

Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Nanopartikel als therapeutisches Konzept
für neurodegenerative Erkrankungen
am Beispiel von Morbus Parkinson**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2022

vorgelegt von Karin Danz

geb. am 25.09.1988 in Bad Salzig

Tag des Kolloquiums: 12.12.2022

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Dissertationsgutachter: Prof. Dr. H. von Briesen
Prof. Dr. E. Meese

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT in Sulzbach/Saar in der Abteilung Bioprozesse und Bioanalytik durchgeführt.



Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1. Morbus Parkinson	1
1.1.1. Medikamentöse Therapie von Morbus Parkinson	1
1.1.2. Alternative Behandlungsstrategien	2
1.1.3. Oxidativer Stress und Morbus Parkinson.....	2
1.2. Telomerase und hTERT.....	4
1.3. In-vitro-Methoden zur Evaluierung von Nanopartikeln	5
1.3.1. Nanopartikel zur Morbus Parkinson-Therapie.....	5
1.3.2. Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	6
1.3.3. Aufnahme in einem neuronalen Parkinson-Modell.....	9
1.4. Zielsetzung	11
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Material.....	13
2.2. Methoden.....	30
2.2.1. Zellkultur.....	30
2.2.2. Permeabilitätsstudien	35
2.2.3. Immunfluoreszenzfärbung	35
2.2.4. Isolierung von RNA.....	36
2.2.5. Reverse Transkription und qPCR	37
2.2.6. Arbeit mit Bakterien und Viren	38
2.2.7. Western Blot.....	40
2.2.8. Bestimmung der Telomeraseaktivität.....	41
2.2.9. Bestimmung des oxidativen Stresses	44
2.2.10. Nanopartikelproduktion.....	45

2.2.11. Dopaminquantifizierung durch HPLC-MS	47
2.2.12. Durchflusszytometrie	48
2.2.13. Zytotoxizitätsuntersuchung	49
2.2.14. Statistische Auswertung	50
3. Ergebnisse	51
3.1. Etablierung erforderlicher Modellsysteme	51
3.1.1. Humanes In-vitro-Blut-Hirn-Schranken-Modell.....	51
3.1.2. Neuronales Parkinson-Modell.....	65
3.2. Parkinson-Behandlung durch intrazelluläre Proteinexpression.....	71
3.3. Nanopartikelherstellung	76
3.3.1. Charakterisierung	77
3.3.2. Bindung an Zielzellen und Zytotoxizität.....	78
3.4. Nanopartikeltransport in Modellsystemen.....	83
3.4.1. Blut-Hirn-Schranke	83
3.4.2. Parkinson-Modell.....	86
4. Diskussion.....	88
4.1. Modell-Systeme	88
4.2. Einfluss von hTERT auf Morbus Parkinson	90
4.3. Nanopartikeltherapie bei Morbus Parkinson.....	92
4.4. Fazit und Ausblick.....	94
5. Literaturverzeichnis	96
6. Anhang.....	111
6.1. Publikationen	111
6.2. Danksagung.....	113
6.3. Lebenslauf	114

Zusammenfassung

Während die Ursachen für die Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen vielfältig und zum Teil noch unbekannt sind, ist der größte Risikofaktor für deren Ausbildung das Alter. In einer alternden Gesellschaft werden entsprechende Erkrankungen daher immer verstärkter auftreten. Nach Morbus Alzheimer ist Morbus Parkinson die zweithäufigste, neurodegenerative Erkrankung, die bereits nachweislich eine stetig steigende Inzidenz aufweist. Bei der Entwicklung entsprechender Therapien bildet die zu meisternde Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, die als hochselektive Barriere zwischen Blutkreislauf und Gehirn fungiert, jedoch ein erhebliches Hindernis. Ein vielversprechender Ansatz zur Überwindung dieser Hürde ist der Einsatz biologisch abbaubarer Nanopartikel als Transportvehikel für therapeutische Substanzen. Nanopartikel ermöglichen die Integration von verschiedensten Substanzen in ihre Struktur, die ohne dies nicht in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Dadurch eröffnet sich eine Vielzahl neuer Optionen in der Entwicklung und Evaluierung effektiver Pharmazeutika.

Diese Arbeit beleuchtete verschiedene Herangehensweisen an die Weiterentwicklung von Morbus Parkinson-Therapien. Hierfür wurden zum einen reproduzierbare In-vitro-Modelle humanen Ursprungs etabliert, um bei der Bewertung von pharmazeutischen Nanopartikeln oder neuen Therapieansätzen zuverlässige Aussagen treffen zu können. Eine Möglichkeit, den dopaminergen Neuronen Dopamin direkt zur Verfügung zu stellen, ist ein wichtiger Schritt, mit der die Schwierigkeiten der Standard-Therapie von Morbus Parkinson mit L-DOPA möglicherweise überwunden werden können. In der Nanopartikelentwicklung wurden Partikel daher mit Dopamin beladen, welches ohne entsprechende Intervention die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann.

Mit hTERT wurde ein neuer, möglicher Angriffspunkt für eine Behandlung von Morbus Parkinson untersucht und der Effekt einer vermehrten Expression auf die intrazellulären Level von oxidativem Stress betrachtet. Über eine Erhöhung der hTERT-Expression war es im In-vitro-Modell möglich, die oxidative Stressreaktion als einen Baustein beim Fortschreiten von Morbus Parkinson abzuschwächen. Damit konnte hTERT als mögliches Ziel neuer pharmazeutischer Behandlungen bestätigt werden. Des Weiteren wurde erfolgreich Dopamin nach Inkorporation in Nanopartikel in In-vitro-Modellen über die Blut-Hirn-Schranke transportiert und die Nanopartikel von dopaminergen Neuronen aufgenommen. So wurden auch Nanopartikel als Transportvehikel für therapeutisch wirksame Substanzen wie Dopamin bei neurodegenerativen Erkrankungen als zu beachtende Alternative belegt.

Summary

Nanoparticles as therapeutic concept for neurodegenerative diseases – Parkinson's disease

While the causes of the development of neurodegenerative diseases are numerous and in part unknown, the most important risk factor for their development is ageing. In an ever-ageing society the incidence of these diseases will therefore increase steadily. Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease and its incidence is known to increase continuously. One of the biggest obstacles to be overcome for the development of new therapies is the blood-brain barrier, a highly selective barrier between the blood circulation and the brain. A promising option to overcome this challenge is the use of biologically degradable nanoparticles as transport vehicle for therapeutic substances. Any number of different substances, that would usually be incapable of traversing the blood-brain barrier, can be incorporated into nanoparticles. This opens up a wide range of new options in the development and evaluation of effective pharmaceuticals.

This study investigated different aspects of furthering new Parkinson's disease therapies. First, reproducible *in vitro* models from human cell sources were established to be able to make accurate predictions in the evaluation of pharmaceutical nanoparticles or new therapeutic approaches. Providing an option for delivering dopamine directly to the dopaminergic neurons is an important step towards overcoming the challenges of L-DOPA as the standard therapy for Parkinson's disease. Therefore, concerning the development of nanoparticles, a particle system encapsulating dopamine was established, which in its natural form cannot cross the blood-brain barrier.

hTERT was analyzed as a new potential pharmacological option for the therapy of Parkinson's disease and the effect of an increased expression on the intracellular levels of oxidative stress studied. It could be shown that an increase in the hTERT expression in an *in vitro* model was capable of ameliorating the oxidative stress reaction, which is a component in the progression of Parkinson's disease. This way hTERT was confirmed as potential new target for a pharmaceutical treatment. Additionally, dopamine was successfully incorporated in nanoparticles and transported across an *in vitro* model of the blood-brain barrier and the nanoparticles were taken up by dopaminergic neurons. Thus, nanoparticles were proven to be an alternative worth considering as transport vehicles for therapeutically active compounds, like dopamine, against neurodegenerative diseases.

Abkürzungsverzeichnis

BCEC	Gehirnkapillarendothelzellen, „brain capillary endothelial cells“
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BSA	bovines Serumalbumin
D2S	Dopamin-Autorezeptor
DAT	Dopamin-Transporter
DCFDA	2',7'-Dichlorofluoreszeindiacetat
FACS	Durchflusszytometrie, „fluorescence activated cell sorting“
FKS	fötale Kälberserum
heSFM	humanes endotheliales Serum-freies Medium
HFBA	Heptafluorobuttersäure, „heptfluorobutyric acid“
hiPS	humane induzierte pluripotente Stammzellen
hiPS-BCEC	aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte Gehirnkapillarendothelzellen
hTERT	humane Telomerase-Reverse-Transkriptase-Proteinuntereinheit
LRP-1	„low density lipoprotein receptor-related protein-1“
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NCS	Serum von neugeborenen Kälbern, „Newborn Calf Serum“
pBCEC	porzine Gehirnkapillarendothelzellen
PDS	Humanserum, hergestellt aus Thrombozyten-armem humanen Plasma
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PLO	Poly-L-ornithin
qRT-PCR	quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RA	Retinsäure, „retinoic acid“
SDS	Natriumlaurylsulfat, „sodium dodecyl sulfate“
TBHP	tert-Butylhydroperoxid
TEER	transendothelialer elektrischer Widerstand
TH	Tyrosinhydroxylase
ü.N.	über Nacht

1. Einleitung

1.1. Morbus Parkinson

Morbus Parkinson ist eine neurodegenerative Erkrankung, die zum ersten Mal im Jahr 1817 von James Parkinson beschrieben [1] und letztlich nach diesem benannt wurde. Nach Morbus Alzheimer handelt es sich bei ihr um die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung [2] mit einer weltweiten Inzidenz von 0,5 bis 1 % [3]. Die Erkrankung ist durch drei motorische Hauptsymptome charakterisiert: Bradykinese, Rigor und Tremor. Die Ursache dieser Symptome liegt im Verlust dopaminerger Neuronen in der Substantia nigra des Gehirns. Diese Neurone sind für die Produktion des Neurotransmitters Dopamin, sowie für die Steuerung der Dopaminfreisetzung und Wiederaufnahme verantwortlich. Sie lenken damit motorische Prozesse [4]. Durch den Verlust der dopaminergen Neurone kommt es zu einem Ungleichgewicht der Neurotransmitter, welches vom Körper für eine gewisse Zeit durch eine Hochregulation der beiden anderen Neurotransmitter Glutamat und Acetylcholin kompensiert werden kann [5]. Zum Zeitpunkt des Auftretens der motorischen Symptome sind bereits bis zu 60 % der dopaminergen Neurone verloren [6]. Neben den zuvor beschriebenen motorischen Symptomen treten auch nicht-motorische Symptome auf [7], die jedoch für eine Diagnosestellung nicht entscheidend sind [8, 9].

Die Ursache von Morbus Parkinson ist bei der überwiegenden Anzahl der Fälle unbekannt, die Erkrankung wird in diesen Fällen als sporadischer Morbus Parkinson bezeichnet. Eine genetische Ursache kann bisher nur in 10 – 25 % aller Fälle identifiziert werden [4, 10]. Umweltfaktoren werden als potenzielle Auslöser diskutiert [11], ebenso hormonelle Störungen, die bei morphologischen Analysen gefundenen Proteinaggregate selbst sowie oxidativer Stress [4]. Der wichtigste bekannte Risikofaktor für das Auftreten der Erkrankung ist jedoch das Altern [12, 13].

Neben dem Verlust der dopaminergen Neuronen kommt es bei Morbus Parkinson auch zur Ablagerung unlöslicher Proteinaggregate im Gehirn [14], begleitet von neuronalen Entzündungsprozessen [15] und dem Auslösen von oxidativem Stress [16]. Diese Kaskade kann wiederum im Zellinneren von Neuronen wie auch anderen Zellen die zelleigenen Alterungsprozesse beschleunigen [17].

1.1.1. Medikamentöse Therapie von Morbus Parkinson

Morbus Parkinson wird in erster Linie durch den pharmazeutischen Ersatz von Dopamin in Form einer medikamentösen Therapie mit der Dopamin-Vorstufe L-DOPA behandelt [18]. Weiterhin werden Antagonisten für die beiden übersteuerten Neurotransmitter Glutamat und

Acetylcholin eingesetzt. Auch Dopamin-Agonisten zur Verstärkung der Wirkung des vorhandenen Dopamins bilden eine Behandlungsmöglichkeit. Die Schwierigkeit bei der medikamentösen Behandlung liegt zum einen darin, dass die Ursachen der Erkrankung nach derzeitigem Kenntnisstand nicht bekämpft werden können und damit das Fortschreiten der Erkrankung nicht gestoppt werden kann. Zum anderen wird beobachtet, dass mit zunehmender Behandlungsdauer das Risiko eines Wirksamkeitsverlusts steigt [19]. Außerdem stellt die Blut-Hirn-Schranke, die von den Kapillarendothelzellen im Bereich des Gehirns zwischen Blutkreislauf und Gehirn gebildet wird, eine bedeutende Barriere da. Sie verhindert den Transport von fast 100 % aller makromolekularen Substanzen und auch etwa 98 % der molekular kleinen pharmazeutischen Wirkstoffe ins Gehirn [20, 21]. Wenn orale Verabreichungsformen nicht mehr ausreichend sind, müssen alternative Wege der Medikamentendarreichung in Betracht gezogen werden, um die Effektivität der medikamentösen Behandlung erhöhen zu können.

1.1.2. Alternative Behandlungsstrategien

Schwierigkeiten bei der medikamentösen Parkinson-Therapie werden häufig durch die Nutzung alternativer Transportstrategien für bereits bekannte Wirkstoffe zu überwinden versucht. In diesem Zusammenhang sind Nanopartikel vermehrt in den Fokus der Forschung getreten. Die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen ist ein ideales Einsatzgebiet für Nanopartikel, da durch spezifische Nanopartikelsysteme Wirkstoffe in Teile des Körpers transportiert werden können, die für sie ohne eine solche Modifikation nicht erreichbar sind. Verschiedene Optionen wurden bereits entwickelt [22, 23]. Bei der Behandlung von Morbus Parkinson sind dabei die Hauptstrategien die Verbesserung der Effizienz der L-DOPA-Therapie [24] sowie der Transport von Dopamin zu den dopaminergen Neuronen in nanopartikulärer Form [25–27]. Auch der Transport anderer pharmazeutischer Wirkstoffe, Wachstumsfaktoren oder sogar Gentherapie-Ansätze werden mit Hilfe von Nanopartikeln verfolgt [28].

1.1.3. Oxidativer Stress und Morbus Parkinson

Zur Ursache von Morbus Parkinson gibt es zwei Theorien. Einige Forscher gehen davon aus, dass neuronale Entzündungsprozesse in den dopaminergen Neuronen eine Kaskade auslösen, die zur zellulären Apoptose und der Entstehung von Proteinaggregaten führt. Diese Aggregate wiederum lösen erneute Entzündungsprozesse in benachbarten Zellen aus und sorgen so für das Fortschreiten der Erkrankung [3, 17]. Eine andere Theorie geht davon aus, dass Proteinaggregate durch inkorrekte Faltung der Proteine oder bakterielle Prozesse im Bereich des Verdauungstraktes entstehen [29]. Von dort bewegen sie sich über einen

Zeitraum von mehreren Jahren hinweg entlang der Nervenstränge, vor allem des Vagus-Nervs, bis hinauf ins Gehirn, um dort über eine Kaskade von oxidativen Stressreaktionen Entzündungsprozesse auszulösen, die wiederum zum Tod der dopaminergen Neurone führen [29, 30]. Unabhängig davon, welche dieser Theorien der Realität entspricht, sind oxidativer Stress und neuronale Entzündungsprozesse ein essentieller Bestandteil der Entstehung und des Fortschreitens von Morbus Parkinson [16, 31, 32]. Abb. 1 zeigt eine vereinfachte Übersicht der zellulären Prozesse, die an dem Entzündungsgeschehen beteiligt sind.

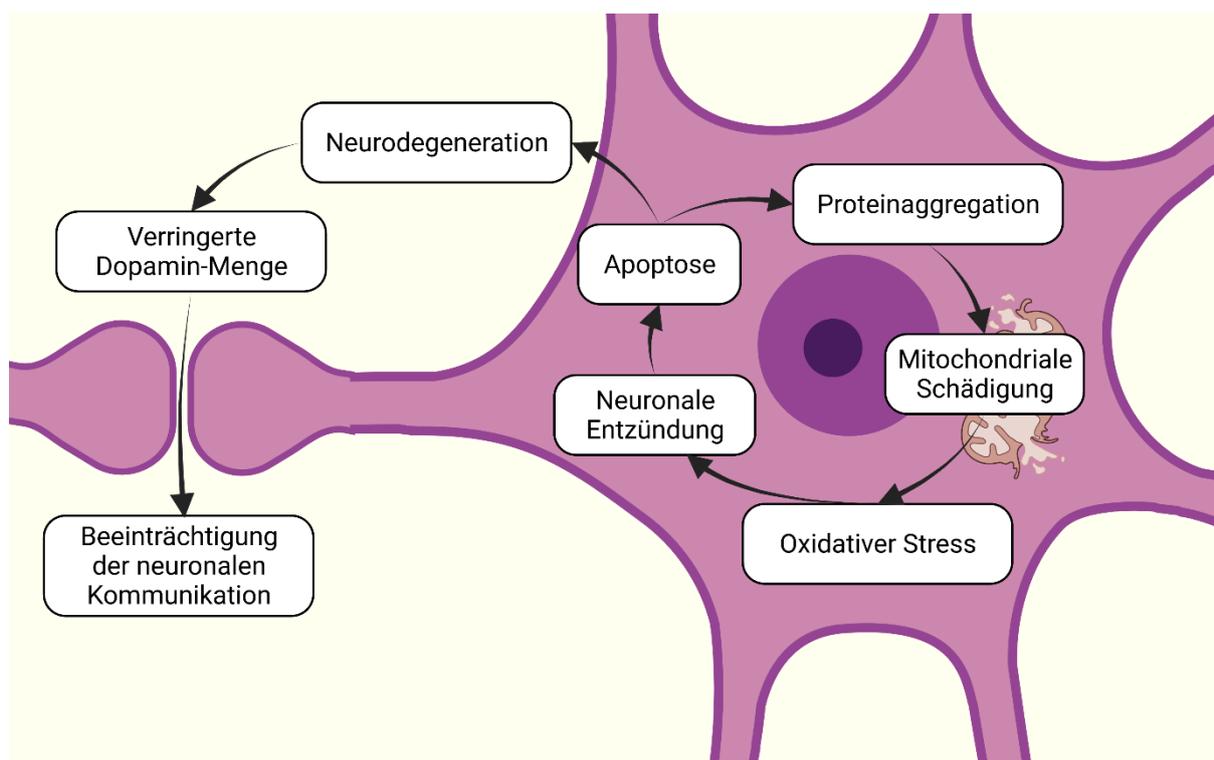


Abbildung 1. Kreislauf der Neurodegeneration bei dopaminergen Neuronen. Innerhalb eines dopaminergen Neurons findet ein Kreislauf aus Proteinaggregation, mitochondrialer Schädigung, Entstehung von oxidativem Stress, neuronaler Entzündungsreaktion und Apoptose statt. Dieser Kreislauf sorgt von der Apoptose ausgehend für die Neurodegeneration des betroffenen Neurons, dadurch für eine Verringerung der Dopamin-Menge im synaptischen Spalt und in der Konsequenz für eine Beeinträchtigung der neuronalen Kommunikation. Erstellt mit biorender.com.

Ausgehend von der Proteinaggregation, die in beiden Theorien eine zentrale Rolle spielt, ist der Kreislauf wie folgt aufgebaut. Extrazelluläre Proteinaggregate werden von neuronalen Zellen aufgenommen. Durch diese Aggregate wird ein Ungleichgewicht in den intrazellulären Transkriptions- und Translationsprozessen ausgelöst, die auch einen Einfluss auf die Mitochondrien der Zelle haben. Die korrekte Funktion der Mitochondrien beruht auf einer fein balancierten Elektronenübertragungskaskade, die für die zelluläre Atmung unerlässlich ist. Ein Ungleichgewicht in diesem Bereich führt zu Schädigungen der Mitochondrien selbst. Wenn die Integrität der Mitochondrien abnimmt, werden freie Radikale ins Zellinnere abgegeben, die normalerweise im Rahmen der Atmungskette gebildet und wieder abgebaut werden. Diese

freien Radikale lösen oxidativen Stress in der Zelle aus. Dabei reagieren die freien Radikale mit allen Substanzen, die sie erreichen, unabhängig davon, ob es sich um kleine Moleküle, Makromoleküle oder DNA handelt. Dadurch werden zelluläre Signalkaskaden hochgefahren, die als Entzündungsprozesse charakterisiert werden können. Diese neuronale Entzündungsreaktion versucht, das zelluläre Gleichgewicht wiederherzustellen. Gelingt dies, ist der Kreislauf unterbrochen. Sind aber zu viele freie Radikale vorhanden, können die körpereigenen Mechanismen sie nicht kompensieren und die Entzündungskaskade löst zelluläre Apoptose aus. Im Rahmen der Apoptose entstehen erneut Proteinaggregate und bereits existierende Aggregate werden erneut freigesetzt. Die Apoptose der neuronalen Zellen, wenn es in mehreren benachbarten Zellen passiert, führt zu Neurodegeneration. Ist dieser Prozess in den dopaminergen Neuronen lokalisiert, wird durch die Neurodegeneration auch das Gleichgewicht von Abgabe und Wiederaufnahme von Dopamin aus diesen Zellen gestört. Die Neurotransmitter-basierte Kommunikation mit benachbarten Neuronen wird beeinträchtigt und damit auch die Signalübertragung. Dieser Prozess ist es, der schließlich motorische und auch nicht-motorische Symptome auslöst [17].

Will man Morbus Parkinson erfolgreich behandeln, muss in diese Signalkaskade eingegriffen und, wenn möglich, der Kreislauf unterbrochen werden. Ein vielversprechender Angriffspunkt dafür ist der intrazelluläre oxidative Stress. Schafft man es, die oxidative Stressreaktion so weit abzuschwächen, dass die zelleigenen Reparaturprozesse sie ausbalancieren können, wird die zelluläre Apoptose und damit auch die fortschreitende Neurodegeneration verhindert. Zu diesem Zweck werden Wirkstoffe und Proteine erforscht, die oxidativen Stress im Zellinneren bekämpfen können. Ein solches Protein ist hTERT.

1.2. Telomerase und hTERT

Die Telomerase ist ein intrazelluläres Enzym, das aus der Proteinuntereinheit hTERT und der RNA-Untereinheit TERC besteht. Die enzymatische Funktion der Telomerase ist es, die Enden der Telomere an den Enden der Chromosomen zu verlängern, um DNA-Schäden zu verhindern. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass die Telomerase unabhängig von ihrer enzymatischen Funktion auch in der Lage ist, Apoptose zu verhindern und die Lebensdauer von Zellen zu verlängern [33].

Die Telomeraseaktivität in gesunden Zellen ist herunterreguliert, eine hohe Telomeraseaktivität dagegen findet sich in Krebszellen [34–37]. Unterscheidet man aber zwischen Telomerase und der Proteinuntereinheit hTERT, wird deutlich, dass ohne die enzymatische Aktivität andere zelluläre Prozesse beeinflusst werden. Bereits 2005 zeigten Huang et al. [38], dass hTERT in der Lage ist die von oxidativem Stress ausgelösten Schäden auszugleichen. Dabei ist es nicht entscheidend, ob der Stress von Zellorganellen wie

Lysosomen [39] oder Mitochondrien [40] ausgelöst wird oder ob es sich um unspezifische Prozesse handelt, die über die durch oxidativen Stress ausgelöste Signalkaskade Apoptose verursachen [38, 41]. Man kann die zellulären Prozesse auch so betrachten, dass hTERT bestimmte Zellorganellen, wie die besonders angreifbaren Mitochondrien, vor Schädigungen durch oxidativen Stress bewahrt [42]. Dabei ist zu beachten, dass diese Funktion nachweisbar auch besteht, wenn die Zellen keinerlei Telomerase-Aktivität zeigen und damit das Enzym inaktiv ist [43]. Damit ist hTERT ein ideales Ziel im Hinblick auf sein Potenzial zur Behandlung von Morbus Parkinson. Eine Herausforderung dabei ist allerdings, dass Substanzen zur Hochregulation von hTERT bisher nicht im Mittelpunkt der Forschung standen. Durch die Prävalenz von Telomerase in Krebsfällen wurden Inhibitoren erforscht und untersucht [35, 44]. Durch die verstärkte Forschung an Stammzellen und die damit verbundene Bestrebung, Zellen unbegrenzt in Kultur zu halten, nimmt die Bedeutung der Telomerase-Aktivierung, ohne Krebs auszulösen, wieder zu [45]. Es ist daher anzunehmen, dass neue pharmakologische Substanzen zur Hochregulierung von Telomerase oder auch nur hTERT in den nächsten Jahren vorgestellt werden.

Um dennoch den Effekt von hTERT auf die Entwicklung von Morbus Parkinson zu untersuchen, gibt es im Zellkulturbereich die Möglichkeit, eine permanente Hochregulation durch Transfektion zu erreichen. Dadurch können Zellen für relevante Modelle entwickelt werden, um die Theorie entweder zu widerlegen oder zu untermauern, bevor man tiefer in die pharmakologische Forschung und Analyse eintaucht.

1.3. In-vitro-Methoden zur Evaluierung von Nanopartikeln

Präklinische Studien sind der erste Schritt zu jeder Art von pharmazeutischer Wirkstoff-evaluierung und –zulassung. Um zuverlässige Aussagen treffen zu können, ist es dabei von entscheidender Bedeutung, relevante Modelle für die Evaluierung von Wirkstoffkandidaten zu nutzen [46, 47]. Dies gilt auch für die Evaluierung von Nanopartikeln als Transportsystem für pharmazeutische Wirkstoffe.

1.3.1. Nanopartikel zur Morbus Parkinson-Therapie

Nanopartikel für die Behandlung von Morbus Parkinson und anderen neurodegenerativen Erkrankungen werden bereits untersucht [28]. Die medikamentöse Therapie von Morbus Parkinson beruht, wie bereits beschrieben, vorrangig auf dem Ersatz von Dopamin zur Symptombehandlung. Da Dopamin selbst nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und in das Gehirngewebe einzudringen, liegt eine Verkapselung in Nanopartikel nahe. Auf diese Art kann die Barriere überwunden und Dopamin ohne Vorstufen oder die

Notwendigkeit weiterer Metabolisierung vom Körper genutzt werden. Zudem ist es im verkapselten Zustand von Zellen und Organsystemen im Körper abgeschirmt. Dies ist wichtig, da systemisch erhöhte Dopamin-Konzentrationen zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Übelkeit und Blutdruckschwankungen führen können [48].

Für die nanopartikuläre Verkapselung von Dopamin sind bereits verschiedene Protokolle publiziert worden [25, 26, 49] und in einem Fall wurden die entstanden Nanopartikel in einem In-vivo-Mausmodell beurteilt [26]. Die Ergebnisse eines Mausmodells lassen sich jedoch nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen. Durch den Spezies-Unterschied hat das Mausmodell nur eine begrenzte Vorhersagekraft im Hinblick auf den Effekt im Menschen. Vom pharmakologischen Standpunkt sollte einem Einsatz in einem In-vivo-Modell stets eine präklinische Untersuchung in In-vitro-Modellen vorausgehen. Auf diese Weise können unnötige Tierexperimente vermieden werden, falls die In-vitro-Ergebnisse nicht den angestrebten Effekt nachweisen können. Es muss gleichzeitig aber gewährleistet sein, dass die Ergebnisse aus den genutzten In-vitro-Modellen so gut wie irgend möglich auf den Menschen übertragbar sind.

1.3.2. Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke ist auch im Zusammenhang mit der Nanopartikel-Entwicklung eine viel diskutierte Barriere [50]. Um die Herausforderungen im Hinblick auf Nanopartikel-Transport zu verstehen, muss zunächst ein umfassendes Bild der Barriere selbst gebildet werden.

Die Blut-Hirn-Schranke stellt in der pharmazeutischen Forschung eine große Herausforderung dar, da nur sehr wenige Stoffe in der Lage sind, sie direkt zu überqueren [21, 51]. Die eigentliche Barriere wird von den Gehirnkapillarendothelzellen (BCEC, „brain capillary endothelial cells“) gebildet, die durch intrazelluläre, sogenannte *tight junction*-Proteine so dicht miteinander verbunden werden, dass selbst der Transport von Ionen wie Na^+ und Cl^- eingeschränkt ist [52, 53]. Im Umfeld der Endothelzellen sind noch weitere Zellen angelagert, die über interzelluläre Kommunikationsprozesse zur Barrierefunktion beitragen. Dazu gehören Perizyten [54], Astrozytenendfüße [55, 56] und Mikroglia [57]. Die Zell-Zell-Verbindungen zwischen den Kapillarendothelzellen sind aus einem komplexen System von intrazellulären und Transmembran-Proteinen aufgebaut, die durch ihre gegenseitige Verankerung als *adherens junctions* und *tight junctions* eine physikalische Barriere bilden (Abb. 2) [58, 59].

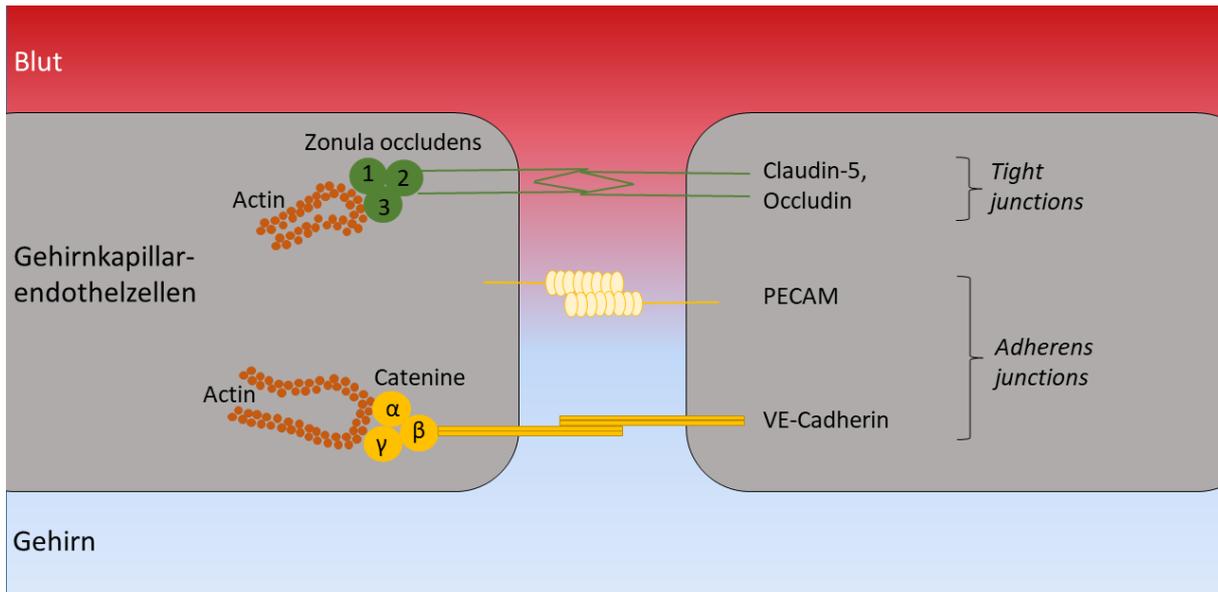


Abbildung 2. Proteininteraktionen zwischen Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Die *tight junctions* werden von den intrazellulären Proteinen Claudin-5 und Occludin gebildet, die im Zellinnern über Zonula occludens-Proteine mit dem zellulären Actin-Skelett verankert sind. Die *adherens junctions* dagegen werden interzellulär durch PECAM und VE-Cadherin gebildet und intrazellulär über verschiedene Catenine mit dem Actin-Skelett verbunden. Angelehnt an [58].

Dieser restriktive Aufbau der Blut-Hirn-Schranke erfordert die Bereitstellung spezifischer Transportmechanismen zu ihrer Überwindung. Über die Blut-Hirn-Schranke werden sämtliche notwendigen Nährstoffe zu den neuronalen Zellen im Gehirn transportiert und auf dem umgekehrten Weg Metabolite entfernt. Dabei kann der Transport sowohl mit als auch entgegen dem Konzentrationsgradienten erfolgen [60, 61].

Basierend auf dem Nährstoffbedarf der Zellen gibt es spezifische Transporter für Aminosäuren, Glukose, Lipoproteine und andere essentielle Proteine und Peptide [62], die den Übertritt dieser Stoffe vermitteln. Manche Substanzen und auch Pharmazeutika sind aufgrund ihrer chemischen Beschaffenheit in der Lage, die den Kapillaren zugewandte Zellmembran der Endothelzellen ohne spezialisierte Transportmechanismen zu überwinden. Sie werden durch spezialisierte Effluxtransporter wie P-glycoprotein (P-gp) wieder auf der gleichen Seite aus der Zelle entfernt [61, 63] oder durch die hohe intrazelluläre Konzentration von metabolischen Enzymen wie Cytochrom P, Monoaminoxidasen und Phosphatasen abgebaut, bevor sie das Gehirn erreichen können [64].

Um Nanopartikel über diese Barriere zu transportieren, gibt es demnach nur eine begrenzte Anzahl an Möglichkeiten, die in Abb. 3 gezeigt sind. Neben der Transzytose handelt es sich dabei um einen Transport vermittelt durch Rezeptoren oder Transportproteine.

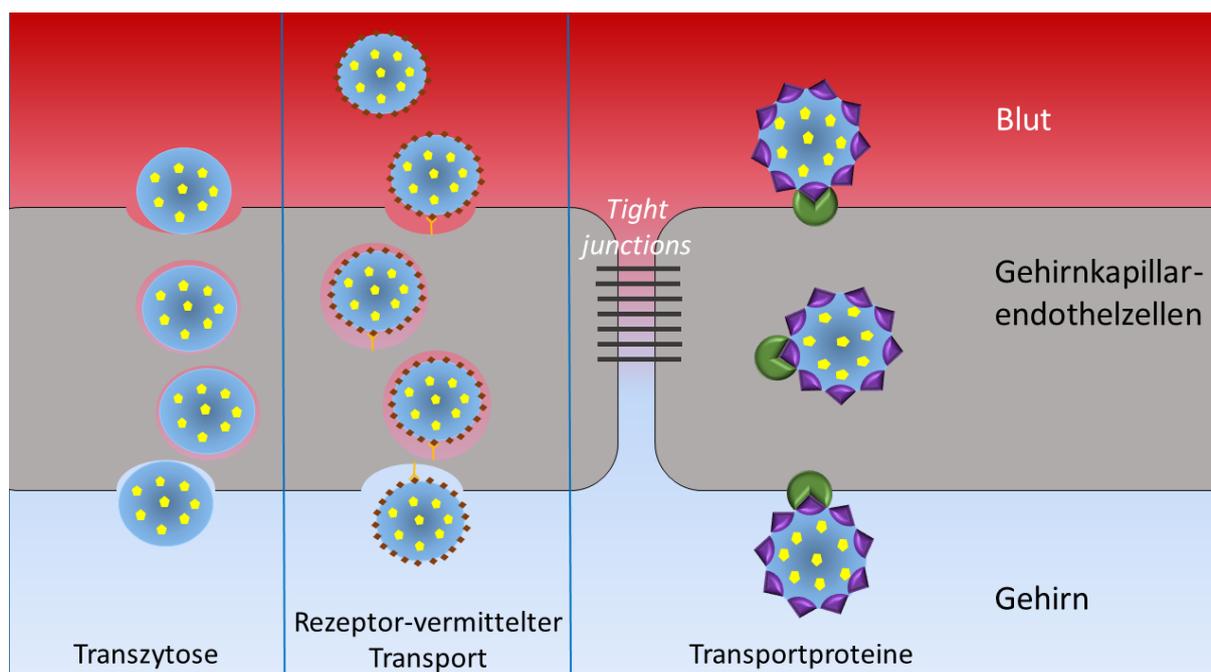


Abbildung 3. Nanopartikel-Transport über die Blut-Hirn-Schranke. Durch die dichten Zell-Zell-Kontakte vermittelt von *tight junctions* können Nanopartikel die Barriere nur auf drei Arten überwinden: Durch Transzytose, Rezeptor-vermittelten Transport oder mit Hilfe von an der Blut-Hirn-Schranke exprimierten Transportproteinen.

Der nanopartikeläre Transport ist demnach direkt von den Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke im Hinblick auf Rezeptorstatus und Expression von Transportproteinen abhängig. Daher ist auch die Wahl des Blut-Hirn-Schranken-Modells für die In-vitro-Studien von essentieller Bedeutung [65]. Lange Zeit wurden Modelle basierend auf Primärzellen tierischen Ursprungs [66–69] für Transportstudien von pharmakologischen Wirkstoffen eingesetzt. Dagegen wurden immortalisierte Zelllinien für Fragestellungen genutzt, bei denen die Barriere eine untergeordnete Rolle spielte [70, 71].

Seit der Veröffentlichung des ersten Protokolls zur Generierung von BCECs aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS) durch Lippmann et al. 2012 [72] wurden Protokollverbesserungen und Abwandlungen dieses Protokolls von einer großen Anzahl verschiedener Arbeitsgruppen veröffentlicht [73–80] und analysiert. Dabei werden die BCECs auf porösen Membranen kultiviert, wie es auch bei den Modellen tierischen Ursprungs der Standard war, um beide Seiten der Barriere darstellen zu können. Im Allgemeinen wird die apikale Seite als „Blutseite“ und die basolaterale, untere Seite als „Hirnseite“ angenommen und interpretiert [65]. Die Beurteilung der Barriereigenschaften erfolgt basierend auf der Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER), der Permeabilität gegenüber Markersubstanzen mit bekanntem Transportverhalten und der Expression von *tight junction* und Transporter-Proteinen [81]. Dabei können die Endothelzellen nicht nur allein eingesetzt werden, sondern auch mit anderen Zellen der neurovaskulären Einheit co-kultiviert werden [77, 82].

Die Eigenschaften der Modelle müssen genau untersucht und mit In-vivo-Modellen ins Verhältnis gesetzt werden, um eine Aussage zur Vorhersagekraft des Modells machen zu können. Eine Studie zum vergleichenden Permeabilitätsverhalten eines Primärzell- und eines hiPS-basierten Barriere-Modells wurde von Di Marco et al. [83] veröffentlicht, wobei in beiden Modellen Co-Kulturen mit Astrozyten eingesetzt wurden. Eine andere Studie verglich die Permeabilität eines hiPS-BCEC-Modells co-kultiviert mit Gliazellen von Ratten mit In-vivo-Daten [84]. Allerdings ist in diesem Zusammenhang die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, basierend auf der Verwendung von Co-Kultur-Zellen nicht humanen Ursprungs, kritisch zu diskutieren. Eine Eigenschaft der Blut-Hirn-Schranke wird jedoch in keinem der bisher genannten Modellsysteme nachgestellt, geschweige denn ausgenutzt: der hochgradig selektive Transport von Bestandteilen des Serum-Proteoms. Während bei der Kultivierung von Primärzellmodellen meist in der Kultivierung auf den Membraneinsätzen vollständig auf Serum verzichtet wird [67], ist in den hiPS-differenzierten Modellen Serum auf beiden Seiten des Zellverbandes auf den Membranen eingesetzt [74]. Eine Untersuchung, inwieweit ein einseitiger Serumeinsatz in einem derartigen Barrieremodell möglich ist, stand bisher aus. Die Etablierung eines „gesunden“ Modells kann dabei einfach durch die Nutzung von Stammzellen eines gesunden Spenders erreicht werden. Um ein möglichst universelles Morbus Parkinson-Modell zu etablieren, muss jedoch die hiPS-Linie eines erkrankten Spenders sorgfältig ausgewählt werden.

1.3.3. Aufnahme in einem neuronalen Parkinson-Modell

Der Aufbau eines neuronalen Modells von Morbus Parkinson für nanopartikuläre Studien auf der einen Seite und für die Evaluierung des Effekts von hTERT auf der anderen Seite verlangt nach einem relativ einfach aufzubauenden Modell ohne lange Differenzierungszeiten. Es sind Protokolle publiziert, um dopaminerge Neurone aus hiPS zu differenzieren [85, 86], sie sind allerdings zeit- und kostenaufwändig. Eine einfache Alternative bieten die LUHMES-Zellen [87], für die eine schnelle, zuverlässige Differenzierungsstrategie hin zu ausdifferenzierten dopaminergen Neuronen bekannt ist [88]. Die so erhaltenen Zellen exprimieren alle wichtigen Komponenten beteiligt am Dopamin-Kreislauf der Zellen: das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH) zur Dopaminherstellung aus L-Tyrosin, den Dopamintransporter (DAT) zur Wiederaufnahme von Dopamin aus dem synaptischen Spalt und den Dopaminautorezeptor (D2S) beteiligt an der Steuerung der Neurotransmission auf Dopamin-Basis [89].

Um einen Parkinson-Phänotyp in den differenzierten LUHMES-Zellen zu induzieren, bietet sich der Einsatz bestimmter Toxine an [90]. Nachdem im Jahr 1983 eine Reihe von Patienten Parkinson-artige Symptome als Reaktion auf die Exposition zu MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) entwickelten [91], wurde diese Substanz sowie ihr Metabolit MPP+

(1-Methyl-4-phenylpyridinium) auch in der Zellkultur zur Induktion eines Parkinson-Phänotyps eingesetzt [92]. Der intrazelluläre Mechanismus ist in Abb. 4 dargestellt [93].

