



universität
wien

DIPLOMARBEIT

THP-1 Zellen als Modell für Phagozytose

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Stefanie Gallauner
Matrikel-Nummer:	0202808
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Wien, im Oktober 2009

Vielen Dank

Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die interessante Themenstellung und Ermöglichung der Diplomarbeit sowie deren rasche Korrektur.

Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth, Mag. Dr. Verena Plattner, Mag. Gerda Ratzinger für die Anleitung und Begleitung bei der praktischen Arbeit und für die Unterstützung beim Verfassen meiner Diplomarbeit.

Mag. Elisabeth Engleder, die mir bereitwillig ihr Wissen weitergegeben und mich mit den Grundlagen der Zellkultur vertraut gemacht hat.

Mag. Isabella Andrlík und Mag. Victoria Klang dafür, dass ich in der entbehrungsreichen Zeit der Diplomarbeit stets etwas zu lachen hatte.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe, die mir immer mit Rat und Tat beiseite standen.

Meinen Freunden, die mich durch die Sternstunden und Tiefpunkte des Studiums begleitet, mich in Stunden der Verzweiflung aufgebaut und motiviert haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Meinen Eltern, die mir das Studium finanziell ermöglicht haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	3
2. Allgemeines	5
2.1. Drug Targeting	5
2.2. Beschreibung der THP-1 Zelllinie.....	5
2.3. Beschreibung der Nanopartikel	5
2.3.1. Fluoresbrite® YG.....	6
2.3.2. Bodipy-PLGA-Nanopartikel	6
2.4. Beschreibung der Lektine.....	7
2.4.1. WGA (wheat germ agglutinin).....	7
2.4.2. PNA (peanut agglutinin)	7
2.4.3. SNA (sambucus nigra agglutinin)	8
2.5. Beschreibung der oberflächenmodifizierten Nanopartikel	8
2.5.1. WGA-modifizierte Nanopartikel	8
2.5.2. BSA-modifizierte Nanopartikel.....	8
3. Experimenteller Teil.....	9
3.1. Materialien.....	9
3.2. Allgemeine Handhabung und Subkultivierung der Zellen	11
3.3. Differenzierungsnachweis zu Makrophagen	11
3.4. Herstellung der PLGA-Nanopartikel	13
3.4.1. Herstellung der PLGA-Nanosphären	13
3.4.2. Herstellung der Bodipy-PLGA-Nanopartikel	13
3.4.3. Herstellung der oberflächenmodifizierten PLGA-Nanosphären	14
3.5. Fluorimetrie	15
3.6. Durchflusszytometrie.....	15
3.7. Bindungsstudien mit unterschiedlich modifizierten Nanopartikeln	16
3.7.1. Interaktion von Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikeln mit THP-1 Zellen.....	16
3.7.2. Interaktion von WGA- und BSA-modifizierten PLGA-Nanopartikeln mit THP-1 Zellen	18
3.8. Internalisierungsstudien und Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Nanopartikeln	21
3.8.1. Internalisierung von Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikeln durch THP-1 Zellen	21

3.8.2. Internalisierung von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln durch THP-1 Zellen und Untersuchung der intrazellulären Lokalisation mittels Monensin	28
3.9. Einfluss von Neuraminidase auf die Interaktion und Internalisation von Lektinen und Nanopartikeln.....	31
3.9.1. Einfluss von Neuraminidase auf die Interaktion von THP-1 Zellen mit Lektinen.....	31
3.9.2. Einfluss von Neuraminidase auf die Internalisation von Bodipy-PLGA-Nanopartikeln durch THP-1 Zellen	36
3.10. Fluoreszenzmikroskopie.....	39
4. Ergebnisse	41
5. Zusammenfassung.....	47
6. Literaturverzeichnis	48
7. Anhang: Publikation	49
8. Lebenslauf.....	57

1. Einleitung

Das menschliche Immunsystem kann bei der Behandlung von Krankheiten sowohl ein Ziel als auch eine Barriere für die Therapie mit Wirkstoffen darstellen. Bei Infektionskrankheiten wie Leishmaniose oder Aids überlebt der Erreger in Zellen des retikuloendothelialen Systems, wodurch das Immunsystem das Ziel für die Therapie darstellt. Sollen jedoch andere Gewebe mit partikulären Mikro- oder Nano-Arzneiformen erreicht werden, führt die vorzeitige Inaktivierung durch Phagozytose zu einer Einschränkung oder auch zum Verlust des Therapieerfolges. Mit der monozytären THP-1 Zelllinie steht ein Modell zur Verfügung, welches erlaubt, das Phagozytoseverhalten von Monozyten und Makrophagen näher zu charakterisieren.

Monozyten und Makrophagen spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem z.B. bei der Bekämpfung von Infektionen, Entzündungsvorgängen und der Abwehr von Fremdstoffen. Sie haben ihren Ursprung im Knochenmark und durchlaufen eine Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen über Monozyten in der Blutbahn bis zu gewebspezifischen Makrophagen. Umgeben sind diese Zellen von einer kohlenhydratreichen Schicht, der Glykokalyx [1, 2]. Diese Zuckerschicht hat besondere Relevanz für die Immunantwort des unspezifischen Immunsystems, welches auf der Erkennung von Kohlenhydraten beruht [3]. Makrophagen sind auf die Aufnahme von Fremdkörpern spezialisiert, wobei der initiale Schritt in der Bindung der körperfremden Substanz an die Zelloberfläche besteht. Diese Bindung kommt durch Interaktion zwischen Oberflächenglykoproteinen der phagozytierenden Zelle und Zuckerresten auf dem Fremdkörper zustande. Mithilfe von Lektinen können spezifisch Kohlenhydratreste der Glykokalyx erkannt werden, wodurch auf bestimmte Glykosylierungsmuster geschlossen werden kann. Aber auch durch unspezifische Wechselwirkung kann die Aufnahme verschiedener Partikel vermittelt werden [4]. Weiters können phagozytierende Zellen durch Modulation ihrer Glykokalyx ihre Bindungskapazität und Zelladhäsion regulieren [5]. Die humane Sialidase (Neuraminidase), die während der Differenzierung zu Makrophagen verstärkt exprimiert wird und an die Zelloberfläche wandert, ist für den Abbau sialylierter Glykokonjugate verantwortlich. Eine Suppression der Neuraminidase-Aktivität kann eine verminderte Bindungs- und Phagozytosekapazität bewirken [6]. Eine zusätzliche Behandlung mit Neuraminidase soll durch Entfernung von Sialinsäure an der Zelloberfläche die Phagozytosefähigkeit steigern [7].

In der vorliegenden Diplomarbeit sollte anhand von Interaktions- und Internalisationsstudien mit unterschiedlichen Lektinen, Nanopartikeln und Lektin-modifizierten Nanopartikeln das Phagozytoseverhalten von THP-1 Monozyten und differenzierten Makrophagen näher charakterisiert werden. Zusätzlich sollte mit Hilfe von Monensin die intrazelluläre Lokalisation der Lektine untersucht werden. Um einen möglichen Einfluss von Partikelbau und -größe zu erkennen, sollten sowohl Polystyrol- als auch PLGA-Partikel eingesetzt werden. Weiters sollte der Einfluss einer Neuraminidase-Vorinkubation auf die Glykokalyx und die daraus resultierende Änderung des Lektinbindungsmusters untersucht werden.

2. Allgemeines

2.1. Drug Targeting

Das Ziel des Drug Targeting ist, einen Arzneistoff über ein molekulares oder supramolekulares Trägersystem selektiv zu seiner Zielzelle zu transportieren. Grundsätzlich sind passives Targeting unter Ausnutzung physiologischer Besonderheiten des Zielgewebes, physikalisches Targeting basierend auf nicht physiologischen pH-Werten oder Temperaturen im Zielgewebe, sowie magnetisches Targeting, aktives Targeting unter Ausnutzung spezifischer Vektoren am Wirkstoff oder Wirkstoffträger und Targeting unter Verwendung zellulärer Träger möglich.

Das Prinzip des aktiven Targeting beruht auf der Beobachtung, dass jeder Zelltyp an seiner Zellmembran charakteristische Proteine exprimiert. So ist es möglich, gezielt Liganden für diese Proteine einzusetzen und diese an Wirkstoffe oder Wirkstoffträger zu koppeln. Als Vektormoleküle kommen Antikörper, Antikörperfragmente, Lipoproteine, Lektine, Saccharide oder niedermolekulare organische Substanzen, die Substrate für Transporter oder Enzyme sind, in Frage. Da nur wenige Effektormoleküle an einen Vektor gekoppelt werden können, erweist es sich als sinnvoll, supramolekulare Wirkstoffträger, wie Mizellen, Liposomen oder Nanopartikel zu verwenden.

2.2. Beschreibung der THP-1 Zelllinie

THP-1 Zellen (ATCC-Nr. TIB-202) wurden aus dem Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten einjährigen Jungen isoliert. Sie weisen Merkmale von Monozyten auf, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Phagozytose und die Produktion von Lysozymen. Die Zellen wachsen in Suspension und bilden zum Teil lockere Anhäufungen. Durch Behandlung mit Phorbolestern differenzieren sie zu Makrophagen und werden adhärent [8].

2.3. Beschreibung der Nanopartikel

Pharmazeutische Formulierungen im Nanometerbereich besitzen als kolloidale Arzneiformen einen wichtigen Stellenwert in der pharmazeutischen Forschung. Die partikulären Trägersysteme bieten durch Verkapselung empfindlichen Wirkstoffen

Schutz und können Wirkstoffe, die in herkömmlichen Darreichungsformen nicht applizierbar sind, bioverfügbar machen. Nanopartikel aus Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA) erfüllen aufgrund ihrer biokompatiblen und biodegradierbaren Eigenschaften die medizinischen und pharmazeutischen Anforderungen an Hilfsstoffe. Durch Immobilisierung von Targetern an der Partikeloberfläche kann ein zielgerichteter Wirkstoff-Transport erreicht werden. Im Vergleich mit herkömmlichen Arzneiformen ist dadurch eine Dosisreduktion möglich, wodurch zusätzlich die Toxizität gesenkt werden kann, sodass die Lebensqualität und Compliance des Patienten steigen. Die intravenöse Applikation von Nanopartikeln bietet zwar die Möglichkeit zur Wirkstofffreisetzung am Zielorgan, doch die Zellen des RES (retikuloendotheliales System) stellen durch Phagozytose der im Blutkreislauf zirkulierenden Nanopartikel ein bedeutendes Hindernis dar. Durch Ummantelung der Nanopartikel mit Polyethylenglycol (PEG) kann die Aufnahme durch Monozyten und Leukozyten eingeschränkt werden [9, 10].

2.3.1. Fluoresbrite® YG

Es handelt sich um fluoreszierende Latex Nanosphären auf Polystyrolbasis. Da ein unbekannter Farbstoff mit den Anregungs- und Emissionswellenlängen von Fluorescein in der hydrophoben Partikelmatrix eingeschlossen ist, steht die Oberfläche für Proteinadsorption und kovalente Bindung über funktionelle Gruppen zur Verfügung.

Die Nanopartikel mit einem Durchmesser von 0,2 µm sind in einer 2,5% wässrigen Suspension erhältlich. Bei lichtgeschützter Lagerung und bei einer Temperatur von 4°C ist die Stabilität gewährleistet [11].

2.3.2. Bodipy-PLGA-Nanopartikel

Bodipy-PLGA-Nanopartikel bestehen aus einer PLGA-Matrix, einem bioabbaubaren und -kompatiblen Polymer aus Milchsäure und Glykolsäure. In diese Matrix ist der hydrophobe Farbstoff Bodipy® (BOD; 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-5-indacene), der fluoresceinähnliche spektrale Eigenschaften besitzt, eingebettet. Das im Gegensatz zu Fluorescein stark hydrophobe Fluorophor macht einen effizienten Einschluss in die Polymerpartikel möglich. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden deshalb BOD-markierte PLGA-Nanosphären verwendet, die mittels Solvent Evaporation Technik hergestellt wurden. Die Nanopartikelsuspension

wird durch Pluronic® F68, ein Blockpolymer aus Polyethylenoxid- und Polypropylenoxideinheiten, sterisch stabilisiert.

Eine kurzfristige lichtgeschützte Lagerung bei 4°C ist zwar möglich, doch um längerfristige Stabilität sicherzustellen, wird die Nanopartikelsuspension bei –80°C gelagert.

2.4. Beschreibung der Lektine

Lektine sind Proteine oder Glykoproteine nicht-immunologischen Ursprungs, die Kohlenhydratstrukturen spezifisch erkennen können. Sie besitzen eine oder mehrere Zuckerbindungsstellen und können dadurch reversibel an freie Zucker oder Zuckerreste von Polysacchariden, Glykoproteinen oder Glykolipiden binden. Obwohl Lektine in fast allen Organismen vorkommen, sind die am besten erforschten Lektine pflanzlichen Ursprungs. Viele Lektine überstehen die Passage durch den Verdauungstrakt unbeschadet und gelangen in biologisch aktiver Form in den Blutkreislauf. Anwendung finden Lektine in der Biochemie, Zellbiologie, Immunologie, Diagnostik und Krebsforschung [12, 13].

2.4.1. WGA (wheat germ agglutinin)

Das Weizenkeimlektin, das aus *Triticum vulgare* isoliert wird, ist ein dimeres Protein, welches sich aus zwei identischen Untereinheiten aus 171 Aminosäuren zusammensetzt. Die Spezifität von WGA richtet sich auf N-Acetylglukosamin und N-Acetylglukosamin-Oligomere. Weiters bindet WGA an Sialinsäure-hältige Oligosaccharide. Oral aufgenommenes WGA wird von intestinalen Epithelzellen aufgenommen und gelangt so in den Blutkreislauf. Anwendung findet WGA zum Beispiel in der Analyse von Glykoproteinen, wobei markiertes WGA zum Nachweis von N-Acetylglukosaminstrukturen dienen kann.

2.4.2. PNA (peanut agglutinin)

Das Erdnuss-Lektin aus *Arachis hypogaea* ist ein Tetramer mit einer Molmasse von 110 kDa, wobei die Molmasse der Untereinheiten jeweils etwa 27 kDa beträgt. Das nicht glykosylierte Protein ist in der Lage Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zu binden und reagiert sehr spezifisch mit β -D-Galaktoseresten. PNA agglutiniert nur Zellen, die mit Neuraminidase vorbehandelt wurden und stellt aufgrund der Spezifität für nicht

reduzierende D-Galaktosylendgruppen ein wichtiges Agens in der Aufklärung von Zelloberflächenstrukturen dar.

2.4.3. SNA (sambucus nigra agglutinin)

Das Holunder-Lektin SNA wurde aus der Rinde von *Sambucus nigra* isoliert. Das Glykoprotein mit einer Molmasse von 240 kDa setzt sich aus 4 Untereinheiten zusammen [A-s-s-B], deren B-Ketten aufgrund zusätzlicher Cysteinreste über Disulfidbrücken paarweise verbunden sind. SNA besitzt eine Spezifität für Neu5Ac α (2,6)Gal/GalNAc-Sequenzen und wird für die Isolierung und Fraktionierung sialylierter Oligosaccharide und Zuckerkonjugate verwendet [14].

2.5. Beschreibung der oberflächenmodifizierten Nanopartikel

Jeder Zelltyp besitzt charakteristische Merkmale, die ihn von anderen Zelltypen unterscheiden und für aktives Targeting ausgenutzt werden können. Sind diese Merkmale auf der Zelloberfläche lokalisiert, ist es möglich, spezifische Liganden für diese Oberflächenstrukturen an den Wirkstoffträger zu koppeln, um eine gezielte Interaktion zwischen Zelle und Wirkstoffträger zu ermöglichen.

2.5.1. WGA-modifizierte Nanopartikel

Bei den WGA-modifizierten Nanopartikeln handelt es sich um oberflächenmodifizierte PLGA-Nanosphären. Durch Konjugation mit Lektinen wird eine spezifische Interaktion mit Oligosaccharidstrukturen der zellulären Glykokalyx möglich. Durch die cytoadhäsiven und cytoinvasiven Eigenschaften von WGA kann die Aufnahme von PLGA-Nanopartikeln in die Zelle gesteigert werden [15].

2.5.2. BSA-modifizierte Nanopartikel

Um den Beitrag von unspezifischen Bindungsmechanismen an die Zellen zu erfassen, wurden PLGA-Partikel mit fluoreszenzmarkiertem bovinem Serumalbumin modifiziert [16].

3. Experimenteller Teil

3.1. Materialien

PBS-Puffer pH 7,2 mit Calcium und Magnesium, partikelfrei

CaCl ₂ – Stammlösung	50,0 ml
(CaCl ₂ -Stammlösung:	2,65 g CaCl ₂ * 2 H ₂ O pro 1000 ml H ₂ O)
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgCl ₂ * 6H ₂ O	0,1 g
NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	0,764 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

PBS-Puffer pH 7,2

Stammlösung: Die Stammlösung wird 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt.

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	15,4 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

20 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4

4,77 g HEPES (4-(2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und mit verdünnter NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

20 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4, isoton

20 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 7,4	1000 ml
NaCl	6 g

RPMI-1640-Gewebekulturmedium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit:

10% hitzeinaktiviertem FCS (fetales Kälberserum)

200 mM L-Glutamin

Penicillin/Streptomycinlösung (104 U/ml)

0,25% EDTA-Lösung in PBS-Puffer

MY4-FITC-Lösung

FITC-markierte murine monoklonale Antikörper (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland), verdünnt 1:20 in PBS mit 2% FCS

MslgG2b-FITC-Lösung (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland)

Poly(D,L-laktid-co-glykolid) (PLGA) Resomer RG 503H (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland)

Pluronic® F68 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Fluoresbrite plain YG 0,2 micron microspheres (Polysciences, Warrington, USA)
2,5% solids-latex

1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

N-Hydroxysuccinimid (NHS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Fluoreszenzmarkierte Lektine (Vector Laboratories, Burlingame, USA)

Lektin aus	Abkürzung	Molares Verhältnis Fluorescein/Protein
Triticum vulgare	WGA	2,9
Sambucus nigra	SNA	7,2
Arachis Hypogaea	PNA	4,7

Neuraminidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* wurde verwendet, um Sialinsäure von Glykoproteinen abzuspalten. Die Neuraminidaselösung wurde mit FCS-freiem Medium soweit verdünnt, dass eine Aktivität von 0,2 bzw. 0,1 U/ml erreicht wurde.

Monensin

Monensin Natrium Salz (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

2,4 mM in Ethanol

Monensin wurde zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der Lektine verwendet.

3.2. Allgemeine Handhabung und Subkultivierung der Zellen

Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml in RPMI-1640 Kulturmedium ausgesät und in einer feuchten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen passagiert und das Medium erneuert.

Um die Differenzierung zu Makrophagen auszulösen wurden die Zellen bei einer Dichte von 9×10^5 Zellen/ml in Kulturmedium resuspendiert und nach Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; 8 nM in DMSO) 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

Für die Versuche wurden die adhärenenten Zellen mit 0,25% EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert (1000 rpm, 5 Min, 4°C) und mit partikelfreiem Calcium- und Magnesium-hältigen PBS (PBS-Ca²⁺-Mg²⁺) auf eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Die Viabilität der Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung kontrolliert und die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Bürker-Türk Zählkammer.

3.3. Differenzierungsnachweis zu Makrophagen

Nach PMA-Behandlung zeigten sich im Mikroskop morphologische Unterschiede zwischen differenzierten und undifferenzierten Zellen. Während unbehandelte Zellen in Suspension wuchsen, Aggregate bildeten und kugelförmig geformt waren, lagen differenzierte Zellen in adhärenenter Form vor und waren länglich und abgeflacht.

Um die Differenzierung zu verifizieren wurden CD14 Rezeptoren, die infolge der Differenzierung zu Makrophagen vermehrt an der Zelloberfläche exprimiert werden, durch eine Antigen-Antikörper Reaktion und anschließende durchflusszytometrische Analyse quantifiziert [17].

Praktische Durchführung:

Undifferenzierte Zellen wurden zentrifugiert (1000 rpm, 5 Min, 4°C) und mit Färbepuffer (PBS mit 0,1% NaN₃ und 2% FCS) auf eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Differenzierte Zellen wurden mit 0,25% EDTA-Lösung abgelöst und auf dieselbe Zellkonzentration eingestellt.

50 µl Zellsuspension wurden mit 210 µl eines FITC-markierten CD14 Antikörpers (MY4-FITC) 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden

die Zellen zentrifugiert und zur Entfernung von überschüssigem, ungebundenem Antikörper 200 µl Überstand abgehoben, 140 µl Waschpuffer (PBS mit 0,1% NaN₃) zugesetzt, nochmals zentrifugiert, wieder 150 µl Überstand abgehoben und das Zellpellet in 150 µl Waschpuffer resuspendiert.

Um den Beitrag der Eigenfluoreszenz der Zellen zu erfassen, wurden 50 µl Zellsuspension mit PBS anstelle von Antikörperlösung versetzt und in gleicher Weise behandelt.

Zur Bestimmung der spezifischen Antikörperbindung wurden 50 µl Zellsuspension mit 210 µl FITC-markierter Isotypenlösung (MslgG2b) inkubiert und danach die Zellen wie oben beschrieben gewaschen.

Alle Zellen wurden schließlich in 1 ml PBS-Ca²⁺-Mg²⁺ resuspendiert und die mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch bestimmt.

Um die spezifische Antikörperbindung zu bestimmen, wurden die MFI-Werte der Isotypenkontrolle von den jeweiligen Daten subtrahiert. Die Rezeptorexpression ist als positiv anzusehen, wenn die MY4-FITC-MFI über der MFI der Isotypenkontrolle liegt bzw. ein Anstieg der CD14 Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu beobachten ist.

