems 1µl Blut einer 1:5 Verdünnung in CPD zugesetzt. Während des Experimentes konnte sowohl bei 3000mm/s als auch bei 7000mm/s keine Aggregation der Erythrozyten beobachtet werden. Bei beiden Geschwindigkeiten ergab die mikroskopische Kontrolle nach 30 Minuten etwa 80% intakte rote Blutkörperchen, während die restlichen 20% der Zellen einen Verlust ihrer typischen Zellform aufwiesen. Sie zeigten ein rundes, ebenmäßiges Äußeres ohne die charakteristische Einbuchtung in der Mitte des Zellkörpers und wurden als funktionsunfähig eingestuft. Nach 30 Minuten wurde das Gerät abgeschaltet und die Zellen 10 Minuten sedimentieren gelassen. Die Erythrozyten akkumulierten in einem breiten Streifen aus dicht nebeneinander liegende Zellen in der Mitte der Kanalstruktur, zu den Rändern hin nahm die Anzahl der Zellen ab. Demnach reichern sich Erythrozyten unter Flussbedingungen vorwiegend im Zentrum der Kanalstruktur an. Dieses Verhalten ist nicht überraschend, da bereits bekannt ist, dass Erythrozyten eine axiale Verteilung zeigen, wenn sie durch eine Kapillare gepumpt werden. Dadurch entstehen ein zentraler Strom mit schnell fließenden Zellen und eine gleitfähige Plasmaschicht. Durch diese zellarme Plasmaschicht sinkt die scheinbare Viskosität des Blutes. Dieses Phänomen wird als „Fåhræus-Lindqvist-Effekt“ bezeichnet und ist vom Gefäßdurchmesser und der Verformbarkeit der Erythrozyten abhängig. Beobachtet wird dieser Effekt bei Kapillardurchmessern unter 300µm [19].

Bei dem durchgeführten Experiment ist die zentrale Verteilung der roten Blutkörperchen nicht dem Fåhræus-Lindqvist-Effekt zuzuordnen, da dieser Effekt wie schon erwähnt bei kleinen Kapillardurchmessern auftritt, hier aber ein Kanal mit 4mm Breite verwendet wurde. Die Arbeitsgruppe um Aarts et al. untersuchte die Verteilung von Blutplättchen in Gegenwart von roten Blutkörperchen. In Glaskapillaren mit 3mm Durchmesser beobachteten sie sowohl Blutplättchen und rote Blutkörperchen alleine als auch in Kombination. Erythrozyten allein zeigten ebenfalls eine axiale Verteilung und dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmendem Scherstress. In Gegenwart von Thrombozyten verdrängten sie diese aus dem zentralen Feld in Richtung Kapillarwand [30]. Inwieweit die Form des Querschnittes das Fließverhalten der Zellen beeinflusst ist noch nicht geklärt. In der Arbeit von Aarts et al. wurde eine gerade Glaskapillare verwendet, in unseren Versuchen Kanalstrukturen aus Silikon mit viereckigem

Querschnitt. Zusätzlich beträgt die geradlinige Flussstrecke der roten Blutkörperchen, bedingt durch die Größe und Form des Kanals, nur eine kurze Strecke von jeweils 44 mm danach folgt jeweils rechtwinkelige Richtungsänderung. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um die Frage zu klären, ob diese Strecke ausreichend ist, um eine gesicherte Aussagen über das Verteilungsmuster der Zellen in Kanalstrukturen treffen zu können.

3.3.2. Einfluss unterschiedlicher Puffersysteme auf Erythrozyten und Endothelzellen

Um die Eignung der Pufferlösung für Erythrozyten zu ermitteln wurden diese in der jeweiligen Lösung bei Raumtemperatur 10 bzw. 30 Minuten gelagert und danach die Viabilität der Zellen mikroskopisch beurteilt. Besaßen die roten Blutkörperchen ihre typische Form mit einem runden scheibenförmigen Zellleib und einer Einbuchtung in der Mitte, wurden sie als funktionsfähig und somit als lebend klassifiziert. [16]. Als funktionsunfähig wurden sie klassifiziert, sobald Aggregation oder Formverlust, wie zum Beispiel Echinozytenbildung, auftraten. Nehmen rote Blutkörperchen die Form eines Stechapfels an, werden sie Echinozyten genannt. Diese können u.a. nach Blutentnahme entstehen, wenn Lyssolezithin gebildet wird oder die ATP-Konzentration abnimmt [31].

Im Fall der Endothelzellen wurden je 100µl Testlösung pro Well eingebracht und ebenfalls nach 10 und 30 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur die Viabilität mikroskopisch beurteilt. Als unverträglich für die verwendeten Endothelzellen galten die Testlösungen dann, wenn sich die Zellform veränderte oder sich die Zellen nach der definierten Zeit nicht mehr in einem einheitlichen Zellverband befanden.

ACD-Stabilisator:

Erythrozyten:

Die Untersuchung zeigt, dass Erythrozyten nach 10 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur ihre intakte Zellform besitzen, eine 30 minütige Lagerung jedoch die Ausbildung einer Stechapfelform zur Folge hat. Daher eignet sich diese Testlösung nur für kurze Experimente. Ein möglicher Grund für diese Veränderung ist, dass dieser Puffer bedingt durch die Zitronensäure einen pH-Wert von etwa 5 besitzt. Durch die Mischung mit Vollblut außerhalb des optimalen Mischungsverhältnisses von 4:1 ist der für Erythrozyten verträgliche pH-Wert nicht mehr gegeben, sodass eine verkürzte Haltbarkeit auftreten kann. [28].

Endothelzellen:

Die drei verwendeten Endothelzell-Arten reagierten auf diesen Puffer mit Ablösen von der Wachstumsoberfläche. Mögliche Ursachen dafür sind zum einen ein Fehlen von Kalziumionen, die für die Anheftung der Zellen essentiell sind, und zum anderen der pH-Wert des ACD-Stabilisators, der mit 5,12 außerhalb des verträglichen Bereiches zu liegen scheint.