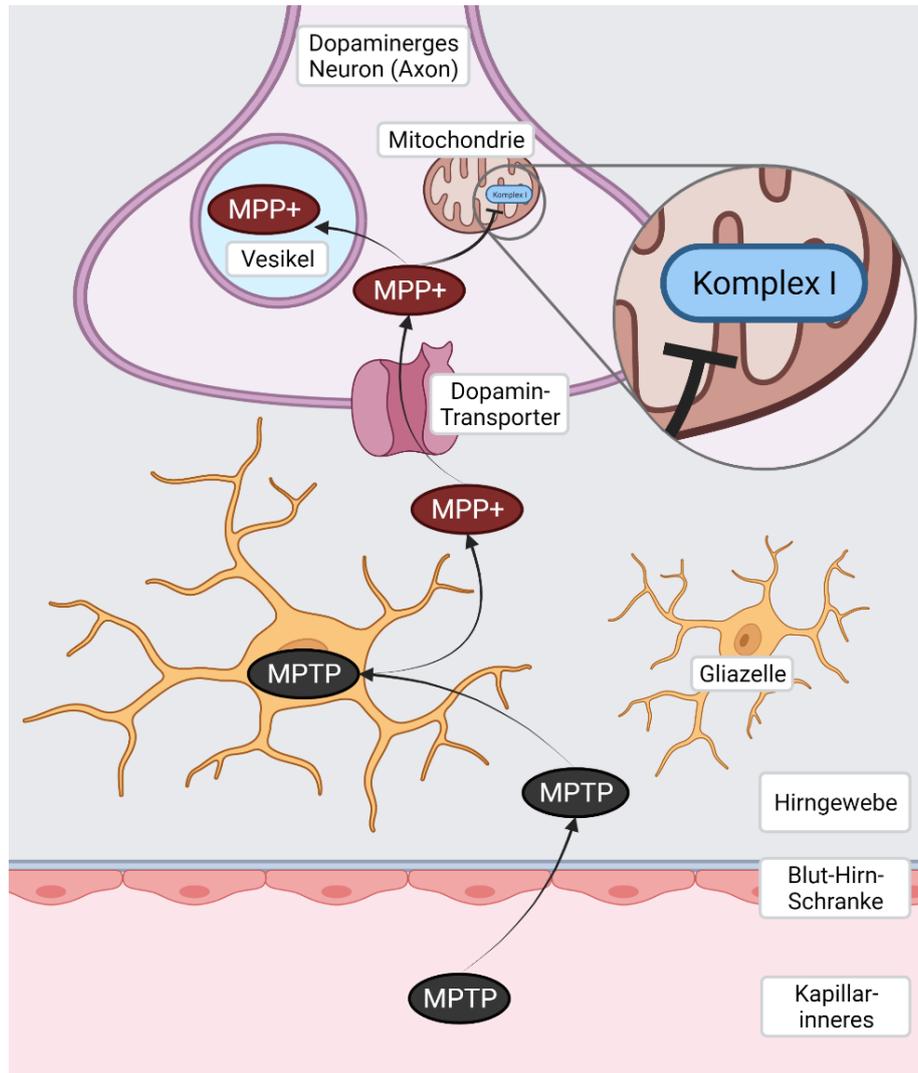


Abbildung 4. Wirkmechanismus von MPTP zur Modellierung von Morbus Parkinson. MPTP ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und wird von Gliazellen aufgenommen und zu MPP+ verstoffwechselt. MPP+ hat eine ausreichende strukturelle Ähnlichkeit mit Dopamin, um vom Dopamintransporter aufgenommen und in den intrazellulären Vesikeln der dopaminergen Neuronen gespeichert zu werden. Nach dem Eindringen in die dopaminergen Neuronen verursacht es durch seinen Radikal-Charakter oxidative Stressreaktion und hemmt den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Angelehnt an Vila und Przedborski, 2003 [93], erstellt mit biorender.com.

Durch den Einsatz von MPP+ in der Zellkultur kann so ein Parkinson-Modell aus dopaminergen Neuronen aufgebaut werden. Zudem ist es möglich, die LUHMES-Zellen vor Beginn der Differenzierung durch Transfektion so zu verändern, dass eine LUHMES-Linie hTERT überexprimiert. Damit ist das LUHMES-Modell eine ideale Plattform zur Beantwortung aller vorliegender Fragestellungen: Der Nanopartikel-Aufnahme in ein neuronales Modell von dopaminergen Neuronen und der Analyse des Effekts von hTERT auf den Parkinson-Phänotyp nach chemischer Induktion von Morbus Parkinson.

1.4. Zielsetzung

Mit der vorliegenden Arbeit soll die Behandlung von Morbus Parkinson durch systemisch verabreichte Medikation auf der Grundlage von Nanopartikeln in In-vitro-Modellen untersucht werden.

Um die Effektivität dieses Behandlungsansatzes beurteilen zu können, ist es notwendig, die relevanten Modellsysteme für diese Fragestellung zu etablieren. Das ist zum einen ein neuronales Modell für Morbus Parkinson und zum anderen ein Blut-Hirn-Schranken-Modell, da diese biologische Barriere bei systemischer Wirkstoffverabreichung überwunden werden muss, um jede Art von Neuronen zu erreichen.

Bei der Etablierung des Blut-Hirn-Schranken-Modells soll zuerst ein Primärmodell tierischen Ursprungs mit einem aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS) differenzierten Gehirnkapillarendothelzellmodell verglichen werden. Eine Untersuchung, inwieweit eine in-vivo-nahe Verteilung des Serums auf beiden Seiten der Barriere in der Lage ist, diese Modelle zu verbessern, wird im Rahmen der Modelletablierung ebenfalls angestrebt. Nach Etablierung eines Protokolls für in-vivo-nahe Blut-Hirn-Schranken-Modelle aus hiPS soll neben einem Modell basierend auf hiPS eines gesunden Spenders auch ein Modell aus Zellen eines Morbus Parkinson-Patienten aufgebaut werden. Wie zuvor beschrieben, ist die Ursache von Morbus Parkinson bei einem Großteil der Patienten unbekannt. Dementsprechend soll auch für die Modell-Etablierung eine hiPS-Linie eines Patienten mit sporadischem Morbus Parkinson gewählt werden.

Das neuronale Parkinson-Modell soll aus differenzierten dopaminergen Neuronen der Zelllinie LUHMES etabliert werden. Dabei sollen die Zellen in ihrer Ausgangsform als gesundes Modell dienen. Ein Morbus Parkinson-Krankheitsmodell soll entstehen, indem bei den LUHMES-Zellen der Parkinson-Typ chemisch durch MPP+ induziert wird.

Bei der Behandlung von Morbus Parkinson sollen zwei Ansätze verfolgt werden. Zum einen soll untersucht werden, inwieweit das körpereigene Protein hTERT in der Lage ist, intrazellulären oxidativen Stress und damit ein Fortschreiten intrazellulärer Entzündungsprozesse zu bekämpfen. Dazu soll die Expression des hTERT in den LUHMES-Zellen durch virale Transduktion erhöht werden, da eine Medikamenten-basierte hTERT-Regulation zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht möglich war.

Zum anderen sollen Nanopartikel hergestellt werden, die in der Lage sein sollen, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und von dopaminergen Neuronen aufgenommen zu werden. Diese Nanopartikel sollen dem Wirkstofftransport dienen. Dabei wird Dopamin als pharmakologischer Wirkstoff, der alleine nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, als Beispiel genutzt. Der Transport über die Blut-Hirn-Schranke und die

Aufnahme in dopaminerge Neurone soll mit Hilfe der etablierten In-vitro-Modellsysteme für gesunde Personen und Patienten mit vorliegendem Morbus Parkinson dargestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Tabelle 1. Chemikalien, Proteine und Enzyme

Chemikalien, Proteine und Enzyme	Lieferant (Artikelnummer)
¹⁴ C-Diazepam	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland (#ARC 1442)
2-Mercaptoethanol, 50 mM (Gibco™ #31350-010)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11528926)
2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#59300)
4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels	Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf, Deutschland (#456-1093)
Accutase® (Gibco™ StemPro® #A11105-01)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11599686)
Acetonitril Optima® LC/MS Grade	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#10489553)
Advanced DMEM/F12 (Gibco™ #12634-010)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11550446)
Bovine serum albumine (BSA), Fraction V	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#1.12018.0025)
CASY®ton	OLS OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
Chloroform, Uvasol® für die Spektroskopie (Merck)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#1.02447.0500)
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf, Deutschland (#1705060)
Collagen aus menschlicher Plazenta, Type IV	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#C5533-5MG)
Collagen Type I, Rat Tail (Corning®)	Corning BV, Amsterdam, Niederlande (#354236)
Collagenase II	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#C2-28)
cOmplete™ Proteasehemmer-Cocktail (Roche)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#11697498001)

DB-cAMP	Biolog Life Science Institute GmbH & Co. KG, Deutschland (#D009)
Dichlormethan, suitable für HPLC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#34856-1L-M)
Dispase (Corning® #354235)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#734-1312)
DMEM (Gibco™ #11960-044)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11500416)
DMEM (Gibco™ #41965-047)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#10063542)
DMEM (Gibco™ #41966-161)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11584556)
DMEM/F12 (Gibco™ #11039-021)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11580376)
DMEM/F12 (Gibco™ #31330-038)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11594426)
Dopamine hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#H8502-10G)
EDTA, 0,5 M, pH 8,0 (invitrogen™ Ambion® #AM9260G)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland (#AM9260G)
Ethanol (absolute for analysis)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#1.00983)
FACSClean™ (BD BioSciences)	BD GmbH, Heidelberg, Deutschland (#340345)
FACSFlow™ (BD BioSciences)	BD GmbH, Heidelberg, Deutschland (#342003)
FACSRinse™ (BD BioSciences)	BD GmbH, Heidelberg, Deutschland (#340346)
Fibronectin from human plasma, 0,1 % solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#F0895-2MG)
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#F7524-500ML)
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland (#E2311)
Gentamicin (Gibco™ #15710-049)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11500506)

GlutaMAX™ Supplement	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11574466)
Heptafluorobuttersäure (HFBA) LC/MS Grade	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#10108263)
heSFM (Human endothelial serum-free medium) (Gibco™ #11111-044)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11540386)
Humanserum, from platelet poor human plasma (PDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#P2918-100ML)
Hydrocortisone solution, 50 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#H6909-10ML)
ibidi Mounting Medium	ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland (#50001)
Inulin, Carboxyl-, [Carboxyl- ¹⁴ C]-	Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau, Deutschland (#NEC164A001MC)
KnockOut™ Serum Replacement (Gibco™ #10828-028)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11520366)
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (#968.1)
L-glutamine (Gibco™ #25030-024)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11500626)
Lumogen® F Red 305	BASF SE, Ludwigshafen, Deutschland (#LG305)
Lysis Buffer Reagent A100 für NucleoCounter® system	ChemoMetec A/S, Allerød, Dänemark (#910-0003)
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (#T145.2)
Matrigel® Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix, Phenol Red-free, LDEV-free (Corning® #356231)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11553620)
Medium 199 (Gibco™ #31150-022)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11544426)
MEM NEAA (Gibco™ #11140-035)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#12084947)
Midi-Vial, 8 ml für Flüssigszintillationszählung	Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau, Deutschland (#6000288)

MPP+ iodide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#D048)
mTeSR™1 Complete Kit	STEMCELL Technologies Germany GmbH, Köln, Deutschland (#85850)
N-2 Supplement (Gibco™ #17502-048)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11520536)
Natriumfluoreszein-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#F6377-100G)
Newborn Calf Serum (NCS, Gibco™ #16010-159)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11580506)
PBS, pH 7.2 (Gibco™ #20012-068)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11540546)
Penicillin-Streptomycin (Gibco™ #15140-122) (Pen/Strep)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11548876)
Percoll™ (GE Healthcare™ #17-0891-01)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#17-0891-01)
Pluronic® F-68 (Ploxamer 188)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#P1300-500G)
Poly-L-ornithin hydrobromide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#P3655-100MG)
Poly(vinyl alcohol) average mol wt 30.000-70.000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#P8136-250G)
QIAzol Lysis reagent	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland (#79306)
Resomer® RG 502 H, Poly(D,L-lactide-co-glycolide)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#719897-5G)
Retinoic acid, all-trans (RA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#R2625-50MG)
rhFGF basic (bFGF)	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland (#233-FB-025)
rhGDNF	R&D Systems, Minneapolis, USA (#212-GD)
ROTI®-Mark Tricolor	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (#8271)
RPMI Medium 1640 (Gibco™ #21875-034)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#11530586)

Stabilizing Buffer Reagent B für NucleoCounter® system	ChemoMetec A/S, Allerød, Dänemark (#910-0002)
Sodium chloride (Natriumchlorid)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#27810.295)
Sodium deoxycholate (Natriumdeoxycholat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#D6750-25G)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#L3771-25G)
Tetracycline Hydrochloride	Zymo Research Corp., Orange, CA, USA (#A1004-5)
Trans-Blot turbo Mini 0.2 µm Transfer Packs	Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf, Deutschland (#170-4165)
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#10708976001)
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#P9416-100ML)
Ultima Gold™	Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau, Deutschland (#6013326)
VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland (#H-1400-10)
Y-27632 dihydrochloride	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland (#1254/1)
Wasser Optima® LC/MS Grade	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#10728098)

Tabelle 2. Geräte und Programme

Geräte und Programme	Hersteller
Absaughilfe Vacuboy	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Absaugsystem Vacusafe	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Agilent 1260 Infinity Series HPLC	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Deutschland
Analysenwaage CP64	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Biometra UNO II Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

CASY® Cell Counter + Analyzer	OLS OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
cellZscope®2 (Software: cellZscope® 2.1.2)	nanoAnalytics GmbH, Münster, Deutschland
ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Eppendorf ThermoMixer® C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACS™ Calibur, Durchflusszytometer (Software: CellQuest Pro)	BD, Heidelberg, Deutschland
Inkubator BBD 6220 (Thermo Scientific™ Heraeus®)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Inkubator Binder CB 210	Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Inkubator Binder CB 150	Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kühlschrank FKU 1800 profi line	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank LGUex 1610 MediLine	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Langzeitlagertank Biosafe® MDß	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen/Sieg, Deutschland
Leica TCS SP8 WLL Confocal Microscope (Software: Leica LAS X 2.0.1.14392)	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Deutschland
Mikroskop IX70 (Software: cell^P)	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell for Mini Precast Gels	Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf, Deutschland
NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Software: Nanodrop 2000)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
NucleoCounter® NC-200™ (Software: ChemoMetec NucleoView NC-200)	ChemoMetec A/S, Allerød, Dänemark (#941-0011)
Pipette: Brand Transferpette® S 0,1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipette: Eppendorf Reference® 0,1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette: Eppendorf Research® 0,1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipette: Eppendorf Research® plus 0,1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette: Eppendorf Research® pro 0,1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette: Gilson Microman® 0,1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe Pipetboy Acu	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy Acu 2	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Q Exactive FOCUS MS System (Chromleon™ 7 Chromatography Data System Software)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) (Software: QuantStudio™ Real-Time PCR Software)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Reinraumkabine, Typ: bc-crc-16-24, mit Regelmodul UNIcon	Kabine: bc-technology GmbH, Dettingen an der Erms, Deutschland; Regelmodul: Ziehl-Abegg SE, Künzelsau, Deutschland
Reinstwasseranlage Milli-Q® Direct 8	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schüttelinkubator Innova® 40 (New Brunswick™)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe™ KSP18 (Thermo Scientific™)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Sicherheitswerkbank S1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Safemate 1.2 (BioAir®)	Euroclone S.p.A., Pero, Italien
SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
SONOPULS HD 200	BANDELIN electronic GmbH & co. KG, Berlin, Deutschland

TECAN infinite® F200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Tiefkühlschrank LGUex 1500 MediLine	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Tiefkühlschrank LKexv 3910 MediLine	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Tri-Carb® 2910 TR International (QuantaSmart™ 4.0)	Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau, Deutschland
Trockenschrank Binder ED 23	Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Ultraschallbad Elmasonic S15H	Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Deutschland
Ultratiefkühlschrank Forma™ 88000 (Thermo Scientific™)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Vortex-Schüttler Agitateur Top-Mix 11118	Fisher Bioblock Scientific, Illkirch Cedex, Frankreich
Vortex-Schüttler lab dancer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad ED-5	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Wasserbad SW22	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
XP6U Ultrafeinwaage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Zentrifuge 5418R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge MiniSpin®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Multifuge X3R (Thermo Scientific™ Heraeus®)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical GmbH, Kassel, Deutschland

Tabelle 3. Verbrauchsgegenstände und Glaswaren

Verbrauchsgegenstände und Glaswaren	Lieferant (Artikelnummer)
9 mm-Braunglasfläschchen mit Schraubgewinde und weiter Öffnung	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#14879810)
9 mm-Schraubgewindekappen für Autosampler-Flaschen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#13296389)
Accucore™ HILIC LC-Säule	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland (#17526-103030)
Aspirationspipette 2 ml (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#710183)
Atraumatische Pinzette, gewinkelt	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland (#FB403R)
C-Chip Disposable Hemocytometer, Neubauer improved	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland (#DHC-N01)
Cell Strainer 100 µm Nylon (Corning®)	Corning BV, Amsterdam, Niederlande (#431752)
Chirurgisches Einmalskalpell CutFix® 11 (B. Braun #5518040)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#233-5311)
Chirurgisches Einmalskalpell CutFix® 21 (B. Braun #5518075)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#233-5321)
Einweglabormäntel Tyvek®, Größe XL	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#113-0469)
ibiTreat µ-Slide 4 Well	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland (#80426)
ibiTreat µ-Slide 8 Well	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland (#80826)
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml) (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland (#4346906)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film Kit (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland (#4313663)
Microplatte 96 Well (Cellstar® µClear®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#655090)
Mikrozentrifugengefäße 0,6 ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland (#G051)

Mikrozentrifugengefäße 1,5 ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland (#G052BP)
Mikrozentrifugengefäße 2,0 ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland (#G053BP)
Multiwellplatte, 6 Well (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#657160)
Multiwellplatte, 12 Well (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#665180)
Multiwellplatte, 24 Well (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#662102)
Multiwellplatte, 48 Well (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#677180)
Multiwellplatte, 96 Well (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#655180)
Nitrilhandschuhe, Nitrile Light, Größe S	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#112-2754)
Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere 0,1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl (Fisherbrand™ SureOne™)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Polystyrene Round-Bottom Tube, 5 ml (Falcon® #352058)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#734-0443)
Präzisionsspinzette 7-Inox-H, gebogen	Aesculap AG, Tuttlingen (#FL068C)
Quadratische Petrischale	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#688161)
Rundhalsflasche 150 ml (Corning®)	Corning BV, Amsterdam, Niederlande (#431175)
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#710180, 606180, 607180, 760180, 768180)
Tissue Culture Plate Inserts, Porengröße 3,0 µm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#734-2732)
Transwell® Inserts, Porengröße 3,0 µm (Corning® #3402)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#CLS3402-48EA)
Vakuum-Filtrationseinheit 250 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#514-0330)

Vakuum-Filtrationseinheit 500 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#514-0332)
Via1-Cassette™ for NucleoCounter® system	ChemoMetec A/S, Allerød, Dänemark (#941-0011)
Weithalsdose mit Schraubverschluss 500 ml (Nalgene®)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (#216-8226)
Zellkulturplatte Nunclon™ Delta Cell Culture/Petri Dish 60x15 mm	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland (#150288)
Zentrifugenröhrchen 15 ml (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#188271)
Zentrifugenröhrchen 50 ml, konischer Boden (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#227261)
Zentrifugenröhrchen 50 ml, Stehrand (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (#210261)

Tabelle 4. Zelllinien, Primärzellen und Bakterien

Zelllinie/ Bakterie	Zelltyp	Biologische Quelle	Lieferant
293T	Embryonale Nierenzellen	<i>Homo sapiens</i>	Abdel Bouazzaoui, Georg-Speyer-Haus Frankfurt, Deutschland
bEnd.3	Endothelzellen aus einem Gehirn - Endotheliom	<i>Mus musculus</i>	Anke Schwedat, Georg-Speyer-Haus Frankfurt, Deutschland
One Shot™ TOP10	Gramnegative Bakterienzellen	<i>Escherichia coli</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
ESi001-A	humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPS)	<i>Homo sapiens</i>	European Bank for induced pluripotent Stem Cells (EBiSC), IMI-Projekt, www.ebisc.org
hiPS-BCEC	humane Gehirnkapillarendothel-zellen (engl. human brain capillary endothelial cells)	<i>Homo sapiens</i>	Differenziert aus hiPS

hBMEC	Immortalisierte Gehirnkapillar-endothelzellen	<i>Homo sapiens</i>	Kwang Sik Kim, Johns Hopkins Universität, Baltimore, MD, USA
LUHMES	Immortalisierte fötale Gehirnzellen aus dem Mittelhirn	<i>Homo sapiens</i>	LGC Standards GmbH (für ATCC), Wesel, Deutschland
pBCEC	porzine Gehirnkapillarendothel-zellen (engl. porcine brain capillary endothelial cells)	<i>Sus scrofa</i> <i>domestica</i>	Frisch präpariert aus Primärmaterial von einem lokalen Schlachter (Zweibrücken, Deutschland)
UKKi011-A	humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPS)	<i>Homo sapiens</i>	European Bank for induced pluripotent Stem Cells (EBiSC), IMI-Projekt, www.ebisc.org

Tabelle 5. Stammzelllinien

Information	UKKi011-A	ESi001-A
Zur Verfügung gestellt von	Klinikum der Universität zu Köln	Spanische Stammzellbank
BioSample ID	SAMEA2774610	SAMEA3302942
Spenderorganismus	human, männlich, kaukasisch, gesund	human, männlich, 55-59, Morbus Parkinson (idiopatisch)
Primärzelltyp	Fibroblast der Dermis	Keratinozyt
Reprogrammierung	Nicht-integrierend mit episomalem Vektor, Gene: Klf4, L-Myc, Sox2, Pou5F1, sh-p53	Integrierend mit Retrovirus, Gene: POU5F1, Klf4, Sox2
Zellkultur	Vitronectin-Matrix*, Essential E8™-Medium*	Matrigel®-Matrix, mTeSR™1-Medium

*Zellen wurden abweichend von der Empfehlung von EBiSC auf Matrigel® mit mTeSR™1-Medium kultiviert.

Die verwendeten Stammzelllinien sind Teil von EBiSC und ebenfalls auf hpsreg.eu registriert. Es liegt eine vollständige Freigabe der EBiSC-Linien zur Verwendung für Forschungsprojekte

vor und sie unterliegen einer umfassenden Qualitätskontrolle. Zum Zeitpunkt der Einlagerung bei EBiSC werden Sterilität (Ausschluss von Mykoplasmenverunreinigungen und mikrobiellem Befall), Identität der Zelllinien basierend auf STR-Analyse („short tandem repeat“-Analyse) und Karyotypisierung routinemäßig durchgeführt. Die Daten und entsprechenden Analysenzertifikate sind auf Nachfrage erhältlich.

Tabelle 6. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pOS-IRES-GFP	pOS Rückgrat [94] mit IRES-GFP Einsatz	PD Dr. Uwe Martens, Freiburg, Deutschland
pOS-hTERT-IRES-GFP	pOS Rückgrat [94] mit hTERT-IRES-GFP Einsatz	PD Dr. Uwe Martens, Freiburg, Deutschland
M57/R690-SV40	gag kodiert Kapsidproteine, pol kodiert reverse Transkriptase	Prof. Dr. Tim Brümmendorf, Hamburg, Deutschland
K85 GALV	Envelope (Hüllplasmid)	Prof. Dr. Tim Brümmendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 7. Medien, Puffer und Lösungen

Medium/Lösung	Komponenten [Konzentration]	Verwendung für
10xLaufpuffer	MilliQ-Wasser Tris [250 mM] Glycin [1,92 M] SDS [35 mM]	Western Blot
10xProtease-Inhibitor	MilliQ-Wasser cOmplete Protease Inhibitor Cocktail [10x] => 1 Tablette in 5 ml MilliQ-Wasser	Western Blot
293T-Medium	DMEM (Gibco #41966) FKS [10 %] Pen/Strep [1 %]	293T
bEnd.3-Medium	DMEM (Gibco #41965) FKS [10 %] Pen/Strep [1 %]	bEnd.3
bFGF-Stammlösung	PBS Bovine Serum Albumine [0,1 %] bFGF [100 µg/ml]	Prol. LUHMES, hiPS-BCEC

Collagen-Beschichtung	Milli-Q Essigsäure [0,05%] Rat tail collagen I [100 µg/ml] => 3 h, 37 °C	pBCEC
Collagen-Fibronectin-Beschichtung (Membranen)	Milli-Q Essigsäure [0,05%] humanes Collagen IV [400 µg/ml] Fibronectin [100 µg/ml] => ü.N., 37 °C	hiPS-BCEC-Differenzierung
Collagen-Fibronectin-Beschichtung (Zellkulturgefäße)	Milli-Q Essigsäure [0,05%] humanes Collagen IV [80 µg/ml] Fibronectin [20 µg/ml] => ü.N., 37 °C	hiPS-BCEC-Differenzierung
DB-cAMP-Stammlösung	PBS DB-cAMP [100 mM]	LUHMES-Differenzierung
EDTA-Stammlösung	PBS EDTA [0,5 mM]	Stammzellen
Endothel+/+-Medium	heSFM (Gibco #11111) PDS [1%] bFGF [20 bzw. 80 ng/ml] RA [10 µM]	hiPS-BCEC-Differenzierung
Endothel-0-Medium	heSFM (Gibco #11111)	hiPS-BCEC-Differenzierung
Endothel-1-Medium	heSFM (Gibco #11111) PDS [1%]	hiPS-BCEC-Differenzierung
Endothel-5-Medium	heSFM (Gibco #11111) PDS [5%]	hiPS-BCEC-Differenzierung
GDNF-Stammlösung	PBS BSA [0,1 %] hrGDNF [10 µg/ml]	LUHMES-Differenzierung
hBMEC-Medium	PRMI 1640 (Gibco #21875) FKS [20 %] Pen/Strep [1 %] GlutaMAX [1 %] Sodium pyruvate [1 mM] MEM NEAA [1 %] MEM vitamins [1 %]	hBMEC

Laufpuffer	MilliQ-Wasser 10xLaufpuffer [10 %]	Western Blot
LB-Medium	MilliQ-Wasser LB-Mediumpulver [2,5 %]	Bakterienkultur
LUHMES-Differenzierungsmedium	Adv. DMEM/F12 (Gibco #12634) N-2 Supplement [1 %] L-Glutamin [2 mM] DB-cAMP [1 mM] GDNF [2 ng/ml] Tetracyclin [1 µg/ml]	Diff. LUHMES
LUHMES-Proliferationsmedium	Adv. DMEM/F12 (Gibco #12634) N-2 Supplement [1 %] L-Glutamin [2 mM] bFGF [40 µg/ml]	Prol. LUHMES
Lysis-Puffer	RIPA-Puffer 10xProtease-Inhibitor [1x]	Western Blot
Matrigel-Beschichtung	DMEM/F12 (#31330) Matrigel [150 µg/cm ²] => min. 2 h, 37 °C	Stammzellen, hiPS-BCEC-Differenzierung
pBCEC-0-Medium	DMEM/F12 (Gibco #11039) Pen/Strep [1 %] Gentamicin [1 %] L-Glutamin [0,75 %] Hydrocortison [550 nm]	pBCEC
pBCEC-5-Medium	DMEM/F12 (Gibco #11039) FKS [5 %] Pen/Strep [1 %] Gentamicin [1 %] L-Glutamin [0,75 %] Hydrocortison [550 nm]	pBCEC
Platierungsmedium	Medium 199 (Gibco # 31150) NCS [10%] Pen/Strep [1%] Gentamicin [1%] L-Glutamin [4 mM]	pBCEC

PLO-Fibronektin-Beschichtung	1) MilliQ-Wasser Poly-L-ornithin [50 µg/ml] => über Nacht (ü.N.) inkubieren, 1x waschen, trocknen 2) MilliQ-Wasser Fibronektin [1 µg/ml] => 2 h inkubieren, 1x waschen, trocknen	LUHMES
Präparationsmedium	Medium 199 (Gibco # 31150) Pen/Strep [1%] Gentamicin [100 µg/ml] L-Glutamin [0,7 mM]	pBCEC
RIPA-Puffer	MilliQ-Wasser NaCl [150 mM] NP-40 [1 %] Natriumdesoxycholat [0,5 %] SDS [0,1 %] Tris, pH 8,0 [50 mM]	Western Blot
Stammzellmedium	mTeSR™ 1 Complete Kit	Stammzellen
TBST-Puffer	MilliQ-Wasser Tris, pH 7,5 [20 mM] NaCl [150 mM] Tween 20 [0,1 %]	Western Blot
Unkonditioniertes Medium	DMEM/F-12 (#11039) Knock-out serum replacement [20%] MEM NEAA [1x] L-Glutamin [0,4 mM] 2-Mercaptoethanol [0,1 µM]	hiPS-BCEC-Differenzierung
WB-Blockpuffer	TBST-Puffer Magermilchpulver [5 %]	Western Blot
WB-Laufpuffer	TBST-Puffer Magermilchpulver [1 %]	Western Blot
Y-27632 Stammlösung	PBS Y-27632 [5 mM]	Stammzellen

Tabelle 8: Primärantikörper

Antigen	Spezies	Hersteller
Claudin-5	Hase	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich (#ab53765)
Dopamin D2 Rezeptor	Maus	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich (#ab88074)
Dopamin Transporter	Ratte	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich (#ab5990)
GAPDH	Maus	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#15276199)
Glut-1	Maus IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland (#sc-377228)
hTERT	Hase	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich (#ab32020)
Occludin	Maus IgG2b	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland (#sc-133256)
MDR1 (P-gp)	Maus IgG2b	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland (#sc-55510)
Tyrosine Hydroxylase	Hase	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich (#ab112)

Tabelle 9. Sekundärantikörper

Spezies und Antigen	Konjugation	Hersteller
Goat anti-mouse IgG	Alexa Fluor® 555	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#10143952)
Goat anti-mouse IgG	HRP	Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf, Deutschland (#1706516)
Goat anti-rabbit IgG	Alexa Fluor® 488	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich (#ab150077)
Goat anti-rabbit IgG	HRP	Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf, Deutschland (#1706515)
Goat anti-rat IgG	Alexa Fluor® 488	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (#10533623)

Tabelle 10. Kits und Assays

Kits und Assays	Hersteller
DCFDA – Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich (#ab113851)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland (#4368814)
miRNeasy Mini Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland (#217004)
Plasmid Midi Kit (25)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland (#12143)
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland (#4444557)
TaqMan™ Gene Expression Assays - Hs02758991_g1 (GAPDH) - Hs00972650_m1 (hTERT)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
TeloTAGGG™ Telomerase PCR ELISA ^{PLUS} (Roche)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (#12013789001)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien wurden steril vom Hersteller bezogen oder vor der Benutzung autoklaviert, mit 80 % Ethanol sterilisiert oder steril filtriert. Alle verwendeten Reagenzien entsprachen den Reinheitsstandards zum Einsatz in der Zellkultur. Immortalisierte Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen getestet.

2.2.1.1. Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Beim Passagieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert, bis mehr als 85 % der Zellen von der Oberfläche gelöst waren. Die Zell-Trypsin-EDTA-Suspension wurde in einen 2,5-fachen Überschuss Zellkulturmedium überführt, um den Fokus der Trypsinfunktion von den Zellen zu nehmen. Die

erhaltene Zellsuspension wurde 5 min bei 200 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Die Aussaat und Kultivierung erfolgte entsprechend der geplanten Versuche. Die endothelialen Zelllinien bEnd.3 und hBMEC wurden passagiert, bevor sie eine Konfluenz erreichen konnten.

2.2.1.2. LUHMES-Differenzierung zu dopaminergen Neuronen und Parkinson-Induktion

Die Differenzierung der LUHMES-Zellen erfolgte auf Grundlage des Protokolls von Scholz et al. [88]. Zusammengefasst wurden $4,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 in PLO-Fibronektin-beschichteten Zellkulturgefäßen in LUHMES-Proliferationsmedium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und durch frisches LUHMES-Differenzierungsmedium ersetzt. 48 h nach diesem Mediumwechsel wurden die beginnend differenzierten LUHMES-Zellen passagiert und in einer Zelldichte von $7,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 in neue PLO-Fibronektin-beschichtete Zellkulturgefäße entsprechend des Bedarfs für die weiteren Experimente ausgesät. Das Medium wurde alle 48 h durch frisches LUHMES-Differenzierungsmedium ersetzt. Experimente wurden ab Differenzierungstag 6 durchgeführt.

Zur Induktion des Morbus Parkinson-Phänotyps wurde MPP+ frisch in MilliQ-Wasser gelöst und eine 1 mg/ml Lösung hergestellt. Diese Stocklösung wurde mit frischem LUHMES-Differenzierungsmedium verdünnt, um die für die Experimente notwendige Konzentration von MPP+ im Medium zu erhalten. Bei den zu behandelnden Zellen wurde das verbrauchte Medium entfernt und durch frisches Differenzierungsmedium mit MPP+ ersetzt. Nach 24 oder 48 h entsprechend der experimentellen Planung wurde das MPP+-Medium wieder entfernt und durch LUHMES-Differenzierungsmedium ersetzt. Experimente wurden noch am selben Tag gestartet. Alle Lösungen und Zellen, die mit MPP+ in Berührung gekommen waren, wurden gesondert gesammelt und nach biologischer Inaktivierung als Chemikalienabfall entsorgt.

2.2.1.3. Primärzellen

Porzine Gehirnkapillarendothelzellen (pBCEC) wurden aus Gehirnen, entnommen aus Schädeln von frischen geschlachteten *Sus scrofa domestica*, in Anlehnung an das Protokoll von Wagner et al. [95] mit einigen Modifikationen isoliert (siehe Abb. 5 A). Die Tiere wurden freundlicherweise vom Schlachthof Färber in Zweibrücken zur Verfügung gestellt und in Übereinstimmung mit der Verordnung EG 1099/2009 des Rates der Europäischen Union vom 24. September 2009 über den Schutz von Tieren zum Zeitpunkt der Tötung geschlachtet. Die Schädeldecke wurde geöffnet und entfernt, das Gehirn als intaktes Organ entnommen und kurz in PBS gespült. Die Hirnhäute wurden mit Hilfe von Pinzetten vorsichtig entfernt und die graue Masse mit Hilfe eines Skalpels von der weißen Masse separiert. Die graue Masse wurde

gesammelt und in Präparationsmedium mit Dispase einer Endkonzentration von 3,1 U/ml für 2 h bei 37 °C unter Rühren bei 680 rpm inkubiert. Anschließend wurde das homogenisierte Gewebe auf diskontinuierliche Dichtegradienten einer Ausgangsdichte von 1,0488 g/cm³ in einem Verhältnis von einem Teil Gewebe-Homogenat zu einem Teil Gradientenlösung aufgeteilt und für 10 min bei 2200 g und 4 °C ohne Abbremsen der Zentrifuge während der Entschleunigung zentrifugiert. Innerhalb des erhaltenen Gradienten wurden die Kapillarfragmente als Wolke knapp über dem Boden des Zentrifugenröhrchens konzentriert, mit einer Einwegpipette in eine neues Zentrifugenröhrchen überführt, durch mechanische Kräfte vereinzelt und mit einem Überschuss an Präparationsmedium gemischt. Die erhaltene Mischung wurde über ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm gefiltert und das Filtrat für 20 min bei 230 g und 4 °C zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen, dieser Rest mit 1 ml 466 U/min Collagenase gemischt und dann bei 37 °C für 30 min bei einer kreisförmigen Bewegung von 150 rpm inkubiert. Nach 27 min dieser Inkubationszeit wurden 2 ml DNase I für eine Endkonzentration von 2×10^{-3} U/ml zugegeben. Die Enzymlösungen wurden anschließend mit einem 7-fachen Überschuss an Präparationsmedium verdünnt und für 10 min bei 166 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 1 ml Präparationsmedium resuspendiert, anschließend sehr vorsichtig auf den vorbereiteten kontinuierlichen Dichtegradienten geschichtet und dann für 20 min bei 792 g und 4 °C ohne Bremse bei der Entschleunigung zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich die pBCEC in der obersten rosafarbenen Bande. Diese wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen gesammelt, mit Präparationsmedium verdünnt und nochmal für 10 min bei 166 g und 4 °C zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem angemessenen Volumen Platierungsmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in einer Dichte von $3,6 \cdot 10^5$ Zellen pro cm² auf Collagen-beschichtete Transwell®-Membranen ausgesät. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, bevor das Medium nochmal entfernt und durch neues Platierungsmedium ersetzt wurde, um nicht angewachsenen Zellen zu entfernen. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium von den Membraninserts entfernt und durch pBCEC-Kulturmedium ersetzt. Sollten gleiche Mediumverhältnisse auf beiden Seiten der Zellbarriere dargestellt werden, wurde apikal und basolateral pBCEC-0-Medium zugegeben, für unterschiedliche Mediumverhältnisse wurde apikal pBCEC-5-Medium und basolateral pBCEC-0-Medium zugegeben. Medium wurde in 48 h-Intervallen erneuert und Experimente 4 oder 5 Tage nach der Isolation durchgeführt, falls TEER-Werte von 300 Ω*cm² erreicht und überschritten wurden.



Abbildung 5. Herstellung von In-vitro-Modellen der Blut-Hirn-Schranke. (A) pBCEC werden aus einem frischen Gehirn des Schweins (*Sus scrofa domestica*) durch schrittweisen enzymatischen Verdau und Gradientenzentrifugationen isoliert, um anschließend auf Membraneinsätze ausgesät zu werden, wo die für die Blut-Hirn-Schranke typischen Zell-Zell-Verbindungen und Eigenschaften erneut etabliert werden. (B) hiPS-BCEC werden aus hiPS differenziert, indem bei einer bestimmten Zelldichte erst durch Einsatz von Unkonditioniertem Medium, nach 6 Tagen von Endotheliales Medium die Ausprägung eines Phänotyps ausgelöst wird, der die Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke widerspiegelt. Auch hier werden die Zellen zur finalen Modellentwicklung auf Membraneinsätze übertragen. Messbalken 200 μm . Modifiziert nach Danz et al. 2022 [96].

2.2.1.4. Stammzellen

Für die Stammzellkultivierung wurden ausschließlich Matrigel-beschichtete Zellkulturoberflächen verwendet. Passagiert wurden die Stammzellen, wenn die Koloniebewachung der Platte bei 80 – 90 % lag. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Oberfläche mit 0,5 mM EDTA-Lösung in PBS bedeckt. Die Zellen wurden 5 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, anschließend die EDTA-Lösung bis auf einen kleinen Rest entfernt und nochmal bei gleichen Verhältnissen für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Stammzellkolonien mechanisch durch 2- bis 3-maliges Aufschlagen des Wachstumsgefäßes auf die Oberfläche der Sterilbank gelöst und dann vorsichtig in Stammzellmedium aufgenommen. Der zur weiteren Kultivierung benötigte Anteil der Suspension wurde mit Stammzellmedium aufgefüllt, durch langsames Invertieren des Zentrifugenröhrchens gemischt und die Kolonie-Suspension auf frische Kulturoberflächen aufgebracht. Dabei wurde die Zugabestelle konstant variiert, um ein punktuell gebündeltes Anwachsen der Kolonien zu verhindern. Die Stammzellen wurden für nicht mehr als 40 Passagen kultiviert.

2.2.1.5. Stammzelldifferenzierung zu Gehirnkapillarendothelzellen

Die Stammzelllinien UKKi011-A und ESi001-A wurden basierend auf dem Protokoll von Stebbins et al. [74] mit leichten Modifikationen differenziert (siehe Abb. 5 B). UKKi011-A wurden in einer Dichte von 5×10^3 Zellen pro cm^2 und ESi001-A in einer Dichte von $3,5 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 in 6-well-Platten ausgesät und für 3 Tage in Stammzellmedium kultiviert, bevor die eigentliche Differenzierung initiiert wurde. An Tag 0 wurde das Stammzellmedium durch unkonditioniertes Medium ausgetauscht. Dieses Medium wurde bis zu Tag 5 alle 24 h erneuert. An Tag 6 wurde das unkonditionierte Medium entfernt und durch Endothel+/-Medium ersetzt. Dieses wurde an Tag 7 erneuert. An Tag 8 wurden die Zellen mit 1 ml Accutase pro well der 6-well-Platte für 35 min bei 37°C , 5 % CO_2 und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, sodass etwa 80 % der Zellen abgelöst wurden. Die Zellen wurden durch mechanische Ablösung mit einer Pipette vollständig von der Platte gelöst, vereinzelt und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Zur Accutase-Zell-Suspension wurde ein vierfacher Überschuss Endothel-1-Medium gegeben, die Suspension anschließend für 5 min bei 200 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellzahl wurde bestimmt und 1×10^6 Zellen pro cm^2 auf vorbereitete, Collagen IV-Fibronektin-beschichtete Membraneinsätze in Endothel+/-Medium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und durch neues Medium, abhängig von den experimentellen Parametern, ersetzt. Für eine Kultivierung bei gleichen Serumverhältnissen auf beiden Seiten der Membran wurde apikal und basolateral Endothel-1-Medium zugegeben, für verschiedene Serumverhältnisse wurde apikal Endothel-5-Medium und basolateral Endothel-0-Medium zugegeben. Die Medien wurden täglich erneuert und Experimente an Tag 10 oder Tag 11 der Differenzierung durchgeführt.

2.2.1.6. Bestimmung der TEER-Werte

Der transendotheliale elektrische Widerstand (TEER) und die Kapazität der Zellbarrieren wurde mit Hilfe des cellZscope-Gerätes automatisch alle 60 min durch Impedanz-Spektroskopie gemessen und protokolliert. Zu diesem Zweck wurden die Membraneinsätze direkt nach der Zelleinsaat in die Messzelle des cellZscope eingesetzt, über den gesamten experimentellen Zeitraum darin belassen und die Messzelle selbst bei 37°C , 5 % CO_2 und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Notwendige Medienwechsel wurden innerhalb der Messzelle in den Pausen zwischen Messungen durchgeführt. Die Messzelle wurde mit einem externen Kontrollmodul und dem damit verbundenen Computer verbunden, um die Daten aufzuzeichnen. Die Rohdaten der Messungen wurden zur weiteren Analyse als Excel-Dateien exportiert. Um das Datenvolumen zu minimieren, wurden die TEER-Werte nur im 12-Stunden-Rhythmus zur Auswertung herangezogen.

2.2.2. Permeabilitätsstudien

Permeabilitätsuntersuchungen wurden nur bei vollständig ausgebildeter Barrierefunktion durchgeführt. Es wurden als Markersubstanzen Natriumfluoreszein, [14C]-Inulin oder [14C]-Diazepam eingesetzt. Für Fluoreszenz-basierte Messungen wurde Natriumfluoreszein zu einer Konzentration von 10 µg/ml mit dem der entsprechenden Zelllinie zugehörigen Medium verdünnt. Messungen wurden in mindestens 2 parallelen Membraneinsätzen durchgeführt. Von der apikalen Seite der Barriere wurde 1/10 des Medium entnommen und durch die Natriumfluoreszein-Lösung ersetzt. Anschließend wurden die Membraneinsätze für 4 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, bevor sowohl das apikale als auch das basolaterale Medium getrennt gesammelt und anschließend zur Messung in schwarze 96-well-Platten übertragen wurde. Die Fluoreszenz-Werte wurden im Tecan infinite 200 bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen.

Bei der Permeabilitätsbestimmung mit radioaktiv markierten Substanzen wurden alle Versuche unter angemessenen Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt. Auf der apikalen Seite der Membran wurden 13 kBq [14C]-Inulin oder [14C]-Diazepam pro Membraneinsatz zugegeben. Die Membranen wurden für 3 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend das gesamte apikale oder basolaterale Medium in vorbereitete Szintillations-Röhrchen mit jeweils 5 ml Ultima Gold Szintillationsflüssigkeit überführt und der radioaktive Zerfall mit dem Tri-Carb 2910TR Szintillationszähler umgehend gemessen.