Inkubationszeit (Stunden)	MFI			
	PBS	MY4-FITC	MslgG2b	spezifische Ak-Bindung
0	0,27 ± 0,12	1,10 ± 0,27	0,57 ± 0,06	0,53 ± 0,23
24	0,20 ± 0,00	1,30 ± 0,00	0,53 ± 0,06	0,77 ± 0,06
48	0,20 ± 0,00	10,27 ± 0,47	0,53 ± 0,06	9,74 ± 0,42

Tab. 1: Mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensitäten von THP-1 Zellen nach spezifischer Antikörperbindung durch PMA-Behandlung (0-48 Stunden)

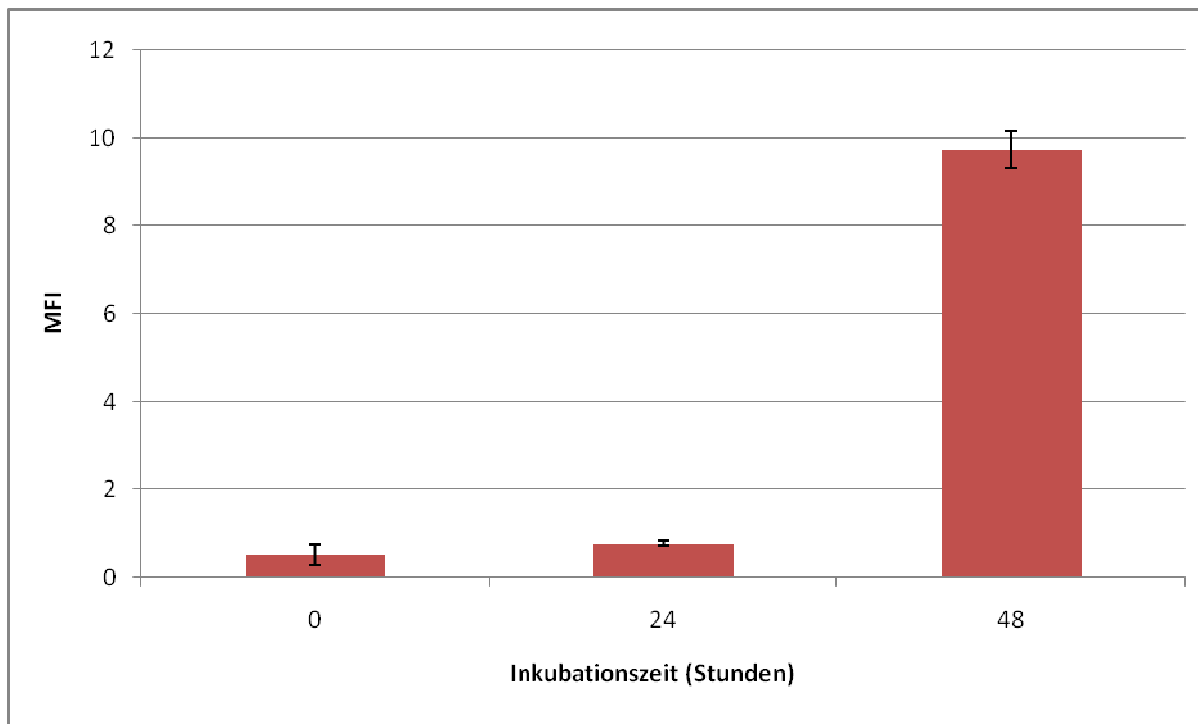


Abb. 1: Durchflusszytometrische Analyse der CD14 Expression von THP-1 Zellen

Nach 48-stündiger Inkubation mit PMA konnte ein starker Anstieg der zellassoziierten Fluoreszenz festgestellt werden, wobei bereits nach 24 Stunden ein leichter Anstieg der MFI-Werte zu beobachten war.

3.4. Herstellung der PLGA-Nanopartikel

3.4.1. Herstellung der PLGA-Nanosphären

400 mg PLGA wurden in 2 g Ethylacetat gelöst. Nach rascher Zugabe von 6 ml einer 10%igen wässrigen Pluronic® F68-Lösung wurde die organische Phase durch Ultraschallbehandlung (Ultraschallstab Bandelin UW 70/HD 70, Spitze: MS 72/D, 50 Sekunden) unter Kühlung in der wässrigen Phase dispergiert. Die O/W Emulsion wurde rasch in 100 ml einer 1%igen wässrigen Pluronic® F68-Lösung gegossen. Das organische Lösungsmittel wurde durch einstündiges Rühren am Magnetrührer (600 rpm) bei Atmosphärendruck und nachfolgend für eine Stunde unter vermindertem Druck entfernt.

3.4.2. Herstellung der Bodipy-PLGA-Nanopartikel

400 mg PLGA und 1 mg BODIPY® 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-5-indacene) wurden in 2 g Ethylacetat gelöst. Die weiteren Arbeitsschritte entsprechen der Herstellung von PLGA-Nanosphären (3.4.1.).

Die Nanopartikelsuspension wurde durch Diafiltration mithilfe einer Vivaflow Kassette (Vivaflow 50, 100 000 MWCO PES, Sartorius Vivascience GmbH) fünfmal mit jeweils 40 ml PBS gewaschen, wobei zunächst die Suspension von 40 auf 20 ml eingengt wurde. Die gereinigte Partikelsuspension wurde weiter konzentriert, indem 20 ml Suspension auf ein Volumen von 10 ml eingengt wurden. Die mittlere Partikelgröße wurde durch dynamische Lichtstreuung (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd.) bestimmt und betrug 112,5 nm bei einem Polydispersitätsindex (PDI) von 0,121.

3.4.3. Herstellung der oberflächenmodifizierten PLGA-Nanosphären

Eine PLGA-Nanopartikelsuspension wurde wie in Kapitel 3.4.1. beschrieben hergestellt. Die Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche von 40 ml Suspension wurden durch Zugabe von 480 mg N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDAC) und 20 mg N-Hydroxysuccinimid (NHS), jeweils gelöst in 1 ml Aqua dest., aktiviert. Nach zweistündiger end-over-end Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension zweimal mit 40 ml 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,5% Pluronic® F68 (HEPES/Pluronic) in einer Vivaflow Kassette gewaschen und auf das Ursprungsvolumen eingengt. Die Nanopartikelsuspension wurde auf zwei gleiche Teile aufgeteilt und jeweils 20 nmol WGA (0,72 mg) oder BSA (1,32 mg), gelöst in 1 ml HEPES/Pluronic, hinzugefügt. Nach end-over-end Inkubation über Nacht wurden überschüssige aktivierte Carboxylgruppen durch Zugabe von jeweils 300 mg Glycin, gelöst in 3 ml HEPES/Pluronic, und weitere einstündige Inkubation abgesättigt. Überschüssige Reagentien wurden durch einmaliges Waschen mit jeweils 40 ml HEPES/Pluronic und zweimaliges Waschen mit jeweils 40 ml isotonem 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,5% Pluronic® entfernt. Im Zuge der Kopplung entstandene Aggregate wurden durch Filtration durch ein Millipore®-Filter mit einem Porendurchmesser von 1 µm entfernt.

Die mittlere Partikelgröße wurde durch dynamische Lichtstreuung bestimmt und betrug für WGA-funktionalisierte Nanosphären 160,3 nm (PDI 0,130) und für BSA-modifizierten Nanosphären 151,2 nm (PDI 0,133). Die an die Partikeloberfläche gekoppelte Menge an fluoreszenzmarkiertem Protein wurde nach Auflösen eines Aliquotes in 0,1M NaOH fluorimetrisch bestimmt. Die Suspensionen enthielten 3,9 µg/ml WGA bzw. 2,1 µg/ml BSA.

3.5. Fluorimetrie

Um bei der durchflusszytometrischen Analyse der mit Fluoresbrite- und Bodipy-PLGA-Nanopartikelsuspensionen inkubierten THP-1 Zellen vergleichbare MFI-Werte zu erzielen, wurden die Nanopartikelsuspensionen mit PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} soweit verdünnt, dass die fluorimetrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten beider Suspensionen bei etwa 20 000 lagen. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da bei der Fluorimetrie die Intensität des emittierten Lichts zur Menge an fluoreszierender Substanz proportional ist.

Für die Untersuchungen wurde ein Spectrafluor Fluorimeter (TECAN Austria, Grödig) eingesetzt.

Praktische Durchführung:

Die Messungen erfolgten in Mikrotiterplatten (Greiner 96 Flat bottom, transparent, Polystyrol), wobei das Füllvolumen pro well exakt 100 µl betrug. Der entsprechende Puffer, in dem die zu untersuchende Probe gelöst oder suspendiert war, wurde als Leerwert berücksichtigt. Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge lag bei 485 bzw. 525 nm, die Verstärkung wurde auf Faktor 85 eingestellt.

3.6. Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein Epics XL-MLC Flowzytometer (Coulter, FL, USA) verwendet. Um tote Zellen, Zellbruchstücke und –aggregate von viabilen Zellen zu trennen, wurden die Zellen aufgrund ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuungsintensitäten zwei verschiedenen Populationen (gates) zugeordnet. Pro Probe wurden 2000 Einzelzellen analysiert und Zellgröße, Granularität und zellassoziierte Fluoreszenz erfasst.

Praktische Durchführung:

50 µl Zellsuspension werden in einem Messröhrchen mit 1 ml auf 4°C gekühltem, partikelfreien PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} verdünnt und analysiert. Weiters wurde bei allen Versuchen die Eigenfluoreszenz einer unbeladenen Zellsuspension erfasst und als Leerwert in die Berechnungen miteinbezogen.

3.7. Bindungsstudien mit unterschiedlich modifizierten Nanopartikeln

Anhand der folgenden Bindungsstudien sollte die optimale Inkubationszeit von THP-1 Zellen mit Nanopartikelsuspensionen bei 4°C ermittelt werden, um die größtmögliche Zellbindung der Partikel an Einzelzellen zu erzielen. Bei dieser Temperatur reduzieren die Zellen ihren Stoffwechsel soweit, dass sich die Interaktion auf die Bindung der Nanopartikel an die Zelloberfläche beschränkt und die Internalisation oberflächengebundener Partikel weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Praktische Durchführung:

Die Versuchsreihe wurde sowohl mit PMA-vorbehandelten, differenzierten als auch undifferenzierten Zellen durchgeführt.

50 µl Zellsuspension (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit 50 µl Nanopartikelsuspension unterschiedlich lange bei 4°C inkubiert. Um ungebundene Partikel zu entfernen, wurden danach 100 µl PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} zugesetzt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 Min, 4°C). 150 µl Überstand wurden abgehoben und durch 150 µl PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} ersetzt. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurden 150 µl Überstand abgehoben. Die restlichen 50 µl Zellsuspension wurden resuspendiert, mit 1 ml PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} verdünnt und durchflusszytometrisch analysiert.

Für alle Versuche wurden Negativkontrollen, bei denen die Nanopartikelsuspension durch PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} ersetzt wurde, erstellt und in die Berechnungen einbezogen.

3.7.1. Interaktion von Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikeln mit THP-1 Zellen

In diesen Versuchen wurden Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanosphären eingesetzt und die Nanopartikelsuspensionen mit PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} soweit verdünnt, dass die mittels eines Fluorimeters (Spectrafluor, TECAN Austria) bestimmten Fluoreszenzintensitäten beider Suspensionen etwa gleich waren. Dabei wurde versucht, Fluoreszenzintensitäten von etwa 20 000 bei einer Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge von 485 bzw. 525 nm und einer Verstärkung von 85 zu erreichen.

Inkubationsdauer (Minuten)	MFI	
	BOD-PLGA	Fluoresbrite
15	16,5 ± 0,2	3,3 ± 0,3
30	17,7 ± 0,0	3,5 ± 0,1
45	22,1 ± 0,6	2,9 ± 0,2
60	18,5 ± 0,5	3,2 ± 0,0
120	21,7 ± 2,7	3,5 ± 0,3

Tab. 2: Vergleich der an differenzierte THP-1 Zellen gebundenen Menge Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikel nach unterschiedlicher Inkubationsdauer bei 4°C.

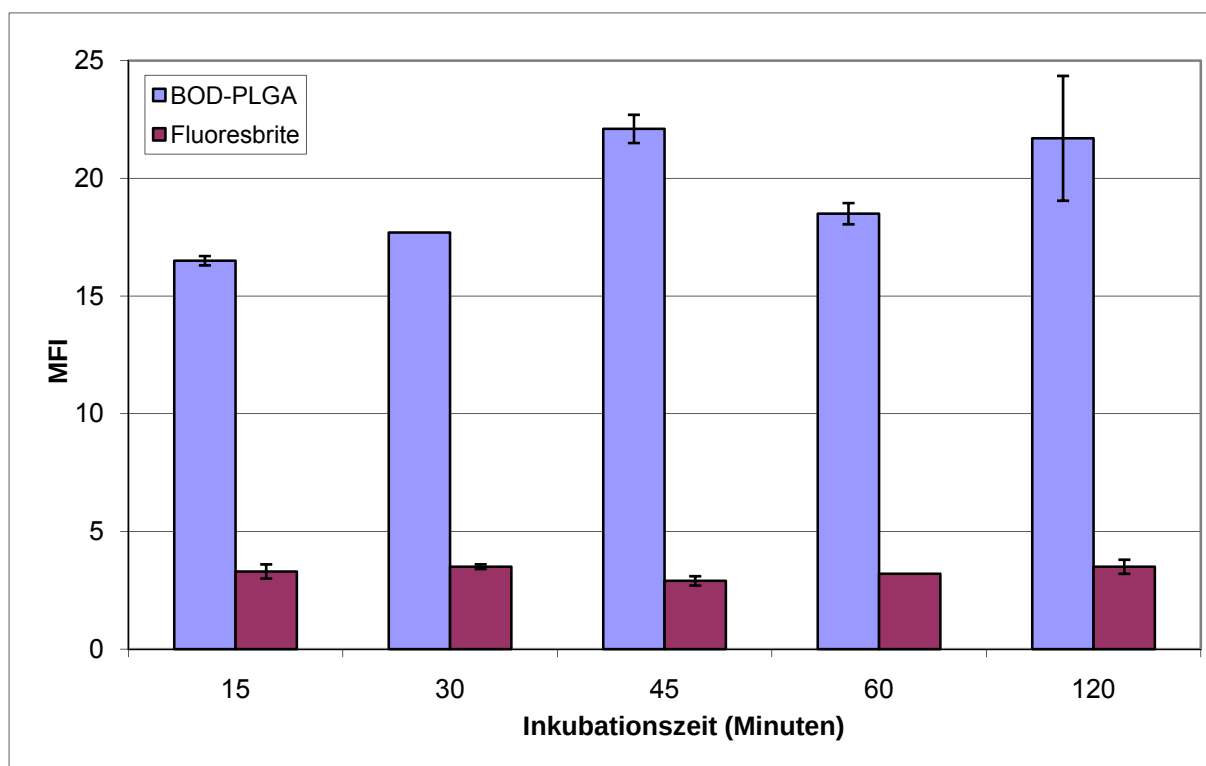


Abb. 2: Mittlere Fluoreszenzintensität differenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikeln über einen Zeitraum von 15-120 Minuten bei 4°C.

Inkubationsdauer (Minuten)	MFI	
	BOD-PLGA	Fluoresbrite
15	4,5 ± 0,4	6,0 ± 0,1
30	5,5 ± 0,0	5,9 ± 0,1
45	5,5 ± 0,2	5,9 ± 0,4
60	6,7 ± 1,2	6,1 ± 0,1
120	6,9 ± 0,3	5,3 ± 0,1

Tab. 3: Vergleich der an undifferenzierte THP-1 Zellen gebundenen Menge Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikel nach unterschiedlicher Inkubationsdauer bei 4°C.

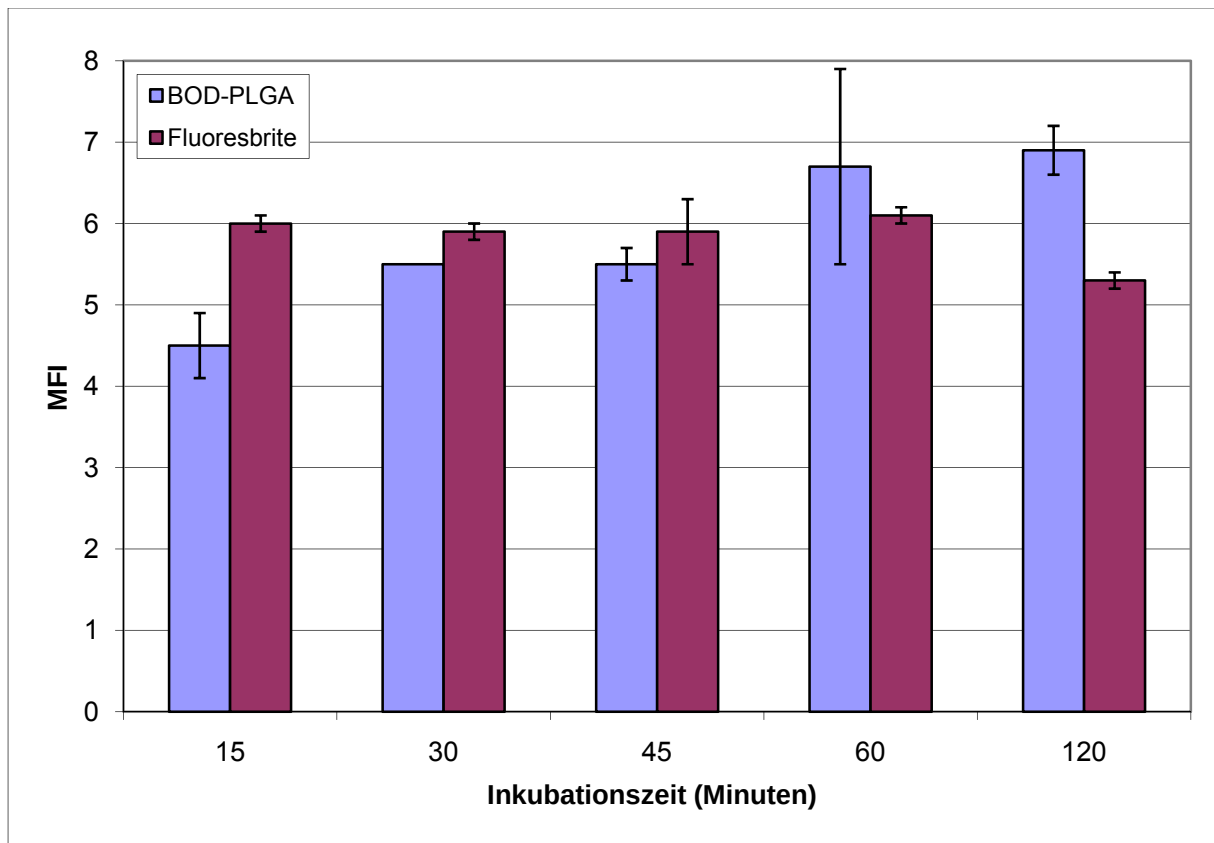


Abb. 3: Mittlere Fluoreszenzintensität undifferenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikeln über einen Zeitraum von 15-120 Minuten bei 4°C.

Da bei einer Inkubation von sowohl differenzierten als auch undifferenzierten THP-1 Zellen mit Bodipy-PLGA-Nanopartikeln und Fluoresbrite-Nanosphären bei 4°C über einen Zeitraum von bis zu 120 Minuten keine signifikante Erhöhung der mittleren zellassoziierten Fluoreszenzintensität im Vergleich zur 15-minütigen Inkubation zu beobachten war, wurde angenommen, dass bereits nach 15 Minuten die maximale Bindungsrate der Nanopartikel an die Zelloberfläche erreicht wurde. Für die folgenden Internalisationsstudien mit Nanopartikeln wurde deshalb für die Pulse-Inkubation, in der die Partikel an die Oberfläche der Zellen binden, ein Zeitraum von 15 Minuten festgelegt.

3.7.2. Interaktion von WGA- und BSA-modifizierten PLGA-Nanopartikeln mit THP-1 Zellen

Es wurden oberflächenmodifizierte PLGA-Nanosphären verwendet, wobei die BSA-modifizierte Nanosphärensuspension 5:1 mit isotonem 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,5% Pluronic® verdünnt wurde, um vergleichbare Partikelkonzentrationen in WGA- und BSA-funktionalisierten Partikelsuspensionen zu erreichen. Hierzu wurde

das Ausmaß der Absorption von Licht einer Wellenlänge von 600 nm durch unterschiedliche Verdünnungsstufen der Partikelsuspensionen bestimmt und nach Erstellung einer Eichgeraden der entsprechende Verdünnungsfaktor errechnet. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da bei den oberflächenmodifizierten Partikeln wegen unterschiedlichen Gehaltes an fluoreszenzmarkiertem WGA und BSA die Fluorimetrie keinen Rückschluss auf die Partikelkonzentration ermöglichte. PMA-behandelte Zellen und undifferenzierte Zellen wurden über einen Zeitraum von 15 bis 45 Minuten bei 4°C mit WGA- und BSA-modifizierten PLGA-Nanopartikeln inkubiert. Die BSA-modifizierten Partikel sollten zur Kontrolle dienen, um den Einfluss unspezifischer Wechselwirkungen abzuschätzen.

Inkubationsdauer (Minuten)	MFI	
	WGA/PLGA	BSA/PLGA
15	8,6 ± 0,4	0,1 ± 0,0
30	9,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1
45	8,9 ± 0,3	0,1 ± 0,0

Tab. 4.: Vergleich der an differenzierte THP-1 Zellen gebundenen Menge an WGA- und BSA-modifizierten PLGA-Nanopartikeln nach unterschiedlicher Inkubationsdauer bei 4°C.

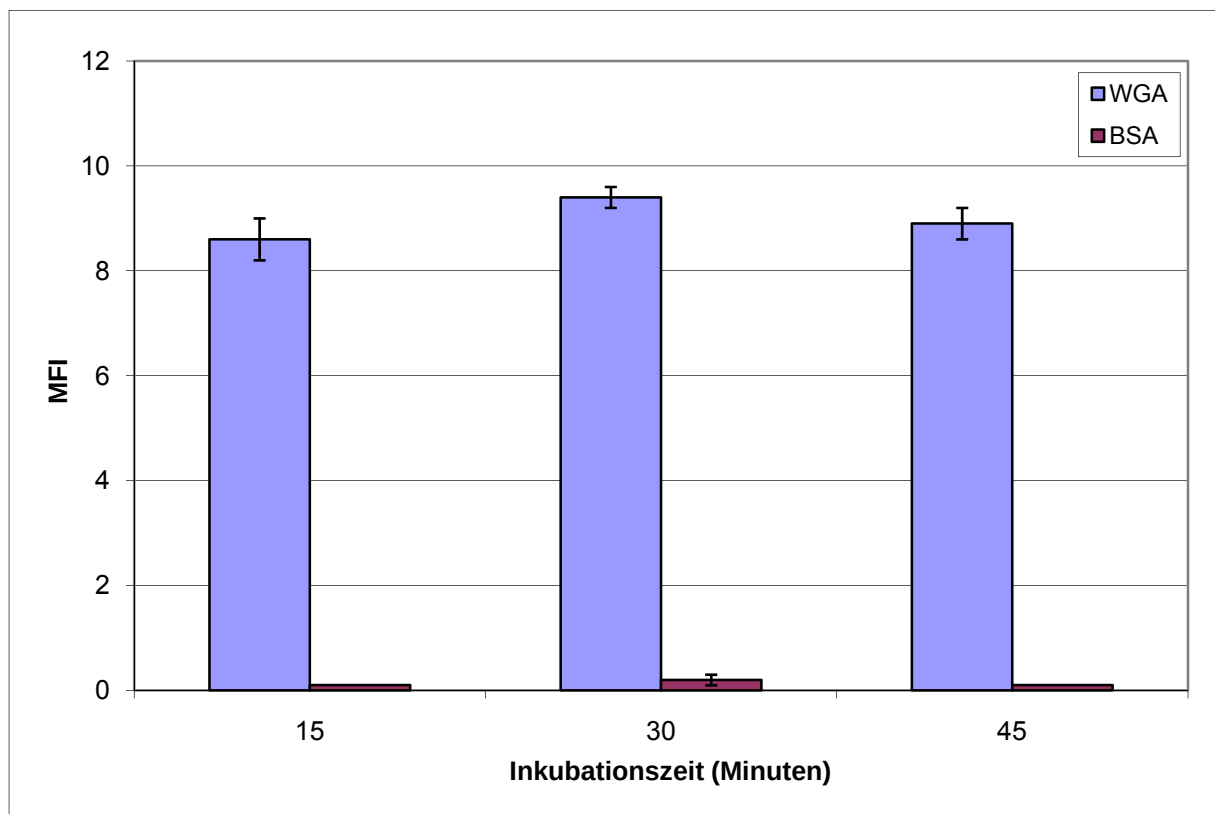


Abb. 4: Mittlere Fluoreszenzintensität differenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit WGA- und BSA-modifizierten PLGA-Nanopartikeln über einen Zeitraum von 15-45 Minuten bei 4°C.