CPD-Stabilisator:

Erythrozyten:

Die Lagerung in diesem Puffer führte innerhalb von 30 Minuten zu keiner äußerlichen Veränderung der Erythrozyten. Der Zusatz von Phosphatsalzen zur Neutralisation der Stoffwechselprodukte dürfte eine längere Haltbarkeit der Blutprobe bewirken.

Endothelzellen:

Auf Endothelzellen hat diese Lösung die gleichen Wirkungen wie der oben angeführte ACD-Stabilisator und war damit nicht geeignet.

0.003M Kalzium- und Magnesium-hältiger PBS:

Erythrozyten:

Bereits nach 10 Minuten Lagerung beginnen die roten Blutkörperchen die Form eines Stechapfels anzunehmen (Abb. 4). Grund dafür dürfte weniger der pH-Wert sein, der mit 7,2 im verträglichen Bereich liegt, als die Osmolarität, die mit 257 mosmol deutlich unter jener

der Stabilisatorlösungen liegt. Das Fehlen von Glucose kann ebenfalls zu dieser Veränderung führen, da die Erythrozyten kein Substrat zur Energiegewinnung vorfinden. Eine Abnahme der ATP-Konzentration ist somit wahrscheinlich und mögliche Ursache der Verformung.

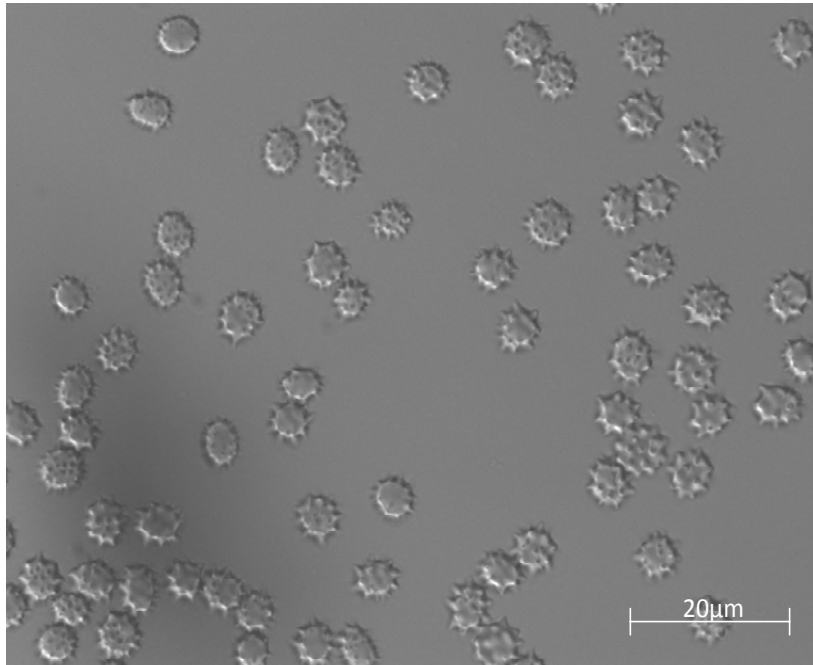


Abb. 4: Erythrozyten in Kalzium und Magnesium hältigen PBS nach 10 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur. Aufgenommen mit Zeiss Axio Observer.Z1 (Göttingen, Deutschland).

Endothelzellen:

Wie erwartet traten bei Endothelzellen keine Veränderung der Zellform ein und auch ein Ablösen konnte nicht beobachtet werden.

0.003M Kalzium- und Magnesium-hältiger PBS mit Glucose:

Erythrozyten:

Wird der oben genannte PBS mit Glucose versetzt, verlängert sich die Haltbarkeit der Erythrozyten erheblich, selbst nach 45 Minuten ist keine Veränderung der Zellform erkennbar. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass diese Lösung annähernd die gleiche Osmolarität wie die oben genannten Stabilisatorlösungen besitzt und damit bessere Bedingungen für Erythrozyten bietet. Glucose wurde deswegen gewählt, da mit dieser Substanz die Osmolarität angehoben werden kann ohne den pH-Wert nennenswert zu verändern und sie als Nährstoff für Erythrozyten dient.

Endothelzellen:

Die Erhöhung der Osmolarität hat keinen Einfluss auf die Viabilität der verwendeten Endothelzellen. Weder Formveränderungen der Zellen noch Verlust des Zellverbandes konnte beobachtet werden.

Zusammenfassung:

Diese Versuchsreihe ergab, dass die CPD-Stabilisatorlösung besonders gut für Lagerung von Erythrozyten über 30 Minuten bei Raumtemperatur geeignet ist. Diese Lösung wird auch als Stabilisator zur Lagerung von Blutkonserven verwendet [28]. Ebenso ist der modifizierte PBS-Puffer mit Glucose geeignet. Auch in dieser Lösung können rote Blutkörperchen während einer Lagerung von 30 Minuten problemlos viabil erhalten werden. Für Endothelzellen erfüllen Kalzium- und Magnesium-hältiger PBS und seine modifizierte Form mit Glucose die Anforderungen für diese Zellen. Die modifizierte Form des PBS-Puffers scheint demnach auch für die Kombination von Erythrozyten und Endothelzellen in einem Versuchsaufbau geeignet zu sein, da die Lagerung in diesem Puffer die Lebensfähigkeit beider Zellarten über diesen definierten Zeitraum nicht beeinflusst.