Die Berechnung der Permeabilitätskoeffizienten erfolgte mit Hilfe folgender Formel unter Annahme eines Kumulationsgleichgewichts:

$$P_{app} = \frac{c_{basolateral} \times V_{basolateral}}{t \times A \times c_{apikal}}$$

Dabei steht P_{app} [cm/s] für den Permeabilitätskoeffizienten, $c_{basolateral}$ und c_{apikal} (in [µg/ml] oder [kBq/ml]) sind die jeweiligen basolateralen oder apikalen Stoffkonzentrationen, $V_{basolateral}$ [ml] ist das Probenvolumen auf der basolateralen Seite, t [s] steht für die Inkubationszeit und A [cm²] für die Membranfläche der verwendeten Einsätze. [97]

2.2.3. Immunfluoreszenzfärbung

Um die Proteinexpression zu analysieren, wurden differenzierte LUHMES-Zellen, pBCEC oder hiPS-BCEC für 2 min mit Aceton fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Bei den Membranfärbungen wurden die fixierten Zellen mit Membran mit Hilfe eines Skalpell aus der Halterung geschnitten und für die Färbung in 12-well-Platten mit PBS überführt. Anschließend wurden die Zellen für 1 h in PBS mit 1 % BSA geblockt. Danach wurden die primären Antikörper in PBS mit 1 % BSA entsprechend der Herstellerangaben verdünnt, zu

den fixierten Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die Proben zweimal in PBS mit 1 % BSA gewaschen und dann mit dem zugehörigen Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen wurden die Zellkerne für 3 min mit einer 300 nM DAPI-Lösung gefärbt, die Proben erneut zweimal gewaschen und dann zur optischen Analyse eingebettet. Bei den LUHMES-Zellen wurden in die verwendeten ibidi-Kammern ein paar Tropfen ibidi Mounting Medium gegeben. Für die gefärbten Membranen wurde auf ein gläsernes Deckglas ein Tropfen VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium gegeben, die Membran mit einer Pinzette dorthin überführt und möglichst flach auf den Tropfen aufgezogen. Ein zweiter kleiner Tropfen Mounting Medium wurde auf die Membran gegeben und ein zweites Deckglas vorsichtig aufgelegt, ohne Luftblasen einzuschließen. Die Proben wurden vor der Analyse über Nacht im Dunkeln getrocknet. Alle Fluoreszenzfärbungen wurden mit dem Leica TCS SP8 Konfokalmikroskop analysiert.

2.2.4. Isolierung von RNA

Um die Proben vielseitig einsetzen zu können, wurde die Gesamt-RNA und miRNA der untersuchten Proben mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen) anhand des Protokolls des Herstellers isoliert. Die differenzierten LUHMES-Zellen wurden gesammelt und in 700 µl Qiazol pro Probe für 2 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden die Proben mindestens über Nacht bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben nochmal für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden pro Probe 140 µl Chloroform zur RNA-Fällung zugegeben, die Probengefäße fest verschlossen und für je 15 s kräftig geschüttelt. Nach 2 min Ruhe wurden die Proben für 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Dadurch haben sich verschiedene Phasen getrennt. Die obere, durchsichtige Phase wurde ohne die anderen Phasen zu berühren aufgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Dort wurde zur gesammelten Phase das 1,5-fache Volumen 100 % Ethanol gegeben und durch Pipettieren gut durchmischt. Jede so erhaltene Probe wurde auf eine eigene Säule gegeben, für 15 s bei 10.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und so über die Säule gespült. Die Säulen wurden mit je 500 µl Puffer RPE aus dem Kit zweimal gewaschen. Anschließend wurde die an der Säule gebundene RNA und miRNA durch Zugabe von je 30 µl RNase-freiem Wasser gefolgt von einer Zentrifugation bei 10.000 g für 1 min bei Raumtemperatur von der Säule gespült und in RNase-freien Zentrifugegefäßen gesammelt. Die erhaltenen RNA wurde mit dem NanoDrop hinsichtlich ihrer Reinheit und Konzentration vermessen. Anschließend wurden die Proben aufgeteilt und ein Teil bei -80 °C für spätere qPCR-Analyse gelagert.

Der andere Teil der Proben wurde an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Meese am Universitätsklinikum des Saarlandes übergeben, wo Lena Krammes anhand der Proben mRNA Microarrays erstellte und auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse eine Pathway-

Analyse durchgeführt hat. Die Ergebnisse wurden zur wissenschaftlichen Bewertung anschließend zurück übermittelt.

2.2.5. Reverse Transkription und qPCR

Um mit den Proben eine qPCR-Analyse durchführen zu können, musste die extrahierte mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde das High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit benutzt. Von jeder Probe wurden 250 µg mRNA in ein neues Zentrifugengefäß überführt und mit RNA-freiem Wasser auf 14,2 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurden nun noch 4,8 µl Reaktionsmix gegeben, der jeweils aus 2,0 µl 10x Puffer, 2,0 µl 10x Random Primers, 1,0 µl RTase und 0,8 µl dNTPs besteht. Die Reaktionsgefäße wurden nun verschlossen, kurz zentrifugiert, um die Lösungen am Gefäßboden zu sammeln, und in den Thermocycler überführt. Hier wurden sie für 10 min bei 25 °C inkubiert, anschließend für 120 min auf 37 °C erwärmt, gefolgt von 5 min bei 85 °C bevor die Proben wieder auf 4 °C gekühlt wurden. Damit war die Transkription in cDNA abgeschlossen und die qPCR konnte durchgeführt werden.

Im Rahmen der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde die hergestellte cDNA unter Verwendung des TaqMan®-Mastermixes und individuell ausgewählter Primer amplifiziert. Pro Reaktion wurden 5 ng DNA entsprechend 4,5 µl des cDNA-Produktes eingesetzt, zu der 5 µl Mastermix und 0,5 µl Primer gegeben wurden. Die Proben wurden in MicroAmp®-Platten übertragen, mit Folie verschlossen, darin für 5 min bei 300 rpm zentrifugiert und anschließend im QuantStudio™7 Flex System vermessen. Pro Probe und Primer wurden drei technische Replikate vermessen. Die qRT-PCR erfolgte mit folgendem Programm: Eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 20 s gefolgt von 40 Zyklen mit 1 s Denaturierung bei 95 °C und 20 s Elongation bei 60 °C. Die Rohdaten wurden in Excel exportiert und die von der Software bestimmten C_T -Werte zur Auswertung benutzt.

Bei der Auswertung wurden zuerst die C_T -Werte der endogenen Kontrolle GAPDH von den C_T -Werte erhalten für hTERT abgezogen. Diese Differenz ΔC_T wurde in Bezug zu einem Kalibrator gesetzt, für den der Wert 1 für die Genexpression angenommen wird. Dazu wurde der ΔC_T -Wert des Kalibrators, hier die Zelllinie 293T, von allen ΔC_T -Werten der Proben abgezogen, sodass man $\Delta\Delta C_T$ -Werte erhielt. In einem letzten Schritt wurden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte in die Formel $2^{\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt. Mit den erhaltenen Werten konnten die Unterschiede in der Genexpression dargestellt werden.

2.2.6. Arbeit mit Bakterien und Viren

Die Arbeiten an den Bakterien wurden unter semi-sterilen Bedingungen durchgeführt, alle Arbeiten im Zusammenhang mit Produktion und Einsatz der Viren dagegen unter sterilen Zellkulturbedingungen mit zusätzlichen Sicherheitsvorkehrungen im Hinblick auf die Virenproduktion, um einer Kreuz-Transduktion von Kontroll-Linien vorzubeugen.

2.2.6.1. Transformation kompetenter Bakterien

Kompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes One Shot™ TOP10 wurden mit den notwendigen Plasmiden transformiert, um diese zu vervielfältigen. Dazu wurde die benötigte Anzahl Bakterien-Vials auf Eis aufgetaut. Zu jedem Bakterien-Vial wurde je 1 µl eines Plasmid-Stocks gegeben und die Mischung anschließend für 15 min auf Eis inkubiert, gefolgt von 45 s im Wasserbad bei 42 °C und nochmal 2 min auf Eis. Anschließend wurden zu jedem Vial 250 µl LB-Medium gegeben und die Bakterienlösungen für 1 h im Innova40-Schüttelinkubator bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Danach wurden pro Bakterienansatz zwei Platten ausgestrichen, einmal mit einer größeren und einmal einer niedrigen Menge transformierte Bakterien. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag die Kolonieentwicklung beurteilt. Für jedes Plasmid wurde eine Platte mit gut abgegrenzten, punktförmigen Kolonien ausgewählt und weiter vermehrt. Dazu wurden 80 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt, um nicht-transformierte Bakterien abzutöten. Pro Plasmid wurden je 2 Zentrifugenröhrchen mit 10 ml LB-Ampicillin-Medium und einer gepickten Kolonie versetzt und erneut über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Eine Trübung des Mediums zeigte eine erfolgreiche Bakterienvermehrung an. Zur Ernte wurden die Zentrifugenröhrchen 15 min bei 6.000 g und 4 °C zentrifugiert und die Pellets zur Plasmidisolation, Weiterkultivierung oder Lagerung verwendet.

2.2.6.2. Plasmid-Isolierung

Die Plasmide wurden mit Hilfe der Plasmid Midi Kit entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Pelletierte Bakterien wurden in 4 ml Kit-Puffer P1 resuspendiert und nach Zugabe von 4 ml Kit-Puffer P2 durch mehrfaches, kräftiges Invertieren der Zentrifugenröhrchen vermischt, um die Lyse der Bakterienzellen auszulösen. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 4 ml gekühlter Kit-Puffer P3 zugegeben, die Lösung erneut durch kräftiges Invertieren vermischt und für weitere 15 min diesmal auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen für 30 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand davon in neue Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals bei 20.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, um die Plasmide von den anderen lysierten Zellbestandteilen der Bakterien zu trennen. Zur Aufreinigung wurden Plasmid-bindende Säulen aus dem Kit zuerst mit 4 ml Kit-

Puffer QBT äquilibriert, anschließend wurde der Überstand der Zentrifugation über die Säulen gegeben, pro Überstand wird eine eigene Säule verwendet. Allen verwendeten Lösungen wurde dabei erlaubt, die Säulen allein basierend auf dem Gravitationsfluss zu durchlaufen. Nach dem Durchlaufen der Überstände wurden die Säulen zweimal mit je 10 ml Kit-Puffer QC gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit je 5 ml Kit-Puffer QF von den Säulen gelöst und in neuen Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die DNA wurde durch Zugabe eines 0,7-fachen Volumens von Isopropanol ausgefällt und mit einer Zentrifugation für 30 min bei 15.000 g und 4 °C gesammelt. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet und das DNA-Pellet durch Zugabe von 2 ml 70 % Ethanol mit anschließender Zentrifugation bei 15.000 g für 10 min bei 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde erneut vorsichtig dekantiert und das Pellet luftgetrocknet. Abschließend wurde die DNA zur Lagerung in einer angemessenen Menge sterilem MilliQ-Wasser resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.6.3. Zelltransfektion

Aus den hergestellten Plasmiden können Retroviren generiert werden, indem die Plasmide K85 und M57 zusammen mit einem Plasmid, auf dem die in den Zielzellen zu integrierenden Informationen enthalten sind, gleichzeitig in eine Verpackungszelllinie eingeschleust werden. In dieser Arbeit wurde entweder ein Plasmid für GFP-Expression als Kontrolle oder GFP-hTERT-Expression zur hTERT-Überexpression eingesetzt. Zur Transfektion wurde als Verpackungszelllinie 293T verwendet. Um die Transfektionseffizienz zu steigern, wurde FuGENE® als Transfektionsreagenz verwendet und die Transfektion erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers.

Für jede Transfektion wurden 4×10^5 293T-Zellen pro T25-Zellkulturflasche ausgesät. Am folgenden Tag wurde die Transfektion durchgeführt. Dazu wurden die drei Plasmide im molaren Verhältnis 2 zu 1 zu 2 (Vektor GFP/GFP-hTERT zu K85 zu M57) bei einer Gesamtmenge der Plasmidmischung von 4 µg gemischt und das Volumen mit PBS auf 33 µl aufgefüllt. Pro Transfektionsansatz wurden in einem Mikrozentrifugengefäß 343 µl 293T-Grundmedium ohne Zusätze vorgelegt, in das mittig 24 µl FuGENE® zugegeben wurden. Dazu wurden die 33 µl Plasmidmischung gegeben, die Mikrozentrifugengefäße kurz gevortext und 30 min bei RT inkubiert. Bei den am Vortag ausgesäten Zellen wurde das Medium abgesaugt und pro T25 durch 3,6 ml neues 293T-Medium ersetzt. Dazu wurden die 400 µl Transfektionsmix mit Plasmiden und Transfektionsreagenz gegeben und die Zellen für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Transfektionserfolg wurde durch optische Beurteilung der Zellen auf Produktion von GFP bewertet. Nach 48 h Inkubation wurde das Medium vollständig abgenommen, mit 0,45 µm Filtern geklärt, um Zellbestandteile zu entfernen, und die Filtrate mit FKS versetzt, um eine FKS-Konzentration von 20 % zu

erreichen. Anschließend wurden die Virus-haltigen Überstände in Kryovials aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.6.4. Retrovirale Transduktion

Zur Transduktion der LUHMES-Zellen wurden $2,5 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 in einer 12-Well-Platte in Proliferationsmedium ausgesät. Nach einem Tag wurde zu je einem Well 200 μl der Virusüberstände gegeben, einmal mit Kontroll-GFP-Vektor und einmal mit hTERT-GFP-Vektor, und die Platte für 48 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit Virusüberständen abgenommen und entsorgt und durch neues LUHMES-Proliferationsmedium ersetzt. Der Erfolg der Transduktion wurde optisch basierend auf der Produktion von GFP in den LUHMES-Zellen bewertet. Um eine Reinkultur an transfizierten Zellen zu erhalten, wurden die transfizierten LUHMES-Zellen vermehrt und mit Hilfe eines Durchflusszytometers wie in Abschnitt 2.2.11. beschrieben sortiert, sodass die Populationen nur noch aus Zellen bestanden, die GFP produzierten.

2.2.7. Western Blot

Zur Untersuchung der Proteinexpression von Zellen mittels Western Blot wurden Zellextrakte eingesetzt. Zur Herstellung dieser Extrakte wurden die zu untersuchenden Zellen wie in Abschnitt 2.2.1.1. beschrieben passagiert. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden 5×10^5 Zellen in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben, für 5 min bei 200 g und RT zentrifugiert der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation bei den vorherigen Parametern wurden die Zellpellets in je 500 μl Lysis-Puffer resuspendiert, dabei in Mikrozentrifugengefäße überführt und mehrfach durch schnelles Pipettieren gemischt. Die Proben wurden für 35 min auf Eis inkubiert und dabei auf einem Plattenschüttler mit 250 rpm bewegt. Anschließend wurden die Proben für 25 min bei 12.00 g und 4 °C zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände enthielten das Proteinextrakt der Zelle. Sie wurden in neue Mikrozentrifugengefäße überführt und zur sofortigen Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt oder bei -80 °C gelagert. Proteinkonzentrationen und -reinheitsverhältnisse in den Lysaten wurden per NanoDrop bestimmt.

Zur korrekten Auftrennung der Proteine beim Western Blot, wurden die Proteinlysate vor dem Auftragen auf das vorgegossene Trenngel denaturiert. Dazu wurde pro Probe eine Lysatmenge entsprechend einer Proteinmenge von 20 μg in ein neues Mikrozentrifugengefäß überführt, 7 μl 5x WB-Probenpuffer und so viel PBS zugegeben, dass eine Gesamtmenge von 35 μl erreicht wurde. Die Proben wurden kurz per Vortexer gemischt, anzentrifugiert und anschließend für 5 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proben auf Eis temperiert. Währenddessen wurden die Trenngele in die Laufkammer eingespannt und mit Laufpuffer

umspült, pro geplanter Antikörperfärbung ein Gel. In die Probenaschen des Trenngels wurden je 15 µl Probe oder 5 µl Marker gegeben. Für den Trennlauf wurde eine Stromstärke von 15 mA angelegt und die Proben solange über das Gel laufen gelassen, bis die erste Markerbande den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel aus der Laufkammer entnommen, die Gelkassette geöffnet und das Gel zusammen mit einer Transfermembran in das Trans-Blot Turbo Transfer System eingelegt. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 2,5 A und einer Spannung von bis zu 25 V für 3 min auf die Transfermembran übertragen. Die erhaltenen Membranen wurden zugeschnitten, in Petrischalen gelegt und mit WB-Blockpuffer für 2 h auf einem Plattenschüttler bei 30 rpm und RT inkubiert. Der Blockpuffer wurde anschließend abgegossen und durch Waschpuffer ersetzt, zu dem pro Gel ein Primärantikörper in 1:1000-Verdünnung zugegeben wurde. Die Membranen wurden mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Plattenschüttler bei 30 rpm inkubiert und anschließend viermal mit frischem Waschpuffer gewaschen. Dann wurden die Sekundärantikörper zu den entsprechenden Membranen in einer 1:1000-Verdünnung in Waschpuffer zugegeben und für 1 h bei RT und 30 rpm auf dem Plattenschüttler inkubiert. Nach 5 weiteren Waschschrritten in Waschpuffer wurden die Gele mit Clarity™ Western ECL Substrate zur Chemilumineszenz-Analyse angefärbt und Bilder mit dem ChemiDoc MP Imaging System aufgenommen.

2.2.8. Bestimmung der Telomeraseaktivität

Die Telomeraseaktivität von Zelllinien wurde mit dem TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} Assay auf der Grundlage von Zellextrakten festgestellt. Dieser Assay kombiniert eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit einem Enzym-gekoppelten Immunadsorptions-Assay (ELISA) und erlaubt damit eine semiquantitative Bestimmung der Telomeraseaktivität. Die Durchführung erfolgte in einer DNA- und RNA-freien Umgebung, um falsche Ergebnisse zu vermeiden.

Die Extrakte erhielt man, indem die zu untersuchenden Zellen wie in Abschnitt 2.2.1.1. beschrieben passagiert wurden, nach einer Zellzahlbestimmung 2×10^5 Zellen in ein neues Mikrozentrifugengefäß gegeben und für 5 min bei 3.000 g und 4 °C zentrifugiert wurden. Das erhaltene Pellet wurde einmal in 200 µl PBS gewaschen und nochmal bei den gleichen Parametern zentrifugiert. Anschließend wurden pro Probe 200 µl #1 Lysis reagent zugegeben, die Mikrozentrifugengefäße für 30 min auf Eis inkubiert und dann für 20 min bei 16.000 g und 5 °C zentrifugiert. Von den Proben wurden je 175 µl in ein neues Mikrozentrifugengefäß überführt und das Volumen mit #1 Lysis reagent auf 200 µl aufgefüllt. Die Proben wurden auf 10 µl Aliquote in Mikrozentrifugengefäßen aufgeteilt und entweder bei sofortiger Weiterverarbeitung auf Trockeneis aufbewahrt oder bei -80 °C gelagert.

Zur Durchführung des Assays wurden pro Probe zwei 10 µl Aliquote auf Trockeneis benötigt. Je ein Aliquot wurde für 10 min bei 85 °C auf einem Thermocycler erhitzt und anschließend auf Eis gelagert.

Im Rahmen des Assays wurde zuerst eine PCR-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden pro Assay-Well auf der PCR-Platte für den Mastermix 25 µl #2 Reaction mixture und 5 µl #3 Internal Standard gemischt und in die auf Eis gelagerte PCR-Platte übertragen. Diese Mischung enthält sowohl einen mit Biotin markierten Primer als Angriffspunkt für die in den Proben enthaltene Telomerase als auch ein durch Telomerase amplifizierbares Primerpaar als internen Standard, mit dem PCR-Produkte einer spezifischen Länge generiert werden. Pro Assay-Durchführung wurden je 2 PCR-Reaktions-Wells als Negativkontrolle sowie für die Assay-internen Kontrollen „low“ und „high“ mit angesetzt. Zu den Wells für die Negativkontrolle wurde je 1 µl #1 Lysis reagent gegeben, zu den „low“-Wells je 1 µl #4 Control template low und zu den „high“-Wells je 1 µl #5 Control template high. Alle Zellproben wurden ebenfalls in Doppelbestimmung aufgetragen, dabei wurden pro Zellprobe je die hitzeinaktivierte und die nicht vorbehandelte Probe vermessen. Von den Zellproben wurden pro Assay-Well ebenfalls je 1 µl zugegeben. Anschließend wurde das Flüssigkeitsvolumen in allen Assay-Wells mit #6 Nuclease-free Water auf 50 µl aufgefüllt und die PCR-Platte mit einer Folie verschlossen, um Verdunstungen zu vermeiden. Die PCR-Platte wurde in den Thermocycler überführt und das in Tab. 11 dargestellte Programm gestartet.

Tabelle 11. Parameter des PCR-Programms zur Telomerasebestimmung

Dauer	Temperatur	Wiederholungszyklen
10 min	25 °C	
5 min	94 °C	
30 s	94 °C	} 30 Gesamtzyklen
30 s	50 °C	
1,5 min	92 °C	
10 min	72 °C	
bis zur Weiterverarbeitung (max. 30 min)	4 °C	

In einer neuen, zweiten PCR-Platte wurden entsprechend dem im Abb. 6 gezeigten Schema die notwendige Anzahl an Wells mit je 10 µl Lösung #7 Denaturation reagent befüllt. Anschließend wurden entsprechend des in Abb. 6 gezeigten Pipettierschemas pro Well 2,5 µl der PCR-Produkte nach Abschluss des PCR-Programms aus der ersten Platte in die zweite PCR-Platte übertragen und für 10 min bei RT inkubiert, um die PCR-Produkte zu denaturieren.

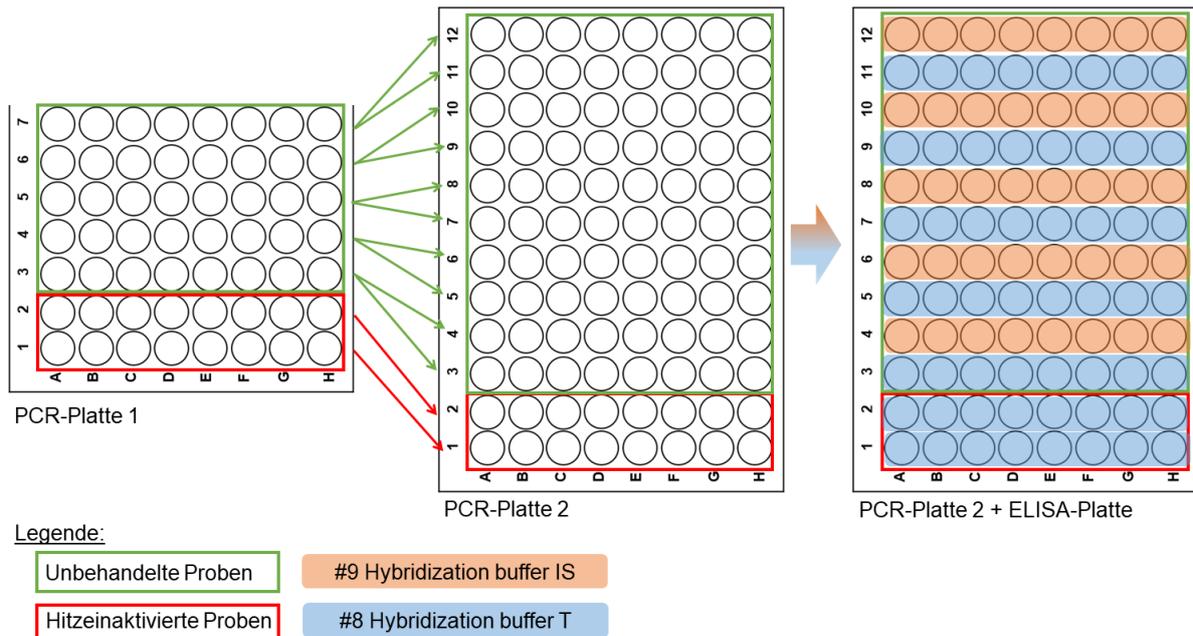


Abbildung 6. Flussschema der Probenübertragung und -behandlung beim TeloTAGG-Assay.

Danach wurden entsprechend der Übersicht in Abb. 6 in die zweite PCR-Platte pro Well entweder 100 µl #8 Hybridization buffer T oder 100 µl #9 Hybridization buffer IS zugegeben, um die Proben mit den jeweiligen Puffer-Lösungen zu hybridisieren. Die Pufferlösung #8 enthält hierbei Detektionssonden, die spezifisch an die von der Telomerase produzierte Nukleotid-Sequenz binden, während die Detektionssonden im Puffer #9 sich spezifisch an die Nukleotid-Sequenz des PCR-Produktes des internen Standards anlagern. Dabei ist eine Aufteilung der hitzeinaktivierten Proben und nachfolgende Zugabe des Puffers für die weitere Analyse des internen Standards nicht notwendig, da die Telomerase in diesen Proben durch die Hitzebehandlung vor der PCR deaktiviert wurde und damit keine Vervielfältigung auf der Grundlage des internen Standards stattgefunden haben kann.

Nun folgte der ELISA-Teil des Assays. Dafür wurde die zweite PCR-Platte auf einem Plattenschüttler kurz durchmischt und dann pro Well je 100 µl der denaturierten und hybridisierten Proben in die ELISA-Platte übertragen, die Antikörper für die Bindung der Biotin-markierten Primer aus Lösung #2 enthielt. Die ELISA-Platte wurde nun ebenfalls mit einer Folie verschlossen, um Verdunstungen zu vermeiden und auf einem Plattenschüttler für 2 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus der Platte vollständig abgesaugt, ohne dabei die am Boden immobilisierten PCR-Produkte zu berühren, und dann dreimal mit je 250 µl #10 Washing buffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde eventuell verbleibende Lösung auf einem Tuch ausgeklopft. Eine 50-fache Verdünnung des Sekundärantikörpers #11 Anti-Dig-HRP mit #12 Conjugate dilution buffer wurde frisch hergestellt und pro Well 100 µl dieser Lösung zugegeben. Die Platte wurde nochmal für 30 min

bei 300 rpm und RT inkubiert, dreimal mit 250 µl #10 Washing buffer gewaschen und Rest-Flüssigkeit auf einem Tuch ausgeklopft. Zum Schluss wurden pro Well 100 µl #13 TMB substrate zugegeben, welches von dem am Sekundärantikörper angeschlossenen Enzym verstoffwechselt werden konnte und so zu einer Farbreaktion mit Bildung eines blauen Farbstoffes führte. Die Platte wurde bei 300 rpm auf einem Plattenschüttler inkubiert, bis die blaue Färbung ausreichend an Stärke zugenommen hatte. Dann wurde die Reaktion in allen Wells durch Zugabe von je 100 µl #14 Stop reagent chemisch unterbunden und die Absorbanz des gebildeten Farbstoffes im Tecan infinite 200 bei 450 nm als Messwellenlänge und 690 nm als Referenzwellenlänge gemessen. Die erhaltenen Extinktionswerte E wurden in eine Excel-Datei exportiert und die relative Telomeraseaktivität (RTA) basierend auf folgender Gleichung berechnet:

$$RTA = \frac{(E_{Probe\ mit\ Puffer\ \#8\ T} - E_{hitzeinaktivierte\ Probe}) / E_{Probe\ mit\ Puffer\ \#9\ IS}}{(E_{interne\ Kontr.\ mit\ Puffer\ \#8\ T} - E_{Negativkontrolle}) / E_{interne\ Kontr.\ mit\ Puffer\ \#9\ IS}} * 100$$

Diese Berechnung wurde für jede Probe einmal gegenüber dem internen Standard „low“ und einmal gegenüber dem internen Standard „high“ durchgeführt. Die Wahl des internen Standards zur Bewertung der Endergebnisse wurde getroffen, indem derjenige Standard ausgewählt wurde, bei dem alle Extinktionswerte der Proben unterhalb von 2,0 lagen, um eine Übersättigung der Enzyme bei der Farbreaktion auszuschließen.

2.2.9. Bestimmung des oxidativen Stresses

Der intrazelluläre oxidative Stress wurde anhand des 2',7'-Dichlorofluoreszeindiazetat-Assays (DCFDA-Assay) bestimmt. Bei diesem Assay wurde der zellpermeable Stoff DCFDA durch reaktive Sauerstoffspezies, einem essentiellen Bestandteil der intrazellulären oxidativen Stressreaktion, zu einem Metaboliten mit Eigenfluoreszenz umgewandelt, wodurch eine quantitative Bestimmung der oxidativen Stressreaktion möglich wurde. Da dieser Assay einige Waschschrte beinhaltet, wurde für differenzierte LUHMES-Zellen das Herstellerprotokoll für Suspensionszellen anstelle dessen für adhärenente Zellen verwendet. Die Integrität der Verbindung der LUHMES-Zellen mit den Protein-beschichteten Zellkulturoberflächen nahm mit zunehmender Differenzierungsdauer ab, da die zur Beschichtung verwendeten Proteine von enzymatischen Prozessen abgebaut werden konnten. Ein unkontrollierbarer Zellverlust während der Waschschrte des Assays würde eine zuverlässige Quantifizierung der Ergebnisse unmöglich machen. Deshalb wurden die LUHMES-Zellen für den Assay wie unter Abschnitt 2.2.1.1. beschrieben passagiert und als Suspensionszellen behandelt. Der durch die Passage eventuell ausgelöste Stress war zu vernachlässigen, da er alle Zellen gleichermaßen betraf.

Es wurden LUHMES-Zellen transfiziert mit dem Kontroll-GFP-Plasmid oder dem hTERT-GFP-Plasmid verwendet, die zu Beginn des Assays entweder für 48 h mit 10 μM MPP+ behandelt worden waren oder als Kontrolle mit normalem Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. Damit wurden 4 verschiedene Zellproben untersucht. Nach der Passage wurden die Zellen gezählt, pro Probe in zwei Mikrozentrifugengefäße je 9×10^5 Zellen gegeben und diese für 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in je 900 μl DCFDA-Lösung resuspendiert. Die Mikrozentrifugengefäße wurden anschließend bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit für 30 min im Dunkeln inkubiert. Währenddessen wurde eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte mit tert-Butylhydroperoxid (TBHP)-Lösung vorbereitet. TBHP fungierte dabei als Positivkontrolle, da es die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies auslöst. Pro Probe wurden 100 μl 25 μM TBHP-Lösung zu 3 Wells der Mikrotiterplatte zugegeben, zu 3 anderen Wells wurde als Kontrolle PBS zugeben. Die Mikrozentrifugengefäße wurden nach der Inkubation im Dunkeln für 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Zellpellets wurden zum Waschen in je 900 μl Assay-Puffer resuspendiert, anschließend erneut bei den gleichen Parametern zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Zellpellets wurden nun in je 450 μl Assay-Puffer resuspendiert und auf die Wells der 96-well-Mikrotiterplatte verteilt. Dabei wurden pro Well 50 μl Zellsuspension zugegeben. Die Platte wurde zum Mischen für 10 s auf einem Plattenschüttler bei 700 rpm bewegt und anschließend bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit für 3 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde zur Quantifizierung die Fluoreszenz in den Wells der 96-Well-Mikrotiterplatte mit dem Tecan infinite 200 bei 485 nm Exzitation und 535 nm Emission gemessen.

2.2.10. Nanopartikelproduktion

2.2.10.1. Nanopartikelherstellung

Nanopartikel wurden basierend auf dem Protokoll von Pahuja et al. [26] mit einigen Modifikation inspiriert von Shin et al. [49] hergestellt. Für jede Charge Dopamin-beladener Nanopartikel wurde eine Kontrollcharge ohne Dopamin nach identischem Protokoll hergestellt. Zur Herstellung der Dopamin-beladenen Nanopartikel wurden 100 mg Dopamin in 1 ml 10 mM Salzsäure mit 2 % Polivinylalkohol (PVA) gelöst. Diese erste wässrige Phase wurde in die organische Phase, bestehend aus 50 mg Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) gelöst in 5 ml Dichlormethan und 100 μl 1 mg/ml LumogenRot 305 in DMSO, innerhalb von 1,5 min eingetroppt, während die Mischung mit einem Sonopuls mit Ultraschallwellen einer Pulsstärke von 30 % homogenisiert wurde. Direkt nach Abschluss der ersten Homogenisation wurden erneut Ultraschallimpulse einer Stärke von 70 % für 1,5 min ausgelöst, während 10 ml einer 1 % PVA-Lösung als Teil der zweiten wässrigen Phase langsam zugegeben wurden. Die

gesamte Mischung wurde dann nochmals 3,5 min mit einer Pulsstärke von 30 % beschallt. Der Rest der zweiten wässrigen Phase, weitere 30 ml 1 % PVA-Lösung wurden in einem Becherglas mit einem Rührfisch bei 1200 rpm gerührt. Die Emulsion, die bei der Ultraschallbehandlung entstand, wurde direkt nach Ende der Beschallung tropfenweise in das Becherglas zugegeben. Die entstandene finale Emulsion wurde für mindestens 3 h oder über Nacht bei einer konstanten Rührgeschwindigkeit von 1200 rpm inkubiert, um dem Lösemittel Dichlormethan Zeit zum Verdampfen zu geben. Anschließend wurde die Emulsion für 30 min in einen Exsikkator unter Vakuum gestellt, um sicherzustellen, dass das Dichlormethan vollständig entfernt wurde. Die Nanopartikelsuspension wurde auf Mikrozentrifugengefäße aufgeteilt und für 45 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert, um die Nanopartikel zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und die Nanopartikel in sterilem MilliQ-Wasser auf einem Thermoschüttler bei 700 rpm und 4 °C wieder gelöst. Dieser Schritt wurde noch einmal zum Waschen der Partikel wiederholt. Die erhaltenen Partikelsuspensionen wurden direkt für die Charakterisierung der erhaltenen Nanopartikel verwendet und im Anschluss umgehend zur Lagerung lyophilisiert.

2.2.10.2. Charakterisierung der Nanopartikel

Zur Bestimmung der Parameter hydrodynamischer Durchmesser, Polydispersitätsindex (PDI) und Zetapotenzial wurde ein Teil der hergestellten Partikelsuspension 1:1000 in MilliQ-Wasser verdünnt, in Einwegküvetten umgefüllt und mit dem Zetasizer ZS vermessen. Für jede Messung wurden 3 unabhängige Messzyklen mit je 10 Einzelmessung gemittelt, um ein zuverlässiges Ergebnis zu erhalten.

Zur Bestimmung der Partikelmenge in der Suspension wurden pro Charge in 4 zuvor ausgewogene Wägeschälchen je 10 µl der unverdünnten Partikelsuspension pipettiert, die Schälchen für 2 h bei 70 °C getrocknet, anschließend für 30 min unter Vakuum im Exsikkator abgekühlt und direkt im Anschluss nochmal ausgewogen. Aus der Gewichts Differenz wurde die Nanopartikelkonzentration in der Ausgangssuspension in mg/ml bestimmt.

2.2.10.3. Lyophilisierung der Nanopartikel

Die Lyophilisierung wurde basierend auf einem Protokoll von Kleimann [98] durchgeführt. Nach der gravimetrischen Vermessung wurde die Partikelsuspension mit sterilem MilliQ-Wasser auf eine Konzentration von 4 mg/ml eingestellt. Die verdünnte Suspension wurde auf Lyophilisierungsgefäße aufgeteilt und mit einer identischen Menge 6 % Poloxamer 188-Lösung vermischt. Die Gefäße wurde in einen Lyophilisator gestellt und folgender Gefriertrocknungszyklus gewählt: Eine initiale Trocknung bei -40 °C bei einem Umgebungsdruck von 1,0 bar für 24 h gefolgt von einer sekundären Trocknung bei -20 °C und 0,01 bar für

12 h oder bis alle verbleibende Flüssigkeit verdampft ist. Nach Ende der Lyophilisierung wurden die Gefäße unter Vakuum verschlossen, aus dem Lyophilisator genommen und bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.11. Dopaminquantifizierung durch HPLC-MS

Für die Vorbereitung und Durchführung der Bestimmung der Dopaminkonzentration mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (HPLC-MS) wurden ausschließlich Lösungen mit einem für die Massenspektrometrie angemessenen Reinheitsgrad verwendet.

Zur korrekten Messung des in den Nanopartikeln enthaltenen Dopamins musste die Nanopartikelstruktur aufgelöst werden. Dazu wurden 10 µl einer Nanopartikelsuspension mit 950 µl Acetonitril (ACN) versetzt mit 0,2 % Heptafluorbuttersäure (HFBA) gemischt und für 1 min auf einem Vortexer durchmischt. Anschließend wurde die Mischung für 10 min in einem Ultraschallbad inkubiert, um die Partikelstruktur endgültig aufzubrechen. Dann wurden 200 µl Wasser mit 0,2 % HFBA zugegeben, um dem hydrophilen Dopamin ein ideales Lösungsmedium zur Verfügung zu stellen, die Mischung nochmal kurz auf dem Vortexer gemischt und anschließend für 5 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert, um die Polymerbestandteile vom gelösten Dopamin zu trennen. Pro Probe wurden 800 µl des Überstandes in HPLC-Vials zur Messung übertragen.

Bei Proben aus der Zellkultur wurden 50 µl der Probe genutzt, ansonsten verlief die Aufreinigung identisch wie für reine Nanopartikelsuspensionen.

Zur Quantifizierung wurde eine Kalibriergerade für Dopamin in einer 1:1 Mischung aus ACN mit 0,2 % HFBA und Wasser mit 0,2 % HFBA angesetzt, in HPLC-Vials gegeben und mit den Proben vermessen.

Die Dopamin-Messung erfolgte an der Agilent 1260 Infinity mit Diodenarray-Detektor und nachgeschaltetem Q Exactive Focus Massenspektrometer. Es wurden 3 µl Probenvolumen pro Probe injiziert und über eine Accucore™ HILIC Säule mit einem Laufmittel aus 85 % ACN mit 0,2 % HFBA und 15 % Wasser mit 0,2 % HFBA und einem Fluss von 1,0 ml/min in einer Zeit von 6 min pro Lauf aufgetrennt. Die Säule war dabei auf 40 °C temperiert. Am DAD-Detektor wurden Spektren bei 280 nm zur Detektion und 360 nm als Referenz aufgezeichnet, die Auswertung erfolgte jedoch allein basierend auf den Daten der MS-Messung. Am Massenspektrometer wurden die ankommenden Stoffe positiv ionisiert, d. h. es wurden an jedes Molekül positive Ladungen in der Form von Protonen eingeführt. Die Ionisierungsparameter sind in Tab. 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Parameter zur Ionisierung an der ESI-Quelle des Massenspektrometers

Parameter	Wert
Sheath gas Flussrate	30
Aux gas Flussrate	1
Sweep gas Flussrate	5
Sprühspannung	4,00 kV
Kapillartemperatur	320 °C

Während der Messung wurden die Gesamtspektren aller Masse/Ladungs-Verhältnisse (m/z) im Bereich von 133,4 bis 2.000,0 m/z bei einer Auflösung von 70.000 aufgezeichnet, um bei der Auswertung mehr Optionen zu haben.

Bei der Auswertung wurde aus dem Vollspektrum ein Kanal mit einem Massenbereich von 154,08490 – 154,08990 m/z isoliert, um die Dopamin-Peaks auch bei niedrigen Konzentrationen exakt vom Hintergrundrauschen unterscheiden zu können. Die Kalibriergerade wurde basierend auf den Flächen unter den Kurven dieser isolierten Peaks erstellt und die unbekannt Proben anhand der Kalibriergerade quantifiziert. Dabei wurden alle von der Software durchgeführten Integrationen der Peakflächen überprüft, um falsche Integrationen auszuschließen.

2.2.12. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Zählung und Sortierung von Zellen basierend auf optischen Fluoreszenzmessungen.

2.2.12.1. Zellsortierung

Zur Sortierung der wie in Abschnitt 2.2.6.4 transduzierten LUHMES-Zellen wurden die transduzierten Populationen sowie eine nicht-transduzierte Population als Kontrolle wie in Abschnitt 2.2.1.1. passagiert und in PBS resuspendiert. Zur Einstellung des Sortier-Gates wurde zuerst die nicht-transduzierte Population vermessen und im grünen Fluoreszenzkanal das Gate so gesetzt, dass alle Ereignisse gerade so als negativ gewertet wurden. Anschließend wurden die transduzierten Populationen getrennt vermessen und die Zellen, die als positiv im grünen Fluoreszenzkanal identifiziert wurden, in mit 4 % BSA vorinkubierten und mit 4 ml PBS gefüllten Zentrifugenröhrchen im Sortierausgang gesammelt. Anschließend wurden die gesammelten Zellsuspensionen für 5 min bei 300 g zentrifugiert, in LUHMES-Proliferationsmedium resuspendiert und in PLO-Fibronectin-beschichtete Zellkulturgefäße ausgesät. Die LUHMES-Zellen der erhaltenen Populationen wurden nach einigen Tagen Proliferation nochmals überprüft und der Erfolg des Sortierens daran gemessen, dass mehr

als 90 % der Zellen positiv für GFP waren. Damit konnten die Populationen als annähernd rein im Hinblick auf erfolgreiche Transduktion angesehen und für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.12.2. Nanopartikelbindung und -aufnahme

Für Nanopartikeluntersuchungen im Hinblick auf Zellbindung und zelluläre Aufnahme ist die Durchflusszytometrie ebenfalls nutzbar. Da alle in dieser Arbeit hergestellten Nanopartikel LumogenRed 305 enthielten, zeigten sie eine rote Fluoreszenzfärbung und konnten somit im Durchflusszytometer (FACS) erkannt werden. Für Bindungsanalysen wurden bei bEnd.3-Zellen $1,25 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 , bei proliferierenden LUHMES-Zellen $2,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 und bei differenzierten LUHMES-Zellen $7,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 in 12-Well-Platten ausgesät. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen und durch Medium mit Nanopartikeln ersetzt. Lyophilisierte Nanopartikel wurden in MilliQ-Wasser gelöst, sodass eine Konzentration von 5 mg/ml der Nanopartikelsuspension erreicht wurde. Die resuspendierten Nanopartikel wurden für 30 min bei 700 rpm und RT inkubiert, um die Oberflächenbeschichtung mit dem ehemaligen Lyophilisationsstabilisator Poloxamer 188 zu ermöglichen. Anschließend wurden die Nanopartikelsuspensionen im Verhältnis 1:1 mit FKS gemischt und nochmals für 1 h bei RT und 700 rpm inkubiert, sodass sich Serumproteine an die Nanopartikel anlagern konnten. Anschließend wurden die Nanopartikelsuspensionen mit angewärmtem Zellkulturmedium der entsprechenden Zelllinien auf eine Nanopartikelkonzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt und diese Verdünnung auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Für Bindungsstudien wurden die Zellen nach 4 h Inkubation mechanisch abgeschabt und direkt im FACS analysiert, für Aufnahmestudien wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.1.1. beschrieben passagiert, in PBS resuspendiert und direkt im FACS analysiert. Bei der FACS-Analyse wurden Zellen zur Festlegung des Gates benutzt, die keinen Nanopartikeln ausgesetzt waren. In den anschließenden Messungen wurden Zellen mit gebundenen oder aufgenommenen Nanopartikeln als positiv im roten Fluoreszenzgate identifiziert und gezählt.

2.2.13. Zytotoxizitätsuntersuchung

Für Zytotoxizitätsstudien wurden die Reagenzien alamarBlue™ oder WST-1 verwendet, die beide Rückschlüsse auf die Zellviabilität zulassen, indem die Fähigkeit der Zellen, den im Reagenz enthaltenen Farbstoff zu reduzieren, gemessen wird. Beim alamarBlue™-Reagenz wird die Entstehung von Resazurin per Fluoreszenzmessung bei 560 nm Excitation und 610 nm Emission gemessen, während WST-1 die Bildung von Formazan und seine Quantifizierung über eine Absorbanzmessung bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm nutzt.

