



Max-Planck-Institut für Polymerforschung  
Max Planck Institute for Polymer Research



# Entwicklung eines PYY-haltigen Nanocarriers zur oralen Verabreichung gegen Adipositas *in vitro* und *ex vivo* Systemen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
- Dr. rer. nat. -

Im Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität  
In Mainz

**Maria Parowatkin**  
geb. am 27.11.1979 in Wolgodonsk

Mainz, Januar 2017





---

Für alle, die an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
Abstract .....	I
1. Einleitung.....	1
1.1 Vorteile einer oralen Verabreichung der Medikamente .....	1
1.2 Die Gastrointestinale Barriere .....	2
1.3 Follikel-assoziiertes Epithel und M-Zellen .....	5
1.4 Adipositas, PYY und therapeutische Ansätze .....	6
1.5 Nachweisverfahren für humanes PYY .....	10
1.6 Nanomaterialien und das Polysaccharid Chitosan.....	11
1.7 Strategien zur Verbesserung der Adsorption, Aufnahme und Transzytose der NP.....	13
1.8 Das zelluläre <i>in vitro</i> Modell der intestinalen Barriere mit FAE.....	15
1.9 Ussing-Chamber System .....	18
1.10 Die intestinalen Aufnahmewege der Nanopartikel.....	19
1.11 Zielsetzung .....	20
2 Materialien und Methoden.....	21
2.1 Materialien.....	21
2.1.1 Chemikalien.....	21
2.1.2 Nanopartikel .....	21
2.1.3 Inhibitoren .....	22
2.1.4 Verwendete Farbstoffe für Immunfluoreszenzfärbungen.....	22
2.1.5 Proteine und Antikörper .....	22
2.1.6 Zelllinien und Gewebe .....	23
2.1.7 Medien, Puffer und Lösungen .....	23
2.1.8 Kommerziell erworbene Kits .....	24
2.1.9 Geräte .....	24
2.1.10 Verbrauchsmaterialien.....	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Kultivierung der Caco-2 Zellen im Transwell® System.....	26
2.2.2 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes .....	26
2.2.3 Bestimmung des scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten .....	27
2.2.4 Analyse des Zellwachstums im Transwell® System.....	27
2.2.5 Zellzahlbestimmung .....	28
2.2.6 Diffusionsfähigkeit der Substanzen im Transwell® System.....	28
2.2.7 Bestimmung der Transzytoserate der fluoreszenz-markierten Substanzen im Transwell® System .....	28
2.2.8 Messung der Transzytoserate des hPYY mittels ELISA System .....	29
2.2.9 Durchflusszytometrie .....	29
2.2.9.1 Untersuchung der Aufnahme der Nanopartikel mittels Durchflusszytometrie	30
2.2.9.2 Untersuchung der Inhibitorenwirkung mittels Durchflusszytometrie .....	30

2.2.10	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	30
2.2.10.1	Visuelle Analyse der Aufnahme der NP .....	31
2.2.10.2	Visualisierung der Zellstrukturen .....	31
2.2.11	Bestimmung der Zytotoxizität der Nanopartikel .....	32
2.2.12	Funktionalisierung der NP durch Aufreinigung der harten Proteinkorona .....	32
2.2.13	Bestimmung des Proteingehaltes.....	33
2.2.14	SDS-PAGE.....	33
2.2.15	Coomassie-Brillant-Blau Färbung der Proteine auf dem Gel.....	33
2.2.16	Western-Blot .....	34
2.2.17	Untersuchung der Transportrate der NP mittels Ussing-Chamber Systems.....	34
2.2.17.1	Organentnahme und Präparation der Epithelien.....	35
2.2.17.2	Versuchsaufbau und Inkubation des Epithelgewebes .....	36
2.2.18	Rasterelektronenmikroskopie .....	38
3	Ergebnisse und Diskussion .....	39
3.1	Etablierung des Transwell® Systems in 12- und 24-Well Zellkultureinsätzen. 39	
3.1.1	Reifung der Caco-2 Zellen in einer Langzeitkultur.....	39
3.1.2	Untersuchung des Caco-2 Zellwachstums auf unterschiedlichen Membrantypen 42	
3.1.3	Vergleich der Zellschichtpermeabilität und der Intaktheit in Bezug auf Wachstum auf den unterschiedlichen Membranen.....	43
3.1.4	Permeabilität der Caco-2 Zellschicht bei Mono- und Co-Kulturen im Transwell® System .....	45
3.1.5	Vermehrung der Caco-2 Zellen im Transwell® System .....	47
3.1.6	Proliferationszustand der Zellen im Transwell® System.....	48
3.2	Etablierung des Ussing-Chamber Systems.....	49
3.2.1	Bestimmung der Permeabilität des Duodenumgewebes im Ussing-Chamber System .....	49
3.3	Polystyrol Nanopartikel.....	51
3.3.1	Diffusion der PS Partikel durch unterschiedliche Membrantypen .....	51
3.3.2	Adhäsionseigenschaften der PS NP (REM) .....	52
3.3.3	Cytotoxizitätstest der PS Nanopartikel.....	53
3.3.4	Internalisation der PS NP in den Mono- und Co-Kulturen (cLSM).....	54
3.3.5	Transzytose von PS NP im Transwell® System .....	56
3.3.5.1	Unterschiedliche Inkubationsdauer der Zellkulturen mit Raji-Zellen als Co-Kultur .....	56
3.3.5.2	Konzentrationsabhängige Transzytose der PS NP im Transwell® System .....	58
3.3.5.3	Effekt des FBS auf den Transport der PS-COOH NP im Transwell® System 59	
3.3.5.4	Effekt des WGA auf den Transport der PS NP im Transwell® System .....	61
3.3.6	Untersuchung der Aufnahme der PS NP mittels Durchflusszytometrie.....	64
3.3.6.1	Aufnahme der Nanopartikel in die Mono- und Co-Kulturen .....	64
3.3.6.2	Effekt des FBS auf die Aufnahme der PS NP in Kurzzeitkultur.....	65
3.3.6.3	Effekt des WGA auf die Aufnahme der PS NP in Kurzzeitkultur .....	66
3.3.6.4	Analyse der Endozytosewege der PS NP mithilfe der Inhibitoren.....	67
3.3.7	Transzytose der PS NP im Ussing-Chamber System durch ein Schweinedarmgewebe .....	69
3.3.7.1	Transport der PS NP im Ussing-Chamber System.....	69

---

3.3.7.2	Einfluss der Funktionalisierung der PS NP mittels WGA auf die Transzytose durch Duodenumgewebe.....	71
3.4	Glycolchitosan NP (GC NP) .....	72
3.4.1	Untersuchung der Adhäsionseigenschaften der GC NP mittels REM.....	72
3.4.2	Biokompatibilität der Glycolchitosan NP.....	73
3.4.3	Intrazelluläre Aufnahme der GC NP .....	74
3.4.4	Transzytose der GC NP und GChPYY NP im Transwell® System.....	76
3.4.4.1	Effekt des FBS auf den Transport der GC NP .....	76
3.4.4.2	Effekt des WGA auf den Transport der GC NP .....	78
3.4.4.3	Effekt von Vitamin B12 in Kombination mit IF auf die Transzytose der GC NP.....	79
3.4.4.4	Konzentrationsabhängige Transzytose der GChPYY NP .....	81
3.4.4.5	Effekt des WGA auf den Transport der GChPYY NP .....	82
3.4.5	Endozytose der GC NP und GCrPYY NP.....	83
3.4.5.1	Vergleich der Aufnahme der GC NP und des freien RBITC .....	83
3.4.5.2	Vergleich der Aufnahme der GCrPYY NP und der GC NP.....	84
3.4.5.3	Analyse der Endozytosewege der GC NP mithilfe der Inhibitoren.....	85
3.4.6	Transzytose der GC NP im Ussing-Chamber System .....	86
3.4.6.1	Konzentrationsunabhängiger Transport der GC NP.....	86
3.4.6.2	Einfluss der Funktionalisierung der GC NP mittels Vitamin B12 und des Lektins WGA auf den Transport .....	87
3.5	Sättigungshormon hPYY.....	88
3.5.1	Intrazelluläre Aufnahme des rPYY .....	88
3.5.2	Transzytose von hPYY.....	90
3.5.2.1	Effekt der unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen an hPYY im Transwell® System .....	90
3.5.2.2	Effekt des WGA auf die Transzytose des hPYY in GChPYY NP im Transwell® System .....	92
3.5.3	Untersuchung der Endozytose des freien und des verpackten rPYY .....	93
3.5.4	Freisetzung des eingekapselten hPYY aus den GChPYY NP.....	94
3.5.5	Transport des eingekapselten hPYY in GChPYY NPs und des freien hPYY durch Duodenumgewebe im Ussing-Chamber System .....	96
3.5.6	Vergleich der Detektionsmethoden für hPYY und rPYY .....	98
4	Zusammenfassung.....	102
5	Literaturverzeichnis .....	105
6	Danksagung.....	118
7	Lebenslauf.....	119
8	Publikationen .....	120

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Epithelwand im Dünndarm. ....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der möglichen Transportwege, die die Arzneimittel-moleküle zur Überquerung der Epithelzellen benutzen können. ....	4
Abbildung 3: Das Prinzip eines ELISA Verfahrens zur Detektion eines Proteins. ....	11
Abbildung 4: Modell zur Nachahmung einer intestinalen Barriere in einem Transwellsystem mit Caco-2 Zellen. ....	17
Abbildung 5: Das Schema für die Kultivierung des Follikel-assoziierten Epithelmodells. ....	26
Abbildung 6: Elektrodenkammer ENDOHM-12 zur Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes in einem 12-Well Zellkultureinsatzes. ....	27
Abbildung 7: Vorbereitung der PYY-haltigen Proben zur Messung mittels ELISA Methode. ....	29
Abbildung 8: Präparation des Duodenums vom Schwein zum Einspannen in die Ussing-Kammer. ....	36
Abbildung 9: Ussing-Kammer mit Gasliftapparatur: Die mukosale Seite des Epithels entspricht der luminalen Seite und die serosale Seite der Blutseite. ....	37
Abbildung 10: Darstellung der Oberfläche der Caco-2 Zellen nach 14-tägigem Wachstum im Transwell® System mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie. ....	39
Abbildung 11: Caco-2 Zellen mit definierter Mikrovilli-Struktur auf der apikalen Zelloberfläche nach 14 Tagen Wachstum auf der Polycarbonat-Membran im Transwell® System. ....	40
Abbildung 12: Expression der Intestinalen Alkalischen Phosphatase (IALP) bei Caco-2 Zellen kultiviert im Transwell® System als (A) Mono-Kultur und (B) als Co-Kultur. ....	41
Abbildung 13: Darstellung der Caco-2 Zellschicht (A) nach 14 Tagen Wachstum auf der Polycarbonat-Membran mit 3 µm Porengröße und (B) nach 3 Tagen Wachstum in einer µ-Schale. ....	41
Abbildung 14: Wachstum der Caco-2 Zellen auf den unterschiedlichen Membrantypen im Transwell® System nach 14 Tagen. A) PC-Membran mit Poren mit einem Durchmesser von 3 µm; B) Caco-2 Zellschicht gewachsen auf der PC-Membran; C) PTFE-Collagen-Membran; D) Caco-2 Zellen gewachsen auf der PTFE-Collagen-Membran. ....	42
Abbildung 15: Apparenter Permeabilitätskoeffizient (Papp) gemessen in den Zellkulturen in 12- oder 24-Well Zellkultureinsätzen im Transwell® System nach 14 Tagen. ....	43
Abbildung 16: Transepithelialer Elektrischer Widerstand (TEER) gemessen in den Zellkulturen in 12-Well Zellkultureinsätzen im Transwell® System nach 14 Tagen. ....	44
Abbildung 17: Transepithelialer Elektrischer Widerstand (TEER) der Zellkulturen am 14. Tag und am 17. Tag Wachstum als Mono- oder Co-Kultur in 12-Well Einsätzen. ....	45
Abbildung 18: Apparenter Permeabilitätskoeffizient (Papp) für Mono- und Co-Kulturen nach 4 h und 24 h Inkubation mit 4 kDa Dextran. ....	46
Abbildung 19: Apparenter Permeabilitätskoeffizient (Papp) für Mono- und Co-Kulturen nach 4 h und 24 h Inkubation mit Transferrin. ....	47
Abbildung 20: Bestimmung der Zellzahl im Transwell® System nach 3 Tage Inkubation mit Raji Zellen in Co-Kultur oder mit Wachstumsmedium in Mono-Kultur. ....	47
Abbildung 21: Bestimmung der Zellzahl im Transwell® System nach 3 und 5 Tagen Inkubation mit Raji-Zellen in Co-Kultur. ....	48
Abbildung 22: Proliferationszustand der Zellen im Transwell® System nach einer 3-tägigen und 5-tägigen Inkubation der Caco-2 Zellen mit Raji Lymphozyten in Co-Kultur. ....	49
Abbildung 23: Apparenter Permeabilitätskoeffizient für das Schweinedarmgewebe im Ussing-Chamber System. ....	50

Abbildung 24: Passive Diffusion der NP durch die unterschiedlichen Membrantypen im Transwell® System nach 2 h und 4 h. ....	51
Abbildung 25: Darstellung der Oberfläche einer Caco-2 Zelle nach einer 24 h Inkubation mit den (A) PS-COOH NP und (B) PS-NH <sub>2</sub> NP mittels Rasterelektronenmikroskopie. ....	52
Abbildung 26: Zytotoxizität der (A) carboxyl-funktionalisierten und (B) aminofunktionalisierten PS NP auf Caco-2 Zellen nach einer 4 h oder 24 h Inkubation mit den Partikeln bis zu einer Konzentration von 1000 µg/ml im Wachstumsmedium. ....	53
Abbildung 27: Internalisation der carboxyl-PS NP bei den (A) Mono-Kultur und (B) Co-Kultur Zellen, gewachsen 14 Tage im Transwell® System nach 24 h Inkubation. ....	54
Abbildung 28: Internalisation der amino-PS NP in die (A) Mono-Kultur und (B) Co-Kultur Zellen, gewachsen 14 Tage im Transwell® System, nach 24 h Inkubation. ....	55
Abbildung 29: Vergleich der Transzytoserate der (A) PS-COOH NP und (B) PS-NH <sub>2</sub> NP durch 3 Tage oder 5 Tage Co-Kultur im Transwell® System. ....	56
Abbildung 30: Konzentrationsabhängige Transzytose der (A) PS-COOH NP und der (B) PS-NH <sub>2</sub> NP durch die Zellschicht in einem Transwell® System nach 4 h und 24 h Inkubation. ....	58
Abbildung 31: Effekt des FBS auf den Transport der PS-COOH NP nach 4 h und 24 h im Transwell® System. ....	59
Abbildung 32: Effekt des Proteins WGA auf den Transport der PS-COOH NP im Medium (A) ohne oder (B) mit 10% FBS nach 4 h oder 24 h im Transwell® System. ....	62
Abbildung 33: SDS-PAGE Analyse der Adsorption des Lektins WGA an die PS-COOH NP und PS-NH <sub>2</sub> NP. ....	63
Abbildung 34: Western-Blot Analyse der Adsorption des Lektins WGA an die PS-COOH NP und PS-NH <sub>2</sub> NP. ....	64
Abbildung 35: Die Aufnahme (A) der carboxyl-funktionalisierten und (B) der aminofunktionalisierten PS NP in 3 Tage (3 d) bzw. 5 Tage (5 d) Mono- und Co-Kulturen. ....	65
Abbildung 36: Aufnahme der PS NP ohne oder mit Zugabe des 10%igen FBS in das Wachstumsmedium nach 4 h und 24 h. ....	66
Abbildung 37: Effekt des Lektins WGA auf die Aufnahme der PS NP ohne oder mit Zusatz des 10% FBS im Wachstumsmedium nach 4 h oder 24 h Inkubation. ....	67
Abbildung 38: Effekt der Inhibitoren auf die Aufnahme der PS-COOH NP (A) und PS-NH <sub>2</sub> NP (B) in die Caco-2 Zellen. ....	68
Abbildung 39: Transzytose der PS-COOH NP und der PS-NH <sub>2</sub> NP durch das Schweinedarmgewebe nach 4 h. ....	70
Abbildung 40: Die Transzytose der PS-COOH NP (A) und der PS-NH <sub>2</sub> NP (B) durch das Schweinedarmgewebe nach 4 h. ....	71
Abbildung 41: Darstellung der Oberfläche einer Caco-2 Zelle nach einer Inkubation mit den Glycolchitosan NP mittels Rasterelektronenmikroskopie. ....	72
Abbildung 42: Zytotoxizität der Glycolchitosan NP auf die Caco-2 Zellen nach einer 4 h oder 24 h Einwirkzeit. ....	73
Abbildung 43: Der Vergleich der intrazellulären Aufnahme (A) der GC NP und (B) des freien Farbstoffs RBITC in die Caco-2 Zellen nach 4 h Inkubationszeit. ....	74
Abbildung 44: Untersuchung der Lokalisation der GC NP nach 30 min (A) und nach 4 h (B) in den Caco-2 Zellen mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie. ....	75
Abbildung 45: Der Vergleich der Adhäsion der GC NP (A) nach 4 h und (B) nach 24 h Inkubation mit den Caco-2 Zellen nach Kultivierung im Transwell® System. ....	76



Abbildung 46: Effekt des FBS auf den Transport der Chitosan NP in einem Transwell® System nach 4 h oder 24 h Inkubation.....	77
Abbildung 47: Effekt des Proteins WGA auf den Transport der Glycolchitosan NP im Medium mit 10% FBS (+FBS) oder ohne FBS (-FBS) nach 4 h oder 24 h im Transwell® System. ....	78
Abbildung 48: Western-Blot Analyse der Adsorption des Lektins WGA an die GC NP. ....	79
Abbildung 49: Effekt von Vitamin B12 in Kombination mit Intrinsischem Faktor auf die Transzytose der Chitosan Partikel (A) nach 4 h und (B) nach 24 h im Transwell® System. ....	80
Abbildung 50: Konzentrationsabhängiger Transport der mit hPYY gefüllten Glycolchitosan NP (GChPYY NP) im Transwell® System nach 4 h und 24 h. ....	82
Abbildung 51: Effekt des Proteins WGA auf den Transport der hPYY haltigen GC NP (GChPYY NP) im Medium mit 10% FBS nach 4 h oder 24 h Inkubation im Transwell® System. ....	83
Abbildung 52: Aufnahme der GC NP im Vergleich zum freien Farbstoff RBITC im Wachstumsmedium ohne oder mit 10% FBS. ....	84
Abbildung 53: Vergleich der Endozytose der mit rPYY gefüllten Glycolchitosan NP (GCrPYY NP) mit den GC NP gemischt mit freiem rPYY und mit den GC NP allein. ....	85
Abbildung 54: Die Wirkung der Inhibitoren auf die Endozytose der Glycolchitosan NP in Caco-2 Zellen. ....	86
Abbildung 55: Transzytose der GC NP durch das Schweinedarmgewebe nach 4 h. (A) Tatsächlich gemessene Menge an GC NP auf der serosalen Seite des Systems. (B) Die transportierte Menge an GC NP bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Konzentration. ....	87
Abbildung 56: Transzytose der mit Vitamin B12 (A) und mit WGA (B) funktionalisierten GC NP durch das Schweinedarmgewebe nach 4 h. ....	88
Abbildung 57: Intrazelluläre Lokalisation des rPYY in den Caco-2 Zellen nach 2 h, 4 h und 24 h Inkubation (A1-A3) mit freiem rPYY, (B1-B3) mit einem Gemisch (Mix) aus freiem rPYY und GC NP und (C1-C3) mit eingekapselten rPYY als GCrPYY NP. ....	89
Abbildung 58: Konzentrationsabhängiger Transport des in Chitosan NP eingekapselten hPYY in Form von GChPYY NP im Transwell® System nach 4 h und 24 h. ....	91
Abbildung 59: Transport des freien hPYY im Transwell® System nach 4 h und 24 h in Bezug auf unterschiedliche Konzentrationen. ....	92
Abbildung 60: Einfluss des Lektins WGA auf die Transzytose des hPYY, das in verpackter Form als GChPYY NP vorliegt. ....	93
Abbildung 61: Aufnahme des gebundenen rPYY in Form von GCrPYY NP und des freien rPYY in die Caco-2 Zellen. ....	94
Abbildung 62: Freisetzung des hPYY aus den GChPYY NP. ....	95
Abbildung 63: Vergleich der freigesetzten hPYY Menge nach Transzytose im Transwell® System (A) direkt nach 24 h Transzytose, (B) nach 24 h nach dem Auftauen der Proben und (C) nach 5 Tagen bei Raumtemperatur. ....	96
Abbildung 64: Transport des in das Glycolchitosan eingekapselten hPYY (A und B) und des freien hPYY (C und D) durch den Schweinedarm im Ussing-Chamber System nach 4 h. ....	97
Abbildung 65: Vergleich der Detektionsmethoden nach der Transzytose der PYY-haltigen GC NP (A) mittels ELISA Kit anhand der Antigen-Antikörper Bindung und (B) mittels Fluorimetrie anhand des Fluoreszenzsignals. ....	99

- 
- Abbildung 66: Vergleich der Detektionsmethoden der Proben von der apikalen Seite nach der Transzytose der PYY-haltigen GC NP (A) mittels ELISA Kit anhand der Antigen-Antikörper Bindung und (B) mittels Fluorimetrie anhand des Fluoreszenzsignals. .... 100
- Abbildung 67: Vergleich der Detektionsmethoden des intrazellulär aufgenommenen PYY nach der Transzytose der PYY-haltigen GC NP (A) mittels ELISA Kit anhand der Antigen-Antikörper Bindung und (B) mittels Fluorimetrie anhand des Fluoreszenzsignals. .... 101

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien .....	21
Tabelle 2: Nanopartikel.....	21
Tabelle 3: Verwendete Inhibitoren.....	22
Tabelle 4: Marker .....	22
Tabelle 5: Proteine und Antikörper .....	22
Tabelle 6: Zelllinien und Gewebe .....	23
Tabelle 7: Medien, Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 8: Verwendete Kits.....	24
Tabelle 9: Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien .....	25
Tabelle 11: Farbstoffe zur Visualisierung der Zellstrukturen oder der NP .....	31
Tabelle 12: Pipettierschema für die Polyacrylamidgelelektrophorese .....	33
Tabelle 13: Zusammensetzung der kommerziell erworbenen NTS Lösung nach Zusammenmischen der beiden Basen im Verhältnis 1:1 .....	35

## Abkürzungsverzeichnis

AEMH	2-Aminoethyl-methacrylat-hydrochlorid
AK	Antikörper
AM	Acetoxymethylester
AS	Acrylsäure
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserum Albumin
Ca	Calcium
CBB	Coomassie-Brillant-Blau
CHAPS	3-[3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CLSM	Confocal laser scanning microscopy, konfokale Laserscanning Mikroskopie
CP	Chlorpromazin
Cyt D	Cytochalasin D
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMEM	Eagle`s minimal essential medium
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FBS	Fetal Bovine Serum, Fötales Kälberserum,
FITC	Fluorescein Isocyanate
GC	Glycolchitosan
GCPYY NP	Glycolchitosan NP beladen mit PYY
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDL	High Density Lipoprotein
HPMCP	Hydroxypropyl methylcellulose phthalate
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettich Peroxidase
hPYY	Humanes PYY
IF	Intrinsischer Faktor
LDL	Low Density Lipoprotein
Mg	Magnesium
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NP	Nanopartikel
NTS	Normal Tyrode Solution
P/S	Penizillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatpuffer
PC	Polycarbonat

PET	Polyethylenterephthalat
PGA	Polyglutamic acid
PLA	Poly(lactic acid)
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
PI	Propidiumiodid
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluorethylen
PYY	Peptid YY (Y steht für Tyrosin)
RBITC	Rhodamin B Isothiocyanat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rPYY	Raten PYY
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
TEER	transepithelial electric resistance, Transepithelialer elektrischer Widerstand
Tnsf	Transferrin
TMB	Tetramethylbenzidin
WGA	Wheat Germ Agglutinin (Lektin)

## Abstract

Die orale Verabreichung der Medikamente dominiert in der gegenwärtigen Arzneimitteltherapie und wird hinsichtlich ihrer sicheren, effizienteren und leicht zugänglichen Form bevorzugt. Diese nicht-invasive Methode stellt auch bei der Applikation von Peptid-basierten Medikamenten einen signifikanten Vorteil gegenüber anderen invasiven Einnahmewegen dar. Eine große Herausforderung bei der Entwicklung der Peptid-basierten Medikamente stellt die gastrointestinale Barriere dar, da diese ein saures Milieu aufweist und dort enzymatische Abbauprozesse stattfinden. Um diese Hürden zu überwinden, werden Peptide in Polymere verpackt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Polysaccharid Chitosan zum Transport des Sättigungshormons PYY verwendet. Chitosan kann die Transzytose durch die gastrointestinale Barriere erhöhen sowie durch Aufquellen zum Sättigungsgefühl beitragen. Die Kombination von Chitosan mit PYY soll daher die Effizienz bei der Behandlung von adipösen Erkrankungen nach oraler Applikation erhöhen.

Zur Untersuchung der medizinisch relevanten Substanzen wurde die Transzytose durch Epithelzellen des Intestinaltraktes mithilfe des Transwell® Systems analysiert. Die gastrointestinale Barriere simulierten hierbei Caco-2 Zellen, welche die Eigenschaften reifer Enterozyten aufweisen und daher geeignet sind, transepitheliale Transportvorgänge zu untersuchen. Für weiterführende *ex vivo* Analysen wurde das Ussing-Chamber System verwendet.

Die Polystyrol Nanopartikel dienten zunächst als Modell für die Experimente. In der Arbeit wurde gezeigt, dass die als Modell verwendeten carboxyl- und amino-Polystyrol Nanopartikel erfolgreich durch die Epithelzellen transportiert wurden. Der Transport der anionisch-geladenen carboxylierten NP erfolgte 10-fach besser als der kationisch-geladenen aminierten NP. Da diese Ergebnisse für beide Untersuchungssysteme festgestellt wurden, zeigte dies, dass beide Modelle, Transwell® Systems sowie Ussing-Chamber System, zur Bestimmung der Transzytoserate gut geeignet sind. Die carboxyl-funktionalisierten PS NP wurden mittels Makropinozytose internalisiert, während die amino-funktionalisierten PS NP vorwiegend die Caveolae-vermittelte Route nahmen. Diese Experimente verdeutlichten, dass die Oberflächenfunktionalisierung bei ähnlicher Partikelgröße eine wichtige Rolle für den Aufnahmeweg in die Zelle spielt. Des Weiteren wurde die Transportrate des freien Hormons PYY und des in Glycolchitosan eingekapselten PYYs analysiert. Hierbei wurde das Peptid erfolgreich durch die Caco-2 Zellschicht sowie durch das Duodenumgewebe transportiert und lag nach dem Transzytoseprozess in intakter Form vor. Bei der Suche nach der Möglichkeit, die Aufnahme und somit Transzytose durch die Epithelzellen zu verbessern, wurde das Vitamin B12 getestet. Der Einsatz von Vitamin B12 in Kombination mit intrinsischem Faktor zur Funktionalisierung der Glycolchitosan Nanopartikel zeigte im Transwell® System positive Resultate hinsichtlich des Transportes durch die Caco-2 Zellen. Hierbei konnte ein deutlicher Anstieg der Transzytoserate detektiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die ersten Schritte zur Entwicklung eines PYY-haltigen Medikamentes zur oralen Verabreichung bei der Behandlung der Adipositas erfolgreich waren.

# 1. Einleitung

## 1.1 Vorteile einer oralen Verabreichung der Medikamente

Es sind viele Formen der Applikation von Medikamenten bekannt. Unter diesen werden die inhalative, intramuskuläre, perkutane, intravenöse, intranasale oder orale Gabe der Wirkstoffe sehr oft angewendet. Die orale Verabreichung der Peptide stellt die pharmazeutische Wissenschaft schon seit Langem vor einer großen Herausforderung. Bei der Suche nach einer Verbesserung der klassischen Aufnahme wurde eine große Zahl von neuen Therapieansätzen getestet. Bei der erfolgreichen oralen Verabreichung müssen zwei wichtige Aufgaben erfüllt werden: zum einen muss das Peptid vor dem Abbau im gastrointestinalen (GI) Trakt geschützt und zum anderen durch das intestinale Gewebe auf eine sichere und effiziente Art und Weise transportiert werden. Während des letzten Jahrzehnts gab es zahlreiche Ansätze basierend auf der chemischen Modifikation der Peptide und der Erhöhung der Durchlässigkeit der Epithelwand sowie des Einsatzes von Enzyminhibitoren und Transport (Drug-Delivery) Systemen [1].

Seit der Entdeckung des Insulins 1922 werden Peptide und Proteine als Biopharmazeutika verwendet, vor allem wegen ihrer hohen Aktivität, Spezifität und Wirksamkeit im Vergleich zu herkömmlichen Medikamenten [2, 3]. Es existieren bereits Peptid-basierte Medikamente zum therapeutischen Einsatz gegen Osteoporose (Calcitonin), Diabetes (Insulin) Prostatakrebs und Endometriose (Gonadotropin Freisetzungshormon) und Hypothyroidismus (Thyrotropin Freisetzungshormon) [4].

Es wurden viele Ansätze getestet, um Peptide sicher an die Zielorte zu bringen. Dabei sind chemische Modifikationen von Peptiden, die Zugabe von Enzyminhibitoren, der Einsatz von adhäsiven Polymeren zur Erhöhung der Absorption, die Entwicklung von Trägersystemen sowie das Ausnutzen der mukoadhäsiven Polymersysteme von großer Bedeutung [5]. Es ist bekannt, dass der Peptidabbau durch Peptidasen ein wichtiger Prozess für die Produktion der bioaktiven Moleküle oder für ihre Inaktivierung ist. Dieser Vorgang stellt eine große Herausforderung bei der Verwendung der Peptide als Medikament dar. Oft ist der Zielort vom Applikationsursprung des Medikaments weit entfernt und das Peptid soll intakt und möglichst schnell seinen Wirkort erreichen. Dabei beinhaltet der Weg meist das Durchdringen mehrerer biologischer Barrieren, wie z.B. das saure Magenmilieu, die Darmschleimhaut oder apikale und basale Zellmembranen. Für die Aufnahme der di- und tri-Peptide sind die so genannten PEPT1 und PEPT2 Peptidtransporter [6] und für die Translokation der Proteine sowie größerer Moleküle sind spezielle membran-liegende Transportproteine zuständig [7]. Unmodifizierte Peptide zirkulieren im Blut nur wenige Minuten aufgrund der dort herrschenden enzymatischen Abbauprozesse und besitzen deswegen nur eine schlechte biologische Verfügbarkeit im Gewebe und Organen. Dadurch wird die Effizienz der therapeutischen Wirkung eingeschränkt. Indem chemische Modifikationen an den Peptiden angebracht werden, kann die enzymatische Stabilität erhöht und auf diese



Weise eine verbesserte Bioverfügbarkeit erreicht werden [8]. Eine weitere vielversprechende Möglichkeit, die Peptide vor dem Abbau zu schützen und biologische Hürden wie die gastrointestinale Barriere zu überwinden, ist das Design von Nanocarriern. Aufgrund ihrer Instabilität und zum Teil eingeschränkten Durchlässigkeit des Darms, können die meisten Peptide in der medizinischen Praxis leider nur parenteral, unter Umgehung des Verdauungstraktes, verabreicht werden. Diese Darreichung von Medikamenten hat viele Nachteile, wie zum Beispiel Schmerzen nach der Injektion sowie eine kurze Halbwertszeit im Blutkreislauf, welche es notwendig macht, die Dosis zu erhöhen und die Applikation zu wiederholen. Außerdem wird über eine schlechte Patientenverträglichkeit berichtet und sterile Bedingungen müssen vorausgesetzt werden. Dadurch entstehen hohe Betriebskosten, weshalb nach alternativen nicht-invasiven Möglichkeiten der Verabreichung wie auf dem pulmonalen, nasalen, bukkalen, rektalen, okulären, vaginalen, transdermalen und insbesondere dem oralen Weg geforscht wird. Es ist bekannt, dass die orale Route die angenehmste Art der Medikamenteneinnahme darstellt [9]. Tatsächlich zeichnet sich die orale Verabreichung durch niedrige Kosten und die höchste Patienten-Akzeptanz aus, was zu einem großen Fortschritt in der Peptid-Therapie führen würde [5]. Somit stellt die orale Verabreichung von therapeutisch relevanten Substanzen eine der bequemsten und komfortabelsten Routen dar, die die beste Verträglichkeit bei den Patienten zeigt.

## 1.2 Die Gastrointestinale Barriere

Trotz aller bisherigen Anstrengungen, bleibt die Entwicklung eines geeigneten Trägersystems zur oralen Verabreichung der Peptide eine Herausforderung. Aufgrund des restriktiven Charakters des gastrointestinalen Traktes, welcher auf den Abbau der Peptide spezialisiert ist, erschwert dies damit den Transport der Partikel durch die intestinale Mukosaschicht [10]. Es gibt Peptidasen, die vom Pankreas in das Darmlumen freigesetzt werden, sowie zelluläre Peptidasen der mukosalen Zellen, die ständig durch die Mikrovilli sezerniert werden. Die nächste wichtige enzymatische Barriere besteht aus dem Bürstensaum der Enterozytenmembran, der mindestens 15 Peptidasen enthält. Diese weisen eine breite Spezifität auf und sind in der Lage sowohl Proteine als auch Peptide abzubauen. Lysosomale Peptidasen stellen ebenfalls eine Barriere für die Endozytoseprozesse in die Epithelzellen dar. Obwohl der Colon als mögliches Ziel für die Peptidaufnahme in Betracht gezogen wird, deuten Ergebnisse darauf hin, dass das Lumen eine erhebliche Menge an Peptidaseaktivität aufgrund der Enzymproduktion durch Mikroorganismen aufweist [11]. Die extremen pH-Bedingungen und hohe enzymatische Aktivität im GI Trakt sind kritische Parameter, die zu einer Konformationsänderung, Inaktivierung sowie dem Abbau der oral verabreichten Peptide führen können. Diese Prozesse umfassen den hydrolytischen Proteinabbau und chemische Modifikationen aufgrund von Oxidation, Phosphorylierung oder Desamidierung [12]. Es ist bekannt, dass z.B. der Insulinabbau durch die Serinproteasen Trypsin,  $\alpha$ -Chymotrypsin und Metalloproteasen

vermittelt wird [5], während das Sättigungshormon PYY durch Metalloendopeptidasen abgebaut wird [13].

Im Bezug auf die physikalischen und biologischen Barrieren, stellt das erste und wohl das wichtigste Hindernis der Mukus der Darmschleimhaut dar. Fremde Partikel sowie Pathogene werden hier durch Adhäsionskräfte oder sterische Behinderung sehr effizient in der Mukosa zurückgehalten und anschließend mittels physiologischer Reinigungsmechanismen entfernt [1]. Schleimhäute sind Epithelien, die mit Mukus bedeckt sind, bestehen in der Regel aus mehreren Schichten, meist säulen- oder plattenartig geformter Zellen (z.B. Mund- und Nasenschleimhaut, Schleimhaut der Bronchien, der Cornea des Auges). Einschichtige Epithelien sind seltener und z. B. im Darm und im Alveolarbereich der Lunge zu finden. Das Vorliegen als ein Monolayer qualifiziert diese einschichtigen Epithelien besonders für die Absorption von Arzneistoffen. Die orale oder inhalative Darreichung von Arzneistoffen ist immer der primär gewünschte Applikationsweg für neue Wirkstoffe, da für den Erfolg einer Arzneimitteltherapie die Patientenverträglichkeit von entscheidender Bedeutung ist. Die orale Verabreichung ist für den Patienten wie beschrieben am angenehmsten und daher ein bedeutendes Gebiet der Forschung und Entwicklung. Oral applizierte Substanzen werden in der Regel über die Schleimhaut des Dünndarms absorbiert. Einschichtige Epithelien (Abbildung 1) weisen Enterozyten auf, welche die Mikrovilli auskleiden, und dazwischen liegende Goblet Zellen, die für die Muzin-Produktion und somit Schleimbildung zuständig sind. Paneth Zellen sind hierbei Zellen, welche bestimmte Substanzen, wie Lysozyme, Peptidasen sowie Defensine in das Lumen des Dünndarm sezernieren und besitzen daher Funktionen beim Abbau der Nährstoffe bzw. bei der Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen.

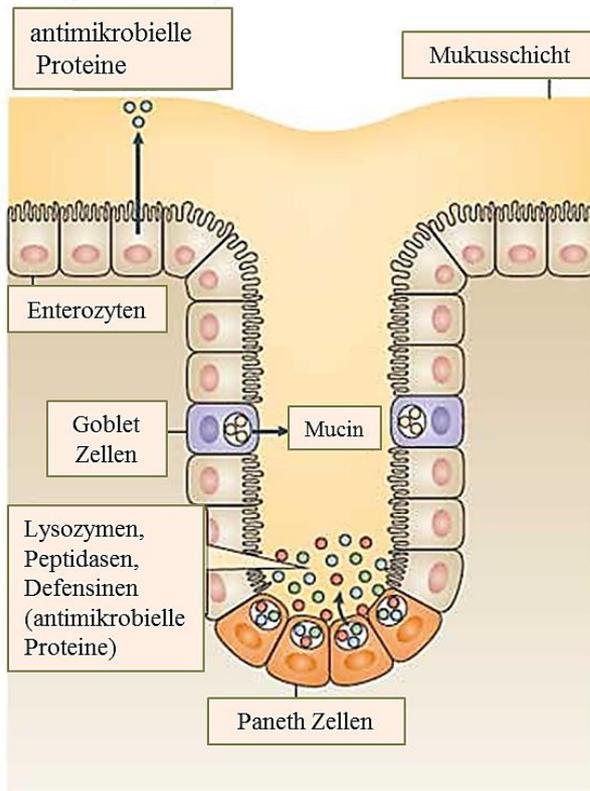


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Epithelwand im Dünndarm. Enterozyten sind die Epithelzellen des Dünndarms, während die Goblet Zellen in einer viel niedrigeren Anzahl vorkommen und für die Schleimproduktion (Mukusschicht) zuständig sind. (Geändert nach [14])

Nachdem die Arzneimittelmoleküle die Mukusschicht überwunden haben, müssen diese im nächsten Schritt die epitheliale Zellwand überqueren. Eine wichtige Eigenschaft der Enterozyten ist, dass diese eine apikale (mukosale) und basolaterale (serosale) Seite aufweisen und somit in der Lage sind einen gerichteten Transport zu betätigen. Dabei sind viele unterschiedliche Transportwege bekannt (Abbildung 2). Der Transport der Moleküle kann auf dem passiven transzellulären, passiven parazellulären Weg, sowie aktiv über eine Transporter-vermittelte Route oder Transzytose geschehen [15].

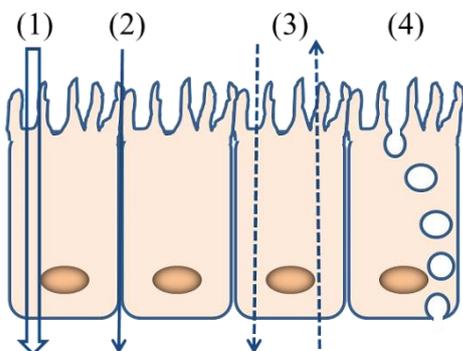


Abbildung 2: Schematische Darstellung der möglichen Transportwege, die die Arzneimittelmoleküle zur Überquerung der Epithelzellen benutzen können. (1) passiv-transzellulär, (2) passiv-parazellulär, (3) aktiv Transporter-vermittelter Weg, (4) Transzytose-Weg.

Die weitere Route führt die Substanzen zu zahlreichen Blutgefäßen, die der Verteilung im Körper dienen sowie zu den in großer Zahl vorhandenen Lymphgefäßen, die für die Immunabwehr verantwortlich sind.

### 1.3 Follikel-assoziiertes Epithel und M-Zellen

Eine weitere besondere Eigenschaft des Dünndarmepithels ist das Vorhandensein der Peyerschen Plaques. Die mukosale Oberfläche wird mit einer immensen Reihe fremder Antigene und Mikroorganismen exponiert, die von außen in das Darmlumen gelangt sind. Diese Antigene werden vom Lumen aus in Richtung organisierter Lymphoidfollikel, dem so genannten Follikel-assoziierten Epithel (FAE), gebracht [16]. Das FAE ähnelt strukturell sehr dem normalen intestinalen Epithel, bei dem die Hauptpopulation durch absorptive Enterozyten in Säulenform mit gut strukturiertem Bürstensaum ausgekleidet wird. Der Unterschied besteht im Phänotyp der Zellen, FAE enthält nur eine eingeschränkte Anzahl an Goblet Zellen und an endokrinen Zellen, was zu einer Verringerung der Mukusproduktion führt. Die Expression der im Bürstensaum integrierten Hydrolasen ist in FAE ebenfalls reduziert [17, 18]. Die lymphoiden Follikel enthalten in der Regel eine Vielzahl von B-Zellen sowie eine kleine Population der follikulären dendritischen Zellen und werden voneinander durch bestimmte Regionen aus T-Zellen und ineinander greifenden dendritischen Zellen getrennt [19]. Darüber hinaus ist die Präsenz der M-Zellen (microfold cells) ein hervorstechendes Merkmal, welches eine zentrale Bedeutung bei der Überwachung des Immunsystems auf der mukosalen Fläche bezüglich der Erkennung und Aufnahme fremder Makromoleküle über den aktiven transepithelialen Transportweg, die Transzytose, besitzt [20, 21].

Zusammengefasst enthält FAE M-Zellen, die eine höhere Transzytoseaktivität aufweisen und in Verbindung mit dem lymphatischen Gewebe stehen. Es ist bekannt, dass die M-Zellen in ihrer Morphologie eine verminderte Expression von Verdauungsenzymen wie der Alkalischen Phosphatase im Vergleich zu den intestinalen Enterozyten aufweisen [22, 23]. Das unterschiedliche Expressionsmuster des Adhäsionsmoleküls  $\alpha 5\beta 1$  Integrin gehört ebenfalls zu einem besonderen Merkmal. Während in den M-Zellen  $\alpha 5\beta 1$  Integrin auf der apikalen Zelloberfläche zu finden ist, liegt dieses bei den Enterozyten auf der basalen Seite [24]. Die M-Zellen sind vor allem für die Aufnahme und Beseitigung der pathogenen Organismen zuständig und sind darauf spezialisiert, die Translokation von Mikroorganismen und von Antigenen aus dem intestinalen Lumen in Richtung basolateraler Epithelseite durchzuführen, wo diese den Makrophagen ausgeliefert werden [25, 26]. Dadurch erfüllen die M-Zellen eine wichtige Funktion bei der immunologischen Abwehr. Es wurde herausgefunden, dass die Peyerschen Plaques vor allem im Jejunum und Ileum des Dünndarms zu finden sind [27]. Weitere Studien haben festgestellt, dass in der Regel nur etwa 10% der gesamten Enterozytenpopulation im Dünndarm die M-Zellen präsentieren [28] und im Falle einer bakteriellen Infektion die Anzahl der M-Zellen sich erhöhen kann

[19, 29, 30]. Der Mechanismus der bakteriellen Internalisation in die M-Zellen ist weitgehend unbekannt. Die auf der apikalen Membran exprimierten Proteine und Oligosaccharide dienen vermutlich als adhärenzte Rezeptoren für Pathogene [31]. Aufgrund dieser Interaktion der M-Zellen mit den Bakterien entstand die Idee die transzytotische Aktivität der M-Zellen für die effizientere Aufnahme der Arzneimittelmoleküle auf dem oralen Weg zu nutzen.

#### **1.4 Adipositas, PYY und therapeutische Ansätze**

Adipositas ist gekennzeichnet durch eine übermäßige Gewichtszunahme aufgrund einer Fettansammlung im Körper. Diese kann in der Regel auftreten, wenn die Person mehr Energie in Form von Nahrung, als der Körper verbraucht, aufnimmt. In der Praxis erfolgt die Klassifikation der Fettleibigkeit über den Body-Mass-Index (BMI), wobei der BMI als der Quotient aus Gewicht durch das Quadrat der Körpergröße definiert wird. Übergewicht wird diagnostiziert, sobald der BMI den Wert 25 bis 29,9 kg/m<sup>2</sup> und Adipositas ab BMI  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup> erreicht [32]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) berichtet, dass im Jahr 2014 global gesehen etwa 39% der Weltbevölkerung ab dem 18. Lebensjahr ein Übergewicht und 13% Adipositas aufweisen. Es wurde nachgewiesen, dass die Gewichtszunahme in einem engen Zusammenhang mit vielen anderen Erkrankungen wie beispielsweise Diabetes Typ II, Hypertonie, hohe LDL Cholesterin mit niedrigen HDL Cholesterin- Werten, koronare Herzkrankheiten, Schlaganfall, Leiden der Gallenblase, Osteoarthritis, Schlafapnoe sowie Atmungsprobleme und starke physiologische Einschränkungen auftritt [33, 34].

Es gibt mehrere Ursachen, die zur Fettleibigkeit führen können. Oft spielt die Ernährungsweise, bei der zu viele Kalorien meistens in Form von fett- und zuckerhaltigen Produkten zugeführt werden in Kombination mit zu wenig körperlicher Aktivität eine bedeutende Rolle. Ebenso sind genetische und epigenetische sowie hormonelle Faktoren in die Kontrolle der Energiehomöostase involviert [32]. Hierbei wurden bereits Gene, die an der Vererbung der Fettsucht beteiligt sind, identifiziert. Im Jahr 2008 sind bereits 14 monogenetische und 4 polygenetische Gene bekannt gewesen [35, 36]. Eine besondere Bedeutung wird den epigenetischen Faktoren zugeschrieben, welche aufgrund chemischer Veränderungen wie Methylierung sowie Acetylierung der DNA oder der Histone die Aktivität eines Gens beeinflussen, ohne dessen Sequenz zu verändern. Besonders anfällig ist der Organismus in der intrauterinen und der frühen postnatalen Phase. Eine ebenso wichtige Rolle spielt die mikrobiotische Besiedlung des Darms, dessen Veränderungen im intestinalen Mikrobiom zu einer Änderung des menschlichen Stoffwechsels, der mit der Genexpression verbunden ist, führt. Es wurde beobachtet, dass es bei den Erwachsenen mit Adipositas zu einer Reduzierung der bakteriellen Diversität kommt [37].

Die Kontrolle des Energiegleichgewichts unterliegt komplexen Vorgängen, bei denen das zentrale Nervensystem und die peripheren neurohormonellen Signale aus den Fettgewebszellen, wie Leptin, Adiponektin, TNF-Alpha oder Resistin im engen Kontakt stehen. Unter anderem sind

weitere Hormone bekannt: Ghrelin, Peptid YY (PYY), Glucagon-like-Peptid 1 (GLP-1), gastro-intestinales Peptid (GIP) und Cholecystokinin, die aus dem gastrointestinalen Trakt freigesetzt werden, sind an der Interaktion und somit an der Regulation des Sättigungsgefühls beteiligt [38]. In dieser Arbeit wird näher auf das Peptid Tyrosin-Tyrosin (PYY) eingegangen, dessen Name aufgrund der an den beiden Enden des Peptides stehenden Tyrosine gegeben wurde. Das PYY ist ein enteroendokrines Hormon, das an der Pathogenese der Obesität bei Mensch und Nagetieren beteiligt ist [39, 40]. Es ist ein Mitglied der Familie der Neuropeptide Y und wird von den endokrinen L-Zellen des distalen gastrointestinalen Traktes (vor allem im Ileum) nach Einnahme einer Mahlzeit freigesetzt [39]. Es sind zwei endogene Formen des PYY vorhanden: PYY 1-36 und PYY 3-36, wobei das PYY 3-36 durch Abspaltung der beiden N-terminal liegenden Aminosäuren durch das Enzym Dipeptidylpeptidase IV entsteht. Dadurch wird das pharmakologisch aktivere Peptid synthetisiert, das in höherer Menge im Blut zu finden ist [41, 42]. Das PYY 3-36 liegt als Hauptform bei Menschen vor und wird postprandial nach einer Mahlzeit produziert. Die Verteilung im Körper geschieht über den Blutkreislauf [43]. Es wurde festgestellt, dass bereits 15 min nach der Essenaufnahme eine Steigerung von PYY im Plasmaspiegel nachweisbar ist und nach 60 min ihr Maximum erreicht. Insgesamt bleibt das PYY für etwa 6 Stunden erhöht [44]. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Nahrungszusammensetzung im engen Zusammenhang mit der Zunahme an PYY im Blut steht. Fettreiche Kost ist ein deutlich stärkerer Stimulus zur Freisetzung des PYYs [45]. Durch das Blut gelangt das zirkulierende PYY zum zentralen Nervensystem und entfaltet seine Wirkung im Hypothalamus durch die Bindung an die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Während das PYY 1-36 in voller Länge an die Y1, Y2 und Y5 Rezeptoren andockt, aktiviert das PYY 3-36 den Y2 Rezeptor und reguliert somit die Energiehomöostase [38, 46]. Der Effekt der Aktivierung des Y2R äußert sich durch Inhibition der cAMP Produktion [47]. Die Calcium-vermittelte Signalübertragung ist ebenfalls reduziert, was vermutlich die Exozytose von Neurotransmitter stört [48]. Es konnte bestätigt werden, dass es eine Korrelation zwischen PYY und Adipositasmarkern in Menschen gibt. Bei Patienten mit Adipositas lässt sich nach Nahrungsaufnahme nur ein gedämpfter Anstieg des PYY-Plasmaspiegels feststellen, während bei den Patienten mit Anorexia nervosa die Menge an zirkulierendem PYY deutlich erhöht ist [49]. PYY ist an der Steigerung der Lipolyse und der Thermogenese beteiligt und spielt somit eine bedeutende Rolle bei der Appetitregulation [50]. Die Aktivierung der Gehirnrezeptoren mittels PYY führt zur Hemmung der Magenmotilität sowie zur Sekretin- und Cholecystokinin-stimulierten pankreatischen Sekretion und verzögert somit die Magenentleerung. Diese Prozesse vermitteln ein Sättigungsgefühl und somit eine Reduzierung der Nahrungsaufnahme. Es ist noch unklar, ob die allgemeinen genetischen Variationen sowie der seltene Single-Nucleotid Polymorphismus auf dem humanen PYY-Genlocus die Biosynthese oder weitere metabolische Merkmale beeinflussen und dadurch in einem Zusammenhang mit Fettleibigkeit stehen. Tatsächlich gibt es einen Zusammenhang zwi-

schen niedrigem Plasmalevel des PYYs und hohen BMI-Werten. Die genetische Variante PYY 3'-UTR bindet jedoch im Gehirn an die Y2 Rezeptoren und induziert eine Appetitsteigerung, die mit einem Anstieg des BMI-Wertes korreliert [51]. Hierbei wurde gezeigt, welchen Einfluss die kleinsten Veränderungen auf genetischer Ebene bezüglich der Regulation des Stoffwechsels im Körper ausüben können.

Zur Behandlung der Adipositas sind bereits viele Lösungsansätze entwickelt worden [52]. Zum einen wird versucht über eine kalorienärmere Nahrungsaufnahme und viel körperlicher Bewegung eine Gewichtsreduktion zu erreichen. Dabei wird darauf geachtet, dass auf fettreiche und kohlenhydratreiche Mahlzeiten verzichtet wird. Eine weitere Strategie ist die Verhaltenstherapie, bei der Selbst-Monitoring der Essgewohnheiten gegenüber der körperlichen Aktivität, Stress-Management, kognitive Restrukturierung und soziale Unterstützung im Vordergrund stehen. Die Kombination von diesen Therapien bietet dabei das erfolgreichste Ergebnis. Bei extrem übergewichtigen Patienten wird ein anderer Lösungsansatz angewendet, bei dem die bariatrische Chirurgie mittels eines operativen Eingriffs eine Verkleinerung des Magens erzielt oder durch das Einsetzen eines verstellbaren Magenbands die Reduzierung der Nahrungsmenge unterstützt wird. Hierbei ist die Magen-Bypass-Operation heutzutage die am meisten praktizierte Methode, um eine Gewichtsabnahme bei adipösen Menschen zu erleichtern. Dabei gibt es eine Reihe von Vor- und Nachteilen. Als Vorteil erweist sich hierbei eine signifikante Gewichtsreduktion um bis zu 70%. Die Operation wirkt sich ebenso positiv auf Komplikationen wie Säure-Reflux, Hypertonie sowie Schlafapnoe aus. Nachteilhaft ist jedoch, dass aufgrund der Verlegung des Duodenums es zu einer verringerten Absorption von Eisen und Calcium kommt. Das Fehlen dieser Mineralien kann zu einer Anämie und Knochenkrankheiten führen, so dass die Patienten gezwungen sind Vitamine und Zusatzstoffe einzunehmen. Brechreiz, Schweißausbrüche und schneller Herzschlag gehören zu den negativen Merkmalen und sind ebenfalls als potenzielle Nachteile zu sehen.

Die Pharmakotherapie kann bei der Gewichtsreduktion unterstützend wirken. Bis jetzt sind zahlreiche Medikamente, die durch die FDA (Food and Drug Administration) zugelassen sind, zur Behandlung der Adipositas entwickelt worden. Das sind zum Beispiel Sibutramin, Orlistat und Beta-Methyl-Phenylethylamin. Das Medikament Beta-Methyl-Phenylethylamin ist ein Stimulanz, das den Fettmetabolismus erhöht. Im Fall des Orlistats handelt es sich um einen Fettabsorptions-Blocker, der in der Lage ist bis zu 30% des Fetts zu resorbieren. Bei Einnahme der Medikamente muss auf die Nebenwirkungen geachtet werden. Bei dem Sibutramin wurde z. B. ein erhöhter Blutdruck festgestellt. Die Einnahme von Orlistat verursacht oft eine Malabsorption der fettlöslichen Vitamine, die dann zusätzlich eingenommen werden müssen, um den Effekt zu kompensieren [32, 34].