4. Zusammenfassung

4.1. Deutsch

Die Lektinbindungsmuster von Endothelzellen werden bei 4°C, vor und nach Induktion einer Entzündung durch TNF- α , an HUVEC, HUVEctert und HMEC untersucht. Weiters wird die Verträglichkeit von WGA mit roten Blutkörperchen analysiert. Die Ergebnisse zeigen eine sättigbare Lektinbindung an den Zellmembranen, wobei WGA und UEA-I die höchste Bindungsrate und Spezifität mit > 90% aufweisen. Die Induktion einer Entzündung bewirkt nur eine geringfügige Erhöhung der Zell-Lektin Wechselwirkung bei HUVEC mit WGA bzw. bei HUVEctert mit UEA-I. Bei allen anderen Lektinen resultiert eine Reduktion der Wechselwirkungen. Eine mögliche Ursache dafür ist der durch TNF- α ausgelöste Umbau der Oberflächenstrukturen der Zellen. Einzelzellen dieser Endothelzelllinien weisen das gleiche Lektin-Bindungsmuster auf wie bei den entsprechenden aktivierten Endothelzellen. Da die Lektinbindungsraten von WGA oder UEA-I nach Einwirken von TNF- α nur geringfügig steigen, kann keine ausgeprägte Änderung der Lektin-Wechselwirkung mit entzündetem Endothel beobachtet werden. Die Bestimmung der Verträglichkeit von WGA mit Erythrozyten ergibt, dass unter 20pmol WGA/50 μ l keine Aggregation der Zellen auftritt.

Die Modifikation von PLGA-Mikropartikeln durch PEI-Beschichtung führt zu einer verstärkten Hydrolyse, die durch Alkalisierung der Suspension während des Beschichtungsprozesses ausgelöst wird. Die Untersuchung der TAAc-Freisetzung aus PLGA-Mikropartikeln ergibt eine Freisetzungsrate von 97,98% TAAc im offenem und 47,61% TAAc im geschlossenem System.

Die Untersuchung der Humanalbumin-Bindung an Endothelzellen zeigt keine signifikante Änderung gegenüber den Negativkontrollen. Eine Bindung des Analyten an die eingesetzten Endothelzelllinien kann nicht bestätigt werden.

Die mikroskopische Beobachtung der Erythrozyten unter Flussbedingungen zeigt, dass es möglich ist, native Erythrozyten ohne nennenswerte Beeinträchtigung ihrer Viabilität bzw. Form, Scherkräften auszusetzen. Weiters wird eine zentrale Anreicherung der Zellen in den Kanalstrukturen beobachtet. Die Untersuchung verschiedener Puffersysteme für Erythrozyten und Endothelzellen ergibt, dass ein modifizierter PBS-Puffer mit Kalzium, Magnesium und Glucose die Kombination beider Zellarten in einem System erlauben würde.

4.2. Englisch

The lectin-binding capacity of endothelial cell membrane was examined with the cell lines HUVEC, HUVEctert and HMEC at 4°C with and without inducing inflammation by TNF- α pretreatment. The lectin data indicated saturable lectin binding to the cell membrane for both, healthy and inflamed endothelial cells. WGA and UEA-I exhibited the highest lectin-binding rate and specificity amounting to more than 90%. Interestingly, inflammation provokes only a slight increase of cell-bound WGA in case of HUVEC and UEA-I in case of HUVEctert, respectively. The interaction of all other lectins under investigation decreased upon inflammation, which might be due to changes in cell surface structure after cytokine stimulation. At the single cell level, lectin-binding was independent from activation with TNF- α . Screening the agglutinating effect of WGA with erythrocytes revealed that 20pmol WGA /50 μ l is the threshold below that no haemagglutination occurs and biocompatibility at low WGA-concentrations.

Another aim of the present work was the characterization of TAAc-release from PLGA-microparticles and their surface modification for inversion of surface charge. Unfortunately, the process of PEI-coating leads to reinforced hydrolysis of the particles, most probably due to increasing pH of the suspension during coating. The release of TAAc from PLGA-microparticles was evaluated in two systems, the so called open and closed system. Whereas the cumulative release in the former system amounted to 97.98% TAAc it was only 47.61% TAAc in the closed system due to approaching saturation conditions.

Furthermore, membrane binding of HSA to endothelial cells was elucidated in this project. In contrast to the literature, the data collected revealed no significant interactions of HSA with the endothelial cell lines.

A final focus was the establishment of an *in-vitro* – system mimicking blood vessels. To simulate blood flow, erythrocytes were circulated in channels coated with endothelial monolayer by surface acoustic waves. Monitoring the cells during the experiment revealed unaltered retention of viability and shape of native erythrocytes under shear stress, and an axial distribution in the microchannel. Screening of erythrocytes and endothelial cells in presence of different buffers revealed that a modified PBS-buffer supplemented with

calcium, magnesium and glucose is biocompatible with both cell types, endothelial cells and red blood cells.

Anhang C

Tabelle 1. Lektinbindung an Endothelzellen

Bindungsstudie mit Monolayern von HUVEC, HUVEctert und HMEC in den Konzentrationen von 1,56 bis 100pmol Lektin/50µl. Bindungsmedium ohne Analyte dienten zur Erfassung der Autofluoreszenz. Es wurde die relative zellassozierte Fluoreszenz nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C bei einer Anregung von 485nm und einer Emission von 535nm (TECAN, Infinite M200, Österreich) bestimmt. Zusätzlich wurde die gleiche Bindungsstudie mit aktivierten Endothelzellen (HUVEC und HUVEctert) durchgeführt. Aktiviert wurden die Zellen durch 4-stündige Inkubation mit TNF-α (0,5ng/50µL) bei 37°C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6 Einzelbestimmungen inklusive Standardabweichung.

