

***Induzierte pluripotente Stammzellen für die
Etablierung eines in vitro-Modells der Blut-Hirn-
Schranke zur biologischen Charakterisierung von
Nanopartikeln***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Helen Nneka Onyema
geb. 14. Januar 1992 in Mainz
Mainz, 2020

durchgeführt am Fraunhofer IMM



Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Otu onye tuo izu, o gbue ochu.
Knowledge is never complete: two heads are better than one.
- Igbo proverb -

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, als solche kenntlich gemacht. Diese Abschlussarbeit wurde nicht, auch nicht auszugsweise, bereits für eine andere Prüfung angefertigt.

Ort, Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei **allen** bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

INHALTSVERZEICHNIS

Eidesstattliche Erklärung	IV
Danksagung	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung	X
Abstract.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Die Blut-Hirn-Schranke	1
1.1.1 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke	1
1.1.2 Die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke	2
1.1.3 Transportwege an der Blut-Hirn-Schranke	4
1.1.4 Modelle der Blut-Hirn-Schranke	6
1.1.5 Stammzellen und ihr Potential beim Einsatz als Hirnendothelzellen	8
1.2 Nanopartikel.....	11
1.2.1 Biomedizinische Anwendungen für Nanopartikel.....	11
1.2.2 Nanopartikel als Wirkstoffträger an der Blut-Hirn-Schranke	12
1.2.3 Proteinkorona	15
2 Zielsetzung der Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Geräte	19
3.1.2 Software.....	20
3.1.3 Verbrauchsmaterial	21
3.1.4 Reagenzien	21
3.1.5 Medien für die Zellkultur	23
3.1.6 Polymere Nanopartikel	23
3.1.7 Zelllinien	24
3.1.8 Primer.....	24
3.2 Methoden	26
3.2.1 Zellkultur	26
3.2.2 Differenzierung der iPSC zu mikrovaskulären Endothelzellen des humanen Gehirns ²⁸	
3.2.3 Kultivierung von hBMEC unter dynamischen Bedingungen.....	32
3.2.4 Nanopartikel-Aufnahme.....	33
3.2.5 Massenspektrometrische Analyse der Proteinkorona.....	35
4 Ergebnisse	37
4.1 Partikelanalysen mit der Zelllinie hCMEC/D3	37
4.1.1 Toxizitätsanalyse der Nanopartikel mit der Zelllinie hCMEC/D3	37
4.1.2 Aufnahme der Nanopartikel in der Zelllinie hCMEC/D3.....	40
4.2 Differenzierung und Charakterisierung aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) zu Hirnendothelzellen (hBMEC).....	46
4.3 Analyse der Nanopartikel-Aufnahme mit aus iPSC differenzierten hBMEC	54
4.4 Analyse der Proteinkorona	64
5 Diskussion.....	70
5.1 Vorteile von humanen iPSC für den Aufbau eines BHS-Modells.....	71
5.2 Differenzierung von iPSC zu hBMEC	73
5.3 Etablierung und Charakterisierung des BHS-Modells	75

5.4	Physikochemische Eigenschaften der polymeren Nanopartikel für den Wirkstofftransport an der Blut-Hirn-Schranke	78
5.5	Einfluss der Nanopartikel auf hBMEC	80
6	Ausblick	85
7	Anhang	86
7.1	Gates der fluoreszenten Durchflusszytometrie.....	86
7.1.1	hcmeC/D3	86
7.1.2	hBMEC	86
7.2	Berechnung des Scherstressses bei μ -slide ^{0,4I} Luer	87
8	Literatur.....	88
9	Abbildungsverzeichnis.....	102
10	Tabellenverzeichnis	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Astrozyten
BCRP	<i>Breast cancer-resistance protein</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
CCK-8	<i>Cell Counting Kit-8</i>
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
cm	Centimeter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR-Effekt	<i>enhanced permeability and retention effect</i>
ES	embryonale Stammzellen
EZ	Endothelzelle
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FI	Fluoreszenzintensität
FSC	Vorwärtstreulicht
FVS660	Fixable Viability Stain 660
g	Fallbeschleunigung
GDNF	<i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GLUT1	Glukosetransporter 1
h	Stunden
hBMEC	mikrovaskuläre Endothelzellen des humanen Gehirns
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IMB	Institut für molekulare Biologie gGmbH
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
JAM	<i>junctional adhesion molecules</i>
kDa	Kilodalton
LAT1	<i>large neutral amino acid transporter 1</i>

LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LRP	<i>Lipoprotein receptor-related protein</i>
MDR	<i>multidrug resistance protein</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MRP	<i>multi drug resistance-related protein</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP	Nanopartikel
PBCA	Polybutylcanoacrylat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersionsindex
PDS	<i>Platelet poor plasma-derived serum</i>
PECAM	<i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule</i>
PEEP	Poly(ethylethylen Phosphat)
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PLA/PLLA	Polyactid
PLGA	Polyactid-co-Glycolid
PMI	Perylenmonoimid
PZ	Perizyten
RA	All-trans Retinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
SSC	Seitwärtsstreulicht
TEER	transendothelialer elektrischen Widerstand
TfR	Transferrintransporter
TGF β	<i>transforming growth factor-β</i>
TJ	<i>tight junction</i>
u.a.	unter anderem
Ve-cadherin	<i>vascular endothelial cadherin</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
ZP	Zetapotential
Ω	Ohm

ZUSAMMENFASSUNG

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stellt eine selektive Barriere dar, die dem Schutz des Hirns vor im Blut zirkulierenden Giftstoffen und Krankheitserregern dient. Die Barrierefunktion ist jedoch eine Herausforderung für pharmakologische Therapieansätze zur Behandlung von z.B. neurodegenerativen Erkrankungen und Hirntumoren. Auf Grund dieser Funktion können potentielle Arzneistoffe nicht an ihren Wirkort im Hirn gelangen. Untersuchungen von Arzneistoffen oder potentiellen Wirkstoffträgersystemen wie Nanopartikel (NP) werden meist in Tiermodellen oder mit Zellen nicht-menschlichen Ursprungs durchgeführt, die als Modelle für die humane BHS dienen sollen. Dies hat zur Folge, dass eine direkte Translation der Forschungsergebnisse in die Klinik wegen unterschiedlicher physiologischer Bedingungen des Modells und der humanen BHS sich oft als kritisch herausstellen kann. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigen, dass humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) auf Grund ihrer Pluripotenz zu mikrovaskuläre Endothelzellen des humanen Gehirns (hBMEC) differenziert werden und zur Etablierung eines statischen sowie dynamischen *in vitro*-Modells der BHS eingesetzt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Differenzierung nach den Protokollen von Lippman, Neal und deren Kollegen durchgeführt und konnte erfolgreich reproduziert und adaptiert werden. Die Zellen exprimieren das endotheliale Protein PECAM/CD31 und die *tight junction*-assoziierten Proteine Claudin-5 und Occludin, die essentiell für den Aufbau einer dichten Barriere sind. Eine dichte, mikrovaskuläre Barriere zeichnet sich durch einen hohen transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) und eine niedrige Permeabilität aus. In diesem Modell konnte ein maximaler TEER von 3.000 Ωcm^2 detektiert werden, der für 120 h über 1.500 Ωcm^2 blieb. Die niedrige Permeabilität für Natrium-Fluorescein lag bei $4 \cdot 10^{-5}$ cm/min. Bei der Kultivierung der hBMEC bei einem physiologischen Scherstress von 10 dyn/cm² für 96 h konnte ebenfalls die Expression von Occludin und Claudin-5 immunozytochemisch nachgewiesen werden. Anders als bei anderen Endothelzellen wie hCMEC/D3 oder HUVEC richten sich die Zellen bei Kultivierung unter den hier angelegten dynamischen Bedingungen nicht nach der Flussrichtung des Kulturmediums aus.

Das statische Modell der BHS wurde für die biologische Charakterisierung von polymeren NP, synthetisiert aus Poly(D, L-Lactid) (PLLA) und Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA) in einer Größe von jeweils 50 und 100 nm, verwendet. Stabilisiert wurden alle NP mit dem Tensid Tween® 80. Bei Inkubation der Partikel in Serum bildet sich auf der NP-Oberfläche eine Proteinkorona, deren Zusammensetzung massenspektrometrisch analysiert wurde. Es zeigte sich eine selektive Adsorption der Serumproteine auf der NP-Oberfläche, die allerdings in ihrer prozentualen Zusammensetzung nicht der des Serums entsprach. Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der Proteinkorona, die von Apolipoproteinen und *Complement Components* dominiert wurde. Die Anlagerung der Proteine beeinflusste auch die Oberflächenladung, wobei der Unterschied sich als nicht signifikant herausstellte.

Obwohl sich die Proteinkorona der Nanopartikel nicht signifikant unterschied, interagierten die Nanopartikel unterschiedlich stark mit zerebralen Zellen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die 50 nm NP am besten in das Zytoplasma aufgenommen wurden, aber dass trotz der unterschiedlichen Interaktion der NP mit den Zellen keiner der Partikel bei einer Konzentration von 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ toxisch für die Zellen war. Partikel aus PLGA und einem Durchmesser von 50 nm zeigten die stärkste Aufnahme. Obwohl sie nicht toxisch auf die Zellen wirkten, reduzierten sie den TEER der hBMEC signifikant.

ABSTRACT

The blood brain-barrier (BBB) is a selective barrier protecting the brain from toxins and pathogens circulating in the blood. However, this barrier function is a challenge for pharmacological therapies for the treatment of e.g. neurodegenerative diseases and brain tumors. Due to this function, potential drugs cannot reach their target cells within the brain. BBB studies of drugs or drug delivery systems like Nanoparticle (NP) are mainly performed in animal models or with cells of non-human origin. This leads to a critical translation of research results to the clinic because of the differences in the physiological conditions of humans and BBB models. Regarding their pluripotency, recently published studies have shown the successful differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSC) into human brain microvascular endothelial cells (hBMEC) for the establishment of a static and dynamic in vitro model of the BBB.

In this dissertation, the differentiation was performed according to the protocols of Lippmann, Neal and colleagues and was successfully reproduced and adapted. The cells express the endothelial protein PECAM/CD31 and tight junction-associated proteins Claudin-5 and Occludin which are essential for building a tight barrier. A tight microvascular barrier is distinguished by a high transendothelial electrical resistance (TEER) and a low permeability. This model attained a maximum TEER of $3.000 \Omega\text{cm}^2$ which stays above $1.500 \Omega\text{cm}^2$ for 120 h. The low permeability for sodium fluorescein is at $4 \cdot 10^{-5}$ cm/min. The cultivation of hBMEC under a physiological shear stress of 10 dyn/cm^2 for 96 h also leads to the expression of Occludin and Claudin-5 which could be detected by immunocytochemical staining. In contrast to other endothelial cells like hCMEC/D3 and HUVEC, the cells do not align to the flow direction when cultivating them under the here described dynamic conditions.

The static model was used for the biological characterization of polymer NP synthesized from Poly(D, L-Lactid) (PLLA) and Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA) with a size of 50 and 100 nm each. All NP were stabilized with the surfactant Tween® 80. The incubation of NP in serum formed a protein corona on the NP surface, whose composition was analyzed by mass spectrometry. This lead to a selective adsorbtion of proteins which do not reflect the percentage composition of the serum. Additionally, there were no significant differences in the protein composition which was dominated by Apolipoproteins and Complement Components. The adsorbtion of proteins influences the surface charge which did not show significant changes.

Although there were no significant changes in the protein corona of the NP, the NP interact differently with cerebral cells. The results show that the best uptake into the cytoplasm was observed with 50 nm NP. Despite different interactions of the NP with the cells, the NP were not toxic at the used concentration of $150 \mu\text{g/ml}$. Particles made of PLGA with a size of 50 nm showed the strongest uptake. While not being toxic to the cells, the TEER of hBMEC was significantly reduced.

1 EINLEITUNG

1.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) beschreibt die einzigartigen Gegebenheiten, welche zwischen der Blutzirkulation und dem zentralen Nervensystem vorliegen (Daneman & Prat, 2015). Sie bildet einen homöostatischen Schutzmechanismus, den das Hirn vor im Blut zirkulierenden Giftstoffen, Verletzungen und Krankheitserregern schützt, sodass neuronale Funktionen des Hirns ungestört ablaufen können (Abbott *et al.*, 2010; Roney *et al.*, 2005). Fehlfunktionen der BHS können zu Ionendysregulationen sowie Eindringen von Immunzellen, Pathogenen und Molekülen führen, welche neuronale Störungen und Degenerationen zur Folge haben können (Abbott *et al.*, 2010; Daneman & Prat, 2015; Hawkins *et al.*, 2006).

1.1.1 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

Bei der BHS handelt es sich um eine selektive Barriere, die, auf Grund von Zell-Zell-Verbindungen zwischen Endothelzellen (EZ), die parazelluläre Diffusion reguliert. Diese Funktion wird zusätzlich von Astrozyten (AZ), Perizyten (PZ) sowie der Basalmembran unterstützt. Zusammen mit neuronalen Zellen und Mikrogliazellen bilden sie die sogenannte neurovaskuläre Einheit (Abbott *et al.*, 2006; Iadecola, 2004). Der histologische Aufbau der BHS ist in Abbildung 1 schematisch im Querschnitt dargestellt.

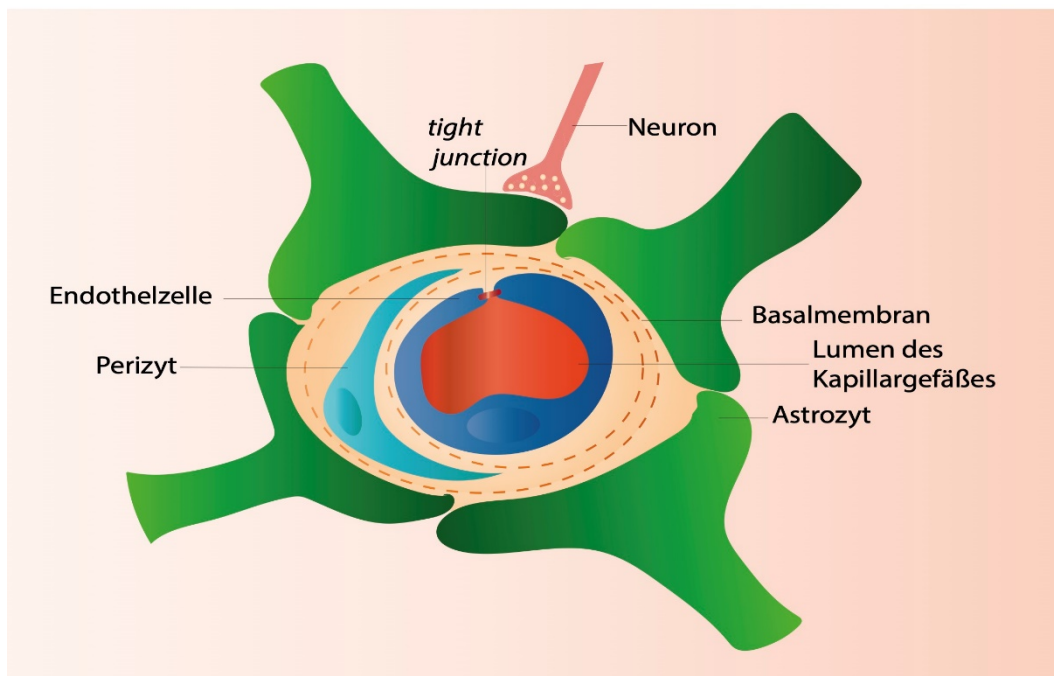


Abbildung 1: Zellulärer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Abbott *et al.*, 2006)). Mikrovaskuläre zerebrale EZ, welche über *tight junctions* miteinander verbunden sind, bilden hauptsächlich die BHS aus. Umgeben sind die EZ von der Basalmembran, in die die PZ eingebettet sind. Durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren spielen AZ eine tragende Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung der BHS.

Die zerebralen Endothelzellen kleiden die Innenwände der zerebralen Mikrokapillaren aus und sind hauptsächlich für die typischen Eigenschaften der BHS verantwortlich (Aird,

2007a, b). Die Zellen sind einem Scherstress von 10 – 30 dyn/cm² ausgesetzt (Cheng *et al.*, 2007a; Garcia-Polite *et al.*, 2017). Außerdem werden sie von Immunzellen, Gliazellen, AZ, PZ sowie der Basalmembran beeinflusst (Daneman & Prat, 2015). Anders als periphere EZ besitzen die EZ der BHS eine hohe Anzahl an Mitochondrien, keine Fenestrierungen, minimale Pinozytose-Aktivitäten und eine erhöhte Anzahl an *tight junctions* (TJ) (Fenstermacher *et al.*, 1988; Hawkins *et al.*, 2006; Oldendorf & Brown, 1975; Sedlakova *et al.*, 1999). Benachbarte EZ sind über TJ und *adherens junctions* (AJ) miteinander verbunden und regulieren so den parazellulären Fluss von Ionen, Molekülen und Zellen zwischen Blut und Hirn (Brightman & Reese, 1969; Reese & Karnovsky, 1967). Dies hat zur Folge, dass auf Grund der Barriere-bildenden EZ essentielle Nährstoffe des Gehirns nur über spezifische Transportersysteme, Pumpen oder Rezeptoren ins Hirn gelangen können (Abbott *et al.*, 2006; Roney *et al.*, 2005).

AZ gehören zu den Gliazellen und stehen über ihre Zellfortsätze mit den Hirnkapillaren in Kontakt (Iadecola, 2004). Als Antwort auf neuronale Aktivitäten regulieren sie den Blutfluss (Iadecola, 2004). Durch die Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. *transforming growth factor-β* TGFβ, *basic fibroblast growth factor* bFGF, *glial cell-derived neurotrophic factor* GDNF, Interleukin-6 IL-6, Hydrokortison) haben sie eine tragende Rolle bei der Funktion und Modulation der BHS (Abbott, 2002; Abbott *et al.*, 2006; Haseloff *et al.*, 2005). TGFβ und bFGF führen zu einer erhöhten Expression von Claudin-5, was eine dichte Barriere zur Folge hat (McMillin *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Darüber hinaus reguliert bFGF weitere TJ-Proteine wie Occludin, *Zona Occludens*-Adaptermoleküle, p120-Catenin und β-Catenin, die den Aufbau sowie die Erhaltung der Barrierefunktion der BHS zur Folge haben (Wang *et al.*, 2016). Außerdem versorgen AZ Neurone mit Nährstoffen und Energie und bilden einen Großteil des Cholesterols für das Myelin der Neuronenaxone (Abbott, 2002).

Die Basalmembran mit einer Dicke von 100 nm umgibt die EZ und hat in ihr die PZ eingebettet (Wong *et al.*, 2013). Sie besteht hauptsächlich aus sekretierten Molekülen wie Kollagen Typ IV, Fibronectin, Laminin, Heparinsulfat, Proteoglykanen und anderen extrazellulären Proteinen (Daneman & Prat, 2015; Wu *et al.*, 2009). Die EZ umgebend fördert die Basalmembran die Ausbildung einer dichten Barriere (Xu *et al.*, 2019).

PZ befinden sich auf der abluminalen Seite des Endothels und sind dort in die Basalmembran eingebettet (Sims, 1986). Sie regulieren die Genexpression in EZ und induzieren die Polarisierung der Endfüße der Astrozyten (Armulik *et al.*, 2010). Auf Grund dessen spielen sie trotz keinem direkten Kontakt zu EZ eine Rolle in der Ausbildung der TJ, ihrer Instandhaltung und in der Entwicklung des Hirns (Armulik *et al.*, 2010; Daneman *et al.*, 2010).

1.1.2 Die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke

Die Barrierefunktion der BHS wird hauptsächlich auf TJ und AJ sowie selektive Transportmechanismen zurückgeführt. Die dichten Zell-Zell-Verbindungen über TJ und AJ, bei der benachbarte EZ über Zelladhäsionsmoleküle miteinander verknüpft sind, haben eine minimierte parazelluläre Permeabilität zur Folge (Hawkins & Davis, 2005; Wolburg & Lippoldt, 2002). Die Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau der TJ.

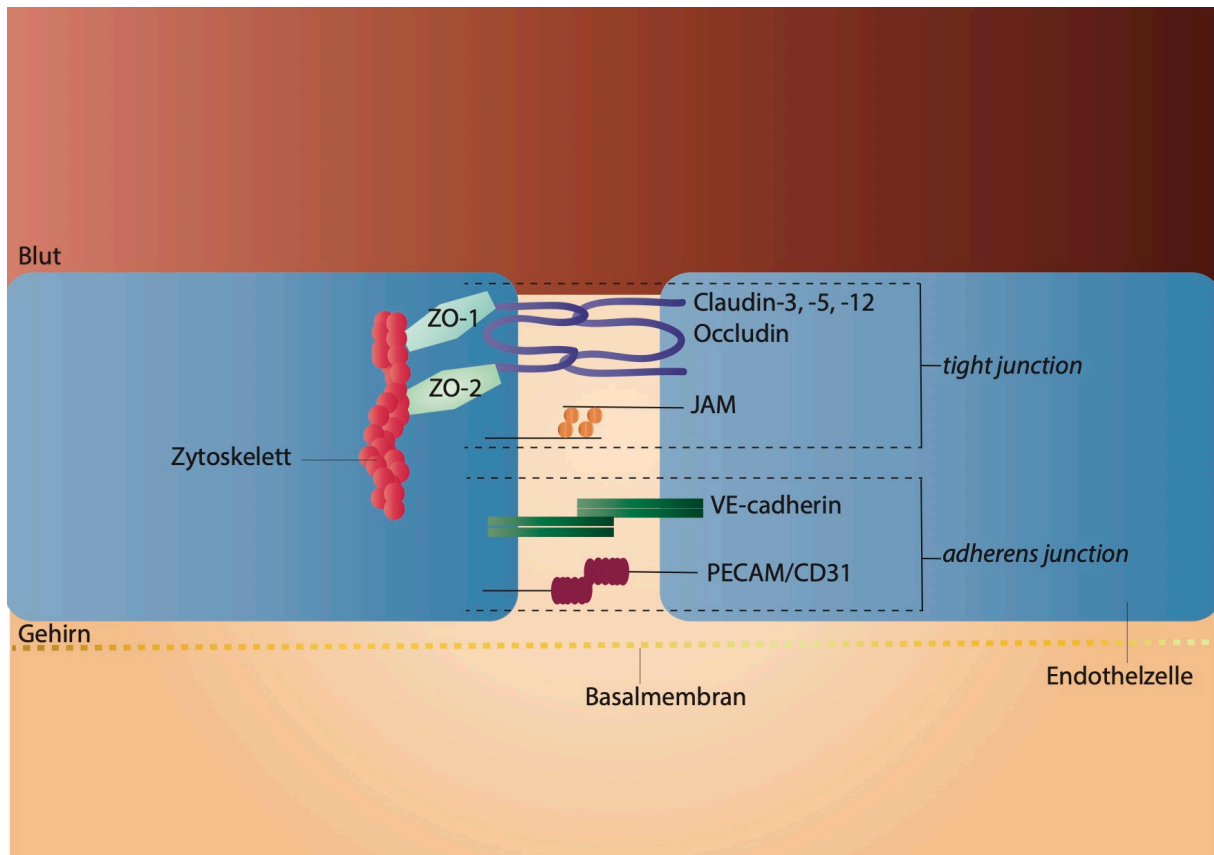


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der tight junctions (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Abbott *et al.*, 2006)). Die transmembranen Proteine Claudin-3, -5 und -12, Occludin sowie junctionale Adhäsionsmoleküle (JAM) sind Hauptbestandteile der TJ. Diese sind über *Zonula Occludens*-Adaptermoleküle ZO-1 und ZO-2 mit dem Zytoskelett verbunden. AJ, welche hauptsächlich aus VE-Cadherin und PECAM/CD31 bestehen, stabilisieren die TJ zusätzlich und tragen so zur Unterbindung der passiven Diffusion großer Moleküle bei.

Die TJ werden hauptsächlich von den transmembranen Proteinen Claudin, Occludin und junctionalen Adhäsionsmolekülen (JAMs) gebildet (Furuse, 2010). Essentiell für ihre Bildung scheinen jedoch nur Claudine, vor allem Claudin-3 und -5, sowie Occludin zu sein (Abbott *et al.*, 2006). JAMs gehören zur Immunoglobulin-Superfamilie, tragen zur Erhaltung und Stabilität der TJ bei und sind somit weitere Regulatoren der parazellulären Permeabilität (Abbott *et al.*, 2006; Martin-Padura *et al.*, 1998). Die Verbindung der transmembranen Proteine der TJ an das Aktin des Zytoskeletts erfolgt über intrazelluläre Membranproteine der *Zonula Occludens*-Familie ZO-1 und ZO-2 (Hawkins & Davis, 2005; Van Itallie & Anderson, 2006). Viele der TJ-Proteine wie Claudin-5 und -12, *Zonula Occludens*-Adaptermoleküle ZO-1 und ZO-2 werden auch von anderen EZ in anderen Geweben exprimiert. Jedoch ist dort die Expressionsrate niedriger, was zu einer geringeren Barrierefunktion führt (Daneman & Prat, 2015; Daneman *et al.*, 2010).

Darüber hinaus werden die Zell-Zell-Verbindungen zusätzlich über AJ, welche über zytoplasmatische Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett der Zellen verbunden sind, stabilisiert (Abbott *et al.*, 2006; Hartsock & Nelson, 2008). Diese bestehen hauptsächlich aus VE-Cadherin (*vascular endothelial cadherin*) und PECAM 1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*)/CD31 (*cluster of differentiation 31*) (Luissint *et al.*, 2012). Studien haben gezeigt, dass VE-Cadherin, welches über Ca^{2+} reguliert wird und über α -, β - und γ -Catenin mit dem Zytoskelett verbunden ist, Zell-Zell-Verbindungen über homophile Interaktionen der Zelladhäsionsmoleküle zwischen benachbarten EZ initiieren (Hawkins & Davis, 2005).

Auf Grund der Expression der endothelialen TJ-Proteine und der daraus resultierenden dichten Zell-Zell-Kontakte weisen die zerebralen mikrovaskulären EZ hohe Dichtigkeit auf, die durch den sogenannten transendothelialen elektrischen Widerstand (*transendothelial electrical resistance*, TEER) beschrieben werden kann. Bei einer intakten BHS führt dies zu einem TEER von bis zu 8.000 Ωcm^2 beim Menschen, bei einer undichten wird jedoch nur noch ein Wert von 100 – 200 Ωcm^2 erreicht (Crone & Olesen, 1982; Smith & Rapoport, 1986). Im Vergleich dazu beträgt der TEER bei peripheren EZ nur 2 – 20 Ωcm^2 (Crone & Christensen, 1981).

Neben der physikalischen Barriere, welche auf TJ und AJ beruht, wird die Barrierefunktion an der BHS zusätzlich über spezifische Transportwege charakterisiert.

1.1.3 Transportwege an der Blut-Hirn-Schranke

Auf Grund der selektiven Barriere an der BHS ist ein Transport lebenswichtiger Nährstoffe ins Hirn aber auch der Abtransport von Abfallstoffen aus dem Hirn nur über spezifische Transporter möglich (Abbott *et al.*, 2006).

Der Transport von kleinen Molekülen an der BHS gliedert sich in parazelluläre und transzelluläre Diffusion. Dieser Transport findet entlang des Konzentrationsgradientens mit Molekülen eines Molekulargewichts von unter 500 Da und weniger als fünf Protonendonatoren statt (Abbott *et al.*, 2006; Roney *et al.*, 2005; Sims, 1986; Szablewski, 2017). Über die parazelluläre Diffusion werden kleine wasserlösliche Stoffe zwischen den Zellen über die TJ ins Hirn transportiert (Abbildung 3a).

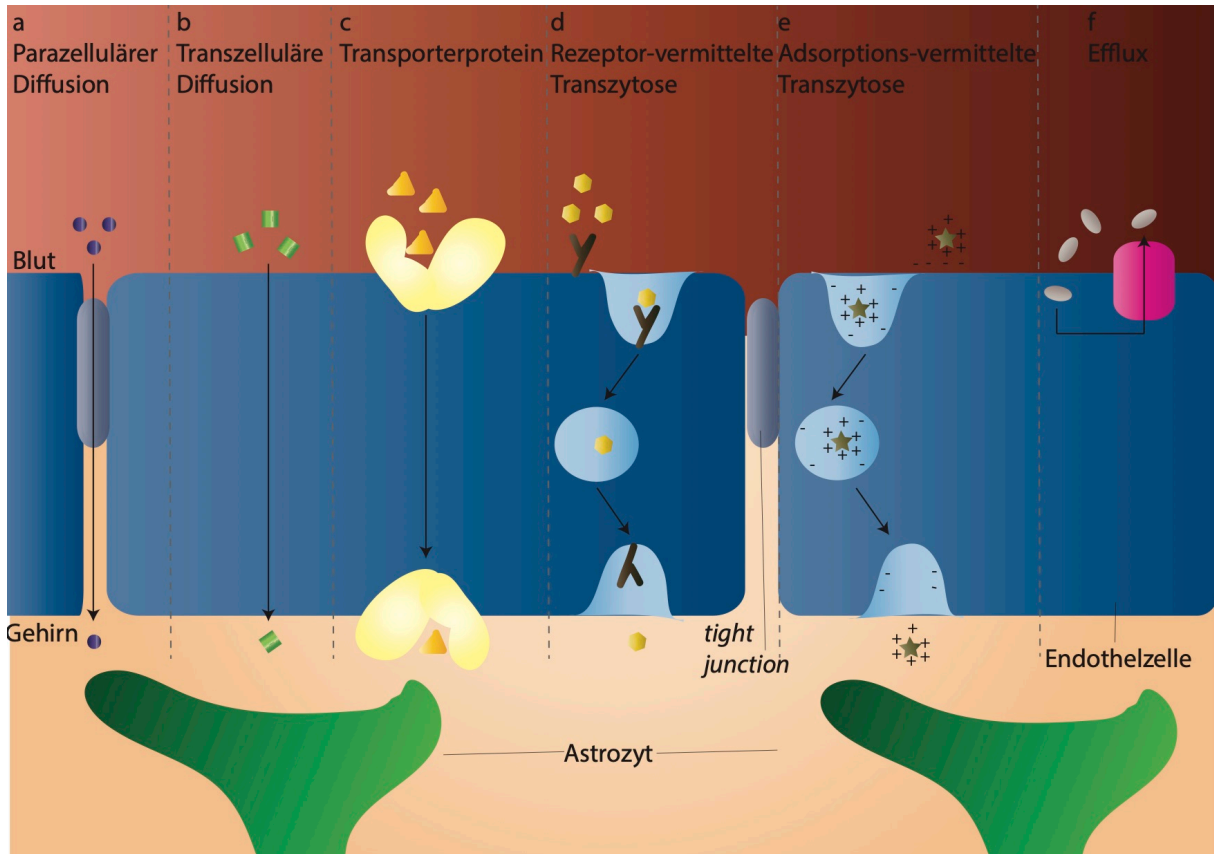


Abbildung 3: Transportmechanismen an der Blut-Hirn-Schranke (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Abbott *et al.*, 2006)). a) Wasserlösliche Moleküle können über passive Diffusion parazellulär die Barriere überqueren. b) Alkohole oder Steroidhormone überqueren die Blut-Hirn-Schranke über transzelluläre Diffusion. c) Aminosäuren oder Glukose gelangen mit Hilfe von Transporterproteinen ins Gehirn. d) Über spezifische Rezeptor-vermittelte Transzytose gelangen Proteine (z.B. Insulin oder Transferrin) ins Gehirn. e) Die Adsorptions-vermittelte Transzytose basiert auf elektrostatische Interaktionen zwischen einem positiv geladenen Molekül oder Peptid und der negativen Ladung der Plasmamembran. f) Der Abtransport unerwünschter Moleküle erfolgt mit Hilfe von Effluxtransportern (z.B. Pgp).

Alkohole oder Steroidhormone gelangen über den transzellulären Transport ins Gehirn (Chen & Liu, 2012) (Abbildung 3b). Da die TJ jedoch den parazellulären Transport an der BHS größerer Moleküle unterbinden, erfolgt die Überwindung der Barriere von größeren Molekülen über spezifische Transporterproteine, Rezeptor- oder Adsorptions-vermittelte Transzytose.

Der Transport von Nährstoffen und großen Molekülen erfolgt über spezifische Transporterproteine wie Glukosetransporter 1 (GLUT1) für Glukose, *large neutral amino acid transporter* 1 (LAT1) für Aminosäuren sowie eine Vielzahl weiterer Transporter für Nukleoside und Nukleinbasen (Begley & Brightman, 2003) (Abbildung 3c).

Die Rezeptor-vermittelte Transzytose wird für den Transport von regulatorischen Molekülen (z.B. Insulinrezeptor für Insulin, Transferrinrezeptor TfR für Transferrin, *low density lipoprotein receptor* LDLR für Lipoproteine) verwendet (Rip *et al.*, 2009). Nach der Bindung des Liganden kommt es am Rezeptor zur Bildung von Vesikeln, die den Transport des Liganden über die Barriere ermöglichen (Endozytose) (Chen & Liu, 2012) (Abbildung 3d). *Lipoprotein receptor-related protein* (LRP) 1 und 2 sind für den Transport von Apolipoprotein E zuständig und gelten auch als mögliche Rezeptoren für den Transport von z.B. NP an der BHS (Kreuter, 2014).

Bei der Adsorptions-vermittelten Transzytose, welche auf elektrostatischen Interaktionen zwischen einem positiv geladenen Molekül oder Peptid und der negativen Ladung der Plasmamembran beruht, werden Serumproteine wie Albumin ins Hirn transportiert (Chen & Liu, 2012) (Abbildung 3e).

Beim aktiven Transport unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) über *ATP-binding cassette* transporter (ABC-Transporter) können Stoffe auch entgegen des Konzentrationsgradientens ins Hirn hinein oder hinaus transportiert werden (Abbildung 3f). Zu dieser Gruppe gehören Effluxtransporter wie z.B. P-Glykoprotein (Pgp), *multidrug resistance protein* (MDR1), Transporter der *multidrug resistance-related protein* (MRP) oder *Breast cancer-resistance protein* (BCRP) Familie, welche hauptverantwortlich für den Abtransport von Neurotoxinen und Arzneistoffen aus dem Hirn sind (Begley, 2004; Ohtsuki & Terasaki, 2007). Dies hat zur Folge, dass eine Vielzahl an Stoffen, welche die BHS erfolgreich überwinden konnten, von den Effluxtransportern wieder aus dem Hirn entfernt werden. Dieser Abtransport stärkt somit zusätzlich die Barriere. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von Pgp zu einer erhöhten Ansammlung von Arzneistoffen im Hirn führte (Kemper *et al*, 2004).

1.1.4 Modelle der Blut-Hirn-Schranke

Das am häufigsten verwendete Modell für die BHS basiert auf dem Einsatz von Transwell-Membraneinsätzen mit einem oder mehreren Zelltypen (Endothelzellen mit AZ oder PZ) (Helms *et al*, 2016). Die EZ werden auf einer synthetischen, porösen Membran kultiviert, sodass eine luminale sowie basolaterale Seite entsteht. Für eine Co-Kultur mit weiteren Zelltypen können diese entweder direkt auf die Unterseite der Membran oder auf den Boden der Zellkulturware für einen indirekten Kontakt kultiviert werden (Kaisar *et al*, 2017). Durch die Co-Kultur werden Wachstumsfaktoren von AZ und PZ abgegeben, die die Dichtigkeit der Barriere erhöhen können (Hatherell *et al*, 2011; Wolff *et al*, 2015). Darüber hinaus ist auch die Stimulation der EZ über konditionierte Medien möglich. Zusätzlich gibt es bei Modellen der BHS das Potential weitere physikalische Parameter wie mittels Pumpe die Anlegung eines Flusses und des daraus resultierenden Scherstresses für einen dynamischen Aufbau sowie die Beobachtung wichtiger Parameter wie Permeabilität und TEER hinzuzufügen (Hajal *et al*, 2018). Bei einer Kultivierung von EZ in Co-Kultur mit AZ konnte beobachtet werden, dass die Anlegung eines Flusses zu einem realistischerem Modell, welches die physiologischen Bedingungen an der BHS simuliert, führte und eine verringerte Permeabilität und somit einen erhöhten TEER zur Folge hatte (Siddharthan *et al*, 2007).

Beim Aufbau eines 3D-Modells der BHS wurden bisher verschiedene Ansätze mit synthetischen Membranen oder extrazellulären Matrices verfolgt. Matrigel bildet dicke, lose vernetzte Gele aus, die eine dreidimensionale Organisation der Zellen fördert (Kaisar *et al*, 2017). Mit einer hohlen Schlauchstruktur, bestehend aus einer Mischung aus Kollagen und hBMEC, welche mit PZ und AZ beschichtet wurde, konnte ein physiologisch realistisches Modell zur Untersuchung der Permeabilität und Entzündungen aufgebaut werden (Herland *et al*, 2016). Kim *et al*. druckte einen Rahmen mit Mikronadeln, welche mit einer Kollagenmischung befüllt wurde. Nach Entfernung der Nadeln blieben hohle Mikrostrukturen zurück. Diese konnten zur Kultivierung von EZ genutzt werden (Kim *et*

al, 2015). Ein schematischer Überblick von *in vitro*-Modellen der BHS ist in Abbildung 4 dargestellt.

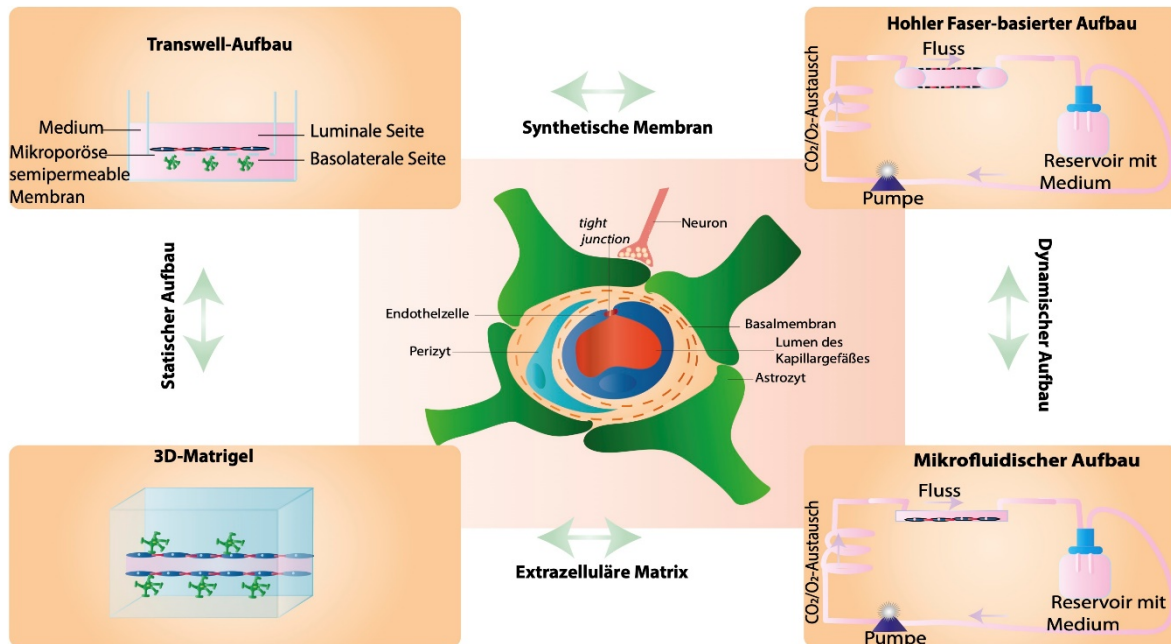


Abbildung 4: Schematischer Überblick der *in vitro*-Modelle der Blut-Hirn-Schranke (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Kaiser *et al.*, 2017)). Neben den einfachen Transwell-Membraneinsatzmodellen werden vermehrt auch dynamische Modelle sowie 3D-Modelle eingesetzt. In diesen Modellen werden nur EZ oder EZ in Co-Kultur mit weiteren Zellen, die an der Bildung der BHS beteiligt sind, eingesetzt. Neben dem Aufbau auf synthetischen Membranen besteht auch die Möglichkeit Modelle mit Hilfe einer extrazellulären Matrix aufzubauen.

Mikrofluidische Modelle der BHS bieten nicht nur die Möglichkeit 3D-Modelle aufzubauen, sondern ermöglichen auch Permeabilitätsmessungen und, bei Einbau von Elektroden, Impedanzmessungen zur Analyse des TEER unter Fluss (Hajal *et al.*, 2018). Hierbei wurden bereits aus iPSC differenzierte hBMEC eingesetzt und es konnte gezeigt werden, dass sich auch bei diesen Zellen unter Fluss und Einwirkung des Scherstress die Permeabilität, bei Erhalt der Barriere von bis zu 21 Tagen, verringerte (Faley *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017). Auf Grund nicht vorhandener Elektroden zur parallelen Impedanzmessung während des angelegten Flusses eignet sich dieses Modell jedoch bisher nur als Grundlage zur Modellierung von Erkrankungen der BHS (Faley *et al.*, 2019).

Um auch zur Untersuchung verschiedener Arzneistoffe und Wirkstoffträger verwendet werden zu können, bedarf es neben der Sensoren für verschiedene Messungen (Fluss, Temperatur, Druck, Impedanz/TEER) auch die Möglichkeit den Zustand der Zellen im Modell während des Experiments mikroskopisch überprüfen zu können (Bhatia & Ingber, 2014; Esch *et al.*, 2015; Hajal *et al.*, 2018).

Auf Grund der Unterschiede (molekular, genetisch, immunologisch sowie zellulär) zwischen Mensch und Tier eignen sich Tiermodelle nur begrenzt für Untersuchungen von Erkrankungen und potentiellen Arzneistoffen (Chesselet & Carmichael, 2012; Mak *et al.*, 2014). Dies erschwert die Translation der Ergebnisse aus den Tiermodellen auf den Menschen. Hinzu kommt, dass vor allem *in vivo*-Tiermodelle nicht nur zeitaufwendig und teuer, sondern auch ethisch kritisch angesehen werden (Chen & Liu, 2012; Hajal *et al.*, 2018). Das ethische Prinzip der „3 R“ (*Replacement*, Vermeidung; *Reduction*,

Reduzierung; *Refinement*, Verbesserung) hat als Ziel die Anzahl an *in vivo* Versuchen durch den Einsatz von alternativen Modellen zu minimieren (Russell & Burch, 1959). Für Zellmodelle wird daher nun vermehrt auf primäre mikrovaskuläre Endothelzellen des humanen Gehirns (*human brain microvascular endothelial cells*, hBMEC) sowie primäre AZ, PZ sowie Neurone gesetzt (Siddharthan *et al.*, 2007). Jedoch gibt es zu den Modellen mit Primärzellen keine Möglichkeit zur Kryokonservierung für eine längere Kultivierung der Zellen (Hajal *et al.*, 2018). Außerdem kommt es bei Immortalisierung der primären Zellen zum Verlust ihrer Barrierefähigkeit (Biemans *et al.*, 2017). Beispielsweise exprimiert die humane immortalisierte Zelllinie hCMEC/D3 zwar alle essentiellen Hirnendothelzellproteine, jedoch erreichen diese Zellen trotz konfluentem Zelllayer TEER-Werte in Höhe von maximal $40 \Omega\text{cm}^2$, was auf eine nicht intakte Barriere hindeutet (Eigenmann *et al.*, 2013). Als vielversprechende Alternative wird die Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) oder embryonalen Stammzellen (ES) zu hBMEC gesehen (Appelt-Menzel *et al.*, 2017; Hollmann *et al.*, 2017; Katt *et al.*, 2016; Lippmann *et al.*, 2012). Neben der Expression essentieller Endothelproteine und einer dichten Barriere gibt es für diese Zellen die Möglichkeit der Kryokonservierung, sodass die Zellen flexibler experimentell genutzt werden können (Wilson *et al.*, 2016).

1.1.5 Stammzellen und ihr Potential beim Einsatz als Hirnendothelzellen

Bei Stammzellen handelt es sich um embryonale oder adulte Zellen, die sich in jede Zelle des menschlichen Organismus differenzieren lassen und sich selbst erneuern können (Zakrzewski *et al.*, 2019). Die Stammzellen werden je nach Differenzierungsgrad in verschiedene Gruppen unterteilt (Abbildung 5).

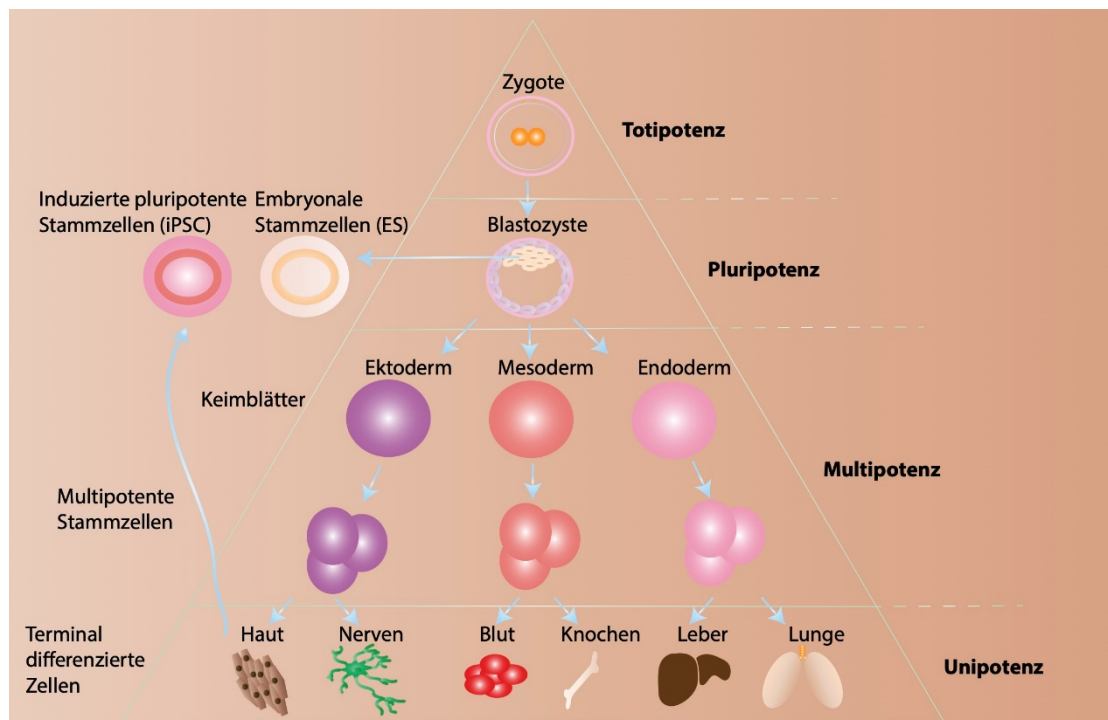


Abbildung 5: Hierarchische Darstellung der potentiellen Entwicklung von Stammzellen (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Sugawara *et al.*, 2012)). Je nach Differenzierungsgrad werden Stammzellen in verschiedene Gruppen unterteilt. Totipotente Zellen wie die befruchtete Eizelle sind in der Lage sich zu jeder beliebigen Zelle zu differenzieren sowie extraembryonale Strukturen zu entwickeln und können somit

einen kompletten Organismus bilden. Pluripotente Stammzellen wie ES aus dem Inneren der Blastozyste oder iPSC, welche aus adulten, somatischen Zellen umprogrammiert werden, können sich zu Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) entwickeln. Multipotente Stammzellen (z.B. hämatopoetische Stammzellen) können sich nur in Zellen eines Gewebes differenzieren. Unipotente Stammzellen (somatische Zellen) können nur Zellen eines Typs bilden.