Für die Zytotoxizitätstests wurden $7,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 der differenzierten LUHMES-Zellen, $2,3 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 der proliferierenden LUHMES-Zellen, $1,5 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 der hBMEC-Zellen oder $1,1 \times 10^6$ Zellen pro cm^2 der hiPS-BCEC-Zellen in angemessenen Zellkulturoberflächen ausgesät. Bei den hBMEC-Zellen und den proliferierenden LUHMES-Zellen wurden die Assays 1 Tage nach Aussaat durchgeführt, bei den hiPS-BCEC-Zellen an Tag 10 der Differenzierung (2 Tage nach Passage und Aussaat in die Well-Platten) und bei den differenzierten LUHMES-Zellen an Tag 8 der Differenzierung.

Die Zytotoxizitätsbestimmung von MPP+ auf LUHMES-Zellen wurde durchgeführt, indem die LUHMES-Zellen beginnend an Tag 6 oder 7 der Differenzierung für 24 h (Tag 7) oder 48 h (Tag 6) verschiedenen Konzentrationen von MPP+ ausgesetzt wurden. An Tag 8 der Differenzierung wurde das Medium mit MPP+ durch frisches Medium ersetzt und pro Well so viel WST-1 zugegeben, dass die Menge 10 % des Zellkulturmediums entsprach. Die Platten wurden anschließend für 4 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und dann im Tecan infinite 200 vermessen.

Für Zytotoxizitätsstudien mit Nanopartikeln wurden die lyophilisierten Nanopartikel wie in Abschnitt 2.2.11.2. beschrieben gelöst und anschließend in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen in Well-Platten gegeben. Zusätzlich wurde eine frische Dopamin-Lösung hergestellt und in Konzentrationen, die denen des Dopamins enthalten in den Nanopartikeln entsprechen, zugegeben. Die Zellen wurden für 4 h oder 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, anschließend wurde das Medium mit Nanopartikeln oder Dopamin entfernt und durch frisches Wachstumsmedium mit 10 % alamarBlue™-Reagenz ersetzt. Die Platten wurden je nach Zelllinie so lange bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, bis ein offensichtlicher Farbumschlag ins rote in manchen Wells zu sehen war. Für alle Platten einer Zelllinie wurde eine identische Inkubationszeit verwendet und die Platten im Tecan infinite 200 vermessen.

2.2.14. Statistische Auswertung

Die dargestellten Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Alle Standardabweichungen wurden aus den Ergebnissen von mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Dabei bezieht sich ein unabhängiges Experiment immer auf einen kompletten Kultivierungszyklus, d.h. bei den pBCEC um einzelne Isolationen der Zellen, bei Differenzierungsprozessen zu verschiedenen Zeitpunkten aus getrennt ausgesäten Zellen begonnene Differenzierungen und bei anderen Zellkulturversuchen Ansätze nach unabhängigen Passagen. Signifikanzen wurden mit t-test oder ANOVA-Analyse mit der Software Origin ermittelt, wobei das Signifikanzniveau auf 0,05 festgelegt wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung erforderlicher Modellsysteme

Die Evaluierung der Wirksamkeit jeglicher neuen pharmakologischen Substanz beruht als erster Schritt auf ihrer Testung an relevanten In-vitro-Modellen. Um Nanopartikel zur Therapie von Morbus Parkinson zu bewerten, sind dabei zum einen Modelle der Blut-Hirn-Schranke als unumgängliche biologische Barriere zwischen Gehirn und Blutkreislauf und zum anderen ein Modell von bei Morbus Parkinson betroffenen Neuronen notwendig.

3.1.1. Humanes In-vitro-Blut-Hirn-Schranken-Modell

3.1.1.1. Vergleichbarkeit mit etabliertem tierischen Modell

Der Einsatz von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS) zur Etablierung von humanen In-vitro-Modellen ist in der Forschung von essentieller Bedeutung, sowohl um reproduzierbare Modelle humanen Ursprungs zu gewährleisten als auch um krankheitsspezifische Modelle aufbauen zu können. Bei der Neuetablierung dieser Modelle muss jedoch Sorge getragen werden, dass die so erhaltenen Ergebnisse in ein Verhältnis zu Ergebnissen gesetzt werden können, die mit vorher etablierten und standardmäßig verwendeten Modellen erlangt wurden. Die Blut-Hirn-Schranke wurde mit primären Zellen tierischen Ursprungs (Hausschwein, *Sus scrofa domestica*) modelliert, daher ist der Vergleich der Eigenschaften dieses Modells mit dem neu etablierten Modell basierend auf hiPS unerlässlich. Beide Modelle wurden auf ihre Eigenschaften im Hinblick auf Bildung einer dichten endothelialen Barriere und Expression relevanter Proteine untersucht.

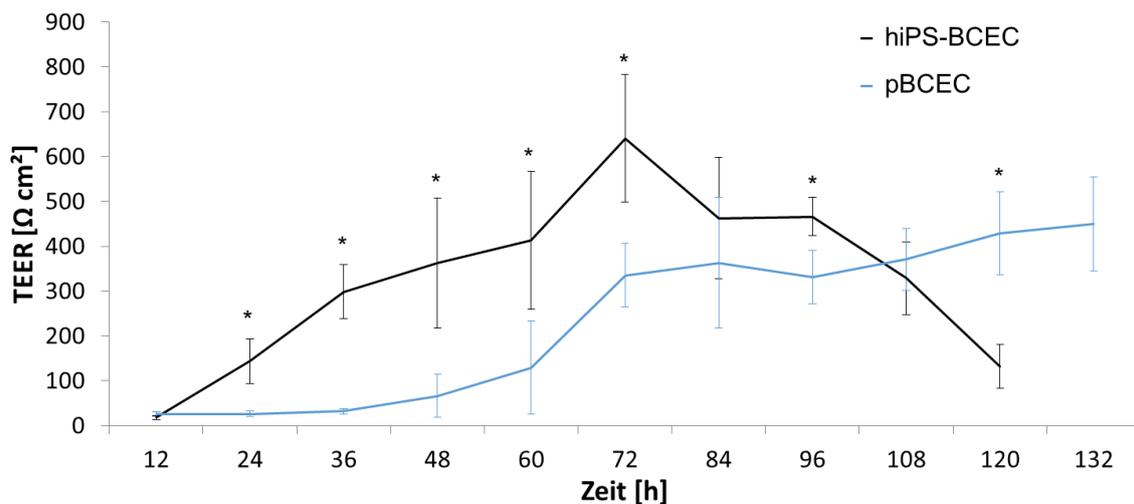


Abbildung 7. TEER-Werte der pBCEC- und hiPS-BCEC-Modelle. hiPS-BCEC wurden 8 Tage differenziert und dann auf Collagen-Fibronectin-beschichtete Membraneinsätze ausgesät. pBCEC wurden frisch isoliert und direkt auf Collagen-beschichtete Transwell®-Membranen ausgesät. TEER-Werte wurden in beiden Modellen vom Zeitpunkt der Aussaat auf die Membranen ausgehend gemessen und als Mittelwert mit Standardabweichungen von mehr als drei unabhängigen Experimenten dargestellt. * zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$. Modifiziert nach Danz et al. 2022 [96].

Wie in Abb. 7 zu sehen ist, erreichte das Primärzellmodell TEER-Werte von $450 \pm 105 \Omega \text{ cm}^2$ als Maximum 132 h nach der Aussaat, während das hiPS-basierte Modell sein Maximum bereits 72 h nach der Aussaat auf poröse Membranen erreichte, mit $640 \pm 140 \Omega \text{ cm}^2$. Damit erreichte das hiPS-basierte Modell TEER-Werte, die jene des primären Modells um etwa $190 \Omega \text{ cm}^2$ übertreffen. Zudem wurden diese hohen Werte auf der Membran-Oberfläche etwa 60 h früher erreicht. Insgesamt betrachtet sind die Verläufe der TEER-Wert-Entwicklung signifikant unterschiedlich: Der TEER-Wert-Anstieg der hiPS erfolgte schneller und steiler als bei den Primärzellen, allerdings fielen sie auch deutlich früher wieder ab. Die pBCEC hatten erst nach einer Aussaatzeit von mehr als 108 h im direkten Vergleich höhere TEER-Werte als die hiPS-BCEC, vorher waren die hiPS-BCEC auch nach Überschreiten ihres Maximums noch im Vorteil.

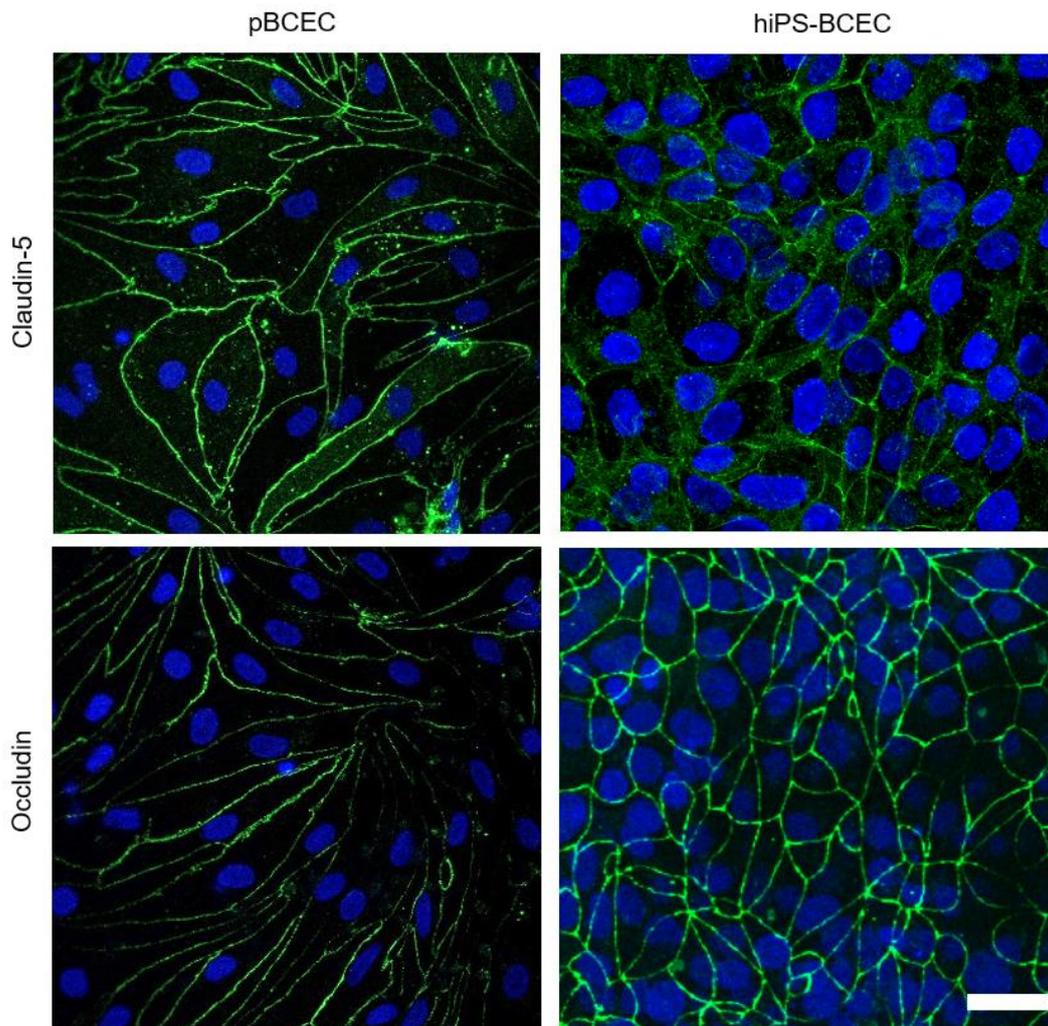


Abbildung 8. Immunfluoreszenzfärbung von pBCEC- und hiPS-BCEC-Zellen. Zellen beider Modelle wurden zum Zeitpunkt des maximalen TEER-Wertes auf den Membraneinsätzen fixiert und auf die Expression der *tight junction*-Proteine Claudin-5 und Occludin (grün) sowie zur Darstellung des Zellkerns (blau) gefärbt. Der Messbalken entspricht 25 µm. Modifiziert nach Danz et al. 2022 [96].

Durch Immunfluoreszenzfärbung wurden die *tight junction*-Proteine Claudin-5 und Occludin in beiden Modellen angefärbt. Die Färbungen in Abb. 8 zeigen, dass diese essentiellen Proteine für dichten Zell-Zell-Kontakt in beiden Modellen deutlich ausgeprägt auffindbar waren. Sie waren an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert und augenscheinlich durchgängig ausgebildet. Sie zeigten nicht nur eine gleichmäßige, starke Ausprägung, sondern machten gleichzeitig auch die Zellform, die den beiden Modellen zugrunde liegt, sichtbar. Bei den pBCEC hatten die Endothelzellen eine langgezogene Erscheinung, während sie im hiPS-BCEC-Modell mehr an Pflastersteine erinnerten. Durch diese kompaktere Form waren auch deutlich mehr Zellkerne in den entsprechenden Ausschnitten der Färbungen bei den hiPS-BCEC sichtbar.

Betrachtet man die Blut-Hirn-Schranke in Hinblick auf ihre Barrierefunktion, sind nicht nur TEER-Werte und Proteinexpression zu berücksichtigen. Vor allem die eigentliche Barrierefunktion in Bezug auf den Transport von Substanzen ist in der pharmazeutischen

Betrachtung essentiell. Dafür wurde die Permeabilität gegenüber spezifischen Markersubstanzen analysiert, in diesem Fall gegenüber Natriumfluoreszein (siehe Abb. 9).

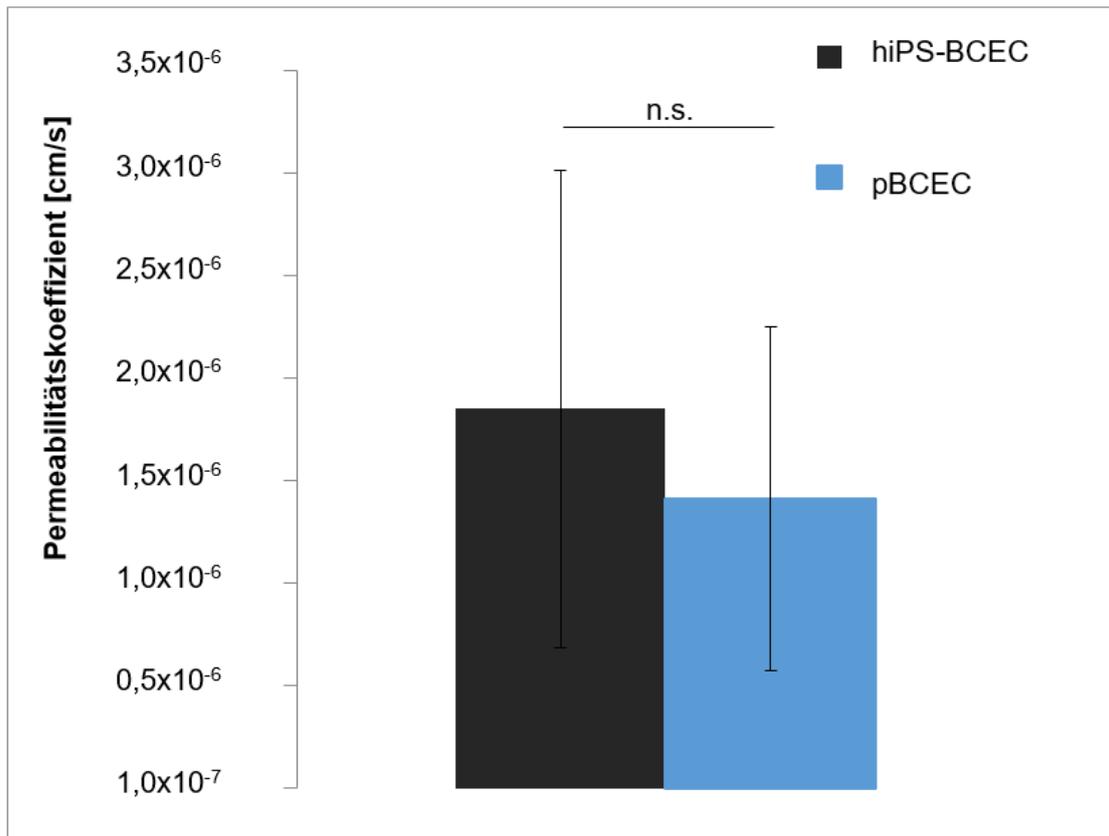


Abbildung 9. Permeabilitätskoeffizienten gegenüber Natriumfluoreszein der pBCEC- und hiPS-BCEC-Modelle. Permeabilitätsstudien wurden zum Zeitpunkt des maximalen TEER-Wertes durchgeführt. $1 \mu\text{M}$ Natriumfluoreszein wurde apikal zugegeben, für 4 h inkubiert und Proben apikal und basolateral entnommen und vermessen. Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichungen von mehr als drei unabhängigen Experimenten dargestellt, n.s. steht für einen nicht signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Modifiziert nach Danz et al. 2022 [96].

Die Permeabilitätskoeffizienten gegenüber Natriumfluoreszein lagen bei jeweils $1,85 \times 10^{-6}$ cm/s bzw. $1,41 \times 10^{-6}$ cm/s für die hiPS-basierte bzw. die Primärzell-Barriere. Durch die verhältnismäßig hohen Standardabweichungen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Permeabilitäten festzustellen. Die Durchschnittswerte für beide Barrieren lagen jedoch über 1×10^{-6} cm/s, einem Wert der in der Literatur [99] als Indikator für eine Blut-Hirn-Schranke mit ausreichender Dichte zur Darstellung der In-vivo-Situation angenommen wird.

3.1.1.2. Modellverbesserung zur In-vivo-Annäherung

In der Kultivierungsphase beider Zell-Modelle auf den porösen Membraneinsätzen zeigte sich in den Medienzusammensetzungen ein deutlicher Unterschied: Serum als ein Standardbestandteil von Zellkulturmedien wurde nur im hiPS-basierten Modell in dieser Kultivierungsphase eingesetzt. Das Primärzellmodell basierte in diesem Stadium vollständig

auf Serum-freiem Medium. Vergleicht man dies mit der Situation im menschlichen Körper, wird der Unterschied erklärt. Die Blut-Hirn-Schranke als Barriere sorgt durch ihre hochgradige Selektivität dafür, dass von den im Blut enthaltenen Serumbestandteile nur ausgewählte in ganz bestimmten Mengen auf die Hirn-Seite der Endothelzellen transportiert werden. Um diesen Zustand in den Modellen nachzustellen, wird die Medienzusammensetzungen beim ersten Medienwechsel nach Aussaat auf die Membraneinsätze variiert. Entweder wird das in den bisherigen Kultivierungsprotokollen verwendete Medium verwendet, oder es werden auf der apikalen und basolateralen Seite der Membraneinsätze verschiedene Medien zur gleichen Zeit eingesetzt - auf der apikalen Seite Medium mit 5 % Serumbestandteilen und auf der basolateralen Seite vollkommen Serum-freies Medium.

Es war nicht zu erwarten, dass diese Protokolländerung einen Einfluss auf die zu diesem Zeitpunkt bereits etablierten, Protein-basierten *tight junctions* hatte, die potenziellen Auswirkungen auf TEER-Werte und Permeabilität mussten jedoch betrachtet werden.

Bei den TEER-Werten des Primärzellmodells wie dargestellt in Abb. 10 waren die Werte im Modell mit unterschiedlichen Serumverteilungen auf beiden Seiten der Barriere konstant etwas höher als im Modell kultiviert nach dem Standardprotokoll, mit Ausnahme eines Zeitpunktes bei 108 h. Hier war ein kurzfristiges Absinken der TEER-Werte im Modell mit apikalem Serum sichtbar, auf das jedoch ein rapider erneuter Anstieg der TEER-Werte folgte. Dieser Unterschied war zwar zu keinem Zeitpunkt signifikant, aber vor allem nach längerer Kultivierungsdauer bei 132 h deutlich sichtbar. Hier stieg der maximale TEER-Wert von vorher $450 \pm 105 \Omega \text{ cm}^2$ auf $635 \pm 90 \Omega \text{ cm}^2$ nach Änderung der Serumverhältnisse.

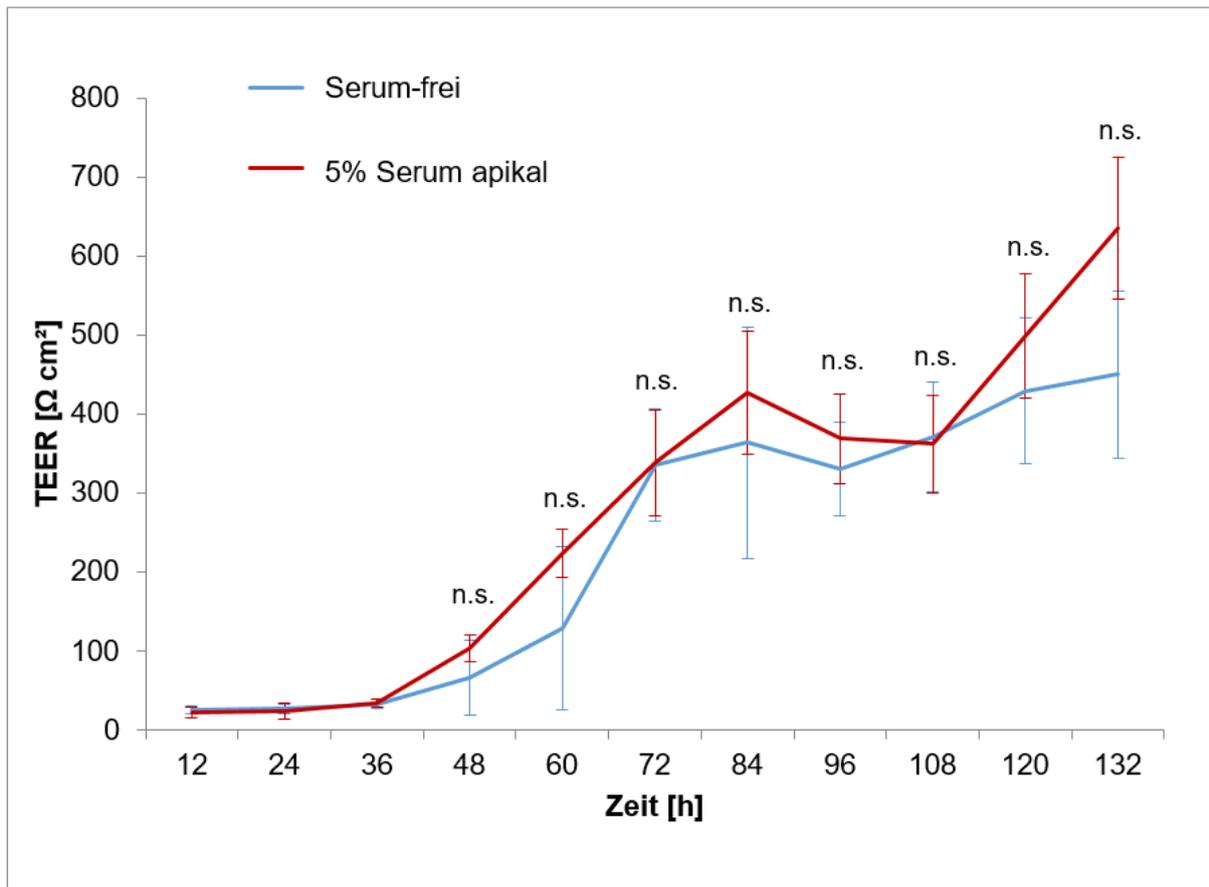


Abbildung 10. TEER-Werte des pBCEC-Modells bei unterschiedlichen Serumzugaben apikal. pBCEC wurden frisch isoliert und direkt auf Collagen-beschichtete Transwell®-Membranen ausgesät. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt und auf der apikalen Seite der Membran entweder Medium ohne Serum oder mit 5 % Serum zugegeben. TEER-Werte wurden vom Zeitpunkt der Aussaat auf die Membranen ausgehend gemessen und als Mittelwert mit Standardabweichungen von mehr als drei unabhängigen Experimenten dargestellt, n.s. steht für einen nicht signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Modifiziert nach Danz et al. 2022 [96].

Ähnliches war im hiPS-basierten Modell zu beobachten (Abb. 11): Die gemessenen TEER-Werte bei Einsatz von Serum ausschließlich auf der apikalen Seite waren über den gesamten Messzeitraum hinweg höher als im Modell mit gleichem Serumanteil im Medium auf beiden Seiten der Zellbarriere. Das Maximum der TEER-Werte bei 60 h stieg von $413 \pm 155 \Omega \text{ cm}^2$ auf $550 \pm 150 \Omega \text{ cm}^2$, die Unterschiede waren jedoch weiterhin nicht signifikant aufgrund der deutlichen Standardabweichungen.

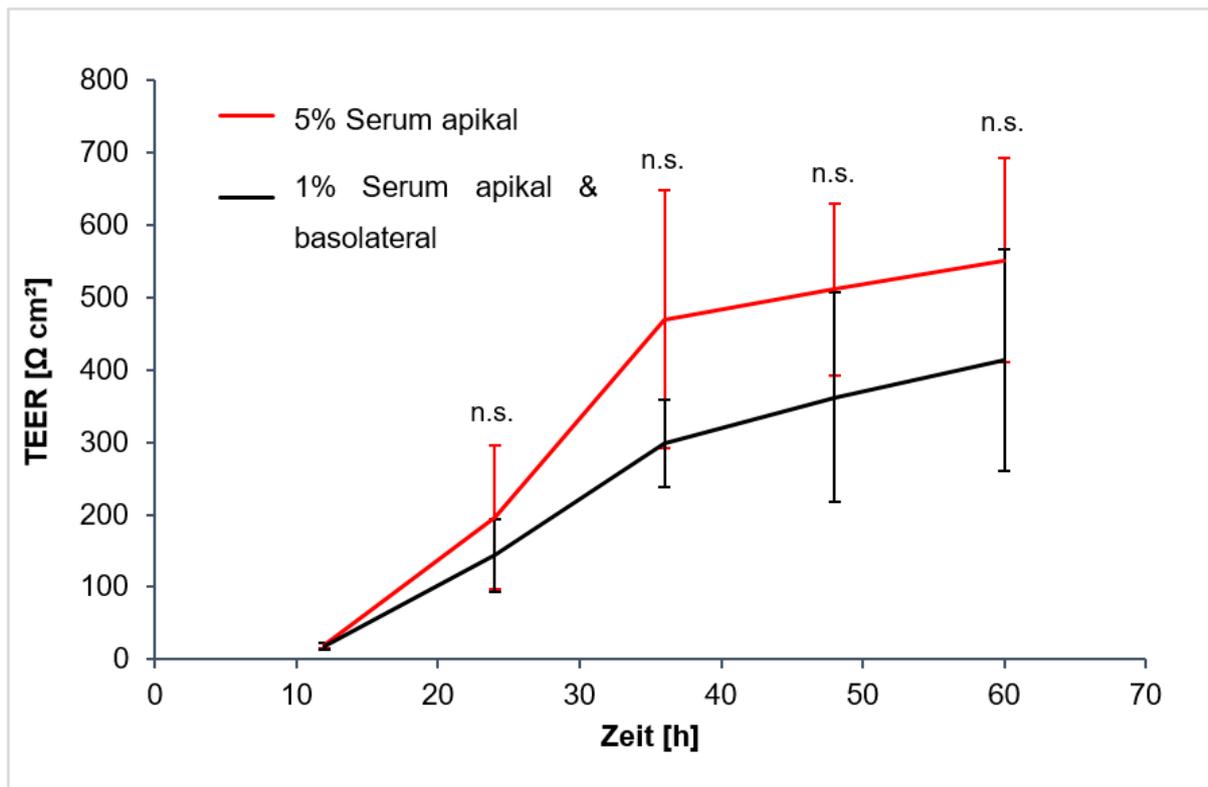


Abbildung 11. TEER-Werte des hiPS-BCEC-Modells. hiPS-BCEC wurden 8 Tage differenziert und dann auf Collagen-Fibronectin-beschichtete Membraneinsätze ausgesät. Nach einem Tag wurde beim Mediumwechsel apikal entweder Medium mit 1 % oder 5 % Serumanteil zugegeben, während basolateral immer 1 % verwendet wurde. TEER-Werte wurden in 12-Stunden-Intervallen vom Zeitpunkt der Aussaat auf die Membranen ausgehend als Mittelwert mit Standardabweichungen von mehr als drei unabhängigen Experimenten dargestellt, n.s. steht für einen nicht signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Modifiziert nach Danz et al. 2022 [96].

Bei den Permeabilitätskoeffizienten war eine noch deutlichere Reaktion sichtbar. Wie in Abb. 12 zu sehen ist, sank der Permeabilitätskoeffizient in beiden Modellen beim nur einseitigen Einsatz von Serum unter die Marke von 1×10^{-6} cm/s. Bei den pBCEC lag er bei $0,62 \times 10^{-6}$ cm/s, bei den hiPS-BCEC bei $0,84 \times 10^{-6}$ cm/s. Aufgrund der hohen Standardabweichungen war allerdings auch hier kein signifikanter Unterschied feststellbar.

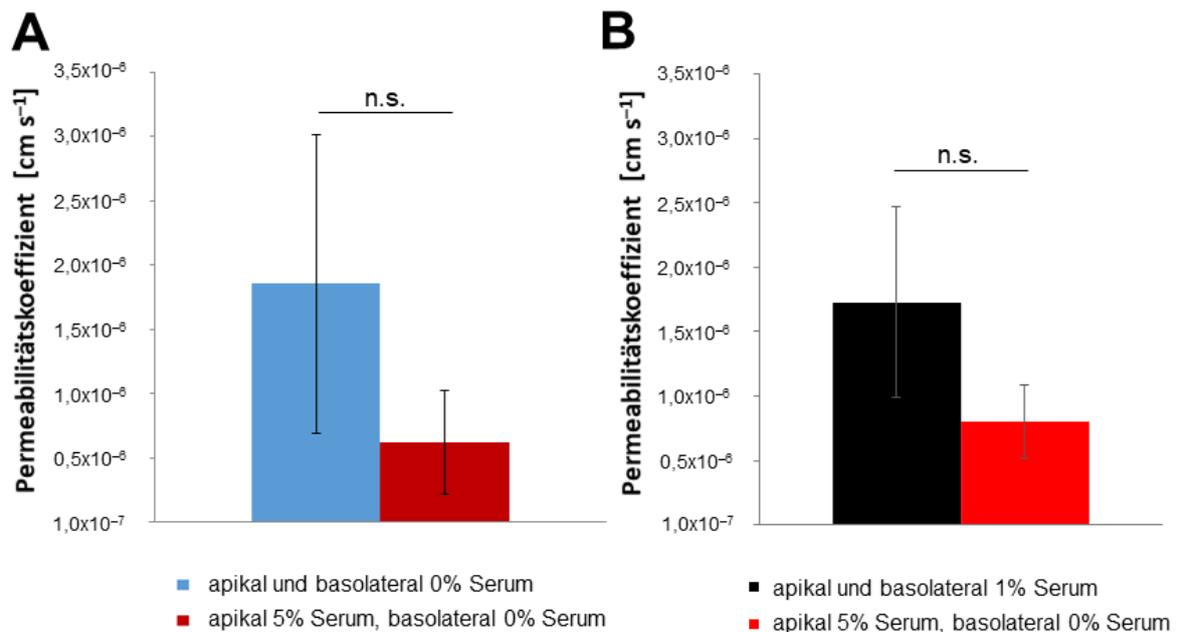


Abbildung 12. Veränderung der Permeabilitätskoeffizienten in Abhängigkeit der eingesetzten Serumkonzentration apikal. Permeabilitätstest bei (A) pBCEC mit Standardmedien (blau) oder apikal 5 % Serum (dunkelrot) und (B) hiPS-BCEC mit Standardmedium (schwarz) oder apikal 5 % Serum (rot) wurden zum Zeitpunkt des maximalen TEER-Wertes \pm 12 h durchgeführt. Apikal wurde $1 \mu\text{M}$ Natriumfluoreszein zugegeben und Proben von der apikalen und basolateralen Seite der Modelle nach 4 h Inkubation entnommen und vermessen. Mittelwert mit Standardabweichungen wurden von mehr als drei unabhängigen Experimenten berechnet, n.s. steht für einen nicht signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Modifiziert nach Danz et al. 2022 [96].

Die Höhe der Standardabweichungen war vor allem der eingesetzten Messmethode geschuldet. Die Fluoreszenz-basierte Quantifizierung ist zwar ein sehr genaues Messverfahren, jedoch kann die Genauigkeit noch verbessert werden, beispielsweise durch den Einsatz radioaktiv markierter Substanzen. Gleichzeitig kann die spezifische Barrierefunktion genauer analysiert werden durch den Einsatz von Substanzen mit bekanntem Permeabilitätsverhalten *in vivo*. Zu diesem Zweck wurde die hiPS-basierte Barriere herangezogen und als Substanzen wurden Inulin als nicht-Barriere-gängiges, natürliches Makromolekül und Diazepam als Barriere-gängiger pharmakologischer Wirkstoff benutzt, beide radioaktiv markiert durch ^{14}C -Kohlenstoff. Abb. 13 zeigt, dass die Permeabilitäten der beiden Stoffe signifikant unterschiedlich waren.

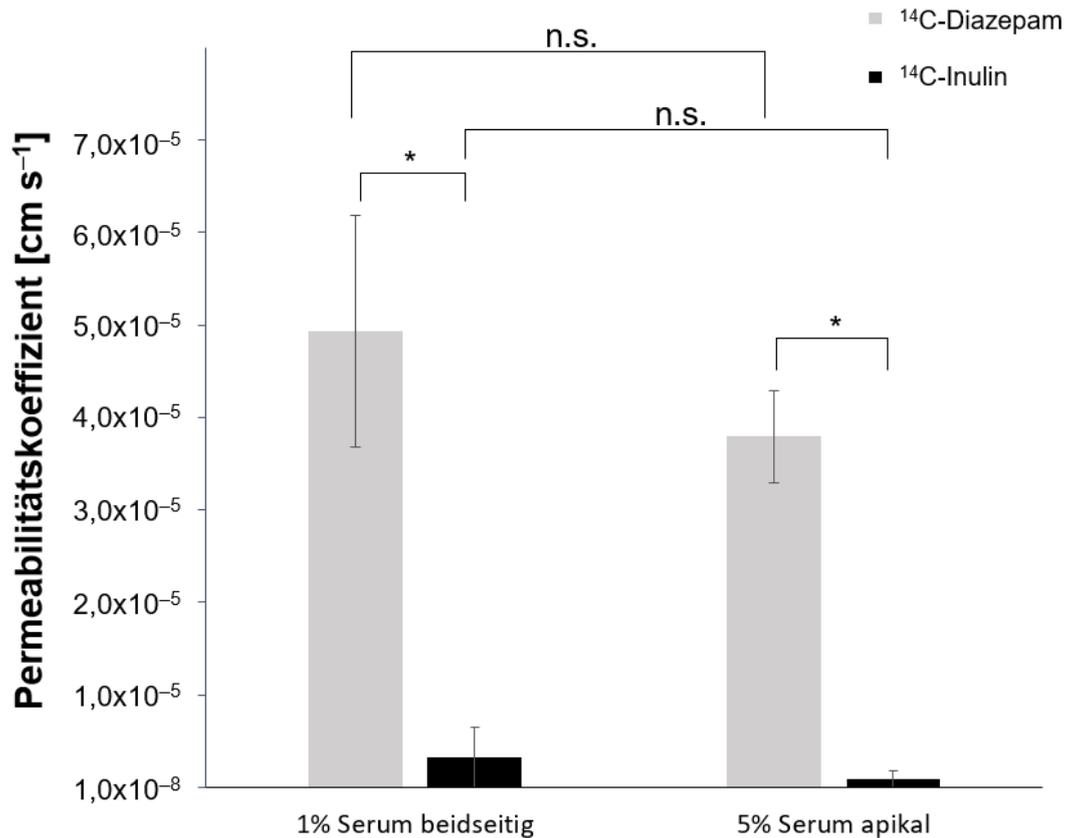


Abbildung 13. Permeabilitäten der hiPS-BCEC gegenüber Inulin und Diazepam bei apikaler Serumveränderung. hiPS-BCEC wurden auf Collagen-Fibronectin-beschichteten Membraneinsätzen mit konstant 1 % Serum oder apikal 5 % Serum und basolateral Serumfrei inkubiert. Zum Zeitpunkt der maximalen TEER-Werte \pm 12 h wurde apikal 13 kBq ¹⁴C-Inulin oder ¹⁴C-Diazepam zugegeben und für 3 h inkubiert. Apikale und basolaterale Proben wurden vermessen und Mittelwert mit Standardabweichungen der Permeabilitätskoeffizienten von mehr als drei unabhängigen Experimenten dargestellt. * zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$; n.s. steht für einen nicht signifikanten Unterschied. Modifiziert nach Danz et al. 2022 [96].

¹⁴C-Diazepam hatte hohe Permeabilitätswerte mit $49,3 \times 10^{-6}$ cm/s bei gleichen Serumverteilungen und $37,9 \times 10^{-6}$ cm/s bei nur apikalem Serumeinsatz. Im Gegensatz dazu lagen die Permeabilitäten von ¹⁴C-Inulin mit $3,19 \times 10^{-6}$ cm/s oder $0,89 \times 10^{-6}$ cm/s im Modell mit beidseitigem oder nur apikalem Medium im Bereich von Natriumfluoreszein, einer nicht Barriere-gängigen Substanz. Die signifikanten Permeabilitätsunterschiede beider Substanzen innerhalb eines Modells basierten auf den grundlegend unterschiedlichen Eigenschaften beider Stoffe. Betrachtete man immer nur entweder ¹⁴C-Diazepam oder ¹⁴C-Inulin und verglich die Permeabilitätswerte zwischen den Modellen mit verschiedenem Serumeinsatz, waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Es war jedoch zu sehen, dass die Permeabilitäten beider Stoffe sanken und auch die Standardabweichungen geringer wurden, wenn nur apikal Serum eingesetzt wurde. Dies war nicht nur ein Indiz für eine dichtere Barriere, sondern demonstrierte gleichzeitig eine exaktere Selektivität im Hinblick auf die

Permeabilitätseigenschaften. Noch deutlicher konnte die verbesserte Selektivität mit Hilfe der sogenannten „dynamic range“ dargestellt werden (Abb. 14).

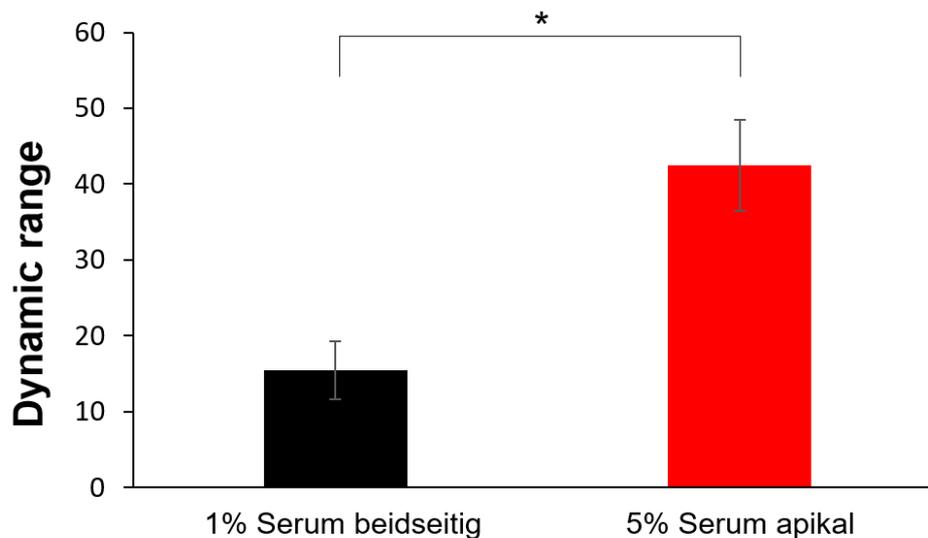


Abbildung 14. Dynamisches Permeabilitätsverhalten der hiPS-BCEC gegenüber Inulin und Diazepam bei apikaler Serumveränderung. hiPS-BCEC wurden auf Collagen-Fibronectin-beschichteten Membraneinsätzen mit konstant 1 % Serum oder apikal 5 % Serum und basolateral Serum-frei inkubiert. Zum Zeitpunkt der maximalen TEER-Werte \pm 12 h wurden Permeabilitätskoeffizienten von ^{14}C -Inulin und ^{14}C -Diazepam bestimmt. Die „dynamic range“ wurde durch dividieren des Permeabilitätskoeffizienten von ^{14}C -Diazepam durch den Permeabilitätskoeffizienten von ^{14}C -Inulin bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden von mehr als drei unabhängigen Experimenten bestimmt. * zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$. Modifiziert nach Danz et al. 2022 [96].

Die „dynamic range“ wurde bestimmt, indem der Permeabilitätskoeffizient des lipophilen ^{14}C -Diazepams durch den Permeabilitätskoeffizienten des hydrophilen ^{14}C -Inulins geteilt wurde [79]. Dabei ergab sich bei gleicher Serumverteilung ein Wert von $15,5 \pm 3,9$ und bei 5 % Serum nur auf der apikalen Seite der Barriere ein Wert von $42,5 \pm 6,0$. Dieser signifikante Anstieg des dynamischen Permeabilitätsverhaltens zeigte eine deutliche Verbesserung des für die Blut-Hirn-Schranke typischen selektiven Transportverhaltens.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das humane, hiPS-basierte Blut-Hirn-Schranken-Modell signifikant höhere TEER-Werte als das Primärzell-basierte Modell erreichte, die Eigenschaften in Hinblick auf *tight junction* Protein-Expression und Permeabilität der Markersubstanz Natriumfluoreszein waren jedoch vergleichbar. Eine Angleichung beider Modelle hin zu In-vivo-ähnlichen Serumverhältnissen erhöhte die TEER-Werte und senkte die Permeabilitätswerte, die Verbesserungen waren jedoch nicht signifikant, wenn einzeln betrachtet. Erst durch die Analyse der dynamic range wurde gezeigt, dass der einseitige Serumeinsatz zu einer signifikanten Verbesserung der Permeabilität führt. Des Weiteren ist zu beachten, dass zur In-vitro-Analyse von pharmakologischen Substanzen für den Einsatz im Menschen In-vitro-Modelle menschlichen Ursprungs jenen tierischen Ursprunges vorzuziehen sind, da die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ohne zusätzlichen Speziesunterschied höher

einzuschätzen ist. Daher war das hiPS-BCEC-Modell mit nur einseitigem Serumeinsatz für weitere Untersuchungen zu favorisieren.

3.1.1.3. Etablierung hiPS-basierter Blut-Hirn-Schranken-Modelle eines gesunden Spenders und eines Morbus Parkinson-Patienten

Pharmakologische Substanzen zur spezifischen Therapie einer Erkrankung sollten in der präklinischen der Testung nicht ausschließlich an entweder Modellen basierend auf Zellen von gesunden Spendern oder spezifischen Krankheitsmodellen untersucht werden, sondern immer an beiden Modellsystemen. Dadurch soll untersucht werden, ob ein eventueller Wirkstofftransport krankheitsspezifisch beeinflusst wird. Gleichzeitig eröffnet die Testung an Modellen verschiedener Erkrankungen die Möglichkeit, Einsatzmöglichkeiten bei anderen Erkrankungen zu evaluieren, sollte dort ebenfalls eine positive therapeutische Wirkung erreicht werden.