HUVEC

(pmol/50µl)	WGA	STL	UEA	LCA	PNA	DBA
100	183.82±17.99	178.59±11.01	203.89±19.69	205.32±19.69	28.32±5.58	4.60±1.69
50	171.24±25.91	171.09±14.56	205.19±15.85	169.69±9.79	23.53±2.39	1.67±1.10
25	163.48±12.12	153.96±10.23	190.31±27.95	131.04±15.12	16.44±1.69	0.32±0.49
12.5	118.41±12.42	111.77±8.52	148.70±13.55	110.86±17.46	11.01±0.81	0.63±1.76
6.25	64.67±10.59	63.49±3.62	105.49±5.03	72.39±10.00	6.63±1.48	-0.08±0.89
3.125	27.52±1.76	31.77±1.54	61.42±4.98	46.53±7.46	4.15±0.93	-0.56±1.59
1.56	14.48±1.52	12.81±1.00	35.80±2.59	25.68±2.39	2.38±0.49	0.08±0.87
0	0.00±0.47	0.00±0.46	0.00±0.65	0.00±0.56	0.00±0.23	0.00±0.78

HUVEC nach Aktivierung mit TNF-α

(pmol/50µl)	WGA	STL	UEA	LCA	PNA	DBA
100	227.33±28.43	129.64±18.28	99.23±17.52	118.15±14.10	10.76±2.14	9.20±2.83
50	187.78±32.33	111.56±14.62	105.80±13.92	101.62±4.16	8.89±0.96	5.55±2.19
25	160.85±11.28	94.27±17.48	97.71±7.22	78.74±1.99	7.19±1.00	2.70±1.03
12.5	94.37±9.10	81.04±12.05	80.80±5.64	63.96±2.71	4.84±1.02	2.06±1.44
6.25	58.59±2.63	41.67±7.68	64.13±6.55	49.05±2.35	3.63±0.79	0.63±1.86
3.125	28.89±3.85	27.19±4.36	47.59±6.56	38.47±2.04	1.90±0.26	-0,80±0,80
1.56	11.41±1.08	13.44±1.89	32.59±2.17	25.18±0.62	1.41±0.64	0.24±0.70
0	0.00±0.26	0.00±0.55	0.00±1.06	0.00±0.81	0.00±0.43	0.00±1.64

HUVECtert

(pmol/50µl)	WGA	STL	UEA	LCA	PNA	DBA
100	229.93±13.46	190.47±6.50	218.27±19.36	107.79±6.55	17.84±1.27	6.27±2.21
50	231.74±5.80	189.38±4.13	203.21±11.12	97.57±4.19	14.22±0.81	1.51±1.40
25	221.59±6.69	171.77±5.62	193.15±18.84	81.44±7.81	9.45±1.10	1.03±1.11
12.5	191.74±12.41	151.15±7.36	158.95±13.79	64.41±5.49	7.19±1.44	0.71±1.34
6.25	120.04±7.56	96.30±3.58	114.26±10.35	49.28±4.42	4.41±0.70	-0.32±1.70
3.125	63.07±2.62	54.17±2.07	77.78±5.32	36.35±2.42	2.45±0.41	0.63±1.08
1.56	30.63±1.22	27.24±1.94	46.36±3.76	20.85±1.65	0.82±0.38	0.00±1.29
0	0.00±0.30	0.00±0.47	0.00±1.18	0.00±0.33	0.00±0.09	0.00±1.26

HUVECtert nach Aktivierung mit TNF-α

(pmol/50µl)	WGA	STL	UEA	LCA	PNA	DBA
100	178.33±9.03	131.51±13.04	226.73±22.69	80.04±7.90	13.17±1.13	4.44±1.26
50	174.63±13.19	133.75±9.97	201.17±11.93	75.31±7.09	11.57±1.58	1.59±1.74
25	165.85±9.17	125.10±6.13	178.83±10.54	67.52±6.60	7.48±1.08	1.83±1.58
12.5	147.74±6.69	110.73±3.93	146.61±8.40	52.03±6.11	5.39±0.73	1.51±0.65
6.25	111.11±3.98	79.64±3.69	112.72±6.75	42.43±3.75	3.04±0.38	0.63±0.92
3.125	58.18±0.68	46.51±2.60	78.70±3.96	32.61±1.10	1.77±0.75	0.40±0.83
1.56	31.30±1.85	23.85±1.44	47.90±2.10	22.21±1.35	1.11±0.48	1.03±0.58
0	0.00±0.67	0.00±0.81	0.00±1.11	0.00±0.50	0.00±0.64	0.00±1.23

HMEC

(pmol/50µl)	WGA	STL	UEA	LCA	PNA	DBA
100	101.00±13.79	79.43±9.00	90.00±10.51	30.90±3.00	5.90±0.80	4.92±1.74
50	104.23±8.76	71.15±7.55	81.80±13.83	31.94±3.14	5.42±0.97	2.70±1.74
25	96.14±15.23	63.70±3.63	73.27±8.21	26.89±2.23	3.07±0.72	1.67±0.74
12.5	80.70±12.96	57.92±4.47	59.57±5.83	23.33±1.06	3.01±0.97	0.48±0.84
6.25	66.52±5.69	44.01±8.39	46.42±2.48	19.32±1.53	1.63±0.63	-0.08±0.89
3.125	43.18±4.12	28.49±1.82	31.17±1.84	15.05±0.88	1.01±0.37	0.16±0.82
1.56	28.15±2.55	16.34±2.95	20.43±2.26	11.08±1.04	0.56±0.27	-0.16±1.14
0	0.00±0.26	0.00±0.55	0.00±0.73	0.00±0.33	0.00±0.27	0.00±0.89

Tabelle 2. Lektinbindung an Endothelzellen

Bindungsstudie an Monolayern von HUVEC und HUVECtert im Konzentrationsbereich 0,78 - 12,5pmol Lektin /50µl. Um die Lektinbindung an der Zelloberfläche mit und ohne Entzündung genauer definieren zu können, wurde die oben genannte Bindungsstudie mit niedrigeren Lektinkonzentrationen wiederholt. Es wurde auf die gleiche Weise vorgegangen wie oben beschrieben.