Wie bereits oben ausführlich beschrieben, ist PYY 3-36 ein Sättigungshormon, das an der Appetitregulation und Energiehomöostase beteiligt ist. Bei übergewichtigen Patienten mit Adiposi-

tas wirkt es appetithemmend und zeigt keine induzierte Resistenz. Aus diesem Grund wurde das Hormon PYY eines der wichtigsten pharmakologischen Ziele in der Adipositasforschung und Gegenstand zahlreicher klinischer Studien. Die ersten Studien haben gezeigt, dass eine 90-minütige Verabreichung des PYYs über die peripher intravenöse Infusion zu einer 33%-igen Reduzierung der Energieaufnahme im Vergleich zum entsprechenden Placebo führt und diese über 24 h anhält [39, 52]. Besonders interessant ist, dass während der Infusion die zirkulierende PYY-Menge vergleichbar mit den physiologischen postprandialen Werten war und keine Nebenwirkungen registriert wurden. Bei der intravenösen Applikation des PYYs 3-36 wurde eine von der Dosis abhängige Reduzierung der Nahrungsaufnahme bewirkt [53]. Eine weitere Studie zeigte ebenfalls eine reduzierte Nahrungsaufnahme nach der intravenösen Verabreichung des PYYs 3-36 [50]. Allerdings kam es hierbei häufig zu Nebenwirkungen wie Brechreiz, gesteigerte Thermogenese und Lipolyse, die ein Zeichen für den gesteigerten Energieverbrauch ist [50]. Zusammengefasst kann das intravenös verabreichte PYY 3-36 einen positiven Effekt auf die Appetitregulation ausüben und demonstriert somit seine potenzielle Anwendung bei der Behandlung von Adipositas.

Bei der Entwicklung eines Medikaments gegen Adipositas auf Basis des Peptidhormons PYY wurden unterschiedliche Strategien, wie eine subkutane und nasale Verabreichung, getestet. Mehrere Peptidhormone haben bereits nach der subkutanen Applikation einen Effekt demonstriert, wobei der am meisten bemerkenswerte durch Insulin beobachtet wurde. Allerdings konnten die ersten Studien der subkutanen Verabreichung des PYYs 1-36 und PYY 3-36 beim Menschen nicht den erwünschten Effekt auf die Nahrungsaufnahme bewirken [54]. Es wird vermutet, dass es dafür mehrere Ursachen gibt. Hierzu zählen eine niedrige Dosis und der Abbau sowie die biologische Inaktivierung des Peptidhormons nach der subkutanen Verabreichung.

Die nasale Mukosa weist eine sehr gute Gefäßversorgung auf, was nach Inhalation zu einer schnellen Absorption führt. Bei der näheren Betrachtung ist die Aufnahme der Medikamente jedoch aufgrund der mukoziliären Barriere eingeschränkt. Die großen Peptidmedikamente sind nicht in der Lage dieses Hindernis ohne die Unterstützung von disruptiven Mitteln zu überwinden [55]. Eine 12-Wochen Studie in Phase II aus dem Jahr 2008 zeigt nach Verabreichung des PYYs 3-36 mittels eines nasal Sprays eine Intoleranz, welche Übelkeit, Brechreiz und abdominale Beschwerden verursachte [56].

Die Beispiele zeigen, dass im Fall des PYYs noch keine geeignete Lösung zur Behandlung der Obesität gefunden wurde.

Der nächste Schritt ist die Entwicklung eines PYY-haltigen Medikaments zur oralen Applikation. Im postprandialen Zustand bewirkt das Hormon PYY über die vagalen Afferenzen des Darms eine Vermittlung des Sättigungsgefühls [57]. Im Fall der oralen Verabreichung kann der physiologische Zustand nach Essensaufnahme besser nachgeahmt werden, da PYY selbst aus dem distalen Darmbereich sekretiert wird. Somit bietet die orale Einnahme des PYY-haltigen



Medikaments einen Vorteil gegenüber anderen Methoden. Es gibt jedoch einige Hürden wie die saure Umgebung des Magens und die Anwesenheit von Verdauungsenzymen aus der Bauchspeicheldrüse, welche die orale Verabreichung des Hormons erschweren bzw. fast unmöglich machen. Um diese Hürden zu überwinden, bietet die Nanotechnologie einzigartige Lösungswege. Vor kurzem hat das Unternehmen Emisphere das neue PYY-haltige Präparat Eligen an menschlichen Probanden getestet. Die Eligen-Methode basiert auf Kopplung der Peptide an Natrium-N-Caprylat. Dieses Transporter-Molekül besitzt hydrophobe Eigenschaften und erzeugt dadurch einen Wirkstoff-Träger Komplex mit lipophilen Eigenschaften, der den Transport durch die Membran erleichtert. Dadurch liegen die Peptide in geschützter Form vor und das Natrium-N-Caprylat erleichtert die intestinale Absorption. Die Studien in Phasen I und II demonstrierten eine wirksame Resorption aus dem Darm und eine 12%ige Reduzierung der Nahrungsaufnahme im Vergleich zum Placebo, bei dem der Träger alleine eingesetzt wurde. Außerdem wurde nach der Einnahme des Medikaments keine Übelkeit beobachtet [39, 52, 58].

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass nach einer intravenösen Applikation des PYYs 3-36 eine Dosis-abhängige Reduzierung der Nahrungsaufnahme, jedoch mit Nebenwirkungen wie Übelkeit, zu verzeichnen ist. Die Entwicklung der PYY-haltigen Wirkstoffe auf Basis der Nanotechnologie zur oralen Verabreichung demonstriert somit ein hohes Potenzial zur Behandlung der Adipositas.

## 1.5 Nachweisverfahren für humanes PYY

Die Detektion des humanen PYYs nach der Transzytose erfolgt mittels ELISA Kits von Millipore, wobei die Durchführung nach Anleitung des Herstellers erfolgt. Dieses Nachweisverfahren basiert auf der Grundlage, das Zielprotein mittels spezifischer Antikörper zu detektieren, wobei das Peptid zwischen den beiden AK gebunden wird (Abbildung 3). Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, weswegen diese Methode in der Regel als Sandwich-ELISA bezeichnet wird. Der zweite Antikörper wird mit einem Reporterenzym wie z.B. Meerrettich Peroxidase markiert und ist somit in der Lage ein Substrat wie Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Reaktionsprodukt umzusetzen. Die Absorption durch den Farbumschlag kann am Spektrometer gemessen werden. Für die Erstellung einer Kalibrierungskurve dient eine Reihe bekannter Proteinkonzentration als Standard.

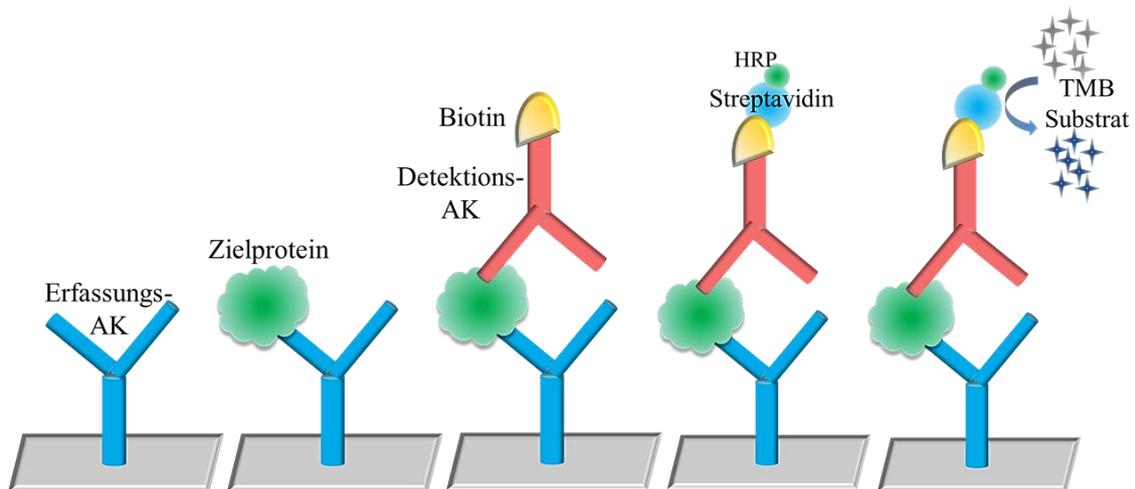


Abbildung 3: Das Prinzip eines ELISA Verfahrens zur Detektion eines Proteins. Zu Beginn bindet das Zielprotein an den Erfassungs-AK (Antikörper) während der Detektions-AK das Protein markiert. Das Reporterenzym HRP (Meerrettichperoxidase), das an den Detektions-AK bindet, oxidiert anschließend das Substrat TMB (Tetramethylbenzidin).

## 1.6 Nanomaterialien und das Polysaccharid Chitosan

Die Forschung an den Polymeren bezüglich ihrer Eigenschaften wie biologische Abbaubarkeit, Biokompatibilität, vielseitige und vorhersagbare Abbaukinetik ist ein aktuelles Thema der Polymerwissenschaft. In den vergangenen Jahrzehnten wurden bioabbaubare Polymere als potenzielle Träger für Proteine und Peptide [59], Makromoleküle, Gene [60], Hormone [61] und Kontrastmittel [62] entwickelt. Dabei wird zwischen Liposomen, Nanopartikel und festen Lipidnanopartikel als Trägersysteme unterschieden. Diese sollen im Idealfall folgende Eigenschaften aufweisen:

- Keine Toxizität,
- Chemisch und physikalisch stabil,
- Biologisch abbaubar,
- Kontrollierte und langanhaltende Freisetzung im Zielgewebe,
- Günstig und einfach in der Herstellung.

Es wird zwischen nativen Polymeren, wie Humanem Serumalbumin (HSA) [63, 64], Gelatine [65, 66] und Chitosan [67] sowie synthetischen Polymeren, wie Poly(methylmetacrylat) (PMMA) [68, 69], Polymilchsäure (PLA) [70], Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) [70] und Poly(alkylcyanoacrylat) (PACA) [71, 72] unterschieden.

Der Einsatz von Polymeren unterstützt dabei die Aufrechterhaltung der Arzneimittelkonzentration im Plasma im stationären Zustand, so dass die Dosis und Dosierungsfrequenz herabgesetzt werden kann. Somit werden Nebenwirkungen durch die Medikamente reduziert. Die Dosis des parenteral verabreichten Hormons Leuprorelin kann, wenn es in PLA oder PLGA geladen wurde, bis auf 1/8 im Vergleich zum freien Leuprorelin, reduziert werden [73]. Der Einsatz der Polymere als Transporter für therapeutische Wirkstoffe ist sehr weit verbreitet, wobei diese

meistens ortsspezifisch im Darm, in der Leber, den Nieren, Lungen, dem Gehirn oder Herz verwendet werden [74]. Die Verabreichung der Proteine allein stellt eine große Herausforderung aufgrund ihrer eingeschränkten oralen biologischen Verfügbarkeit aufgrund der epithelialen Barriere des gastrointestinalen Trakts, der Anfälligkeit gegenüber Verdauungsenzymen und der kurzen Halbwertszeit *in vivo* dar. Die Proteine werden meistens über eine invasive Route wie beispielsweise der subkutanen Infusion verabreicht. Weiterhin erfordern diese Maßnahmen eine wiederholte Infusionsgabe, um eine effektive therapeutische Wirkung zu erreichen [75]. Die Verpackung der Proteine, beispielsweise in PLGA- Nanopartikel, bietet also eine vielversprechende Alternative, solche Probleme wie den enzymatischen und hydrolytischen Abbau zu überwinden [74].

Die Nanomedizin entwickelte erfolgreiche Trägersysteme gegen Krankheiten wie Krebs [76], Diabetes [77], Malaria [78], AIDS [66], Tuberkulose [79] und Prionenkrankheit [80], die sich noch in den Testphasen befinden oder bereits kommerziell zu erwerben sind [81, 82]. Die Arzneimittelformulierung hängt von der Wahl des passenden Polymers ab, um eine maximale Verkapselung zu erreichen. Die Aufnahme der Wirkstoffe bzw. der Nanokapseln hängt von der Partikelgröße, Oberflächenladung, Oberflächenmodifikation und hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften ab. Es wurde gezeigt, dass die kationischen Substanzen eine Interaktion mit der negativ geladenen Zelloberfläche eingehen können und somit eine bessere zelluläre Aufnahme bewirken [83]. Unter den Polymeren erwies sich Chitosan als ein sehr gut geeignetes natives Polysaccharid. Aufgrund seiner Eigenschaften wie Biokompatibilität, starker Mukoadhäsion und Verbesserung der parazellulären Durchlässigkeit [84-86] stellt Chitosan ein potenzielles Trägersystem dar. Die Verpackung der Peptide in Chitosan schützt diese vor der sauren Umgebung des gastrointestinalen Trakts sowie vor Verdauungsenzymen, bis diese von den Enterozyten absorbiert werden. Zusätzlich wird die mukoadhäsive Eigenschaft des Chitosans für einen direkteren und verlängerten Zellkontakt benutzt [87-89].

Chitosan kann Insulin entweder auf dem nasalen [90] oder oralen Weg [85] erfolgreich transportieren, wobei das Insulin seine Wirkung am Zielort erfolgreich entfalten kann. Die nasal applizierte Lösung mit dem kationischen Polymer Chitosan zeigt eine verstärkte Absorption des Insulins durch die nasale Mukosaschicht bei Ratten und bei Schafen. Der ermittelte Effekt ist konzentrationsabhängig, reversibel und bei optimaler Effizienz höher als 0,2% für Ratten und 0,5% für Schafe [90]. Nach einer peroralen Verabreichung von Chitosan/HPMCP-NP kann dies einen 9,8-fach stärkeren Anstieg der hypoglykämischen Wirkung des Insulins im Vergleich zu einer freien Insulinlösung erzielen [85]. Weitere Studien haben festgestellt, dass nach oraler Verabreichung der Chitosan-Insulin-NP bei Ratten eine bis zu 20-fach höhere Insulinaufnahme in Vergleich zum freien Insulin in Peyerschen Plaques gemessen werden [91]. Alle bis jetzt entwickelten Systeme auf Chitosan-Basis werden als DNA-Träger [67] sowie siRNA-Transporter [92, 93] oder zur Insulinverabreichung gegen Diabetes [85] verwendet. Des Weiteren

ren werden Chitosan-NP zur Krebstherapie entwickelt. Es wird berichtet, dass Doxorubicin/methoxy PEG enthaltende Chitosan-NP mit in die Zellen aufgenommen werden und dort mit einer hohen Effizienz die Proliferation der Tumorzellen inhibieren können [94].

Chitosan kann auch allein nach oraler [95] oder subkutaner [96] Verabreichung beim Mensch zu einer Gewichtsreduktion führen. Des Weiteren ist bekannt, dass das hydrophile Peptid YY (PYY) als Sättigungshormon im Körper eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Essensaufnahme spielt [38, 39]. Somit kann die Kombination aus Chitosan als schützende Hülle und gleichzeitig als Träger des Peptids PYY eingesetzt werden, womit die Effizienz des gegen Adipositas eingesetzten Wirkstoffs verbessert wird. Weitere Vorteile des Chitosans für dieses System ist seine starke Mukoadhäsion und Biokompatibilität. In dieser Arbeit wird ein Konzept entwickelt das PYY von pH-regulierten Chitosan-basierten Nanoträger zu liefern und freizusetzen [97]. Um diese beiden Komponenten zu kombinieren, ist eine Polyelektrolytkomplex-Methode entwickelt worden. Dabei erfolgt eine Verkapselung des hydrophilen Peptids PYY in Chitosan über den Wasser-in-Öl Miniemulsionsprozess. Im zweiten Schritt soll die Verstärkung des Polyelektrolytkomplexes durch eine kontrollierte Grenzflächenvernetzung stattfinden [97]. Dadurch wird das PYY effizient eingekapselt und kann infolge der im Magen-Darm Trakt bestehenden Bedingungen freigesetzt werden. Solche Trägersysteme sind vielversprechende Kandidaten bei der Therapie gegen Adipositas und werden im Allgemeinen für die orale Verabreichung der Wirkstoffe auf Peptidbasis verwendet.

## **1.7 Strategien zur Verbesserung der Adsorption, Aufnahme und Transzytose der NP**

Es sind mehrere Strategien zur Verbesserung der biologischen Verfügbarkeit und oralen Aufnahme der Nanomaterialien entwickelt worden. Zu den bekannten gehören die Erhöhung der Durchlässigkeit der gastrointestinalen Barriere, chemische Modifikation der Polymere, Einsatz von Enzyminhibitoren sowie die Verkapselung der Wirkstoffe in mukoadhäsive Polymere wie z.B. Chitosan [1]. Eine weitere erfolgreich eingesetzte Methode, um die Wirkstoffe effektiver an ihren Zielort zu bringen, ist das Ausnutzen von Rezeptor-vermittelten Endozytosewegen oder reversibel bindenden mukoadhäsiven Proteinen.

Hierbei wurden bereits unterschiedliche Molekültypen getestet, wobei die am meisten untersuchten die aus der Familie der Lektine sind. Lektine sind natürliche Proteine bzw. Glycoproteine, die in der Lage sind, reversibel und spezifisch an Zucker zu binden und somit zu einer Agglutination bzw. Verschmelzung der Zellen mit den Polysacchariden führen [98, 99]. Diese sind vielseitig bei der Zellerkennung und bei Adhäsionsprozessen involviert. Ihre Konjugation an die Nanopartikel erhöht signifikant den Transport durch die intestinale Mukosaschicht aufgrund der verstärkten Interaktion mit Schleim [100] und der Oberfläche der Epithelzellen [101]. Grundlagenforschung zeigte, dass manche Lektinarten aufgrund ihrer Eigenschaften eine verbesserte

Mukoadhäsion, Zytoadhäsion und Aufnahme der Partikel in die Zellen vermitteln können. Oberflächenmodifikationen der Liposomen mittels WGA, Concanavalin A oder Agglutinin aus Sojabohnen bewirken dabei eine 6-11-fach stärkere Bindung an A549 [102]. WGA (Wheat Germ Agglutinin) ist ein positiv-geladenes Lektin, das in *Triticum vulgare* vorkommt und eine homodimere Struktur bei 36 kDa aufweist [103]. Eine typische Eigenschaft des WGA ist die spezifische Bindung an N-Acetyl-D-Glucosamin sowie Sialinsäure, die im intestinalen Bereich zahlreich beobachtet wurde [102]. Weiterhin gibt die Färbung der fixierten Präparate des humanen Magengewebes Hinweise darauf, dass die oberflächlich gelegenen Mikrovilli positiv aufgrund der vorhandenen Sialinsäure markiert werden, während der extrazelluläre Mukus negativ bleibt [104]. In anderen Studien wurde festgestellt, dass die zelluläre Aufnahme der mit WGA funktionalisierten Nanopartikel mit einer Bindung des Lektins an einen spezifischen Rezeptor beginnt. Die anschließende Endozytose geschieht über Clathrin- und Caveolae-vermittelte Wege [105]. Außerdem haben Tests gezeigt, dass WGA keinen toxischen Effekt auf die differenzierten Caco-2 Zellen aufweist [106]. Somit wird deutlich, dass mithilfe der Funktionalisierung der Nanomaterialien mittels Lektinen eine Steigerung der biologischen Verfügbarkeit und eine verbesserte Aufnahme nach einer oralen Applikation erzielt werden kann [107].

Es sind mehrere Rezeptoren identifiziert worden, die das Eindringen in die Zellen beispielsweise von pathogenen Mikroorganismen und pflanzlichen Lektinen, vermitteln. Weiterhin spielen Rezeptoren bei der Aufnahme der für die Zellen bzw. den Körper relevanten Substanzen eine wichtige Rolle. Die Internalisierung des Eisens geschieht über den Transferrinrezeptor, während viele biologische Moleküle wie IgG oder IgA den Weg in die Zelle über die Fc Rezeptoren verfolgen [108]. Während die Vitamine A, D, E und K mithilfe der mit der Nahrung aufgenommenen Fette absorbiert werden, gelangen die kleinen wasserlöslichen Vitamine wie Vitamin C, Thiamin, Riboflavin, Biotin, Folsäure meistens durch Diffusion in den Körper. Vitamin B12 ist ein größeres Molekül und benötigt das Helfermolekül Haptocorin aus dem Speichel, einen intrinsischen Faktor aus Belegzellen des Magens, sowie den spezifischen Rezeptor Transcobalamin II [109]. Das aufgenommene Vitamin B12 wird im Darm an intrinsische Faktoren gebunden. Dieser Komplex interagiert dann mit dem Rezeptor der Epithelzellen des Dünndarms im Ileum und wird internalisiert. All diese Faktoren sind wichtig für den Transport sowie die Aufnahme von Vitamin B12 und folglich für den Transzytoseprozess der mit dem Vitamin B12 funktionalisierten Nanopartikel durch die Darmwand von Bedeutung. Um eine höhere Effizienz bei der Aufnahme der Nanopartikel zu erzielen, kann die Eigenschaft der Rezeptor-vermittelten Endozytose ausgenutzt werden, wie in diesem Fall unter Verwendung von Vitamin B12 [108].

Es wurde bereits berichtet, dass durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose mittels Vitamin B12 eine 4-fach bessere Aufnahme des Erythropoetins oder des Granulozyten-Koloniestimulierenden Faktors, erzielt werden kann [108, 110]. Weiterhin wurden signifikante Fortschritte bei der oralen Verabreichung der Peptide, welche in das Vitamin-B12-Aufnahmesystem

eingebunden sind, [111, 112] sowie der Folatabsorption [113, 114] gemacht. Einige Studien haben einen verbesserten Transport von Polysciences Nanopartikel durch die Caco-2 Zellen, die mit Vitamin B12 funktionalisiert wurden, demonstriert [108, 115]. Es wurde nachgewiesen, dass die humanen Kolon-Adenokarzinom Zellen in der Lage sind, sowohl den Cobalamin-Rezeptor, als auch Transcobalamin II, das für den weiteren Transport von Vitamin B12 in der Zelle benötigt wird, zu exprimieren. Die Expression dieser Komponenten stieg am 6. Tag und erreichte das höchste Level zwischen Tag 10 und 15 in der Zellkultur [116]. Durch Studien wurde nachgewiesen, dass die mit Insulin gefüllten Nanopartikel nach Konjugation mit dem Vitamin B12 an der Oberfläche eine verbesserte Adsorption sowie Aufnahme des Insulins nach oraler Verabreichung aufweisen [111, 117-119].

### **1.8 Das zelluläre *in vitro* Modell der intestinalen Barriere mit FAE**

Eine *in vitro* Kultivierung der Zellen zur Modellierung der biologischen Barrieren ist eine Hauptmethode verschiedener Forschungsbereiche, wie beispielsweise in der pharmazeutischen Wissenschaft, der Toxikologie sowie der regenerativen Medizin. Neben der Anwendung in der Wissenschaft wird dieser Vorgang auch in der Industrie angewendet. Um die Zelltypspezifischen Fragen zu beantworten, wurde über viele Jahre an den unterschiedlichen Zellkulturtechniken und Zellen, welche in einer Monoschicht auf Gewebekulturplastik kultiviert wurden, geforscht. Schließlich konnten Lösungsansätze identifiziert werden, um den speziellen Anforderungen gerecht zu werden, wodurch *in vitro* Systeme mit großer Ähnlichkeit zu den *in vivo* Bedingungen geschaffen werden konnten. Die Erfindung der Zellkultureinsätze aus porösen Membranen hat zu einer wesentlichen Verbesserung bei der Kultivierung von polarisierten Epithelzellen beigetragen. Die im Handel erhältlichen permeablen Träger (z.B. Transwell® System), bestehend aus den mikroporösen Membranen, sind heutzutage der Goldstandard für die Nachahmung der biologischen Barriermodele *in vitro*. Meistens bestehen diese Membranen aus Polycarbonat oder Polyester und weisen eine definierte Porengröße auf. Das Wachstum der Zellen auf einem durchlässigen Träger ermöglicht, eine dem *in vivo* Zustand sehr ähnliche physiologische Zelldifferenzierung zu schaffen, welche hinsichtlich der morphologischen Merkmale und metabolischen Prozesse in den Zellen, mit den *in vivo* Bedingungen korreliert. Darüber hinaus erlauben diese durchlässigen Membranen eine Analyse von Permeabilitäts- und Transportstudien bei Medikamenten, Biomolekülen und partikulären Trägersystemen durch die intestinale Zellbarriere [120].

Die humane intestinale Caco-2 Zelllinie ist bereits über viele Jahrzehnte sehr ausgiebig verwendet worden, um das Modell der intestinalen Barriere nachzuahmen. Diese Zellen stammen ursprünglich von den humanen Adenokarzinom-Epithelzellen des Colons. Diese zeigen in Kultur eine spontane Differenzierung, die zur Bildung einer zellulären Monoschicht führt. Diese weist die Expression einiger morphologischer und funktioneller Merkmale, die für die reifen Entero-

zyten typisch sind, auf. Nach Erreichen der Konfluenz beginnen die Caco-2 Zellen sich zu polarisieren und zu differenzieren. Die Ausbildung der Tight Junctions und Entwicklung der Mikrovilli auf der apikalen Seite zeichnen dabei die weitere Differenzierung aus. Manche Studien haben gezeigt, dass die Expression des Enzyms Intestinale Alkalische Phosphatase (IALP), ebenfalls ein typisches Merkmal für die Reifung der Enterozyten nach der Differenzierung ist [121]. Dieses membranständige Bürstensaumenzym ist für die Hydrolyse der Monophosphates-ter zuständig und trägt zu einer effektiveren Verdauung und Absorption der Nährstoffe im Darm bei [122-124]. Weiterhin ist bekannt, dass sich der Grad der Reifung der epithelialen Zellen wie Caco-2 durch eine starke Ausbildung der Mikrovilli an der apikalen Zelloberfläche am 12.-14. Tag der Kultivierung auszeichnet [125]. Die in großer Vielzahl vorhandenen Mikrovilli präsentieren die typischen Eigenschaften einer morphologischen und funktionellen Differenzierung der reifen Epithelzellen [126-128].

Ein neuer Ansatz mittels der Proteomanalyse hat das Expressionslevel der Proteine in Bezug auf die biochemischen Prozesse in den ausdifferenzierten Zellen untersucht. Die Studien haben gezeigt, dass die Caco-2 Zellen während der Differenzierung von Kolon-Karzinomzellen zu Dünndarmzellen einen deutlichen Unterschied bei der Expression der Proteinen hinsichtlich des Fettsäurestoffwechsels [129], der Fibronektinverteilung [130] und des Wirkstoffmetabolismus [131] aufweisen. Zusätzlich ist die Expression der Proteine, die an der Proteinfaltung in verschiedenen Kompartimenten und an der Glykolyse beteiligt sind, ebenfalls verändert. Bei weiteren biochemischen Prozessen, wie bei ATP-abhängigen Reaktionen, welche mit Kreatin- und Nucleosiddiphosphat-Phosphorylierungen einhergehen ist eine Änderung im Expressionsmuster erkennbar. Dies stellt *in vitro* einen Differenzierungsprozess der Caco-2 von Kolonepithelzellen zu den reifen Enterozyten dar. Hierbei wurde am Tag 10 der Postkonfluenz eine 3-fache Erhöhung der Aktivität des Enzyms Kreatin-Kinase und eine 3-fache Reduktion des Expressionslevels der Nucleosiddiphosphat-Kinase detektiert [132]. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) erhöhte sich von einem nicht-detektierbaren Niveau am Tag 3 bis auf 120 mU/mg Protein am Tag 18 der Postkonfluenz [132]. Der Anstieg der Aktivität des Enzyms ALP ist ein typisches Merkmal für reife Enterozyten. Ein weiteres Zeichen für eine erfolgreiche Wandlung der Caco-2 Zellen zu reifen Enterozyten wurde anhand der erhöhten Expression der Gluthation S-Transferase A1 (GTA1) und der reduzierten Expression des translatorisch kontrollierten Tumorproteins (TCTP) sowie des in mitochondrialer Matrix vorkommenden Hitzeschockproteins (CH60) nachgewiesen [132]. Nur die in Langzeitkultur (14 Tage<sup>9</sup>, im Vergleich zu Kurzzeitkultur (3 Tage), gehaltenen Caco-2 Zellen unterliegen diesen morphologischen und funktionellen Differenzierungsprozessen [133].

Die Caco-2 Zelllinie eignet sich somit am besten für ein *in vitro* Modell zur Nachahmung des Dünndarms. Die Kultivierung dieser Zellen auf einem permeablen Träger ist ein ideales System

zur Untersuchung der Transzytose von medizinisch relevanten Substanzen durch die epitheliale Zellschicht.

Die Kultivierung der Zellen im Transwell® System ermöglicht, technisch gesehen, den Zugang zu beiden Seiten der darauf gewachsenen Zellschicht und damit die Untersuchung von Transportvorgängen. Durch die Fähigkeit der Caco-2 Zellen sich in einer polarisierten Zellschicht zu differenzieren, kann in diesem System in einen apikalen und einen basolateralen Bereich unterschieden werden.

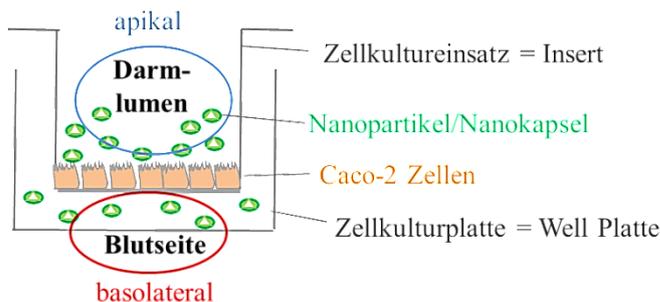


Abbildung 4: Modell zur Nachahmung einer intestinalen Barriere in einem Transwellssystem mit Caco-2 Zellen. In dem verwendeten Transwellssystem entspricht die apikale Seite dem intestinalen Darmlumen und die basolaterale Seite ist äquivalent zur Blutseite.

In dem verwendeten Transwell® System ist die apikale Seite äquivalent mit dem intestinalen Darmlumen und die basolaterale Seite entspricht der Blutseite, zu der die zu untersuchenden Wirkstoffe transportiert werden sollen (Abbildung 4).

Die Integrität der Darmwand wird als eine Barriere zwischen dem gastrointestinalen Trakt und dem Blutkreislauf angesehen. Diese Permeabilitätsbarriere ist selektiv und schränkt somit freie Diffusion ein. Daher reguliert diese den Transport von Wasser und gelösten Substanzen durch die Epithelzellen. Die Permeabilität und die Dichtigkeit des Zellrasens, welche in einem *in vitro* System kultiviert ist, spielt somit eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der Transzytose. Daher wurde neben einer qualitativen Prüfung mittels cLSM auch eine quantitative Analyse des Zellwachstums im Transwell® System durchgeführt. Der apparente Permeabilitätskoeffizient (Papp) beschreibt dabei den parazellulären passiven Fluss der Substanzen durch eine epitheliale Zellschicht und ist ein Indikator für die Durchlässigkeit des Zellrasens [134, 135]. Typische Moleküle für die Bestimmung der Papp-Werte eines Zellmonolayers können Mannitol, Transferrin oder Dextran mit 4 kDa, 10 kDa oder 20 kDa Molekulargewicht sein [135, 136]. Diese Substanzen zeichnen sich durch bestimmte Eigenschaften aus, wie zum Beispiel eine nicht vorhandene Toxizität, keine biologische Abbaubarkeit, eine geringe Größe und keine Verursachung der Membranpermeabilisierung.

Wie bereits beschrieben, besitzt das Dünndarmepithel besondere Bereiche, die so genannten Peyerschen Plaques, die sich durch das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) auszeichnen. Dieses



enthält bestimmte M-Zellen, die für einen erhöhten Transport von pathogenen Organismen, Viren und Partikel zu den Antigen-präsentierenden Zellen unterhalb der epithelialen Barriere bekannt sind und somit eine höhere Transzytoseaktivität aufweisen. Dies gilt als erster Schritt in der Erkennung und Induktion einer spezifischen Immunantwort. Zu einer besseren Nachahmung des Follikel-assoziierten Epithels im Darm sind von mehreren Arbeitsgruppen Untersuchungen durchgeführt worden. Dabei wurde festgestellt, dass die basale Zugabe der lymphozytären Zelllinie Raji es ermöglicht, die Caco-2 Zellen in so genannte M-Zellen umzuwandeln und dadurch die morphologischen und physiologischen Eigenschaften des Follikel-assoziierten Epithels besser simulieren zu können [22]. Die Induktion dieses Phänotyps benötigt dabei keinen direkten Zellkontakt. Dies ist in einem Transwellsystem erreicht worden, bei dem die Caco-2 Zellen von den Raji-Zellen durch eine Membran voneinander getrennt vorlagen. Die Raji-Zellen geben stattdessen ein Signal, um die Differenzierung der Caco-2 Zellen in M-Zellen zu stimulieren [137]. Dieses Modell wird wegen der Co-Inkubation zweier Zelllinien demzufolge als Co-Kultur bezeichnet. Eine Studie zur Genexpression hat bestimmte Gene identifiziert, die sowohl im *in vitro* Co-Kultur-Modell als auch *in vivo* bei FAE bzw. Peyerschen Plaques, exprimiert werden [138]. Die Faktoren, die zur Induzierung der Caco-2 Zellen zu FAE beitragen sind lösliche Zytokine, die von Raji-Zellen produziert und in das Medium sekretiert werden. Die Co-Kultivierung der Caco-2 und Raji-Zellen ändert die Expression einer Vielzahl von Genen, einschließlich der Haushaltsgene, Transkriptionsfaktoren und Zelloberflächenproteine. Bei den stärker transkribierten Genen sind beispielsweise Gene für Transkriptionsfaktoren, DEC-1, RAB-13 und cdc2-verwandte Kinasen identifiziert worden. Die Gene für Ubiquitin B, Transketolase, 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase weisen hierbei eine reduzierte Expression auf. Somit wird deutlich, dass eine Co-Inkubation der Caco-2 Zellen mit Raji-Zellen (B Lymphozyten) auf Ebene der Genexpression zu einer Umwandlung in FAE führt [138]. Eine Co-Kultur mit regenerierten M-Zellen imitiert das FAE und ermöglicht somit eine realistischere Untersuchung der Transzytose von Partikeln durch die intestinale Zellschicht.

## 1.9 Ussing-Chamber System

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Wirkstoffmolekülen können oft nicht ausreichend in ihrer oralen Bioverfügbarkeit prognostiziert werden. Die *in vitro* Verfahren können bei der Bewertung einiger verschiedener Faktoren, wie der zellulären Aufnahme oder Adsorption von Nutzen sein. Während die Arzneimittellöslichkeit die orale Verfügbarkeit beeinflusst, spielt im Darmbereich in den meisten Fällen der Stoffwechsel und die Absorption der Wirkstoffe eine entscheidende Rolle. Die unterschiedlichen *in vitro* Techniken, wie die Kultivierung von Caco-2 Zellen, ermöglichen die Untersuchung bezüglich der Aufnahme und der Transzytose von Stoffen. Diese bieten jedoch neben ihren Vorteilen auch diverse Nachteile. Eine Zwischenstufe zwischen *in vitro* und *in vivo* Systemen bei der Prüfung der Wirkstoffe auf

ihre Absorption und den Transport kann ein *ex vivo* Modell bieten [139, 140]. Das Ussing-Chamber System (Ussing-Kammer System) wird sehr oft in der pharmazeutischen Forschung zur Untersuchung der Resorption und biologischen Verfügbarkeit der Wirkstoffe verwendet. Dieses System ist aufschlussreich bei der Untersuchung des Transports durch ein natives Darmgewebe. Das zwischen zwei Kammerhälften eingespannte *ex vivo* entnommene Gewebe stellt ein System dar, das einer natürlichen Darmbarriere entspricht. Das Ussing-Chamber System wurde vom Herrn Ussing im Jahr 1949 entwickelt. Dieses System diente zur Untersuchung des aktiven Natrium-Transports als Quelle für elektrischen Strom bei einer kurzgeschlossenen isolierten Froschhaut [141, 142]. Ussing hat die Sättigungskinetik des Natrium-Einstroms demonstriert und hat dabei beobachtet, dass dieser Prozess mit der transepithelialen Potenzialdifferenz korreliert [141]. Später wurde dieses Kammer-System ausgiebig zur Untersuchung des Ionen-Transports durch viele unterschiedliche Membranarten, wie der Magenschleimhaut, des Dünndarms, des Kolons, des Gallenblasegewebes, des Atemwegsepithels sowie des Cornea Epithels des Auges verwendet [143-146]. Seit langem sind die Vorteile des Ussing-Kammer Systems für Darm-Transportstudien bekannt und werden für Analysen des intestinalen Metabolismus von Xenobiotika und vieler Nährstoffkomponenten wie Glukose, Amino- und Fettsäuren sowie Vitaminen verwendet [147]. Weitere Studien haben bereits in humanen Jejunum und im Raten-Jejunum Darmabschnitt folgende Wirkstoffe getestet: Inogatran (Thrombin-Inhibitor), Enalaprilat (ACE-Inhibitor), Atenolol (Betablocker) und Naproxen (Schmerzmittel) [148]. Die vielseitigen Anwendungsgebiete des Ussing-Chamber Systems bieten somit eine gute ergänzende Methode bei der Untersuchung der medizinisch relevanten Substanzen zur oralen Verabreichung.

### **1.10 Die intestinalen Aufnahmewege der Nanopartikel**

Die Endozytose ist ein Prozess der Aufnahme von Proteinen, Lipiden, extrazellulären und löslichen Molekülen und Nährstoffen von der Zelloberfläche in das Zellinnere mithilfe der endozytotischen Vesikel. Die Fracht und die Membrankomponenten der Vesikel können nachfolgend einerseits zurück zur Plasmamembran transportiert werden, um den Inhalt an die Zelloberfläche wieder zu recyceln. Andererseits können die aufgenommenen Komponenten zu den Spätendosomen/Lysosomen zur Degradation transportiert werden. Generell wird zwischen zwei Typen der Endozytose unterschieden: dem Clathrin-abhängigen und Clathrin-unabhängigen Endozytoseweg [149]. Zu den Clathrin-unabhängigen Aufnahmemechanismen zählt die Caveolae-abhängige Endozytose, die Makropinozytose und die Phagozytose [150]. Der Phagozytoseprozess ist spezifisch für phagozytotische Zellen, wie beispielsweise Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten. Bei der Internalisierung der Partikel spielt die Aktinpolymerisation eine wichtige Rolle. Einige Studien haben bereits gezeigt, dass die Eigenschaften der Partikel eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme in die Zelle spielen. Es gibt viele Substanzen,

die eine hemmende Wirkung auf bestimmte Endozytosewege ausüben. Diese werden oft zur Charakterisierung der Aufnahmeprozesse verwendet [151].

Chlorpromazin ist beispielsweise in der Lage durch Störung des Zusammenbaus des Clathrins die Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche zu reduzieren und dadurch die Clathrin-vermittelte Endozytose zu inhibieren [152, 153]. Die Substanz Filipin ist an der Unterdrückung der Partikelaufnahme auf dem Caveolae-abhängigen Weg beteiligt. Durch die Bindung des Filipins an das Cholesterol werden die Caveolae-Strukturen zerstört. Dieser Prozess führt zu einer Desorganisation des Caveolins [154]. Cytochalasin D ist ein Pilzmetabolit und inhibiert an mechanochemischen Motoren wie beim Aktin-Myosin System die Aktinpolymerisation [155, 156]. Diese Eigenschaften führen zu einer Hemmung der Caveolae-abhängigen Endozytose und Makropinozytose [151, 157]. Makropinozytose ist einer der am effizientesten Wege eine große Menge an extrazellulärer Flüssigkeit in das Zellinnere aufzunehmen. Die Neuordnung des Zytoskeletts, das zu dem Prozess der Makropinozytose führt, benötigt die Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) an der Plasmamembran [158]. Obwohl die komplette Signalkaskade nicht vollständig geklärt ist, sind bestimmte GTPasen wie Rac1 [159], Cdc42 sowie die p21-aktivierte Kinase bei der Aktinpolymerisation involviert. Die Proteine CtBP1/BARS sind für die Schließung der Makropinosome zuständig. Wie frühere Untersuchungen gezeigt haben, hemmen Amiloride den Prozess der Makropinozytose [160]. Während bei der Makropinozytose die Transportvesikel eine Größe von bis zu 500 nm erreichen, sind bei der Clathrin- und Caveolin-abhängigen Endozytose Vesikelgröße unter 500 nm, sogar nur 120 nm, typisch. Diese Beispiele demonstrieren, dass bei der Aufnahme der partikulären Substanzen die Größenordnung ebenfalls eine wichtige Rolle spielt.

### 1.11 Zielsetzung

Zu den Zielen dieser Arbeit gehört in erster Linie die Untersuchung der Transzytoserate der nanopartikulären Systeme durch die intestinale Zellschicht. Dafür stand im Vordergrund zunächst die Etablierung zweier Untersuchungsmethoden, das Transwell® System und Ussing-Chamber System. Während das Transwell® System ein *in vitro* Modell darstellt, wird bei dem Ussing-Chamber System entnommenes Gewebe aus dem Duodenum eines Schweins verwendet. Des Weiteren sollte die Transporteffizienz des Sättigungshormons PYY untersucht werden, welches der Entwicklung eines Medikamentes gegen Adipositas zur oralen Verabreichung dienen soll. Beim Einsatz von bestimmten Substanzen sollte eine Steigerung der transepithelialen Transzytoserate und dadurch eine Verbesserung der oralen Verfügbarkeit des Wirkstoffes erreicht werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Anbieter
3-[3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Sigma Aldrich; U.S.A.
Ammoniumsulfat	AppliChem, Illinois Tool Works Inc.;U.S.A.
Coomassie-Brillant-Blau G 250	Serva Electrophoresis; Deutschland
Dextran (FITC)	Thermo Fisher Scientific; Deutschland
Essigsäure	Sigma Aldrich; U.S.A.
Ethanol	Sigma Aldrich; U.S.A.
Kälberserum Albumin (BSA bovine Serum Albumin)	Sigma Aldrich; U.S.A.
Methanol	VWR International; U.S.A.
Paraformaldehyde	Sigma Aldrich; U.S.A.
Phosphorsäure	Sigma Aldrich; U.S.A.
Pierce™ 660nm Protein Assay Reagenz	Thermo Fisher Scientific; U.S.A.
Thiourea	Sigma Aldrich; U.S.A.
Transferrin (FITC)	Thermo Fisher Scientific; Deutschland
Triton X-100	Sigma Aldrich; U.S.A.
Tween-20	Sigma Aldrich; U.S.A.
Urea	Sigma Aldrich; U.S.A.

#### 2.1.2 Nanopartikel

Tabelle 2: Nanopartikel

Nano-partikel	Poly-mer	Funktio-nalisierung	Tensid	Cross-linker	Durchmes-ser (nm)	Farbstoff	ζ-Potential (mV)
PS-COOH	PS	COOH	SDS	-	134	BodiPy1	- 71,2
PS-HN2	PS	NH2	CTMA-Cl	-	120	BodiPy2	+ 46,8
GC	GC	-	-	TDI	229	RBITC	+ 20,0
GCPYY	GC	PYY	-	TDI	227	RBITC	+ 2,5

Alle Partikel sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Außerdem enthalten die GCPYY NP die Polyglutaminsäure.

### 2.1.3 Inhibitoren

Tabelle 3: Verwendete Inhibitoren

<b>Inhibitor</b>	<b>Anbieter</b>
<b>Chlorpromazin (Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose)</b>	Sigma Aldrich; U.S.A.
<b>Cytochalasin D (Inhibition der F-Aktin Polymerisation)</b>	Sigma Aldrich; U.S.A.
<b>5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride, EIPA (Inhibition der Makropinozytose)</b>	Sigma Aldrich; U.S.A.
<b>Filipin (Hemmung der Caveolin-vermittelten Endozytose)</b>	Sigma Aldrich; U.S.A.
<b>Dynasore (Blockierung des Dynamins und somit Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose)</b>	Sigma Aldrich; U.S.A.

### 2.1.4 Verwendete Farbstoffe für Immunfluoreszenzfärbungen

Tabelle 4: Marker

<b>Marker</b>	<b>Anbieter</b>
<b>CellMask™ Orange Plasma membrane Stain</b>	Thermo Fisher Scientific; U.S.A.
<b>Phalloidin</b>	Invitrogen; U.S.A.
<b>DRAQ5</b>	Abcam; U.S.A.
<b>Calcein AM</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>Propidiumiodid</b>	Sigma Aldrich; U.S.A.
<b>MitoTracker® Green FM</b>	Thermo Fisher Scientific; U.S.A.
<b>Wheat Germ Agglutinin, Oregon Green® 488 Conjugate</b>	Thermo Fisher Scientific; U.S.A.

### 2.1.5 Proteine und Antikörper

Tabelle 5: Proteine und Antikörper

<b>Protein</b>	<b>Anbieter</b>
<b>Humanes PYY</b>	American Peptide Company; England
<b>WGA</b>	Biozol; U.S.A.
<b>Anti-WGA</b>	Sigma Aldrich; U.S.A.
<b>Vitamin B12</b>	Sigma Aldrich; U.S.A.
<b>Intrinsischer Faktor</b>	Prospecbio; U.S.A.
<b>Anti-Vitamin B12 (FITC)</b>	LifeSpan BioSciences; U.S.A.

### 2.1.6 Zelllinien und Gewebe

Tabelle 6: Zelllinien und Gewebe

Zelllinie	Anbieter
<b>Caco-2 Zellen (ATCC® HTB-37™)</b>	American Type Culture Collection; U.S.A.
<b>Duodenungewebe aus dem Schweinedarm</b>	Hofgut Acker in Bodenheim; Deutschland
<b>Raji-Zellen</b>	DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; Deutschland

### 2.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Medien, Puffer und Lösungen

Lösung	Anbieter
<b>0,25% Trypsin-EDTA</b>	Thermo Fisher Scientific; U.S.A.
<b>1x Dulbecco´s phosphate buffered saline</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix</b>	BD BioSciences; Deutschland
<b>CDP-Star® Substrat</b>	Life Technologies; U.S.A.
<b>Fötale Kälberserum (FBS)</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>GlutaMAX™ Zusatz 100x</b>	Life technologies; U. S. A.
<b>Hank's Balanced Salt Solution mit Calcium, mit Magnesium, ohne Phenolrot (HBSS)</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>Immersionsöl Typ F</b>	Leica; Deutschland
<b>MEM Eagle-EBSS w/ NEAA w/o L-Gln (EMEM)</b>	Lonza; U.S.A.
<b>Normal Tyrode`s Solution 20x NTS Base-1/Base-2</b>	EcoCyte Bioscience; Deutschland
<b>Novex® AP Chemiluminescent substrate</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>NuPAGE® LDS Sample buffer 4x</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>NuPAGE® MES SDS Running Buffer</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>NuPAGE® Reducing agent 10x</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) 100x</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>RPMI-1640</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard</b>	Life technologies; U. S. A.
<b>Sheath Lösung für Durchflusszytometer</b>	Partec; Deutschland

### 2.1.8 Kommerziell erworbene Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits

<b>Kit</b>	<b>Anbieter</b>
<b>Human PYY (Total) ELISA Kit</b>	Merck Millipore; Deutschland
<b>Human VitB12 ELISA Kit</b>	MyBioSource; U.S.A.
<b>Novex™ WesternBreeze™ Chemilumineszenz Kits</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay</b>	Promega; U. S. A.
<b>CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)</b>	Promega; U. S. A.

### 2.1.9 Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Anbieter</b>
<b>Bad-Umwälzthermostat ED-5A</b>	Julabo; Deutschland
<b>Diffusionskammersystem mit 6 Kammern für Epithel Ussing-Chamber System</b>	Scientific Instruments, K. Mussler; Deutschland
<b>Durchflusszytometer CyFlow ML</b>	Partec; Deutschland
<b>EndOhm-12 Messkammer</b>	World Precision Instruments, Deutschland
<b>Epithelial Volt-Ohm Messgerät Millicell ERS-2</b>	Merck Millipore; Deutschland
<b>Luminescent Image Analyzer LAS-3000</b>	Fujifilm, Japan
<b>Fluorescence Mikroskope IX81-ZDC</b>	Olympus; Deutschland
<b>Gefrierschrank -20°</b>	Liebherr; Deutschland
<b>Gefrierschrank -80°C Hera Freeze Top</b>	Thermo Scientific; Deutschland
<b>Konfokales Laserscanning Mikroskop Leica SP5 II mit CW-STED</b>	Leica; Deutschland
<b>Mikroskop CKX41SF</b>	Olympus; Japan
<b>Pipetten</b>	Eppendorf; Deutschland
<b>Pipettenhelfer Accujet Pro</b>	Brand; Deutschland
<b>Plate Reader Infinite M1000</b>	Tecan; Deutschland
<b>SDS-PAGE/Western Blot Chamber Mini</b>	Biometra; Deutschland
<b>Stickstofftank LS6000</b>	Taylor-Wharton; Deutschland
<b>Trocken Blot System iBlot®</b>	Life technologies; U.S.A.
<b>Vakuumpumpe Vacusafe comfort</b>	IBS Integra Bioscience; Deutschland
<b>Vortexer Reax Control</b>	Heidolph; Deutschland
<b>Wasserbad</b>	Memmert; Deutschland

<b>Zellkultur Inkubator C200</b>	Labotec; Deutschland
<b>Zellzähler TC10</b>	Bio Rad; Deutschland
<b>Zentrifuge 3K30</b>	SIGMA Laborzentrifugen; Deutschland
<b>Zentrifugen 5810R und 5430</b>	Eppendorf; Deutschland
<b>Zeiss Gemini 1530</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Deutschland
<b>PowerPac™ HC Power Supply</b>	Bio Rad; Deutschland
<b>Multipette® plus</b>	Eppendorf; Deutschland
<b>ViewPix 1100 - Scanner System A3 für feuchte Gele</b>	Biostep; Deutschland
<b>Pipette Xplorer®</b>	Eppendorf; Deutschland
<b>Kritisch-Punkt-Trockner CPD 30</b>	Leica; Deutschland

### 2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Anbieter</b>
<b>Zellkultureinsätze Transwell® Inserts</b>	Corning® - VWR International
<b>Zellkulturflaschen</b>	Greiner; Deutschland
<b>NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel</b>	Life Technologies; U.S.A.
<b>12-, 96- Well Platten</b>	Greiner bio-one; Deutschland
<b>Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)</b>	Greiner bio-one; Deutschland
<b>ibiTreat µ-dishes</b>	IBIDI; Deutschland
<b>Reaktionsgefäße (1,5 ml)</b>	Greiner bio-one; Deutschland
<b>Sterile Filter (0,2 µm; 0,45 µm)</b>	Millipore, U. S. A.
<b>Pipettenspitzen</b>	Starlab; Deutschland
<b>Pipettes (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)</b>	Greiner bio-one; Deutschland
<b>Protran® Nitrozellulosemembran</b>	Life Technologies; U.S.A.
<b>PVDF Membran</b>	Life Technologies; U.S.A.



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Caco-2 Zellen im Transwell® System

Das *in vitro* M-Zell Modell wurde zuerst von Kerneis entwickelt [22] und später von Gullberg übernommen [137]. Das Protokoll von Gullberg diente als Anleitung für die Kultivierung der Caco-2 Zellen in einem *in vitro* System für Langzeitkulturen in Kombination mit Raji-Zellen als Co-Kultur. Dies ermöglichte den Aufbau eines Follikel-assoziierten Epithels (FAE) mit den M-Zellen in einem Transwell® System (Abbildung 5).

Für diese Arbeit erwiesen sich die 12-Well Zellkultureinsätze mit einem Membrandurchmesser von 1,12 cm<sup>2</sup> als am besten geeignet. Diese wurden in eine 12-Well Platte platziert. In das basale Kompartiment der 12-Well Platte wurden zunächst 1,5 ml Wachstumsmedium EMEM mit Zusätzen (10% FBS, 1% Glutamin und 1% P/S) zugegeben.

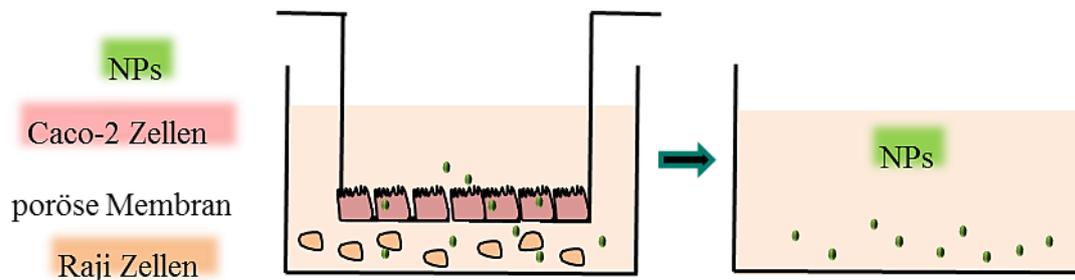


Abbildung 5: Das Schema für die Kultivierung des Follikel-assoziierten Epithelmodells. Das Transwell® System bestand aus einem Membraneinsatz, der in eine mit Wachstumsmedium gefüllte Kammer platziert wurde. Die Co-Kultur beinhaltete Caco-2 Zellen in Kombination mit Raji-Zellen. Die Mono-Kultur bestand nur aus Caco-2 Zellen und wurde als Kontrolle mitgeführt.

Auf die apikale Seite der Membran wurden 0,5 ml der Caco-2 Zellen ( $3 \cdot 10^5$  Zellen/ml) im gleichen Wachstumsmedium, wie auf der basalen Seite, ausgesät und bei 37 °C für 14 Tage im Brutschrank kultiviert. Der Mediumswechsel erfolgte alle 2 Tage auf der apikalen und basalen Seite des Systems. Anschließend wurden  $5 \cdot 10^5$  Raji-Zellen in 1,5 ml Wachstumsmedium in das basolaterale Kompartiment des Systems zugegeben und 3 oder 5 Tage in Co-Kultur gehalten.

### 2.2.2 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Die Intaktheit sowie Dichtigkeit der auf der Membran gewachsenen Caco-2 Zellschicht wurde nach 14 Tagen mit Hilfe des Volt-Ohm Messgerätes mit der Kammerelektrode EndOhm-12 (Abbildung 6) überprüft. Dafür wurde das Wachstumsmedium zuerst auf 37 °C vorgewärmt, die Elektrodenkammer mit diesem Medium 2 Mal gespült und mit 3 ml Medium gefüllt. Anschließend kam der Zellkultureinsatz mit den darauf gewachsenen Zellen in die vorbereitete Elektrodenkammer. Der TEER (Transepithelialer Elektrischer Widerstand) Wert wurde nach folgender Formel ausgerechnet:

$$TEER (\text{Ohm} * \text{cm}^2) = R \times A$$

R entspricht dabei dem Widerstand über dem Monolayer (Ohm) und A der Oberfläche der Zellschicht ( $\text{cm}^2$ ) auf der Membran.