Im Fall des humanen hiPS-basierten Blut-Hirn-Schranken-Modells mussten im Rahmen dieser Arbeit ein Modell basierend auf hiPS von einem gesunden Spender und ein Modell aus hiPS von einem Parkinson-Patienten aufgebaut werden. Die ausgewählte hiPS-Linie für Morbus Parkinson war dabei von einem Patienten mit sporadischem Morbus Parkinson anstatt einer Linie basierend auf einer spezifischen genetischen Mutation, um ein breiteres Spektrum der Parkinson-Erkrankung abzudecken. Zur Evaluierung der etablierten Modelle wurden die gleichen Parameter herangezogen, wie beim Vergleich von Primärmodell und hiPS-basiertem Modell zuvor: TEER-Werte, Permeabilität gegenüber Natriumfluoreszein und Immunfluoreszenzfärbung von spezifischen Markerproteinen.

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, waren die TEER-Werte der Barrieren differenziert aus hiPS von gesundem Spender und Morbus Parkinson-Patient vergleichbar. Das Maximum der TEER-Werte im gesunden Modell lag bei $551 \pm 150 \Omega \text{ cm}^2$ zum Zeitpunkt 60 h, im Parkinson-Modell wird das Maximum bei 72 h mit $508 \pm 41 \Omega \text{ cm}^2$ erreicht. Der Anstieg der TEER-Werte im Parkinson-Modell erfolgte etwas weniger steil als im gesunden Vergleichsmodell, fing dagegen aber etwas früher an. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wechselte das Modell mit dem höchsten Wert zwischen gesundem und Parkinson-Modell. Die Standardabweichungen und Kurvenverläufe beider Modelle waren jedoch insgesamt vergleichbar, es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den TEER-Werten vorhanden.

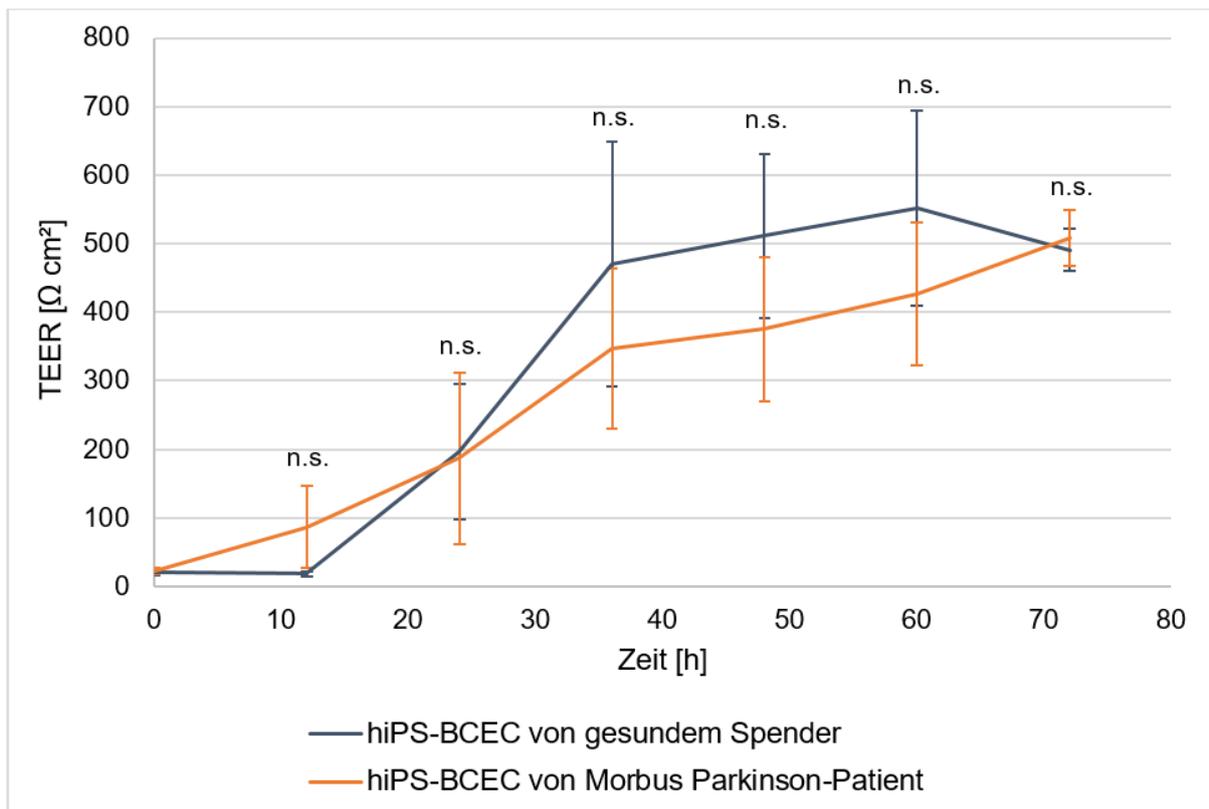


Abbildung 15. TEER-Werte von hiPS-BCEC-Modellen aus gesunder oder Morbus Parkinson-Zellquelle. hiPS eines gesunden Spenders (blaugrau) oder eines Morbus Parkinson-Patienten (orange) wurden 8 Tage zu hiPS-BCEC differenziert und dann auf Collagen-Fibronectin-beschichtete Membraneinsätze ausgesät. TEER-Werte wurden vom Zeitpunkt der Aussaat auf die Membranen ausgehend gemessen und als Mittelwert mit Standardabweichungen von mehr als drei unabhängigen Experimenten gezeigt, n.s. steht für einen nicht signifikanten Unterschied ($p > 0,05$).

Abb. 16 verdeutlicht, dass auch die Permeabilität gegenüber der Markersubstanz Natriumfluoreszein keine merkbaren Unterschiede zwischen den Modellen zeigen konnte. Während es bei der Membrankontrolle ohne Zellen zu erwarten war, dass die Werte unabhängig vom Modell gleich sind, war die starke Vergleichbarkeit im Modell mit Zellen ein Ausdruck ähnlicher Eigenschaften unabhängig von der genutzten Zelllinie. Der Permeabilitätskoeffizient im Modell mit Zellen vom gesunden Spender lag bei $0,93 \times 10^{-6} \pm 0,38$ cm/s, im Modell mit Zellen vom Parkinson-Patienten bei $0,88 \times 10^{-6} \pm 0,28$ cm/s. Damit liegt kein signifikanter Unterschied vor und die Permeabilitätskoeffizienten beider Modelle liegen unterhalb der zuvor benannten Literatur-Marke von 1×10^{-6} cm/s.

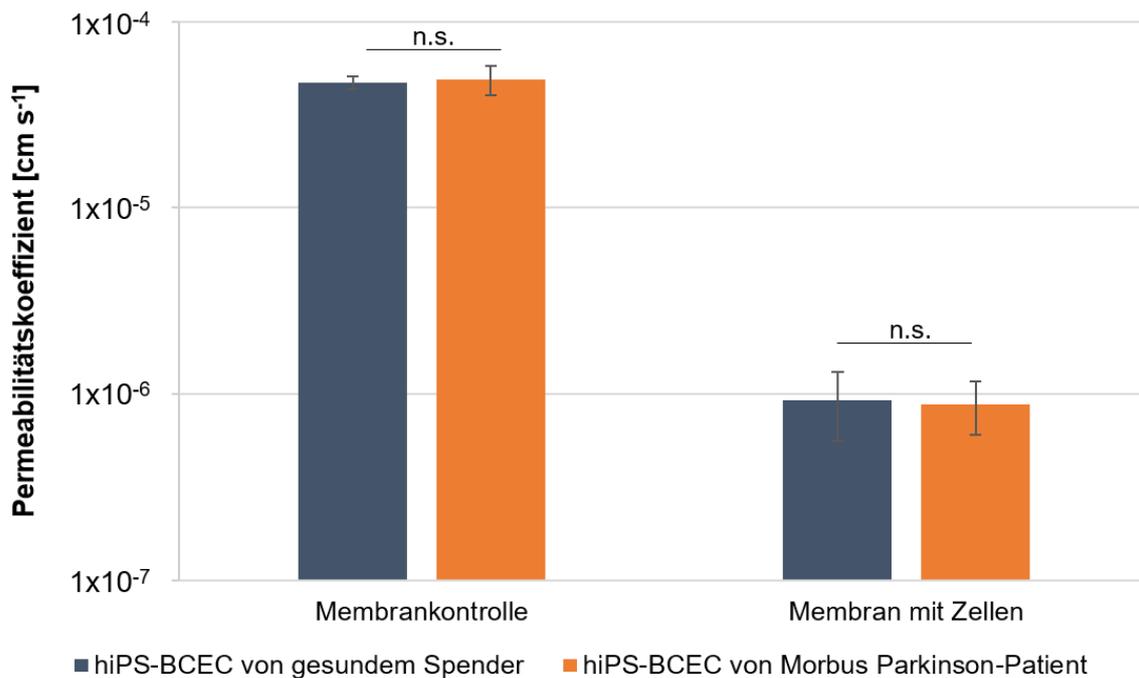


Abbildung 16. Permeabilität gegenüber Natriumfluoreszein für hiPS-BCEC eines gesunden Spenders und eines Parkinson-Patienten. Zum Zeitpunkt des maximalen TEER-Wertes \pm 12 h wurden apikal zum gesunden (blaugrau) oder Morbus Parkinson-Modell (orange) je 1 μ M Natriumfluoreszein zugegeben. Apikale und basolaterale Proben wurden nach 4 h Inkubation in Kontrollwells ohne Zellen (links) oder hiPS-BCEC-Modell-Wells entnommen und vermessen. Der Mittelwert \pm Standardabweichungen wurde von mehr als drei unabhängigen Experimenten abgebildet, n.s. steht für einen nicht signifikanten Unterschied ($p > 0,05$).

Immunfluoreszenzfärbungen zur Proteinexpression wurden nicht nur für die *tight junction* Proteine Occludin und Claudin-5 genutzt, sondern zusätzlich wurden auch spezifische Transporter mit angefärbt, die an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert werden: Glut-1 und P-gp (Abb. 17).

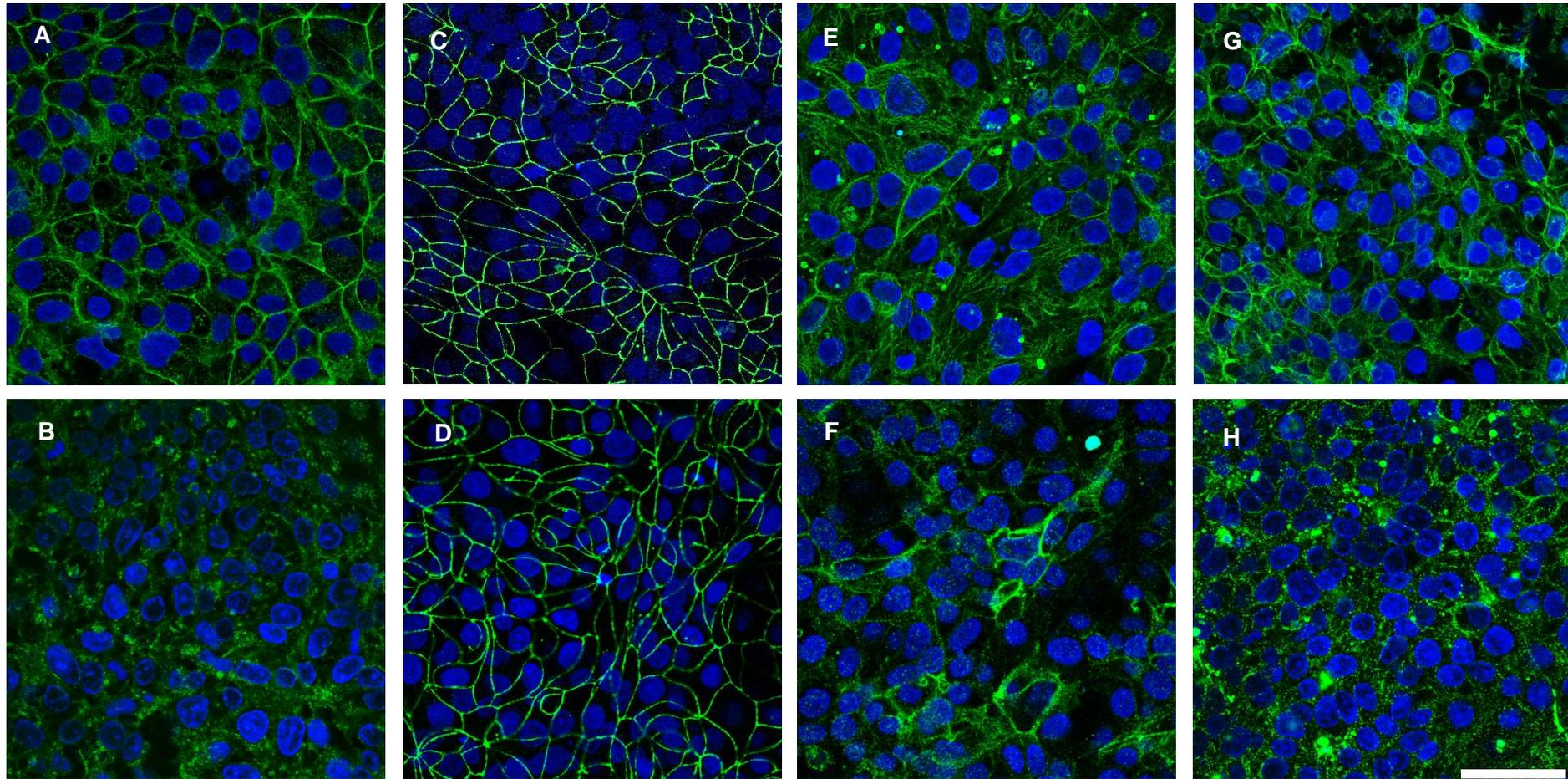


Abbildung 17. Immunfluoreszenzfärbung von gesunden und Morbus Parkinson-hiPS-BCEC-Zellen. hiPS von gesundem Spender (A, C, E, G) oder Morbus Parkinson-Patient (B, D, F, H) wurden zu hiPS-BCEC differenziert und zum Zeitpunkt des maximalen TEER-Wertes auf den Membraneinsätzen fixiert. Die Expression der *tight junction*-Proteine Claudin-5 (A, B) und Occludin (C, D) sowie der Transporter Glut-1 (E, F) und P-gp (G, H) wurde mit Antikörpern (grün) gefärbt und die Zellkerne mit DAPI (blau). Der Messbalken entspricht 50 μm .

Während die Färbungen deutlich zeigten, dass alle untersuchten Proteine in beiden Modellen exprimiert wurden, gab es doch im Expressionsmuster selbst einige Unterschiede. Die Occludin-Expression war in beiden Zelllinien deutlich erkennbar an den Zell-Zell-Grenzen ausgeprägt. Dies war auch für Claudin-5 im gesunden Modell der Fall. Im Parkinson-Blut-Hirn-Schranken-Modell dagegen waren Expressionen an den Zell-Zell-Grenzen zwar vorrangig vorhanden, das Expressionsmuster war aber bei weitem nicht so gleichmäßig. Die Proteinexpression hatte ein eher punktuell Muster, das die Zell-Zell-Grenze zwar erkennen ließ, sie ist aber nicht so durchgängig anfärbte, wie im gesunden Modell, von einigen Teilstellen abgesehen. Bei den Transportern P-gp und Glut-1 war das Expressionsmuster in beiden Modellen vergleichbar in Hinblick auf Lokalisation und Ausprägung der Proteinexpression. Es waren Zell-Zell-Grenzen sichtbar wie auch lokale Ansammlungen der Transporter. Besonders deutlich war das für P-gp im gesunden Blut-Hirn-Schranken-Modell zu sehen. Es war allerdings festzustellen, dass im Parkinson-Blut-Hirn-Schranken-Modell insgesamt gesehen die Expression schwächer war. Es waren mehrere Stellen vorhanden, an denen die Expression zu einer schwächeren Färbung führte und das Muster war teils unterbrochen. Trotz dieser geringen Unterschiede im Proteinexpressionsprofil zwischen den Blut-Hirn-Schranken-Modellen differenziert aus hiPS-Zellen eines gesunden Spenders und eines Parkinson-Patienten, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf Barriere-Integrität und -Funktion. Basierend auf der Analyse der TEER-Werte und Permeabilitätskoeffizienten war davon auszugehen, dass beide Modelle eine intakte Barriere darstellten, die für Transportstudien eingesetzt werden konnte.

3.1.2. Neuronales Parkinson-Modell

Die Etablierung eines neuronalen Parkinson-Modells basierte auf der gerichteten Differenzierung von LUHMES-Zellen zu dopaminergen Neuronen basierend auf einem bereits publizierten Protokoll [88]. Wie in Abb. 18 zu sehen ist, veränderte sich über die Dauer des sechstägigen Differenzierungsprozesses das Aussehen der Zellen. Die neuronalen Vorläufer LUHMES-Zellen mit kleinen Zellkörpern und nur wenigen angedeuteten Ausläufern bildeten ein verzweigtes axonales Netzwerk zwischen den einzelnen Zellkörpern aus. Dabei wurden die Zellkörper selbst nochmals etwas kleiner.

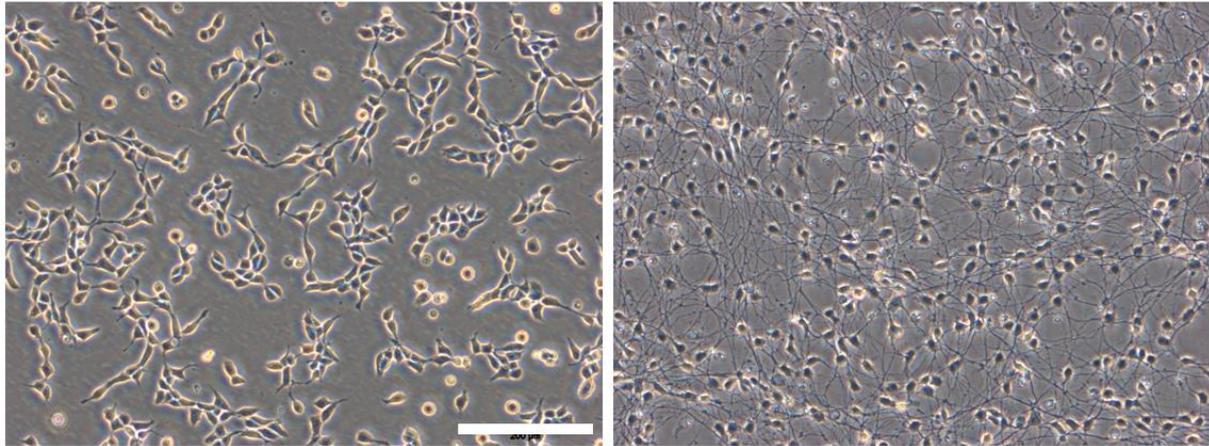


Abbildung 18. Mikroskopische Darstellung von proliferierenden und differenzierten LUHMES-Zellen. Proliferierende LUHMES-Zellen (links) wachsen in losen Verbänden und bilden nur kurze Zellausläufer, während für 6 Tage differenzierte LUHMES-Zellen (rechts) ein Geflecht von Axonen ausgebildet haben, das die Zellkörper miteinander verbindet. Der Messbalken entspricht 200 μm .

3.1.2.1. Charakterisierung

Um die Zuverlässigkeit der Differenzierung nach Protokoll zu kontrollieren, wurden drei spezifische Markerproteine der dopaminergen Neuronen durch Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Abb. 19 zeigt die Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) als essentielles Enzym des Dopaminstoffwechsels, dem Dopamin-Transporter (DAT) und dem Dopamin-Autorezeptor (D2S), die für die neuronale Kommunikation mit Dopamin als Neurotransmitter von essentieller Bedeutung sind.

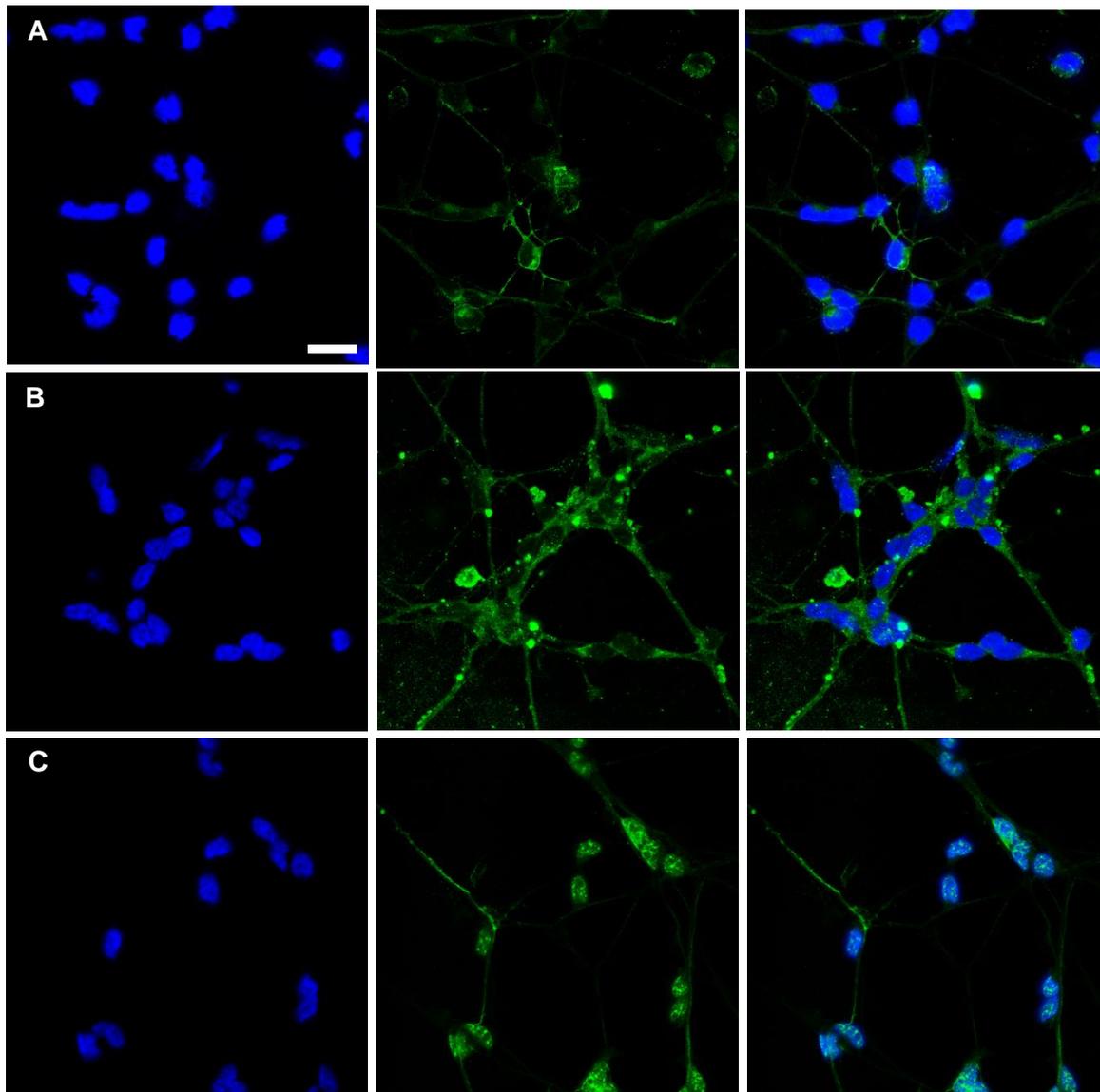


Abbildung 19. Immunfluoreszenzfärbung von differenzierten LUHMES-Zellen. LUHMES-Zellen wurden an Tag 6 der Differenzierung zu dopaminergen Neuronen fixiert und mit Primärantikörpern (grün) gegen typische Markerproteine gefärbt: Dopamin-Transporter (A), Dopamin-Autorezeptor (B) und Tyrosin-Hydroxylase (C), die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Bilder auf der linken Seite zeigen die Kernfärbung, in der Mitte sind die Antikörperfärbungen zu sehen und rechts ist eine Überlagerung der beiden Färbungen gezeigt. Der Messbalken entspricht 25 μm .

Die mittlere Spalte der Immunfluoreszenzbilder in Abb. 19 zeigt jeweils die Antikörperfärbungen für DAT (A), D2S (B) und TH (C). Es war deutlich zu sehen, dass die Expression von DAT und D2S nicht nur im Bereich der Zellkörper in Nähe des Nukleus zu finden war, sondern sich auch über die Axone erstreckte. TH dagegen war teilweise an Axonen zu finden. Die Hauptexpression war allerdings mit dem Nukleus zusammen lokalisiert und konzentrierte sich auf den kleinen Zellkörper der Neurone.

3.1.2.2. Chemisch induzierter Morbus Parkinson

Um Morbus Parkinson auf zellulärer Ebene zu modellieren, wurde 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) eingesetzt. Diese aktive Form des 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) wird spezifisch von dopaminergen Neuronen über den Dopamin-Transporter aufgenommen und löst beim Menschen Symptome aus, die dem Morbus Parkinson auf motorischer Ebene exakt entsprechen. In der Zellkultur führte die Exposition von differenzierten LUHMES-Zellen sowohl zu optischen Veränderungen und hatte auch einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität.

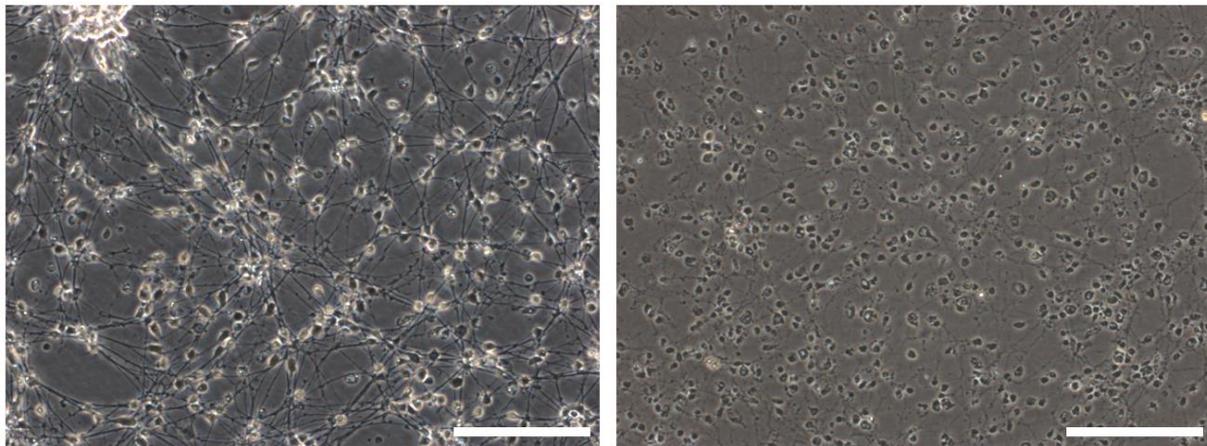


Abbildung 20. Mikroskopische Darstellung differenzierter LUHMES-Zellen mit oder ohne chemisch induziertem Morbus Parkinson. 6 Tage differenzierte LUHMES-Zellen im gesunden Zustand (links) oder nach 48 h Exposition mit 10 µM MPP⁺ zur chemischen Induktion von Morbus Parkinson (rechts) sind gezeigt. Das im gesunden Zustand gut erkennbare Axongeflecht ist im Parkinson-Modell deutlich zurückgegangen. Der Messbalken ist 200 µm.

Wie in Abb. 20 zu sehen ist, verloren die differenzierten LUHMES-Zellen nach 48 h Exposition mit 10 µM MPP⁺ deutlich an optischem Kontrast, was ein Hinweis auf abnehmende zelluläre Integrität war. Außerdem waren die Axone kaum noch zu erkennen und hatten ein gepunktetes Erscheinungsbild angenommen, das auch deren Integrität in Frage stellte.

Analysierte man die Zellviabilität auf Grundlage der Fähigkeit der Zellen, Resazurin zu reduzieren, wurde deutlich, dass die optischen Veränderungen sich nicht genauso deutlich dort widerspiegeln (Abb. 21). Das Reduktionspotenzial der LUHMES-Zellen nahm mit steigender MPP⁺-Konzentration ab, unabhängig davon, ob es sich um undifferenzierte Zellen handelte, oder ob die differenzierten Neurone für 24 h oder 48 h dem MPP⁺ ausgesetzt wurden. Es bestand immer ein Unterschied in der Zellviabilität zwischen proliferierenden LUHMES-Zellen und differenzierten, 48 h exponierten Zellen. Dennoch war dieser Unterschied nur für MPP⁺-Konzentration von 10 µM und 25 µM MPP⁺ signifikant. Zudem war auch der Unterschied zwischen 24 h-Exposition und 48 h-Exposition bei einer MPP⁺-Konzentration von 50 µM signifikant. Die Zellviabilität fiel in den verschiedenen Zell-Zuständen zu

unterschiedlichen Zeitpunkten unter die Marke von 70 %, die in der Forschung als Scheidemarke zwischen noch gesunden und nicht mehr gesunden Zellen angesehen wird. Die proliferierenden LUHMES-Zellen unterschritten diesen Wert erst bei einer MPP+-Konzentration von 50 μM , genauso wie die 24 h exponierten, differenzierten Zellen. Bei einer 48-stündigen Exposition dagegen unterschritten die differenzierten LUHMES-Zellen diesen Wert bereits bei einer Konzentration von 10 μM MPP+. Um diesen signifikanten Unterschied auszunutzen, sowie Kontroll-Zellen mit möglichst wenig negativ beeinflusstem internen Stoffwechsel zu gewährleisten, wurde für weitere Experimente die Konzentration von 10 μM MPP+ und eine Expositionsdauer von 48 h gewählt.

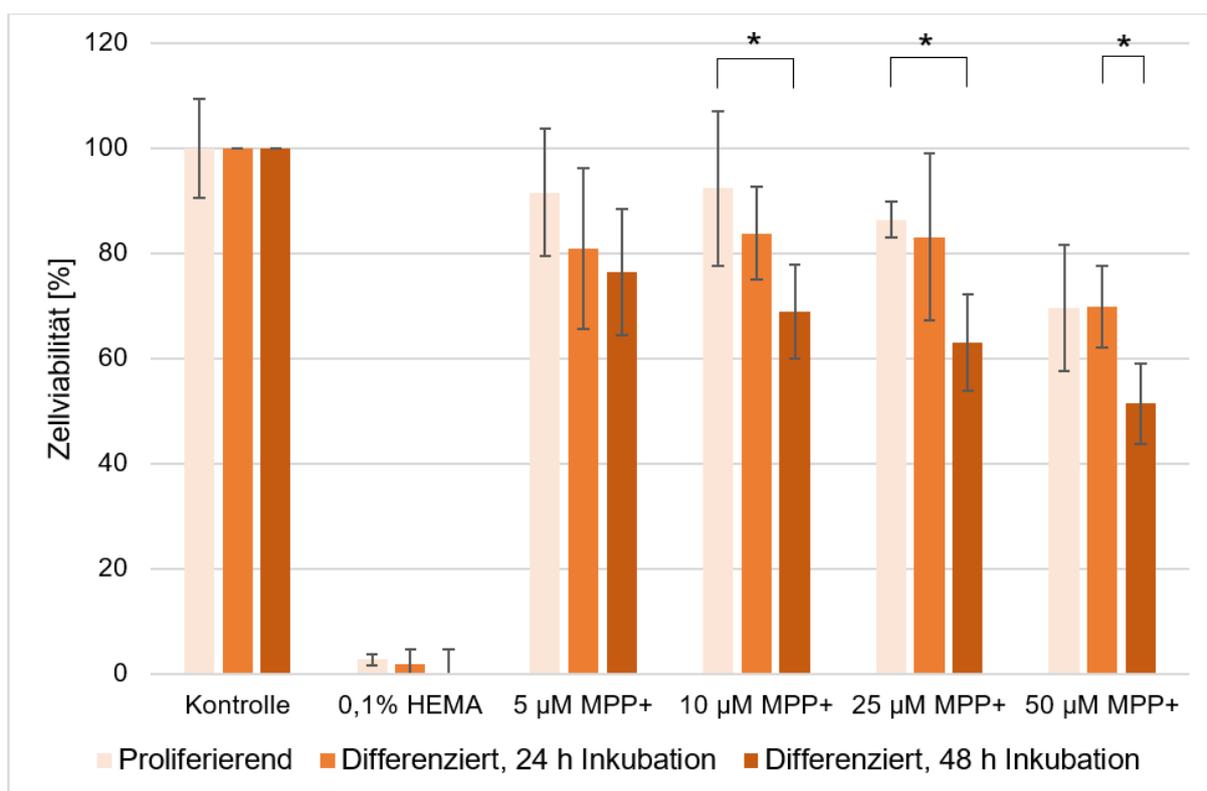


Abbildung 21. Zytotoxizitätsstudie von LUHMES-Zellen bei MPP+-Exposition. Verschiedene Konzentrationen von MPP+ oder 0,1 % HEMA als Positivkontrolle wurden für 48 h mit proliferierenden LUHMES-Zellen (rosa) oder mit min. 6 Tage differenzierten LUHMES-Zellen für 24 h (orange) oder 48 h (dunkelorange) inkubiert. Die Zytotoxizität wurde mittels WST-1 basierend auf ihrem Reduktionspotenzial bestimmt. Zur Auswertung wurden unbehandelte Zellen auf 100 % gesetzt und der Mittelwert mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten berechnet. * zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

Basierend auf dem Wirkmechanismus von MPP+ und um ein genaueres Bild der intrazellulären Prozesse zu erhalten, wurde eine mRNA-Analyse mit anschließender Zuordnung zu zellulären Kommunikations-Kaskaden (sogenannte „pathway analysis“) mit Schwerpunkt auf oxidativem Stress in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Meese am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Saarland durchgeführt.

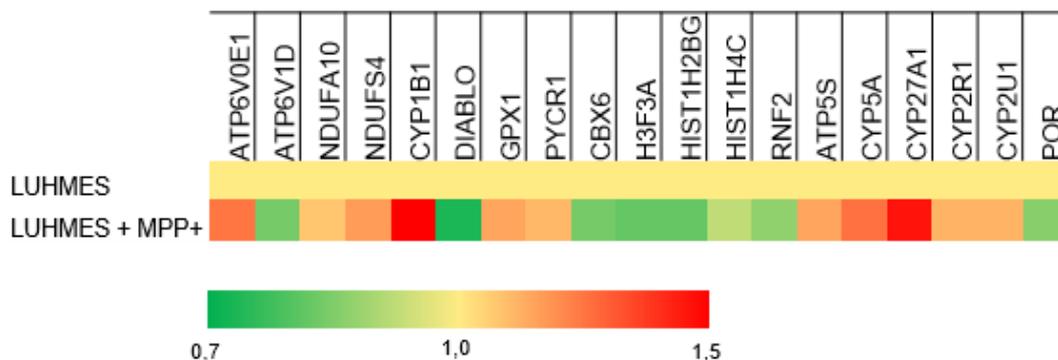


Abbildung 22. Heat map am stärksten beeinflusster Genexpressionen bei chemisch induziertem Morbus Parkinson aufgeteilt nach Prozessdatenbank. Differenzierte LUHMES Zellen als gesundes Modell (obere Reihe, LUHMES) oder nach chemischer Induktion von Morbus Parkinson mit 10 μ M MPP+ für 48 h (untere Reihe, LUHMES + MPP+) wurden auf ihre Genexpression im Hinblick auf Gene von oxidativen Stress-Prozessen analysiert. Eine grüne Färbung zeigt eine Herabregulation, eine rote Färbung eine Hochregulation. Die Farbtiefe spiegelt die Stärke der Veränderung wieder. Werte basieren auf Mittelwerten von 3 unabhängigen Experimenten.

Abb. 22 zeigt die durch MPP+ - Exposition veränderten Signalkaskaden, entweder durch Hoch- oder Herunterregulation von Genen beteiligt an der Regulation von oxidativem Stress. Dabei gibt Tab. 13 einen Überblick über die Funktion der in Abb. 22 benannten zellulären Kommunikationswege.

Tabelle 13. Zelluläre Steuerungsprozesse beeinflusst von MPP+ - Exposition in dopaminergen Neuronen.

Name	Zellulärer Steuerungsprozess
ATP6V0E1	Rezeptor-vermittelte Endozytose, Ansäuern von Zellorganellen
ATP6V1D	Oxidative Phosphorylierung, mTOR Signalkaskade
NDUFA10	Mitochondriale NADPH Dehydrogenase
NDUFS4	Komplex I der mitochondrialen Atmungskette
CYP1B1	Cytochrom P450, Metabolismus von Karzinogenen
DIABLO	Mitochondriale Apoptose-Aktivierung durch Caspase-Inhibition
GPX1	Glutathionperoxidase
PYCR1	Mitochondriale Prolin-Konversion
CBX6	Gesteuerte Transkriptionsunterdrückung durch Chromatin-Bindung
H3F3A	Histon-basierte Transkriptionssteuerung
HIST1H2BG	Histon-basierte Transkriptionssteuerung
HIST1H4C	Histon-basierte Transkriptionssteuerung
RNF2	Gesteuerte Transkriptionsunterdrückung durch Histon-Ubiquitierung
ATP5S	Mitochondriale ATP-Synthese

CYP5A	Cytochrom P450
CYP27A1	Mitochondrialer Cholesterol-Stoffwechsel
CYP2R1	Umwandlung von Vitamin D zu biologisch aktiver Form Calcidiol
CYP2U1	Cytochrom P450 Monooxygenase, Arachidonsäure-Stoffwechsel
POR	Cytochrom P450 Reduktase, Elektronentransfer von NADPH

Die beeinflussten Signalkaskaden und Gene der intrazellulären Proteinexpression konzentrierten sich auf die Mitochondrien und dort spezifisch auf den Komplex I der Atmungskette. Dort ist auch der bekannte Wirkungsort des MPP+, sodass damit gezeigt wurde, dass die MPP+ - Exposition auf zellulärer Ebene den erwarteten Effekt hatte. Des Weiteren ist festzuhalten, dass alle hier benannten Signalwege in Verbindung zu Oxidationsprozessen und oxidativem Stress stehen. Daraus ergab sich auch die Grundlage der geplanten potenziellen Parkinson-Therapie, der Eingriff in oxidative Stress-Prozesse.

3.2. Parkinson-Behandlung durch intrazelluläre Proteinexpression

Um der Entstehung von oxidativem Stress auf zellulärer Ebene entgegen zu wirken, wurde die Proteinuntereinheit des Enzymes Telomerase, humanes TERT (hTERT), ausgewählt.

Da es sich bei hTERT um ein natürlich in den Zellen vorkommendes Protein handelt, ist es theoretisch möglich, die Stärke der Expression von hTERT durch spezifische pharmazeutische Wirkstoffe zu steuern. Die Identifikation solcher Substanzen ist jedoch ein sehr zeitintensiver Prozess. Um die Theorie der Nutzbarkeit von hTERT zu untermauern, ohne pharmakologische Substanzen zu entwickeln oder zu identifizieren, wurde die intrazelluläre Expression durch Transfektion der Zellen mit einem retroviralen Vektor zur hTERT-Expression erhöht. Der Erfolg dieser Strategie ist in Abb. 23 und 24 sichtbar.

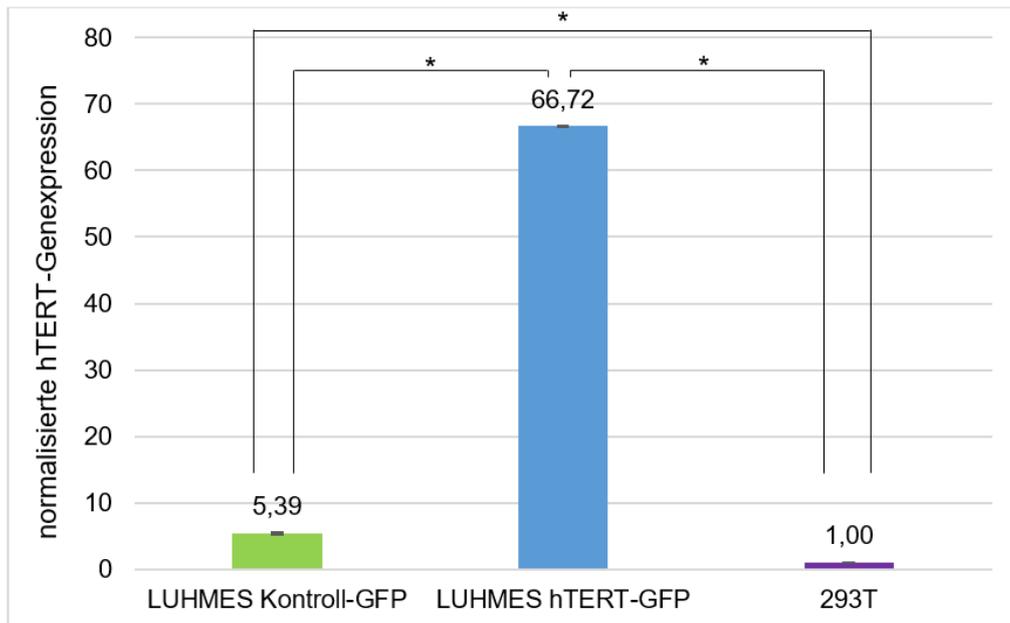


Abbildung 23. hTERT-Genexpression von transduzierten LUHMES-Zellen und 293T-Zellen. Die Genexpression von hTERT normalisiert mit GAPDH wurde für proliferierende LUHMES-Zellen transduziert mit Kontroll-GFP (grün) oder hTERT-GFP (blau) im Vergleich zu 293T-Zellen (lila) als Kalibrator bestimmt. Mittelwert mit Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten berechnet. * zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

Die Expression von hTERT auf Gen-Ebene war, wie in Abb. 23 gezeigt ist, stark hoch reguliert. Zwar war auch die Genexpression in den LUHMES-Zellen transfiziert mit dem Kontroll-GFP-Plasmid um mehr als den Faktor 5 höher als in der Vergleichszelllinie 293T, jedoch war das bei Weitem nicht so stark erhöht wie in der Linie transfiziert mit dem hTERT-GFP-Plasmid. Hier lag der Faktor bei 66,72. Für den intrazellulären Effekt war jedoch nicht die genetische Überexpression von Bedeutung, sondern die Hochregulation auf Proteinebene.