Unipotente Stammzellen sind normale Körperzellen, die lediglich Zellen eines Typs bilden können (Zakrzewski *et al.*, 2019). Totipotente Stammzellen wie die befruchtete Eizelle bis zum 8-Zellstadium der Morula können, auf Grund ihrer Fähigkeit extraembryonale Strukturen auszubilden, einen kompletten Organismus bilden (Zakrzewski *et al.*, 2019).

Nach vier Tagen sind die Zellen der Blastozyste pluripotent. Pluripotente Stammzellen bilden Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) aus. Da sie jedoch keine extraembryonalen Strukturen wie die Plazenta ausbilden, kann aus diesen Zellen kein ganzer Organismus entstehen.

Multipotente Stammzellen können sich nur zu Zelltypen innerhalb eines Gewebes differenzieren. Zu ihnen gehören u.a. hämatopoetischen Stammzellen, die verschiedene Blutzellen ausbilden können (Zakrzewski *et al.*, 2019).

ES werden zwar meist aus *in vitro*-Befruchtungen gewonnen, ihre Verwendung wird jedoch dennoch ethisch kritisch betrachtet, da diese von vielen bereits als menschliches Wesen mit einem Recht auf Leben gesehen werden. iPSC stellen eine Alternative dar, da diese aus somatischen Zellen umprogrammiert werden (Zakrzewski *et al.*, 2019). 2006 gelang es Takahashi und Yamanaka erstmals adulte Zellen zu iPSC zu reprogrammieren. Dies erfolgte mit Hilfe von Retroviral-vermittelter Transduktion von Oct3/4, Sox2, KLF4 und c-Myc, welche hauptsächlich von ES exprimiert werden (Takahashi & Yamanaka, 2006). Für eine schnelle und kontrollierte Reprogrammierung somatischer Zellen werden meist Fibroblasten verwendet (Zakrzewski *et al.*, 2019). In der gezielten Differenzierung von pluripotenten Stammzellen wird die Entwicklung in der Blastozyste nachgestellt, welche zu der Bildung von ektodermalen, mesodermalen oder endodermalen Vorläuferzellen führt. Unter anderem spielen *fibroblast growth factors* (FGFs), Moleküle der *Wnt*-Familie und *Transforming growth factor-β* (TGFB) eine Rolle (Moustakas & Heldin, 2009; Rao & Kuhl, 2010; Turner & Grose, 2010).

Zur Testung potentieller Arzneistoffe können aus Patienten generierte iPSC genutzt werden, sodass die entwickelten Arzneistoffe später gezielt zur Therapie des Patienten eingesetzt werden können (Rowe & Daley, 2019; Shi *et al.*, 2017). Eine direkte Transplantation von aus Patienten generierten iPSC ist auf Grund der onkogenen Proteine c-Myc und KLF4, welche zur Tumorbildung führen können, sowie den noch potentiell enthaltenden krankheitserregenden Genen nicht möglich (Rowe & Daley, 2019; Yu *et al.*, 2007). Als Alternative bietet sich für die autologe Therapie von Patienten die Transplantation von gezielt zu Geweben differenzierten iPSC, in denen das krankheitserregende Gen mittels der CRISPR/Cas-Methode repariert wurde, an (Rowe & Daley, 2019). Ein Überblick über die mögliche Verwendung von iPSC in der Therapie ist in Abbildung 6 dargestellt.

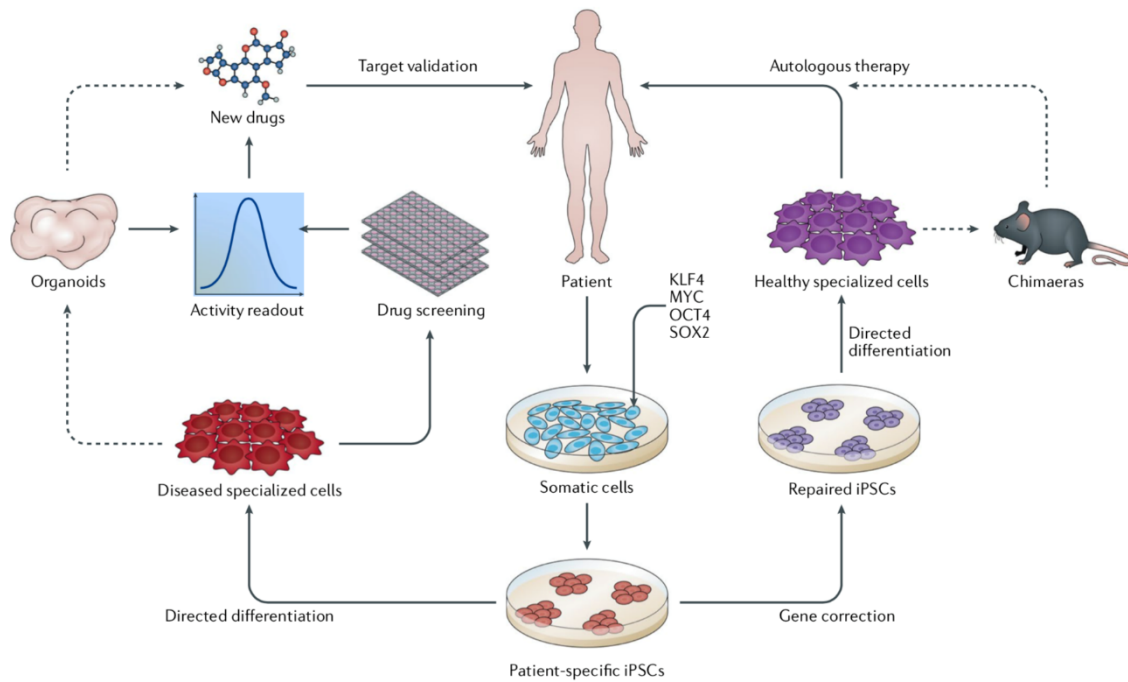


Abbildung 6: Mögliche Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) in der Therapie (Rowe & Daley, 2019). Aus somatischen Zellen des Patienten werden Patientenspezifische iPSC generiert. Für eine autologe Therapie kann das krankheitserregende Gen mittels der CRISPR/Cas-Methode repariert und nach gezielter Differenzierung der Zellen dem Patienten transplantiert werden. Die gezielte Differenzierung der iPSC zu Zellen, welche dem Krankheitsbild entsprechen, können für Arzneimitteltests oder -optimierungen für eine gezielte Therapie genutzt werden.

Neben dem Einsatz in der regenerativen Medizin werden iPSC vermehrt in 3D-Modellen, u.a. auch in *organ-on-a-chip*-Modellen wie z.B. der BHS, verwendet (Faley *et al.*, 2019). Diese werden meist zur Untersuchung verschiedener physiologischer Bedingungen sowie zur Charakterisierung potentieller Arzneistoffe und Wirkstoffträger genutzt (Rowe & Daley, 2019).

Die Differenzierung von Stammzellen zu hBMEC konnte bereits erfolgreich in mehreren Arbeiten gezeigt werden (Appelt-Menzel *et al.*, 2017; Hollmann *et al.*, 2017). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich iPSC auch zu weiteren, an der BHS beteiligten Zellen wie AZ und PZ differenzieren lassen. Auf Grund ihres humanen Ursprungs eignen sie sich so für den Einsatz von Modellen der BHS in präklinischen Untersuchungen. Darüber hinaus bietet die Isolation aus Patienten-generierten iPSC die Möglichkeit ein personalisiertes Modell mit individuellem Krankheitsbild aufzubauen. Die Anlegung eines Mediumflusses und dem daraus resultierenden Scherstress ermöglichen dem Modell die Annäherung an realistische physiologische Bedingungen.

Bereits in Monokultur exprimieren die Zellen alle essentiellen Proteine für den Aufbau und die Erhaltung der BHS mit einem TEER von bis zu $4.000 \Omega\text{cm}^2$ (Appelt-Menzel *et al.*, 2017; Hollmann *et al.*, 2017). Dies bietet eine erste einfache Möglichkeit das Potential sowie die Auswirkungen der Aufnahme und des Transports von Arzneistoffen oder Wirkstoffträgern wie Nanopartikeln unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

1.2 Nanopartikel

Nanopartikel (NP) sind Partikel, die in mindestens einer Dimension eine Größe zwischen 1 und 100 nm besitzen (Auffan *et al*, 2009). Hinzu kommt, dass NP im Vergleich zu Bulkmaterialien auf Grund ihrer größeren Oberfläche reaktiver sind (Shi *et al*, 2013). Gebildet werden sie durch natürliche Ereignisse (Vulkanausbrüche, Waldbrände), als Nebenprodukt industrieller Prozesse oder synthetisch über chemische Prozesse (Senapati *et al*, 2017). Synthetische NP zeichnen sich durch eine einfache Herstellung und Vielfältigkeit bei ihren Materialbestandteilen aus (Rogers & Lewis, 2016). Die Verkleinerung des Materials in den Nanogrößenbereich kann zu wesentlichen Veränderungen in ihren Stoff- sowie Materialeigenschaften (z.B. Löslichkeit, Farbe, Leitfähigkeit oder Schmelzpunkt) führen (Knauer S.K., 2009).

Anwendung finden sie in Produkten der Körperpflege, Katalyse, Optik, Elektronik und Biomedizin (z.B. Arzneistoff- und Gentransport, *tissue engineering*, Krebstherapie, Diagnostik, Bildgebung) (Cho *et al*, 2008; Liang *et al*, 2010; Patel & Kumar, 2019; Tanaka *et al*, 2010; Xu *et al*, 2011; Yan *et al*, 2011). Vor allem in biologischen Systemen finden sie auf Grund ihrer Größenkompatibilität immer mehr Anwendung im biomedizinischen Bereich (Rogers & Lewis, 2016). Trotz vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten können sie toxisches Potential besitzen. So kann es z.B. durch Inhalation von Nanoteilchen aus Luftverunreinigungen zu Lungenentzündungen kommen (Nel *et al*, 2006). Dies hat zur Folge, dass es vor der Verwendung der NP sowie zur Beobachtung von Langzeiteffekten intensiver Beobachtungen und Untersuchungen bezüglich ihres toxischen Potentials bedarf.

1.2.1 Biomedizinische Anwendungen für Nanopartikel

Im biomedizinischen Bereich gibt es für NP eine Vielzahl möglicher Anwendungen. Superparamagnetische Eisenoxide werden bereits im medizinischen Alltag als Kontrastmittel in der Kernspin- sowie Magnetresonanztomographie und bei Hyperthermiebehandlungen eingesetzt (Huber, 2005; Najafzadeh & Anderson, 2018). Die Hyperthermiebehandlung wird zur gezielten Behandlung von Tumorzellen verwendet. Hierfür werden Eisenoxide in das betroffene Gewebe injiziert, sodass die Tumorzellen gezielt bei Anlegen eines elektrischen Feldes erhitzt und somit zerstört werden (Johannsen *et al*, 2005). Verloren gegangenes Gewebe, wie z.B. Haut bei Verbrennungen oder Herzgewebe nach Infarkten, kann beim *tissue engineering* mittels nanostrukturierter Oberflächen rekonstruiert werden (Riehemann *et al*, 2009).

NP werden auch als Wirkstoffträger (*drug delivery systems*) zur Behandlung von chronischen Erkrankungen oder Krebs eingesetzt (Najafzadeh & Anderson, 2018). Hierfür eignen sich vor allem Polymere in Form von Liposomen, Dendrimeren oder NP (Najafzadeh & Anderson, 2018). Diese sind oft nicht nur wasserlöslich, nicht toxisch und biologisch abbaubar, sondern auch stabil in der Blutbahn und können auf Grund ihrer Größe Zellmembranen überwinden (Godwin *et al*, 2001; Haag & Kratz, 2006; Kopecek *et al*, 2000). Das Bestreben beim Einsatz von NP als Wirkstoffträger ist nicht nur eine gezielte Freisetzung des Arzneistoffes in den Zielorganen, sondern auch dessen frühzeitigen Abbau zu verhindern und die benötigte Dosis und seine Nebenwirkungen im gesunden Gewebe zu reduzieren (Najafzadeh & Anderson, 2018).

1.2.2 Nanopartikel als Wirkstoffträger an der Blut-Hirn-Schranke

Ausnahmslos alle großen und eine Vielzahl an kleinen molekularen Arzneistoffen können die BHS auf Grund der Barriere-bildenden TJ nicht über passive Diffusion überwinden (Pardridge, 2005). Bisher konnten nur 3 bis 5 % der Arzneistoffe zur Behandlung von neurologischen Erkrankungen die klinische Phase erreichen, da vielen das Überwinden *in vivo* nicht gelang (Pardridge, 2002). Um die Anzahl an Arzneistoffen, welche die Barriere erfolgreich überwinden können, zu erhöhen, gibt es die Möglichkeit die Barriere kurzzeitig durch das Aufbrechen der TJ mittels osmotischen Drucks, Mikrobläschen oder fokussiertem Ultraschall zu öffnen (Chu *et al*, 2016; Gumerlock *et al*, 1992; Wu *et al*, 2017). Dies kann jedoch neben einer irreversiblen Zerstörung der Barriere auch zu unkontrolliertem Eindringen von Arzneistoffen, ungewollten Bakterien, Toxinen und anderen Molekülen führen (Upadhyay, 2014). Für einen erfolgreichen Einsatz als Wirkstoffträger an der BHS bedarf es einer Vielzahl notwendiger Eigenschaften der NP, die in einer Übersicht in Abbildung 7 gezeigt werden.



Abbildung 7: Notwendige Eigenschaften von Nanopartikeln für den Einsatz als Wirkstoffträger (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Bleul, 2014)). Inorganische sowie Polymere Nanopartikel können auf Grund ihrer einstellbaren Form, Größe und unterschiedlichen biokompatiblen Materialien als Wirkstoffträger eingesetzt werden. Neben einer gezielten Adressierung der Zielzellen und einer verlängerten Blutzirkulation bieten Nanopartikel dem Wirkstoff die erleichterte Überwindung von Barrieren, Schutz vor vorzeitigem Abbau und minimieren seine Nebenwirkungen in gesundem Gewebe.

Inorganische sowie polymere NP werden als potentielle Wirkstoffträger der BHS auf Grund ihrer Größe, modulierbare Form sowie der Möglichkeit ihre Oberfläche zu modifizieren gesehen (Hajal *et al*, 2018). Mit NP können neben molekularen Arzneistoffen auch Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper oder retrovirale Arzneistoffe über die BHS transportiert werden (Koffie *et al*, 2011; Loureiro *et al*, 2016; Mahajan *et al*, 2010; Peluffo *et al*, 2015; Reimold *et al*, 2008; Wohlfart *et al*, 2012). Der Vorteil der NP ist, dass diese einfach und günstig in ihrer Synthese, biokompatibel, über lange Zeit stabil, kontrollierbar in ihrer Beladung sowie Freisetzung des Arzneistoffes sind und eine erhöhte Effizienz in

der Adressierung der Zielzellen im Vergleich zum ungeschützten Arzneistoff besitzen (Nance *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Inorganische NP (z.B. aus Gold, Silika oder Zinkoxide) sind in ihrer Größe und Form sehr gut kontrollierbar, jedoch nicht bioabbaubar und oft toxisch, sodass sie meist nur in der Bildgebung oder in der Theranostik eingesetzt werden (Hajal *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018). Im Vergleich dazu sind polymere NP (z.B. Liposome, Polybutylcanoacrylat PBCA, Polylactid-co-Glycolid PLGA oder Polylactid PLA) in ihrer Größe und Form schwerer einzustellen, aber ihre Polymerzusammensetzung, die Verkapselung des Arzneistoffes sowie die Oberflächenmodifikation kann einfach variiert werden (Hajal *et al.*, 2018). Je nach eingesetztem Polymer können Arzneistoffe unterschiedlichen Molekulargewichts, physiologischen Eigenschaften und Wasserlöslichkeit verkapselt werden (Saraiva *et al.*, 2016).

Vor allem PLGA sowie PLA eignen sich für einen Transport von Arzneistoffen an der BHS, da sie biokompatibel und die Kinetiken im Reagenzglas zur Hydrolyse in ihre Monomere bekannt sind (Ramot *et al.*, 2016). Die bioabbaubaren Monomere, Milchsäure sowie bei PLGA zusätzlich noch die Glykolsäure, können im Krebszyklus verstoffwechselt werden (Mahapatro & Singh, 2011). Außerdem sind beide Polymere von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) für den pharmazeutischen Einsatz im Menschen bewilligt (Zhou *et al.*, 2018). Die Toxizität der polymeren NP wird neben der Reinheit, der Konzentration sowie des Polymermaterials auch von dessen Größe, Form, Oberfläche und Ladung beeinflusst (Olivier *et al.*, 1999).

Die BHS kann von NP über Transzytose mit den Zellen oder über passive Akkumulation überwunden werden (Zhou *et al.*, 2018). Bei der passiven Überwindung handelt es sich um einfache Diffusion der NP, die so vor allem von Tumorzellen aufgenommen werden. Dies ist auf den EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*) zurückzuführen (Maeda *et al.*, 2000). Auf Grund des geschädigten Lymphsystems, der Angiogenese und den porösen EZ im Tumorgewebe kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der BHS und somit zur Ansammlung von Makromolekülen im Gewebe (Maeda *et al.*, 2000). Dieser ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

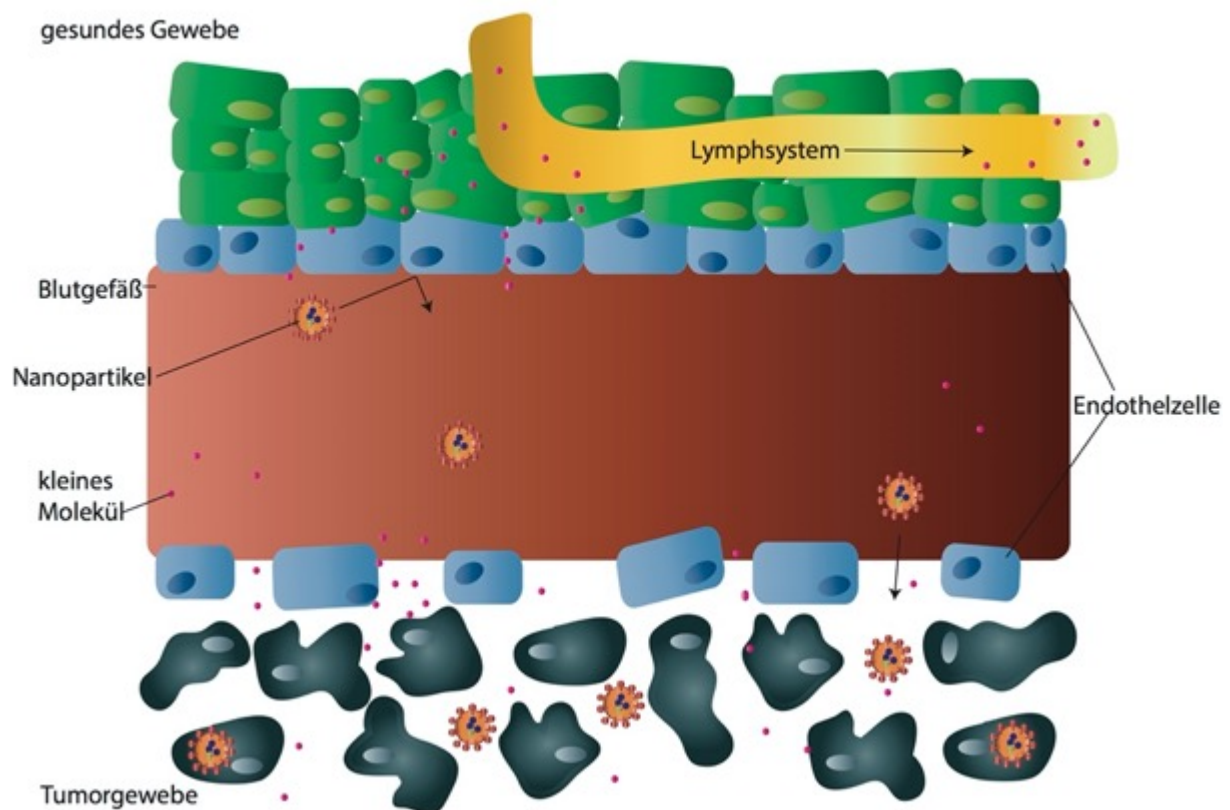


Abbildung 8: Der EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*, eigene Darstellung, in Anlehnung an (Stockhofe *et al.*, 2014)). Kleine Moleküle können in gesundem wie auch in erkranktem Gewebe aufgenommen werden. Jedoch kommt es in gesundem Gewebe auf Grund des intakten Lymphsystems zu dessen Abtransport. Im Vergleich zu kleinen Molekülen können Nanopartikel nur in geschädigtes Gewebe eindringen. Im gesunden Gewebe ist dies wegen der intakten Endothelschicht nicht möglich.

Ein solcher Zusammenbruch der BHS, welche auf den Verlust oder die verringerte Expression von Claudin-1 und -3 sowie die Ansammlung von Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) zurückgeführt werden kann, ist bei Multipler Sklerose sowie Hirntumoren der Fall (Davies, 2002; Minagar & Alexander, 2003; Sato *et al.*, 1994; Wolburg *et al.*, 2003). Hinzu kommt, dass bei Multipler Sklerose Lamin, ein Bestandteil der Basalmembran, verstärkt abgebaut wird (Oki *et al.*, 2004). Da der EPR-Effekt jedoch hauptsächlich nur bei einer bereits geschädigten BHS wie bei Hirntumoren oder Multipler Sklerose vorkommt, eignet sich die passive Akkumulation nicht für eine Behandlung von Erkrankungen, bei der die BHS, wie z.B. im frühen Tumorstatus, noch nicht beschädigt ist.

Eine Größe der NP zwischen 50 und 100 nm erhöht die passive Aufnahme über einen transzellulären Transport, wohingegen größere Partikel oft eine gezielte Modifikation für einen aktiven Transport benötigen (Hajal *et al.*, 2018). Beim aktiven Transport über die BHS handelt es sich um eine Rezeptor- und Adsorptions-vermittelte Transzytose sowie den Transport mittels Transporterprotein, welche meist unter Energieverbrauch stattfinden (Grabrucker *et al.*, 2016; Herve *et al.*, 2008; Pulicherla & Verma, 2015). Es konnte bereits eine erfolgreiche Überwindung der Barriere von PLGA- und PLA-NP sowie Liposome über den Transferrin-, Insulin- sowie *low density lipoprotein*-Rezeptor gezeigt werden (Zhou *et al.*, 2018). Am häufigsten befindet sich auf EZ der Transferrin-Rezeptor, welcher auch in erhöhter Zahl auf Zellen bösartiger Hirntumoren vorzufinden ist und sich somit für eine gezielte Adressierung in der Tumorthherapie im Hirn eignen könnte (Hajal *et al.*, 2018).

Für eine Erhöhung der Aufnahmeeffizienz kann die Oberfläche der NP mit einem Tensid (z.B. Polysorbat 80) oder kovalent mit einem Zielliganden wie Transferrin modifiziert werden (Zhou *et al.*, 2018). Die Interaktionen der Partikeloberfläche mit im Blut befindlichen Proteinen beeinflussen die Dauer der Partikelzirkulation im Blut und auch die Wahrscheinlichkeit die BHS überwinden zu können (Hajal *et al.*, 2018). Diese neue Identität, welche auf die Proteinkorona zurückzuführen ist, hat Einfluss auf die Zirkulationsdauer, Signale, Kinetik, Toxizität, Zellaufnahme sowie Agglomeration der Partikel (Monopoli *et al.*, 2012; Treuel & Nienhaus, 2012). Abbildung 9 zeigt eine Übersicht an möglichen Transportmechanismen von NP zur Überwindung der BHS.

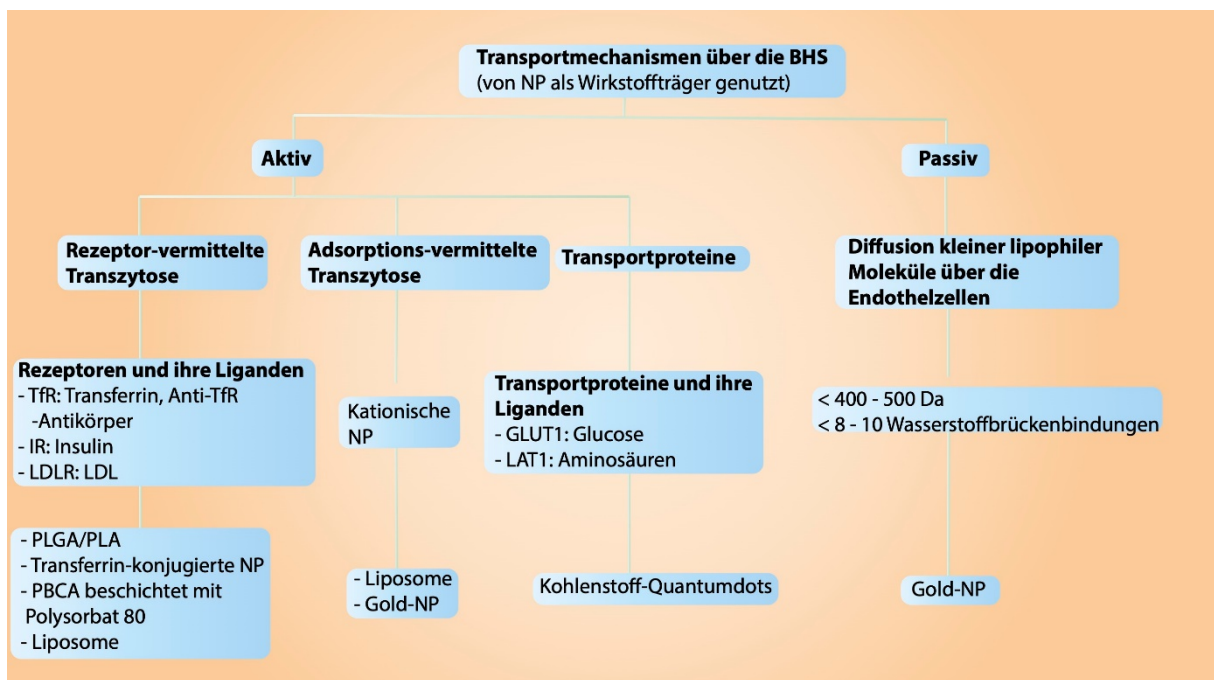


Abbildung 9: Transportmechanismen von Nanopartikeln zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Zhou *et al.*, 2018)). NP können an der BHS über passive wie auch aktive Transportwege ins Gehirn gelangen. Der passive Transport kann jedoch nur von lipophilen Partikeln mit einer Größe von weniger als 500 Da, wie z.B. einigen Gold-NP, erfolgen. Die Überwindung der Barriere von kationischen NP (z.B. Liposome oder Gold-NP) basiert auf Adsorptions-vermittelter Transzytose. Große Moleküle (z.B. PLGA, PLA-, PBCA-NP oder Liposome) werden über Rezeptor-vermittelte Transzytose transportiert.

1.2.3 Proteinkorona

Proteine in biologischen Systemen wie z.B. Blut adsorbieren auf der NP-Oberfläche und bilden auf ihr eine Proteinkorona (PK) aus (Monopoli *et al.*, 2013). Diese entsteht sofort nach Kontakt der NP mit biologischen Systemen (Patel & Kumar, 2019). Es wird diskutiert, dass es neben einer harten auch eine weiche PK gibt. Die weiche PK setzt sich hauptsächlich aus den am häufigsten in der biologischen Umgebung vorkommenden Proteinen zusammen (Patel & Kumar, 2019). Auf Grund der niedrigen Affinität dieser Proteine werden diese über die Zeit mit Proteinen höherer Affinität ergänzt (*Vroman's effect*) (Patel & Kumar, 2019). Dieser Effekt führt zur Bildung einer harten Korona und zeigt, dass die PK nicht starr, sondern dynamisch ist (Monopoli *et al.*, 2011; Patel & Kumar, 2019; Tenzer *et al.*, 2013). Die Proteine der harten Korona sind irreversibel und stellen die Hauptbestandteile der neuen Identität der NP dar (Cedervall *et al.*, 2007; Nel *et al.*, 2009; Treuel & Nienhaus, 2012). Die Adsorption der Proteine auf der NP-Oberfläche kann jedoch

zu einer Änderung ihrer Konformation führen, sodass die Proteine zum Teil denaturieren und nicht mehr funktionsfähig sind (Müller *et al*, 2018; Yan *et al*, 2013).

Physikochemische Eigenschaften der NP wie Größe, Form, Oberflächenladung, funktionelle Gruppen, Hydrophilie sowie Hydrophobie haben Einfluss auf die Bildung der PK (Kharazian *et al*, 2016; Tenzer *et al*, 2011). Aber auch biologische und physiologische Umgebung und die Verweilzeit der NP in der biologischen Umgebung spielen eine wichtige Rolle (Patel & Kumar, 2019; Tenzer *et al.*, 2013). Eine Vielzahl intermolekularer Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte sowie Solvatisierung prägen die Bildung und die Zusammensetzung der PK (Foroozandeh & Aziz, 2015; Wolfram *et al*, 2014). Eine Analyse der PK kann unter anderem mittels dynamischer Lichtstreuung, Zetapotentialsmessung, UV-Spektroskopie und zur Analyse der genauen PK-Zusammensetzung mit Hilfe von Elektrophorese, Chromatographie und Massenspektrometrie durchgeführt werden (Shah & Singh, 2019). Faktoren, welche die Bildung der PK beeinflussen, sind in Abbildung 10 dargestellt.

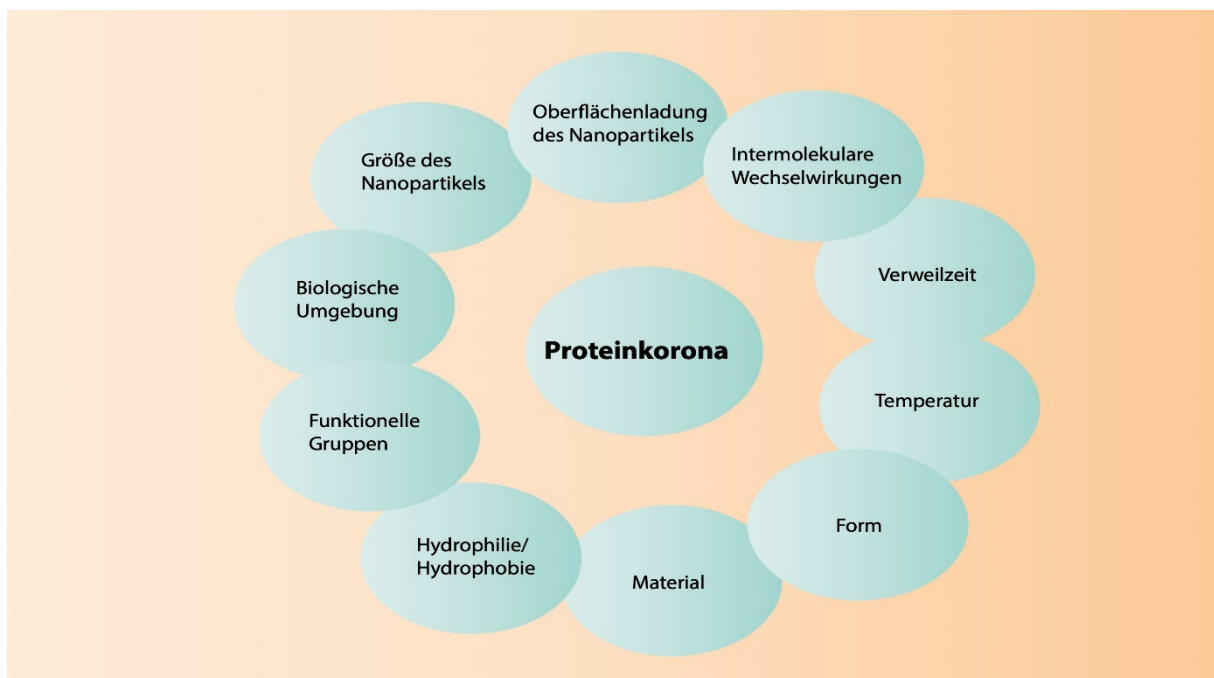


Abbildung 10: Übersicht der Bildung und Zusammensetzung der Proteinkorona beeinflussende Faktoren (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Patel & Kumar, 2019)). Neben physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel haben auch die biologische und physiologische Umgebung sowie die Verweilzeit der Nanopartikel darin einen Einfluss auf die Bildung sowie die Zusammensetzung der Proteinkorona.

Auffällig bei der PK-Zusammensetzung ist, dass diese nicht die Zusammensetzung der vorkommenden Proteine der biologischen Umgebung wie z.B. Blut widerspiegelt (Patel & Kumar, 2019). Jedoch ist Albumin, das Hauptprotein im Blut, häufig Bestandteil der Korona (Patel & Kumar, 2019). Neben diesem sind auch Fibrinogene, Apolipoprotein E, *Complement Component C3* und Immunglobuline in Koronen verschiedener NP vorzufinden und bekannt dafür die Target-Effizienz sowie die Opsonisierung der NP zu verändern (Nagayama *et al*, 2007; Patel & Kumar, 2019). Vor allem polymere NP binden eine Vielzahl unterschiedlicher Apolipoproteine (Shah & Singh, 2019).

Die Oberflächenladung der NP bestimmt welche Arten von Proteinen gebunden werden. NP binden ohne Ladung im Vergleich zu positiv oder negativ geladenen NP weniger

Proteine (Aggarwal *et al*, 2009). Gleichzeitig erhöht eine hydrophobe Oberfläche die Proteinadsorption und Opsonisierung der NP (Patel & Kumar, 2019). Um die Zirkulationszeit und somit auch die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen ihre Zielzellen zu erreichen, kann die Oberfläche der NP mit Polyethylenglycol (PEG), welches die unspezifische Zellaufnahme reduziert, funktionalisiert werden (*stealth effect*) (Muller *et al*, 2017; Schottler *et al*, 2016; Settanni *et al*, 2018).

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Der BHS kommt zwar eine essentielle physiologische Bedeutung zu, die Barrierefunktion geht allerdings auch mit Herausforderungen für pharmakologische Therapieansätze einher. Zwar gibt es potentielle Arzneistoffe zur Behandlung neurodegenerativer und anderer Erkrankungen des ZNS, jedoch können diese auf Grund der BHS nicht an ihre Zielregion im Hirn gelangen. Dies hat zur Folge, dass diese Erkrankungen bisher nur symptomatisch, aber nicht kausal behandelt werden können.

Modelle der BHS könnten neben der allgemeinen Untersuchung der Barriere auch für die Entwicklung und Charakterisierung geeigneter Arzneistoffe sowie Wirkstoffträgersysteme wie NP und deren BHS-Gängigkeit eingesetzt werden. Kritisch für eine erfolgreiche Translation der Forschungsergebnisse in die Klinik ist die realitätsnahe Simulation der physiologischen Bedingungen des menschlichen Körpers. Für Untersuchungen der BHS werden jedoch häufig Tiermodelle oder Zellen nicht-menschlichen Ursprungs verwendet, die häufig auch keine dichte Barriere aufbauen. Dies kann die Übertragbarkeit auf den Menschen deutlich erschweren.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein realitätsnäheres *in vitro*-Modell der BHS zu etablieren und dieses für die biologische Charakterisierung von polymeren NP als potentielle Wirkstoffträgersysteme einzusetzen. Für den Aufbau des BHS-Modells werden iPSC verwendet, die zu Barriere-bildenden hBMEC differenziert werden sollen. Neben dem humanen Ursprung der Zellen steht die Reproduzierbarkeit, eine intakte Barriere, welche den parazellulären Transport kleiner Moleküle unterbindet, sowie die Expression essentieller Endothelzell- und TJ-assoziierten Proteine zum Aufbau einer dichten Barriere im Fokus. Des Weiteren soll das Modell in ein dynamisches System, d.h. die Zellen werden unter Flussbedingungen zur Nachbildung der Blutströmung kultiviert, übertragen werden.

Zur Referenz bei der biologischen Charakterisierung wurde ein Modell, welches auf der Endothelzelllinie hCMEC/D3 basiert, verwendet. Neben Untersuchungen zur Partikel Aufnahme wurden Analysen zur Untersuchung des toxischen Potentials sowie dem Einfluss der Partikel auf die intakte Barriere der Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden NP aus PLGA und PLLA mit weiteren unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften wie Größe und Oberflächenladung bei gleicher Oberflächenstabilisierung mit Tween® 80 synthetisiert. Final wird die Proteinkorona-Zusammensetzung der NP untersucht.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Name des Gerätes	Hersteller
-80 °C-Gefrierschrank	HERAfreeze HFUT series	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
CO₂-Inkubator	HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Cryobox	Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Durchflusszytometer	BD Accuri™ C6 Flow cytometer	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Epithelialer Voltohmmeter	EVOM2	World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA
Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskop	BX41	Olympus K.K., Shinjuku, JPN
Heiz-Thermo-Mixer	MHR 13	HLC Biotech, Bovenden, DEU
Impedanz-Messgerät	cellZscopeE	nanoAnalytics GmbH, Münster, DEU
Mikroplatten-Photometer	Victor™ X3	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Mikroskopkamera	UC 90	Olympus K.K., Shinjuku, JPN
Multiplattenleser	VICTOR	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DEU
Pipette (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, DEU
Pump-System	ibidi-Pump-System	Ibidi GmbH, Planegg, DEU
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Thermocycler	peqSTAR 2X Gradient	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen DEU

Thermocycler für Real-Time-PCR	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
UV/VIS-Spektralphotometer	Nanodrop® ND-8000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen DEU
Vortexer	Reax control	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DEU
Vortexer	TopMix FB15024	Fisher Scientific GmbH, Schwarte, DEU
Wasserbad	WNB7	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, DEU
Weitfeldfluoreszenzmikroskop	BX51	Olympus K.K., Shinjuku, JPN
Weitfeldfluoreszenzmikroskop	AF7000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DEU
Weitfeldfluoreszenzmikroskop	IX71 mit Delta Vision	Olympus K.K., Shinjuku, JPN
Zentrifuge (groß)	Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zentrifuge (klein)	Heraeus Fresco 32	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

3.1.2 Software

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Softwares.

Name der Software	Version	Entwickler
Adobe Illustrator CC 2018	22.1.0	Adobe Inc., San José, USA
BD Accuri™ C6 Software	1.0.264.21	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
cellSense	2.3	Olympus K.K., Shinjuku, JPN
cellZscopeE	4.3.2	nanoAnalytics, Münster, DEU
CFX Manager™ Software	3.0	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Fiji Is Just ImageJ (Fiji)		Open Source Projekt (https://fiji.sc)
GraphPad Prism	8	GraphPad Software, San Diego, USA
ibidi PumpControl	1.5.0	Ibidi GmbH, Planegg, DEU
LAS X Life Science		Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DEU
NanoDrop 8000	2.3.2	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen DEU
Victor™ Software	3.00 release 2	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
CryoPure-Gefäße (2 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Falcons (15, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Flaschenaufsatzfilter (150, 500 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 300, 1250 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, DEU Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DEU
Reaktionsgefäße (1,5, 2, 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Spritzen (10 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DEU
Transwell-Membraneinsätze (24er mit Porengröße 0,4 µm, 12er mit Porengröße 0,4 und 3 µm)	Corning Inc., Corning, USA
Zellkulturflaschen (25, 75 cm²)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Zellkulturplatten (6er, 12er, 24er, 96er)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Zellkulturslide	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
µ-slide ^{0.4} Luer	Ibidi GmbH, Planegg, DEU

3.1.4 Reagenzien

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Reagenzien.

Reagenzien	Hersteller
4 % Paraformaldehyd in PBS	Alfa Aesar, Haverhill, USA
Accutase	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, DEU
Agarose (Agarose-Tabletten)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
All-trans Retinsäure (RA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Basic fibroblast growth factor (bFGF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cell Mask™ orange	Life Technologies, Carlsbad, USA
Cell-Counting Kit-8	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fibronektin	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, AUT
Fixable Viability Stain 660 (FVS 660)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
GelRed® Nucleid Acid Stain	Biotium Inc., Fremont, USA
Glutamax	Gibco by Life technologies, Carlsbad, USA
Glycerin	VWR International, Radnor, USA
Höchst 33342	Life Technologies, Carlsbad, USA
Humanes Blutplasma	Isoliert aus 20 gesunden Blutspenden, vermengt, hitzeinaktiviert und steril filtriert
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Knockout serum replacement	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Kollagen I	Ibidi GmbH, Planegg, DEU
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lysotracker® Deep Red	Life Technologies, Carlsbad, USA
Matrigel®	Corning Inc., Corning, USA
MEM Non-Essential Amino acids Solution (100X)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Natrium-Heparin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Platelet poor plasma-derived serum (PDS)	Alfa Aesar, Haverhill, USA
ProLong Glass Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Resomer® (R 202 H, R 203 H, RG 502 H, RG 504 H, RG 752 H)	Evonik Industries AG, Essen, DEU
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNeasy Mini Kit	Quiagen N.V., Venlo, NLD
SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit	Bioline, London, GBR
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Steriles Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Tris-Acetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Versene	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA

3.1.5 Medien für die Zellkultur

Tabelle 5: Übersicht der eingesetzten Zellkulturmedien.

Medium	Hersteller	Zelltyp
mTeSR™ Plus	Stemcell Technologies, Vancouver, CAN	<ul style="list-style-type: none"> ▪ iPS(IMR90)-4
mFreSR™	Stemcell Technologies, Vancouver, CAN	<ul style="list-style-type: none"> ▪ iPS(IMR90)-4
Endothel Basal Medium	Promocell GmbH, Heidelberg, DEU	<ul style="list-style-type: none"> ▪ hCMEC/D3 ▪ Differenzierung von iPSC zu hBMEC
DMEM/F12	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ iPS(IMR90)-4 ▪ Differenzierung von iPSC zu hBMEC

3.1.6 Polymere Nanopartikel

Die verwendeten NP wurden von Dr. Anna Musyanovych mittels Miniemulsion hergestellt (Calvo *et al*, 2001; Musyanovych *et al*, 2008). Alle NP wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Perylenmonoimid (PMI) verkapselt und mit Tween® 80 stabilisiert. Hierfür wurden die bioabbaubaren Polymere aus der RESOMER®-Produktreihe RESOMER® R 202 H, RESOMER® R 203 H, RESOMER® RG 502 H, RESOMER® RG 504 H und RESOMER® RG 752 H (alle Evonik) verwendet. Alle Polymere besitzen eine freie Carbonsäure als Endgruppe und liegen amorph vor. Ihre Eigenschaften sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht der Eigenschaften der eingesetzten Polymere.

RESOMER-Typ	Zusammensetzung	Molekulargewicht [kDa]	Viskosität [dl/g]
RESOMER® R 202 H	Poly(D, L-Lactid)	10 – 18	0,16 – 0,24
RESOMER® R 203 H	Poly(D, L-Lactid)	18 – 28	0,25 – 0,35
RESOMER® RG 502 H	Poly(D,L-lactid-co-glycolid) 50:50	7 – 17	0,16 – 0,24
RESOMER® RG 504 H	Poly(D,L-lactid-co-glycolid) 50:50	38 – 54	0,45 – 0,6
RESOMER® RG 752 H	Poly(D,L-lactid-co-glycolid)	4 - 15	0,14 – 0,22

Die Eigenschaften der synthetisierten Nanopartikel sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Nanopartikel.

Name Abkürzung	RESOMER-Typ	Feststoffgehalt [%]	D_z [nm]*	Zetapotential [mV]**
PLLATw-202H PLLA-202	RESOMER® R 202 H	2,07	95 ± 20	-28
PLLATw-203H PLLA-203	RESOMER® R 203 H	2,90	106 ± 24	-25
PLGATw-502H PLGA-502	RESOMER® RG 502 H	1,65	93 ± 23	-29
PLGATw-504H PLGA-504	RESOMER® RG 504 H	2,07	106 ± 25	-33
PLGATw-752H PLGA-752	RESOMER® RG 752 H	1,56	92 ± 21	-24
PLLATw-202H PLLA-202	RESOMER® R 202 H	0,88	63 ± 10	-32
PLLATw-203H PLLA-203	RESOMER® R 203 H	1,61	65 ± 13	-30
PLGATw-502H PLGA-502	RESOMER® RG 502 H	1,05	56 ± 9	-26
PLGATw-504H PLGA-504	RESOMER® RG 504 H	1,48	60 ± 8	-24
PLGATw-752H PLGA-752	RESOMER® RG 752 H	1,01	59 ± 11	-27

*Gemittelter Durchmesser (D_z) wurde mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt. **Das Zetapotential wurde mittels elektrophoretischer Lichtstreuung bestimmt.

3.1.7 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien.

Name der Zelllinie	Hersteller	Zelltyp
hCMEC/D3	Cedarlane, Burlington, CAN	Endothelzelllinie
iPS(IMR90)-4	WiCell Research Institute, Madison, USA	Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)

3.1.8 Primer

Tabelle 9: Sequenz, Länge, Produktlänge sowie Temperatur der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Gen (human), mRNA	Länge [bp]	T_m [°C]	Sequenz
Sox2-for	Sex Determining Region Y-Box 2	26	74	5'-GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG-3'

Sox2-rev		26	74	5'-TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG-3'
Nanog-for	Homeobox Transcription Factor Nanog	25	76	5'-CAG CCC CGA TTC TTC CAC CAG TCC C- 3'
Nanog-rev		25	74	5'-CGG AAG ATT CCC AGT CGG GTT CAC C- 3'
Oct 3/4-for	Octamer-Binding Transcription Factor	24	77	5'-GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG-3'
Oct 3/4-rev		26	75	5'-CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC-3'
BCRP-for	Breast Cancer Resistance Protein	23	62,9	5'-CAG GTC TGT TGG TCA ATC TCA CA-3'
BCRP-rev		22	60,1	5'-TCC ATA TCG TGG AAT GCT GAA G-3'
MDR-1-for	Multidrug-Resistance- Protein 1	20	54,3	5'-TAA TGC CGA ACA CAT TGG AA-3'
MDR1-rev		20	60,5	5'-AGC TGG ACC ACT GTG CTC TT-3'
RPL13A-for	Ribosomal protein 13A	23	64,6	5'-CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA-3'
RPL13A-rev		21	61,2	5'-TCC GTA GCC TCA TGA GCT GTT-3'
ZO-1-for	Zonula occludens-1	20	60,5	5'-TGC CAT TAC ACG GTC CTC T-3'
ZO-1-rev		22	62,1	5'-GGT TCT GCC TCA TCA TTT CCT C-3'
Ocludin-for	Occludin	20	60,5	5'-ACT TCA GGC AGC CTC GTT AC-3'
Ocludin-rev		20	62,5	5'-CCT GAT CCA GTC CTC CTC CA-3'
Claudin-5-for	Claudin-5	21	59,5	5'-GCC CTT AAC AGA CGG AAT GAA-3'
Claudin-5-rev		20	58,4	5'-AAG TAA GGC AGC AGC CAA GA-3'
CD31-for	Cluster of differentiation 31	20	60,5	5'-TTC CGG GAG AAG TGA CCA GA-3'
CD31-rev		20	60,5	5'-AGA GTG AAG ACT GCA GGC AC-3'

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden unter Standardkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Um die Sterilität der Zellen gewährleisten zu können, wurde mit den Zellen unter einer Sterilbank ausschließlich mit vom Hersteller bereits sterilisierten, im Autoklav sterilisierten oder steril filtrierten Medien gearbeitet. Die Tabelle 10 zeigt die eingesetzten Volumina zur Beschichtung und Kultivierung der Zellen in der verwendeten Zellkulturware.