HUVEC

pmol/50µl	WGA	WGA + TNF	UEA	UEA + TNF	LCA	LCA + TNF
12.5	128.63±5.32	123.81±7.49	112.84±7.87	117.28±2.80	65.76±5.06	54.95±4.41
6.25	69.15±1.33	65.15±4.49	80.18±3.65	81.91±4.25	43.06±2.00	36.04±1.41
4.17	42.81±2.06	38.93±1.76	55.06±3.42	58.33±1.39	30.36±1.22	24.19±2.07
3.125	27.04±1.40	20.00±1.41	38.70±1.61	41.73±0.93	23.33±0.94	18.24±0.85
2.5	22.30±0.64	15.26±1.04	24.88±1.29	29.01±2.71	17.88±0.47	13.65±0.72
1.56	12.26±0.91	4.11±0.44	9.75±1.74	9.38±0.74	8.87±1.16	5.54±0.41
0.78	6.52±0.95	2.44±0.61	2.22±0.19	3.09±0.78	4.41±0.89	1.40±0.22
0	0.00±0.54	0.00±0.44	0.00±0.73	0.00±0.45	0.00±0.81	0.00±0.36

HUVECtert

pmol/50µl	WGA	WGA + TNF	UEA	UEA + TNF
12.5	106.59±9.33	96.89±4.87	97.10±9.47	84.94±9.33
6.25	55.48±4.69	55.04±3.05	70.93±3.56	62.59±3.97
4.17	33.15±1.59	30.85±1.89	51.23±2.78	43.52±2.62
3.125	15.89±1.43	17.41±0.71	37.28±2.17	29.81±1.97
2.5	9.26±0.61	11.41±1.05	26.23±2.60	21.79±2.51
1.56	0.52±0.61	1.33±0.80	9.57±0.83	7.35±0.69
0.78	0.11±0.50	0.52±0.26	3.70±1.48	2.22±0.90
0	0.00±0.56	0.00±0.70	0.00±0.84	0.00±0.80

Tabelle 3. Lektinbindung an Endothelzellen

Bindungsstudie an Einzelzellen von HUVEC und HUVECtert im Konzentrationsbereich 0,8 - 6,25pmol Lektin /50µl. Die Einzelzellsuspensionen wurden 5 Minuten mit der entsprechenden Lektinkonzentration bei 4°C inkubiert und anschließend die zellassozierte Fluoreszenz mittels Flowcytometrie bestimmt. Proben ohne Analyten dienten als negativer Blindwert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Einzelbestimmungen inklusive Standardabweichung.

HUVEC

pmol/50µl	WGA	UEA	LCA	PNA	DBA
0	0.049±0.004	0.0864±0.003	0.083±0.006	0.048±0.001	0.142±0.002
0.8	1.718±0.123	1.407±0.071	0.712±0.013	0.063±0.000	0.134±0.001
1.6	3.600±0.097	2.202±0.092	1.226±0.082	0.085±0.002	0.132±0.001
3.125	9.800±0.385	7.321±0.180	3.135±0.0	0.133±0.001	0.131±0.003
6.25	28.593±0.642	17.136±0.564	6.514±0.0	0.232±0.005	0.131±0.004

HUVECtert

pmol/50µl	WGA	UEA	LCA	PNA	DBA
0	0.064±0.002	0.118±0.002	0.085±0.003	0.054±0.000	0.228±0.002
0.78	0.698±0.029	3.365±0.426	0.826±0.028	0.061±0.001	0.308±0.058
1.56	1.286±0.015	5.358±0.223	1.367±0.133	0.078±0.001	0.296±0.091
3.125	6.481±0.210	11.037±0.582	4.135±0.435	0.116±0.002	0.299±0.022
6.25	25.778±2.837	25.432±2.126	10.640±0.220	0.195±0.005	0.786±0.431

Tabelle 4. Lektin-Bindungskapazität – Berechnung der 50%-Bindungsrate

Um die Lektinbindungen untereinander vergleichen zu können, wurde aus den erhaltenen Werten der Bindungsstudie an Endothezellmonolayern (siehe Tabelle 1) die 50% Lektin-Bindungskapazität ermittelt. Sie gibt die Menge an benötigtem Lektin an, um die Hälfte der Fluoreszenz im Vergleich zur Sättigung zu erreichen. Angegeben sind die Werte in pmol/50µl.

Bindungskapazität 50%	HUVEC	HUVEC + TNF	HUVECtert	HUVECtert + TNF	HMEC
WGA	8.88	15.29	5.88	4.69	3.9
STL	9.05	9.40	6.14	4.67	5.2
UEA	5.91	3.40	5.67	6.33	5.9
LCA	10.78	9.96	7.72	5.27	3.3
PNA	18.69	14.67	21.28	18.56	12.1
DBA	58.08	39.67	63.38	58.30	42.61

Tabelle 5. Ermittlung der Zellzahl mittels Zellproliferationstest (CyQuant®-assay)

Die Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und das Zellkulturmedium entfernt. Anschließend wurden 50µl Reagenz I (25µl 20mM HEPES pH 7 und 25µl Celllytic-M) zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Nach Zusatz von 150µl Reagenz II (CyQuant GR 0,33%, Celllysis buffer 5,0% und destilliertes Wasser 95%) wurde bei einer Anregung von 485nm und Emission von 535nm die Fluoreszenz bestimmt. Dieser Zellproliferationstest wurde sowohl mit nicht aktivierten als auch mit aktivierten Zellen (wie bei Tabelle 1 beschrieben) durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 18 Einzelbestimmungen inklusive Standardabweichung.

	HMEC	HUVEC	HUVEC + TNF	HUVECtert	HUVECtert + TNF
MW	10763.87	12324.92	11803.58	10101.50	10184.72
	± 761.90	± 1544.37	± 1433.32	± 671.30	± 620.49

Tabelle 6. Bestimmung der Zuckerspezifität der verwendeten Lektine

Die Spezifität der Lektinbindung wurde kompetitiv bestimmt. Die konfluenten Monolayer wurden nach einem Waschschrift mit kaltem PBS-Puffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} mit je 25µl einer Lektinlösung (12,5pmol/50µl) und dem entsprechenden komplementären Kohlenhydrat 30 Minuten bei 4° C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften mit dem oben genannten PBS-Puffer wurden die Proben fluorimetrisch analysiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6 Einzelbestimmungen inklusive Standardabweichung.