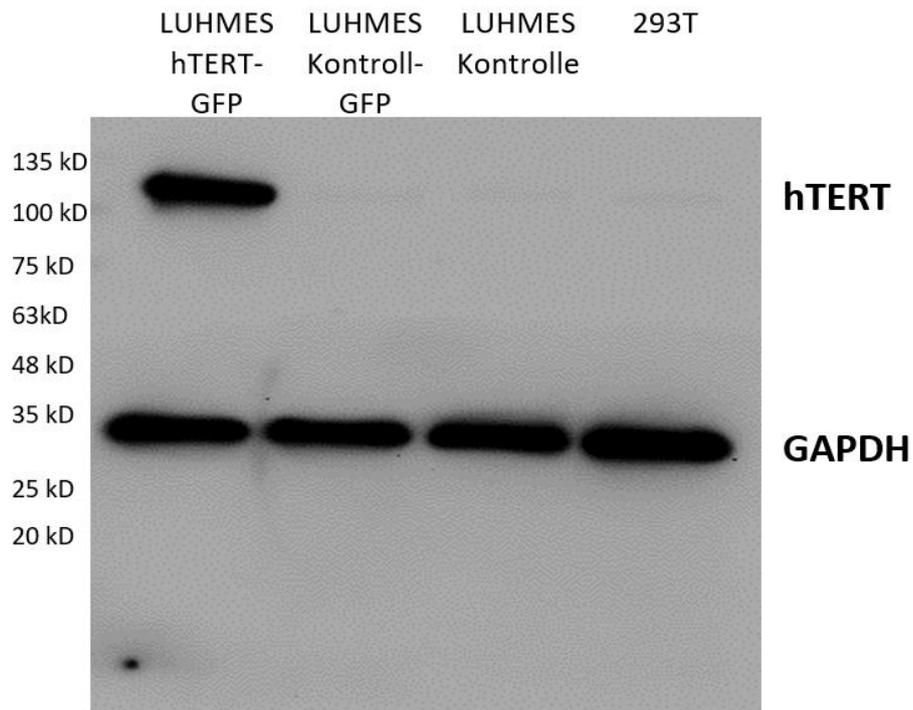


Abbildung 24. hTERT-Proteinexpression von LUHMES- und 293T-Zellen. Die Proteine von Zelllysaten wurden durch Western Blot aufgetrennt und mit Antikörpern gegen hTERT (Zielprotein) und GAPDH (Kontrolle) markiert. Die Banden wurden durch Chemilumineszenz angefärbt und ein Bild der Signale aufgenommen.

Die Expression des hTERT-Proteins war in der Kontrollzelllinie 293T sowie in nicht transfizierten LUHMES-Zellen und den LUHMES-Zellen transfiziert mit einem Kontroll-GFP-Plasmid sehr schwach und im Western Blot (Abb. 24) kaum als Bande erkennbar. Im Gegensatz dazu war bei den mit dem hTERT-GFP-Plasmid transfizierten LUHMES-Zellen eine deutliche Bande zwischen 100 und 135 kDa Größe erkennbar. hTERT hat eine Größe von 127 kDa, was dieser Bande entspricht.

Bevor dieser angestrebte Effekt auf Proteinebene jedoch für die Untersuchung der Effekte im Zusammenhang mit Morbus Parkinson genutzt werden konnte, musste noch ausgeschlossen werden, dass die Hochregulierung sich auch auf die Proteinfunktion derart ausgewirkt hatte. Telomerase als funktionales Protein sollte nicht derart stark überexprimiert werden, daher wurde die Funktionalität mittels TeloTAGGG-Assay überprüft.

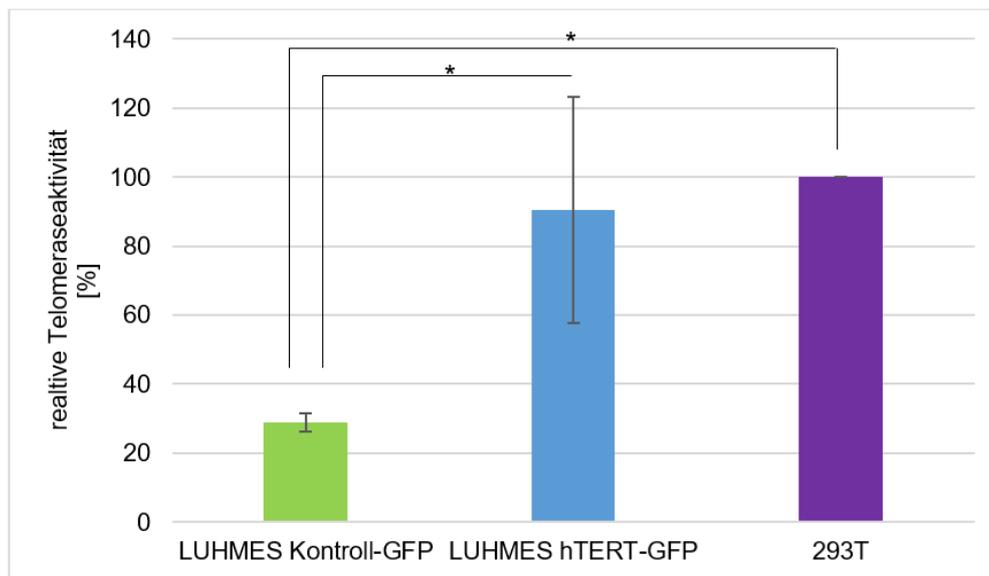


Abbildung 25. Telomeraseaktivität von transduzierten LUHMES-Zellen und 293T-Zellen. Die relative Telomeraseaktivität wurde über den TeloTAGGG-Assay für proliferierende LUHMES-Zellen transduziert mit Kontroll-GFP (grün) oder hTERT-GFP (blau) im Vergleich zu 293T-Zellen (lila) bestimmt. Der Mittelwert mit Standardabweichungen ist von drei unabhängigen Experimenten berechnet. * zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

Wie in Abb. 25 zu sehen ist, war die Telomerase-Aktivität der mit dem hTERT-GFP-Plasmid transfizierten Zellen vergleichbar mit der natürlichen Telomerase-Aktivität in 293T-Zellen, und damit nicht ein Spiegelbild der starken Überexpression auf genetischer oder Protein-Ebene. Es war offensichtlich, dass die Telomerase-Aktivität in den LUHMES Zellen transfiziert mit Kontroll-GFP-Plasmid nur etwa ein Drittel der Aktivität in der hTERT-LUHMES-Linie oder 293T-Zellen war, aber auch hier war der Unterschied deutlich geringer als er es auf Gen- oder Protein-Level der Fall war. Damit wurde mit dieser Transfektion das Ziel erreicht, die Proteinexpression von hTERT in LUHMES-Zellen stark zu erhöhen, ohne denselben Effekt in der Telomeraseaktivität des Enzyms Telomerase auszulösen. Die erhaltenen hTERT- und Kontroll-Linien der LUHMES-Zellen konnten nun zur eigentlichen Untersuchung der oxidativen Stressreaktion im Rahmen des chemisch induzierten Parkinson-Modells genutzt werden. Die Beurteilung der oxidativen Stressreaktion wurde mit Hilfe des DCFDA-Assays vorgenommen. Bei diesem Assay steigt die gemessene Fluoreszenz bei steigender Anzahl freier Radikale, die zellulären oxidativen Stress auslösen. Abb. 26 zeigt, dass beide transfizierten Linien einen sehr ähnlichen Level an freien Radikalen mit 5433 bzw. 5709 RFU für Kontroll-GFP und hTERT-GFP hatten. Wurden sie mit $10 \mu\text{M}$ MPP+ für 48 h inkubiert, stieg der Stress in der Linie transfiziert mit dem Kontroll-GFP-Plasmid leicht an auf 6777 RFU. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Wurden beide Linien stattdessen mit $50 \mu\text{M}$ TBHP behandelt, welches unspezifischen intrazellulären Stress auslöst, reagierten beide Linien ähnlich stark mit relativen Fluoreszenzwerten von 26066 bzw. 31483 für Kontroll-GFP bzw. hTERT-GFP, unterschieden sich aber auch hier nicht signifikant voneinander. Wurden die

Linien jedoch sowohl dem allgemeinen Stressor TBHP als auch dem mitochondrialen oxidativen Stress auslösenden MPP⁺ ausgesetzt, unterschieden sich die Reaktionen signifikant. Der Level an freien Radikalen in der Kontroll-GFP-LUHMES-Linie stieg auf 34471 RFU, bei den hTERT-GFP-LUHMES dagegen fiel er relativ zum Wert bei reiner TBHP-Exposition auf 25164 RFU. Das zeigte, dass die Zellen, die hTERT intrazellulär überexprimieren bei starker Radikal-Entstehung im Zellinneren und den Mitochondrien in der Lage sind, dieser Produktion von Radikalen in einem gewissen Maß entgegenzuwirken. Bei den Zellen ohne überexprimiertes intrazelluläres hTERT stieg dagegen der Radikallevel weiter an, wenn die Stressoren kombiniert wurden.

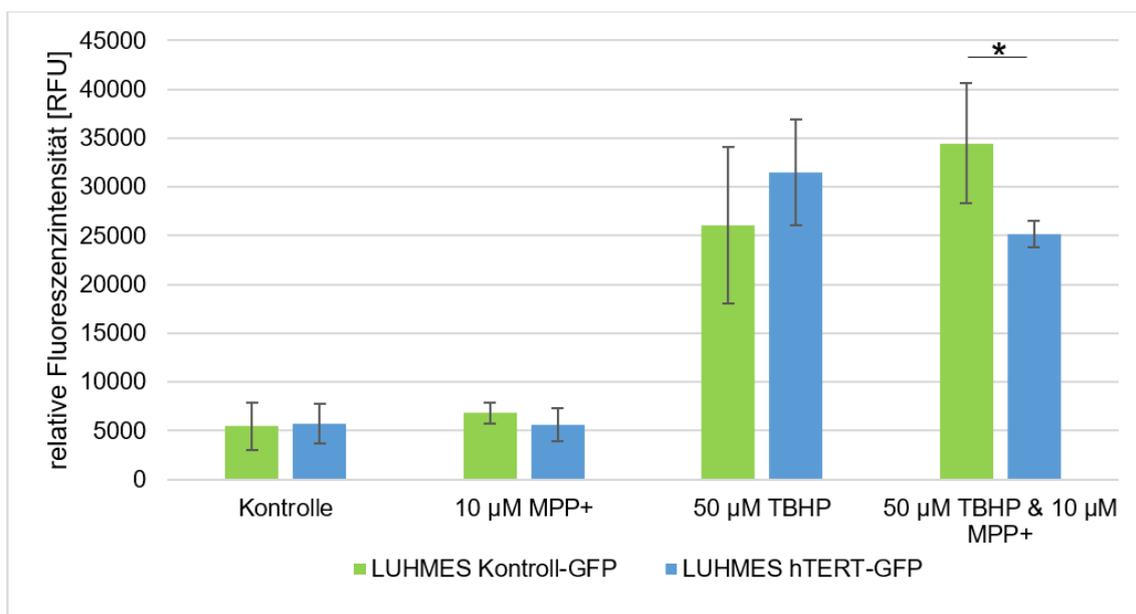


Abbildung 26. Oxidative Stresslevel von transduzierten LUHMES-Zellen bei verschiedenen Stressoren. Differenzierte LUHMES-Zellen transduziert mit Kontroll-GFP (grün) oder hTERT-GFP (blau) wurden an Tag der Differenzierung analysiert. Zum Teil wurden sie zuvor für 28 h mit 10 µM MPP⁺ als potentiellm Stressor inkubiert. Im Rahmen des DCFDA-Assays zur Messung des oxidativen Stresses wurde 50 µM TBHP als zweiter unabhängiger Stressor eingesetzt. Der Mittelwert mit Standardabweichungen ist von drei biologischen Replikaten berechnet. * zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

Auch der Effekt auf das Niveau der intrazellulären Kommunikation wurde mit Hilfe der in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Meese erhobenen mRNA-Daten beurteilt. In Abb. 27 sieht man, inwieweit die intrazelluläre Überexpression von hTERT die Effekte der MPP⁺-Behandlung ausgleichen konnte. Die roten Pfeile zeigen, wie eine Hochregulierung der 4 Kommunikationsbahnen CYP1B1, ATP5S, CYP5A und CYP27A1 abgeschwächt werden konnte. Bei den Steuerungsprozessen ATP6V1D und H3F3A (grüne Pfeile) wurde einer Herunterregulation leicht entgegengewirkt. Im Fall von ATP6V0E1, NDUFA10, PYCR1, HIST1H2BG, HIST1H4C und CYP2U1 (schwarze Pfeile) konnte der Steuerungsprozess umgekehrt werden und bei den restlichen dargestellten Kommunikationsbahnen ohne Pfeil

wurde durch das intrazelluläre hTERT bei MPP+ - Behandlung wieder in etwa das Level der nicht mit MPP+ behandelten Kontroll-GFP-LUHMES-Zellen erreicht.

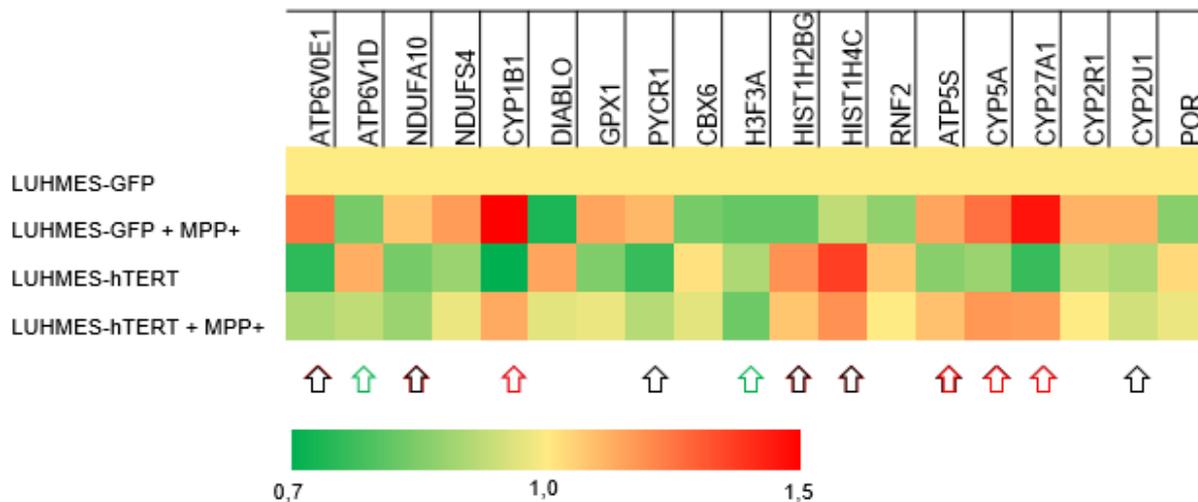


Abbildung 27. Heat map am stärksten beeinflusster Genexpressionen in transduzierten LUHMES-Zellen bei chemisch induziertem Morbus Parkinson. Mit Kontroll-GFP transduzierte, differenzierte LUHMES Zellen als gesunde Kontrolle (obere Reihe) wurden mit Kontroll-GFP-LUHME-Zellen nach chemischer Induktion von Morbus Parkinson (zweite Reihe), gesunden LUHMES-Zellen transfiziert mit hTERT-FGP (dritte Reihe) und hTERT-GFP-LUHME-Zellen mit chemisch induziertem Morbus Parkinson (untere Reihe) auf ihre Genexpression im Hinblick auf Gene von oxidativen Stress-Prozessen analysiert. Eine grüne Färbung zeigt eine Herabregulation, eine rote Färbung eine Hochregulation. Die Farbtiefe spiegelt die Stärke der Veränderung wieder. Werte basieren auf Mittelwerten von 3 biologischen Replikaten. Grüne und rote Pfeile weisen auf eine Entwicklung der Expression in hTERT-GFP-LUHME-Zellen mit Parkinson-Induktion zurück zum Niveau der Kontroll-Zellen an, schwarze Pfeile einer Umkehrung der Regulationsveränderung in hTERT-GFP-LUHME-Zellen mit Parkinson im Vergleich zu Kontroll-GFP-LUHME-Zellen mit Parkinson.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Steuerung der intrazellulären hTERT-Expression ein realistischer Ansatz zur Behandlung von Morbus Parkinson ist. Da jedoch die Produktion von ausreichenden Mengen hTERT für eine nanopartikelbasierte Verkapselung nicht im Rahmen dieser Arbeit umsetzbar war, wurde eine andere Alternative für die Evaluierung der Nanopartikelbasierten Morbus Parkinson-Therapie gewählt.

3.3. Nanopartikelherstellung

Um Nanopartikel als therapeutisches Konzept für die Behandlung von Morbus Parkinson zu beurteilen, wurde eine Verkapselung mit anschließendem Transport für Dopamin gewählt, da Dopamin als freier Stoff nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Bevor die Partikel jedoch in den zuvor etablierten Modellen eingesetzt werden können, werden sie ausführlich charakterisiert und auf ihr Verhalten in der Zellkulturumgebung hin untersucht.

3.3.1. Charakterisierung

Für die Herstellung von Dopamin-beladenen Nanopartikeln wurde als Partikelmatrix PLGA ausgewählt, um biologisch abbaubare Partikel zu synthetisieren. Die Synthese erfolgte nach dem Grundprotokoll von Pahuja et al. [26], das modifiziert wurde, um Optimierungen im Hinblick auf die Dopamin-Beladung durch Abwandlung der Zusammensetzung der ersten wässrigen Phase [49] und dem Inkorporieren der ersten Emulsion in die zweite wässrige Phase [100] aufzunehmen. Auf Grundlage dieses optimierten Protokolls wurden Nanopartikel generiert und hinsichtlich der Eigenschaften hydrodynamischer Durchmesser, PDI, Zetapotenzial und Dopamin-Beladung charakterisiert. Dabei wurde immer eine Charge Dopamin-beladene und eine Charge Kontroll-Nanopartikel ohne Dopamin hergestellt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Grundcharakteristika sind in Tab. 14 zusammengefasst.

Tabelle 14. Charakterisierung von Dopamin-beladenen oder unbeladenen PLGA-Nanopartikeln. Der Hydrodynamischer Durchmesser, der PDI und das Zetapotenzial wurden per Zetasizer ZS und der Dopamin-Gehalt mittels HPLC-MS-Messung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von wenigstens drei unabhängig hergestellten Chargen.

	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI	Zetapotenzial [mV]	Dopamin-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mg NP}$]
Dopamin-beladene Nanopartikel	197,6 \pm 3,4	0,03 \pm 0,02	-29,1 \pm 1,7	4,1 \pm 0,4
Unbeladene Kontroll-Nanopartikel	202,5 \pm 1,3	0,04 \pm 0,02	-32,4 \pm 2,5	---

Wie man Tab. 14 entnehmen kann, lagen die gemessenen Werte für den hydrodynamischen Durchmesser, den PDI und das Zetapotenzial der Dopamin-beladenen Nanopartikel und der unbeladenen Kontroll-Nanopartikeln im selben Größenbereich. Schwankungen waren unter Beachtung der Standardabweichungen zu vernachlässigen. Der Dopamingehalt der beladenen Nanopartikel lag bei 4,1 μg Dopamin pro mg Nanopartikel, was einer eher geringen Beladungsmenge entsprach.

Um die hergestellten Nanopartikel spezifisch für den Transport über die Blut-Hirn-Schranke zu modifizieren, wurde eine Oberflächenmodifikation mit Poloxamer 188 gewählt [101]. Zudem war die Nutzung der Nanopartikel in einem therapeutischen Umfeld das Ziel der Forschung. Dafür war es unerlässlich, die Partikel zum einen in eine lagerbare Form zu bringen und zum anderen durch die in Chargen geteilte Herstellung so geringe Schwankungen zwischen den

einzelnen Chargen wie möglich zu erreichen. Um dies umzusetzen, wurden die Nanopartikel lyophilisiert. Bei dieser Gefriertrocknung wurde eine Lösung mit Poloxamer 188 zur Stabilisierung der Partikel während des Trocknungsvorgangs eingesetzt. Bei der Rekonstitution der Partikel waren sie dadurch ebenfalls von dieser Lösung umgeben, die dabei gleichzeitig die Oberflächenbeschichtung ermöglichte. Der Erfolg dieser Oberflächenbeschichtung wurde ersichtlich, wenn man sich nochmal den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel vor und nach der Lyophilisation und anschließenden Rekonstitution ansah (Abb. 28).

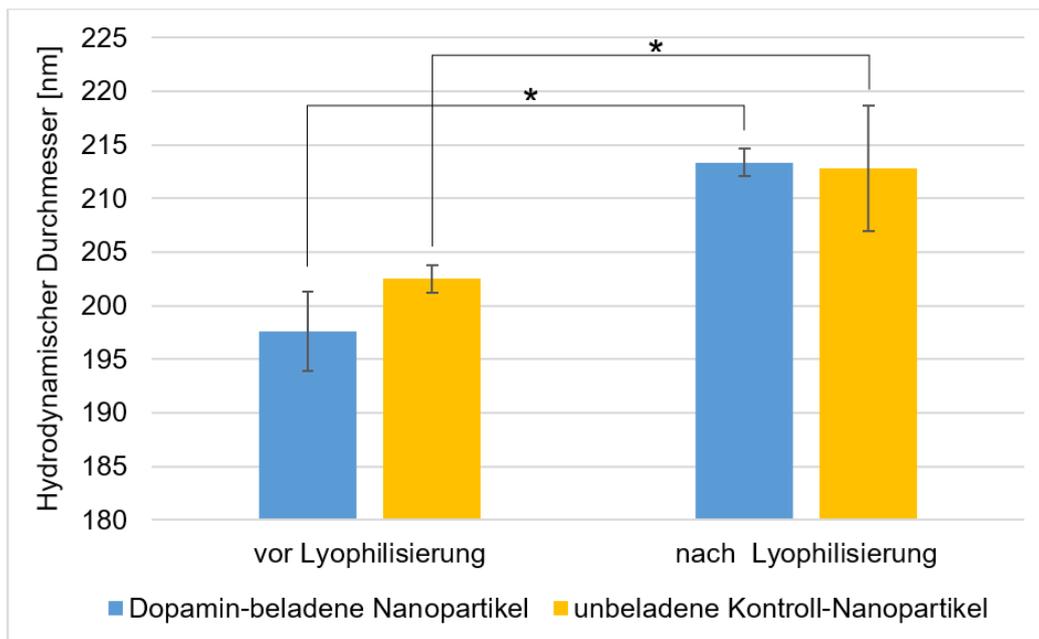


Abbildung 28. Hydrodynamischer Durchmesser von PLGA-Nanopartikeln vor und nach Lyophilisierung. Dopamin-beladene (blau) oder unbeladene Kontroll-Nanopartikel (gelb) wurden mit dem Zetasizer vermessen. Der Mittelwert mit Standardabweichungen ist von mehr als drei unabhängigen Herstellungen berechnet. * zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

Die Nanopartikel zeigten eine signifikante Größenzunahme auf $213,4 \pm 1,3$ nm bei den Dopamin-beladenen Nanopartikeln bzw. auf $212,8 \pm 5,9$ nm bei den Kontroll-Nanopartikeln. Das entsprach einer Größenzunahme von durchschnittlich 16 nm bzw. 10 nm für die jeweils Dopamin-beladenen bzw. Dopamin-freien Nanopartikel. Diese Größenzunahme entspricht der Anlagerung von Poloxamer 188 im Rahmen der Beschichtung nach Rekonstitution.

3.3.2. Bindung an Zielzellen und Zytotoxizität

Die hergestellten Nanopartikel wurden vor dem Einsatz in den finalen Modellsystemen noch eingehender untersucht, zum einen auf ihre Bindung an die angestrebten Zielzellen in einem einfachen Zellkulturmodell und zum anderen auf ihre Zytotoxizität. Damit sollte

ausgeschlossen werden, dass sie einen negativen Effekt auf die Modelle haben, der die angestrebten Ergebnisse verfälschen könnte.

Als einfaches Zellkulturmodell zur Zielzell-Bindung werden bEnd.3-Zellen verwendet. Diese murinen Endothelzellen haben einen vergleichbaren Rezeptorstatus zu humanen Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke [95]. Als neuronales Modell wurden differenzierte und undifferenzierte LUHMES-Zellen verwendet, da ihre Kultivierung und Differenzierung einfach und vergleichsweise schnell funktioniert [88].

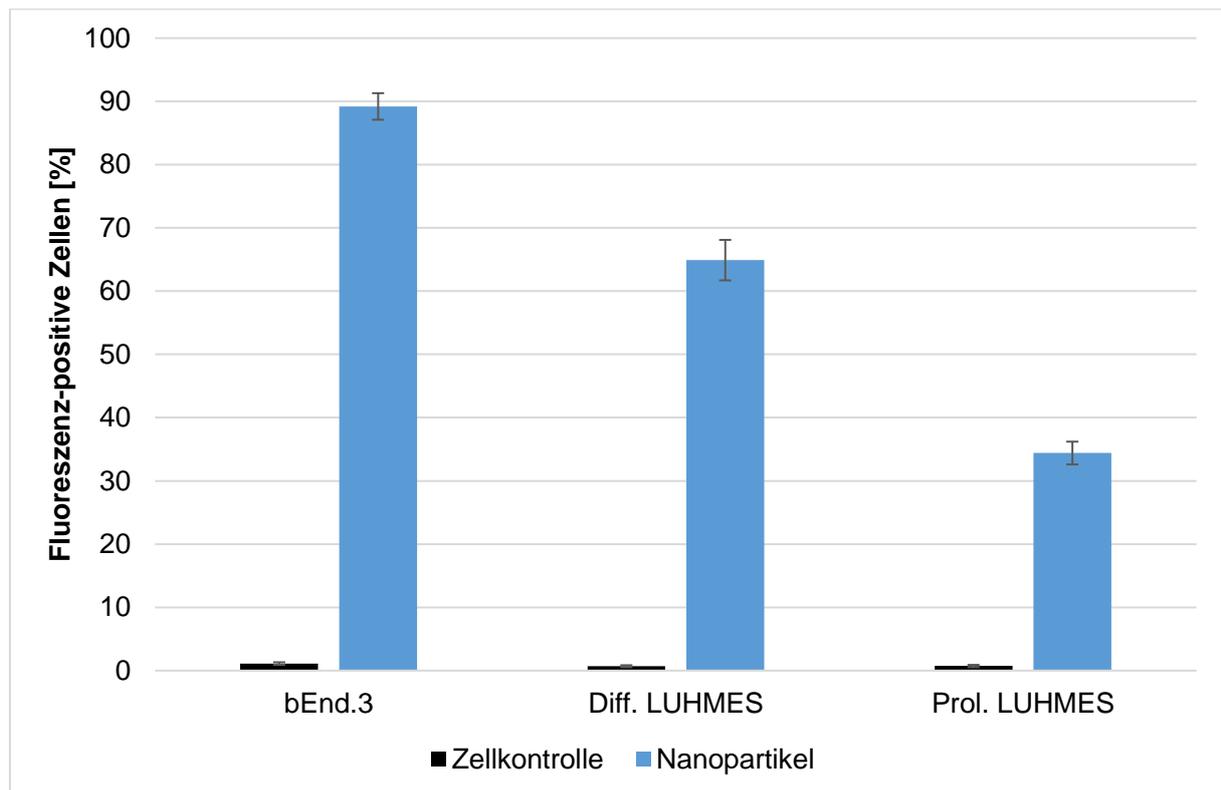


Abbildung 29. Zelluläre Bindung der Nanopartikeln an den Zielzellen bestimmt mit Durchflusszytometrie. bEnd.3-Zellen, proliferierende und 6 Tage differenzierte LUHMES-Zellen wurden als Kontrolle (schwarz) oder nach 4 h Inkubation mit 250 µg/ml Dopamin-beladenen Nanopartikeln (blau) auf ihre Fluoreszenz hin mittels Durchflusszytometrie untersucht. Das Fluoreszenzsignal wurde induziert durch die Bindung von Fluoreszenz-markierten Nanopartikeln an die Zielzellen. Die Anzahl der Fluoreszenz-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und der Mittelwert mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten berechnet.

In Abb. 29 sieht man, dass die Bindung der hergestellten Nanopartikel an bEnd.3-Zellen mit 89,2 % der analysierten Zellen sehr hoch war. Das sprach für eine hohe Affinität der beschichteten Nanopartikel zu Zellen der Blut-Hirn-Schranke. Bei den differenzierten LUHMES-Zellen als Analogon für dopaminerge Neurone lag die Nanopartikel-Bindung bei 64,9 % und bei den proliferierenden LUHMES-Zellen bei 34,4 %, wobei diese Zellen als unspezifische Neuronen zu betrachten waren. Das zeigte, dass die Affinität der Nanopartikel zu dopaminergen Neuronen höher war als zu anderen neuronalen Zellen. Dieses Verhalten war für den geplanten Einsatz sehr vielversprechend.

Für die Zytotoxizitäts-Untersuchungen wurden anstelle der bEnd.3-Zellen humane immortalisierte Gehirnkapillarendothelzellen (hBMEC) verwendet, die ein sehr genaues Abbild der humanen Blut-Hirn-Schranke in Hinblick auf Rezeptoren und zelluläre Reaktionen darstellen, obwohl sie nicht in der Lage sind eine dichte Barriere zu bilden.

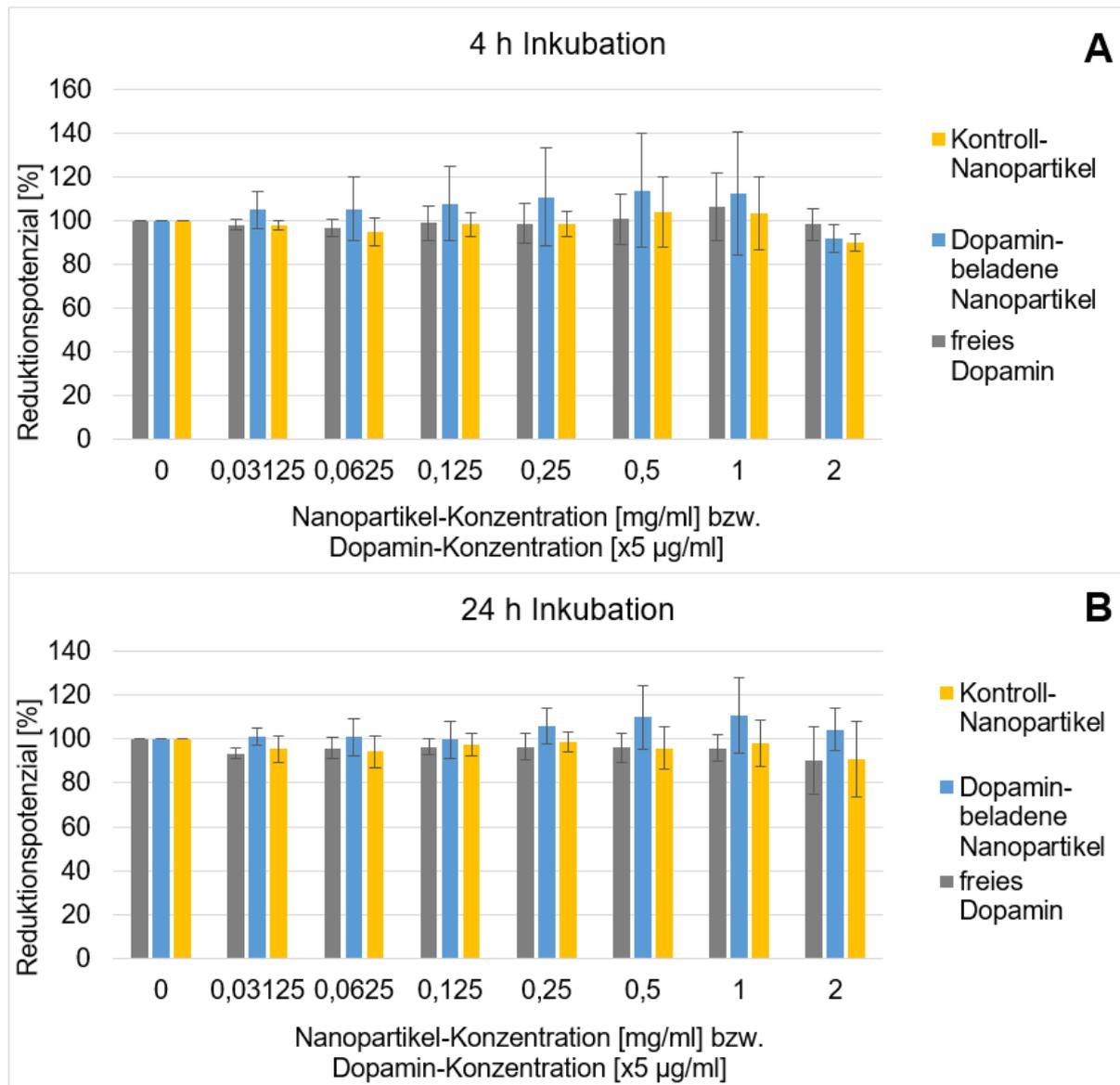


Abbildung 30. Zytotoxizitätsstudie von hBMEC-Zellen bei Exposition mit Nanopartikeln oder Dopamin. Verschiedene Konzentrationen von freiem Dopamin (grau), Dopamin-beladenen Nanopartikeln (blau) oder leeren Kontroll-Nanopartikeln (gelb) wurden auf hBMEC-Zellen appliziert und für 4 h (A) oder 24 h (B) inkubiert. Die Zytotoxizität wurde mittels alamarBlue®-Reagenz basierend auf dem Reduktionspotenzial der Zellen bestimmt. Zur Auswertung wurden unbehandelte Zellen auf 100 % gesetzt und der Mittelwert mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Die Untersuchung der Zellviabilität auf Grundlage des Reduktionspotenzials der hBMEC-Zellen (Abb. 30) zeigte, dass keine der getesteten Nanopartikel-Konzentration oder der entsprechenden Konzentration an freiem Dopamin einen negativen Einfluss hatte. Dabei hatte auch eine verlängerte Inkubationszeit von 24 h anstatt der in Transportstudien üblichen 4 h

keinen negativen Effekt auf die Zellen. Die hergestellten Nanopartikel waren demnach unbedenklich für ihren Einsatz in einem humanen Blut-Hirn-Schranken-Modell.

Um weiterhin auszuschließen, dass die Barriere hergestellt aus differenzierten Stammzellen empfindlicher reagierte, wurden auch diese Zellen den Nanopartikeln oder freiem Dopamin für 24 h ausgesetzt (Abb. 31).

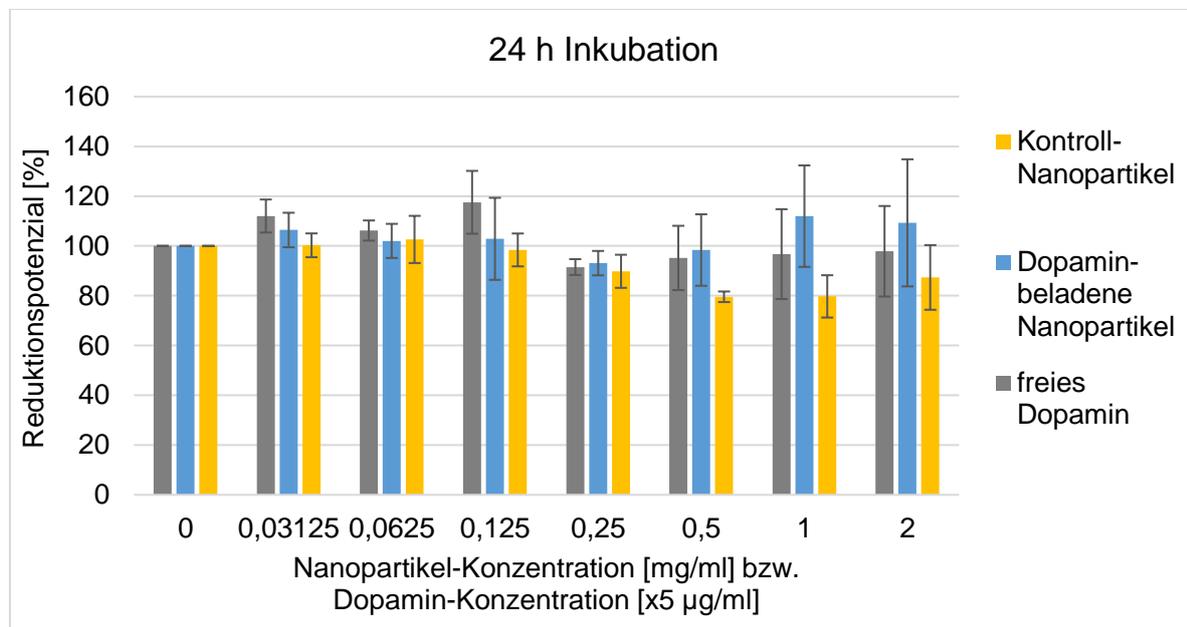


Abbildung 31. Zytotoxizitätsstudie von hiPS-BCEC-Zellen bei Exposition mit Nanopartikeln oder Dopamin. Verschiedene Konzentrationen von freiem Dopamin (grau), Dopamin-beladenen Nanopartikeln (blau) oder leeren Kontroll-Nanopartikeln (gelb) wurden für 4 h mit hiPS-BCEC-Zellen inkubiert. Die Zytotoxizität wurde mittels alamarBlue®-Reagenz basierend auf dem Reduktionspotenzial der Zellen bestimmt. Zur Auswertung wurden unbehandelte Zellen auf 100 % gesetzt und der Mittelwert mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Beim Einsatz dieser Zellen zeigte sich tendenziell eine geringe Abnahme des Reduktionspotenzials beim Einsatz von 0,5 mg/ml oder mehr von Kontroll-Nanopartikeln. Die Werte fielen jedoch zu keinem Zeitpunkt soweit, dass die Zellviabilität in Frage gestellt werden könnte. Zu einigen Zeitpunkten kam es sowohl gegenüber dem freien Dopamin als auch den Dopamin-beladenen Nanopartikeln zu einer Zunahme des Reduktionspotenzials der Zellen. Damit waren diese Zellen zwar geringfügig empfindlicher, aber dennoch stand dem Nanopartikeleinsatz in diesem Modell nichts im Weg.

Als abschließende Zytotoxizitätsstudie wurden differenzierte LUHMES-Zellen den Nanopartikeln oder freiem Dopamin ausgesetzt. Auch hier wurden zwei Zeitpunkte analysiert (Abb. 32).

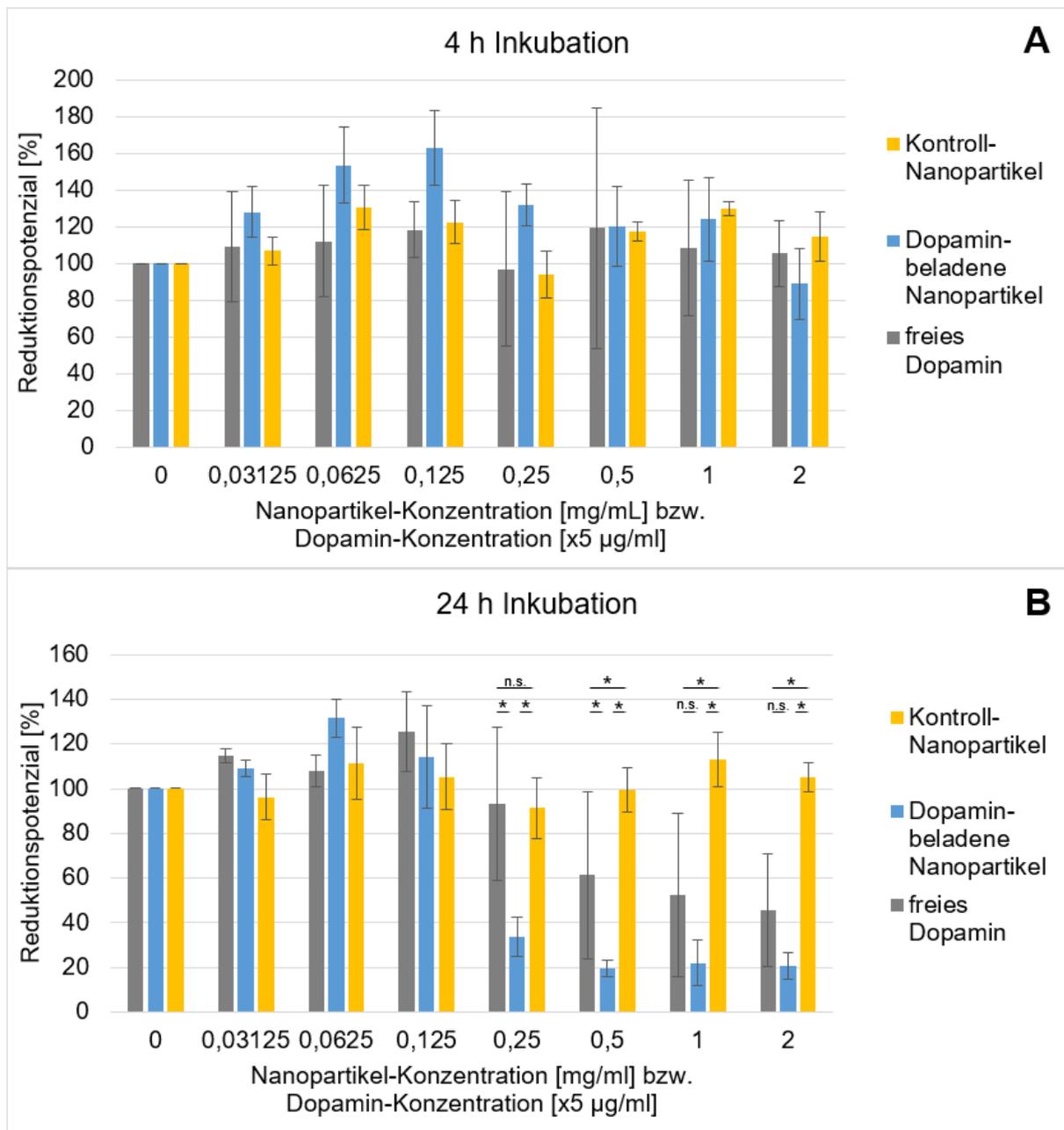


Abbildung 32. Zytotoxizitätsstudie von differenzierten LUHMES-Zellen bei Exposition mit Nanopartikeln oder Dopamin. Verschiedene Konzentrationen von freiem Dopamin (grau), Dopamin-beladenen Nanopartikeln (blau) oder leeren Kontroll-Nanopartikeln (gelb) wurden auf 6 Tage differenzierte LUHMES-Zellen appliziert und für 4 h (A) oder 24 h (B) inkubiert. Die Zytotoxizität wurde mittels alamarBlue®-Reagenz basierend auf dem Reduktionspotenzial der Zellen bestimmt. Zur Auswertung wurden unbehandelte Zellen auf 100 % gesetzt und der Mittelwert mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten berechnet. * zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$, n.s. bedeutet kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Bei den differenzierten LUHMES-Zellen zeigte sich ein etwas anderes Bild in Hinblick auf Zellviabilität und Reduktionspotenzial. Bei 4 h Inkubation der Zellen mit Nanopartikeln oder freiem Dopamin war keine der eingesetzten Konzentrationen zytotoxisch. Jedoch zeigten sich starke Anstiege des Reduktionspotenzials vor allem als Reaktion auf die Dopamin-beladenen

Nanopartikel im Konzentrationsbereich unter 0,5 mg/ml. Dies zeigte eine starke Hochregulation des zellulären Stoffwechsels, beispielsweise als Reaktion auf veränderte Dopamin-Konzentrationen in den Zellen oder als Reaktion der Zellen auf eine Annäherung an zytotoxische Umstände. Bei einer Inkubation der Nanopartikel mit den Zellen für 24 h zeigte sich, dass Konzentrationen der Dopamin-beladenen Nanopartikel von 0,25 mg/ml oder mehr und freies Dopamin in Konzentrationen von 2,5 µg/ml und mehr einen zytotoxischen Effekt auf die dopaminergen Neuronen hatten. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstestungen unterschieden sich bei diesen und allen höheren Konzentration von Dopamin oder Dopamin-beladenen Nanopartikeln signifikant von der nicht zytotoxisch einzustufenden Inkubation mit den unbeladenen Kontroll-Nanopartikeln. Es ist anzunehmen, dass bei diesen Konzentrationen und bei der verlängerten Inkubationszeit die Zellen nicht mehr in der Lage sind die zusätzlichen Dopamin-Mengen im Rahmen ihres eigenen Stoffwechsels zu kompensieren. Nur bei der Konzentration von 0,25 mg/mL Nanopartikel, die 1,25 µg/mL Dopamin entspricht, zeigte das freie Dopamin noch keinen zytotoxischen Effekt, während die Dopamin-beladenen Nanopartikel ein signifikant gesenktes Reduktionspotenzial zeigten. Dies kann durch ein Zusammenspiel der Wirkung des Dopamins mit der gleichzeitigen Belastung der Zellen durch die Nanopartikel ausgelöst worden sein. Da die Kontroll-Nanopartikel zu keinem Zeitpunkt zytotoxisch waren, kann dieser Effekt nicht von den Nanopartikeln allein ausgelöst worden sein.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse in den nachfolgenden Transport- und Aufnahmestudien auszuschließen, wurden die Nanopartikel nur in Konzentrationen von 250 µg/ml für maximal 4 h eingesetzt. Bei dieser Inkubationszeit hatte keines der Modelle auf einen der Nanopartikel oder die entsprechende Menge freies Dopamin eine negative Reaktion gezeigt.

