



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**„Einfluss von Blutzellen auf die Wechselwirkung
zwischen Mikropartikeln und Endothelien unter
Flussbedingungen.“**

verfasst von

Nina Mizerovsky

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Danksagung:

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Unterstützung und Ermöglichung meiner Diplomarbeit und auch besonders für den eigenen Körpereinsatz in Form einer für die Arbeit sehr wichtigen Blutspende.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth, der immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein herzliches Dankeschön für die aufopfernde Betreuung und kompetente Hilfestellung gilt Frau Mag.^a Dr.ⁱⁿ Xueyan Wang während der experimentellen Arbeit und bei der Erstellung der Diplomarbeit.

Ich möchte mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglicht und mich vor allem in schwierigen Zeiten immer unterstützt und ermutigt haben.

Meinem Bruder Lukas danke ich für eine Blutspende, das Korrekturlesen meiner Arbeit und die motivierende Unterstützung durch Gespräche.

Ein großes Dankeschön an Herrn Dr. med. Hubert Göpfrich, der bereit war, die für die Diplomarbeit notwendigen Blutabnahmen in seiner Ordination durchzuführen.

Meinen Freunden und Wegbegleitern während des Studiums danke ich für die gute Teamarbeit und die heiteren Momente bei der Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	7
2 AGGREGATION VON BLUTZELLEN DURCH WEIZENLEKTIN	9
3 PLGA-MIKROPARTIKEL	11
3.1 EINLEITUNG.....	11
3.2 METHODEN UND MATERIALIEN.....	13
3.2.1 Herstellung von PLGA-Mikropartikeln	13
3.2.2 Oberflächenmodifikation	14
3.2.3 Kultivierung von Endothelzellen.....	15
3.2.4 Interaktion zwischen PEI-modifizierten und WGA-modifizierten PLGA-Mikropartikeln und Endothelzellmonolayer	16
3.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	17
3.3.1 Charakterisierung der PEI- modifizierten PLGA-Mikropartikel.....	17
3.3.2 Interaktion zwischen PEI-modifizierten – bzw. WGA-modifizierten PLGA-Mikropartikeln und Endothelzellmonolayern	17
4 ENTWICKLUNG EINES IN-VITRO MODELLS VON BLUTGEFÄßEN ZUR UNTERSUCHUNG DER INTERAKTIONEN MIT PARTIKULÄREN ARZNEIFORMEN.....	19
4.1 EINLEITUNG.....	19
4.1.1 Blut.....	19
4.1.2 Flußsystem	22
4.2 METHODEN UND MATERIALIEN.....	24
4.2.1 Kanalherstellung	24
4.2.2 Subkultivierung von Endothelzellen im Kanal	24
4.2.3 Blutabnahme	25
4.2.4 Selektion eines geeigneten Puffersystems für Erythrozyten und Endothelzellen.....	26
4.2.5 Untersuchung der Interaktion von Erythrozyten, Endothelzellen und PLGA-Mikropartikeln unter Flußbedingungen.....	27
4.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	29
4.3.1 Auswahl eines geeigneten Puffersystems für Blut- und Endothelzellen	29
4.3.2 Interaktion zwischen Blutzellen, Endothelzellen und PLGA-Mikropartikeln unter Flußbedingungen	31
5 INTERNALISATION VON F-WGA IN HUVEC.....	34
5.1 EINLEITUNG.....	34
5.2 METHODEN UND MATERIALIEN.....	35
5.2.1 Internalisation von F-WGA in HUVEC bei 37°C/4°C.....	35
5.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	37
6 ZUSAMMENFASSUNG DEUTSCH-ENGLISCH	40
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	42
8 ANHANG A – PUBLIZIERTES MANUSKRIFT.....	44
9 ANHANG B	77
10 CURRICULUM VITAE.....	79

1 Einleitung und Problemstellung

Ziel des Drug Targetings ist die spezifische Anreicherung des Wirkstoffes am Wirkort. Da oftmals der systemisch applizierte Arzneistoff sehr hoch dosiert werden muss, um im erkrankten Gewebe eine therapeutische Wirkung zu erzielen, wäre eine Dosisreduktion bei gleicher Wirksamkeit und eine damit verbundene Reduktion von Nebenwirkungen wünschenswert. Ziel ist es, die Wirksamkeit zu verbessern. Das kann mit zielgerichteten Arzneistoffträgern erreicht werden, da diese den Arzneistoff direkt ins erkrankte Gewebe bringen können ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen. Dazu müssen bioabbaubare Arzneistoffträger verwendet werden, wie zum Beispiel der Polyester Poly(DL-lactid-co-glycolid) (PLGA). Aus diesem Polyester können mit relativ einfachen Techniken Mikropartikel hergestellt werden, die direkt mit dem Zielgewebe interagieren können. Um den Wirkstoffbehälter an eine zelluläre Zielstruktur zu lenken wird noch ein zielerkennendes Strukturelement benötigt. Dazu können pflanzliche Lektine, wie das Weizen-Lektin (WGA), eingesetzt werden. [1]

Eine besonders große Rolle spielt dabei die Verträglichkeit von WGA mit Erythrozyten, da der Hauptteil der Arzneistoffe über die Blutbahn zum Zielgewebe transportiert wird. Diese Verträglichkeit soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wobei die Verklumpung der Erythrozyten von verschiedenen Blutgruppen als entscheidender Parameter bewertet werden soll.

Weiteres sollte die Interaktion zwischen PLGA-Mikropartikeln, Erythrozyten und Endothelzellen untersucht werden. Ein wichtiger Punkt ist dabei, eine positiv geladene Partikeloberfläche zu generieren, um eine Wechselwirkung zwischen Arzneistoffträger und Zielgewebe zu ermöglichen. Die Oberflächenmodifikation sollte durch Beschichtung der PLGA-Mikropartikel mit dem Polykation Polyethylenimin (PEI) erreicht werden.

Zusätzlich sollte ein in-vitro Modell von Blutgefäßen entwickelt werden, um das Verhalten von Erythrozyten, Mikropartikeln und Endothelzellen gemeinsam unter dynamischen Bedingungen beobachten zu können und vor allem ein geeignetes Puffersystem zu finden, dass den physiologischen Bedürfnissen beider Zellarten entspricht.

Im in-vitro Modell von Blutgefäßen sollen kultivierte menschliche Endothelzellen eingesetzt werden. Es werden zwei Arten von Zellen verwendet: primäre HUVEC und HUVEC-tert. Bei primären HUVEC handelt es sich um primäre Endothelzellen, welche durch Behandlung mit Kollagenase Typ 1 aus der Nabelschnur isoliert werden. HUVEC-tert sind immortalisierte Zellen, die aus HUVEC durch Einschleusung des Gens codierend für die „humane Telomerase reverse Transkriptase“ hergestellt wurden. In Kultur bilden beide Zelltypen einen dichten, homogenen Monolayer.

Schließlich sollen Internalisationsversuche mit Fluoreszein-markiertem Weizen-Lektin (F-WGA) in Endothelzellen durchgeführt werden. Dabei soll untersucht werden, ob und inwieweit Weizenlektin als Transportmolekül in Endothelzellen fungieren kann. Diese Vermutung beruht auf der Beobachtung, dass WGA in Caco-2-Monolayer oder in artifizielles Blasengewebe aufgenommen wird. [2]

2 Aggregation von Blutzellen durch Weizenlektin

Da die hohe Spezifität der Wechselwirkung zwischen WGA und Endothelzellen bekannt ist, wurde die Verklumpung von WGA mit Blutzellen, vorwiegend Erythrozyten, mittels Flowcytometrie untersucht und zur Bestätigung der Analyse mikroskopische Bilder der Hämagglutination ausgezählt. Es wurden Erythrozyten der Blutgruppen A, B und 0 verwendet.

Mit dem Zusatz steigender Mengen an WGA (0,039 mg/ml-1,25 mg/ml) stieg gleichzeitig - unabhängig von der Blutgruppe - der Prozentsatz an aggregierten Blutzellen. Die Durchflusscytometrie ergab, dass in Gegenwart von 0,31 mg/ml-1,25 mg/ml WGA mehr als 1 % der Blutzellen aggregieren. Dieser Prozentsatz war signifikant höher als jener der Kontrollgruppe und unabhängig von der Blutgruppe. Auch die quantitative Auswertung der mikroskopischen Bilder führte zum gleichen Ergebnis. Bei der höchsten WGA-Konzentration von 1,25 mg/ml konnten eindeutig große Aggregate festgestellt werden. Mit abnehmender Menge an WGA sank auch die Tendenz der Blutzellen zur Verklumpung und es konnten nur noch vereinzelt Aggregate beobachtet werden. Bei Blutgruppe B traten durchschnittlich 0,5 Aggregate, bei den Blutgruppen A und 0 jedoch 2,1 Aggregate auf. Bei allen Konzentrationsstufen <0,15 mg/ml WGA wurden nur $0,13 \pm 0,06$ % Aggregate unabhängig von der Blutgruppe gezählt. Dieses Ergebnis unterscheidet sich kaum von der Kontrollgruppe ohne WGA mit ebenfalls $0,13 \pm 0,03$ % Aggregaten.

Auch die mikroskopischen Bilder zeigten ein ähnliches Ergebnis. Etwa $0,1 \pm 0,2$ Blutzellaggregate pro Bild wurden in Lösungen mit $\geq 0,15$ mg/ml WGA beobachtet, im Vergleich zu $0,0 \pm 0,2$ Aggregaten in der Kontrollgruppe ohne Lektin.

Interessanterweise wurden auf den mikroskopischen Bildern der Hämagglutination von Blutgruppe 0 in Gegenwart von 0,15 mg/ml WGA ein paar überlagerte Erythrozyten beobachtet. Dabei könnte es sich um echte Aggregate handeln, oder den sogenannten „Rouleau- oder Geldrollen-Effekt“, der bei Erythrozyten bekannt ist. Bei diesem Rouleau Effekt können sich Erythrozyten in einer Länge von zwei bis mehrere Zellen aneinander lagern. Dieses Geldrollenphänomen ist reversibel und die Agglutinate können zum Beispiel durch Erhöhung der Scherrate wieder getrennt

werden. [3,4] Obwohl die Aggregation reversibel war, wurden diese Pseudoaggregate als Aggregate gewertet, die nach strengen Kriterien ausgewählt wurden. Bei weiterer Abnahme der WGA-Konzentration auf 0,07 mg/ml konnten keine Aggregate mehr beobachtet werden, ähnlich der Kontrollgruppe ohne WGA. Die mikroskopischen Bilder der Blutgruppen A und B zeigten ähnliche Resultate.

Diese Ergebnisse meiner experimentellen Arbeit sind Teil eines Manuskriptes, das zur Publikation eingereicht wird und den Anhang A darstellt.

3 PLGA-Mikropartikel

3.1 Einleitung

Mikropartikel haben in den letzten Jahren in der pharmazeutischen Technologie einen hohen Stellenwert als Arzneistoffträgersysteme erlangt. Bei Anwendung am Menschen sollten diese Polymere bioabbaubar sein. Zur Herstellung von Partikeln ist der Polyester Poly(DL-lactid-co-glycolid) (PLGA) etabliert, der eine hervorragende Biokompatibilität besitzt und bei Körpertemperatur und physiologischem pH von 7,4 hydrolytisch degradiert wird. Die Freisetzung des inkorporierten Wirkstoffes steigt beachtlich an, sobald die oligomeren Fragmente in Lösung gehen. Diese werden weiter zu den Monomeren Milchsäure und Glycolsäure abgebaut, die in den Citratzyklus eingeschleust werden bzw. Glycolsäure kann auch renal ausgeschieden werden. In den eingesetzten Konzentrationen zeigen sie keinerlei Anzeichen von Toxizität. [5]

Die hergestellten PLGA-Mikropartikel besitzen durch die endständige Carboxylgruppe des eingesetzten Polymers eine negativ geladene Partikeloberfläche. Da die Zelloberfläche des Endothels durch sialylierte Strukturen und sulfatierte Proteoglycane ebenfalls negativ geladen ist, könnte aufgrund der Abstoßung gleichsinniger Ladungen eine Wechselwirkung zwischen Partikeln und Endothelzellen verhindert werden. Das Ziel ist durch direkte Kopplung der Mikropartikel mit dem Polykation Polyethylenimin (PEI) eine positive Oberflächenladung zu bekommen, um die Wechselwirkung zwischen Arzneistoffträger und Zielgewebe zu ermöglichen bzw. zu verstärken. Damit könnte durch lokale Anreicherung des Wirkstoffes eine höhere Konzentration am Zielort erzielt werden. [6]

Die Arterienwand besteht aus drei Schichten, wobei die innerste Schicht, die sogenannte Intima, aus einer Schicht von Endothelzellen besteht. Endothelzellen sind spezialisierte, flache Zellen, die ein einschichtiges Plattenendothel bilden und von feinen kollagenen Fasern und einer fenestrierten, elastischen Membran umgeben sind. Ihre wichtigste Funktion ist die Bildung einer Barriere zwischen dem Blutgefäß und dem Extravasalraum. [7]

Endothelzellen (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) können aus der Nabelschnur isoliert werden und unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden, sodass sie einen dichten Monolayer bilden. Es handelt sich hier um primäre Endothelzellen (primäre HUVEC). Es wird auch mit immortalisierten Endothelzellen, den sogenannten HUVEC-tert, die durch Insertion des Gens der humanen Telomerase reversen Transkriptase in HUVEC immortalisiert wurden, gearbeitet.

HUVECs eignen sich gut zur Untersuchung von Endothelzell-Funktionen wie die Entwicklung von Arteriosklerotischen Plaque, die Angiogenese, die Auswirkung der Scherkräfte auf Zellen und die Rolle der Endothelzellen für die Blutgefäße. [8]

3.2 Methoden und Materialien

3.2.1 Herstellung von PLGA-Mikropartikeln

- Poly(DL-lactid-co-glycolid) (PLGA) 503 H, Boehringer-Ingelheim, Österreich
- Pluronic® F-68, Sigma-Aldrich, Österreich
- BODIPY® 493/503, Invitrogen Corp. California, USA
- Ethylacetat, Sigma-Aldrich, Österreich
- N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochlorid (EDAC), Sigma-Aldrich, Österreich
- N-Hydroxysuccinimid (NHS), Sigma-Aldrich, Österreich
- Polyethylenimin (PEI) MG= 10000; MG= 1200; verzweigt, Polysciences Europe GmbH, Deutschland

Alle verwendeten Substanzen sind von analytischer Reinheit.

Für die Herstellung einer 0,05 %igen wässrigen Pluronic® Lösung werden 100 mg Pluronic® eingewogen, 200 ml Aqua dest. zugegeben und bei Raumtemperatur bis zur Lösung gerührt. 60,0 mg PLGA werden ebenfalls eingewogen, 4 ml Ethylacetat zugesetzt, luftdicht verschlossen, bei 4°C bis zur Lösung gerührt und 2 µl BODIPY®-Lösung (1 mg pro ml in Ethylacetat) zugesetzt. In die PLGA/BODIPY®-Lösung lässt man 12 ml der 0,05 %igen Pluronic-Lösung schnell und ohne Tropfen einlaufen. Die Mischung wird mit dem Ultraturrax® (ULTRA - TURRAX® T8, IKA, Staufen, Deutschland; Stufe 2) fünf Minuten emulgiert und gekühlt, um eine Erwärmung der Emulsion zu verhindern. Diese Emulsion wird unter Rühren in 148 ml 0,05 %ige Pluronic®-Lösung rasch und ohne Tropfen eingebracht und bei Raumtemperatur unter Lichtschutz über Nacht zum Verdunsten von Ethylacetat gerührt.

Die Mikropartikelsuspension wird auf vier Zentrifugenröhrchen aufgeteilt, auf jeweils 30-40 ml mit HEPES aufgefüllt und bei 3200 UpM zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach werden die Überstände abgesaugt. Jedes Röhrchen wird wieder mit HEPES auf 35 ml aufgefüllt und das Pellet im gekühlten Ultraschallbad bei 100 % Intensität zehn Minuten lang resuspendiert. Dabei sollte immer wieder geschüttelt werden, um eine vollständige Resuspendierung der Mikropartikel zu erreichen. Danach wird wie oben beschrieben zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Insgesamt wird dreimal gewaschen. Nach diesen drei Waschschritten werden die Röhrchen mit HEPES auf 20ml aufgefüllt, im Ultraschallbad gut resuspendiert und in einen 100,0 ml Meßkolben vereinigt. Nach Auffüllen mit HEPES bis zur Marke wird umgeschüttelt, der Inhalt auf vier Röhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Größenbestimmung der Mikropartikel erfolgt mit dem Mastersizer 3000 (Malvern, UK).

3.2.2 Oberflächenmodifikation

Derivatisierung der PLGA-Mikropartikel mit PEI:

Um die Carboxylgruppe an der Oberfläche der PLGA-Mikropartikel zu aktivieren, wird 1 ml Partikelsuspension (1,5 mg/ml) mit einer Mischung von 125 µl einer EDAC/NHS-Lösung in 20 mM Hepes pH 7,0 (180 mg/ml EDAC; 7,5 mg/ml NHS) versetzt und zwei Stunden end-over-end bei Raumtemperatur gemischt.

Um überschüssige Aktivierungsreagentien zu entfernen wird anschließend dreimal mit je 1,5 ml 20 mM HEPES pH 8,0 gewaschen. Zwischen den Waschschritten wird bei 14000 UpM zwei Minuten bei 4°C zentrifugiert. Um eine vollständige Resuspendierung der Mikropartikel zu erreichen wird zwischen den Waschschritten das Pellet im gekühlten Ultraschallbad zehn Minuten lang unter Umschwenken inkubiert. Vor der Kopplung mit PEI wird das Pellet in 1 ml 20 mM HEPES pH 8,0 nochmals homogen resuspendiert und danach 500 µl PEI Lösung (10 mg/ml PEI in 1 M HEPES, pH 8,0) zugesetzt, wobei zwei Typen von PEI mit den Molekulargewichten 1200 (PEI 1200) und 10000 (PEI 10000) verwendet wurden. Zusätzlich wird mit Indikatorpapier der pH-Wert kontrolliert, um einen leicht basischen pH Wert von 8,0 zu gewährleisten. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur über Nacht am end-over-end-Mischer.

Am nächsten Tag werden nach Zusatz von 500 µl Glycin Lösung (100 mg/ml in HEPES pH 8,0) und fünf Stunden Inkubation am end-over-end-Mischer bei Raumtemperatur aktivierte Bindungsstellen an der Oberfläche der Mikropartikel ab gesättigt. Danach wird wieder viermal mit je 1,5 ml 20 mM HEPES pH 7,4 gewaschen. Vor und zwischen den Waschschritten wird bei 14000 UpM zwei Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet wieder in 20 mM HEPES pH 7,4 aufgenommen und im gekühlten Ultraschallbad bei 100 % Intensität zehn Minuten homogen suspendiert.

Vor der Bestimmung der Oberflächenladung im Zetasizer (Malvern, UK) wird das Pellet in 1 ml 20 mM HEPES pH 7,4 aufgenommen und im gekühlten Ultraschallbad bei 100 % Intensität zehn Minuten lang resuspendiert.

Derivatisierung der PLGA-Mikropartikel mit WGA

Die Immobilisierung von Wheat Germ Agglutinin (WGA, Vector Laboratories, UK) an der Partikeloberfläche erfolgt wie oben beschrieben. Nach der Aktivierung mit EDAC und NHS und dem Entfernen der überschüssigen Aktivierungsreagentien wird die Derivatisierung mit 50 µl WGA-Lösung (25 µg/ml beziehungsweise 50 µg/ml WGA in Aqua dest.) durchgeführt.

3.2.3 Kultivierung von Endothelzellen

Die Endothelzellen, primäre HUVEC oder HUVEC-tert, werden in EndoPrime® Medium (PAA, Österreich) unter Zusatz von Pen/Strep/Amphotericin B (Bio Whittaker®, 1 % v/v, Lonza, Schweiz) bei 37°C, 5 % CO₂ Begasung und 96 % Luftfeuchtigkeit, kultiviert.

Die Subkultivierung wird unter dem Laminar Air Flow durchgeführt, um eine möglichst hohe Keimarmut zu gewährleisten. Die noch unbenutzte Zellkulturflasche wird 30 Minuten vor dem Spalten der Zellen mit 6 ml 1 % Gelatine Lösung (Gelatine Typ B aus Rinderhaut, durch alkalische Behandlung hergestellt, Sigma-Aldrich, Österreich) beschichtet. Der konfluente Monolayer wird zwei Mal mit je 2 ml PBS Puffer gewaschen. Anschließend werden 2 ml 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung zugesetzt, um die Zellen von der Kulturflasche zu lösen. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Trypsin/EDTA-Lösung die Zellen möglichst noch nicht berührt. Danach wird die

Zellkulturflasche zugeschraubt, einige Male geschwenkt und unter dem Mikroskop die Ablösung der Zellen kontrolliert, wobei auf eine rasche Vorgehensweise zu achten ist. Nach Absaugen des Trypsins wird mit der Hand fest auf die Seite der Zellkulturflasche geschlagen, damit sich die Zellen am Boden der Flasche sammeln. Es wird 6 ml EndoPrime® Medium zugegeben und homogen suspendiert. Dabei muss beachtet werden, dass auch der Flaschenboden gespült wird. Nach Absaugen der Gelatine Lösung aus der unbenutzten Zellkulturflasche wird die benötigte Menge EndoPrime® Medium vorgelegt und ein entsprechendes Volumen an Zellsuspension zur weiteren Kultivierung langsam zugetropft.

3.2.4 Interaktion zwischen PEI-modifizierten und WGA-modifizierten PLGA-Mikropartikeln und Endothelzellmonolayer

Nachdem durch die kovalente Bindung von PEI an PLGA-Mikropartikel eine positiv geladene Oberfläche geschaffen werden konnte, sollte die Interaktion zwischen HUVEC mit PEI-Partikeln und WGA-Partikeln untersucht werden.

Dazu wurden primäre HUVEC in einer 96-well Mikrotiterplatte bis zur Konfluenz kultiviert. Nach einmaligem Waschen des Zellmonolayers mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, werden in jedes well 50 μl Partikelsuspension (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eingebracht. Unmittelbar nach Zusatz, sowie nach 30 Minuten Inkubation unter Lichtschutz bei 4°C, wird die relative Fluoreszenzintensität (RFI) im Mikrotiterplatten-Fluorimeter (Tecan Infinite M 200, Gröding, Österreich) bestimmt. Danach wird der Zelllayer zweimal mit Puffer gewaschen, um ungebundene Partikel zu entfernen. Ebenso wird nach jedem Waschschrift die zellgebundene Fluoreszenzintensität bestimmt.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Charakterisierung der PEI- modifizierten PLGA-Mikropartikel

Da die Inversion der Oberflächenladung durch Partikelcoating mit PEI nicht gelang, wurde die direkte kovalente Kopplung des Polykations an die freien Carboxylgruppen des PLGA über die Carbodiimid Methode versucht. [9] Die Kopplung wurde mit PEI mit den Molmassen 10.000 und 1.200 Da durchgeführt. Das gemessene Zeta-Potential von PLGA-Mikropartikeln mit PEI 1200 betrug $+ 28,55 \pm 2,76$ mV, jenes von PLGA-Mikropartikeln mit PEI 10000 bei $+ 23,95 \pm 4,61$ mV. Die deutliche Inversion des Zeta-Potentials von -50mV von PLGA-Mikropartikeln vor der Kopplung in den deutlichst positiven Bereich bestätigte die Immobilisierung der Polykationen an der Partikeloberfläche. Somit ist die direkte, Carbodiimid-vermittelte kovalente Kopplung von PEI eine geeignete Technik, um die Oberflächenladung der Partikel in den positiven Bereich zu verschieben.

3.3.2 Interaktion zwischen PEI-modifizierten – bzw. WGA-modifizierten PLGA-Mikropartikeln und Endothelzellmonolayern

Es ist äußerst schwierig einen intakten Zellmonolayer mit primären HUVEC und HUVEC-tert in einer 96-Well-Platte zu kultivieren. Die Zellen sind sehr empfindlich und auch bei manuellem Absaugen wird vermutlich ein erheblicher Anteil der Zellen trotz Gelatine-Beschichtung abgelöst bzw. zerstört. Die Messwerte von drei nebeneinanderliegenden wells mit gleicher Probe und Konzentration sind deutlich unterschiedlich. Da dieses Ergebnis auch beim Leerwert mit nicht modifizierten Partikeln in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ auftrat, ist davon auszugehen, dass sich der Zellmonolayer zum Teil abgelöst hat.

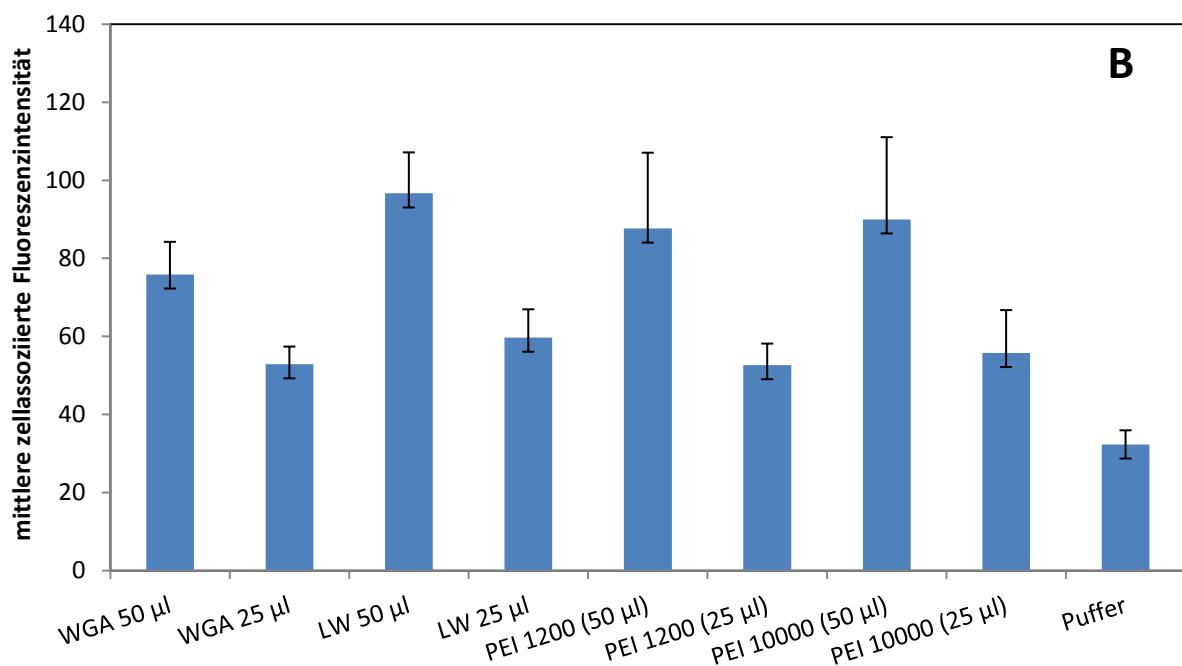
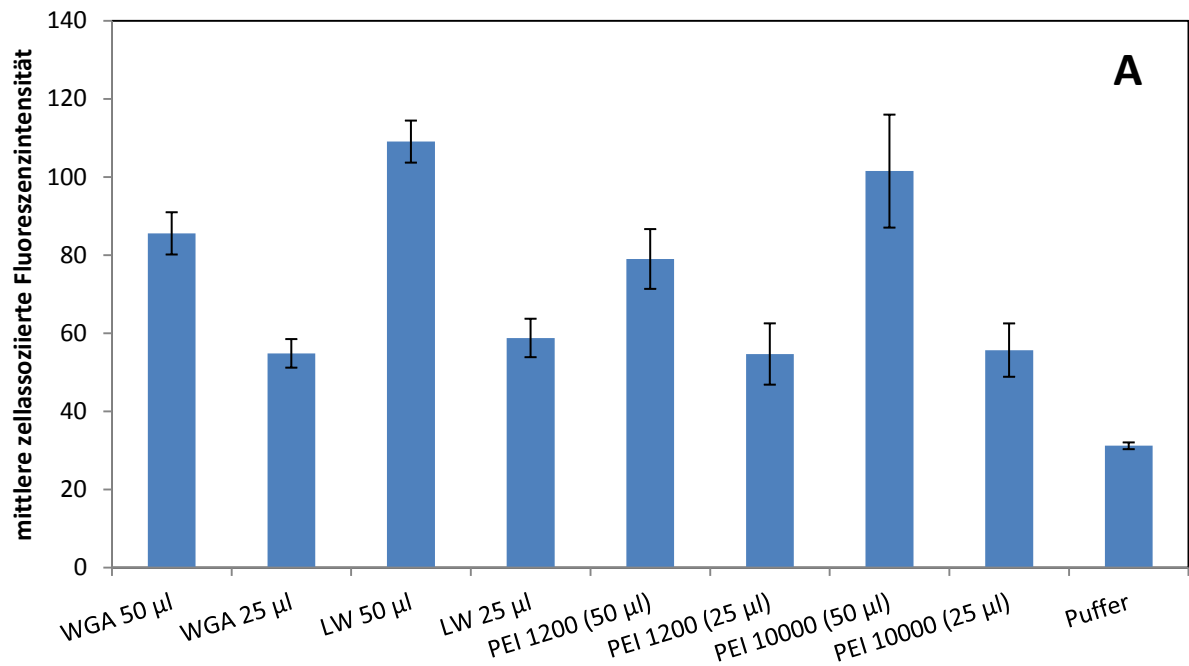


Abbildung 1: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität nach Inkubation von primären HUVEC (A) und HUVEC-tert (B) mit WGA-modifizierten – (WGA), PEI-modifizierten – (PEI 1200 und PEI 10000) und nicht modifizierten Partikeln (LW) in zwei Konzentrationsstufen (50 µg/ml und 25 µg/ml). Mittelwert und Standardabweichung aus drei Bestimmungen; Puffer = PBS mit Ca^{2+} / Mg^{2+} ohne Partikel

4 Entwicklung eines in-vitro Modells von Blutgefäßen zur Untersuchung der Interaktionen mit partikulären Arzneiformen

4.1 Einleitung

Während ihrer Passage durch Kapillaren der Blutgefäße müssen Erythrozyten sehr rasch ihre scheibenförmige Gestalt ändern. Da viele Kapillare einen engeren Durchmesser als die Erythrozyten selbst haben, ist ihre elastische Verformbarkeit Grundvoraussetzung, um im gesamten Körper den Gasaustausch zu gewährleisten. [10] Außerdem müssen Erythrozyten den vorliegenden Scherkräften Stand halten. Der Blutfluss ist von der Viskosität des Blutes abhängig, die Viskosität wiederum von den rheologischen Eigenschaften der Blutzellen. Besonders bei der Mikrozirkulation wird die Viskosität von den rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten bestimmt. In größeren Kapillaren reichern sich die Erythrozyten durch die dort stärker wirkenden Scherkräfte stromlinienförmig in der Gefäßmitte an (Fåhræus-Lindquist-Effekt). Dadurch nimmt die Blutviskosität in den größeren Kapillaren ab. Außerdem entsteht dadurch eine zellarme Randzone, die die Fortbewegung der Zellen im Zentrum ebenfalls beschleunigt. [11, 12]

4.1.1 Blut

Das Blut besteht aus Zellen und Plasma, einer Eiweiß- und elektrolythaltigen Lösung. Die Hauptfunktionen des Blutes sind der Transport von Stoffen innerhalb des Organismus, die Aufrechterhaltung eines konstanten inneren Milieus (Homöostase) und die Abwehr von körperfremden Stoffen sowie Krankheitserregern. Die Gesamtblutmenge beträgt 7-8% des Körpergewichts, bei einem Erwachsenen sind das vier bis sechs Liter Blut. Die Zusammensetzung des Blutes unterliegt normalerweise nur geringen Schwankungen.

Das Blutplasma, eine klare, gelbe Flüssigkeit, ist der extrazelluläre Anteil des Blutes. Es besteht aus Wasser, Elektrolyten, Proteinen und niedermolekularen organischen Substanzen. Das Plasma steht mit der interstitiellen Flüssigkeit, die Körperzellen umgibt, in Kontakt und es erfolgt ein ständiger Austausch von Wasser und Elektrolyten.

Nach der Blutgerinnung setzt sich von den Blutzellen und dem als Gerinnungsprodukt entstandenen Fibrinnetz eine Flüssigkeit ab, das sogenannte Blutserum. Dem Serum fehlen Fibrinogen und andere Gerinnungsfaktoren. Ansonsten ist die Zusammensetzung des Serums aber identisch mit dem Blutplasma.

Der zelluläre Hauptbestandteil des Blutes sind Erythrozyten. Die Erythrozyten wirken beim O₂- und CO₂-Transport sowie bei der Regulation des pH-Wertes mit. Die Form der roten Blutkörperchen, die als runde, bikonkave, kernlose Scheiben beschrieben werden, stellt eine günstige Voraussetzung für die Verformung bei der Kapillarpassage dar. Der mittlere Durchmesser der Erythrozyten beträgt etwa 7,5 µm bei einer Randdicke von etwa 2 µm und einer zentralen Dicke von ca. 1 µm. Die gesamte Erythrozytenoberfläche eines Erwachsenen wird auf 3800 m² geschätzt. Die Membran der Erythrozyten ist etwa 10 nm dick und besteht aus einer fluiden Lipiddoppelschicht, in die mosaikartig integrale Proteine eingelagert sind. An der Membraninnenseite befinden sich verdrehte Proteinfäden (Spektrine), die untereinander durch Aktin und mit der Membran durch sogenannte Ankerproteine mit integralen Membranproteinen fest verbunden sind. Dadurch ist die Zellmembran mit dem Zytoskelett vernetzt, was für die Ruheform und die leichte Verformbarkeit der Erythrozyten im strömenden Blut wichtig ist. Die typische rote Farbe verdanken die Erythrozyten dem Blutfarbstoff Hämoglobin, der gleichzeitig den bedeutsamsten Bestandteil darstellt. Hämoglobin ist sowohl für den O₂- und CO₂-Transport als auch für die Pufferwirkung des Blutes maßgeblich.

Da Erythrozyten kernlos sind, haben sie die Fähigkeit zur Zellteilung verloren. Sauerstoffmangel im Gewebe regt die Neubildung von Erythrozyten an. Vor allem in den Nieren wird dadurch die Produktion des Glykoproteins Erythropoietin angeregt, welches auf dem Blutweg zum roten Knochenmark gelangt und dort spezifisch die Erythropoese stimuliert.

Die fertig ausgebildeten Erythrozyten zirkulieren 110 bis 120 Tage in der Blutbahn. Abgebaut werden sie von den Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems in Milz, Leber und Knochenmark. [7]

Blutgruppen:

Auf der Erythrozytenmembran befinden sich spezielle, genetisch festgelegte Strukturen mit Antigencharakter. Diese unterschiedlichen antigenen Eigenschaften bilden die Grundlage für die Differenzierung in Blutgruppen. Über 30 Blutgruppensysteme sind bis heute näher bekannt, wobei das ABO- und das Rhesus-System von besonderer klinischer Bedeutung sind.

Die Antigene des ABO-Systems in der Erythrozytenmembran, die vererbt werden, sind spezielle Glykoproteine oder Glykolipide, die als Agglutinogene bezeichnet werden. Die spezifischen Antikörper, die gegen diese Blutgruppensubstanzen gerichtet sind, gehören zur Klasse der Immunglobuline M und werden als Agglutinine bezeichnet. Es sind sogenannte komplette Antikörper, die Erythrozyten direkt agglutinieren und gegebenenfalls Hämolyse induzieren. Diese Antikörper findet man im Plasma und sie entstehen während der Säuglingszeit, auch wenn noch kein Kontakt mit fremden, antigen wirkenden Erythrozyten stattgefunden hat. Die Antikörperbildung wird von kreuzreagierenden Antigenen ausgelöst. Das können nicht-pathogene Darmbakterien oder bestimmte Nahrungsbestandteile sein, welche die gleichen antigenen Determinaten wie die entsprechenden Erythrozytenantigene des ABO-Systems besitzen.

Die Erythrozyten können vier verschiedene Antigenkonstellationen aufweisen: die Eigenschaft A, die Eigenschaft B, die Eigenschaft AB sowie die Eigenschaft 0, woraus sich die Blutgruppen A, B, AB und 0 ergeben. Werden beispielsweise Erythrozyten der Blutgruppe A mit Anti-A-haltigem Plasma gemischt, kommt es zu Agglutination. Durch diese Agglutinationsreaktion kann man auch die Blutgruppenbestimmung durchführen. Dazu wird eine Blutprobe mit Anti-A- und Anti-B-Prüfserum vermischt. Bei Blutgruppe A kommt es bei Anti-A und Anti A+B zu einer Verklumpung. Bei Blutgruppe B agglutinieren die Patientenerythrozyten mit Anti-B und Anti-A+B-Serum. Bei Blutgruppe AB tritt mit allen Testsera eine Verklumpung auf und bei Blutgruppe 0 führt kein Testserum zu einer Agglutination. Menschen mit Blutgruppe 0 können daher als Universalspender dienen. [13]

Blutgerinnung:

An der Hämostase (Blutstillung) beteiligte Komponenten sind Thrombozyten, Gefäßwandreaktionen und plasmatische Gerinnungsfaktoren. Wenn es zu einer Verletzung des Endothels kommt, gibt es drei Abläufe, die ineinander greifen: Es kommt zur Vasokonstriktion des verletzten Blutgefäßes, damit der Blutverlust eingeschränkt wird. Dann lagern sich durch den von-Willebrand-Faktor stimulierte Thrombozyten an der Gefäßwand an, um diese zu Verschließen (Thrombozytenadhäsion und –aggregation). Schlussendlich setzt die Blutgerinnung ein, um die Wunde langfristig zu verschließen. Dabei spinnt sich ein faseriges Netz aus Fibrin um den Thrombozytenpfropf herum. Zur endgültigen Stabilisation wird der Thrombus durch den fibrinstabilisierenden Faktor XIII vor vorzeitiger Auflösung geschützt. [13]

4.1.2 Flusssystem

Das Flusssystem wurde entwickelt, um die Fließbedingungen im Blutgefäßsystem weitgehend nachzuahmen. Es handelt sich dabei um ein chipbasiertes mikrofluidisches in-vitro-Testmodell, das aus vier 3D-Mikrokanälen besteht, welche auf eine Glasplatte geklebt werden. In diesen Mikrokanälen werden durch akustische Oberflächenwellen (surface acoustic waves, SAW) Flüssigkeitsströme erzeugt. Durch Variation der Aufnahmeleistung kann ein laminarer, durch Variation der Amplitude des Hochfrequenzsignals auch ein pulsierender Fluss erzeugt werden und die Gegebenheiten in einem Blutgefäß simuliert werden. [14]

Das System wird über einen Radiofrequenzgenerator angeregt (SMB 100A, Rohde & Schwarz GmbH, Österreich), der mit einem gleichachsigen Verstärker (LZY-1, Mini Circuits, Brooklyn, USA) und einem fixen Dämpfungsregler (VAT-3W2+, Mini Circuits, Brooklyn, USA) in Serie geschaltet ist. Das Radiofrequenzsignal wird von einem 4-Wege-Verteiler (D1572-102, Werlatone, Brewster, USA) zu den interdigitierenden Elektroden jedes der vier Chips geleitet. Um die Übertragung der Oberflächenwellen zu gewährleisten, muss zwischen Glasplatte des Kanals und dem Chip eine dünne Wasserschicht vorhanden sein.

Die undurchsichtige Trägerplatte des Flusssystems besitzt Fenster, sodass bereits während des laufenden Versuches die Zellen und Partikel im Mikroskop (Zeiss Z1, Göttingen, Deutschland) beobachtet werden können. [15]

4.2 Methoden und Materialien

4.2.1 Kanalherstellung

10 g Base werden mit 1 g Curing agent (Sylgardv® 184 Silicone Elastomer Kit, Baltres Baden, Österreich) kräftig gemischt. Um mögliche Luftblasen zu entfernen wird die Mischung unter Vakuum entgast. Das noch flüssige Polydimethylsiloxan (PDMS) wird in eine Aluminiumform gegossen, die in der Arbeitsgruppe entwickelt wurde. Die Form wird mindestens zwei Stunden auf einer Heizplatte auf 120°C erwärmt. Der abgekühlte PDMS Kanal wird mit einer Pinzette herausgelöst und mit noch flüssigem PDMS mithilfe einer Schablone auf der Glasplatte (127 mm x 85 mm) exakt positioniert und angeklebt. Die Glasplatte wird dann wieder auf der Heizplatte bei 100°C 30 Minuten zur Aushärtung des Klebers erwärmt.

4.2.2 Subkultivierung von Endothelzellen im Kanal

Die Mikrokanäle werden in einer Petrischale autoklaviert. Die Kanäle werden unter dem Laminar Air Flow mit jeweils 500 µl, auf 37°C vorgewärmtem PBS 30 Minuten lang vorgequollen. Der PBS-Puffer wird abgesaugt und die Kanäle werden mit jeweils 400 µl Fibronectinlösung (100 µg/ml in PBS) beschichtet, wobei darauf zu achten ist, dass die gesamte Oberfläche des Kanals mit Fibronectinlösung benetzt ist. Die mit Fibronectin gefüllten Kanäle werden eine Stunde bei 37°C im Brutschrank gelagert. Nach Absaugen der Fibronectinlösung wird die primäre HUVEC beziehungsweise HUVEC-tert Zellsuspension (300 000 Zellen pro ml) in den Kanal eingebracht. Die Kanäle werden in eine sterile Petrischale eingebracht und ein steriles Silikonstück wird zwischen Petrischale und Deckel geklemmt, um im Brutschrank den Gas- und Feuchtigkeitsaustausch zu gewährleisten. Erfahrungsgemäß ist der Zellmonolayer nach einem Tag Inkubation im Brutschrank konfluent.

4.2.3 Blutabnahme

Zusammensetzung Heparin/CPD-Puffer pro 100ml:

- Natriumcitrat-dihydrat 2,997 g
 - Citronensäure wasserfrei 0,299 g
 - Glucose-monohydrat 2,55 g
 - Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat 0,251 g
 - Zellkulturwasser ad 100 ml
- pH: 5,77 Osmolarität: 414 mOsm
- 1 mg Heparin in 1 ml CPD-Lösung lösen.

Kapillarblut:

Das Blut wird von geschultem Personal aus der Fingerkuppe entnommen. Dazu wird mit einer geeigneten Stechhilfe in die Fingerkuppe gestochen, das Blut auf einem Objektträger getropft und von diesem direkt 100 µl in ein Eppendorf Röhrchen transferiert. Es werden sofort 15 µl Heparin/CPD-Puffer zugesetzt und homogen suspendiert, um die Blutgerinnung zu unterbinden.



Abbildung 2: Abnahme von Kapillarblut (Foto: Mag.^a Dr.ⁱⁿ Xueyan Wang)

Venöses Blut:

Es wird ebenfalls mit venösem Blut von Blutgruppe A, B und 0 gearbeitet. Das Blut wird von einem Arzt oder einer Ärztin aus der Vene entnommen und in Röhrchen mit Citratbeschichtung bzw. mit Heparin aufgefangen.



Abbildung 3: Abnahme von venösem Blut (Foto: Mag.^a Dr.ⁱⁿ Xueyan Wang)

4.2.4 Selektion eines geeigneten Puffersystems für Erythrozyten und Endothelzellen

Um die Interaktion zwischen Erythrozyten und Endothelzellen in-vitro untersuchen zu können, musste zuerst ein geeigneter Puffer gefunden werden, in dem sowohl Erythrozyten als auch Endothelzellen über einen bestimmten Zeitraum überleben können.

Puffer	Volumen und Verdünnung
Glucosepuffer (384,6 mg Glucose in 15 ml PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)	500 μl 2000 μl
CPD-Puffer/Glucosepuffer	1:2, 1:3, 1:5 Je 2000 μl
0,9 % NaCl-Lösung/Glucosepuffer	1:2, 1:3, 1:5, 1:10 Je 1000 μl
FCS (fetales Kälberserum)	1000 μl
Humanes Serum (Sigma, Typ AB, male, USA)	1000 μl
PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ /1 % BSA (Bovine Serum Albumin)	500 μl
Humanes Serum (Innsbruck, Typ AB)	2000 μl

Tabelle 1: Puffer zur Untersuchung der Kompatibilität mit Blutzellen.

Es wurde der jeweilige Puffer bzw. Puffermischung mit 1 μl Blut (Kapillarblut aus der Fingerbeere) versetzt und nach 15 beziehungsweise 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur die Agglutination unter dem Mikroskop beobachtet.

4.2.5 Untersuchung der Interaktion von Erythrozyten, Endothelzellen und PLGA-Mikropartikeln unter Flussbedingungen

Nach Bildung der konfluenten Endothelzellmonolayer von primären HUVEC im Kanal, wurden Untersuchungen mit drei Arten von oberflächenmodifizierten PLGA-Mikropartikeln durchgeführt: WGA-, PEI- und Human Serum Albumin (HSA)-dotierten Mikropartikeln. Zur Kontrolle wurden PLGA-Mikropartikel ohne Oberflächenmodifikation (Plain) eingesetzt.

Der Versuch wird mit 1:2000 verdünntem Blut durchgeführt. Als Puffer dient PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ und 1 % BSA. Zuerst wird das Zellkulturmedium mit Zellstoff vorsichtig aus den Kanälen gesaugt, um den Zelllayer nicht zu zerstören. Es wird einmal mit Puffer gewaschen und nach Absaugen des Puffers der Fluss bei noch trockenem Kanal

aktiviert. Sofort werden 465 µl verdünntes Blut in den Kanal eingebracht und noch fünf Minuten ohne Partikelsuspension bewegt. Dann werden 35 µl (1,5 mg/ml) Partikelsuspension zugesetzt und 15 Minuten fließen gelassen. Noch bei aktiviertem Fluss wird einmal mit Puffer gewaschen und danach die zellgebundene Fluoreszenzintensität im Mikrotiterplattenfluorimeter (Tecan Infinite M 200, Gröding, Österreich) bestimmt. Nach weiteren 15 Minuten unter Flussbedingungen wird ein zweites Mal gewaschen und wieder die zellgebundene Fluoreszenzintensität ermittelt. Während des ganzen Versuchs wird das Fließverhalten der Erythrozyten und der Partikel auch mikroskopisch beobachtet.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Auswahl eines geeigneten Puffersystems für Blut- und Endothelzellen

Die Versuche wurden mit menschlichen Blutzellen der Blutgruppe 0 durchgeführt, um möglichst nahe an in-vivo Bedingungen heran zu kommen. Im Blutplasma herrschen isotonische Bedingungen und damit optimale Verhältnisse für Erythrozyten. Deshalb wurde zunächst humanes und nicht Kälberserum untersucht. Die Form der Erythrocyten wurde nach 15 Minuten unter dem Mikroskop kontrolliert. Wie Abbildung 4 zeigt, weisen die Erythrozyten Stachelform auf. Dies ist ein Hinweis, dass die Blutzellen in einer hypertonen Lösung vorliegen, d.h. eine Lösung mit höherem osmotischen Druck als in der Zelle vorherrscht. Dadurch gibt die Zelle Wasser an die Umgebung ab und schrumpft, sodass eine stachelige oder gefurchte Form entsteht. Auch die Wiederholung des Versuches mit dem Blut einer zweiten Versuchsperson, ebenfalls Blutgruppe 0, brachte kein positives Ergebnis. Es wurde auch humanes Serum der Blutgruppe AB (Sigma, USA) untersucht. Danach wurde humanes Serum von einer anderen Quelle (Innsbruck, Typ AB) verwendet. Diese Blutgruppe ist Universalempfänger, deswegen kann eine Unverträglichkeit aufgrund der Blutgruppe ausgeschlossen werden.

Da die Unverträglichkeit der Blutzellen unabhängig von der Blutgruppe war, wurde die Osmolarität bestimmt. Der Messwert von 251 mosmol liegt innerhalb der Norm. Auch nach Anpassung mit 2,38 mg NaCl an die Osmolarität von FCS (298 mosmol) haben die Blutzellen nicht überlebt. In Abbildung 4 sieht man deutlich, dass die roten Blutkörperchen in einer hypotonen Lösung vorliegen, d.h. es diffundiert Wasser in die Zelle hinein. Dadurch schwillt die Zelle an.

Daher konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf den pH-Wert. Bei einem pH-Wert von 7,95 liegt ein zu stark basisches Milieu vor. Der pH-Wert des arteriellen Blutes sollte exakt zwischen 7,37 und 7,43 liegen. Liegt er darunter, dann spricht man von einer Azidose, liegt er darüber, von einer Alkalose. Die Aufrechterhaltung dieses pH-Werts ist eine wichtige Voraussetzung für die Fortdauer eines geregelten Stoffwechselablaufs in den Körperzellen. An der Konstanthaltung des Blut-pH Wertes

sind mehrere Faktoren wie die Puffereigenschaften des Blutes, der Gasaustausch in der Lunge sowie die langsamer ablaufenden renalen und hepatischen Regulationsmechanismen beteiligt. [7] Aus der Literatur sind derzeit keine anderen Ursachen oder Hypothesen als Erklärung bekannt.

Die Verträglichkeit mit Glucosepuffer wurde ebenfalls untersucht, aber in diesem Puffer wurden die Erythrozyten hypertont und sind abgestorben. Auch mit Mischungen von CPD-Puffer mit Glucosepuffer in unterschiedlichen Verhältnissen (1:2, 1:3 und 1:5) konnte kein zufriedenstellendes gewünschtes Ergebnis erzielt werden. Der CPD-Puffer allein bewirkte schon bei HUVECs eine rasche Ablösung von der Kanalwand. Dafür könnte möglicherweise der mit pH 5,5 zu saure pH-Wert des Puffers verantwortlich sein. Dieser saure pH-Wert war auch für Blutzellen nicht geeignet.

Der nächste Versuch wurde mit 0,9 % NaCl-Lösung/Glucosepuffer und Blut durchgeführt. Es wurden wieder unterschiedliche Verhältnisse (1:2, 1:3, 1:5 und 1:10) von 0,9 % NaCl-Lösung und Glucosepuffer eingesetzt. Die Osmolarität der 0,9 % NaCl-Lösung betrug 264 mOsmol. Trotzdem konnte im Mikroskop nur das Absterben der Erythrozyten beobachtet werden. Allerdings wäre die 0,9 % NaCl-Lösung ein geeigneter Puffer für HUVEC, da sie sich auch nach einer Stunde Inkubation nicht vom Kanal ablösen.

Es wurde auch die Kompatibilität mit fetalem Kälberserum (FCS) untersucht, welches eine Osmolarität von 298 mOsmol aufweist. Die mikroskopische Auswertung bestätigte, dass FCS für in-vitro Tests mit Blutzellen geeignet ist. Auch HUVEC waren mit FCS kompatibel. Da aber mit menschlichem Blut gearbeitet und möglichst humane Bedingungen imitiert werden sollten, wurde der Einsatz von FCS eher als letzte Option betrachtet.

Schließlich wurde PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, supplementiert mit 1% BSA (Bovines Serum Albumin), als Medium eingesetzt. [10, T. Franke] In den mikroskopischen Bildern war erkennbar, dass die typische Erythrozytenform erhalten bleibt. Auch die Verträglichkeitsprüfung dieses Puffers mit den HUVEC fiel positiv aus. Darüber hinaus ergab die Überprüfung der Verträglichkeit des Puffers mit Blutzellen in Gegenwart von HUVEC-monolayern unter Flussbedingungen, dass die Blutzellen keine Aggregate bilden und keine stachelige Morphologie zeigen. Zusätzlich haben sich kaum HUVEC

von der Kanalwand abgelöst. Damit ist PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, supplementiert mit 1% BSA, der für die Untersuchung der Interaktion zwischen Blutzellen und Endothelzellen geeignete Puffer

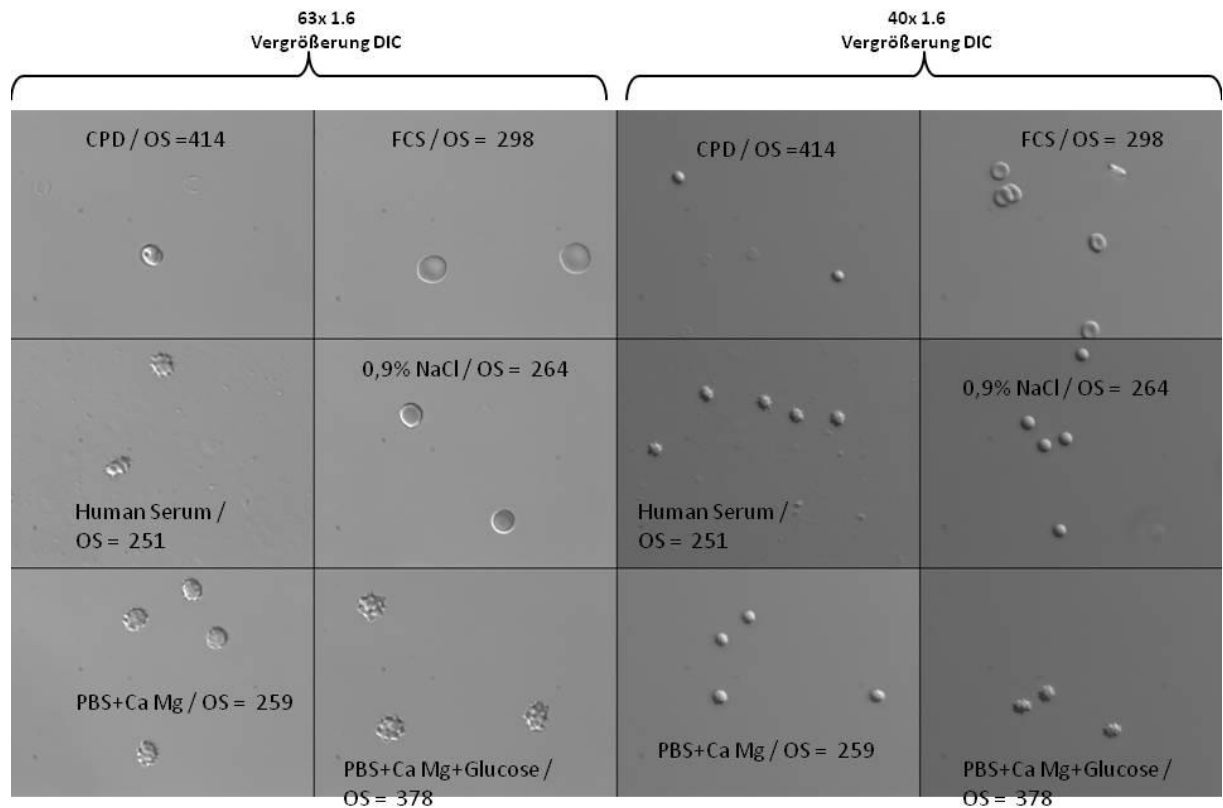


Abbildung 4: Mikroskopische Bilder von Blutzellen in Gegenwart unterschiedlicher Medien. Als Medien wurden CPD-Puffer, fetales Kälberserum (FCS), 0.9% NaCl, Humanserum, PBS-Puffer und PBS-Puffer supplementiert mit Glucose eingesetzt. Zusätzlich ist die Osmolarität (OS) in mOsm angegeben. (Foto: Mag.^a Dr.ⁱⁿ Xueyan Wang, aufgenommen mit Zeiss Axio Observer Z1, Göttingen, Deutschland)

4.3.2 Interaktion zwischen Blutzellen, Endothelzellen und PLGA-Mikropartikeln unter Flussbedingungen

Es sollte untersucht werden, inwieweit Blutzellen unter Flussbedingungen sedimentieren und ob mit unterschiedlich Oberflächen-modifizierten (WGA, PEI, HSA) PLGA-Mikropartikeln Wechselwirkungen auftreten. Obwohl während des Versuchs darauf geachtet wurde, die Beweglichkeit der Erythrozyten durch das Flusssystem nicht zu unterbrechen, war die Erythrozytensedimentation relativ hoch. Allerdings ist zu erwähnen, dass die Scherrate im System bei der gewählten Eingangsleistung von +2,5 dBm geringer war als im Körper. Eine Erhöhung der Scherrate ist in Zukunft aber

nur möglich, wenn die Leistung des Flusssystems durch einen leistungsstärkeren Hochfrequenzgenerator erhöht wird. Jedoch könnte durch eine Erhöhung der Frequenz, die Temperatur für die Blutzellen zu hoch werden und dadurch zum Absterben der Zellen führen. Auch die zellarme Randzone, die in der humanen Physiologie beschrieben wird, war nur sehr schwach zu erkennen. [11] Positiv zu vermerken ist, dass es zwischen den Blutzellen und den Partikeln zu keinen sichtbaren Wechselwirkungen kam und auch der Zelllayer gut an der Glasplatte haften blieb. Um den Zelllayer nicht zu zerstören, ist es wichtig, mit einer möglichst sanften Methode den Puffer wieder zu entfernen. Deswegen wurde zum Absaugen Zellstoff verwendet, um dabei die Scherkräfte so klein wie möglich zu halten.

15 Minuten nach Zusatz der unterschiedlich modifizierten (WGA, PEI und HSA) bzw. unbehandelten PLGA-Mikropartikel zur Kontrolle unter Flussbedingungen und einem Waschvorgang wurden die Kanäle mit den erstmals fluorimetrisch analysiert. Nach weiteren 15 Minuten unter Flussbedingungen und nochmaligen Waschen wurde ein zweites Mal die zellgebundene Fluoreszenzintensität bestimmt.

Nach erstmaligem Waschen verursachten WGA-modifizierte Partikel eine mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität von $133,33 \pm 18,18$, PEI-dotierte $151,67 \pm 35,02$, HSA-modifizierte $116,67 \pm 16,8$ und unbehandelte Partikel $96 \pm 8,544$ (Abb. 5). Nach dem zweiten Waschschrift betrug die mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität $107,33 \pm 17,62$ (WGA-modifizierte Partikel), $131,33 \pm 38,44$ (PEI-modifizierte Partikel), $94,67 \pm 9,07$ (HSA-modifizierte Partikel) bzw. $80,67 \pm 10,79$ (unbehandelte Partikel). Obwohl nicht signifikant könnte aus den Mittelwerten die Stärke der Interaktion folgendermaßen gereiht werden: PEI > WGA > HSA > unbehandelte Partikel. Damit bewirkt die positive Oberflächenladung der PEI-modifizierten Partikel eine starke elektrostatische Wechselwirkung mit der negativen Zelloberfläche des Endothels. Da es sich bei WGA um ein an Sialinsäure bzw. N-Acetyl-D-glucosamin bindendes Protein handelt, dürfte es bei den WGA-modifizierten Partikeln zu einer Wechselwirkung mit spezifischen Oberflächenstrukturen an der Glykokalyx der Endothelzellen kommen. Die Wechselwirkung zwischen den HSA-modifizierten Partikeln und der Oberfläche der Endothelzellen könnte durch Bindung von HSA an den Albumin-Rezeptor gp-60 zu Stande kommen [9] oder durch eine unspezifische Wechselwirkung bedingt sein. Bei

den unbehandelten Partikeln kann aufgrund der negativ geladenen Oberfläche und der hydrophoben Polymermatrix von einer unspezifischen Wechselwirkung ausgegangen werden. Auch nach weiteren 15 Minuten Inkubation unter Flussbedingungen und einmaligem Waschen sind etwa 80% der Partikel mit der Endothelzellschicht assoziiert, was auf ein für Flussbedingungen unerwartet hohes Ausmaß an Interaktion hinweist. Insbesondere der Einsatz von PEI als unspezifisch bioadhäsiver Ligand für das Endothel könnte für zukünftige Wirkstoff-Formulierungen von hohem Interesse sein.

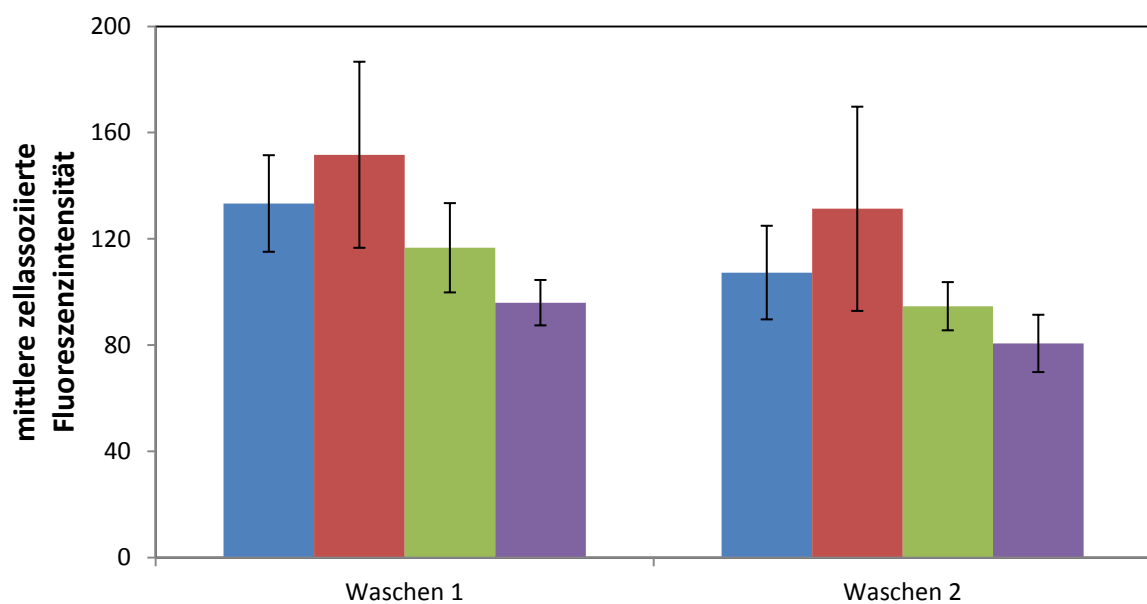


Abbildung 5: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität von viabilen primären HUVEC mit WGA- (blau), PEI- (rot) und HSA-modifizierten PLGA-Mikropartikeln (grün) im Vergleich zu unbehandelten Partikeln (violett) unter Flussbedingungen. Die Fluoreszenzintensität wurde nach 15 Minuten Inkubation und einmaligem Waschen (Waschen 1) sowie nach weiteren 15 Minuten Inkubation und Waschen (Waschen 2) bestimmt.

5 Internalisation von F-WGA in HUVEC

5.1 Einleitung

Für einen zielgerichteten Arzneistofftransport ist eine spezifische Anreicherung des Wirkstoffes im erkrankten Gewebe wünschenswert. Eine notwendige Voraussetzung besteht darin, einen geeigneten Transporter zu finden. Aufgrund seiner mucoadhäsiven, cytoadhäsiven und cytoinvasiven Eigenschaften erwies sich WGA als potentiell zielgerichtetes Wirkstoffträger-Molekül. Wie bereits vorausgegangene Versuche zeigten, wird WGA in Gewebe wie artifizielles Dünndarmepithel (Caco-2-monolayer) oder Blasenzelllinien aufgenommen. [16]

Auf Grund dieser Beobachtung sollte auch die Adhäsion bzw. Internalisation von F-WGA in primären HUVEC und HUVEC-tern bei 37°C und bei 4°C untersucht werden. 37°C ist die „Betriebstemperatur“ der Zellen, wo auch energieabhängige aktive Transportmechanismen möglich sind. Zur Überprüfung, ob tatsächlich eine Internalisation erfolgte, wird der Versuch bei 4°C, wiederholt, einer Temperaturstufe, bei der aktive Mechanismen unwahrscheinlich sind und eher Adhäsion an die Zellwand erfolgen könnte. Um den durch den sauren, intralysosomalen pH-Wert bedingten Verlust an Fluoreszenzintensität von Fluorescein zu verhindern, das als Label eingesetzt wird, kann Monensin zugesetzt werden. Monensin, ein selektives Ionophor, welches durch Austausch von Protonen gegen Natriumionen eine Neutralisation des pH-Wertes in den Lysosomen bewirkt, kann dadurch einen Quench des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes aufheben und dadurch kann indirekt die Anreicherung eines Fluorescein-markierten Moleküls in den Lysosomen nachgewiesen werden. [17]

5.2 Methoden und Materialien

5.2.1 Internalisation von F-WGA in HUVEC bei 37°C/4°C

Materialien:

- PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- Fluorescein- Wheat Germ Agglutinin (F-WGA)-Stammlösung (4000 pmol/ml in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)
- Monensin-Stammlösung (1,5 mg/ml in unvergälltem Ethanol)

Alle verwendeten Substanzen sind von analytischer Reinheit.

In einer 96 well-Platte werden primäre HUVEC beziehungsweise HUVEC-tert kultiviert. Nachdem der Monolayer mikroskopisch überprüft worden ist, wird das Medium händisch abgesaugt und einmal mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Danach werden 50 µl F-WGA (4000 pmol/ml in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) pro Well vorgelegt. Die Platte wird unter Lichtschutz 30 Minuten bei 4 °C gelagert. Dann wird je dreimal mit jeweils 100 µl Puffer gewaschen, 50 µl Puffer pro well zugesetzt und die zellgebundene Fluoreszenzintensität bestimmt (*Null Minuten Wert*). Aus den wells der ersten Spalte der well-Platte werden die Überstände entfernt. Die Absorption dieser vereinigten Überstände wird fluorimetrisch bestimmt. In die wells der ersten Spalte der well-Platte werden 50 µl Monensin-Lösung (2,36 mg/2,5 ml in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) zugesetzt. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten Beobachtungen über einen Zeitraum von 120 Minuten. Die Platte wird unter Lichtschutz fünf Minuten bei 37°C gelagert und danach sofort die zellgebundene Fluoreszenzintensität bestimmt (*Null Minuten Wert mit Monensin*). Die Platte wird wieder bei 37°C gelagert bis die ersten zehn Minuten vorbei sind. Dann wird der Überstand von Spalte 2 in die frische Well-Platte übergeführt, danach rasch mit je 50 µl frischem Puffer aufgefüllt und die Fluoreszenzintensität der wells in Spalte 2 ermittelt (*Zehn Minuten Wert ohne Monensin*). Der Puffer wird wieder händisch entfernt, 50 µl Monensin-Lösung pro well zugefügt und die Platte fünf Minuten bei 37°C gelagert. Danach werden die wells von Spalte 2 nochmals fluorimetrisch erfasst (*Zehn Minuten Wert mit Monensin*) und die Platte wieder unter Lichtschutz

bei 37°C 30 Minuten gelagert. Der Versuch wird in der beschriebenen Vorgehensweise 120 Minuten fortgeführt. Die Messungen dazwischen erfolgen nach 60 Minuten, nach 90 Minuten und nach 120 Minuten. Im Anschluss wird die Well-Platte mikroskopisch kontrolliert, ob der Zellmonolayer noch intakt ist.

Der Versuch wird nochmals mit anderen Zeitintervallen zur Messung durchgeführt, da das händische Waschen sehr viel Zeit in Anspruch nimmt und die Zeiten womöglich nicht eingehalten werden können. Die Messungen erfolgten nach 60 Minuten, nach 120 Minuten, nach 180 Minuten und nach 300 Minuten. Der Ablauf ändert sich insofern, dass nach der Messung der Monensinzugabe Monensin wieder entfernt wurde und nochmals gemessen wurde.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Monensin wurde verwendet, um den Transportweg von WGA an Hand von F-WGA in der Zelle zu untersuchen. Die Fluoreszenz von Fluorescein im F-WGA-Molekül ist nur im neutralen und leicht alkalischen Milieu stabil, im sauren Milieu der Lysosomen wird jedoch die Quantenausbeute reduziert. Monensin kann den pH-Wert in den Lysosomen in den neutralen Bereich verschieben und somit die Reduktion der Quantenausbeute aufheben, sofern F-WGA intralysosomal akkumuliert wurde.

Unter der Annahme, dass F-WGA von primären HUVEC und HUVEC-tert über den lysosomalen Weg internalisiert wird, müsste in Abbildung 6 und Abbildung 7 eine deutlich höhere mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität von F-WGA nach Monensin-Zusatz sichtbar sein. Außerdem wurde die mögliche, wenn auch in den angewandten Konzentrationen unwahrscheinliche Toxizität von Monensin auf die Endothelzellen nicht untersucht. Daher kann eine unbeeinträchtigte Viabilität der Zellen über die gesamte Versuchsdauer nur angenommen werden. Somit wären für eine fundierte Aussage umfangreiche weiterführende Versuchsreihen notwendig. Zusätzlich ist durch die hohen Standardabweichungen keine Signifikanz gegeben und damit derzeit noch keine Aussage möglich.

Die Internalisation von F-WGA in andere Zelllinien (z.B. Caco-2) wurde unter anderem mittels Durchflusscytometrie untersucht. Dabei werden Einzelzellen und nicht das Gewebe untersucht. Endothelzellen sind als Einzelzellen nur kurzzeitig viabil, sodass diese Versuchsanordnung nicht möglich ist.

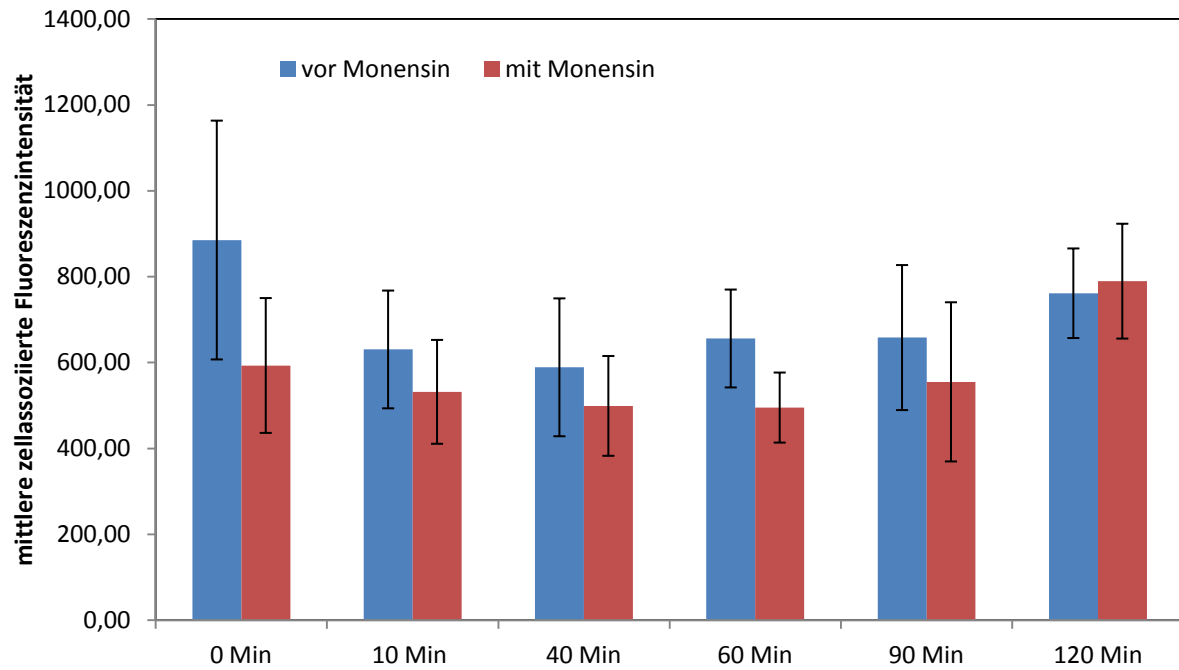


Abbildung 6: Mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität von primären HUVEC nach Beladung mit F-WGA (30 Minuten Inkubation) und Messung 0, 10, 40, 60, 90 und 120 Minuten nach Beladung vor (blau) und nach Monensinzusatz (rot). Mittelwert und Standardabweichung.

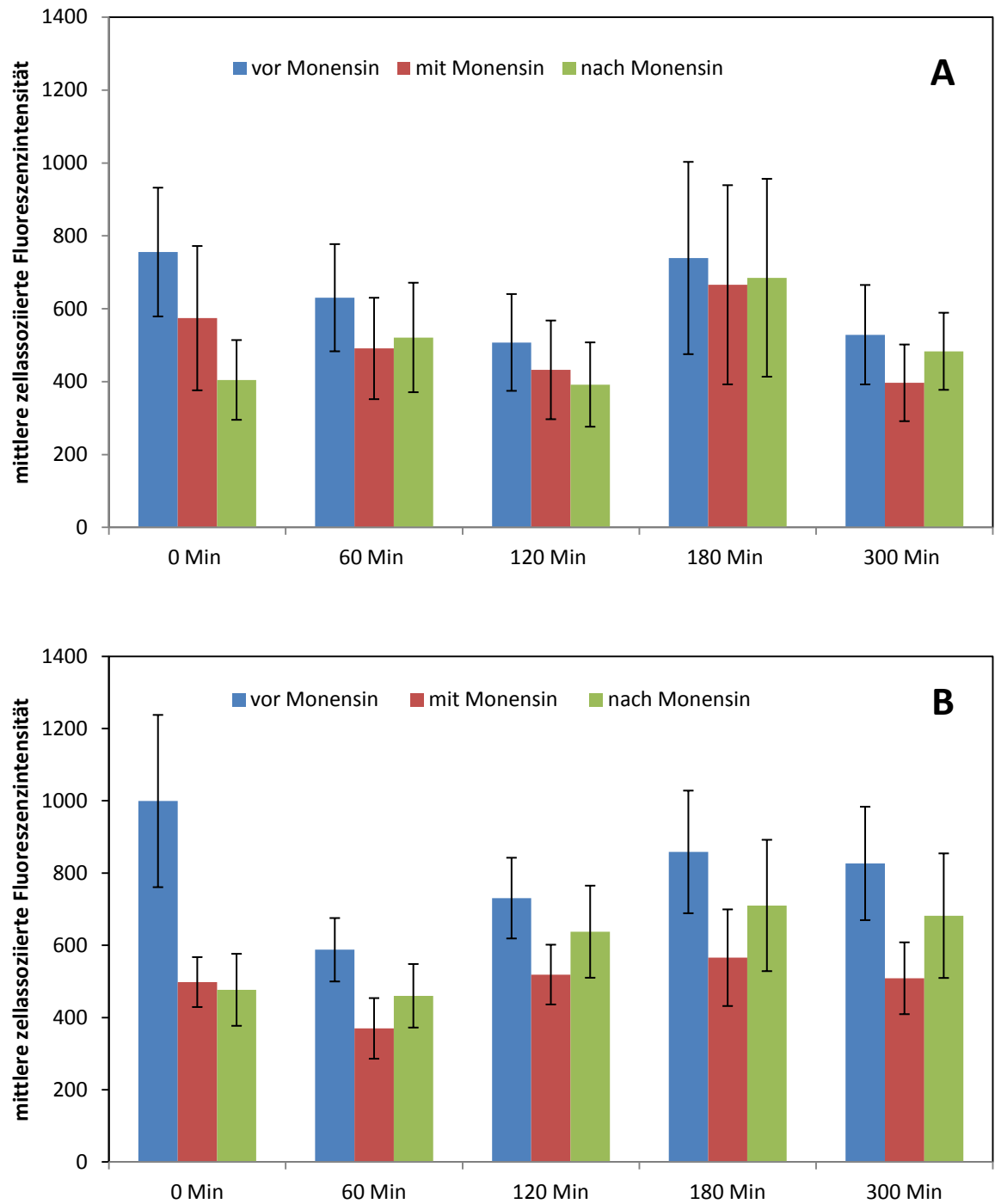


Abbildung 7: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität von primären HUVEC (A) bzw. HUVEC-tert (B) nach Beladung mit F-WGA (Inkubation 30 Minuten) und Messung vor Monensinzusatz (blau), in Gegenwart von Monensin (rot) und nach Monensinzusatz (grün) nach 0, 60, 120, 180 und 300 Minuten Chase-Inkubation.

6 Zusammenfassung Deutsch-Englisch

Deutsch:

Um Arzneistoffe über die Blutbahn zum Zielgewebe transportieren zu können, eignet sich das bioabbaubare Poly(DL-lactid-co-glycolid) (PLGA) als Arzneistoffträger. Da das Weizenlektin (WGA), verglichen mit anderen pflanzlichen Lektinen, die höchste Bindungsrate an Zellmembranen von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) aufweist, insbesondere nach der Induktion einer Entzündung, [9] könnten WGA-modifizierte PLGA-Mikropartikel als Arzneistoffträger für die parenterale Verabreichung eines Arzneistoffes geeignet sein. Dabei spielt die Verträglichkeit aller Komponenten mit den Blutzellen eine entscheidende Rolle. Da aber vorangegangene Studien [18] ergaben, dass WGA zur Agglutination von menschlichen und tierischen Erythrozyten führt, sollte dies im Detail untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde in-vitro die Agglutination von WGA mit Blutzellen sowohl mittels Durchflusscytometrie als auch durch die Auswertung mikroskopischer Bilder untersucht und ergab eine parenteral verträgliche Konzentration von 0,15 mg WGA/ml. Ab und unterhalb dieser Konzentration konnten keine Unterschiede im Agglutinationsverhalten im Vergleich mit der Kontrollgruppe beobachtet werden. Die Untersuchung wurde mit Blutzellen der Blutgruppen A, B und 0 durchgeführt.

Zusätzlich wurden PLGA-Mikropartikel hergestellt und deren Oberfläche mit Polyethylenimin (PEI) modifiziert, um die Oberfläche der Mikropartikel in den positiven Bereich zu invertieren und damit eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen Arzneistoffträger und der negativ geladenen Zelloberfläche zu ermöglichen. Um diese Wechselwirkung möglichst nahe den in-vivo Bedingungen analysieren zu können, wurde ein in-vitro Modell für Blutgefäße weiterentwickelt, sodass nun ein Puffersystem zur Verfügung steht, das sowohl die Viabilität der Blutzellen als auch der Endothelzellen gewährleistet. Sogar unter Flussbedingungen konnte in diesem in-vitro Modell in Gegenwart von Blutzellen gezeigt werden, dass PEI als unspezifischer Targeter für Formulierungen hohes Potential besitzt.

English:

In order to shuttle drugs from the bloodstream to target tissue, the biocompatible and biodegradable polymer Poly(DL-lactide-co-glycolide) is well established as a drug carrier system. Studies aimed to enhance the interaction with endothelial cells revealed that the binding rate of wheat germ agglutinin (WGA) to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is extraordinarily high compared to other plant lectins especially after inflammation [9]. Considering the benefits of WGA for grafting drug carriers for parenteral administration at the one hand, but considering reported haemagglutinating effects of WGA at the other hand, an aim of this work was to find the dose of WGA for blood cell agglutination. By means of flow cytometry and analysis of microscopic images of agglutination of blood cells by WGA, the parenterally tolerable dose of WGA is 0,15 mg/ml analyzing blood cells of the blood groups A, B and O.

Additionally, the surface of negatively charged PLGA microparticles has been converted to a positive one by surface modification with PEI to allow for an electrostatic interaction between the drug carrier and the negatively charged cell membrane of endothelial cells. In an effort to approach in-vivo conditions, a buffer system has been established for a microfluidic in-vitro model of blood vessels which guarantees viability of both, the blood cells and the endothelial cells. Even under flow conditions in presence of blood cells a strong interaction between PEI-grafted microparticles and endothelial cells was observed. Thus, PEI might be a useful non-specific bioadhesive targeter for improved parenteral drug delivery.

7 Literaturverzeichnis

1. Langguth P., Fricker G., Wunderli-Allenspach H., Biopharmazie, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, 2004 Kapitel 8 S. 395-408
2. Gabor, F., Bogner, E., Weissenboeck, A., Wirth, M., The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 459– 480.
3. Samsel, RW., Perelson, AS., Kinetics of rouleau formation. I. A mass action approach with geometric features. *Biophys J.* 1982 Feb; 37 (2): 493-514.
4. Samsel, RW., Perelson AS., Kinetics of rouleau formation. II. Reversible reactions. *Biophys J.* 1984 Apr; 45 (4): 805-24
5. Pharmazie-lehrbuch.de/Kapitel/1-6.pdf; Kapitel 1.7., Polymermikropartikel, Scheler,S., Sandoz AG (13.05.2014)
6. Wang, X.-Y., Pichl, C., Gabor, F., Wirth, M., A novel cell-based microfluidic multichannel setup – impact of hydrodynamics and surface characteristics on the bioadhesion of polystyrene microspheres. *Biointerfaces* 102 (2013) 849-856
7. Thews, Mutschler, Vaupel: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, 5. Auflage
8. Park, H. J., Zhang, Y., Georgescu, S. P., Johnson, K. L., Kong, D., Galper, J. B., Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Reviews* 2006, Volume 2, Issue 2, pp 93-101
9. M. Führinger, Diplomarbeit, Universität Wien 2013
10. Braunmüller, S., Schmid, L., Sackmann, E., Franke, T., Hydrodynamic deformation reveals two coupled modes/time scales of red blood cell relaxation. *Soft Matter*, 2012, 8, 11240
11. Schmid-Schönbein H. Microrheology of erythrocytes, blood viscosity, and the distribution of blood flow in the microcirculation. *Int Rev Physiol* 9: 1-62, 1976.
12. M. Christ, Dissertation, Universität Ulm 2006
13. Menche: *Biologie, Anatomie, Physiologie*, 7.Auflage
14. C. Pichl, Diplomarbeit, Universität Wien 2011

15. Wang, X.-Y., Fillafer, C., Pichl, C., Deinhammer, S., Hofer-Warbinek, R., Wirth, M., Gabor, F., A multichannel acoustically driven microfluidic chip to study particle-cell Interactions. *Biomicrofluidics* 7, 044127 (2013); doi: 10.1063/1.4819273
16. Gabor, F., Bogner, E., Weissenboeck, A., Wirth, M., The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 459– 480.
17. Mollenhauer, H.H., Morrè, D.J., Rowe, L.D., Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity, *Biochim. Biophys. Acta* 1031 (2) (1990), 225
18. Peumans, W.J., Stinissen, H.M., Carlier, A.R., 1982. A genetic basis for the origin of six different isolectins in hexaploid wheat. *Planta*. 154:562-568

8 Anhang A – Publiziertes Manuskript

Author's contributions

I hereby declare to have significantly contributed to the present manuscript. The manuscript was planned together with Mag.^a Dr.ⁱⁿ Xueyan Wang and Mag.^a Martina Führinger. The experiments were split between Mag.^a Martina Führinger and me.

As part of my diploma thesis, I was involved in the execution of the experiments and responsible for the analysis and interpretation of the data according to the Interaction between WGA and Erythrocytes from different blood group's.

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

Xue-Yan Wang¹, Martina Führinger¹, Nina Mizerovsky¹, Renate Hofer-Warbinek², Michael Wirth¹, Franz Gabor¹

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

²Department of Vascular Biology and Thrombosis Research, Center for Physiology and Pharmacology, Medical University of Vienna, Vienna A-1090, Austria

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

To be submitted

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-blood cell interaction studies revealed no agglutination of blood cells 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 to improve the 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 reflecting the carbohydrate pattern of the endothelial cell surface 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-1-1) [18]. At this, primary HUVEC and HUVECTert represent macrovascular cells,

whereas HMEC-1-1 is of microvascular origin. Moreover, another focus is set on the blood cell 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-1 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-1).

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-1) were investigated.

For monolayer experiments, confluent monolayers of HUVEC, HUVEctert and HMEC-1 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 Ca^{2+} and Mg^{2+} , the cells were incubated with 25 μL of the complementary carbohydrate in buffer (see Table 2) and 25 μL 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 μL 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, IC_{50} 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 μL PBS buffer supplemented with Ca^{2+} and Mg^{2+} 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 μL /well). After rehydration in PBS containing 1% (w/v) BSA (100 μL /well) for 20 minutes at room temperature the monolayer were washed twice with the same buffer. Then, 100 μL solution of 0.5 μg 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 of serial dilutions of fluorescence labeled WGA (corresponding to an end concentration between 1.975 and 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 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 20,000-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. 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 ($0.1 - 0.8 \mu\text{mol mL}^{-1}$), and then with 1 μL WGA-solution (2.5mg mL^{-1}). After 10 min 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-1-1, 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 capacity of 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-1-1 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 by half of those of primary cells, and in case of LCA it decreased even to about a tenth.

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 fluorescence of WGA associated 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 (see Figure S1C in supplementary appendix). HUVEctert and HMEC-1-1 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-1-1 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 binding specificity. 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 0.002 ± 0.0001 (WGA) and 0.094 ± 0.0003 (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 blood cells 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 blood cells 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 blood cells 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 of 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 blood cell 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 similar to 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 to 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 accessible 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 with 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 the 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 $3.9 \pm 0.1\%$ 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 IC_{50} 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 IC_{50} value decreased significantly after TNF- α activation. This might be due to the decreasing of mannose structure at the cell surface after inflammation. Therefore, the needed amount of complementary sugar would be reduced for the inhibition of lectin binding to the cells.

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 blood cells. 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 50,000 WGA molecules per blood cell. Considering the maximum WGA-density at the surface of $3 \mu\text{m}$ PLGA-microparticles (unpublished data), agglutination of blood cells is supposed to occur only when the ratio between blood cells 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 blood cells, 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.

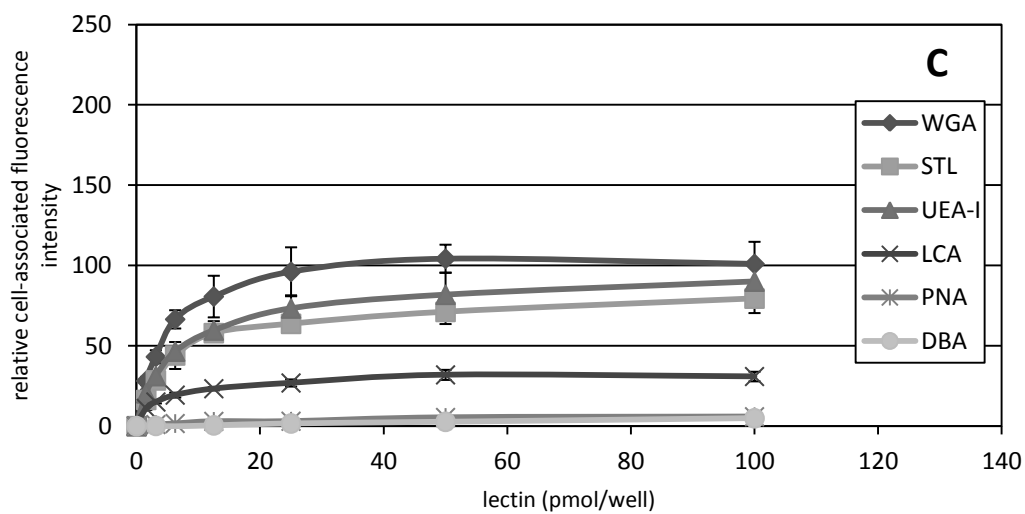
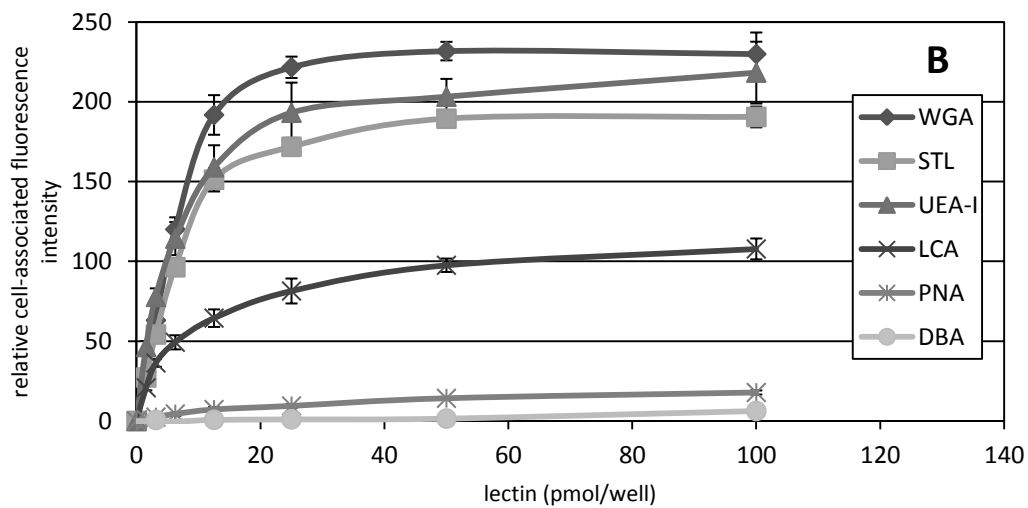
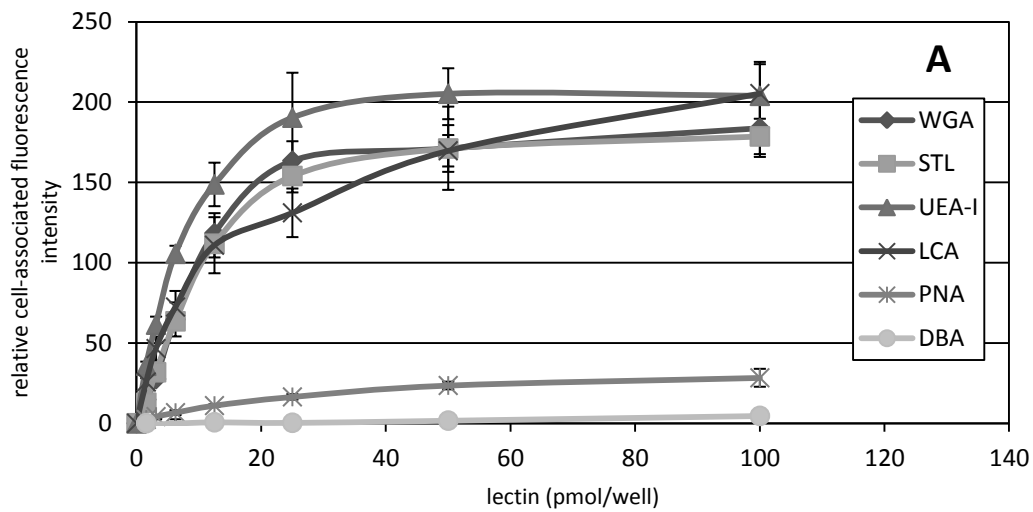
To sum up, this study confirms that sialic acid, N-acetylglucosamine, and fucosyl residues are predominant structures in the glycocalyx of endothelial cells. Especially, upon inflammation by TNF- α stimulation the increase of sialic acid structures leads to increasing WGA-binding to primary HUVEC. Moreover, the sugar inhibition study proved high specificity of the interaction between WGA and endothelial cells. In addition, up to a concentration of $15.88\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 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 blood cells 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-1-1: 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, Pusztai A, Bardocz S. 1997. *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. 1st ed. Chichester (UK): John Wiley & Sons.
- [27] Rimi 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.



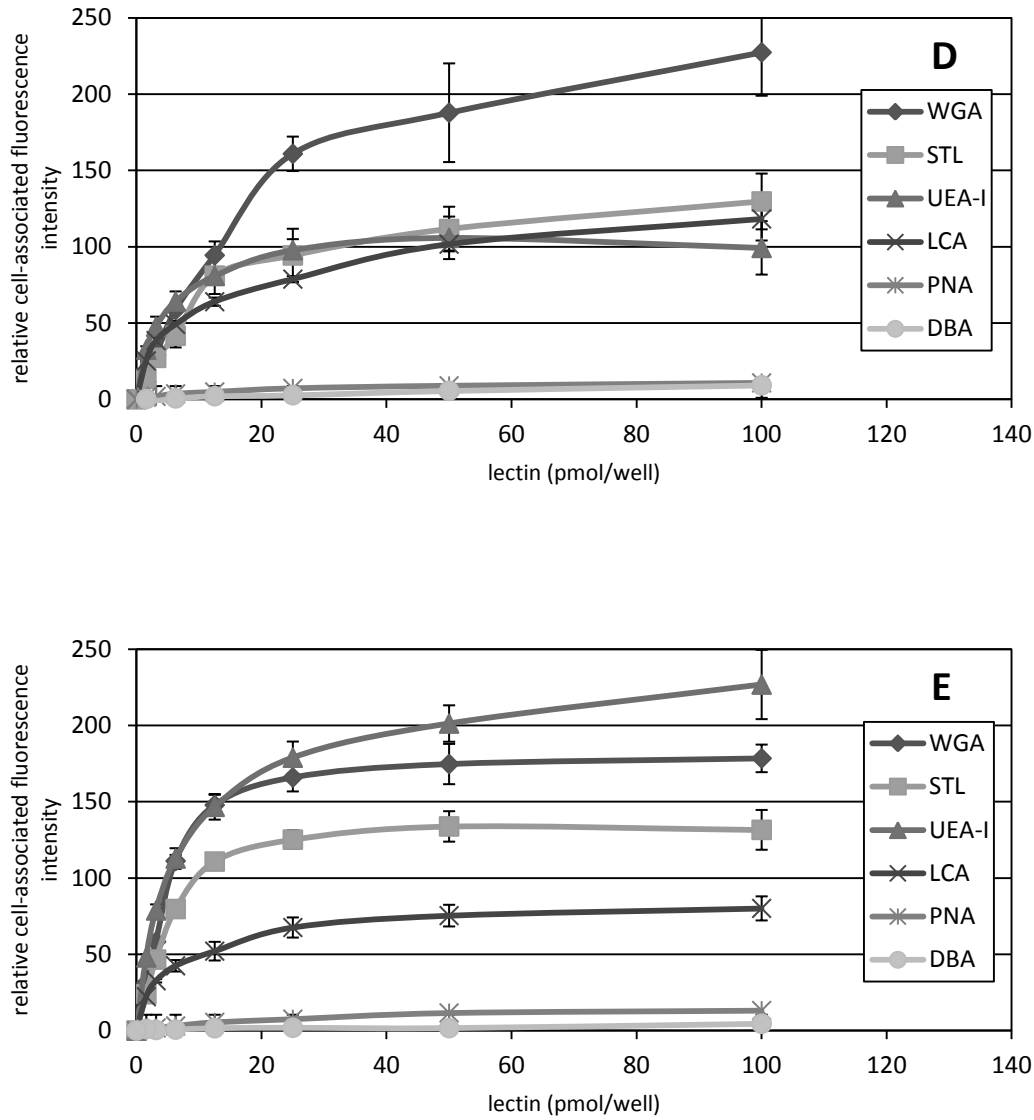


Figure 1: Lectin binding (1.56 – 100 pmol/well, serial dilutions) to endothelial monolayers at 4°C. The fluorescein-labeled lectins associated with the cell surface were related to an apparent F/P ratio of 1 (mean±SD, n=6). Monolayers of primary HUVECs(A), HUVECtert(B) and HMEC-1(C), as well as inflamed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

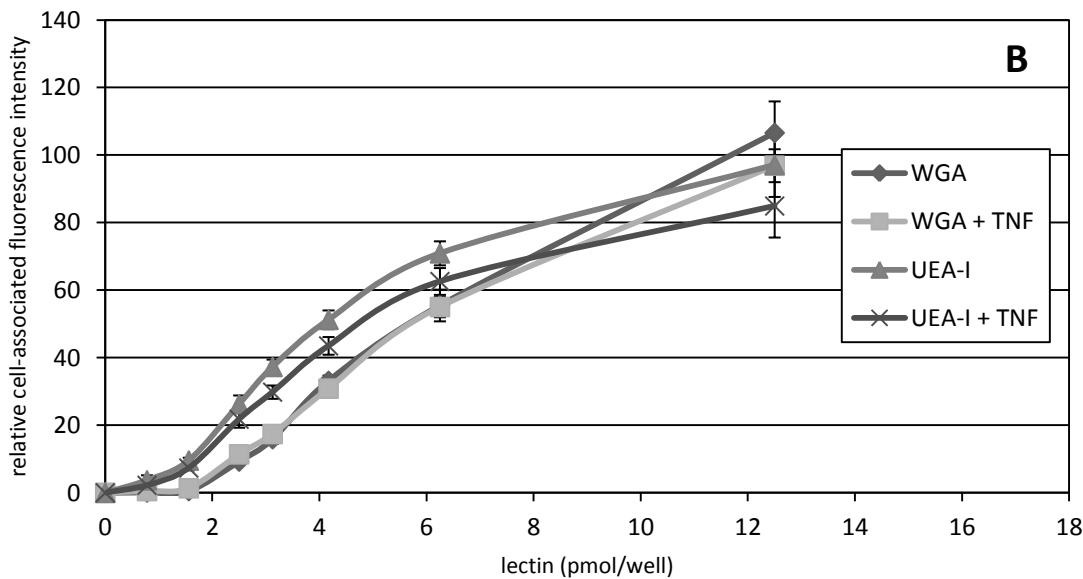
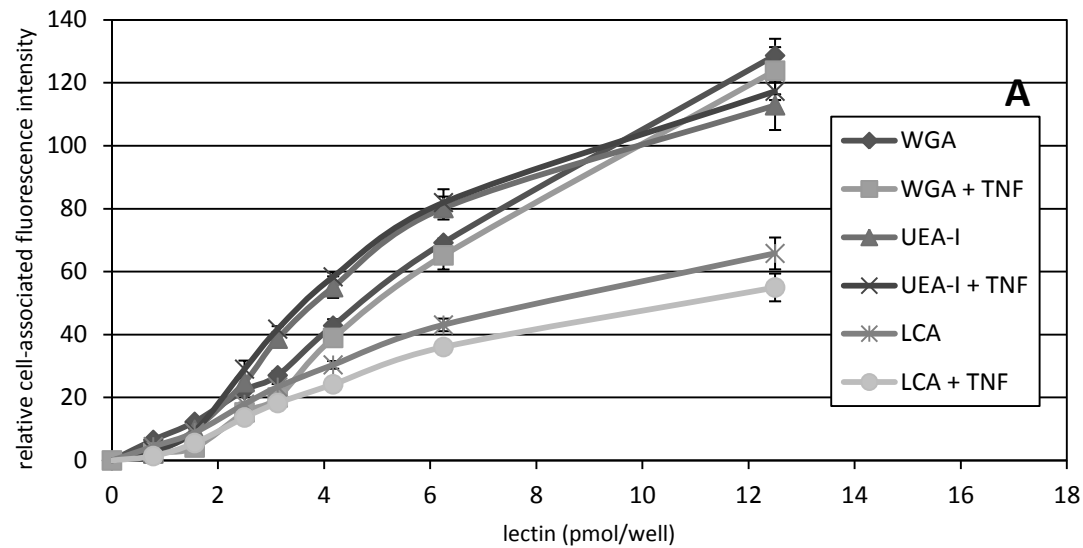


Figure 2: Lectin binding (1.56 – 12.5 pmol/well, serial dilutions) to endothelial cell monolayers at 4°C. The fluorescein-labelled lectins associated with the cell surface were related to an apparent F/P ratio of 1 (mean±SD, n=6). Monolayers of primary HUVECs(A) and HUVECtert(B) with and without TNF-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