Abbildung 6: Elektrodenkammer ENDOHM-12 zur Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes in einem 12-Well Zellkultureinsatzes.

### 2.2.3 Bestimmung des scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten

Der sogenannte scheinbare „Permeabilitätskoeffizient“ (Papp, apparent permeability coefficient) ist ein gebräuchlicher Parameter zur Angabe der Durchlässigkeit der auf der Membran gewachsenen Zellschicht für eine bestimmte Substanz. Daraus können auch Erkenntnisse über die mögliche Absorption und Permeabilität des Epithels gezogen werden.

Oral verabreichte Substanzen zeigen üblicherweise einen Papp-Wert von  $10^{-6}$  cm/sec [161]. Daraus kann man ableiten, dass ein Papp-Wert unter  $1 \cdot 10^{-6}$  cm/sec eine gute Zelldichte und somit eine hohe Intaktheit aufweist. Dieser wird mit nach folgender Gleichung berechnet:

$$P_{app} (\text{cm/s}) = \frac{dC}{dt} \times \frac{V}{A \times C_0}$$

$dC/dt$  entspricht dabei dem Substanzflux über den Monolayer ( $\mu\text{g}/\text{sec}$ ), A der Oberfläche der auf der Membran gewachsenen Zellschicht ( $\text{cm}^2$ ) und  $C_0$  der Ausgangskonzentration im Donorkompartiment ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 2.2.4 Analyse des Zellwachstums im Transwell® System

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Caco-2 Zellen im Transwell® System wurde mittels CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) durchgeführt. Zuerst wurde das komplette Medium apikal und basolateral aus den Wells abgesaugt und mit

angereichertem Medium gespült. Dann kamen apikal 400 µl und basal 1200 µl CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent verdünnt mit Medium in einem Verhältnis 1 zu 5. Nach 1,5 h Inkubation im Brutschrank wurde die Reaktion mit 10% SDS-Lösung gestoppt. Die zu messende Lösung wurde in eine 96-Well-Platte überführt und anschließend das Absorptionssignal bei 490 nm am Plate Reader Tecan Infinite® M1000 PRO gemessen.

### **2.2.5 Zellzahlbestimmung**

Zur Zellzahlbestimmung der adhärennten Caco-2 Zellen wurden die Zellen mit 0,25%iger Trypsin-EDTA Lösung abgelöst und nach dem Zentrifugieren bei 120 g 3 min wieder im angereicherten Medium resuspendiert. Für die Zählung wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblaulösung resuspendiert und nach etwa 20 Sekunden gemessen. Dabei diente Trypanblau zur Färbung der toten Zellen. Die Messung der Zellzahl erfolgte automatisch mithilfe des Gerätes TC 10 von Bio Rad.

### **2.2.6 Diffusionsfähigkeit der Substanzen im Transwell® System**

Für diesen Test wurden 12-Well-Inserts mit einem Durchmesser von 1,12 cm<sup>2</sup> verwendet. Die NP wurden im angereicherten Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 150 µg/ml verdünnt und 0,5 ml apikal in die Kultureinsätze zugegeben. In das basolaterale Kompartiment kamen 1,5 ml Medium. Nach 2 h oder 4 h wurden aus der basalen Seite jeweils 200 µl für die Messung am Plate Reader Tecan Infinite® M1000 PRO zur Detektion entnommen. Zur Berechnung des Gehaltes wurde eine Eichgerade aus der eingesetzten Lösung mit einer Konzentrationsreihe zwischen 0,146 µg/ml und 300 µg/ml mitgeführt.

### **2.2.7 Bestimmung der Transzytoserate der fluoreszenz-markierten Substanzen im Transwell® System**

Zur Bestimmung der Transportrate der fluoreszenz-markierten Substanzen durch die Zellschicht wurden die Zellen wie oben beschrieben im Transwell® System kultiviert. Am Tag 17 oder 19 wurden die Zellkultureinsätze mit der darauf gewachsenen Caco-2 Zellschicht in eine frische, mit 1,5 ml Wachstumsmedium gefüllte, 12-Well Platte umgesetzt. Anschließend wurde das apikale Medium gegen 0,5 ml Medium mit gewünschter NP Konzentration (10, 20, 40, 150, 300 oder 600 µg/ml) ersetzt und bei 37 °C 4 h oder 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden von apikaler und basolateraler Seite jeweils 200 µl entnommen und für die Messung der Fluoreszenzintensität am Fluoreszenzspektrometer Tecan Infinite® M1000 PRO in eine 96-Well Platte überführt. Die Menge der durch die Zellschicht transportierten Substanzen konnte anhand einer Eichgerade bestimmt werden.

### 2.2.8 Messung der Transzytoserate des hPYY mittels ELISA System

Die Detektion des humanen PYY nach der Transzytose erfolgte mittels ELISA Kits von Millipore. Die Durchführung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers.

In dieser Arbeit stand die Bestimmung der Transportrate durch die im Transwell® System kultivierten Zellen im Vordergrund. Dafür wurden die Caco-2 Zellen in Mono- oder Co-Kultur wie oben beschrieben 17 Tage lang kultiviert. Auf die apikale Seite der Zellschicht wurden 0,5 ml der mit PYY beladenen Chitosan NP zugegeben und 4 h oder 24 h bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde freies PYY in gleicher Konzentration wie bei den mit PYY beladenen NP eingesetzt. Für die Messung der PYY Konzentration wurde jeweils 200 µl der auf die basolaterale Seite der Zellkultur transportierten Proben entnommen. Dabei wurden drei unterschiedliche Ansätze vorbereitet (Abbildung 7). Die Proben wurden mit 40 000 g 20 min zentrifugiert. Der Überstand (Abbildung 7 C) wurde anschließend in ein frisches Gefäß überführt und das Pellet (Abbildung 7 B) im gleichen Volumen 200 µl Probenpuffer, der im ELISA Kit verwendet wird, resuspendiert.

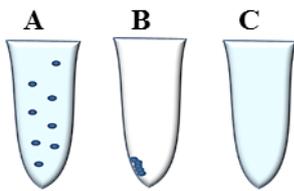


Abbildung 7: Vorbereitung der PYY-haltigen Proben zur Messung mittels ELISA Methode. (A) Gesamtprobe: die mit PYY beladenen Chitosan Nanopartikel; (B) Pellet: das abzentrifugierte Pellet mit GCPYY NP (Glycolchitosan PYY Nanopartikel), resuspendiert im Probenpuffer (pH 8.5); (C) Überstand: nach dem Abzentrifugieren der GCPYY NP im Wachstumsmedium.

Davon wurden wie in der Herstelleranleitung gefordert jeweils 20 µl der PYY-haltigen Probe für die Messung der Transzytoserate sowie für die Kalibrierungskurve eingesetzt.

### 2.2.9 Durchflusszytometrie

Die quantitative Analyse der Internalisation der NP erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dabei besteht die Möglichkeit die Aufnahme und die Bindung der fluoreszenz-markierten Substanzen quantitativ zu bestimmen. Das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird detektiert. Unbehandelten Zellen dienen dabei als Negativkontrolle und zur Auswahl der Zellpopulation. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels FCS Express V4 Software.

### **2.2.9.1 Untersuchung der Aufnahme der Nanopartikel mittels Durchflusszytometrie**

Zur Bestimmung der Fähigkeit der Caco-2 Zellen ein bestimmtes NP aufzunehmen, wurden  $1 \cdot 10^5$  Caco-2 Zellen in eine 12-Well Platte ausgesät und 3 Tage bei 37 °C kultiviert. Anschließend kamen die zu testenden NP gelöst im Wachstumsmedium auf die Zellen für 4 h oder 24 h. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die adhärenen Caco-2 Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA abgelöst und bei 1000 g für 3 min in der Eppendorf Zentrifuge 5430 abzentrifugiert. Die Proben wurden 3 Mal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Das in 2 ml PBS resuspendierte Zellpellet wurde anschließend im Durchflusszytometer analysiert, um die Aufnahme zu quantifizieren. Die Anregung der mit Bodipy1 und Bodipy2 markierten NP erfolgte mit dem 488 nm Laser und die Detektion der Emission in dem 527 nm Bandpassfilter. Die mit RBITC markierten NP konnten am besten mit dem 561 nm Laser angeregt und in dem 610 nm Bandpassfilter detektiert werden. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Fähigkeit der Zellen die fluoreszenz-markierten NP aufzunehmen.

### **2.2.9.2 Untersuchung der Inhibitorenwirkung mittels Durchflusszytometrie**

Um die Wirkung der Inhibitoren auf die Aufnahme der NP zu untersuchen, wurden  $1 \cdot 10^5$  Caco-2 Zellen in eine 12-Well Platte ausgesät und 3 Tage bei 37 °C kultiviert. Danach wurden die adhärenen Zellen für 45 min mit einem Inhibitor (Tabelle 3), der vorher auf eine bestimmte Konzentration mit Wachstumsmedium verdünnt wurde, vorbehandelt. Anschließend wurde die NP Suspension dazu pipettiert und 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Einwirkzeit wurden die Caco-2 Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA abgelöst und bei 1000 g für 3 min abzentrifugiert. Nach 3 Mal Waschen mit PBS und Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert. Die Wirkung der Inhibitoren auf die Aufnahme der NP wurde mittels Durchflusszytometrie im CyFlow ML untersucht. Die quantitative Aufnahme der Substanzen wurde mithilfe des Medians der Fluoreszenzintensität bestimmt.

### **2.2.10 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Zur Visualisierung der Zellkompartimente und der Internalisation der NP wurden die Zellen entweder 3 Tage in der  $\mu$  IBIDI Schale oder 17 Tage in dem Transwell® System kultiviert. Je nach Ziel des Versuchs fand eine Vorinkubation mit den NP statt. Vor der Färbung wurden die Zellkulturen mit HBSS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Die auf dem Transwell® Membran gewachsenen Zellen wurden vorsichtig aus den Zellkultureinsätzen ausgeschnitten. Diese wurde dann auf ein Deckgläschen platziert, mit dem entsprechenden Farbstoff (Tabelle 11) bedeckt und sofort unter dem Mikroskop Leica SP5 II analysiert. Die Proben in den  $\mu$  IBIDI Schalen wurden etwa 15 min mit dem Farbstoff im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und im konfokalem

Laserscanning Mikroskop Leica SP5 II angeschaut. Um die Überlappung der Kanäle zu vermeiden, wurde ein sequenzielles Scanning der Proben durchgeführt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe zur Visualisierung der Zellkompartimente und der NP sind in der Tabelle (Tabelle 11) zusammengefasst und wurden anhand des Fluoreszenzsignals detektiert.

Tabelle 11: Farbstoffe zur Visualisierung der Zellstrukturen oder der NP

<b>Farbstoff</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Exzitation</b>	<b>Emission</b>	<b>Anzufärbende Struktur</b>
<b>Calcein-AM</b>	2 µg/ml	496	510-560	Lebende Zellen
<b>CellMask™ Orange</b>	1 µg/ml	561	570-600	Zellmembran
<b>DRAQ5</b>	2 µg/ml	633	680-710	Zellkern
<b>RBITC</b>	laut NP	561	580-620	GC NP
<b>Bodipy1</b>	laut NP	488	510-540	PS-COOH NP
<b>Bodipy2</b>	laut NP	514	530-560	PS-NH2 NP
<b>MitoTracker®</b>	1 µg/ml	488	500-540	Mitochondrien
<b>Phalloidin-FITC</b>	1 µg/ml	488	500-540	Aktin/Zellmembran
<b>Propidiumiodid</b>	50 µg/ml	561	590-625	Tote Zellen
<b>WGA 488</b>	1 µg/ml	488	520-550	Zellmembran

### 2.2.10.1 Visuelle Analyse der Aufnahme der NP

Zum besseren Verständnis der Verteilung der NP innerhalb der Zelle und der Bindung an die Zelloberfläche wurden die Caco-2 Zellen mit den NP mit einer Konzentration von 150 µg/ml im Wachstumsmedium bei 37 °C im Brutschrank 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h oder 24 h inkubiert. Anschließend wurden die nicht aufgenommenen oder nicht adsorbierten NP im Überstand durch frisches Medium ersetzt. Die Aufnahme der NP in die Zellen wurde im konfokalem Laserscanning Mikroskop Leica SP5 II analysiert.

### 2.2.10.2 Visualisierung der Zellstrukturen

Die Farbstoffe CellMask™ Orange, WGA-488 und Phalloidin-FITC und dienen der Darstellung der Zellmembran bzw. des F-Aktins, während der DRAQ5 zur Anfärbung der Zellkerne verwendet wurde (Tabelle 4).

Zur qualitativen Untersuchung der lebenden und der toten Zellen in dem Transwell® System wurden die Zell-Layer mit Calcein-AM und PI (Tabelle 4) angefärbt. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft des Propidiumiodids durch eine perforierte Membran durchzudringen und somit eine tote Zelle sichtbar zu machen. Calcein-AM diene der Visualisierung der lebenden Zellen. Die lebenden Zellen sind in der Lage das nicht-fluoreszierende Calcein-AM mithilfe des intrazellulär liegenden Enzyms Esterase in grün-fluoreszierende Calcein hydrolytisch umzuwandeln.

Der Farbstoff MitoTracker® (Tabelle 4) ist in der Lage an die Mitochondrien zu binden und somit diese sichtbar zu machen.

### **2.2.11 Bestimmung der Zytotoxizität der Nanopartikel**

Zur Untersuchung der toxischen Wirkung der Substanzen bzw. der Nanopartikel auf die Zellen wurde das CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay benutzt. Dafür wurden 10 000 Caco-2 Zellen in 200 µl angereichertem Medium in eine 96-Well Platte ausgesät und 24 h im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und gegen 100 µl der jeweiligen Testlösung mit entsprechender Konzentration der Partikel ersetzt. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne NP mitgeführt. Daraufhin wurden die Zellen 4 h und 24 h im Brutschrank inkubiert. Zur Testdurchführung kamen dann in jedes Well je 100 µl des CellTiter-Glo® Reagents (bestehend aus Substrat und Puffer). Nach 2 min auf dem Orbitalschüttler wurden die Caco-2 Zellen lysiert. Die anschließenden 15 min bei Raumtemperatur dienten der Stabilisierung des Lumineszenzsignals. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte am Plate Reader Tecan Infinite® M1000 PRO.

### **2.2.12 Funktionalisierung der NP durch Aufreinigung der harten Proteinkorona**

Für die Untersuchung der Proteinbindung und somit die Bildung einer Proteinkorona an der Oberfläche der NPs wurden jeweils 150 µg/ml PS oder GC Partikel mit 15 µg/ml Protein WGA, das vorher in PBS gelöst wurde, 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde EMEM oder EMEM mit FBS dazugegeben und 0,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte 1 h lang mit 20 000 g bei 4 °C und der Überstand wurde verworfen. Das anschließende Resuspendieren in PBS diene der Entfernung der weichen Proteinkorona. Jede Probe wurde 3 Mal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Pellet in 50 µl Urea/Thiourea-Puffer resuspendiert und 15 min bei 37 °C, 600 upm auf dem Schüttler gelöst. Dieser Ansatz wurde anschließend zur quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes und zur Durchführung der SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Brillant-Blau Färbung oder Nachweis mittels Western-Blot verwendet. Zum Aufbewahren der Proben wurden diese bei -20 °C gelagert.

### 2.2.13 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Berechnung des Proteingehaltes in der Probe wurde ein kommerziell erworbenes Pierce™ 660nm Protein Assay Reagenz verwendet. Dafür wurden je 10 µl der proteinhaltigen Probe mit 150 µl Reagenz vermischt, 1 min geschüttelt und nach 5 min Inkubation gemessen. Die Absorption wurde bei 660 nm am Plate Reader Tecan Infinite® M1000 PRO detektiert. Zur Berechnung des gesamten Proteingehaltes wurde eine Eichgerade aus BSA mit einer Konzentrationsreihe zwischen 25 µg/ml und 1000 µg/ml mitgeführt.

### 2.2.14 SDS-PAGE

Die qualitative Analyse der Bindung eines bestimmten Proteins an die unterschiedlichen Partikel wurde eine Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde ein kommerziell erworbenes 10%iges NuPAGE® Bis-Tris Gel verwendet. Die Probenvorbereitung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers, wobei alle Lösungen in einem bestimmten Verhältnis zueinander pipettiert wurden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Pipettierschema für die Polyacrylamidgelelektrophorese

Reagenz	Volumen
Probe	X µl
NuPAGE® LDS Sample buffer 4x	2,5 µl
NuPAGE® Reducing agent 10x	1 µl
Deionisiertes Wasser	auf 6,5 µl
<b>Totales Volumen</b>	<b>25 µl</b>

Nach dem Zusammenpipettieren der Proben wurden diese für 10 min bei 70 °C erhitzt und je 25 µl auf das Gel aufgetragen. Der SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard diente als Marker für die Proteine. Zur Kontrolle wurde das bekannte Protein WGA und 1:200 in deionisiertem Wasser verdünntes FBS mitgeführt. Das Gel wurde in die dafür vorgesehene Apparatur platziert, die mit NuPAGE® MES SDS Running Buffer 1x aufgefüllt wurde, und an PowerPac™ HC Power Supply angeschlossen. Die Auftrennung der Proteine lief 60 min bei 100 V. Anschließend wurden die gesamten Proteine mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt. Das Protein WGA wurde im Western-Blot über die Bindung des spezifischen Antikörpers nachgewiesen.

### 2.2.15 Coomassie-Brillant-Blau Färbung der Proteine auf dem Gel

Die Proteine wurden mit einer selbsthergestellten Coomassie-Brillant-Blau Lösung angefärbt. Dafür wurden eine Fixierungs- und eine Färbelösung mit folgender Zusammensetzung angesetzt:



- Fixierungslösung
  - 10% Essigsäure (aus 99,7%iger Stammlösung)
  - 40% Ethanol
  - Auf 100 ml deionisiertes Wasser
- Färbelösung
  - 10% Ammoniumsulfat (10 g)
  - 2% Phosphorsäure (2,35 g der 85% Phosphorsäure)
  - 0,1% CBB G250 (0,1 g)
  - In 100 ml deionisiertes Wasser lösen
  - Kurz vor der Benutzung 25 ml Methanol dazugeben

Das Gel wurde für 2 h mit der Fixierungslösung bedeckt und anschließend 3 Mal je 10 min mit deionisiertem Wasser gewaschen. Für die nächsten 24 h wurde das Gel in die Färbelösung gelegt. Das 3-malige Waschen des Gels mit 1%iger Essigsäure und anschließendem Platzieren im Wasser beendete das Färbeprotokoll. Die Gelbanden wurden mit ViewPix 1100 - Scanner System aufgenommen.

### 2.2.16 Western-Blot

Der qualitative Nachweis eines bestimmten Proteins erfolgte über das Western-Blot System. Nachdem die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte eine Übertragung der Proteine auf eine Membran. Dafür wurde das Trocken Blot System iBlot® mit Einstellung Programm 2 und PVDF Membranen verwendet.

Nach der Überführung der Proteine auf die Membran wurden diese 30 min mit Block-Lösung (5 ml Wasser, 2 ml Blocker A, 3 ml Blocker B) behandelt. Nach 2 Mal Waschen mit Wasser wurde die Membran für 1 h in die Lösung mit primärem AK bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Waschpuffer (Antibody Wash Solution) 3 Mal gewaschen und mit sekundärem AK, der mit Alkalischen Phosphatase gekoppelt ist, für 1 h inkubiert. Zum Abschluss wurde die Membran mit Waschpuffer und Wasser gewaschen und mit dem CDP-Star® Substrat bedeckt. Die Aufnahme des Signals erfolgte in einer Detektionskammer Luminescent Image Analyzer LAS-3000.

### 2.2.17 Untersuchung der Transportrate der NP mittels Ussing-Chamber Systems

Neben dem Modell im Transwell® System wurde eine weitere Methode, genannt Ussing-Chamber (Kammer) System, herangezogen. Diese diente ebenfalls der Analyse der Transzytose der Substanzen durch eine Zellschicht. Der signifikante Unterschied zum *in vitro* Transwell® System lag darin, dass ein *ex vivo* Gewebestück von Schweinedarm, eingespannt in eine Ussing-Kammer, verwendet wurde.

### 2.2.17.1 Organentnahme und Präparation der Epithelien

Die verwendeten Darmepithelien stammten von Schweinen im Alter zwischen 9-12 Monaten von Hofgut Acker in Bodenheim am Rhein. Die Tiere wurden elektrisch betäubt und sofort getötet. Unmittelbar nach dem Öffnen der Bauchdecke wurde ein 15 cm langes Stück direkt nach dem Magenende, der Duodenumabschnitt, entnommen und in eine mit kalter NTS Lösung, bestehend aus Base 1 und 2 (Tabelle 13), gefüllten Schottflasche zum Transport überführt.

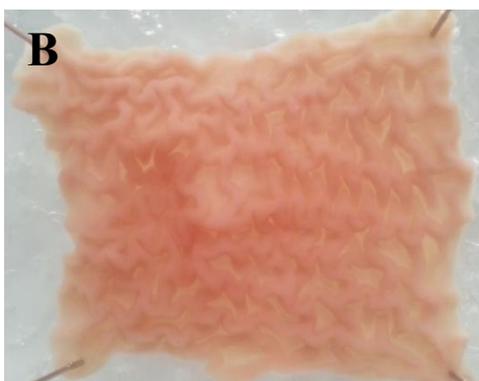
Tabelle 13: Zusammensetzung der kommerziell erworbenen NTS Lösung nach Zusammenmischen der beiden Basen im Verhältnis 1:1.

Substanz	Konzentration
NaCl	126,7 mM
KCl	5,4 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,05 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42 mM
NaHCO <sub>3</sub>	22 mM
Glucose	10 mM

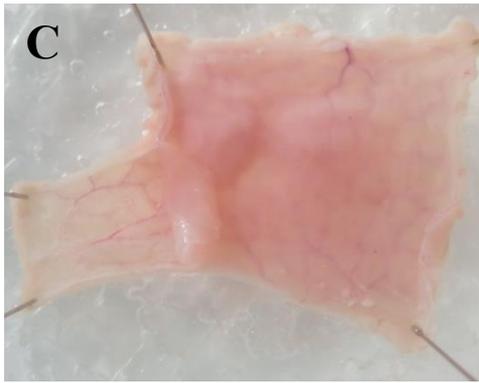
Im Labor wurde der Schweinedarm zügig präpariert (Abbildung 8) und zwischen zwei Us-sing-Kammerhälften eingespannt.



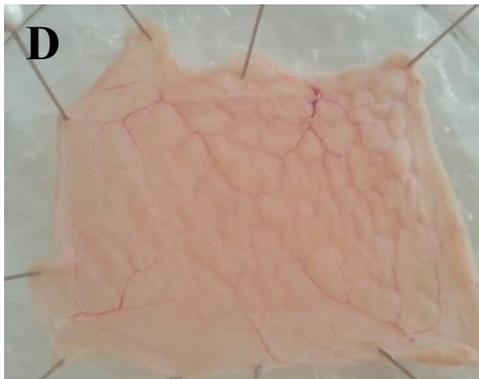
(A) Das etwa 10 cm große Stück Duodenum wurde zunächst von Mesenterium befreit und an der Mesenterium-Linie aufgeschnitten. Das Gewebe wurde in der NTS Lösung gründliche gespült und in der kalten NTS Lösung auf Eis platziert.



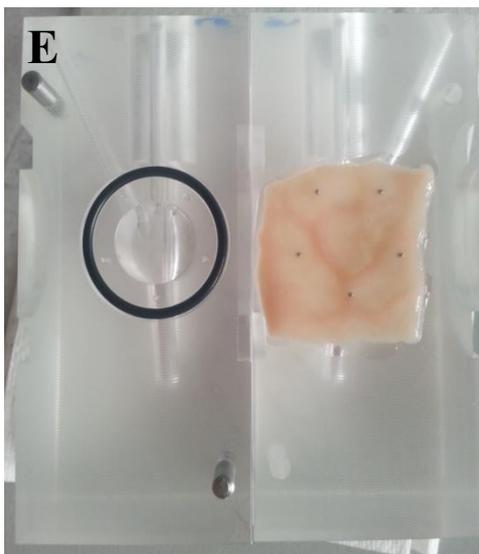
(B) Die mukosal liegende Innenseite des Zwölffingerdarms weist eine Vielzahl von Ringfalten auf, die durch die Schleimhaut (Tunica mucosa) geschützt sind.



(C) Als Nächstes wurden die Tunica serosa und Muskelschicht (Tunica muscularis) sehr vorsichtig von der Schleimhautschicht entfernt (= Strippen).



(D) Nach der Präparation des Gewebes lagen Tunica mucosa und Tela submucosa (nachfolgend als Epithel bezeichnet) mit darin verlaufenden Blutgefäßen frei.



(E) Ein Stück Epithel wurde anschließend passend ausgeschnitten und zwischen zwei Kammerhälften eingespannt. Der schwarze Silikonring diente als Pufferung, um Quetschungen des Gewebes zu vermeiden.

Abbildung 8: Präparation des Duodenums vom Schwein zum Einspannen in die Ussing-Kammer. Während der Vorbereitung befand sich das Gewebe in der NTS Lösung auf Eis. A) Zwölffingerdarmstück. B) Innenseite des Duodenums mit Ringfalten. C) Das Ablösen der Muskel- und Serosaschicht. D) Die frei liegende Schleimhautschicht (Tela submucosa) mit sichtbaren Blutgefäßen. E) Ausgeschnittenes Stück Epithel gespannt über die Nadeln einer Kammerhälfte (rechts) und schwarzer Silikonring (links) auf der zweiten Kammerhälfte.

### 2.2.17.2 Versuchsaufbau und Inkubation des Epithelgewebes

Der Versuchsaufbau und die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des Begründers des Systems, Herrn Ussing [141, 142]. Das für die Versuche verwendete Ussing-Kammer System besteht aus 6 Ussing-Kammern. Eine Ussing-Kammer setzt sich aus zwei Plexiglas-

halbkammern, zwischen die ein Epithelstück so eingespannt wird, dass die mukosale Seite nach rechts und die serosale Seite nach links ausgerichtet ist (Abbildung 9). Die mukosale Seite des Epithels entspricht dabei der luminalen Seite des Dünndarms und der apikalen Seite im Transwell® System. Die serosale Seite entspricht dem basolateral liegenden Kompartiment in dem Transwell® System und somit der Blutseite des Modells. Um Quetschungen an den Rändern der 1,0 cm<sup>2</sup> großen Epithelfläche zu vermeiden, wurde ein Silikonring zwischen Gewebe und Plexiglas platziert. In jede Kammerhälfte kamen 2 ml der entsprechenden Lösung, die auf beide Seiten gleichzeitig pipettiert wurde, um Druckunterschiede auf das Gewebe zu vermeiden.

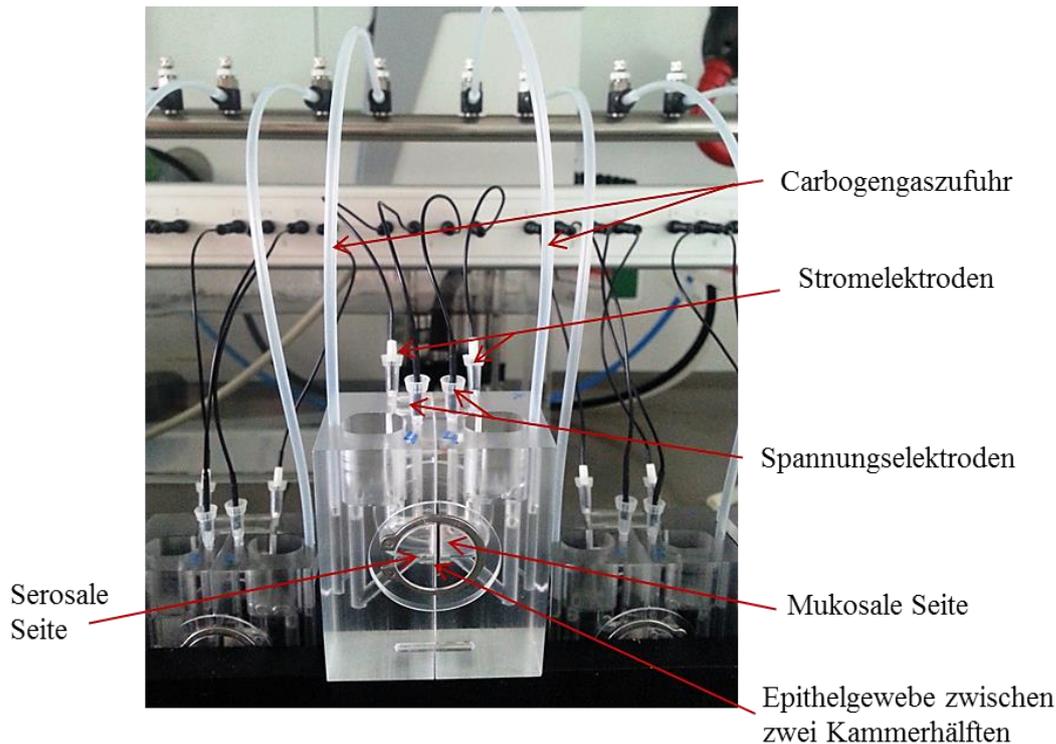


Abbildung 9: Ussing-Kammer mit Gasliftapparatur: Die mukosale Seite des Epithels entspricht der luminalen Seite und die serosale Seite der Blutseite. Die Zugabe der Nanopartikel-haltigen Lösung fand auf der mukosalen Seite statt und entsprach somit dem Transport der Substanzen aus Dünndarmlumen durch Enterozyten ins Blut. Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz wurde mittels Ag/AgCl Elektroden durchgeführt.

Die NTS-Lösung mit der zu testenden Substanz wurde auf die mukosale und die reine NTS-Lösung auf die serosale Seite gefüllt. Alle Lösungen wurden auf 38 °C vorgewärmt. Die 6 Kammern wurden zwischen zwei Wärmetauschern (Leisten), die an ein Wasserbad mit Thermozirkulator angeschlossen waren, eingespannt. Zur Erhaltung des Gewebes wurden alle Kammern mit Carbogen begast. Carbogen ist die Bezeichnung für ein Gasgemisch aus 95% Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und 5% Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>). Durch Begasung erfolgte eine kontinuierliche Durchmischung des Puffers bzw. der zugegebenen Substanzen und somit konnte die Bildung von ungerührten Lösungsschichten an der Epitheloberfläche vermieden werden. Bei einer Temperatur von 38 °C und Begasung mit Carbogen betrug der pH-Wert der Puffer 7,4. Zur Messung elektrophysiologischer Parameter wurden je Kammer vier Ag/AgCl Elektroden verwendet

(Abbildung 9). Sie dienen der Erfassung des Gewebepotentials und zur Einleitung des Stroms. Die Inkubation des Gewebes erfolgte über 4 h.

### **2.2.18 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Rasterelektronenmikroskopie diente der Analyse der Oberfläche der für 14 Tage im Transwell® System gewachsenen Caco-2 Zellen und der Untersuchung des Adhäsionsverhaltens der NP. Dafür wurden die Zellkultureinsätze, mit den auf der PC Membran gewachsenen Caco-2 Zellen, mit PBS gewaschen und mit 2,5%igem Glutaraldehyd sowie 1%igem Osmiumtetroxid je 30 min bei 37°C fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS erfolgte die Entwässerung über eine aufsteigende Isopropanolreihe jeweils für 5 Minuten. Dafür wurden 30%, 50%, 70%, 90% und 100% Isopropanol verwendet. Proben durften nicht trocken fallen und wurden in 100%igem Isopropanol über Nacht aufbewahrt. Der Austausch des Isopropanols gegen flüssiges CO<sub>2</sub> im Kritisch-Punkt-Trockner CPD 30 erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Kurz zusammengefasst, nach 9 Durchgängen wandelt sich flüssiges CO<sub>2</sub> in gasförmiges CO<sub>2</sub> um, ohne eine Phasengrenze zu passieren. Dadurch wird ein schonender Prozess der Dehydrierung erreicht. Gasförmiges CO<sub>2</sub> wird nach Abschluss der Trocknung langsam abgelassen und die Proben mit einer 5 nm dünnen Platinschicht bedampft.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Etablierung des Transwell® Systems in 12- und 24-Well Zellkultureinsätzen

##### 3.1.1 Reifung der Caco-2 Zellen in einer Langzeitkultur

In erster Linie stand die Charakterisierung der Langzeitzellkultur in einem Transwell® System im Vordergrund. Dafür wurden die Caco-2 Zellen in einem Kultureinsatz im Transwell® System für 14 Tage ausgesät. Die Polycarbonat-Membran ermöglichte dabei die Versorgung der Zellen mit den Nährstoffen von beiden Seiten, der apikalen und der basolateralen Zelloberfläche. Die Rasterelektronenmikroskopie ist eine geeignete Methode um die Oberfläche der adherenten Zellen zu untersuchen und die Strukturen ohne Einsatz der Fluoreszenzfärbung darzustellen. Die Aufnahmen haben gezeigt, dass sich nach 14 Tagen Kultivierung der Caco-2 Zellen eine konfluente polarisierte Schicht der dicht nebeneinander gewachsenen Zellen gebildet hat (Abbildung 10 A). Es ist ein deutlich ausgeprägter Bürstensaum mit den etwa 1  $\mu\text{m}$  großen Mikrovilli an den Zellrändern zu erkennen (Abbildung 10 B). Die gut ausgebildeten Mikrovilli führen zu einer 20 - 30-fachen Oberflächenvergrößerung im Darmbereich. Den Literaturangaben zufolge liegt die Länge der Mikrovilli bei 1  $\mu\text{m}$  [162]. Dies korreliert mit den festgestellten Ergebnissen.

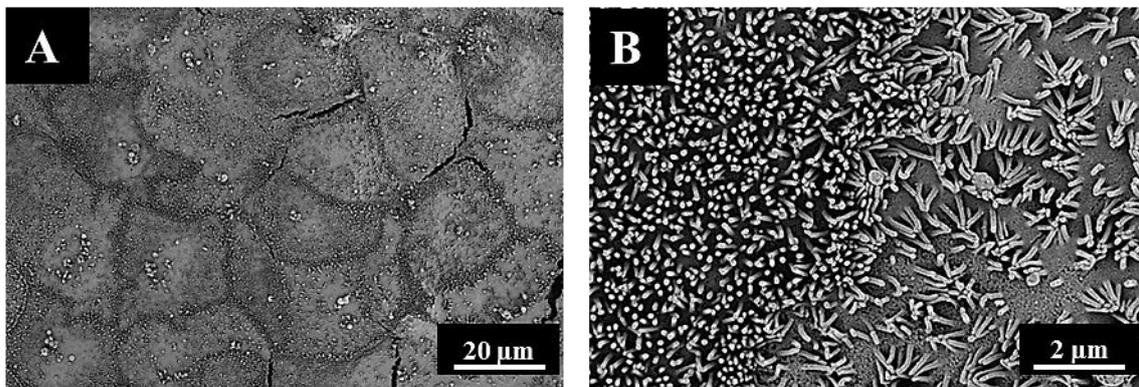


Abbildung 10: Darstellung der Oberfläche der Caco-2 Zellen nach 14-tägigem Wachstum im Transwell® System mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie. (A) Zellschicht auf der PC Membran, bestehend aus mehreren dicht nebeneinander gewachsenen Caco-2 Zellen. (B) Ausschnitt der Zelloberfläche einer Caco-2 Zelle mit deutlich sichtbaren Mikrovilli.

Wie es in der Literatur schon berichtet wurde, zeigt sich der Grad der Reifung der epithelialen Zellen wie Caco-2 durch eine starke Ausbildung der Mikrovilli an der apikalen Zelloberfläche am 12.-14. Tag der Kultivierung [125]. Eine große Vielzahl an Mikrovilli präsentiert die typischen Eigenschaften einer morphologischen und funktionellen Differenzierung der reifen Epithelzellen [126-128].

Eine weitere Methode, die Transmissionselektronenmikroskopie, wurde verwendet, um eine Caco-2 Zelle im Querschnitt auf das Wachstum der Mikrovilli zu untersuchen. Die Aufnahmen bestätigen ebenfalls das Vorhandensein eines Bürstensaums mit ausgeprägten Mikrovilli auf der apikalen Seite der Zelle nach 14 Tagen Wachstum im Transwell® System (Abbildung 11).

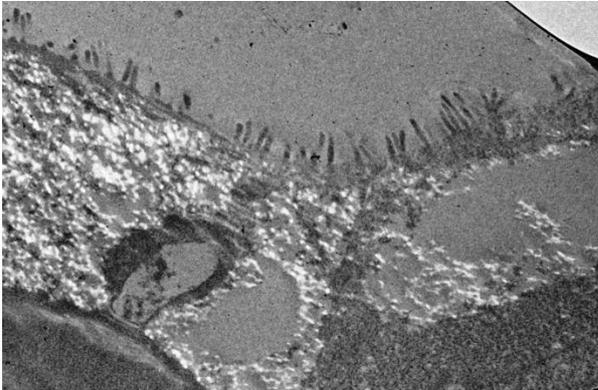


Abbildung 11: Caco-2 Zellen mit definierter Mikrovilli-Struktur auf der apikalen Zelloberfläche nach 14 Tagen Wachstum auf der Polycarbonat-Membran im Transwell® System. Die Präparate wurden zuerst über eine aufsteigende Isopropanolreihe dehydriert und anschließend im Harz eingebettet. Die Aufnahmen wurden unter Verwendung von Transmissionselektronenmikroskopie gemacht.

In der nächsten Untersuchung der Caco-2 Zellen in einer Langzeitkultur sollte die Expression des Enzyms Intestinale Alkalische Phosphatase (IALP) analysiert werden. Dieses Enzym ist in der Lage die Monophosphatester zu hydrolysieren und spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Verdauung und Adsorption der Nährstoffe im Darm. Dieses membranständige Bürstensaumprotein ist ein typisches Merkmal für die reifen Enterozyten nach der Differenzierung [122-124]. Wie die Aufnahmen zeigen, bindet ein Antikörper, anti-IALP, an das Enzym IALP in Mono- und Co-Kultur (Abbildung 12 A+B) und gibt somit einen Hinweis auf das Vorhandensein dieses Enzyms. Eine weitere Methode, die Durchflusszytometrie, zeigte quantitativ die Expression des Enzyms, wobei in beiden, Mono- und Co-Kultur, ungefähr die gleiche Menge an exprimiertem Enzym IALP detektiert wurde (Abbildung 12 C). Manche Studien haben über einen weiteren Marker Glycoprotein-2 (GP-2), das für die M-Zellen in den humanen Peyerschen Plaques spezifisch ist, berichtet [25]. Aus diesem Grund wurde ebenfalls eine Analyse mithilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Bei den Messungen konnte keine Expression des GP-2 in den Caco-2 Zellen festgestellt werden (Abbildung 12 C). Eine Untersuchung mithilfe des cLSM bestätigte die Ergebnisse, dass weder in Co-Kultur noch in Mono-Kultur ein GP-2 Protein exprimiert wird. Eine weitere Literaturrecherche zeigte den Grund. Das membranständige GP-2 wird als Glycosylphosphoinositol in Pankreas exprimiert und aufgrund einer hormonellen Stimulation zusammen mit Zymogenen in das Duodenum freigesetzt [163]. Vermutlich interagiert das GP-2 mit den Epithelzellen und bleibt verankert in der Epithelmembran. Diese Information im Zusammenhang mit den Ergebnissen verdeutlicht, dass dieses Protein nur in einem *in vivo* Gewebe und nicht in *in vitro* Kultur der Caco-2 Zellen nachgewiesen werden kann.

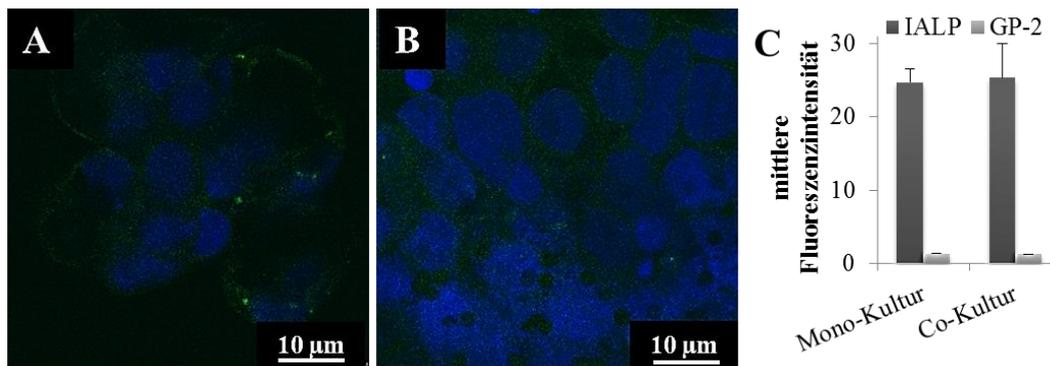


Abbildung 12: Expression der Intestinalen Alkalischen Phosphatase (IALP) bei Caco-2 Zellen kultiviert im Transwell® System als (A) Mono-Kultur und (B) als Co-Kultur. Die IALP wurde mit anti-IALP-FITC (grün) und der Zellkern mit DRAQ5 (blau) angefärbt. Die Bilder wurden mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie aufgenommen. (C) Expression des Enzyms IALP oder Proteins GP-2 in Mono- und Co-Kultur (Detektion erfolgte mittels Durchflusszytometrie).

Zum Vergleich der Größe und der Anordnung der Caco-2 Zellen in einer Langzeit- gegenüber einer Kurzzeitkultur wurden die Zellen für 14 Tage oder nur für 3 Tage ausgesät. Interessanterweise konnte ein deutlicher Unterschied in Ausbreitung und der Anordnung der Zellen festgestellt werden. Während die Zellen nach 3 Tagen Kultivierung eher sehr flach mit etwa 2-4  $\mu\text{m}$  Höhe und 20  $\mu\text{m}$  Zellkerndurchmesser ausgedehnt waren, zeigten die Zellen nach 14 Tagen Kultivierung eine Höhe von 18-20  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$  Zellkerndurchmesser (Abbildung 13 A+B). Diese Feststellung bestätigt die Annahme, dass die Caco-2 Zellen nach 2 Wochen einen sehr dichten impermeablen Epithelrasen bilden können und sind dadurch als ein Modell der intestinalen Barriere zur Analyse der Transportkapazität der medizinisch relevanten Substanzen geeignet.

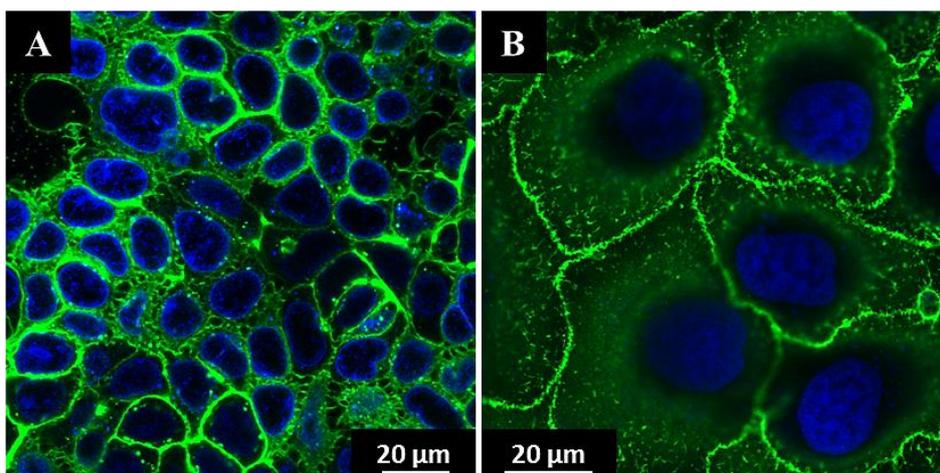


Abbildung 13: Darstellung der Caco-2 Zellschicht (A) nach 14 Tagen Wachstum auf der Polycarbonat-Membran mit 3  $\mu\text{m}$  Porengröße und (B) nach 3 Tagen Wachstum in einer  $\mu$ -Schale. Die Zellmembran wurde mit CellMask™ Orange (grün) und der Zellkern mit DRAQ5 (blau) angefärbt. Die Bilder wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen.



### 3.1.2 Untersuchung des Caco-2 Zellwachstums auf unterschiedlichen Membrantypen

Zur weiteren Etablierung des Transwell® Systems wurden die Zellkultureinsätze mit unterschiedlichen Membrantypen getestet. Für diesen Test wurde eine Polycarbonat-Membran mit einem Porendurchmesser von 3  $\mu\text{m}$  (Abbildung 14 A) und eine PTFE-Collagen-Membran (Abbildung 14 C) gewählt. Dafür wurden die Caco-2 Zellen in einer Langzeitkultur für 14 Tage ausgesät und anschließend mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie untersucht. Die Färbung der Membran gab einen Aufschluss über die Lokalisation der Zellen auf den Membranen. Die Aufnahmen haben gezeigt, dass auf beiden Membrantypen die Epithelzellen apikal einen dichten Zellrasen gebildet haben und etwa die gleiche Höhe aufwiesen. Ein signifikanter Unterschied ließ sich bei der Lokalisation der Zellen feststellen. Bei der PC-Membran war eine dünne Zellschicht auf der basalen Membranseite erkennbar (Abbildung 14 B). Vermutlich waren die Zellen in der Lage durch die 3  $\mu\text{m}$  Poren durch die Membran auf die andere Seite zu migrieren und eine sehr flache Schicht zu bilden.

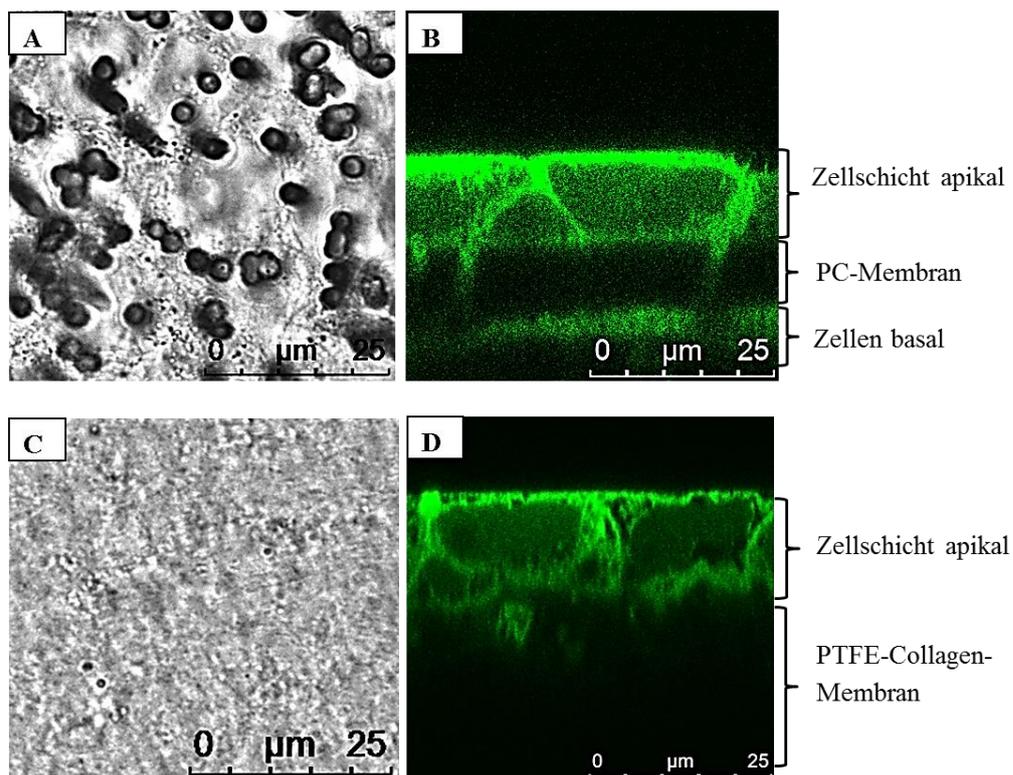


Abbildung 14: Wachstum der Caco-2 Zellen auf den unterschiedlichen Membrantypen im Transwell® System nach 14 Tagen. A) PC-Membran mit Poren mit einem Durchmesser von 3  $\mu\text{m}$ ; B) Caco-2 Zellschicht gewachsen auf der PC-Membran; C) PTFE-Collagen-Membran; D) Caco-2 Zellen gewachsen auf der PTFE-Collagen-Membran. Die Zellen wurden nur auf der apikalen Seite der Zellkultureinsätze ausgesät. Die Bilder wurden mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie aufgenommen. Die Zellmembran wurde mit CellMask™ Orange (grün) angefärbt.

### 3.1.3 Vergleich der Zellschichtpermeabilität und der Intaktheit in Bezug auf Wachstum auf den unterschiedlichen Membranen

Die Permeabilitätsbarriere reguliert den Transport von Wasser und gelösten Stoffen durch die Epithelzellen, da diese selektiv arbeitet und somit die freie Diffusion einschränkt. Die Permeabilität und die Dichte des Zellrasens, gewachsen in einem *in vitro* System, spielen somit eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der Transzytose. Deswegen wurde neben einer qualitativen Prüfung mittels cLSM auch eine quantitative Analyse des Zellwachstums im Transwell® System durchgeführt.

Für dieses Experiment wurden unterschiedliche Membranarten mit einem Durchmesser einer 12-Well oder 24-Well Platte gewählt. Dabei handelt es sich um eine Polycarbonat-Membran sowie PET-Membran mit 3 µm Porendurchmesser, mit oder ohne Matrigelbeschichtung, und eine PTFE-Collagen-Membran. Zur Bestimmung der Durchlässigkeit des Zellrasens von apikal nach basolateral nach 14 Tagen Wachstum im Transwell® System wurde 4 kDa Dextran gewählt.

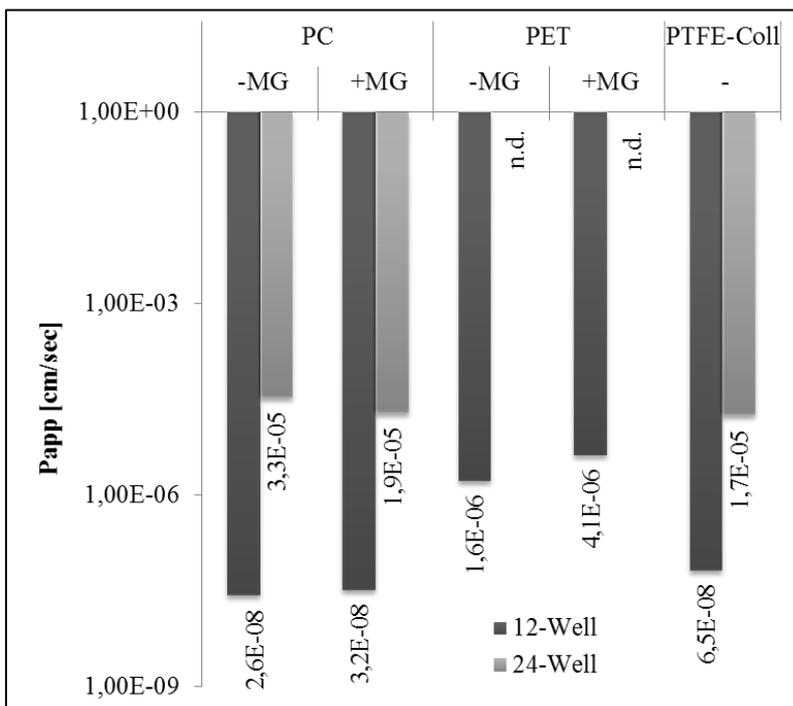


Abbildung 15: Apparenter Permeabilitätskoeffizient (Papp) gemessen in den Zellkulturen in 12- oder 24-Well Zellkultureinsätzen im Transwell® System nach 14 Tagen. Die Bestimmung der Permeabilität erfolgte mittels 4 kDa Dextran. Dafür kamen 0,5 ml 100 µM Dextran gelöst im Wachstumsmedium auf die apikale Insertseite. Auf die basolaterale Seite kamen 1,5 ml Wachstumsmedium. Die Beschichtung der PC und PET Membranen mit Matrigel erfolgte vor dem Aussäen der Caco-2 Zellen. PC: Polycarbonat Membran; PET: Polyethylenterephthalat; PTFE: Polytetrafluorethylen Membran; MG: Matrigel.

Die berechneten Papp-Werte haben einen deutlichen Größenunterschied und somit eine ungleiche Durchlässigkeit für Dextran gezeigt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass insgesamt die Zellen, die in dem 12-Well Insert gewachsen sind, eine höhere Dichte und somit eine niedrigere Permeabilität für Dextran aufweisen im Vergleich zu den Zellschichten im 24-Well Kulturein-

satz. Diese lagen im Bereich von  $1,6E-06$  cm/sec -  $2,6E-08$  cm/sec für das Wachstum in 12-Well Platten und  $1,7E-05$  cm/sec -  $3,3E-05$  cm/sec für das Wachstum in 24-Well Platten (Abbildung 15). Die höchste Dichte demonstrierten die auf der 12-Well PC-Membran ohne Matrigel kultivierten Caco-2 Zellen mit einem Papp-Wert von  $2,6E-08$  cm/sec. Gemäß verschiedenen Studien sind die Papp-Werte unter  $2E-06$  cm/sec für eine niedrige Permeabilität, im Bereich von  $2E-06$  -  $20E-06$  cm/sec für eine mittlere Permeabilität und mit den Werten über  $20E-06$  cm/sec für eine hohe Permeabilität charakteristisch [15, 164-166]. Diese Ergebnisse gaben einen deutlichen Hinweis, dass die Inserts mit 12-Well PC- Membran ohne Matrigel-Beschichtung die höchsten Dichteigenschaften aufweisen und somit für die weiteren Versuche am besten geeignet sind.