3.4. Nanopartikeltransport in Modellsystemen

Der Transport der hergestellten Dopamin-beladenen Nanopartikel über die Blut-Hirn-Schranke oder deren Aufnahme in die differenzierten LUHMES-Zellen wurde analysiert, um die Fähigkeit dieses Partikelsystems zu bestimmen, als Wirkstofftransportsystem für pharmakologische Substanzen zur Behandlung von Morbus Parkinson zu fungieren.

3.4.1. Blut-Hirn-Schranke

Der Transport der Dopamin-beladenen Nanopartikel über die Blut-Hirn-Schranke wurde in den etablierten Modellen basierend auf hiPS von einem gesunden Spender und eines Morbus Parkinson-Patienten getestet. Die Quantifizierung des Transports erfolgte auf Grundlage des

transportierten Dopamins bestimmt durch HPLC-MS-Messung. Da die Kontroll-Nanopartikel keinerlei Dopamin enthielten, erbrachten die entsprechenden HPLC-MS-Messungen vollständig keine quantifizierbaren Ergebnisse. Deshalb wurden nur die Daten dargestellt, die beim Einsatz der Dopamin-beladenen Nanopartikel erhoben wurden (Abb. 33).

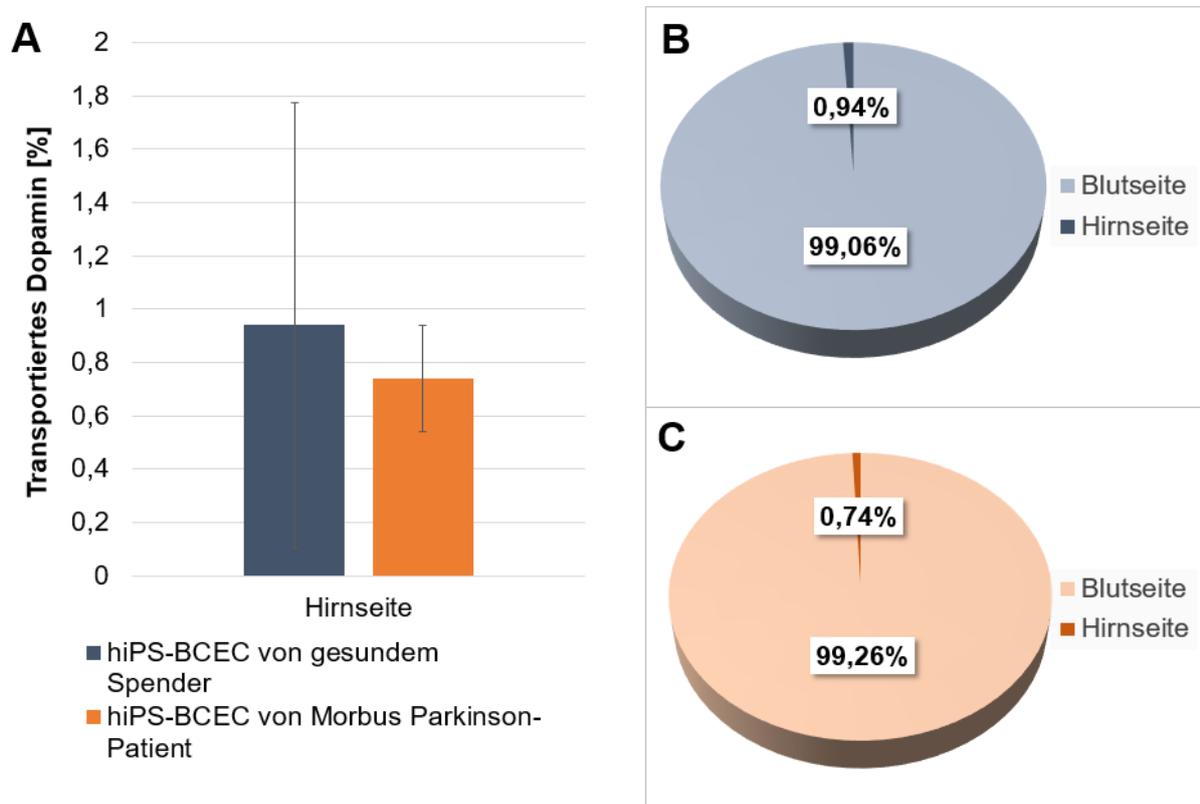


Abbildung 33. Bestimmung des Dopamin-Transports über ein In-vitro-BHS-Modell eines gesunden Spenders oder eines Morbus Parkinson-Patienten. Zu hiPS-BCEC differenziert aus Stammzellen eines gesunden Spenders (grau) oder eines Morbus Parkinson-Patienten (orange) wurden apikal 250 µg/ml Dopamin-beladenen Nanopartikel zugegeben und für 4 h inkubiert. Die Dopamin-Konzentrationen in den Medien wurden mittels HPLC-MS gemessen. Gezeigt in (A) sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen bestimmt in 3 unabhängigen Experimenten nach Messung im basolateralen Medium (Hirnseite) beider Modelle oder das Verhältnis der Dopamin-Konzentrationen in apikalem (schwache Farbe, Blutseite) und basolateralen Medium (kräftige Farbe, Hirnseite) im (B) BHS-Modell eines gesunden Spenders oder (C) BHS-Modell eines Morbus Parkinson-Patienten.

Die Menge von transportiertem Dopamin über die Blut-Hirn-Schranken-Modelle lag im Bereich von 0,94 % im Modell aus Zellen eines gesunden Spenders (Abb. 33 B) und 0,74 % im Modell aus Zellen eines Morbus Parkinson-Patienten (Abb. 33 C). Basierend auf den Standardabweichungen gibt es keinen signifikanten Unterschied im Nanopartikel-basierten Dopamin-Transport zwischen den beiden Modellen (Abb. 33 A). Die transportierte Menge selbst war sehr gering, allerdings sind Transportprozesse im Zusammenhang mit der Blut-Hirn-Schranke im Allgemeinen in sehr geringen Mengen zu beziffern. Die Tatsache, dass Dopamin auf der Seite des Modells, die das Gehirnkompartment darstellt, reproduzierbar

nachgewiesen werden konnte, stellte einen Transporterfolg dar, unabhängig von der absoluten transportierten Menge an Dopamin.

Um die Interaktion des Parkinson-Blut-Hirn-Schranken-Modells mit den Dopamin-beladenen Nanopartikeln noch weiter zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung einer Membran mit hiPS-BCEC-Zellen nach 4 h Inkubation mit Nanopartikeln durchgeführt (Abb. 34).

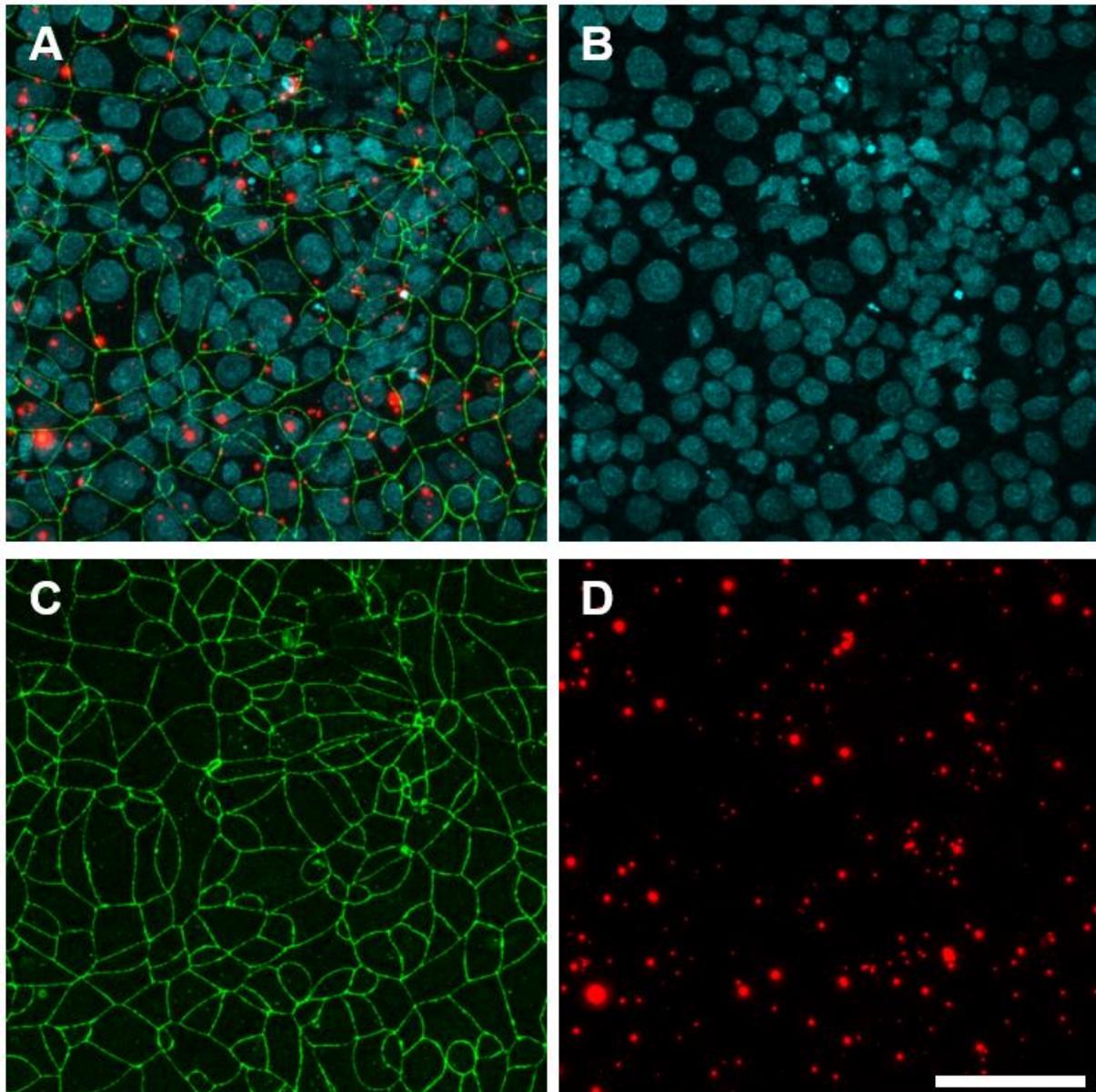


Abbildung 34. Immunfluoreszenzfärbung zur Aufnahme von Dopamin-beladenen Nanopartikeln in Morbus Parkinson-hiPS-BCEC-Zellen. (A) hiPS von einem Morbus Parkinson-Patient wurden zu hiPS-BCEC differenziert und zum Zeitpunkt des maximalen TEER-Wertes für 4 h mit Dopamin-beladenen Nanopartikeln (rot, D) inkubiert, bevor sie auf den Membraneinsätzen fixiert wurden. Die Expression des *tight junction*-Proteins Occludin wurde mit einem Antikörper (grün, C) gefärbt und die Zellkerne mit DAPI (blau, B). Der Messbalken entspricht 50 μm .

Die Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzkanäle zeigte, dass deutliche Signale der Dopamin-beladenen Nanopartikel in der Ebene der hiPS-BCEC-Zellen gefunden wurden. Das zeigte, dass die Nanopartikel von den Zellen gut aufgenommen wurden, auch wenn die zum Zeitpunkt der Probenahme nach 4 h gemessene Dopamin-Menge auf der Hirnseite des Blut-Hirn-Schranken-Modells sehr gering war.

3.4.2. Parkinson-Modell

Als zweite Stufe der Evaluierung der hergestellten Nanopartikel wurden Dopamin-beladene und unbeladene Kontroll-Nanopartikel im neuronalen Parkinson-Modell sowie dem zugehörigen gesunden Zellmodell eingesetzt und die Aufnahme in diese Zellen anhand der Fluoreszenz der Nanopartikel quantifiziert (Abb. 35). Um die Aufnahme von einer reinen Oberflächenbindung der Nanopartikel an die Zellen unterscheiden zu können, wurden die inkubierten Zellen wiederholt gewaschen. Zudem wurden durch enzymatischen Verdau die Membranproteine, die zur Bindung an die Zellkulturoberflächen sowie zur Bindung der Nanopartikel verantwortlich sind, gelöst, sodass ein Signal ausschließlich von den aufgenommenen Nanopartikeln detektiert werden konnte.

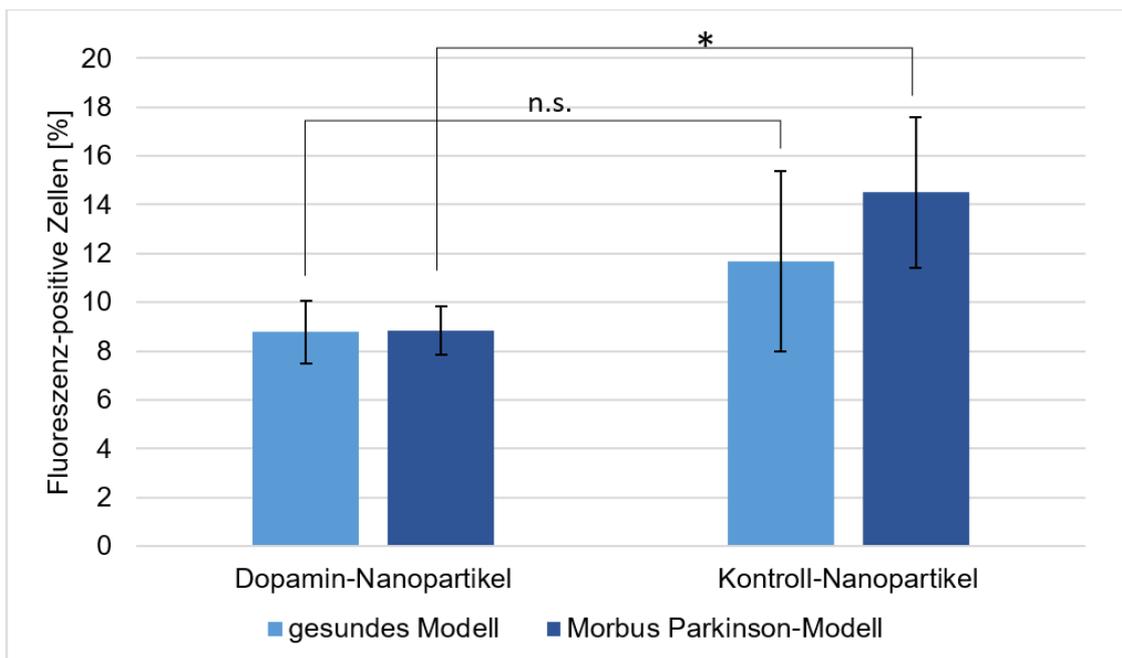


Abbildung 35. Zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln durch differenzierte LUHMES-Zellen. LUHMES-Zellen wurden für 6 Tage zu dopaminergen Neuronen differenziert, anschließend entweder mit normalem Medium als Kontrolle (hellblau) oder mit 10 μ M MPP+ zur chemischen Induktion von Morbus Parkinson (dunkelblau) für 48 h behandelt. Anschließend wurden 250 μ g/ml Dopamin-beladene oder Kontroll-Nanopartikel für 4 h inkubiert und die zelluläre Aufnahme durch Durchflusszytometrie über die Fluoreszenz der Nanopartikel bestimmt. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen wurden von drei biologischen Replikaten berechnet. * zeigt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$, n.s. bedeutet kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Von den LUHMES-Zellen nahmen unabhängig davon, ob Morbus Parkinson induziert wurde oder nicht, etwa 8,8 % der Zellen Dopamin-beladene Nanopartikel auf. Die Kontroll-Nanopartikel wurden in noch etwas größerer Menge aufgenommen. Hier nahmen bei den gesunden differenzierten LUHMES-Zellen 11,7 % und bei den mit MPP+ behandelten Zellen 14,5 % Nanopartikel auf. Dabei war aufgrund der Standardabweichungen nur die Zunahme bei der Internalisierung im Parkinson-Modell signifikant, im gesunden Modell war die Aufnahmesteigerung nicht signifikant. Die hier gezeigten Aufnahme-Werte waren niedriger als die Werte, die in der Bindungsstudie festgestellt wurden. Es muss aber ein Unterschied zwischen Bindung und Aufnahme gemacht werden, der hier zum Tragen kommt. Bei dieser Aufnahme-Studie werden ausschließlich internalisierte Nanopartikel quantifiziert, während Bindungsstudien auch oberflächengebundene Nanopartikel berücksichtigen.

Insgesamt ist zu sagen, dass die hergestellten Dopamin-beladenen Nanopartikel sowohl in der Lage sind, Dopamin über eine intakte Blut-Hirn-Schranke zu transportieren, unabhängig davon, ob es sich um ein gesundes oder ein Morbus Parkinson-Modell handelt. Zudem werden sie auch von dopaminergen Neuronen aufgenommen, ebenfalls unabhängig vom Modellstatus in Hinblick auf die zugrundeliegende Erkrankung.

4. Diskussion

4.1. Modell-Systeme

Die Auswahl und der Einsatz von aussagekräftigen In-vitro-Modellsystemen ist in der pharmakologischen Forschung von entscheidender Bedeutung, um eine gute Übertragbarkeit von Ergebnissen der präklinischen Studien auf die klinischen Studienabschnitte des Zulassungsverfahrens von pharmazeutischen Wirkstoffen oder Formulierungen zu gewährleisten. Vor allem in Hinblick auf Erkrankungen des zentralen Nervensystems gibt es dabei noch eine große Diskrepanz [102, 103]. Es ist nicht nur entscheidend, die korrekten Modelle für den Weg des Wirkstofftransports zu wählen, sondern bei Zelllinien auch auf die Wahl der korrekten Spezies zu achten. Vor allem bei Modellen der Blut-Hirn-Schranke hat sich gezeigt, dass unterschiedliche Spezies pharmakologische Substanzen unterschiedlich aufnehmen und transportieren [104].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die in den vergangenen Jahren publizierten Blut-Hirn-Schranken-Modelle basierend auf hiPS-Zellen [73, 74] vergleichbare Charakteristika bieten wie die vorher etablierten Modelle basierend auf Primärzellen tierischen Ursprungs [67, 69]. Die erreichten TEER-Werte des hiPS-basierten Modells waren für den Großteil der Kultivierungsdauer auf Membraneinsätzen höher als die des Primärzellmodells, die Werte der Permeabilitätskoeffizienten für Natriumfluoreszein und die Expression der *tight junction* Proteine Claudin-5 und Occludin waren jedoch vergleichbar. Eine ähnliche Studie zum Vergleich hiPS-basierter und Primärzell-Modelle wurde von Di Marco et al. [83] bereits 2020 veröffentlicht, allerdings wurde in dieser kein reiner Vergleich der Endothelzell-Charakteristika gezogen. Für alle Untersuchungen wurde ein Co-Kultur-Modell mit Astrozyten verwendet, die einen positiven Einfluss auf die Barriere-Eigenschaften und die Expression von spezifischen Markern haben können [82]. Dagegen wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Endothelzellen betrachtet, um ein zugleich einfaches wie auch zuverlässiges Modell-System für routinemäßige pharmakologische Studien zu untersuchen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass durch eine Anpassung des Kultivierungsprotokolls im Stadium der Kultivierung auf Membraneinsätzen mit dem Einsatz von Serum nur auf einer Seite der Barriere die selektive Permeabilität signifikant gesteigert werden konnte. Der Vergleich des dynamischen Permeabilitätsverhaltens im Hinblick auf hydrophile und lipophile Markersubstanzen stellte einen signifikanten Anstieg dar. Dies ist ein Ausdruck dafür, dass die etablierte Blut-Hirn-Schranken-Barriere ähnlich der In-vivo-Situation sehr gut in der Lage ist, den Übertritt hydrophiler Substanzen zu begrenzen [53, 79].

Im Hinblick auf das hiPS-basierte Blut-Hirn-Schranken-Modell darf allerdings nicht die Tatsache ignoriert werden, dass bei der Untersuchung des Transkriptom von Zellen, die

basierend auf der hier genutzten Differenzierungsstrategie hergestellt wurden, nicht nur endotheliale Marker gefunden wurden, sondern auch epitheliale Gene exprimiert wurden [78, 105, 106]. Dieses unterschwellige epitheliale Transkriptionsprofil ändert jedoch nichts daran, dass die erhaltenen differenzierten Zellen die bereits beschriebenen endothelialen Eigenschaften verkörpern [107]. Die wissenschaftliche Gemeinschaft diskutiert zu diesem Zeitpunkt noch, inwieweit das erhaltene Barriere-Modell als Endothelzell-ähnliches Modell anzusehen ist [107] oder ob es aufgrund der epithelialen Expressionsprofile nicht als Blut-Hirn-Schranken-Modell eingesetzt werden sollte [108]. Eine endgültige Entscheidung wird vermutlich darauf basieren, inwieweit der epitheliale Charakter durch Anpassung der Differenzierungsstrategie unterdrückt werden kann [105] und ob die erhaltenen Ergebnisse nutzbringend in der pharmakologischen Forschung eingesetzt und auf In-vivo-Studien übertragen werden können.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Entwicklung krankheitsspezifischer Blut-Hirn-Schranken-Modelle nicht auf solche Erkrankungen beschränkt sein muss oder sollte, bei denen die Integrität der Blut-Hirn-Schranke bereits im frühen Krankheitsverlauf in Frage gestellt ist. Modelle für neurodegenerative Erkrankungen mit zugrundeliegenden Mutationen sind bereits für eine Vielzahl von Erkrankungen wie Morbus Huntington [109, 110], Amyotrophe Lateralsklerose [110] oder auch Morbus Alzheimer verursacht durch PSEN1-Mutation [110] vorhanden. Der Zeitpunkt, zu dem die Blut-Hirn-Schranke bei Morbus Parkinson an Funktionsfähigkeit verliert, wird noch immer in der Wissenschaft diskutiert. Man ging lange davon aus, dass eine Schädigung der Barriere erst im späteren Parkinson-Verlauf auftritt [4, 111], jedoch haben neuere Studien gezeigt, dass die Integrität und Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke bereits in einem früheren Krankheitsstadium reduziert ist. So wurden in histologischen Studien punktuelle Einblutungen gefunden [112, 113] und auch eine Reduzierung der P-gp-Aktivität als Ursache für verstärktes Eindringen von pharmakologischen Substanzen ins Gehirn wurde diskutiert [114, 115]. Auch in dem hier etablierten Blut-Hirn-Schranken-Modell basierend auf hiPS eines Patienten mit sporadischem Morbus Parkinson zeigt die Immunfluoreszenzfärbung eine weniger starke Ausprägung von P-gp. Das legt zum einen nahe, dass das hier etablierte Modell eine zuverlässige Grundlage für die Evaluierung pharmakologischer Substanzen für die Parkinson-Therapie darstellt, und zum anderen ist dies ein weiterer Baustein, der die Bedeutung des P-Glycoproteins beim Fortschreiten des Morbus Parkinson untermauert.

Die in dieser Arbeit erreichten TEER-Werte der verschiedenen Blut-Hirn-Schranken-Modelle sind deutlich niedriger als die Werte, die von anderen Gruppen berichtet werden [74, 77, 80, 116, 117], die erreichten Permeabilitätskoeffizienten dagegen sind vergleichbar [68, 74, 99]. Der Grund für den Unterschied der TEER-Werte liegt in den verwendeten Membraneinsätzen. In dieser Arbeit wurden Membranen mit Poren einer Größe von 3,0 μm verwendet, um einen

uneingeschränkten Transport von Nanopartikeln durch die Poren sicherzustellen. Andere genannte Arbeitsgruppen nutzen Membranen mit nur 0,4 µm großen Poren, die zwar höhere TEER-Werte generieren, aber für Nanopartikel-Transportstudien ungeeignet sind. Zudem ist es ein Indiz dafür, dass der absolute TEER-Wert ab einer gewissen Grenze weniger bedeutend ist als die tatsächliche Barriere-Permeabilität im Hinblick auf verschiedenste Substanzen. Die tatsächliche Barriere-Dichte im Hinblick auf den TEER-Wert der menschlichen Blut-Hirn-Schranke wird bis heute nur auf Werte über 1000 Ω cm² geschätzt [118, 119], da eine Messung mit heutigen Methoden am lebenden Menschen nicht möglich ist. Im Gegensatz dazu können Permeabilitätskoeffizienten für eine Vielzahl von pharmakologischen Substanzen bestimmt und für Vergleiche mit In-vitro-Modellen genutzt werden [84, 120].

Bei Nutzung von immortalisierten Zelllinien in der Optimierungs- und Charakterisierungsphase der Nanopartikelherstellung wird darauf Wert gelegt, dass beim Einsatz dieser einfacheren Modelle keine relevanten Eigenschaften für die jeweilige Fragestellung fehlen, sodass trotzdem ein zuverlässiges Ergebnis erlangt werden kann. Die nicht-humane Maus-Linie bEnd.3 ist nicht in der Lage, eine dichte Barriere mit hohen TEER-Werten auszubilden [121], verfügt jedoch über alle relevanten Proteine und Transporter [121, 122] um ein zuverlässiges Bild im Hinblick auf Bindung und zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln zu liefern. Bei den humanen immortalisierten Zelllinien wurde die Zelllinie hBMEC ausgewählt, da diese neben der Expression von *tight junction* Proteinen auch in der Lage ist, eine Barriere mit begrenzten Eigenschaften auszubilden [70].

Es ist im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls gelungen ein Zellkultur-Modell für Morbus Parkinson zu etablieren. Das beschriebene Modell basierend auf differenzierten LUHMES-Zellen wird verbreitet eingesetzt [87, 88, 123, 124], da es einen zuverlässigen dopaminergen Phänotyp ausbildet und die gleichen Sensitivitäten gegenüber Neurotoxinen ausweist, wie sie bei primären dopaminergen Neuronen vorkommen [90]. Vor allem die Sensitivität gegenüber MPP⁺ [125], die parallel der in In-vivo-Studien genutzten Toxizität seines Vorläufer-Moleküls MPTP [126–128] besteht, macht das LUHMES-basierte Modell zu einer idealen In-vitro-Plattform in der Morbus Parkinson-Forschung. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die in diesem Modell bei MPP⁺ - Exposition beeinflussten miRNA-Expressionsmuster sowohl mit anderen Zellkulturmodellen als auch mit Patientendaten korreliert werden können [129] und für ein zuverlässiges In-vitro-Modell sprechen.

4.2. Einfluss von hTERT auf Morbus Parkinson

Basierend auf den erbrachten Ergebnissen, sowohl bei der Quantifizierung der oxidativen Stressreaktion (Abb. 26) als auch der Analyse der Genexpressionsprofile (Abb. 27), konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der intrazellulären hTERT-Proteinmenge intrazellulären

oxidativen Stress reduzieren kann. Der intrazelluläre Kreislauf zur Entstehung und Steuerung von oxidativem Stress ist eng mit den Mitochondrien verflochten [17]. Ein Abfall der mitochondrialen Funktionalität [130] sowie genetische Mutationen, die die Funktion der Mitochondrien beeinflussen [131], sind bekannte Ursache oder Begleiterscheinung einer fortschreitenden Parkinson-Erkrankung. Die Rolle der mitochondrialen Atmungskette und ihrer Enzyme ist schon seit Jahren im Rahmen des Fortschreitens der Erkrankung bekannt [132]. Die wichtigste Konsequenz einer deregulierten mitochondrialen Funktion ist die Entstehung von intrazellulärem oxidativen Stress und die daraus resultierende zelluläre Entzündungsreaktion [16], die ein integraler Bestandteil beim Fortschreiten des Absterbens der dopaminergen Neuronen bei Morbus Parkinson ist [15, 133]. Dass die Proteinuntereinheit hTERT des Enzyms Telomerase in der Lage ist, oxidativem Stress entgegenzuwirken, ist seit Jahren bekannt [33, 38, 40, 42, 134, 135]. Dabei wurde auch festgestellt, dass diese Funktion durch Regulationen auf dem Level der Mitochondrien erfolgt [136, 137] und unabhängig von der enzymatischen Aktivität des Gesamtzyms Telomerase ist [138]. Die Analyse der intrazellulären Kommunikationsprozesse hat gezeigt, dass die deregulierten Gene zum überwiegenden Teil an der mitochondrialen Atmungskette beteiligt sind, wie in Tab. 13 aufgeführt ist. Neben dem Effekt von hTERT auf die Gene beteiligt an der mitochondrialen Atmungskette [136, 139] stehen die restlichen durch Parkinson-Induktion veränderten Genexpressionen mit DNA-Replikation im Zusammenhang. Auch die Regulation der Reparatur von DNA-Schädigungen ist eine bekannte Funktion von hTERT [140, 141]. Die verstärkte Expression des hTERT-Proteins führt folglich im genutzten Morbus Parkinson-Modell dazu, dass dieser fehlerhaften Regulation von Genexpressionsmustern entgegengesteuert wird. Dass dieser Effekt auch in einem In-vivo-Mausmodell einen positiven Effekt im Hinblick auf das Fortschreiten von Morbus Parkinson hat, wurde aktuell von Wan et al. [142] gezeigt. Damit ist hTERT ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine Parkinson-Therapie, unabhängig von der aktuell unumgänglichen Dopaminersatz-Therapie [19, 143]. Dopaminersatz wird weiterhin nötig sein, da verlorene dopaminerge Neurone zur körpereigenen Dopaminproduktion zum jetzigen Zeitpunkt nicht regeneriert werden können. Jedoch ist der Behandlungsansatz mit hTERT insofern vielversprechend, als dass er eine Verlangsamung des Fortschreitens der Erkrankung erreichen könnte. Somit könnte das Zeitfenster, in dem Morbus Parkinson mit Hilfe einer medikamentösen Dopaminregulierung symptomatisch behandelt werden kann [48], deutlich verlängert werden. Dies würde auch die Prognose der Patienten auf lange Sicht verbessern.

Die Schwierigkeit liegt nun darin, die intrazelluläre hTERT-Konzentration zu steuern und zu erhöhen, ohne eine Zellimmortalisierung auszulösen [144], die bei Krebszellen verbreitet ist [34, 145]. Gleichzeitig darf die hTERT-Konzentration bei Steuerungsversuchen auch nicht zu weit verringert werden, da eine Absenkung der hTERT-Expression ebenfalls zellschädigend

wirkt [146] und zu beschleunigter Zellalterung führt. Über viele Jahre hinweg war die medikamentöse Steuerung von hTERT und Telomerase beschränkt auf eine Herabregulierung der Aktivität, um Krebserkrankungen entgegenzuwirken [35, 44, 147]. Die Aktivierung von hTERT wurde ebenfalls im Zusammenhang mit Krebszellen untersucht [148], jedoch hat in den vergangenen Jahren auch die Aktivierung im Rahmen der Stammzellkultivierung [45] und Behandlung von Erkrankungen assoziiert mit Alterung [149] an Bedeutung gewonnen. In diesem Zusammenhang werden auch natürliche Aktivatoren von Telomerase bzw. hTERT diskutiert, wie beispielsweise ein Extrakt von *Centella asiatica* [150]. Die Funktion von hTERT im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen tritt ebenfalls in den Fokus der Forschung [151]. Damit ist die Regulation von hTERT als neuer Behandlungsansatz bei Morbus Parkinson ein fundierter, vielversprechender Ansatz. Die Schwierigkeit liegt nun eher darin, zum einen die richtigen Substanzen für diesen therapeutischen Ansatz zu identifizieren, und zum anderen festzustellen, auf welchem Weg sie zu den relevanten Zellstrukturen im Gehirn transportiert werden können. In diesem Zusammenhang sind Nanopartikel ein vielversprechender Ansatz [28, 152, 153].

4.3. Nanopartikeläre Therapie bei Morbus Parkinson

Die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen ist stark limitiert was den Einsatz pharmakologischer Stoffe betrifft, da ein Großteil der pharmakologisch aktiven Substanzen nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und ins Gehirn zu gelangen [21, 154]. Nanopartikel als Strategie, diese Limitierung zu überwinden, werden bereits seit Jahren diskutiert [28]. Dabei sind Nanopartikel basierend auf biologisch abbaubaren Polymeren oder humanem Serumalbumin als körpereigenem Protein [25, 50, 95, 155] zu favorisieren, da es bei ihrem Einsatz zu keiner Akkumulation nach längerer Behandlungsdauer kommen kann. Auch für die Therapie von Morbus Parkinson wurden bereits nanopartikeläre Strategien betrachtet, zum einen als Transportmedium für eine Gentherapie [156] und zum anderen um L-DOPA [24] oder Dopamin [26] direkt zu den dopaminergen Neuronen zu transportieren. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde Dopamin als therapeutischer Wirkstoff gewählt, da für die Nutzung von hTERT als therapeutische Option noch zu viele Zwischenschritte in der Forschung zu überwinden sind.

Die Herstellung von Dopamin-beladenen Nanopartikeln wurde angelehnt an das Protokoll publiziert von Pahuja et al. [26], jedoch wurden Anpassungen vorgenommen. Die genutzte Herstellungsmethode basiert auf einem Doppelemulsions-Lösemittelverdampfungsverfahren, das bereits bei verschiedenen Nanopartikelherstellungen die Methode der Wahl ist [49, 157]. Diese Methode hat Vorteile bei der Verkapselung von hydrophilen Substanzen wie Dopamin im Gegensatz zu einfacheren Methoden wie Nanopräzipitation [158, 159], da durch

die doppelte Emulsion ein höherer Anteil des hydrophilen Dopamins im Partikel verbleibt. Bei der stufenweisen Emulsion wird das hydrophile Dopamin als Teil einer ersten wässrigen Phase mit dem Polymer zur Nanopartikelherstellung in der organischen Phase emulgiert. Dabei verbleibt das Dopamin innerhalb kleiner hydrophiler Bereiche in der vom Volumen überwiegenden organischen Phase verteilt. Beim zweiten Emulsionsschritt wird eine zweite wässrige Phase zur Verbindung mit der ersten Emulsion angeregt. Dabei bewegt sich ein Großteil der hydrophilen, Dopamin-haltigen Bereiche aus den organischen Bereichen heraus. Es verbleibt jedoch noch immer ein höherer Anteil an Dopamin in dem Emulsionsbereich, aus dem die Nanopartikel hervorgehen, als es bei einer Methode mit nur einfacher Emulsion der Fall wäre. Es wird auch diskutiert, ob eine Veränderung der Zusammensetzung der organischen Phase hin zu einem besser mit Wasser mischbaren organischen Lösemittel die Verkapselung hydrophiler Stoffe weiter verbessern würde [157] und gleichzeitig die Charakteristika wie hydrodynamischer Durchmesser und PDI günstig beeinflussen könnten. Es ist allerdings festzuhalten, dass der Prozess der Nanopartikel-Entstehung dabei stärker auf einer Eliminierung der organischen Lösemittel basierend auf Diffusionsprozessen anstelle der hier angestrebten Verdampfungsprozesse beruhen würde. Dies kann die Charakteristika der Nanopartikel durch die Änderung des Herstellungsprozesses vollständig verändern. Daher muss jede Protokoll-Änderung gut überlegt und fundiert recherchiert sein, um keine unnötigen Rückschläge zu erleben. Mit der erfolgreichen Verkapselung von Dopamin ist allerdings erst die erste Hürde genommen. Der Transport der erhaltenen Nanopartikel hin zum Gehirn wird, wie bereits diskutiert, durch die Blut-Hirn-Schranke erschwert. Es gibt verschiedene Strategien zur Überwindung dieses Hindernisses, beispielsweise die kovalente Kopplung von Proteinen an die Nanopartikel, für die es an der Blut-Hirn-Schranke spezifische Transporter gibt, wie beispielsweise das „low density lipoprotein receptor-related protein-1“ (LRP-1) für Apolipoprotein E [66, 160], den Transferrin-Rezeptor [161, 162] oder den Insulin-Rezeptor [163]. Die nicht-kovalente Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln ist ebenfalls eine ausführlich diskutierte Technik [101, 153, 164], bei der die gewünschte Oberflächenbeschichtung nicht auf die kovalente Bindung der Zielproteine an die Nanopartikel-Oberfläche angewiesen ist. Eine wie hier durchgeführte Beschichtung der Oberfläche mit einem Surfactant [101] löst die Rekrutierung und Anlagerung von körpereigenen Proteinen aus dem Blutkreislauf aus. Die dabei entstehende Protein-Corona ist es, die die Aufnahme der Nanopartikel an der Blut-Hirn-Schranke vermittelt [165]. Durch diese verhältnismäßig einfach durchzuführende Oberflächenmodifikation wird die Partikelherstellung beschleunigt und vereinfacht, was nicht nur wirtschaftliche Vorteile birgt, sondern auch weniger chemischen Stress auf die Partikel selbst und die verkapselten pharmakologischen Substanzen auslöst. Vor allem bei geringen Verkapselungsmengen wie beim hydrophilen Dopamin ist es wichtig, nicht mehr Substanz als unbedingt notwendig durch chemische

Modifikationsprozesse zu verlieren. Dass die verwendete Oberflächenmodifikation erfolgreich darin ist, die Nanopartikel gezielt in bestimmte Zellen zu transportieren, zeigt sich sowohl in den Bindungsstudien an bEnd.3-Zellen wie auch in den Aufnahmestudien mit differenzierten hiPS-BCECs und dem erfolgreichen Dopamintransport über die Blut-Hirn-Schranken-Modelle. Der festgestellte Transport von etwas weniger als 1 % im gesunden und im Parkinson-Modell erscheint zwar sehr gering, es muss jedoch beachtet werden, dass In-vitro-Transporte einen anderen zeitlichen Verlauf haben, als das *in vivo* der Fall ist. Zensi et al. [166] haben gezeigt, dass die Aufnahme von Nanopartikeln in In-vivo-Modellen im Minutenbereich erfolgt, während bei In-vitro-Studien Inkubationszeiten von Stunden angesetzt werden müssen, um ein vergleichbares Ergebnis zu erzielen. Des Weiteren ist zu bedenken, dass eine 1%ige Konzentration im Gehirn einer ausgeglichenen systemischen Verteilung nahekommt, da das Gehirn nur etwa 1 % der Körpermasse ausmacht [167]. Zudem ist die im Modell dargestellte Kapillaroberfläche von 1,12 cm² nur etwa ein Hunderttausendstel von der Gesamtoberfläche der Kapillaren im Gehirn, die beim Menschen etwa 12 m² entspricht [168]. Damit ist bei einem In-vitro-Transport im Bereich von 1 % ein erfolgreicher Transport anzunehmen.

Zusätzlich wurden die hergestellten Partikel sowohl in Bindungsstudien als auch bei der Aufnahmeuntersuchung von einem Modell aus dopaminergen Neuronen aufgenommen. Es war dafür keine zusätzliche, die Neuronen direkt adressierende Modifikation notwendig. Ob die Nanopartikel allerdings tatsächlich selbstständig in der Lage sein müssen, nach der Blut-Hirn-Schranke auch von neuronalen Zellen aufgenommen werden zu können, wird wissenschaftlich in Frage gestellt. Beispielsweise hat Begley hat bereits 2012 [169] basierend auf experimentellen Beobachtungen postuliert, dass an der Blut-Hirn-Schranke aufgenommene Nanopartikel nicht nach dem Durchwandern der Kapillarendothelzellen wieder in den Zellzwischenraum auf der Hirnseite der Kapillaren abgegeben, sondern von Zelle zu Zelle über bestehende Zell-Zell-Kontakte weitergegeben werden. Die in dieser Arbeit erreichten Ergebnisse zeigen, dass die hergestellten Nanopartikel mit einem Morbus Parkinson-Modell kompatibel sind, von dopaminergen Neuronen aufgenommen werden können und in den genutzten Mengen keinen zytotoxischen Effekt haben. Inwieweit die Wirkung im Hinblick auf Dopaminersatz *in vivo* erfolgreich sein kann, muss entweder mit Hilfe eines kombinierten komplexeren Modells aus Blut-Hirn-Schranke und dopaminergen Neuronen mit induziertem Morbus Parkinson in einer nachfolgenden In-vitro-Studie analysiert werden, oder in einem geeigneten In-vivo-Krankheitsmodell.

4.4 Fazit und Ausblick

Zusammengefasst ist festzustellen, dass im Rahmen dieser Arbeit sowohl Blut-Hirn-Schranken- als auch neuronale In-vitro-Modelle für einen gesunden Zustand und als

Parkinson-Krankheitsmodell etabliert wurden. Die gewählten Modelle entsprechen dem aktuellen Stand der Forschung und generieren für Forschungsfragen relevante Ergebnisse. Auch wenn aktuelle Literatur nahelegt, dass Blut-Hirn-Schranken-Modelle differenziert aus hiPS nach aktuellen Protokollen keinen eindeutigen endothelialen Phänotyp haben, präsentieren sie im Hinblick auf ihre Eigenschaften und ihr Transportverhalten dennoch ein zuverlässiges, verbreitet eingesetztes Modell.

Der Einsatz von Dopamin-beladenen, biologisch abbaubaren Nanopartikeln in den etablierten Modellen hat gezeigt, dass Dopamin mit Hilfe der nanopartikulären Verkapselung über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden kann und die produzierten Nanopartikel auch von dopaminergen Neuronen unabhängig von ihrem Krankheitszustand aufgenommen werden. Die Nutzung von Dopamin als transportierte Substanz ist bereits beschrieben worden und dient in diesem Zusammenhang vorrangig als Modellsubstanz. Selbstverständlich ist die Bereitstellung von Dopamin bei Morbus Parkinson im Gehirn ein wesentlicher Behandlungsansatz, doch es dient hier vor allem zur Verdeutlichung des konzeptionellen Designs der Versuchsanordnung.