Tabelle 10: Arbeitsvolumina sowie Volumina zur Beschichtung für die verwendete Zellkulturware.

Zellkulturware	Volumen zur Beschichtung	Arbeitsvolumen
12er Transwell-Membraneinsätze	Oben: 250 µl Unten: 1,5 ml PBS	Oben: 500 µl Unten: 1,5 ml PBS
12er Zellkultur-Platte	200 µl	1,5 ml
24er Transwell-Membraneinsätze	Oben: 100 µl Unten: 1 ml PBS	Oben: 350 µl Unten: 1 ml
6er Zellkultur-Platte	1 ml	2 - 4 ml
96er Zellkultur-Platte	50 µl	100 µl
Zellkulturflasche (25 cm²)	1 ml	5 ml

3.2.1.1 hCMEC/D3

Bei den Zellen handelt es sich um eine immortalisierte humane Zelllinie der mikrovaskulären Hirnendothelzellen D3 (*human cerebral microvascular endothelial cells*). Die Tabelle 11 zeigt die für die Kultivierung und Langzeitlagerung verwendeten Medien.

Tabelle 11: Verwendete Medien für hCMEC/D3.

Medium	Komponente	Mixtur
Endothelmedium	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Endothel Basal Medium ▪ bFGF ▪ Natrium-Heparin ▪ FCS 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 42,5 ml ▪ 100 µl ▪ 10 µl ▪ 15%
Einfriermedium für hCMEC/D3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FCS ▪ DMSO 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 95% ▪ 5%

Verwendete Zellkulturware wurde mit 150 µg/ml Kollagen I in H₂O für mindestens 1 h bei 37 °C beschichtet. Vor Verwendung wurde diese mit PBS gespült.

Für die Passage wurden die Zellen zunächst mit 1 ml PBS gewaschen und mittels Zugabe von 1 ml 1x Trypsin bei 37 °C für 7 min gelöst. Durch Zugabe von Endothelmedium wurde die Reaktion gestoppt. Die gelösten Zellen wurden bei 400 g für 5 min zentrifugiert und anschließend in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 ausgesät.

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen einer T25-Flasche wie beschrieben gelöst, in Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses lagerte zunächst für 24 h mit Hilfe des Cryoboys bei -80 °C bevor die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Zum Auftauen der Zellen wurde die im Kryoröhrchen befindlichen Zellen zunächst im Wasserbad bei 37 °C durch Schwenken des Röhrchens aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eisklumpen übrig war. Nach Desinfizierung des Kryoröhrchens wurden die Zellen in 9 ml Medium überführt und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen und auf mit Kollagen I beschichtete T25-Flasche ausgesät.

3.2.1.2 iPS(IMR90)-4

Bei den Zellen der humanen Zelllinie iPS(IMR90)-4 handelt es sich um eine induzierte pluripotente Zelllinie. Diese wurden aus einer Zelllinie humaner Lungenfibroblastenzellen zu iPSC reprogrammiert. Die für die Kultivierung und Langzeitlagerung verwendeten Medien sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Für iPS(IMR90)-4 verwendete Medien.

Medium	Komponente	Mixtur	Bemerkung
mTeSR™ Plus	<ul style="list-style-type: none"> ▪ TeSR™ Plus Basal Medium ▪ mTeSR™ Plus 5X Supplement, 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 400 ml ▪ 100 ml 	Lagerung des angesetzten Mediums bei -20 °C
Einfriermedium für iPS(IMR90)-4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ mFreSR™ 		
DMEM/F12			Wird ausschließlich für die Beschichtung von Zellkulturware verwendet

Für die Beschichtung der Zellkulturware wurde pro 6er Zellkulturplatten 0,5 mg Matrigel eingesetzt. Dieses wurde zunächst in 6 ml kaltem DMEM/F12 durch mehrmaliges Resuspendieren aufgetaut und jeweils 1 ml pro well einer 6er Zellkulturplatte hinzugegeben. Zur Inkubation wurden diese Platten anschließend für mindestens 1 h bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Für eine Lagerung von bis zu 10 Tagen wurde zusätzlich 1 ml DMEM/F12 hinzugegeben.

Die Passage der Zellen erfolgte sobald die Kolonien zu groß waren, zu dicht beieinander waren oder bei einer erhöhten Anzahl an unspezifischen Differenzierungen. Zu Beginn wurden die Zellen mit 1 ml PBS gespült und durch Zugabe von 1 ml Versene für 7 min bei 37 °C gelöst. Anschließend wurde die Substanz abgenommen und die Zellen im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 in 2 ml Medium pro well einer 6er Zellkulturplatten ausgesät. Für eine homogene Verteilung der Zellen wurde die Platte mit den ausgesäten Zellen mehrmals leicht vor- und zurückbewegt.

Um eine ausreichende Versorgung sowie die Erhaltung der Pluripotenz der Zellen erhalten zu können, wurde täglich ein Medienwechsel durchgeführt. Für eine Kultivierung am Wochenende ohne Medienwechsel wurden die Zellen zunächst im Verhältnis 1:10

passagiert und in doppeltem Volumen aufgenommen, sodass ein Medienwechsel am Wochenende entfallen konnte.

Für die langfristige Aufbewahrung der Zellen wurden die gelösten Zellen eines *wells* einer 6er Zellkulturplatten in Einfriermedium resuspendiert und mit Hilfe des *Cryoboy*s über Nacht schrittweise bei -80 °C heruntergekühlt. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Die in einem Wasserbad aufgetauten Zellen wurden tröpfchenweise in ein 15 ml-Falkon überführt, in welches 11 ml Medium hinzugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 200 g für 5 min zentrifugiert und das gewonnene Pellet in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Ein Kryoröhrchen wurde auf 6 *wells* einer 6er Zellkulturplatten ausgesät. Für eine homogene Verteilung der Zellen wurde die Platte mit den ausgesäten Zellen mehrmals leicht vor- und zurückbewegt.

3.2.2 Differenzierung der iPSC zu mikrovaskulären Endothelzellen des humanen Gehirns

Für die Differenzierung von iPSC zu hBMEC (*human brain microvascular endothelial cells*, mikrovaskuläre Endothelzellen des humanen Gehirns) wurden Zellen der Zelllinie IPS(IMR90)-4 verwendet. Es wurde mit einem optimierten Protokoll nach Lippman et al. und Neal et al. (Lippmann *et al.*, 2012; Neal *et al.*, 2019) gearbeitet. Die zur Differenzierung genutzten Zellen wurden zu Beginn im Verhältnis 1:6 ausgesät und in mTeSR™ Plus kultiviert. Die Differenzierung startet mit der Kultivierung der Zellen für 7 Tage in unkonditioniertem Medium (UM). Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen für zwei Tage in EC-Medium mit bFGF und Retinsäure (RA) ohne Mediumswechsel. RA wurde erst kurz vor Benutzung des Mediums frisch hinzugegeben. Die Tabelle 13 zeigt die für die Differenzierung notwendigen Medien.

Tabelle 13: Für die Differenzierung eingesetzte Medien.

Medium	Komponenten	Mixtur	Bemerkung
Unkonditioniertes Medium (UM)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ DMEM / F12 ▪ KOSR ▪ NEAA ▪ Glutamax ▪ β-Mercaptoethanol 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 78,5 ml ▪ 20 ml ▪ 1 ml ▪ 0,5 ml ▪ 0,7 µl 	Steril filtrieren!
EC-Medium	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Endothel Basal Medium ▪ bFGF ▪ PDS ▪ RA 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 50 ml ▪ 0,5 ml 	Steril filtrieren!

Durch Aussaat auf einer Kollagen-Fibronectin-Matrix (100 µg/ml Fibronectin, 400 µg/ml Ratten-Kollagen I in Wasser) erfolgte die Aufreinigung der potentiell durch andere Nervenzellen verunreinigten, unreifen hBMEC. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 ml PBS gewaschen bevor sie für 20 bis 40 min mit Accutase gelöst wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt und die Zellen wurden für 5 min bei 400 g pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in EC-Medium mit bFGF und RA gelöst und

1.000.000 Zellen/cm² ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Kultivierung der Zellen in EC-Medium ohne bFGF und RA bis diese eine vollständige Konfluenz erreichten.

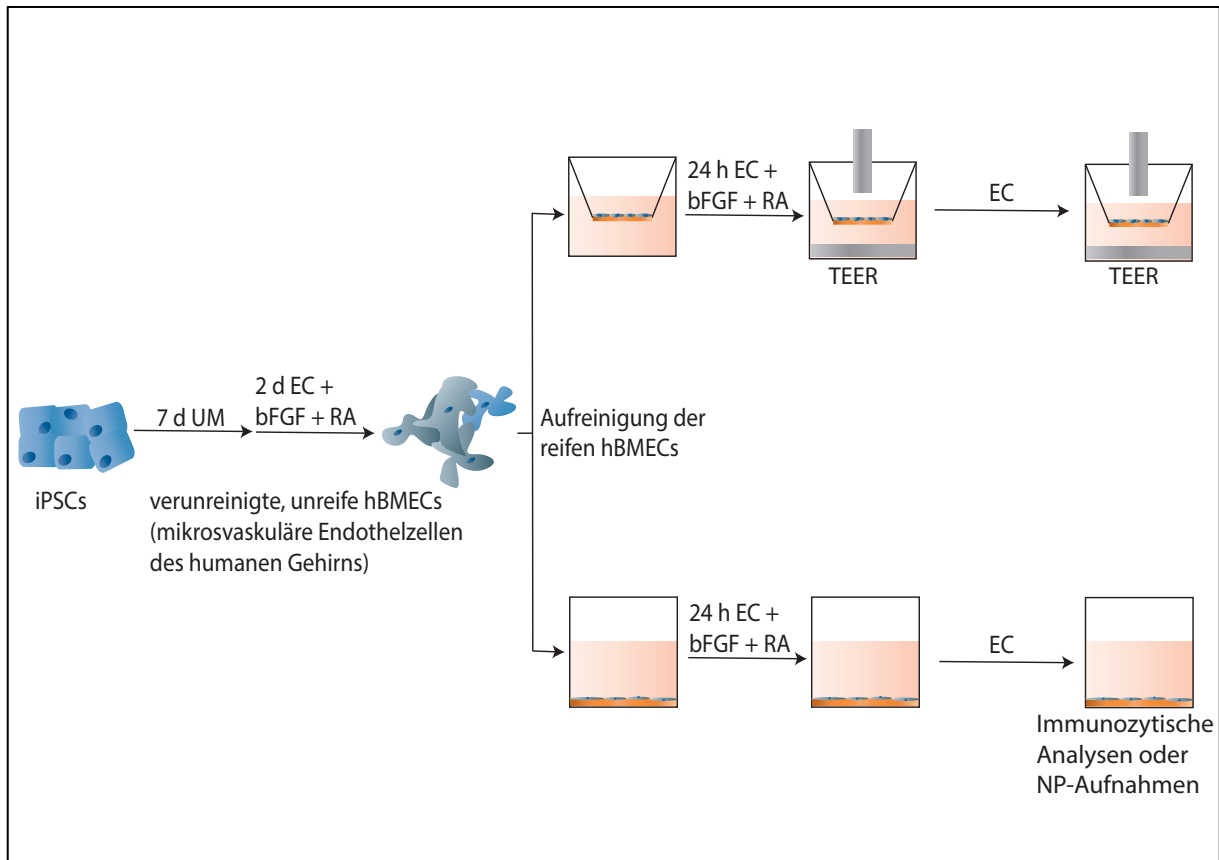


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Differenzierung (nach Lippmann et al. 2012 modifiziert). Die iPSCs wurden für 7 Tage in UM-Medium und anschließend 2 Tage in EC-Medium mit bFGF und RA, welches frisch hinzugegeben wurde, kultiviert. Die potentiell durch andere Nervenzellen verunreinigten, unreifen hBMECs wurden durch Aussaat auf einer Fibronectin-Kollagen-Matrix aufgereinigt und erneut für 24 h in EC-Medium mit bFGF und RA kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung in EC-Medium ohne bFGF und RA. Daran anschließend wurden weitere Untersuchungen zur NP-Aufnahme sowie Charakterisierung der Zellen durchgeführt. Bei Aussaat auf Transwell-Membraneinsätzen wurden die Zellen zur Messung des TEER-Wertes ins *CellZscopeE* umgesetzt.

3.2.2.1 Immunocytochemische Färbungen

Um eine erfolgreiche Differenzierung der iPSC zu hBMEC bestätigen zu können, wurden diese anhand der Nachweise von ZO-1, PECAM/CD31 und Claudin-5 durch immunocytochemische Färbungen charakterisiert.

Die auf Zellkulturslides oder Transwell-Membraneinsätze ausgesäten Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS zur Fixierung für 20 min mit 4 % Paraformaldehyd behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit 1 % BSA in PBS bei RT blockiert und durch Inkubation mit 0,1 % Triton-X permeabilisiert. Daraufhin wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen bevor sie mit dem primären Antikörper, welcher in 1 % BSA in PBS verdünnt wurde, für 1 h bei RT inkubierten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der zweite Antikörper für 1 h abgedunkelt bei RT hinzugegeben (Tabelle 14). Darauffolgend wurden die Zellen wiederholt dreimal mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit Hoechst 33342 im Verhältnis 1:5000 in PBS für 5 min bei RT angefärbt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS dreimal gewaschen und zurückgebliebene Flüssigkeit mit einem Tuch abgenommen. 1 bis 2 Tropfen ProLong Glass Antifade Mountant wurden

pro well hinzugegeben, mit einem Deckgläschen blasenfrei abgedeckt und bei RT über Nacht abgedunkelt inkubiert.

Tabelle 14: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für immunozytochemische Färbungen zum Nachweis der zu hBMEC differenzierten iPSCs.

1. Antikörper	Verdünnung (in 1% BSA in PBS)	2. Antikörper	Verdünnung (in 1% BSA in PBS)
PECAM/CD31	1:25	Alexa Fluor 594 anti-Rabbit	1:1000
Occludin	1:50	Alexa Fluor 594 anti-Rabbit	1:1000
Claudin-5	1:100	Alexa Fluor 594 anti-Mouse	1:1000

3.2.2.2 Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes

Der transendotheliale elektrische Widerstand (*transendothelial electrical resistance*, TEER) wurde mit Hilfe des *CellZscopeE* und des epithelialen Voltohmmeters (EVOM2) gemessen und wird in Ωcm^2 angegeben. Zur Messung des TEER werden Elektronen genutzt, welche sich jeweils auf einer Seite der Membran der Transwell-Membraneinsätze befinden. Durch Anlegen einer geringen Wechselspannung kann der TEER über die Erfassung der elektrischen Impedanz gemessen werden.

Zuvor wurden Transwell-Membraneinsätze über Nacht mit einer Fibronectin-Kollagen-Matrix beschichtet. Nach Spülen mit 500 μl PBS wurden pro well 1.000.000 Zellen/ cm^2 in EC-Medium ausgesät. Das untere Kompartiment wurde mit 1 ml Medium gefüllt. Als Kontrolle diente ein Transwell-Membraneinsatz, welcher nur beschichtet war.

Für die Messung im *CellZscope E* wurden 24er Transwell-Membraneinsätze in das Gerät gesetzt. Die Messung des TEER erfolgte stündlich automatisiert.

Für die Messung mittels EVOM2 wurden die Elektroden zunächst mit 70 % Ethanol 15 min sterilisiert. Daran anschließend wurde mit der Messung der Kontrolle begonnen bevor die Transwell-Membraneinsätze mit Zellen gemessen wurden. Der TEER konnte durch Multiplikation mit der Kulturfläche des Transwell-Membraneinsatzes und durch Subtraktion der Kontrolle berechnet werden. Die Messung wurde einmal täglich durchgeführt.

3.2.2.3 Analysen zur Permeabilität von Natrium-Fluorescein

Mit Hilfe der Untersuchungen zur Permeabilität mittels Natrium-Fluorescein kann die Dichtigkeit der Barriere verifiziert werden, da es sich bei Natrium-Fluorescein um einen Stoff handelt, der nachweislich parazellulär transportiert wird.

48 h vor Zugabe des Natrium-Fluoresceins wurden die Hirnendothelzellen auf Transwell-Membraneinsätzen ausgesät. Nach Erreichen eines transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von mindestens 1.500 Ωcm^2 wurde in das obere Kompartiment 350 μl EC-Medium mit einer finalen Konzentration des Natrium-Fluoresceins von 10 $\mu\text{g/ml}$

hinzugegeben. Stündlich wurden aus dem unteren Kompartiment jeweils dreimal 50 µl Medium entnommen und auf eine neue 96 well-Platte überführt. Dem unteren Kompartiment wurden nach jeder Abnahme 150 µl frisches Medium zugeführt. Für die Standardreihe wurde zunächst eine 1:100-Verdünnung der Stammlösung in Kulturmedium angesetzt und diese im Verhältnis 1:4 in Kulturmedium weiterverdünnt. Die Fluoreszenz wurde mittels eines Plattenphotometers bei einer Anregung von $\lambda = 485$ nm und einer Emission von $\lambda = 535$ nm gemessen. Mit Hilfe der Standardreihe konnte die Konzentration des Natrium-Fluoresceins bestimmt werden. Der Permeabilitätskoeffizient wurde mit folgender Formel berechnet:

$$P_{app} = \frac{V_A}{A \cdot C_D} \cdot \frac{d_{CA}}{d_t}$$

V_A = Volumen des unteren Kompartiments [cm^3]

A = Membranfläche [cm^2]

C_D = Endkonzentration des Natrium – Fluoresceins [$\frac{\mu g}{ml}$]

$\frac{d_{CA}}{d_t}$ = über die Zeit gestiegte Konzentration im unteren Kompartiment [$\frac{\mu g/ml}{min}$]

P_{app} = Permeabilitätskoeffizient [$\frac{cm}{min}$]

3.2.2.4 Quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

Um die Veränderung in der Genexpression der nicht differenzierten iPSC zu den hBMEC untersuchen zu können, wurde eine Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR) durchgeführt. Neben den essentiellen iPSC-Genen zur Erhaltung der Pluripotenz (*oct 3/4*, *nanog*, *sox2*) wurden auch wichtige Endothelzellgene, welche für einen Aufbau einer dichten Barriere benötigt werden (*claudin-5*, *occludin*, *pecam/cd31*, *zo-1*, *bcrp*, *mdr-1*), untersucht.

Zunächst wurde die RNA der Zellen mit Hilfe des RNeasy Mini Kit nach Protokoll des Herstellers mit DNA-Verdau isoliert. Die Konzentration sowie die Reinheit der isolierten RNA wurde mit Hilfe des UV/VIS-Spektralphotometer bestimmt. Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben mit 1 µl der Probe.

Die cDNA-Synthese von 1 µg RNA erfolgte mit Hilfe des SensiFAST cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben. Die Anreicherung der Gene erfolgte mittels Realtime-PCR. Hierfür wurde der iTaq Universal SYBR Green Supermix verwendet. Es wurde für jedes Gen eine Dreifachbestimmung mit jeweils 500 nM Primer sowie 50 ng der cDNA durchgeführt. Tabelle 15 zeigt das verwendete Temperaturprotokoll.

Tabelle 15: Temperaturprotokoll der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initialisierung (Denaturierung)	95 °C	3 min
39x (Denaturierung, Primer-hybridisierung, Elongation)	95 °C 60 °C	15 s 30 s
Finale Elongation	72 °C	7 min
Schmelzkurve	65 °C bis 95 °C (in 0,5 °C Schritten)	Jeweils 5 s

Zur Berechnung der relativen Expression aus den C_t -Werten der PCR wurde folgende Formel verwendet:

$$relative\ Expression = \frac{2^{(C_t\ Wildtyp\ Testgen - C_t\ Mutante\ Testgen)}}{2^{(C_t\ Wildtyp\ Kontrollgen - C_t\ Mutante\ Kontrollgen)}}$$

Der C_t -Wert gibt den Zyklus an, bei dem das Produkt den Schwellwert erreicht. Als Kontrollgen dient *rlp13a*. Der Wildtyp entspricht den undifferenzierten iPSC. Tabelle 9 zeigt die in der PCR verwendeten Primer.

3.2.3 Kultivierung von hBMEC unter dynamischen Bedingungen

Mit Hilfe des Ibidi-Pump-Systems kann innerhalb von μ -slides ein pulsierender, unidirektionaler oder oszillierender Fluss erzeugt werden. Dafür wird mit einer Pumpe ein gleichbleibender Druck (in mbar) aufgebaut, welcher das Medium von einem Behälter zum anderen pumpt. Durch den Druck fließt das Medium mit einer definierten Flussrate (ml/min) über die mit Zellen beladenen μ -slides. Diese ist abhängig vom angewendeten Druck, der Viskosität des Mediums sowie dem ihm entgegengebrachten Widerstand durch das verwendete Perfusionssystem (μ -slide und Perfusionskanal). Die Zellen sind auf den μ -slides nur dem Scherstress (dyn/cm²) ausgesetzt, welcher auf die Flussrate zurückzuführen ist (siehe 7.2).

Der Aufbau des Ibidi-Pump-Systems ist in Abbildung 12 dargestellt.

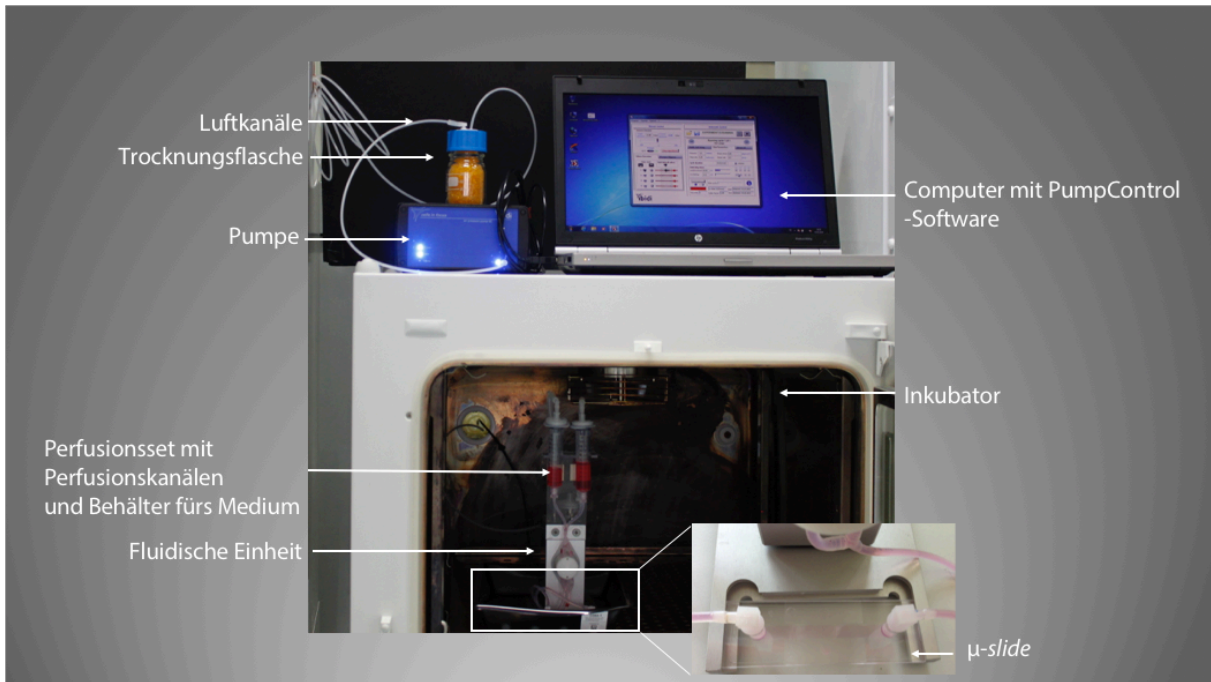


Abbildung 12: Aufbau des ibidi-Pump-Systems. Die Pumpe wird mit Hilfe der Computer-Software *PumpControl* gesteuert. Die gepumpte Luft wird mit der Trocknungsflasche getrocknet, sodass keine Feuchtigkeit in die Pumpe gelangen kann. Die fluidische Einheit mit dem Perfuionsset, bestehend aus den Perfuionskanälen und den Behältern für das Medium und der μ -slide mit den Zellen befinden, sich im Inkubator, welcher auf 37 °C und 5 % CO₂ eingestellt ist.

24 h vor der Zellaussaat wurden μ -slide, Perfuionskanal und fluidische Einheit zur Reduzierung möglicher Luftblasen in den Inkubator gestellt. Pro μ -slide wurden 1.000.000 Zellen/cm² in 200 μ l Medium ausgesät und 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor Anschluss des μ -slide an das Pumpsystem wurde das Perfuionsset gleichmäßig mit 12 ml EC-Medium befüllt, bei einem Druck von 5 mbar die Flussrate manuell kalibriert und für mindestens 30 min ohne μ -slide ein unidirektionaler Fluss erzeugt. Daran anschließend wurde der μ -slide an das Pumpsystem angeschlossen und die Zellen wurden bei einem Scherstress von 10 dyn/cm² für 96 h kultiviert.

3.2.4 Nanopartikel-Aufnahme

Die NP-Aufnahme erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, mit einer NP-Konzentration von 150 μ g/ml für 20 h unter Standardkulturbedingungen. Zusätzlich wurden für eine Negativkontrolle auch Zellen ohne NP kultiviert.

3.2.4.1 Toxizitätsanalysen

Um ein möglichst aussagekräftiges Urteil über den Einfluss der NP auf die Zellen machen zu können, wurde die Toxizität der Zellen mittels *Cell Counting Kit-8* (CCK-8) und Kristallviolett färbung analysiert.

Zunächst erfolgte die Inkubation der Zellen mit Partikeln bei verschiedenen Konzentrationen unter Standardkulturbedingungen. Als Referenz dienten zum einen Zellen, die nicht mit NP behandelt wurden, sowie Zellen, welche durch Zugabe von 5 μ l einer 0,1 %-igen Triton-X-Lösung für 1 h unter Standardkulturbedingungen lysiert wurden (Positivkontrolle). Pro Ansatz wurden drei *wells* vorbereitet.

Anschließend wurde die CCK-8-Lösung nach Protokoll hinzugegeben und für 1 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die Lösung wurde auf eine neue 96 well-Platte überführt und die Absorption mit Hilfe eines Plattenphotometers bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm gemessen. Die zurückgebliebenen Zellen auf der 96er Zellkulturplatte wurden mit Ethanol/Methanol (2:1) für 1 h bei Raumtemperatur (RT) fixiert und in PBS bei 4 °C gelagert.

Für die Kristallviolett-Färbung wurden 50 μ l einer 0,1 %-igen Kristallviolettlösung pro well auf die fixierten Zellen hinzugegeben und für 20 min bei RT und 70 - 80 rpm inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff durch Spülen mit H₂O entfernt und die wells über Nacht getrocknet. Durch Zugabe von 100 μ l 33 %-iger Essigsäure für 10 min bei RT und 70 – 80 rpm wurde der Farbstoff aus den Zellen herausgelöst und 90 μ l der Lösung auf eine neue 96er Zellkulturplatte überführt. Die Absorption wurde mittels Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm gemessen.

Zur Auswertung wurde zunächst der Mittelwert des Mediums von den Messwerten abgezogen und die Zellen ohne NP auf 100 % gesetzt. Die Toxizität der unterschiedlichen NP-Konzentrationen wurde mittels folgender Formel im Vergleich zu den Zellen ohne NP berechnet:

$$\begin{aligned} & \textit{Toxizität der NP – Konzentration} [\%] \\ & = \textit{Mittelwert}_{\textit{Konzentration des NP}} \cdot \frac{100}{\textit{Mittelwert}_{\textit{Zellen ohne NP}}} \end{aligned}$$

3.2.4.2 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie zur Zellanalyse

Durch Streuung von Licht und der Emission von Farbstoffen können mittels der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) Zellen gezählt, sortiert sowie im Hinblick auf ihre physikalischen und molekularen Eigenschaften analysiert werden. Mittels einer Trägerflüssigkeit passieren die in Suspension befindlichen Zellen einzeln einen fokussierten Lichtstrahl. Es entsteht Vorwärtsstreulicht (FSC, *Forward scatter*), welches Angaben zur Größe der Zellen wiedergibt, sowie Seitwärtsstreulicht (SSC, *Side scatter*), welches Angaben über die Granularität der Zellen wiedergibt (Valet, 2003).

3.2.4.3 Normierung der fluoreszenten Nanopartikel

Die Fluoreszenzintensität der NP kann trotz Einsatz von gleicher Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes bei der Synthese auf Grund der unterschiedlichen Polymere sowie der unterschiedlichen Verkapselungseffizienzen variieren. Um dennoch einen Vergleich der NP untereinander zu ermöglichen, müssen diese auf die am stärksten fluoreszierende Probe normiert werden. Hierzu wurde die Fluoreszenzintensität (FI) der NP bei gleicher Partikelkonzentration spektrometrisch ermittelt (Dreifachbestimmung). Darauf folgend wurde der Faktor des Partikels mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$Faktor_{NP} = \left(\frac{Mittelwert_{NP}}{Mittelwert_{NP \text{ mit stärkster FI}}} \right)^{-1}$$

3.2.4.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie zur Analyse von Nanopartikel-Aufnahme und Zellviabilität

Für die Analyse der NP-Aufnahme sowie der Toxizität der NP auf die Zellen wurden bei allen nachfolgenden Schritten die Überstände (Medium und PBS) bis zur Zentrifugation in einem 5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach dem Spülen mit PBS wurden die Zellen gelöst und nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von Medium für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Zur Analyse der NP-Aufnahme werden die Zellen mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. Im Kanal FL1 (Filter 533/30) wurde die Fluoreszenzintensität der NP, welche den Fluoreszenzfarbstoff PMI verkapselt haben, bestimmt. Um zerfallene Zellbestandteile bei der späteren Analyse ausschließen zu können, wurden *gates* bei der Auswertung eingesetzt, in denen 20.000 *events* gemessen wurden (siehe 7.1). Ein *event* entspricht einer Zelle. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *BD Accuri C6* Software, wobei zur statistischen Auswertung der Median der Messergebnisse der NP-Aufnahme des Kanals FL1 genutzt wurde. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne NP verwendet. Um eine Eigenfluoreszenz der Zellen ausschließen zu können, wurde die Kontrolle von den Messergebnissen subtrahiert.

Parallel zur Zellaufnahme wurde die Vitalität der Zellen mittels *Fixibal Viability Stain 660* (FVS660; Anregung bei 640 nm, Emission bei 660 nm in Kanal FL4) analysiert. Bei FVS660 handelt sich um einen fluoreszenten Viabilitätsfarbstoff, welcher kovalent an Zelloberflächen sowie intrazellulären Aminen nekrotischer Zellen bindet. Hierfür wurden die zuvor abgelösten und pelletierten Zellen in 200 µl FVS660 (1:1000 in PBS) gelöst und für 15 min bei RT inkubiert.

Zur Berechnung der relativen NP-Aufnahme im Vergleich zum NP mit der stärksten FI wurde folgende Formel verwendet:

$$relative\ NP - Aufnahme = \frac{Mittelwert_{NP} \cdot Faktor_{NP}}{Mittelwert_{NP \text{ mit stärkster FI}} \cdot Faktor_{NP \text{ mit stärkster FI}}}$$

3.2.5 Massenspektrometrische Analyse der Proteinkorona

Um die Proteinkoronazusammensetzung auf die NP-Eigenschaften und Aufnahme zurückführen zu können, wurde die Korona der NP massenspektrometrisch analysiert. Diese Analyse sowie die Messungen wurden vom Institut für molekulare Biologie gGmbH (IMB) in Mainz durchgeführt.

Zur Ausbildung der Proteinkorona wurden die NP für 1 h bei 37 °C und 500 U/min auf einem Heiz-Thermo-Mixer im Verhältnis von 0,1 m² Partikeloberfläche in 150 µl NP-Lösung zu 500 µl Blutplasma, einer Vereinigung aus 20 einzelnen Blutproben, inkubiert. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$S_{1g\ NP} = \frac{6}{\rho \cdot d}$$

$S_{1g\ NP}$ = Oberfläche von 1g NP [m^2]

ρ = Dichte des Polymermaterials [$\frac{g}{m^3}$]

d = Durchmesser des NP [nm]

Als Kontrolle dienten NP, welche unter gleichen Bedingungen mit PBS anstelle des Blutplasmas behandelt wurden. Die Reaktion wurde durch Auffüllen auf 1 ml mit PBS und *Vortexen* gestoppt. Proteine, welche nicht an der Partikeloberfläche adsorbierten, wurden mittels viermaligen Zentrifugierens bei 4 °C und 20.000 g für 30 min entfernt. Zum Schluss wurde das entstandene Pellet in 10 μ l PBS gelöst und bis zur Analyse am IMB bei -80 °C gelagert.

Für die Analyse wurde zunächst eine Matrix aus den 10 am häufigsten detektierten Proteinen aus jedem Ansatz erstellt. Nach Subtraktion der Kontrollen wurde der prozentuale Anteil dieser Proteine für jeden Ansatz bestimmt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Partikelanalysen mit der Zelllinie hCMEC/D3

Die Analysen zur Toxizität und Partikelaufnahme wurden zunächst mit Zellen der humanen zerebralen Endothelzelllinie hCMEC/D3 durchgeführt. Diese Zellen sind menschlichen Ursprungs und exprimieren spezifische Hirnendothelproteine (ZO-1, VE-Cadherin und Claudin-5) sowie -- transporter (MDR-1, MRP-1, BCRP) (Eigenmann *et al.*, 2013). Darüber hinaus eignen sie sich auf Grund ihrer zeitsparenden und reproduktiven Handhabung in der Kultivierung und Kryokonservierung als Referenz für NP-Analysen für Hirnendothelzellen.

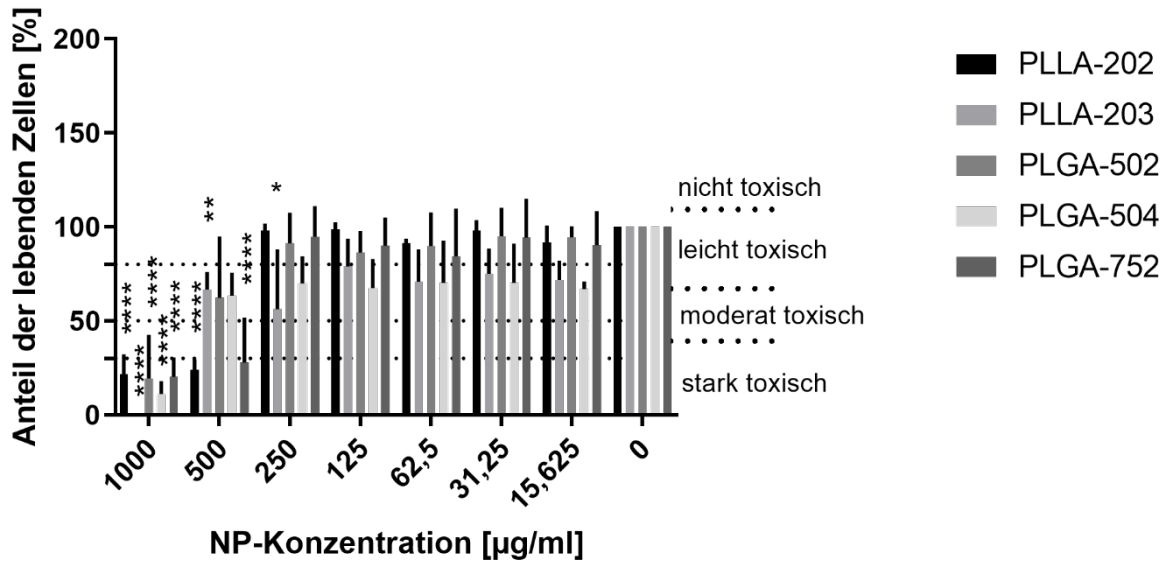
4.1.1 Toxizitätsanalyse der Nanopartikel mit der Zelllinie hCMEC/D3

NP im biomedizinischen Bereich können ein toxisches Potential für die Zellen besitzen. Dieses kann auf unterschiedliche Konzentrationen sowie Polymermaterial bzw. Größe der Partikel zurückgeführt werden (Huang *et al.*, 2017). Um einen nicht toxischen Arbeitsbereich der Partikelkonzentrationen für weiterführende Versuche definieren zu können, wurden Toxizitätsanalysen mittels eines Zellproliferationstests (*Cell Counting Kit-8*; CCK-8) und Kristallviolett-färbung durchgeführt. Die Analyse mittels CCK-8 beruht auf der stoffwechselabhängigen Reduzierung des gelblichen WST-8 zum orangefarbenen Formazan, wohingegen die Kristallviolett-färbung auf die Interkalierung des Kristallvioletts in die DNA bzw. Proteine der fixierten Zellen zurückzuführen ist und sich proportional zur Zellmasse verhält.

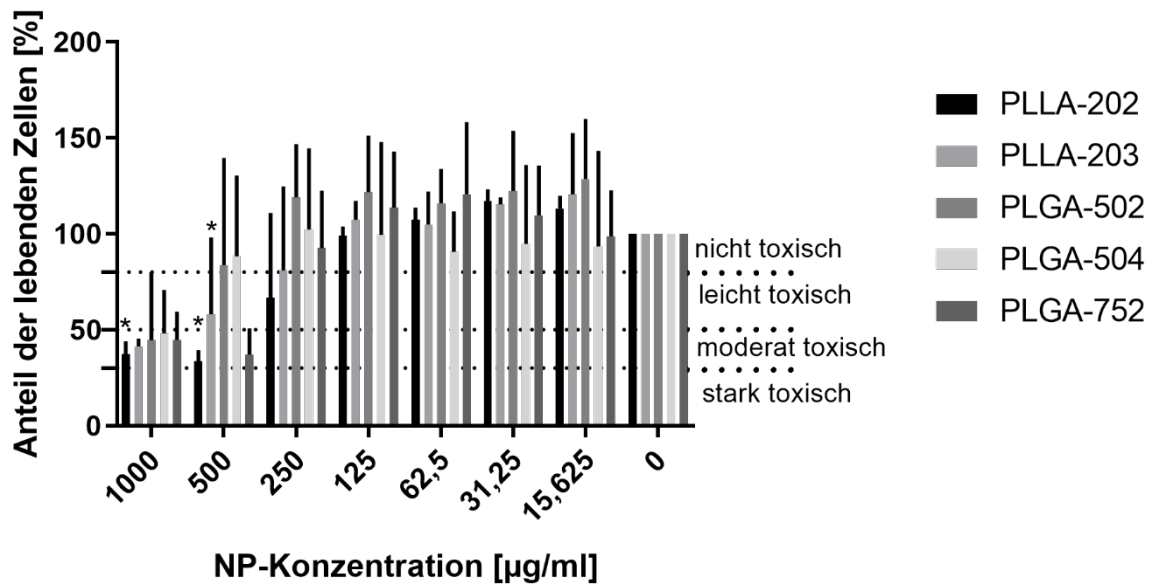
Zunächst erfolgte die Inkubation der Zellen mit allen synthetisierten PLGA- sowie PLLA-Partikeln mit einem Durchmesser von 50 und 100 nm (Tabelle 7) und verschiedenen Konzentrationen unter Standardkulturbedingungen. Als Referenz dienten Zellen, die nicht mit NP behandelt wurden (0 $\mu\text{g/ml}$) und dessen Anteil an lebenden Zellen auf 100 % gesetzt wurde (Negativkontrolle).

Die Abbildung 13 zeigt die Toxizitätsanalysen der NP-Aufnahme mittels CCK-8 sowie Kristallviolett-färbung. Nach einer Inkubation von 20 h konnte keine gesteigerte Aufnahme der Partikel beobachtet werden (Onyema, 2016), sodass in den nachfolgenden Experimenten die gleiche Inkubationszeit gewählt wurde. Laut Literatur weist ein Anteil an lebenden Zellen über 90 % auf keine Toxizität der Partikel hin. Anteile zwischen 50 % und 90 %, 30 % und 50 % und unter 30 % werden als leichte, moderate oder starke Toxizität der Partikel betrachtet (Tabatabaei *et al.*, 2015). Der Anteil der lebenden Zellen in Prozent ist jeweils gegen die verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Partikel aufgetragen.

a) **Toxizitätsanalyse (CCK-8)**
NP-Größe 50 nm



b) **Toxizitätsanalyse (Kristallviolett)**
NP-Größe 50 nm



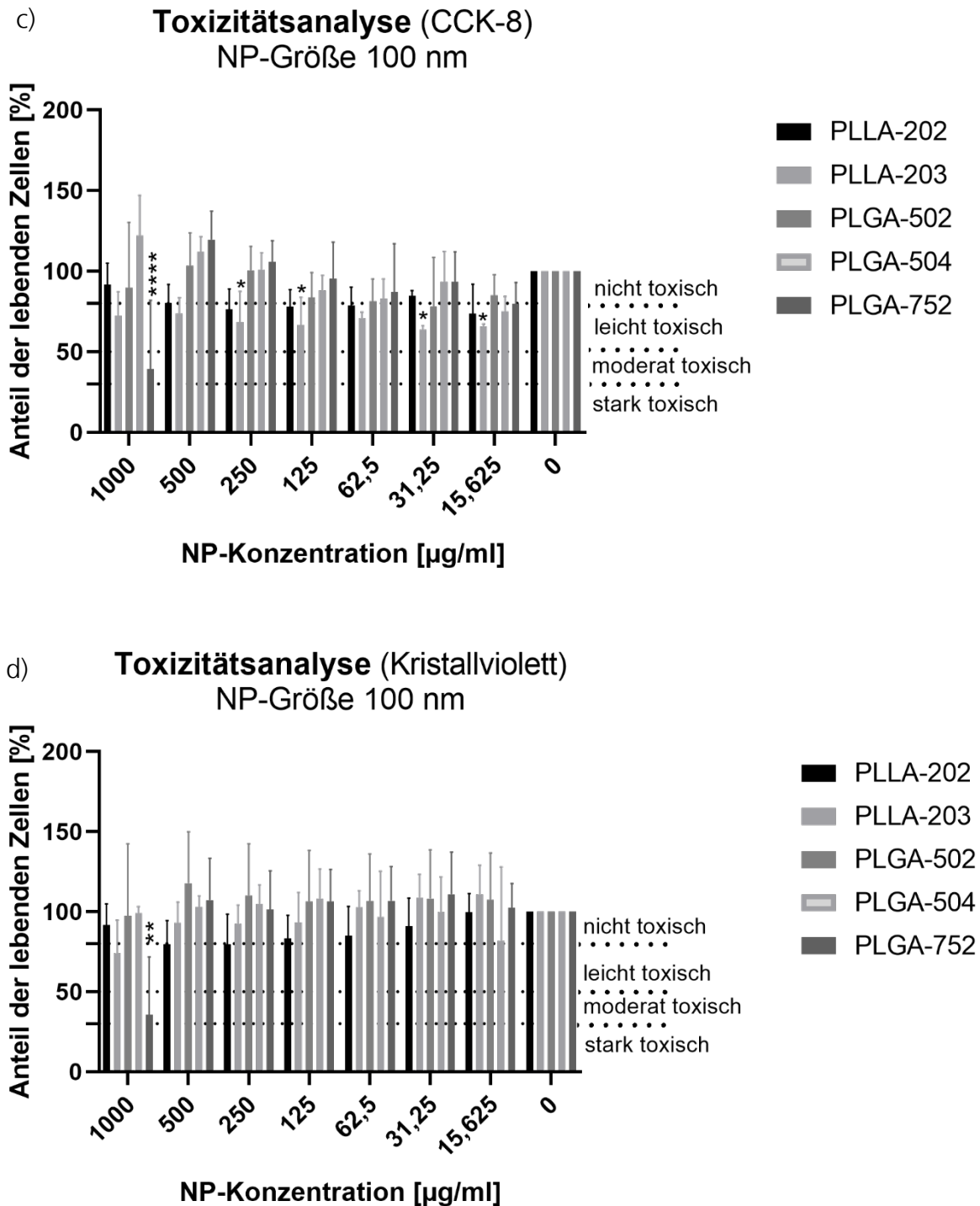


Abbildung 13: Toxizitätsanalyse mittels Cell Counting Kit-8 (CCK-8; a, c) und Kristallviolett (b, d) nach NP-Aufnahme. Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 wurden mit den Partikeln PLLA-202, PLLA-203, PLGA-502, PLGA-504 und PLGA-752 mit jeweils einer Größe von 50 und 100 nm bei verschiedenen Konzentrationen für 20 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen (0 $\mu\text{g/ml}$), dessen Anteil an lebenden Zellen auf 100 % gesetzt wurde. (Anteil der lebenden Zellen <30 %: stark toxisch, 30 – 50 %: moderat toxisch, 50 – 80 %: leicht toxisch, >80 %: nicht toxisch; Zweifache Varianzanalyse mit *Dunnnett*-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$).

Bei einer Partikel-Größe von 50 nm (Abbildung 13a) wirken alle NP bei einer Konzentration von 1.000 $\mu\text{g/ml}$ mit einem Anteil an lebenden Zellen von unter 30 % signifikant stark toxisch auf die Zellen. Bei einer Stimulation mit PLLA-203 bei dieser

Konzentration konnte durch den CCK-8-Assay keinerlei metabolische Aktivität der Zellen detektiert werden. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml bei PLLA-202 und PLGA-752 wirken die Partikel ebenfalls signifikant stark toxisch auf die Zellen. Ab einer Partikelkonzentration von 125 µg/ml sind alle eingesetzten Partikel nicht oder mit einem Anteil an lebenden Zellen von 60 – 80 % leicht toxisch.

Die Ergebnisse aus dem Kristallvioletttest mit einer Partikelgröße von 50 nm (Abbildung 13b) bestärken die Aussagen aus den Analysen mit CCK-8 bei gleicher Partikelgröße (Abbildung 13a). Bei einer Partikelkonzentration von 1.000 µg/ml ist der Anteil an lebenden Zellen bei allen NP mit 30 - 50 % moderat toxisch auf die Zellen. Eine moderate Toxizität kann auch bei der Aufnahme von PLLA-202 und PLGA-752 mit einer Konzentration von 500 µg/ml beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 125 µg/ml werden die Zellen nur gering in ihrer Viabilität beeinflusst. Auffällig ist jedoch, dass die Anteile an lebenden Zellen hier im Vergleich zu den Kontrollen leicht erhöht sind.

Im Gegensatz zu den Partikeln mit einer Größe von 50 nm ist die Zellviabilität bei den NP mit einer Größe von 100 nm (Abbildung 13c) nur von PLGA-752 moderat toxisch beeinflusst. Die restlichen Partikel haben mit 70 – 100 % lebenden Zellen keinen oder nur einen geringen Einfluss auf den Stoffwechsel der Zellen.