Inkubationsdauer (Minuten)	MFI	
	WGA	BSA
15	$7,7 \pm 0,8$	$0,1 \pm 0,1$
30	$8,5 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,0$
45	$8,4 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,1$

Tab. 5: Vergleich der an undifferenzierte THP-1 Zellen gebundenen Menge an WGA- und BSA-modifizierten PLGA-Nanopartikeln nach unterschiedlicher Inkubationsdauer bei 4°C.

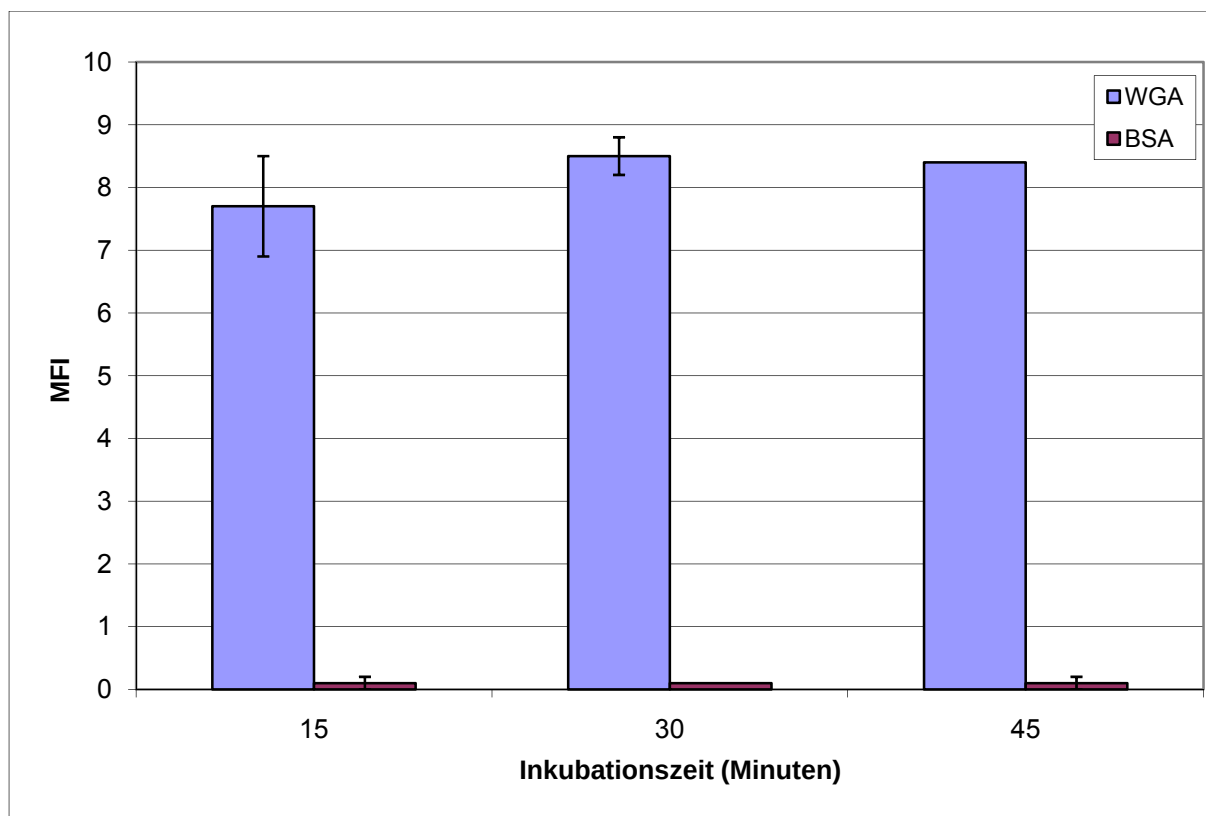


Abb. 5: Mittlere Fluoreszenzintensität undifferenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit WGA- und BSA-modifizierten PLGA-Nanopartikeln über einen Zeitraum von 15-45 Minuten bei 4°C.

Da bei den oberflächenmodifizierten Nanopartikeln nach einer Inkubationszeit über einen Zeitraum von 15 bis 45 Minuten bei 4°C nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten die höchsten MFI-Werte gemessen wurden, dürfte die maximale Bindungsrate der Partikel an die Zelloberfläche nach 30 Minuten erreicht sein. Deshalb wurde bei den folgenden Internalisationsstudien nach Pulse-Chase-Protokoll für die Pulse-Inkubation ein Zeitraum von 30 Minuten gewählt. Darüber hinaus war die Bindungsrate von BSA-modifizierten Partikeln an die Zellen vernachlässigbar, da die MFI-Werte im Bereich der Eigenfluoreszenz der Zellen lagen.

3.8. Internalisierungsstudien und Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Nanopartikeln

3.8.1. Internalisierung von Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikeln durch THP-1 Zellen

In der folgenden Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob oberflächlich gebundene Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikel von THP-1 Zellen, die als Monozyten und besonders als Makrophagen eine hohe Phagozytosefähigkeit erwarten lassen, auch internalisiert werden können. Entsprechend einem Pulse-Chase-Protokoll werden die Nanopartikel zuerst bei 4°C an die Zelloberfläche gebunden (Pulse) und nach Entfernung der ungebunden Partikel werden die Zellen unterschiedlich lange bei 37°C inkubiert (Chase). Die während der Pulse-Inkubation an die Zelloberfläche gebundenen Nanopartikel sollten während der Chase-Phase internalisiert werden, da Zellen nur bei 37°C metabolisch aktiv sind. Zum Vergleich wurden die Versuche auch bei 4°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur wird aufgrund des reduzierten Zellstoffwechsels keine Internalisierung erwartet.

Praktische Durchführung:

Die Versuche wurden mit beiden Zelltypen durchgeführt. Für die Versuche wurden Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikelsuspensionen wieder mit PBS-Ca²⁺-Mg²⁺ soweit verdünnt, dass die fluorimetrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten beider Suspensionen etwa gleich waren.

50 µl Zellsuspension (5x10⁶ Zellen/ml) und 50 µl Nanopartikelsuspension wurden 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Um ungebundene Partikel zu entfernen, wurden 100 µl PBS-Ca²⁺-Mg²⁺ zugesetzt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 Min, 4°C). 150 µl Überstand wurden abgehoben und durch 150 µl PBS-Ca²⁺-Mg²⁺ ersetzt. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurden 150 µl Überstand abgehoben. Danach wurde 0 bis 120 Minuten bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde resuspendiert, mit 1 ml PBS-Ca²⁺-Mg²⁺ verdünnt und durchflusszytometrisch analysiert.

In alle Versuche wurden Negativkontrollen, die statt Nanopartikelsuspension PBS-Ca²⁺-Mg²⁺ enthielten, inkludiert und in den Berechnungen berücksichtigt.

Die Pulse-Chase-Inkubation von THP-1 Zellen mit Bodipy-PLGA-Nanopartikeln ergab folgende Werte:

Chase-Inkubation (Minuten)	MFI	
	4°C	37°C
0	9,05 ± 0,35	9,05 ± 0,35
10	8,35 ± 0,92	4,25 ± 0,21
30	9,25 ± 0,07	2,00 ± 0,28
60	9,35 ± 0,07	1,50 ± 0,21
120	9,50 ± 0,71	1,10 ± 0,14

Tab. 6: Vergleich der MFI-Werte differenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit Bodipy-PLGA Nanopartikeln über einen Zeitraum von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

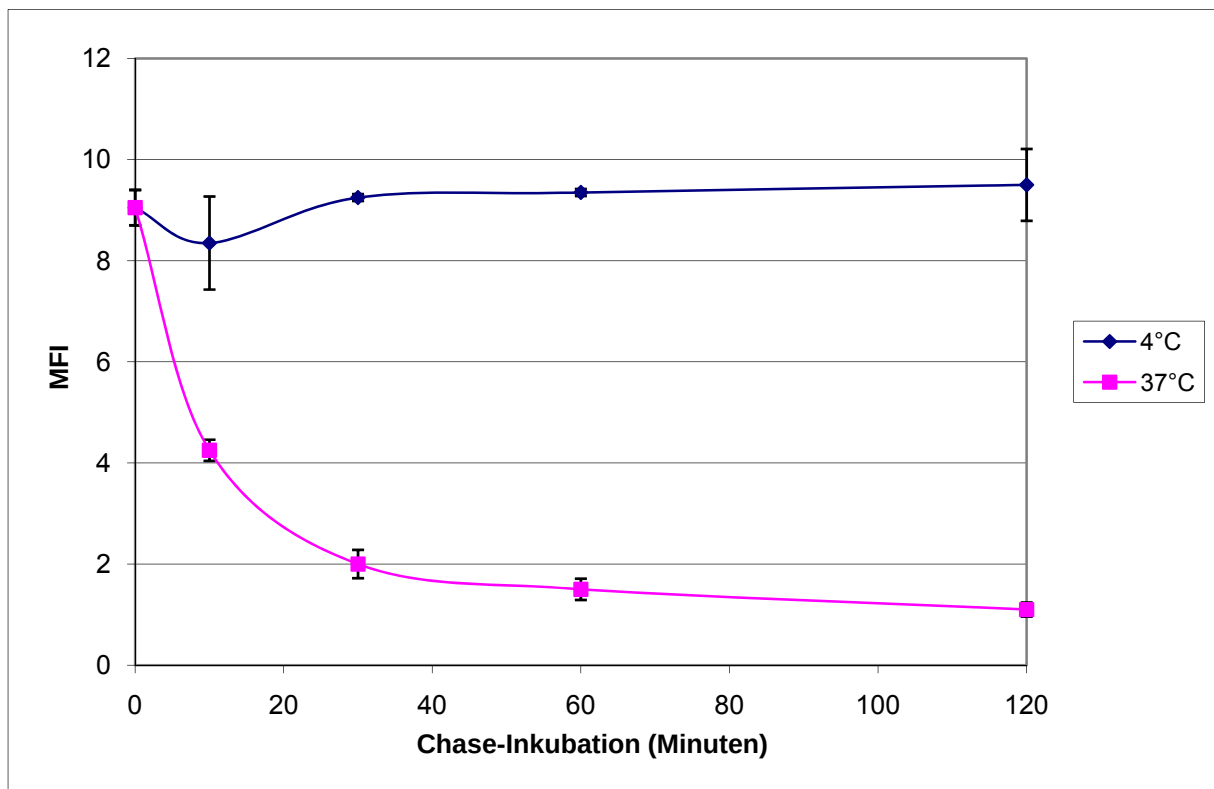


Abb. 6: Mittlere Fluoreszenzintensitäten differenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit Bodipy-PLGA Nanopartikeln über einen Zeitraum von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

Chase-Inkubation (Minuten)	MFI	
	4°C	37°C
0	4,35 ± 0,21	4,35 ± 0,21
10	3,80 ± 0,14	2,95 ± 0,21
30	4,20 ± 0,57	2,10 ± 0,00
60	4,55 ± 0,21	1,50 ± 0,07
120	4,10 ± 0,71	1,00 ± 0,14

Tab. 7: Vergleich der MFI-Werte undifferenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit Bodipy-PLGA Nanopartikeln über einen Zeitraum von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

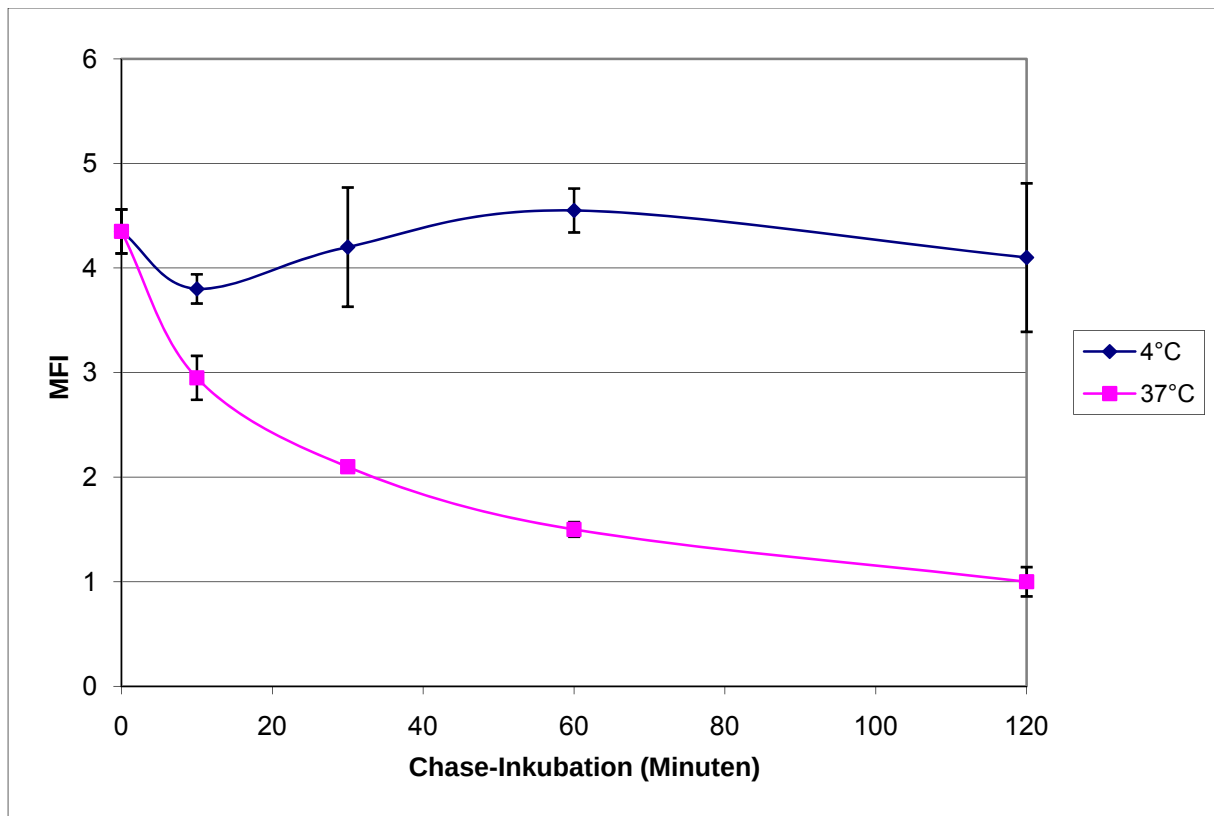


Abb. 7: Mittlere Fluoreszenzintensitäten undifferenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit Bodipy-PLGA Nanopartikeln über einen Zeitraum von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

Die Pulse-Chase-Inkubationen von THP-1 Zellen mit Fluoresbrite-Nanopartikeln ergaben folgende Messwerte:

Chase-Inkubation (Minuten)	MFI	
	4°C	37°C
0	3,95 ± 0,21	3,95 ± 0,21
10	4,35 ± 0,07	4,10 ± 0,28
30	4,10 ± 0,14	3,75 ± 0,21
60	3,90 ± 0,00	3,30 ± 0,07
120	4,20 ± 0,00	3,00 ± 0,07

Tab. 8: Vergleich der MFI-Werte differenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit Fluoresbrite Nanopartikeln über einen Zeitraum von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

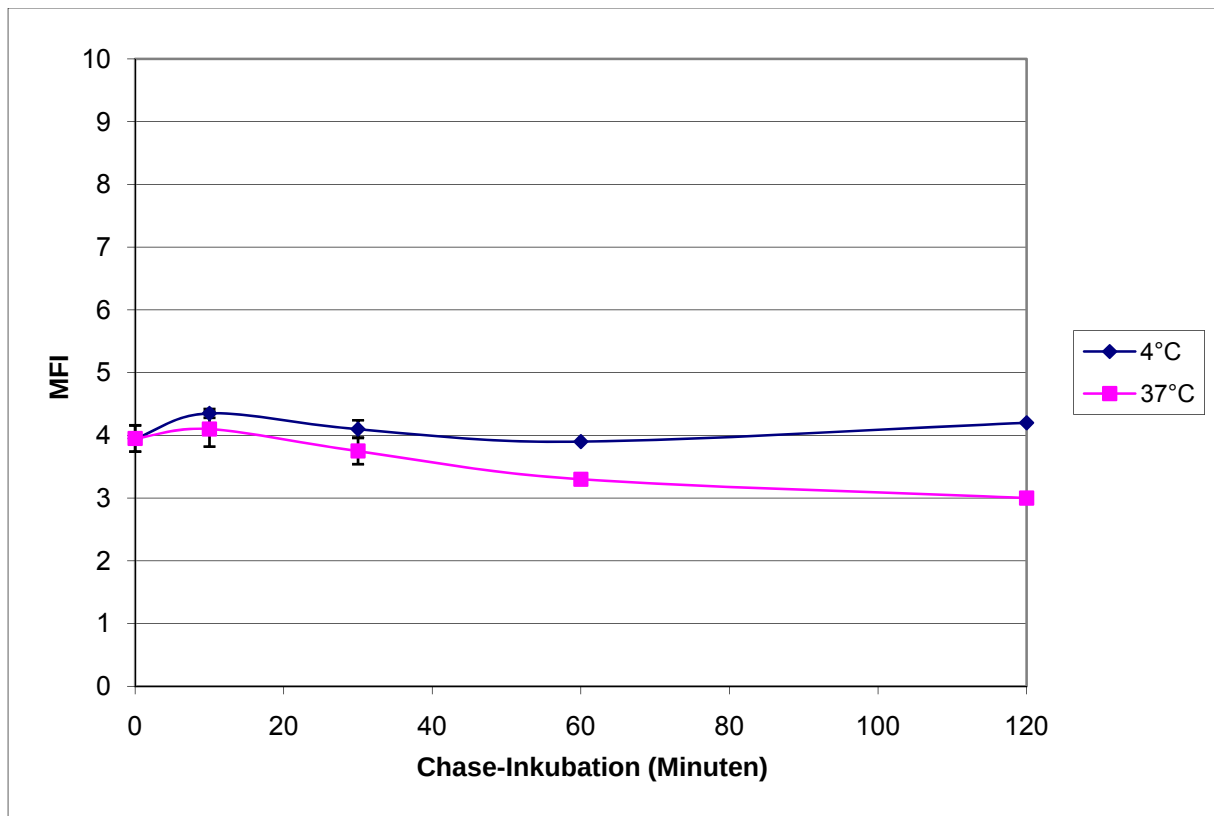


Abb. 8: Mittlere Fluoreszenzintensitäten differenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit Fluoresbrite Nanopartikeln über einen Zeitraum von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

Chase-Inkubation (Minuten)	MFI	
	4°C	37°C
0	5,20 ± 0,00	5,20 ± 0,00
10	5,40 ± 0,42	5,20 ± 0,28
30	4,90 ± 0,14	4,95 ± 0,07
60	5,10 ± 0,28	4,60 ± 0,00
120	5,00 ± 0,07	4,70 ± 0,07

Tab. 9: Vergleich der MFI-Werte undifferenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit Fluoresbrite Nanopartikeln über einen Zeitraum von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

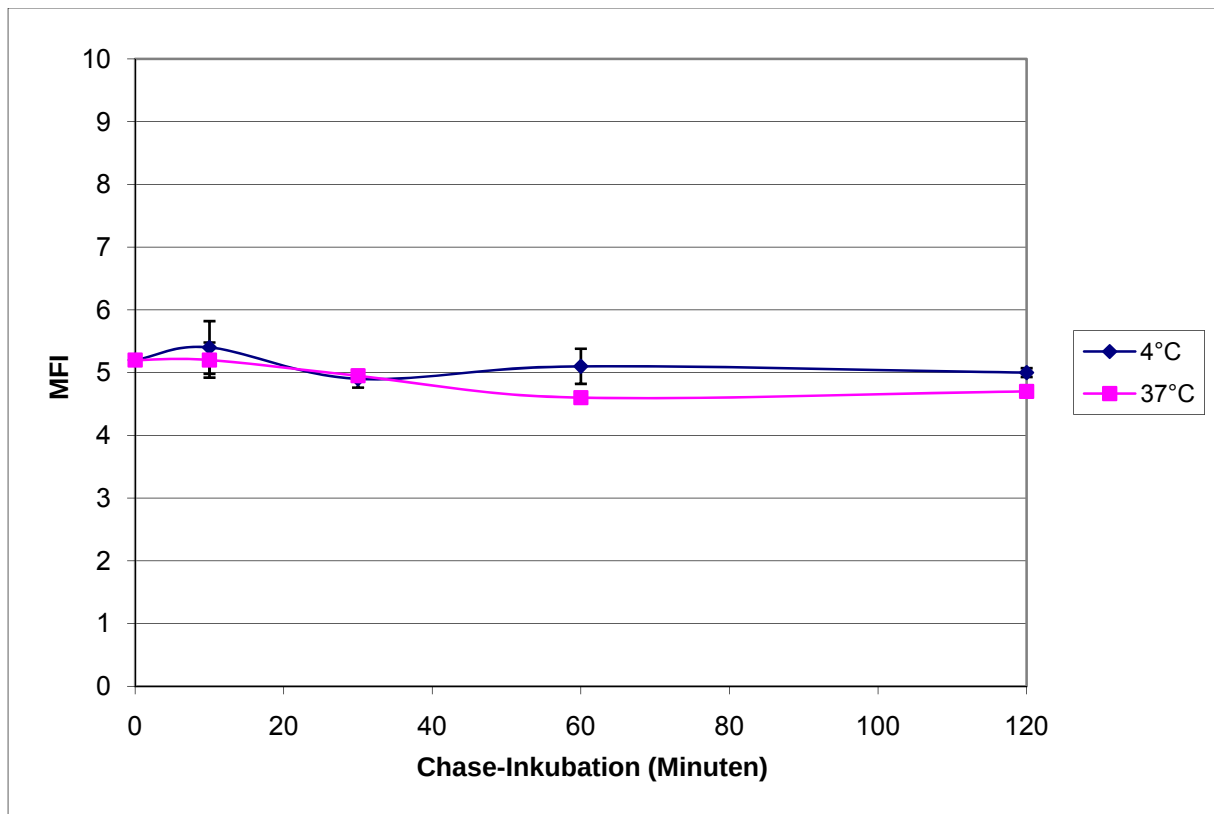


Abb. 9: Mittlere Fluoreszenzintensitäten undifferenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit Fluoresbrite Nanopartikeln über einen Zeitraum von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

Nach der Pulse-Inkubation für 15 Minuten bei 4°C mit Bodipy-PLGA-Partikeln erreichten die PMA-behandelten THP-1 Zellen einen weit höheren MFI-Wert als die unbehandelten Zellen. Während der 120-minütigen Chase-Inkubation bei 37°C war eine zeitabhängige Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenzintensitäten zu beobachten, wobei beide Zelltypen am Ende der Chase-Inkubation annähernd gleiche MFI-Werte aufwiesen.

Im Gegensatz dazu zeigten die mit Fluoresbrite-Nanopartikeln inkubierten Zellen nur unbedeutend unterschiedliche Startwerte. Im Zuge der Chase-Inkubation bei 37°C waren geringfügige Abnahmen der Fluoreszenzintensitäten zu beobachten, die für differenzierte und undifferenzierte Zellen im annähernd gleichen Bereich lagen.

Die MFI-Werte während der Chase-Inkubation bei 4°C blieben bei beiden Zelltypen weitgehend konstant.

Weiters wurden die Überstände, die während eines zusätzlichen Waschschruttes nach Ende der Inkubationszeit bei 37°C bzw. 4°C anfallen, fluorimetrisch analysiert. So sollte überprüft werden, ob im Zuge der Chase-Inkubation eine Dissoziation der oberflächengebundenen Bodipy-PLGA-Nanopartikel von der Zelloberfläche erfolgt.