Als neuer Ansatz bei der Therapie von Morbus Parkinson wird eine verstärkte Expression von hTERT untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass intrazelluläres hTERT die wesentlichen zellulären Prozesse beteiligt am Fortschreiten von Morbus Parkinson basierend auf oxidativem Stress und Entzündungsreaktionen positiv hin zum gesunden Zustand verändern kann. Um diese Erkenntnisse auch in einem therapeutischen Rahmen nutzen zu können, muss eine pharmazeutische Option identifiziert werden, die die hTERT-Expression erhöht. Es sind verschiedene Substanzen zur Absenkung des hTERT-Spiegels bekannt, Stoffe zur Erhöhung dagegen wurden bisher kaum identifiziert. Es gilt daher künftig zu untersuchen, ob ein solcher Stoff zu dem extrem kleinen Teil von Pharmazeutika gehört, die in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Sollte dies – was nahelegt – nicht der Fall sein, wäre eine Transportmöglichkeit für einen derartigen Stoff erforderlich. Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Nanopartikel können dafür in Betracht gezogen werden. Basierend auf dem etablierten Modell ist es möglich das beispielhaft genutzte verkapselte Dopamin durch andere Stoffe zu ersetzen. Protokollanpassungen sind nötig, Dopamin stellt jedoch als kleiner, hydrophiler Stoff bereits einen Vertreter der am schwierigsten zu verkapselnden Stoffe dar. Damit sind die Grundsteine für weitere Forschungsprojekte im Hinblick auf eine nanopartikuläre Therapie von Morbus Parkinson gelegt, sowohl in der Identifizierung hTERT-Expression-steigernder Substanzen wie auch im Transport dieser Substanzen über die Blut-Hirn-Schranke hin zu den dopaminergen Neuronen. In weiteren Studien kann nun der Einsatz von hTERT in der Therapie von Morbus Parkinson beurteilt und hin zu einer pharmakologischen Zulassung untersucht werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 14(2):223-236. doi:10.1176/jnp.14.2.223
2. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE (2017) Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 3:17013. doi:10.1038/nrdp.2017.13
3. Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J (2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.* 26 Suppl 1:S1-S58. doi:10.1007/s10654-011-9581-6
4. Kalia LV, Lang AE (2015) Parkinson's disease. *Lancet.* 386(9996):896-912. doi:10.1016/S0140-6736(14)61393-3
5. Mutschler E, Schaible H-G, Vaupel P (eds) (2007) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 6., völlig überarb. und erw. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
6. Gaig C, Tolosa E (2009) When does Parkinson's disease begin?. *Mov Disord.* 24 Suppl 2:S656-S664. doi:10.1002/mds.22672
7. Garcia-Ruiz PJ, Chaudhuri KR, Martinez-Martin P (2014) Non-motor symptoms of Parkinson's disease A review...from the past. *J Neurol Sci.* 338(1-2):30-33. doi:10.1016/j.jns.2014.01.002
8. Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet.* 373(9680):2055-2066. doi:10.1016/S0140-6736(09)60492-X.
9. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S (1999) Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol.* 56(1):33-39. doi:10.1001/archneur.56.1.33
10. Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM (2003) Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 157(11):1015-1022. doi:10.1093/aje/kwg068
11. Chen H, Ritz B (2018) The Search for Environmental Causes of Parkinson's Disease: Moving Forward. *J Parkinsons Dis.* 8(s1):S9-S17. doi:10.3233/JPD-181493
12. Hipkiss AR (2014) Aging risk factors and Parkinson's disease: contrasting roles of common dietary constituents. *Neurobiol Aging.* 35(6):1469-1472. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.032
13. Reeve A, Simcox E, Turnbull D (2014) Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor?. *Ageing Res Rev.* 14(100):19-30. doi:10.1016/j.arr.2014.01.004

14. Bertram L, Tanzi RE (2005) The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 115(6):1449-1457. doi:10.1172/JCI24761
15. Deleidi M, Gasser T (2013) The role of inflammation in sporadic and familial Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci.* 70(22):4259-4273. doi:10.1007/s00018-013-1352-y
16. Hald A, Lotharius J (2005) Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link?. *Exp Neurol.* 193(2):279-290. doi:10.1016/j.expneurol.2005.01.013
17. Bishop NA, Lu T, Yankner BA (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature.* 464(7288):529-535. doi:10.1038/nature08983
18. Dorszewska J, Prendecki M, Lianeri M, Kozubski W (2014) Molecular Effects of L-dopa Therapy in Parkinson's Disease. *Curr Genomics.* 15(1):11-17. doi:10.2174/1389202914666131210213042
19. Katzenschlager R, Lees AJ (2002) Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. *J Neurol.* 249 Suppl 2:II19-II24. doi:10.1007/s00415-002-1204-4
20. He Q, Liu J, Liang J, Liu X, Li W, Liu Z, Ding Z, Tuo D (2018) Towards Improvements for Penetrating the Blood-Brain Barrier-Recent Progress from a Material and Pharmaceutical Perspective. *Cells.* 7(4):24. doi:10.3390/cells7040024
21. Pardridge WM (2005) The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.* 2(1):3-14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3
22. Re F, Gregori M, Masserini M (2012) Nanotechnology for neurodegenerative disorders. *Maturitas.* 73(1):45-51. doi:10.1016/j.maturitas.2011.12.015
23. Poupot R, Bergozza D, Fruchon S (2018) Nanoparticle-Based Strategies to Treat Neuro-Inflammation. *Materials (Basel).* 11(2):270. doi:10.3390/ma11020270
24. Gambaryan PY, Kondrasheva IG, Severin ES, Guseva AA, Kamensky AA (2014) Increasing the Efficiency of Parkinson's Disease Treatment Using a poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Based L-DOPA Delivery System. *Exp Neurobiol.* 23(3):246-252. doi:10.5607/en.2014.23.3.246
25. Trapani A, De Giglio E, Cafagna D, Denora N, Agrimi G, Cassano T, Gaetani S, Cuomo V, Trapani G (2011) Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery. *Int J Pharm.* 419(1-2):296-307. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.07.036
26. Pahuja R, Seth K, Shukla A, Shukla RK, Bhatnagar P, Chauhan LK, Saxena PN, Arun J, Chaudhari BP, Patel DK, Singh SP, Shukla R, Khanna VK, Kumar P, Chaturvedi RK, Gupta KC (2015) Trans-blood brain barrier delivery of dopamine-loaded nanoparticles reverses functional deficits in parkinsonian rats. *ACS Nano.* 9(5):4850-4871. doi:10.1021/nn506408v

27. Di Gioia S, Trapani A, Mandracchia D, De Giglio E, Cometa S, Mangini V, Arnesano F, Belgiovine G, Castellani S, Pace L, Lavecchia MA, Trapani G, Conese M, Puglisi G, Cassano T (2015) Intranasal delivery of dopamine to the striatum using glycol chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin based nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 94:180-193. doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.019
28. Saraiva C, Praça 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. doi:10.1016/j.jconrel.2016.05.044
29. Travagli RA, Browning KN, Camilleri M (2020) Parkinson disease and the gut: new insights into pathogenesis and clinical relevance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 17(11):673-685. doi:10.1038/s41575-020-0339-z
30. Klingelhoefer L, Reichmann H (2015) Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors. *Nat Rev Neurol.* 11(11):625-636. doi:10.1038/nrneurol.2015.197
31. Lotharius J, Falsig J, van Beek J, Payne S, Dringen R, Brundin P, Leist M (2005) Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. *J Neurosci.* 25(27):6329-6342. doi:10.1523/JNEUROSCI.1746-05.2005
32. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P (2005) Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 827(1):65-75. doi:10.1016/j.jchromb.2005.04.023
33. Chung HK, Cheong C, Song J, Lee HW (2005) Extratelomeric functions of telomerase. *Curr Mol Med.* 5(2):233-241. doi:10.2174/1566524053586635
34. Singhapol C, Pal D, Czapiewski R, Porika M, Nelson G, Saretzki GC (2013) Mitochondrial telomerase protects cancer cells from nuclear DNA damage and apoptosis. *PLoS One.* 8(1):e52989. doi:10.1371/journal.pone.0052989
35. Lin CP, Liu JD, Chow JM, Liu CR, Liu HE (2007) Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Drugs.* 18(2):161-170. doi:10.1097/CAD.0b013e3280109424
36. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 266(5193):2011-2015. doi:10.1126/science.7605428
37. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE (2001) Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet.* 10(7):677-685. doi:10.1093/hmg/10.7.677

38. Huang XQ, Wang J, Liu JP, Feng H, Liu WB, Yan Q, Liu Y, Sun SM, Deng M, Gong L, Liu Y, Li DW (2005) hTERT extends proliferative lifespan and prevents oxidative stress-induced apoptosis in human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(7):2503-2513. doi:10.1167/iovs.05-0154
39. Abd El-Hafeez AA, Hosoi T, Nakatsu K, Thon M, Shimamoto A, Tahara H, Ozawa K (2018) TERT enhances the survival rate of human fibroblasts under endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and lysosomal stresses. *Biotechnol Lett.* 40(6):915-922. doi:10.1007/s10529-018-2544-1
40. Indran IR, Hande MP, Pervaiz S (2011) hTERT overexpression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells. *Cancer Res.* 71(1):266-276. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1588
41. Luiten RM, Péne J, Yssel H, Spits H (2003) Ectopic hTERT expression extends the life span of human CD4+ helper and regulatory T-cell clones and confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis. *Blood.* 101(11):4512-4519. doi:10.1182/blood-2002-07-2018
42. Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, Beckmann T, Brings S, Peters H, Birch-Machin MA, von Zglinicki T, Saretzki G (2008) Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci.* 121(Pt 7):1046-1053. doi:10.1242/jcs.019372
43. Ren JG, Xia HL, Tian YM, Just T, Cai GP, Dai YR (2001) Expression of telomerase inhibits hydroxyl radical-induced apoptosis in normal telomerase negative human lung fibroblasts. *FEBS Lett.* 488(3):133-138. doi:10.1016/s0014-5793(00)02397-8
44. Barma DK, Elayadi A, Falck JR, Corey DR (2003) Inhibition of telomerase by BIBR 1532 and related analogues. *Bioorg Med Chem Lett.* 13(7):1333-1336. doi:10.1016/s0960-894x(03)00101-x
45. Nagpal N, Wang J, Zeng J, Lo E, Moon DH, Luk K, Braun RO, Burroughs LM, Keel SB, Reilly C, Lindsley RC, Wolfe SA, Tai AK, Cahan P, Bauer DE, Fong YW, Agarwal S (2020) Small-Molecule PAPD5 Inhibitors Restore Telomerase Activity in Patient Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 26(6):896-909.e1-e8. doi:10.1016/j.stem.2020.03.016
46. Gibson M (ed) (2009) *Pharmaceutical preformulation and formulation. A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form*, 2. Aufl. Informa Healthcare, New York
47. Atterwill CK, Wing MG (2002) In vitro preclinical lead optimisation technologies (PLOTs) in pharmaceutical development. *Toxicol Lett.* 127(1-3):143-151. doi:10.1016/s0378-4274(01)00494-5

48. Connolly BS, Lang AE (2014) Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*. 311(16):1670-1683. doi:10.1001/jama.2014.3654
49. Shin M, Kim HK, Lee H (2014) Dopamine-loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: new strategy for encapsulating small hydrophilic drugs with high efficiency. *Biotechnol Prog*. 30(1):215-223. doi:10.1002/btpr.1835
50. Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J (2012) Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Control Release*. 161(2):264-273. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.017
51. Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A (2015) Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol*. 38:2-6. doi:10.1016/j.semcd.2015.01.002
52. Keaney J, Campbell M (2015) The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J*. 282(21):4067-4079. doi:10.1111/febs.13412
53. Daneman R, Prat A (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7(1):a020412. doi:10.1101/cshperspect.a020412
54. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV (2011) Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci*. 14(11):1398-1405. doi:10.1038/nn.2946
55. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP (2010) The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*. 58(9):1094-1103. doi:10.1002/glia.20990
56. Janzer RC, Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. 325(6101):253-257. doi:10.1038/325253a0
57. Baalman K, Marin MA, Ho TS, Godoy M, Cherian L, Robertson C, Rasband MN (2015) Axon initial segment-associated microglia. *J Neurosci*. 35(5):2283-2292. doi:10.1523/JNEUROSCI.3751-14.2015
58. Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 7(1):41-53. doi:10.1038/nrn1824
59. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 37(1):13-25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030
60. Sun H, Dai H, Shaik N, Elmquist WF (2003) Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev*. 55(1):83-105. doi:10.1016/s0169-409x(02)00172-2
61. Löscher W, Potschka H (2005) Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci*. 6(8):591-602. doi:10.1038/nrn1728
62. Benarroch EE (2012) Blood-brain barrier: recent developments and clinical correlations. *Neurology*. 78(16):1268-1276. doi:10.1212/WNL.0b013e318250d8bc
63. Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P (1995) Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of

- dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest.* 96(4):1698-1705. doi:10.1172/JCI118214
64. Minn A, Ghersi-Egea JF, Perrin R, Leininger B, Siest G (1991) Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels. *Brain Res Brain Res Rev.* 16(1):65-82. doi:10.1016/0165-0173(91)90020-9
65. Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcão A (2014) Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. *Eur J Pharm Biopharm.* 87(3):409-432. doi:10.1016/j.ejpb.2014.03.012
66. Wagner S, Zensi A, Wien SL, Tschickardt SE, Maier W, Vogel T, Worek F, Pietrzik CU, Kreuter J, von Briesen H (2012) Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model. *PLoS One.* 7(3):e32568. doi:10.1371/journal.pone.0032568
67. Stab J, Zlatev I, Raudszus B, Meister S, Pietrzik CU, Langer K, von Briesen H, Wagner S (2016) Flurbiprofen-loaded Nanoparticles Can Cross a Primary Porcine In vitro Blood-brain Barrier Model to Reduce Amyloid- β 42 Burden. *J Nanomedicine Biotherapeutic Discov* 6:140. doi:10.4172/2155-983X.1000140
68. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, Förster C, Galla HJ, Romero IA, Shusta EV, Stebbins MJ, Vandenhaute E, Weksler B, Brodin B (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(5):862-890. doi:10.1177/0271678X16630991
69. Patabendige A, Skinner RA, Abbott NJ (2013) Establishment of a simplified in vitro porcine blood-brain barrier model with high transendothelial electrical resistance. *Brain Res.* 1521:1-15. doi:10.1016/j.brainres.2012.06.057
70. 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(1):33. doi:10.1186/2045-8118-10-33
71. Eigenmann DE, Jähne EA, Smieško M, Hamburger M, Oufir M (2016) Validation of an immortalized human (hBMEC) in vitro blood-brain barrier model. *Anal Bioanal Chem.* 408(8):2095-2107. doi:10.1007/s00216-016-9313-6
72. 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(8):783-791. doi:10.1038/nbt.2247

73. 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. doi:10.1038/srep04160
74. Stebbins MJ, Wilson HK, Canfield SG, Qian T, Palecek SP, Shusta EV (2016) Differentiation and characterization of human pluripotent stem cell-derived brain microvascular endothelial cells. *Methods.* 101:93-102. doi:10.1016/j.ymeth.2015.10.016
75. Stebbins MJ, Lippmann ES, Faubion MG, Daneman R, Palecek SP, Shusta EV (2018) Activation of RAR α , RAR γ , or RXR α Increases Barrier Tightness in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Endothelial Cells. *Biotechnol J.* 13(2):1700093. doi:10.1002/biot.201700093
76. Wilson HK, Canfield SG, Hjortness MK, Palecek SP, Shusta EV (2015) Exploring the effects of cell seeding density on the differentiation of human pluripotent stem cells to brain microvascular endothelial cells. *Fluids Barriers CNS.* 12:13. doi:10.1186/s12987-015-0007-9
77. Appelt-Menzel A, Cubukova A, Günther K, Edenhofer F, Piontek J, Krause G, Stüber 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(4):894-906. doi:10.1016/j.stemcr.2017.02.021
78. Delsing L, Dønnes P, Sánchez J, Clausen M, Voulgaris D, Falk A, Herland A, Brolén G, Zetterberg H, Hicks R, Synnergren J (2018) Barrier Properties and Transcriptome Expression in Human iPSC-Derived Models of the Blood-Brain Barrier. *Stem Cells.* 36(12):1816-1827. doi:10.1002/stem.2908
79. Goldeman C, Andersen M, Al-Robai A, Buchholtz T, Svane N, Ozgür B, Holst B, Shusta E, Hall VJ, Saaby L, Hyttel P, Brodin B (2021) Human induced pluripotent stem cells (BIONi010-C) generate tight cell monolayers with blood-brain barrier traits and functional expression of large neutral amino acid transporter 1 (SLC7A5). *Eur J Pharm Sci.* 156:105577. doi:10.1016/j.ejps.2020.105577
80. Neal EH, Marinelli NA, Shi Y, McClatchey PM, Balotin KM, Gullett DR, Hagerla KA, Bowman AB, Ess KC, Wikswo JP, Lippmann ES (2019) A Simplified, Fully Defined Differentiation Scheme for Producing Blood-Brain Barrier Endothelial Cells from Human iPSCs. *Stem Cell Reports.* 12(6):1380-1388. doi:10.1016/j.stemcr.2019.05.008
81. Mantle JL, Min L, Lee KH (2016) Minimum Transendothelial Electrical Resistance Thresholds for the Study of Small and Large Molecule Drug Transport in a Human in Vitro Blood-Brain Barrier Model. *Mol Pharm.* 13(12):4191-4198. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00818

82. Lippmann ES, Weidenfeller C, Svendsen CN, Shusta EV (2011) Blood-brain barrier modeling with co-cultured neural progenitor cell-derived astrocytes and neurons. *J Neurochem.* 119(3):507-520. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07434.x
83. Di Marco A, Vignone D, Gonzalez Paz O, Fini I, Battista MR, Cellucci A, Bracacel E, Auciello G, Veneziano M, Khetarpal V, Rose M, Rosa A, Gloaguen I, Monteagudo E, Herbst T, Dominguez C, Muñoz-Sanjuán I (2020) Establishment of an in Vitro Human Blood-Brain Barrier Model Derived from Induced Pluripotent Stem Cells and Comparison to a Porcine Cell-Based System. *Cells.* 9(4):994. doi:10.3390/cells9040994
84. Roux GL, Jarray R, Guyot AC, Pavoni S, Costa N, Théodoro F, Nassor F, Pruvost A, Tournier N, Kiyon Y, Langer O, Yates F, Deslys JP, Mabondzo A (2019) Proof-of-Concept Study of Drug Brain Permeability Between in Vivo Human Brain and an in Vitro iPSCs-Human Blood-Brain Barrier Model. *Sci Rep.* 9(1):16310. doi:10.1038/s41598-019-52213-6
85. Suzuki S, Akamatsu W, Kisa F, Sone T, Ishikawa KI, Kuzumaki N, Katayama H, Miyawaki A, Hattori N, Okano H (2017) Efficient induction of dopaminergic neuron differentiation from induced pluripotent stem cells reveals impaired mitophagy in PARK2 neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 483(1):88-93. doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.188
86. Wang M, Ling KH, Tan JJ, Lu CB (2020) Development and Differentiation of Midbrain Dopaminergic Neuron: From Bench to Bedside. *Cells.* 9(6):1489. doi:10.3390/cells9061489
87. Kraushaar U, Loser D, Danker T, Moeller C, Leist M (2019) Electrophysiological evaluation of LUHMES cells as model of human dopaminergic neurons. *Toxicol Lett.* 314(Suppl):S152. doi:10.1016/j.toxlet.2019.09.002
88. Scholz D, Pörtl D, Genewsky A, Weng M, Waldmann T, Schildknecht S, Leist M (2011) Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. *J Neurochem.* 119(5):957-971. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07255.x
89. Cenci MA (2014) Presynaptic Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications. *Front Neurol.* 5:242. doi:10.3389/fneur.2014.00242
90. Ko KR, Tam NW, Teixeira AG, Frampton JP (2020) SH-SY5Y and LUHMES cells display differential sensitivity to MPP+, tunicamycin, and epoxomicin in 2D and 3D cell culture. *Biotechnol Prog.* 36(2):e2942. doi:10.1002/btpr.2942

91. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 219(4587):979-980. doi:10.1126/science.6823561
92. Schildknecht S, Pörtl D, Nagel DM, Matt F, Scholz D, Lotharius J, Schmiege N, Salvo-Vargas A, Leist M (2009) Requirement of a dopaminergic neuronal phenotype for toxicity of low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium to human cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 241(1):23-35. doi:10.1016/j.taap.2009.07.027
93. Vila M, Przedborski S (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 4(5):365-375. doi:10.1038/nrn1100
94. Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM, Klingmüller U (2002) Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther*. 9(8):477-487. doi:10.1038/sj.gt.3301653
95. Wagner S, Kufleitner J, Zensi A, Dadparvar M, Wien S, Bungert J, Vogel T, Worek F, Kreuter J, von Briesen H (2010) Nanoparticulate transport of oximes over an in vitro blood-brain barrier model. *PLoS One*. 5(12):e14213. doi:10.1371/journal.pone.0014213
96. Danz K, Höcherl T, Wien SL, Wien L, von Briesen H, Wagner S (2022) Experimental Comparison of Primary and hiPS-Based In Vitro Blood-Brain Barrier Models for Pharmacological Research. *Pharmaceutics*. 14(4):737. doi:10.3390/pharmaceutics14040737
97. Yuan SY, Rigor RR (2011) Regulation of Endothelial Barrier Function. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA)
98. Kleimann, P. (2014). Der Einfluss von Nanopartikelstabilisatoren auf die Flüssigkeitszerstäubung mittels Druckluft-, Ultraschall- und Lochmembranverneblern. Doctoral dissertation, Gießen, Justus-Liebig-Universität
99. Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, Grove JR (1999) MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci*. 88(1):28-33. doi:10.1021/js9803205
100. Xu JS, Huang J, Qin R, Hinkle GH, Povoski SP, Martin EW, Xu RX (2010) Synthesizing and binding dual-mode poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanobubbles for cancer targeting and imaging. *Biomaterials*. 31(7):1716-1722. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.052
101. Gelperina S, Maksimenko O, Khalansky A, Vanchugova L, Shipulo E, Abbasova K, Berdiev R, Wohlfart S, Chepurnova N, Kreuter J (2010) Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 74(2):157-163. doi:10.1016/j.ejpb.2009.09.003

102. Kola I, Landis J (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 3(8):711-715. doi:10.1038/nrd1470
103. Dowden H, Munro J (2019) Trends in clinical success rates and therapeutic focus. *Nat Rev Drug Discov.* 18(7):495-496. doi:10.1038/d41573-019-00074-z
104. Syvänen S, Lindhe O, Palner M, Kornum BR, Rahman O, Långström B, Knudsen GM, Hammarlund-Udenaes M (2009) Species differences in blood-brain barrier transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metab Dispos.* 37(3):635-643. doi:10.1124/dmd.108.024745
105. Lu TM, Houghton S, Magdeldin T, Durán JGB, Minotti AP, Snead A, Sproul A, Nguyen DT, Xiang J, Fine HA, Rosenwaks Z, Studer L, Rafii S, Agalliu D, Redmond D, Lis R (2021) Pluripotent stem cell-derived epithelium misidentified as brain microvascular endothelium requires ETS factors to acquire vascular fate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 118(8):e2016950118. doi:10.1073/pnas.2016950118
106. Vatine GD, Barrile R, Workman MJ, Sances S, Barriga BK, Rahnema M, Barthakur S, Kasendra M, Lucchesi C, Kerns J, Wen N, Spivia WR, Chen Z, Van Eyk J, Svendsen CN (2019) Human iPSC-Derived Blood-Brain Barrier Chips Enable Disease Modeling and Personalized Medicine Applications. *Cell Stem Cell.* 24(6):995-1005. doi:10.1016/j.stem.2019.05.011
107. Lippmann ES, Azarin SM, Palecek SP, Shusta EV (2020) Commentary on human pluripotent stem cell-based blood-brain barrier models. *Fluids Barriers CNS.* 17(1):64. doi:10.1186/s12987-020-00222-3
108. Lu TM, Barcia Durán JG, Houghton S, Rafii S, Redmond D, Lis R (2021) Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Endothelial Cells: Current Controversies. *Front Physiol.* 12:642812. doi:10.3389/fphys.2021.642812
109. Lim RG, Quan C, Reyes-Ortiz AM, Lutz SE, Kedaigle AJ, Gipson TA, Wu J, Vatine GD, Stocksdales J, Casale MS, Svendsen CN, Fraenkel E, Housman DE, Agalliu D, Thompson LM (2017) Huntington's Disease iPSC-Derived Brain Microvascular Endothelial Cells Reveal WNT-Mediated Angiogenic and Blood-Brain Barrier Deficits. *Cell Rep.* 19(7):1365-1377. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.021
110. Katt ME, Mayo LN, Ellis SE, Mahairaki V, Rothstein JD, Cheng L, Searson PC (2019) The role of mutations associated with familial neurodegenerative disorders on blood-brain barrier function in an iPSC model. *Fluids Barriers CNS.* 16(1):20. doi:10.1186/s12987-019-0139-4
111. Schapira AH, Jenner P (2011) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 26(6):1049-1055. doi:10.1002/mds.23732
112. Pienaar IS, Lee CH, Elson JL, McGuinness L, Gentleman SM, Kalaria RN, Dexter DT (2015) Deep-brain stimulation associates with improved microvascular integrity in the

- subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 74:392-405. doi:10.1016/j.nbd.2014.12.006
113. Gray MT, Woulfe JM (2015) Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 35(5):747-750. doi:10.1038/jcbfm.2015.32
114. Bartels AL, Willemsen AT, Kortekaas R, de Jong BM, de Vries R, de Klerk O, van Oostrom JC, Portman A, Leenders KL (2008) Decreased blood-brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson's disease, PSP and MSA. *J Neural Transm (Vienna).* 115(7):1001-1009. doi:10.1007/s00702-008-0030-y
115. Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen AT, Hendrikse NH (2005) Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol.* 57(2):176-179. doi:10.1002/ana.20369
116. Canfield SG, Stebbins MJ, Morales BS, Asai SW, Vatine GD, Svendsen CN, Palecek SP, Shusta EV (2017) An isogenic blood-brain barrier model comprising brain endothelial cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *J Neurochem.* 140(6):874-888. doi:10.1111/jnc.13923
117. 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(1):9. doi:10.1186/s12987-017-0059-0
118. Lauschke K, Frederiksen L, Hall VJ (2017) Paving the Way Toward Complex Blood-Brain Barrier Models Using Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 26(12):857-874. doi:10.1089/scd.2017.0003
119. Yan L, Moriarty RA, Stroka KM (2021) Recent progress and new challenges in modeling of human pluripotent stem cell-derived blood-brain barrier. *Theranostics.* 11(20):10148-10170. doi:10.7150/thno.63195
120. Gaillard PJ, de Boer AG (2000) Relationship between permeability status of the blood-brain barrier and in vitro permeability coefficient of a drug. *Eur J Pharm Sci.* 12(2):95-102. doi:10.1016/s0928-0987(00)00152-4
121. Yang S, Mei S, Jin H, Zhu B, Tian Y, Huo J, Cui X, Guo A, Zhao Z (2017) Identification of two immortalized cell lines, ECV304 and bEnd3, for in vitro permeability studies of blood-brain barrier. *PLoS One.* 12(10):e0187017. doi:10.1371/journal.pone.0187017
122. Yang S, Jin H, Zhao Z (2018) Paracellular tightness and the functional expression of efflux transporters P-gp and BCRP in bEnd3 cells. *Neurol Res.* 40(8):644-649. doi:10.1080/01616412.2018.1460701
123. Smirnova L, Harris G, Delp J, Valadares M, Pamies D, Hogberg HT, Waldmann T, Leist M, Hartung T (2016) A LUHMES 3D dopaminergic neuronal model for neurotoxicity

- testing allowing long-term exposure and cellular resilience analysis. *Arch Toxicol.* 90(11):2725-2743. doi:10.1007/s00204-015-1637-z
124. Ganjam GK, Bolte K, Matschke LA, Neitemeier S, Dolga AM, Höllerhage M, Höglinger GU, Adamczyk A, Decher N, Oertel WH, Culmsee C (2019) Mitochondrial damage by α -synuclein causes cell death in human dopaminergic neurons. *Cell Death Dis.* 10(11):865. doi:10.1038/s41419-019-2091-2
125. Hsieh YC, Mounsey RB, Teismann P (2011) MPP(+)-induced toxicity in the presence of dopamine is mediated by COX-2 through oxidative stress. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 384(2):157-167. doi:10.1007/s00210-011-0660-8
126. Watanabe Y, Himeda T, Araki T (2005) Mechanisms of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. *Med Sci Monit.* 11(1):RA17-23.
127. Bjarkam CR, Nielsen MS, Glud AN, Rosendal F, Mogensen P, Bender D, Doudet D, Møller A, Sørensen JC (2008) Neuromodulation in a minipig MPTP model of Parkinson disease. *Br J Neurosurg.* 22 Suppl 1:S9-S12. doi:10.1080/02688690802448285
128. Kin K, Yasuhara T, Kameda M, Date I (2019) Animal Models for Parkinson's Disease Research: Trends in the 2000s. *Int J Mol Sci.* 20(21):5402. doi:10.3390/ijms20215402
129. Kern F, Krammes L, Danz K, Diener C, Kehl T, Küchler O, Fehlmann T, Kahraman M, Rheinheimer S, Aparicio-Puerta E, Wagner S, Ludwig N, Backes C, Lenhof HP, von Briesen H, Hart M, Keller A, Meese E (2021) Validation of human microRNA target pathways enables evaluation of target prediction tools. *Nucleic Acids Res.* 49(1):127-144. doi:10.1093/nar/gkaa1161
130. Winklhofer KF, Haass C (2010) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1802(1):29-44. doi:10.1016/j.bbadis.2009.08.013
131. Zuo L, Motherwell MS (2013) The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene.* 532(1):18-23. doi:10.1016/j.gene.2013.07.085
132. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 395(6701):451-452. doi:10.1038/26652
133. Vernier P, Moret F, Callier S, Snappyan M, Wersinger C, Sidhu A (2004) The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: insights from embryology and evolution of the mesostriatocortical system. *Ann N Y Acad Sci.* 1035:231-249. doi:10.1196/annals.1332.015
134. Chiodi I, Mondello C (2012) Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria. *Front Oncol.* 2:133. doi:10.3389/fonc.2012.00133

135. Cong Y, Shay JW (2008) Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell Res.* 18(7):725-732. doi:10.1038/cr.2008.74
136. Green PD, Sharma NK, Santos JH (2019) Telomerase Impinges on the Cellular Response to Oxidative Stress Through Mitochondrial ROS-Mediated Regulation of Autophagy. *Int J Mol Sci.* 20(6):1509. doi:10.3390/ijms20061509
137. Saretzki G (2009) Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp Gerontol.* 44(8):485-492. doi:10.1016/j.exger.2009.05.004
138. Lee J, Sung YH, Cheong C, Choi YS, Jeon HK, Sun W, Hahn WC, Ishikawa F, Lee HW (2008) TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene.* 27(26):3754-3760. doi:10.1038/sj.onc.1211037
139. Shin WH, Chung KC (2020) Human telomerase reverse transcriptase positively regulates mitophagy by inhibiting the processing and cytoplasmic release of mitochondrial PINK1. *Cell Death Dis.* 11(6):425. doi:10.1038/s41419-020-2641-7
140. Billard P, Poncet DA (2019) Replication Stress at Telomeric and Mitochondrial DNA: Common Origins and Consequences on Ageing. *Int J Mol Sci.* 20(19):4959. doi:10.3390/ijms20194959
141. Zhang Y, Wang C, Jin Y, Yang Q, Meng Q, Liu Q, Dai Y, Cai L, Liu Z, Liu K, Sun H (2018) Activating the PGC-1 α /TERT Pathway by Catalpol Ameliorates Atherosclerosis via Modulating ROS Production, DNA Damage, and Telomere Function: Implications on Mitochondria and Telomere Link. *Oxid Med Cell Longev.* 2018:2876350. doi:10.1155/2018/2876350
142. Wan T, Weir EJ, Johnson M, Korolchuk VI, Saretzki GC (2021) Increased telomerase improves motor function and alpha-synuclein pathology in a transgenic mouse model of Parkinson's disease associated with enhanced autophagy. *Prog Neurobiol.* 199:101953. doi:10.1016/j.pneurobio.2020.101953
143. Schapira AH (2009) Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 30(1):41-47. doi:10.1016/j.tips.2008.10.005
144. Ouellette MM, McDaniel LD, Wright WE, Shay JW, Schultz RA (2000) The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes. *Hum Mol Genet.* 9(3):403-411. doi:10.1093/hmg/9.3.403
145. Smith-Sonneborn J (2020) Telomerase Biology Associations Offer Keys to Cancer and Aging Therapeutics. *Curr Aging Sci.* 13(1):11-21. doi:10.2174/1874609812666190620124324
146. Sun L, Chiang JY, Choi JY, Xiong ZM, Mao X, Collins FS, Hodes RJ, Cao K (2019) Transient induction of telomerase expression mediates senescence and reduces tumorigenesis in primary fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116(38):18983-18993. doi:10.1073/pnas.1907199116

147. Leão R, Apolónio JD, Lee D, Figueiredo A, Tabori U, Castelo-Branco P (2018) Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *J Biomed Sci.* 25(1):22. doi:10.1186/s12929-018-0422-8
148. Chau MN, El Touny LH, Jagadeesh S, Banerjee PP (2007) Physiologically achievable concentrations of genistein enhance telomerase activity in prostate cancer cells via the activation of STAT3. *Carcinogenesis.* 28(11):2282-2290. doi:10.1093/carcin/bgm148
149. Tsoukalas D, Fragkiadaki P, Docea AO, Alegakis AK, Sarandi E, Thanasoula M, Spandidos DA, Tsatsakis A, Razgonova MP, Calina D (2019) Discovery of potent telomerase activators: Unfolding new therapeutic and anti-aging perspectives. *Mol Med Rep.* 20(4):3701-3708. doi:10.3892/mmr.2019.10614
150. Tsoukalas D, Buga AM, Docea AO, Sarandi E, Mitrut R, Renieri E, Spandidos DA, Rogoveanu I, Cercelaru L, Niculescu M, Tsatsakis A, Calina D (2021) Reversal of brain aging by targeting telomerase: A nutraceutical approach. *Int J Mol Med.* 48(5):199. doi:10.3892/ijmm.2021.5032
151. Saretzki G, Wan T (2021) Telomerase in Brain: The New Kid on the Block and Its Role in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines.* 9(5):490. doi:10.3390/biomedicines9050490
152. Mc Carthy DJ, Malhotra M, O'Mahony AM, Cryan JF, O'Driscoll CM (2015) Nanoparticles and the blood-brain barrier: advancing from in-vitro models towards therapeutic significance. *Pharm Res.* 32(4):1161-1185. doi:10.1007/s11095-014-1545-6
153. Gao H (2016) Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. *Acta Pharm Sin B.* 6(4):268-286. doi:10.1016/j.apsb.2016.05.013
154. Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K, Małeckki A (2008) Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep.* 60(5):600-622.
155. Kreuter J (2013) Mechanism of polymeric nanoparticle-based drug transport across the blood-brain barrier (BBB). *J Microencapsul.* 30(1):49-54. doi:10.3109/02652048.2012.692491
156. Huang R, Ma H, Guo Y, Liu S, Kuang Y, Shao K, Li J, Liu Y, Han L, Huang S, An S, Ye L, Lou J, Jiang C (2013) Angiopep-conjugated nanoparticles for targeted long-term gene therapy of Parkinson's disease. *Pharm Res.* 30(10):2549-2559. doi:10.1007/s11095-013-1005-8
157. Cohen-Sela E, Chorny M, Koroukhov N, Danenberg HD, Golomb G (2009) A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J Control Release.* 133(2):90-95. doi:10.1016/j.jconrel.2008.09.073

158. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release*. 57(2):171-185. doi:10.1016/s0168-3659(98)00116-3
159. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T (1999) Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm*. 25(4):471-476. doi:10.1081/ddc-100102197
160. Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ränge P, Cychutek K, Koch-Brandt C, Alyautdin R (2002) Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target*. 10(4):317-325. doi: 10.1080/10611860290031877
161. Choudhury H, Pandey M, Chin PX, Phang YL, Cheah JY, Ooi SC, Mak KK, Pichika MR, Kesharwani P, Hussain Z, Gorain B (2018) Transferrin receptors-targeting nanocarriers for efficient targeted delivery and transcytosis of drugs into the brain tumors: a review of recent advancements and emerging trends. *Drug Deliv Transl Res*. 8(5):1545-1563. doi:10.1007/s13346-018-0552-2
162. Yan F, Wang Y, He S, Ku S, Gu W, Ye L (2013) Transferrin-conjugated, fluorescein-loaded magnetic nanoparticles for targeted delivery across the blood-brain barrier. *J Mater Sci Mater Med*. 24(10):2371-2379. doi:10.1007/s10856-013-4993-3
163. Leyva-Gómez G, Cortés H, Magaña JJ, Leyva-García N, Quintanar-Guerrero D, Florán B (2015) Nanoparticle technology for treatment of Parkinson's disease: the role of surface phenomena in reaching the brain. *Drug Discov Today*. 20(7):824-837. doi:10.1016/j.drudis.2015.02.009
164. Pardridge WM (2021) Kinetics of Blood-Brain Barrier Transport of Monoclonal Antibodies Targeting the Insulin Receptor and the Transferrin Receptor. *Pharmaceuticals (Basel)*. 15(1):3. doi:10.3390/ph15010003
165. Jain P, Pawar RS, Pandey RS, Madan J, Pawar S, Lakshmi PK, Sudheesh MS (2017) In-vitro in-vivo correlation (IVIVC) in nanomedicine: Is protein corona the missing link? *Biotechnol Adv*. 35(7):889-904. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.08.003
166. Zensi A, Begley D, Pontikis C, Legros C, Mihoreanu L, Wagner S, Büchel C, von Briesen H, Kreuter J (2009) Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *J Control Release*. 137(1):78-86. doi:10.1016/j.jconrel.2009.03.002
167. Kreuter J, Gelperina S (2008) Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori*. 94(2):271-277.
168. Pardridge WM (1991) Advances in cell biology of blood-brain barrier transport. *Semin Cell Biol*. 2(6):419-426.
169. Begley DJ (2012) Brain superhighways. *Sci Transl Med*. 4(147):147fs29. doi:10.1126/scitranslmed.3004611

6. Anhang

6.1. Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften (Peer-Reviewed)

Pohl M, **Danz K**, Gross O, John U, Urban J, Patzer L, Habbig S, Feldkötter M, Witzke O, Walther M, Rhode H (2013) Diagnosis of Alport syndrome - Search for proteomic biomarkers in body fluids. *Pediatric Nephrology* 28(11):2117–2123. doi:10.1007/s00467-013-2533-5

Kern F, Krammes L, **Danz K**, Diener C, Kehl T, Küchler O, Fehlmann T, Kahraman M, Rheinheimer S, Aparicio-Puerta E, Wagner S, Ludwig N, Backes C, Lenhof H-P, Briesen H von, Hart M, Keller A, Meese E (2021) Validation of human microRNA target pathways enables evaluation of target prediction tools. *Nucleic Acids Res* 49(1):127–144. doi:10.1093/nar/gkaa1161

Doniz Kettenmann S, White M, Colard-Thomas J, Kraft M, Feßler AT, **Danz K**, Wieland G, Wagner S, Schwarz S, Wiehe A, Kulak N (2022) Investigating Alkylated Prodigiosenes and Their Cu(II)-Dependent Biological Activity: Interactions with DNA, Antimicrobial and Photoinduced Anticancer Activity. *ChemMedChem* 17(3):e202100702. doi:10.1002/cmdc.202100702

Danz K, Höcherl T, Wien SL, Wien L, Briesen H von, Wagner S (2022) Experimental Comparison of Primary and hiPS-Based In Vitro Blood–Brain Barrier Models for Pharmacological Research. *Pharmaceutics* 14(4):737. doi:10.3390/pharmaceutics14040737

Rohde F, **Danz K**, Jung N, Wagner S, Windbergs M (2022) Electrospun Scaffolds as Cell Culture Substrates for the Cultivation of an In Vitro Blood-Brain Barrier Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Pharmaceutics*. 14(6):1308. doi:10.3390/pharmaceutics14061308

Buchbeiträge

Danz K, Briesen H von, Wagner S (2021) Biodegradable Nanoparticles for Specific Drug Transport. In: J.M. Abadie M, Pinteala M, Rotaru A (eds) *New Trends in Macromolecular and Supramolecular Chemistry for Biological Applications*. Springer International Publishing, Cham, S 255–274

Poster

Danz K, Rößler F, Pohl M, Gross O, John U, Urban J, Feldkötter M, Rohde H. Evaluation proteomischer Biomarkerkandidaten zum Alport Syndrom (AS). 42. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie (GPN) und 60. Jahrestagung der Süddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (SGKJ), Bamberg (Deutschland), April 2011.

Danz K, Höcherl T, Wilhelm N, Wagner S. Comparative Analysis of Primary Porcine and Human iPS-differentiated Blood-Brain Barrier Systems. 20th Barrier- and Transporter-Meeting, Bad Herrenalb (Deutschland), Mai 2018.

Danz K, von Briesen H, Wagner S. Disease-specific, hiPS-based blood-brain barrier modelling in Parkinson's disease. 2019 Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases, Düsseldorf (Deutschland), November 2019.

Vorträge

Danz K, Höcherl T, Briesen H von, Wagner S. Blut-Hirn-Schranken-Modelle für die Pharmakologie – von Primärzellen zu hiPS-Krankheitsmodellen. PharmaForum 2021, Saarbrücken (Deutschland), April 2021.

Danz K, Gammel L, Altmaier S, Majer J, Knoll T, Meiser I, Wagner S. Investigating avenues for glioblastoma therapy with a microfluidic blood-brain barrier co-culture model. 23rd International Symposium on Signal transduction at the blood-brain barriers, Virtual Symposium, September 2021.

6.2. Danksagung

An dieser Stelle einen herzlichen Dank an alle, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Heiko Zimmermann für das Interesse und die konstruktiven Anregungen während des Erstellens meiner Arbeit und die Möglichkeit, meine Arbeit am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Hagen von Briesen für die Betreuung meiner Promotion, die andauernde Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragestellung.

Herrn Prof. Dr. Eckart Meese für die Begutachtung der Arbeit und die Unterstützung bei der Erwägung genetischer Ansatzpunkte.

Frau Dr. Sylvia Wagner für die stete Unterstützung, Betreuung, Diskussionsbereitschaft und wissenschaftliche Begleitung meines Themas.

Frau Dr. Lena Krammes und Herrn Dr. Martin Hart aus der Arbeitsgruppe von Prof. Messe (Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes) für die Durchführung der mRNA Microarrays und die anschließenden Pathway-Analysen zur oxidativen Stressreaktion von LUHMES-Zellen bei der chemischen Induktion von Morbus Parkinson mit und ohne hTERT.

Frau Dr. Julia Stab für die interessanten Diskussionen zu zellulären Morbus Parkinson-Modellen und neuen Behandlungsansätzen.

Herrn Sascha Wien für die Unterstützung bei der Protokollanpassung des Primärzellmodells der Blut-Hirn-Schranke.

Frau Tara Höcherl und Frau Anna-Lena Fischer für die Unterstützung im Rahmen ihrer Masterarbeiten.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Bioprozesse und Bioanalytik sowie der Abteilung Stammzell- und Kryotechnologie für das wundervolle Arbeitsklima, die gute und stets freundliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Meiner Mutter Karla Danz und meiner Schwester Rita Fromm für ihre dauerhafte, liebevolle Unterstützung und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

6.3. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