Eine weitere Methode, die Intaktheit und somit die Stabilität der Zellschicht zu überprüfen ist die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER). Dieser beschreibt vor allem die ionische Leitfähigkeit der transzellulären Vorgänge durch eine Zellschicht. Ein hoher elektrischer Widerstand steht für eine niedrige ionische Permeabilität und gibt die transzelluläre Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte wieder [136, 167, 168].

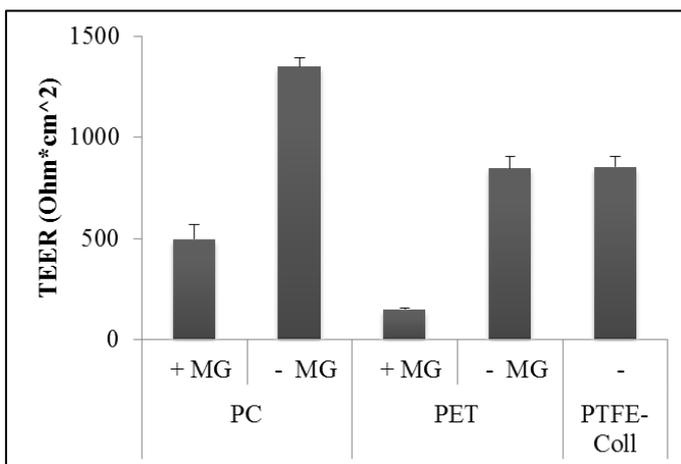


Abbildung 16: Transepithelialer Elektrischer Widerstand (TEER) gemessen in den Zellkulturen in 12-Well Zellkultureinsätzen im Transwell® System nach 14 Tagen. Bei den PC und PET Membranen erfolgte eine Beschichtung mit MG vor dem Aussäen der Caco-2 Zellen. PC: Polycarbonat Membran; PET: Polyethylenterephthalat; PTFE: Polytetrafluorethylen Membran; MG: Matrigel.

Die gemessenen TEER-Werte zeigten, dass die Beschichtung der Membranen mit Matrigel den TEER-Wert verringert (um ein 3-faches für PC-Membranen und ein 4-faches für PET-Membranen) (Abbildung 16) und dadurch die transzelluläre Durchlässigkeit für die Substanzen erhöht. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Werten für den apparenten Permeabilitätskoeffizienten (Abbildung 15). Die höchsten TEER-Werte wurden bei der PC-Membran ohne Matrigel-Beschichtung mit  $1300$  Ohm\*cm<sup>2</sup> gemessen (Abbildung 16). Diese Feststellung stimmt mit den Ergebnissen der Papp-Werte überein und bestätigt dadurch die höchste transzelluläre Intaktheit der Caco-2 Epithelschicht gewachsen auf einer 12-Well PC-Membran ohne Beschichtung.

Im nächsten Schritt der Etablierung des Transwell® Systems sollten die Mono- und Co-Kultur am 17. Tag der Kultivierung auf die transzelluläre Dichtigkeit überprüft werden. Die Messergebnisse haben gezeigt, dass die Mono-Kultur nach 17 Tagen basalen Inkubation mit Wachstumsmedium einen höheren TEER-Wert als nach 14 Tagen im Transwell® System zeigt. Im Gegensatz dazu weist die Co-Kultur nach 3 Tagen basaler Inkubation mit Raji eher niedrigere TEER-Werte auf (Abbildung 17). Dieses Resultat korreliert mit den Feststellungen anderer Studien, die ebenfalls bei den Co-Kulturen einen niedrigeren TEER-Wert gezeigt haben [169].

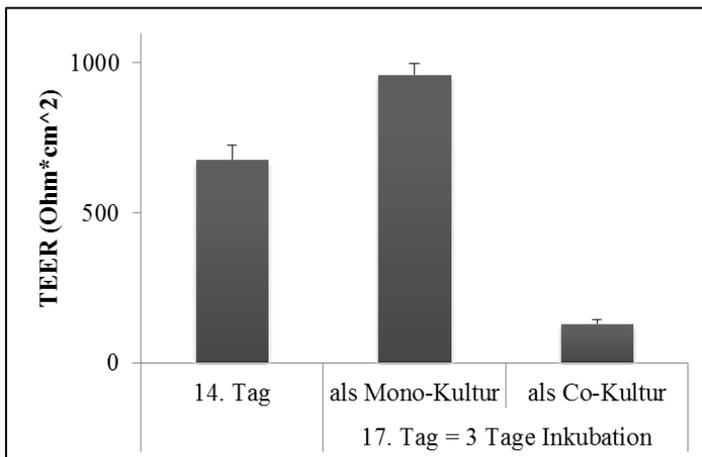


Abbildung 17: Transepithelialer Elektrischer Widerstand (TEER) der Zellkulturen am 14. Tag und am 17. Tag Wachstum als Mono- oder Co-Kultur in 12-Well Einsätzen. Die Caco-2 Zellen wurden auf den PC Membranen 14 Tage lang im Wachstumsmedium kultiviert. Anschließend wurden für 3 Tage entweder Wachstumsmedium EMEM (als Mono-Kultur) oder Raji-Zellen in EMEM (als Co-Kultur) basal zugegeben. Die Messung der TEER Werte erfolgte am 14. und am 17. Tag.

Die Analyse der Morphologie hat gezeigt, dass die M-Zellen weniger Mikrovilli, eine reduzierte Mukusschicht sowie einen unregelmäßig verteilten Bürstensaum aufweisen und als immunologisch aktive Zellen eine höhere Transportrate besitzen [22, 23, 137, 170]. Vermutlich haben sich die Caco-2 Zellen wie erwartet nach basolateraler Zugabe der Raji-Zellen zu M-Zellen differenziert und dadurch eine höhere Aktivität für transzellulären Transport der Ionen erreicht. Dies kann ein Grund für eine niedrigere Dichtigkeit des Zell-Layers sein.

### 3.1.4 Permeabilität der Caco-2 Zellschicht bei Mono- und Co-Kulturen im Transwell® System

Die parazelluläre Permeabilität der Caco-2 Zellschicht für Mono- und Co-Kulturen nach 4 h und 24 h Inkubationszeit wurde mithilfe des Dextrans oder Transferrins mit oder ohne Zugabe des FBS getestet. Aus der Literatur ist bekannt, dass ein Papp-Wert unter 1,0E-06 einem dichten Zell-Layer entspricht [15, 164-166]. Alle Papp-Werte lagen im Bereich von 1,2E-07 - 7,6E-07 cm/sec. Bei den Mono-Kulturen ließ sich ein etwas niedrigerer Papp-Wert im Vergleich zu Co-Kulturen erkennen, wobei die Mono-Kultur nach 24 h Inkubation Dextran+FBS die höchste Dichte für den parazellulären Transport aufwies (Abbildung 18). In Anwesenheit des FBS im

Medium erhöhte sich die Permeabilität jedoch um etwa 15% - 20% im Vergleich zu den Proben ohne FBS.

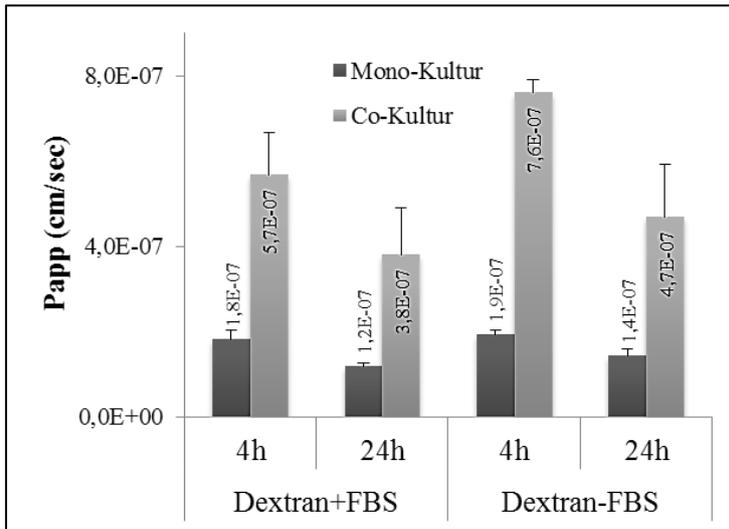


Abbildung 18: Apparenter Permeabilitätskoeffizient (Papp) für Mono- und Co-Kulturen nach 4 h und 24 h Inkubation mit 4 kDa Dextran. Die Caco-2 Zellen wurden 14 Tage im Transwell® System kultiviert. Anschließend kamen 0,5 ml 100 µM Dextran gelöst im Wachstumsmedium mit oder ohne FBS auf die apikale Insertseite. Auf die basolaterale Seite kamen 1,5 ml Wachstumsmedium mit oder ohne FBS.

Die festgestellten Resultate für Papp-Werte korrelieren mit den TEER-Werten und zeigen, dass die Co-Kulturen mit den vorhandenen M-Zellen eine höhere parazelluläre und transzelluläre Permeabilität aufweisen und somit ein Indiz für einen transzytotisch aktiveren Zellverband sind. Als Nächstes wurden die Papp-Werte mittels Transferrin mit oder ohne FBS bestimmt. Transferrin wurde gewählt, um den Vergleich zwischen den unterschiedlich großen Substanzen zu überprüfen. Das Molekulargewicht für Transferrin liegt bei 75 kDa und für Dextran bei 4 kDa. Die errechneten Werte befanden sich zwischen 1,4E-08 und 1,0E-07 cm/sec (Abbildung 19) und lagen somit im Normbereich unter 1,0E-06 cm/sec. Interessanterweise zeigten die Zellschichten für 75 kDa Transferrin eine höhere Dichtigkeit als für 4 kDa Dextran.

Dieses Experiment verdeutlichte, dass die Größe der Substanzen entscheidend für ihre Transportfähigkeit ist und mit der Durchgängigkeit der Substanzen durch eine Zellschicht korreliert.

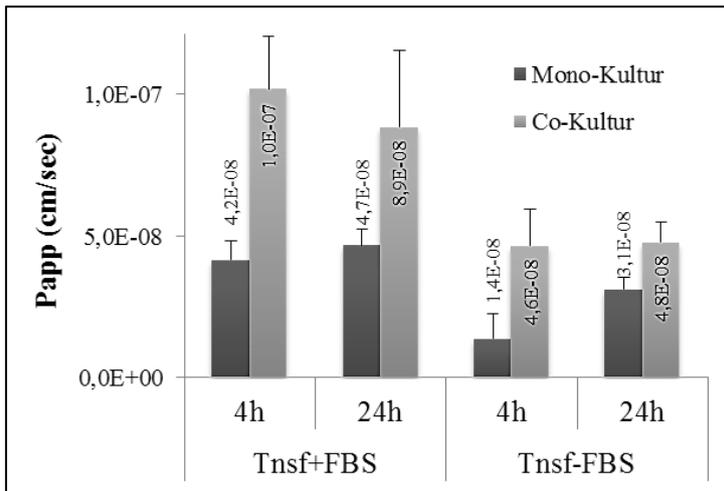


Abbildung 19: Apparenter Permeabilitätskoeffizient (Papp) für Mono- und Co-Kulturen nach 4 h und 24 h Inkubation mit Transferrin. Die Transferringröße lag bei etwa 75 kDa. Die Caco-2 Zellen wurden 14 Tage im Transwell® System kultiviert. Anschließend wurden 0,5 ml Transferrin mit einer Konzentration von 50 µg/ml im Wachstumsmedium mit oder ohne FBS gelöst und auf die apikale Seite zugegeben. Auf die basolaterale Seite kamen 1,5 ml Wachstumsmedium mit oder ohne FBS.

### 3.1.5 Vermehrung der Caco-2 Zellen im Transwell® System

Die Bestimmung der Zellzahl in Mono- und Co-Kulturen diente neben der Detektion der Papp- und TEER-Werte ebenfalls der Charakterisierung. Die M-Zellen sind vor allem für die Aufnahme und Beseitigung der pathogenen Organismen zuständig und sind spezialisiert für die Translokation der Mikroorganismen und der Antigene aus dem intestinalen Lumen in die Richtung der basolateralen Epithelseite, wo diese den Lymphozyten sowie den Makrophagen ausgeliefert werden [25, 26]. Auffallend war, dass die Zellzahl in den Co-Kulturen im Vergleich zu den Mono-Kulturen mit den NP um etwa 25% reduziert war und keinen Unterschied zwischen den Inkubationszeiten von 4 h und 24 h nach der Partikelzugabe zeigte (Abbildung 20).

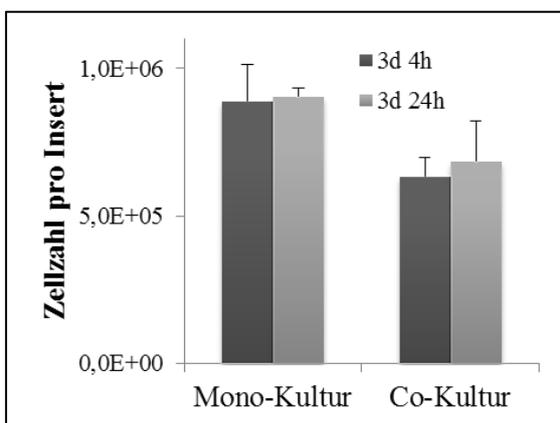


Abbildung 20: Bestimmung der Zellzahl im Transwell® System nach 3 Tage Inkubation mit Raji Zellen in Co-Kultur oder mit Wachstumsmedium in Mono-Kultur. Nach 4 h oder 24 h Zugabe der PS-COOH NP wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl bestimmt. 3d: 3 Tage Inkubation.

Der Vergleich zwischen den 3 Tage und 5 Tage Mono- bzw. Co-Kultur zeigt, dass in den 3 Tage Mono- und Co-Zell-Layern eine höhere Zellzahl als in den 5 Tage Kulturen zu verzeichnen ist. Dabei lag die Zellzahl nach 5 Tagen Kultivierung für die Mono-Kultur um 10% und für die Co-Kultur um 20% niedriger, als nach 3 Tagen Inkubation (Abbildung 21).

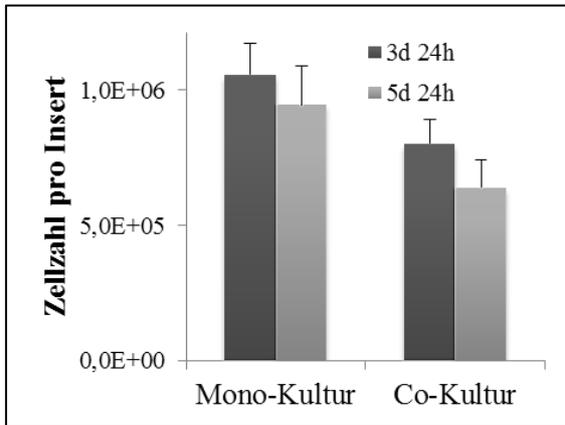


Abbildung 21: Bestimmung der Zellzahl im Transwell® System nach 3 und 5 Tagen Inkubation mit Raji-Zellen in Co-Kultur. Mono- und Co-Kultur wurden zuerst jeweils 24 h mit PS-COOH NP inkubiert und anschließend nach der Ablösung von der PC Membran gezählt. 3d/5d: 3/5 Tage Inkubation.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Modifizierung und die Differenzierung der in Co-Kultur gewachsenen Caco-2 Zellen im Vergleich zu denen in Mono-Kultur sein, da sich in Co-Kultur das FAE mit den M-Zellen gebildet hat. Dieser Versuch konnte veranschaulichen, dass die 3 Tage Kulturen eine höhere Zellzahl aufweisen und deswegen für die weiteren Experimente verwendet wurden.

### 3.1.6 Proliferationszustand der Zellen im Transwell® System

Zur Bestimmung des Proliferationszustandes der Caco-2 Zellen in Mono- und Co-Kulturen wurde der CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) herangezogen. Dieser beruht auf der Fähigkeit der metabolisch aktiven Zellen, das MTS Tetrazolium mithilfe von ADPH oder NADH, welches von Dehydrogenasen produziert wird, zu Formazan zu reduzieren und erlaubt dadurch eine schnelle Detektion der Zellviabilität aufgrund eines Farbumschlags [171, 172].

In diesem Experiment stand es im Vordergrund die Viabilität in Mono- und Co-Kulturen nach 3 oder 5 Tagen zu untersuchen. Die Messwerte haben gezeigt, dass die Zellen in Mono-Kulturen eine stärkere metabolische Aktivität besitzen. Die Co-Kulturen zeigten nach 4 h Inkubation mit NP eine um 40% und nach 24 h Inkubation eine um 30% reduzierte Proliferation. Zwischen den 3 Tagen und 5 Tagen Kultivierung in Mono- oder Co-Kultur wurden keine Unterschiede festgestellt (Abbildung 22).

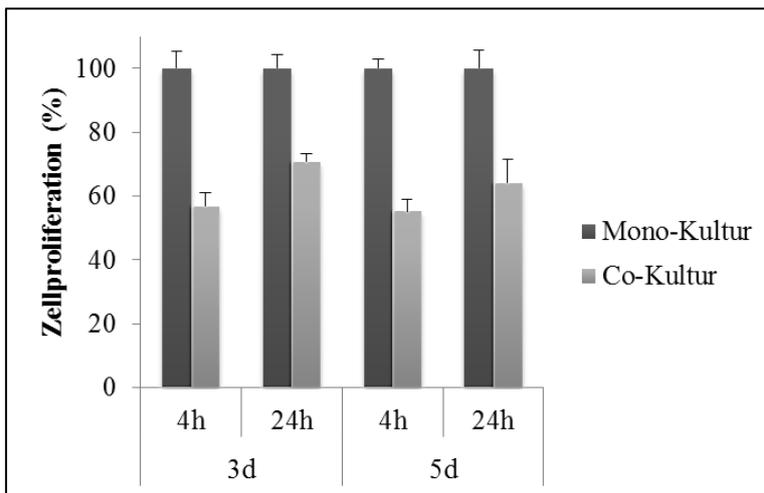


Abbildung 22: Proliferationszustand der Zellen im Transwell® System nach einer 3-tägigen und 5-tägigen Inkubation der Caco-2 Zellen mit Raji Lymphozyten in Co-Kultur. Die Caco-2 Zellen wurden für 14 Tage in die Zellkultureinsätze ausgesät und anschließend mit basal zugegebenen Raji-Zellen 3 oder 5 Tagen in Co-Kultur gehalten. Die Bestimmung des Proliferationszustandes auf der apikalen Seite des Systems erfolgte nach einer 4 h oder 24 h Inkubation mit PS-COOH NP mithilfe des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS).

Eine mögliche Erklärung könnte die verminderte Anzahl der Caco-2 Zellen in der Co-Kultur (Abbildung 20, Abbildung 21) und somit eine niedrigere Menge des exprimierten Enzyms Dehydrogenase sein. Außerdem ist bekannt, dass die M-Zellen eine verminderte Expression der Verdauungsenzyme im Vergleich zu den intestinalen Enterozyten aufweisen [22, 23]. Möglicherweise werden solche Enzyme, wie z. B. Dehydrogenasen, in ihrer Expression ebenfalls reduziert.

## 3.2 Etablierung des Ussing-Chamber Systems

### 3.2.1 Bestimmung der Permeabilität des Duodenumgewebes im Ussing-Chamber System

Das Prinzip des Aufbaus eines Ussing-Chamber Systems wurde bereits im Abschnitt „Materialien und Methoden“ erklärt (2.2.17). Diese *ex vivo* Methode dient als Vergleich zu dem *in vitro* Transwell® System. Das Gewebe des Duodenums, entnommen aus einem Schwein, ist ein üblicherweise verwendetes Material zur Messung der Transportrate der medizinisch relevanten Substanzen. Da dieses in seinen anatomischen und physiologischen Eigenschaften dem menschlichen Intestinalgewebe sehr ähnlich ist, eignet es sich sehr gut, um mehr Informationen über den Transport der Substanzen auf dem oralen Weg zu untersuchen [173, 174]. Das Duodenumgewebe eines Schweins wurde zwischen zwei Plexiglas-Kammern eingespannt und mittels Transferrin und Dextran hinsichtlich der Permeabilität untersucht.



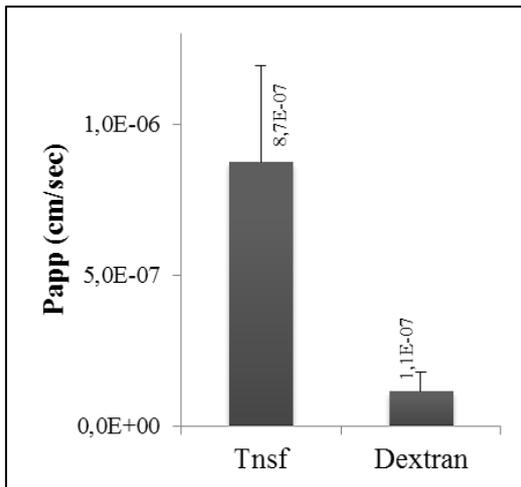


Abbildung 23: Apparenter Permeabilitätskoeffizient für das Schweinedarmgewebe im Ussing-Chamber System. Die Permeabilität wurde mithilfe des 75 kDa Transferrins und 4 kDa Dextrans bestimmt. Anschließend kamen 2 ml 100  $\mu$ M Dextran oder 50  $\mu$ g/ml Transferrin gelöst in NTS auf die mukosale Duodenumseite. Auf die serosale Seite kamen 2 ml NTS. Die Inkubationszeit betrug 4 h.

Die Permeabilität wurde von mukosal nach serosal untersucht, was der Anordnung im Transwell® System von apikal nach basolateral entspricht. In die mukosale Kompartimentseite wurde die zu testende Substanz gelöst in NTS und in die serosale Seite ausschließlich NTS Medium gefüllt. Das Duodenumgewebe zeigte mit 8,7E-07 cm/sec für Transferrin und 1,1E-07 cm/sec für Dextran eine gute Dichtigkeit, die vergleichbar mit den Papp-Werten der Zellkulturen im Transwell® System sind (Abbildung 18, Abbildung 19). Ein wesentlicher Unterschied war, dass das Duodenumgewebe für Transferrin mehr durchlässig war, als für Dextran, obwohl Transferrin mit 75 kDa ein größeres Molekulargewicht aufweist. Ein Grund dafür könnte sein, dass Transferrin in geringen Mengen von den Zellen des duodenalen Gewebes aufgenommen wird und auf die serosale Seite aktiv transportiert werden kann. Transferrin ist ein körpereigenes Eiweiß, das für den Transport des Eisens ins Blut zuständig ist. Es wurde berichtet, dass in intestinalen Epithelzellen ein Transferrinrezeptor exprimiert wird und somit für die Absorption des Eisens im Duodenum sorgt. Die Eisenaufnahme geschieht vor allem in den Enterozyten des Duodenums und des oberen Jejunums [175, 176], was als eine Erklärung für die höheren Detektionswerte angesehen werden kann. Dextran dagegen ist ein von Bakterien produziertes Polysaccharid, für das im Duodenum keine Rezeptoren zur Aufnahme ins Blut zu finden sind. Zusammengefasst, entsprechend den detektierten Papp-Werten, zeichnen sich das duodenale Gewebe und die Caco-2 Zellschicht gewachsen im Transwell® System durch eine sehr gute Intaktheit und somit hohe Dichte aus.

### 3.3 Polystyrol Nanopartikel

#### 3.3.1 Diffusion der PS Partikel durch unterschiedliche Membrantypen

Die Fähigkeit der Nanopartikel eine poröse Membran aufgrund einer passiven Diffusion zu überqueren ist entscheidend bei der Untersuchung der Transportrate im Transwell® System. Die Menge der Nanopartikel, die die Membran durchqueren kann, ist ein Faktor, der in Betracht gezogen werden muss, um festzulegen, welche Art von Membran geeignet für die Transzytose Experimente ist. Dafür wurden unterschiedliche Membrantypen mit verschiedenen Beschichtungen untersucht. Für den Versuch wurden eine Polycarbonat-Membran mit einer definierten Porengröße von 3 µm und eine Polytetrafluorethylen-Membran (PTFE), die mit Collagen (Coll) beschichtet ist und keine bestimmte Porengröße aufweist, verwendet.

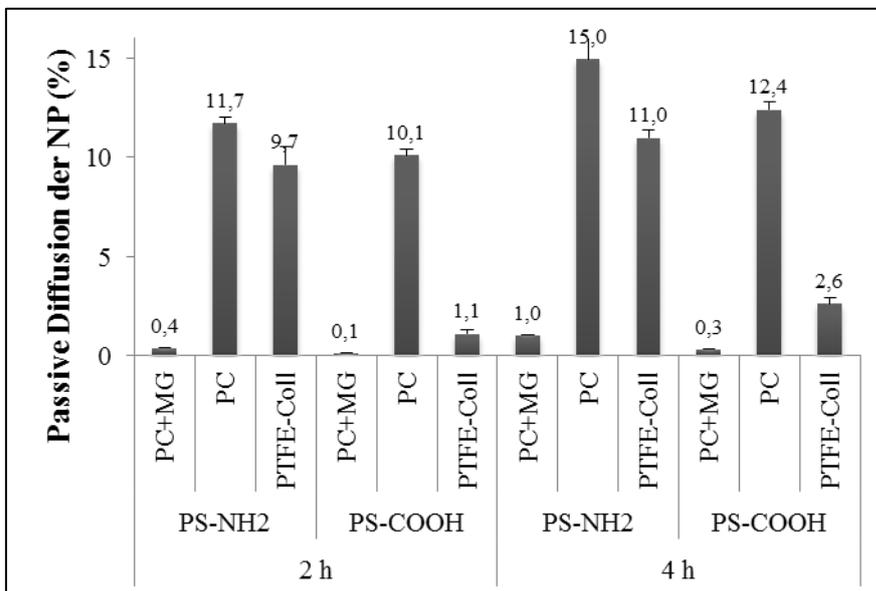


Abbildung 24: Passive Diffusion der NP durch die unterschiedlichen Membrantypen im Transwell® System nach 2 h und 4 h. Die eingesetzte Konzentration der NP lag bei 150 µg/ml. PS: Polystyrol, PS-COOH NP: carboxylierte PS NP, PS-NH2: aminierte PS NP, PC: Polycarbonat-Membran, MG: Matrigel als Beschichtung der Polycarbonat-Membran, PTFE-Coll: Polytetrafluorethylen-Membran beschichtet mit Collagen. Die Beschichtung der PC-Membran mit Matrigel erfolgte nach Anleitung des Herstellers und die PTFE-Coll-Membran wurde kommerziell erworben.

Aufgrund ihrer Durchlässigkeit und der Fähigkeit, die NP diffundieren zu lassen, zeigen die Membranen unterschiedliche Eigenschaften. Die Porengröße und die Beschichtung mit Collagen oder Matrigel (MG) spielten dabei eine wichtige Rolle bei der Passage der NP durch die Membranen. Es konnte festgestellt werden, dass die PC-Membran die besten Diffusionseigenschaften für beide, amino- und carboxyl-PS Partikel, aufweist. Schon nach 2 h konnten 12% der PS-NH2 NP und 10% der PS-COOH NP bzw. 15% und 12% nach 4 h durch die Poren auf die basolaterale Seite des Transwell®-Systems übertreten (Abbildung 24). Die Beschichtung der PC-Membran mit Matrigel verhinderte den Fluss fast vollständig. Durch die PTFE-Collagen-

Membran konnte nur für amino-PS NP eine Diffusion von 10% nach 2 h oder 11% nach 4 h detektiert werden. Für carboxyl-PS NP zeigte sich hingegen nur eine minimale Diffusionsrate von etwa 1% nach 2 h und 2% nach 4 h Diffusionszeit. Somit wurde die PC-Membran ohne Matrigel-Beschichtung für die weiteren Experimente im Transwell®-System gewählt. Dieses Ergebnis hat die vorher dargestellten Resultate für Papp- (Abbildung 15) und TEER- (Abbildung 16) Werte bekräftigt.

### 3.3.2 Adhäsionseigenschaften der PS NP (REM)

In einer weiteren Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) sollten die Eigenschaften der unterschiedlich geladenen Polystyrol Nanopartikel in Bezug auf die Bindungseigenschaften an die Zelloberfläche geklärt werden. Die negativ geladenen carboxyl-PS NP und positiv-geladenen amino-PS NP dienten als Modell.

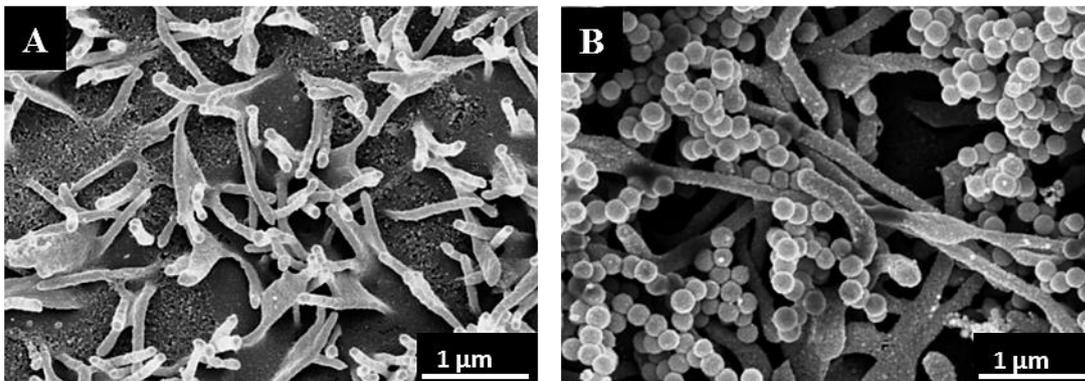


Abbildung 25: Darstellung der Oberfläche einer Caco-2 Zelle nach einer 24 h Inkubation mit den (A) PS-COOH NP und (B) PS-NH<sub>2</sub> NP mittels Rasterelektronenmikroskopie. Die Caco-2 Zellen wurden 14 Tage im Transwell® System gezüchtet und anschließend 24 h mit 150 µg/ml NP im Wachstumsmedium inkubiert. Die Dehydrierung der Zellen erfolgte über eine aufsteigende Isopropanolreihe mit anschließendem Austausch gegen Kohlendioxid. Um eine bessere Darstellung zu erzielen wurden die Proben mit Platin bedampft.

Die Caco-2 Zellen wurden im Transwell® System 14 Tage kultiviert, 24 h mit den PS NP inkubiert, gewaschen und anschließend über eine aufsteigende Isopropanolreihe dehydriert. Die Morphologie der ausdifferenzierten Enterozyten zeigte deutlich ausgebildete Mikrovilli an der apikalen Seite der Caco-2 Zellen (Abbildung 25). Die Aufnahmen ergaben interessante Befunde. Während an der Zelloberfläche, die vorher mit den carboxylierten NP behandelt wurde, keine Partikel zu finden waren (Abbildung 25 A), ließen sich bei der Probe nach der Inkubation mit PS-NH<sub>2</sub> NP große Mengen an feststehenden aminierten PS NP beobachten (Abbildung 25 B). Nach mehrmaligem Waschen ließen sich die PS-NH<sub>2</sub> NP von den Zellen nicht entfernen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die verbesserte Adsorption der positiv-geladenen Partikel aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den positiv-geladenen Aminogruppen und der negativ geladenen Zellmembran eine starke Anziehungskraft aufweist [177, 178]. Dadurch lässt sich die hohe Adhäsionskraft der PS-NH<sub>2</sub> NP an die Zelloberfläche erklären.

### 3.3.3 Cytotoxizitätstest der PS Nanopartikel

Die Bestimmung der Toxizität der Nanopartikel auf die Zellen und dadurch eine richtige Auswahl der Konzentration für die weiteren Experimente spielen eine wichtige Rolle bei der Anwendung der Partikel. Für die Zytotoxizitätsmessungen wurde der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay verwendet. Dafür wurden die Caco-2 Zellen den Polystyrol NP mit unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt. Nach 4 h oder 24 h Inkubation mit den Partikeln wurden diese entfernt und die Toxizität bestimmt.

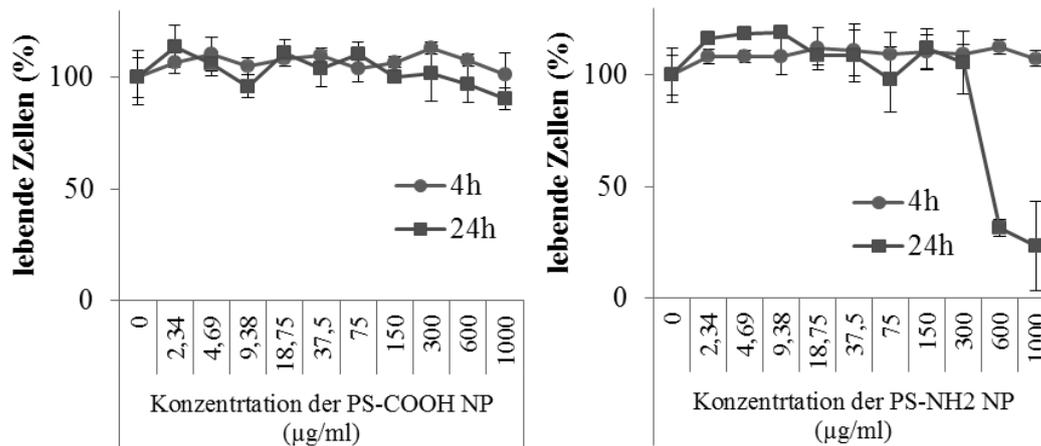


Abbildung 26: Zytotoxizität der (A) carboxyl-funktionalisierten und (B) amino-funktionalisierten PS NP auf Caco-2 Zellen nach einer 4 h oder 24 h Inkubation mit den Partikeln bis zu einer Konzentration von 1000 µg/ml im Wachstumsmedium. Für den Test wurde der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay verwendet.

Beide NP, PS-COOH NP und NH<sub>2</sub>-PS NP, haben nach 4 h Inkubation keine toxische Wirkung auf die Zellen gezeigt. Die Menge der lebenden Zellen blieb bei etwa 100% bis zu einer Konzentration von 1000 µg/ml (Abbildung 26 A + B). Nach einer Inkubation von 24 h zeigten die carboxylierten PS NP ebenfalls auch bei der höchsten Konzentration keinen toxischen Einfluss. Bei den amino-PS NP wurde jedoch ab einer Konzentration von 600 µg/ml ein toxischer Effekt festgestellt. Die Zahl der lebenden Zellen sank auf 40% (Abbildung 26 B). Es könnte an der direkten toxischen Wirkung der PS-NH<sub>2</sub> NP liegen oder, wie die REM Aufnahmen schon gezeigt haben (Abbildung 25 B), bedecken die amino-PS NP bei steigender Konzentration großflächig die Zelloberfläche und verhindern dadurch die Nährstoffzufuhr sowie den Gasaustausch mit dem Wachstumsmedium. Diese Tatsache führt zum partiellen Absterben der Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit den PS-NH<sub>2</sub> NP. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Konzentration von 150 µg/ml für die beiden Modellpartikel für die weiteren Experimente als Standardkonzentration gewählt.

### 3.3.4 Internalisation der PS NP in den Mono- und Co-Kulturen (cLSM)

Im nächsten Schritt wurden die Polystyrol Partikel auf ihre Fähigkeit in das Zellinnere aufgenommen zu werden, mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. In einer weiteren Fragestellung sollte geklärt werden, ob sich ein Unterschied zwischen Mono- und Co-Kultur qualitativ feststellen lässt.

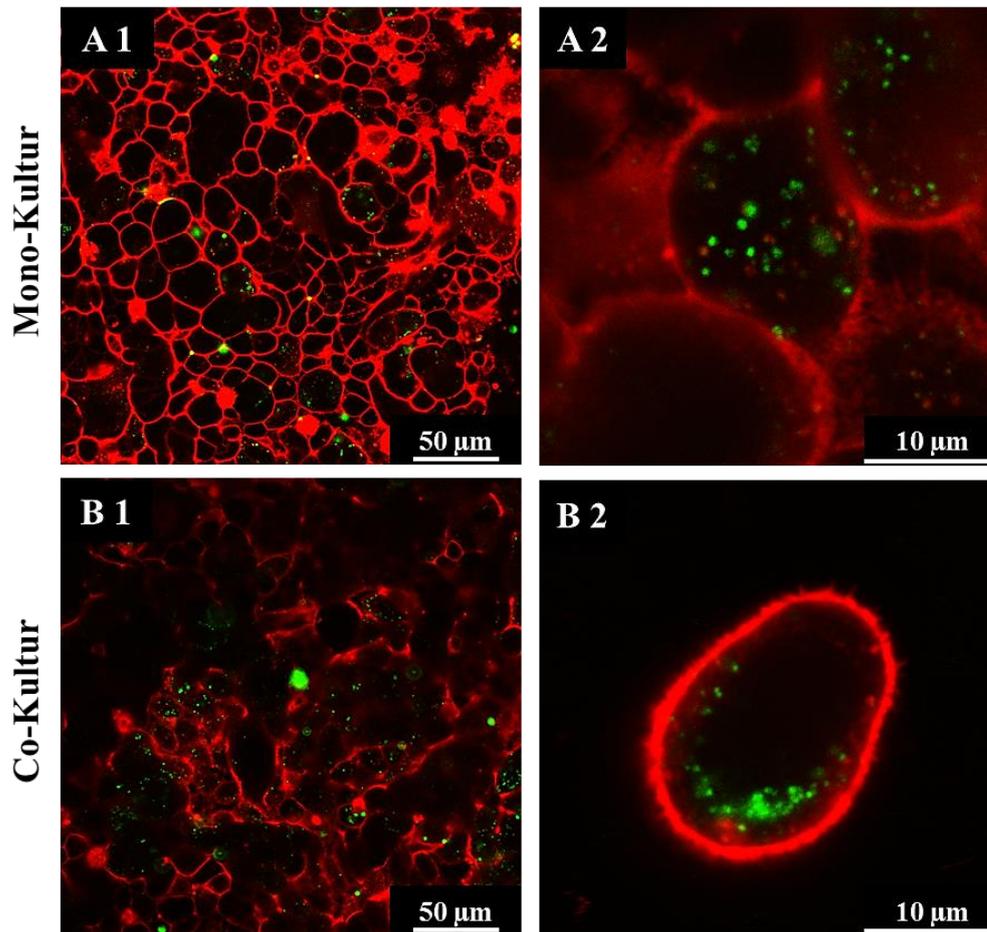


Abbildung 27: Internalisation der carboxyl-PS NP bei den (A) Mono-Kultur und (B) Co-Kultur Zellen, gewachsen 14 Tage im Transwell® System nach 24 h Inkubation. Die NP wurden mithilfe des Bodipy1 (grün) sichtbar gemacht. Die Zellmembran wurde mit CellMask™ Orange (rot) angefärbt. Die Bilder wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen.

Einige Gruppen haben bereits herausgefunden, dass die positiv-geladenen Partikel eine stärkere Adsorption an die Zellmembran aufweisen, als die neutral- oder negativ-geladenen Partikel [83]. Wie die Mikroskopieaufnahmen gezeigt haben, ließ sich deutlich erkennen, dass die carboxyl-PS NP nicht an der Zelloberfläche, dafür aber im Zellinneren, eingeschlossen in Vesikel, zu finden waren (Abbildung 27).

Die Mikroskopiebilder der mit amino-PS NP inkubierten Caco-2 Zellen zeigen ein Signal nicht nur in den Zellen, sondern auch an der Zelloberfläche (Abbildung 28).

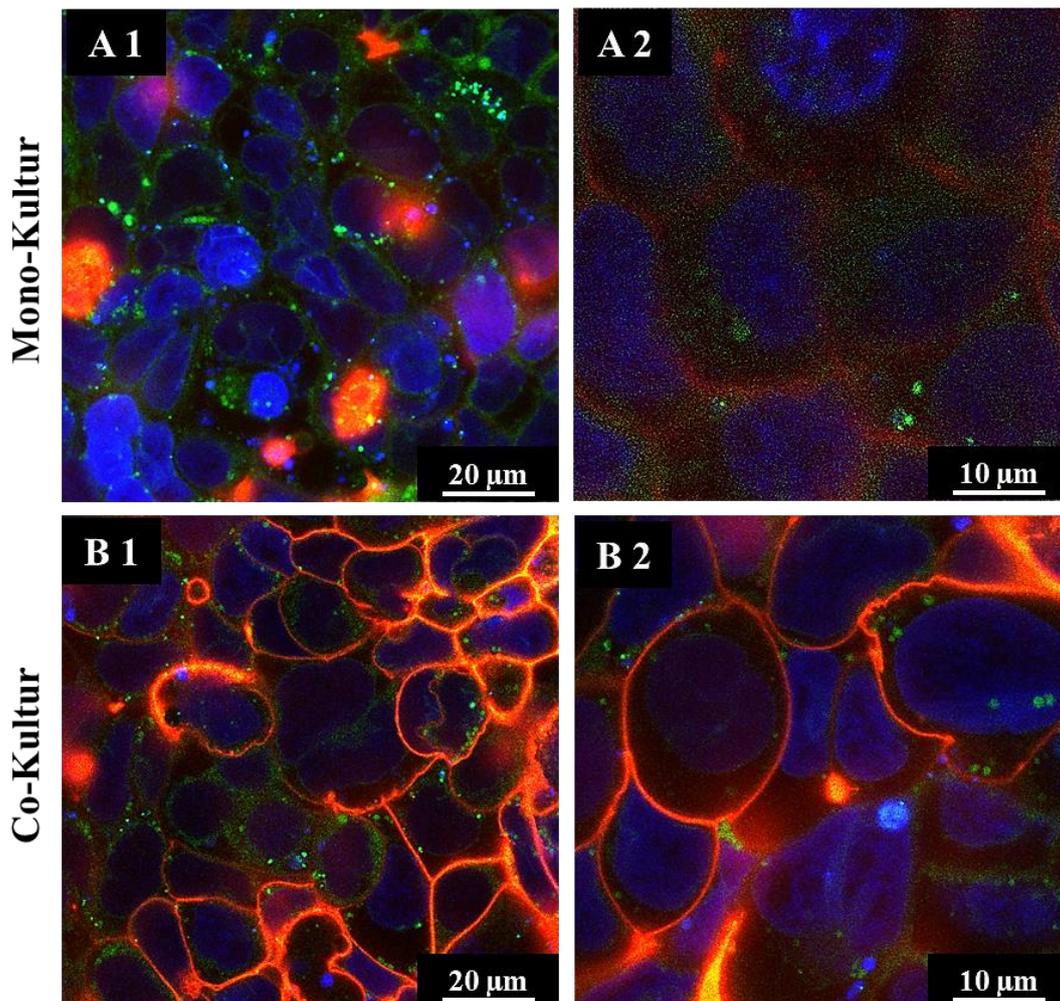


Abbildung 28: Internalisation der amino-PS NP in die (A) Mono-Kultur und (B) Co-Kultur Zellen, gewachsen 14 Tage im Transwell® System, nach 24 h Inkubation. Die NP wurden mithilfe des Bodipy2 (grün) sichtbar gemacht. Die Zellmembran wurde mit CellMask™ Orange (grün) und der Zellkern mit DRAQ5 (blau) angefärbt. Die Bilder wurden mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie aufgenommen.

Im Gegensatz zu den PS-COOH NP, zeigt die mit grün erkennbare Fluoreszenz der amino-PS NP eine Signalüberlagerung mit der roten Fluoreszenz der Membranfärbung, was sich in einem orange färbenden Signal äußert. Dies ist ein Hinweis auf eine Colokalisation der aminierten PS Partikel mit der Zellmembran und somit ein Indiz für eine starke Adsorption der PS-NH<sub>2</sub> NP an der Zelloberfläche (Abbildung 28). Diese Feststellung korreliert mit den REM Aufnahmen (Abbildung 25) und verdeutlicht den starken Effekt der unterschiedlichen Ladungen der Nanopartikel auf das Adhäsions- und Internalisationsverhalten.

Des Weiteren ließ sich erkennen, dass trotz des weniger ausgeprägten Adhäsionsverhaltens die negativ-geladenen PS-COOH NP besser als die amino-PS NP in die Zellen internalisiert werden können. Bei der Betrachtung der Mono- (Abbildung 27 A, Abbildung 28 A) und Co-Kulturen (Abbildung 27 B, Abbildung 28 B), konnte kein qualitativer Unterschied festgestellt werden. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass die Polystyrol Partikel grundsätzlich in der Lage sind, von den Epithelzellen aufgenommen zu werden.

### 3.3.5 Transzytose von PS NP im Transwell® System

#### 3.3.5.1 Unterschiedliche Inkubationsdauer der Zellkulturen mit Raji-Zellen als Co-Kultur

Zunächst sollte am Modell der 3 Tage und 5 Tage Mono- bzw. Co-Kultur die Transportrate der unterschiedlich funktionalisierten Polystyrol NP untersucht werden. Um die Zellkultur in dem Transwell® System in Bezug auf die Inkubationsdauer der Raji-Zellen in Co-Kultur als Modell für die Entwicklung des Follikel-assoziierten Epithels zu optimieren, wurden die Raji-Zellen basal für 3 oder 5 Tage zugegeben. Für diese Tests wurden die Caco-2-Zellen zuerst für 14 Tage in dem Transwell® System kultiviert und anschließend mit den basal zugegebenen Raji-Zellen als Co-Kultur für 3 oder 5 Tage gehalten. Die Untersuchung der Transzytose erfolgte in Richtung von apikal nach basolateral.

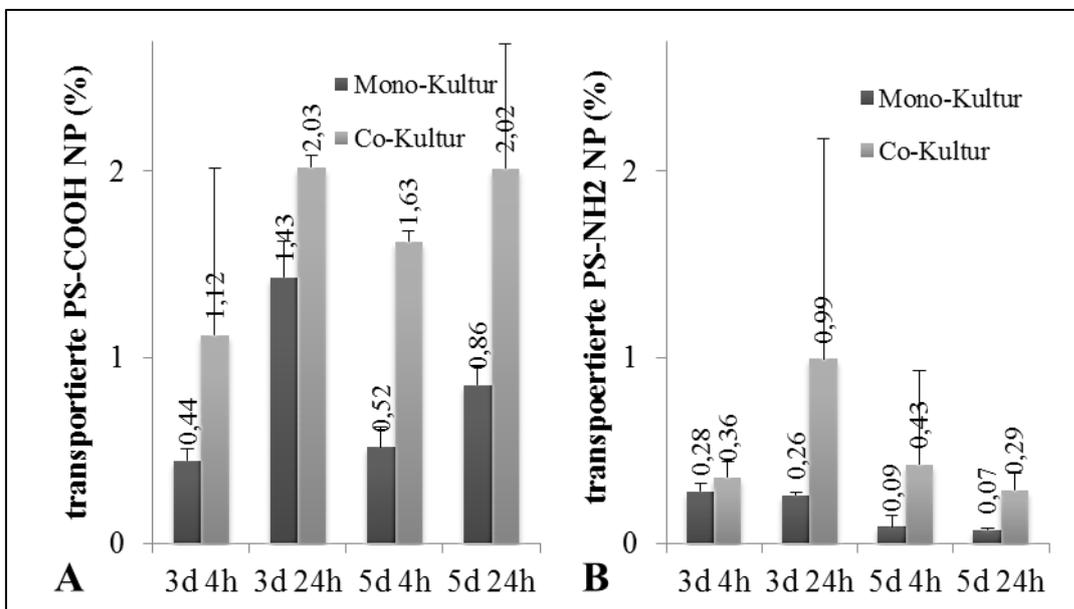


Abbildung 29: Vergleich der Transzytoserate der (A) PS-COOH NP und (B) PS-NH<sub>2</sub> NP durch 3 Tage oder 5 Tage Co-Kultur im Transwell® System. Die NP wurden im Wachstumsmedium mit FBS auf eine Konzentration von 150 µg/ml gelöst und für 4 h oder 24 h zu den Zellkulturen auf die apikale Insertseite gegeben.

Da einige wissenschaftliche Gruppen bereits über die Raji-Zellen in der Co-Kultur mit den Caco-2 Zellen für 2 bzw. 4-5 Tage Inkubationszeit berichtet haben [166, 179, 180], sollte geklärt werden, ob die Co-Inkubationszeit eine unterschiedliche Wirkung auf die Transzytoserate zeigt und welche Co-Inkubationsdauer für die weiteren Transportexperimente besser geeignet ist. Um die Transportrate zu analysieren, wurden als Modell die PS NP in Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 150 µg/ml verdünnt und apikal für 4 h oder 24 h zugegeben. Wie bereits beschrieben, erzeugt die Co-Inkubation von Caco-2-Zellen mit Raji-Zellen ein Modell für ein FAE mit M-Zellen [181, 182]. Diese M-Zellen sind immunologisch aktiv und besitzen die Fähigkeit, verstärkt einige pathogene Erreger und kleine Substanzen,

einschließlich Nanopartikel, transportieren zu können [183, 184]. Dies führt zu einem Unterschied bei den Transzytoseraten führt. Es wurde festgestellt, dass 3 Tage Mono- und Co-Kultur eine höhere Kapazität für Transzytose bei beiden Arten von Nanopartikeln, carboxyl- und aminofunktionalisierten, zeigen (Abbildung 29). Weiterhin sind die Zellen in der Co-Kultur in der Lage, eine zwei- bis dreimal höhere Menge an PS NPs im Vergleich zur Mono-Kultur durch die Zellschicht zu transportieren. Diese Feststellung gibt einen Hinweis auf die Anwesenheit von M-Zellen und verdeutlicht eine höhere Transzytose-Kapazität der NP in der Co-Kultur. Weiterhin wurde ersichtlich, dass im Allgemeinen die PS-COOH NP besser als die PS-NH<sub>2</sub> NP nach 4 h und 24 h Inkubationszeit transportiert werden können. Die für dieses Experiment verwendeten PS-COOH NP wurden mit SDS und die PS-NH<sub>2</sub> NP mit CTMA-Cl stabilisiert. Es wurde bereits berichtet, dass die in SDS redispergierten Kapseln eine um 30% bessere Aufnahme im Vergleich zu den in CTMA-Cl stabilisierten Kapseln, aufweisen [185]. Desweiteren kann dieser Unterschied durch die Anwesenheit von funktionellen Gruppen und unterschiedlichen Zetapotentialen der Partikel, mit -71 mV für PS-COOH NP und +46 mV für PS-NH<sub>2</sub> NP, erklärt werden. Einige Studien konnten zeigen, dass die Größe sowie die positive oder negative Ladung der Funktionsgruppen auf der Partikeloberfläche und dadurch der Unterschied im Zeta-Potential eine wichtige Rolle bei der Aufnahme und den Transportprozessen in den Zellen spielen [186]. Aufgrund der ungefähr gleichen Teilchengröße, 134 nm für die carboxyl-PS NP und 120 nm für amino-PS NP, tragen vermutlich die negativ geladenen Carboxylgruppen zur besseren Endozytose und einem erhöhten Transport der Nanopartikel durch die Zellen bei. Weiterhin wurde nach 24 h eine höhere Transzytoserate für PS-COOH NP mit 1,4% für die Mono-Kultur und 2% für die Co-Kultur detektiert (Abbildung 29 A). Im Vergleich dazu konnte bei den PS-NH<sub>2</sub> Nanopartikeln eine Transportrate von nur 0,3% und 0,9%, bestimmt werden (Abbildung 29 B). Der niedrigere Transportwert von aminierten PS Partikeln könnte auch aufgrund einer Aggregation der Partikel, welche nach der Verdünnung in dem Medium zu sehen war, erklärt werden. Es wurde bereits beobachtet, daß die Aggregation der Teilchen oft die Aufnahme beeinflusst und zu einer 25%igen Abnahme führt [187]. Einige Studien haben gezeigt, dass die Nanopartikel, die in einer Humanserumlösung inkubiert wurden, große Aggregate bilden können, während jene, welche in einer isotonischen Salzlösung vorliegen, keine Aggregation aufweisen [188]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz der Untersuchung jeder einzelnen Art der Partikel und zeigt in diesem Fall eine deutlich bessere Transzytoserate der anionischen, negativ-geladenen Polystyrol NP. Außerdem zeigten die 3 Tage Mono- und Co-Kultur eine höhere Kapazität für Transzytose von carboxyl- und aminofunktionalisierten PS NP als die 5 Tage Kulturen und sind somit für weitere Experimente gut geeignet.



### 3.3.5.2 Konzentrationsabhängige Transzytose der PS NP im Transwell® System

Im weiteren Schritt wurde überprüft, ob die Transzytose einen konzentrationsabhängigen Charakter zeigt. Dafür wurden drei unterschiedliche Konzentrationen (37,5; 75 und 150  $\mu\text{g/ml}$ ) der carboxyl- und amino-PS NP eingesetzt. Die Transportrichtung erfolgte von der apikalen zu basolateralen Seite der Epithelschicht im Transwell® System. Die Ergebnisse wurden in Prozenten in Bezug auf die Konzentration der Stammlösung angegeben. Wie bereits zuvor beschrieben, zeigten die carboxylierten Partikel signifikant höhere Transzytoseraten in Mono- und Co-Kultur im Vergleich zu den aminierten Partikeln.

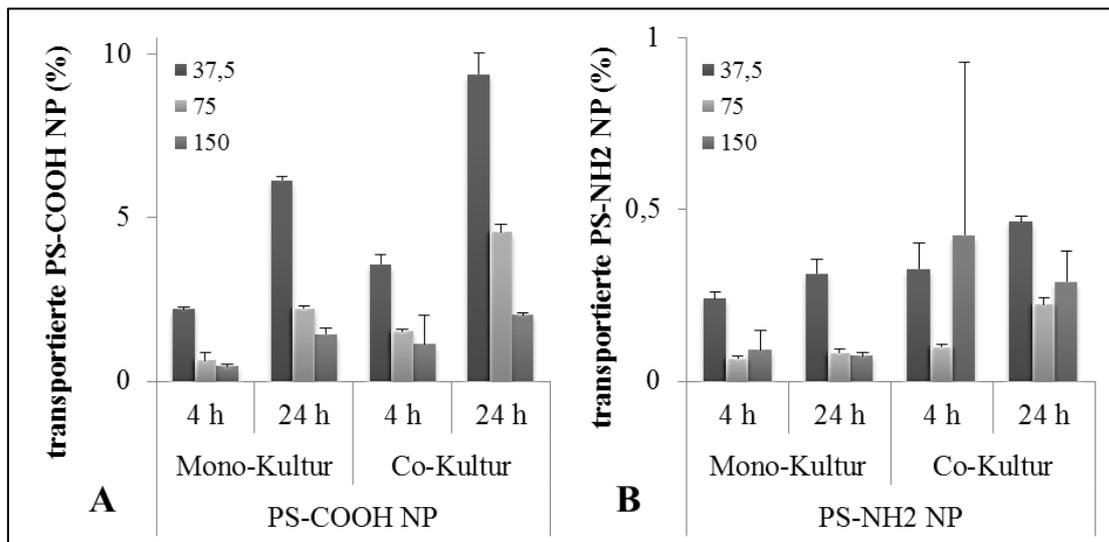


Abbildung 30: Konzentrationsabhängige Transzytose der (A) PS-COOH NP und der (B) PS-NH<sub>2</sub> NP durch die Zellschicht in einem Transwell® System nach 4 h und 24 h Inkubation. Die NP wurden im Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 37,5; 75 oder 150  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt und apikal zugegeben. Zur Berechnung der Transportrate wurde die Konzentration der NP Donorlösung als 100% gesetzt.