Praktische Durchführung:

Der Versuch wurde mit beiden Zelltypen durchgeführt. Es wurde ein Pulse-Chase-Protokoll wie oben beschrieben verfolgt. Nach der Inkubation bei 4°C und 37°C wurden der Zellsuspension 100 µl PBS-Ca²⁺-Mg²⁺ hinzugefügt, zentrifugiert und 100 µl Überstand abgehoben. Der Überstand wurde nicht verworfen sondern fluorimetrisch vermessen. Die Zellsuspension wurde durchflusszytometrisch analysiert.

Chase-Inkubation (Minuten)	MFI			
	undifferenzierte THP-1		differenzierte THP-1	
	37°C	4°C	37°C	4°C
0	24,05 ± 0,35	24,05 ± 0,35	32,85 ± 4,31	32,85 ± 4,31
30	9,55 ± 0,78	29,20 ± 2,69	13,65 ± 0,21	37,20 ± 2,12
120	8,00 ± 0,42	29,20 ± 0,28	11,80 ± 0,99	32,50 ± 5,09

Tab. 10: Vergleich der MFI-Werte Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladener undifferenzierter und differenzierter THP-1 Zellen während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

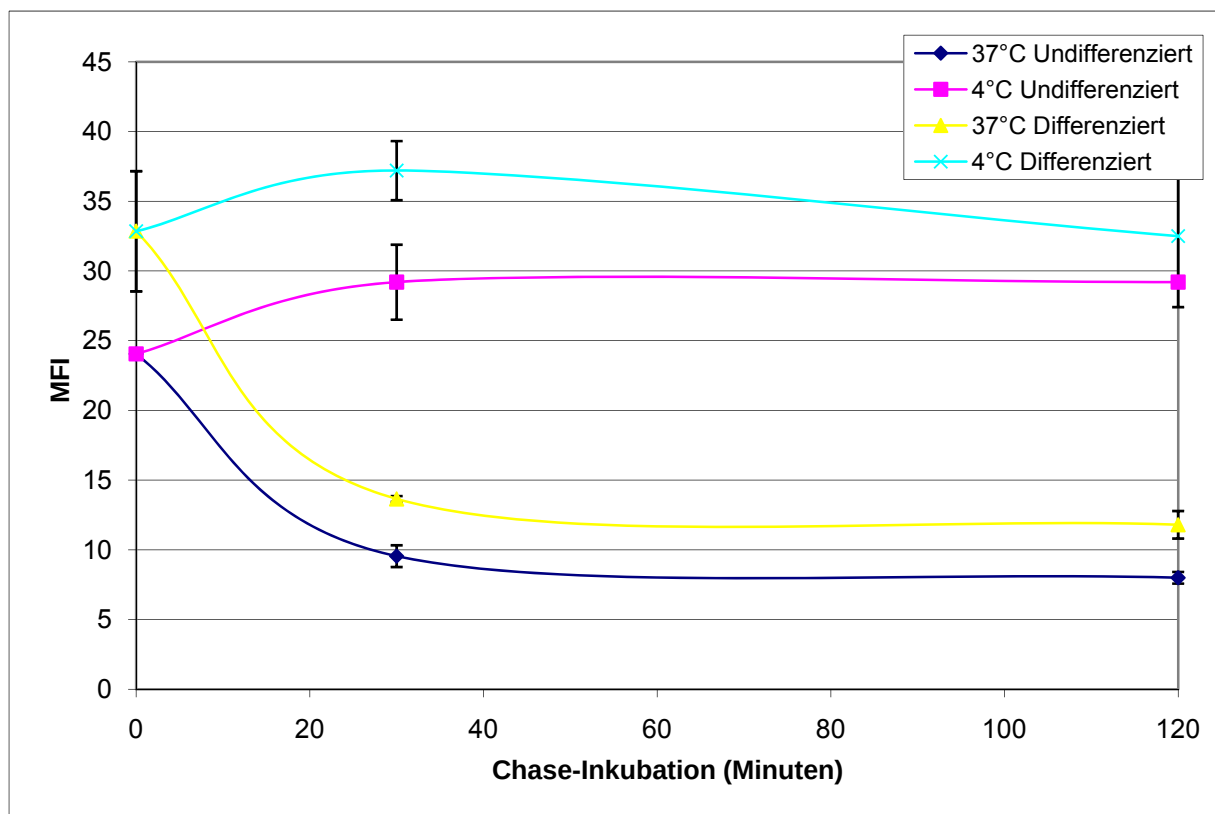


Abb. 10: Mittlere Fluoreszenzintensitäten Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladener undifferenzierter und differenzierter THP-1 Zellen während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

Chase-Inkubation (Minuten)	Fluoreszenzintensität			
	Differenziert		Undifferenziert	
	37°C	4°C	37°C	4°C
0	415	415	449,5	449,5
30	359	361,5	365	364
120	249	314,5	242	351,5

Tab. 11: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Überstände eines zusätzlichen Waschschruttes von Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladenen, undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

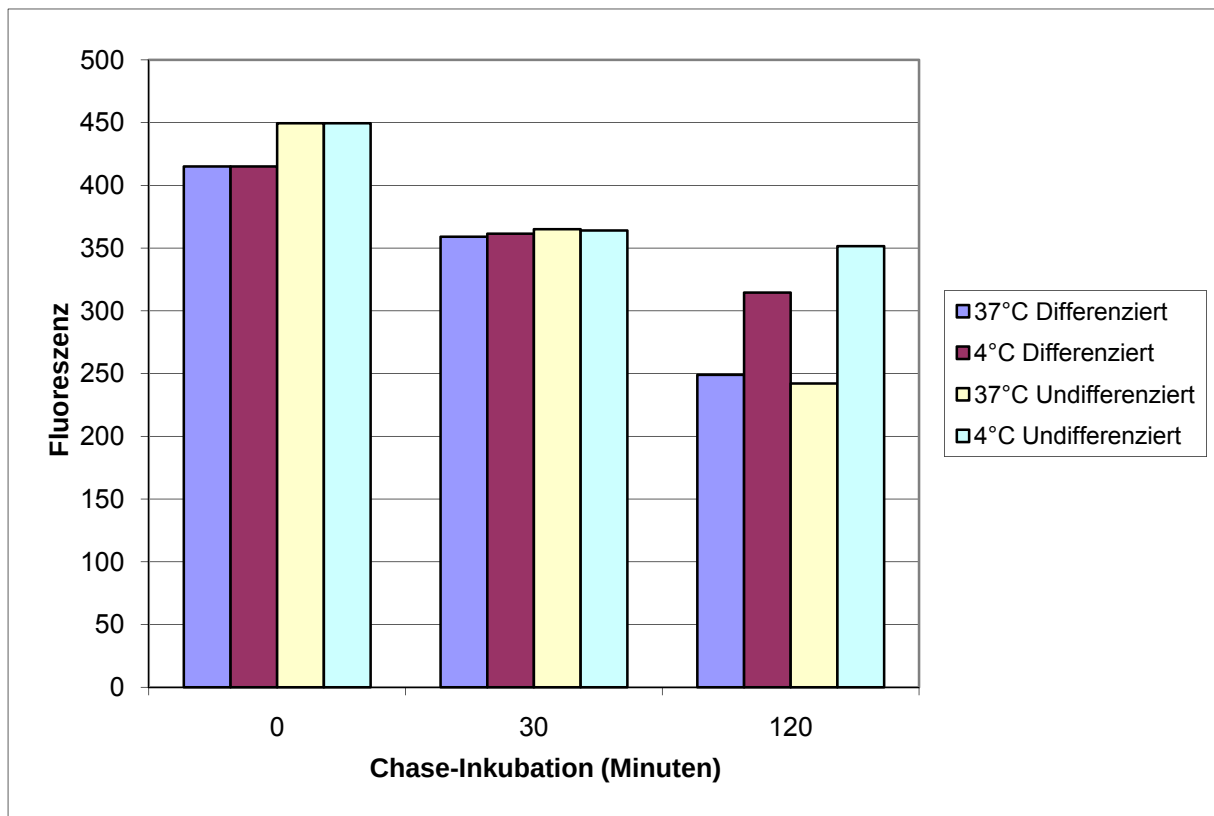


Abb. 11: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Überstände eines zusätzlichen Waschschruttes von Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladenen, undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C.

Während der Chase-Inkubation bei 37°C war wieder eine zeitabhängige Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenzintensität zu beobachten, während die MFI-Werte bei 4°C weitgehend konstant blieben.

Nach der Pulse-Inkubation bei 4°C wiesen die Überstände der undifferenzierten THP-1 Zellen etwas höhere Fluoreszenzwerte auf. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 37°C und 4°C fluoreszierten die Überstände beider Zelltypen bei beiden Temperaturstufen in einem annähernd gleichen Ausmaß. Am Ende der Chase-Inkubation waren die Fluoreszenzintensitäten der Überstände der bei 37°C

120 Minuten inkubierten Zellen sowohl bei PMA-behandelten als auch bei unbehandelten Zellen deutlich geringer als nach der Inkubation bei 4°C.

3.8.2. Internalisierung von oberflächenmodifizierten Nanopartikeln durch THP-1 Zellen und Untersuchung der intrazellulären Lokalisation mittels Monensin

Die oben erwähnte zeitabhängige Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenzintensität nur bei 37°C deutet auf Quench-Effekte des säureempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein, mit dem WGA und BSA markiert sind, hin. Die mögliche intrazelluläre Lokalisation der in saure Kompartimente der Zelle aufgenommenen Nanopartikel sollte in der folgenden Versuchsreihe mit Monensin untersucht werden. Monensin, ein Natrium-Ionophor, ist in der Lage, den intrazellulären pH-Gradienten zu äquilibrieren. Folglich sollte die Zugabe von Monensin die ursprüngliche Abnahme der MFI-Werte während der Chase-Inkubation bei 37°C kompensieren [18].

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Funktionalisierung von PLGA-Nanopartikeln mit WGA aufgrund der cytoadhäsiven und –invasiven Eigenschaften des Lektins die Bindung und Aufnahme der Nanopartikel erleichtern kann.

Praktische Durchführung:

Die Versuche wurden mit beiden Zelltypen unter Einsatz vergleichbarer Konzentrationen an WGA-PLGA- und BSA-PLGA-Partikeln entsprechend dem oben beschriebenen Pulse-Chase-Protokoll durchgeführt.

50 µl einer Zellsuspension (5×10^6 Zellen/ml) und 50 µl Nanopartikelsuspension wurden 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Um ungebundene Partikel zu entfernen, wurden 100 µl PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} zugesetzt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 Min, 4°C). 150 µl Überstand wurden abgehoben und durch 150 µl PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} ersetzt. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurden 150 µl Überstand abgehoben und unterschiedlich lange (0 bis 120 Minuten) bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde resuspendiert, mit 1 ml PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} verdünnt und durchflusszytometrisch analysiert. Danach wurden 40 µl Monensin-Lösung zugesetzt, drei Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und erneut durchflusszytometrisch erfasst.

In alle Versuche wurden Negativkontrollen inkludiert, die statt Nanopartikelsuspension PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} enthielten, und bei den Berechnungen berücksichtigt.

Es wurden folgende Messwerte ermittelt:

Chase-Inkubation (Minuten)	MFI			
	WGA-PLGA-Nanopartikel			
	37°C		4°C	
	vor Monensinzugabe	nach Monensinzugabe	vor Monensinzugabe	nach Monensinzugabe
0	9,10 ± 0,42	9,25 ± 0,21	9,10 ± 0,42	9,25 ± 0,21
30	6,60 ± 0,14	8,70 ± 0,28	8,80 ± 0,00	8,90 ± 0,14
60	6,40 ± 0,21	9,10 ± 0,21	8,40 ± 0,28	8,50 ± 0,28
120	6,00 ± 0,14	9,10 ± 0,42	8,90 ± 0,70	8,60 ± 0,07
	BSA-PLGA-Nanopartikel			
	37°C		4°C	
	vor Monensinzugabe	nach Monensinzugabe	vor Monensinzugabe	nach Monensinzugabe
	vor Monensinzugabe	nach Monensinzugabe	vor Monensinzugabe	nach Monensinzugabe
0	0,05 ± 0,07	0,10 ± 0,00	0,05 ± 0,07	0,10 ± 0,00
120	0,01 ± 0,00	0,50 ± 0,07	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00

Tab. 12: Änderung der Fluoreszenzintensität undifferenzierter THP-1 Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit WGA-PLGA- und BSA-PLGA-Nanopartikeln bei 37°C und 4°C, vor und nach Monensinzugabe.

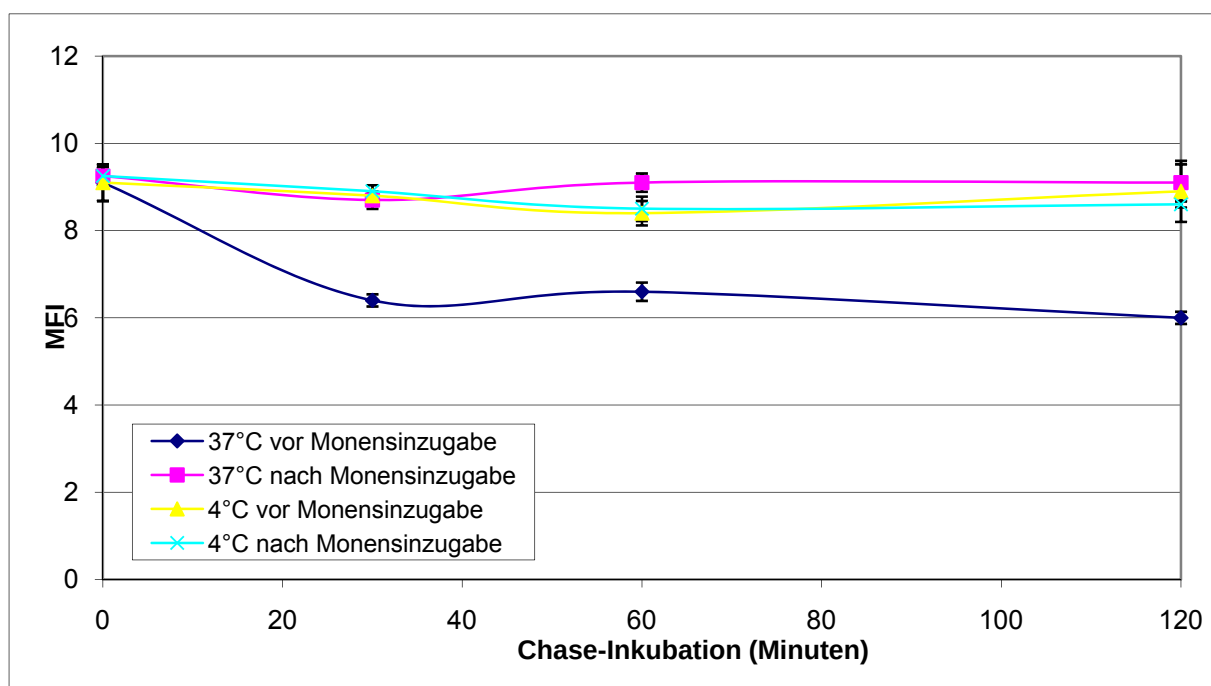


Abb. 12: Zellassoziierte Fluoreszenzintensitäten WGA-PLGA-Nanopartikel beladener undifferenzierter THP-1 Zellen, vor und nach Monensinzugabe, während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 37°C und 4°C.

Chase-Inkubation (Minuten)	MFI			
	WGA-PLGA-Nanopartikel			
	37°C		4°C	
	vor Monensin- zugabe	nach Monensin- zugabe	vor Monensin- zugabe	nach Monensin- zugabe
0	5,70 ± 0,42	5,50 ± 0,28	5,70 ± 0,42	5,50 ± 0,28
30	4,25 ± 0,07	6,00 ± 0,14	6,00 ± 0,21	5,80 ± 0,21
60	3,50 ± 0,21	5,80 ± 0,57	5,80 ± 0,21	5,60 ± 0,07
120	3,20 ± 0,21	5,90 ± 0,21	6,20 ± 0,35	5,70 ± 0,28
	BSA-PLGA-Nanopartikel			
	37°C		4°C	
	vor Monensin- zugabe	nach Monensin- zugabe	vor Monensin- zugabe	nach Monensin- zugabe
0	0,20 ± 0,00	0,25 ± 0,07	0,20 ± 0,00	0,25 ± 0,07
120	0,80 ± 0,07	3,3 ± 0,35	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,00

Tab. 13: Änderung der Fluoreszenzintensität differenzierter THP-1 Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit WGA-PLGA- und BSA-PLGA-Nanopartikeln bei 37°C und 4°C, vor und nach Monensinzugabe.

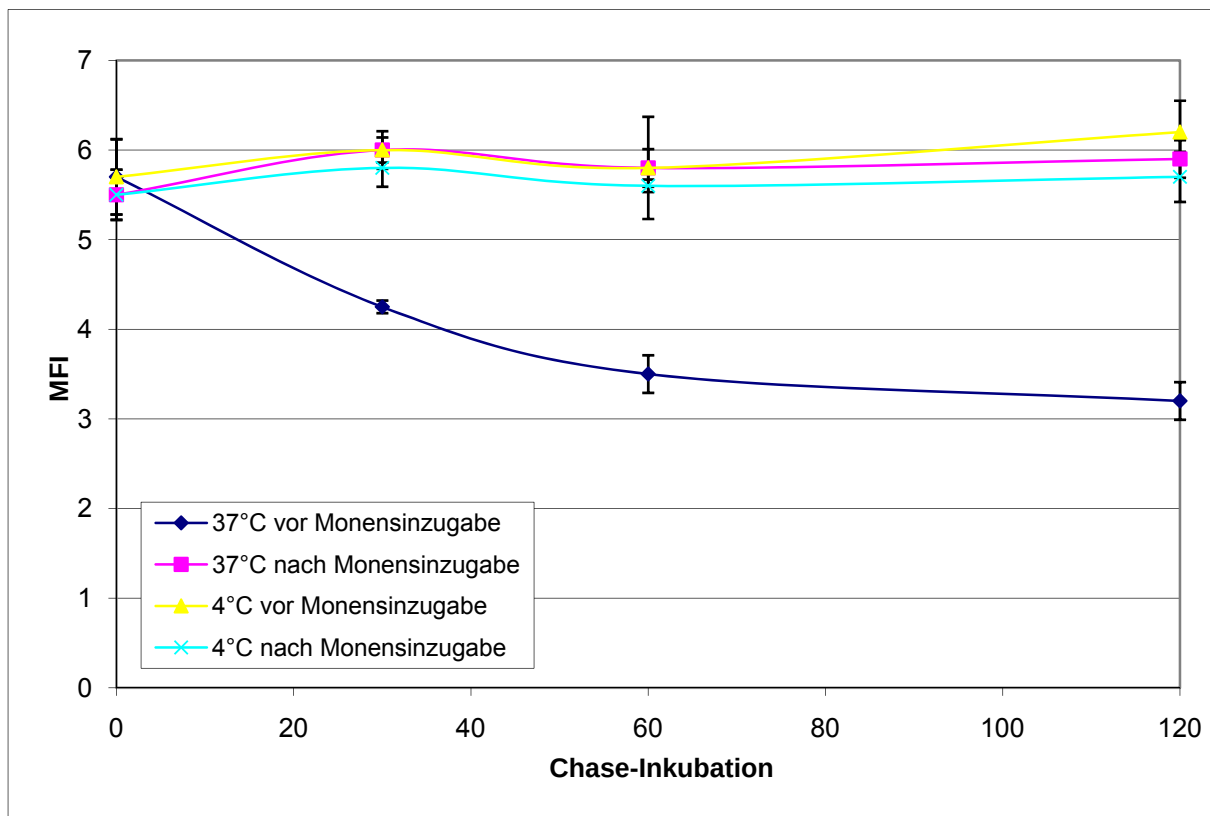


Abb. 13: Zellassoziierte Fluoreszenzintensitäten WGA-PLGA-Nanopartikel beladener differenzierter THP-1 Zellen, vor und nach Monensinzugabe, während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 37°C und 4°C.

Nach der halbstündigen Pulse-Inkubation bei 4°C mit WGA-PLGA-Nanopartikeln wiesen die unbehandelten Zellen weit höhere MFI-Werte auf als die mit PMA behandelten THP-1 Zellen. Während der 120 Minuten andauernden Chase-Inkubation bei 37°C nahm sowohl bei differenzierten als auch bei undifferenzierten Zellen die zellassozierte Fluoreszenzintensität mit steigender Inkubationsdauer ab, wobei die relative Abnahme der Fluoreszenzintensität bei beiden Zelltypen annähernd gleich war. Im Zuge der Chase-Inkubation bei 4°C blieben die Fluoreszenzwerte der Vergleichsgruppen wie erwartet weitgehend konstant.

Nach Zusatz von Monensin stiegen die reduzierten MFI-Werte der PMA-behandelten und unbehandelten Zellen wieder an und erreichten die Messwerte der Vergleichsgruppen bei 4°C. Bei den Vergleichsgruppen bei 4°C konnten hingegen keine nennenswerten Unterschiede in den MFI-Werten vor und nach Monensinzugabe beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den WGA-funktionalisierten Nanosphären war die Bindung BSA-modifizierter Partikel an die Zelloberfläche vernachlässigbar. Die MFI-Werte lagen nach der Pulse-Inkubation bei beiden Zelltypen im Bereich der Eigenfluoreszenz der Zellen oder nur geringfügig höher.

3.9. Einfluss von Neuraminidase auf die Interaktion und Internalisation von Lektinen und Nanopartikeln

3.9.1. Einfluss von Neuraminidase auf die Interaktion von THP-1 Zellen mit Lektinen

In der folgenden Bindungsstudie mit fluoreszenzmarkierten pflanzlichen Lektinen sollten Änderungen im Lektinbindungsmuster von undifferenzierten und PMA-behandelten Zellen untersucht werden, nachdem die Sialinsäure an der Zelloberfläche durch Vorbehandlung mit Neuraminidase entfernt wurde. Verwendet wurden WGA, das spezifisch an N-Acetyl-D-glukosamin- und Sialinsäurestrukturen bindet, PNA, ein für D-Galaktosamine spezifisches Lektin, und SNA, welches spezifisch α 2,6-verknüpfte Sialylgruppen erkennt.

Praktische Durchführung:

Die Versuchsreihe wurde sowohl mit differenzierten als auch mit PMA-unbehandelten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in einer Neuraminidaselösung von 0,2 bzw. 0,1 U/ml in FCS-freiem Medium resuspendiert. Die Zellen der Kontrollgruppe wurden mit FCS-freiem Medium auf die gleiche Zellzahl eingestellt. Beide Zellsuspensionen wurden 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (1000 rpm, 5 Min, 4°C) und die Zellen in PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} (5×10^6 Zellen/ml) resuspendiert.

50 µl Zellsuspension wurden mit 50 µl Lektinlösung (100 pmol/50 µl) 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Um den ungebundenen Lektinanteil zu entfernen, wurden danach 100 µl PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} zugesetzt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 Min, 4°C). 150 µl Überstand wurden abgehoben und durch 150 µl PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} ersetzt. Nach nochmaligem Zentrifugieren werden 150 µl Überstand verworfen. Die verbleibenden 50 µl Zellsuspension wurden resuspendiert, mit 1 ml PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} verdünnt und durchflusszytometrisch analysiert.

In alle Versuche wurden Negativkontrollen einbezogen, die statt Lektinlösung PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} enthielten, und in den Berechnungen berücksichtigt.