		HUVEC	HUVEC + TNF	HUVEctert	HUVEctert + TNF	HMEC
	Zucker µmol/50µl	Inhibition %	Inhibition %	Inhibition %	Inhibition %	Inhibition %
WGA + Chitotriose	0.01	95.31 ± 0.56	94.47 ± 2.65	94.08 ± 0.51	94.32 ± 1.0	91.16 ± 0.91
	0.005	83.05 ± 1.41	82.42 ± 2.77	82.19 ± 0.77	86.30 ± 1.11	73.65 ± 2.59
	0.002	41.68 ± 1.82	42.31 ± 4.06	38.54 ± 1.73	48.36 ± 5.66	27.11 ± 4.37
	0.001	22.94 ± 1.81	21.39 ± 4.09	16.64 ± 1.98	22.16 ± 3.83	14.10 ± 4.39
	0.0005	14.36 ± 3.15	16.54 ± 4.31	9.69 ± 3.11	9.21 ± 5.30	7.24 ± 6.28
	IC 50	0.002	0.002	0.003	0.002	0.003
UEA I + Fucose	1.5	93.18 ± 0.21	93.75 ± 1.31	95.55 ± 0.98	94.28 ± 1.30	92.56 ± 1.10
	1	90.00 ± 1.86	91.51 ± 0.77	92.10 ± 1.19	92.17 ± 1.28	89.50 ± 0.88
	0.5	81.36 ± 2.68	81.48 ± 1.62	86.01 ± 1.70	83.32 ± 1.76	78.41 ± 2.44
	0.25	70.91 ± 1.67	66.13 ± 1.94	70.57 ± 2.80	69.46 ± 1.27	64.41 ± 3.23
	0.1	52.88 ± 3.42	47.84 ± 3.50	50.86 ± 1.88	48.00 ± 2.30	40.55 ± 1.97
	0.05	36.67 ± 5.09	30.09 ± 5.66	28.06 ± 4.06	32.42 ± 4.82	28.74 ± 3.33
	IC 50	0.088	0.111	0.097	0.109	0.144
LCA + D-Mannose	30	80.58 ± 0.73	81.11 ± 1.22	83.08 ± 1.10	80.39 ± 1.91	82.08 ± 1.86
	10	55.43 ± 0.93	81.25 ± 1.27	60.68 ± 1.32	60.08 ± 1.50	68.60 ± 1.56
	5	34.63 ± 1.04	71.53 ± 1.23	46.44 ± 1.12	44.53 ± 1.37	43.16 ± 3.33
	1	6.21 ± 2.1	33.61 ± 2.64	19.58 ± 2.83	9.94 ± 1.10	15.41 ± 1.95
	0.5	-2.17 ± 1.18	21.66 ± 1.05	9.64 ± 1.13	7.84 ± 2.04	9.24 ± 2.39
	0.25	0.31 ± 1.77	8.61 ± 1.46	1.92 ± 2.85	1.81 ± 2.34	3.07 ± 4.24
	IC 50	8.345	2.005	5.946	6.381	6.024

Tabelle 7. Bindung von Humanalbumin an Endothelzellen

Um die Bindung von Albumin an Endothelzellen zu charakterisieren, wurden die konfluenten Monolayer mit einer Verdünnungsreihe von HSA in albuminfreiem Medium (6,25-100µg/ml) 60 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend die zellgebundene Fluoreszenz bestimmt. Um Interaktionen mit dem im Kultivierungsmedium enthaltenen Albumin zu vermeiden, wurden die Zellen vor dem Versuch 2 Stunden bei 37°C in albuminfreiem Medium inkubiert. Proben ohne Analyten dienten zur Ermittlung der Autofluoreszenz der Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6 Einzelbestimmungen inklusive Standardabweichung.

F-HSA (µg/ml)	HUVEC	HUVECtert	HMEC
100	49.17±10.21	7.50±4.24	19.90±8.20
50	25.00±4.54	3.50±1.41	10.00±2.07
25	9.17±3.78	2.50±1.41	4.83±1.03
12.5	6.17±2.88	2.50±0.00	5.17±1.97
6.25	2.17±1.86	1.00±2.12	1.17±1.97
0	0.00±1.94	0.00±2.12	0.00±1.05

Tabelle 8. Eichgerade von TAAc in Acetonitril

TAAc µg/ml	Retentionszeit	Peakfläche	Peakhöhe
2	2.728	91.23356	17.83452
5	2.726	190.27887	37.12444
10	2.727	380.30069	74.07523
15	2.724	607.67688	115.70445
20	2.72	783.24585	148.63588
25	2.719	996.68182	189.7803
30	2.718	1171.97083	223.3951
40	2.719	1547.99429	297.7684
50	2.719	1981.69446	381.51028