Es ließ sich erkennen, dass bei einer niedriger eingesetzten Konzentration von 37,5  $\mu\text{g/ml}$  PS-COOH NP im Vergleich zu 150  $\mu\text{g/ml}$  eine 5-fach höhere Menge transportiert wurde (Abbildung 30 A). Diese Feststellung wurde bei allen Proben mit den carboxyl-PS NP festgestellt, für Mono- und Co-Kultur sowie nach 4 h und 24 h Inkubationszeit. Ein Grund für diesen Befund könnte die Sättigung der Zellen aufgrund der hohen Menge der zugesetzten Partikel und eine begrenzte Kapazität der Zelloberfläche sein. Eine stärker ausgeprägte Transzytose nach 24 h im Vergleich zu 4 h Inkubation könnte daran liegen, dass die Zellen längere Zeit in Kontakt mit den Nanopartikeln bleiben und somit eine zunehmende Wechselwirkung zwischen der Zelloberfläche und den Nanopartikeln stattfindet. Im Gegensatz zu den carboxylierten PS NP, konnte in der basolateralen Kammer nur ein geringer Anteil der transportierten amino-Partikel nach der Transzytose detektiert werden, weniger als 0,5% (Abbildung 30 B). Wie schon berichtet, sind die PS-NH<sub>2</sub> NP wahrscheinlich nicht stabil genug und neigen zur Aggregation. Dieses Verhalten wurde nach der Verdünnung im Wachstumsmedium beobachtet. Des Weiteren blei-

ben die amino-PS NP stark an der Zelloberfläche haften, was vermutlich die Aufnahme hindert. Zusammengefasst konnte ein deutlich messbarer Transport schon bei einer niedrig eingesetzten Konzentration der carboxyl-PS NP festgestellt werden. Dadurch konnte veranschaulicht werden, dass aufgrund der Transzytose selbst kleine Mengen an applizierten Nanopartikeln durch die Darmzellschicht transportiert werden können und eine Wirkung im Organismus zeigen.

### 3.3.5.3 Effekt des FBS auf den Transport der PS-COOH NP im Transwell® System

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob die Proteine, die im FBS (fötales Rinderserum) enthalten sind und dem Wachstumsmedium zugegeben werden, die Aufnahme und damit die Transzytoserate durch die Caco-2 Zellen beeinflussen können. Für diese Experimente wurde das Wachstumsmedium EMEM mit 10% FBS oder ohne FBS verwendet. Da die vorherigen Ergebnisse veranschaulicht haben, dass die PS-COOH NP besser durch die Epithelzellen transportiert werden können, während die NH<sub>2</sub>-PS NP nur in sehr geringen Mengen unter 0,5% auf der basolateralen Seite zu finden waren, wurden hier nur die carboxylierten Partikel getestet. Die Anwesenheit des FBS im Medium zeigte einen interessanten Effekt. In den Proben mit 10% FBS wurden nach 4 h und 24 h mehr Partikel transportiert, als im Medium ohne FBS. Die Anwesenheit von Serum hat den Transportgrad von Polystyrolpartikeln 2-fach in der Mono- und 1,3-fach in der Co-Kultur erhöht (Abbildung 31).

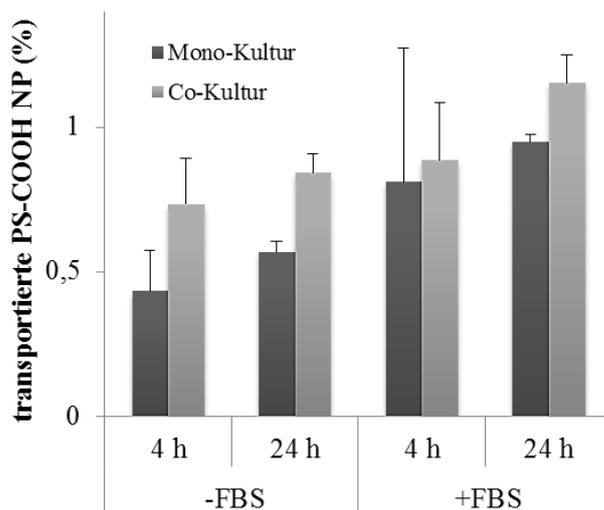


Abbildung 31: Effekt des FBS auf den Transport der PS-COOH NP nach 4 h und 24 h im Transwell® System. Die apikal eingesetzte Konzentration der NP betrug 150 µg/ml im Wachstumsmedium ohne oder mit 10% FBS. Die Caco-2 Zellen wurden nach 14 Tagen Wachstum im Transwell® System für 3 Tage als Mono-Kultur in EMEM oder als Co-Kultur mit Raji-Zellen kultiviert.

Diese Beobachtung veranschaulicht die Bedeutung von Proteinen und anderen Komponenten in FBS für den Transzytoseprozess, der sich aus endozytotischen und exozytotischen Vorgängen

zusammensetzt. Es ist allgemein bekannt, dass FBS aus vielen Komponenten wie Proteinen (Albumin), verschiedenen Hormonen, Cholesterin und einer Menge an Vitaminen (A, E) besteht [189]. Darüber hinaus ist das Albumin die am häufigsten vorkommende Komponente im Serum und macht mehr als die Hälfte des Gesamtproteingehaltes aus [189, 190]. Es ist ein anionisches Protein, das reich an Aspartat- und Glutamat-Resten ist. Albumin fungiert auch als Transportprotein für manche Vitamine, Hormone, unkonjugiertem Bilirubin und viele Medikamente aufgrund seiner Bindung an kationische Arzneimittel [190]. Albumin ist eine attraktive Komponente zur Entwicklung der Arzneimittel aufgrund ihrer Interaktion mit dem FcRn-Rezeptor auf der Zelloberfläche [191, 192]. Aber auch das in FBS in kleinen Mengen enthaltene Immunglobulin IgG kann effektiv an den FcRn-Rezeptor binden. Da die Caco-2-Zellen in der Lage sind den FcRn-Rezeptor zu exprimieren [193], weisen diese eine Fähigkeit für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Albumin auf. Aufgrund der Inkubation der Nanopartikel mit FBS im Medium ist es anzunehmen, dass die Partikel mit den Proteinen beschichtet wurden, auch mit im FBS vorhandenem Albumin und Immunglobulin. Dadurch wurde die Partikeloberfläche mit Albumin bzw. IgG funktionalisiert und folglich durch den Transport über FcRn-Rezeptor in der Caco-2-Zelllinie der Transzytosevorgang verbessert. Einige Gruppen haben bereits über die Vorteile dieses Proteins in Form von Albumin-basierten Nanopartikeln als potentielle Substanz zur kontrollierten Freisetzung im Körper berichtet. Aufgrund seiner Eigenschaften als biologisch abbaubares, nicht toxisches und wasserlösliches Protein, eignet sich Albumin zur Entwicklung gut verträglicher Medikamente [194, 195] und könnte zur Funktionalisierung der Polystyrol NP eingesetzt werden.

Eine weitere Überlegung und eine mögliche Erklärung für eine erhöhte Transzytose in Anwesenheit von FBS ist das Vorhandensein von Vitamin A. Im Falle von Vitamin A wurde vor kurzem neben dem an der Zelloberfläche exprimierten RBP Rezeptor ein weiteres multitransmembran- Domänenprotein STRA6 identifiziert. STRA6 bindet mit hoher Affinität an RBP und vermittelt dadurch die zelluläre Aufnahme von Vitamin A [196, 197]. Es ist bekannt, dass die Aufnahme von Vitamin A durch die Enterozyten und insbesondere im Dünndarm erfolgt [198]. Einige Studien konnten feststellen, dass die reifen Caco-2-Zellen nach 6 Tagen Kultivierung und Ausbildung einer konfluenten Zellschicht zu den Epithelzellen des Dünndarms differenziert sind und anhand bestimmter exprimierter Proteine eine Umwandlung von Colonozyten zu Enterozyten zeigen [199]. Möglicherweise lässt sich der verbesserte Partikeltransport auf die Rezeptor-vermittelte Aufnahme der Partikel zurückführen, da die PS NP durch das in FBS vorhandene Vitamin A funktionalisiert wurden.

Einige Studien haben berichtet, dass in Gegenwart von kationischen Gruppen an der Partikeloberfläche deren Transport durch die Zellen in der Co-Kultur verbessert werden kann [179]. Diese Studien wurden jedoch mit anderen NP als in dieser Arbeit verwendet, daher sind die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar mit jenen der hier vorliegenden Arbeit. Bei diesen Studien

weisen beide Partikeltypen, aminierte und carboxylierte, das gleiche Zetapotential von  $-50$  mV auf. Bei der hier vorliegenden Arbeit weisen die PS NP  $+46$  mV für NH<sub>2</sub>-PS NP und  $-71$  mV für PS-COOH NP auf und bestätigen somit, dass die Partikel, die ein negatives Zetapotential besitzen, eine bessere Transzytose aufweisen. Des Weiteren wurden die Experimente der Studien in HBSS ausgeführt, gepuffert mit  $25$  mM HEPES und  $4$  mM Natriumbikarbonat und ergänzt mit  $1\%$  FCS [179], während in der hier vorliegenden Arbeit EMEM mit  $10\%$  FBS verwendet wurde. Eine weitere wissenschaftliche Gruppe hat berichtet, dass positiv geladene Teilchen besser aufgenommen werden können als die neutral oder negativ geladenen Partikel [83]. In meinen Experimenten war anhand der konfokalen Mikroskopie-Aufnahmen deutlich zu erkennen, dass die positiv geladenen PS-NH<sub>2</sub> NP stark an der Oberfläche adhärieren und dadurch zu einem stärkeren Signal bei der Durchflusszytometrie führen. Jedoch es ist bekannt, dass der Prozess der Transzytose nicht nur die Absorption/Aufnahme, sondern auch Endozytose und Exozytose umfasst. Dies sollte bei dem Einfluss von Proteinen auf den Transport der Partikel berücksichtigt werden.

#### **3.3.5.4 Effekt des WGA auf den Transport der PS NP im Transwell® System**

Bei der Frage nach einer Verbesserung der Transzytoserate der Nanopartikel wurde WGA (Wheat Germ Agglutinin) getestet, da bereits über einen positiven Effekt der verschiedenen Lektinarten, wie z.B. des WGA, auf die Absorption der Partikel in Caco-2 Zellen berichtet wurde [99].

Für dieses Experiment wurden die Caco-2 Zellen wie oben beschrieben im Transwell® System als Mono- oder Co-Kultur gehalten und anschließend von apikal nach basolateral auf die Transzytose der carboxylierten PS NP mit oder ohne WGA sowie mit oder ohne FBS untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Anwesenheit von WGA keinen Effekt auf den Transport der NP durch die Mono-Kulturschicht mit oder ohne Zugabe des FBS ins Medium aufweist. Im Fall der Co-Kulturen, mit und ohne FBS, wurde eher ein leicht inhibierender Effekt des WGA auf den Transport der PS NP durch die Epithelzellen festgestellt (Abbildung 32). Die Zugabe des FBS zeigte wie im vorherigen Experiment (Abbildung 31) ebenfalls einen leicht positiven Einfluss auf die Transzytoserate der carboxylierten PS NP (Abbildung 32 B). Dabei erhöhte sich der Transport-Wert in Anwesenheit des FBS um  $80\%$  in der Mono-Kultur und um  $20\%$  in der Co-Kultur (Abbildung 32). Wie oben schon beschrieben, ist FBS vermutlich aufgrund seiner Komponente wie zum Beispiel Vitamin A und Protein Albumin in der Lage die Transzytose zu erhöhen und somit effizienter zu machen [194-197]. Interessanterweise zeigt sich dieser positive Effekt verstärkt vor allem in den Mono-Kulturen. Ein Grund dafür könnte sein, dass die in der Co-Kultur vorhandenen M-Zellen von Natur aus transzytotisch aktiv sind und nicht auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose angewiesen sind. Die Zugabe des FBS könnte aufgrund seiner positiven Eigenschaften zur Funktionalisierung der Nanopartikel eingesetzt

werden, um eine effektivere Transzytose nicht nur in M-Zellen des Darm-Traktes, sondern auch in den Enterozyten zu erzielen.

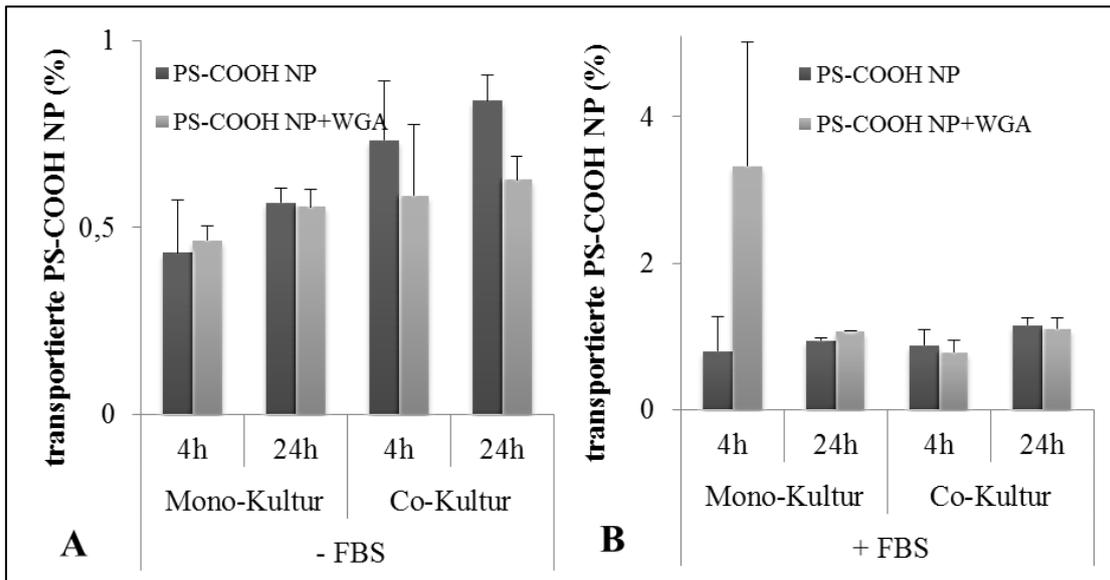


Abbildung 32: Effekt des Proteins WGA auf den Transport der PS-COOH NP im Medium (A) ohne oder (B) mit 10% FBS nach 4 h oder 24 h im Transwell® System. Die Caco-2 Zellen wurden nach 14 Tagen Wachstum im Transwell® System 3 Tage als Mono-Kultur mit EMEM oder als Co-Kultur mit Raji-Zellen gehalten. Die NP wurden im Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 150 µg/ml mit oder ohne 15 µg/ml WGA gelöst und apikal zugegeben. Zur Berechnung der Transportrate wurde die Konzentration der NP Donorlösung als 100% gesetzt.

Eine weitere Analyse mittels SDS-PAGE sollte verdeutlichen, inwieweit die Modell-PS NP in der Lage sind die Proteine an die Oberfläche zu adsorbieren. Dafür wurden die Partikel mit WGA oder WGA mit FBS inkubiert und anschließend über Zentrifugationsschritte gewaschen. Es ist bekannt, dass Lektin WGA als ein Homodimer mit etwa 35 kDa Molekulargewicht bei einem neutralen bis leicht saurem pH vorliegt, während es bei einem sehr niedrigem pH-Wert von 3 als Monomer mit einer Größe von 17 kDa zu finden ist [200, 201]. Die Gelbilder haben gezeigt, dass schon die kleinsten Mengen an WGA als Banden auf dem Gel zu finden sind (Abbildung 33). Es wurde schon berichtet, dass bei einer SDS-PAGE Analyse das WGA-Monomer als ein 18 kDa Protein auftritt [202]. Bei allen Proben mit WGA-Zugabe, PS-COOH NP und PS-NH<sub>2</sub> NP, konnte eine deutliche Bande bei etwa 18 kDa festgestellt werden. In Anwesenheit des FBS ließ sich ebenfalls ein positives Signal des WGA als Bande erkennen (Abbildung 33). Dies ist ein Hinweis auf eine Adsorption des Lektins WGA an beide, negativ- und positiv-geladenen Partikelarten. Außerdem haben die Proteine im FBS die Adsorption des WGA nicht beeinträchtigt.

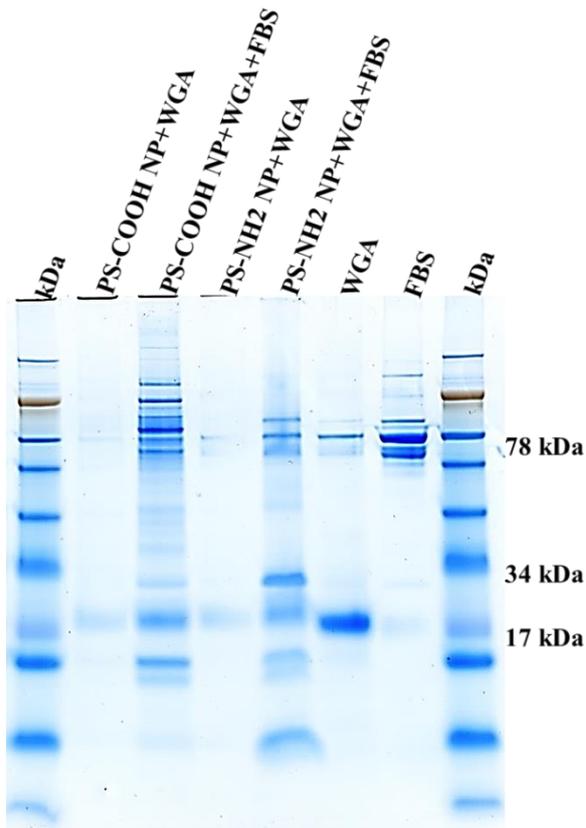


Abbildung 33: SDS-PAGE Analyse der Adsorption des Lektins WGA an die PS-COOH NP und PS-NH<sub>2</sub> NP. Die 150 µg/ml NP wurden jeweils mit 15 µg/ml WGA oder WGA+FBS oder nur mit FBS 1 h bei 37 °C im Wachstumsmedium inkubiert. Um die nicht gebundenen Proteine zu entfernen, erfolgten drei Zentrifugations-Wasch-Schritte.

Eine weitere Methode, die Western-Blot Analyse, bei der sich die Detektion anhand der Antikörper gegen WGA ermitteln lässt, zeigten bei 18 kDa und 40 kDa ebenfalls Banden (Abbildung 34), die für WGA eine typische Größe aufweisen. Dies gab ein eindeutiges Indiz auf die positive Adsorption des WGA an die carboxyl- und amino-PS NP in EMEM mit oder ohne FBS Proteine. Demzufolge übt die Anwesenheit der FBS Proteine auf die Funktionalisierung der PS NP mittels WGA keinen Einfluss aus.

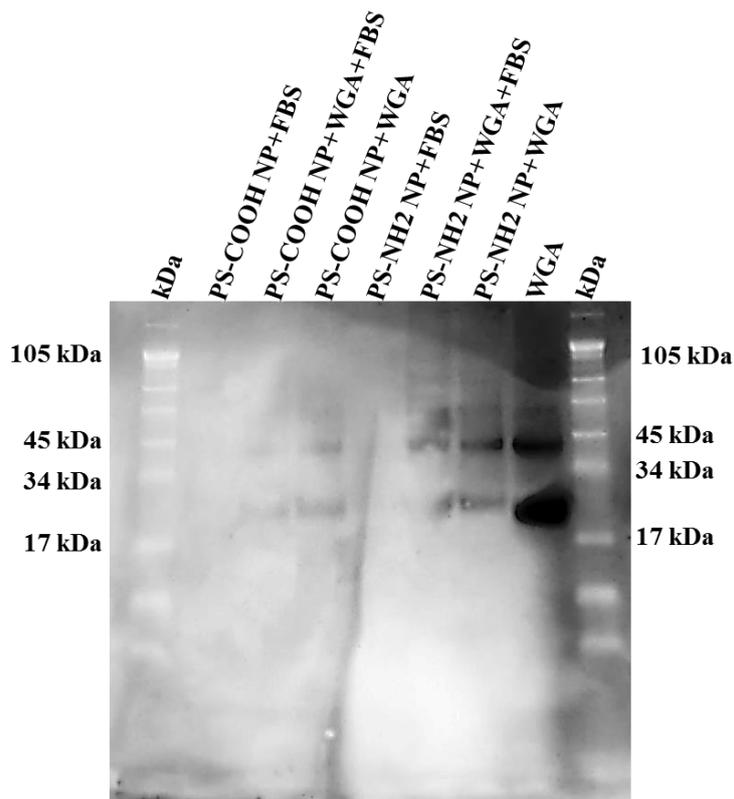


Abbildung 34: Western-Blot Analyse der Adsorption des Lektins WGA an die PS-COOH NP und PS-NH<sub>2</sub> NP. Die 150 µg/ml NP wurden jeweils mit 15 µg/ml WGA oder WGA+FBS oder nur mit FBS 1 h bei 37 °C inkubiert. Um die nicht gebundenen Proteine zu entfernen, erfolgten drei Zentrifugations-Wasch-Schritte.

### 3.3.6 Untersuchung der Aufnahme der PS NP mittels Durchflusszytometrie

#### 3.3.6.1 Aufnahme der Nanopartikel in die Mono- und Co-Kulturen

Um das Aufnahmeverhalten der fluoreszenz-markierten NP in 3 oder 5 Tage Co-Kulturen mit dem der Mono-Kultur vergleichen zu können, wurden die Mono- und Co-Kulturen immer parallel 4 h oder 24 h mit den PS NP inkubiert und die Aufnahme mittels Durchflusszytometrie detektiert (Abbildung 35). Die Messung ergab, dass die Mono-Kulturen ein höheres Aufnahmeverhalten zeigen. Während bei den carboxylierten Partikeln ein deutlicher Unterschied zwischen den 4 h und 24 h Inkubationszeit zu erkennen ist (Abbildung 35 A), zeigten die Werte für amino-funktionalisierte NP etwa die gleiche Aufnahme (Abbildung 35 B).

Im Allgemeinen wurde festgestellt, dass die Kulturen, die mit den NH<sub>2</sub>-PS NP inkubiert wurden, in Bezug auf die gesamte Zellpopulation, höhere Fluoreszenzwerte aufweisen. Eine Erklärung für die höheren Werte kann im Zusammenhang mit dem verstärkten Adhäsionsverhalten der amino-PS NP stehen.

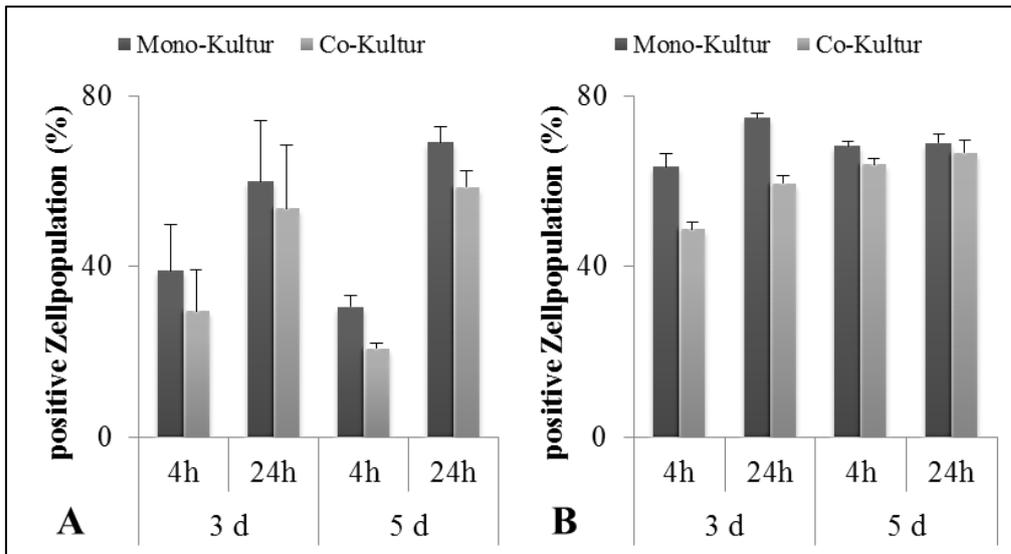


Abbildung 35: Die Aufnahme (A) der carboxyl-funktionalisierten und (B) der amino-funktionalisierten PS NP in 3 Tage (3 d) bzw. 5 Tage (5 d) Mono- und Co-Kulturen. Die NP wurden mit Medium auf eine Konzentration von 150  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt und zu den Caco-2 Zellen gegeben. Die prozentuellen Angaben beziehen sich auf die Gesamtpopulation der Zellen nach 4 h bzw. 24 h Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten NP und entsprechen somit dem Anteil der Zellen mit einem positiven Fluoreszenzsignal.

Wie die REM Aufnahmen gezeigt haben, bleiben nach dem Entfernen der NP mittels Waschen sehr viele amino-PS NP an den Mikrovilli der Caco-2 Zellen haften (Abbildung 25). Dies resultiert in einem höheren Fluoreszenzsignal. Außerdem bleiben nach 24 h Inkubation vermutlich mehr NP an der Zelloberfläche kleben, was zu einer verlängerten Kontaktzeit und somit zu einem höheren Signal nach 24 h führt. Grundsätzlich lässt die Analyse mittels Durchflusszytometers erkennen, dass die Co-Kulturen zum Zeitpunkt der Messung niedrigere Werte als die Mono-Kulturen für PS-COOH NP und PS-NH<sub>2</sub> NP aufweisen (Abbildung 35). Vermutlich sind die Zellen in der Co-Kultur, wie erwartet, in der Lage mehr Exozytose zu betreiben und schleusen somit mehr NP aus der Zelle heraus. Dadurch erhöht sich die nach der Transzytose gemessene Transportrate. Dies korreliert mit den höheren Transzytosewerten bei den Co-Kulturen in dem Transwell® System. Eine weitere Erklärung für die niedrigere Werte in Co-Kultur, gemessen mittels Durchflusszytometrie, könnte die niedrigere Anzahl der Mikrovilli an der Oberfläche der M-Zellen in der Co-Kultur sein, was zu einem verminderten Festhalten der Partikel zwischen den Fortsätzen führen könnte.

### 3.3.6.2 Effekt des FBS auf die Aufnahme der PS NP in Kurzzeitkultur

In dem nächsten Versuch wurde der Einfluss der in FBS enthaltenen Proteine in einer Caco-2 Kurzzeitkultur mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dafür wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, Caco-2 Zellen 3 Tage in 12-Well Platten kultiviert und anschließend mit Nanopartikel inkubiert.



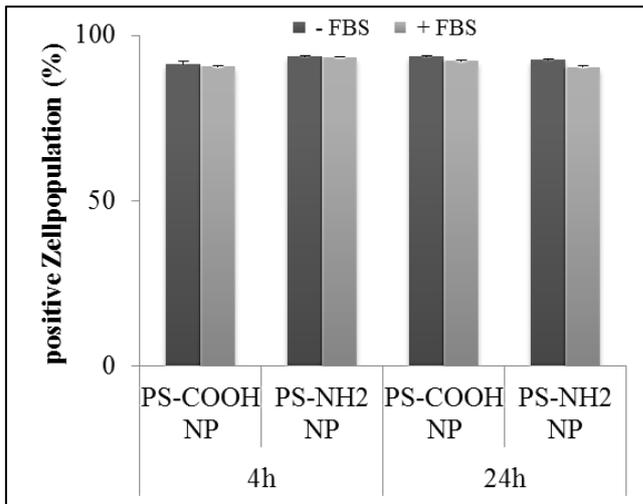


Abbildung 36: Aufnahme der PS NP ohne oder mit Zugabe des 10%igen FBS in das Wachstumsmedium nach 4 h und 24 h. Die Konzentration der beiden PS-COOH NP und PS-NH2 NP betrug 150 µg/ml. Die Caco-2 Zellen wurden 3 Tage in 12-Well Platten kultiviert, für 4 h oder 24 h mit den Partikel inkubiert und anschließend mit Trypsin-EDTA abgelöst. Die Detektion der Aufnahme erfolgte mittels Durchflussszytometrie. Zur quantitativen Auswertung der Messung wurde der prozentuale Anteil von der Gesamtpopulation der Zellen herangezogen.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass alle Zellkulturen mit etwa 92% das gleiche Aufnahmeverhalten für die PS-COOH NP und PS-NH2 NP aufweisen. Es konnte kein Unterschied zwischen den Proben mit oder ohne Zugabe des FBS festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten könnte das Alter der Zellen in der Kultur gewesen sein. Da die Caco-2 Zellen hier als Kurzzeitkultur nur 3 Tage und nicht wie in Langzeitkultur 14 Tage gehalten wurden, exprimierten diese vermutlich andere physiologische und morphologische Merkmale und unterliegen noch keiner Differenzierung wie im Transwell® System. Es konnte jedoch mithilfe dieses Experiments gezeigt werden, dass beide Partikeltypen erfolgreich von den Zellen aufgenommen werden können.

### 3.3.6.3 Effekt des WGA auf die Aufnahme der PS NP in Kurzzeitkultur

Für die folgende Fragestellung bezüglich des Einflusses von WGA auf die Aufnahme der Polystyrol NP wurden die Caco-2 Zellen in Kurzzeit-Kultur verwendet. Nach einer 4 h oder 24 h Inkubation mit den Partikeln wurden die Zellen abgelöst und 3 Mal über Zentrifugation gewaschen, um die nicht aufgenommenen NP zu entfernen. Wie schon oben berichtet, zeigen manche Lektinarten unter anderem WGA, einen positiven Effekt auf die Absorption der Partikel in die Zelle [99, 102]. Eine interessante Feststellung war, dass das Lektin WGA bei allen Proben eine etwa 25% inhibierende Wirkung auf die Aufnahme gezeigt hatte (Abbildung 37). Dies korreliert mit den Ergebnissen für die Transzytoserate durch die Mono- bzw. Co-Kulturzellschicht im Transwell® System (Abbildung 32). Ebenfalls ließ das Vorhandensein der FBS Komponente keinen Unterschied im Aufnahmeverhalten der PS NP erkennen. Wie die Resultate der SDS-

PAGE (Abbildung 33) und der Western-Blot Analyse (Abbildung 34) gezeigt haben, zeigt die Anwesenheit des FBS keinen Einfluss auf die Adsorption des WGA an die NP. Weiterhin geht aus diesem Experiment hervor, dass die Wachstumsdauer der Caco-2 Zellen in Kurz- oder Langzeitkultur ebenfalls eine Rolle bei den Ergebnissen spielt. In der Kurzzeitkultur liegt die Aufnahme für beide carboxyl- und amino-PS NP nach 4 h oder 24 h Inkubation bei etwa 90% der positiven Zellpopulation (Abbildung 37), während in der Langzeitkultur sich diese abhängig von dem NP-Typ unterscheidet. Dabei liegt die PS-NH<sub>2</sub> NP Aufnahme rate etwa zweifach höher als die der PS-COOH NP in der Mono-Kultur (Abbildung 35). Eine Erklärung für diese Feststellung könnte an der unterschiedlichen Wachstumsdauer der Zellen in der Kultur sein und daran, dass in der Kurzzeitkultur die Caco-2 Zellen nicht genug Zeit hatten sich zu den reifen Enterozyten zu differenzieren. Die entscheidende Feststellung ist, dass das Lektin WGA keinen positiven Effekt auf die Endozytose der Polystyrol Partikel ausübt.

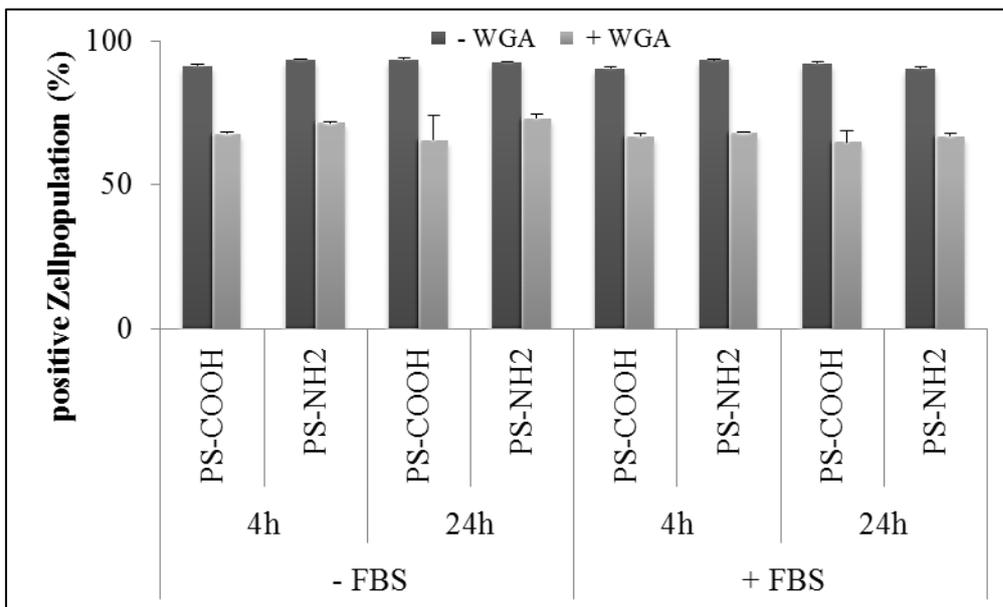


Abbildung 37: Effekt des Lektins WGA auf die Aufnahme der PS NP ohne oder mit Zusatz des 10% FBS im Wachstumsmedium nach 4 h oder 24 h Inkubation. Die Konzentration der PS NP lag bei 150 µg/ml, die des WGA bei 15 µg/ml. Die Caco-2 Zellen wurden 3 Tage in 12-Well Platten kultiviert, für 4 h oder 24 h mit den Partikeln inkubiert und anschließend mit Trypsin-EDTA abgelöst. Die Detektion der Aufnahme erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Gesamtpopulation der Caco-2 Zellen wurde als 100% gesetzt und diente der quantitativen Auswertung des prozentualen Anteils der positiven Zellen.

#### 3.3.6.4 Analyse der Endozytosewege der PS NP mithilfe der Inhibitoren

Wie mehrere Studien berichtet haben, werden die Nanopartikel in Abhängigkeit von ihren Eigenschaften über verschiedene Wege wie Makropinozytose [149, 203] Clathrin-abhängige Endozytose [204, 205] oder mittels Caveolae [206, 207] in die Zellen aufgenommen. Die Makropinozytose ist in der Regel ein Aktin-abhängiger Mechanismus, der den Vesikel-Transport bis zu einer Größe von etwa 500 nm umfasst. Dynamin gehört zur Familie von GTPasen und ist am Clathrin- und Caveolae-abhängigen Prozess beteiligt [151, 208], wobei es an der Abschnürung

der kleinen Vesikel mitwirkt. Bei allen diesen Aufnahmeprozessen spielt nicht nur die Größe der Partikel, sondern auch die Funktionalisierung ihrer Oberfläche sowie die Ladung eine wesentliche Rolle. Um herauszufinden, auf welche Art und Weise die carboxyl- und aminofunktionalisierten Polystyrol-Nanopartikel in die Caco-2-Zellen transportiert werden, wurden verschiedene Inhibitoren getestet. Wie frühere Untersuchungen gezeigt haben, hemmt EIPA (5-N-ethyl-N-isopropyl-Amilorid) die Makropinozytose und Chlorpromazin blockiert die Clathrin-abhängige Endozytose [151, 206, 208]. Der Inhibitor Cytochalasin D (Cyt D) verhindert durch eine Aktin-Depolymerisation die Aufnahme der Partikel in die Zellen über den Caveolae-vermittelten Weg und der Makropinozytose [209]. Wie in früheren Studien berichtet wurde, spielt Dynamin eine wesentliche Rolle bei der Verengung der Vesikel, die von der Plasmamembran zum Weitertransport der Partikel in der Zelle gebildet werden [206].

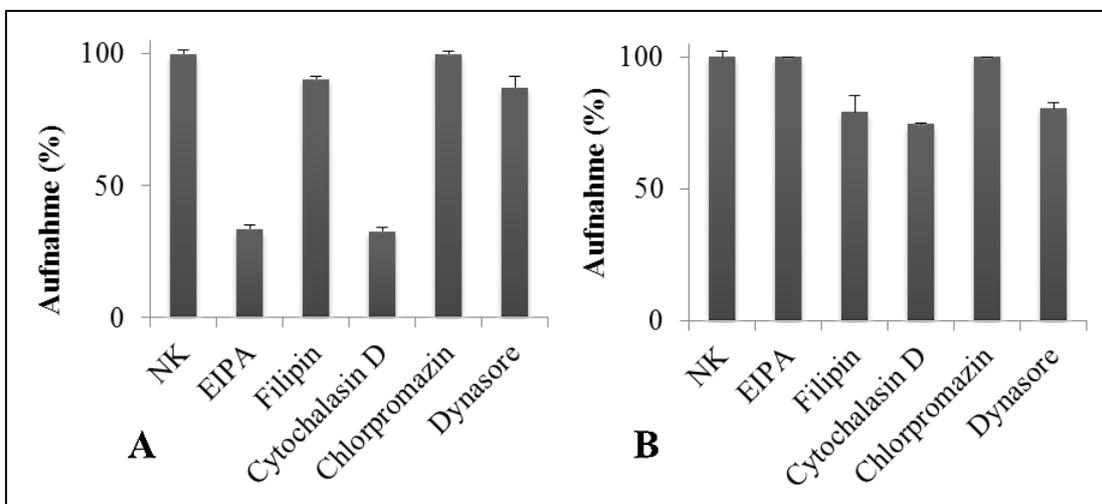


Abbildung 38: Effekt der Inhibitoren auf die Aufnahme der PS-COOH NP (A) und PS-NH<sub>2</sub> NP (B) in die Caco-2 Zellen. Nach 45 min Vorinkubation der Zellen mit entsprechendem Hemmstoff im Wachstumsmedium erfolgte die Zugabe der 150 µg/ml PS NP für 4 h. Die nicht behandelten Zellen ohne Zugabe eines Inhibitors wurden als Referenz (Negativkontrolle) genommen. Folgende Konzentrationen wurden eingesetzt: 100 µM EIPA, 10 µg/ml Filipin, 20 µM Cytochalasin D, 25 µM Chlorpromazin, 50 µM Dynasore. Die Detektion der Aufnahme erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Der Median der detektierten Fluoreszenzintensität der Proben wurde zur quantitativen Auswertung der Messung herangezogen und die Negativkontrolle als 100% gesetzt.

Um zu klären, über welche Route die Polystyrol-Partikel in die Zelle eindringen, wurden die Caco-2-Zellen mit jeweils 100 µM EIPA, 10 µg/ml Filipin, 20 µM Cytochalasin D, 25 µM Chlorpromazin und 50 µM Dynasore für 45 min vorbehandelt. Anschließend wurden die Proben mit 150 µg/ml NP 4 h inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Obwohl beide Arten von PS NP etwa die gleiche Größe aufweisen, wurde festgestellt, dass die Aufnahme über die verschiedenen Wege abläuft. In Gegenwart von EIPA und Cyt D wird die Endozytose der carboxyl-PS NP bis auf 30% stark reduziert (Abbildung 38 A). Diese Feststellung gibt den Hinweis, dass die Aufnahme der carboxyl-PS NP in die Caco-2-Zellen vorwiegend über den Weg der Makropinozytose stattfindet. Die weiteren Substanzen wie Filipin, Chlorpromazin

sowie Dynasore zeigten keinen signifikanten Effekt auf die Aufnahme der carboxyl-PS NP. Die weiteren Ergebnisse haben gezeigt, dass die Zugabe von EIPA bzw. Chlorpromazin keine Wirkung auf die Aufnahme des amino-PS NP aufweisen (Abbildung 38 B) und bestätigt somit, dass die amino-funktionalisierten Partikel nicht über die Makropinozytose bzw. Clathrin-abhängige Endozytose in die Zellen gelangen. Eine Hemmung mit etwa 30% auf die Aufnahme der PS-NH<sub>2</sub> NP zeigten Cytochalasin D und Filipin (Abbildung 38 B). Da in manchen Studien berichtet wurde, dass Cyt D und Filipin einen Einfluss auf die Caveolae-vermittelte Endozytose ausüben, verläuft die Aufnahme der NH<sub>2</sub>-PS NP vermutlich über die Caveolae-vermittelte Route. Weitere Messungen mittels Durchflusszytometrie haben gezeigt, dass der Inhibitor Dynasore sowohl PS-COOH NP als auch PS-NH<sub>2</sub> NP in ihrer Aufnahme hemmt, jedoch mit etwa 15% nur eine schwache Hemmung ausübt verglichen mit den Inhibitoren der Makropinozytose, mit denen die Absorption bis zu 70% gehemmt wurde. Offensichtlich nehmen beide PS NP Typen teilweise den Dynamin-abhängigen Transportweg in die Caco-2-Zellen. Eine weitere Gemeinsamkeit für die beiden NP wurde in Bezug auf die Zugabe des Chlorpromazins festgestellt. Chlorpromazin zeigte keinen Einfluss auf die Aufnahme der NP. Dies ist somit ein Hinweis (Abbildung 38), dass die Partikel nicht über die Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zellen eintreten. Als Schlussfolgerung kann zusammengefasst werden, dass die carboxyl-funktionalisierten PS NP über den Weg der Makropinozytose in die Caco-2-Zellen internalisiert werden, während die amino-funktionalisierten PS NP vorwiegend die Caveolae-vermittelte Route nehmen. Obwohl beide PS NP etwa den gleichen Durchmesser aufweisen, spielt vermutlich die Oberflächenfunktionalisierung eine entscheidende Rolle bei der Wahl des Aufnahme-weges in die Zelle.

### **3.3.7 Transzytose der PS NP im Ussing-Chamber System durch ein Schweinedarmgewebe**

#### **3.3.7.1 Transport der PS NP im Ussing-Chamber System**

Zur Beurteilung des Partikeltransportes durch Epithelzellen wurde eine weitere Methode, die ein *ex vivo* System darstellt, herangezogen. Damit sollte eine Analyse an einem natürlicheren Modell durchgeführt werden. Für dieses Experiment wurde ein Ussing-Chamber System, das oben bereits beschrieben wurde, verwendet. Das Schweinedarmgewebe wird aufgrund seiner Eigenschaften oft als geeignetes Material eingesetzt. Das Gewebe des Dünndarms aus Schwein weist dem eines Menschen anatomische und physiologische Ähnlichkeiten auf und wird deswegen sehr oft als Labormaterial verwendet [173, 174]. Dies sollte helfen, mehr Informationen über die Arzneimittelgabe auf dem oralen Weg durch eine Darmzellschicht zu erhalten. Der erste Schritt war die Untersuchung der Transportfähigkeit der Polystyrolpartikel als Modell mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen, carboxyl- oder amino-Gruppe, in einer Konzentration von 150 µg/ml zu vergleichen. Die Transportrichtung wurde von mukosal nach serosal untersucht, was

der Anordnung von apikal nach basolateral im Transwell® System sowie der aus dem Darmlumen auf die Blutseite entspricht.

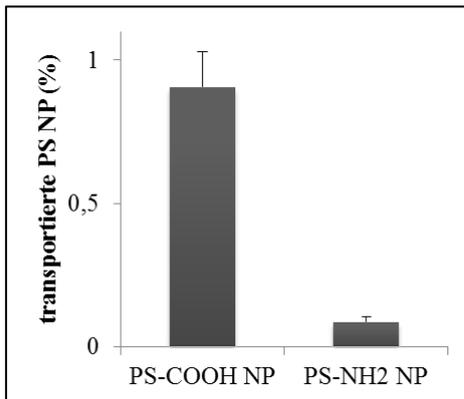


Abbildung 39: Transzytose der PS-COOH NP und der PS-NH<sub>2</sub> NP durch das Schweinedarmgewebe nach 4 h. Das Experiment wurde im Ussing-Kammer System mit der NTS Lösung auf beiden Kammerseiten durchgeführt. Der Transport der 150 µg/ml NP wurde in Richtung von mukosal (apikal) nach serosal (basolateral) untersucht. Die verwendete Konzentration der NP wurde als 100% gesetzt.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die carboxylierten PS NP mit 1% Transportrate eine relativ gute Fähigkeit zur Transzytose durch den Zwölffingerdarm im Schweinegewebe aufweisen. Im Gegensatz dazu konnte nur eine sehr geringe Menge unter 0,1% der aminierten PS NP auf der serosalen Seite detektiert werden (Abbildung 39). Diese geringe Transportrate könnte aufgrund der Neigung der PS-NH<sub>2</sub> NP zu einer Aggregation oder einer starken Wechselwirkung mit der negativ geladenen Schleimoberfläche zustande gekommen sein. Einige Studien haben beobachtet, dass anionische Partikel besser durch das Darmgewebe, das mit einer Schleimschicht bedeckt ist, transportiert werden können [210]. Die adhäsive Interaktion der Partikel mit dem Mukus kann aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen erreicht werden. Da die glykosylierten Regionen von Muzin sehr reich an negativen Ladungen sind, ist der Schleim in der Lage positiv geladene Teilchen mit sehr hoher Affinität zu binden [211]. Aufgrund der negativen Ladung und hydrophoben Domänen des Schleims, bildet es eine sterische Barriere für positiv geladene Substanzen [212]. Wahrscheinlich könnten die physikalischen Eigenschaften der Mukusschicht der Grund für die 10-mal niedrigere Transportrate von aminierten Partikeln sein. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen aus den *in vitro* Tests im Transwell® System, bei denen die Transportrate bei der gleichen eingesetzten Konzentration von 150 µg/ml in der Donorlösung für die carboxylierten PS NP bei etwa 1,1% (Abbildung 29 A) und für aminierte NP bei etwa 0,3% lag (Abbildung 29 B). Somit veranschaulichen diese Experimente, dass die stark positiv-geladenen aminierten Polystyrolpartikel für den Transport durch die Epithelwand weniger geeignet sind als die carboxylierten PS NP. Im Allgemeinen wird es deutlich, dass die stark-positiven Partikel zwar in der Lage sind sehr gut an der Zelloberfläche zu adhären, jedoch nicht immer für eine bessere Transzytoserate sorgen und somit keine gut geeigneten Kandidaten für den Transport der Substanzen durch eine Dünndarmwand darstellen.

### 3.3.7.2 Einfluss der Funktionalisierung der PS NP mittels WGA auf die Transzytose durch Duodenungewebe

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Funktionalisierung der Polystyrolpartikel mittels des Lektins WGA einen Effekt auf die Transportrate durch Schweinedarmgewebe zeigt. Wie bereits oben beschrieben, wurde in manchen Studien festgestellt, dass einige Lektinarten und darunter WGA einen positiven Einfluss auf die Absorption der Partikel ausüben [99, 102].

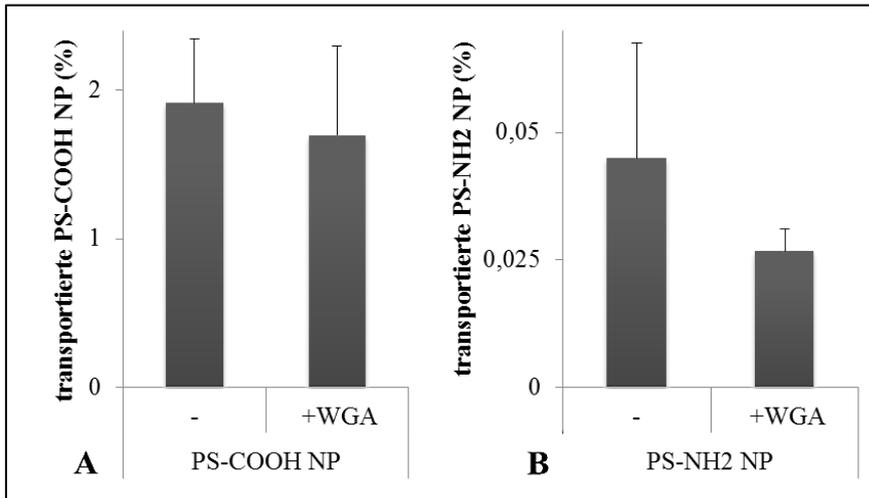


Abbildung 40: Die Transzytose der PS-COOH NP (A) und der PS-NH<sub>2</sub> NP (B) durch das Schweinedarmgewebe nach 4 h. Das Experiment wurde im Ussing-Kammer System mit der NTS Lösung auf beiden Kammerseiten durchgeführt. Für den Transport wurden 150 µg/ml NP ohne oder mit 15 µg/ml WGA eingesetzt. Die Transzytose wurde in Richtung von mukosal (apikal) nach serosal (basolateral) untersucht. Die Menge der NP in der Stammlösung wurde als 100% gesetzt.

Die Resultate haben veranschaulicht, dass die Adsorption des WGA an carboxyl- bzw. amino-PS NP zu einer 10% bzw. 30% Verringerung der Transzytoserate durch das *ex vivo* Duodenungewebe führt (Abbildung 40). Diese Ergebnisse decken sich mit den festgestellten Resultaten für die Transportrate durch die Caco-2 Zellen im Transwell® System, in denen die Zugabe des WGA ebenfalls zu einer etwa 10%igen Reduzierung der Transzytose der PS-COOH NP geführt hat (Abbildung 32). Bei den Ergebnissen der Durchflusszytometrie ließ sich im gleichen Maße ein Herabsetzen der Aufnahme der PS NP feststellen (Abbildung 37). Demzufolge korrelieren die Ergebnisse und bestätigen, dass das Lektin WGA kein geeignetes Mittel zur Verbesserung der Aufnahme und Transzytose der PS NP darstellt. Des Weiteren sind die beiden Methoden, Transwell® System *in vitro* und Ussing-Chamber System *ex vivo*, zum Vergleich der Ergebnisse gut geeignet und können weiterhin zur Untersuchung der Transzytose der medizinisch interessanten Substanzen zur oralen Verabreichung herangezogen werden.

### 3.4 Glycolchitosan NP (GC NP)

#### 3.4.1 Untersuchung der Adhäsionseigenschaften der GC NP mittels REM

Um dem Ziel eines geeigneten Trägersystems für Peptide in Form von Nanopartikeln näher zu kommen, wurde das Polysaccharid Chitosan getestet. Chitosan ist ein bioabbaubares und nicht toxisches Polymer mit zahlreichen Aminogruppen, das aufgrund seiner mukoadhäsiven Eigenschaften eine erhöhte Adsorption zeigt [86]. Es wurde berichtet, dass wegen der positiven Ladung des Chitosans dieses in der Lage ist, verstärkt an die negativ-geladene Oberfläche der Zellen zu binden und somit in Form von Nanopartikeln den Transport durch die Caco-2 Zellen [177, 178] verbessern kann.

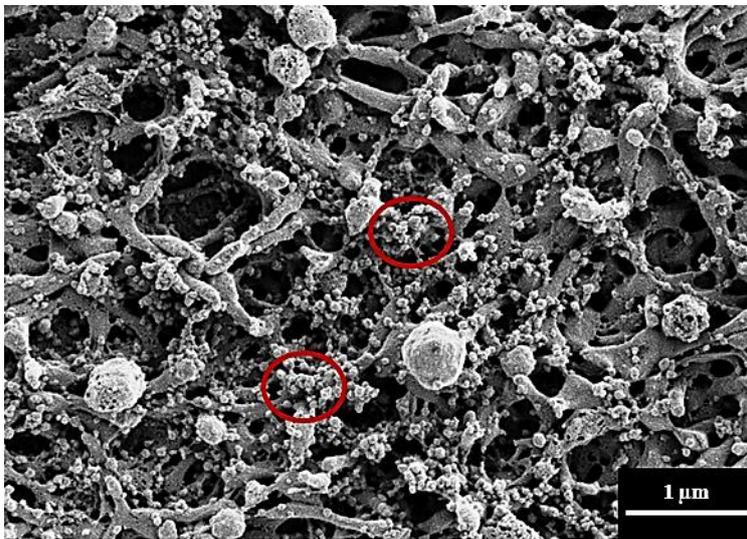


Abbildung 41: Darstellung der Oberfläche einer Caco-2 Zelle nach einer Inkubation mit den Glycolchitosan NP mittels Rasterelektronenmikroskopie. Die Caco-2 Zellen wurden 14 Tage im Transwell® System gezüchtet und anschließend 24 h mit 150  $\mu\text{g/ml}$  GC NP im Wachstumsmedium inkubiert. Die Dehydrierung der Zellen erfolgte über eine aufsteigende Isopropanolreihe mit anschließendem Austausch gegen Kohlendioxid.

Zunächst wurden die Glycolchitosan NP (GC NP) mittels Rasterelektronenmikroskopie in Bezug auf ihre Bindungseigenschaften an die Zelloberfläche untersucht. Dafür wurden die Caco-2 Zellen 14 Tage im Transwell® System kultiviert, und anschließend 24 h mit den GC NP inkubiert. Danach wurden die Proben über eine aufsteigende Isopropanolreihe dehydriert und mit Platin bedampft. Die Aufnahmen haben gezeigt, dass die GC NP in einer sehr hohen Anzahl an den Mikrovilli der Caco-2 Oberfläche zu finden sind (Abbildung 41). Weiterhin ließ sich deutlich erkennen, dass die ursprünglich im wässrigen Medium gelösten NP nach der Dehydrierung von 230 nm bis auf etwa 20 nm stark geschrumpft sind. Im Fall der Polystyrol NP konnte keine Abnahme des Durchmessers nach dem Entwässerungsschritt beobachtet werden (Abbildung 25). Die Eigenschaft des Chitosans, sich plastisch zu verhalten und zu verformen, könnte als ein Vorteil bei der Aufnahme und dem Transport der Partikel durch die Zelle betrachtet werden und kann von großem Nutzen bei der Entwicklung von Wirkstoffträgersystemen sein.