Folgende MFI-Werte wurden gemessen:

	MFI	
	FCS-freies Medium	Neuraminidaselösung 0,2 U/ml
WGA	136,20 ± 1,86	115,43 ± 3,27
PNA	0,70 ± 0,10	92,30 ± 2,17
SNA	101,73 ± 2,51	51,73 ± 2,41

Tab. 14: Vergleich der an undifferenzierte THP-1 Zellen gebundenen Lektinmengen nach 5 Minuten Inkubationszeit bei 4°C, mit oder ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,2 U/ml, 90 Minuten, 37°C).

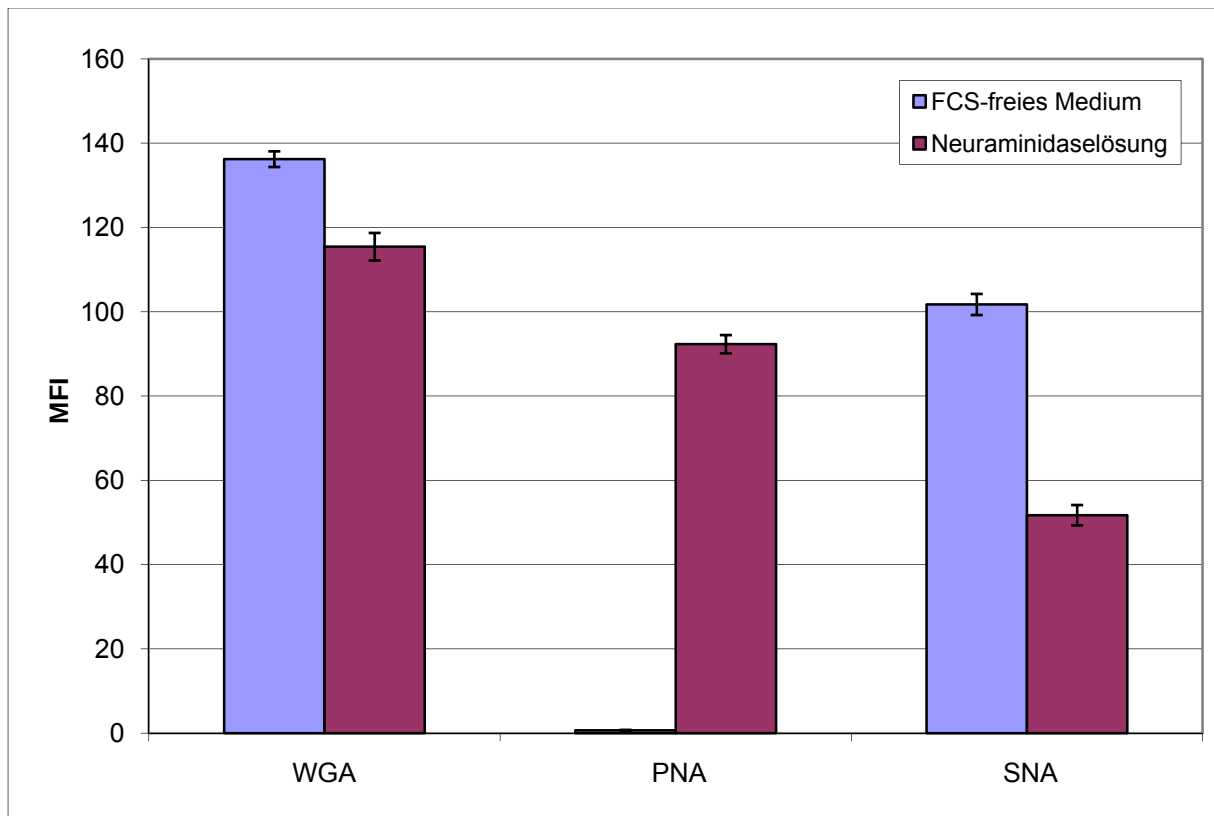


Abb. 14: Mittlere Fluoreszenzintensität undifferenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit WGA, PNA und SNA für 5 Minuten bei 4°C mit oder ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,2 U/ml, 90 Minuten, 37°C).

	MFI	
	FCS-freies Medium	Neuraminidaselösung (0,1 U/ml)
WGA	137,20 ± 2,51	111,63 ± 1,19
PNA	1,70 ± 0,26	100,90 ± 2,36
SNA	116,63 ± 3,53	76,33 ± 2,62

Tab. 15: Vergleich der an undifferenzierte THP-1 Zellen gebundenen Lektinmengen nach 5 Minuten Inkubationszeit bei 4°C, mit oder ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,1 U/ml, 90 Minuten, 37°C).

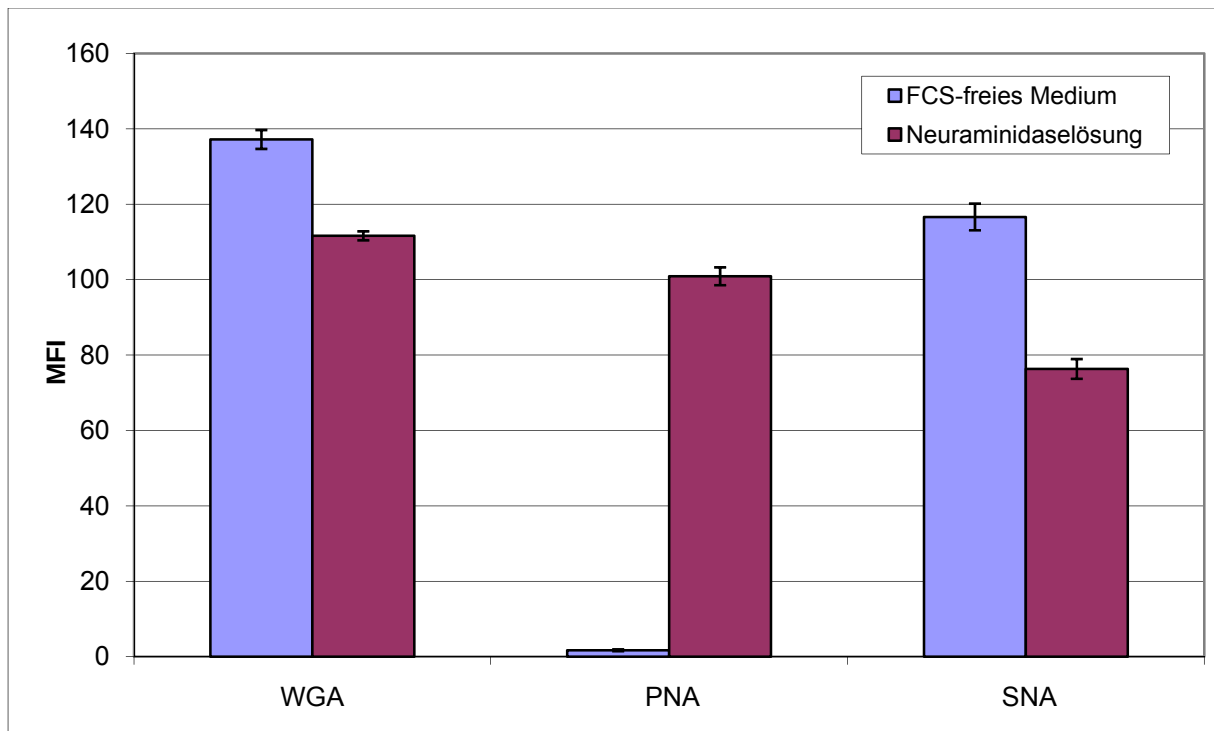


Abb. 15: Mittlere Fluoreszenzintensität undifferenzierter THP-1 Zellen nach Inkubation mit WGA, PNA und SNA für 5 Minuten bei 4°C mit oder ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,1 U/ml, 90 Minuten, 37°C).

	MFI	
	FCS-freies Medium	Neuraminidaselösung (0,2 U/ml)
WGA	148,63 ± 2,39	113,40 ± 0,66
PNA	14,90 ± 4,53	78,27 ± 3,61
SNA	165,63 ± 4,62	72,60 ± 0,26

Tab. 16: Vergleich der an differenzierte THP-1 Zellen gebundenen Lektinmengen nach 5 Minuten Inkubation bei 4°C, mit oder ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,2 U/ml, 90 Minuten, 37°C).

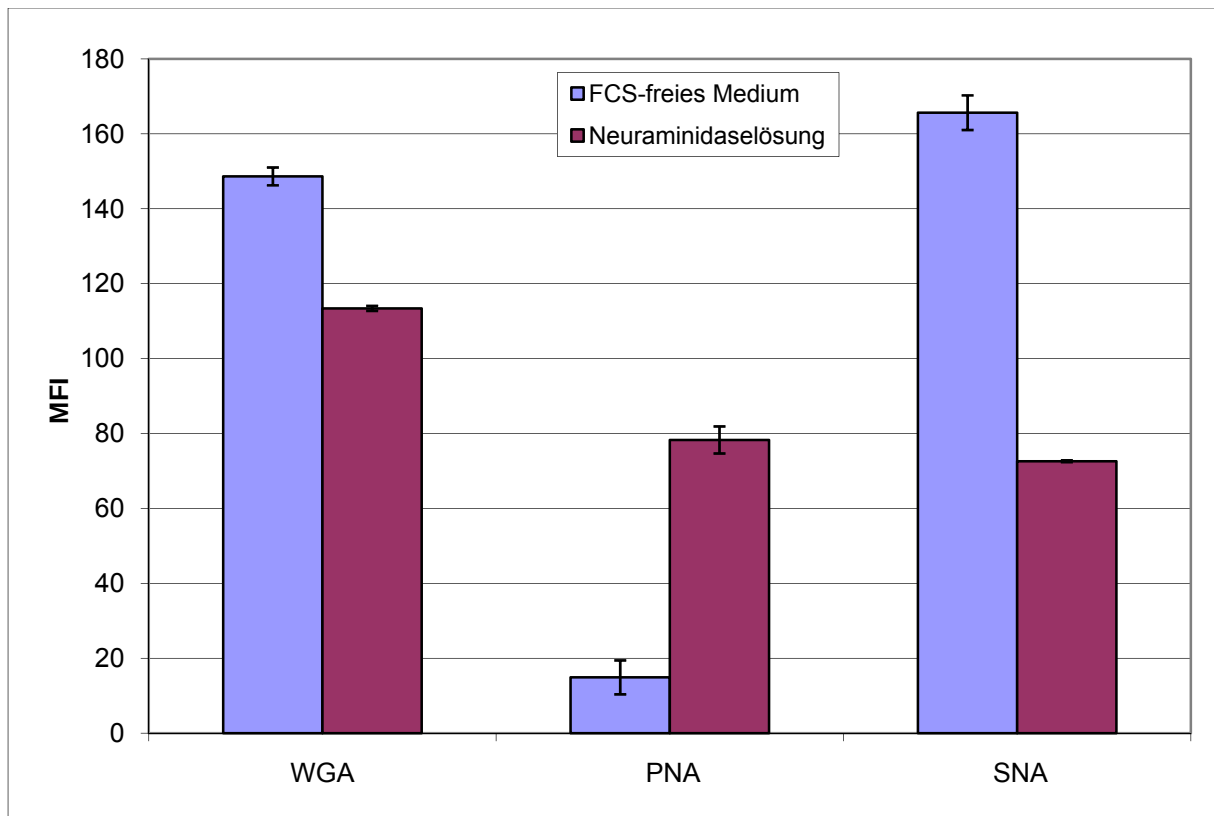


Abb. 16 Mittlere Fluoreszenzintensität differenzierter THP-1 Zellen nach 5 Minuten Inkubation mit WGA, PNA und SNA bei 4°C mit oder ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,2 U/ml, 90 Minuten, 37°C).

Die Ergebnisse zeigen, dass undifferenzierte THP-1 Zellen sowohl mit als auch ohne Neuraminidasevorbehandlung die höchste Bindungskapazität für WGA an der Zelloberfläche aufweisen. Die Neuraminidasevorbehandlung bewirkte geringfügig niedrigere MFI-Werte, wobei die Konzentration der Neuraminidaselösung keine Rolle spielte. Die MFI-Werte für PNA lagen bei PMA-unbehandelten Zellen nur knapp über der Eigenfluoreszenz der Zellen und stiegen durch Vorbehandlung mit Neuraminidase um ein Vielfaches an, wobei zusätzlich eine erhöhte Neuraminidasekonzentration in einer erhöhten Lektinbindung resultierte. Im Gegensatz dazu konnte die hohe Bindung von SNA an undifferenzierte Zellen durch Neuraminidasevorbehandlung in einem signifikanten Ausmaß reduziert werden; eine höhere Neuraminidasekonzentration übte keinen nennenswerten Einfluss aus.

Differenzierte Zellen hingegen wiesen für SNA vor der Behandlung mit Neuraminidase die höchste Bindungskapazität auf. Die relative Abnahme der Bindungskapazitäten für WGA und SNA durch eine Neuraminidasevorbehandlung lagen größenordnungsmäßig im Bereich der undifferenzierten Zellen. Die Fähigkeit, PNA vor der Neuraminidasebehandlung an die Zelloberfläche zu binden, war bei

PMA-behandelten Zellen ausgeprägter als bei undifferenzierten Zellen, stieg aber durch eine Neuraminidasebehandlung nicht in gleichem Ausmaß an wie bei PMA-unbehandelten Zellen.

3.9.2. Einfluss von Neuraminidase auf die Internalisation von Bodipy-PLGA-Nanopartikeln durch THP-1 Zellen

In der Literatur gibt es Hinweise, dass eine Vorbehandlung mit Neuraminidase, welche für den Abbau von Glycokonjugaten an der Zelloberfläche verantwortlich ist, die Phagozytosefähigkeit von Zellen steigert [7].

Anhand der folgenden Pulse-Chase-Inkubationen sollten die Auswirkungen der Neuraminidasebehandlung auf die Internalisation von Bodipy-PLGA-Nanopartikeln in THP-1 Zellen untersucht werden.

Praktische Durchführung:

Die Versuchsreihe wurde sowohl mit differenzierten als auch mit PMA-unbehandelten Zellen durchgeführt. Die Bodipy-PLGA-Nanopartikelsuspension wurde mit PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} soweit verdünnt, dass die Fluoreszenzintensität der Suspension bei einer Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge von 485 bzw. 525 nm und einem Verstärkungsfaktor 85 bei etwa 20 000 lag. Differenzierte Zellen wurden nach Bestimmung der Zellzahl 10 Minuten bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in einer Neuraminidaselösung von 0,2 bzw. 0,1 U/ml in FCS-freiem Medium resuspendiert. Die Zellen der Kontrollgruppe wurden mit FCS-freiem Medium auf dieselbe Zelldichte eingestellt. Differenzierte Zellen wurden 30 Minuten, undifferenzierte Zellen 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (1000 rpm, 5 Min, 4°C) und in PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} (5×10^6 Zellen/ml) resuspendiert.

50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl Nanopartikelsuspension 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Um ungebundene Partikel zu entfernen, wurden 100 µl PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} zugesetzt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 Min, 4°C). 150 µl Überstand wurden abgehoben und durch 150 µl PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} ersetzt. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurden 150 µl Überstand abgehoben und verworfen. Danach wurde unterschiedlich lange (0 bis 120 Minuten) bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde resuspendiert, mit 1 ml PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} verdünnt und durchflusszytometrisch analysiert. In alle Versuche wurden Negativkontrollen

eingeschlossen, die statt Nanopartikelsuspension PBS- Ca^{2+} - Mg^{2+} enthielten, und in die Berechnungen miteinbezogen.

Die Pulse-Chase-Inkubationen von Neuraminidase-vorbehandelten THP-1 Zellen mit Bodipy-PLGA-Nanopartikeln ergaben folgende Fluoreszenzintensitäten:

Chase-Inkubation (Minuten)	MFI			
	FCS-freies Medium		Neuraminidaselösung	
	37°C	4°C	37°C	4°C
0	26,40 ± 1,56	26,40 ± 1,56	27,30 ± 0,99	27,30 ± 0,99
30	8,15 ± 0,35	24,40 ± 1,56	8,85 ± 0,21	27,50 ± 0,57
120	3,80 ± 0,28	27,45 ± 2,90	4,20 ± 0,42	31,35 ± 0,07

Tab. 17: Vergleich der MFI-Werte Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladener, undifferenzierter THP-1 Zellen während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C, mit und ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,2 U/ml).

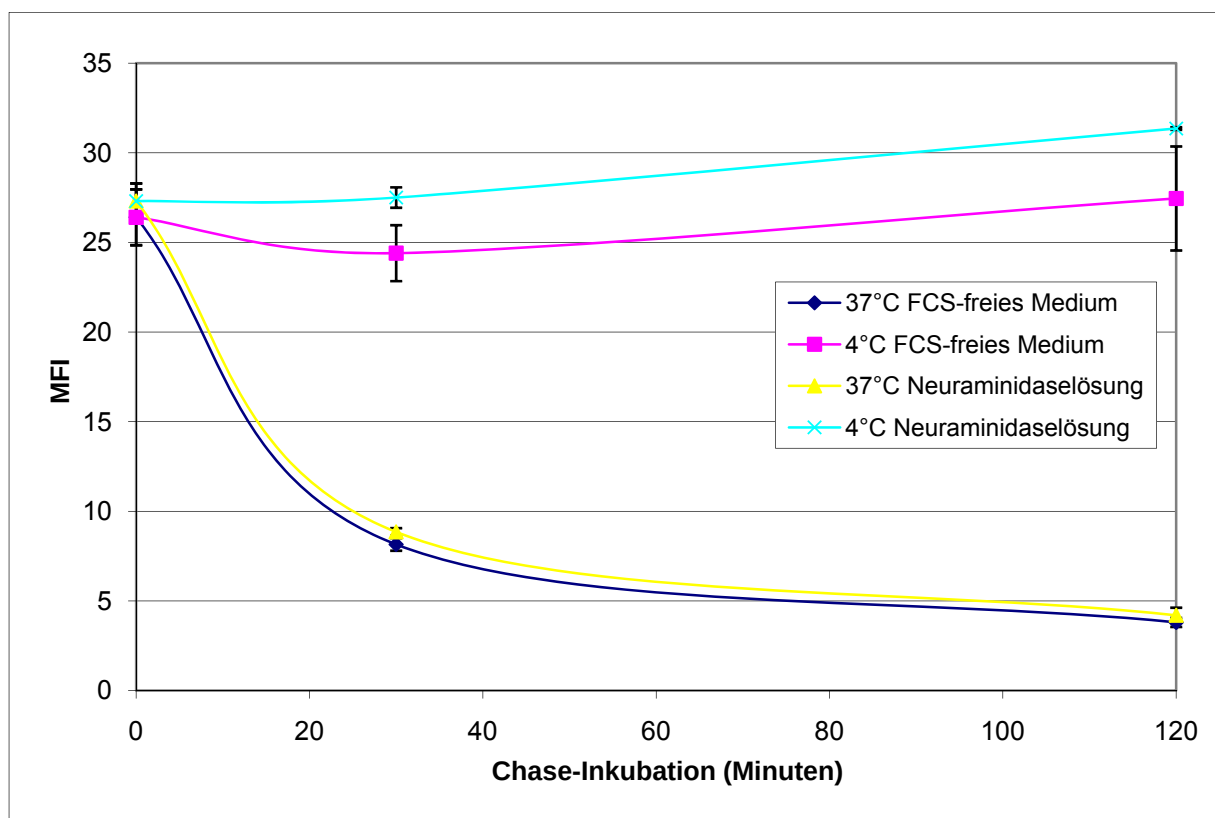


Abb. 17: Mittlere Fluoreszenzintensitäten Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladener, undifferenzierter THP-1 Zellen während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C, mit und ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,2 U/ml).

Chase-Inkubation (Minuten)	MFI			
	FCS-freies Medium		Neuraminidaselösung	
	37°C	4°C	37°C	4°C
0	41,45 ± 0,21	41,45 ± 0,21	48,40 ± 5,23	48,40 ± 5,23
30	30,75 ± 1,63	39,15 ± 0,78	47,75 ± 1,20	51,75 ± 9,55
120	12,95 ± 2,05	41,60 ± 0,57	24,90 ± 8,63	48,30 ± 5,52

Tab. 18: Vergleich der MFI-Werte Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladener, differenzierter THP-1 Zellen während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C, mit und ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,1 U/ml).

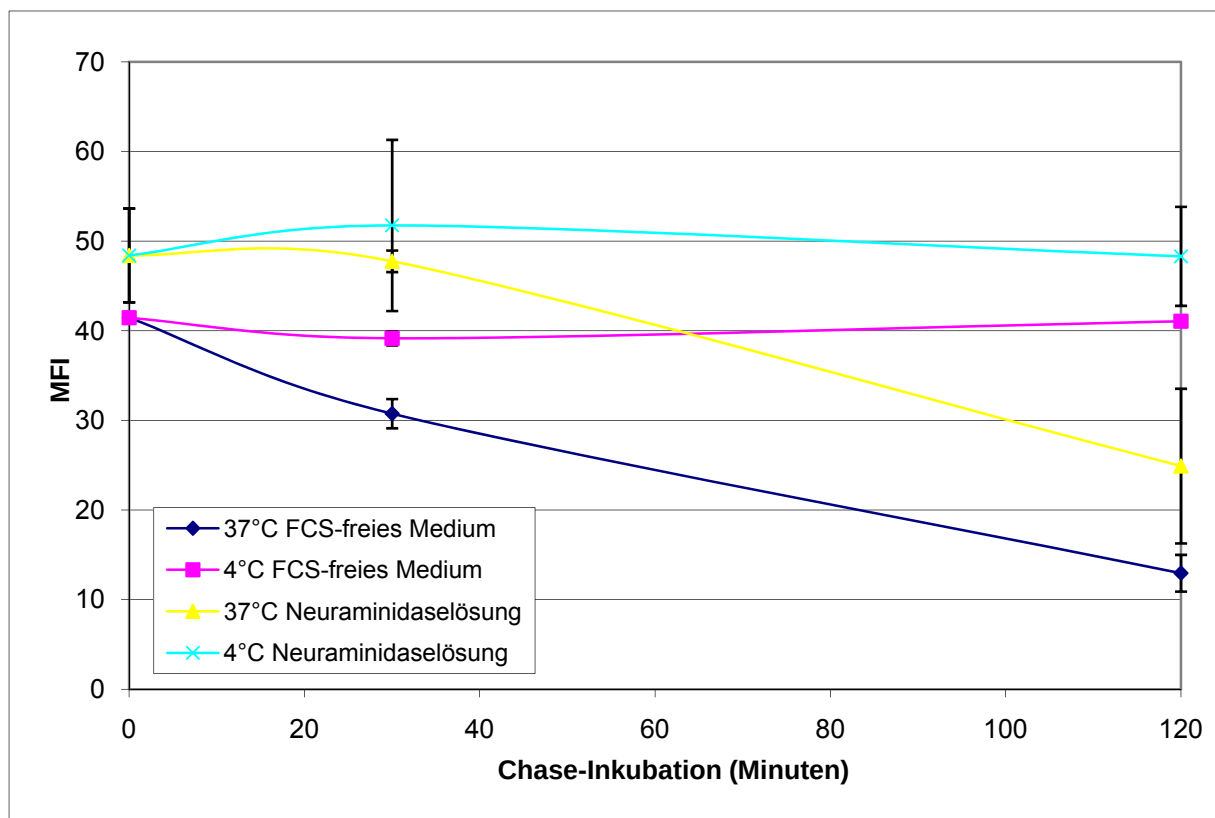


Abb. 18: Mittlere Fluoreszenzintensitäten Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladener, differenzierter THP-1 Zellen während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C, mit und ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,1 U/ml).