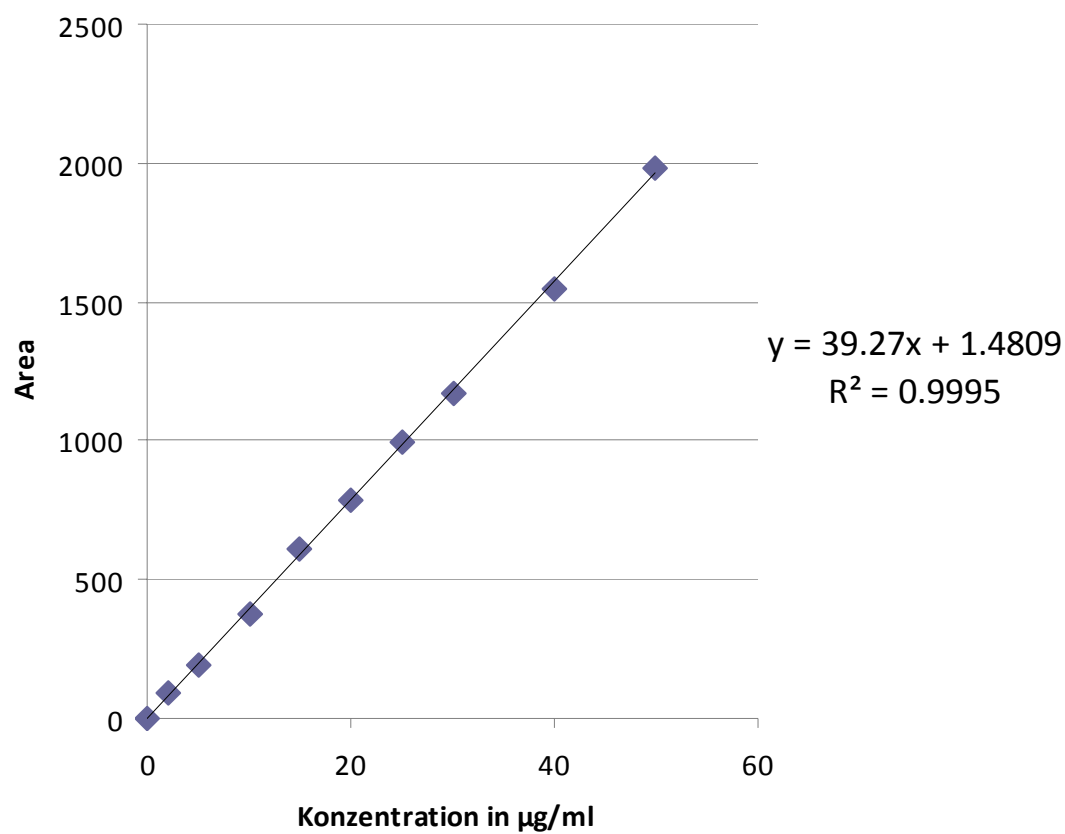
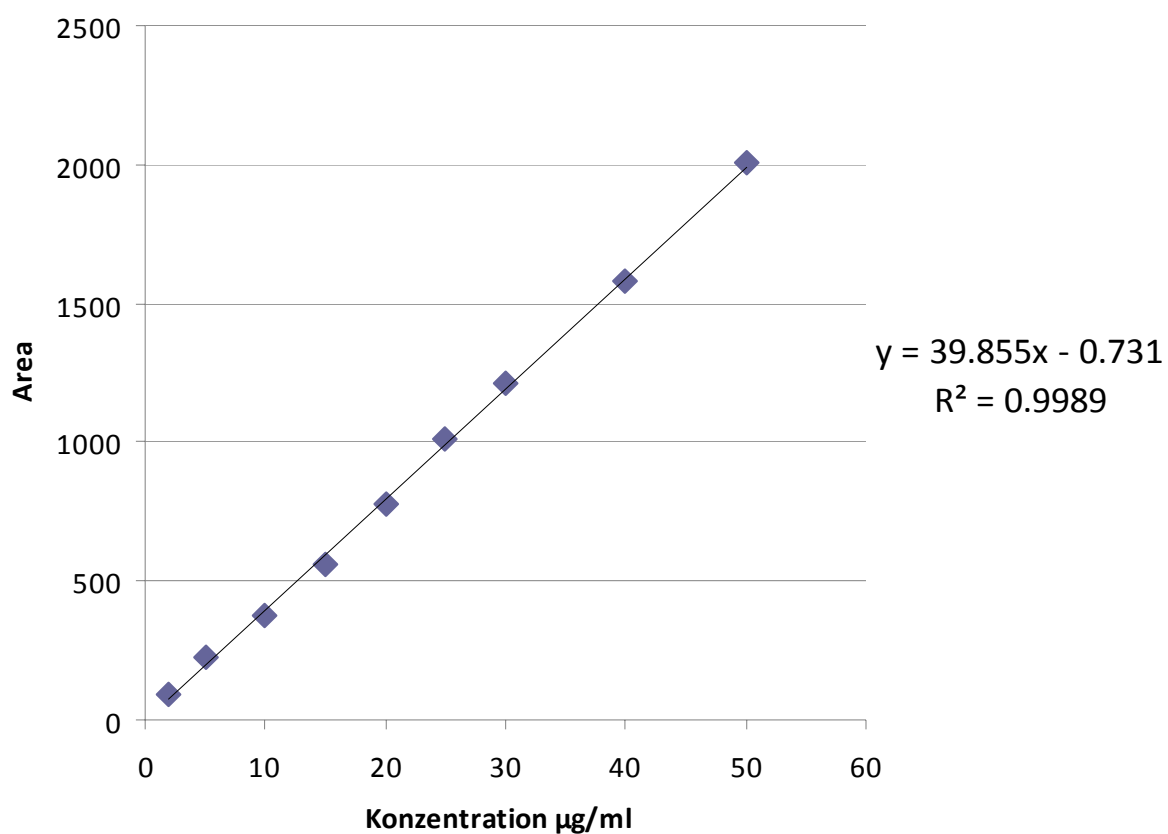


Tabelle 9. Eichgerade von TAAc in mobiler Phase (90% ACN / 10% Wasser)

TAAc µg/ml	Retentionszeit	Peakfläche	Peakhöhe
2	2.687	93.74893	10.59305
5	2.687	223.4129	25.47648
10	2.687	379.52684	50.850325
15	2.688	563.69473	77.909355
20	2.690	777.268615	115.102495
25	2.689	1014.99195	136.727585
30	2.690	1210.63196	167.69982
40	2.690	1578.37238	225.22513
50	2.689	2003.28565	276.653275



Literaturverzeichnis

[1] Blood. 2008 Jun 1;111(11):5271-81. doi: 10.1182/blood-2008-01-078204.

The vessel wall and its interactions.

Wagner DD, Frenette PS.

[2] Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 1;89(21):9991-5.

A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1.

Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G.

[3] J Control Release. 2012 Mar 10;158(2):194-206. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.084. Epub 2011 Sep 29.

E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging.