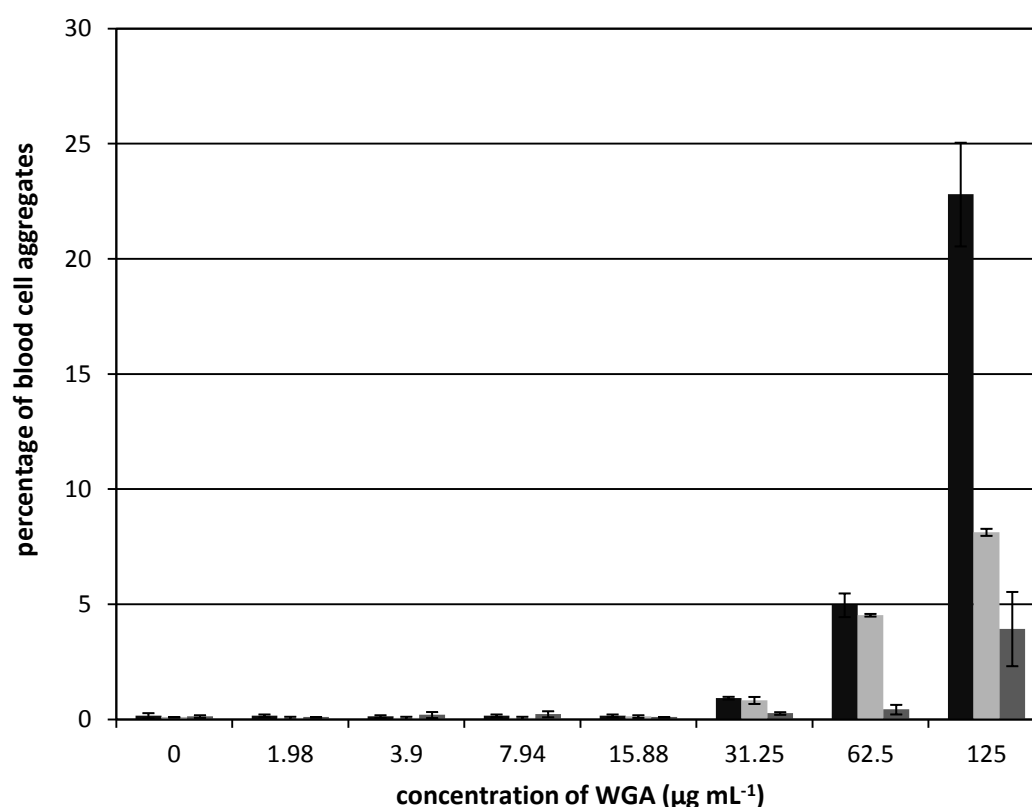
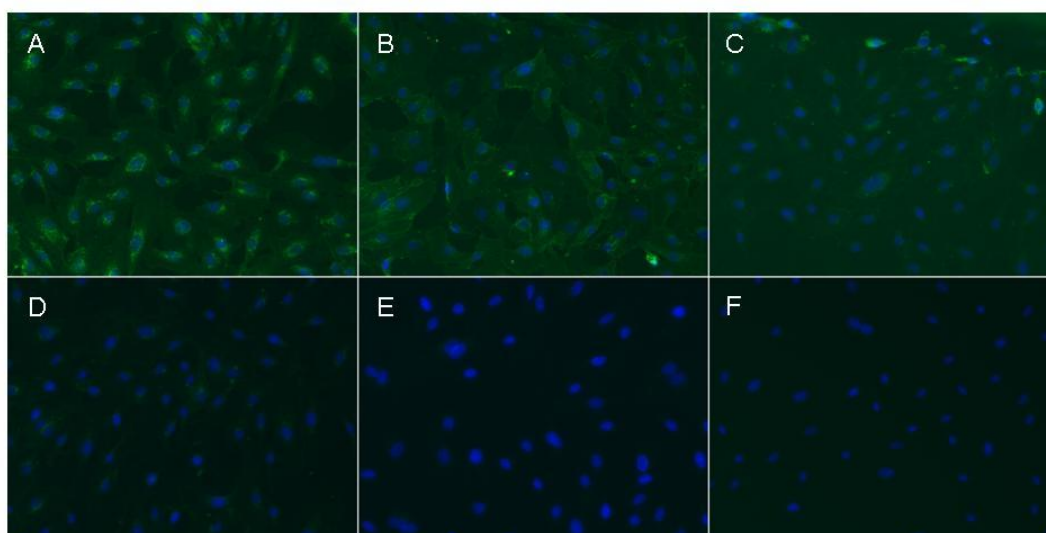
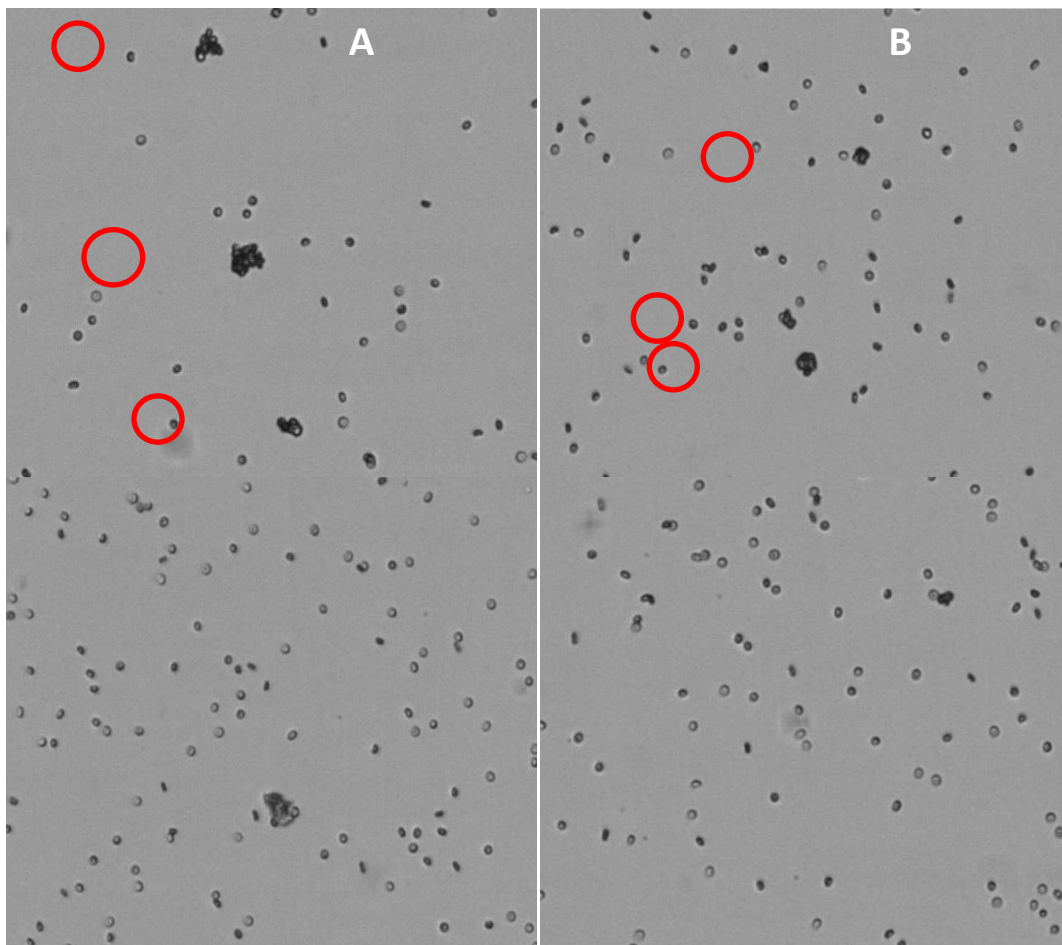


Figure 3: Fluorescence images of confluent primary HUVEC monolayer pre-incubated with fluorescein-labeled lectins (green) at 4°C for 30 min (A-F). The nuclei of cells were counterstained with Hoechst 3334 in blue. To allow comparison of fluorescence images, the duration of exposure was correlated with 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 as 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 µg mL⁻¹ WGA (n = 3).



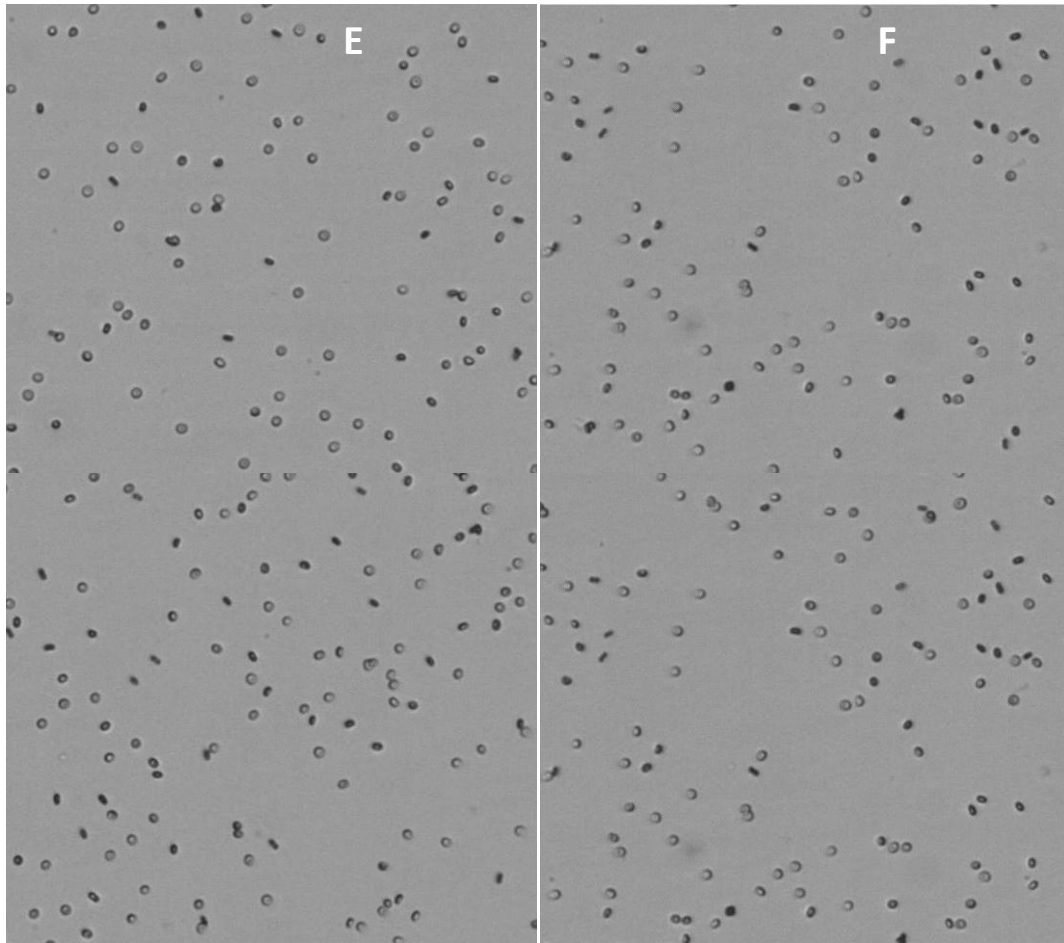


Figure 5: Microscopic images of blood cells from blood group O in presence of decreasing amounts of WGA (A: 125 $\mu\text{g/ml}$, B: 61.5 $\mu\text{g/ml}$, C: 31.25 $\mu\text{g/ml}$, D: 15.88 $\mu\text{g/ml}$, E: 7.84 $\mu\text{g/ml}$, F: 3.92 $\mu\text{g/ml}$, G: 1.96 $\mu\text{g/ml}$, H: 0 $\mu\text{g/ml}$). Freshly drawn blood was incubated with WGA solution for 10min at 37°C, and the images were acquired after 1200-fold dilution by TC20™ automated cell counter (Bio-Rad Laboratories, Austria). Samples without WGA served as a control. Red circles indicate agglomerates of blood cells.

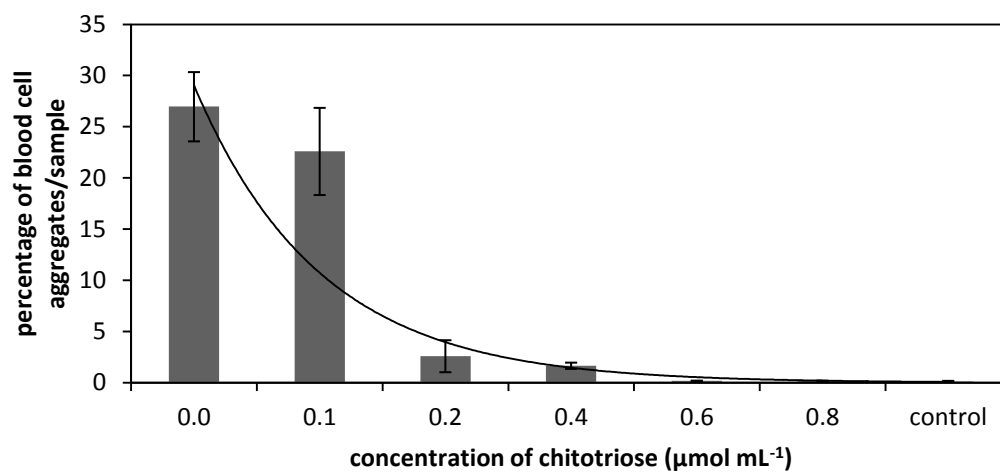


Figure 6: Competitive inhibition of WGA-binding to cells of blood group O by addition of increasing amounts of the complementary carbohydrate chitotriose. Blood samples without addition of sugar and WGA served as controls (mean $\pm$ SD, n=3).

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

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.

			HUVEC prim	HUVEC prim + TNF- α	HUVEC tert	HUVEC tert + TNF- α	HMEC- 1
Lectin + inhibitory sugar	Sugar (μ mol/sample)		Inhibition %				
WGA + Chitotriose	0.01		95.3 $\pm$ 0.6	94.5 $\pm$ 2.7	94.1 $\pm$ 0.5	94.3 $\pm$ 1.0	91.2 $\pm$ 0.9
	0.005		83.1 $\pm$ 1.4	82.4 $\pm$ 2.8	82.2 $\pm$ 0.8	86.3 $\pm$ 1.1	73.7 $\pm$ 2.6
	0.002		41.7 $\pm$ 1.8	42.3 $\pm$ 4.1	38.6 $\pm$ 1.7	48.4 $\pm$ 5.8	27.1 $\pm$ 4.4
	0.001		23.0 $\pm$ 1.8	21.4 $\pm$ 4.1	16.7 $\pm$ 2.0	22.2 $\pm$ 3.8	14.1 $\pm$ 4.4
	0.0005		14.4 $\pm$ 3.2	16.6 $\pm$ 4.3	9.7 $\pm$ 3.1	9.2 $\pm$ 5.3	7.2 $\pm$ 6.3
	IC ₅₀ (μ mol)		0.002	0.002	0.003	0.002	0.003
UEA-I + L-Fucose	5		93.2 $\pm$ 0.2	93.8 $\pm$ 1.3	95.6 $\pm$ 1.0	94.3 $\pm$ 1.3	92.6 $\pm$ 1.1
	1		90.0 $\pm$ 1.9	91.5 $\pm$ 0.8	92.1 $\pm$ 1.2	92.2 $\pm$ 1.3	89.5 $\pm$ 0.9

			HUVEC prim	HUVEC prim + TNF- α	HUVEC tert	HUVEC tert + TNF- α	HMEC- 1
Lectin + inhibitory sugar	Sugar (μ mol/sample)		Inhibition %				
	0.5		81.4 $\pm$ 2.7	81.5 $\pm$ 1.6	86.0 $\pm$ 1.7	83.3 $\pm$ 1.8	78.4 $\pm$ 2.4
	0.25		70.9 $\pm$ 1.7	66.1 $\pm$ 1.9	70.6 $\pm$ 2.8	69.5 $\pm$ 1.3	64.4 $\pm$ 3.2
	0.1		52.9 $\pm$ 3.4	47.8 $\pm$ 3.5	50.9 $\pm$ 1.9	48.0 $\pm$ 2.3	40.6 $\pm$ 2.0
	0.05		36.7 $\pm$ 5.1	30.1 $\pm$ 5.7	28.1 $\pm$ 4.1	32.4 $\pm$ 4.8	28.7 $\pm$ 3.3
	IC ₅₀ (μ mol)		0.094	0.101	0.097	0.109	0.144
LCA + D-Mannose	30		80.6 $\pm$ 0.7	81.1 $\pm$ 1.2	83.1 $\pm$ 1.1	80.4 $\pm$ 1.9	82.1 $\pm$ 1.9
	10		55.4 $\pm$ 0.9	81.3 $\pm$ 1.3	60.7 $\pm$ 1.3	60.1 $\pm$ 1.5	68.6 $\pm$ 1.6
	5		34.6 $\pm$ 1.0	71.5 $\pm$ 1.2	46.4 $\pm$ 1.1	44.5 $\pm$ 1.4	43.2 $\pm$ 3.3

			HUVEC prim	HUVEC prim + TNF- α	HUVEC tert	HUVEC tert + TNF- α	HMEC- 1
Lectin + inhibitory sugar	Sugar (μ mol/sample)		Inhibition %				
	1		6.2 $\pm$ 2.1	33.6 $\pm$ 2.6	19.6 $\pm$ 2.8	9.9 $\pm$ 1.1	15.4 $\pm$ 2.0
	0.5		2.2 $\pm$ 1.2	21.7 $\pm$ 1.1	9.6 $\pm$ 1.1	7.8 $\pm$ 2.0	9.2 $\pm$ 2.4
	0.25		0.3 $\pm$ 1.8	8.6 $\pm$ 1.5	1.9 $\pm$ 2.9	1.8 $\pm$ 2.3	3.1 $\pm$ 4.2
	IC ₅₀ (μ mol)		8.345	2.005	5.946	6.381	6.024

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

Table 3. Number of cell aggregates in whole blood samples after WGA-incubation. 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 from manually counts (mean±SD, n=30).

	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±3.7	10.4±5.2	2.5±1.4
62.5	8.6±3.6	6.1±1.7	0.9±0.8
31.25	2.1±0.9	2.1±1.2	0.5±0.8
15.88	0.0±0.0	0.5±0.6	0.1±0.3
7.94	0.1±0.3	0.6±0.7	0.0±0.2
3.9	0.0±0.2	0.1±0.3	0.0±0.0
1.98	0.0±0.0	0.0±0.2	0.0±0.1
control	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.2

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 0.8-6.25 pmol 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 6.25 pmol 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 (12.5 pmol/ 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.

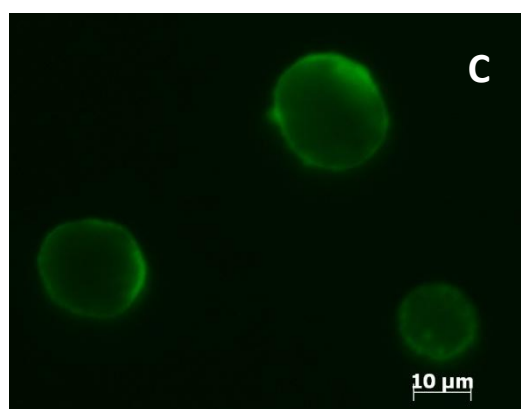
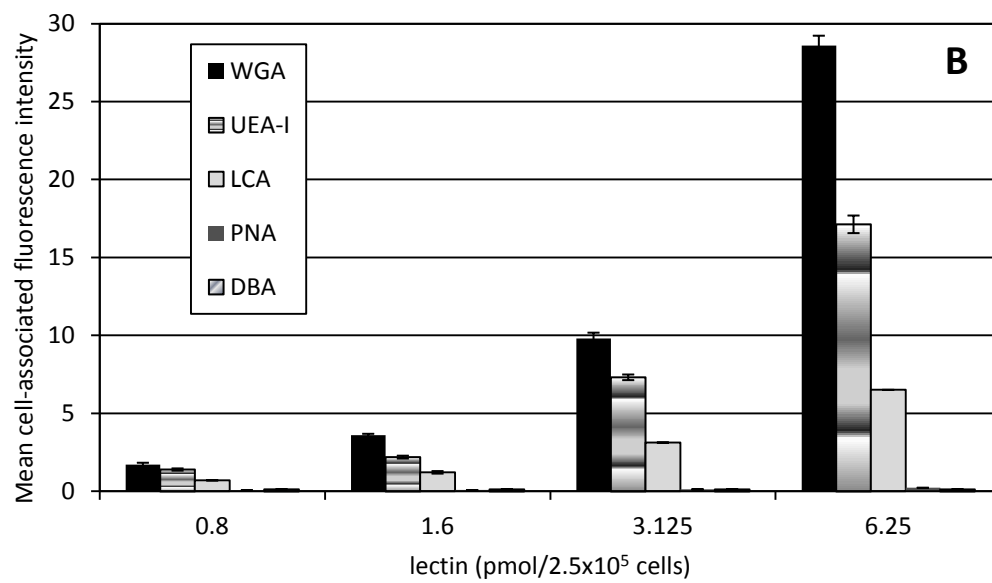
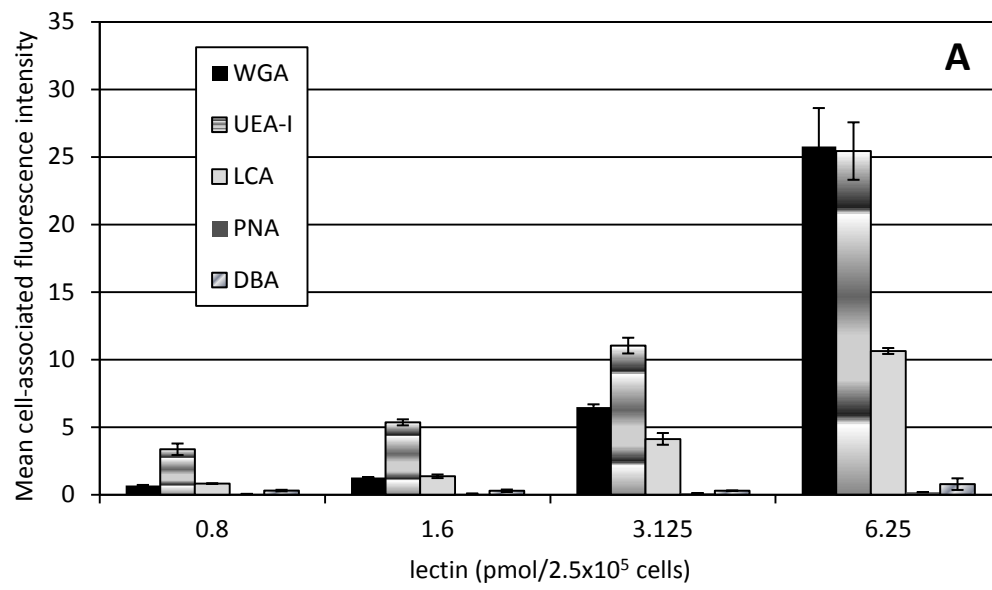
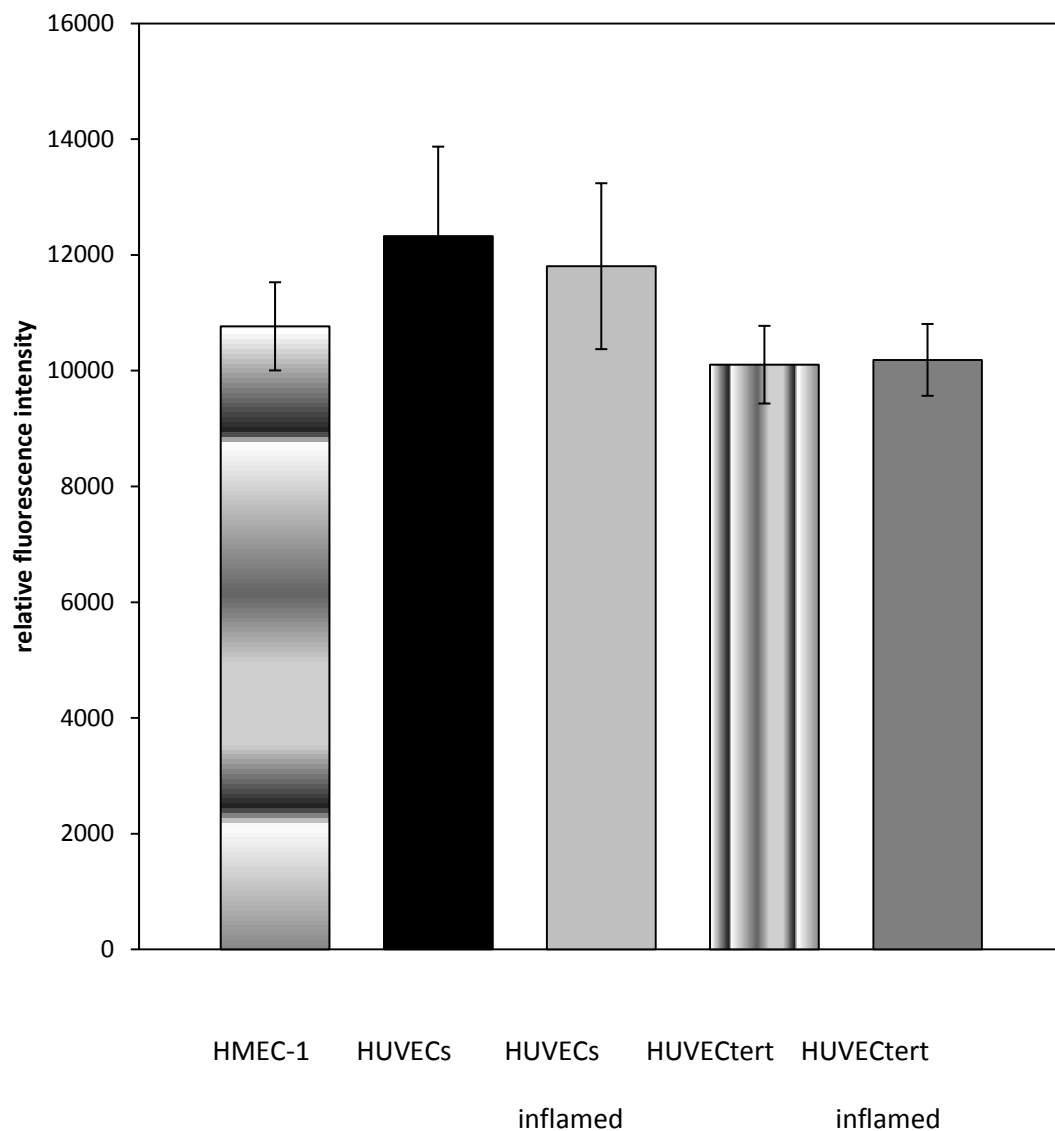


Figure S2. CyQuant® cell proliferation test

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, no significant changes in cell number during inflammation could be observed. (n=18, SD $\leq$ 1544.37)



9 Anhang B

Auswertung: 4.3.2 Interaktion zwischen PEI-modifizierten PLGA-Mikropartikeln und Endothelzellmonolayer: Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Einzelbestimmungen inklusive Standardabweichung von primären HUVEC (A) und HUVEC-tert (B).

A Primäre HUVEC	WGA 50 µl	WGA 25 µl	LW 50 µl	LW 25 µl	PEI MG=1200 (50 µl)	PEI MG=1200 (25 µl)	PEI MG=10000 (50 µl)	PEI MG=10000 (25 µl)	Puffer
Mittelwert	85,56	54,83	109,06	58,78	79,00	54,67	101,50	55,67	31,17
Standardabweichung	5,41	3,66	5,38	4,92	7,66	7,85	14,47	6,83	0,87

Rohdaten 1: zu Abbildung 1(A)

B HUVEC-tert	WGA 50 µl	WGA 25 µl	LW 50 µl	LW 25 µl	PEI MG=1200 (50 µl)	PEI MG=1200 (25 µl)	PEI MG=10000 (50 µl)	PEI MG=10000 (25 µl)	Puffer
Mittelwert	75,89	52,89	96,67	59,70	87,67	52,67	90,00	55,78	32,33
Standardabweichung	8,35	4,51	10,49	7,24	19,41	5,50	21,05	10,97	3,62

Rohdaten 2: zu Abbildung 1(B)

Auswertung: 5.3.2 Interaktion zwischen Erythrozyten, Endothelzellen und PLGA-Mikropartikeln unter Flussbedingungen: gemessen wurde im Kanal hinten, vorne und seitlich zwei Mal (in Summe vier Mal). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus diesen 4 Bestimmungen inklusive Standardabweichungen.

	Waschen 1 MW	Waschen 2 MW	Standardabweichung 1	Standardabweichung 2
WGA	133,33	107,33	18,18	17,61
PEI	151,67	131,33	35,02	38,44
HSA	116,67	94,67	16,80	9,07
Plain	96,00	80,67	8,54	10,79

Rohdaten 3: zu Abbildung 5

Auswertung Internalisation von F-WGA in HUVEC prim/tert bei 37°C/4°C: Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 8 Einzelbestimmungen inklusive Standardabweichungen. Gemessen wurde jeweils vor Monensinzugabe, nach Monensin-Zusatz bzw. nach Entfernung von Monensin.

1.Internalisation mit HUVEC prim bei 37 °C

	MW vor Monensin	MW mit Monensin	Stabw vor Monensin	Stabw mit Monensin
0 Min	885,25	593,13	278,04	157,00
10 Min	630,50	531,75	137,12	120,93
40 Min	588,88	499,00	160,49	116,19
60 Min	656,00	495,13	113,97	81,59
90 Min	658,13	555,00	168,83	185,30
120 Min	761,38	789,50	104,33	133,70

Rohdaten 4: zu Abbildung 6

2.Internalisation mit HUVEC prim bei 37 °C

HUVEC prim	MW vor Monensin	MW mit Monensin	MW nach Monensin	Stabw vor Monensin	Stabw mit Monensin	Stabw nach Monensin
0 Min	755,38	574,00	404,50	176,66	198,00	109,40
60 Min	630,13	490,88	521,00	147,03	139,12	150,21
120 Min	507,38	432,13	391,88	132,81	135,43	115,65
180 Min	739,00	665,63	684,88	263,82	273,29	271,46
300 Min	528,63	396,50	483,13	136,42	105,19	105,74

Rohdaten 5: zu Abbildung 7(A)

3.Internalisation mit HUVEC tert bei 37 °C

HUVEC tert	MW vor Monensin	MW mit Monensin	MW nach Monensin	Stabw vor Monensin	Stabw mit Monensin	Stabw nach Monensin
0 Min	999,38	498,13	476,75	238,47	69,12	99,70
60 Min	587,63	369,88	460,13	87,77	83,90	87,98
120 Min	730,63	518,88	637,63	111,76	82,77	127,50
180 Min	858,50	565,63	710,25	169,82	133,74	181,84
300 Min	826,63	508,75	682,00	157,00	99,40	172,41

Rohdaten 6: zu Abbildung 7(B)

10 Curriculum vitae

Persönliche Daten

<u>Name</u>	Nina Mizerovsky
<u>Geburtsdatum</u>	17.11.1986 in Wien
<u>Familienstand</u>	ledig
<u>Mutter</u>	Eva Pointner
<u>Vater</u>	Harald Mizerovsky

Schulische Ausbildung/Studium

<u>09/1993-06/1997</u>	Öffentliche Volksschule 1220 Wien, Meißnergasse 1
<u>09/1997-06/2005</u>	Bundesgymnasium 1220 Wien, Theodor Kramer-Straße 3 Abschluss: Matura am 15.06.2005
<u>seit 10/2005</u>	Pharmaziestudium an der Universität Wien
<u>09/2013-08/2014</u>	Ausbildung zur Ganzheitskosmetikerin bei IKOS®Ganzheitskosmetik, Wien. Diplomabschluss am 12. August 2014 mit ausgezeichnetem Erfolg

Berufliche Erfahrungen

<u>06-07/2004</u>	Informationsbetreuung der Biberausstellung für die MA 49 Land- und Forstbetrieb der Stadt Wien im Nationalpark Donauauen
<u>08/2005</u>	Ferialpraxis bei Austria Frost Nahrungsmittel GmbH
<u>Seit Herbst/2006</u> und	Selbstständige EDV-Trainerin für Volkshochschule Donaustadt Sozial Medizinisches Zentrum Ost in Wien
<u>09/2006</u>	Ferialpraxis 1220 Wien Apotheke Donauzentrum
<u>08/2007</u>	Ferialpraxis 1220 Wien Apotheke Donauzentrum

<u>08/2008</u>	Ferialpraxis 1220 Wien Apotheke Donauzentrum
<u>08/2009</u>	Ferialpraxis 1220 Wien Apotheke Donauzentrum
<u>09/2008-03/2013</u>	geringfügig beschäftigt bei Apotheke Donauzentrum
<u>03/2011-07/2014</u>	Informationsbetreuung Nationalpark Donauauen
<u>Seit 03/2011</u>	selbstständige Durchführung von Kräuterwanderungen im Nationalpark Donauauen
<u>10/2012-07/2014</u>	Studentische Mitarbeiterin (Tutorin) in den Übungen industrielle Arzneimittelherstellung am Institut der pharmazeutischen Technologie und Biopharmazie der Universität Wien
<u>Seit 09/2014</u>	Angestellt bei Apotheke Donauzentrum
<u>Seit 09/2014</u>	selbstständige Leitung von Naturkosmetik-Workshops

Sprachen

Deutsch

Englisch

Französisch (Grundkenntnisse)

EDV-Kenntnisse

ECDL-Standard Zertifikat

Windows

MS-Office