Chase-Inkubation (Minuten)	MFI			
	FCS-freies Medium		Neuraminidaselösung	
	37°C	4°C	37°C	4°C
0	17,75 ± 0,21	17,75 ± 0,21	15,05 ± 0,21	15,05 ± 0,21
30	7,00 ± 1,84	16,90 ± 0,14	6,95 ± 1,91	16,60 ± 1,27
120	6,15 ± 0,64	17,40 ± 1,13	7,80 ± 1,27	16,55 ± 3,04

Tab. 19: Vergleich der MFI-Werte Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladener, differenzierter THP-1 Zellen während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C, mit und ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,2 U/ml).

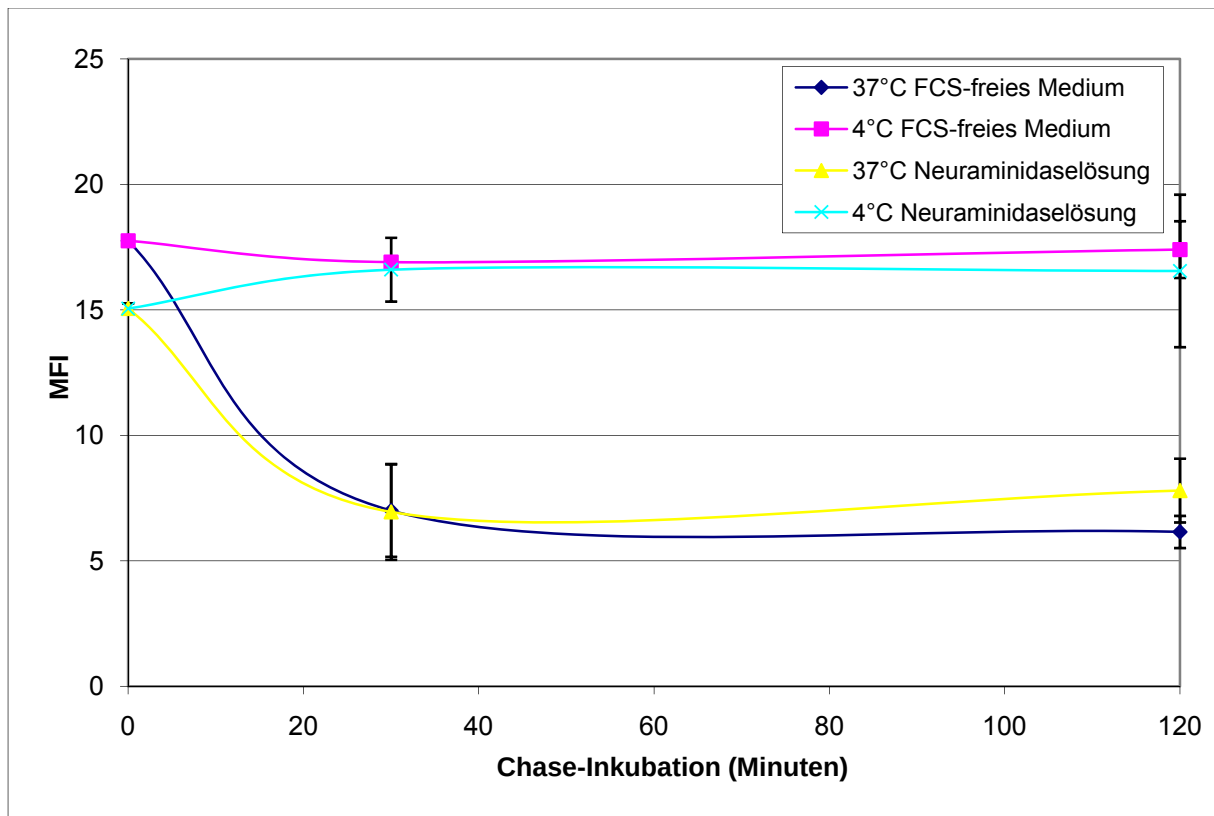


Abb. 19: Mittlere Fluoreszenzintensitäten Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladener, differenzierter THP-1 Zellen während einer Inkubationszeit von 0 bis 120 Minuten bei 4°C und 37°C, mit und ohne Neuraminidasevorbehandlung (0,2 U/ml).

Im Allgemeinen war im Zuge der Chase-Inkubation bei 37°C wieder eine zeitabhängige Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenzintensitäten zu beobachten, während die MFI-Werte bei 4°C weitgehend konstant blieben. Bei undifferenzierten THP-1 Zellen war kein Unterschied in der relativen Fluoreszenzabnahme zwischen neuraminidasevorbehandelten und unbehandelten Zellen festzustellen. Differenzierte Zellen zeigten in neuraminidasevorbehandeltem Zustand eine geringere relative Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenz als Zellen, die nicht mit Neuraminidase behandelt wurden. Eine Änderung der Neuraminidasekonzentration übte keinen Einfluss auf die relative Fluoreszenzabnahme aus.

3.10. Fluoreszenzmikroskopie

Die Bindung und Internalisierung von Bodipy-PLGA-Nanopartikeln wurde zusätzlich mittels Fluoreszenzmikroskopie visuell untersucht. Zur Analyse der Interaktion zwischen Nanopartikel und Zelle wurden die Nanopartikel bei 4°C an die Zelloberfläche gebunden und die Zellen danach fluoreszenzmikroskopisch

untersucht. Um die Internalisierung zu visualisieren, wurden die Zellen mit oberflächengebundenen Nanopartikeln nach Entfernung des ungebundenen Partikelanteils bei 37°C weiter inkubiert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

Praktische Durchführung:

Der Versuch wurde mit beiden Zelltypen durchgeführt.

50 µl Zellsuspension (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit 50 µl Bodipy-PLGA-Nanopartikelsuspension 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Der ungebundene Partikelanteil wurde wie oben beschrieben entfernt. Danach wurde unterschiedlich lange (0 bis 120 Minuten) bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde resuspendiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

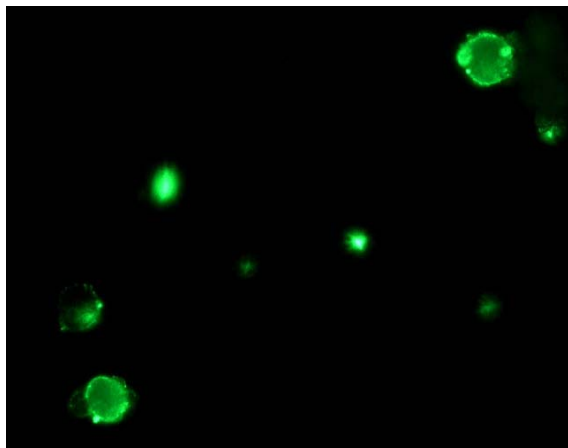


Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladenen, differenzierten THP-1 Zellen nach 15 Minuten Pulse-Inkubation bei 4°C.

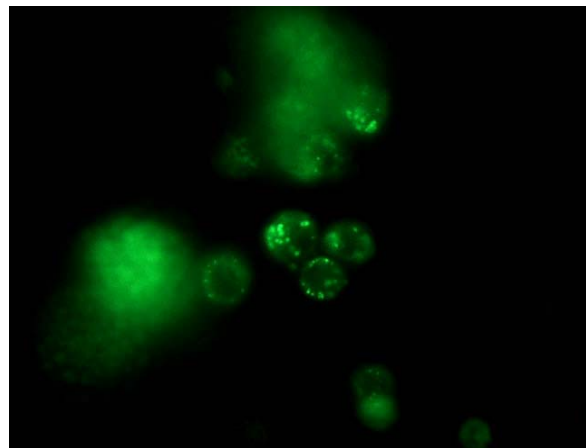


Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Bodipy-PLGA-Nanopartikel-beladenen, undifferenzierten THP-1 Zellen nach 120 Minuten Chase-Inkubation bei 37°C.

Die Fluoreszenzbilder zeigen, dass Zellen, die nur bei 4°C inkubiert wurden, eine diffuse Fluoreszenzverteilung an ihrer Zelloberfläche als fluoreszierenden Ring um die Zellmembran, aufweisen. Zellen, die bei 37°C weiter inkubiert wurden, zeigen jedoch eine punktförmige Verteilung im Zellinneren, während sich bei Chase-Inkubation bei 4°C die Fluoreszenz unverändert an der Zelloberfläche akkumuliert.

4. Ergebnisse

Für das Phagozytoseverhalten von Monozyten und Makrophagen bzw. für ein gezieltes Targeting an diese Zellen ist der Aufbau der Glykokalyx von Bedeutung. Da THP-1 Zellen monozytäre Eigenschaften besitzen und durch Behandlung mit Phorbolestern zu makrophagenähnlichen Zellen differenzieren, wurden mit dieser Zelllinie anhand von Interaktions- und Internalisationsstudien die Phagozytoseeigenschaften von Monozyten und Makrophagen näher untersucht. Alle Versuche wurden sowohl mit differenzierten als auch mit undifferenzierten Zellen unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Durch Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) wurden die Zellen zur Differenzierung angeregt und 24 bis 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach PMA-Behandlung lagen die Zellen in adhärenter und länglich abgeflachter Form vor, während unbehandelte Zellen in Suspension wuchsen und kugelhähnliche Form aufwiesen. Um die Differenzierung zu bestätigen wurden CD14 Rezeptoren, die infolge der Differenzierung vermehrt exprimiert werden, über eine Antigen-Antikörper Reaktion mit einem FITC-markierten CD14 Antikörper und anschließende durchflusszytometrische Analyse quantifiziert [17]. Zur Bestimmung der spezifischen Antikörperbindung wurde ein FITC-markierter Isotyp eingesetzt, dessen MFI-Werte von den jeweiligen Daten subtrahiert wurden. Nach 48 Stunden stieg bei PMA-vorbehandelten Zellen die mittlere zellassoziierte Fluoreszenzintensität (MFI) von $0,27 \pm 0,12$ (undifferenzierte Zellen) auf $9,74 \pm 0,42$ an, was auf eine erhöhte Expression des CD14 Rezeptors hinweist.

Zur Charakterisierung der Interaktion von unmodifizierten Nanopartikeln mit THP-1 Zellen wurden Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikel verwendet. Um die optimale Inkubationszeit für die maximale Bindungsrate der Nanopartikel an die Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen mit den Partikeln unterschiedlich lange (15 – 120 Minuten) bei 4°C inkubiert. Bei dieser Temperatur ist der Stoffwechsel der Zellen soweit reduziert, dass sich die Interaktion auf die Bindung der Nanopartikel an die Zelloberfläche beschränkt und eine Permeation der Partikel ins Zellinnere weitgehend ausgeschlossen werden kann. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Die Ergebnisse zeigten, dass bereits nach 15 Minuten Inkubationszeit die Bindung der Partikel an die Zelloberfläche zum Großteil

abgeschlossen ist, da eine weitere Erhöhung der Inkubationsdauer keine signifikante Änderung der zellgebundenen Fluoreszenzintensität bewirkte. Folglich wurde bei den Internalisierungsstudien mit Bodipy-PLGA- und Fluoresbrite-Nanopartikeln für die Pulse-Inkubation eine Dauer von 15 Minuten festgelegt.

Um die Interaktion von THP-1 Zellen mit oberflächenmodifizierten Nanopartikeln zu untersuchen, wurden PLGA-Partikel mittels Solvent Evaporation Technik hergestellt und fluoreszenzmarkiertes WGA bzw. BSA mittels einer Carbodiimid-Aktivestermethode kovalent an freie Oberflächencarboxylgruppen des PLGA-Partikels gebunden. Durch Konjugation mit Lektinen wird eine spezifische Interaktion mit Zuckerstrukturen der zellulären Glykokalyx möglich, wodurch die Aufnahme von PLGA-Nanopartikeln in die Zellen gesteigert werden kann [15]. Zur Kontrolle der unspezifischen Bindung wurden BSA-modifizierte PLGA-Partikel eingesetzt [16]. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (15 – 45 Minuten) von THP-1 Zellen mit oberflächenmodifizierten Nanopartikeln bei 4°C wurde die optimale Pulse-Inkubationsdauer mit 30 Minuten festgelegt.

In weiterer Folge wurde untersucht, inwieweit oberflächlich gebundene Nanopartikel von den Zellen internalisiert werden können. Entsprechend einem Pulse-Chase-Inkubationsprotokoll wurden die Partikel zunächst bei 4°C an die Zelloberfläche gebunden (Pulse) und die Zellen nach Entfernung der ungebundenen Partikel unterschiedliche lange (0 – 120 Minuten) bei 37°C inkubiert (Chase). Die während der Pulse-Inkubation oberflächlich gebundenen Nanopartikel sollten in der Chase-Phase internalisiert werden, da Zellen nur bei 37°C metabolisch aktiv sind. Im Zuge der Chase-Inkubation wird durch Aufnahme der Partikel in saure Zellkompartimente eine zeitabhängige Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenz erwartet, die auf Quench-Effekten der säureempfindlichen Farbstoffe beruht. Zum Vergleich wurden die Chase-Inkubationen auch bei 4°C durchgeführt, da bei dieser Temperatur aufgrund des reduzierten Zellstoffwechsels keine Internalisierung erwartet wird.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab bei einer Chase-Inkubationstemperatur von 4°C über einen Zeitraum von 120 Minuten bei beiden Zelltypen sowohl für Bodipy-PLGA- als auch für Fluoresbrite-Nanopartikel weitgehend konstante MFI-Werte.

Hingegen konnte nach gleich langer Chase-Inkubation bei 37°C bei mit Bodipy-PLGA-Partikeln beladenen Zellen eine zeitabhängige Abnahme der zellgebundenen Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden. Da PMA-behandelte Zellen nach 15-minütiger Pulse-Inkubation bei 4°C weit höhere MFI-Werte ($9,05 \pm 0,35$) als die unbehandelten Zellen ($4,35 \pm 0,21$) zeigten, besitzen differenzierte THP-1 Zellen eine höhere Bindungskapazität für Bodipy-PLGA-Nanopartikel. Da beide Zelltypen am Ende der Chase-Inkubation annähernd gleiche MFI-Werte aufwiesen, scheint die Phagozytosefähigkeit differenzierter THP-1 Zellen für Bodipy-PLGA-Nanopartikel ausgeprägter zu sein als jene von undifferenzierten Zellen.

Im Gegensatz dazu zeigten die mit Fluoresbrite-Nanopartikeln inkubierten Zellen nur geringfügig unterschiedliche Startwerte. Im Zuge der Chase-Inkubation bei 37°C nahmen die zellgebundenen Fluoreszenzintensitäten nur geringfügig ab und lagen für differenzierte und undifferenzierte Zellen in annähernd gleichen Bereichen. Folglich wurden wegen der geringen Aufnahmerate von Fluoresbrite-Nanopartikeln in THP-1 Zellen PLGA-Nanopartikel für weitere Versuche bevorzugt eingesetzt.

Die Bindung und Aufnahme von Bodipy-PLGA-Nanopartikeln wurde zusätzlich anhand von Pulse-Chase-Inkubationen und Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie visuell bestätigt. Zellen, die bei 4°C inkubiert wurden, wiesen eine diffuse Fluoreszenzverteilung an der Zelloberfläche auf. Hingegen zeigten Zellen, die bei 37°C inkubiert wurden, eine punktförmige Verteilung der Fluoreszenz im Zellinneren, was eine Internalisation der Partikel und eine Lokalisation in Vesikeln bestätigt.

Um eine mögliche Dissoziation von ursprünglich membrangebundenen Bodipy-PLGA-Nanopartikeln während der Chase-Inkubation zu erkennen, wurden die Überstände, die während eines zusätzlichen Waschschrilles nach Ende der Inkubationszeit bei 37°C bzw. 4°C anfallen, fluorimetrisch analysiert. Nach der Pulse-Inkubation wiesen die Überstände der undifferenzierten THP-1 Zellen höhere Fluoreszenzintensitäten auf, was auf eine geringere Partikel-Bindungskapazität dieser Zellen hinweist. Da am Ende der zweistündigen Chase-Inkubation bei 37°C die Fluoreszenzintensitäten der Überstände sowohl bei PMA-behandelten als auch bei unbehandelten Zellen deutlich geringer waren als nach der Inkubation bei 4°C,

werden die membrangebundenen Partikel in die Zelle aufgenommen und lösen sich nicht mehr von der Zelloberfläche ab.

Die intrazelluläre Lokalisation der in saure Kompartimente der Zelle aufgenommenen Nanopartikel sollte mit Monensin, einem Natrium-Ionophor, das den intrazellulären pH-Gradienten ausgleicht, verifiziert werden. Folglich sollte die Zugabe von Monensin die Abnahme der MFI-Werte während der Chase-Inkubation bei 37°C rückgängig machen [18]. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Funktionalisierung von PLGA-Nanopartikeln mit WGA aufgrund der cytoadhäsiven und -invasiven Eigenschaften die Absorption der Partikel in die Zellen fördert.

Nach 30-minütiger Pulse-Inkubation bei 4°C und Entfernung des ungebundenen Partikelanteils wurde unterschiedlich lange (0 – 120 Minuten) bei 37°C weiterinkubiert (Chase-Inkubation). Bei undifferenzierten Zellen war im Zuge der Chase-Inkubation bei 37°C eine zeitabhängige Abnahme der Fluoreszenzwerte von $9,10 \pm 0,42$ auf $6,00 \pm 0,14$ zu beobachten. Nach Zugabe von Monensin wurde die ursprüngliche Fluoreszenzintensität ($9,10 \pm 0,42$) wieder hergestellt. Die MFI-Werte differenzierter Zellen fielen von $5,70 \pm 0,42$ auf $3,20 \pm 0,21$ und erreichten nach Monensinzugabe wieder einen MFI-Wert von $5,90 \pm 0,21$. Die Chase-Inkubation bei 4°C ergab sowohl für differenzierte als auch undifferenzierte Zellen weitgehend konstante Werte. Im Gegensatz dazu zeigten BSA-konjugierte Nanosphären, die zur Kontrolle der unspezifischen Bindung dienen sollten, keine nachweisbare Zellbindung. Die MFI-Werte lagen dabei im Bereich der Eigenfluoreszenz der Zellen. Die Bindung und Internalisierung der WGA-funktionalisierten PLGA-Nanopartikel ist angesichts des Vergleichs mit BSA-modifizierten Partikeln auf eine spezifische Interaktion zurückzuführen und die Versuche in Gegenwart von Monensin deuten auf eine Akkumulation der aufgenommenen Partikel in sauren Kompartimenten der Zelle wie den Lysosomen hin.

Durch Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder durch eine Vorbehandlung mit dem Enzym Neuraminidase, welches spezifisch Sialinsäure von der Zelloberfläche abspaltet und auch während der Differenzierung vermehrt exprimiert wird, kommt es zu Veränderungen des Kohlenhydratmusters in der Glykokalyx. Um die Auswirkungen einer Neuraminidasevorbehandlung auf das Interaktions- und Internalisationsverhalten der THP-1 Zellen festzustellen, wurden

zunächst mögliche Änderungen im Lektinbindungsmuster der Zellen untersucht. Für diese Bindungsstudien wurden WGA, das spezifisch an N-Acetyl-D-Glukosamin- und Sialinsäurestrukturen bindet, PNA, ein für D-Galaktosamine spezifisches Lektin, und SNA, welches spezifisch α 2,6-verknüpfte Sialylgruppen erkennt, eingesetzt. Nach Vorinkubation mit Neuraminidase bei 37°C wurden die Zellen 5 Minuten bei 4°C mit den jeweiligen Lektinen inkubiert und nach Entfernung des ungebundenen Lektinanteils durchflusszytometrisch analysiert. Sowohl undifferenzierte als auch differenzierte Zellen wiesen vor und nach Neuraminidasebehandlung eine hohe und nur geringfügig veränderte Bindungskapazität für WGA auf, was auf einen hohen Anteil von N-Acetyl-D-Glukosamin- und Sialinsäurestrukturen in der Glykokalyx beider Zelltypen hinweist. Die Bindung von SNA, welches bei differenzierten Zellen die höchsten MFI-Werte zeigte ($165,63 \pm 4,62$), und auf ein vermehrtes Vorhandensein von Sialylgruppen bei PMA-behandelten Zellen hinweisen könnte, wurde durch Neuraminidase bei beiden Zelltypen auf die Hälfte reduziert. Undifferenzierte Zellen zeigten mit MFI-Werten knapp über der Eigenfluoreszenz der Zellen ($0,7 \pm 0,1$) praktisch keine PNA-Bindung und besitzen demnach keine zugänglichen Galaktosamin-Teilstrukturen. Durch Neuraminidase-Vorbehandlung stiegen die MFI-Werte undifferenzierter Zellen stark an ($92,30 \pm 2,17$), sodass erst die Entfernung von Sialylsäure-Teilstrukturen Galaktosaminy-Reste offenlegt. Bei differenzierten Zellen waren Galaktosamin-Strukturen zwar vorhanden ($\text{MFI } 14,90 \pm 4,53$) eine Neuraminidasevorbehandlung bewirkte jedoch keine so deutliche Steigerung der PNA-Bindungskapazität ($78,27 \pm 3,61$) wie bei undifferenzierten Zellen. Eine Veränderung der Neuraminidasekonzentration resultierte nur im Fall von PNA in veränderter Bindungskapazität.

Um mögliche Auswirkungen der Neuraminidase auf das Phagozytoseverhalten von THP-1 Zellen festzustellen, wurde nach Neuraminidasevorinkubation der Zellen die Partikel-Zell-Interaktion anhand eines Pulse-Chase-Protokolls mit Bodipy-PLGA-Partikeln verfolgt. Im Zuge der Chase-Inkubation bei 37°C nahm die zellassoziierte Fluoreszenzintensität mit der Inkubationsdauer ab, die MFI-Werte bei 4°C blieben jedoch weitgehend unverändert. Bei undifferenzierten THP-1 Zellen war kein Unterschied in der relativen Fluoreszenzabnahme zwischen neuraminidasevorbehandelten (von $27,30 \pm 0,99$ auf $4,20 \pm 0,42$) und unbehandelten Zellen (von $26,40 \pm 1,56$ auf $3,80 \pm 0,28$) festzustellen. Differenzierte Zellen hingegen

zeigten in neuraminidasevorbehandeltem Zustand eine geringere relative Abnahme der zellassozierten Fluoreszenzintensität von ($15,05 \pm 0,21$ auf $7,80 \pm 1,27$) als jene Zellen, die nicht mit Neuraminidase behandelt wurden (von $17,75 \pm 0,21$ auf $6,15 \pm 0,64$). Eine Änderung der Neuraminidasekonzentration zeigte keine Auswirkung auf die relative Fluoreszenzabnahme. Die in der Literatur beschriebene erhöhte Phagozytosefähigkeit der Zellen durch Neuraminidasevorbehandlung [7] konnte somit nicht bestätigt werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde das Phagozytoseverhalten von Monozyten und Makrophagen anhand von THP-1 Zellen näher charakterisiert. Monozytäre THP-1 Zellen konnten durch PMA zu Makrophagen differenziert werden, was durch erhöhte CD14 Expression an der Oberfläche nachgewiesen werden konnte. Mittels Solvent Evaporation Technik wurden unmarkierte PLGA- und Bodipy-markierte PLGA-Nanopartikel hergestellt. WGA wurde mittels Carbodiimidmethode an PLGA-Partikel gekoppelt, und es wurde untersucht, inwiefern diese Oberflächenmodifikation mit Lektin die Cytoadhäsion und –invasion der kolloidalen Arzneiformen beeinflusst. Anhand eines Pulse-Chase-Protokolls wurde die Interaktion und Internalisation unterschiedlich modifizierter Nanopartikel aus unterschiedlichen Matrices verfolgt. Während differenzierte THP-1 Zellen mehr PLGA-Nanopartikel in die Zelle aufnehmen als undifferenzierte Zellen, bewirkte die Oberflächenmodifikation mit Lektin keine erhöhte intrazelluläre Akkumulation. Die intrazelluläre Lokalisation der Partikel in sauren Kompartimenten wurde durch Behandlung mit Monensin und Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Darüber hinaus wurde anhand des Lektinbindungsmusters die Glykokalyx der THP-1 Zellen im undifferenzierten und differenzierten Status näher charakterisiert und der Einfluss der Neuraminidase auf die Zuckerbindungskapazität und Absorption von Bodipy-PLGA-Nanopartikeln untersucht.