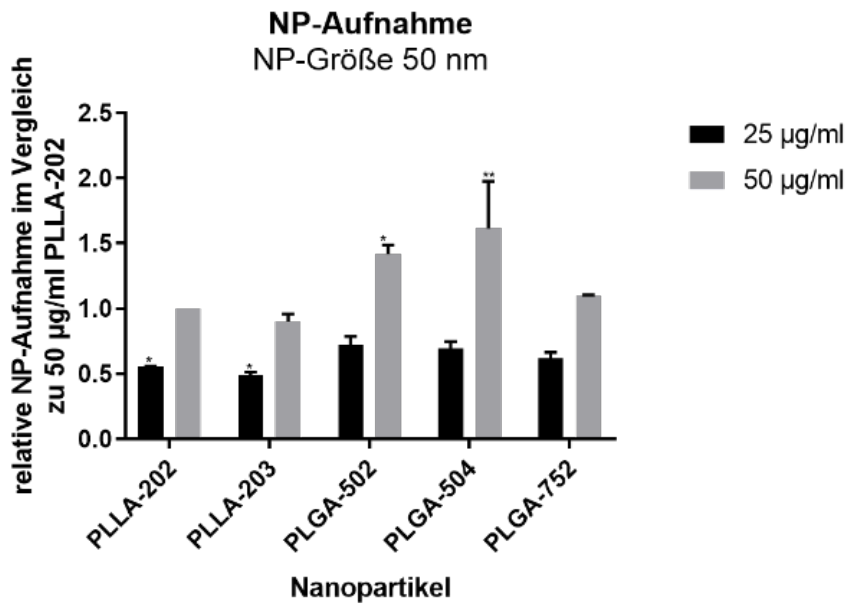
Auch bei einer Größe von 100 nm wurden die gewonnenen Ergebnisse über die Toxizität der NP mit dem Kristallvioletttest (Abbildung 13d) verifiziert. Nur PLGA-752 wirkt bei einer Konzentration von 1000 µg/ml moderat toxisch auf die Zellen und weist signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ohne NP auf.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen der Toxizitätsanalysen wird deutlich, dass die NP vor allem bei einer Konzentration ab 500 µg/ml signifikant stark toxisch auf die Zellen wirken. Bisher wurde für die Partikelinkubation eine Konzentration von 150 µg/ml eingesetzt (Onyema, 2016). Jedoch zeigt PLLA-203 bei allen untersuchten Konzentrationen eine leichte toxische Wirkung auf die Zellen. Auf Grund dessen wurden, um eine mögliche Toxizität der Partikel auf die Zellen zu umgehen, für die weiteren Analysen zur Partikelaufnahme sowie weiteren Toxizitätsanalysen geringe Konzentrationen von 25 bzw. 50 µg/ml gewählt.

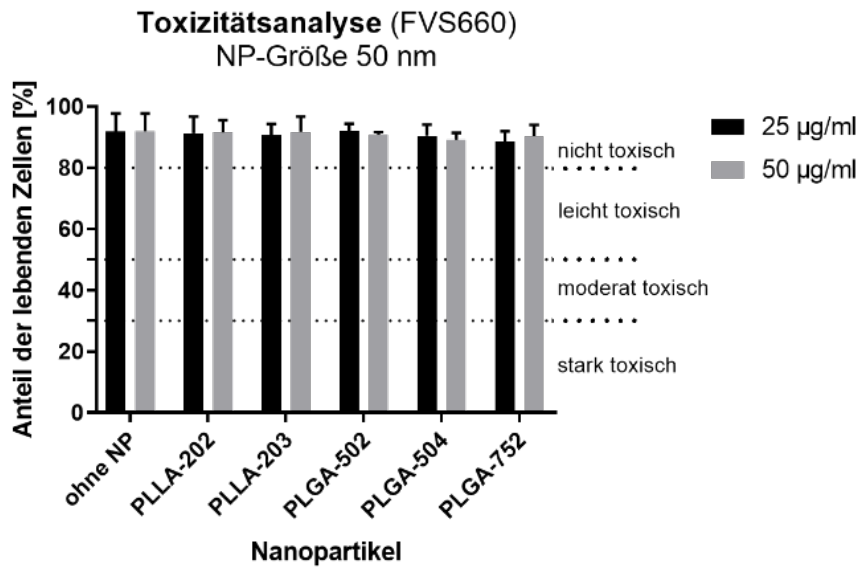
4.1.2 Aufnahme der Nanopartikel in der Zelllinie hCMEC/D3

Die Aufnahme der NP kann den transzellulären Transport fördern und somit den Transport der Partikel über die Barriere erhöhen. Zur Untersuchung der NP-Aufnahme wurden die Zellen mit den PLLA- und PLGA-Partikel mit einer Größe von 50 und 100 nm (Tabelle 7) für 20 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die Analyse der Aufnahme in den Zellen erfolgte nach der Inkubation an lebenden Zellen mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Durchflusszytometers. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Partikel gemessen. Um eine Eigenfluoreszenz der Zellen ausschließen zu können, wurde die Kontrolle von den Messergebnissen der Zellen mit Partikeln subtrahiert. Die Abbildung 14 zeigt die daraus resultierenden Ergebnisse. Da die Partikel unterschiedlich stark fluoreszieren, wurden sie auf den am stärksten fluoreszierenden Partikel, PLLA-202 bzw. PLLA-203 bei 50 µg/ml, normiert (3.2.4.3, nicht abgebildet). Dies ist auf Unterschiede in den Chargen und in der Größe der Partikel, die zu Varianzen in der Fluoreszenzintensität führen können, zurückzuführen. Die Varianz liegt zwischen 1 und 4.

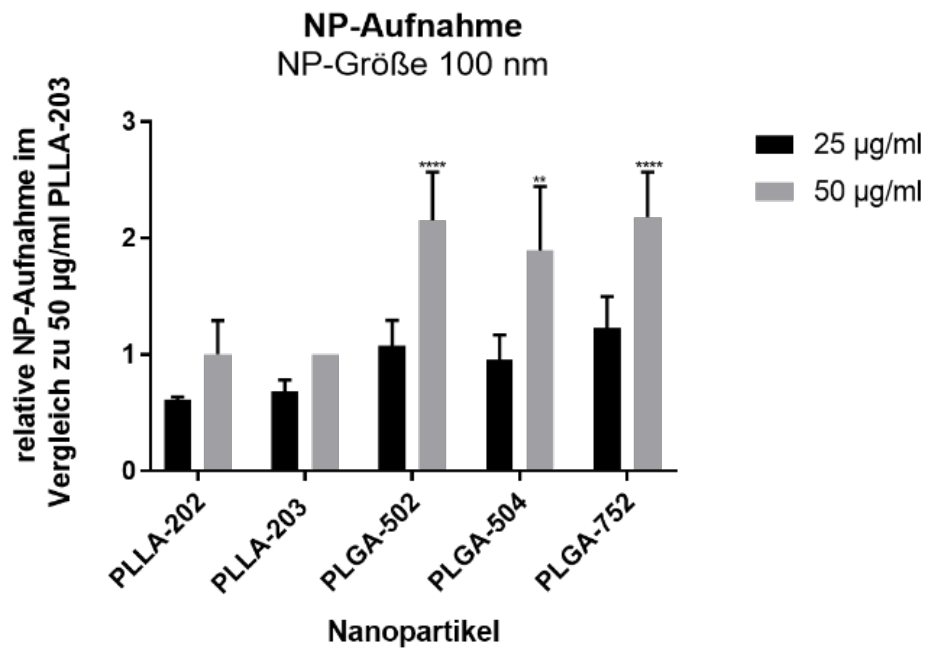
a)



b)



c)



d)

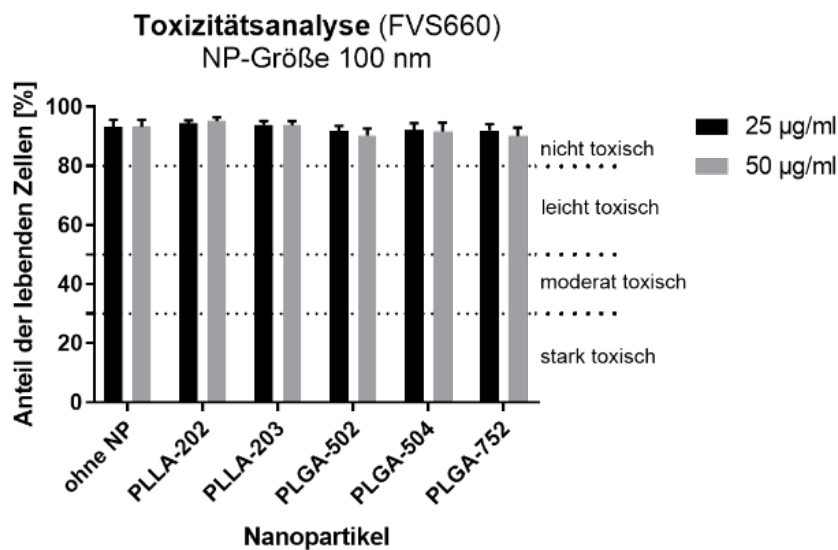


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Nanopartikel-Aufnahme (a,c) und Toxizitätsanalysen der Nanopartikel (b, d). hCMEC/D3 wurden mit 25 und 50 µg/ml NP (PLLA-202, -203, PLGA-502, -504, -752) mit einer Größe von jeweils 50 und 100 nm für 20 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert und die Aufnahme sowie Toxizität per fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten wurden auf die Fluoreszenzintensitäten der Partikel PLLA-202 (a, n=3) bzw. PLLA-203 (c, n=3) normiert. Als Kontrolle wurden ungefärbte Zellen ohne NP mit FVS660 verwendet (Anteil der lebenden Zellen <30 %: stark toxisch, 30 – 50 %: moderat toxisch, 50 – 80 %: leicht toxisch, >80 %: nicht toxisch; zweifache Varianzanalyse mit *Dunnnett*-Post-hoc-Test. *: P<0,0332, **: P<0,0021, ***: P<0,0002, ****: P<0,0001).

Bei einer Partikelgröße von 50 nm wurde die Fluoreszenzintensität aller Partikel auf den Partikel PLLA-202 normiert (Abbildung 14a). Die stärkste Aufnahme konnte mit den

Partikeln PLGA-502 und -504 beobachtet werden, die sich signifikant von PLLA-202 unterscheiden. Bei einer Konzentration von 25 µg/ml sind die Aufnahmen um bis zu 50 % geringer als bei der doppelten Konzentration. Außerdem gibt es signifikante Unterschiede bei der Aufnahme von PLLA-202 und -203 bei einer Konzentration von 25 µg/ml im Vergleich zu PLLA-202 bei 50 µg/ml.

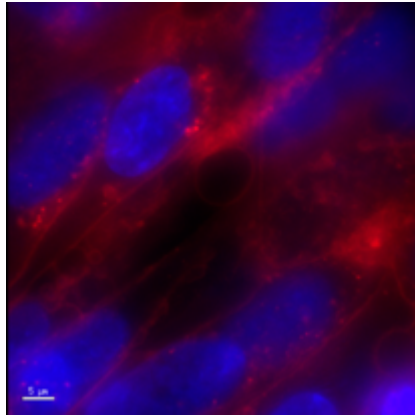
Die NP-Aufnahme von Partikeln mit einer Größe von 100 nm ist in Abbildung 14c dargestellt. Da hier PLLA-203 die stärkste Fluoreszenz aufweist, wurden alle NP auf diesen Partikel normiert. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml werden PLGA-502, -504 und -752 mit einer doppelten NP-Aufnahme im Vergleich zu PLLA-203 am stärksten aufgenommen. Hinzu kommt, dass es einen signifikanten Unterschied in der Aufnahme dieser Partikel im Vergleich zu PLLA-203 gibt. Die Aufnahme bei einer Konzentration von 25 µg/ml ist um bis zu 50 % geringer im Vergleich zu 50 µg/ml.

Parallel zur NP-Aufnahme mittels Durchflusszytometrie konnte durch die Zugabe des FVS660-Farbstoffs eine weitere Methode zur Verifizierung der vorangegangenen Toxizitätsanalysen durchgeführt werden. Zusätzlich zu den vorhergehenden Toxizitätsanalysen, bei denen die Zellproliferation und die adhärenen Zellen detektiert wurden, detektiert der FVS660-Farbstoff nekrotische Zellen. Die Abbildung 14b/d zeigt die Toxizitätsanalyse der Zellen nach der NP-Aufnahme. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen verwendet. Die NP wirken bei den verwendeten Konzentrationen von 25 und 50 µg/ml nicht toxisch auf die Zellen. Dies wird daran deutlich, dass der Anteil an lebenden Zellen sowohl bei einer Größe von 50 nm wie auch von 100 nm mit 95 – 100% einen ähnlich hohen Anteil an lebenden Zellen wie in den Kontrollen besitzt. Außerdem sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Dies bestätigt die Erkenntnisse aus den Toxizitätsanalysen mit CCK-8 und der Kristallviolett-Färbung, dass die NP in den niedrigeren Konzentrationen nicht toxisch auf die Zellen wirken.

Bei der Durchflusszytometrie werden nicht nur Zellen, welche NP tatsächlich aufgenommen haben, sondern auch solche Zellen, die NP lediglich auf ihrer Oberfläche adsorbiert haben, detektiert. Auf Grund dessen sollte die Lokalisation der NP im Zytoplasma der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie ergänzend durchgeführt werden, um eine Aussage über die Menge der aufgenommenen Partikel machen zu können. Die Untersuchung der NP-Aufnahme erfolgte mit allen Partikeln (Tabelle 7) bei einer Konzentration von 50 µg/ml für 20 h. Durch die Färbung von Zellmembran und Zellkern sollte eindeutig belegt werden, ob die NP tatsächlich im Zytoplasma lokalisiert sind. Als Kontrolle wurden die Zellkompartimente der Zellen ohne Zugabe von NP gefärbt.

Die Abbildung 15 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der grün-fluoreszierenden NP in hCMEC/D3.

Negativkontrolle

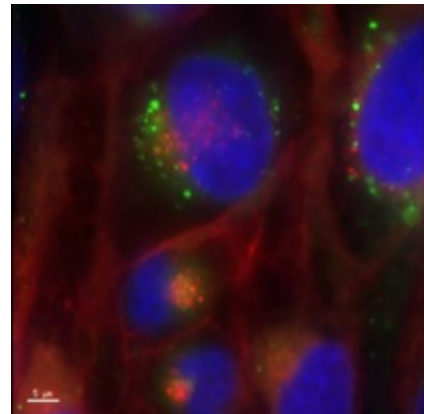
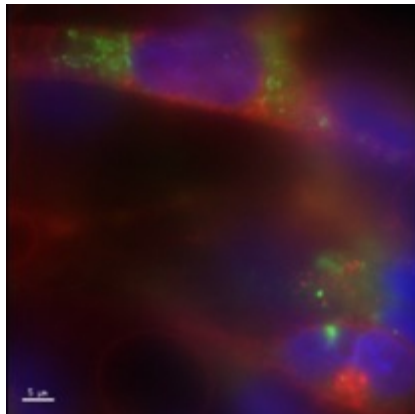


Partikel

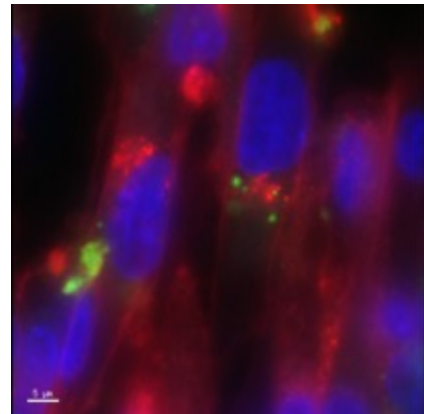
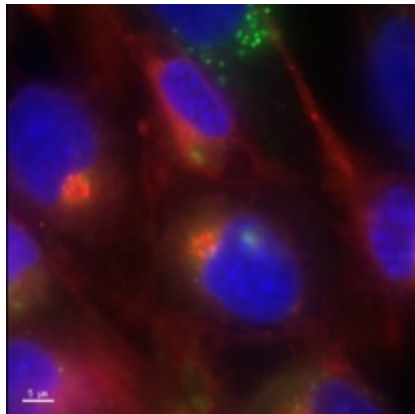
50 nm

100 nm

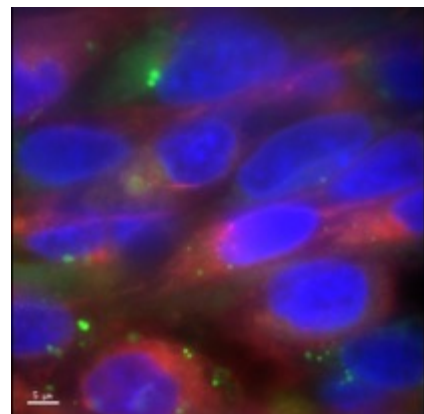
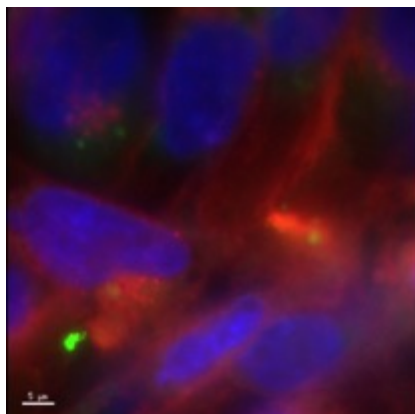
PLLA-202



PLLA-203



PLGA-502



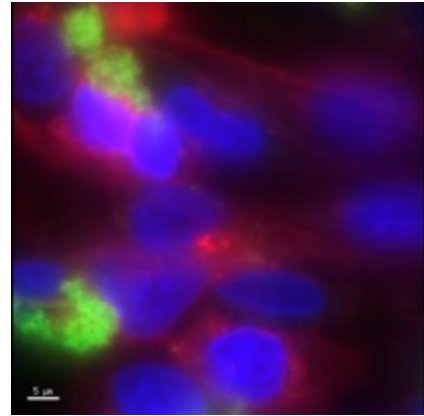
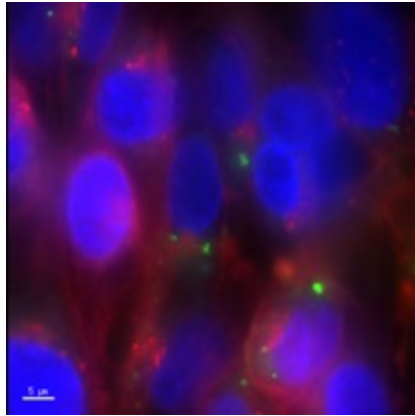
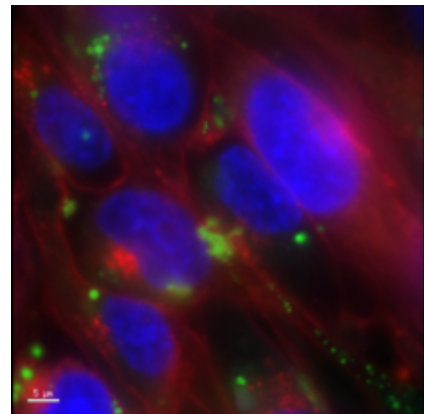
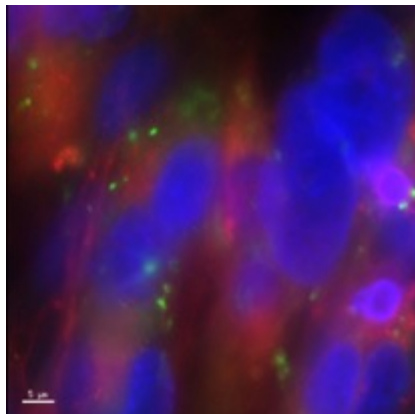
PLGA-504**PLGA-752**

Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Aufnahme von verschiedenen Polymer-Nanopartikel. Aufnahme von PLLA-202, -203 sowie PLGA-502, -504- und -752 mit jeweils einer Größe von 50 und 100 nm und einer Konzentration von 50 µg/ml für 20 h unter Standardkulturbedingungen in hCMEC/D3. In die NP wurde der fluoreszierende Farbstoff PMI (grün) verkapselt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Höchst 33342 (blau) und der Zellmembran mit Cell Mask™ Orange (rot; Weitfeldfluoreszenzmikroskops Olympus IX71 mit Delta Vision, 40x-Vergrößerung, Messbalken= 5 µm).

Bei Betrachtung der Aufnahme wird deutlich, dass alle Partikel von den Zellen ins Zytoplasma aufgenommen werden. Hierbei bilden PLGA-504 und -752 mit einer Größe von 100 nm eine Ausnahme. Diese beiden Partikel scheinen verstärkt Aggregate an der Zellmembran zu bilden, sodass eine Aufnahme dieser Partikel nur begrenzt möglich sein könnte und die Partikel sich vermehrt außen an den Zellmembranen anlagern.

Aus den vorangegangenen Toxizitätsanalysen wurden für die weiterführenden Untersuchungen nicht-toxische Konzentrationen von 25 und 50 µg/ml NP eingesetzt. Die Bilder zeigen, dass die PLGA-Partikel im Vergleich vermehrt intrazellulär vorzufinden sind. Bei PLGA-504 sowie PLGA-752 kam es zu Agglomeratbildung der Partikel. Dies führte vor allem bei PLGA-504 nicht zu einer Aufnahme der Partikel, sondern zu einer Adsorption an der Zellmembran.

Insgesamt ermöglichen die Untersuchungen zur NP-Aufnahme mit den Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 einen ersten Eindruck bezüglich ihres Potentials zur intrazellulären Aufnahme in Endothelzellen. Jedoch eignen sich diese Zellen auf Grund ihrer geringen Barriere von 40 Ωcm² (Weksler *et al*, 2013) nicht für den Aufbau eines Modells sowie für weiterführende Versuche zur Aufnahme und den Einfluss auf die BHS.

4.2 Differenzierung und Charakterisierung aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) zu Hirnendothelzellen (hBMEC)

Anstelle der Endothelzelllinie hCMEC/D3 sollen zu hBMEC differenzierte iPSC im Modell verwendet werden. Bei Differenzierung der iPSC zu hBMEC erreichen diese, anders als hCMEC/D3 mit einem TEER von bis zu $40 \Omega\text{cm}^2$ (Eigenmann *et al.*, 2013), einen TEER von bis zu $4.000 \Omega\text{cm}^2$. Außerdem exprimieren die Zellen auch essentielle Hirnendothelproteine wie ZO-1, PECAM/CD31, Claudin-5 und VE-Cadherin zum Aufbau einer dichten Barriere (Appelt-Menzel *et al.*, 2017; Hollmann *et al.*, 2017; Lippmann *et al.*, 2012). Diese Annäherung an physiologische Bedingungen des Menschen, welche einen TEER von bis zu $8.000 \Omega\text{cm}^2$ (Crone & Olesen, 1982) bei einer intakten BHS ausbilden, sowie die Expression der Gene für den Aufbau dieser Barriere, sind essentiell für die Etablierung eines Modells zur Untersuchung von Wirkstoffträgern wie NP an der BHS.

Die Differenzierung der iPSC wurde durch die Kultivierung in unkonditioniertem Medium (UM) drei Tage nach der Aussaat im Verhältnis 1:6 bis 1:10 in mTeSR™ Plus-Medium begonnen. Dies initiierte die Kodifferenzierung der iPSC in neuronale und endotheliale Zellen. Die morphologische Veränderung der Zellen ist in Abbildung 16 dargestellt.

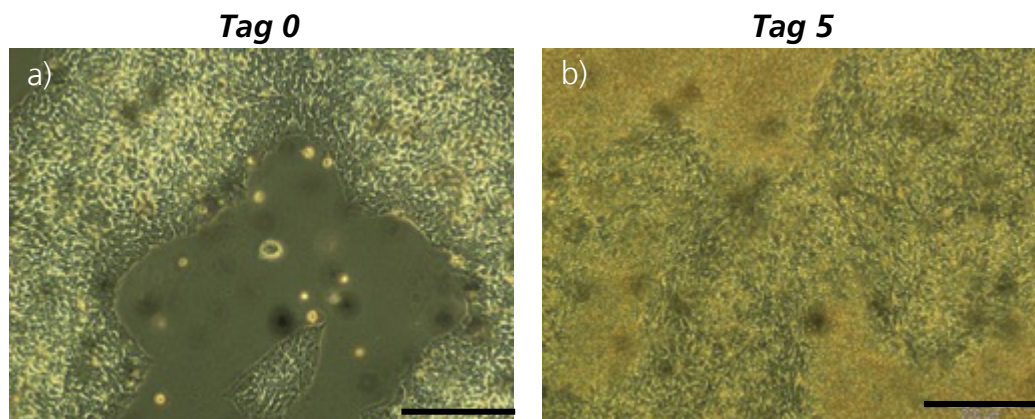


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahmen an verschiedenen Tagen der Differenzierung. a) Undifferenzierte iPSC an Tag 0 der Differenzierung. b) Konfluente Zellrasen mit einem Zellgemisch bestehend aus teilweise übereinander wachsenden Zellen. (Messbalken = $200 \mu\text{m}$, 50x-Vergrößerung, Phasenkontrastmikroskop Olympus BX41).

Eine morphologische Veränderung der Zellen war bereits am fünften Tag sichtbar. Der nun konfluente Zelllayer hatte keine scharfkantigen Kolonien mehr, sondern bestand aus langgestreckten sowie runden Zellen (Abbildung 16). Zur Förderung des Wachstums der endothelialen Zellen wurde die Kultivierung in Endothelzellmedium (EC) fortgeführt. Dies führte zu einem dichten Zellrasen, bei dem die Zellen zum Teil übereinander wuchsen. Die Selektion der Endothelzellen erfolgte durch die Subkultivierung auf einer Kollagen-Fibronektin-Matrix.

Nach 10 Tagen der Differenzierung erfolgte die Charakterisierung der Zellen mittels quantitativer Realtime-Polymerase-Kettenreaktion, immunozytochemischer Färbungen und Permeabilitätsanalysen. Da der Transport der Partikel durch die Aufnahme in astrozytären Zellen analysiert werden soll, wurde die Kultivierung der hBMEC auf

Transwell-Membraneinsätzen mit Astrozyten-Medium auf basolateraler Seite analysiert. Außerdem wurde die Kultivierung der Zellen bei einem physiologischen Scherstress getestet.

Durch die Expression der drei essentiellen Gene zur Erhaltung der Pluripotenz *oct3/4*, *nanog* und *sox2* können sich die iPSC-Zellen in jede Zelle der drei Keimblätter differenzieren. Bei einer Differenzierung der iPSC zu hBMEC geht die Expression der Gene zur Erhaltung der Pluripotenz jedoch verloren und die Expression von Endothelzellgenen, welche zum Aufbau einer dichten Barriere notwendig sind, wird aktiviert.

Um die Veränderung in der Genexpression der nicht differenzierten iPSC zu den hBMEC untersuchen zu können, wurde eine quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Neben den essentiellen Genen zur Erhaltung der Pluripotenz (*oct 3/4*, *nanog*, *sox2*) bei iPSC wurden auch wichtige Endothelzellgene, die für die Etablierung einer dichten Barriere benötigt werden, untersucht. Beispielhaft wurde hierfür die Expression von *claudin-5*, *occludin*, *pecam/cd31*, *zo-1*, *bcrp* und *mdr-1* analysiert. Die Abbildung 17 zeigt die relative Genexpression wichtiger Hirnendothelgene und Pluripotenzgene in hBMEC im Vergleich zu iPSC.

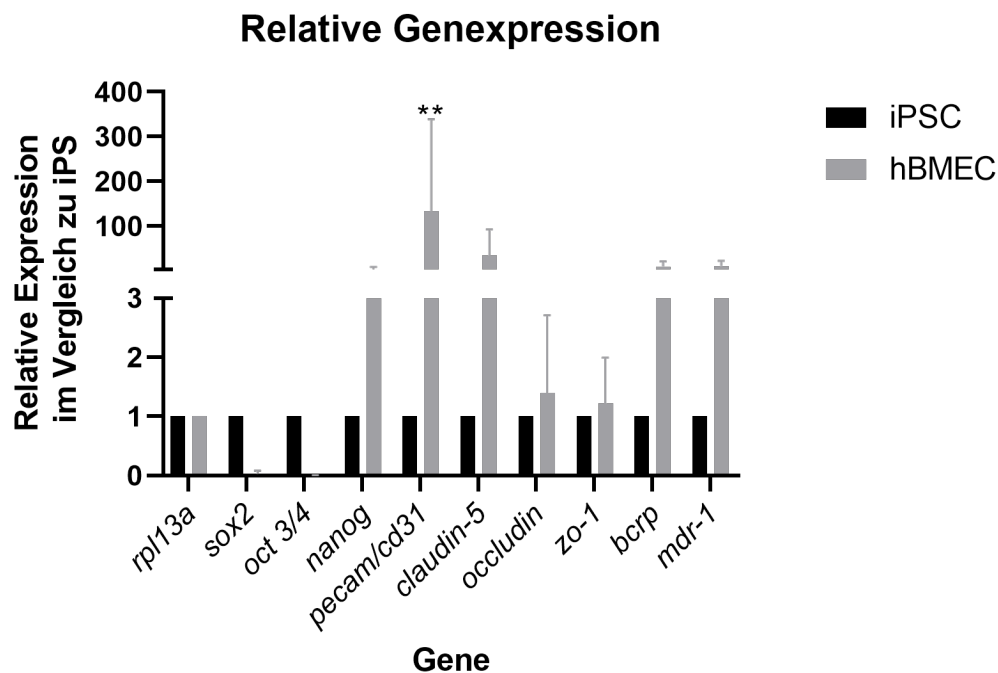


Abbildung 17: Relative Genexpression essentieller Hirnendothelproteine. *rpl13a* dient als Referenzgen und die undifferenzierten iPSC als Wildtyp. Hirnendothelgene: *claudin-5*, *occludin*, *pecam/cd31*, *zo-1*, *bcrp*, *mdr-1*. Pluripotenzgene: *sox2*, *nanog*, *oct3/4* (n=3; Zweifache Varianzanalyse mit Sidak-Post-hoc-Test. *: P<0,0332, **: P<0,0021, ***: P<0,0002, ****: P<0,0001).

Als Kontrollgen dient das ribosomale Protein *rpl13a*. Betrachtet man die Expression der drei Pluripotenzgene *sox2*, *nanog* und *oct3/4*, so ist die Expression von *oct3/4* und *sox2* bei differenzierten hBMEC gegenüber iPSC reduziert. Die Expression von *nanog* ist in hBMEC 60-mal höher als in iPSC. *sox2* und *oct3/4* werden aber nicht in hBMEC exprimiert. hBMEC zeigen eine erhöhte Expression der Hirnendothelgene. Vor allem die Expression von *pecam/cd31* ist mit einer 100-fach erhöhten Expression in hBMEC im Vergleich zu iPSC signifikant. Die Expression von *bcrp* und *mdr-1* ist 65- und *claudin-5* 70-mal höher

in hBMEC als in iPSC. Im Vergleich dazu sind die Expressionen von *occludin* sowie *zo-1* nur 1,2-fach erhöht.

Um eine erfolgreiche Differenzierung der iPSC zu hBMEC bestätigen zu können, müssen die Membran-ständigen Hirnendothelproteine PECAM/CD31 und die TJ-Proteine Occludin und Claudin-5 durch immunozytochemische Färbungen positiv nachgewiesen werden. Die Abbildung 18 zeigt Aufnahmen der immunozytochemischen Färbungen jeweils mit PECAM/CD31, Claudin-5 und Occludin, welche in rot dargestellt sind. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt und sind in blau dargestellt.

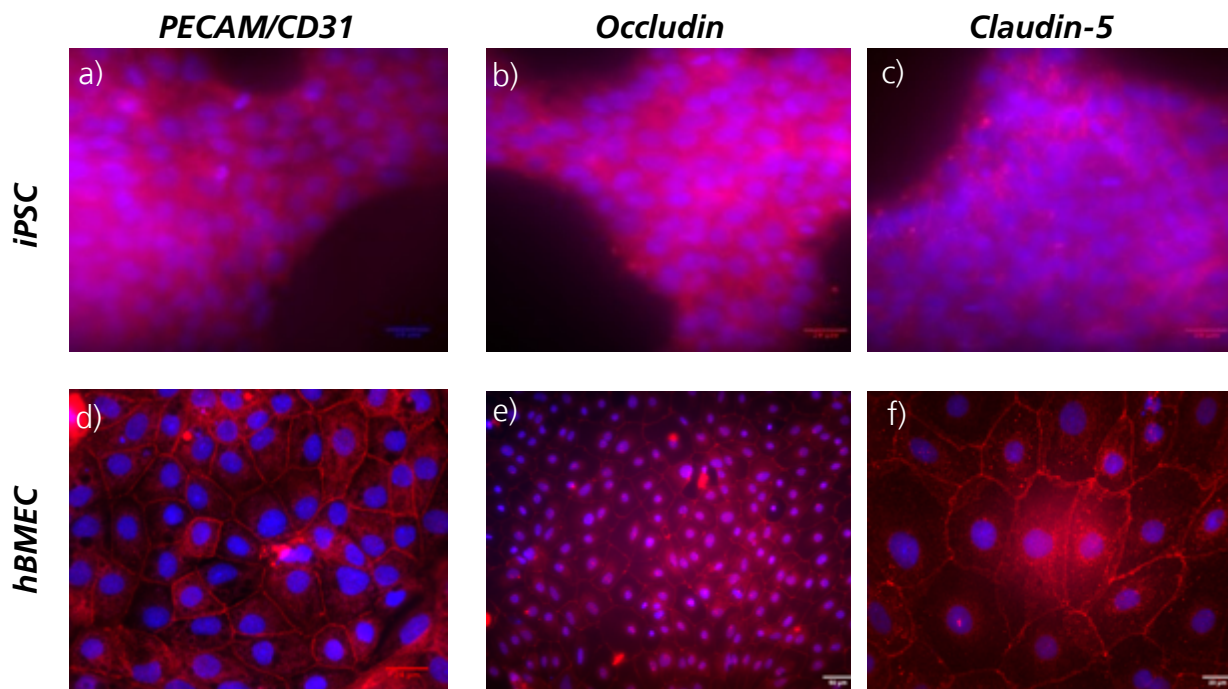


Abbildung 18: Immunozytochemische Analysen der Hirnendothelproteine. Die Aufnahmen zeigen den immunozytochemischen Nachweis von PECAM/CD31, Claudin-5 und Occludin (jeweils in rot). Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Undifferenzierte iPSC dienen als Negativkontrolle (a-d, Messbalken = 24 μm , 63x-Vergrößerung, Weitfeldfluoreszenzmikroskop Leica AF7000; e-f, Messbalken = 20 μm , 50x-Vergrößerung, Weitfeldfluoreszenzmikroskop Olympus BX51).

Die spezifische Membranfärbung der essentiellen Hirnendothelproteine zum Aufbau einer dichten Barriere (PECAM/CD31, Occludin, Claudin-5) war positiv (Abbildung 18). Auffällig ist jedoch, dass die Detektion aller Proteine an der Membran zwar erfolgreich war, es aber zusätzlich auch zu diffusen intrazellulären Färbungen kam. Im Vergleich dazu kam es bei der Untersuchung der Expression in den undifferenzierten iPSC zu einem negativen Nachweis. Dies zeigt sich in ausschließlich diffusen Färbungen der Zellen.

Die nachgewiesenen Proteine sind für einen dichten Zell-Zell-Kontakt verantwortlich, welcher für Hirnendothelzellen charakteristisch ist. Dieser schränkt den parazellulären Transport von kleinen Molekülen wie Natrium-Fluorescein nachweislich ein. Dies hat eine niedrige Permeabilität für Natrium-Fluorescein zur Folge und deutet auf eine dichte Barriere hin. Auf Grund dessen kann die Dichtigkeit der Barriere mit Natrium-Fluorescein untersucht werden (3.2.2.3).

Die Abbildung 19 zeigt den Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) des Natrium-Fluoresceins bei humanen Hirndothelzellen nach 1, 2, 3 und 4 h. Als Kontrolle ist ebenfalls der Koeffizient der leeren Filter ohne Zellen dargestellt.

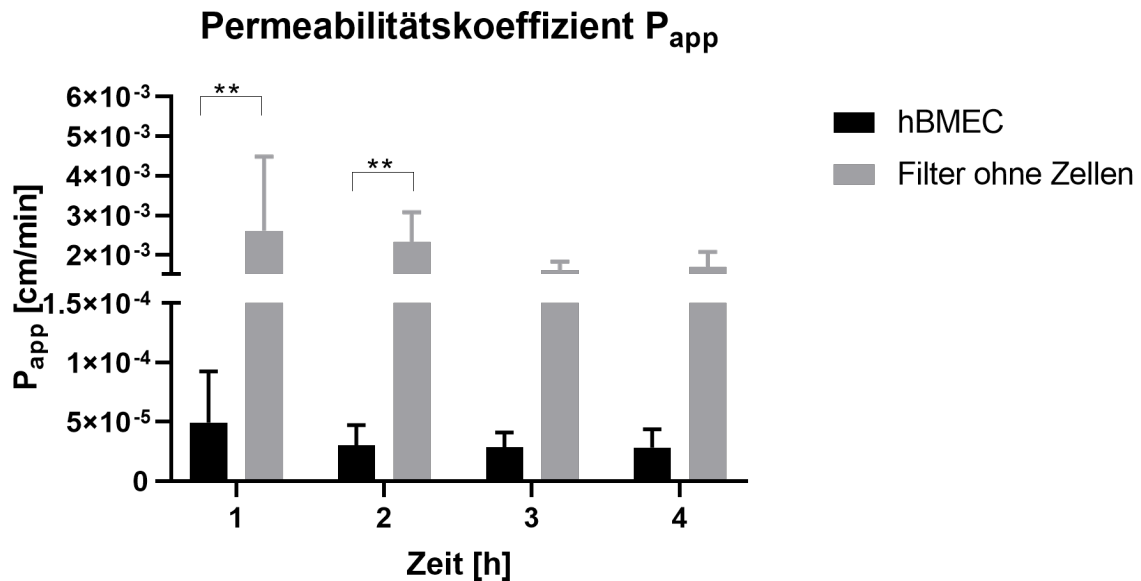


Abbildung 19: Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) bei hBMEC. Nach Erreichen eines TEER von mindestens $1.500 \Omega\text{cm}^2$ (nach ca. 48 h) wurde Natrium-Fluorescein mit einer Endkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Aus dem unteren Kompartiment wurde Medium nach 1, 2, 3 und 4 h nach der Zugabe entnommen. (Zweifache Varianzanalyse mit *Bonferroni*-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$).

Der Transport von Natrium-Fluorescein ist bei hBMEC im Vergleich zur Kontrolle signifikant eingeschränkt. Nach 1 h ist der P_{app} der hBMEC bei $6 \times 10^{-5} \text{ cm/min}$, sinkt nach 2 h auf $4 \times 10^{-5} \text{ cm/min}$ und bleibt bei diesem Wert bis zum Ende der Messung konstant. Im Vergleich dazu ist die Permeabilität bei den Transwell-Membraneinsätzen ohne Zellen um den Faktor 100 höher.

Eine niedrige Permeabilität kleiner Moleküle kann auf einen hohen TEER hindeuten. Dieser kann mittels Impedanz ermittelt werden und verifiziert eine dichte Barriere. Nachfolgend wurden zur Bestätigung einer dichten Barriere TEER-Analysen durchgeführt (Abbildung 20). Gleichzeitig ermöglicht der Einsatz unterschiedlicher Porengrößen der Transwell-Membraneinsätze Untersuchungen zur Kultivierung der Zellen auf unterschiedlichen Untergrundeigenschaften. Nach der Aussaat der hBMEC auf Transwell-Membraneinsätzen mit jeweils einer Porengröße von $0,4$ und $3 \mu\text{m}$ erfolgte die Messung 24 h nach dem Mediumswechsel täglich.

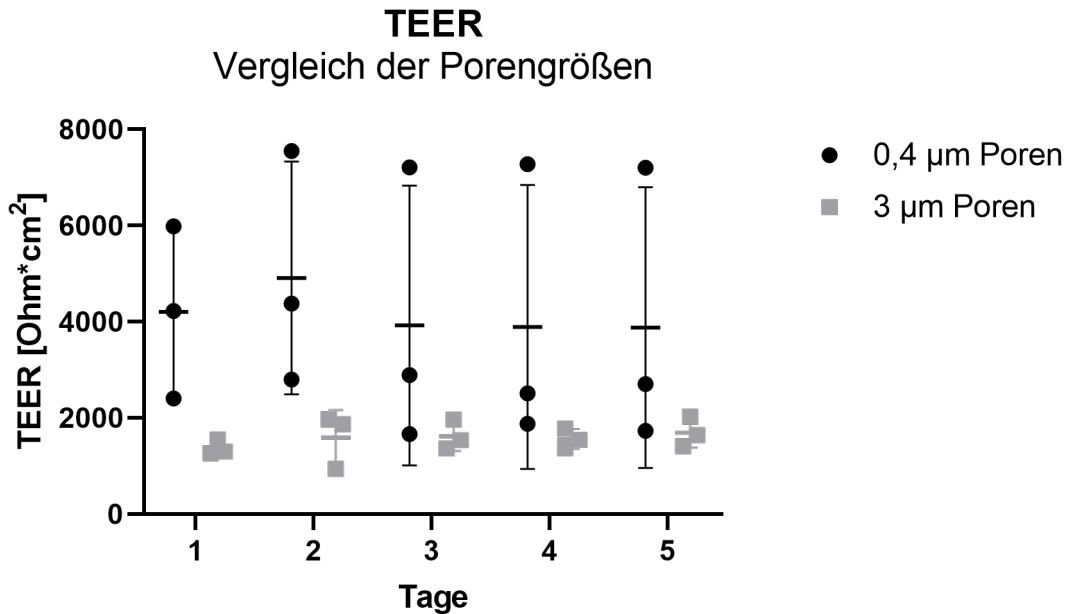


Abbildung 20: Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) bei unterschiedlichen Porengrößen der Transwell-Membraneinsätzen. Nach einem Mediumswechsel mit Endothelzellmedium (Tag 11 der Differenzierung, EC-Medium) erfolgte die tägliche Analyse des TEER von hBMEC auf Transwell-Membraneinsätzen mit einer Porengröße von 0,4 und 3 µm. Die erste Messung (Tag 1) wurde 24 h nach dem Mediumswechsel durchgeführt. Als Referenz dienten beschichtete Transwell-Membraneinsätze ohne Zellen. Messungen wurden mit EVOM durchgeführt und die Referenzmessung der Leerfilter abgezogen (Zweifache Varianzanalyse mit *Dunnnett*-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$).

Die Messungen des TEER korrelieren mit der niedrigen Permeabilität und zeigen einen hohen TEER von bis zu $4.200 \Omega \text{cm}^2$ bei Kultivierung auf Transwell-Membraneinsätzen mit $0,4 \mu\text{m}$ Poren. Bis zum Ende des Versuchs nach 5 Tagen bleibt der TEER dieser dichten Barriere konstant. Eine Kultivierung der Zellen auf Transwell-Membraneinsätzen mit $3 \mu\text{m}$ Poren führt zu einer Reduzierung des TEER um bis zu 50 %. Jedoch gibt es auf Grund der hohen Standardabweichungen keine signifikanten Unterschiede der TEER-Werte nach der Aussaat der Zellen auf Transwell-Membraneinsätzen unterschiedlicher Porengröße.

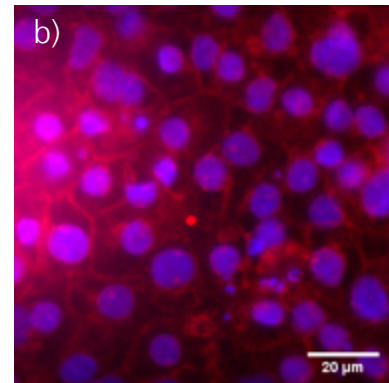
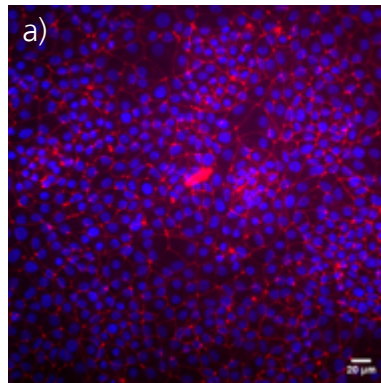
Des Weiteren wurde die Expression der TJ-Proteine Claudin-5 und Occludin bei Kultivierung auf Transwell-Membraneinsätzen immunozytochemisch überprüft. Die immunozytochemischen Färbungen widerlegen jedoch diese Annahme (Abbildung 21).

**Medium auf
basolateraler
Seite**

Claudin-5

Occludin

EC-Medium



**Astrozyten-
medium**

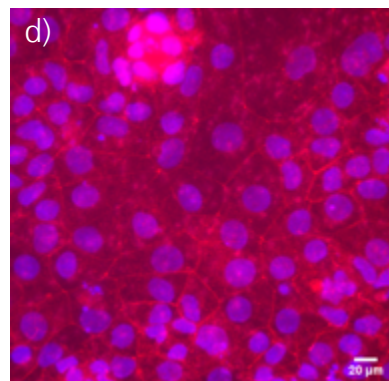
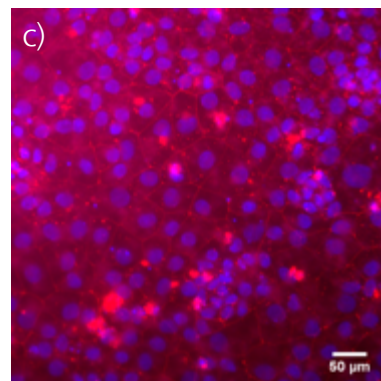


Abbildung 21: Immunocytochemische Analysen von Claudin-5 und Occludin nach Kultivierung von hBMEC auf Transwell-Membraneinsätzen. Der immunocytochemische Nachweis der TJ-assoziierten Proteinen Claudin-5 und Occludin (jeweils in rot) mit hBMEC auf Transwell-Membraneinsätzen (Porengröße 0,4 µm) mit EC-Medium (a, b) und Astrozyten-Medium (c, d) auf basolateraler Seite. Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt (20x-Vergrößerung, Weitfeldfluoreszenzmikroskop Olympus BX51).

Die Zellen wachsen in einem dichten Zelllayer und exprimieren sowohl Claudin-5 und Occludin bei Kultivierung auf Transwell-Membraneinsätzen mit einer Porengröße von 0,4 µm (Abbildung 21a und Abbildung 21b). Jedoch konnte trotz hoher TEER-Messung bei einer Aussaat auf Transwell-Membraneinsätzen mit einer Porengröße von 3 µm kein eindeutiger immunocytochemischer Nachweis von Occludin und Claudin-5 (nicht gezeigt) erfolgen. Auf Grund der Porengröße der Transwell-Membraneinsätze wurden auch diese gefärbt, sodass Aufnahmen mit einem eindeutigen Nachweis der Membran-ständigen Proteine nicht möglich waren.

Zur Untersuchung des NP-Transports wird eine Co-Kultur mit AZ angestrebt, welche als potentielle Zielzellen die NP aufnehmen sollen. Da dies eine Kultivierung von hBMEC mit AZ-Medium auf basolateraler Seite voraussetzt, wurde die Expression von Claudin-5 und Occludin unter diesen Bedingungen untersucht.

Abbildung 21c und Abbildung 21d zeigen, dass auch bei Kultivierung der Zellen auf Transwell-Membraneinsätzen mit AZ-Medium auf basolateraler Seite die Expression der beiden TJ-assoziierten Proteine gegeben ist. Vergleicht man jedoch die Expression der Proteine jeweils mit AZ- und EC-Medium auf basolateraler Seite miteinander, so wird deutlich, dass es nur bei Claudin-5 mit EC-Medium auf basolateraler Seite nicht zu diffusen intrazellulären Färbungen neben der spezifisch gefärbten Membran kommt.

Ergänzend wurde auch die Dichtigkeit der Barriere mittels TEER-Messung bei Kultivierung der Zellen mit EC- und AZ-Medium auf basolateraler Seite verglichen (Abbildung 22). Die tägliche Messung erfolgte 24 Stunden nach dem Mediumswechsel.

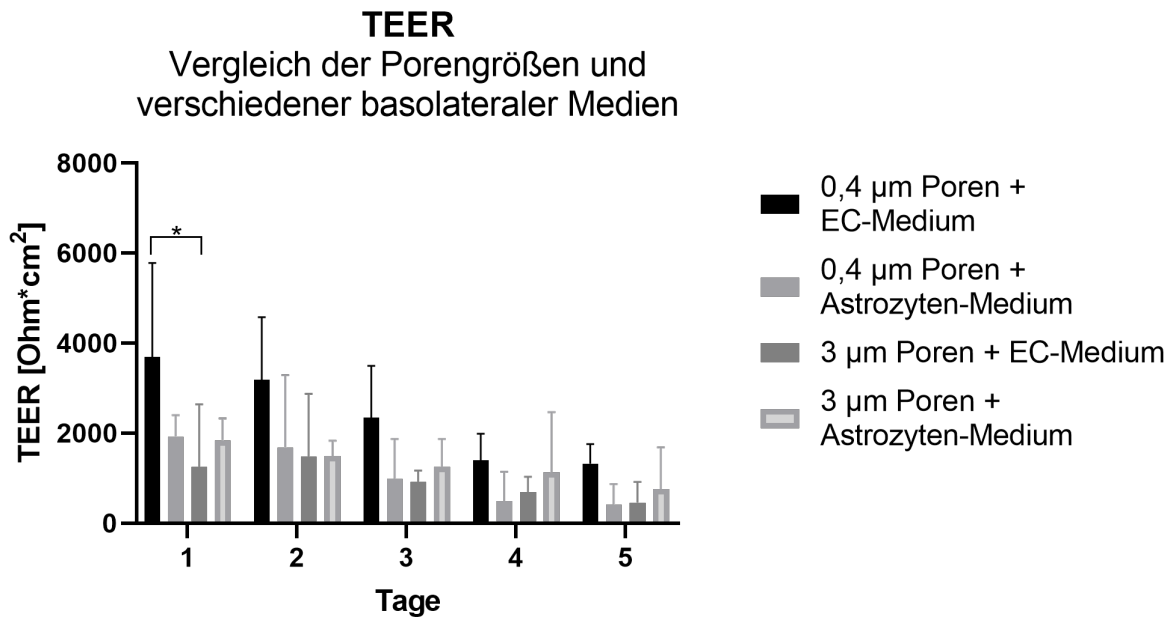


Abbildung 22: Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) bei Kultivierung von hBMEC auf Transwell-Membraneinsätzen mit einer Porengröße von 0,4 und 3 µm unter Nutzung verschiedener Medien auf der basolateralen Seite der Zellen. Der Mediumswechsel auf lateraler Seite erfolgte bei allen Zellen mit EC-Medium Auf basolateraler Seite wurde das Medium durch EC-Medium bzw. AZ-Medium ersetzt. 24 h nach dem Mediumswechsel wurde der TEER mit Hilfe des EVOM täglich gemessen. Als Referenz dienten beschichtete Transwell-Membraneinsätze ohne Zellen. (Zweifache Varianzanalyse mit Tukey-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$).

Anders als bei den Transwell-Membraneinsätzen mit einer Porengröße von 0,4 µm resultiert die Kultivierung der Zellen auf den größeren Poren mit AZ-Medium in einen höheren TEER. Jedoch ist der TEER-Wert, der Zellen auf einer Membran mit einer Porengröße von 0,4 µm bei Kultivierung mit EC-Medium auf basolateraler Seite mit 3.800 Ωcm^2 am höchsten. Im Vergleich dazu kommt es bei Kultivierung auf 3 µm Poren unter gleichen Bedingungen mit einer Reduzierung des TEER um mehr als 50 % zu signifikanten Unterschieden. Insgesamt sinkt der TEER im Laufe der Versuchsreihe in allen Ansätzen täglich um bis zu 20 %.

Neben der Kultivierung der Zellen unter statischen Bedingungen wurde auch die Kultivierung der Zellen unter dynamischen Bedingungen bei einem physiologischen Scherstress von 10 dyn/cm^2 untersucht. Dies entspricht einem Scherstress, dem die Zellen auch unter physiologischen Bedingungen ausgesetzt sind. Die differenzierten Zellen wurden 48 h nach Aussaat auf einer Fibronectin-Kollagen-Matrix zur Selektion der endothelialen Zellen für 96 h bei 10 dyn/cm^2 kultiviert. Vergleicht man die immunozytochemische Färbung der TJ-Proteine Claudin-5 und Occludin nach Kultivierung der Zellen unter den genannten dynamischen Bedingungen mit denen unter statischen, so konnten in beiden Fällen die Proteine erfolgreich detektiert werden (Abbildung 23).

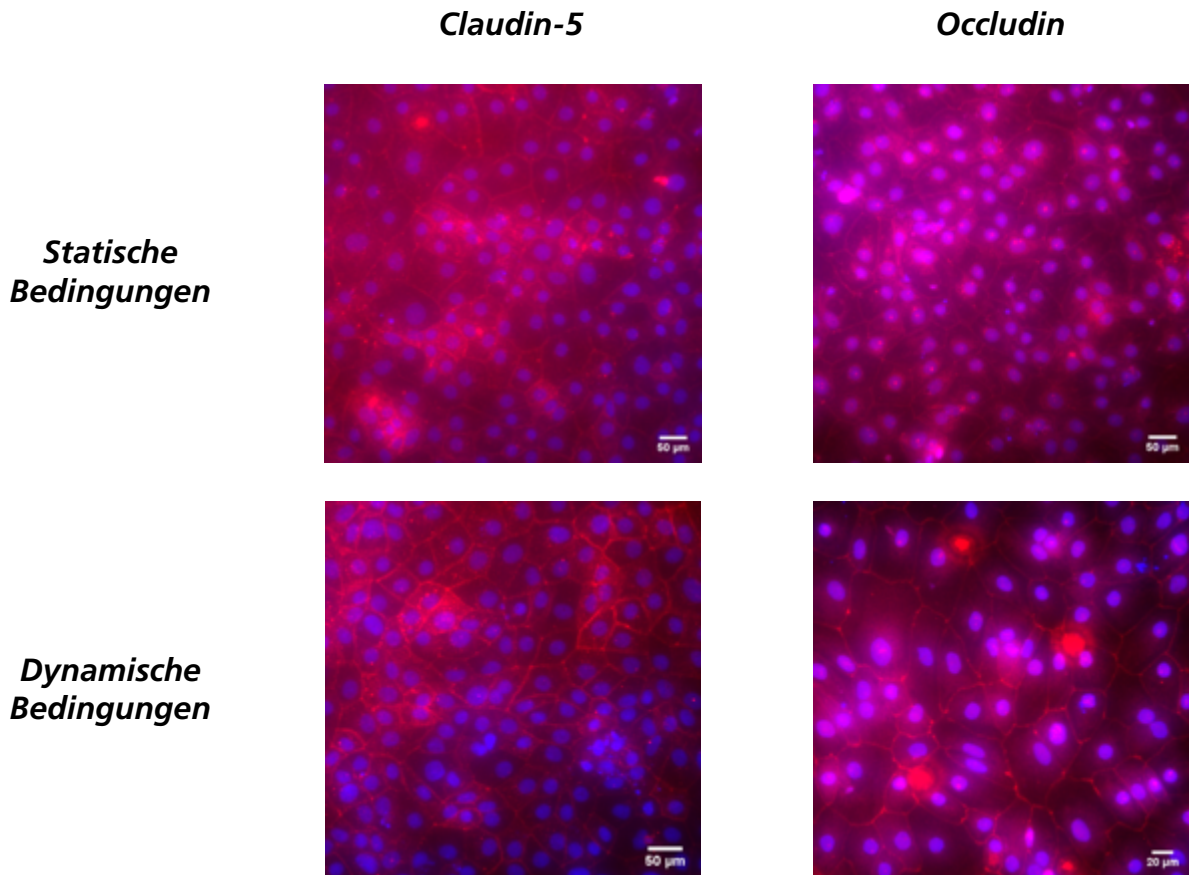


Abbildung 23: Immunocytochemische Analysen von Claudin-5 und Occludin nach Kultivierung der Zellen unter dynamischen Bedingungen. Die Aufnahmen zeigen den immunocytochemischen Nachweis von Claudin-5 und Occludin (jeweils in rot) von hBMEC, welche bei einem Scherstress von 10 dyn/cm² für 96 h kultiviert wurden. Zur Kontrolle dienten Zellen, welche im *µslide*-Channel ohne Scherstress unter statischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst 33342 (blau; 20x-Vergrößerung, Olympus BX51).

Die Färbung der Membran-ständigen Proteine hebt sich heraus und zeigt, dass die Kultivierung der Zellen unter diesen physiologischen Bedingungen möglich ist. Jedoch kam es in allen Ansätzen auch zu diffusen Färbungen intrazellulärer Strukturen der Zelle. Darüber hinaus richteten sich die Zellen unter dynamischen Bedingungen nicht nach der Flussrichtung aus.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Differenzierung der iPSC zu hBMEC erfolgreich war. Die untersuchten Hirnendothelproteine konnten nicht nur immunocytochemisch, sondern auch genetisch verifiziert werden. Die Expression der TJ-Proteine Occludin und Claudin-5 ist auch bei einer Kultivierung bei einem physiologischen Scherstress von 10 dyn/cm² sowie bei der Kultivierung der Zellen mit Astrozyten-Medium auf basolateraler Seite gegeben. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Zellen eine dichte Barriere, die einen parazellulären Transport unterbindet, aufbauen. Dies konnte durch Permeabilitätsanalysen mittels Natrium-Fluorescein sowie der Messung des TEER mit Hilfe der Impedanz verifiziert werden. Eine Ausrichtung der Zellen nach der Flussrichtung war jedoch bei Kultivierung unter dynamischen Bedingungen nicht zu beobachten.

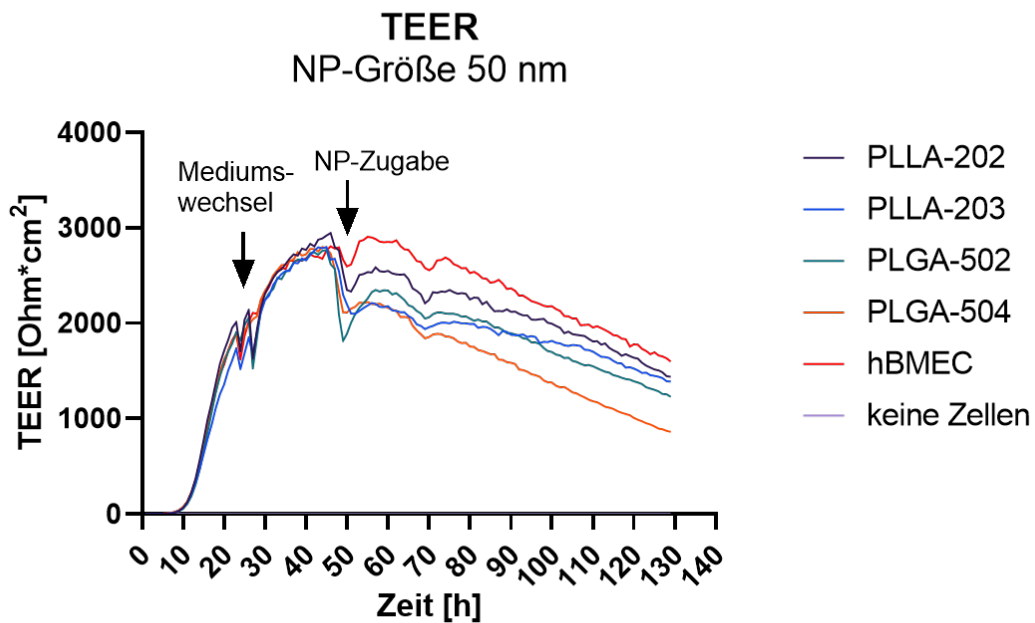
Durch die dichte Barriere und die Expression essentieller Proteine zum Aufbau dieser Barriere eignen sich die Zellen für eine Etablierung eines *in vitro*-Modells der BHS. Dieses kann für den Einsatz von Untersuchungen bezüglich der Aufnahme und Toxizität von Wirkstofftransportern wie NP an der BHS genutzt werden.

4.3 Analyse der Nanopartikel-Aufnahme mit aus iPSC differenzierten hBMEC

Nach der erfolgreichen Charakterisierung der zu hBMEC differenzierten Zellen wurden Analysen der NP-Aufnahme durchgeführt. Mittels stündlicher Messung des TEER konnte der Einfluss der Partikel auf die intakte Barriere untersucht werden. Ergänzend wurde die Aufnahme der Partikel durchflusszytometrisch untersucht. Gleichzeitig wurde eine Toxizitätsanalyse mit Hilfe des Farbstoffs FVS660 durchgeführt. Um die Ergebnisse der Toxizitätsanalyse verifizieren zu können, wurden weitere Analysen zur Untersuchung des toxischen Potentials der Partikel mittels CCK-8 und Kristallviolett färbung bei verschiedenen Partikelkonzentrationen vorgenommen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dienen der Lokalisation der NP in den Zellen.

Die Aufnahme von NP kann die intakte Barriere von EZ beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurden Analysen des TEER nach NP-Zugabe durchgeführt. Die zu hBMEC differenzierten Zellen wurden auf Transwell-Membraneinsätzen (0,4 µm Porengröße) in EC-Medium mit Retinsäure ausgesät und ins *CellZscope E* überführt. Dieses wurde zur stündlichen, automatisierten Messung des TEER verwendet. Nach 24 h erfolgte ein Mediumswechsel mit EC-Medium ohne Retinsäure. Bei Erreichen eines TEER von mindestens 1.500 Ωcm² wurden die NP PLLA-202, PLLA-203, PLGA-502 und PLGA-504 (Tabelle 7) jeweils mit einer Größe von 50 und 100 nm hinzugegeben. Auf die Untersuchung mit PLGA-752 wurde auf Grund des nicht vorhandenen Platzes im Messgerät für eine parallele Messung aller synthetisierter Partikel verzichtet. Anders als die anderen Partikel zeigte dieser bei Aufnahme in hCMEC/D3 vermehrte Agglomeratbildung und zum Teil ähnliche relative Aufnahmen wie die PLLA-Partikel. Die Partikelkonzentration wurde, anders als bei den Untersuchungen in hCMEC/D3, auf 150 µg/ml erhöht. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne NP sowie Transwell-Membraneinsätze ohne Zellen verwendet. Die NP-Aufnahme wurde für 96 h durchgeführt. Die Abbildung 24 zeigt die Entwicklung des TEER der hBMEC nach Zugabe der NP mit einer Konzentration von 150 µg/ml über die Zeit. In den unbehandelten Zellen konnte eine stabile Barriere von über 1.500 Ωcm² für 120 h aufgebaut werden.

a)



b)

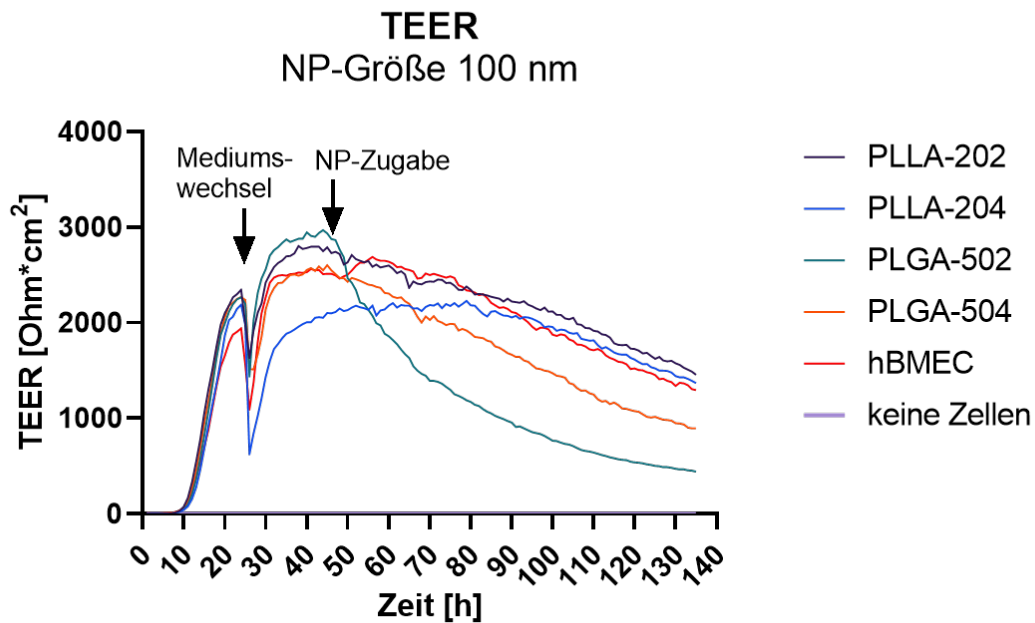


Abbildung 24: Untersuchung des Einflusses der NP auf die intakte Barriere der hBMEC. Die Untersuchung des Einflusses der NP nach ihrer Aufnahme von den hBMEC auf die intakte Barriere erfolgte durch stündliche Messungen des TEER mit Hilfe des *CellZscope E*. 24 h nach der Aussaat auf Transwell-Membraneinsätze (Porengröße 0,4 μm) erfolgte ein Mediumswechsel mit EC-Medium ohne Retinsäure. Bei Erreichen eines TEER-Werts von mindestens 1.500 Ωcm^2 (ca. 24 h nach dem Mediumswechsel) wurden die NP (PLLA-202, -203, PLGA-502, -504) jeweils mit einer Größe von 50 nm (a) und 100 nm (b) und mit einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Als Kontrolle dienten Zellen ohne NP (hBMEC) sowie

Transwell-Membraneinsätze ohne Zellen. (Zweifache Varianzanalyse mit *Dunnnett*-Post-hoc-Test, nicht abgebildet. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$).

Die Abbildung 24a zeigt den TEER nach Aufnahme der Partikel mit einer Größe von 50 nm. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen reduziert sich der TEER bei NP-Zugabe um 7 – 10 %. Ausgenommen davon ist jedoch der TEER bei NP-Zugabe von PLGA-504. Der TEER ist bereits direkt der NP-Zugabe um 34 % reduziert. 90 h nach der NP-Zugabe dieses Partikels ist der TEER dieser Zellen im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen um 50 % vermindert. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Zellen konnten nicht beobachtet werden (nicht abgebildet).

In Abbildung 24b ist die Entwicklung des TEER nach NP-Aufnahme mit Partikeln einer Größe von 100 nm dargestellt. Ausgenommen von PLGA-502 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Der TEER der unbehandelten Zellen liegt zwischen 2.800 und 1.500 Ωcm^2 . Im Vergleich dazu liegt der TEER nach Aufnahme von PLLA-202 und – 203 sowie PLGA-504 mit 2.800 – 1000 Ωcm^2 maximal um 34 % darunter. Die Aufnahme von PLGA-502 zeigt mit einer Reduzierung des TEER von 52 – 67 % signifikante Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($P < 0,0021$, nicht abgebildet).

Nach der Aufnahme von PLGA-502 mit einer Größe von 100 nm zeigt der Partikel signifikante Unterschiede im Vergleich zu Zellen ohne NP-Inkubation. Dieser Einfluss auf die intakte Barriere der hBMEC könnte auf die Partikelkonzentration, aber auch auf ihre Größe zurückgeführt werden. Um dies ausschließen zu können, wurden zusätzlich Aufnahmen des Partikels bei einer Größe von 50 und 100 nm mit jeweils einer Partikelkonzentration von 75 und 150 $\mu\text{g/ml}$ für 85 h durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.

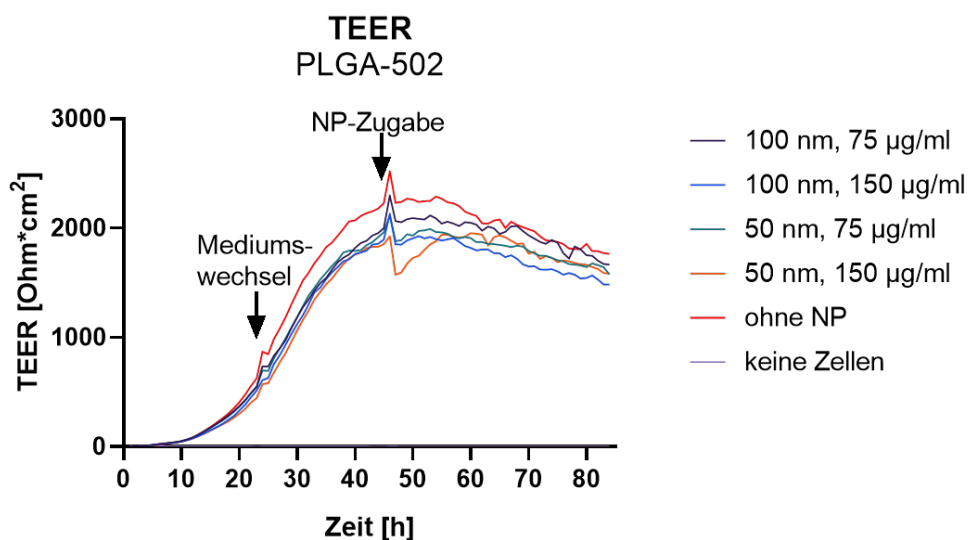


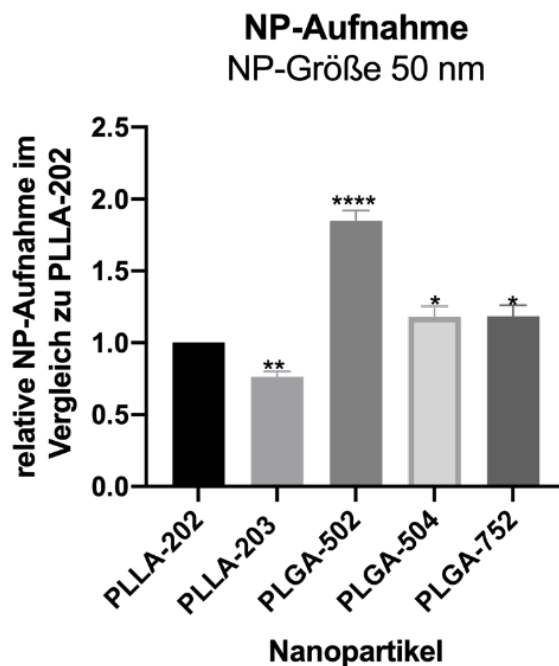
Abbildung 25: Untersuchung des Einflusses des NP PLGA-502 mit einer Größe von 100 und 50 nm und jeweils einer Partikelkonzentration von 75 und 150 $\mu\text{g/ml}$. Die Analyse der intakten Barriere nach NP-Aufnahme erfolgte durch stündliche Messung des TEER mit dem *CellZscope E* der auf Transwell-Membraneinsätzen ausgesäten hBMEC. 24 h nach der Aussaat wurde ein Mediumswechsel durchgeführt. Bei Erreichen eines TEER-Werts von mindestens 1.500 Ωcm^2 (ca. 24 h nach Mediumswechsel) wurde der NP PLGA-502 jeweils mit einer Größe von 50 nm und 100 nm sowie einer Konzentration von 75 und 150 $\mu\text{g/ml}$

hinzugegeben. Als Kontrolle dienten Zellen ohne NP (hBMEC) sowie Transwell-Membraneinsätze ohne Zellen. (Zweifache Varianzanalyse mit *Dunnnett*-Post-hoc-Test, nicht abgebildet. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$).

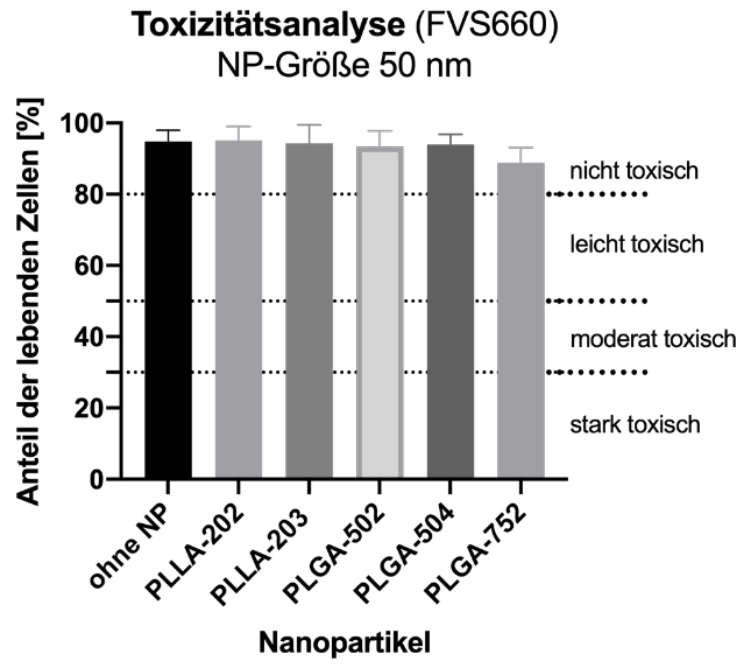
Nach der Inkubation der NP mit einer Konzentration von $150 \mu\text{g/ml}$ kommt es sowohl bei einer Größe von 50 nm wie auch bei 100 nm zu signifikanten Unterschieden in den TEER-Werten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($P < 0,0021$, nicht abgebildet). Eine Reduzierung des TEER zwischen 12 und 15% ist zu beobachten. Wird die Partikelkonzentration auf $75 \mu\text{g/ml}$ reduziert, so zeigen sich signifikante Unterschiede nur bei Partikeln einer Größe von 50 nm ($P < 0,0332$, nicht abgebildet). Der TEER dieser Zellen ist um bis zu 29% vermindert. Bei einer Größe von 100 nm liegt der TEER zwischen 1.600 und $2.000 \Omega\text{cm}^2$ im Vergleich zu den unbehandelten Zellen mit $1.800 - 2.100 \Omega\text{cm}^2$.

Die signifikanten Unterschiede können auf eine Toxizität oder erhöhte Aufnahme der Partikel zurückzuführen sein. Um dies zu untersuchen, wurde die NP-Aufnahme und parallel dazu eine Analyse der Toxizität der NP auf hBMEC mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie durchgeführt. Für diese Analyse wurden die Partikel (Tabelle 7) mit einer Konzentration von $150 \mu\text{g/ml}$ für 20 h behandelt. Um die Aufnahme der NP vergleichen zu können, wurden diese auf den am stärksten fluoreszierenden Partikel, PLLA-202, normiert (3.2.4.3 Normierung der fluoreszenten Nanopartikel). Zur Analyse der Toxizität wurde der Viabilitätsfarbstoff FVS660 nach der Zellaufnahme hinzugegeben. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Partikel gemessen. Um eine Eigenfluoreszenz der Zellen ausschließen zu können, wurde die Kontrolle von den Messergebnissen der Zellen mit Partikeln subtrahiert. In der Abbildung 26 ist die relative NP-Aufnahme mit einer Konzentration von $150 \mu\text{g/ml}$ im Vergleich zu PLLA-202 sowie die daran anschließende Toxizitätsanalyse mittels FVS660-Farbstoff dargestellt.

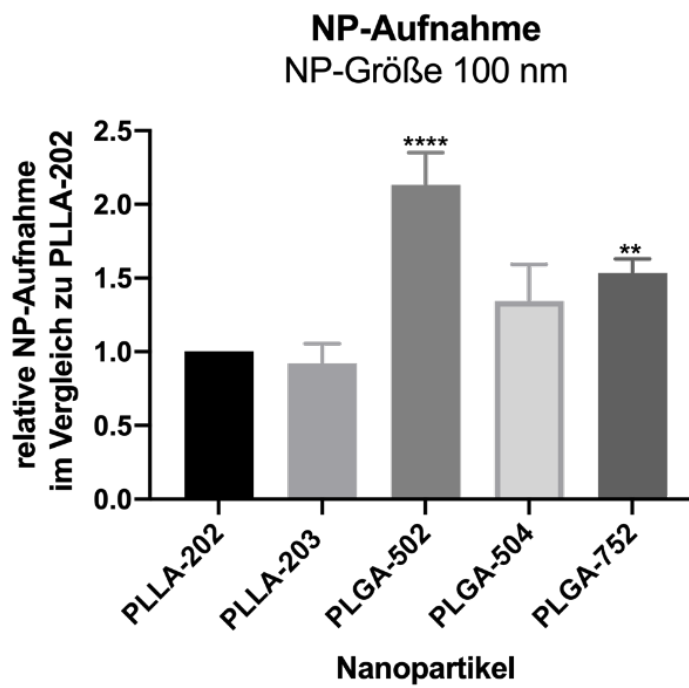
a)



b)



c)



d)

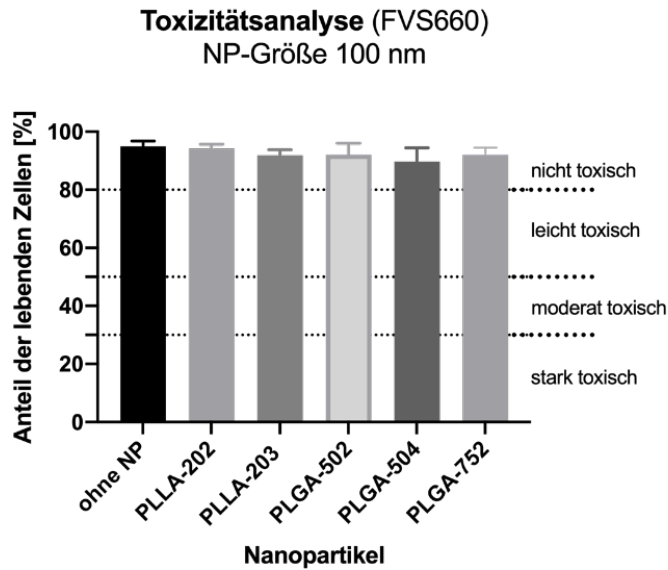


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Nanopartikel-Aufnahme (a, c) und Toxizitätsanalysen verschiedener Nanopartikel (b, d). hBMEC wurden mit 150 µg/ml verschiedener NP (PLLA-202, -203, PLGA-502, -504, -752) und einer Größe von 50 und 100 nm für 20 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert und die Aufnahme sowie Toxizität per fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten wurden auf die Fluoreszenzintensitäten des Partikels PLLA-202 normiert. Als Kontrolle wurden ungefärbte Zellen ohne NP mit FVS660 verwendet (Anteil der lebenden Zellen <30 %: stark toxisch, 30 – 50 %: moderat toxisch, 50 – 80 %: leicht toxisch, >80 %: nicht toxisch; einfache Varianzanalyse mit *Dunnnett*-Post-hoc-Test. *: P<0,0332, **: P<0,0021, ***: P<0,0002, ****: P<0,0001; n=3).

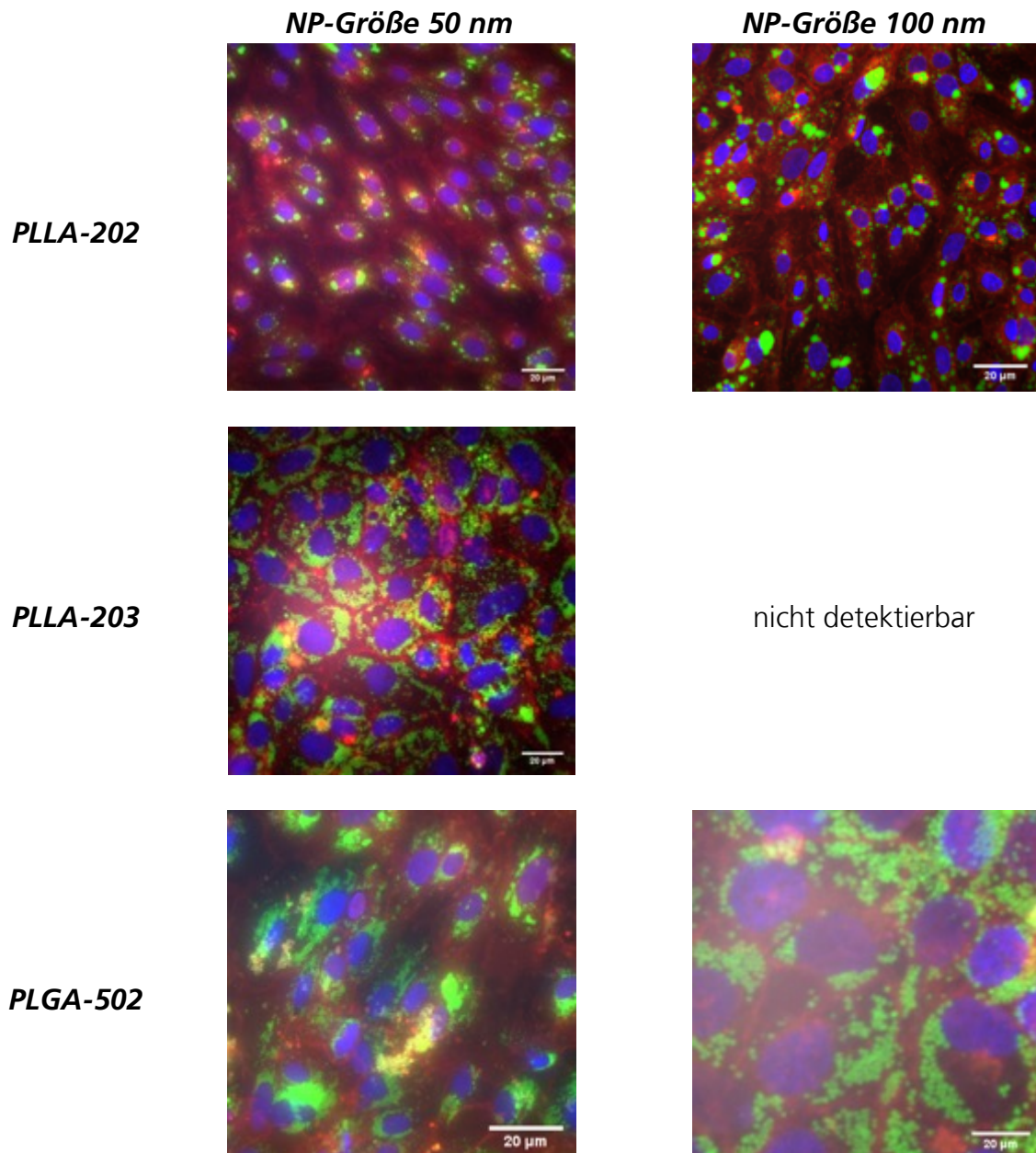
Aus Abbildung 26 wird deutlich, dass die Aufnahme von PLGA-502 sowohl mit einer Partikelgröße von 50 wie auch mit 100 nm am stärksten ist. Darüber hinaus gibt es signifikante Unterschiede bei der Aufnahme aller Partikel mit einer Größe von 50 nm im Vergleich zu PLLA-202 (Abbildung 26a). So ist die Aufnahme des am stärksten aufgenommenen Partikels, PLGA-502, um 1,8-mal signifikant stärker als die von PLLA-202. Im Vergleich dazu sind die Aufnahmen der anderen beiden PLGA-Partikel nur um 1,2-fach stärker als PLLA-202. Betrachtet man die Aufnahme des anderen PLLA-Partikels, so ist diese sogar 0,2-mal niedriger als die des PLLA-202.

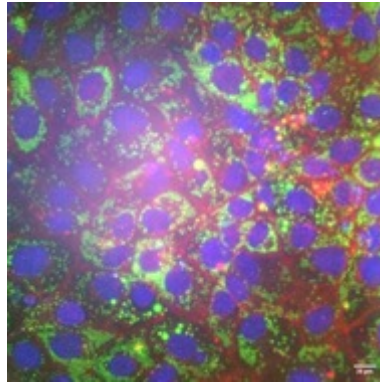
Auch bei einer Partikelgröße von 100 nm werden die PLGA-Partikel stärker als die PLLA-Partikel aufgenommen (Abbildung 26c). Jedoch sind nur die Aufnahmen von PLGA-502 und PLGA-752 signifikant stärker als jene von PLLA-202. Die Aufnahme von PLLA-203 ist ähnlich stark wie PLLA-202.

Die Analyse der Toxizität der NP im Vergleich zu Zellen ohne NP ist in Abbildung 26b und Abbildung 26c dargestellt. Es wird deutlich, dass der Anteil lebender Zellen nach der NP-Behandlung mit Partikeln über 95 % ist. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass keiner der NP bei einer Konzentration von 150 µg/ml nach 20 h Inkubation toxisch ist.

Die Durchflusszytometrie detektiert auch Zellen, die NP lediglich auf ihrer Zelloberfläche adsorbieren. Um dies auszuschließen, ist eine Verifizierung der intrazellulären Aufnahme der NP mittels Fluoreszenzmikroskopie notwendig. Um einen Vergleich zwischen den durchflusszytometrischen Analysen und der Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, wurde die gleiche NP-Konzentration von 150 µg/ml eingesetzt. Da es jedoch bei dieser

hohen Konzentration auch zu einer erhöhten Aufnahme der Partikel kam und die zellulären Strukturen nicht mehr zu erkennen waren, musste die Inkubationszeit auf 4 h reduziert werden. Die NP-Aufnahme erfolgte mit allen Partikeln (Tabelle 7). Durch die Färbung von Zellmembran (Cell Mask™ Orange, rot) und Zellkern (Hoechst 33342, blau) sollte eindeutig belegt werden, ob die grün-fluoreszierenden NP im Zytoplasma lokalisiert sind (Abbildung 27).



PLGA-504

nicht detektierbar

PLGA-752

nicht detektierbar

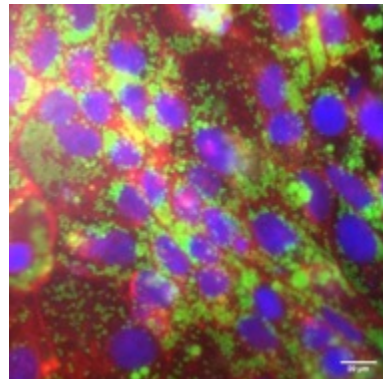
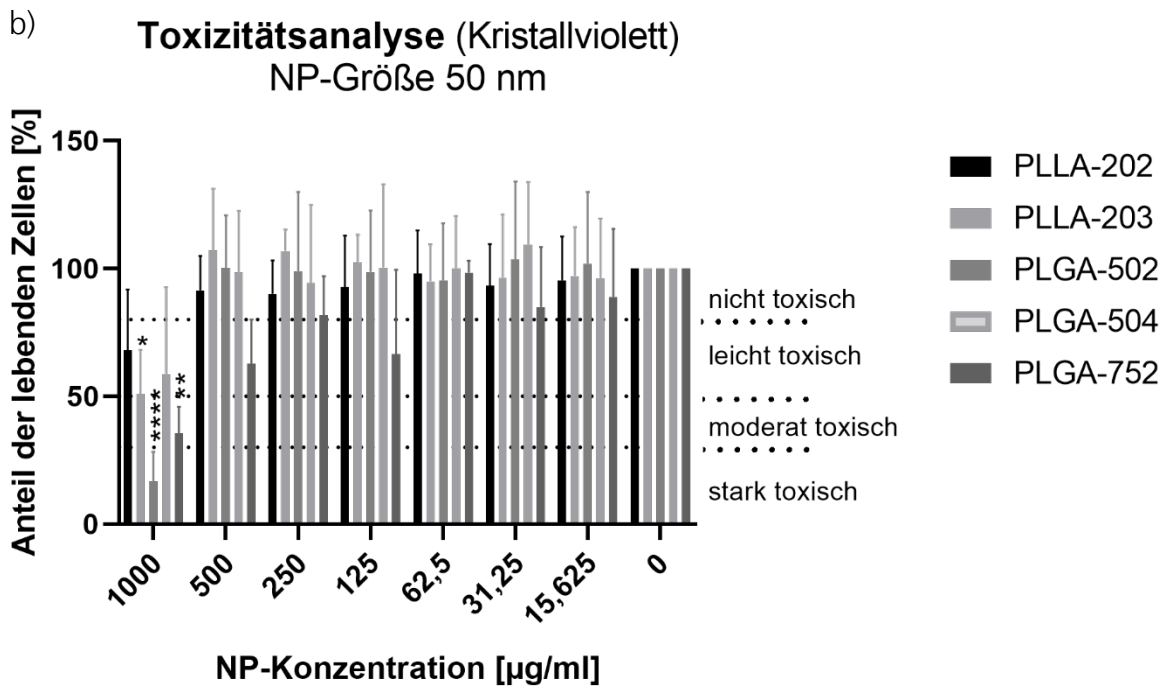
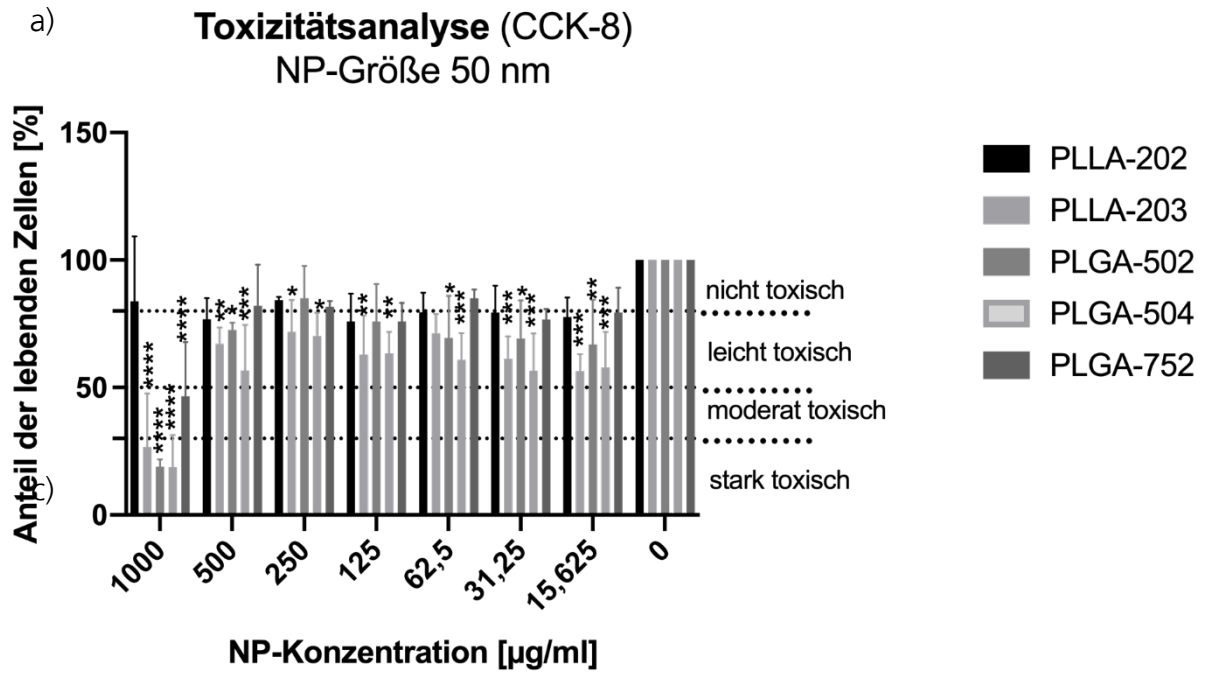


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der NP-Aufnahmen aller Nanopartikel. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen (hBMEC) erfolgten nach der Aufnahme von PLLA-202, -203 sowie PLGA-502, -504 und -752 mit jeweils einer Größe von 50 und 100 nm und einer Konzentration von 150 µg/ml für 4 h unter Standardkulturbedingungen. In den NP wurde der fluoreszierende Farbstoff PMI (grün) verkapselt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Höchst 33342 (blau) und der Zellmembran mit Cell Mask™ Orange (rot). (50x-Vergrößerung, Weitfeldfluoreszenzmikroskop Olympus BX51).

Ausgenommen von PLLA-204 und PLGA-504 mit einer Größe von 100 nm und PLGA-752 mit einer Größe von 50 nm konnten von allen Partikeln fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht werden. Diese zeigen eine erfolgreiche Aufnahme dieser Partikel in das Zytoplasma. Außer PLGA-502 und PLGA-752 mit einer Größe von 100 nm agglomerieren die anderen Partikel nach der Aufnahme in den Zellen nicht. Jedoch scheint diese Agglomeratbildung keinen Einfluss auf die Aufnahme der Partikel im Zytoplasma der Zellen zu haben. Bei 100 nm PLLA-204 und PLGA-504 und 50 nm PLGA-752 kam es auch bei Reduktion der NP-Konzentration sowie der Inkubationszeit zu erhöhten Aufnahmen (nicht abgebildet). Dies hatte zur Folge, dass die Membranstrukturen der Zellen nicht mehr zu erkennen waren. Eine eindeutige Verifizierung der Aufnahme dieser Partikel war nicht möglich.

Um die Toxizitätsanalysen mit FVS660 zu verifizieren, wurden weitere Analysen, welche auf anderen Nachweismethoden beruhen, durchgeführt. In Abbildung 28 ist die Toxizitätsanalyse mittels CCK-8 sowie Kristallviolett färbung dargestellt. Der prozentuelle Anteil der lebenden Zellen ist gegen die verschiedenen Konzentrationen der NP aufgetragen. Auffällig ist, dass die Anteile an lebenden Zellen bei der Kristallviolett färbung im Vergleich zu den Kontrollen leicht erhöht ist.



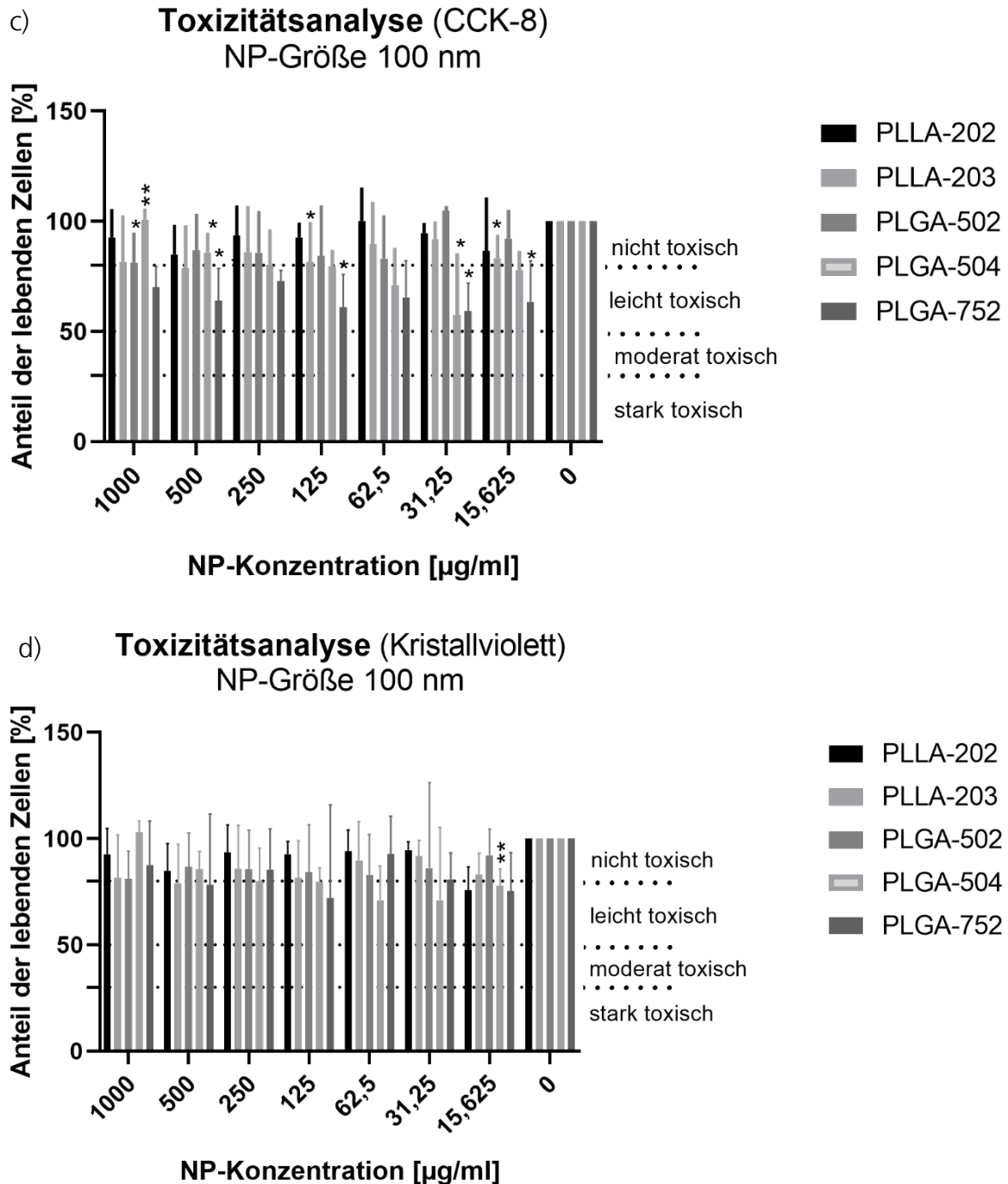


Abbildung 28: Toxizitätsanalyse mittels Cell Counting Kit-8 (CCK-8; a, c) und Kristallviolett (b, d). Die zu hBMEC differenzierten Zellen wurden mit den Partikeln PLLA-202, PLLA-203, PLGA-502, PLGA-504 und -752 mit einer Größe von 50 und 100 nm bei verschiedenen Konzentrationen für 20 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen (0 $\mu\text{g/ml}$), deren Anteil an lebenden Zellen auf 100 % gesetzt wurde. (Anteil der lebenden Zellen <30 %: stark toxisch, 30 – 50 %: moderat toxisch, 50 – 80 %: leicht toxisch, >80 %: nicht toxisch; zweifache Varianzanalyse mit *Dunnnett-Post-hoc-Test*. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$).

Bei einer Konzentration von 1.000 $\mu\text{g/ml}$ ist der Anteil an lebenden Zellen nach einer Aufnahme der Partikel mit einer Größe von 50 nm auf unter 30 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Abbildung 28a). Somit wirken alle NP bei dieser Konzentration, ausgenommen PLLA-202, signifikant moderat bzw. stark toxisch auf die Zellen. Unter einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ sind nur noch leichte oder keine toxischen Einflüsse

der Partikel auf die Zellen zu beobachten. Die Beobachtungen der Toxizitätsanalysen bei 1000 µg/ml zeigten sich auch bei den Analysen mit Kristallviolett bei einer NP-Größe von 50 nm (Abbildung 28c). Unter einer Konzentration von 500 µg/ml gab es mit einem Anteil von 70 – 100 % leichte oder keine toxischen Einflüsse der NP.

Wie in Abbildung 28c zu beobachten ist, führt bei einer NP-Größe von 100 nm die Aufnahme von PLGA-752 zu einer teilweise signifikanten Reduzierung der lebenden Zellen auf 60 - 70 % bei allen verwendeten Konzentrationen. Dies führt zu einer leichten toxischen Wirkung des Partikels auf die Zellen. Auffällig ist auch, dass PLGA-504 nur bei niedrigen Konzentrationen von 62,8 und 31,5 µg/ml leicht toxisch auf die Zellen wirkt. Bei Aufnahme der anderen Partikel liegt der Anteil lebender Zellen zwischen 80 - 90 % bei den verschiedenen Konzentrationen. Keines dieser NP wirkt toxisch auf die Zellen. Die Ergebnisse des Kristallvioletttests mit einer NP-Größe von 100 nm korrelieren mit den Ergebnissen aus den CCK-8-Analysen (Abbildung 28d). Es ist nur eine leichte bis keine toxische Wirkung der Partikel erkennbar.

Zusammenfassend betrachtet wird PLGA-502 am besten aufgenommen und hat mit einer Partikelgröße von 50 wie auch 100 nm bei einer Konzentration von 150 µg/ml einen signifikanten Einfluss auf die Dichtigkeit der Zell-Barriere. Dies ist auch bei einer Konzentration von 75 µg/ml und einer Größe von 50 nm zu beobachten. Bei niedrigeren Konzentrationen sowie bei der Aufnahme von Partikeln mit einer Größe von 100 nm ist keine oder nur eine leichte Toxizität der Partikel zu beobachten. Durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen konnte eine erfolgreiche Aufnahme der Partikel in den Zellen gezeigt werden. Bei Aufnahme von PLGA-502 und -752 haben die Agglomeratbildungen jedoch keinen Einfluss auf die Zellaufnahme. Eine fluoreszenzmikroskopische Verifizierung der Partikel aufnahmen von PLLA-204 und -504 mit einer Größe von 100 nm und PLGA-752 mit einer Größe von 50 nm war nicht erfolgreich.

Neben dem Polymermaterial und den Tensiden zur Stabilisierung sowie weiteren physikochemischen Eigenschaften wie der Größe und der Oberflächenladung hat auch die Proteinkorona der Partikel einen Einfluss auf die Aufnahme und Toxizität der Partikel. Um den Einfluss der Proteinkorona genauer untersuchen zu können, bedarf es an Analysen zu dessen Zusammensetzung.

4.4 Analyse der Proteinkorona

Gibt man NP in ein biologisches Medium, so adsorbieren auf dessen Oberfläche Proteine und bilden eine Proteinkorona (PK) (Jiang *et al.*, 2008; Nel *et al.*, 2006). Eine Vielzahl an physikochemischen Eigenschaften der NP (u.a. Größe, Material, Oberflächenladung) beeinflussen die Bildung der PK (Cedervall *et al.*, 2007; Nel *et al.*, 2009). Unterschieden wird zwischen einer harten und einer weichen PK, wobei die harte PK die Hauptbestandteile der neuen Identität der NP bilden (Monopoli *et al.*, 2012; Monopoli *et al.*, 2013; Treuel & Nienhaus, 2012). Diese hat oft einen Einfluss auf die Toxizität, Zellaufnahme, aber auch Agglomeration der Partikel (Monopoli *et al.*, 2013; Monopoli *et al.*, 2011). Daher wurden nachfolgend massenspektrometrisch die PK-Zusammensetzung sowie die Veränderung der Oberflächenladung mittels Zetapotentialsmessung der harten PK untersucht.

Um die PK-Zusammensetzung auf die NP-Eigenschaften und Aufnahme zurückführen zu können, wurde die Korona der NP massenspektrometrisch analysiert. Zur Ausbildung der PK wurden die NP für 1 h bei 37 °C und 500 U/min mit Blutplasma inkubiert. Zur Subtraktion der Intensitäten der NP von denen der Proteine, wurden die NP als Referenz unter den gleichen Bedingungen nur mit PBS inkubiert.

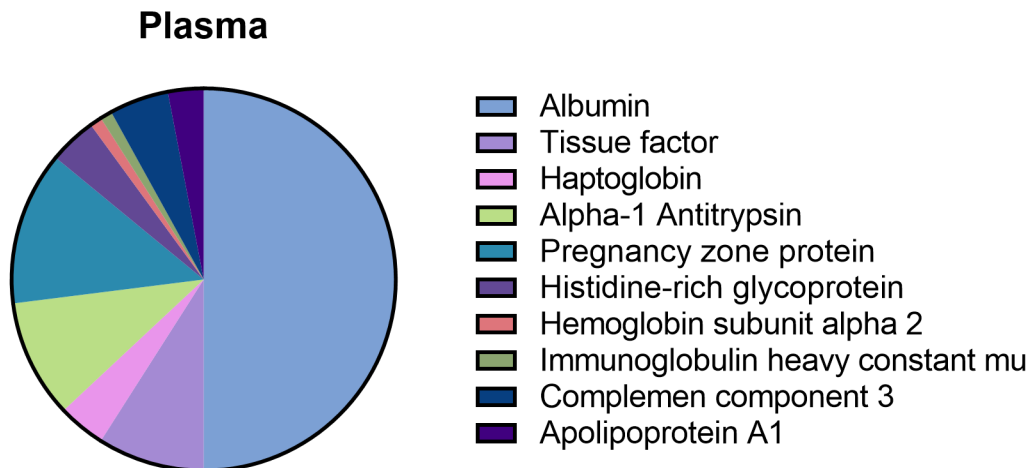
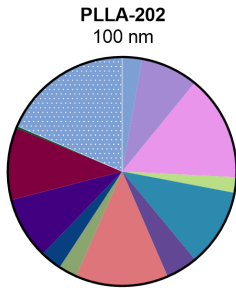
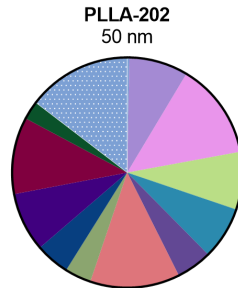


Abbildung 29: Proteinzusammensetzung des verwendeten humanen Blutplasmas. Das Blutplasma setzt sich aus 20 verschiedenen Blutproben zusammen. Die Analyse der Proteinzusammensetzung wurde vom Institut für molekulare Biologie gGmbH (IMB) in Mainz massenspektrometrisch durchgeführt.

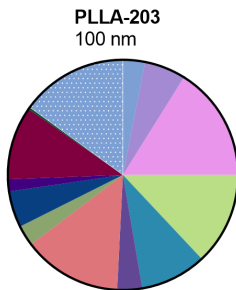
Die Abbildung 29 zeigt die Proteinzusammensetzung des verwendeten humanen Blutplasmas. Das Blutplasma besteht zu 50 % aus Albumin. Weitere Proteine, die einen großen Anteil einnehmen, sind mit 13 % *Pregnancy zone protein*, 10 % *Alpha-1 Antitrypsin* sowie 9 % der *Tissue factor*.



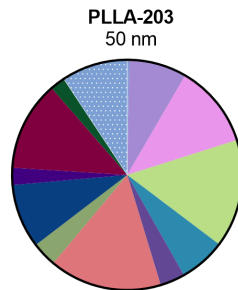
- Actin Beta
- Albumin
- Apolipoprotein A1
- Apolipoprotein A4
- Apolipoprotein E
- Apolipoprotein H
- Complement Component 3
- Complement Factor H
- Clusterin
- Histidine-rich Glycoprotein
- Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
- Serpin Family G Member
- Sonstige



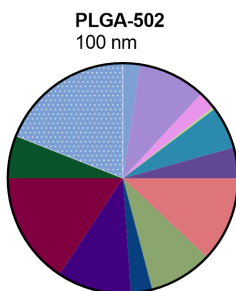
- Actin Beta
- Albumin
- Apolipoprotein A1
- Apolipoprotein A4
- Apolipoprotein E
- Apolipoprotein H
- Complement Component 3
- Complement Factor H
- Clusterin
- Histidine-rich Glycoprotein
- Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
- Serpin Family G Member
- Sonstige



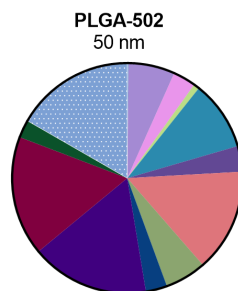
- Actin Beta
- Albumin
- Apolipoprotein A1
- Apolipoprotein A4
- Apolipoprotein E
- Apolipoprotein H
- Complement Component 3
- Complement Factor H
- Clusterin
- Histidine-rich Glycoprotein
- Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
- Serpin Family G Member
- Sonstige



- Actin Beta
- Albumin
- Apolipoprotein A1
- Apolipoprotein A4
- Apolipoprotein E
- Apolipoprotein H
- Complement Component 3
- Complement Factor H
- Clusterin
- Histidine-rich Glycoprotein
- Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
- Serpin Family G Member
- Sonstige



- Actin Beta
- Albumin
- Apolipoprotein A1
- Apolipoprotein A4
- Apolipoprotein E
- Apolipoprotein H
- Complement Component 3
- Complement Factor H
- Clusterin
- Histidine-rich Glycoprotein
- Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
- Serpin Family G Member
- Sonstige



- Actin Beta
- Albumin
- Apolipoprotein A1
- Apolipoprotein A4
- Apolipoprotein E
- Apolipoprotein H
- Complement Component 3
- Complement Factor H
- Clusterin
- Histidine-rich Glycoprotein
- Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
- Serpin Family G Member
- Sonstige

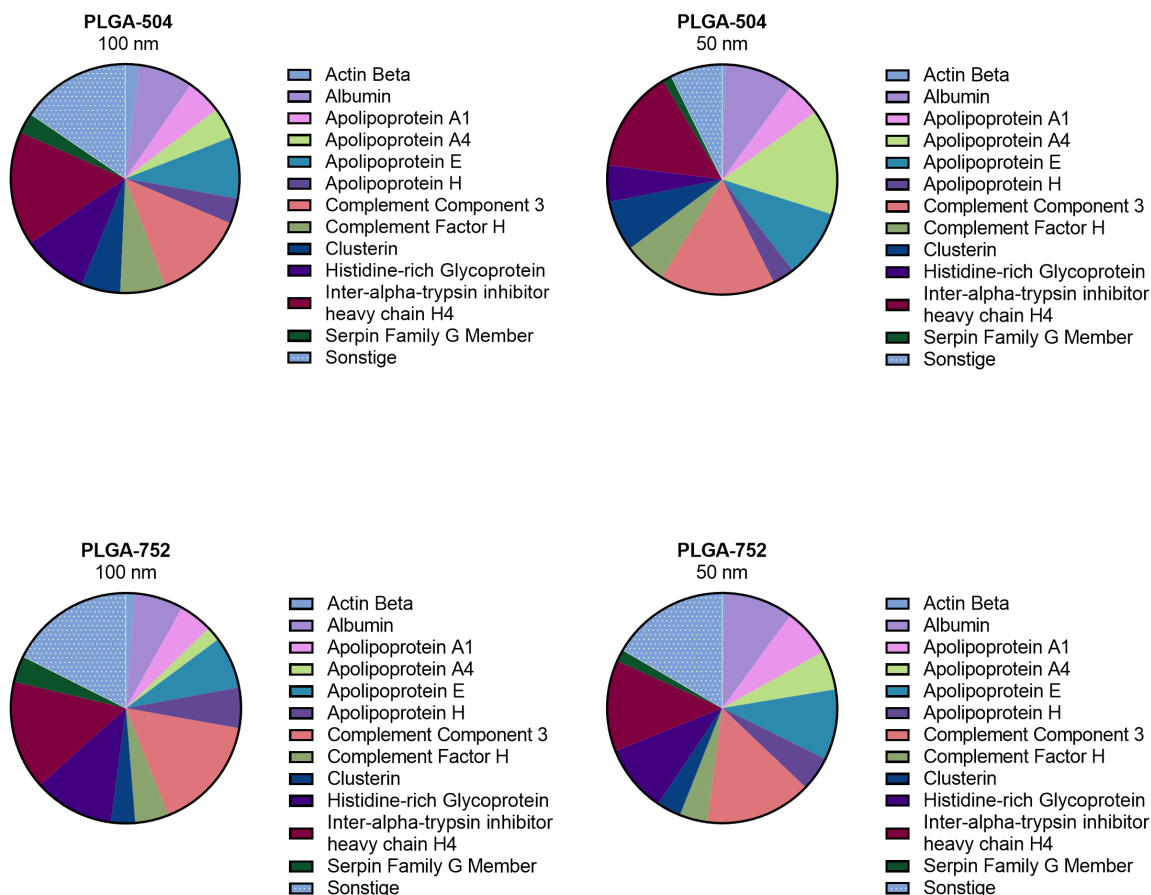
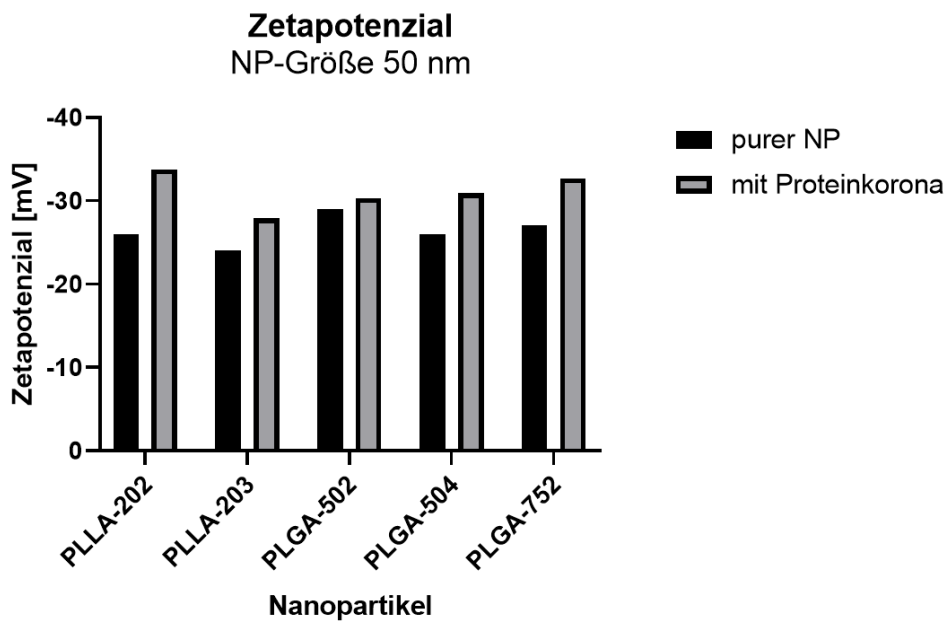


Abbildung 30: Zusammensetzungen der Proteinkoronen der verschiedenen Nanopartikel nach Inkubation mit humanem Blutplasma. Für die Ausbildung der PK wurden die NP für 1 h bei 37 °C und 500 U/min auf einem Heiz-Thermo-Mixer mit humanem Blutplasma, vereinigt aus 20 einzelnen Blutproben, inkubiert. Als Kontrolle dienten NP, welche unter gleichen Bedingungen mit PBS anstelle des Blutplasmas behandelt wurden. Die massenspektrometrischen Messungen und Analysen wurden vom Institut für molekulare Biologie gGmbH (IMB) in Mainz durchgeführt. (Zweifache Varianzanalyse mit *Tukey-Post-hoc-Test*. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=1$).

Die Abbildung 30 zeigt die PK-Zusammensetzung der synthetisierten NP. Obwohl Albumin 50 % des Blutplasmas ausmacht, ist es in den PK der Partikel nur mit 6 – 10 % vertreten. Vergleicht man die adsorbierten Proteine auf den Oberflächen der verschiedenen NP miteinander, so wird deutlich, dass es bei gleicher Materialzusammensetzung der NP keine signifikanten Unterschiede zwischen den 50 nm und 100 nm großen Partikeln gibt. Obwohl Apolipoproteine mit 3 % und *Complement Components* mit 5 % nur einen sehr geringen Anteil im Blutplasma einnehmen, bestehen die Koronen der NP hauptsächlich aus diesen beiden Proteinen. Die PLLA-NP besitzen einen Anteil von 33 – 42 % an Apolipoproteinen in ihrer PK. Im Vergleich dazu, besitzen die PLGA-NP nur 13 % (PLGA-502, 100 und 50 nm) – 31,8 % (PLGA 504, 50 nm) an Apolipoproteinen in ihren Koronen. Betrachtet man den Anteil an *Complement Components*, so verteilt sich dieser bei beiden Polymeren ähnlich und liegt bei 16 – 19 % bei PLLA- und 18 – 22 % bei PLGA-Partikeln.

Die in den PK enthaltenen Proteine können auf Grund ihrer Ladung auch einen Einfluss auf die Oberflächenladung der Proteine haben. Um dies auszuschließen, wurde nach der Ausbildung der PK eine Zetapotentialsmessung (ZP) durchgeführt (Abbildung 31).

a)



b)

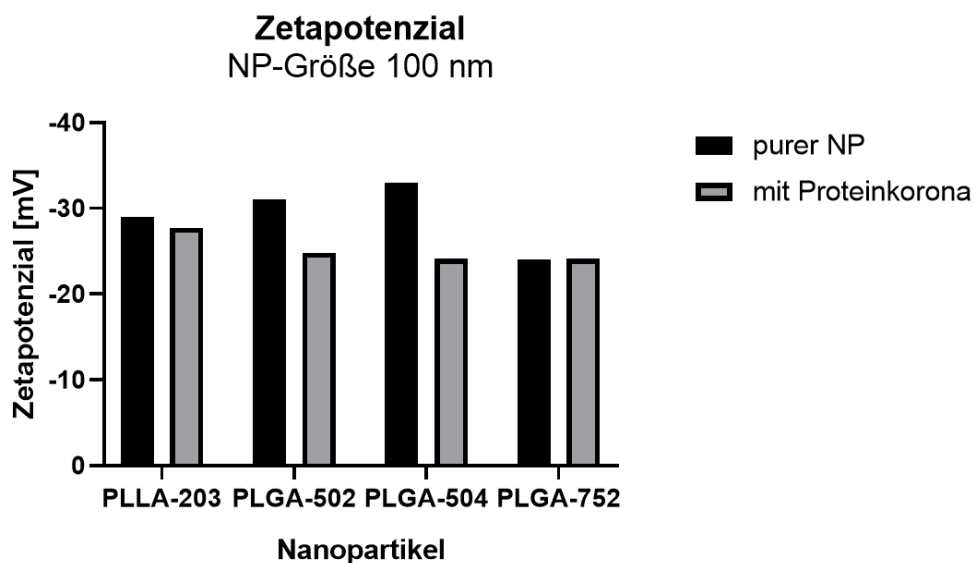


Abbildung 31: Veränderung des Zetapotenzials nach Ausbildung einer Proteinkorona. Für die Ausbildung der PK wurden die NP mit einer Größe von 50 nm (a) und 100 nm (b) für 1 h bei 37 °C und 500 U/min auf einem Heiz-Thermo-Mixer mit humanem Blutplasma, vereinigt aus 20 einzelnen Blutproben, inkubiert. Als Kontrolle dienten NP, welche unter gleichen Bedingungen mit PBS anstelle des Blutplasmas behandelt wurden. Zur ZP wurden die NP in 10 mM KCL gelöst. (Zweifache Varianzanalyse mit *Sidak*-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=1$).

Betrachtet man die Abbildung 31 so wird deutlich, dass es nach Ausbildung der PK keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenladung zwischen NP mit und jenen ohne PK gibt. Sowohl bei einer Größe von 50 nm wie auch bei 100 nm beträgt das ZP bei allen Partikeln 25 – 33 mV. Bei einer Größe von 50 nm ist eine Steigerung des ZP mit einer PK

lediglich um 7 % ersichtlich. Im Vergleich dazu ist bei einer Größe von 100 nm keine oder ein erhöhtes ZP von bis zu 35 % ohne PK zu beobachten. Da der Partikel PLLA-202 mit einer Größe von 100 nm nicht stabil war, war eine Messung des ZP nach Ausbildung einer PK nicht möglich.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Zusammensetzungen der Partikel-PK nicht die des Serums widerspiegeln. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der PK-Zusammensetzung, die auf die Größe oder das Polymermaterial zurückzuführen sind. Darüber hinaus scheint die PK auch die Oberflächenladung, welche mittels ZP gemessen wurde, nicht signifikant zu verändern.

5 DISKUSSION

Die BHS bildet eine Barriere zwischen dem ZNS und der Blutzirkulation. Ihre Funktion ist hauptsächlich auf dichte Zell-Zell-Verbindungen sowie selektive Transporter in den Hirnendothelzellen zurückzuführen. Aufgabe dieser Barriere ist es das ZNS vor im Blut befindlichen Giftstoffen, Krankheitserregern und Verletzungen zu schützen. Jedoch stellt diese Barriere bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Hirntumoren eine nur schwer überwindbare Barriere für potentielle Arzneistoffe dar. Dies hat zur Folge, dass Arzneistoffe zu der Behandlung diese Barriere nicht überwinden können, vorher metabolisiert werden oder bei erfolgreicher Überwindung ihre Zielzellen im Gehirn nur in geringer Konzentration erreichen. Daher werden höhere Dosen eingesetzt, um die Konzentration im Hirn zu steigern. Dies erhöht allerdings auch das Risiko Nebenwirkungen in gesundem Gewebe zu verursachen. Um die Barriere zu überwinden, werden NP als mögliche Wirkstoffträgersysteme gesehen. Sie erhöhen die Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe und reduzieren die Nebenwirkungen im gesunden Gewebe.

Der hohe Bedarf an Testsystemen für die Grundlagen- und präklinische Forschung zur Untersuchung potentieller Arzneistoffe und Wirkstoffträgersysteme resultierte in einer Vielzahl an unterschiedlichen Modellsystemen der BHS. Meist wird auf Tiermodelle oder tierische Zellen zurückgegriffen. Dies bringt jedoch den großen Nachteil, dass ihre Verwendung oft sehr kostspielig, zeitaufwendig und ethisch kritisch gesehen wird. Darüber hinaus ist eine direkte Translation der gemachten Erkenntnisse in erste präklinische Studien von Tier auf Mensch nur bedingt möglich. Mit einem physiologischen Modell der BHS kann das ethische Prinzip der „3 R“: *Replacement* (Vermeidung), *Reduction* (Reduzierung) und *Refinement* (Verbesserung) gefördert werden (Russell & Burch, 1959). Ursprünglich *in vivo* geplante Versuche können in einem physiologischen BHS-Modell mit humanen Zellen durchgeführt werden. Dies kann eine hohe Anzahl an Tierversuchen einsparen. Darüber hinaus kann ein Modell für die Auswahl von ungeeigneten Arzneistoffen und Wirkstoffträgersystemen, die für eine Arzneimittelzulassung *in vivo* geprüft werden müssen, genutzt werden. Dies kann die Anzahl an notwendigen Tierversuchen reduzieren.

Modelle aus humanen Zelllinien generieren oft keine dichte Zellbarriere und exprimieren nur zum Teil TJ-assoziierte und endotheliale Proteine (Deli *et al.*, 2005). Der Zugang zu primären, humanen Zellen ist zudem sehr beschränkt. Zellen stehen ausschließlich von Autopsien oder Biopsien zur Verfügung. Oftmals handelt es sich dabei jedoch um erkranktes Hirngewebe und es besteht eine erhöhte Gefahr, dass die isolierten Zellen mit Tumorzellen kontaminiert werden könnten (Lippmann *et al.*, 2012). Als Alternative für humane Zellen zum Aufbau eines BHS-Modells eignen sich humane iPSC, die zu hBMEC differenziert wurden. Die zu hBMEC differenzierten Zellen exprimieren nicht nur essentielle endotheliale Gene, sondern auch TJ-assoziierte Proteine und generieren unter den optimalen Kulturbedingungen eine dichte Barriere.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein realitätsnahes *in vitro*-Modell der BHS zu etablieren und dieses für die biologische Charakterisierung von polymeren NP als potentielle Wirkstoffträgersysteme einzusetzen. Hierfür wurden humane iPSC verwendet, die durch geeignete Kulturmedien und dem Einsatz von extrazellulären Matrixproteinen zu hBMEC differenziert wurden. Neben der Expression essentieller endothelialer Proteine, stand auch

die Expression essentieller Proteine zum Aufbau einer Zellbarriere sowie dessen Dichtigkeit bei der Charakterisierung der differenzierten Zellen im Fokus. Ein weiteres Ziel war der Einsatz des Modells zur Untersuchung von polymeren NP unterschiedlichen Materials und physikochemischer Eigenschaften wie der Größe. Ein weiterer Punkt in der Partikel-Analyse war die Zusammensetzung der PK und ihr Einfluss auf die Oberflächenladung.

5.1 Vorteile von humanen iPSC für den Aufbau eines BHS-Modells

Für den Aufbau des Modells sollten humane EZ, welche eine dichte Barriere ausbilden, verwendet werden. Neben humanen primären EZ aus Autopsien oder Biopsien können auch humane endotheliale Zelllinien sowie humane embryonale oder induzierte pluripotente Stammzellen, welche zu Endothelzellen differenziert werden, für das Modell eingesetzt werden.

Verwendet man humane primäre EZ, welche aus Autopsien oder Biopsien von Patienten mit Epilepsie oder Hirntumoren stammen, kann es zu erhöhter Variabilität unter den Spendern kommen. Dies ist auf die unterschiedliche Qualität der Zellen, die dem Patienten entnommen werden, zurückzuführen. Vor allem bei Biopsien werden vorrangig erkrankte Zellen entfernt. Neben einer geringen Ausbeute der gesunden EZ kann es auch zu einer Kontamination durch die erkrankten Zellen kommen. Die Verwendung von primären EZ kann eine personalisierte Behandlung des Patienten ermöglichen. So kann direkt eine Aussage über die Wirkung eines potentiellen Wirkstoffes gemacht und gegebenenfalls an den Patienten angepasst werden. Dies eignet sich jedoch vorrangig für Untersuchungen von Erkrankungen, bei denen die BHS bereits geschädigt ist. Außerdem ist die Zahl der Zellen, welche sowohl aus Autopsien oder Biopsien generiert werden können, limitiert, da diese von den Spenderzahlen abhängig ist. Die Entnahme dieser Zellen wird vorrangig in Operationssälen in Krankenhäusern durchgeführt. Dementsprechend kann beim Transport der Zellen vom Krankenhaus zum Forschungslabor, der oft mit großer Zeitverzögerung stattfindet, bei einer Vielzahl der Zellen der Zelltod eintreten. Dies kann die Zahl der isolierbaren EZ weiter verringern. Eine Kultivierung der Zellen ist dann dennoch möglich, jedoch könnten diese EZ keine oder nur eine stark verringerte Barriere ausbilden. Außerdem könnte es auf Grund der geringen Zahl an isolierbaren EZ vermehrt zum Wachstum anderer Zellen kommen.

Durch die starke Limitierung sowie Variabilität der EZ, welche aus Autopsien oder Biopsien gewonnen werden können, eignen diese sich nicht für den Aufbau eines humanen sowie reproduzierbaren Modells der BHS (Helms *et al.*, 2016).

Die Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 werden oft zum Aufbau von BHS-Modellen eingesetzt. Sie exprimieren zwar endotheliale sowie TJ-assoziierte Proteine wie PECAM/CD31, VE-cadherin, Claudin-5, Occludin und ZO-1 und -2 (Weksler *et al.*, 2013), jedoch ist diese Expression, vor allem von Claudin-5, stark verringert (Urich *et al.*, 2012). Dies zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in diskontinuierlichen Expressionen von Claudin-5, PECAM/CD31 und Occludin. Die Folge daraus war, dass die Expression der Proteine durch immunozytochemische Färbungen nicht nachgewiesen werden konnten. Aus der Literatur können TEER-Werte von bis zu $40 \Omega\text{cm}^2$ in Monokultur entnommen werden (Helms *et al.*, 2016). Bei Messungen konnte, trotz vollständiger Konfluenz, jedoch gar kein TEER ermittelt werden. Occludin, Claudin-5 sowie PECAM/CD31 sind essentiell für den Aufbau

einer dichten Barriere und den endothelialen Charakter. Ist die Expression dieser Proteine verringert bzw. nicht gegeben, kann keine dichte Barriere aufgebaut und somit kein TEER gemessen werden. Die Dichtigkeit der Barriere und damit die Permeabilität kann auch mit Hilfe eines Permeabilitätskoeffizienten für Stoffe unterschiedlicher Größe bestimmt werden. Je niedriger dieser Wert ist, desto dichter ist die Barriere. Bei der Analyse dessen beträgt er für Natrium-Fluorescein (ca. 0,33 kDa) $20 - 90 \cdot 10^{-6}$ cm/s, wohingegen er für 70 kDa Dextran einen Wert von $0,3 \cdot 10^{-6}$ cm/s erreicht (Helms *et al.*, 2016). Dies zeigt, dass hCMEC/D3 nur eine Barriere für große Substanzen über ca. 70 kDa, nicht aber für kleine Substanzen mit einer Größe von ca. 0,33 kDa darstellen.

Die Nutzung der Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 hat den Vorteil der einfachen Kultivierung und Kryokonservierung sowie der hohen Zugänglichkeit. Jedoch eignen sich diese Zellen auf Grund der geringen Barriere nicht für den Aufbau eines BHS-Modells zur Analyse der Barrieregängigkeit von NP. Ihr Einsatz dient vorrangig der Untersuchung von neuroinflammatorischen Einflüssen verschiedener Stoffe (Helms *et al.*, 2016). Darüber hinaus können die Zellen auch für den Arzneimitteltransport großer Moleküle eingesetzt werden.

Für Untersuchungen bezüglich des Transports von kleinen Stoffen bedarf es an Optimierungen oder Alternativen wie z.B. der Einsatz von Stammzellen, die zu Hirnendothelzellen differenziert werden.

Neben embryonalen Stammzellen werden vor allem iPSC für den Aufbau eines Modells der BHS verwendet (Appelt-Menzel *et al.*, 2017; Lippmann *et al.*, 2012). Beide Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich auf Grund ihrer Pluripotenz in jede Zelle des menschlichen Körpers differenzieren lassen (Zakrzewski *et al.*, 2019). Embryonale Stammzellen werden aus dem Inneren der Blastozyste einer befruchteten Eizelle aus überzähligen *in vitro* Befruchtungen gewonnen. Ihre Verwendung in der Forschung wird jedoch ethisch kritisch betrachtet, da die Eizelle nach der Kernschmelze potentiell menschliches Leben entwickeln kann. Darüber hinaus ist in Deutschland die Produktion von mehr als der Anzahl an benötigten befruchteten Eizellen zum Einsetzen in eine Patientin nach §2 des Embryonenschutzgesetzes verboten. Die Einfuhr aus dem Ausland ist nur mit den embryonalen Stammzellen möglich, welche vor dem 1. Januar 2002 entstanden sind und bedarf ebenfalls nach §2 des Embryonenschutzgesetzes einer Genehmigung. Auf Grund der strikten Limitierung und ethischen Kritik beim Einsatz von embryonalen Stammzellen wurden diese zum Aufbau eines Modells nicht verwendet.

Pluripotente Stammzellen besitzen das gleiche genetische Material und die Möglichkeit der Kryokonservierung. Dies ermöglicht eine erhöhte Standardisierung und Reproduktion angewandeter Protokolle. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen bedarf es für die Verwendung von iPSC keiner Genehmigung. Zudem ist der Zugang unbegrenzt.

Lippmann *et al.* hat gezeigt, dass die Verwendung der iPSC iPS(IMR90)-4 im Vergleich zu anderen iPSC in einer kürzeren Differenzierungszeit, das höchste Differenzierungspotential, die höchste Zellausbeute sowie einem erhöhtem TEER und einer niedrigen Permeabilität resultierte (Lippmann *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wurde zum Aufbau des BHS-Modells ebenfalls auf diese iPS-Zelllinie zurückgegriffen. Die undifferenzierten Zellen wurden auf Matrigel™ in mTeSR™ Plus-Kulturmedium kultiviert. Dies ermöglichte eine Kultivierung der Zellen ohne täglichen Wechsel des Mediums bei Erhaltung der Pluripotenz der Zellen. Die Zellen wuchsen in Kolonien, welche durch scharfe Kanten abgegrenzt waren. Diese Morphologie ähnelt den embryonalen Stammzellen (Robinton & Daley, 2012). Zellauswüchse aus diesen Kolonien sprechen für

eine unspezifische Differenzierung und damit einem Verlust ihrer Pluripotenz. Aus diesem Grund ist neben einer morphologischen Kontrolle die Analyse der Pluripotenz der Zellen auch auf anderer Ebene notwendig. Essentiell für die Erhaltung der Pluripotenz ist die Expression von *nanog*, *oct3/4* und *sox2* (Takahashi & Yamanaka, 2006; Yu *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Expression dieser drei Gene erfolgreich nachgewiesen werden und zeigte, dass die Zellen pluripotent sind. Die Pluripotenz kann auch durch das Potential der Differenzierung in alle drei Keimblätter Mesoderm, Endoderm und Ektoderm *in vivo* oder *in vitro* mittels Teratomanalyse durchgeführt werden. Des Weiteren sind auch Analysen durch Immunfluoreszenzfärbungen sowie Durchflusszytometrie weit verbreitet. Da die verwendeten iPSC jedoch bereits intensiv charakterisiert worden sind, wurde auf weitere Analysen verzichtet (Yu *et al.*, 2007).

5.2 Differenzierung von iPSC zu hBMEC

Die Differenzierung der iPSC zu Hirnendothelzellen erfolgte nach den bereits veröffentlichten Protokollen nach Lippmann *et al.* (Lippmann *et al.*, 2012) und Neal *et al.* (Neal *et al.*, 2019). Während der Differenzierung kommt es zur Bildung neuronaler und endothelialer Zellen. Für die Entwicklung dieser Zellen wird eine Umgebung geschaffen, die der Entwicklung des embryonalen Hirns ähnelt (Lippmann *et al.*, 2012). Diese Protokolle konnten erfolgreich in dieser Arbeit adaptiert sowie reproduziert werden.

Die Differenzierung wurde durch die Kultivierung der auf Matrigel™ wachsenden iPSC in unkonditioniertem Medium (UM) für 6 Tage gestartet. Dies initiierte die Entwicklung neuronaler Zellen sowie endothelialer Vorläuferzellen (Lippmann *et al.*, 2012). Zu erkennen war dies an den unterschiedlichen Morphologien der Zellen. Daran anschließend folgte die Kultivierung in EC-Medium mit Retinsäure (RA) und bFGF, welches die Entwicklung von EZ förderte (Lippmann *et al.*, 2012). RA wird von AZ-Vorläufern ausgeschüttet. Es steigert die Expression von VE-cadherin und TJ-Proteinen Occludin und Claudin-5 und führt zu einer erhöhten Efflux-Aktivität von MRP und Pgp (Lippmann *et al.*, 2014; Mizee *et al.*, 2013). Diese Wirkung von RA konnte bereits an der Zelllinie hCMEC/D3 (Mizee *et al.*, 2013), aber auch an zu hBMEC differenzierten iPSC (Lippmann *et al.*, 2014) gezeigt werden. Darüber hinaus führt eine Kultivierung mit RA zu einer erhöhten Zellausbeute bei der Differenzierung von iPSC zu hBMEC (Lippmann *et al.*, 2014). Auch dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

Die Differenzierungen wurden in den bisherigen Protokollen meist mit Serum (PDS) durchgeführt (Appelt-Menzel *et al.*, 2017; Hollmann *et al.*, 2017; Lippmann *et al.*, 2014; Lippmann *et al.*, 2012). Da die Herstellung dessen eingestellt wurde und es durch Variationen in der Zusammensetzung zu unterschiedlichen Qualitäten der Chargen kommen kann, ist bei der Verwendung von PDS keine Standardisierung des Protokolls möglich. Hinzu kommt, dass es bei der Verwendung von PDS auch häufig zu nicht erfolgreichen Differenzierungen kam (Neal *et al.*, 2019). Neal *et al.* etablierte ein Protokoll zur Differenzierung bei dem anstelle von PDS B27 verwendet worden ist. Bei B27 handelt es sich um einen Medienzusatz bestehend aus 27 Bestandteilen, welches zur Kultivierung neuronaler Zellen verwendet wird. Nutzt man anstelle von PDS B27, so erhält man einen ähnlich hohen bzw. höheren TEER und die Expression der endothelialen sowie TJ-Proteine ist gegeben (Neal *et al.*, 2019). Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus wurde auf Grund fehlender Verfügbarkeit für das EC-Medium anstelle des EC-

Basalmediums von *Thermo Fisher* auf jenes von *Promocell* zurückgegriffen. Dies resultierte ebenfalls in einer erfolgreichen Differenzierung der Zellen.

Die Aufreinigung des Zellgemisches, bestehend aus neuronalen und endothelialen Zellen, erfolgte durch die Passage auf eine Kollagen-Fibronectin-Matrix. Kollagen IV stellt einen der Hauptbestandteile der Basalmembran dar, wohingegen Fibronectin vor allem in der Entwicklung der EZ einer der Hauptbestandteile der Basalmembran ist und die Entwicklung der EZ-Vorläufer fördert (Thomsen *et al.*, 2017). Im Vergleich zu einer Aufreinigung mittels Antikörper ist die Subkultivierung auf eine Kollagen-Fibronectin-Matrix kostengünstiger, zeitsparender und verursacht keinen Zellstress (Lippmann *et al.*, 2014). Anders als Lippmann *et al.* konnte nicht auf humanes Kollagen IV für den Aufbau der Matrix zurückgegriffen werden, da dieses in Deutschland nur beschränkt zur Verfügung steht. Auf Grund dessen wurde Rattenkollagen I, welches auch erfolgreich zur Kultivierung von hCMEC/D3 verwendet wird, genutzt. Dies resultierte in einer erfolgreichen Differenzierung und konnte die Ergebnisse von Lippmann *et al.* bestätigen. Beim Lösen der Zellen für eine Subkultivierung auf der Kollagen-Fibronectin-Matrix kam es zu einer Accutase-Behandlung von 30 bis 45 min. Die Länge der Behandlung war auf ausgebildete Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte zurückzuführen. Dies konnte anhand von positiven Nachweisen von Occludin und Claudin-5 bereits nach 5 bis 6 Tagen nach Start der Kultivierung in UM von Lippmann *et al.* gezeigt werden (Lippmann *et al.*, 2012).

Über immunocytochemische Färbungen konnten erste Charakterisierungen der hBMEC durchgeführt werden. Der Nachweis von PECAM/CD31, Occludin und Claudin-5 war positiv (Abbildung 18). Auffällig waren jedoch die teilweise diffusen Färbungen der Zellen im Zytoplasma zusätzlich zu den Membran-ständigen Proteinen. Greene *et al.* zeigte, dass es bei der neuronalen Entwicklung des Fötus vermehrt zur Expression von Claudin-5 im Zytoplasma kommt. Erst ab Woche 18 ist eine kontinuierliche Expression von Claudin-5 in der Membran zu beobachten (Greene *et al.*, 2019). Eine ähnliche Beobachtung konnte auch bei der Expression von Occludin gemacht werden. Jedoch sind weitere Isoformen von Occludin oder unspezifische Antikörperfärbungen nicht auszuschließen (Bendriem *et al.*, 2019). Da bei der Differenzierung der iPSC zu hBMEC die neuronale Entwicklung des Hirns nachgestellt wird, können die zusätzlichen diffusen Färbungen darauf zurückgeführt werden. Eine Minimierung dessen könnte durch eine längere Differenzierung der iPSC erfolgen. Darüber hinaus war ein Nachweis von PECAM/CD31 nicht in allen Differenzierungen erfolgreich. Auch bei Verwendung unterschiedlicher Antikörper war dies nicht möglich. Dies könnte auf unterschiedliche *Splice*-Muster, welche verschiedene Isoformen und Sensitivitäten der verwendeten Antikörper zur Folge haben, zurückgeführt werden (DeLisser *et al.*, 1994).

Des Weiteren erfolgte die Charakterisierung durch die Analyse der relativen Genexpression der endothelialen Proteine PECAM/CD31, TJ-assoziierte Proteine Claudin-5, Occludin, ZO-1 sowie Effluxproteine MDR-1 und BCRP (Abbildung 17). Zum Vergleich und zur Beobachtung der Genexpression im Laufe der Differenzierung wurde ebenfalls die Expression der Gene zur Erhaltung der Pluripotenz von iPSC *oct3/4*, *sox2* und *nanog* analysiert und mit undifferenzierten iPSC verglichen. Es zeigte sich, dass die Expression der mikrovaskulären Hirnendothelialen Proteine in hBMEC höher ist als in iPSC. Auffällig war jedoch, dass die Expression des Pluripotenzgens *nanog* in hBMEC höher war als in iPSC. Diese erhöhte Expression von *nanog* in den hBMEC kann auf den Wnt/ β -catenin-Signalweg zurückgeführt werden. Bei der embryonalen Entwicklung der EZ der BHS

werden Wnt7a und Wnt7b von neuronalen Vorläuferzellen ausgeschüttet (Daneman *et al.*, 2010; Lippmann *et al.*, 2012; Stenman *et al.*, 2008). Wnt führt zu einer Stabilisierung von β -catenin, welches die Expression von KLF4 (*Krüppel-like factor 4*) und dieses wiederum die Expression von Nanog fördert (Kohler *et al.*, 2011). Die genaue Rolle von Nanog in EZ ist bisher unklar. Jedoch konnte es bereits in der frühen embryonalen Entwicklung nachgewiesen werden und scheint somit eine Rolle in der Entwicklung der Angiogenese zu spielen. Nanog bindet und aktiviert an FLK-1 (*fetal liver kinase-1*), welches daraufhin den Wnt-Signalweg weiter stimuliert (Kohler *et al.*, 2011). Inhibiert man Nanog, so führt dies zu einer Reduzierung von FLK-1, der Angiogenese und der Zell-Proliferation (Kohler *et al.*, 2011). Ein Fehlen von FLK-1 führt bereits in der embryonalen Entwicklung zu einem Fehlen von EZ und führt zum Tod des Embryos im Uterus (Shalaby *et al.*, 1997).

Die Verwendung des erfolgreich adaptierten Protokolls auf andere iPSC-Zelllinien könnte auf Grund des epigenetischen Gedächtnisses der iPSC herausfordernd sein. Die Epigenetik beschreibt die Untersuchung der Genaktivität, die nicht auf Mutationen beruhen, sondern auf DNA-Methylierungen und Modifikationen der Histone, die von parentalen Zellen vererbt werden. Dies kann, trotz der Pluripotenz der iPSC, maßgeblich ihr Potential sowie ihre Effizienz in verschiedene Zelltypen zu differenzieren beeinflussen (Noguchi *et al.*, 2018). Dies hat zur Folge, dass zur Anwendung des Protokolls auf andere iPSC-Zelllinien weitere Modifikationen sowie Charakterisierungen bezüglich der Effizienz erforderlich sein könnte.

5.3 Etablierung und Charakterisierung des BHS-Modells

Ziel war es ein realitätsnahes Modell der BHS nach Lippmann *et al.* (Lippmann *et al.*, 2012) zu etablieren und an diesem NP auf ihre Aufnahme und Toxizität für einen potentiellen Einsatz als Wirkstoffträger zu testen. Im Fokus stand der humane Ursprung der Zellen, eine Barriere-bildende Eigenschaft und die Expression essentieller Proteine für dessen Aufbau. Die Bildung der Barriere ist hauptsächlich auf EZ zurückzuführen. Diese unterbinden durch dichte Zell-Zell-Verbindungen, welche auf TJ und AJ zurückzuführen sind, den parazellulären Transport kleiner Moleküle. Dies hat zur Folge, dass der Transport über diese Barriere vorrangig nur über transzelluläre Transportwege mit spezifischen Transportern möglich ist. Darüber hinaus kommt es zum aktiven Abtransport von eingedrungenen Molekülen durch ABC-Transporter wie z.B. Pgp. Dies erschwert zusätzlich den Transport von Arzneistoffen oder Wirkstofftransportern wie NP über die Barriere (Abbott *et al.*, 2006).

iPSC weisen nach Differenzierung zu hBMEC diese Eigenschaften auf und bilden über 5 Tage eine stabile Barriere aus, was durch Messung des TEER-Wertes gezeigt werden konnte (Abbildung 20). Diese Zellen sind humanen Ursprungs und exprimieren essentielle Hirnendothelproteine zum Aufbau einer dichten Barriere (Lippmann *et al.*, 2012), was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Die Dichtigkeit dieser Barriere konnte durch eine niedrige Permeabilität sowie hohe TEER-Werte bestätigt werden. Dies erlaubt eine Unabhängigkeit von endothelialen Zellen aus Zelllinien, Biopsien oder Autopsien, die oft nur eine limitierte Zellzahl zur Verfügung stellen (Lippmann *et al.*, 2012). In Monokultur konnte mit hBMEC ein TEER von bis zu 4.000 Ωcm^2 für 5 Tage bei Aussaat auf Transwell-Membraneinsätzen mit 0,4 μm Porengröße erreicht werden. Bei Aussaat

auf Transwell-Membraneinsätzen mit einer Porengröße von 3 μm bricht die Barriere zwar nicht ein, reduziert sich aber dennoch auf 1.800 Ωcm^2 und bleibt für 5 Tage konstant (Abbildung 20).