### 3.4.2 Biokompatibilität der Glycolchitosan NP

Zur Bestimmung der Biokompatibilität der Glycolchitosan NP wurden die Caco-2 Zellen mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 2,3  $\mu\text{g/ml}$  bis 600  $\mu\text{g/ml}$  im Wachstumsmedium inkubiert. Der anschließende Zytotoxizitätstest (CellTiter-Glo®) wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Toxizität der GC NP keinen zeitlichen Verlauf aufweist. Sogar nach 24 h Inkubationszeit ließ sich deutlich erkennen, dass die Partikel auch bei hohen Konzentrationen keine toxischen Effekte ausüben. Selbst bei der am höchsten eingesetzten Konzentration von 600  $\mu\text{g/ml}$  blieben die Caco-2 Zellen metabolisch aktiv (Abbildung 42). Interessanterweise wurde beobachtet, dass mit steigender Konzentration der GC NP auch der Stoffwechsel in den Zellen in Bezug auf ihre Viabilität leicht erhöht ist. Ein Grund dafür kann die Gegenwart der Polyglutaminsäure (PGA) sowie des Natriumglutamats in der GC NP Dispersionslösung gewesen sein, die bei der Herstellung der Partikel eingesetzt wurden. Es ist bekannt, dass Glutamat mithilfe eines Transporters EEAT (excitatory amino acid transporter, exzitatorischer Aminosäuretransporter) in die Zellen eingeschleust wird, der in einer engen Verbindung mit dem Energiemetabolismus steht und somit eine wichtige Rolle in der Physiologie der Zelle spielt [213]. Dieser Prozess übt eine stimulierende Wirkung auf die Zellen aus, wodurch die metabolische Aktivität gesteigert wird. Diese wiederum führt zu einem erhöhten Signal bei der Bestimmung der Toxizität. Demzufolge führt die Zugabe des Glutamats zu einer erhöhten Viabilität. Weiterhin haben manche Studien die Eigenschaften des Polysaccharids GC analysiert und gezeigt, dass Chitosan nur eine sehr geringe Toxizität und eine hohe Biokompatibilität aufweist [84, 85]. Somit stimmen diese Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Gruppen überein.

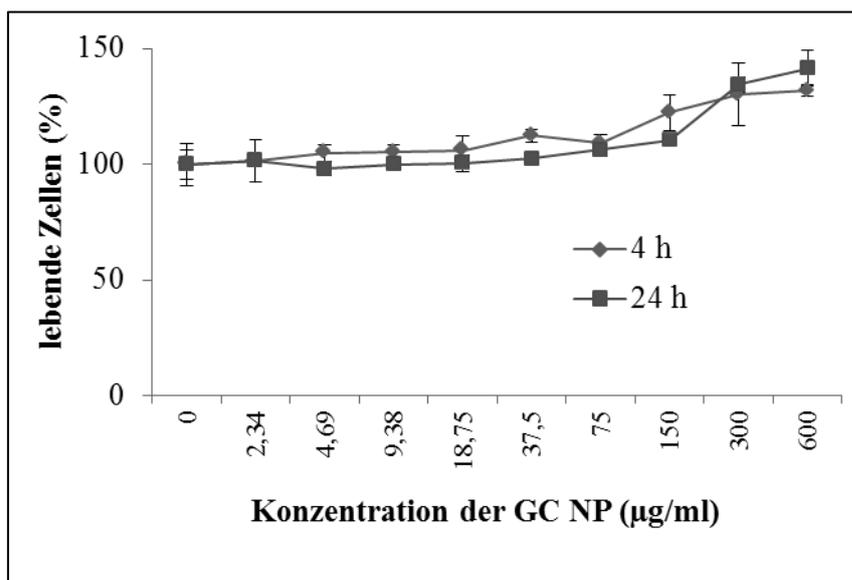


Abbildung 42: Zytotoxizität der Glycolchitosan NP auf die Caco-2 Zellen nach einer 4 h oder 24 h Einwirkzeit. Die NP wurden mit Wachstumsmedium auf eine entsprechende Konzentration (0; 2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,5; 75; 150; 300 und 600  $\mu\text{g/ml}$ ) verdünnt und zu den Zellen gegeben.



### 3.4.3 Intrazelluläre Aufnahme der GC NP

Die intrazelluläre Lokalisation der mit RBITC markierten GC NP wurde mithilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Im ersten Schritt wurde die Internalisierung der GC NP mit dem freien Farbstoff RBITC verglichen. Die Mikroskopie-Bilder der GC NP zeigten einige gefärbte Punkte und zusätzliche Filamente im Inneren der Zellen (Abbildung 43 A). In der Probe mit freien RBITC wurden nur die markierten Filamente beobachtet (Abbildung 43 B). Dies ist ein Indiz für die Lokalisierung der GC NP in den Endosomen während das freie RBITC auch in anderen intrazellulären Strukturen lokalisiert ist. Die Aufnahmen bestätigen somit die Lokalisierung der GC NP in den Zellenkompartimenten, die für den Transport der kleinen Substanzen relevant sind. Außerdem lässt es sich deutlich erkennen, dass die Fluoreszenzsignale der GC NP und des freien Farbstoffes überlappen. Offensichtlich können das freie RBITC sowie das nicht gebundene RBITC aus den GC Nanopartikel freigesetzt werden und spezifische Strukturen in Form von Filamenten in der Zelle markieren.

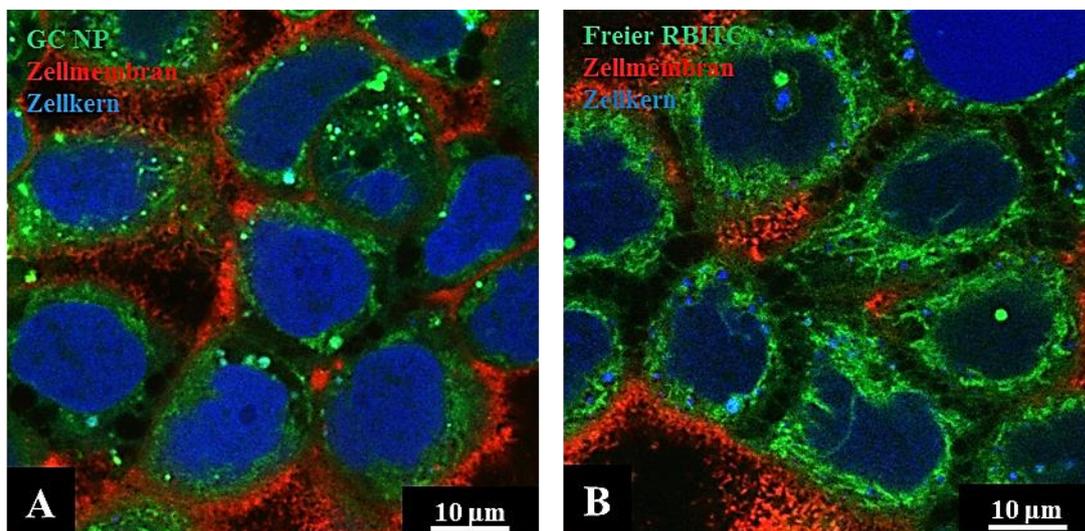


Abbildung 43: Der Vergleich der intrazellulären Aufnahme (A) der GC NP und (B) des freien Farbstoffs RBITC in die Caco-2 Zellen nach 4 h Inkubationszeit. Die Caco-2 Zellen wurden für 3 Tage in eine  $\mu$ -Schale ausgesät und anschließend mit 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GC NP in Wachstumsmedium inkubiert. Der Waschvorgang diente dem Entfernen der nicht internalisierten Partikel. Die Zellmembran wurde mittels WGA Oregon Green® 488 (rot) gefärbt, die GC NP wurden mit RBITC markiert und der Zellkern mit DRAQ5 sichtbar gemacht.

Zum besseren Verständnis der Lokalisation der Partikel wurden die Proben parallel zu den GC NP mit einem Farbstoff MitoTracker®, der die Mitochondrien sichtbar macht, untersucht. Die Färbung der Mitochondrien veranschaulichte, dass das Fluoreszenzsignal von RBITC sich mit dem Signal von Mitochondrien überlappt (Abbildung 44 A3, B3). Es kommt zu einer Überlagerung der Fluoreszenzsignale von beiden, Partikel und MitoTracker®, was sich in einer orangenen Färbung erkennen lässt. Die einzeln lokalisierten grünen Punkte liegen außerhalb der mit MitoTracker® gefärbten Mitochondrien. Die Co-Lokalisation lässt sich bereits nach 30 min Inkubationszeit mit den GC NP feststellen (Abbildung 44 A3). Weiterhin lässt sich bemerken,

dass das Signal der Partikel nicht nur in den Mitochondrien zu finden ist, sondern wie schon vorher beobachtet als einzelne Punkte in der Zelle. Dies ist ein eindeutiges Zeichen für die Lokalisation der GC NP in den Transportvesikeln.

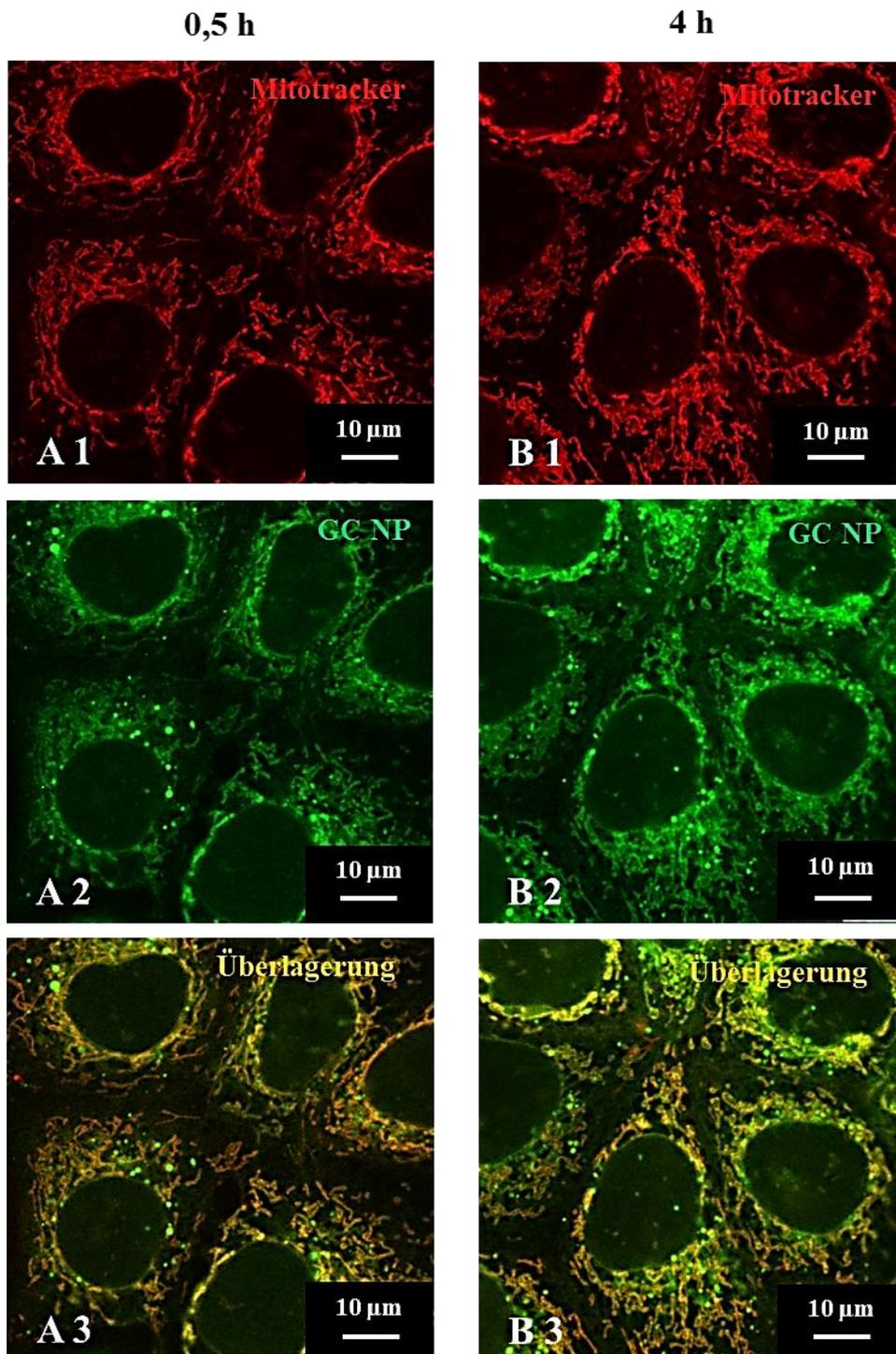


Abbildung 44: Untersuchung der Lokalisation der GC NP nach 30 min (A) und nach 4 h (B) in den Caco-2 Zellen mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie. Die Caco-2 Zellen wurden für 3 Tage in eine  $\mu$ -Schale ausgesät und anschließend mit 150  $\mu\text{g/ml}$  GC NP (grün) in Wachstumsmedium inkubiert. Nach dem Entfernen der NP im Überstand wurden die Mitochondrien mit MitoTracker® (rot) angefärbt.

Diese Ergebnisse haben deutlich gezeigt, dass die Caco-2 Zellen in der Lage sind, die GC NP in sehr kurzer Zeit aufzunehmen. Da die Caco-2-Zellen das Modell für die intestinale Aufnahme von NP darstellen, zeigt dieses Experiment, dass Chitosan in Form von NP mit hoher Effizienz internalisiert werden kann und es sich als Wirkstoffträgersystem eignet.

Weiterhin wurde untersucht, ob das Adsorptionsverhalten der GC NP einer zeitlichen Kinetik unterliegt. Wie die Bilder gezeigt haben, sind an den Mikrovilli nach 4 h Inkubation viele hafende GC NP zu sehen (Abbildung 45 A), wobei nach 24 h mehr adhärenente Partikel zu finden sind (Abbildung 45 B). Das hohe Adhäsionsverhalten der GC NP wurde bereits bei den REM Aufnahmen beobachtet (Abbildung 41) und korreliert somit mit den festgestellten Resultaten.

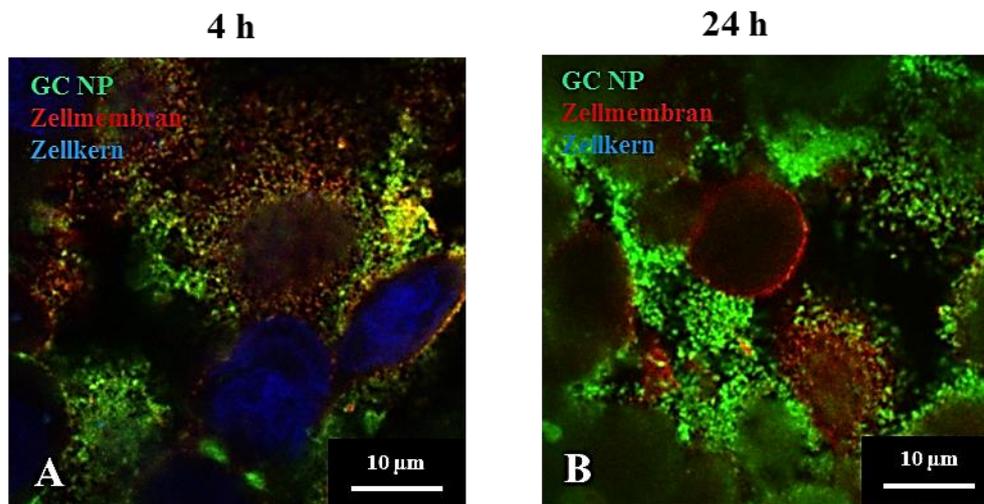


Abbildung 45: Der Vergleich der Adhäsion der GC NP (A) nach 4 h und (B) nach 24 h Inkubation mit den Caco-2 Zellen nach Kultivierung im Transwell® System. Nach dem Waschen der Proben zum Entfernen der frei liegenden Partikel, wurden die Membranen mit dem Zell-Layer ausgeschnitten, gefärbt und zwischen zwei Deckgläschen platziert. Die Zellmembran wurde mittels WGA Oregon Green® 488 gefärbt (rot), die GC NP wurden mit RBITC markiert (grün) und der Zellkern mit DRAQ5 sichtbar gemacht (blau).

### 3.4.4 Transzytose der GC NP und GChPYY NP im Transwell® System

#### 3.4.4.1 Effekt des FBS auf den Transport der GC NP

Um herauszufinden, ob der Transport der Glycolchitosan NP von den Komponenten im FBS abhängig ist, wurden diese im Medium mit FBS oder ohne FBS verdünnt und auf die apikale Seite im Transwell® System zugegeben. Nach einer Inkubation von 4 h oder 24 h ließ sich ein deutlich positiver Effekt des FBS auf die Transzytose der GC NP verzeichnen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Zugabe des FBS nach 24 h Inkubation die Transportrate um 40% im Vergleich zu den Proben ohne FBS erhöht hat (Abbildung 46). Wie zuvor im Falle der Polystyrol NP festgestellt wurde, ließ die Anwesenheit der FBS Komponente die Transzytose ebenfalls steigern (Abbildung 31). Wie oben schon vermutet und ausführlich beschrieben (Kapitel 3.3.5.3), könnte die Gegenwart des Proteins Albumin, sowie von Vitamin A, für die Zunahme

der Transportrate der GC NP durch die Caco-2 Zellschicht verantwortlich sein. Dabei kann Albumin, welches an die Oberfläche der NP adsorbiert, an den FcRn-Rezeptor binden, wodurch die NP über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose effizienter in die Zelle aufgenommen werden. Es wurde berichtet, dass die Caco-2 Zellen den FcRn-Rezeptor exprimieren [191-193]. Dadurch kann eine gezielte Interaktion zwischen den GC NP und den Zellen im Medium mit FBS stattfinden, wodurch die Transzytose verbessert wird. Ein weiterer Kandidat ist Vitamin A, das mit hoher Affinität an den STRA6 Rezeptor bindet, weshalb ebenfalls NP über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden können [196-198].

Die Chitosan NP sind mit einer Größe von 230 nm größer als die Polystyrol NP, welche eine Größe von etwa 130 nm aufweisen. Im Rahmen der vorliegenden Experimente zeigte sich, dass die Chitosan NP trotz ihrer höheren Größe eine bessere Transportkapazität aufweisen. Diese zeigen mit bis zu 3% eine verbesserte Transzytoserate im Vergleich zu der Transportrate der PS-COOH NP mit bis zu 2% sowie PS-NH<sub>2</sub> NP mit unter 0,5%. Für diese Beobachtung könnte zum einen die Stabilität der GC NP ohne sichtbare Aggregate im Medium verantwortlich sein. Zum anderen verlängert sich aufgrund seiner mukoadhäsiven Eigenschaften und guter Verformbarkeit die Kontaktzeit zwischen den Substanzen und der Zelloberfläche bei den GC NP. Somit zeichnet sich Chitosan als ein sehr gut geeignetes Polymer für die Verbesserung der Transzytose aus. Darüber hinaus ist Chitosan in der Lage durch reversible Öffnung der Tight Junctions [214, 215] die parazelluläre Permeabilität zu erhöhen und dadurch die Transportgeschwindigkeit von Nanopartikeln zu steigern. Dies führt ebenfalls zu einer verbesserten Transzytose. Diese Merkmale machen daher die Chitosan Nanopartikel zu vielversprechenden Kandidaten für die Weiterentwicklung der Arzneimittel zur oralen Verabreichung im klinischen Umfeld.

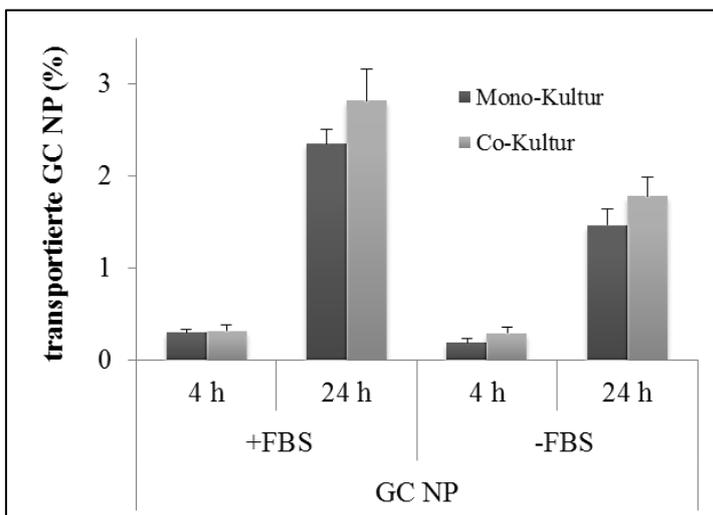


Abbildung 46: Effekt des FBS auf den Transport der Chitosan NP in einem Transwell® System nach 4 h oder 24 h Inkubation. Die Chitosan NP wurden im Wachstumsmedium ohne oder mit FBS auf eine Konzentration von 150 µg/ml verdünnt und für 4 h oder 24 h zugegeben. GC NP: Glycolchitosan Nanopartikel; FBS: Fötale Bovines Serum.

### 3.4.4.2 Effekt des WGA auf den Transport der GC NP

Bei der Suche nach einer Substanz zur Verbesserung der Transzytoserate durch die intestinale Zellschicht, wurde das Lektin WGA getestet. Verschiedene Lektinarten haben die Fähigkeit eine spezifische Bindung mit N-Acetyl-D-Glucosamin sowie Sialinsäure einzugehen, wodurch die Muko- und Zytoadhäsion verbessert wird. [102, 107]. Parallel dazu wurde der Einfluss des FBS auf die Transportrate der GC NP mit oder ohne Lektin WGA untersucht. Die Ergebnisse haben einen deutlichen Anstieg der Transzytose bei allen Proben in Anwesenheit des WGA gezeigt. Die Zunahme der Transportrate lag in Mono- sowie in Co-Kultur bei etwa 30% (Abbildung 47). Verglichen mit dem leicht inhibierenden Effekt des WGA auf den Transport der PS-COOH NP (Abbildung 32), lässt sich ableiten, dass je nach Art des Polymers das Lektin unterschiedliche Einflüsse auf die Transzytose der NP ausübt. Die Anwesenheit des FBS zeigte keinen Einfluss auf die Proben mit WGA im Vergleich zu denen ohne Lektin, jedoch wie bereits schon im Fall der Polystyrol NP festgestellt wurde (Abbildung 31), übt FBS einen positiven Effekt auf die Transzytose aus.

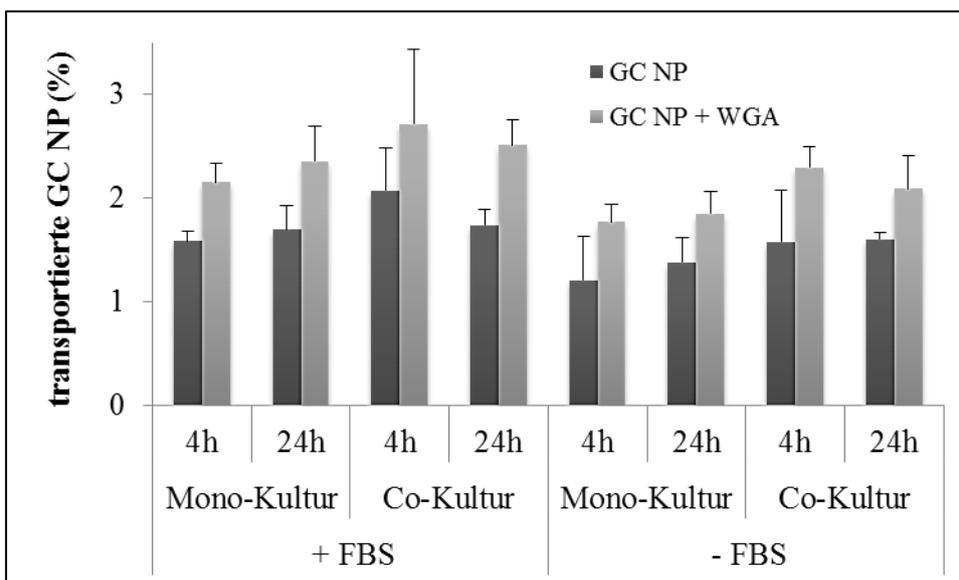


Abbildung 47: Effekt des Proteins WGA auf den Transport der Glycolchitosan NP im Medium mit 10% FBS (+FBS) oder ohne FBS (-FBS) nach 4 h oder 24 h im Transwell® System. Die Caco-2 Zellen wurden nach 14 Tagen Wachstum im Transwell® System 3 Tage als Mono-Kultur mit EMEM oder als Co-Kultur mit Raji-Zellen gehalten. Die GC NP wurden im Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 150 µg/ml mit oder ohne 15 µg/ml WGA gelöst und apikal zugegeben. Zur Berechnung der Transportrate wurde die Konzentration der NP Donorlösung als 100% gesetzt.

Des Weiteren wurde die Bindung des WGA an die Glycolchitosan NP mittels der Western-Blot Methode untersucht. Dabei lässt sich eine deutliche Bande bei 18 kDa (WGA) feststellen (Abbildung 48).

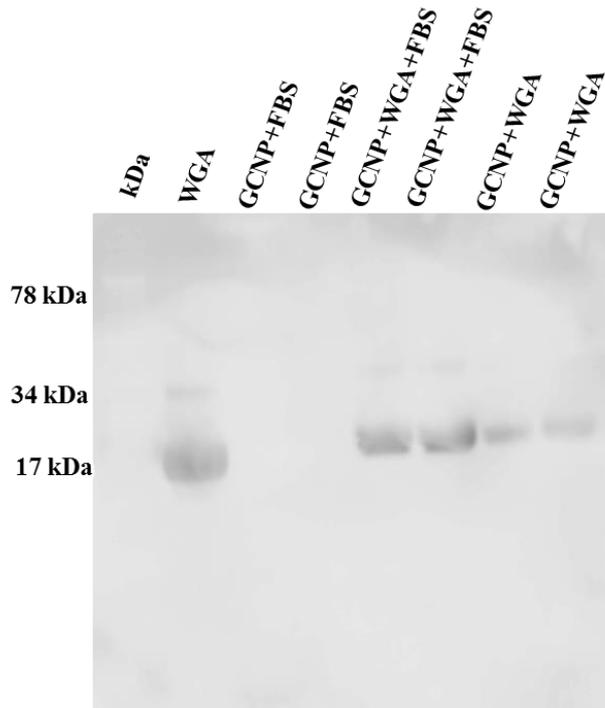


Abbildung 48: Western-Blot Analyse der Adsorption des Lektins WGA an die GC NP. Die 150 µg/ml NP wurden jeweils mit 15 µg/ml WGA oder WGA+FBS oder nur mit FBS 1 h bei 37 °C inkubiert. Um die nicht gebundenen Proteine zu entfernen, erfolgten drei Zentrifugations-Wasch-Schritte.

Dies ist ein Hinweis, dass auch nach dem mehrmaligen Waschen und Zentrifugieren WGA an den GC NP gebunden ist und dieses sich somit zur Funktionalisierung der Partikeloberfläche eignet. Eine weitere interessante und wichtige Feststellung ist, dass die FBS-Proteine das WGA nicht vom Partikel verdrängen. Es lassen sich in Anwesenheit von FBS etwas stärker ausgeprägte WGA-Banden erkennen, was vermutlich auf eine erhöhte Adsorption des WGA schließen lässt.

#### 3.4.4.3 Effekt von Vitamin B12 in Kombination mit IF auf die Transzytose der GC NP

Im folgenden Experiment wurde die Wirkung von Vitamin B12 in Kombination mit intrinsischem Faktor (IF) als einen wichtigen Zusatz für die Rezeptor-vermittelte Endozytose untersucht. Diese Studie könnte von großem Nutzen sein, um den Transport der Arzneimittel durch die Epithelzellen aus dem Darm in Richtung Blutkreislauf zu verbessern. Es wurde bereits berichtet, dass durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose mittels Vitamin B12 eine 4-fach bessere Aufnahme des Erythropoetins oder des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors, erzielt werden kann [108, 110]. Weiterhin wurden signifikante Fortschritte bei der oralen Verabreichung der Peptide, eingebunden in das Vitamin-B12-Aufnahmesystem [111, 112], sowie der Folatabsorption [113, 114] gemacht. Einige Studien haben einen verbesserten Transport durch die Caco-2 Zellen von Polysciences Nanopartikel, die mit Vitamin B12 funktionalisiert wurden,

demonstriert [108, 115]. Die humanen Kolon-Adenokarzinom Zellen sind in der Lage sowohl den Transcobalamin II zu exprimieren. Dabei bindet der in den Hepatozyten produzierter intrinsischer Faktor an den Cobalamin-Rezeptor. Dieser Komplex wird dann in der Zelle vom Transcobalamin II aufgefangen, um den weiteren Transport zur basalen Zellmembran zu ermöglichen. Die Expression dieser Komponente stieg am 6. Tag und erreichte den höchsten Level zwischen dem Tag 10 und 15 in der Zellkultur [116]. Diese beiden Faktoren sind wichtig für die Aufnahme sowie Transport des Vitamin B12 und folglich den Transzytoseprozess der mit Vitamin B12 funktionalisierten Nanopartikel durch die Darmwand. Der aufgenommene Vitamin B12 wird im Darm an intrinsischen Faktor gebunden. Dieser Komplex interagiert dann mit dem Rezeptor der Epithelzellen im Dünndarm und wird aufgenommen. Studien haben nachgewiesen, dass die mit Insulin gefüllte Nanopartikel nach der Konjugation mit dem Vitamin B 12 an der Oberfläche eine verbesserte Absorption des Insulins nach einer oralen Verabreichung aufweisen [111, 117-119].

Die Vorinkubation der Glycolchitosan NP erfolgte bei 37 °C mit Vitamin B12 in An- oder Abwesenheit des IF im Medium. Dieser Schritt diente zur Funktionalisierung der Partikel. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass allein durch Zugabe von Vitamin B12 eine 2-fache und in Anwesenheit des IF ohne Vitamin B12 eine 3-fache Erhöhung der Transzytoserate nach 4 h verzeichnet werden konnte. Der beste Effekt auf die Verbesserung der Transzytose wurde in Anwesenheit der beiden Komponenten, Vitamin B12 in Kombination mit IF, erreicht. In diesem Fall stieg der Transport um das 5-fache im Vergleich zu den GC NP ohne Funktionalisierung (Abbildung 49).

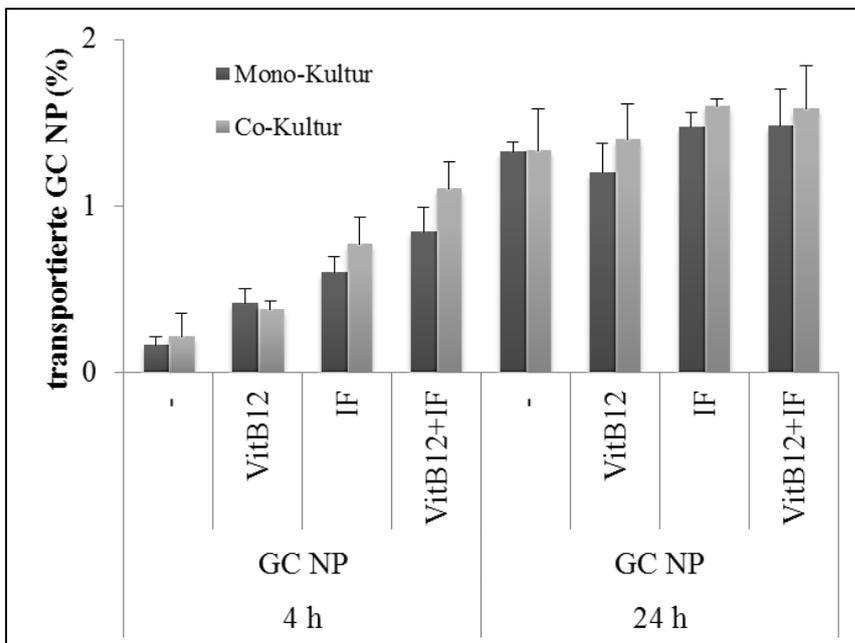


Abbildung 49: Effekt von Vitamin B12 in Kombination mit Intrinsischem Faktor auf die Transzytose der Chitosan Partikel (A) nach 4 h und (B) nach 24 h im Transwell® System. Die GC NP wurden im Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 150 µg/ml mit oder ohne 10 µM Vitamin B12 sowie mit oder ohne 0,58 µg/ml intrinsischem Faktor (IF) gelöst und apikal zugegeben. Zur Berechnung der Transportrate wurde die Konzentration der NP Donorlösung als 100% gesetzt.

Ein Grund für diese Feststellung ist die Anwesenheit der beiden Faktoren, die für den Transport der Cobalamine von großer Bedeutung sind. Durch die Adsorption von IF in Kombination mit Vitamin B12 können die Partikel über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden, wodurch diese mit einer höheren Effizienz in Richtung der basalen Seite transportiert werden. Auch nach 24 h konnte ein Anstieg der Transzytose beobachtet werden, jedoch ist der Effekt der Funktionalisierung schwächer ausgeprägt. Die Transportrate erhöhte sich nur 1,2-fach im Vergleich zu den nicht funktionalisierten Partikeln. Somit wurde klar, dass Vitamin B12 in Verbindung mit IF vorwiegend in den ersten Stunden nach der Zugabe einen starken Effekt ausübt. Vermutlich sind die Cobalamin-Rezeptoren nach einem bestimmten Zeitintervall gesättigt und erreichen damit ihr Maximum in dem Aufnahmeverhalten.

#### **3.4.4.4 Konzentrationsabhängige Transzytose der GChPYY NP**

Wie bereits erwähnt, sollten die Glycolchitosan NP (GC NP) der Entwicklung eines Peptidhaltigen Trägersystems dienen. Dafür wurde das humane Peptid YY (hPYY) in das Polysaccharid GC eingekapselt und ebenfalls auf seine Transporteffizienz untersucht. Für dieses Experiment wurden die hPYY-haltigen GC NP (GChPYY NP) im Wachstumsmedium auf verschiedene Konzentrationen (10; 20; 40; 75; 150 oder 300 µg/ml) verdünnt und auf die apikale Seite im Transwell® System zugegeben. Die Analyse ergab, dass es eine signifikante Korrelation zwischen der eingesetzten Konzentration und der transportierten Menge an Partikel besteht. Je niedriger die eingesetzte Konzentration war, desto effizienter war die Transportrate in % der eingesetzten Donorlösung. Bei der verwendeten Konzentration von 300 µg/ml sind durch die Zellschicht der Mono-Kultur etwa 0,15% der Partikel durchgegangen, während bei den eingesetzten 10 µg/ml die Transportrate auf 1,5% gestiegen ist. Im Fall der Co-Kultur wurden bei 300 µg/ml nur 0,2% und bei 10 µg/ml etwa 2,9% der ursprünglich eingesetzten Partikel auf der basolateralen Seite detektiert (Abbildung 50).

Im Allgemeinen ließ sich nach 24 h Inkubationszeit ein deutlicher Anstieg der Transportrate bei allen getesteten Konzentrationen erkennen. Bei der Mono-Kultur war hierbei eine 2-fache und bei der Co-Kultur 3-fache Zunahme der Transzytoserate zu verzeichnen. Durch die mukoadhäsiven Eigenschaften des Chitosans kommt es zu einer verlängerten Kontaktzeit zwischen der Zelloberfläche und den Nanopartikeln, wodurch die Transzytose verbessert wird.



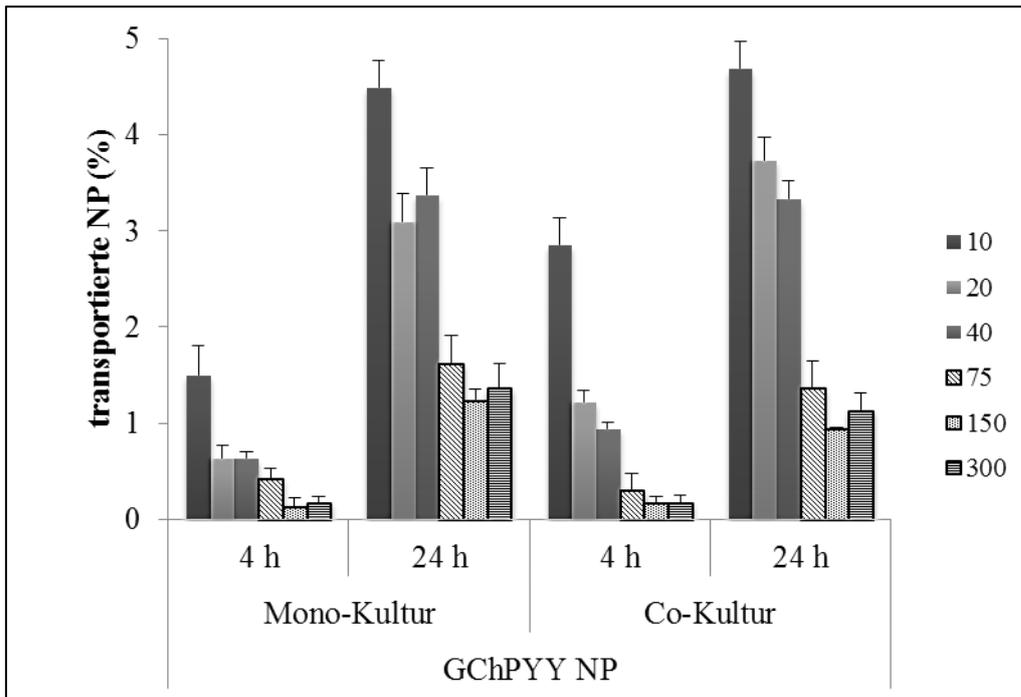


Abbildung 50: Konzentrationsabhängiger Transport der mit hPYY gefüllten Glycolchitosan NP (GChPYY NP) im Transwell® System nach 4 h und 24 h. Die Kultivierung der Caco-2 Zellen erfolgte über 14 Tage mit anschließender Inkubation mit EMEM als Mono-Kultur oder den Raji-Zellen als Co-Kultur im Transwell® System. Die Legende im Diagramm gibt die Konzentration der apikal zugegebenen NP in µg/ml an. Die verwendete Konzentration der Donorlösung wurde zur Referenz als 100% gesetzt.

Die Feststellung, dass bereits bei der eingesetzten Konzentration von 10 µg/ml bis zu 4,5% der NP durch eine Fläche von etwa 1 cm<sup>2</sup> transportiert werden können, zeigt, wie effizient die Transportrate ist. Studien zufolge liegt die durchschnittliche Länge des Dünndarms bei etwa 7 Metern mit einem Durchmesser von 2,5-3 cm [216], die Oberfläche der menschlichen Dünndarmschleimhaut beträgt etwa 32 m<sup>2</sup> [217]. Diese Kontaktfläche im nativen System ist demzufolge groß genug, um eine ausreichende Menge an Nanopartikel und damit des eingekapselten humanen PYY in Richtung des Blutkreislaufs transportieren zu können.

#### 3.4.4.5 Effekt des WGA auf den Transport der GChPYY NP

Zur Analyse auf die mögliche Verbesserung der Transzytoserate der GChPYY NP wurde das schon vorher erwähnte Lektin WGA getestet. In Gegenwart von WGA ist die Transzytose der NP im Fall der Mono- und Co-Kultur leicht inhibiert. Nach 4 h wird eine 15% Reduktion und nach 24 h eine 10% Reduktion des Transportes von apikaler zu basolateraler Seite festgestellt (Abbildung 51). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den nicht mit hPYY gefüllten GC NP. Im Fall der GC NP ohne hPYY wurde eine deutliche Zunahme der Transzytoserate in Anwesenheit des WGA und somit ein positiver Effekt des Lektins festgestellt (Abbildung 47).

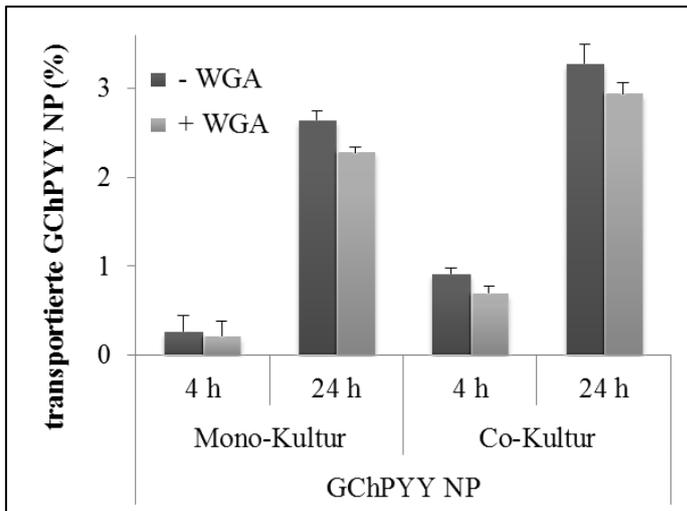


Abbildung 51: Effekt des Proteins WGA auf den Transport der hPYY haltigen GC NP (GChPYY NP) im Medium mit 10% FBS nach 4 h oder 24 h Inkubation im Transwell® System. Die Caco-2 Zellen wurden nach 14 Tagen Wachstum im Transwell® System 3 Tage als Mono-Kultur mit EMEM oder als Co-Kultur mit Raji-Zellen gehalten. Die NP wurden im Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 150 µg/ml mit oder ohne 15 µg/ml WGA gelöst und apikal zugegeben. Zur Berechnung der Transportrate wurde die Konzentration der NP Donorlösung als 100% gesetzt.

Eine mögliche Erklärung für diese Differenz kann die Präsenz der PGA in den GChPYY NP Proben sein, da PGA für die Synthese der PYY-haltigen NP benötigt wird. Aufgrund der negativen Ladung der PGA [213] kann diese vermutlich an die positiv-geladene Oberfläche des WGA [103] binden und dadurch die Interaktion zwischen den NP und der Zelloberfläche verändern. Die GChPYY NP besitzen auf diese Weise eine weniger positiv-geladene Hülle und zeigen dadurch andere Eigenschaften als die GC NP. Diese Ergebnisse verdeutlichen, wie wichtig es ist den möglichen Effekt der bei der Synthese der Nanopartikel eingesetzten zusätzlichen Substanzen zu beachten.

### 3.4.5 Endozytose der GC NP und GCrPYY NP

#### 3.4.5.1 Vergleich der Aufnahme der GC NP und des freien RBITC

Darüber hinaus wurde die Endozytose der GC NP im Vergleich zu dem freien Farbstoff in die Caco-2 Zellen bei den unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Dies diente der Überprüfung, ob nur der von den GC NP Proben freigesetzte Farbstoff oder auch das an das Glycolchitosan gebundene RBITC in die Zellen transportiert werden kann. Es lässt sich deutlich erkennen, dass bei der gleich eingesetzten Konzentration des Farbstoffs in Proben mit GC NP und freiem RBITC ein signifikanter Unterschied zu sehen ist. Dabei wird nur 3% vom freien Farbstoff im Vergleich zu 80% des Signals kommend von GC NP in Bezug auf die Gesamtpopulation der Zellen detektiert (Abbildung 52). Dieses positive Ergebnis weist nach, dass der Farbstoff tatsächlich an das Chitosan gebunden ist und das Polymer in Form von Nanopartikel mit hoher Effizienz in die Epithelzellen aufgenommen wird.

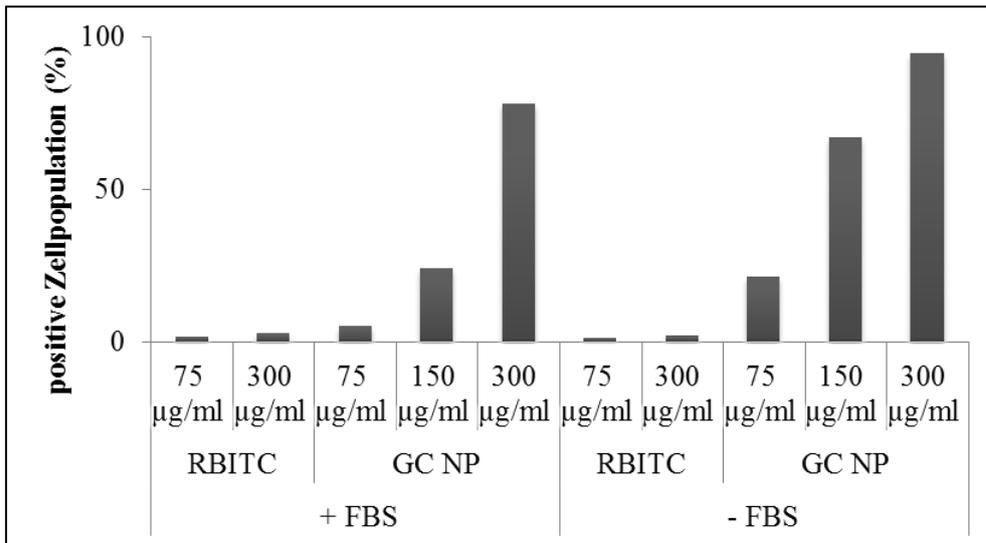


Abbildung 52: Aufnahme der GC NP im Vergleich zum freien Farbstoff RBITC im Wachstumsmedium ohne oder mit 10% FBS. Die Caco-2 Zellen wurden 3 Tage kultiviert, mit den GC NP oder freiem RBITC inkubiert und anschließend zur Messung mittels Trypsin-EDTA abgelöst. Die Konzentration des freien Farbstoffs in den Proben entsprach der Gesamtkonzentration des zur Markierung der GC NP eingesetzten Farbstoffs. Die Detektion der Aufnahme erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Gesamtpopulation der Zellen nach 4 h Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Proben und entsprechen somit dem Anteil der Zellen mit einem positiven Fluoreszenzsignal.

### 3.4.5.2 Vergleich der Aufnahme der GCrPYY NP und der GC NP

Bei der weiteren Analyse wurde getestet, ob es einen Unterschied in der quantitativen oder zeitlichen Aufnahme zwischen den GC NP und den GCrPYY NP gibt. Dafür wurden die Proben mit gleicher Konzentration der NP behandelt und nach dem Ablösen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Detektion des Fluoreszenzsignals zeigte, dass sich in den ersten 4 h keine Unterschiede in dem Aufnahmeverhalten verzeichnen lassen (Abbildung 53).

Nach 24 h Inkubation stieg jedoch die Aufnahme der rPYY-haltigen GCrPYY NP um 30% im Vergleich zu GC NP Proben. Ein Grund dafür kann das Vorhandensein der PGA in den GCrPYY NP sein. Wie bereits berichtet, kann Glutamat mithilfe eines Transporters EEAT in die Zellen eingeschleust werden und dadurch den Stoffwechsel erhöhen [213]. Vermutlich werden die NP aufgrund einer Zunahme des Metabolismus verstärkt in die Zelle befördert.

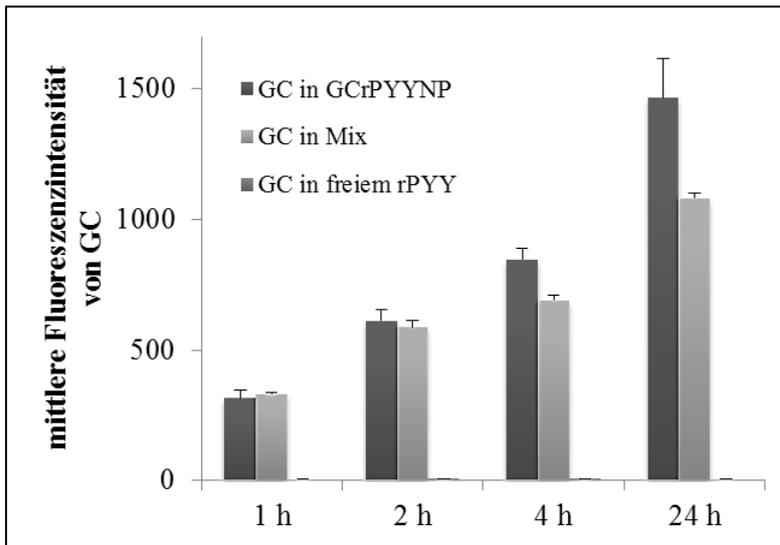


Abbildung 53: Vergleich der Endozytose der mit rPYY gefüllten Glycolchitosan NP (GC:rPYY NP) mit den GC NP gemischt mit freiem rPYY und mit den GC NP allein. Die Caco-2 Zellen wurden über 3 Tage in Kultur gehalten und anschließend mit NP inkubiert. Die eingesetzte Konzentration der Partikel betrug 600 µg/ml. Das Fluoreszenzsignal, das von dem mit RBITC markierten Glycolchitosan stammte, wurde mittels Durchflusszytometers detektiert.

### 3.4.5.3 Analyse der Endozytosewege der GC NP mithilfe der Inhibitoren

Um den Aufnahmeweg der Glycolchitosan NP zu charakterisieren, wurden die Caco-2 Zellen mit den zu testenden Inhibitoren vorbehandelt und anschließend mit den NP inkubiert. Es wurde festgestellt, dass der Prozess der Endozytose von mehreren Substanzen gehemmt wird. Der stärkste Effekt von 50% wurde in Anwesenheit von Cytochalasin D und Dynasore verzeichnet (Abbildung 54). Diese Feststellung gibt den Hinweis, dass die GC NP diese Komponente, Aktin und Dynamin, für die Aufnahme in die Epithelzellen benötigen. Aufgrund der inhibierenden Wirkung der EIPA auf den Endozytoseprozess, werden die Chitosan Partikel über Makropinozytose aufgenommen. Die Inhibitoren Chlorpromazin und Filipin weisen ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf. Vermutlich sind die GC NP aufgrund ihrer Eigenschaften wie zum Beispiel Verformbarkeit und natürliche Bioverfügbarkeit in der Lage über viele unterschiedliche Wege wie Makropinozytose sowie Caveolae- und Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen zu werden. Eine weitere Erklärung kann das Vorliegen von sowohl Hydroxyl- als auch Aminogruppen in dem Polymer sein. Diese stellen vielseitige chemische Eigenschaften bereit und ermöglichen dadurch einen effizienten Transport in die Enterozyten. Diese Resultate bestätigen die Annahme, dass Chitosan in Form von NP ein geeignetes Trägersystem für die verbesserte orale Verabreichung der Arzneimittel und in diesem Fall als Transporter für das Sättigungshormon PYY fungieren kann.

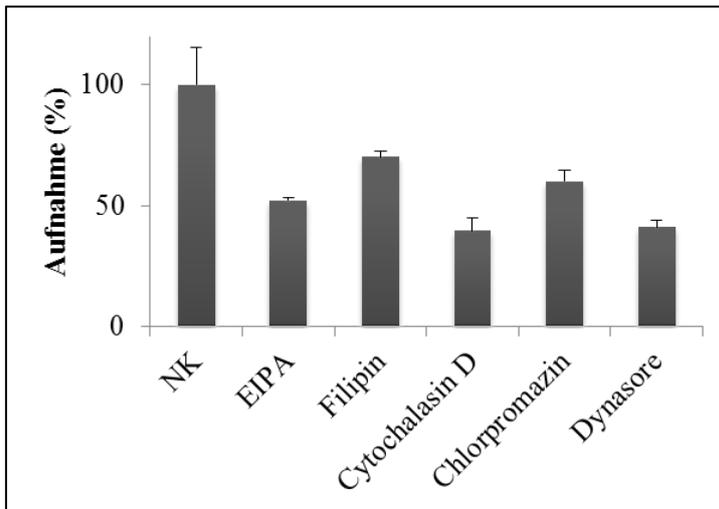


Abbildung 54: Die Wirkung der Inhibitoren auf die Endozytose der Glycolchitosan NP in Caco-2 Zellen. Nach 45 min Vorinkubation der Zellen mit entsprechendem Hemmstoff im Wachstumsmedium erfolgte die Zugabe der 150  $\mu\text{g/ml}$  GC NP für 4 h. Die nicht behandelten Zellen ohne Zugabe eines Inhibitors wurden als Referenz (Negativkontrolle, NK) verwendet. Folgende Konzentrationen wurden eingesetzt: 50  $\mu\text{M}$  EIPA, 5  $\mu\text{g/ml}$  Filipin, 20  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D, 50  $\mu\text{M}$  Chlorpromazin, 25  $\mu\text{M}$  Dynasore. Die Aufnahme erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Der Median der Fluoreszenzintensität der Proben wurde zur quantitativen Auswertung der Messung herangezogen und die Negativkontrolle als 100% gesetzt.

### 3.4.6 Transzytose der GC NP im Ussing-Chamber System

#### 3.4.6.1 Konzentrationsunabhängiger Transport der GC NP

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Epithelschicht aus dem duodenalen Abschnitt des Schweinedarms in der Lage ist die Glycolchitosan NP zu transportieren und inwieweit die Transzytose konzentrationsabhängig ist. Die Analyse des Transports erfolgte von mukosalen in die Richtung der serosalen Seite im Ussing-Chamber System. In diesem Experiment wurden mukosal jeweils 150, 300 oder 600  $\mu\text{g/ml}$  NP eingesetzt und anschließend nach 4 h mithilfe des Fluoreszenzsignals detektiert. Es wurde festgestellt, dass bei allen Proben etwa 1  $\mu\text{g/ml}$  unabhängig von der verwendeten Konzentration transportiert wurde (Abbildung 55 A). Bei der Berechnung des prozentualen Anteils ließ sich demzufolge erkennen, dass bei der niedrigeren Konzentration von 150  $\mu\text{g/ml}$  etwa 0,6%, während bei 600  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzter Menge an NP nur 0,15% auf die serosale Seite befördert wurden (Abbildung 55 B). Vermutlich tritt nach einem bestimmten Zeitpunkt der Inkubation ein Sättigungseffekt an der Epitheloberfläche auf, so dass das Duodenumgewebe nicht mehr die nötige Kapazität aufweist und die Menge der transportierten NP limitiert wird. Vergleicht man die Transzytoserate der GC NP mit den Polystyrolpartikel, ca. 1% bei den PS-COOH NP und 0,1% der PS-NH<sub>2</sub> NP (Abbildung 39), lässt sich ein Unterschied in dem Transzytoseverhalten feststellen. Vermutlich spielt dabei die Ladung eine wichtige Rolle. Während die PS-NH<sub>2</sub> NP mit + 46 mV stark positiv sind und die PS-COOH mit - 71 mV stark negativ vorliegen, befinden sich die GC NP mit + 25 mV dazwischen.

Diese Resultate bestätigen den Effekt der unterschiedlichen Ladungen auf die Transportfähigkeiten der NP und somit die Effizienz der Transzytose durch das intestinale Gewebe.

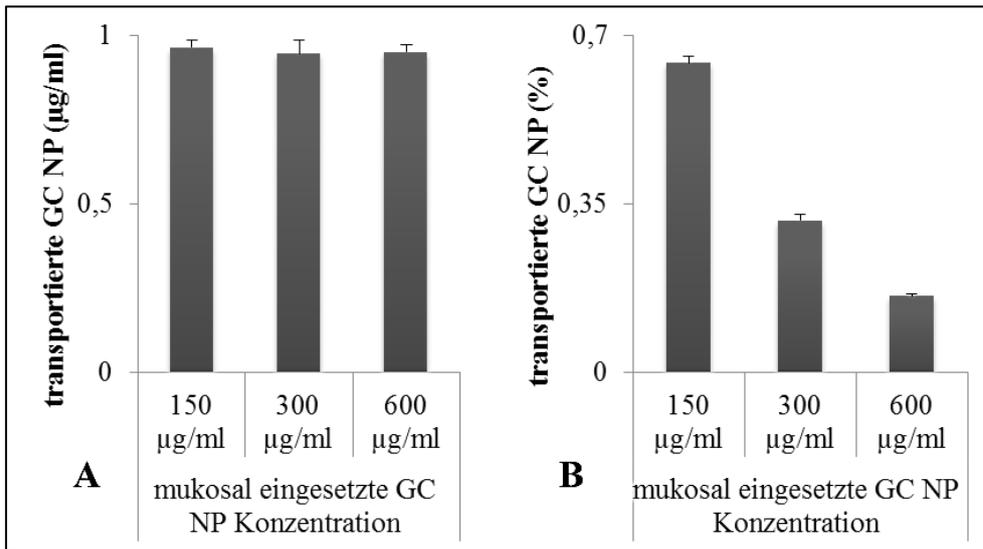


Abbildung 55: Transzytose der GC NP durch das Schweinedarmgewebe nach 4 h. (A) Tatsächlich gemessene Menge an GC NP auf der serosalen Seite des Systems. (B) Die transportierte Menge an GC NP bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Konzentration. Das Experiment wurde im Ussing-Kammer System mit der NTS Lösung auf beiden Kammerseiten durchgeführt. Die Untersuchung des Transports erfolgte in Richtung von mukosal (apikal) nach serosal (basolateral). Die jeweilige eingesetzte Konzentration der NP wurde als 100% gesetzt.

### 3.4.6.2 Einfluss der Funktionalisierung der GC NP mittels Vitamin B12 und des Lektins WGA auf den Transport

Zur Untersuchung der Verbesserungsmöglichkeit der Transzytoserate durch das Duodenumgewebe im Ussing-Chamber System wurden Vitamin B12 in Kombination mit dem intrinsischen Faktor und dem Lektin WGA getestet. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass der Zusatz von Vitamin B12 mit IF keinen Effekt hinsichtlich der Erhöhung des Transports zeigt (Abbildung 56 A), während sich in Gegenwart von WGA ein leichter Anstieg der Transzytose (Abbildung 56 B) erkennen ließ. Bei der Analyse des Effekts von Vitamin B12 auf die Transzytose im Transwell® System durch die Caco-2 Zellschicht wurde jedoch ein deutlich positiver Einfluss der Funktionalisierung mittels Vitamin B12 beobachtet (Abbildung 49). Eine Erklärung dafür könnte an der Expression der für die Aufnahme der Cobalamine notwendigen Komponenten in den Caco-2 Zellen sein [108, 110, 115, 116], die jedoch nicht in den Epithelzellen des Duodenums zu finden sind. Den Studien zufolge wird Vitamin B12 vorwiegend im distalen Abschnitt des Dünndarms (Ileum und Kolon) absorbiert. Offensichtlich kann die Funktionalisierung der GC NP mittels Vitamin B12 eine Verbesserung der Aufnahme und demzufolge der Transzytose vor allem im distalen Abschnitt des Dünndarm-Traktes und im Kolon bewirken.

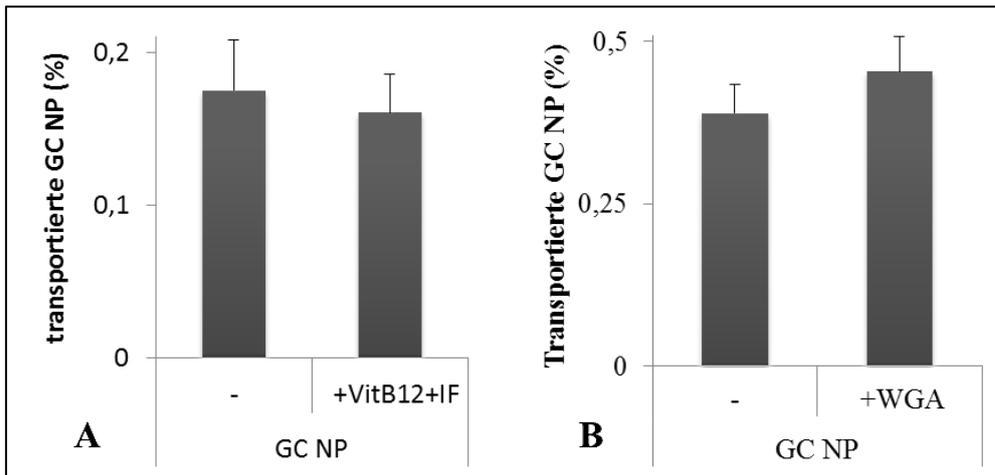


Abbildung 56: Transzytose der mit Vitamin B12 (A) und mit WGA (B) funktionalisierten GC NP durch das Schweinedarmgewebe nach 4 h. Das Experiment wurde im Ussing-Chamber System mit 150 µg/ml GC NP auf der mukosalen Seite durchgeführt. Der Transport wurde in Richtung von mukosal (apikal) nach serosal (basolateral) untersucht. Die jeweilige eingesetzte Konzentration der NP wurde als 100% gesetzt.

### 3.5 Sättigungshormon hPYY

#### 3.5.1 Intrazelluläre Aufnahme des rPYY

Zur Entwicklung eines Medikaments gegen Adipositas sollte ein PYY-haltiger Träger entwickelt werden. Aus einigen Studien ist es bekannt, dass das PYY als ein Hormon mit einer Langzeitwirkung bei der Essensaufnahme, Regulation des Körpergewichtes sowie des Sättigungsgefühls eine wichtige Rolle spielt [38, 218-220]. Dafür wurde das 3,3 kDa große PYY in die Glycolchitosan NP eingekapselt. Die Hülle aus dem Polymer Glycolchitosan diente dabei dem Schutz des Peptides gegen das im Magen herrschende saure Milieu sowie der sequenziellen Freisetzung des PYY bei steigendem pH-Wert im Darm-Bereich zur Entfaltung einer Langzeitwirkung. Diese sind einige der wichtigen Eigenschaften, die bei der Herstellung des Medikaments zur oralen Verabreichung beachtet werden sollen [221, 222]. Die mukoadhäsiven Eigenschaften von Chitosan stellen einen weiteren Vorteil dar [186], wodurch ebenfalls zur Verbesserung des Aufnahmeverhaltens und der Transzytoseraten der mit PYY geladenen NP kommt.

Dafür wurde zuerst die Fähigkeit des Peptides in die Zelle transportiert zu werden, mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Für dieses Experiment wurde anstelle von humanen PYY (hPYY) das Raten-PYY (rPYY), das eine Fluoreszenzmarkierung mit FITC aufweist, verwendet. Dabei erfolgte ein Vergleich zwischen dem Internalisationsverhalten des freien rPYY gegenüber dem in Chitosan eingekapselten rPYY in Form von GC rPYY NP. Die Aufnahmen haben gezeigt, dass die Caco-2 Zellen in der Lage sind das freie PYY sowie das in Chitosan verpackte (GC rPYY NP) und als Gemisch mit GC NP (Mix) aufzunehmen. Bei allen Proben konnte das vom rPYY kommende Signal detektiert werden. Bereits nach 2 h wurde die Aufnahme des rPYY bei allen drei Proben verzeichnet (Abbildung 57 A1, B1, C1). Jedoch lie-

Ben sich die von rPYY kommende Signale in GCrPYY NP in einer höheren Zahl in Form der einzelnen Punkte im Vergleich zu der Probe, bei der rPYY und GC NP als Gemisch vorlagen, erkennen (Abbildung 57 B1, C1).

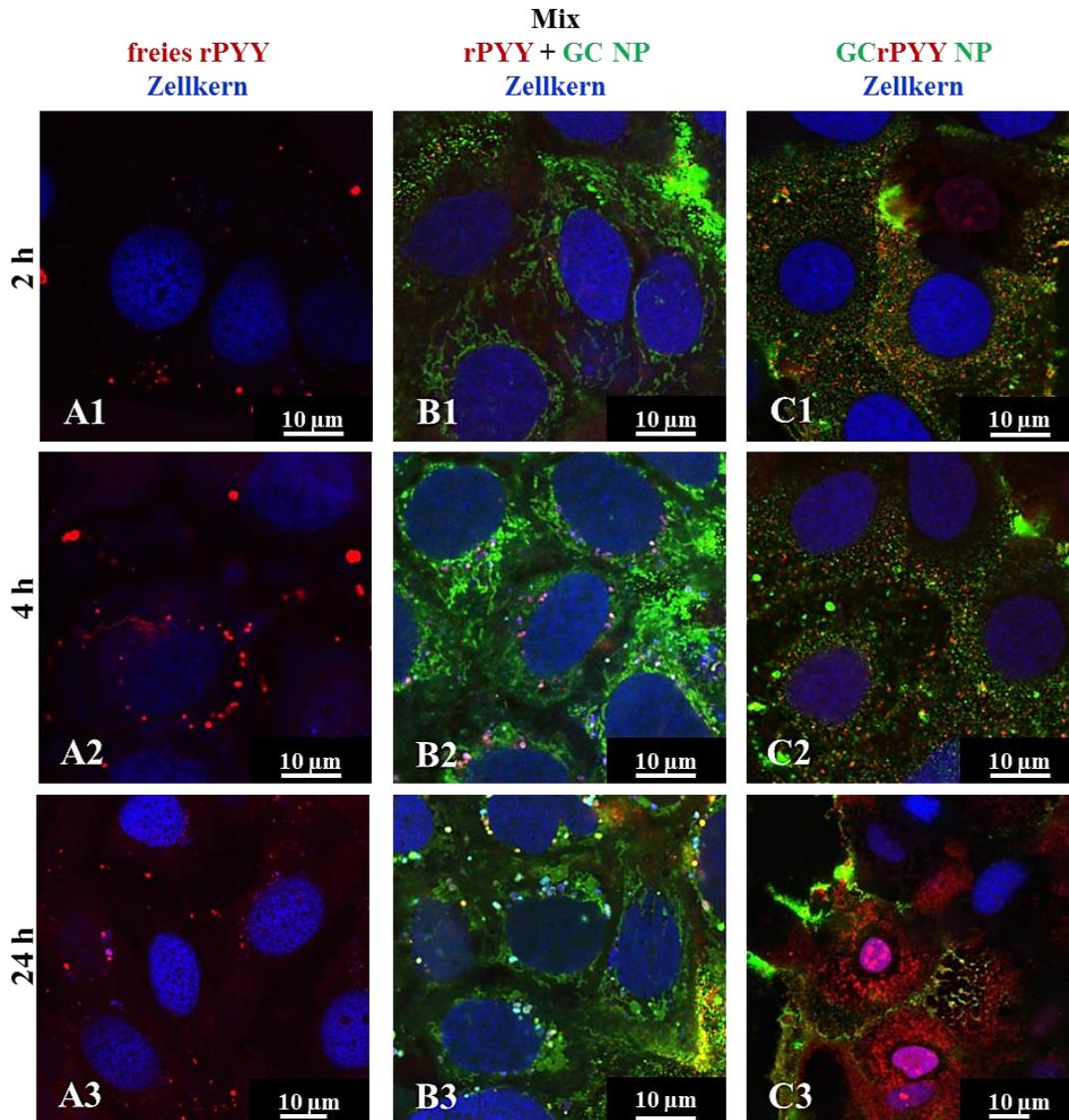


Abbildung 57: Intrazelluläre Lokalisation des rPYY in den Caco-2 Zellen nach 2 h, 4 h und 24 h Inkubation (A1-A3) mit freiem rPYY, (B1-B3) mit einem Gemisch (Mix) aus freiem rPYY und GC NP und (C1-C3) mit eingekapseltem rPYY als GCrPYY NP. Die eingesetzte Konzentration lag bei 600 µg/ml GC NP bzw. 600 µg/ml GCrPYY NP enthielt in allen 3 Proben 12 µg/ml rPYY. Rot: rPYY markiert mit FITC, grün: GC NP RBITS und blau: Zellkern gefärbt mit DRAQ5.

Bei den Proben mit eingekapseltem rPYY (GCrPYY NP) ließ sich nach 2 h Inkubation eine Überlagerung der Signale von markiertem Chitosan und von rPYY in GCrPYY NP erkennen. Im Fall der Probe, in der GC NP und freies rPYY als Gemisch getrennt voneinander vorlagen, wurden die Signale separat voneinander registriert (Abbildung 57 B1). Nach einer 24 h Inkubation ließ sich in beiden Proben eine Überlappung der Signale verzeichnen (Abbildung 57 B3, C3). Somit wurde klar, dass die Verpackung des Peptides in das Glycolchitosan einen positiven Effekt auf die intrazelluläre Aufnahme ausübt und verdeutlicht dadurch die Vorteile des Glycol-



chitosans als ein Polymer zum Schutz des Peptides und der höheren Effizienz der Internalisation in die intestinalen Zellen.

### 3.5.2 Transzytose von hPYY

#### 3.5.2.1 Effekt der unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen an hPYY im Transwell® System

Wie bereits erwähnt, diente Glycolchitosan als schützende Hülle für das Peptid sowie für eine länger anhaltende Freisetzung des hPYY in die Umgebung. Die mukoadhäsiven Eigenschaften des Polymers sollten die Adsorption der NP unterstützen und die Aufnahme in die Zellen somit verbessern. Es wurde gezeigt, dass hPYY erfolgreich in Glycolchitosan NP verkapselt werden kann und dass das Peptid nach diesem Prozess in intakter Form bleibt [97]. Die Detektion der Transzytose des humanen PYY erfolgte auf der Grundlage eines Sandwich-ELISA Prinzips. Dabei ermöglicht diese Messmethode den Transport des Peptides in der aktiven Form zu analysieren, da diese auf einem immunologischen Antigen-Antikörper-Bindungsprinzip beruht. Dafür wurden die PYY-haltigen NP in Form von GChPYY NP in unterschiedlichen Konzentrationen auf die apikale Seite im Transwell® System zugegeben und 4 h oder 24 h inkubiert. Die von der basolateralen Kammer entnommenen Proben wurden zuerst zentrifugiert, um die Nanopartikel zu entfernen und nur die Menge des nicht gebundenen hPYY zu ermitteln. Um die Transporteffizienz zu untersuchen, wurden für den Test 50; 100; 200 oder 750 ng/ml des hPYY, enthalten jeweils in 10; 20; 40 oder 150 µg/ml GChPYY NP, eingesetzt. Die auf der apikalen Seite verwendeten Konzentrationen der Stammlösungen wurden zur Berechnung der Transportrate als 100% gesetzt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass in Mono-Kultur nach 4 h Inkubation bei der eingesetzten Konzentration von 50 ng/ml hPYY in GChPYY NP etwa 0,05% transportiert werden konnte, während bei der höher verwendeten Konzentration von 750 ng/ml nur 0,01% durch die Caco-2 Zellschicht transportiert werden (Abbildung 58). Aufgrund dieser Werte wird es klar, dass bei der niedriger eingesetzten Konzentration eine höher effiziente Transportrate detektiert werden konnte. Nach 24 h stieg in Mono-Kultur die Transzytoserate 2-fach und in Co-Kultur etwa 3-fach. Diese Feststellungen korrelieren mit dem Transportverhalten der GChPYY NP in Bezug auf die Detektion der Menge an den transportierten Nanopartikel (Abbildung 50). In diesem Experiment wurde festgestellt, dass bei dem Einsatz von 200 ng/ml hPYY in Form von GChPYY NP nach 4 h etwa 40 pg/ml in Mono- Kultur und 70 pg/ml in Co-Kultur des freien hPYY durch eine Fläche von 1 cm<sup>2</sup> transportiert werden konnten. Aus der Literatur ist es bekannt, dass die Konzentration des hPYY im Blut bei der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Obesität bei 41 pg/ml liegt. 60 min nach Einnahme einer Mahlzeit stieg der hPYY-Wert in der Kontrollgruppe auf 62 pg/ml und in der Gruppe mit Fettleibigkeit auf 45 pg/ml im Plasma [223]. Es ist bekannt, dass die Adsorptionsfläche der Mukosa im Dünndarm etwa 32 m<sup>2</sup> beträgt [217], demzufolge ist diese groß genug, um eine ausreichende Menge an dem Sättigungshormon

transportieren zu können. Dadurch wird es deutlich, dass das Glycolchitosan in Form von NP als ein Trägersystem fungieren kann und für die Weiterentwicklung eines Medikaments, das das hPYY durch die Epithelzellen in Richtung Blutseite transportiert, geeignet ist.

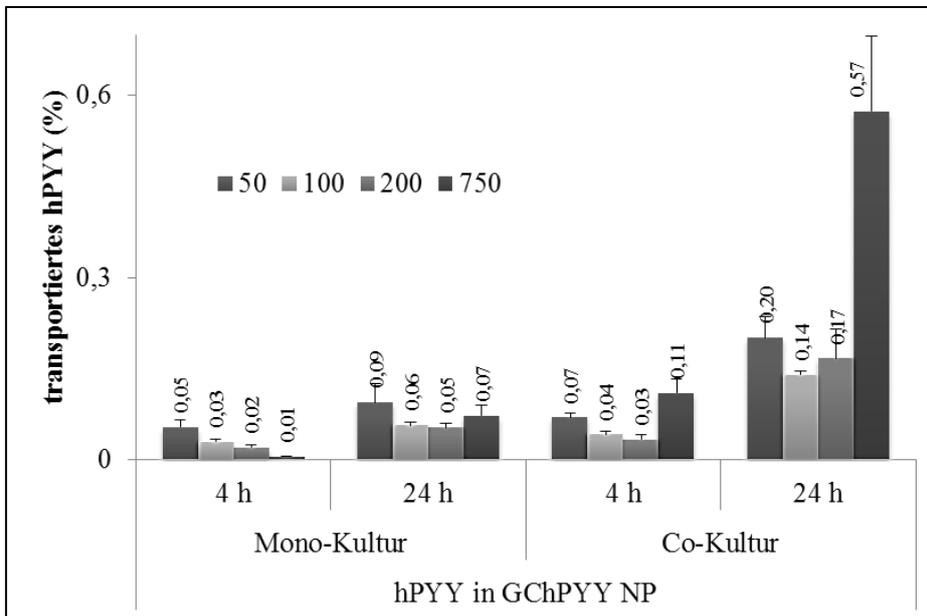


Abbildung 58: Konzentrationsabhängiger Transport des in Chitosan NP eingekapselten hPYY in Form von GChPYY NP im Transwell® System nach 4 h und 24 h. Die Kultivierung der Caco-2 Zellen erfolgte über 14 Tage mit anschließender Inkubation mit EMEM als Mono-Kultur oder den Raji-Zellen als Co-Kultur im Transwell® System. Die Legende im Diagramm gibt die Konzentration des apikal zugegebenen hPYY in ng/ml an. Die verwendete Konzentration der Donorlösung wurde zur Referenz als 100% gesetzt.

Um einen Vergleich zwischen dem verpackten und dem frei liegenden hPYY zu erhalten, wurde das freie hPYY mitgeführt. Dieser Kontrollschritt war wichtig, um die Aussage über die Fähigkeit des hPYY, durch die Zellschicht transportiert zu werden, zu erhalten. Außerdem, sollte damit der Abbau des Peptides, nachdem es durch die Zelle durchgeschleust wurde, überprüft werden. Um den optimalen Vergleich erzielen zu können, wurde die gleiche Menge an freiem hPYY wie die in Chitosan eingekapselte Menge für das jeweilige Experiment eingesetzt. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass das freie Peptid eine etwa 4 Mal höhere Transportrate aufweist (Abbildung 59) als das in GC verpackte hPYY. Eine Erklärung dafür könnte die Größe des Peptides sein, das mit 3,3 kDa Molekulargewicht eher klein ist. Aufgrund dieser Größe kann angenommen werden, dass das hPYY in der Lage ist, nicht nur intrazelluläre, sondern auch parazelluläre Wege zu nehmen. Eine weitere Überlegung ist, dass das nicht verpackte hPYY den Zellen sofort zur Verfügung steht und dadurch schneller auf die basolaterale Seite im Transwell® System gebracht werden kann. Allerdings ist es wichtig, das Peptid hPYY zum Schutz vor den Verdauungsenzymen in das Polysaccharid zu verpacken.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Sättigungshormon, in freier sowie in verpackter Form, nach der Transzytose durch die Epithelschicht in intakter Form mithilfe des ELISA-Prinzips detektiert werden kann.

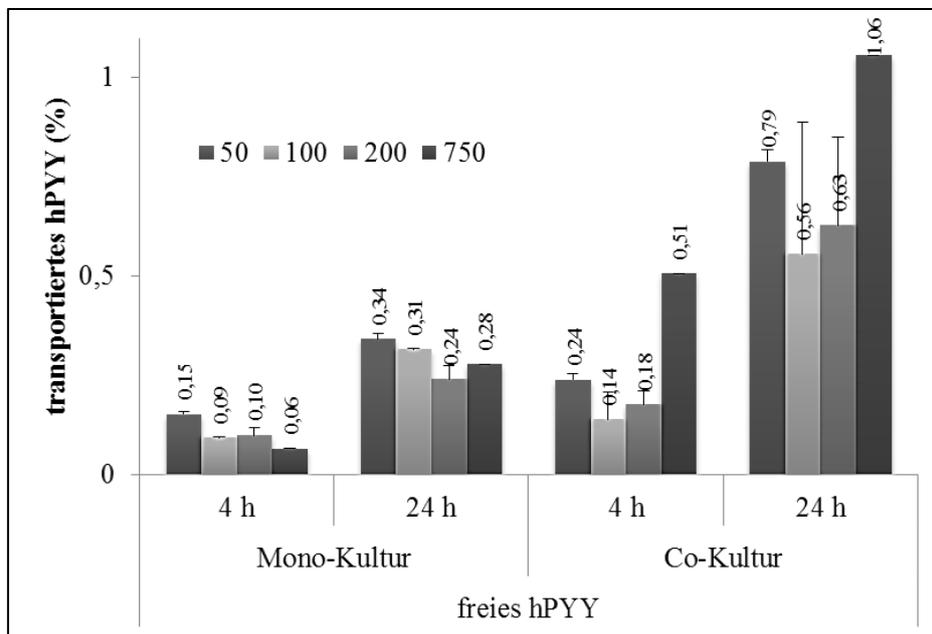


Abbildung 59: Transport des freien hPYY im Transwell® System nach 4 h und 24 h in Bezug auf unterschiedliche Konzentrationen. Die Kultivierung der Caco-2 Zellen erfolgte über 14 Tage mit anschließender Inkubation mit EMEM als Mono-Kultur oder den Raji-Zellen als Co-Kultur im Transwell® System. Die Legende im Diagramm gibt die Konzentration des apikal zugegebenen freien hPYY in ng/ml an. Die verwendete Konzentration der Donorlösung wurde zur Referenz als 100% gesetzt.

### 3.5.2.2 Effekt des WGA auf die Transzytose des hPYY in GChPYY NP im Transwell® System

Der Einfluss des Lektins WGA wurde bereits in Fall der GC NP und der GChPYY NP untersucht. In den Experimenten erfolgte die Bestimmung der Transportrate aufgrund des vom Chitosan kommenden Signals. Hier wurde die Transzytose des hPYY, das in GC verpackt wurde, mittels ELISA gemessen. Interessanterweise wurde in diesem Test ein teilweise 2-facher Abfall des Transports durch die Epithelzellen festgestellt (Abbildung 60). Im Vergleich dazu wurde bei den GChPYY NP Proben eine Abnahme der Transportrate um etwa 15% detektiert (Abbildung 51). Die Resultate aus diesen beiden Experimenten korrelieren miteinander und verdeutlichen, dass das hPYY in Abhängigkeit von dem Chitosan als Hülle transportiert wird. In Fall der GC NP, die kein hPYY enthielten, konnte eine etwa 30%ige Zunahme des Transports registriert werden (Abbildung 47). Dieser Unterschied könnte aufgrund der Präparationsmethoden der Nanopartikel entstanden sein. Da alle hPYY-haltigen Proben, PGA als Zusatz enthalten, führte es zu dem unterschiedlichen Transportverhalten in Gegenwart von WGA. Infolge der negativen Ladung von PGA [213] kann diese vermutlich an die positiv-geladene Oberfläche des WGA [103] binden und dadurch eine Interaktion zwischen den NP und der Zelloberfläche verändern.

Die GChPYY NP bekommen auf diese Weise eine weniger positiv-geladene Hülle und zeigen dadurch andere Eigenschaften als die GC NP. Dieser Effekt führt demzufolge wie im Fall der GChPYY NP auch bei dem hPYY zu einer Reduzierung der Transzytose.

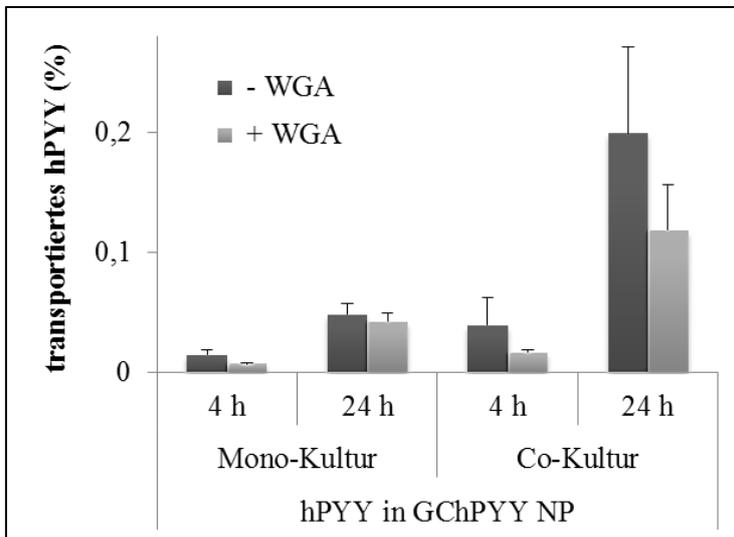


Abbildung 60: Einfluss des Lektins WGA auf die Transzytose des hPYY, das in verpackter Form als GChPYY NP vorliegt. Die Caco-2 Zellen wurden nach 14 Tagen Wachstum im Transwell® System 3 Tage als Mono-Kultur mit EMEM oder als Co-Kultur mit Raji-Zellen gehalten. Die GChPYY NP wurden im Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 150 µg/ml mit oder ohne 15 µg/ml WGA gelöst und apikal zugegeben. Die Konzentration des hPYY in GChPYY NP betrug 750 ng/ml. Zur Berechnung der Transportrate wurde die Konzentration der NP Donorlösung als 100% eingesetzt.

### 3.5.3 Untersuchung der Endozytose des freien und des verpackten rPYY

Zum Vergleich des Aufnahmeverhaltens des PYY zwischen frei liegender und verpackter Form wurde eine Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. In diesem Experiment sollte geklärt werden, welchen Einfluss das Polymer Glycolchitosan bzw. die Verkapselung auf das Peptid ausüben. Dafür wurden 3 Proben miteinander verglichen: rPYY in GCrPYY NP, rPYY gemischt mit GC NP und freies rPYY, wobei das rPYY mit FITC markiert wurde. Bei allen Proben wurde mit steigender Inkubationszeit ein klarer Anstieg der Aufnahmewerte verzeichnet (Abbildung 61). Damit ist es ersichtlich, dass die Caco-2 Zellen in der Lage sind über einen längeren Zeitraum das eingekapselte und freie PYY aufzunehmen.

Im Vergleich zu der Analyse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, bei der nur eine qualitative Aussage gemacht werden kann, ermittelt die Durchflusszytometrie die quantitativen Ergebnisse. Im Fall der Mikroskopiebilder wurde zwar festgestellt, dass bereits nach 2 h Inkubation das Peptid internalisiert ist, aber es ergab keinen klaren Unterschied zu den Aufnahmen nach 24 h Inkubation (Abbildung 57).

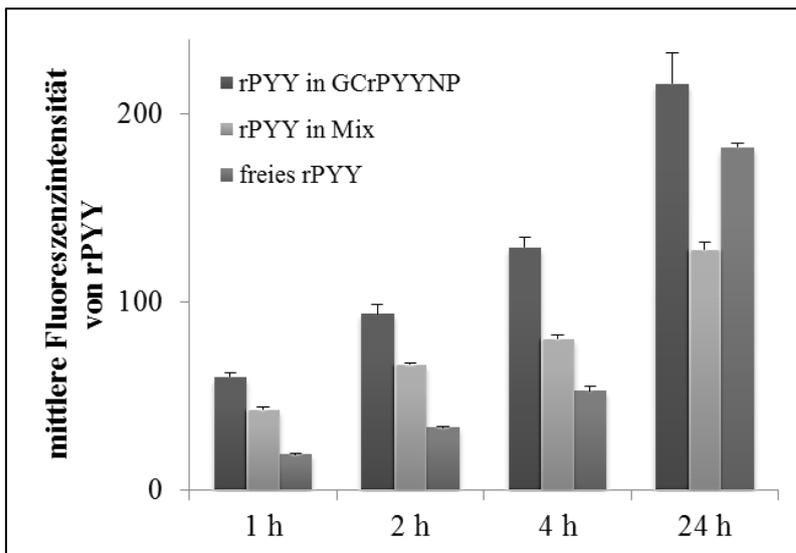


Abbildung 61: Aufnahme des gebundenen rPYY in Form von GCrPYY NP und des freien rPYY in die Caco-2 Zellen. Die eingesetzte Konzentration des rPYY in allen Proben lag bei 12  $\mu\text{g/ml}$ . Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte mithilfe des Durchflusszytometers nach 1 h, 2 h, 4 h oder 24 h Inkubationszeit.

Weiterhin wurde festgestellt, dass das in GCrPYY NP verpackte Peptid nach 1 h, 2 h oder 4 h Inkubation um das 3-fache besser aufgenommen werden kann, als das freie rPYY (Abbildung 61). Bei der Probe rPYY und GC NP Mix lag der Endozytosewert zwischen den beiden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass das eingekapselte rPYY offensichtlich mit viel höherer Effizienz in die Zellen aufgenommen werden kann, als das frei vorliegende Peptid. Vermutlich üben dabei die Eigenschaften des Chitosans, wie die Mukoadhäsion sowie die schützende Hülle einen positiven Effekt auf die Adsorption und den Endozytoseprozess aus. Dieses Experiment verdeutlicht die Vorteile des Glycolchitosans als ein effizientes Trägersystem für die Weiterentwicklung eines PYY-haltigen Medikaments.

### 3.5.4 Freisetzung des eingekapselten hPYY aus den GChPYY NP

Um ein besseres Verständnis über die Freisetzung des hPYY aus den GChPYY NP zu bekommen, wurden die NP im Medium über 4 h inkubiert, anschließend alle 20 min abzentrifugiert, um die NP von dem Peptid zu trennen, und mittels ELISA Methode detektiert. Dabei wurde festgestellt, dass sich kein signifikanter Unterschied in diesen 4 h bei der Freisetzung erkennen lässt. Bei der Gesamtprobe und bei dem Überstand ließen sich etwa die gleichen Werte messen. Dabei blieb über 4 h Inkubation die freigesetzte Menge an hPYY bei 1500 pg/ml (Abbildung 62 A), was dem prozentualen Anteil von etwa 40% (Abbildung 62 B) entspricht. Obwohl dieses Ergebnis zeigt, dass das hPYY bereits in den ersten 4 h zu 40% in freier Form vorliegt, haben bis jetzt alle Experimente gezeigt, dass die Verkapselung des Peptids einen positiven Effekt auf die Aufnahme ausübt. (Abbildung 61). Vermutlich spielt bei der Transzytose das frei vorliegende Peptid eine Rolle, da bei diesem eine höhere Transportrate ermittelt wurde. Allerdings aufgrund

der niedrigen pH-Werte im Magenbereich ist es von großer Bedeutung, dass das Peptid in geschützter Form vorliegt.

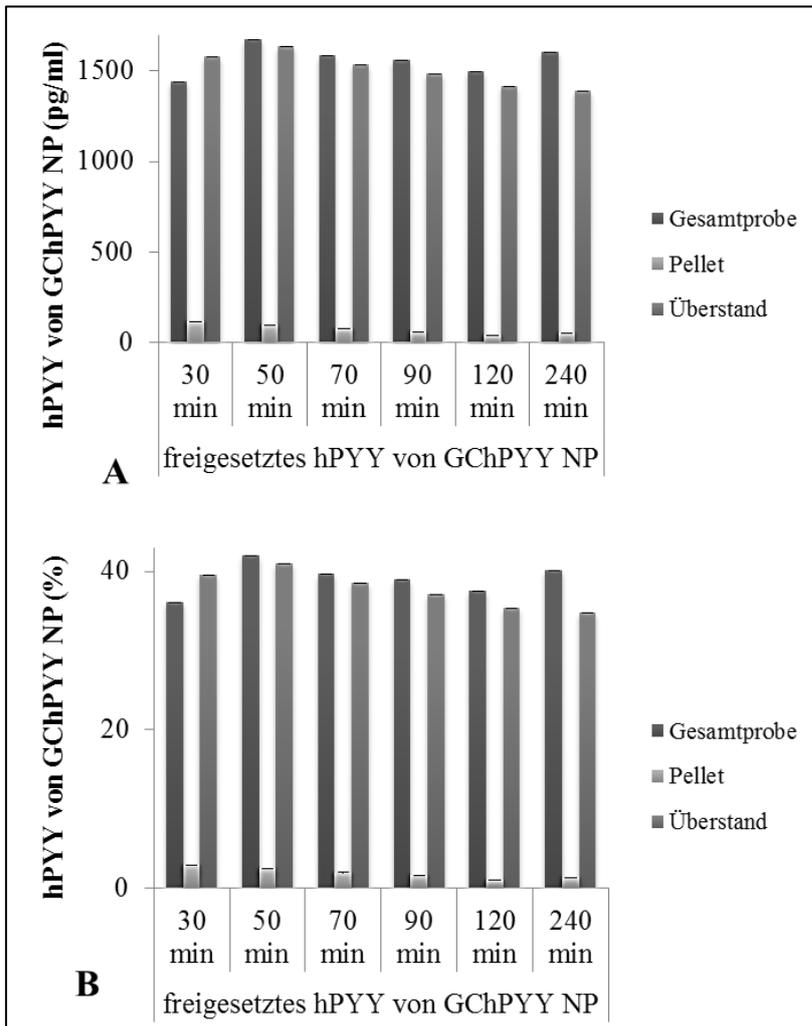


Abbildung 62: Freisetzung des hPYY aus den GChPYY NP. Die eingesetzte Konzentration des hPYY betrug 4 ng/ml hPYY in 0,8 µg/ml GChPYY NP. Die NP wurden im Wachstumsmedium bei Raumtemperatur inkubiert und nach jeweiligem Zeitpunkt abzentrifugiert. Zur Berechnung des Anteils an freigesetztem hPYY wurde die Konzentration der Donorlösung als 100% gesetzt.

Zur weiteren Analyse wurden die nach den Transzytoseversuchen entnommenen Proben nach 24 h, nach dem Auftauen nach 24 h und nach 5 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur erneut mittels ELISA gemessen. Alle Proben stammten aus der basolateralen Kammer im Transwell® System. Dabei wurde ersichtlich, dass der prozentuale Anteil an hPYY in der jeweiligen Probe, Mono- oder Co-Kultur, zu allen Zeitpunkten der Messung gleich blieb. Im Fall der GChPYY NP in Mono-Kultur lag der Wert bei 0,05% und in Co-Kultur bei 0,15%. Wie erwartet, lag für das freie hPYY nach den Transportexperimenten der PYY-Wert etwa 4,5-fach in Mono-Kultur und 3,5-fach in Co-Kultur höher im Vergleich zu den GChPYY NP Proben (Abbildung 63). In diesem Experiment konnte zwar nicht ein Zeit-abhängiges Freisetzungsverhalten gezeigt werden, aber es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass sogar nach 5 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur das Peptid in der intakten Form vorliegt. Eine weitere positive Beobachtung

war ebenfalls, dass sich bei den gleichen Proben nach unterschiedlichen Messzeiten keine Unterschiede in Bezug auf die Standardabweichung gezeigt haben. Somit wird es deutlich, dass das Messprinzip ELISA eine zuverlässige Methode zur Detektion der kleinsten Mengen an hPYY ist und eine ausreichende Menge an hPYY transportiert werden kann.

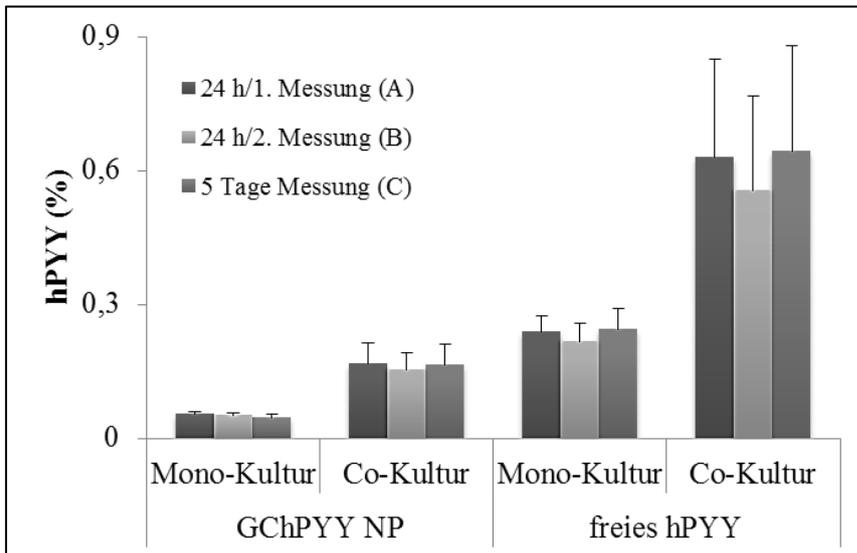


Abbildung 63: Vergleich der freigesetzten hPYY Menge nach Transzytose im Transwell® System (A) direkt nach 24 h Transzytose, (B) nach 24 h nach dem Auftauen der Proben und (C) nach 5 Tagen bei Raumtemperatur. Die ursprünglich verwendete Konzentration lag bei 40 µg/ml GChPYY NP mit 200 ng/ml hPYY. Nach den Transzytoseversuchen wurden die Proben im Wachstumsmedium bei Raumtemperatur inkubiert und nach jeweiligem Zeitpunkt abzentrifugiert. Zur Berechnung des Anteils an freigesetztem hPYY wurde die Konzentration der Donorlösung als 100% gesetzt.

### 3.5.5 Transport des eingekapselten hPYY in GChPYY NPs und des freien hPYY durch Duodenungewebe im Ussing-Chamber System

Eine weitere Untersuchung des hPYY in Bezug auf das Transzytoseverhalten erfolgte im Ussing-Chamber System durch das *ex vivo* Duodenungewebe. Für dieses Experiment wurden das eingekapselte hPYY als GChPYY NP und das freie hPYY verwendet. Das freie hPYY diente wie in vorherigen Experimenten zur Kontrolle. Dafür wurden 3 unterschiedliche Konzentrationen auf der mukosalen Seite eingesetzt und nach 4 h von der serosalen Seite entnommen. Die Detektion der transportierten Menge an hPYY erfolgte mithilfe der ELISA Methode.

Die Resultate zeigten, dass je nach verwendeter Konzentration das Peptid in beiden Formen durch das Dünndarmgewebe befördert werden kann. Interessanterweise wurden bei einer höheren Konzentration von 3000 ng/ml etwa 90 pg/ml hPYY transportiert und somit mehr, als nach der Zugabe von 750 ng/ml, bei der nur 30 pg/ml durch das Gewebe gegangen ist (Abbildung 64 A). Im Vergleich dazu wurde eine etwa 3,7-fach höhere Menge des frei vorliegenden hPYY bei 750 ng/ml bzw. eine 1,8-fach höhere Menge bei 3000 ng/ml transportiert. Somit ist es ersichtlich, dass bei höheren eingesetzten Mengen an PYY die transportierte Menge höher ist, jedoch ein niedrigerer prozentualer Anteil bezüglich der Transportrate vorliegt.

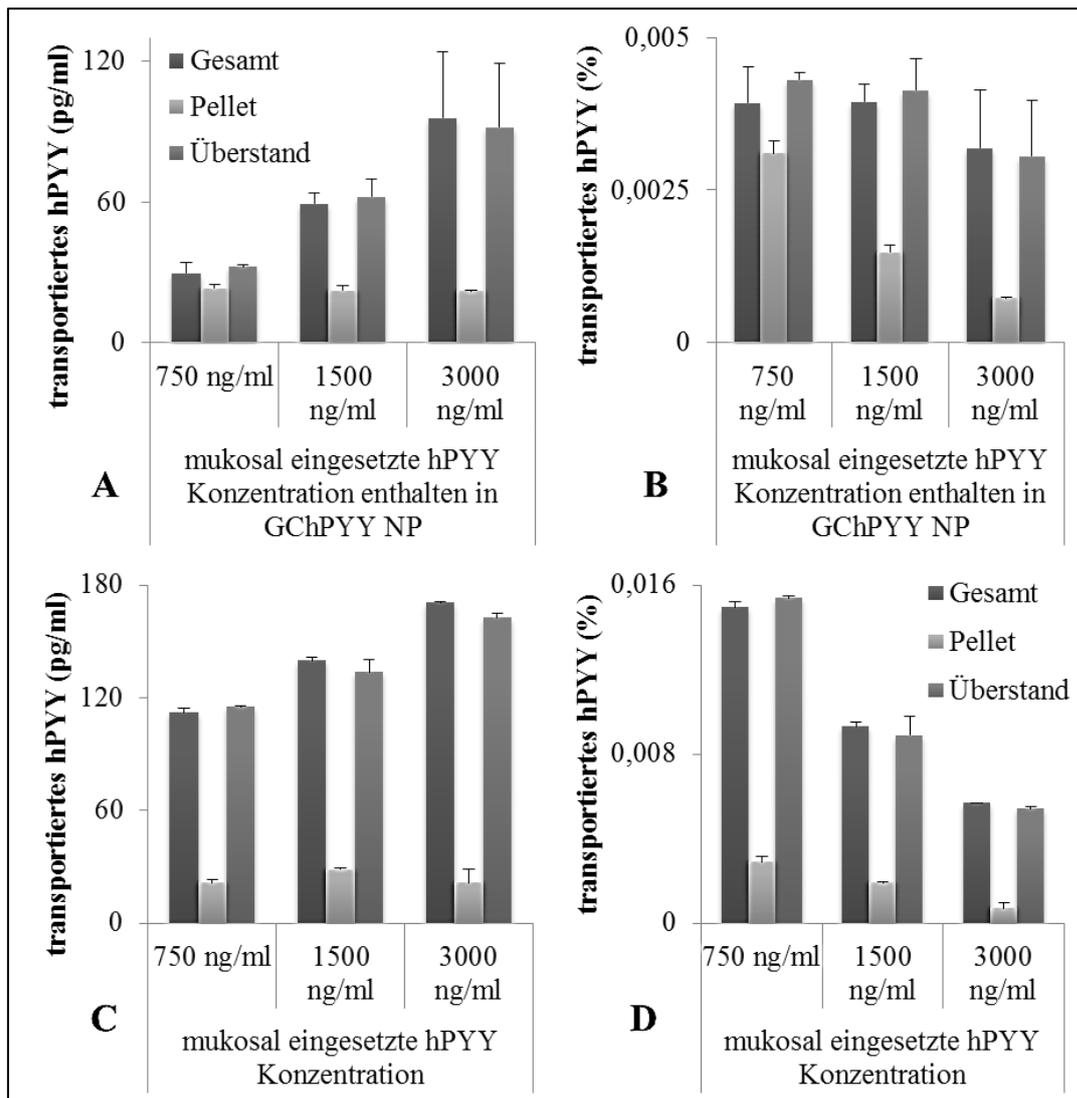


Abbildung 64: Transport des in das Glycolchitosan eingekapselten hPYY (A und B) und des freien hPYY (C und D) durch den Schweinedarm im Ussing-Chamber System nach 4 h. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf das hPYY in den GC NP oder frei in der Lösung, das mukosal zugegeben wurde. Nach 4 h Inkubationszeit wurden die entnommenen Proben gesammelt und 20 min bei 40000 g abzentrifugiert, um das freigesetzte hPYY im Überstand zu messen. Das Pellet wurde im gleichen Probenvolumen resuspendiert. Die Detektion des hPYY erfolgte mithilfe des ELISA-Tests.

Im Weiteren wurde festgestellt, dass die Transportrate des eingekapselten hPYY durch das Duodenumgewebe etwa 20-mal und des freien hPYY 30-mal niedriger ist, als durch die Caco-2 Zellschicht im Transwell® System. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann der Ort der Synthese und der Sekretion des nativen hPYY sein. Das Sättigungshormon wird in L-Zellen des distalen Ileums und im Colon in die Blutbahn freigesetzt [224]. Das in diesem Experiment verwendete Gewebe stammt aus dem Duodenum und somit dem proximalen Teil des Dünndarms. Ein weiterer Grund dafür kann die Gegenwart der Mukusschicht auf der Oberfläche des intestinalen Epithels aus dem Schwein aufgrund seines nativen Ursprungs sein. Die Viskosität des Mukus hat die Aufgabe die pathogenen Mikroorganismen sicher abzufangen [210, 212] sowie auch die Nanopartikel bzw. Peptide.



In diesem Experiment konnte bis zu 90 pg/ml hPYY in verpackter Form durch die Fläche von 1 cm<sup>2</sup> transportiert werden, demzufolge, bezogen auf die Gesamtfläche des Dünndarms, sind die Enterozyten in der Lage eine ausreichende Menge an dem Sättigungshormon zu transportieren. Beide Methoden, Ussing-Chamber System sowie das Transwell® System, zeigen positive Ergebnisse hinsichtlich der hPYY-Transzytose und sind somit gut geeignet zur Analyse der Transportraten. Hier konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, das Sättigungshormon in Form von NP durch das intestinale Gewebe in die Richtung der Blutseite erfolgreich zu transportieren.

### 3.5.6 Vergleich der Detektionsmethoden für hPYY und rPYY

Im weiteren Schritt wurden die unterschiedlichen Methoden in Bezug auf rPYY- und hPYY-Detektion miteinander verglichen. Aufgrund der gegenseitigen Signalauslöschung der Fluoreszenzfarbstoffe FITC (für rPYY) und RBITC (für GC), war es nicht möglich, diese zusammen in eine Probe zu bringen. Für die Untersuchung der Endozytose mittels Durchflusszytometrie und der Internalisation unter Verwendung von Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde das mit FITC fluoreszenz-markierte Peptid, rPYY-FITC, benötigt. Im Fall des hPYY, das mithilfe des ELISA Kits gemessen wurde, fand keine Markierung statt. Hinsichtlich dieser Bedingungen liegt bei der GChPYY NP Probe nur das GC mit Fluoreszenz markiert vor und bei der GCrPYY NP Probe zeigt nur das rPYY eine Markierung.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass bei der ELISA Methode die Menge an transportiertem hPYY in GChPYY NP signifikant niedriger ist, als in den Proben, in welchen freies hPYY (Mix hPYY+GC NP oder freies hPYY) eingesetzt wurde (Abbildung 65 A). Im Fall der fluorimetrischen Methode wurde bei allen Proben etwa die gleiche Menge an transportierten rPYY festgestellt (Abbildung 65 B). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass das in GChPYY NP verpackte hPYY teilweise an dem Chitosan haftet und demzufolge nicht von dem Antigen-Antikörper System erkannt werden kann bzw. es kann keine spezifische Bindung mit den Komponenten des ELISA Kits eingehen. Ein weiterer Unterschied wurde bezüglich der Transportrate festgestellt. Im Allgemeinen ließ sich anhand der Fluoreszenzmethode eine mit 1% - 2% höhere Transzytose des rPYY detektieren, während bei dem ELISA Prinzip, bei dem eine kolorimetrische Bestimmung stattfindet, die Transportwerte für hPYY in GChPYY NP unter 0,5% geblieben sind. Es ist bekannt, dass die ELISA Methode ein sehr sensitives System zur Messung im Pikogramm-Bereich, zwischen 6,5-1800 pg/ml, darstellt, während das Fluoreszenzsignal vom rPYY am Plate Reader detektiert wird. Wahrscheinlich wird dabei auch der vom rPYY frei liegende FITC-Farbstoff mitbestimmt.

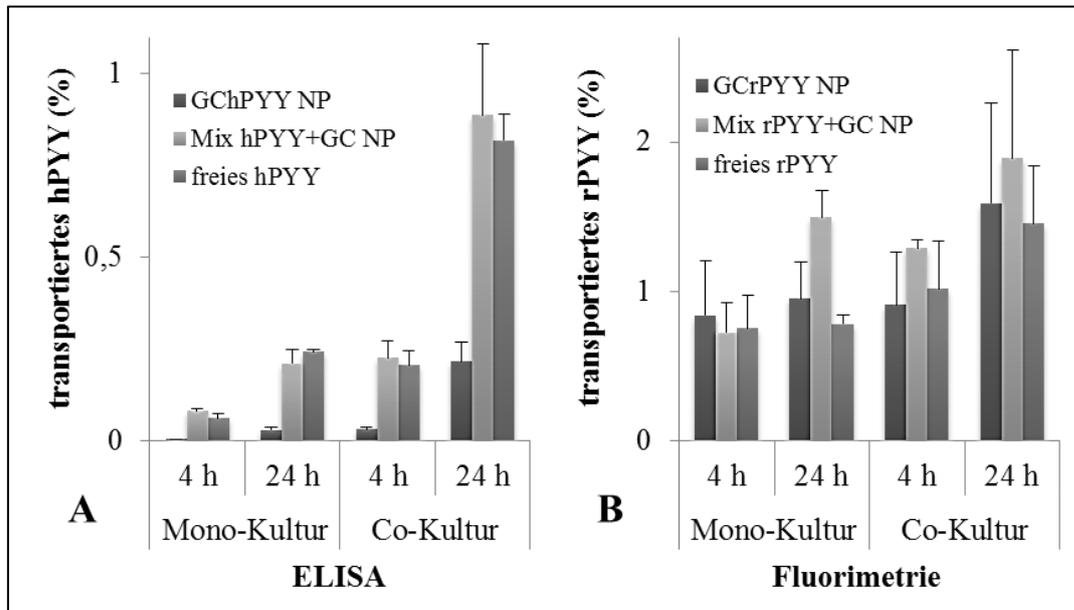


Abbildung 65: Vergleich der Detektionsmethoden nach der Transzytose der PYY-haltigen GC NP (A) mittels ELISA Kit anhand der Antigen-Antikörper Bindung und (B) mittels Fluorimetrie anhand des Fluoreszenzsignals. Die Untersuchung wurde im Transwell® System nach 4 h oder 24 h Inkubationszeit durchgeführt. Die NP wurden im Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 375 ng/ml PYY enthalten in 75 µg/ml NP gelöst und apikal zugegeben. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Proben von der basolateralen Seite. Zur Berechnung der Transportrate wurde die Konzentration der Donorlösung als 100% gesetzt.

Im weiteren Schritt wurde die Menge an Peptid in der apikalen Kammer des Transwell® Systems nach 4 h oder 24 h Inkubation analysiert. Die apikale Kammer ist die Seite an welcher die Zugabe der Proben stattfindet. Die Resultate haben gezeigt, dass analog zu den Transzytoseergebnissen (Abbildung 65 A), die Menge an detektiertem hPYY in der GChPYY NP Probe etwa 4-fach niedriger, als in der Probe Mix hPYY+GC NP oder der Probe mit freiem hPYY, war (Abbildung 66 A). Wahrscheinlich unterstützt das Polymer Chitosan die Adhäsion des hPYY an die Zelloberfläche, was zur Reduzierung des frei liegenden hPYY in GChPYY NP Proben führt und dadurch nicht im ELISA System detektiert werden kann. Ein weiterer Unterschied zwischen den Methoden lag im insgesamt gemessenen prozentualen Anteil des PYY auf der apikalen Seite. Im Fall der ELISA Detektion konnten 7% bei GChPYY NP oder 33% nach 4 h sowie 27% nach 24 h Inkubation wieder gefunden werden (Abbildung 66 A). Bei der Fluoreszenzmessung des rPYY wurden 45% bei GCrPYY NP oder 100% nach 4 h sowie nach 24 h Inkubation wieder gefunden werden (Abbildung 66 B). Somit wurde ersichtlich, dass anhand des Fluoreszenzsignals insgesamt mehr PYY detektiert wird. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich, dass FITC ein stabileres Molekül als PYY ist und eine höhere Resistenz bei der Synthese der NP besitzt. Interessanterweise ließ sich bei der ELISA Methode ein Unterschied zwischen der Menge an hPYY nach 4 h mit 33% und nach 24 h mit 27% erkennen. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass nach 24 h eine Abnahme des PYY im apikalen Bereich stattfindet (Abbildung 66 A).

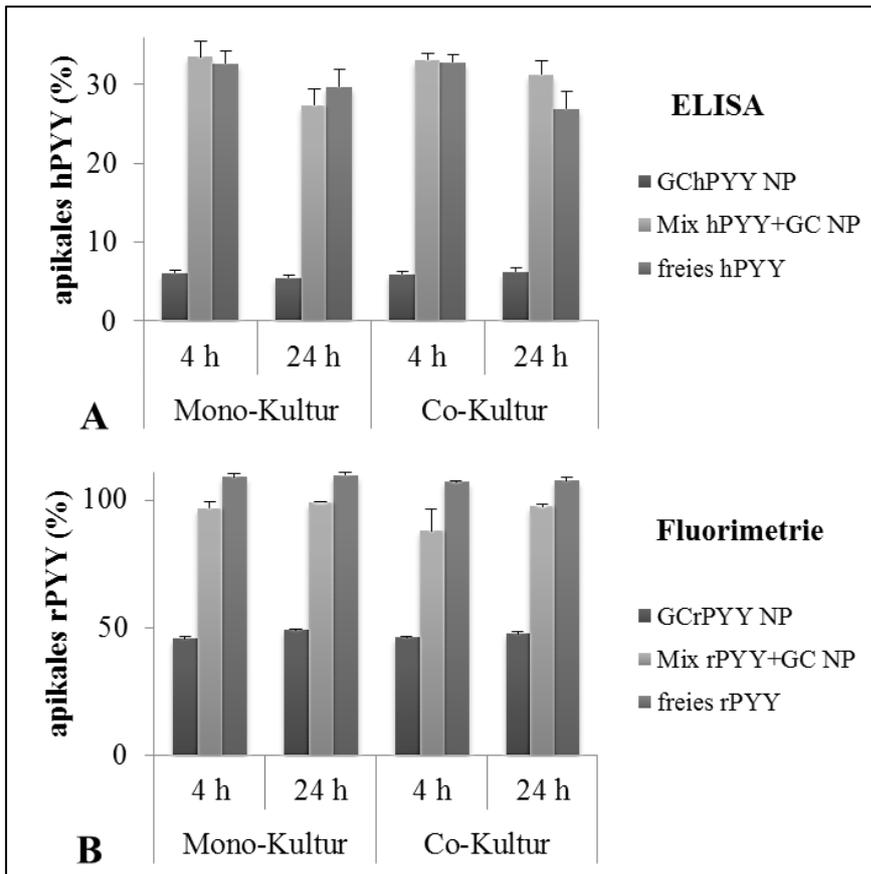


Abbildung 66: Vergleich der Detektionsmethoden der Proben von der apikalen Seite nach der Transzytose der PYY-haltigen GC NP (A) mittels ELISA Kit anhand der Antigen-Antikörper Bindung und (B) mittels Fluorimetrie anhand des Fluoreszenzsignals. Die Untersuchung wurde im Transwell® System nach 4 h oder 24 h Inkubationszeit durchgeführt. Die NP wurden im Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 375 ng/ml PYY enthalten in 75 µg/ml NP gelöst und apikal zugegeben. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Proben von der apikalen Seite. Zur Berechnung der Transportrate wurde die Konzentration der Donorlösung als 100% gesetzt.

Im Anschluss an die Transzytoseversuche wurden die Zellen von der PC-Membran abgelöst, die Zahl bestimmt und lysiert, um das Sättigungshormon frei zu setzen. Insgesamt wurde in Bezug auf die unterschiedlichen Messtechniken ein signifikanter Unterschied in der aufgenommenen Menge an PYY pro Zelle festgestellt (Abbildung 67). Dabei blieb der detektierte PYY-Gehalt pro Zelle bei allen Proben, GCPYY NP, Mix PYY+GC NP sowie freies PYY, in Bezug auf die jeweilige Methode, gleich.

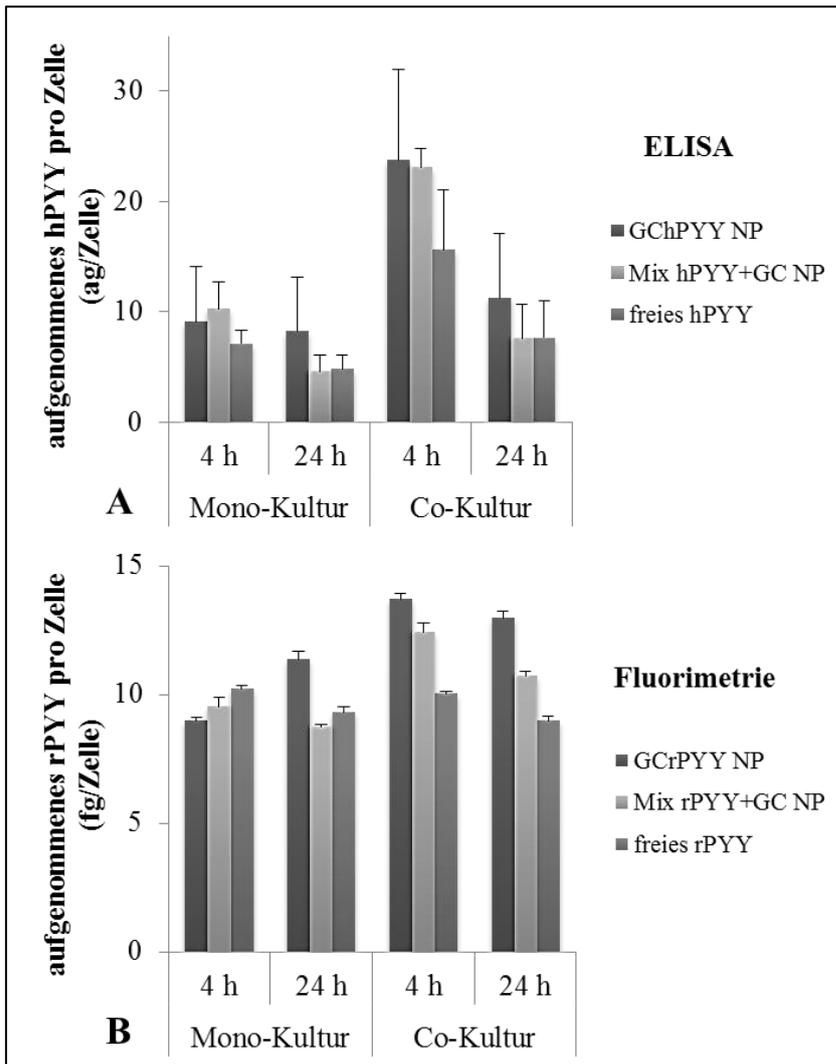


Abbildung 67: Vergleich der Detektionsmethoden des intrazellulär aufgenommenen PYY nach der Transzytose der PYY-haltigen GC NP (A) mittels ELISA Kit anhand der Antigen-Antikörper Bindung und (B) mittels Fluorimetrie anhand des Fluoreszenzsignals. Die Untersuchung wurde im Transwell® System nach 4 h oder 24 h Inkubationszeit durchgeführt. Die NP wurden im Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 375 ng/ml PYY enthalten in 75 µg/ml NP gelöst und apikal zugegeben. Die Ergebnisse beziehen sich auf die von der PC-Membran abgelösten Zellen. Zur Berechnung der Transportrate wurde die Konzentration der Donorlösung als 100% gesetzt.

Ein Augenmerk wird auf die Probe der Co-Kultur nach 4 h Inkubationszeit gelegt. Hier wurde mit 25 ag/Zelle die höchste Menge an hPYY im Vergleich zu 10 ag/Zelle in Mono-Kultur mittels ELISA Kit registriert (Abbildung 67 A). Dies gibt einen Hinweis, dass die Caco-2 Zellen in der Co-Kultur im Transwell® System tatsächlich die Eigenschaften der transzytotisch aktiveren M-Zellen aufweisen und somit für eine höhere Transzytoserate der NP oder des Peptids PYY verantwortlich sind.

## 4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte ein PYY-haltiger Wirkstoff zur Behandlung der Adipositas auf dem oralen Weg erforscht werden. Die Fähigkeit der Zellen Substanzen aufzunehmen und diese anschließend auf der basalen Membranseite herauszuschleußen, ist eine Grundlage für den Transport der therapeutisch relevanten Partikel aus dem Darmlumen über die intestinalen Zellen in den Blutkreislauf. Zur Nachahmung der gastrointestinalen Barriere wurden zwei Untersuchungsmethoden etabliert: das Transwell® System und das Ussing-Chamber System. Die Caco-2 Zellen wurden in einem *in vitro* Transwell® System kultiviert, während das *ex vivo* Ussing-Chamber System zur Prüfung der Transzytosekapazität der Partikel durch ein Schweinedarmgewebe aufgebaut und zum Vergleich der Modelle herangezogen wurde.

Die Ergebnisse gaben einen deutlichen Hinweis, dass hinsichtlich des apparenten Permeabilitätskoeffizientes (Papp) die Caco-2 Zellschicht in den Transwell® Inserts mit 12-Well PC - Membran ohne Matrigel-Beschichtung die höchste Dichteigenschaft aufweist und somit für die weiteren Versuche am besten geeignet war. Um *in vivo* Bedingungen besser zu simulieren, wurde das System durch die Co-Kultur mit einer weiteren Zelllinie, den Raji Zellen, ergänzt. Die Zugabe dieser lymphozytären Zelllinie auf die basolaterale Seite ermöglichte die Differenzierung der Caco-2 Zellen zu M-Zellen, die auf die Partikelaufnahme spezialisiert sind. In der Co-Kultur konnte eine Steigerung der Transzytoserate im Vergleich zur Mono-Kultur festgestellt werden.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass die carboxyl-Polystyrol NP vielfach besser als die amino-PS NP durch das Transwell® System sowie das Ussing-Chamber System transportiert werden konnten. Diese Feststellung zeigt, wie wichtig die Rolle der funktionellen Gruppen bei der Aufnahme und Transzytose der Nanopartikel durch die Epithelzellschicht ist. Die Glycolchitosan NP zeigten eine bis zu 3% verbesserte Transzytoserate durch die epitheliale Zellschicht im Transwell® System.

Die Anwesenheit von FBS führte zu einem Anstieg der Transzytoserate der Chitosan- und Polystyrol- Partikel, was vermutlich auf die Wirkung des Proteins Albumin, sowie von Vitamin A, welche in FBS vorhanden sind, zurückzuführen war.

Die Oberflächenfunktionalisierung der Glycolchitosan NP mithilfe von Vitamin B12 in Kombination mit intrinsischem Faktor zeigte im Transwell® System positive Resultate hinsichtlich des Transportes durch die Caco-2 Zellen. Hierbei konnte ein deutlicher Anstieg der Transzytoserate durch die Anwesenheit von Vitamin B12 detektiert werden. Aufgrund der Expression des Rezeptors für Vitamin B12 in den intestinalen Zellen und der festgestellten Ergebnisse veranschaulichen die Experimente, dass das Vitamin B12 zur Erhöhung der Effizienz bei der oralen Verabreichung der Wirkstoffe beitragen kann.

Hohe Konzentrationen an Glycolchitosan Partikel wirkten nicht toxisch auf die Caco-2 Zellen, wobei diese ebenfalls metabolisch aktiv blieben. Im Fall der Polystyrol NP konnte nur bei den

carboxylierten Proben eine hohe Zellviabilität detektiert werden. Die amino-funktionalisierten PS NP bewirkten zytotoxische Effekte ab einer Konzentration von 600 µg/ml. Diese Feststellung zeigt einen direkten toxischen Effekt der amino-PS NP auf die Caco-2 Zellen.

Die elektronenmikroskopische Bildgebung zeigte, dass die negativ-geladenen PS-COOH NP besser als die amino-PS NP in die Zellen internalisiert werden konnten, obwohl erstere ein weniger ausgeprägtes Adhäsionsverhalten aufwiesen. Beim Vergleich der Mono- und Co-Kulturen konnte kein qualitativer Unterschied festgestellt werden. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass die Polystyrol Partikel grundsätzlich in der Lage sind von den Epithelzellen aufgenommen zu werden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Caco-2 Zellen in der Lage waren bereits nach 30 min die GC NP aufzunehmen und somit schon in sehr kurzer Zeit dem Körper zur Verfügung stehen können. Da die Caco-2-Zellen ein wichtiger Standard für die intestinale Aufnahme von NP sind, zeigte dieses Experiment, dass Chitosan in Form von NP mit hoher Effizienz internalisiert werden kann. Aus diesem Grund eignet sich dieses sehr gut als Wirkstoffträgersystem.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Wirkstoffträgersystem für das humane Sättigungshormon PYY entwickelt und auf das Aufnahme- und Transzytoseverhalten hin untersucht werden, da dieser Wirkstoff bei der Therapie gegen Adipositas auf dem oralen Weg eingesetzt werden soll. Dafür wurde das PYY in Glycolchitosan verpackt und auf die intrazelluläre Aufnahme mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Hierbei wurde beobachtet, dass das Hormon PYY sowohl in freier als auch in verpackter Form erfolgreich internalisiert werden konnte. Der Vergleich zwischen dem freien rPYY und dem in Chitosan eingekapselten rPYY in Form von GCrPYY NP sollte Hinweise auf das Endozytoseverhalten geben. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie verdeutlichten, dass die Verpackung des Peptides in das Glycolchitosan einen positiven Effekt auf die intrazelluläre Aufnahme ausübte. Dadurch konnten die Vorteile des Glycolchitosans als geeignetes Polymer zum Schutz des Peptides demonstriert werden.

Mithilfe immunologischer Methoden konnte die Menge an PYY nach der Transzytose im Piko-gramm-Bereich detektiert werden. Die Ergebnisse im Transwell® System hatten gezeigt, dass bei Verwendung von 200 ng/ml hPYY in Form von GChPYY NP etwa 40 pg/ml in Monokultur und 70 pg/ml in Co-Kultur des hPYY durch eine Fläche von 1 cm<sup>2</sup> transportiert werden konnten. Im Fall des Ussing-Chamber Systems wurden bei eingesetzten 3000 ng/ml des in Chitosan eingekapselten hPYY etwa 90 pg/ml detektiert. Im Normalfall beträgt die Adsorptionsfläche der Mukosa im Dünndarm etwa 32 m<sup>2</sup>, wobei hPYY im Blutplasma in der Konzentration von 40 pg/ml vorliegt. Bei der Annahme, dass der menschliche Körper etwa 5 l Blut enthält, würde eine Fläche von 0,5 m<sup>2</sup> ausreichen, um die in der Literatur angegebene Konzentration von 40 pg/ml hPYY zu erreichen. Dies macht deutlich, dass diese Menge ausreichend ist, um eine Wirkung im menschlichen Organismus zu entfalten und zur Behandlung der Adipositas beizutragen.

Zusammengefasst waren beide Modelle, *ex vivo* entnommenes Duodenumgewebe für Ussing-Chamber System und die *in vitro* kultivierten Caco-2 Zellen im Transwell® System, zur Untersuchung der Transzytoserate der Nanopartikel sowie der Peptide geeignet. Es kann jedoch ein Nachteil der Caco-2 Zellschicht im Transwell® System erwähnt werden. Hier kann für die Versuche nur in dem pH-Bereich von 7,0-7,4 gearbeitet werden, da sonst die Zellen absterben würden.

Design und Formulierung der Peptid-basierten Wirkstoffe zur oralen Verabreichung gegen Adipositas benötigen noch weitere experimentelle Studien. Die Dosisabhängigkeit sowie Dauer der Verabreichung zur Entwicklung der optimalen Wirkung kann im Weiteren durch *in vivo* Experimente untersucht werden. Die systemische Verteilung sowie Lokalisation des Wirkstoffes im Körper sind ebenso wichtige Parameter, die bei der Entwicklung eines Medikamentes in Betracht gezogen werden müssen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Herrero, E.P., M.J. Alonso, and N. Csaba, *Polymer-based oral peptide nanomedicines*. Therapeutic delivery, 2012. **3**(5): p. 657-668.
2. Walsh, G., *Biopharmaceutical benchmarks*. Nature biotechnology, 2000. **18**(8): p. 831-833.
3. Johnson-Léger, C., et al., *Protein therapeutics—lessons learned and a view of the future*. Expert opinion on biological therapy, 2006. **6**(1): p. 1-7.
4. Reid, R., *Peptide and protein drug analysis*. 1999: CRC Press.
5. Shaji, J. and V. Patole, *Protein and peptide drug delivery: oral approaches*. Indian journal of pharmaceutical sciences, 2008.
6. Rubio-Aliaga, I. and H. Daniel, *Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition*. Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 1022-1042.
7. Lodish, H., et al., *Molecular Cell Biology: An Integrated View of Cells at Work*. 2000.
8. Adessi, C. and C. Soto, *Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability*. Current medicinal chemistry, 2002. **9**(9): p. 963-978.
9. Tuncer Degim, I. and N. Çelebi, *Controlled delivery of peptides and proteins*. Current pharmaceutical design, 2007. **13**(1): p. 99-117.
10. Bernkop-Schnurch, A. and G. Walker, *Multifunctional matrices for oral peptide delivery*. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2001. **18**(5).
11. Woodley, J.F., *Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery*. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 1993. **11**(2-3): p. 61-95.
12. Lee, V.H., R.D. Traver, and M.E. Taub, *Enzymatic barriers to peptide and protein drug delivery*. 1991: Marcel Dekker, New York.
13. Addison, M.L., et al., *A role for metalloendopeptidases in the breakdown of the gut hormone, PYY3–36*. Endocrinology, 2011. **152**(12): p. 4630-4640.
14. Gallo, R.L. and L.V. Hooper, *Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine*. Nature Reviews Immunology, 2012. **12**(7): p. 503-516.
15. Artursson, P., K. Palm, and K. Luthman, *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport*. Advanced drug delivery reviews, 2001. **46**(1): p. 27-43.
16. Neutra, M.R., N.J. Mantis, and J.-P. Kraehenbuhl, *Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues*. Nature immunology, 2001. **2**(11): p. 1004-1009.
17. Owen, R.L. *Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches—a personal and historical perspective*. in *Seminars in immunology*. 1999. Elsevier.
18. Smith, M.W., *Selective expression of brush border hydrolases by mouse Peyer's patch and jejunal villus enterocytes*. Journal of cellular physiology, 1985. **124**(2): p. 219-225.
19. Kucharzik, T., et al., *Characterization of M cell development during indomethacin-induced ileitis in rats*. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2000. **14**(2): p. 247.
20. Owen, R.L., *Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study*. Gastroenterology, 1977. **72**(3): p. 440-451.



21. Hase, K., et al., *Distinct gene expression profiles characterize cellular phenotypes of follicle-associated epithelium and M cells*. DNA Research, 2005. **12**(2): p. 127-137.
22. Kernéis, S., et al., *Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria*. Science, 1997. **277**(5328): p. 949-952.
23. Masuda, K., A. Kajikawa, and S. Igimi, *Establishment and Evaluation of an in vitro M Cell Model using C2BBel Cells and Raji Cells*. Bioscience and microflora, 2011. **30**(2): p. 37.
24. Azizi, A., et al., *Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells*. PLoS Pathog, 2010. **6**(11): p. e1001147.
25. Hase, K., et al., *Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response*. Nature, 2009. **462**(7270): p. 226-230.
26. Sansonetti, P.J., *War and peace at mucosal surfaces*. Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(12): p. 953-964.
27. Cornes, J., *Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches*. Gut, 1965. **6**(3): p. 225.
28. Kleiveland, C.R., *Co-culture Caco-2/Immune Cells*, in *The Impact of Food Bioactives on Health*. 2015, Springer. p. 197-205.
29. Keita, Å.V., et al., *Characterization of antigen and bacterial transport in the follicle-associated epithelium of human ileum*. Laboratory investigation, 2006. **86**(5): p. 504-516.
30. Cuvelier, C., et al., *M-cells are damaged and increased in number in inflamed human ileal mucosa*. Histopathology, 1994. **24**(5): p. 417-426.
31. Clark, M.A., et al., *Targeting polymerised liposome vaccine carriers to intestinal M cells*. Vaccine, 2001. **20**(1): p. 208-217.
32. EBERT, A., S. BILZ, and S. ACZÉL, *Diabetes und Adipositas*.
33. National Heart, L. and B. Institute, *Managing overweight and obesity in adults: systematic evidence review from the obesity expert panel. 2013*. US Department of Health and Human Services: National Institutes of Health, 2013.
34. Pi-Sunyer, F.X., et al., *Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults*. American Journal of Clinical Nutrition, 1998. **68**(4): p. 899-917.
35. Choquet, H. and D. Meyre, *Genetics of obesity: what have we learned?* Current genomics, 2011. **12**(3): p. 169-179.
36. Loos, R.J., et al., *Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity*. Nature genetics, 2008. **40**(6): p. 768-775.
37. Bäckhed, F., *Programming of host metabolism by the gut microbiota*. Annals of Nutrition and Metabolism, 2011. **58**(Suppl. 2): p. 44-52.
38. Simpson, K., et al., *CCK, PYY and PP: the control of energy balance, in Appetite Control*. 2012, Springer. p. 209-230.
39. Batterham, R.L., et al., *Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake*. Nature, 2002. **418**(6898): p. 650-654.
40. Boey, D., et al., *Low serum PYY is linked to insulin resistance in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes*. Neuropeptides, 2006. **40**(5): p. 317-324.
41. Renshaw, D. and R. Batterham, *Peptide YY: a potential therapy for obesity*. Current drug targets, 2005. **6**(2): p. 171-179.
42. Vila, G., *Ein Hormon stellt sich vor: Peptid Tyrosin-Tyrosin*. Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel-Austrian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2014. **6**(1): p. 46-47.

43. Grandt, D., et al., *Two molecular forms of peptide YY (PYY) are abundant in human blood: characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1–36 and PYY 3–36*. *Regulatory peptides*, 1994. **51**(2): p. 151-159.
44. Adrian, T., et al., *Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY*. *Gastroenterology*, 1985. **89**(5): p. 1070-1077.
45. Essah, P.A., et al., *Effect of macronutrient composition on postprandial peptide YY levels*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007. **92**(10): p. 4052-4055.
46. Grandt, D., et al., *Novel generation of hormone receptor specificity by amino terminal processing of peptide YY*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1992. **186**(3): p. 1299-1306.
47. Browning, K. and R. Travagli, *Modulation of inhibitory neurotransmission in brainstem vagal circuits by NPY and PYY is controlled by cAMP levels*. *Neurogastroenterology & Motility*, 2009. **21**(12): p. 1309-e126.
48. Toth, P.T., et al., *Mechanism of presynaptic inhibition by neuropeptide Y at sympathetic nerve terminals*. *Nature*, 1993. **364**(6438): p. 635-639.
49. Karra, E. and R.L. Batterham, *The role of gut hormones in the regulation of body weight and energy homeostasis*. *Molecular and cellular endocrinology*, 2010. **316**(2): p. 120-128.
50. Sloth, B., et al., *Effects of PYY1–36 and PYY3–36 on appetite, energy intake, energy expenditure, glucose and fat metabolism in obese and lean subjects*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2007. **292**(4): p. E1062-E1068.
51. Shih, P.-a.B., et al., *Peptide YY (PYY) gene polymorphisms in the 3'-untranslated and proximal promoter regions regulate cellular gene expression and PYY secretion and metabolic syndrome traits in vivo*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009. **94**(11): p. 4557-4566.
52. Zac-Varghese, S., A. De Silva, and S.R. Bloom, *Translational studies on PYY as a novel target in obesity*. *Current opinion in pharmacology*, 2011. **11**(6): p. 582-585.
53. Degen, L., et al., *Effect of peptide YY 3–36 on food intake in humans*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(5): p. 1430-1436.
54. Sloth, B., et al., *Effect of subcutaneous injections of PYY1-36 and PYY3-36 on appetite, ad libitum energy intake, and plasma free fatty acid concentration in obese males*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2007. **293**(2): p. E604-E609.
55. Türker, S., E. Onur, and Y. Ózer, *Nasal route and drug delivery systems*. *Pharmacy world and Science*, 2004. **26**(3): p. 137-142.
56. Gantz, I., et al., *Efficacy and safety of intranasal peptide YY3–36 for weight reduction in obese adults*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007. **92**(5): p. 1754-1757.
57. Koda, S., et al., *The role of the vagal nerve in peripheral PYY3–36-induced feeding reduction in rats*. *Endocrinology*, 2005. **146**(5): p. 2369-2375.
58. Steinert, R.E., et al., *Oral administration of glucagon-like peptide 1 or peptide YY 3-36 affects food intake in healthy male subjects*. *The American journal of clinical nutrition*, 2010. **92**(4): p. 810-817.
59. Mishra, N., et al., *Biodegradable polymer based particulate carrier (s) for the delivery of proteins and peptides*. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*, 2008. **7**(4): p. 240-251.

60. Janes, K., P. Calvo, and M. Alonso, *Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules*. *Advanced drug delivery reviews*, 2001. **47**(1): p. 83-97.
61. Mittal, G., et al., *Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo*. *Journal of Controlled Release*, 2007. **119**(1): p. 77-85.
62. Lü, J.-M., et al., *Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology*. *Expert review of molecular diagnostics*, 2014.
63. Langer, K., et al., *Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles*. *International journal of pharmaceutics*, 2003. **257**(1): p. 169-180.
64. Langer, K., et al., *Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000. **49**(3): p. 303-307.
65. Balthasar, S., et al., *Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes*. *Biomaterials*, 2005. **26**(15): p. 2723-2732.
66. Coester, C., et al., *Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA)*. *International journal of pharmaceutics*, 2000. **196**(2): p. 147-149.
67. Mansouri, S., et al., *Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy*. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 2004. **57**(1): p. 1-8.
68. Kreuter, J. and P.P. Speiser, *New adjuvants on a polymethylmethacrylate base*. *Infection and immunity*, 1976. **13**(1): p. 204-210.
69. Tröster, S., U. Müller, and J. Kreuter, *Modification of the body distribution of poly (methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1990. **61**(1): p. 85-100.
70. Anderson, J.M. and M.S. Shive, *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. **64**: p. 72-82.
71. Couvreur, P., et al., *Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1979. **31**(1): p. 331-332.
72. Kreuter, J., *Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. 1. Preparation methods*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 1983. **58**(7): p. 196-209.
73. Okada, H., *One-and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprorelin acetate*. *Advanced drug delivery reviews*, 1997. **28**(1): p. 43-70.
74. Danhier, F., et al., *PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications*. *Journal of controlled release*, 2012. **161**(2): p. 505-522.
75. Talmadge, J.E., *The pharmaceutics and delivery of therapeutic polypeptides and proteins*. *Advanced drug delivery reviews*, 1993. **10**(2): p. 247-299.
76. Mu, L. and S. Feng, *A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS*. *Journal of controlled release*, 2003. **86**(1): p. 33-48.
77. Damgé, C., P. Maincent, and N. Ubrich, *Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats*. *Journal of controlled release*, 2007. **117**(2): p. 163-170.

78. Date, A.A., M.D. Joshi, and V.B. Patravale, *Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles*. *Advanced drug delivery reviews*, 2007. **59**(6): p. 505-521.
79. Ahmad, Z., et al., *Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential*. *Indian journal of chest diseases and allied sciences*, 2006. **48**(3): p. 171.
80. Calvo, P., et al., *PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as vector for drug delivery in prion diseases*. *Journal of neuroscience methods*, 2001. **111**(2): p. 151-155.
81. Kim, S.Y. and Y.M. Lee, *Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly (ethylene glycol) and poly ( $\epsilon$ -caprolactone) as novel anticancer drug carriers*. *Biomaterials*, 2001. **22**(13): p. 1697-1704.
82. Lee, K.S., et al., *Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer*. *Breast cancer research and treatment*, 2008. **108**(2): p. 241-250.
83. Panyam, J. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. *Advanced drug delivery reviews*, 2003. **55**(3): p. 329-347.
84. Kean, T. and M. Thanou, *Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan*. *Advanced drug delivery reviews*, 2010. **62**(1): p. 3-11.
85. Makhlof, A., Y. Tozuka, and H. Takeuchi, *Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery*. *European journal of pharmaceutical sciences*, 2011. **42**(5): p. 445-451.
86. Deli, M.A., *Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2009. **1788**(4): p. 892-910.
87. Hejazi, R. and M. Amiji, *Chitosan-based gastrointestinal delivery systems*. *Journal of Controlled Release*, 2003. **89**(2): p. 151-165.
88. Peppas, N., *Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery*. *International journal of pharmaceutics*, 2004. **277**(1): p. 11-17.
89. Khafagy, E.-S., et al., *Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review*. *Advanced drug delivery reviews*, 2007. **59**(15): p. 1521-1546.
90. Illum, L., N.F. Farraj, and S.S. Davis, *Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs*. *Pharmaceutical research*, 1994. **11**(8): p. 1186-1189.
91. Yin, L., et al., *Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery*. *Biomaterials*, 2009. **30**(29): p. 5691-5700.
92. Katas, H. and H.O. Alpar, *Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery*. *Journal of controlled release*, 2006. **115**(2): p. 216-225.
93. Wang, J.J., et al., *Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers*. *Int J Nanomedicine*, 2011. **6**(9): p. 765-774.
94. Jeong, Y.-I., et al., *Doxorubicin-incorporated nanoparticles composed of poly (ethylene glycol)-grafted carboxymethyl chitosan and antitumor activity against glioma cells in vitro*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010. **79**(1): p. 149-155.
95. Schiller, R.N., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled study examining the effects of a rapidly soluble chitosan dietary supplement on weight loss and body composition in overweight and mildly obese individuals*. *J Am Nutraceutical Assoc*, 2001. **4**(1): p. 42-9.

96. Mhurchu, C.N., et al., *Effect of chitosan on weight loss in overweight and obese individuals: a systematic review of randomized controlled trials*. Obesity reviews, 2005. **6**(1): p. 35-42.
97. He, W., et al., *Nanocarrier for oral peptide delivery produced by polyelectrolyte complexation in nanoconfinement*. Biomacromolecules, 2015. **16**(8): p. 2282-2287.
98. Goldstein, I., Hughes, RC Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N.(1980): *What should be called a lectin*. Nature. **285**: p. 66.
99. des Rieux, A., et al., *Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach*. Journal of controlled release, 2006. **116**(1): p. 1-27.
100. Irache, J.M., et al., *Bioadhesion of lectin-latex conjugates to rat intestinal mucosa*. Pharmaceutical research, 1996. **13**(11): p. 1716-1719.
101. Lehr, C.-M., et al., *Bioadhesion by means of specific binding of tomato lectin*. Pharmaceutical research, 1992. **9**(4): p. 547-553.
102. Gabor, F., et al., *The lectin–cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery*. Advanced drug delivery reviews, 2004. **56**(4): p. 459-480.
103. Kristiansen, A., et al., *Quantitative studies of the binding of wheat germ agglutinin (WGA) to chitin-oligosaccharides and partially N-acetylated chitosans suggest inequivalence of binding sites*. Carbohydrate polymers, 1999. **38**(1): p. 23-32.
104. Rios-Martin, J., S. Diaz-Cano, and F. Rivera-Hueto, *Ultrastructural distribution of lectin-binding sites on gastric superficial mucus-secreting epithelial cells*. Histochemistry, 1993. **99**(2): p. 181-189.
105. Song, Q., et al., *Mechanisms of transcellular transport of wheat germ agglutinin-functionalized polymeric nanoparticles in Caco-2 cells*. Biomaterials, 2012. **33**(28): p. 6769-6782.
106. Dalla Pellegrina, C., et al., *Effects of wheat germ agglutinin on human gastrointestinal epithelium: insights from an experimental model of immune/epithelial cell interaction*. Toxicology and applied pharmacology, 2009. **237**(2): p. 146-153.
107. Clark, M.A., B.H. Hirst, and M.A. Jepson, *Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles*. Advanced drug delivery reviews, 2000. **43**(2): p. 207-223.
108. Russell-Jones, G., *The potential use of receptor-mediated endocytosis for oral drug delivery*. Advanced drug delivery reviews, 1996. **20**(1): p. 83-97.
109. Guéant, J., et al., *Receptor-mediated endocytosis of the intrinsic factor—cobalamin complex in HT 29, a human colon carcinoma cell line*. FEBS letters, 1992. **297**(3): p. 229-232.
110. Hamman, J., P. Demana, and E. Olivier, *Targeting receptors, transporters and site of absorption to improve oral drug delivery*. Drug target insights, 2007. **2**: p. 71.
111. Chalasani, K.B., et al., *Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2007. **122**(2): p. 141-150.
112. Russell-Jones, G.J., *Oral delivery of therapeutic proteins and peptides by the vitamin B12 uptake system*. Peptide-based drug design: Controlling transport and metabolism, ACS Books, Washington, DC, 1995: p. 181-98.

113. Ni, S., S.M. Stephenson, and R.J. Lee, *Folate receptor targeted delivery of liposomal daunorubicin into tumor cells*. *Anticancer research*, 2001. **22**(4): p. 2131-2135.
114. Ward, C., *Folate-targeted non-viral DNA vectors for cancer gene therapy*. *Current opinion in molecular therapeutics*, 2000. **2**(2): p. 182-187.
115. Russell-Jones, G., L. Arthur, and H. Walker, *Vitamin B 12-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 cells*. *International journal of pharmaceutics*, 1999. **179**(2): p. 247-255.
116. Ramanujam, K.S., et al., *Expression of cobalamin transport proteins and cobalamin transcytosis by colon adenocarcinoma cells*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1991. **260**(3): p. G416-G422.
117. Pridgen, E.M., F. Alexis, and O.C. Farokhzad, *Polymeric nanoparticle technologies for oral drug delivery*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2014. **12**(10): p. 1605-1610.
118. Petrus, A.K., T.J. Fairchild, and R.P. Doyle, *Traveling the vitamin B12 pathway: oral delivery of protein and peptide drugs*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. **48**(6): p. 1022-1028.
119. Fowler, R., et al., *Nanoparticle transport in epithelial cells: pathway switching through bioconjugation*. *small*, 2013. **9**(19): p. 3282-3294.
120. Schneider, M., et al., *Crossing biological barriers for advanced drug delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013. **84**(2): p. 239-241.
121. Matsumoto, H., et al., *Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2*. *Gastroenterology*, 1990. **98**(5): p. 1199-1207.
122. Alpers, D., et al., *The secretion of intestinal alkaline phosphatase (IAP) from the enterocyte*. *Journal of gastroenterology*, 1994. **29**: p. 63-67.
123. Goldberg, R.F., et al., *Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(9): p. 3551-3556.
124. Goldstein, D.J., C. Rogers, and H. Harris, *Evolution of alkaline phosphatases in primates*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982. **79**(3): p. 879-883.
125. Pignata, S., et al., *The enterocyte-like differentiation of the Caco-2 tumor cell line strongly correlates with responsiveness to cAMP and activation of kinase A pathway*. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 1994. **5**(9): p. 967-973.
126. Pinto, M., *Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture*. *Biol. Cell*, 1983. **47**: p. 323-330.
127. Levy, P., A. Robert, and J. Picard, *Biosynthesis of glycosaminoglycans in the human colonic tumor cell line Caco-2: structural changes occurring with the morphological differentiation of the cells*. *Biology of the Cell*, 1988. **62**(3): p. 255-264.
128. Levy, P., et al., *Changes in glycosaminoglycan sulfation and protein kinase C subcellular distribution during differentiation of the human colon tumor cell line Caco-2*. *Experientia*, 1989. **45**(6): p. 588-591.
129. Darimont, C., et al., *Effects of intestinal fatty acid-binding protein overexpression on fatty acid metabolism in Caco-2 cells*. *Journal of lipid research*, 2000. **41**(1): p. 84-92.

130. Vachon, P.H., et al., *Cellular fibronectin expression is down-regulated at the mRNA level in differentiating human intestinal epithelial cells*. Experimental cell research, 1995. **216**(1): p. 30-34.
131. Stein, J., et al., *Induction of glutathione-S-transferase-pi by short-chain fatty acids in the intestinal cell line caco-2*. European journal of clinical investigation, 1996. **26**(1): p. 84-87.
132. Stierum, R., et al., *Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2003. **1650**(1): p. 73-91.
133. Borchardt, R.T., et al., *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. Gastroenterol, 1989. **96**: p. 736-749.
134. Spring, K.R., *ROUTES AND MECHANISM OF FLUID TRANSPORT BY EPITHELIA I*. Annual Review of Physiology, 1998. **60**(1): p. 105-119.
135. Zucco, F., et al., *An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines*. ATLA-NOTTINGHAM-, 2005. **33**(6): p. 603.
136. Leonard, M., et al., *Evaluation of the Caco-2 monolayer as a model epithelium for iontophoretic transport*. Pharmaceutical research, 2000. **17**(10): p. 1181-1188.
137. Gullberg, E., et al., *Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model*. Biochemical and biophysical research communications, 2000. **279**(3): p. 808-813.
138. Lo, D., et al., *Cell culture modeling of specialized tissue: identification of genes expressed specifically by follicle-associated epithelium of Peyer's patch by expression profiling of Caco-2/Raji co-cultures*. International immunology, 2004. **16**(1): p. 91-99.
139. Barthe, L., J. Woodley, and G. Houin, *Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies*. Fundamental & clinical pharmacology, 1999. **13**(2): p. 154-168.
140. Le Ferrec, E., et al., *In vitro models of the intestinal barrier*. Atla, 2001. **29**: p. 649-668.
141. USSING, H.H., *The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies*. Acta physiologica Scandinavica, 1949. **17**(1): p. 1-37.
142. Ussing, H.H. and K. Zerahn, *Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin*. Acta physiologica Scandinavica, 1951. **23**(2-3): p. 110-127.
143. Larsen, E.H., *Hans H. Ussing—scientific work: contemporary significance and perspectives*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2002. **1566**(1): p. 2-15.
144. Diamond, J.M., *Transport of salt and water in rabbit and guinea pig gall bladder*. The Journal of general physiology, 1964. **48**(1): p. 1-14.
145. Diamond, J.M., *The reabsorptive function of the gall-bladder*. The Journal of physiology, 1962. **161**(3): p. 442.
146. Curran, P.F. and A. Solomon, *Ion and water fluxes in the ileum of rats*. The Journal of general physiology, 1957. **41**(1): p. 143-168.
147. He, L., et al., *Use of the Ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial tissues*. Front Biosci, 2013. **18**: p. 1266-1274.

148. Lennernäs, H., *Animal data: the contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo*. *Advanced drug delivery reviews*, 2007. **59**(11): p. 1103-1120.
149. Lim, J.P. and P.A. Gleeson, *Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps*. *Immunology and cell biology*, 2011. **89**(8): p. 836-843.
150. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, *Mechanisms of endocytosis*. *Annual review of biochemistry*, 2009. **78**: p. 857-902.
151. Khalil, I.A., et al., *Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery*. *Pharmacological reviews*, 2006. **58**(1): p. 32-45.
152. Ma, Z. and L.-Y. Lim, *Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles*. *Pharmaceutical Research*, 2003. **20**(11): p. 1812-1819.
153. Sofer, A. and A.H. Futerman, *Cationic amphiphilic drugs inhibit the internalization of cholera toxin to the Golgi apparatus and the subsequent elevation of cyclic AMP*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(20): p. 12117-12122.
154. Orlandi, P.A. and P.H. Fishman, *Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains*. *The Journal of cell biology*, 1998. **141**(4): p. 905-915.
155. Shurety, W., N.A. Bright, and J.P. Luzio, *The effects of cytochalasin D and phorbol myristate acetate on the apical endocytosis of ricin in polarised Caco-2 cells*. *Journal of cell science*, 1996. **109**(12): p. 2927-2935.
156. Jackman, M.R., et al., *Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in Caco-2 cells by cytochalasin D*. *Journal of cell science*, 1994. **107**(9): p. 2547-2556.
157. Parton, R.G., B. Joggerst, and K. Simons, *Regulated internalization of caveolae*. *The Journal of cell biology*, 1994. **127**(5): p. 1199-1215.
158. Araki, N., M.T. Johnson, and J.A. Swanson, *A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages*. *The Journal of cell biology*, 1996. **135**(5): p. 1249-1260.
159. West, M.A., et al., *Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation*. *Current Biology*, 2000. **10**(14): p. 839-848.
160. Koivusalo, M., et al., *Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling*. *The Journal of cell biology*, 2010. **188**(4): p. 547-563.
161. Artursson, P. and J. Karlsson, *Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1991. **175**(3): p. 880-885.
162. Grajek, W.o. and A. Olejnik, *Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food*. *Pol J Food Nutr Sci*, 2004. **13**(54): p. 5-24.
163. Bogdanos, D.P., et al., *Pancreatic-specific autoantibodies to glycoprotein 2 mirror disease location and behaviour in younger patients with Crohn's disease*. *BMC gastroenterology*, 2012. **12**(1): p. 1.
164. Riley, S.A., et al., *Active hexose transport across cultured human Caco-2 cells: characterisation and influence of culture conditions*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1991. **1066**(2): p. 175-182.



165. Sakai, M., et al., *Effects of absorption enhancers on the transport of model compounds in Caco-2 cell monolayers: assessment by confocal laser scanning microscopy*. Journal of pharmaceutical sciences, 1997. **86**(7): p. 779-785.
166. des Rieux, A., et al., *An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells*. european journal of pharmaceutical sciences, 2007. **30**(5): p. 380-391.
167. Lohmann, C., S. Hüwel, and H.-J. Galla, *Predicting blood-brain barrier permeability of drugs: evaluation of different in vitro assays*. Journal of drug targeting, 2002. **10**(4): p. 263-276.
168. Srinivasan, B., et al., *TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems*. Journal of laboratory automation, 2015. **20**(2): p. 107-126.
169. Sarmento, B., *Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue Based in Vitro Culture Models*. 2015: Woodhead Publishing.
170. Lasa-Saracíbar, B., et al., *In vitro intestinal co-culture cell model to evaluate intestinal absorption of edelfosine lipid nanoparticles*. Current topics in medicinal chemistry, 2014. **14**(9): p. 1124-1132.
171. Malich, G., B. Markovic, and C. Winder, *The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines*. Toxicology, 1997. **124**(3): p. 179-192.
172. Riss, T.L., et al., *Cell viability assays*. 2015.
173. Patterson, J.K., X.G. Lei, and D.D. Miller, *The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption*. Experimental Biology and Medicine, 2008. **233**(6): p. 651-664.
174. Kararli, T.T., *Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals*. Biopharmaceutics & drug disposition, 1995. **16**(5): p. 351-380.
175. Oates, P.S., et al., *Gene expression of divalent metal transporter 1 and transferrin receptor in duodenum of Belgrade rats*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2000. **278**(6): p. G930-G936.
176. PERINI, M., E. VENTURA, and G. CAIRO, *Regulation of transferrin, transferrin receptor, and ferritin genes in human duodenum*. Gastroenterology, 1992. **102**: p. 802-809.
177. Yamasaki, Y., et al., *Pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger receptors: importance of molecular size and negative charge density for in vivo recognition by receptors*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002. **301**(2): p. 467-477.
178. Jia, X., et al., *Tracing transport of chitosan nanoparticles and molecules in Caco-2 cells by fluorescent labeling*. Carbohydrate Polymers, 2009. **78**(2): p. 323-329.
179. des Rieux, A., et al., *Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **25**(4): p. 455-465.
180. Gullberg, E., et al., *Expression of Specific Markers and Particle Transport in a New Human Intestinal M-Cell Model: Volume 279, Number 3 (2000), pages 808-813*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **281**(4): p. 1063.
181. Neutra, M.R., V. *Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1998. **274**(5): p. G785-G791.

182. Neutra, M., et al., *M cells and microbial pathogens*. Infections of the GI tract. Raven Press, New York, NY, 1995: p. 163-178.
183. Frey, A. and M. Neutra, *Targeting of mucosal vaccines to Peyer's patch M cells*. Behring Institute Mitteilungen, 1997(98): p. 376-389.
184. Mohanraj, V. and Y. Chen, *Nanoparticles-a review*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2007. **5**(1): p. 561-573.
185. Baier, G., et al., *DNA Amplification via Polymerase Chain Reaction Inside Miniemulsion Droplets with Subsequent Poly (n-butylcyanoacrylate) Shell Formation and Delivery of Polymeric Capsules into Mammalian Cells*. Macromolecular bioscience, 2011. **11**(8): p. 1099-1109.
186. Vinod, K., et al., *Critical review on mucoadhesive drug delivery systems*. Hygeia JD Med, 2012. **4**(1): p. 1-5.
187. Albanese, A. and W.C. Chan, *Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity*. ACS nano, 2011. **5**(7): p. 5478-5489.
188. Rausch, K., et al., *Evaluation of nanoparticle aggregation in human blood serum*. Biomacromolecules, 2010. **11**(11): p. 2836-2839.
189. Gstraunthaler, G. and T. Lindl, *Zell-und Gewebekultur*. 2013, Springer.
190. Busher, J.T., *Serum albumin and globulin*. 1990.
191. Sleep, D., *Albumin and its application in drug delivery*. Expert opinion on drug delivery, 2015. **12**(5): p. 793-812.
192. Dickinson, B.L., et al., *Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line*. The Journal of clinical investigation, 1999. **104**(7): p. 903-911.
193. Shah, U., et al., *Distribution of the IgG Fc receptor, FcRn, in the human fetal intestine*. Pediatric research, 2003. **53**(2): p. 295-301.
194. Elzoghby, A.O., W.M. Samy, and N.A. Elgindy, *Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems*. Journal of controlled release, 2012. **157**(2): p. 168-182.
195. Mariam, J., S. Sivakami, and P.M. Dongre, *Albumin corona on nanoparticles—a strategic approach in drug delivery*. Drug delivery, 2015: p. 1-9.
196. Kawaguchi, R., et al., *A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A*. Science, 2007. **315**(5813): p. 820-825.
197. Kawaguchi, R., et al., *Vitamin A Transport Mechanism of the Multitransmembrane Cell-Surface Receptor STRA6*. Membranes, 2015. **5**(3): p. 425-453.
198. Reboul, E., *Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins*. Nutrients, 2013. **5**(9): p. 3563-3581.
199. Engle, M., G. Goetz, and D. Alpers, *Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes*. Journal of cellular physiology, 1998. **174**(3): p. 362-369.
200. Nagata, Y. and M.M. Burger, *Wheat germ agglutinin molecular characteristics and specificity for sugar binding*. Journal of Biological Chemistry, 1974. **249**(10): p. 3116-3122.
201. Hames, B.D., *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. Vol. 197. 1998: OUP Oxford.
202. Rice, R.H. and M.E. Etzler, *Subunit structure of wheat germ agglutinin*. Biochemical and biophysical research communications, 1974. **59**(1): p. 414-419.
203. De Vries, E., et al., *Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway*. PLoS Pathog, 2011. **7**(3): p. e1001329.

204. Silvius, J., *Lipid microdomains in model and biological membranes: how strong are the connections?* Quarterly reviews of biophysics, 2005. **38**(04): p. 373-383.
205. Simons, K. and W.L. Vaz, *Model systems, lipid rafts, and cell membranes 1*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2004. **33**: p. 269-295.
206. Mayor, S. and R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nature reviews Molecular cell biology, 2007. **8**(8): p. 603-612.
207. Nabi, I.R. and P.U. Le, *Caveolae/raft-dependent endocytosis*. The Journal of cell biology, 2003. **161**(4): p. 673-677.
208. Rejman, J., A. Bragonzi, and M. Conese, *Role of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo-and polyplexes*. Molecular Therapy, 2005. **12**(3): p. 468-474.
209. Song, Q., et al., *Cellular internalization pathway and transcellular transport of pegylated polyester nanoparticles in Caco-2 cells*. International journal of pharmaceutics, 2013. **445**(1): p. 58-68.
210. Crater, J.S. and R.L. Carrier, *Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport*. Macromolecular bioscience, 2010. **10**(12): p. 1473-1483.
211. Lai, S.K., Y.-Y. Wang, and J. Hanes, *Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues*. Advanced drug delivery reviews, 2009. **61**(2): p. 158-171.
212. Boegh, M. and H.M. Nielsen, *Mucus as a barrier to drug delivery—understanding and mimicking the barrier properties*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2015. **116**(3): p. 179-186.
213. Mordrelle, A., et al., *EAAT1 is involved in transport of L-glutamate during differentiation of the Caco-2 cell line*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2000. **279**(2): p. G366-73.
214. Schipper, N.G., et al., *Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement*. Pharmaceutical research, 1997. **14**(7): p. 923-929.
215. Sadeghi, A., et al., *Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin absorption in Caco-2 cells*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 2008. **70**(1): p. 270-278.
216. Gray, H., *Anatomy of the human body*. 1918: Lea & Febiger.
217. Helander, H.F. and L. Fändriks, *Surface area of the digestive tract—revisited*. Scandinavian journal of gastroenterology, 2014. **49**(6): p. 681-689.
218. De Silva, A. and S.R. Bloom, *Gut hormones and appetite control: a focus on PYY and GLP-1 as therapeutic targets in obesity*. Gut Liver, 2012. **6**(1): p. 10-20.
219. Boey, D., et al., *PYY transgenic mice are protected against diet-induced and genetic obesity*. Neuropeptides, 2008. **42**(1): p. 19-30.
220. Pittner, R., et al., *Effects of PYY 3–36 in rodent models of diabetes and obesity*. International journal of obesity, 2004. **28**(8): p. 963-971.
221. Mura, S., J. Nicolas, and P. Couvreur, *Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery*. Nature materials, 2013. **12**(11): p. 991-1003.
222. Bhattarai, N., J. Gunn, and M. Zhang, *Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery*. Advanced drug delivery reviews, 2010. **62**(1): p. 83-99.
223. Zwiriska-Korczała, K., et al., *BASAL AND POSTPRANDIAL PLASMA LEVELS OF PYY, GHRELIN*. Journal of physiology and pharmacology, 2007. **58**(1): p. 13-35.

- 
224. Woods, S.C. and D.A. D'Alessio, *Central control of body weight and appetite*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **93**(11\_supplement\_1): p. s37-s50.

## 6 Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinem Projektleiter Prof. Dr. Volker Mailänder bedanken für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas, für hilfreiche Diskussionen und wertvolle Ratschläge und das freundschaftliche Verhältnis, das mich gerade in schwierigen Phasen durchhalten ließ.

Prof. Dr. Katharina Landfester danke ich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit und für die Möglichkeit am Max-Planck Institut für Polymerforschung in Mainz zu promovieren.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem Prof. Dr. Harald Paulsen für die Annahme und Korrektur meiner Arbeit bedanken.

Für die Synthese und Bereitstellung der Nanopartikel möchte ich mich herzlich bei Katja Klein und Carl Wei He bedanken.

Ein spezielles Dankeschön an meine Kollegen Manuel Tonigold, Johanna Simon, Jonas Rheinholz und Marleen Willig sowie Freundin Dr. Sabrina Graf für das Korrekturlesen und die Unterstützung während der „Schreibphase“.

Gleichermaßen danke ich Raweewan Thiramanas, Dr. Artur Ghazaryan, David Passlick, Jorge Pereira und Gabor Kuhn für die klasse Mitarbeit und ständige Hilfestellung während der gesamten Zeit meiner Promotion.

Meine Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis sind meine Freunde geworden und ich danke allen für die unvergessliche Zeit am Institut, aber auch außerhalb. Neben zahlreichen fachlichen Diskussionen stand immer der Spaß an der Arbeit im Vordergrund. Die gemeinsam verbrachte Zeit in der Kaffee-Ecke half über so manchen Tiefpunkt hinweg und führte dazu, dass ich mich auch in Zukunft sehr gerne an diesen Lebensabschnitt zurückerinnern werde.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern und meiner Familie, die mich in meiner gesamten schulischen und akademischen Ausbildung immer liebevoll unterstützten und in allen Lagen mitfieberten. Meinen Schwiegereltern und meinem Partner danke ich dafür, dass ich mich ständig an sie lehnen durfte. Meinem Sohn danke ich für seine grenzenlose Geduld und das Verständnis während meiner gesamten Promotionszeit.

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Maria Parowatkin  
Geburtsdatum: 27.11.1979  
Geburtsort: Wolgodonsk (Russland)  
Staatsangehörigkeit: deutsch



### Bildungsweg

- 04.2013 – 11.2016      **Dissertation**  
Max-Planck Institut für Polymerforschung in Mainz  
Forschungsgruppe Physikalische Chemie der Polymere  
(Prof. Landfester)
- 04.2005 - 08.2012      **Studium der Biologie**  
Johannes-Gutenberg Universität in Mainz  
Abschlussthema der Diplomarbeit: „Charakterisierung der Sensorkinase  
CitA aus *Geobacillus thermodenitrificans*“, (Note 1,3)  
(Prof. Dr. Gottfried Uden am Institut für Mikrobiologie und  
Weinforschung)
- 08.2001-07.2004      **Berufsausbildung zur Physiotherapeutin**  
Staatlich anerkannte Schule für Physiotherapeuten in Bad Sulza

## 8 Publikationen

**„Nanocarrier for Oral Peptide Delivery Produced by Polyelectrolyte Complexation in Nanoconfinement“**, Carl Wei He · Maria Parowatkin · Volker Mailänder · Marion Flechtner-Mors · Robert Graf · Andreas Best · Kaloian Koynov · Kristin Mohr · Ulrich Ziener · Katharina Landfester · Daniel Crespy; BIOMACROMOLECULES 16(8) · JULY 2015

**„CitA (citrate) and DcuS (C4-dicarboxylate) sensor kinases in thermophilic Geobacillus kaustophilus and G. thermodenitrificans“**, Sabrina Graf · Constanze Broll · Juliane Wissig · Alexander Strecker · Maria Parowatkin · Gottfried Uden; MICROBIOLOGY · SEPTEMBER 2015

**„Ruthenium-Containing Block Copolymer Assemblies: Red-Light-Responsive Metallopolymers with Tunable Nanostructures for Enhanced Cellular Uptake and Anticancer Phototherapy“**, Wen Sun · Maria Parowatkin · Werner Steffen · Hans-Jürgen Butt · Volker Mailänder · Si Wu; ADVANCED HEALTHCARE MATERIALS · DECEMBER 2015

**„Sequence-Controlled Delivery of Peptides from Hierarchically Structured Nanomaterials“**, (Carl) W. He, M. Parowatkin, V. Mailänder, M. Flechtner-Mors, U. Ziener, K. Landfester, D. Crespy; ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES · JANUAR 2017

Die vorgelegte Arbeit wurde von April 2013 bis November 2016 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Volker Mailänder und Frau Prof. Dr. Katharina Landfester angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den aufgeführten Quellen und Hilfsmitteln erstellt habe.

Mainz, den 09.01.2017

---

Maria Parowatkin