Basierend auf diesen Ergebnissen scheinen THP-1 Zellen als Modell für Phagozytose geeignet zu sein, wobei sich fluoreszenzmarkierte PLGA-Nanopartikel als geeignete analytische Plattform für die Charakterisierung der Nanopartikel-Zell-Interaktion erwiesen haben. Weiters bietet die Behandlung der Zellen mit Neuraminidase durch Modifikation der Glykokalyx eine vielversprechende Möglichkeit, in die Lektinbindungskapazität von Monozyten bzw. Makrophagen einzugreifen, was für weiterführende Studien im Bereich Lektin-vermitteltes Targeting von Monozyten bzw. Makrophagen von Interesse ist.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Bennet H.S., 1963. Morphological aspects of extracellular polysaccharides, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 11, 14-23
- [2] Carr I., Everson G., Rankin A., Rutherford J., 1970. The fine structure of the cell coat of peritoneal macrophage and its role in the recognition of foreign material, *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 105, 339-349
- [3] Hounsell E.F., 2000. Glycobiology of the immune system, In: Ernst B., Hart G.W., Sinaÿ P., *Carbohydrates in chemistry and biology, part II, vol. 4* Wiley-VCH New York
- [4] Maldonado G., Gorocica P., Agundis C., Pérez A., Molina J., Zenteno E., 1998. Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*, *Glycoconjugate Journal* 15, 615-622
- [5] Sabri S., Soler M., Foa C., Pierres A., Benoliel A., Bongrand P., 2000. Glycocalyx modulation is a physiological means of regulation cell adhesion, *Journal of Cell Science* 113, 1589-1600
- [6] Liang F., Seyrantepe V., Landry K., Ahmad R., Ahmad A., Stamatou N.M., Pshezhetsky A.V., 2006. Monocyte Differentiation Up-Regulates the Expression of the Lysosomal Sialidase, Neu1, and Triggers its Targeting to the Plasma Membrane via Major Histocompatibility Complex Class II-positive Compartments, *The Journal of Biological Chemistry* 281 (37) 27526–27538
- [7] Videira P.A., Amado I.F., Crespo H.J., Algueró M.C., Dall’Olio F., Cabral M.G., H. Trindade, 2008. α 2-3- and α 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence of endocytosis, *Glycoconjugate Journal* 25, 259-268
- [8] S. Tsuchiya et al, 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-), *International Journal of Cancer* 26 (2), 171-176
- [9] Win K.Y., Feng S.S., 2005. Effects of particles size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials* 26, 2713-2722
- [10] Anderson J.M., Shive M.S., 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 5-27
- [11]
<http://www.polysciences.com/SiteData/docs/TDS%20431/f9c2b5a7ebf9f8d8aa29f953aae60269/TDS%20431.pdf>
- [12] Wang T.S., Lee M.H., Su N.W., 2009. Screening of lectins by an enzyme-linked adsorbent assay, *Food Chemistry* 113, 1218-1225

- [13] Sharon N. & Lis H., 2004. Lectins Second Edition, Springer
- [14] Van Damme E.J.M., Peumans W.J., Pusztai A., Bardocz S., 1998. Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications, Wiley
- [15] Weissenböck A., Wirth M., Gabor F., 2004. WGA-grafted PLGA-nanospheres: preparation and association with Caco-2 single cells, Journal of Controlled Release 99, 383-392
- [16] Gabor F., Wirth M., Jurkovich B., Haberl I., Theyer G., Walcher G., Hamilton G., 1997, Lectin-mediated bioadhesion: Proteolytic stability and binding characteristics of wheat germ agglutinin and Solanum tuberosum lectin on Caco-2, HT-29 and human colonocytes, Journal of Controlled Release 49, 27-37
- [17] Schwende H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P., 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3, Journal of Leukocyte Biology 59, 555-561
- [18] Gabor F., Bogner E., Weissenböck A., Wirth M., 2004. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery, Advanced Drug Delivery Reviews 56, 459-480

7. Anhang: Publikation



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Research paper

Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells upon differentiation and its impact on lectin-mediated drug delivery

V.E. Plattner, G. Ratzinger, E.T. Engleder, S. Gallauner, F. Gabor, M. Wirth *

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2009

29 June 2009

Accepted in revised form 8 July 2009

Available online xxxx

Keywords:

Monocytes/macrophages

Glycosylation pattern

Lectins

Bioadhesion

Drug targeting

Nanoparticles

ABSTRACT

In the present study, human monocytic THP-1 cells were treated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) in order to obtain macrophage-like cells. Before and after treatment, plant lectins with distinct sugar specificities were applied in order to elucidate the glycosylation patterns of both monocytic and macrophage-like cell types and to follow changes during differentiation.

As a result of flow-cytometric analyses, for untreated as well as for PMA-differentiated cells WGA yielded the highest binding rate without significant changes in the binding capacity. For the other lectins, divergent results were obtained which point to reorganization of sugar residues on the cell surface during differentiation.

Additionally, cytoinvasion being beneficial for enhanced drug absorption was studied with WGA which had displayed a high binding capacity together with a high specificity. For both untreated and PMA differentiated cells decreased fluorescence intensity at 37 °C as compared to 4 °C was observable pointing to internalization and accumulation within acidic compartments. Moreover, WGA-functionalized PLGA nanoparticles were prepared, and their uptake evaluated. Uptake rates of 55% in case of PMA-differentiated cells suggested that WGA-grafted drug delivery systems might be an interesting approach for treatment of infectious diseases provoked by parasites, facultative intracellular bacteria, or viruses such as HIV.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Being essential parts of the immune system, monocytes and macrophages are involved in defense against microbial infection, initiation of inflammation, immunity to foreign substances, wound healing, and angiogenesis. They originate from the bone marrow and undergo differentiation from hematopoietic stem cells to blood monocytes and finally to tissue-specific macrophages. Like all eukaryotic cells, they are covered by a carbohydrate-rich layer, denominated glycocalyx or pericellular matrix [1,2]. This cell coat is several tens of nanometers thick and is of functional importance as the first line defense of the innate immune system is relying on recognition of carbohydrates [3]. Furthermore, it plays an important role in cell–cell and cell–matrix interactions. At this, there is evidence that glycocalyx elements influence the endocytic capacity of monocytes [4] and are modulated during adhesion [5,6]. As adhesion of peripheral blood monocytes to endothelial cells initiates the differentiation program of monocytes into phagocytes

[7], this process may also cause reorganization of sugar residues at the cell surface.

To investigate the glycosylation pattern of monocytes, which undergo differentiation to macrophages, the human monocytic leukemia cell line THP-1 was chosen, which was established by Tsuchiya et al. and exhibits stable monocytic characteristics [8]. Additionally, treatment with various agents such as DMSO, phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), 1, 25-dihydroxyvitamin D3 (VD3), retinoic acid, or cytokines results in differentiation along the monocytic lineage [9–11]. In summary, it was shown that macrophage-like cells, which mimic native monocyte-derived macrophages in several aspects, are obtained with phorbol esters [12], whereas DMSO or retinoic acid shift the cells rather to characteristics of neutrophils [13].

In the present study, differentiation was carried out with PMA according to Park et al. [14]. In comparison to primary human monocytes, THP-1 cells are characterized by homogeneity, accessibility, and a higher transfection efficiency which renders them a reliable cell model.

To identify and characterize the glycocalyx elements of both untreated and PMA-differentiated THP-1 cells, binding of fluorescent-labeled lectins was investigated. Lectins represent carbohydrate-binding proteins which recognize distinct sugar structures at the cell surface. In order to cover a broad range of sugar residues at

* Corresponding author. Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria. Tel.: +43 1 4277 55407; fax: +43 1 4277 9554.

E-mail address: michael.wirth@univie.ac.at (M. Wirth).

the cell surface, several plant lectins with diverse carbohydrate specificities were applied: wheat germ agglutinin (WGA) and *Solanum tuberosum* lectin (STL) were used to identify *N*-acetyl-D-glucosamine structures and in case of WGA also sialic acid residues can be detected. The lectin from *Sambucus nigra* (SNA) specifically recognizes sialic acid (2,6)Gal/GalNAc sequences, and *Lens culinaris* agglutinin (LCA) binds to mannose residues. Peanut agglutinin (PNA) was used to detect galactosamine moieties, *Dolichus biflorus* agglutinin for *N*-acetyl-D-galactosamine-containing structures, and *Ulex europaeus* isoagglutinin I (UEA) specifically binds to fucose.

Ongoing from this characterization and comparison of the pericellular matrices of both untreated and PMA-differentiated cells, the internalization of WGA was studied in detail. This lectin had already been shown to enhance the phagocytic and bactericidal activity of murine peritoneal macrophages [15], and hence might be a suitable candidate for advanced drug delivery purposes. As improved drug delivery might promise higher therapeutic efficiency together with a reduction in side effects, there are considerable efforts to identify appropriate "targeters" which can be used for the functionalization of drug delivery devices. Therefore, nanoparticles were prepared from the biocompatible and biodegradable polymer poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) and surface modified with WGA [16]. Subsequently, their interaction with untreated and PMA-differentiated THP-1 cells was studied in order to examine the potential of WGA for guiding nanoparticles to macrophages.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Fluorescein-labeled lectins from *Triticum vulgare* (wheat germ agglutinin (WGA); molar ratio fluorescein/protein (F/P) = 2.9), *Solanum tuberosum* (STL; F/P = 3.1), *Sambucus nigra* (SNA, F/P = 7.2), *Lens culinaris* (LCA; F/P = 3.8), *Arachis hypogaea* (peanut agglutinin (PNA); F/P = 5.2), *Dolichos biflorus* (DBA; F/P = 2.2), and *Ulex europaeus* (UEA; F/P = 2.7) were purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). For the immunofluorescence analysis, FITC-labeled antibodies were obtained from Beckman Coulter (Krefeld, Germany). For particle preparation, poly(DL-lactide-co-glycolide) RESOMER® RG 503 H (PLGA) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). All other chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) unless otherwise specified.

2.2. Cell culture

Human THP-1 monocytic leukemia cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/ml in RPMI-1640 medium containing 10% heat-inactivated FCS (Biochrom AG, Berlin, Germany), 200 mM L-glutamine, 10,000 U/ml penicillin, and 10,000 µg/ml streptomycin and maintained at $3\text{--}8 \times 10^5$ cells/ml in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C.

Differentiation into macrophages was achieved by resuspending the cells at 3×10^5 cells/ml in growth medium supplemented with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; 8 nM in DMSO) for 48 h. To analyse the surface marker CD14 by immunofluorescence, cells were incubated with PMA also for 24 h and 72 h.

Viability of the cells was determined by trypan blue exclusion and counting the viable cells using a Bürker-Türk hemocytometer. Adherence of PMA-differentiated cells was examined with the same setup by determining the amount of unattached and adherent cells. Unattached cells were collected by centrifugation (1000 rpm, 5 min, 4 °C) of the supernatant, whereas adherent cells were detached with 0.25% EDTA in PBS followed by centrifugation.

2.3. Immunofluorescence analysis of surface antigen CD14

Untreated THP-1 cells were harvested by centrifugation (1000 rpm, 5 min, 4 °C) and resuspended in RPMI medium at a concentration of 5×10^6 cells/ml. PMA-differentiated cells were detached and collected as described above and resuspended at the same concentration as untreated cells.

A cell suspension of 50 µl (5×10^6 cells/ml) was incubated with 210 µl of the FITC-labeled anti-human CD14 monoclonal antibody solution (MY4-FITC, diluted 1:20 in PBS with 2% FCS) for 30 min at 4 °C. After incubation, cells were spun down (1000 rpm, 5 min, 4 °C) and the supernatant was discarded. Then, 100 µl PBS was added, and this washing step was repeated to remove any unbound antibody. Finally, cells were resuspended in 1 ml particle free PBS, and the mean cell-associated fluorescence intensity (MFI) was determined by flow cytometry (Epics XL-MCL, Coulter, FL, USA). To detect any non-specific antibody binding, additional cells were treated with an adequate isotypic control (MslgG2b-FITC) or with PBS before analysis.

2.4. Lectin-binding capacity

Untreated and PMA-differentiated cells were harvested as described earlier and processed immediately. A cell suspension of 50 µl (5×10^6 cells/ml) was incubated with a dilution series of fluorescein-labeled lectins (3.125–100 pmol in PBS, 50 µl) for 15 min at 4 °C. Then, cells were washed and prepared for flow cytometry as described above. Negative controls containing PBS instead of the lectin solution were included in all experiments and considered for all calculations. As a control to estimate non-specific-binding, samples were prepared as described above but using a dilution series of fluorescein-labeled bovine serum albumin (BSA, (F/P = 10)) instead of the lectins.

2.5. Specificity of the lectin binding

To determine if the binding of the lectins is mediated by carbohydrate moieties at the surface of untreated and PMA-differentiated THP-1 cells, 50 µl cell suspension (5×10^6 cells/ml), 100 µl of a dilution series of the corresponding complementary carbohydrate, and 50 µl of a solution containing 12.5 pmol fluorescein-labeled lectin were incubated for 15 min at 4 °C. The subsequent processing was again performed as described above. Table 1 displays the respective inhibitory carbohydrate for each lectin and the amounts used in the study. According to preliminary results, UEA-I and DBA exhibited no binding to either untreated or PMA-differentiated cells. Hence, no specificity studies were carried out for these lectins. The specificity of the interaction between SNA and THP-1 cells was not determined as the corresponding carbohydrate sialic acid α2,6 Gal/GalNAc is commercially unavailable.

2.6. Internalization of surface-bound WGA

To evaluate the internalization of surface-bound WGA, 50 µl cell suspension (5×10^6 cells/ml) of untreated and PMA-differentiated cells were incubated with 50 µl WGA solution containing 12.5 pmol lectin for 15 min at 4 °C (pulse incubation). Unbound lectin was removed by centrifugation and washing with 150 µl PBS. Subsequently, cells were further incubated for 0–240 min at either 4 °C or 37 °C (chase incubation) and then prepared for flow cytometry. After determination of the mean fluorescence intensity (MFI), 40 µl monensin solution (2.4 mM in EtOH) was added, and cells were incubated for 3 min at room temperature. Finally, the MFI was assessed again.

Table 1
Specificity of the lectins used in the competitive-binding assays.

Lectin	MW	Carbohydrate specificity	Inhibitory sugar	Sugar [c] in $\mu\text{mol}/\text{reaction}$ (untreated/differentiated)
WGA	36,000	GlcNAc, sialic acid	N-acetyl-D-glucosamine, Chitotriose	0.004–0.125/0.004–0.125
STL	100,000	GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine, Chitotriose	0.004–0.125/0.004–0.125
PNA	110,000	β -D-Gal-D-GalNAc, β -D-GalNAc, Gal	D-galactosamine	0.031–1/n.d.
DBA	120,000	α -D-GalNAc, Gal	N-acetyl-D-galactosamine	n.d./n.d.
UEA	63,000	α -L-Fuc	L-fucose	n.d./n.d.
SNA	150,000	Sialic acid $\alpha(2,6)$ Gal/GalNAc	–	n.d./n.d.
LCA	49,000	α -Man, α -Glc, α -GlcNAc	D-mannose	n.d./1–32

GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; α -Glc, α -glucose; α -D-GalNAc, N-acetyl- α -galactosamine; Gal, galactose; α -L-Fuc, α -L-fucose; α -Man, α -mannose; and n.d., not determined.

2.7. Preparation of WGA-functionalized nanoparticles

Nanoparticles were prepared by the solvent evaporation technique. Briefly, 400 mg of PLGA was dissolved in 2 g ethyl acetate. Upon addition of 6 ml 10 % (w/w) aqueous solution of Pluronic® F68, the organic phase was dispersed in the aqueous phase by ultrasonication for 50 s (Bandelin electronic Sonopuls UW 70/HD 70, tip MS 72/D, Berlin, Germany). The resulting O/W emulsion was poured into 100 ml 1 % (w/w) aqueous solution of Pluronic® F68. The organic solvent was allowed to evaporate at room temperature during mechanical stirring (600 rpm) at atmospheric pressure for 1 h and subsequently during 1 h under reduced pressure.

The PLGA nanospheres were covalently coupled with fluorescein-labeled WGA or fluorescein-labeled BSA. For this purpose, 40 ml of the particle suspension was activated by addition of 480 mg N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC) and 20 mg N-hydroxysuccinimide (NHS), each dissolved in 1 ml of 20 mM HEPES/NaOH buffer pH 7.4. After end-over-end incubation for 2 h at room temperature, the suspension was washed twice by diafiltration (Vivaflow 50, 100 000 MWCO PES, Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany) using 80 ml of 0.1% Pluronic in 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4. The nanoparticle suspension was divided into two equal parts followed by addition of 20 nmol of WGA (0.72 mg) and BSA (1.32 mg), respectively, each dissolved in 1 ml of the same buffer as described earlier. Following end-over-end incubation overnight at room temperature non-reacted coupling sites were saturated by addition of 300 mg glycine to each tube and further incubation for 1 h. Finally, excess of reagents was removed by three cycles of diafiltration with 40 ml of 0.1% Pluronic in 20 mM isotonic HEPES/NaOH pH 7.4 each. The amount of fluorescein-labeled protein coupled to the particle surface was determined by fluorimetric analysis following dissolution of an aliquot in 0.1 M NaOH. The respective nanosphere suspensions contained 3.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ WGA and 2.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA coupled to the particle surface. The concentration of the nanoparticle suspension amounted to 1.2 mg PLGA/ml. The mean particle size as determined by dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) was 160.3 nm for WGA-functionalized nanospheres with a polydispersity index (PDI) of 0.130 and 151.2 nm for BSA-coated nanospheres with a PDI of 0.133 using 0.1% Pluronic in 20 mM isotonic HEPES/NaOH pH 7.4 as dispersant.

2.8. Internalization of surface-bound WGA-functionalized PLGA nanoparticles

In order to examine the interaction between WGA- or BSA-coupled PLGA nanospheres and untreated as well as PMA-differentiated THP-1 cells, 50 μl cell suspension (5×10^6 cells/ml) was incubated with 50 μl nanoparticle suspension (1.2 mg PLGA/ml) for 15 min at 4 °C (pulse incubation). Unbound particles were removed as described above, and the cells were further incubated

for 30, 60 or 120 min at either 4 °C or 37 °C (chase incubation). After a first flow-cytometric analysis, 40 μl monensin (2.4 mM in EtOH) was added. Thereupon, cells were incubated for 3 min at room temperature, and the MFI values were determined again.

2.9. Flow cytometry

Data were acquired using an Epics XL-MLC analytical flow cytometer (Coulter, FL, USA). In order to exclude any dead cells, debris, and aggregates, viable cells were gated according to their forward versus side scatter properties. From each sample, 3000 cells were accumulated within this gate. Fluorescence emission of the fluorescence labeled single cell-population was measured at 525 nm (10 nm bandwidth) after excitation at 488 nm. Data analysis was conducted using Coulter System II Software 3.0.

2.10. Fluorescence microscopy

Uptake of WGA-functionalized PLGA nanoparticles was visually confirmed by incubating 50 μl cell suspension (5×10^6 cells/ml, both untreated and PMA-differentiated cells) with 50 μl nanoparticle suspension for 15 min at 4 °C (pulse incubation). After removal of unbound particles as described above, the cells were further incubated for 120 min at 37 °C. Thereafter, cells were washed again and immediately mounted for microscopy without fixation. Control samples were incubated at 4 °C only.

Immunofluorescence images were obtained using a Nikon Eclipse 50i microscope equipped with an EXFO X-Cite 120 fluorescence illumination system. Excitation and emission filter blocks were at 465–495/515–555 for green fluorescence and 510–560/>590 for red fluorescence. Fluorescence images were acquired at 40 $\times$ magnification and processed using Lucia G v5.0 software for image evaluation.

2.11. Statistics

Statistical analyses were carried out using the Microsoft Excel® integrated analysis tool. The hypothesis test among two data sets was made by comparing two means from independent (unpaired) samples (*t*-test). Values of $p < 0.05$ were considered significant. All experiments were performed at least in triplicate.

3. Results

3.1. PMA-induced differentiation of THP-1 monocytes to macrophages

After treatment of THP-1 cells with 8 nM PMA for 48 h, adherence and morphology were examined microscopically. Analysis of cell adherence by counting after trypan blue exclusion revealed that >90% of the cells were attached to the surface after PMA treatment. Additionally, adherent THP-1 cells were more flattened and elongated indicating the macrophage phenotype as compared to

the untreated cells which remained round and in suspension albeit partly aggregated in clusters.

To further ensure differentiation to macrophages, CD14 expression was investigated as the up-regulation of this surface molecule has been reported for maturing monocytes [10,17]. Flow cytometric analysis revealed an increase in CD14 as compared to untreated THP-1 cells. The mean cell-associated fluorescence intensity (MFI) was 0.5 ± 0.3 in case of untreated cells, 0.8 ± 0.0 MFI for cells treated for 24 h, 9.9 ± 0.5 for cells treated for 48 h, and 26.0 ± 0.5 MFI in case of cells treated for 72 h. MFI values of the isotype control were 0.52 in case of untreated cells and 0.57 in case of PMA-differentiated cells and subtracted from all data quoted.

3.2. Lectin-binding capacity of THP-1 cells

Plant lectins with different carbohydrate specificities were used to estimate the glycosylation pattern of untreated and PMA-differentiated THP-1 cells. For comparison of the data, MFI values of each lectin were related to an apparent conjugation number of 1 mol fluorescein per mole of lectin. For both untreated and PMA-differentiated THP-1 cells, WGA yielded the highest binding capacity with MFI values between 1.0 ± 0.0 and 17.1 ± 0.2 (untreated cells) and 0.7 ± 0.1 and 16.6 ± 0.4 (PMA-differentiated cells), respectively (Fig. 1). In case of untreated THP-1 cells, lectin binding was also observed for STL (MFI values up to 10.3 ± 0.5), PNA (up to 1.0 ± 0.1), and SNA (up to 0.3 ± 0.1) (Fig. 1A). LCA revealed only very low MFI values scarcely above the autofluorescence of the cells (0.1 ± 0.1). For both untreated and PMA-differentiated cells, binding of UEA-I, DBA as well as BSA, which served as a control for non-specific protein-membrane interactions, was not detectable. Comparison of the two different THP-1 types exhibited for PMA-differentiated THP-1 cells also a distinct interaction with STL (MFI values up to 5.8 ± 0.2) and SNA (1.2 ± 0.1) (Fig. 1B). Interestingly, a notably higher interaction occurred with LCA (2.4 ± 0.1 MFI at 100 pmol) as compared to untreated THP-1 cells, whereas no binding of PNA was observed. Fig. 2 compares the results at a lectin concentration of 100 pmol. At this concentration, no significant differences ($p > 0.05$) were evaluated for WGA, as contrary to all other lectins ($p < 0.01$).