Andere Arbeitsgruppen konnten nach Differenzierung von iPS(IMR90)-4 zeigen, dass maximale TEER-Werte von 3.000 Ωcm^2 erreicht werden konnte, die für 4 bis 10 Tage über 1.500 Ωcm^2 blieben (Hollmann *et al.*, 2017; Lippmann *et al.*, 2014; Neal *et al.*, 2019). Andere Gruppen zeigten, dass die differenzierten iPS(IMR90)-4 in Monokultur nur einen durchschnittlichen TEER von 1.200 Ωcm^2 erreichen (Appelt-Menzel *et al.*, 2017). Nutzt man anstelle des Zusatzes PDS B27 im EC-Medium, können sogar maximale TEER-Werte von 8.000 Ωcm^2 erreicht werden (Neal *et al.*, 2019). Die Differenzen in den TEER-Werten sowie die Länge der stabilen Barriere kann auf die Erfahrung des Laboranten, die Kultivierung der iPSC, aber auch die Höhe der Passagenzahl zurückgeführt werden. Dennoch konnte in allen Modellen eine deutliche Steigerung des TEER im Vergleich zu EZ des Schweins mit 347 Ωcm^2 (Freese *et al.*, 2017b), hCMEC/D3 mit 40 Ωcm^2 (Weksler *et al.*, 2013), primären EZ mit 340 Ωcm^2 und peripheren EZ mit 2 – 30 Ωcm^2 erreicht werden (Lippmann *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurden die Messungen der genannten Studien nur einmal täglich manuell mit Messelektroden durchgeführt. Je nach Position dieser Messelektroden kann es zu starken Varianzen in den TEER-Werten kommen. Deutlich wird dies bei Vergleich der vorangegangenen TEER-Werte mit Ergebnissen aus dem *CellZscope E*. Dieses ermöglicht stündlich eine automatisierte Messung des TEER. Mit Hilfe des *CellZscope E* konnte ein maximaler TEER von 3.000 Ωcm^2 erreicht werden, der für 120 h über 1.500 Ωcm^2 blieb (Abbildung 24 und Abbildung 25). Durch die fixierte Position der Elektroden können Messvarianzen, welche auf die Position der Messelektroden, Frequenz oder Länge der Messungen zurückgeführt werden können, ausgeschlossen werden. Trotz der niedrigeren Messung im *CellZscope E* gibt die manuelle Messung eine erste Tendenz über die Bildung einer dichten Barriere der differenzierten Zellen.

Eine Co-Kultur mit AZ oder PZ könnte eine Steigerung des TEER zur Folge haben. Lippmann konnte durch eine Co-Kultur mit primären AZ den maximalen TEER auf bis zu 5.000 Ωcm^2 steigern (Lippmann *et al.*, 2014). Nutzt man aus iPSC generierte AZ oder PZ oder neuronale Stammzellen in der Co-Kultur kann ein TEER von über 6.000 Ωcm^2 erreicht werden (Hollmann *et al.*, 2017). Primäre AZ oder PZ stammen meist aus Biopsien oder Autopsien erkrankter Patienten. Auch wenn AZ oder PZ bei der Erkrankung nicht direkt betroffen sein müssen, kann die Erkrankung einen Einfluss auf die Zellen haben. Dies hat zur Folge, dass die Kommunikation zwischen EZ und primären Zellen im Vergleich zu jenen, welche aus iPSC generiert worden sind, gestört ist (Hollmann *et al.*, 2017). In einigen Modellen führte die Co-Kultur mit PZ nicht zu einer Steigerung des TEER (Jamieson *et al.*, 2019). Appelt *et al.* zeigte, dass durch eine Co- oder Quadrupel-Kultur ein maximaler TEER von 2.489 Ωcm^2 erreicht werden konnte (Appelt-Menzel *et al.*, 2017). Dieser Wert liegt jedoch 18 % unter dem in dieser Arbeit in Monokultur erreichten TEER. Dies bestärkt die Aussage von Jamieson *et al.*, dass zur Steigerung des TEER nicht unbedingt eine Co-Kultur notwendig ist (Jamieson *et al.*, 2019). Vergleicht man jedoch die Permeabilität in Co-Kulturen mit jenen in Monokultur, so ist deren Reduzierung zu beobachten (Appelt-Menzel *et al.*, 2017). Darüber hinaus können Zell-Zell-Interaktionen zwischen AZ und EZ den Zeitraum einer stabilen Barriere verlängern (Lippmann *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2019). Diese physiologischeren Bedingungen im BHS-Modell können Veränderungen in der Aufnahme, dem Transport und der Toxizität von Arzneistoffen zur Folge haben (Stone *et al.*, 2019).

Auf Grund dessen wird zur Ergänzung des Modells eine Co-Kultur mit AZ angestrebt. Neben einer Umgebung, die der physiologischen Bedingung des humanen Hirns ähnelt, ist so auch ein Nachweis für den Transport verschiedener Arzneistoffe oder Wirkstoffträgersystemen wie NP über die Barriere-bildenden EZ möglich. Bei Kultivierung der AZ auf basolateraler Seite können diese die von den EZ transportierten NP aufnehmen. Optimalerweise erfolgt dieser Transport von der luminalen Seite der EZ zu ihrer basolateralen Seite. Im Anschluss daran kann die separate Analyse mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie der Zellen erfolgen.

Voraussetzung dafür ist jedoch die Kultivierung der EZ mit AZ-Medium auf basolateraler Seite ohne Einbruch der Barriere. Im Vergleich zur Kultivierung mit EC-Medium zeigten sich signifikante Reduzierungen um 50 % des TEER. Der Einfluss auf die Zellen kann auf Grund des Serums im AZ-Medium je nach seiner Zusammensetzung der Charge variieren. Lässt man dieses weg, so könnten sich diese Variationen reduzieren. Zusätzlich kann das Fehlen der AZ, die im Hirn sowie in Co-Kultur in BHS-Modellen durch Abgabe von Wachstumsfaktoren das Wachstum stark beeinflussen, die EZ stressen. Dies könnte einen langsamen Abbau der Barriere zur Folge haben. Der Abbau der Barriere zeigt sich in diffusen immunozytochemischen Färbungen der TJ-Proteine Claudin-5 und Occludin. Dennoch ist die Barriere für 4 Tage über $1.000 \Omega\text{cm}^2$, sodass der Zeitraum direkt im Anschluss der Differenzierung für Studien zum Transport von Arzneistoffen oder NP genutzt werden kann.

Messungen des TEER wurden bisher meist auf Transwell-Membraneinsätzen mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ durchgeführt (Appelt-Menzel *et al.*, 2017; Hollmann *et al.*, 2017; Lippmann *et al.*, 2012; Neal *et al.*, 2019). Für Untersuchungen bezüglich des Transports der NP über die Barriere-bildenden EZ ist jedoch eine Porengröße von $3 \mu\text{m}$ notwendig. Dies vermindert die Anlagerung der Partikel an der Membran und deren Poren und ist notwendig, damit die NP mit einem Durchmesser von 50 nm durch die Poren diffundieren können. Nur so kann gewährleistet werden, dass bei erfolgreicher Abgabe der NP von EZ diese nach dem Transport durch die Membran von AZ aufgenommen werden können (Hajal *et al.*, 2018). Die Kultivierung auf den größeren Poren führte in den Versuchen zu einer Reduzierung des TEER um 50 % (Abbildung 20 und Abbildung 22). Dies könnte auf eine niedrige Expression der TJ-assoziierten Proteine auf Grund eines veränderten Untergrunds zurückgeführt werden. Da es bei diesen TEER-Werten jedoch nicht zu signifikanten Unterschieden und somit einem signifikanten Einbruch der Barriere im Vergleich zur Kultivierung auf $0,4 \mu\text{m}$ Poren kommt, kann eine Kultivierung zur Untersuchung des TEER auf Transwell-Membraneinsätzen mit einer Porengröße von $3 \mu\text{m}$ durchgeführt werden.

Des Weiteren konnte, auf Grund einer niedrigen Permeabilität für kleine Moleküle, auf eine dichte Barriere geschlossen werden. Mit einem Permeabilitätskoeffizienten von $4 \cdot 10^{-5} \text{ cm/min}$ unterscheidet sich dieser signifikant von der Kontrolle ($2 \cdot 10^{-3} \text{ cm/min}$; Abbildung 19). Dies korreliert ebenfalls mit einer niedrigen Permeabilität von 10^{-5} bis 10^{-6} cm/min bei TEER-Werten über $1.500 \Omega\text{cm}^2$ in anderen BHS-Modellen (Hollmann *et al.*, 2017; Lippmann *et al.*, 2014; Neal *et al.*, 2019). Im Vergleich dazu hat hCMEC/D3 mit $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm/min}$ mit einem Faktor von 100 eine deutlich höhere Permeabilität für Natrium-Fluorescein (Forster *et al.*, 2008).

Statischen Modellen fehlt der Scherstress, welcher auf den Blutfluss zurückzuführen ist. Dieser beträgt in den Gefäßen der BHS $10 - 30 \text{ dyn/cm}^2$ (Cheng *et al.*, 2007b; Garcia-

Polite *et al.*, 2017). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung der zu hBMEC differenzierten Zellen bei einem Scherstress von 10 dyn/cm² für 96 h möglich ist. Nach der Kultivierung unter diesen dynamischen Bedingungen konnte ein Zellrasen mit einer flächendeckenden Expression der TJ-assoziierten Proteine Occludin und Claudin-5 beobachtet werden (Abbildung 23). Auffallend war jedoch auch, dass es neben der Färbung der membranständigen Proteine zum Teil auch intrazelluläre Färbungen gab. Bei Kultivierung von EZ bei 1 sowie 6 dyn/cm² für 72 h konnte ebenfalls ein positiver Nachweis von Claudin-5 und ZO-1 erfolgen (Park *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017). Faley *et al.* zeigte, dass hBMEC, die aus iPSC generiert wurden, nach Kultivierung unter dynamischen Bedingungen eine verminderte Genexpression der Endothelproteine aufweisen (Faley *et al.*, 2019). Dies kann zu intrazellulären Färbungen neben den Membran-ständigen Proteinen führen, die auch in dieser Arbeit beobachtet wurden. Eine Erhöhung des Scherstress auf 5 dyn/cm² hatte bei hCMEC/D3 bei anschließender Messung des TEER eine Steigerung von bis zu 120 Ωcm² zur Folge (Griep *et al.*, 2013). Durch den Fluss ist ein besserer Sauerstoff- und Nährstofftransport gegeben, welcher zusätzlich durch den Abtransport von Abfallstoffen, einen TEER von über 2.000 Ωcm² für 10 Tage ermöglichen kann (Wang *et al.*, 2017).

Typisch für EZ wie HUVEC (Freese *et al.*, 2017a) oder hCMEC/D3 ist auch die Ausrichtung an die Flussrichtung (Reinitz *et al.*, 2015). Nach der Kultivierung der Zellen unter Scherstress zeigte sich jedoch keine Anpassung der Zellen an die Flussrichtung (Abbildung 23). Reinitz *et al.* sowie Wang *et al.* zeigten ebenfalls, dass bei Kultivierung von EZ bei einem Scherstress von 16 dyn/cm² für 36 h keine Ausrichtung der Zellen erfolgte (Reinitz *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Dies könnte die Annahme bestärken, dass sich die endotheliale Zellen des Hirns natürlicherweise nicht dem Scherstress anpassen. Anstelle dessen erlaubt ihr Bau es diesem standzuhalten und sich weder in ihrer Ausrichtung noch ihrer Zellform anzupassen (Reinitz *et al.*, 2015). Eine Ausrichtung der Zellen könnte jedoch bei Steigerung des Scherstress oder bei längerer Kultivierung unter dynamischen Bedingungen erfolgen. Bisher konnte nur Wang *et al.* mit aus iPSC generierten hBMEC ein dynamisches Modell der BHS etablieren, dass eine Beobachtung der Zellen sowie Messungen des TEER mit fixierter Positionen der Elektroden erlaubte (Wang *et al.*, 2017). Nachteil des Modells ist jedoch, dass die mikroskopierbare Fläche nur einen kleinen Anteil der Gesamtfläche ausmacht. Hinzu kommt, dass die kultivierbare Fläche sehr gering ist. Darüber hinaus muss die Messung des TEER manuell gestartet werden und kann nur bei Stillstand des Mediumflusses durchgeführt werden. Dementsprechend sollte der Aufbau von zukünftigen BHS-Modellen neben einer größeren mikroskopierbaren Kultivierungsfläche auch eine automatisierte Messung des TEER während des Mediumflusses gewährleisten.

5.4 Physikochemische Eigenschaften der polymeren Nanopartikel für den Wirkstofftransport an der Blut-Hirn-Schranke

Inorganische sowie polymere NP werden als potentielle Wirkstoffträger für den Transport über die BHS gesehen. Durch ihre kleine Größe, Variationen in ihrer Form sowie ihre modifizierbare Oberfläche können diese sowohl trans- wie auch parazellulär die BHS überwinden (Hajal *et al.*, 2018). Polymere NP bringen den Vorteil, dass diese meist

biokompatibel sind, in ihrer Polymerzusammensetzung variiert und Wirkstoffe in ihnen verkapselt werden können (Hajal *et al.*, 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden NP aus PLLA oder PLGA synthetisiert (Tabelle 7). Diese bringen den Vorzug, dass sie vom Körper in Laktat und Glykolsäure hydrolysiert werden können. Laktat und Glykolsäure können im Krebszyklus verstoffwechselt werden, sodass PLGA und PLLA vollständig bioabbaubar sind (Mahapatro & Singh, 2011). Zu beachten ist jedoch, dass alle eingesetzten NP mit dem Tensid Tween® 80 stabilisiert wurden. Dieses minimiert zwar die Aggregation der Partikel und stabilisiert diese (Cai *et al.*, 2016), kann aber bei erhöhter Konzentration in der NP-Lösung zu einer toxischen Wirkung der Partikel führen. Arechabala *et al.* haben gezeigt, dass im Vergleich zu anderen Tensiden Tween® 80 weniger toxisch ist (Arechabala *et al.*, 1999). Jedoch zeigte sich in späteren Versuchen, dass Tween® 80 vor allem bei Steigerung seiner Konzentration toxisch auf die Zellen wirken kann (Han *et al.*, 2008). Dies kann mittels mehrerer Waschgänge der NP-Lösung minimiert werden, was gleichzeitig jedoch auch die Stabilität der Partikel stören kann.

Die eingesetzten PLLA- und PLGA-Polymere liegen teilkristallin vor und unterscheiden sich in ihren Molekulargewichten. Dies ist auf die racemische Mischung der Isomere des Lactids, D- und L-Lactid, zurückzuführen (Tabelle 6) und haben darüber hinaus unterschiedliche Schmelztemperaturen zur Folge. Dies führt zu Variationen in der Degradierungszeit der eingesetzten Polymere. Darüber hinaus unterscheiden sich die PLGA-Polymere in ihren Verhältnissen des Lactids und der Glykolsäure. So ist das Verhältnis von Lactid zu Glykolsäure bei PLGA-502 und -504 50:50. Im Gegensatz dazu steigt bei PLGA-752 der Anteil des Lactids (75:25), was sich in einer deutlichen Reduzierung des Molekulargewichts zeigt. Das könnte dann interessant werden, wenn ein geringes Molekulargewicht der Partikel den Transport fördert (Pardridge, 2012). So werden PLGA-502 und -752 in hBMEC am besten aufgenommen. Da jedoch das Molekulargewicht der einzelnen Partikel nicht bestimmt worden ist, kann darauf kein Rückschluss gezogen werden.

Bisher wurden polymere NP einer Größe von 10 – 1000 nm an der BHS getestet (Hajal *et al.*, 2018). Im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden Partikel einer Größe von 50 und 100 nm synthetisiert. Partikel mit einer Größe von 50 – 100 nm können sowohl passiv wie auch aktiv über Adsorptions- und Rezeptor-vermittelte Transporter aufgenommen werden. Es zeigte sich jedoch, dass ab einer Größe von 100 nm eine gezielte Modifikation der Oberfläche der Partikel mit einem Liganden der Rezeptoren nötig war, um eine effiziente Aufnahme des Partikels zu ermöglichen (Hajal *et al.*, 2018). Sowohl modifizierte wie auch nicht modifizierte Partikel adsorbieren bei erstem Kontakt mit biologischen Umgebungen Proteine auf ihrer Oberfläche. Dies kann zu einer obsoleten Wirkung der gezielten Modifizierung eines Liganden zur Rezeptor-vermittelten Transzytose führen. Die adsorbierten Proteine der PK geben den NP eine neue Identität.

Die Zusammensetzung der PK ist abhängig von der Größe, Oberflächenladung, Art des Monomers sowie der Stabilisierung der NP (Kharazian *et al.*, 2016; Tenzer *et al.*, 2011). Bei der Untersuchung der PK-Zusammensetzung zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede für NP unterschiedlicher Größe und Polymere (Abbildung 30). Außerdem konnte auch keine signifikante Veränderung der Oberflächenladung nach Ausbildung einer PK beobachtet werden (Abbildung 31). Dies könnte auf die Stabilisierung der Partikel, welche ausschließlich mit Tween® 80 erfolgte, zurückzuführen sein. Die

Stabilisierung von NP mit Tween® 80 zeigte in vielen Untersuchungen vorrangig die Adsorption verschiedener Apolipoproteine. Dies führt auch bei NP aus anderen Materialien zu einem erhöhten Anteil an Apolipoproteinen und konnte den Transport an der BHS nachweislich fördern (Cai *et al.*, 2016; Hajal *et al.*, 2018; Li & Sabliov, 2013; Shah & Singh, 2019). Neben Apolipoproteinen nahmen *Complement Components* einen hohen Anteil der PK ein. Dies konnte auch in anderen Studien mit NP aus PLLA und PLGA bestätigt werden (Allemann *et al.*, 1997; Shah & Singh, 2019). Der hohe Anteil an *Complement Components* erhöht *in vivo* den Abbau der Partikel durch Immunzellen, scheint jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme von EZ zu haben (Jena *et al.*, 2019).

Auffällig ist auch, dass die Zusammensetzung der PK der einzelnen NP nicht mit dem des Serums übereinstimmt. Albumin nimmt mit 50 % den größten Anteil im Serum ein. Jedoch ist dieses nur mit maximal 10 % in der PK der NP vertreten. Diese Selektivität der NP konnte auch in anderen Studien bestätigt werden (Sempff *et al.*, 2013; Shah & Singh, 2019; Tenzer *et al.*, 2011). Sie konnte auf die Größe, Ladung, Oberfläche und Form der NP, aber auch die Proteinkonzentration der biologischen Umgebung zurückgeführt werden (Berg, 2016). Auf Grund dessen kann es bei der Zugabe identischer NP zu einer veränderten PK-Zusammensetzung in anderen biologischen Fluiden kommen.

Die Messung des Zetapotentials zeigte eine negative Oberflächenladung der Partikel (Abbildung 31). Im Gegensatz zu einer negativen Ladung wird eine positive Ladung der Partikel vom retikuloendothelialen System identifiziert. Dies führt zur Phagozytose der Partikel, sodass diese vermehrt in der Leber, Niere oder Milz anstelle ihrer Zielorgane wiedergefunden werden (Shah & Singh, 2019). Eine negative Ladung vermindert diesen Effekt und führt zu einer längeren Zirkulationszeit in der Blutbahn, was die Wahrscheinlichkeit des Partikels seine Zielzellen zu erreichen erhöht (Nikandish *et al.*, 2016). Außerdem kommt es bei negativer Ladung der Partikel vermehrt zu einer Adsorption von positiv geladenen Proteinen in der PK. Dies führt dazu, dass die Aufnahme der Partikel über Adsorptions-vermittelte Transzytose weiter erhöht werden kann.

Zusammenfassend konnte erfolgreich reproduzierbare NP einer Größe von 50 und 100 nm aus PLLA und PLGA synthetisiert werden. Alle NP wurden mit Tween® 80 stabilisiert und besitzen eine negative Oberflächenladung. Betrachtet man die PK-Zusammensetzung der einzelnen Partikel, so sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Partikeln erkennbar. Vorrangig bestehen die PK aus Apolipoproteinen sowie *Complement Components*. Darüber hinaus waren die Unterschiede in der Oberflächenladung nach Ausbildung einer PK ebenfalls nicht signifikant. Jedoch zeigte sich eine selektive Adsorption der Proteine auf den NP, da diese nicht die Zusammensetzung des Serums widerspiegelte.

Der Einfluss der bestimmten physikochemischen Eigenschaften der Partikel auf die Partikel-Aufnahme und -Toxizität sowie die Auswirkungen auf die dichte Barriere des *in vitro*-Modells der BHS werden im nachfolgenden Abschnitt detailliert besprochen.

5.5 Einfluss der Nanopartikel auf hBMEC

Das etablierte *in vitro*-Modell wurde zur biologischen Charakterisierung der NP für einen zukünftigen Einsatz als Wirkstoffträger an der BHS eingesetzt.

Die erfolgreiche Aufnahme von PLLA- und PLGA-Partikeln in EZ der BHS konnte bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden (Hajal *et al.*, 2018; Veszelka *et al.*, 2015). Dies konnte auch bei Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigt werden. Vergleicht man den Einfluss der Partikel auf die Barriere der BHS, so hat nur der Partikel PLGA-502 bei einer Größe von 50 nm und 100 nm und einer Konzentration von 150 µg/ml signifikanten Einfluss auf die Dichtigkeit der Barriere. Bei einer reduzierten Konzentration von 75 µg/ml zeigen sich signifikante Unterschiede nur bei einer Größe von 50 nm (Abbildung 25). PLGA-502 hat in den eingesetzten Konzentrationen keine toxische Wirkung auf die Zellen (Abbildung 26). Der Einbruch der Barriere könnte auf eine hohe Aufnahme der Partikel in Zellen schließen lassen. Dies zeigt sich beim Vergleich der Aufnahme aller NP, da PLGA-502 sowohl in hCMEC/D3 sowie hBMEC am stärksten aufgenommen wird (Abbildung 26).

Auffällig ist, dass die kleinere Größe von 50 nm sowohl bei einer Konzentration von 75 als auch 150 µg/ml Einfluss auf die Barriere hat. Kleinere Partikel (unter 50 nm) können vermehrt über die transzelluläre Diffusion von den NP aufgenommen werden, welches die Aufnahme im Vergleich zu größeren Partikeln zusätzlich steigern kann (Hajal *et al.*, 2018; Li & Sabliov, 2013). Dies könnte darauf schließen lassen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Partikel mit einer Größe von 100 nm weniger über die transzelluläre Diffusion aufgenommen werden. Eine Steigerung ihrer Aufnahme könnte durch eine gezielte Modifizierung der Oberfläche der Partikel mit einem Liganden der Rezeptoren an der BHS für eine gezielte Rezeptor-vermittelte Transzytose erreicht werden (Hajal *et al.*, 2018). Da jedoch keine konkreten Untersuchungen zu den Aufnahmewegen der synthetisierten NP gemacht worden sind, lassen sich dazu bisher keine konkreten Rückschlüsse ziehen.

Vergleicht man PLGA-Partikel mit einer Größe zwischen 114 und 250 nm und einer negativ geladenen Oberfläche, so werden jene unter 250 nm zu 90 % von den Zellen aufgenommen. Bei größeren Partikeln reduziert sich die Aufnahme auf 75 % (Teleanu *et al.*, 2018). Je kleiner die Partikel, desto höher ist die Aufnahme (Hajal *et al.*, 2018). Somit kann, trotz einer geringeren Menge an verkapselbarem Wirkstoff, eine höhere Menge an Wirkstoff ins Gehirn transportiert werden. Dennoch eignen sich NP unter 50 nm nicht als Wirkstoffträger ins Gehirn. Durch die geringe Größe besitzen sie eine kürzere Zirkulationszeit und werden in größeren Mengen in Leber, Milz und Niere vorgefunden (Hoshyar *et al.*, 2016).

In der vorliegenden Arbeit führte die Aufnahme von PLLA-Partikel und PLGA-504 zu keiner signifikanten Veränderung im TEER (Abbildung 24). Dies ist auch in anderen BHS-Modellen zu beobachten. Bittner *et al.* zeigte, dass die Aufnahme von PLLA beschichteten Silikapartikeln mit einer Konzentration von 160,3 µg/ml und einer Größe von 90 und 95 nm zu keiner signifikanten Veränderung des TEER führte (Bittner *et al.*, 2019). Dieser nutzte jedoch zum Aufbau seiner Barriere Ratten-EZ mit einem maximalen TEER von 40 Ωcm². Keine signifikante Änderung im TEER erzielte auch die Aufnahme von Gold-NP mit einer Größe von 105 nm und einer negativen Oberflächenladung in Modellen mit Maus-EZ und einem durchschnittlichen TEER von 164 Ωcm² (Khongkow *et al.*, 2019). Im humanen Modell der BHS mit einem maximalen TEER von 220 Ωcm² von Kuo *et al.* führte die Aufnahme von Tween® 80 stabilisierten Lipid-Partikeln einer Größe von 100 – 500 nm und einer negativen Oberflächenladung ebenfalls zu keinem Einbruch der Barriere (Kuo & Ko, 2013). Diese Übereinstimmungen in den BHS-Modellen könnten zunächst darauf schließen lassen, dass die NP-Aufnahme keinen Einfluss auf die Barriere zu haben scheint.

Bei der Zelllinie MDCK handelt es sich um humane Nierenzellen. Die Zellen können eine Barriere ausbilden und exprimieren zum Teil TJ-assoziierte Proteine. Auf Grund ihrer einfachen und kostengünstigen Kultivierung, einer niedrigen Permeabilität sowie hohen Efflux-Aktivität werden sie häufig in Modellen der BHS eingesetzt (Hellinger *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2005). Nikandish *et al.* verwendete zum Aufbau seines Modells der BHS MDCK-Zellen und konnte eine Barriere von über 1.000 Ωcm^2 erreichen. Bei Zugabe von PLGA-Partikeln (150 nm, negative Oberflächenladung) führte dies zur Öffnung der Barriere und damit zu einer signifikanten Reduzierung des TEER (Nikandish *et al.*, 2016). Dies führte zu einem deutlichen Anstieg im Vergleich von verkapselten Wirkstoff zu freiem Wirkstoff im BHS-Modell ohne die Aktivität des Efflux-Transporters Pgp zu zerstören. Dieser Einbruch der Barriere des BHS-Modells korreliert mit den Ergebnissen nach der Aufnahme von PLGA-502, das sowohl mit einer Größe von 50 und 100 nm am stärksten aufgenommen wird (Abbildung 26) und als einziger Partikel die Barriere signifikant sinken lässt (Abbildung 25). Dies könnte somit auch eine Öffnung der Barriere vermuten lassen. Da jedoch keine anschließenden Untersuchungen zur Permeabilität dieses Partikels durchgeführt wurden, kann keine konkrete Aussage über eine Öffnung der Barriere nach einer Aufnahme von PLGA-502 gemacht werden.

Erhöht man jedoch die NP-Konzentration, so wirken alle NP ab einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ bei hCMEC/D3 (Abbildung 13) und NP mit einer Größe von 50 nm ab einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ stark toxisch auf hBMEC (Abbildung 28). Es ist jedoch zu beachten, dass um eine Stabilität der Partikel gewährleisten zu können, unterschiedliche NP-Chargen mit identischen Eigenschaften für die Versuche in den jeweiligen Zellen genutzt wurden. Diese Toxizität ist jedoch nicht auf die Polymere zurückzuführen, deren Produkte bei einer Hydrolyse im Körper im Krebszyklus verstoffwechselt werden können, sondern auf die Konzentration des Tensids in der Partikellösung. Dieses kann bei erhöhter Konzentration toxisch auf die Zellen wirken (Cai *et al.*, 2016). Je nach Intensität der Waschgänge kann es somit bei gleichen Partikeleigenschaften zu unterschiedlichen Konzentrationen des Tensids in den Partikellösungen der unterschiedlichen Chargen kommen. Darüber hinaus spricht aber auch die erhöhte Aufnahme kleinerer Partikel für eine Toxizität auf die Zellen, da bei hBMEC nur die NP ab einer Konzentration von 1.000 $\mu\text{g/ml}$ und einer Größe von 50 nm toxisch auf die Zellen wirken (Abbildung 28). Angetrieben vom Konzentrationsgradienten können diese NP vermehrt passiv aufgenommen werden (Abbott *et al.*, 2006; Roney *et al.*, 2005; Sims, 1986; Szablewski, 2017). Verringert man die Größe der NP, so muss die Konzentration des Tensids erhöht werden (Musyanovych *et al.*, 2008). Die erhöhte NP-Konzentration führt zu einer erhöhten Konzentration des Tensids in den Zellen. Dies hat die Toxizität der kleineren Partikel zur Folge. Dies zeigte sich sowohl in einer Reduzierung der Stoffwechselaktivität der Zellen, die mittels CCK-8-Lösung untersucht worden ist, wie auch in den Ergebnissen der Kristallviolett-Färbung. Durch die Färbung von DNA und Proteinen mittels Kristallviolett kann dieser Nachweis somit nur mit adhärennten Zellen erfolgen. Darüber hinaus sind die Anteile an lebenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen leicht erhöht. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Farbstoff eventuell auch mit den Partikeln interagieren könnte, sodass die Intensität und damit der Anteil an adhärennten Zellen leicht erhöht ist.

Bei der Analyse der NP-Aufnahme mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie werden neben Zellen, die NP erfolgreich intrazellulär aufgenommen haben, auch jene detektiert, die NP nur außen an ihrer Zellmembran adsorbieren. Auf Grund dessen ist eine

mikroskopische Verifizierung der intrazellulären NP-Aufnahme notwendig. Diese zeigte, dass bei hCMEC/D3 alle NP erfolgreich intrazellulär aufgenommen wurden (Abbildung 15). Bei hBMEC konnte die intrazelluläre Aufnahme von PLLA-204 und PLGA-504 mit einer Größe von 100 nm und PLGA-752 mit einer Größe von 50 nm nicht erfolgen. Somit lässt sich die intrazelluläre Aufnahme dieser Partikel nicht final verifizieren. Beim Versuch der Aufnahme dieser NP war die Membran der Zellen nicht zu erkennen, da es vermehrt zu einer Überlagerung des Membran-Farbstoffs mit den NP kam. Dies lässt vermuten, dass ein großer Teil der NP in der Membran aufgenommen wurde. Die erhöhte Menge an NP in der Membran könnte zu einer Agglomeratbildung führen, sodass die NP zu groß für eine finale intrazelluläre Aufnahme werden. Eine Agglomeratbildung war vor allem bei PLGA-504 und -752 in hCMEC/D3 und PLLA-202 in hBMEC zu erkennen, welche zu einer verminderten Aufnahme dieser Partikel führte. Die Reduzierung der NP-Aufnahme auf Grund vermehrter Agglomeratbildung der Partikel wurde von Berg bereits beschrieben (Berg, 2016). Durch die Agglomeratbildung vergrößert sich der Durchmesser der NP, was zu einer verminderten Aufnahme der Partikel an der BHS führen kann (Berg, 2016). Diese Agglomeratbildung kann in großer Zahl bei kleinen Partikeln (21 - 190 nm bei Babakhani 2019) sowie bei hohen Konzentrationen beobachtet werden (Babakhani, 2019).

Außer den physikochemischen Eigenschaften der NP hat auch die PK-Zusammensetzung einen Einfluss auf die Aufnahme der NP an der BHS (Tenzer *et al.*, 2013). Diese gibt den NP eine neue Identität, welche den Zellen präsentiert wird. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der PK-Zusammensetzung (Abbildung 30), welche vorrangig von Apolipoproteinen dominiert wurde. Apolipoproteine zählen zu den Liganden der LDLR-Rezeptoren der EZ, sodass eine Rezeptor-vermittelte Transzytose der Partikel vermehrt stattfinden könnte (Li & Sabliov, 2013). Dies könnte die Aufnahme aller Partikel gewährleisten und als vorrangig genutzter Aufnahmeweg in die Zellen gelten. Obwohl es keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der PK sowie der Oberflächenladung der Zellen nach Ausbildung der PK gibt, zeigten sich in der Partikelaufnahme signifikante Unterschiede. Dies könnte auf eine mögliche Denaturierung der Proteine in der PK der verschiedenen Partikel deuten, die bereits von Yan *et al.* und Müller *et al.* beobachtet werden konnten (Müller *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2013). Die Denaturierung kann einen Funktionsverlust der Proteine zur Folge haben, sodass die NP-Aufnahme mit Hilfe potentieller Rezeptoren nur reduziert stattfinden kann. Bei den Analysen der Zusammensetzung der PK sowie der Oberflächenladung wurde nur die harte PK mit einer hohen Bindungsaffinität der Proteine (Cedervall *et al.*, 2007; Nel *et al.*, 2009; Treuel & Nienhaus, 2012) untersucht. Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zur weichen PK, die aus Proteinen mit einer niedrigen Bindungsaffinität (Patel & Kumar, 2019) besteht. Auf Grund dessen ist es bisher noch nicht eindeutig belegt, ob die harte oder die weiche PK zur neuen biologischen Identität der Proteine beiträgt (Weber *et al.*, 2018). Weber *et al.* zeigten, dass die Aufnahme von Polystyrol-NP in menschlichen Epithelzellen des Zervixkarzinoms ohne weiche PK zwar reduziert ist, aber dennoch keine signifikanten Unterschiede zur Aufnahme des NP bestehend aus einer weichen sowie harten PK zeigte (Weber *et al.*, 2018). Weber *et al.* merkte jedoch an, dass die Aufnahme der NP vom Zelltyp, NP-Material sowie Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst werden können (Weber *et al.*, 2018). Die signifikanten Unterschiede in der NP-Aufnahme der Partikel dieser Arbeit bestärken die Annahme, dass die weiche PK sich bei den untersuchten Partikeln unterscheidet und einen Einfluss auf die neue biologische Identität hat. Dies hat zur Folge, dass die NP unterschiedlich stark

aufgenommen werden, obwohl es keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenladung nach Ausbildung der harten PK sowie in ihrer Zusammensetzung gibt.

Neben Proteinen kann die PK auch aus Lipiden und Zucker bestehen (Berg, 2016). Lipide könnten eine Aufnahme der Partikel zusätzlich fördern, da die Zellmembran aus Lipiden besteht. Darüber hinaus könnte auch Glukose die Aufnahme der Partikel fördern. Glukose gilt als Ligand des GLUT1-Rezeptors, der von EZ exprimiert wird. Dieser Rezeptor könnte von den NP mit Glukose als Bestandteil ihrer PK zu Rezeptor-vermittelten Transzytose genutzt werden. Jedoch könnten komplexere Zucker die Aufnahme der Partikel auf Grund der zunehmenden Größe weiter verringern. Da die PK nur auf Proteine untersucht worden ist, kann darüber jedoch keine konkrete Aussage getroffen werden.

Auf Grund der negativen Oberflächenladung sowohl mit wie auch ohne PK besteht die Annahme, dass die Aufnahme der NP über Adsorptiv-vermittelte Transzytose reduziert ist (Cena & Jativa, 2018). Da jedoch durch Apolipoproteine die Rezeptor-vermittelte Transzytose (Zhou *et al.*, 2018) sowie bei den NP mit einer Größe von 50 nm die passive Aufnahme (Hajal *et al.*, 2018) gegeben ist, ist die potentielle Reduzierung der Aufnahme über Adsorptiv-vermittelte Transzytose nicht signifikant.

Ein Faktor, der einen wesentlichen Einfluss auf die NP-Aufnahme haben könnte, ist der Scherstress, welcher eine Folge des Medium- bzw. Blutflusses ist (Berg, 2016). Vergleicht man die Aufnahme von NP unter dynamischen Bedingungen mit statischen Bedingungen in HUVEC, so kann eine Aufnahme nur mittels gezielter Modifizierung der Oberfläche mit einem Liganden zur Rezeptor-vermittelten Transzytose gesteigert werden (Klingberg *et al.*, 2015).

Zusammenfassend wurden alle NP erfolgreich von den Zellen aufgenommen. Die Aufnahme der Partikel mit einer Größe von 50 nm erzielten im Vergleich eine stärkere Aufnahme. In der gewählten Konzentration von 150 µg/ml wirkte keiner der eingesetzten Partikel toxisch auf die Zellen. Die Aufnahme von PLLA-Partikeln und PLGA-504 führte nicht zu einer Veränderung im TEER. Lediglich die Aufnahme von PLGA-502, der am stärksten aufgenommene Partikel, führte zu einer signifikanten Reduzierung der Barriere.

6 AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich ein realitätsnahes *in vitro*-Modell der BHS etabliert. In der Pharma- und Chemieindustrie könnte das Modell zur Entwicklung verschiedener Arzneistoffe und Wirkstoffträgersysteme genutzt werden. Intensive Untersuchungen zur Aufnahme und Toxizität potentieller Arzneistoffe und Wirkstoffträgersysteme könnten im BHS-Modell durchgeführt werden bevor zeit- und kostenintensive Analysen *in vivo* oder in präklinischen Studien anstehen. Dies würde die Anzahl an *in vivo*-Versuchen reduzieren und somit die Umsetzung des ethische Prinzips der „3 R“ (Russell & Burch, 1959) in der Industrie unterstützen.

Bisher wurde in der vorliegenden Arbeit die Aufnahme, nicht aber der Transport der NP betrachtet. Ein unversehrter Transport der Partikel über die EZ ins Hirn ist jedoch für eine Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen erforderlich. Die Co-Kultur mit AZ oder PZ würden sich für die Untersuchung des Transports eignen. So kann sichergestellt werden, dass NP, die von EZ auf der basolateralen Seite abgegeben werden, mit geringem Verlust von AZ oder PZ aufgenommen werden.

Darüber hinaus ermöglicht eine Co-Kultur Untersuchungen unter physiologischeren Bedingungen, die einen maßgeblichen Einfluss auf den Transport und die Toxizität von Arzneistoffen und Wirkstoffträgern wie NP haben können. Generiert man iPSC aus Patienten und nutzt diese für den Aufbau eines BHS-Modells, können personalisierte Therapien für effizientere Behandlungen von neurodegenerativen Erkrankungen und Hirntumoren ermöglicht werden.

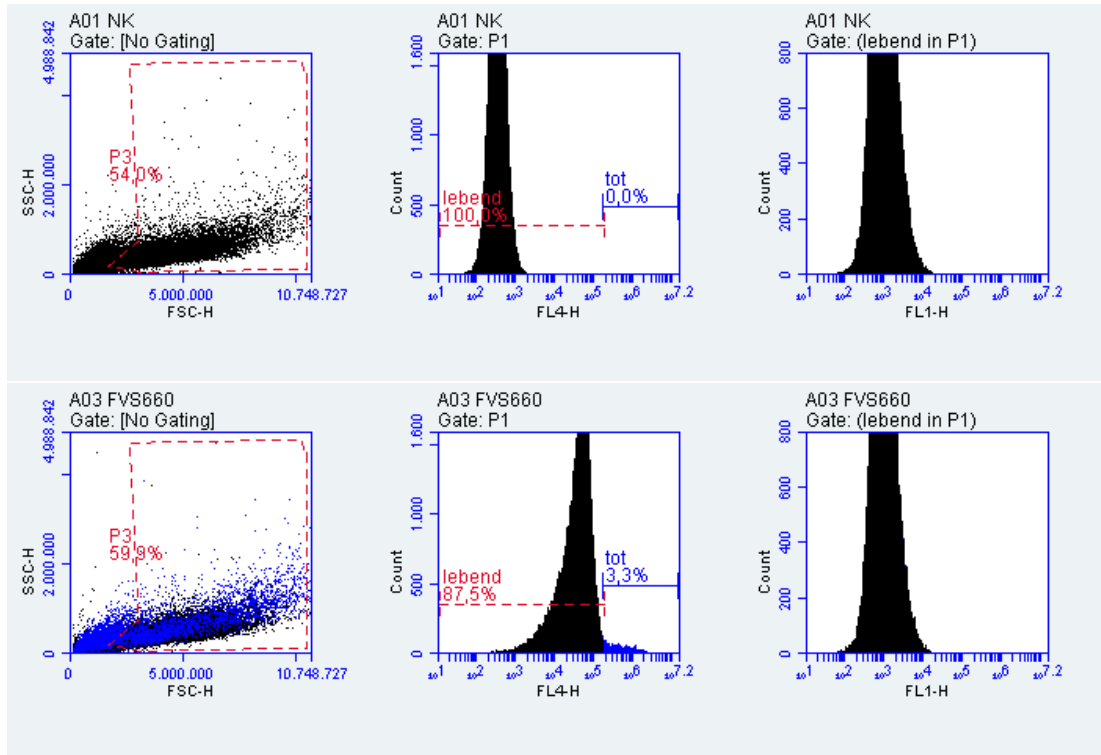
In der vorliegenden Arbeit konnte die Kultivierung der hBMEC unter physiologischem Scherstress gezeigt werden. Dieses dynamische Modell der BHS könnte genutzt werden, um den Einfluss auf die NP-Aufnahme sowie ihre Toxizität auf die Zellen weiter zu untersuchen. Durch die Ergänzung des Systems mit Messelektroden könnte der Einfluss des Scherstress sowie der NP-Aufnahme auf den TEER zusätzlich analysiert werden.

PLGA-502 erwies sich als jener Partikel, der am stärksten von den Zellen aufgenommen wurde und eine signifikante Reduzierung des TEER zur Folge hatte. Ausstehend sind Untersuchungen zur Permeabilität sowie der Regeneration des TEER nach Aufnahme des Partikels. Unter dynamischen Bedingungen wird vorrangig die Rezeptor-vermittelte Transzytose zur Aufnahme an der BHS genutzt (Klingberg *et al.*, 2015). Um dies gewährleisten zu können, könnte die Oberfläche der NP so modifiziert werden, dass die PK vorrangig aus Liganden der Rezeptor-vermittelten Transzytose gebildet wird.

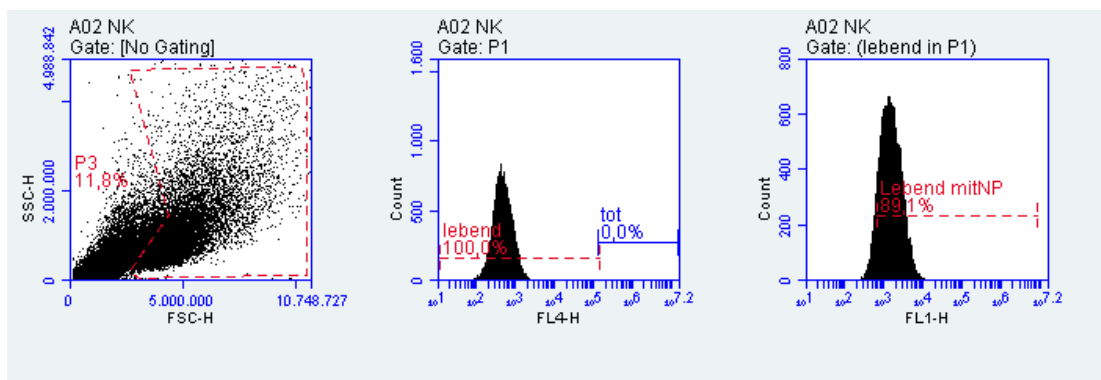
7 ANHANG

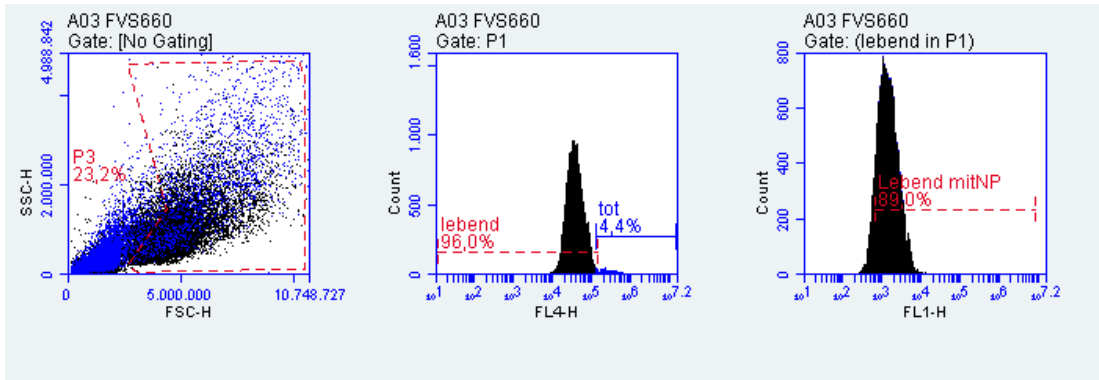
7.1 Gates der fluoreszenten Durchflusszytometrie

7.1.1 hcmeec/D3



7.1.2 hBMEC





7.2 Berechnung des Scherstresses bei μ -slide^{0,4} Luer

$$\tau = \eta \cdot 131,6 \cdot \phi$$

τ = Scherstress [dyn/cm²]

ϕ = Flussrate [ml/min]

η = Viskosität des Mediums [dyn·s/cm²], hier: 0,0072 dyn·s/cm²

8 LITERATUR

Abbott NJ (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200: 629-638

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37: 13-25

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41-53

Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE (2009) Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 428-437

Aird WC (2007a) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100: 158-173

Aird WC (2007b) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 100: 174-190

Allemann E, Gravel P, Leroux JC, Balant L, Gurny R (1997) Kinetics of blood component adsorption on poly(D,L-lactic acid) nanoparticles: evidence of complement C3 component involvement. *J Biomed Mater Res* 37: 229-234

Appelt-Menzel A, Cubukova A, Gunther K, Edenhofer F, Piontek J, Krause G, Stuber T, Walles H, Neuhaus W, Metzger M (2017) Establishment of a Human Blood-Brain Barrier Co-culture Model Mimicking the Neurovascular Unit Using Induced Pluri- and Multipotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 8: 894-906

Arechabala B, Coiffard C, Rivalland P, Coiffard LJ, de Roeck-Holtzhauer Y (1999) Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J Appl Toxicol* 19: 163-165

Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K *et al* (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468: 557-561

Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol* 4: 634-641

Babakhani P (2019) The impact of nanoparticle aggregation on their size exclusion during transport in porous media: One- and three-dimensional modelling investigations. *Sci Rep* 9: 14071

Begley DJ (2004) ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* 10: 1295-1312

Begley DJ, Brightman MW (2003) Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res* 61: 39-78

- Bendriem RM, Singh S, Aleem AA, Antonetti DA, Ross ME (2019) Tight junction protein occludin regulates progenitor Self-Renewal and survival in developing cortex. *eLife* 8: e49376
- Berg C (2016) Quantitative analysis of nanoparticle transport through in vitro blood-brain barrier models. *Tissue barriers* 4: e1143545-e1143545
- Bhatia SN, Ingber DE (2014) Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* 32: 760-772
- Biemans EALM, Jäkel L, de Waal RMW, Kuiperij HB, Verbeek MM (2017) Limitations of the hCMEC/D3 cell line as a model for A β clearance by the human blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 95: 1513-1522
- Bittner A, Ducray AD, Widmer HR, Stoffel MH, Mevissen M (2019) Effects of gold and PCL- or PLLA-coated silica nanoparticles on brain endothelial cells and the blood-brain barrier. *Beilstein J Nanotechnol* 10: 941-954
- Bleul R, 2014. Herstellung, Charakterisierung und Funktionalisierung polymerer Nanopartikel und Untersuchung der Wechselwirkungen mit biologischen Systemen, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie. Freie Universität Berlin.
- Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40: 648-677
- Cai Q, Wang L, Deng G, Liu J, Chen Q, Chen Z (2016) Systemic delivery to central nervous system by engineered PLGA nanoparticles. *American journal of translational research* 8: 749-764
- Calvo P, Gouritin B, Chacun H, Desmaele D, D'Angelo J, Noel JP, Geogin D, Fattal E, Andreux JP, Couvreur P (2001) Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharm Res* 18: 1157-1166
- Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S (2007) Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2050-2055
- Cena V, Jativa P (2018) Nanoparticle crossing of blood-brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Nanomedicine (Lond)* 13: 1513-1516
- Chen Y, Liu L (2012) Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 64: 640-665
- Cheng C, Helderma F, Tempel D, Segers D, Hierck B, Poelmann R, van Tol A, Duncker DJ, Robbers-Visser D, Ursem NT *et al* (2007a) Large variations in absolute wall shear stress levels within one species and between species. *Atherosclerosis* 195: 225-235
- Cheng C, Helderma F, Tempel D, Segers D, Hierck B, Poelmann R, van Tol A, Duncker DJ, Robbers-Visser D, Ursem NTC *et al* (2007b) Large variations in absolute wall shear stress levels within one species and between species. *Atherosclerosis* 195: 225-235

- Chesselet M-F, Carmichael ST (2012) Animal models of neurological disorders. *Neurotherapeutics* 9: 241-244
- Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM (2008) Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 14: 1310-1316
- Chu PC, Chai WY, Tsai CH, Kang ST, Yeh CK, Liu HL (2016) Focused Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening: Association with Mechanical Index and Cavitation Index Analyzed by Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic-Resonance Imaging. *Sci Rep* 6: 33264
- Crone C, Christensen O (1981) Electrical resistance of a capillary endothelium. *J Gen Physiol* 77: 349-371
- Crone C, Olesen SP (1982) Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res* 241: 49-55
- Daneman R, Prat A (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020412
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA (2010) Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468: 562-566
- Davies DC (2002) Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours. *Journal of anatomy* 200: 639-646
- Deli MA, Abraham CS, Kataoka Y, Niwa M (2005) Permeability Studies on In Vitro Blood-Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology* 25: 59-127
- DeLisser HM, Chilkotowsky J, Yan HC, Daise ML, Buck CA, Albelda SM (1994) Deletions in the cytoplasmic domain of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) result in changes in ligand binding properties. *J Cell Biol* 124: 195-203
- Eigenmann DE, Xue G, Kim KS, Moses AV, Hamburger M, Oufir M (2013) Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers CNS* 10: 33
- Esch EW, Bahinski A, Huh D (2015) Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 14: 248-260
- Faley SL, Neal EH, Wang JX, Bosworth AM, Weber CM, Balotin KM, Lippmann ES, Bellan LM (2019) iPSC-Derived Brain Endothelium Exhibits Stable, Long-Term Barrier Function in Perfused Hydrogel Scaffolds. *Stem Cell Reports* 12: 474-487
- Fenstermacher J, Gross P, Sposito N, Acuff V, Pettersen S, Gruber K (1988) Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann N Y Acad Sci* 529: 21-30
- Foroozandeh P, Aziz AA (2015) Merging worlds of nanomaterials and biological environment: factors governing protein corona formation on nanoparticles and its biological consequences. *Nanoscale Res Lett* 10: 221

- Forster C, Burek M, Romero IA, Weksler B, Couraud PO, Drenckhahn D (2008) Differential effects of hydrocortisone and TNF α on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Physiol* 586: 1937-1949
- Freese C, Anspach L, Deller RC, Richards SJ, Gibson MI, Kirkpatrick CJ, Unger RE (2017a) Gold nanoparticle interactions with endothelial cells cultured under physiological conditions. *Biomater Sci* 5: 707-717
- Freese C, Hanada S, Fallier-Becker P, Kirkpatrick CJ, Unger RE (2017b) Identification of neuronal and angiogenic growth factors in an in vitro blood-brain barrier model system: Relevance in barrier integrity and tight junction formation and complexity. *Microvasc Res* 111: 1-11
- Furuse M (2010) Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a002907
- Garcia-Polite F, Martorell J, Del Rey-Puech P, Melgar-Lesmes P, O'Brien CC, Roquer J, Ois A, Principe A, Edelman ER, Balcells M (2017) Pulsatility and high shear stress deteriorate barrier phenotype in brain microvascular endothelium. *J Cereb Blood Flow Metab* 37: 2614-2625
- Godwin A, Bolina K, Clochard M, Dinand E, Rankin S, Simic S, Brocchini S (2001) New strategies for polymer development in pharmaceutical science — a short review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53: 1175-1184
- Grabrucker AM, Ruozi B, Belletti D, Pederzoli F, Forni F, Vandelli MA, Tosi G (2016) Nanoparticle transport across the blood brain barrier. *Tissue Barriers* 4: e1153568
- Greene C, Hanley N, Campbell M (2019) Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids and barriers of the CNS* 16: 3-3
- Griep LM, Wolbers F, de Wagenaar B, ter Braak PM, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Vermes I, van der Meer AD, van den Berg A (2013) BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function. *Biomed Microdevices* 15: 145-150
- Gumerlock MK, Belshe BD, Madsen R, Watts C (1992) Osmotic blood-brain barrier disruption and chemotherapy in the treatment of high grade malignant glioma: patient series and literature review. *J Neurooncol* 12: 33-46
- Haag R, Kratz F (2006) Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 45: 1198-1215
- Hajal C, Campisi M, Mattu C, Chiono V, Kamm RD (2018) In vitro models of molecular and nano-particle transport across the blood-brain barrier. *Biomicrofluidics* 12: 042213
- Han DL, Liu KQ, Guo SS, Zhu HL, Huang C, Wang BH (2008) [Dose-effect relationship of DMSO and Tween 80 influencing the growth and viability of murine bone marrow-derived cells in vitro]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 16: 377-380
- Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778: 660-669

- Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H (2005) In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 25: 25-39
- Hatherell K, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Pilkington GJ (2011) Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J Neurosci Methods* 199: 223-229
- Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57: 173-185
- Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Vina JR (2006) Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr* 136: 218s-226s
- Hellinger E, Veszelka S, Toth AE, Walter F, Kittel A, Bakk ML, Tihanyi K, Hada V, Nakagawa S, Duy TD *et al* (2012) Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm* 82: 340-351
- Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, Forster C, Galla HJ, Romero IA, Shusta EV *et al* (2016) In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab* 36: 862-890
- Herland A, van der Meer AD, FitzGerald EA, Park TE, Sleeboom JJ, Ingber DE (2016) Distinct Contributions of Astrocytes and Pericytes to Neuroinflammation Identified in a 3D Human Blood-Brain Barrier on a Chip. *PLoS One* 11: e0150360
- Herve F, Ghinea N, Scherrmann JM (2008) CNS delivery via adsorptive transcytosis. *Aaps j* 10: 455-472
- Hollmann EK, Bailey AK, Potharazu AV, Neely MD, Bowman AB, Lippmann ES (2017) Accelerated differentiation of human induced pluripotent stem cells to blood-brain barrier endothelial cells. *Fluids Barriers CNS* 14: 9
- Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G (2016) The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond)* 11: 673-692
- Huang Y-W, Cambre M, Lee H-J (2017) The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *Int J Mol Sci* 18: 2702
- Huber DL (2005) Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* 1: 482-501
- Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5: 347-360
- Jamieson JJ, Linville RM, Ding YY, Gerecht S, Searson PC (2019) Role of iPSC-derived pericytes on barrier function of iPSC-derived brain microvascular endothelial cells in 2D and 3D. *Fluids and Barriers of the CNS* 16: 15

- Jena L, McErlean E, McCarthy H (2019) Delivery across the blood-brain barrier: nanomedicine for glioblastoma multiforme. *Drug Delivery and Translational Research*
- Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC (2008) Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol* 3: 145-150
- Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, Feussner A, Waldofner N, Scholz R, Deger S, Wust P, Loening SA, Jordan A (2005) Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *Int J Hyperthermia* 21: 637-647
- Kaisar MA, Sajja RK, Prasad S, Abhyankar VV, Liles T, Cucullo L (2017) New experimental models of the blood-brain barrier for CNS drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 12: 89-103
- Katt ME, Xu ZS, Gerecht S, Searson PC (2016) Human Brain Microvascular Endothelial Cells Derived from the BC1 iPS Cell Line Exhibit a Blood-Brain Barrier Phenotype. *PLoS One* 11: e0152105
- Kemper EM, Boogerd W, Thuis I, Beijnen JH, van Tellingen O (2004) Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? *Cancer Treat Rev* 30: 415-423
- Kharazian B, Hadipour NL, Ejtehad MR (2016) Understanding the nanoparticle-protein corona complexes using computational and experimental methods. *Int J Biochem Cell Biol* 75: 162-174
- Khongkow M, Yata T, Boonrungsiman S, Ruktanonchai UR, Graham D, Namdee K (2019) Surface modification of gold nanoparticles with neuron-targeted exosome for enhanced blood-brain barrier penetration. *Sci Rep* 9: 8278
- Kim JA, Kim HN, Im SK, Chung S, Kang JY, Choi N (2015) Collagen-based brain microvasculature model in vitro using three-dimensional printed template. *Biomicrofluidics* 9: 024115
- Klingberg H, Loft S, Oddershede LB, Moller P (2015) The influence of flow, shear stress and adhesion molecule targeting on gold nanoparticle uptake in human endothelial cells. *Nanoscale* 7: 11409-11419
- Knauer S.K. SRH (2009) Kontroverse im „Nanohype“: Nanopartikel – Freund oder Feind? *Deutsche Zeitschrift für Klinische Forschung DZKF* Heft 05/06:1-7
- Koffie RM, Farrar CT, Saidi LJ, William CM, Hyman BT, Spires-Jones TL (2011) Nanoparticles enhance brain delivery of blood-brain barrier-impermeable probes for in vivo optical and magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 18837-18842
- Kohler EE, Cowan CE, Chatterjee I, Malik AB, Wary KK (2011) NANOG induction of fetal liver kinase-1 (FLK1) transcription regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Blood* 117: 1761-1769
- Kopecek J, Kopeckova P, Minko T, Lu Z (2000) HEMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 61-81

- Kreuter J (2014) Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? *Adv Drug Deliv Rev* 71: 2-14
- Kuo Y-C, Ko H-F (2013) Targeting delivery of saquinavir to the brain using 83-14 monoclonal antibody-grafted solid lipid nanoparticles. *Biomaterials* 34: 4818-4830
- Li J, Sabliov C (2013) PLA/PLGA nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Nanotechnology Reviews* 2: 241-257
- Liang XJ, Meng H, Wang Y, He H, Meng J, Lu J, Wang PC, Zhao Y, Gao X, Sun B *et al* (2010) Metallofullerene nanoparticles circumvent tumor resistance to cisplatin by reactivating endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7449-7454
- Lippmann ES, Al-Ahmad A, Azarin SM, Palecek SP, Shusta EV (2014) A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources. *Sci Rep* 4: 4160
- Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, Nessler RA, Wilson HK, Al-Ahmad A, Palecek SP, Shusta EV (2012) Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 30: 783-791
- Loureiro JA, Gomes B, Fricker G, Coelho MAN, Rocha S, Pereira MC (2016) Cellular uptake of PLGA nanoparticles targeted with anti-amyloid and anti-transferrin receptor antibodies for Alzheimer's disease treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces* 145: 8-13
- Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO (2012) Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 9: 23
- Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65: 271-284
- Mahajan SD, Roy I, Xu G, Yong KT, Ding H, Aalinkeel R, Reynolds J, Sykes D, Nair BB, Lin EY *et al* (2010) Enhancing the delivery of anti retroviral drug "Saquinavir" across the blood brain barrier using nanoparticles. *Curr HIV Res* 8: 396-404
- Mahapatro A, Singh DK (2011) Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology* 9: 55
- Mak IW, Evaniew N, Ghert M (2014) Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* 6: 114-118
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A *et al* (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142: 117-127
- McMillin MA, Frampton GA, Seiwel AP, Patel NS, Jacobs AN, DeMorrow S (2015) TGF β 1 exacerbates blood-brain barrier permeability in a mouse model of hepatic encephalopathy via upregulation of MMP9 and downregulation of claudin-5. *Lab Invest* 95: 903-913

- Minagar A, Alexander JS (2003) Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 9: 540-549
- Mizee MR, Wooldrik D, Lakeman KA, van het Hof B, Drexhage JA, Geerts D, Bugiani M, Aronica E, Mebius RE, Prat A *et al* (2013) Retinoic acid induces blood-brain barrier development. *J Neurosci* 33: 1660-1671
- Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* 7: 779-786
- Monopoli MP, Pitek AS, Lynch I, Dawson KA (2013) Formation and characterization of the nanoparticle-protein corona. *Methods Mol Biol* 1025: 137-155
- Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli FB, Dawson KA (2011) Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc* 133: 2525-2534
- Moustakas A, Heldin CH (2009) The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* 136: 3699-3714
- Muller J, Bauer KN, Prozeller D, Simon J, Mailänder V, Wurm FR, Winzen S, Landfester K (2017) Coating nanoparticles with tunable surfactants facilitates control over the protein corona. *Biomaterials* 115: 1-8
- Musyanovych A, Schmitz-Wienke J, Mailänder V, Walther P, Landfester K (2008) Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions. *Macromolecular Bioscience* 8: 127-139
- Müller J, Simon J, Rohne P, Koch-Brandt C, Mailänder V, Morsbach S, Landfester K (2018) Denaturation via Surfactants Changes Composition of Protein Corona. *Biomacromolecules* 19: 2657-2664
- Nagayama S, Ogawara K, Fukuoka Y, Higaki K, Kimura T (2007) Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. *Int J Pharm* 342: 215-221
- Najafzadeh M, Anderson D (2018) Chapter 5 Nanoparticles in Biomedicine and Medicine, and Possible Clinical Toxicological Application of Peripheral Lymphocytes in the Risk Assessment Process for Susceptible Disease State Individuals. In: *Nanotoxicology: Experimental and Computational Perspectives*, pp. 133-150. The Royal Society of Chemistry:
- Nance E, Timbie K, Miller GW, Song J, Louttit C, Klibanov AL, Shih TY, Swaminathan G, Tamargo RJ, Woodworth GF *et al* (2014) Non-invasive delivery of stealth, brain-penetrating nanoparticles across the blood-brain barrier using MRI-guided focused ultrasound. *J Control Release* 189: 123-132
- Neal EH, Marinelli NA, Shi Y, McClatchey PM, Balotin KM, Gullett DR, Hagerla KA, Bowman AB, Ess KC, Wikswo JP *et al* (2019) A Simplified, Fully Defined Differentiation Scheme for Producing Blood-Brain Barrier Endothelial Cells from Human iPSCs. *Stem Cell Reports* 12: 1380-1388

Nel A, Xia T, Madler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622-627

Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 8: 543-557

Nikandish N, Hosseinzadeh L, Hemati Azandaryani A, Derakhshandeh K (2016) The Role of Nanoparticle in Brain Permeability: An in-vitro BBB Model. *Iran J Pharm Res* 15: 403-413

Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y (2018) Induced Tissue-Specific Stem Cells and Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci* 19: 930

Ohtsuki S, Terasaki T (2007) Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res* 24: 1745-1758

Oki T, Takahashi S, Kuwabara S, Yoshiyama Y, Mori M, Hattori T, Suzuki N (2004) Increased ability of peripheral blood lymphocytes to degrade laminin in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 222: 7-11

Oldendorf WH, Brown WJ (1975) Greater number of capillary endothelial cell mitochondria in brain than in muscle. *Proc Soc Exp Biol Med* 149: 736-738

Olivier JC, Fenart L, Chauvet R, Pariat C, Cecchelli R, Couet W (1999) Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. *Pharm Res* 16: 1836-1842

Onyema HN, 2016. Aufnahme von Nanopartikel in einem statischen und dynamischen in vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke, Biologie. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Pardridge WM (2002) Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Neuron* 36: 555-558

Pardridge WM (2005) The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2: 3-14

Pardridge WM (2012) Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32: 1959-1972

Park T-E, Mustafaoglu N, Herland A, Hasselkus R, Mannix R, FitzGerald EA, Prantil-Baun R, Watters A, Henry O, Benz M *et al* (2019) Hypoxia-enhanced Blood-Brain Barrier Chip recapitulates human barrier function and shuttling of drugs and antibodies. *Nature Communications* 10: 2621

Patel P, Kumar A (2019) CHAPTER 3 Factors Affecting a Nanoparticle's Protein Corona Formation. In: *Nanoparticle-Protein Corona: Biophysics to Biology*, pp. 61-79. The Royal Society of Chemistry:

- Peluffo H, Unzueta U, Negro-Demontel ML, Xu Z, Vaquez E, Ferrer-Miralles N, Villaverde A (2015) BBB-targeting, protein-based nanomedicines for drug and nucleic acid delivery to the CNS. *Biotechnol Adv* 33: 277-287
- Pulicherla KK, Verma MK (2015) Targeting therapeutics across the blood brain barrier (BBB), prerequisite towards thrombolytic therapy for cerebrovascular disorders-an overview and advancements. *AAPS PharmSciTech* 16: 223-233
- Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A (2016) Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Adv Drug Deliv Rev* 107: 153-162
- Rao TP, Kuhl M (2010) An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 106: 1798-1806
- Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34: 207-217
- Reimold I, Domke D, Bender J, Seyfried CA, Radunz HE, Fricker G (2008) Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy. *Eur J Pharm Biopharm* 70: 627-632
- Reinitz A, DeStefano J, Ye M, Wong AD, Searson PC (2015) Human brain microvascular endothelial cells resist elongation due to shear stress. *Microvasc Res* 99: 8-18
- Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H (2009) Nanomedicine—Challenge and Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition* 48: 872-897
- Rip J, Schenk GJ, de Boer AG (2009) Differential receptor-mediated drug targeting to the diseased brain. *Expert Opin Drug Deliv* 6: 227-237
- Robinton DA, Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481: 295-305
- Rogers NJ, Lewis DJ (2016) Biological applications of nanomaterials. In: *Nanoscience: Volume 3*, pp. 276-323. The Royal Society of Chemistry:
- Roney C, Kulkarni P, Arora V, Antich P, Bonte F, Wu A, Mallikarjuana NN, Manohar S, Liang HF, Kulkarni AR *et al* (2005) Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *J Control Release* 108: 193-214
- Rowe RG, Daley GQ (2019) Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet* 20: 377-388
- Russell WMS, Burch RL (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen, London
- Saraiva C, Praca C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L (2016) Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release* 235: 34-47
- Sato S, Suga S, Yunoki K, Mihara B (1994) Effect of barrier opening on brain edema in human brain tumors. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 60: 116-118

- Schottler S, Becker G, Winzen S, Steinbach T, Mohr K, Landfester K, Mailander V, Wurm FR (2016) Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nat Nanotechnol* 11: 372-377
- Sedlakova R, Shivers RR, Del Maestro RF (1999) Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31: 149-161
- Sempf K, Arrey T, Gelperina S, Schorge T, Meyer B, Karas M, Kreuter J (2013) Adsorption of plasma proteins on uncoated PLGA nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 85: 53-60
- Senapati VA, Kansara K, Shanker R, Dhawan A, Kumar A (2017) Monitoring characteristics and genotoxic effects of engineered nanoparticle-protein corona. *Mutagenesis* 32: 479-490
- Settanni G, Schäfer T, Muhl C, Barz M, Schmid F (2018) Poly-sarcosine and Poly(Ethylene-Glycol) Interactions with Proteins Investigated Using Molecular Dynamics Simulations. *Comput Struct Biotechnol J* 16: 543-550
- Shah J, Singh S (2019) CHAPTER 1 Nanoparticle–Protein Corona Complex: Composition, Kinetics, Physico–Chemical Characterization, and Impact on Biomedical Applications. In: *Nanoparticle–Protein Corona: Biophysics to Biology*, pp. 1-30. The Royal Society of Chemistry:
- Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J (1997) A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89: 981-990
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* 10: 15
- Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S (2017) Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 16: 115-130
- Siddharthan V, Kim YV, Liu S, Kim KS (2007) Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res* 1147: 39-50
- Sims DE (1986) The pericyte--a review. *Tissue Cell* 18: 153-174
- Smith QR, Rapoport SI (1986) Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium, and chloride. *J Neurochem* 46: 1732-1742
- Stenman JM, Rajagopal J, Carroll TJ, Ishibashi M, McMahon J, McMahon AP (2008) Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science* 322: 1247-1250
- Stockhofe K, Postema JM, Schieferstein H, Ross TL (2014) Radiolabeling of Nanoparticles and Polymers for PET Imaging. *Pharmaceuticals (Basel)* 7: 392-418
- Stone NL, England TJ, O'Sullivan SE (2019) A Novel Transwell Blood Brain Barrier Model Using Primary Human Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13
- Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H (2012) Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 3: 8

- Szablewski L (2017) Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 55: 1307-1320
- Tabatabaei FS, Moezizadeh M, Javand F (2015) Effects of extracts of *Salvadora persica* on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. *J Conserv Dent* 18: 315-320
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676
- Tanaka T, Mangala LS, Vivas-Mejia PE, Nieves-Alicea R, Mann AP, Mora E, Han HD, Shahzad MM, Liu X, Bhavane R *et al* (2010) Sustained small interfering RNA delivery by mesoporous silicon particles. *Cancer Res* 70: 3687-3696
- Teleanu DM, Chircov C, Grumezescu AM, Volceanov A, Teleanu RI (2018) Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology. *Pharmaceutics* 10: 269
- Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, Schlenk F, Fischer D, Kiouptsi K, Reinhardt C *et al* (2013) Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol* 8: 772-781
- Tenzer S, Docter D, Rosfa S, Wlodarski A, Kuharev J, Rekić A, Knauer SK, Bantz C, Nawroth T, Bier C *et al* (2011) Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano* 5: 7155-7167
- Thomsen MS, Routh LJ, Moos T (2017) The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 37: 3300-3317
- Treuel L, Nienhaus GU (2012) Toward a molecular understanding of nanoparticle-protein interactions. *Biophys Rev* 4: 137-147
- Turner N, Grose R (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 116-129
- Upadhyay RK (2014) Drug delivery systems, CNS protection, and the blood brain barrier. *Biomed Res Int* 2014: 869269
- Urich E, Lazic SE, Molnos J, Wells I, Freskgard PO (2012) Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS One* 7: e38149
- Valet G (2003) Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *J Biol Regul Homeost Agents* 17: 213-222
- Van Itallie CM, Anderson JM (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68: 403-429
- Veszelka S, Bocsik A, Walter F, Hantosi D, Deli M (2015) Blood-brain barrier co-culture models to study nanoparticle penetration: Focus on co-culture systems. 59: 157-168

- Wang Q, Rager JD, Weinstein K, Kardos PS, Dobson GL, Li J, Hidalgo IJ (2005) Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int J Pharm* 288: 349-359
- Wang YI, Abaci HE, Shuler ML (2017) Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening. *Biotechnol Bioeng* 114: 184-194
- Wang ZG, Cheng Y, Yu XC, Ye LB, Xia QH, Johnson NR, Wei X, Chen DQ, Cao G, Fu XB *et al* (2016) bFGF Protects Against Blood-Brain Barrier Damage Through Junction Protein Regulation via PI3K-Akt-Rac1 Pathway Following Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol* 53: 7298-7311
- Weber C, Simon J, Mailänder V, Morsbach S, Landfester K (2018) Preservation of the soft protein corona in distinct flow allows identification of weakly bound proteins. *Acta Biomater* 76: 217-224
- Weksler B, Romero IA, Couraud PO (2013) The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS* 10: 16
- Wilson HK, Faubion MG, Hjortness MK, Palecek SP, Shusta EV (2016) Cryopreservation of Brain Endothelial Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Is Enhanced by Rho-Associated Coiled Coil-Containing Kinase Inhibition. *Tissue Eng Part C Methods* 22: 1085-1094
- Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J (2012) Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Control Release* 161: 264-273
- Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38: 323-337
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 105: 586-592
- Wolff A, Antfolk M, Brodin B, Tenje M (2015) In Vitro Blood-Brain Barrier Models-An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches. *J Pharm Sci* 104: 2727-2746
- Wolfram J, Yang Y, Shen J, Moten A, Chen C, Shen H, Ferrari M, Zhao Y (2014) The nanoplasma interface: Implications of the protein corona. *Colloids Surf B Biointerfaces* 124: 17-24
- Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC (2013) The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* 6: 7
- Wu C, Ivars F, Anderson P, Hallmann R, Vestweber D, Nilsson P, Robenek H, Tryggvason K, Song J, Korpos E *et al* (2009) Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nat Med* 15: 519-527
- Wu S-K, Chu P-C, Chai W-Y, Kang S-T, Tsai C-H, Fan C-H, Yeh C-K, Liu H-L (2017) Characterization of Different Microbubbles in Assisting Focused Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening. *Sci Rep* 7: 46689-46689

- Xu C, Mu L, Roes I, Miranda-Nieves D, Nahrendorf M, Ankrum JA, Zhao W, Karp JM (2011) Nanoparticle-based monitoring of cell therapy. *Nanotechnology* 22: 494001
- Xu L, Nirwane A, Yao Y (2019) Basement membrane and blood-brain barrier. *Stroke Vasc Neurol* 4: 78-82
- Yan L, Zhao F, Li S, Hu Z, Zhao Y (2011) Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale* 3: 362-382
- Yan Y, Gause KT, Kamphuis MM, Ang CS, O'Brien-Simpson NM, Lenzo JC, Reynolds EC, Nice EC, Caruso F (2013) Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines. *ACS Nano* 7: 10960-10970
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R *et al* (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920
- Zakrzewski W, Dobrzynski M, Szymonowicz M, Rybak Z (2019) Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* 10: 68
- Zhang TT, Li W, Meng G, Wang P, Liao W (2016) Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. *Biomater Sci* 4: 219-229
- Zhou Y, Peng Z, Seven ES, Leblanc RM (2018) Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J Control Release* 270: 290-303

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Zellulärer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Abbott *et al.*, 2006)). Mikrovaskuläre zerebrale EZ, welche über *tight junctions* miteinander verbunden sind, bilden hauptsächlich die BHS aus. Umgeben sind die EZ von der Basalmembran, in die die PZ eingebettet sind. Durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren spielen AZ eine tragende Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung der BHS. 1
- Abbildung 2: Schematischer Aufbau der *tight junctions* (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Abbott *et al.*, 2006)). Die transmembranen Proteine Claudin-3, -5 und -12, Occludin sowie junktionale Adhäsionsmoleküle (JAM) sind Hauptbestandteile der TJ. Diese sind über *Zonula Occludens*-Adaptermoleküle ZO-1 und ZO-2 mit dem Zytoskelett verbunden. AJ, welche hauptsächlich aus VE-Cadherin und PECAM/CD31 bestehen, stabilisieren die TJ zusätzlich und tragen so zur Unterbindung der passiven Diffusion großer Moleküle bei. 3
- Abbildung 3: Transportmechanismen an der Blut-Hirn-Schranke (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Abbott *et al.*, 2006)). a) Wasserlösliche Moleküle können über passive Diffusion parazellulär die Barriere überqueren. b) Alkohole oder Steroidhormone überqueren die Blut-Hirn-Schranke über transzelluläre Diffusion. c) Aminosäuren oder Glukose gelangen mit Hilfe von Transporterproteinen ins Gehirn. d) Über spezifische Rezeptor-vermittelte Transzytose gelangen Proteine (z.B. Insulin oder Transferrin) ins Gehirn. e) Die Adsorptions-vermittelte Transzytose basiert auf elektrostatische Interaktionen zwischen einem positiv geladenen Molekül oder Peptid und der negativen Ladung der Plasmamembran. f) Der Abtransport unerwünschter Moleküle erfolgt mit Hilfe von Effluxtransportern (z.B. Pgp). 5
- Abbildung 4: Schematischer Überblick der *in vitro*-Modelle der Blut-Hirn-Schranke (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Kaiser *et al.*, 2017)). Neben den einfachen Transwell-Membraneinsatzmodellen werden vermehrt auch dynamische Modelle sowie 3D-Modelle eingesetzt. In diesen Modellen werden nur EZ oder EZ in Co-Kultur mit weiteren Zellen, die an der Bildung der BHS beteiligt sind, eingesetzt. Neben dem Aufbau auf synthetischen Membranen besteht auch die Möglichkeit Modelle mit Hilfe einer extrazellulären Matrix aufzubauen. 7
- Abbildung 5: Hierarchische Darstellung der potentiellen Entwicklung von Stammzellen (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Sugawara *et al.*, 2012)). Je nach Differenzierungsgrad werden Stammzellen in verschiedene Gruppen unterteilt. Totipotente Zellen wie die befruchtete Eizelle sind in der Lage sich zu jeder beliebigen Zelle zu differenzieren sowie extraembryonale Strukturen zu entwickeln und können somit einen kompletten Organismus bilden. Pluripotente Stammzellen wie ES aus dem Inneren der Blastozyste oder iPSC, welche aus adulten, somatischen Zellen umprogrammiert werden, können sich zu Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) entwickeln. Multipotente Stammzellen (z.B. hämatopoetische Stammzellen) können sich nur in Zellen eines Gewebes differenzieren. Unipotente Stammzellen (somatische Zellen) können nur Zellen eines Typs bilden. 8
- Abbildung 6: Mögliche Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) in der Therapie (Rowe & Daley, 2019). Aus somatischen Zellen des Patienten werden Patientenspezifische iPSC generiert. Für eine autologe Therapie kann das krankheitserregende Gen mittels der CRISPR/Cas-Methode repariert und nach gezielter

- Differenzierung der Zellen dem Patienten transplantiert werden. Die gezielte Differenzierung der iPSC zu Zellen, welche dem Krankheitsbild entsprechen, können für Arzneimitteltests oder -optimierungen für eine gezielte Therapie genutzt werden. 10
- Abbildung 7: Notwendige Eigenschaften von Nanopartikeln für den Einsatz als Wirkstoffträger (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Bleul, 2014)). Inorganische sowie Polymere Nanopartikel können auf Grund ihrer einstellbaren Form, Größe und unterschiedlichen biokompatiblen Materialien als Wirkstoffträger eingesetzt werden. Neben einer gezielten Adressierung der Zielzellen und einer verlängerten Blutzirkulation bieten Nanopartikel dem Wirkstoff die erleichterte Überwindung von Barrieren, Schutz vor vorzeitigem Abbau und minimieren seine Nebenwirkungen in gesundem Gewebe. 12
- Abbildung 8: Der EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*, eigene Darstellung, in Anlehnung an (Stockhofe *et al*, 2014)). Kleine Moleküle können in gesundem wie auch in erkranktem Gewebe aufgenommen werden. Jedoch kommt es in gesundem Gewebe auf Grund des intakten Lymphsystems zu dessen Abtransport. Im Vergleich zu kleinen Molekülen können Nanopartikel nur in geschädigtes Gewebe eindringen. Im gesunden Gewebe ist dies wegen der intakten Endothelschicht nicht möglich. 14
- Abbildung 9: Transportmechanismen von Nanopartikeln zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Zhou *et al.*, 2018)). NP können an der BHS über passive wie auch aktive Transportwege ins Gehirn gelangen. Der passive Transport kann jedoch nur von lipophilen Partikeln mit einer Größe von weniger als 500 Da, wie z.B. einigen Gold-NP, erfolgen. Die Überwindung der Barriere von kationischen NP (z.B. Liposome oder Gold-NP) basiert auf Adsorptions-vermittelter Transzytose. Große Moleküle (z.B. PLGA, PLA-, PBCA-NP oder Liposome) werden über Rezeptor-vermittelte Transzytose transportiert. 15
- Abbildung 10: Übersicht der Bildung und Zusammensetzung der Proteinkorona beeinflussende Faktoren (eigene Darstellung, in Anlehnung an (Patel & Kumar, 2019)). Neben physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel haben auch die biologische und physiologische Umgebung sowie die Verweilzeit der Nanopartikel darin einen Einfluss auf die Bildung sowie die Zusammensetzung der Proteinkorona. 16
- Abbildung 11: Schematische Darstellung der Differenzierung (nach Lippmann *et al.* 2012 modifiziert). Die iPSCs wurden für 7 Tage in UM-Medium und anschließend 2 Tage in EC-Medium mit bFGF und RA, welches frisch hinzugegeben wurde, kultiviert. Die potentiell durch andere Nervenzellen verunreinigten, unreifen hBMECs wurden durch Aussaat auf einer Fibronectin-Kollagen-Matrix aufgereinigt und erneut für 24 h in EC-Medium mit bFGF und RA kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung in EC-Medium ohne bFGF und RA. Daran anschließend wurden weitere Untersuchungen zur NP-Aufnahme sowie Charakterisierung der Zellen durchgeführt. Bei Aussaat auf Transwell-Membraneinsätzen wurden die Zellen zur Messung des TEER-Wertes ins *CellZscopeE* umgesetzt. 29
- Abbildung 12: Aufbau des ibidi-Pump-Systems. Die Pumpe wird mit Hilfe der Computer-Software *PumpControl* gesteuert. Die gepumpte Luft wird mit der Trocknungsflasche getrocknet, sodass keine Feuchtigkeit in die Pumpe gelangen kann. Die fluidische Einheit mit dem Perfusionsset, bestehend aus den Perfusionskanälen und den Behältern für das Medium und der μ -slide mit den Zellen befinden, sich im Inkubator, welcher auf 37 °C und 5 % CO₂ eingestellt ist. 33

- Abbildung 13: Toxizitätsanalyse mittels *Cell Counting Kit-8* (CCK-8; a, c) und Kristallviolett (b, d) nach NP-Aufnahme. Zellen der Zelllinie hCMEC/D3 wurden mit den Partikeln PLLA-202, PLLA-203, PLGA-502, PLGA-504 und PLGA-752 mit jeweils einer Größe von 50 und 100 nm bei verschiedenen Konzentrationen für 20 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen (0 µg/ml), dessen Anteil an lebenden Zellen auf 100 % gesetzt wurde. (Anteil der lebenden Zellen <30 %: stark toxisch, 30 – 50 %: moderat toxisch, 50 – 80 %: leicht toxisch, >80 %: nicht toxisch; Zweifache Varianzanalyse mit *Dunnett*-Post-hoc-Test. *: P<0,0332, **: P<0,0021, ***: P<0,0002, ****: P<0,0001)..... 39
- Abbildung 14: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Nanopartikel-Aufnahme (a,c) und Toxizitätsanalysen der Nanopartikel (b, d). hCMEC/D3 wurden mit 25 und 50 µg/ml NP (PLLA-202, -203, PLGA-502, -504, -752) mit einer Größe von jeweils 50 und 100 nm für 20 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert und die Aufnahme sowie Toxizität per fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten wurden auf die Fluoreszenzintensitäten der Partikel PLLA-202 (a, n=3) bzw. PLLA-203 (c, n=3) normiert. Als Kontrolle wurden ungefärbte Zellen ohne NP mit FVS660 verwendet (Anteil der lebenden Zellen <30 %: stark toxisch, 30 – 50 %: moderat toxisch, 50 – 80 %: leicht toxisch, >80 %: nicht toxisch; zweifache Varianzanalyse mit *Dunnett*-Post-hoc-Test. *: P<0,0332, **: P<0,0021, ***: P<0,0002, ****: P<0,0001)..... 42
- Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Aufnahme von verschiedenen Polymer-Nanopartikel. Aufnahme von PLLA-202, -203 sowie PLGA-502, -504- und -752 mit jeweils einer Größe von 50 und 100 nm und einer Konzentration von 50 µg/ml für 20 h unter Standardkulturbedingungen in hCMEC/D3. In die NP wurde der fluoreszierende Farbstoff PMI (grün) verkapselt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Höchst 33342 (blau) und der Zellmembran mit Cell Mask™ Orange (rot; Weitfeldfluoreszenzmikroskops Olympus IX71 mit Delta Vision, 40x-Vergrößerung, Messbalken= 5 µm)..... 45
- Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahmen an verschiedenen Tagen der Differenzierung. a) Undifferenzierte iPSC an Tag 0 der Differenzierung. b) Konfluenten Zellrasen mit einem Zellgemisch bestehend aus teilweise übereinander wachsenden Zellen. (Messbalken = 200 µm, 50x-Vergrößerung, Phasenkontrastmikroskop Olympus BX41)..... 46
- Abbildung 17: Relative Genexpression essentieller Hirnendothelproteine. *rpl13a* dient als Referenzgen und die undifferenzierten iPSC als Wildtyp. Hirnendothelgene: *claudin-5*, *occludin*, *pecam/cd31*, *zo-1*, *bcrp*, *mdr-1*. Pluripotenzgene: *sox2*, *nanog*, *oct3/4* (n=3; Zweifache Varianzanalyse mit *Sidak*-Post-hoc-Test. *: P<0,0332, **: P<0,0021, ***: P<0,0002, ****: P<0,0001)..... 47
- Abbildung 18: Immunozytochemische Analysen der Hirnendothelproteine. Die Aufnahmen zeigen den immunozytochemischen Nachweis von PECAM/CD31, Claudin-5 und Occludin (jeweils in rot). Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Undifferenzierte iPSC dienen als Negativkontrolle (a-d, Messbalken = 24 µm, 63x-Vergrößerung, Weitfeldfluoreszenzmikroskop Leica AF7000; e-f, Messbalken = 20 µm, 50x-Vergrößerung, Weitfeldfluoreszenzmikroskop Olympus BX51)..... 48
- Abbildung 19: Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) bei hBMEC. Nach Erreichen eines TEER von mindestens 1.500 Ωcm² (nach ca. 48 h) wurde Natrium-Fluorescein mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml hinzugegeben. Aus dem unteren Kompartiment wurde Medium nach 1, 2, 3 und 4 h nach der Zugabe entnommen. (Zweifache Varianzanalyse mit *Bonferroni*-Post-hoc-Test. *: P<0,0332, **: P<0,0021, ***: P<0,0002, ****: P<0,0001; n=3)..... 49

- Abbildung 20: Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) bei unterschiedlichen Porengrößen der Transwell-Membraneinsätzen. Nach einem Mediumswechsel mit Endothelzellmedium (Tag 11 der Differenzierung, EC-Medium) erfolgte die tägliche Analyse des TEER von hBMEC auf Transwell-Membraneinsätzen mit einer Porengröße von 0,4 und 3 μm . Die erste Messung (Tag 1) wurde 24 h nach dem Mediumswechsel durchgeführt. Als Referenz dienten beschichtete Transwell-Membraneinsätzen ohne Zellen. Messungen wurden mit EVOM durchgeführt und die Referenzmessung der Leerfilter abgezogen (Zweifache Varianzanalyse mit *Dunnett*-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$)..... 50
- Abbildung 21: Immunozytochemische Analysen von Claudin-5 und Occludin nach Kultivierung von hBMEC auf Transwell-Membraneinsätzen. Der immunozytochemische Nachweis der TJ-assoziierten Proteinen Claudin-5 und Occludin (jeweils in rot) mit hBMEC auf Transwell-Membraneinsätzen (Porengröße 0,4 μm) mit EC-Medium (a, b) und Astrozyten-Medium (c, d) auf basolateraler Seite. Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt (20x-Vergrößerung, Weitfeldfluoreszenzmikroskop Olympus BX51)..... 51
- Abbildung 22: Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) bei Kultivierung von hBMEC auf Transwell-Membraneinsätzen mit einer Porengröße von 0,4 und 3 μm unter Nutzung verschiedener Medien auf der basolateralen Seite der Zellen. Der Mediumswechsel auf lateraler Seite erfolgte bei allen Zellen mit EC-Medium Auf basolateraler Seite wurde das Medium durch EC-Medium bzw. AZ-Medium ersetzt. 24 h nach dem Mediumswechsel wurde der TEER mit Hilfe des EVOM täglich gemessen. Als Referenz dienten beschichtete Transwell-Membraneinsätzen ohne Zellen. (Zweifache Varianzanalyse mit *Tukey*-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$)..... 52
- Abbildung 23: Immunozytochemische Analysen von Claudin-5 und Occludin nach Kultivierung der Zellen unter dynamischen Bedingungen. Die Aufnahmen zeigen den immunozytochemischen Nachweis von Claudin-5 und Occludin (jeweils in rot) von hBMEC, welche bei einem Scherstress von 10 dyn/cm^2 für 96 h kultiviert wurden. Zur Kontrolle dienten Zellen, welche im *μslide*-Channel ohne Scherstress unter statischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst 33342 (blau; 20x-Vergrößerung, Olympus BX51). 53
- Abbildung 24: Untersuchung des Einflusses der NP auf die intakte Barriere der hBMEC. Die Untersuchung des Einflusses der NP nach ihrer Aufnahme von den hBMEC auf die intakte Barriere erfolgte durch stündliche Messungen des TEER mit Hilfe des *CellZscope E*. 24 h nach der Aussaat auf Transwell-Membraneinsätze (Porengröße 0,4 μm) erfolgte ein Mediumswechsel mit EC-Medium ohne Retinsäure. Bei Erreichen eines TEER-Werts von mindestens 1.500 Ωcm^2 (ca. 24 h nach dem Mediumswechsel) wurden die NP (PLLA-202, -203, PLGA-502, -504) jeweils mit einer Größe von 50 nm (a) und 100 nm (b) und mit einer Konzentration von 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinzugegeben. Als Kontrolle dienten Zellen ohne NP (hBMEC) sowie Transwell-Membraneinsätze ohne Zellen. (Zweifache Varianzanalyse mit *Dunnett*-Post-hoc-Test, nicht abgebildet. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$)..... 55
- Abbildung 25: Untersuchung des Einflusses des NP PLGA-502 mit einer Größe von 100 und 50 nm und jeweils einer Partikelkonzentration von 75 und 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Analyse der intakten Barriere nach NP-Aufnahme erfolgte durch stündliche Messung des TEER mit dem *CellZscope E* der auf Transwell-Membraneinsätzen ausgesäten hBMEC. 24 h nach der Aussaat wurde ein Mediumswechsel durchgeführt. Bei Erreichen eines TEER-Werts

von mindestens $1.500 \Omega\text{cm}^2$ (ca. 24 h nach Mediumswechsel) wurde der NP PLGA-502 jeweils mit einer Größe von 50 nm und 100 nm sowie einer Konzentration von 75 und 150 $\mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Als Kontrolle dienten Zellen ohne NP (hBMEC) sowie Transwell-Membraneinsätze ohne Zellen. (Zweifache Varianzanalyse mit *Dunnett*-Post-hoc-Test, nicht abgebildet. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$). 56

Abbildung 26: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Nanopartikel-Aufnahme (a, c) und Toxizitätsanalysen verschiedener Nanopartikel (b, d). hBMEC wurden mit 150 $\mu\text{g/ml}$ verschiedener NP (PLLA-202, -203, PLGA-502, -504, -752) und einer Größe von 50 und 100 nm für 20 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert und die Aufnahme sowie Toxizität per fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten wurden auf die Fluoreszenzintensitäten des Partikels PLLA-202 normiert. Als Kontrolle wurden ungefärbte Zellen ohne NP mit FVS660 verwendet (Anteil der lebenden Zellen $< 30\%$: stark toxisch, $30 - 50\%$: moderat toxisch, $50 - 80\%$: leicht toxisch, $> 80\%$: nicht toxisch; einfache Varianzanalyse mit *Dunnett*-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$). 59

Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der NP-Aufnahmen aller Nanopartikel. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen (hBMEC) erfolgten nach der Aufnahme von PLLA-202, -203 sowie PLGA-502, -504 und -752 mit jeweils einer Größe von 50 und 100 nm und einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ für 4 h unter Standardkulturbedingungen. In den NP wurde der fluoreszierende Farbstoff PMI (grün) verkapselt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Höchst 33342 (blau) und der Zellmembran mit Cell Mask™ Orange (rot). (50x-Vergrößerung, Weitfeldfluoreszenzmikroskop Olympus BX51). 61

Abbildung 28: Toxizitätsanalyse mittels *Cell Counting Kit-8* (CCK-8; a, c) und Kristallviolett (b, d). Die zu hBMEC differenzierten Zellen wurden mit den Partikeln PLLA-202, PLLA-203, PLGA-502, PLGA-504 und -752 mit einer Größe von 50 und 100 nm bei verschiedenen Konzentrationen für 20 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen (0 $\mu\text{g/ml}$), deren Anteil an lebenden Zellen auf 100 % gesetzt wurde. (Anteil der lebenden Zellen $< 30\%$: stark toxisch, $30 - 50\%$: moderat toxisch, $50 - 80\%$: leicht toxisch, $> 80\%$: nicht toxisch; zweifache Varianzanalyse mit *Dunnett*-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=3$). 63

Abbildung 29: Proteinzusammensetzung des verwendeten humanen Blutplasmas. Das Blutplasma setzt sich aus 20 verschiedenen Blutproben zusammen. Die Analyse der Proteinzusammensetzung wurde vom Institut für molekulare Biologie gGmbH (IMB) in Mainz massenspektrometrisch durchgeführt. 65

Abbildung 30: Zusammensetzungen der Proteinkoronen der verschiedenen Nanopartikel nach Inkubation mit humanem Blutplasma. Für die Ausbildung der PK wurden die NP für 1 h bei 37°C und 500 U/min auf einem Heiz-Thermo-Mixer mit humanem Blutplasma, vereinigt aus 20 einzelnen Blutproben, inkubiert. Als Kontrolle dienten NP, welche unter gleichen Bedingungen mit PBS anstelle des Blutplasmas behandelt wurden. Die massenspektrometrischen Messungen und Analysen wurden vom Institut für molekulare Biologie gGmbH (IMB) in Mainz durchgeführt. (Zweifache Varianzanalyse mit *Tukey*-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=1$). 67

Abbildung 31: Veränderung des Zetapotenzials nach Ausbildung einer Proteinkorona. Für die Ausbildung der PK wurden die NP mit einer Größe von 50 nm (a) und 100 nm (b) für 1 h bei 37°C und 500 U/min auf einem Heiz-Thermo-Mixer mit humanem Blutplasma,

vereinigt aus 20 einzelnen Blutproben, inkubiert. Als Kontrolle dienten NP, welche unter gleichen Bedingungen mit PBS anstelle des Blutplasmas behandelt wurden. Zur ZP wurden die NP in 10 mM KCL gelöst. (Zweifache Varianzanalyse mit *Sidak*-Post-hoc-Test. *: $P < 0,0332$, **: $P < 0,0021$, ***: $P < 0,0002$, ****: $P < 0,0001$; $n=1$)..... 68

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte.	19
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Softwares.	20
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	21
Tabelle 4: Übersicht über verwendete Reagenzien.	21
Tabelle 5: Übersicht der eingesetzten Zellkulturmedien.....	23
Tabelle 6: Übersicht der Eigenschaften der eingesetzten Polymere.....	23
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Nanopartikel.....	24
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien.....	24
Tabelle 9: Sequenz, Länge, Produktlänge sowie Temperatur der verwendeten Oligonukleotide.	24
Tabelle 10: Arbeitsvolumina sowie Volumina zur Beschichtung für die verwendete Zellkulturware.....	26
Tabelle 11: Verwendete Medien für hCMEC/D3.	26
Tabelle 12: Für iPS(IMR90)-4 verwendete Medien.....	27
Tabelle 13: Für die Differenzierung eingesetzte Medien.....	28
Tabelle 14: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für immunozytochemische Färbungen zum Nachweis der zu hBMEC differenzierten iPSCs.....	30
Tabelle 15: Temperaturprotokoll der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion.	32