Jubeli E, Moine L, Vergnaud-Gauduchon J, Barratt G.

[4] Trends Mol Med. 2003 Jun;9(6):263-8.

The role of selectins in inflammation and disease.

Ley K.

[5] International Journal of Scientific & Engineering Research, Volume 3, Issue 4, April-2012

Insight of Lectins – A review

Himansha Singh, Sai Partha Sarathi

[6] Eur J Biochem. 1981 Jun;117(1):41-55.

Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins.

Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G, Montreuil J.

[7] Glycobiology. 2004 Nov;14(11):53R-62R. Epub 2004 Jun 30.

History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.

Sharon N, Lis H.

[8] J Cell Sci. 1992 Aug;102 (Pt 4):821-32.

Alteration in glycosaminoglycan metabolism and surface charge on human umbilical vein endothelial cells induced by cytokines, endotoxin and neutrophils.

Klein NJ, Shennan GI, Heyderman RS, Levin M.

[9] J Clin Invest. 1973 Nov;52(11):2745-56.

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR.

[10] Biologie für Mediziner – Buselmaier, 11. Auflage

[11] Biophys J. 1984 Apr;45(4):805-24.

Kinetics of rouleau formation. II. Reversible reactions.

Samsel RW, Perelson AS.

[12] Polymers (Basel). 2011 Sep 1;3(3):1377-1397. Epub 2011 Aug 26.

Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier.

Makadia HK, Siegel SJ.

[13] FASEB J. 1992 Feb 1;6(3):861-70.

Proteoglycans: many forms and many functions.

Hardingham TE, Fosang AJ.

[14] Histochem Cell Biol. 2002 Feb;117(2):105-12. Epub 2002 Jan 22.

Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function.

Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Malik AB.

[15] www.malvern.com

[16] Moderne Pharmazeutische Technologie 2009 – Cornelia M. Keck, Rainer H. Müller, Kapitel 3.1 Laserdiffraktometrie

[17] Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie – Welsch Sobotta, Lehrbuch Histologie 2. Auflage

[18] Blood. 1998 May 15;91(10):3527-61.

Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM.

[19] Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen – Thews, Mutschler, Vaupel, 6. Auflage

[20] Blood. 2011 May 12;117(19):5033-43. doi: 10.1182/blood-2010-09-267492. Epub 2011 Jan 25.

Functional architecture of Weibel-Palade bodies.

Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J.

[20] Mol Biol Cell. 2009 Feb;20(3):745-56. doi: 10.1091/mbc.E08-06-0569. Epub 2008 Nov 26.

Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor limits cell invasion by controlling alphaVbeta3 integrin expression and proteolytic processing of urokinase-type plasminogen activator receptor.

Schiller HB, Szekeres A, Binder BR, Stockinger H, Leksa V.

[21] J Invest Dermatol. 1992 Dec;99(6):683-90.

HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line.

Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ

[22] Produktinformation von Sigma zur Kopplung von Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) an Proteinen

[23] Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jan 9;93(1):250-4.

Isolation and characterization of a cell surface albumin-binding protein from vascular endothelial cells.

Tiruppathi C, Finnegan A, Malik AB.

[24] Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Dec;281(6):L1512-22.

Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells in vivo induced by albumin-binding protein.

Vogel SM, Minshall RD, Pilipović M, Tiruppathi C, Malik AB.

[25] Biophys J. 1982 Feb;37(2):493-514.

Kinetics of rouleau formation. I. A mass action approach with geometric features.

Samsel RW, Perelson AS.

[26] Gerthsen Physik 24. Auflage – Dieter Meschede

[27] Lab Chip. 2009 Oct 7;9(19):2782-8. doi: 10.1039/b906006e. Epub 2009 Jul 6.

An acoustically-driven biochip - impact of flow on the cell-association of targeted drug carriers.

Fillafer C, Ratzinger G, Neumann J, Guttenberg Z, Dissauer S, Lichtscheidl IK, Wirth M, Gabor F, Schneider MF.

[28] Transfusionsmedizin und Immunhämatologie 4. Auflage, Grundlagen, Therapie, Methodik – Kiefel

[29] Pharmakopoea Europaea – Solutiones Anticoagulantes et Sanguinem Humanum Conservantes

[30] Arteriosclerosis. 1988 Nov-Dec;8(6):819-24.

Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood.

Aarts PA, van den Broek SA, Prins GW, Kuiken GD, Sixma JJ, Heethaar RM.

[31] Roche Grundkurs hämatologische Morphologie – Barbara J. Bain, Dieter Huhn, Andreas Kage, Band 7

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Curriculum Vitae



Persönliche Daten

Name: Martina Führinger
Geburtsdatum: 30.06.1987
Geburtsort: Mödling, Niederösterreich
Familienstand: ledig

Familie

Mutter: Christine Führinger (22. September 1957)
Vater: Siegfried Führinger (24. März 1954)
Schwester: Eva Führinger (18. August 1983)

Ausbildung

1993-1997 Volksschule Hyrtlplatz, Mödling
1997-2001 Unterstufe des wirtschaftskundlichen Real-
gymnasiums, Untere Bachgasse, Mödling
2001-2006 HLA für Mode- und Bekleidungstechnik, Mödling
Abschluss mit Matura
2006-dato Diplomstudium Pharmazie, Universität Wien

Berufliche Tätigkeiten

01.07.2003-31.07.2003	Benetton, Pratscher GmbH Ferialpraktikant
01.10.2011-29.02.2012	Universität Wien – Pharmazie Studentische Mitarbeiterin in den Übungen Pharmakologie, Pharmakotherapie und Toxikologie I
06.08.2012-31.08.2012	Activ Apotheke Tribuswinkel Praktikant
01.09.2012-30.11.2013	Activ Apotheke Tribuswinkel geringfügig Angestellte
01.03.2013-31.07.2013	Universität Wien – Pharmazie Studentische Mitarbeiterin in den Übungen Industrielle Arzneimittelherstellung