3.3. Specificity of the lectin-THP-1 interaction

The specificity of the interaction between the plant lectins and THP-1 cells was elucidated by competitive inhibition with complementary carbohydrates (Table 1). For both untreated and PMA-differentiated cells, addition of increasing amounts of corresponding carbohydrates resulted in a decrease in the cell-bound lectin. The results are shown exemplarily for PMA-differentiated cells in Fig. 3 and indicate the specificity of the lectin-cell interactions. Based on the control sample without any sugar addition representing 100%, the percentage of inhibition was calculated. At this, inhibition values of more than 85% were calculated for WGA, STL, and LCA which point to a highly specific interaction of the respective lectin with cellular structures. In case of untreated cells, similar results were obtained for WGA and STL with inhibition values of about 90% in the same concentration range (data not shown). As LCA had not shown a relevant binding capacity to untreated THP-1, the specificity of the PNA-cell interaction was assessed instead, which also turned out to be specific as represented by more than 90% inhibition at a concentration of 1 μ mol galactosamine/reaction (data not shown).

3.4. Internalization of surface-bound WGA

Fig. 4 depicts the results of the internalization experiments with PMA-differentiated THP-1 cells. After pulse incubation at 4 °C, the MFI values of surface-bound WGA amounted to 41.5 ± 0.9 at the mean. During chase incubation at 37 °C, a time-dependent decrease in fluorescence intensities was observed resulting in 15.8 ± 0.5 MFI after 240 min. In case of untreated THP-1 cells (data not shown), MFI values yielded 40.6 ± 2.0 after pulse incubation and decreased to 14.2 ± 1.1 upon incubation at 37 °C for 240 min. After adding monensin to these WGA pretreated cells, the reduced fluorescence intensity was restored and approached the same level as the control samples at 4 °C. In addition, the same assays were performed for both untreated and PMA-differentiated cells also at 4 °C where no considerable differences were observable between the MFI values prior and after monensin additions.

3.5. Interaction of WGA-functionalized nanoparticles with THP-1 cells

To investigate a potential applicability of lectins for directing drugs to macrophages, the interaction of WGA-functionalized nanoparticles with THP-1 cells was studied. After a pulse incubation at 4 °C and removal of unbound particles, the chase incubation was performed up to 120 min at 4 °C and 37 °C. During chase incubation of untreated cells at 37 °C, MFI values decreased from 9.1 ± 0.4 (0 min) to 6.0 ± 0.1 (120 min). Upon addition of monensin, the cell-bound fluorescence intensity was restored by reaching 9.1 ± 0.5 (120 + 3 min monensin). In case of PMA-differentiated cells, the MFI values declined from 5.7 ± 0.4 (0 min) to 3.2 ± 0.2 (120 min) and re-equilibrated to 5.9 ± 0.2 (120 + 3 min monensin) upon addition of monensin. Chase incubation at 4 °C yielded stable MFI values for both untreated and PMA-differentiated cells.

In contrast, cell binding of BSA-conjugated nanospheres was near to the detection limit. The pulse incubation yielded MFI values of 0.1 ± 0.1 (untreated cells) and 0.2 ± 0.1 (PMA-differentiated cells) which are only marginally higher than the autofluorescence of the cells.

Additional information concerning the uptake of WGA-functionalized nanoparticles to untreated and PMA-differentiated THP-1 cells was collected via fluorescence microscopy. As illustrated in Fig. 5 for PMA-differentiated cells, control samples incubated with WGA at 4 °C revealed merely a fluorescent ring of particles around the cells indicating surface binding without any signs of internalization when the focus plane was set to the middle of the cell. In contrast, after incubation at 37 °C a dot-like pattern of fluorescence around the nucleus (black spot) was observed pointing to uptake and vesicular enrichment of initially surface-bound particles. For untreated cells, similar images were acquired (data not shown).

4. Discussion

In this study a systematic characterization of the glycosylation pattern of untreated and PMA-differentiated THP-1 cells was performed via detailed analysis of the binding capacities of selected lectins in order to investigate possible changes in course of the differentiation process. Additionally, the potential applicability of the applied lectins for drug delivery purposes at both stages was elucidated. For untreated as well as for PMA-differentiated THP-1 cells, the highest binding capacity was found for WGA, a lectin specific for *N*-acetyl- β -glucosamine and sialic acid structures. Regarding the MFI values at 100 pmol, no significant difference ($p > 0.05$) between both untreated and PMA-differentiated cells was detected. STL was the second best binding lectin for both untreated and PMA-differentiated cells, which also recognizes *N*-acetyl- β -gluco-

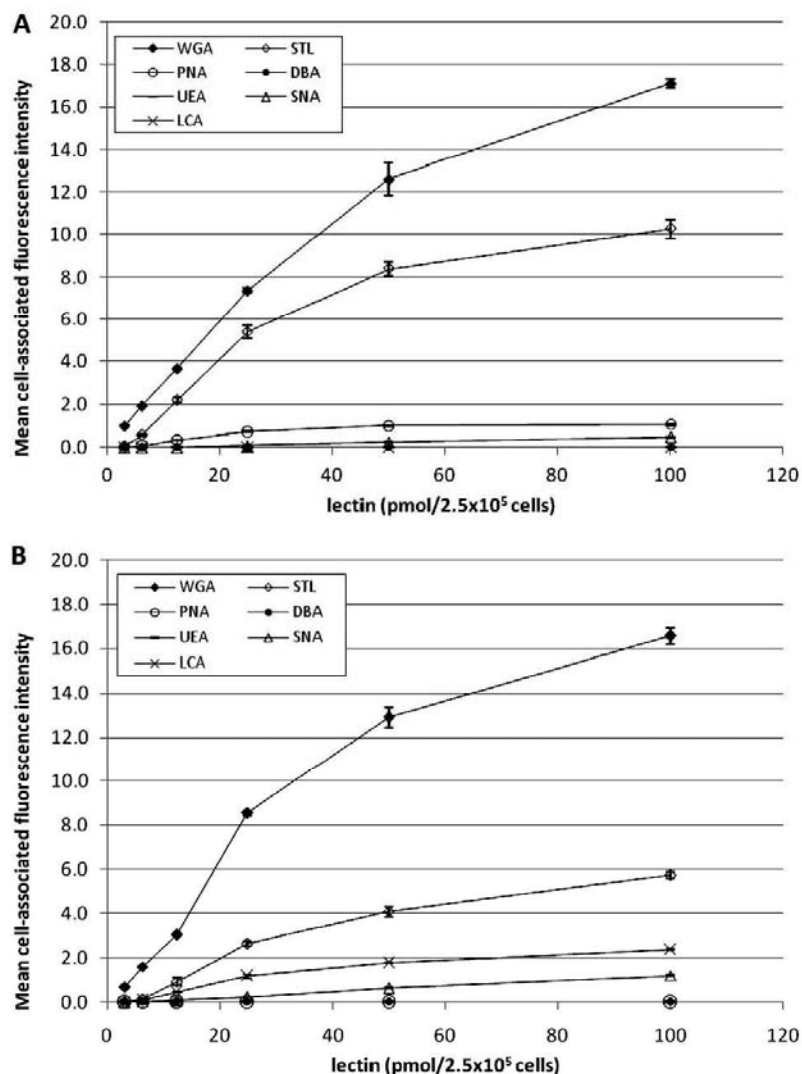


Fig. 1. Lectin binding to undifferentiated THP-1 (A) and differentiated THP-1 cells (B) at 4 °C. The fluorescein-labeled lectins associated with the cell surface were related to an apparent F/P ratio of 1 (mean $\pm$ SD, $n = 3$).

samine residues. In contrast to WGA, STL binding was significantly different between PMA-differentiated and untreated cells over the whole concentration range tested. This decrease in *N*-acetyl-D-glucosamine residues might be attributed to an increase in sialic acid moieties present at the cell surface of PMA-differentiated cells as indicated by the binding rate of SNA, a lectin which specifically binds to α 2,6-linked sialyl groups and yielded a higher binding capacity in case of PMA-differentiated THP-1 cells too ($p < 0.01$). Significant differences in the lectin-binding pattern were also observed for PNA and LCA. In case of untreated cells, galactosamine residues were assessed via PNA, whereas PMA-differentiated cells only showed a PNA binding scarcely above the autofluorescence level. In contrast, binding of LCA to mannose structures was very low in case of untreated cells, whereas PMA-differentiated cells revealed a notably higher density of mannose at the cell surface. Accessible fucose residues, traceable via UEA, and *N*-acetyl-D-galactosamine moieties, being detectable with DBA, were neither found on monocytes nor on monocyte-derived macrophages.

Sabri et al. [6] demonstrated that increased adhesiveness of stimulated THP-1 cells resulted in decreased cell coat thickness, presumably mostly affecting O-linked carbohydrates. Since Gal β 1-3-GalNAc represents the core 1 structure of the O-linked chains and is detected by PNA binding, the loss of PNA-binding capacity upon differentiation of THP-1 cells to macrophages is in agreement with the aforementioned observation. Additionally, PMA differentiation also had an effect on N-linked sugar residues. Among the motifs on N-linked oligosaccharides, α 2, 6-linked sialyl groups detectable by SNA and trimannosyl core groups detectable by LCA are present. For both lectins, a significantly higher binding capacity was determined on PMA-differentiated cells as compared to untreated ones ($p < 0.01$) which might be due to up-regulation of the CD14 receptor expression during differentiation. CD14 possesses four potential N-linked glycosylation sites with a carbohydrate content contributing to 20% of the total molecular mass [18]. Thus, increased binding of SNA and LCA might occur via these partial structures.

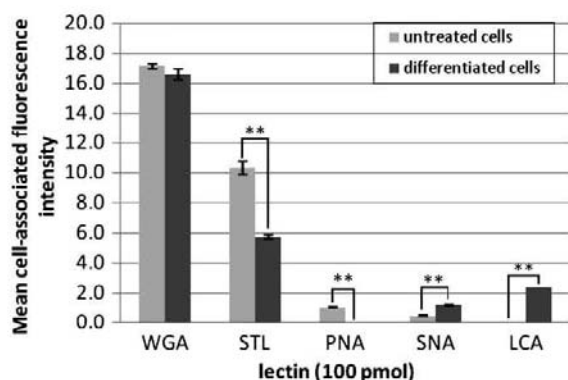


Fig. 2. Comparison of the lectin-binding capacities of untreated and differentiated THP-1 cells using a lectin concentration of 100 pmol (mean $\pm$ SD, $n = 3$). Statistically significant differences were determined by student's t -test: ** = $p < 0.01$.

For improved drug delivery purposes, not only a high binding rate, but also the specificity of the interaction is an important parameter. Thus, specificity of lectin binding was ascertained yielding inhibition values of at least 85% for each individual lectin.

Uptake of the "targeter", a favourable feature in advanced drug delivery, was observed for WGA. For this lectin, the enhancement of the phagocytic and bactericidal activities had been demonstrated with murine macrophages [15]. In our studies, WGA displayed a high binding capacity together with a high specificity for both untreated and PMA-differentiated THP-1 cells. In case of a selective approach towards either monocytes or macrophages, LCA might be a suitable candidate, as this lectin interacted only with PMA-differentiated THP-1 cells. On the contrary, PNA appears to be useful to target monocytic cells. However, according to a study with murine peritoneal macrophages, this lectin diminished the phagocytic activity suggesting that O-glycosylation is altered during activation of the cells [19]. This observation correlates with our results, and thus, its application as a targeting moiety is questionable.

The cellular fate of WGA was investigated over a period of 4 h at 4 °C and 37 °C, respectively. As shown in Fig. 5, the incubation temperature exerted a significant influence on the MFI values: upon chase incubation at 4 °C, they remained constant indicating an irreversible binding without any evidence for detachment or internalization of the cell-bound lectin. In contrast, at 37 °C the fluidity of the cell membrane increases and active transport processes can oc-

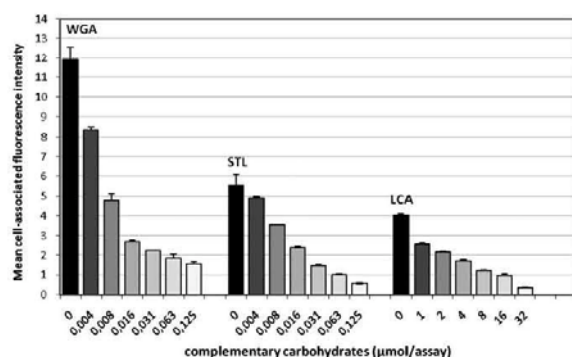


Fig. 3. Competitive inhibition of lectin binding (WGA, STL, LCA) to differentiated THP-1 cells by addition of increasing amounts of complementary carbohydrate (mean $\pm$ SD, $n = 3$).

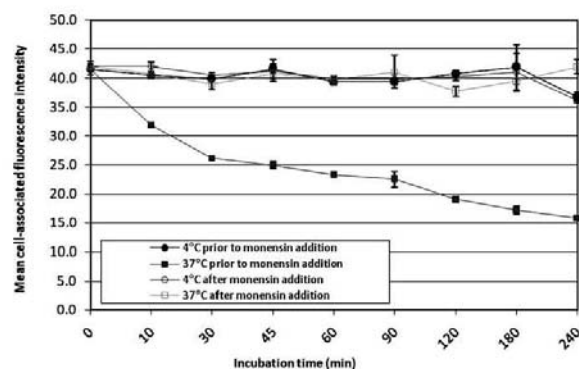


Fig. 4. Mean cell-associated fluorescence intensities of WGA-loaded differentiated THP-1 cells prior and after monensin additions during incubation (0–240 min) at both 4 °C and 37 °C (mean $\pm$ SD, $n = 3$).

cur. Regarding the MFI values of WGA at this temperature, the observed continuous decrease points to internalization of the lectin and enrichment within acidic compartments, since the fluorescence emission of fluorescein is known to be reduced at acidic pH. Thus, monensin, a carboxylic ionophore which can compensate the pH gradient between the cytoplasm and acidic compartments was added to the cells to verify this assumption. After monensin treatment, the MFI could be re-established, and it underlines the obviously pH dependent and reversible quench of the acid-sensitive label (Fig. 5). As analyses of the supernatants yielded no detached WGA, calculation of the fraction of WGA entering the lysosomal pathway was possible [20]. In case of untreated THP-1 cells, about 15% of the surface-bound WGA were accumulated after 10 min, in case of PMA differentiated cells, it was 25%. The cytoinvasion of WGA at the end of incubation after 240 min amounted to 64% in case of untreated THP-1 cells and 74% in case of PMA-differentiated THP-1 cells, respectively. These results indicate that PMA treatment of THP-1 cells might elicit a faster and higher phagocytic activity. Nevertheless, for both untreated and PMA-differentiated cells, a high internalization rate was assessed, and thus, WGA seems to be an appropriate candidate for guiding drug carriers to differentiated as well as non-differentiated cells.

Moreover, not only uptake of free WGA was observed, but also internalization of WGA-functionalized PLGA nanoparticles of about 160 nm in diameter. Again, incubation at 4 °C revealed stable MFI values, whereas incubation at 37 °C resulted in a decrease in cell-associated fluorescence intensities by time which could be restored upon addition of monensin. Regarding untreated cells, after 120 min about 40% of the surface-bound WGA-grafted particles were internalized and were subject to reversible pH quenching. Regarding PMA-differentiated cells, at the same time about 55% were taken up into acidic compartments. For comparison, the cell binding of BSA-grafted nanoparticles was assessed, but only marginal cell binding could be observed for both untreated and PMA-differentiated cells. Cytoinvasion of WGA-functionalized PLGA nanoparticles was additionally confirmed by fluorescence microscopy (Fig. 5). The images acquired after incubation at 37 °C revealed that the staining of the cytoplasm was not uniform but in a dot-like manner indicating vesicular accumulation of the particles. Thus, functionalisation of nanocarriers with WGA can lead to enhanced particle uptake into THP-1 cells. This is in line with Brandhonneur et al. [21] who recently showed increased uptake of WGA-grafted PLGA microparticles using pig alveolar macrophages. The specific interaction might be exploited for lectin-mediated drug delivery systems to combat infectious diseases evoked by parasites (malaria, leishmaniasis), facultative intracellular bacteria (brucella, listeria).

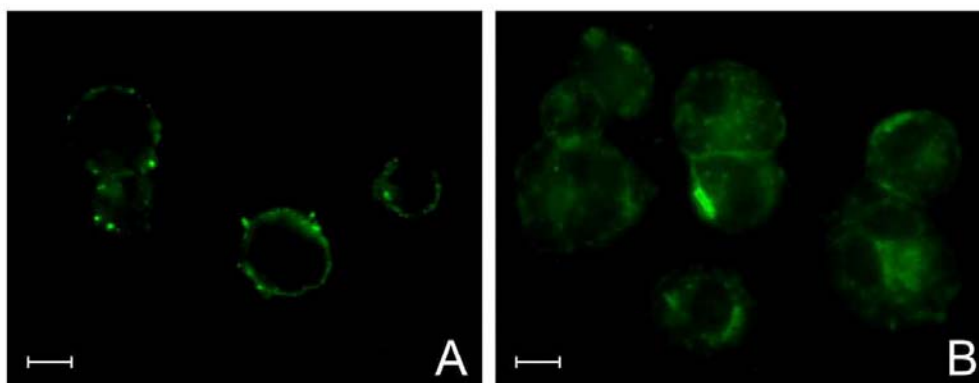


Fig. 5. Fluorescence microscopy images of differentiated THP-1 cells incubated with WGA-functionalized PLGA nanoparticles for 120 min at 4 °C (A) and 37 °C (B). Scale bar represents 10 μ m

ria, shigella, mycobacteria), and viruses such as HIV which are known to colonize in the mononuclear phagocyte system [22,23].

In summary, the glycosylation pattern of THP-1 cells showed significant changes due to differentiation with PMA demonstrating a reorganization of sugar residues at the cell surface. Additionally, the endocytic capacity to free WGA and WGA-functionalised nanoparticles was higher in case of PMA-differentiated cells as compared to untreated cells, which might be a result of this rearrangement [4]. In this context, also the potential of WGA as a cytotoxic vehicle was evaluated. Following on from this work, the application of WGA-grafted drug delivery systems might be an interesting approach towards treatment of diseases involving monocytes and macrophages which should be further pursued.

References

- [1] H.S. Bennett, Morphological aspects of extracellular polysaccharides, *J. Histochem. Cytochem.* 11 (1963) 14–23.
- [2] I. Carr, G. Everson, A. Rankin, J. Rutherford, The fine structure of the cell coat of the peritoneal macrophage and its role in the recognition of foreign material, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 105 (1970) 339–349.
- [3] E.F. Hounsell, Glycobiology of the immune system, in: B. Ernst, G.W. Hart, P. Sinay (Eds.), *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, New York, 2000, pp. 1029–1041.
- [4] P.A. Videira, I.F. Amado, H.J. Crespo, M.C. Algueró, F. Dall'Olio, M.G. Cabral, H. Trindade, Surface α 2-3- and α 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis, *Glycoconj. J.* 25 (2008) 259–268.
- [5] M. Soler, C. Merant, C. Servant, M. Fratero, C. Allasia, J.C. Lissitzky, P. Bongrand, C. Foa, Leukosialin (CD43) behavior during adhesion of human monocytic THP-1 cells to red blood cells, *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997) 609–618.
- [6] S. Sabri, M. Soler, C. Foa, A. Pierres, A.M. Benoliel, P. Bongrand, Glycocalyx modulation is a physiological means of regulation cell adhesion, *J. Cell Sci.* 113 (2000) 1589–1600.
- [7] S. Thomas-Ecker, A. Lindecke, W. Hatzmann, C. Kaltschmidt, K.S. Zanker, Alteration in the gene expression pattern of primary monocytes after adhesion to endothelial cells, *PNAS* 104 (2007) 5539–5544.
- [8] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, K. Tada, Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int. J. Cancer* 26 (1980) 171–176.
- [9] S. Tsuchiya, Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S. Nakae, T. Konno, K. Tada, Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester, *Cancer Res.* 42 (1982) 1530–1536.
- [10] H. Schwende, E. Fitzke, P. Ambis, P. Dieter, Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, *J. Leukoc. Biol.* 59 (1996) 555–561.
- [11] Q. Chen, A.C. Ross, Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells, *Exp. Cell Res.* 297 (2004) 68–81.
- [12] J. Auwerx, The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation, *Experientia* 47 (1991) 22–31.
- [13] M. Kubin, J.M. Chow, G. Trinchieri, Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor α , and IL-18 production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells, *Blood* 83 (1994) 1847–1855.
- [14] E.K. Park, H.S. Jung, H.I. Yang, M.C. Yoo, C. Kim, K.S. Kim, Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli, *Inflamm. Res.* 56 (2007) 45–50.
- [15] R. Gallily, B. Vray, I. Stain, N. Sharon, Wheat germ agglutinin potentiates uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages, *Immunology* 52 (1984) 679–686.
- [16] A. Weissenböck, M. Wirth, F. Gabor, WGA-grafted PLGA-nanospheres: preparation and association with Caco-2 single cells, *J. Control. Release* 99 (2004) 383–392.
- [17] S. Takashiba, T.E. Van Dyke, S. Amar, Y. Murayama, A.W. Soskolne, L. Shapira, Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor κ B, *Infect. Immun.* 67 (1999) 5573–5578.
- [18] D.L. Simmons, S. Tan, D.G. Tenen, A. Nicholson-Weller, B. Seed, Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein, *Blood* 73 (1989) 284–289.
- [19] G. Maldonado, F. Porras, L. Fernández, L. Vázquez, F. Zenteno, Effect of lectins on mouse peritoneal macrophage phagocytic activity, *Immunol. Invest.* 23 (1994) 429–436.
- [20] M. Wirth, C. Kneuer, C.M. Lehr, F. Gabor, Studying cellular binding and uptake of bioadhesive lectins, in: C.M. Lehr (Ed.), *Cell Culture Models of Biological Barriers*, Taylor and Francis, London and New York, 2002, pp. 62–93.
- [21] N. Brandhonneur, F. Chevanne, V. Vié, B. Frisch, R. Primault, M.F. Le Potier, P. Le Corre, Specific and non-specific phagocytosis of ligand-grafted PLGA microspheres by macrophages, *Eur. J. Pharm. Sci.* 36 (2009) 474–485.
- [22] C. Bogdan, Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example, *Cell. Microbiol.* 10 (2008) 1221–1234.
- [23] H.E. Gendelmann, M.S. Meltzer, Mononuclear phagocytes and the human immunodeficiency virus, *Curr. Opin. Immunol.* 2 (1989–1990) 414–419.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stefanie Gallauner

Geburtsdatum: 28. Oktober 1983

Geburtsort: Wien, Österreich

Ausbildung:

1990 – 1994	Volksschule Antonigasse 1180 Wien
1994 – 2002	AHS Albertus Magnus Schule 1180 Wien
Oktober 2002	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien
März – September 2008	Diplomarbeit an der Universität Wien am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Sommersemester und Wintersemester 2008:	Tutorin im Praktikum Industrielle Arzneimittelherstellung am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie