



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Entwicklung und Etablierung von Testsystemen zur
Evaluierung der Lektin-Zell-Interaktionen gedehnter und
ungedehnter Urothelzellen“

verfasst von

Nadine Skarek

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

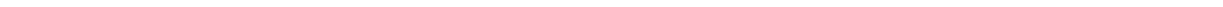
A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreuer:

A.o.Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth



**Ein herzliches Dankeschön an alle, die mich während meines Studiums
unterstützt und begleitet haben, damit dieser Lebensabschnitt ein
unvergesslicher wurde.**

Dieser Dank gilt vor allem:

Herrn Ao.Univ.-Prof. Mag.pharm. Dr. Michael Wirth und Herrn Ao.Univ.-Prof.
Mag.pharm. Dr. Franz Gabor für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses
spannenden Themas und für die ausgezeichnete Betreuung;

Mag.pharm. Dr. Lukas Neutsch für die umfangreiche und geduldige Betreuung
während des experimentellen Arbeitens und beim Verfassen dieser Arbeit
sowie für seine vielen Ideen und Ratschläge;

der gesamten Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme und für die
Hilfestellung während der experimentellen Arbeit;

der Universitätsklinik für Orthopädie, insbesondere Ass.-Prof. Mag. Dr. Stefan
Tögel und Univ.-Ass. Dr. Sonja Walzer für die Möglichkeit der Nutzung des
Flexcell® FX-5000™;

meinen Eltern, Großeltern und Schwiegereltern, die mir nicht nur das Studium
ermöglicht haben, sondern mich auch stets unterstützen und motivieren;

meinen Freunden und Studienkollegen, für die vielen Momente, die diese Zeit
einfach unvergesslich gemacht haben;

und Alexander, der mir nicht nur mit vielen Korrekturvorschlägen und
Formulierungshilfen zur Seite stand.

Danke euch allen!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Aufbau und Funktion der Harnblase	3
2.1.1	Aufbau der Harnblasenwand	3
2.1.2	Aufbau des Urothels.....	4
2.1.3	Das Urothel unter Füllungsdruck	5
2.2	Harnblasenkarzinom.....	5
2.2.1	Klassifikation des Harnblasentumors nach TNM.....	6
2.2.2	Diagnose des Urothelkarzinoms	7
2.2.3	Therapie des Urothelkarzinoms	8
2.3	Internalisation in Urothelzellen	10
2.3.1	Mögliche Endo- und Exozytoseprozesse in Urothelzellen	10
2.3.2	Endo- und Exozytoseprozesse in Urothelzellen bei Dehnung der Harnblase ..	12
2.3.3	Lektin-medierte Internalisation	13
3	Materialien und Methoden	15
3.1	Zellkultur	15
3.1.1	Aseptisches Arbeiten	15
3.1.2	Auftauen eingefrorener Zellen	15
3.1.3	Mediumwechsel.....	16
3.1.4	Passagieren der Zellen	16
3.1.5	Züchtung in FlexiPERMS	16
3.1.6	Züchtung in HT-BioFlex®-Kulturplatten (HT-Platten)	16
3.1.7	Waschen von Zellen.....	17
3.2	Auswertung der Fluoreszenzsignale	17
3.2.1	Fluoreszenzspektroskopie	18
3.2.2	Fluoreszenzmikroskopie	18
3.3	Reagenzien.....	18
3.3.1	Puffer	18

3.3.2	Lektine und Fluoreszenzfarbstoffe	19
3.3.3	Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne von Urothelkarzinomzellen	20
3.3.4	Endozytoseinhibitoren	21
3.3.5	Sonstige Chemikalien	22
3.4	Inhibition der Endo- und Exozytose fluoreszenzmarkierter Lektine	23
3.4.1	Endozytoseinhibition bei Zellen in Suspension	23
3.4.2	Internalisationsstudien am Monolayer nach zweistündiger Vorinkubation mit Endozytoseinhibitoren	24
3.4.3	Endozytoseinhibition nach Beladung mit Lektinen bei 4 °C (Pulse-Chase)	24
3.4.4	Darstellung des Zytoskeletts nach Behandlung mit Endozytoseinhibitoren	25
3.4.5	Exozytoseinhibition.....	25
3.5	Bindungs- und Internalisationsstudien von Lektinen unter Dehnung der Urothelzellen	25
3.5.1	Lektinbindungsstudien unter Verwendung kugelförmiger Dehnungskörper	26
3.5.2	Etablierung eines Testsystems für das Flexcell® FX-5000™ Tension System	27
3.5.3	Entwicklung eines Dichtungssystems für das FX-5000 System	29
3.5.4	Festlegen der Parameter der Dehnung und des Analysenprotokolls	31
4	Ergebnisse und Diskussion	34
4.1	Internalisationsstudien unter Dehnung.....	34
4.1.1	Kontrolle der Intaktheit des Monolayers nach Dehnung	35
4.1.2	Vergleich von Bindungs- und Internalisationsstudien unter Dehnung mit kugelförmigen Dehnungskörpern.....	38
4.1.3	Internalisationsstudien bei 37 °C unter Dehnung mit FX-5000	40
4.1.4	Exozytose durch Dehnung	43
4.2	Entwicklung und Vergleich verschiedener Testsysteme für die Inhibition von Endozytosewegen	46
4.2.1	Robustheit der Urothelzelllinien gegenüber ausgewählten Endozytoseinhibitoren	46
4.2.2	Internalisationsstudien nach 120-minütiger Vorinkubation mit den Endozytoseinhibitoren	48
4.2.3	Internalisationsstudie nach vorheriger Lektinbeladung (Pulse Chase)	52

4.2.4	Exozytoseinhibition.....	56
5	Zusammenfassung	58
6	Summary.....	59
7	Abkürzungsverzeichnis.....	60
8	Literaturverzeichnis.....	61
9	Abbildungsverzeichnis	64
ANHANG A.....		67
A1.	Skizze der Baseplate und Baupläne des Dichtungssystems	67
A2.	Berechnung der prozentuellen Flächendehnung	71
A3.	Interaktion der Fluoreszenzsignale in Mischungen Alexa- und Fluorescein-gekoppelter Lektine	74
A4.	Kontrolle der Überstände nach Dehnung durch kugelförmige Dehnungskörper.....	76
Anhang B.....		79
B1.	Evaluierung des Einflusses von TCEP auf die Fluoreszenzintensitäten	79
B2.	Internalisationsstudien mit Endozytoseinhibitoren (15, 45 und 60 Minuten)	80
Anhang C.....		84
	Ermittlung der optimalen Inkubationszeit	84
CURRICULUM VITAE.....		87

1 Einleitung

Beim Urothel handelt es sich um ein mechanosensibles Gewebe, dessen apikale Oberfläche sich den unterschiedlichen Füllungszuständen der Harnblase anpassen kann. Bei steigendem hydrostatischem Druck vergrößert sich die uroplakinhaltige Deckschicht des Urothels durch Insertion weiterer Uroplakine aus einem zytoplasmatischen Pool. Auch werden Botenstoffe (z.B. ATP) aus den Urothelzellen in den Extrazellularraum sezerniert, die schließlich durch Bindung an purinerge Rezeptoren afferenter Neurone die Miktion einleiten. Nach der Miktion wird der Pool an intrazellulären Vesikeln – auch durch Aufnahme von Membran-Arealen aus der apikalen Oberfläche – wieder aufgefüllt. Unklar dabei ist, ob diese Vesikel intrazellulär den Weg der lysosomalen Degradierung gehen und anschließend *de novo* synthetisiert werden müssen oder ob sie direkt in den zytoplasmatischen Pool zurückkehren können [1, 2, 3]. Eine detaillierte Kenntnis des Endozytosewegs nach Dehnung könnte eine Rolle bei der Verbesserung der intravesikalen Therapie verschiedener Erkrankungen der Harnblase spielen. So könnten durch gezielte Dehnung der Harnblase bestimmte Endozytosemechanismen stimuliert und damit die Aufnahme, zum Beispiel von Zytostatika bei der Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms, in die Urothelzellen verbessert werden.

Das nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinom ist mittels Tumorresektion zwar gut behandelbar und weist eine niedrige Mortalität auf, bei 90 % der Erkrankten treten aber innerhalb von 15 Jahren Rezidive auf, bei zwei Drittel sogar innerhalb von fünf Jahren. Neben der Belastung für den Patienten durch die laufenden Behandlungen birgt die hohe Rezidivrate bei einer langen Überlebensdauer auch hohe Kosten. Zudem besteht bei Beteiligung der Lamina propria die Gefahr der Muskelinvasion (bei 48 %), wodurch die Fünfjahresüberlebensrate auf nur noch 50 % sinkt. Das Ziel der Behandlung ist somit die Reduktion der Rezidivrate und Verhinderung der Muskelinvasion durch Verbesserung der intravesikalen Behandlung [4].

Die intravesikale Zytostatikatherapie bietet durch die Möglichkeit der direkten transurethralen Instillation in die Harnblase eine Möglichkeit der örtlich beschränkten Therapie und Rezidivprophylaxe. Jedoch ist der Therapieerfolg durch die kurze Verweilzeit am Wirkort und rasche Verdünnung durch stetige Urinproduktion begrenzt. Mittels Kopplung der Wirkstoffe an sogenannte Lektine – das sind Proteine, die durch Bioadhäsion spezifisch an Zuckerstrukturen der Oberfläche entarteter Urothelzellen binden [5] – könnte es möglich sein, die Behandlungseffizienz zu steigern, dadurch die Wirkstoffkonzentration und somit auch die Kosten der Therapie zu reduzieren, sowie die Harnblase vor aggressiven Wirkstoffen zu schützen [5]. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des Füllungszustands der

Harnblase auf die Endozytose von pflanzlichen Lektinen und soll so einen Beitrag zur Optimierung des neuen Behandlungskonzeptes sowie zum grundlegenden Verständnis des Weges der Endozytose in Urothelzellen leisten.

2 Grundlagen

Dieses Kapitel beschreibt die theoretischen Grundlagen der Harnblase und des Harnblasenkarzinoms, die als Fundament für den nachfolgenden Versuchsaufbau und die Ergebnisse dienen.

2.1 Aufbau und Funktion der Harnblase

Die Harnblase (lat. *Vesica urinaria*) ist ein glattmuskuläres Hohlorgan und befindet sich vorne im kleinen Becken unterhalb der Schambeinfuge. Ihre Aufgabe ist es, den von den Nieren gebildeten Urin kontinuierlich zu sammeln und ab einem bestimmten Füllungsvolumen rasch zu entleeren. Die Kapazität der Harnblase ist individuell unterschiedlich, der erste Harndrang tritt in der Regel ab einer Füllung von 150-300 ml auf, die gesunde Blase kann aber auch etwa 600-1.000 ml fassen [6, 7].

In der Blasenwand befinden sich vegetative Ganglienzellen und afferente Nervenfasern, die Informationen über den Füllungszustand der Harnblase sowie Schmerzen bei Überdehnung an das ZNS vermitteln [8].

2.1.1 Aufbau der Harnblasenwand

Die Wand der Harnblase besteht aus der Adventitia, der Muskularis und der vom Urothel bedeckten Mukosa. Die Adventitia ist eine Bindegewebsschicht, die für die Verankerung der Harnblase in der Umgebung zuständig ist. Sie enthält kollagene und elastische Fasern sowie Gefäße und Nerven [8]. Die Muskularis wird auch als Detrusor vesicae bezeichnet und besteht aus drei parasymphatisch innervierten Schichten glatter Muskelzellen. Am Blasenausgang verdicken sich die glattmuskulären Fasern zum inneren Sphinkter, der durch den Parasympathikus gesteuert wird. Der äußere Sphinkter besteht aus der quergestreiften Muskulatur des Beckenbodens und kann willentlich gesteuert werden. Nach der willentlichen Einleitung der Miktion erschlafft über einen komplexen Regelkreis auch der innere Sphinkter [8, 9].

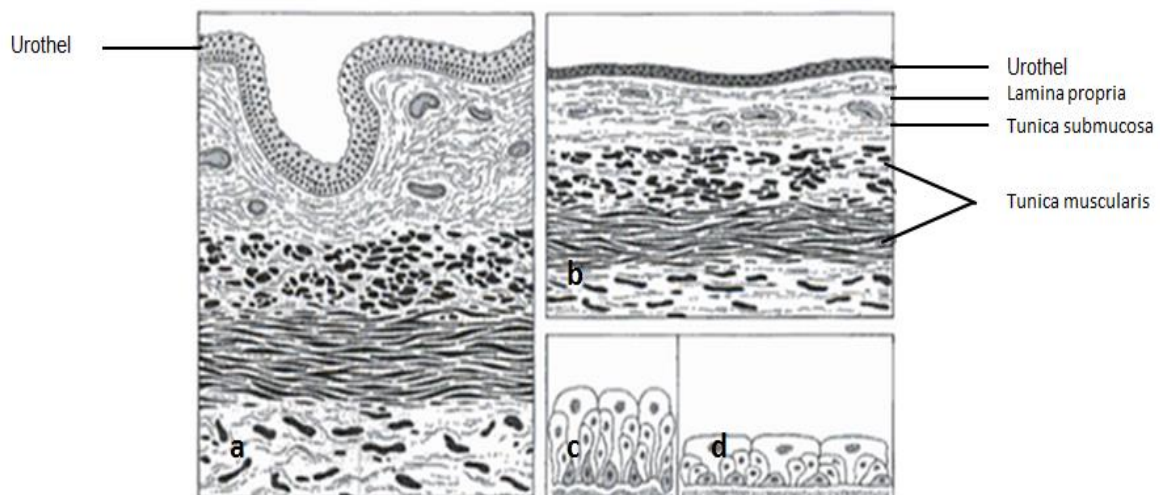


Abbildung 1: Querschnitt durch die Harnblasenwand im entleerten (a) und im gefüllten (b) Zustand sowie durch das Urothel im entspannten (c) und gespannten (d) Zustand [10].

2.1.2 Aufbau des Urothels

Beim Urothel, das die ableitenden Harnwege auskleidet, handelt es sich um ein mehrschichtiges Epithel. Es besteht aus einer einlagigen Basalschicht, einer mehrlagigen Intermediärschicht und einer einlagigen, oberflächlichen Deckschicht. Die Deckzellen (*engl. umbrella cells*) können mehrkernig oder polyploid sein und sind wesentlich größer als die darunterliegenden Zellschichten. Eine Deckzelle überdeckt jeweils mehrere Intermediärzellen (siehe Abbildung 1d). In der apikalen Membran der Deckschicht befinden sich spezifische Transmembranproteine, die sogenannten Uroplakine. Diese aggregieren zu dicht gepackten, hexagonalen Plaques aus Aggregaten von je vier verschiedenen Uroplakin-Typen (siehe Abbildung 2). Diese Plaques sind asymmetrisch gebaut; die äußere Lamelle ist dicker als die innere (siehe Abbildung 2c). Die schmalen Straßen zwischen den Plaques werden als „Hinge Regions“ bezeichnet. Durch den asymmetrischen Aufbau der Plaques und die Verbindung der Zellen durch „Tight Junctions“ entsteht eine wichtige Barriere gegen den meist nicht isotonen Harn und seinen potentiell zellschädigenden Bestandteilen. Die Deckzellen werden zudem von einer sialinsäurehaltigen Mukopolysaccharidschicht bedeckt [8, 11].

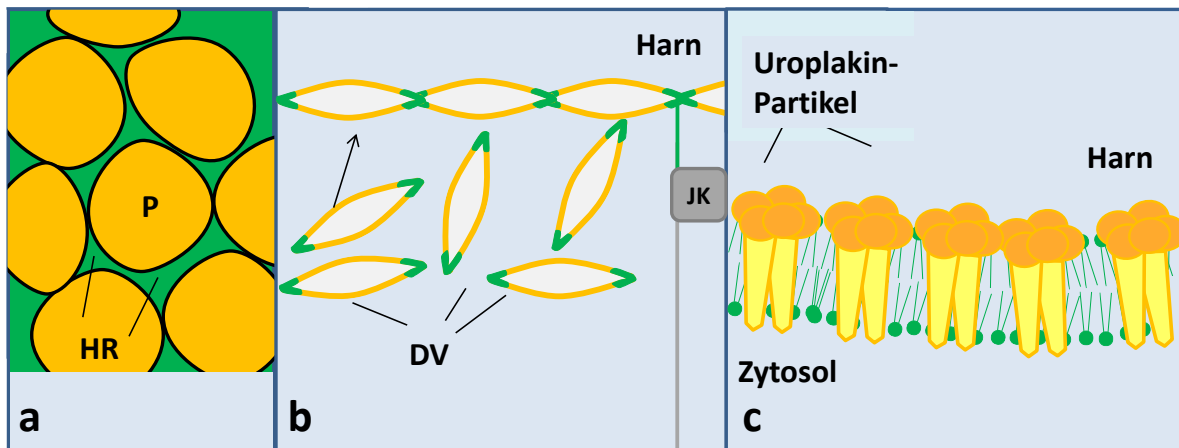


Abbildung 2: Schematische Darstellung der apikalen Membran der Deckzellen.
a) Uroplakinpartikel (P) und Hinge Regions (HR) in Aufsicht. **b)** Uroplakinhaltige, diskoiden Vesikel (DV) im Zytosol und Junktionaler Komplex (JK) mit Tight junctions. **c)** Uroplakinpartikel und Hinge Regions in Seitenansicht (modifiziert nach [8]).

2.1.3 Das Urothel unter Füllungsdruck

Das Urothel weist im entspannten Zustand bis zu acht Zelllagen auf und wirft Falten. Bei zunehmender Füllung glätten sich zuerst diese Falten (siehe Abbildung 1) bevor sich die Zahl der Zelllagen auf zwei bis drei reduziert [8, 9, 10].

Im Zytoplasma der Deckzellen liegen Uroplakine gespeichert in diskoiden Vesikeln (engl. *fusiform shaped vesicles*) bereit (siehe Abbildung 2b), die bei Bedarf durch Exozytose in die apikale Membran eingebaut werden können (siehe 2.3.22.3.1). Dies dient einerseits der Zellerneuerung und -reparatur, andererseits wird angenommen, dass das Urothel sich so durch Vergrößerung der Oberfläche dem Füllungsdruck der Blase anpassen kann, ohne für den Harn durchlässig zu werden [8, 12]. Frühere in-vivo-Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die Oberfläche der apikalen Membran von Urothelzellen nach Glättung der Falten unter Füllungsdruck um bis zu 22 % vergrößern kann [13].

2.2 Harnblasenkarzinom

Das Harnblasenkarzinom ist der siebent häufigste Krebs bei Männern und der siebzehnt häufigste bei Frauen. Zu den Risikofaktoren zählen neben genetischer Prädisposition vor allem die Exposition gegenüber renal eliminierten aromatischen Aminen und polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, welche vor allem im Tabakrauch enthaltenen sind. Raucher weisen demnach verglichen mit Nichtrauchern ein doppeltes Risiko auf, an Harnblasenkarzinom zu erkranken. Mitarbeiter der Farb-, Metall- und Erdölindustrie zählen durch die chronische Exposition gegenüber den genannten Substanzen und gegenüber chlorierten Kohlenwasserstoffen auch zu der Risikogruppe [14]. Auch eine durch

Schistosoma haematobium ausgelöste Form der Entstehung des Harnblasenkarzinoms, ist bekannt. Die infektionsbedingte Nitrosaminbildung wird hierbei als Ursache vermutet [11]. Ungeklärt ist bisweilen, ob auch die regelmäßige Verwendung von Haarfärbemitteln, ein regelmäßiger Genuss von Kaffee oder die Süßstoffe Saccharin und Zyklamat ein erhöhtes Risiko bergen [14]. Die bekannten, an der Krebsentstehung beteiligten, molekularbiologischen Mechanismen sind vor allem die Mutation von FGFR3 und des Tumorsuppressors p53, die durch den Kontakt mit den genannten Kanzerogenen entstehen [11].

2.2.1 Klassifikation des Harnblasentumors nach TNM

Die anatomische Ausbreitung der Tumore der Harnblase wird mithilfe des TNM-Klassifizierungssystems der Union Internationale Contre le Cancer (UICC 2009) eingeteilt (TNM-Staging). Dabei beschreibt die T-Kategorie die Ausbreitung des Tumors im Organ bzw. in den Nachbarorganen, die N-Kategorie das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und die M-Kategorie die Anwesenheit von Fernmetastasen. Die Einteilung erfolgt prätherapeutisch mithilfe klinischer und bildgebender Verfahren oder pathohistologisch nach Entfernung der Harnblase bzw. der regionalen Lymphknoten [14].

Prinzipiell unterscheidet man zwischen dem muskelinvasiven (MIB) und dem nicht-muskelinvasiven Blasenkrebs (NMIB). Bei Infiltration der Nachbarorgane beim MIB beträgt die Fünfjahresüberlebensrate 50 %, wenn Fernmetastasen vorhanden sind nur noch 10 % [15]. Bei etwa 75 % der Patienten handelt es sich aber um eine nicht-muskelinvasive Form. Dabei ist die Mucosa (Ta, CIS) oder Submucosa (T1) betroffen, nicht aber der Detrusor vesicae. Dieser hohe Anteil an NMIB-Patienten ist vor allem durch den langsamen Krankheitsfortschritt und das lange Überleben der Patienten begründet [14].

Beim CIS (Carcinoma in situ, auch TIS) handelt es sich um ein flaches, hochdifferenziertes NMIB, welches oft multifokal auftritt. CIS kann bei einer Zystoskopie leicht übersehen oder makroskopisch als entzündliche Läsion missinterpretiert werden [14].

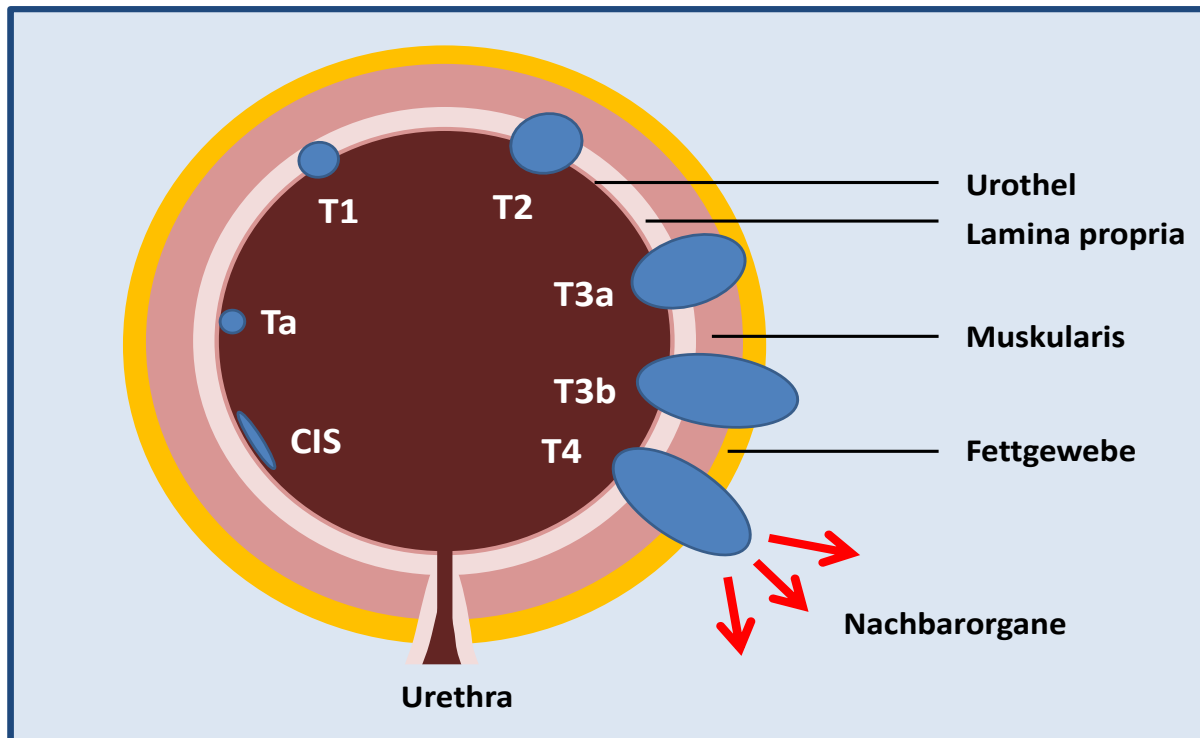


Abbildung 3: Stadien des Harnblasenkarzinoms (modifiziert nach [16]).

2.2.2 Diagnose des Urothelkarzinoms

Eine korrekte Diagnosestellung ist wesentlich, sowohl um eine adäquate Therapie einleiten zu können, als auch um deren Erfolg zu überwachen. Vor der Anwendung zytologischer oder bildgebender Diagnoseverfahren ist es von Bedeutung, neben den häufigsten Symptomen (Hämaturie und Algurie) auch die Patientengeschichte zu berücksichtigen, um eventuelle Risikofaktoren zu erheben.

Das wichtigste Diagnoseverfahren ist die Zystoskopie mit anschließender Biopsie und histologischer Auswertung des entnommenen Materials. Es können neben Anzahl, Größe und Lage der Tumore auch deren Beschaffenheit sowie Abnormitäten der Beschaffenheit der Mukosa festgestellt werden. Dabei wird unter Vollnarkose oder Spinalanästhesie ein flexibles oder formstabiles Zystoskop transurethral in die Harnblase geführt. So ist es dem Urologen möglich, eine optische Untersuchung der gesamten Harnblase durchzuführen, Gewebeproben zu entnehmen und auch direkt eine Resektion des Tumors durchzuführen [14, 17].

Daneben gibt es unter anderem die diagnostische Möglichkeit der Urinzytologie oder bildgebender Verfahren wie Computertomographie, intravenöse Urographie und Ultraschall. Um eine möglichst präzise Diagnose stellen zu können, erfolgt in der Praxis meist eine Kombination mehrerer dieser Methoden [14].

2.2.3 Therapie des Urothelkarzinoms

Für das MIB ist die radikale Zystektomie die Therapie der Wahl. Zusätzlich zur Harnblase kann es notwendig sein, auch benachbarte Organe (z.B. Prostata oder Teile der Harnleiter) zu entfernen. Allerdings wird im Interesse einer bestmöglichen Lebensqualität versucht, insbesondere bei alten, multimorbiden Patienten, die Harnblase zu erhalten. Bei normaler Blasenfunktion stehen hier die Radiotherapie und die später beschriebene Instillation von BCG als Alternative zur Verfügung [17].

Das NMIB wird vorzugsweise vollständig reseziert, standardgemäß wird diese Resektion (wie auch die Zystoskopie) mit weißem Licht durchgeführt. Das ist aber hinsichtlich der Sensitivität problematisch, da oft nicht alle Läsionen erfasst werden können. Als Alternative hat sich die photodynamische Diagnosemethode (PDD, Fluoreszenzzystoskopie) bewährt. Dabei wird 5-Aminolaevulinsäure oder Hexaminolaevulinsäure intravesikal instilliert. Unter Verwendung von blauem Licht fluoreszieren so gezielt maligne Zellen. Die Spezifität ist aber gegenüber weißem Licht reduziert, da hier auch z.B. entzündete Zellen fluoreszieren können. Daneben gibt es auch noch die Möglichkeit des Narrow-band Imaging (NBI), das über Lichtabsorption durch Hämoglobin einen Kontrast zwischen gesunden und entarteten Urothelzellen erzeugt, da Tumorzellen stärker vaskularisiert sind [17].

Obwohl durch Resektion v.a. Ta und T1 Blasentumoren meist vollständig entfernt werden können, ist die Rezidivrate hoch. Bei 90 % der Erkrankten tritt mindestens ein Rezidiv innerhalb von 15 Jahren auf, bei 70 % bereits innerhalb von fünf Jahren. Auch eine Verschlechterung durch Muskelinvasion und damit einhergehend eine wesentlich schlechtere Prognose ist v.a. bei T1 und CIS (48%) durch Beteiligung der Lamina propria möglich. Dieser hohe Anteil liegt vermutlich neben der Möglichkeit einer unvollständigen Resektion an einer durch die Resektion verursachte Tumorstreuung oder am generell schnellen Wachstum epithelialer Tumore. Daher ist eine regelmäßige zystoskopische Kontrolle notwendig und auch eine adjuvante intravesikale Zytostatikatherapie ratsam [4, 14, 17].

Standardmäßig sollte eine einmalige, postoperative intravesikale Instillation eines Chemotherapeutikums (Mitomycin C, Thiotepa, Doxorubicin oder Epirubicin) verabreicht werden, um zirkulierende oder bei der Resektion übersehene, kleine Tumore zu entfernen (Chemoresektion). Die Therapie sollte innerhalb der ersten Stunde nach einem möglichen Anheften der Tumorzellen, auf jeden Fall aber innerhalb der ersten sechs Stunden nach dem Eingriff durchgeführt werden. Diese frühe Instillation reduziert die Rezidivrate um etwa 12 % [4, 14].

Die Länge und Frequenz der Instillationstherapie wird kontrovers diskutiert. Bei Niedrigrisikopatienten ist eine einmalige postoperative Therapie Standard, bei Hochrisikopatienten kann die Therapie anschließend für mindestens vier bis acht Wochen fortgesetzt werden, jedoch nicht länger als ein Jahr [4, 14].

Bei Patienten mit sehr hohem Rezidivrisiko (z.B. bei CIS) oder bei Patienten, bei denen keine Zystektomie durchgeführt werden kann, wird eine intravesikale Therapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Immuntherapie empfohlen. Fünf Metaanalysen haben gezeigt, dass BCG-Immuntherapie nicht nur die Rezidivrate, sondern auch die Tumorprogression verringert und somit der adjuvanten Chemotherapie überlegen ist. Allerdings ist sie in den ersten beiden Wochen nach der Tumorresektion aufgrund der möglichen starken systemischen Nebenwirkungen kontraindiziert. Auch die hohen Kosten machen eine individuelle Kosten-Nutzen-Abwägung notwendig [14, 15].

Im Gegensatz zur systemischen Chemotherapie, wo neben dem Ansprechen des Tumors auf die Therapie vor allem die gegebene Dosis für den Therapieerfolg wichtig ist, ist bei der Instillationstherapie auch die Dauer der Exposition und die Konzentration der instillierten Lösung wesentlich. Die Expositionsdauer wird aber durch die Blasenkapazität des Patienten limitiert und durch die laufende Harnproduktion sinkt die Konzentration des Wirkstoffs. Daher ist es wichtig, dass der Patient am Morgen vor der Instillation keine Flüssigkeit zu sich nimmt und die Blase vor der Behandlung mithilfe eines Katheters vollständig entleert wird. Die Vollständigkeit der Entleerung kann durch eine Ultraschalluntersuchung kontrolliert werden. Ferner sollte das Chemotherapeutikum möglichst lange in der Harnblase verbleiben. Eine Stunde Instillation ist effektiver als 30 Minuten. Ob zwei Stunden effektiver als eine Stunde sind ist nicht belegt, wird aber diskutiert [4, 14].

Weitere effizienzverbessernde Maßnahmen sind Hyperthermie-induzierende, in die Blase eingeführte Mikrowellenapplikatoren oder iontophoretische Maßnahmen (electromotive drug administration, EMDA). Eine Anpassung des pH-Werts des Urins und Pufferung der intravesikalen Lösung tragen auch zur Verbesserung des Therapieerfolgs bei [4, 14].

Möglicherweise spielt auch das instillierte Volumen und damit der Füllungsstatus der Harnblase eine Rolle. Chemotherapeutika sowie auch BCG werden in einem Volumen zwischen 25-60 ml verabreicht. Eine Erhöhung dieses Volumens könnte durch erhöhte Dehnung der Urothelzellen zu einer vermehrten Aufnahme des Wirkstoffs in die Zellen führen, wie im Folgenden genauer beschrieben wird.

2.3 Internalisation in Urothelzellen

Die Instillationstherapie bietet zwar die Möglichkeit der direkten Applikation, z.B. von Zytostatika, am Wirkort und verringert so die Gefahr systemischer Nebenwirkungen. Sie wird allerdings durch die kurze Verweilzeit am Wirkort und die geringe Penetrationsrate ins Urothel limitiert. Das Urothel bildet eine starke natürliche Penetrationsbarriere für Urin und darin gelöste Stoffe und verhindert auch die unkontrollierte Aufnahme dieser. Dies wird durch den dichten Aufbau der im Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Deckschicht des Urothels gewährleistet. Die auf der Mucopolysaccharidschicht vorkommenden Zuckerreste stellen allerdings ein vielversprechendes Target dar, um durch Bindung an dieselben eine räumliche Nähe über längere Zeit zu schaffen. So kann die stetige Endozytoseaktivität der Urothelzellen passiv genutzt werden, um die Aufnahme dieser zuckerbindenden Stoffe zu erhöhen. Durch zusätzliche Dehnung der Urothelzellen könnten Endozytosemechanismen auch aktiv stimuliert werden [11, 18].

2.3.1 Mögliche Endo- und Exozytoseprozesse in Urothelzellen

Exo- und Endozytoseprozesse beschreiben den Vorgang des Transportes großer und/oder hydrophiler Moleküle durch die Zellmembran mit dem Ziel der raschen Adaption der Zellen auf bestimmte Stimuli und Bedingungsänderungen [8].

Als Exozytose bezeichnet man den Transport vesikulär abgepackter Stoffe aus der Zelle durch Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran. Die auf den beiden zu fusionierenden Membranen befindlichen SNARE-Proteine verschränken sich reißverschlussartig ineinander und führen so zur Verschmelzung der Membranen. Die Exozytose dient einerseits der Sekretion bestimmter Stoffe (z.B. Neurotransmitter), andererseits dem Einbau bestimmter Membranelemente (z.B. Uroplakine) in die Plasmamembran. Um die Membranbilanz der Zelle im Gleichgewicht zu halten, ist eine anschließende Rezirkulation der Membran in Form von Endozytose erforderlich [8].

Umgekehrt versteht man unter Endozytose den Transport extrazellulärer Stoffe, in Vesikeln verpackt, in die Zelle. Zunächst entstehen Einbuchtungen der Plasmamembran, die sich anschließend als Vesikel abschnüren und ins Zellinnere an den Zielort transportiert werden. Beim Transport innerhalb der Zelle (z.B. zu den Lysosomen) spielen die Mikrotubuli, Aktin und Myosin eine wesentliche Rolle. Die Vesikelabschnürung erfolgt mithilfe des GTP-spaltenden Proteins Dynamin (siehe Abbildung 4) [8, 19].

Verschiedene Mechanismen der Endozytose sind bekannt. Neben der Phagozytose, die nur in bestimmten Zelltypen (z.B. Makrophagen, dendritische Zellen) vorkommt, kennt man v.a. die Pinozytose. Darunter versteht man den Einschluss kleiner Mengen extrazellulärer

Flüssigkeit samt den darin gelösten Substanzen in Vesikel (ca. 100 nm). Meist wird sie durch Ligand-Rezeptorbindung initiiert [8].

Die drei wichtigsten Formen der Pinozytose sind die Clathrin-vermittelte (siehe Abbildung 4-1), die Caveolin-vermittelte (siehe Abbildung 4-2), und die Clathrin- und Caveolin-unabhängige (siehe Abbildung 4-3), Endozytose. Nur die ersten beiden werden hier genauer behandelt, da der Begriff der Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytose ein Sammelbegriff aller anderen Wege der Pinozytose ist [8].

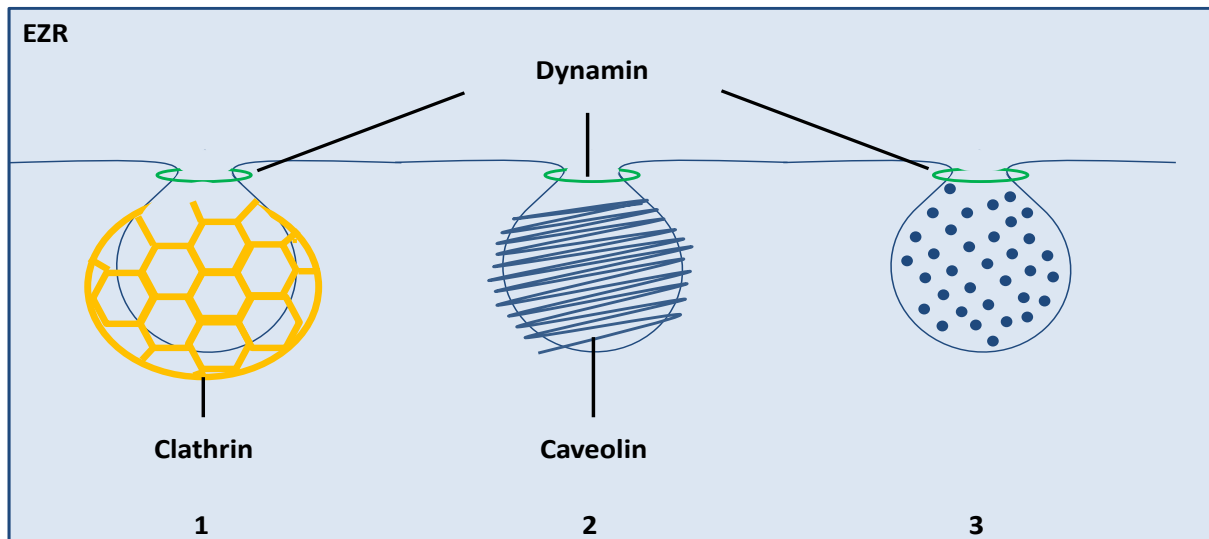


Abbildung 4: Verschiedene Formen der Pinozytose. Vereinfachte Darstellung der Clathrin-vermittelten (1), der Caveolin-vermittelten (2) und der Clathrin- und Caveolin unabhängigen Endozytose (3) (modifiziert nach [8]).

Der Clathrin-vermittelte ist der am besten untersuchte Endozytoseweg. Dabei wird ein Clathrin-Mantel über ein Adaptorprotein an der zytosolischen Seite der Membran gebunden. Die so entstehende Vertiefung der Membran (coated pit) senkt sich durch Bindung eines Liganden an spezifische Rezeptoren so weit in die Membran ein, bis sich ein Vesikel abschnürt. Der Vesikelinhalt wird über die Endosomen zu den degradierenden Lysosomen transportiert [8].

Bei der Caveolin-vermittelten Endozytose ist das Protein Caveolin für die Membraneinbuchtung verantwortlich. Im Caveola-Bereich weist die Plasmamembran eine hohe Konzentration an Cholesterol und Sphingolipiden auf (Lipid rafts). Das Vorhandensein von Cholesterol ist für die Caveolin-vermittelte Endozytose essentiell. Die Caveolae dienen vermutlich auch als Ankerplätze für Membranrezeptoren und dadurch ausgelöste intrazelluläre Signalketten. Im Gegensatz zur Clathrin-abhängigen Endozytose führt die Caveolin-abhängige Endozytose nicht unbedingt zur lysosomalen Degradierung, sondern auch eine Freisetzung im Zytosol, eine Fusion mit den Golgi-Vesikeln und dem endoplasmatischen Retikulum oder auch Transzytose sind möglich. Bei Urothelzellen

scheinen Endo- und Exozytoseprozesse eng aneinander gekoppelt zu sein (siehe 2.3.2) [8, 20, 21].

2.3.2 Endo- und Exozytoseprozesse in Urothelzellen bei Dehnung der Harnblase

Wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, machen die Deckzellen des Urothels periodisch wiederkehrende Umorganisationsprozesse durch. Um sich der Oberflächenvergrößerung der Harnblase bei zunehmendem Volumen anzupassen, durchlaufen die Zellen einen Zyklus aus Endo- und Exozytoseprozessen von Uroplakin-enthaltenden Vesikel während der Füllungsphase und Miktion. Abbildung 5 zeigt die beiden grundlegend unterschiedlichen Modelle dieses Zyklus.

Beim konventionellen Modell (a) werden bei zunehmender Dehnung der Harnblase diskoide Vesikel aus dem Zytoplasma der Urothelzellen durch Exozytose und Fusion in die apikale Membran eingebaut (a1), wodurch diese ihre Oberfläche vergrößert (a2). Bei der Miktion werden die zuvor abgegebenen Vesikel rasch wieder endozytiert (a3) und in den zytoplasmatischen Vesikelpool für den nächsten Füllungszyklus rückgeführt (a4). Neuere Untersuchungen lassen aber vermuten, dass ein weiteres Modell (b) näher am wahren Mechanismus liegt. Dabei werden in der Füllungsphase Vesikel sowohl durch Exo- als auch Endozytose (b1) für die Oberflächenvergrößerung genutzt. Die endozytierten Vesikel werden dann zu den Lysosomen transportiert und degradiert (b2). Nach der Miktion wird auch die überschüssige Membran wieder endozytiert und lysosomal abgebaut (b3). Um den Vesikelpool zu erneuern, werden im Golgi-Apparat neue Vesikel gebildet und auch die Uroplakine müssen *de-novo* synthetisiert werden (b4) [2, 8, 12, 22].

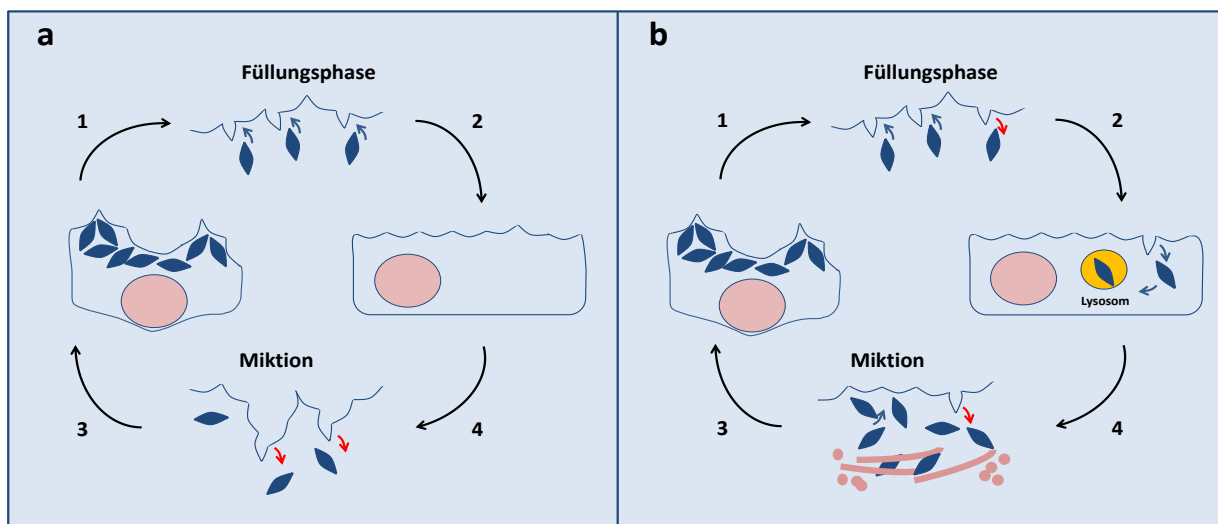


Abbildung 5: Unterschiedliche Modelle des Endo- und Exozytosezyklus bei Dehnung der Urothelzellen (modifiziert nach [2]).

Die Steuerung der Endozytose durch mechanische Stimuli ist nicht im Detail geklärt, wahrscheinlich aber spielt das Zytoskelett eine wesentliche Rolle. Auch werden Endozytoseprozesse vermutlich ATP-vermittelt induziert. Durch den steigenden hydrostatischen Druck bei der Füllung der Harnblase wird ATP aus dem Urothel in den Extrazellularraum sezerniert (siehe Abbildung 6). Von dort aus kann es an P2X-Rezeptoren der basolateralen Seite der Deckzellen binden und eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen, wodurch die Ca^{2+} -Konzentration rasch ansteigt. Dadurch und durch Proteinkinase A-vermittelt, wird der apikale Membran-Turnover, stimuliert, also sowohl Exozytose diskoider Vesikel als auch Membraninsertion. Auch an den glatten Muskelzellen der Harnblase und an afferenten Neuronen, die die Harnblase innervieren, befinden sich P2X Rezeptoren, die so ATP-vermittelt Informationen über den Füllungszustand der Harnblase vermitteln können und somit an der Einleitung der Miktion beteiligt sind [3, 22].

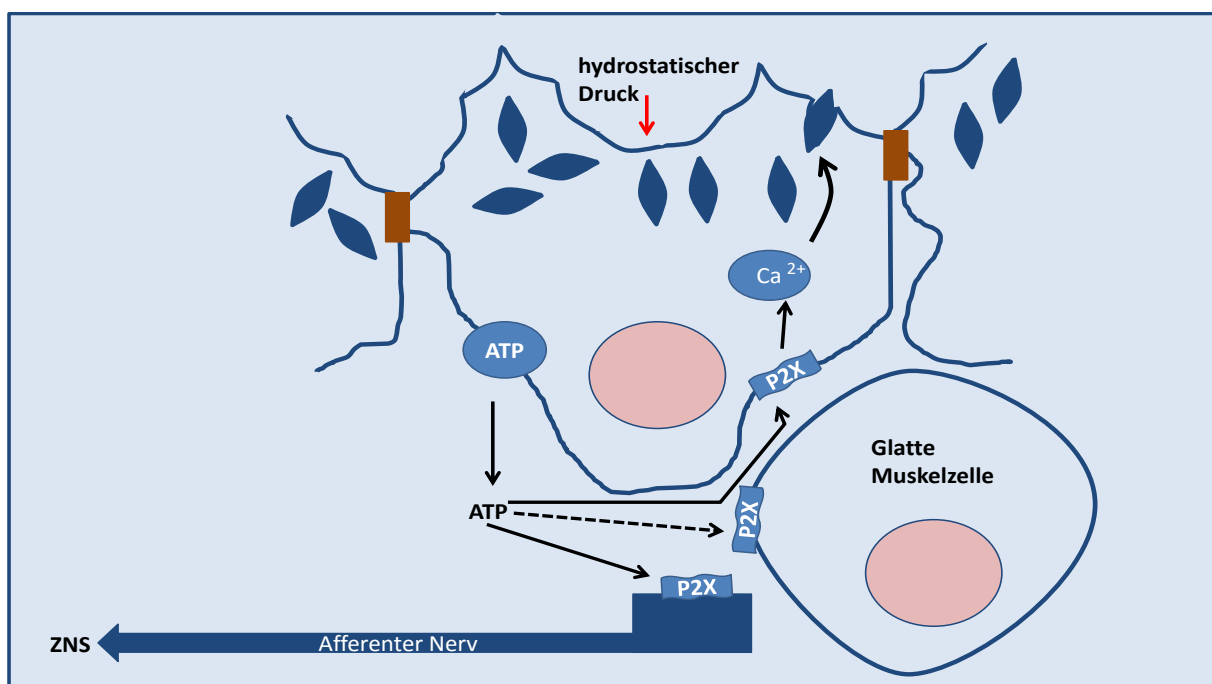


Abbildung 6: Modell der ATP-regulierten Endo- und Exozytose (modifiziert nach [3]).

2.3.3 Lektin-medierte Internalisation

Lektine (lat. *legere* – auswählen) sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, die Kohlenhydrate spezifisch erkennen und reversibel daran binden können. Sie sind weit verbreitet und kommen vor allem in Pflanzen aber auch in Tieren und Mikroorganismen vor. Die wahrscheinlich bekanntesten, hochgiftigen Vertreter der Lektine sind das Ricin (aus *Ricinus communis*) und das Abrin (aus *Abrus precatorius*) [23].

Unterschiedliche Lektine binden bevorzugt an bestimmte Zuckerstrukturen. Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick über ausgewählte, wichtige Lektine, ihren Ursprungsorganismen und

die Zuckergruppen die bevorzugt gebunden werden. WGA weist an Urothelzellen die stärkste Bindung auf, da die bevorzugt gebundenen Sialinsäurereste an der luminalen Oberfläche der Urothelzellen stark vertreten sind [11]. PNA zeigt im Zellkulturmodell eine höhere Bindungsaffinität zu entarteten Zellen als WGA [18].

Tabelle 1: Übersicht ausgewählter Lektine, ihrem Vorkommen und Selektivität [14].

Lektin	Vorkommen	Selektivität
LCA (Lens culinaris agglutinin)	Lentis culinaris	Mannose, Glucose
PNA (Peanut agglutinin)	Arachis hypogaea	Galaktose, GalNAc
UEA (Ulex europaeus isoagglutinin)	Ulex europaeus	Fucose
WGA (Wheat germ agglutinin)	Triticum vulgare	GlcNAc (N-Acetyl-D-Glucosamin) Sialinsäure (N-Acetyl-D-Neuraminsäure)

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Konjugation von Wirkstoffen an Lektine die Internalisation dieser Liganden in die Zelle erhöht sein kann. Einstülpungen der Zellmembran, die die Aufnahme von kleinen Mengen Extrazellulärflüssigkeit erlauben (fluid-phase endocytosis oder Pinozytose, siehe 2.3.1), kommen in beinahe allen Zellen vor. Durch Bioadhäsion akkumulieren Lektin-Konjugate in räumlicher Nähe der Membran und können so durch passive Ausnutzung der vorhandenen Endozytose-Aktivität verstärkt aufgenommen werden. Eine spezifische Bindung an bestimmte Membranrezeptoren kann sogar Signale an die Zelle senden, die die Vesikelbildung und/oder einen speziellen Endozytoseweg aktiv stimulieren [5, 23].

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde versucht, die genannten Vorteile der Bioadhäsion der Lektine an die Mucopolysaccharidschicht der Urothelzellen und die erhöhte Vesikulation bei Dehnung zu kombinieren, sowie die bevorzugten Endozytosewege ins Urothel zu finden mit dem Ziel, einen Beitrag zur Verbesserung der intravesikalen Therapie des Harnblasenkarzinoms zu leisten. Das Ziel der Arbeit war es, durch Anwendung von Dehnung der mit Lektinen inkubierten Urothelzellen eine erhöhte Internalisation in die gedehnten Urothelzellen zu zeigen und diese zu quantifizieren.

3 Materialien und Methoden

3.1 Zellkultur

Für alle Dehnungsversuche wurde die Zelllinie **5637** verwendet (bezogen von American Type Culture Collection, Middlesex, UK). Dabei handelt es sich um eine humane Grad-2 Urothelkarzinomzelllinie, die 1976 aus einem 68-jährigen Kaukasier isoliert wurde [24]. Als Nährmedium wurde RPMI-1640 verwendet (bezogen von Gibco® life technologies, Carlsbad, USA). Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % feuchtigkeitsgesättigter Luftatmosphäre. Alle Untersuchungen wurden mit Zellen der Passagen 40 bis 101 durchgeführt.

Für alle weiteren Studien wurde neben 5637 auch die Zelllinie **SV-HUC-1** (bezogen von American Type Culture Collection, Middlesex, UK) verwendet. Dabei handelt es sich um humane, mittels SV-40 Viren immortalisierte Urothelzellen eines gesunden 11-Jährigen [24]. Als Nährmedium wurde HAM's F-12 verwendet (bezogen von Gibco® life technologies, Carlsbad, USA), dem 10 % fetales Kälberserum, L-Glutamin zu einer Konzentration von 0,5 mM und 1 % 10 µM Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt wurde. Alle Versuche wurden mit Zellen der Passagen 76 bis 82 durchgeführt.

3.1.1 Aseptisches Arbeiten

Alle Arbeiten, die ein Öffnen der Kulturflaschen oder der Behältnisse steriler Lösungen erforderten, wurden in einer Reinraumwerkbank, auch Laminar Airflow (LAF) genannt, durchgeführt. Durch einen vertikalen Luftstrom und HOSCH-Filter entsteht eine Luftschleuse, die eine keimarme Umgebung erzeugt. Sämtliche Arbeitsflächen sowie auch Handschuhe und alle in den LAF eingebrachten Behältnisse müssen vor der Verwendung mit Ethanol (70 %) desinfiziert werden. Flüssigkeiten werden vor der Verwendung in der Zellkultur keimfiltriert (Maschenweite des Filters=0,22 µm) und anschließend nur noch im LAF geöffnet.

3.1.2 Auftauen eingefrorener Zellen

Die in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren gelagerten Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C angetaut, schnell in 9 ml angewärmtes Medium überführt und resuspendiert. Nach siebenminütiger Zentrifugation bei 1.000 Umdrehungen pro Minute wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 2 ml frischem Medium resuspendiert und je 1 ml Zellsuspension in einer frischen Kulturflasche mit 10 ml Medium angesetzt.

3.1.3 Mediumwechsel

Die Notwendigkeit eines Mediumwechsels war bei RPMI-1640 und HAM's F-12 Medium durch einen Farbumschlag des enthaltenen pH-Indikators Phenolrot von Rot zu Gelb erkennbar. In der Regel wurde ein Mediumwechsel etwa zweimal wöchentlich durchgeführt.

3.1.4 Passagieren der Zellen

Wenn eine Zelllinie in der Kulturflasche eine Konfluenz von 70-80 % (mikroskopische Beurteilung) erreicht hatte, war eine Passagierung erforderlich. Die 5637-Zelllinie wurde zweimal wöchentlich, die SV-HUC-1 Zellen etwa einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurde unter aseptischen Bedingungen im LAF der Zellrasen zuerst mit 2 ml PBS-EDTA-Lösung gespült, dann mit 2 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) etwa 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, bis ein Ablösen der Zellen mikro- und makroskopisch zu beobachten war. Dann wurden die Zellen durch Abklopfen von der Kulturplatte abgelöst, in 10 ml frischem Medium resuspendiert und 5 Minuten lang bei 1.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und das Zellpellet in 2 ml frischen Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden nun etwa 1.000.000 Zellen in einer frischen Kulturflasche mit 10 ml frischem Medium ausgesät. In Abhängigkeit von der Zellzahl/ml entspricht dies etwa 3-6 Tropfen der Zellsuspension.

3.1.5 Züchtung in FlexiPERMS

Bei FlexiPERMS handelt es sich um Kulturkammern aus Silikon, die an glatten Oberflächen wie Objektträgern haften und so eine mikroskopische Analyse der Zellen vor, während und nach der Durchführung der Versuche ermöglichen. Zum Aussäen wurde in jedes Well 160 µl Zellsuspension mit 15.000-30.000 Zellen pipettiert und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, bis eine Konfluenz von 80-90 % erreicht war.

3.1.6 Züchtung in HT-BioFlex®-Kulturplatten (HT-Platten)

Die Böden der sterilen HT-Platten (bezogen von Flexcell International Corp., Burlington, USA) bestehen aus einer elastischen Silikonmembran, welche, um eine bessere Zellanhaftung zu gewährleisten, mit Kollagen Typ 1 beschichtet ist (siehe Abbildung 7)

Um ein optimales Wachstum der 5637-Zelllinie zu erreichen, wurde die Membran mindestens 60 Minuten lang mit 300 µl RPMI vorinkubiert, diese 300 µl wurden anschließend wieder abgesaugt und je 300.000 Zellen in 300 µl frischem Medium angesetzt. Nach dem Anheften der Zellen (mikroskopische Kontrolle), spätestens aber nach 12 Stunden wurden nochmals 300 µl frisches Medium hinzugefügt (Gesamtvolumen: 600 µl). Durch dieses

Vorgehen war einerseits eine ausreichende Versorgung mit Medium gewährleistet, andererseits wurde so verhindert, dass durch das Gewicht des Mediums auf der elastischen Membran die Zellen vermehrt in der Mitte anwachsen, da sich hier eine leichte Einbuchtung bildet.

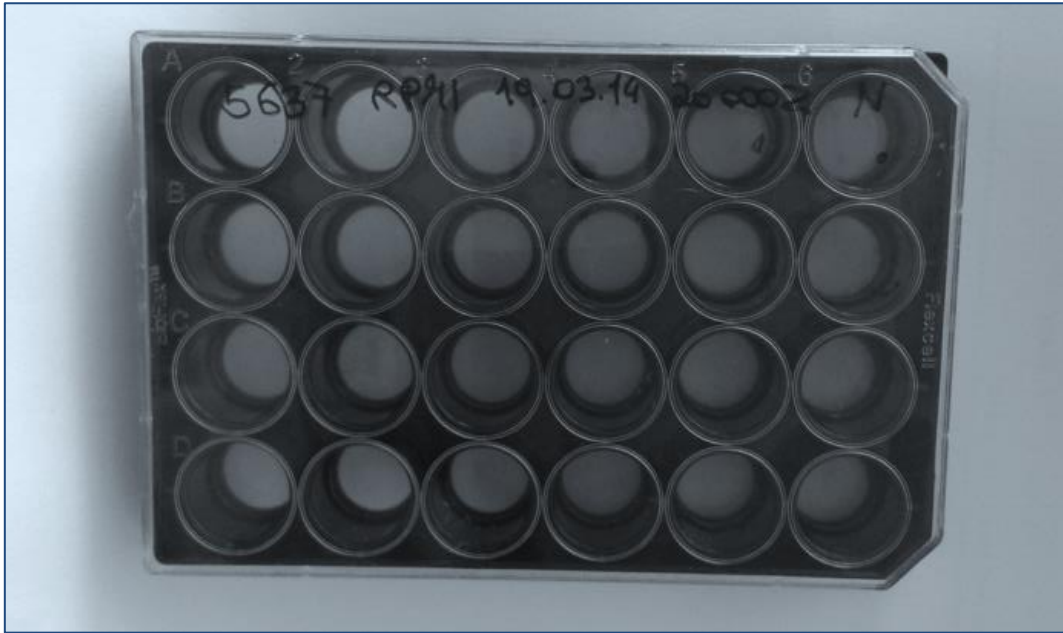


Abbildung 7: HT BioFlex®-Kulturplatten

3.1.7 Waschen von Zellen

Unter dem Waschen von Zellen wird in dieser Arbeit das Zufügen und Wiederabheben von Medium oder PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} verstanden. Bei Zellsuspension wurden die Zellen für einen Waschschrift zunächst 5 Minuten lang bei 1.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, danach der Überstand vorsichtig abgehoben und die Zellen in PBS resuspendiert. Am Monolayer wurde der Überstand vorsichtig abgehoben und in 96-Wellplatten (96-WP) 180 μl bzw. in HT-Platten 800-1.000 μl PBS zugesetzt.

3.2 Auswertung der Fluoreszenzsignale

Als Fluoreszenz bezeichnet man die Eigenschaft bestimmter Substanzen, nach Anregung mit energiereicher (kurzwelliger) Strahlung einer spezifischen Wellenlänge in einen höherenergetischeren Zustand überzugehen und durch Emission energieärmerer (langwelligerer) Strahlung in den Grundzustand zurückzukehren. Da viele Biomoleküle (z.B. Lektine) aber nicht oder nur kaum fluoreszieren, können diese mit sogenannten Fluorophoren markiert werden (siehe 3.3.2), um sie dennoch mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie oder -mikroskopie detektieren zu können [25].

3.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Durch Messung der nach der Anregung emittierten längerwelligen Strahlung lassen sich mithilfe von Mikrotiterplattenlesegeräten die relativen Fluoreszenzintensitäten der an Lektine gekoppelten Fluoreszenzmarker (siehe 3.3.2) bestimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Geräte Infinite® M200 (Tecan, Grödig, Austria) und Wallac 1420 Victor 2™ plate reader (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) verwendet.

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die in Abschnitt 3.2 beschriebene Fluoreszenzemission kann auch mikroskopisch analysiert werden. So lassen sich internalisierte Fluorophore, und damit an sie gebundene Lektine, erfassen sowie Kollokalisierungen verschiedener Fluorophore durchführen. Das erlaubt z.B. einen Einblick in die Transportvorgänge der Zelle sowie die Sichtbarmachung bestimmter Zellstrukturen.

3.3 Reagenzien

3.3.1 Puffer

PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (pH 7,2-7,3)

Sämtliche Zellbindungsstudien wurden mit dem **Phosphatpuffer PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} pH 7,2-7,3** (in der weiteren Arbeit als PBS bezeichnet) durchgeführt. Die Herstellung erfolgte durch Lösen aller in Tabelle 2 angeführten, festen Substanzen in Aqua destillata und anschließendem Zufügen der CaCl_2 -Lösung.

Tabelle 2: Zusammensetzung PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}

Teile (Masse)	Substanz
0,2	KCl
0,1	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
8	NaCl
0,2	KH_2PO_4
0,764	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

50	CaCl ₂ -Lösung (2,65 T CaCl ₂ · 2 H ₂ O+ 997,35 T Aqua dest.)
950	Aqua dest.

Tris Puffer pH 9 wurde verwendet, um TCEP-Lösungen zu verdünnen (siehe 3.3.5). Dazu wurde eine frisch zubereitete 0,4 M Trometamol-Lösung mit wenigen Tropfen 0,1 M Salzsäure auf pH 9 eingestellt.

3.3.2 Lektine und Fluoreszenzfarbstoffe

Die in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen Lektine können mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, um sie fluoreszenzspektroskopisch oder mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie nachweisen zu können. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Lektine, die daran konjugierten Farbstoffe, sowie deren Exzitations- und Emissionsmaxima. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein fluoresziert – durch blaues Licht angeregt – Grün. Das Fluoreszenzsignal ist allerdings stark pH-abhängig und wird nach Aufnahme in saure Zellkompartimente (Lysosomen) durch den erniedrigten pH-Wert gemindert. Ein weiterer Nachteil ist das rasche Ausbleichen durch Anregungs-Licht. Eine höhere Fotostabilität und pH-Unabhängigkeit weisen die rot leuchtenden Alexa Fluor®- Farbstoffe Alexa Fluor® 592 (av) und Alexa Fluor® 647 (ab) auf [26].

Die Alexa Fluor®- Farbstoffe abWGA und avWGA wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen, fWGA von der Firma Vector laboratories, (Burlingame, USA).

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Lektine-Fluorophor-Konjugate.

Lektin	Konjugierter Farbstoff	Exzitations-maximum [nm]	Emissions-maximum [nm]	Konzentrationen [pmol/ml]
GNL	Fluorescein (f)	485	525	25,00
LCA	Fluorescein (f)	485	525	6,25-25,00
PNA	Fluorescein (f)	485	525	25,00
WGA	Fluorescein (f)	485	525	25,00-200,00
WGA	Alexa Fluor (av)	592	622	25,00-200,00
WGA	Alexa Fluor (ab)	647	675	12,50-200,00

3.3.3 Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne von Urothelkarzinomzellen

Um die Zellkerne lebender Zellen anzufärben, wurde der Farbstoff **H33342** (Hoechst 33342) in einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet. Da sowohl beim Zusatz von Endozytoseinhibitoren als auch bei Anwendung von Dehnung ein vermehrtes Ablösen der Zellen von der Kulturplatte vermutet wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer Methode gesucht, diesen Zellverlust zu quantifizieren. Dazu wurden die Zellen nach drei Waschschritten (siehe 3.1.7) 15 Minuten lang mit 100 µl (96 Well-Platte) bzw. 500 µl (BioFlex®-Kulturplatten) H33342-Lösung bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde die relative zellassoziierte Fluoreszenzintensität (RFI) bei einer Exzitation von 365 nm und einer Emission von 450 nm mit einem Plattenlesegerät (Tecan) erfasst. Diese Fluoreszenzsignale dienten als Grundlage, um einen Vergleich des Zellverlusts zwischen unterschiedlich behandelten Zellen darzustellen. Es zeigte sich, dass diese Messmethode über einen großen Bereich linear ist (siehe Abbildung 8). Dies deutet darauf hin, dass die H33342-Signale als Indikator der Zellablösung dienen können.

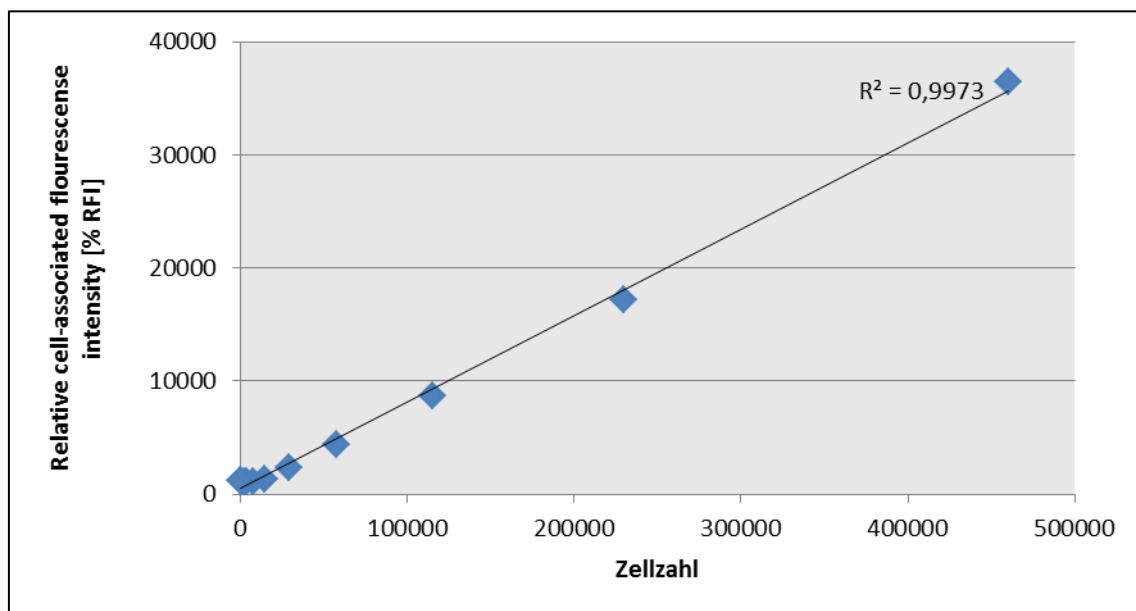


Abbildung 8: Verdünnungsreihe einer mit H33342-gefärbten 5637 Zellesuspension (5 µg/ml, 15 Minuten, 37 °C, gemessen bei 365/450 nm, Gain 100).

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, der an die DNA der Zellen bindet [26]. Da die Zellmembran für diesen Farbstoff impermeabel ist, wurde er in einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet, um die Zellkerne permeabilisierter Zellen zu markieren. Die Zellen wurden dazu nach drei Waschschritten (siehe 3.1.7) 15 Minuten lang bei 37 °C im Wasserbad mit dem Farbstoff inkubiert und anschließend zweimal gewaschen.

3.3.4 Endozytoseinhibitoren

Um einen Einblick in den Endozytosemechanismus der Urothelzellen (maligne und nicht-maligne) zu erhalten, wurde versucht, mithilfe diverser Endozytoseinhibitoren bekannte Wege (siehe 2.3.1) in 5637 und SV-HUC Zellen auszuschalten. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren aufgezählt und der Inhibitionsmechanismus kurz beschrieben. Da auch Exozytoseprozesse durch diese Inhibitoren gehemmt werden können, wurde auch dieser Effekt an 5637 und SV-HUC Zellen evaluiert.

DYN (Dynasore) inhibiert die GTPase-Aktivität von Dynamin und damit die Vesikelabschnürung vor allem Clathrin-abhängiger, aber auch Caveolin-abhängiger Endozytose sowie der Makropinozytose [27]. In der weiteren Arbeit wird Dynasore in einer Konzentration von 100 μM als DYN100 und Dynasore in einer Konzentration von 40 μM als DYN40 bezeichnet.

BFA (Brefeldin A) inhibiert den intrazellulären Vesikeltransport und disruptiert den Golgi-Apparat [28].

CPZ (Chlorpromazin) blockiert selektiv den Clathrin-vermittelten Endozytoseweg, indem es die Zusammenlagerung der Clathrin-Proteine hemmt [28, 29].

NOCO (Nocodazol) führt zur Disruption der Mikrotubuli und hemmt deren Polymerisation. Damit verlieren die Mikrotubuli die Fähigkeit, Vesikel zu den Lysosomen zu transportieren [19, 28].

MBCD (Methyl- β -Cyclodextrin) kann durch Komplexbildung und dadurch Extraktion von Cholesterol aus der Membran vor allem die Caveolin-abhängige aber auch die Clathrin-abhängige Endozytose hemmen [30].

EIPA (5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid) blockiert die Makropinozytose, indem es durch Inhibition der Na^+/H^+ -ATPase den submembranösen pH-Wert senkt [28].

Tabelle 4 gibt nochmals einen Überblick über die eingesetzten Endozytosehemmer und die verwendete Konzentration. Alle Inhibitoren wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Endozytoseinhibitoren, ihren Mechanismen und den verwendeten Konzentrationen.

Inhibitor	gehemmter Mechanismus	Konzentration
DYN	Vesikelabschnürung	80µM, 100 µM, 120 µM
BFA	Vesikeltransport	10 µM
NOCO	Vesikeltransport	10 µM
EIPA	Makropinozytose	100 µM
CPZ	Clathrin-vermittelter Weg	31 µM (10 µg/ml)
MßCD	Caveolae- und Clathrin-vermittelter Weg	5 mM, 10 mM

3.3.5 Sonstige Chemikalien

GlcNAc (N-Acetyl-D-Glucosamin) ist ein Monosaccharid, das selektiv an WGA bindet. So kann das an der Zelloberfläche über Sialinsäurereste gebundene WGA kompetitiv aus dieser Bindung verdrängt werden [31]. GlcNAc (bezogen von Sigma Aldrich, St. Louis, USA) wurde in einer Konzentration von 50 µM (in 5 Teilen PBS + 1 Teil Aqua dest., 280-300 mosmol/l) verwendet, um zwischen zellgebundenen und internalisiertem WGA zu unterscheiden. Die Zellen wurden dreimal 10 Minuten lang bei 4 °C mit jeweils 50 µl (96 Well-Platten) bzw. 400 µl (24 Well-Platten) behandelt und anschließend die RFI (Überstand: 100 bzw. 800 µl PBS) bestimmt.

Monensin ist ein Ionophor, das die Funktion eines Na^+/H^+ -Austauschers in der Plasmamembran imitiert. Dadurch kommt es zu einem Austausch zwischen den sauren Zellkompartimenten und dem Zytoplasma und der pH-Wert gleicht sich an [32]. So sollte das durch den sauren pH-Wert der Lysosomen reduzierte Fluorescein-Signal weitgehend wiederhergestellt werden können. Dazu wurde zu den 96-WP 50 µl und zu den HT-Platten 400 µl einer 1,5 µM Lösung pipettiert und die RFI sofort mit einem Plattenlesegerät analysiert.

Paraformaldehyd-Lösung (2 %) wurde verwendet, um Zellen zu fixieren. Es wurde dazu mit 50 bzw. 400 µl der Lösung mindestens 30 Minuten lang bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid; pH 7) ist ein Reduktionsmittel, das mit Carbocyaninen wie Alexa Fluor® 647 reversibel Addukte bildet, die keine Fluoreszenz mehr aufweisen. Da TCEP die Plasmamembran kaum passieren kann, und somit nur die Fluoreszenzsignale der an der Zelloberfläche gebundenen Lektine vermindert, kann es

verwendet werden, um zwischen zellassoziierten und internalisierten Lektinen zu unterscheiden [33]. Nach vorherigem Fixieren der Zellen mit zweiprozentiger Paraformaldehyd-Lösung (für mindestens 30 Minuten) und einmaligem Waschen (siehe 3.1.7) wurden 100 µl (96WP) bzw. 400 µl (HT-Platten) einer 50 mM TCEP-Lösung in Tris-Puffer (pH 9) zugesetzt und sofort die RFI bestimmt. TCEP wurde von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Cytokeratin-Antikörper (Cytokeratin-AK) Ks 5+8.22/C 22 (bezogen von Progen, Heidelberg, Deutschland) ist ein FITC-Konjugat eines murinen monoklonalen Antikörpers (IgG1), der spezifisch mit den vor allem in Epithelzellen vorkommenden Keratinen K5 und K8 reagiert [34]. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der in flexiPERMs (siehe 3.1.5) gezüchteten Zellen für 20 Minuten mit eisgekühltem Methanol bei -20 °C wurde zweimal gewaschen (siehe 3.1.7) und dann 20 Minuten lang bei 4 °C mit frischem PBS rehydriert. Mit 50 µl einer 1:100-verdünnten Cytokeratinlösung wurde anschließend das Zytoskelett durch 10-minütige Inkubation bei 4 °C angefärbt und nach einem erneuten Waschschriff mikroskopisch analysiert.

3.4 Inhibition der Endo- und Exozytose fluoreszenzmarkierter Lektine

Die in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Endozytoseinhibitoren wurden in den angegebenen Konzentrationen an 5637 und SV-HUC-1 Zellen in Suspension und am Monolayer getestet. Die Wirksamkeit dieser Endozytoseinhibitoren wurde überprüft, indem die RFI der Lektinkonjugate (siehe 3.3.2) nach Inkubation mit den Inhibitoren fluorimetrisch mittels Plattenlesegerät oder Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet wurden. Diese RFI-Werte wurden dann mit der RFI nach Inkubation ohne Zusatz eines Endozytoseinhibitors (OH) verglichen.

Im Folgenden werden die Versuchsabläufe genau beschrieben. Mit Hilfe von Internalisationsstudien unter Endozytoseinhibition in FlexiPERMs und anschließender Behandlung mit Cytokeratin-AK (siehe 3.3.5) konnten eventuelle Veränderungen des Zytoskeletts durch Inhibitoren, die die Mikrotubuli und andere Zytoskelett-Elemente beeinflussen, fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden (siehe 3.4.4).

3.4.1 Endozytoseinhibition bei Zellen in Suspension

Von 5637 bzw. SV-HUC-Zellen wurden nach einem Passagievorgang (siehe 3.1.4) je 200.000 Zellen in einem Eppendorfgefäß dreimal mit 500 µl PBS gewaschen (siehe 3.1.7) und anschließend mit 75 µl des jeweiligen Endozytoseinhibitors (Konzentrationen siehe

3.3.4) und DAPI (siehe 3.3.3) 60 Minuten lang bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden je 75 µl einer Lektinlösung (Endkonzentration abWGA 12,50 pmol/ml, fLCA 6,25 pmol/ml) zugesetzt und 60 Minuten lang bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert. Schließlich wurde dreimal mit je 160 µl PBS gewaschen. Je 10 µl dieser Suspensionen wurden entnommen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert, die übrigen 150 µl wurden dreimal mit je 150 µl GlcNAc behandelt (siehe 3.3.5) und anschließend ebenfalls mikroskopisch analysiert.

3.4.2 Internalisationsstudien am Monolayer nach zweistündiger Vorinkubation mit Endozytoseinhibitoren

In 96-WP wurden die Zellen präkonfluenten Monolayer (etwa 90 %) nach dreimaligem Waschen (siehe 3.1.7) mit je 180 µl PBS mit H33342 (siehe 3.3.3) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen für 120 Minuten mit 50 µl der Lösungen der Endozytoseinhibitoren (siehe 3.3.4) bei 37 °C im Wasserbad vorinkubiert, bevor 50 µl Lektinlösung zugesetzt wurden, sodass die entstandene Lektinlösung in einer Konzentration von 12,50 pmol/ml abWGA und 6,25 pmol/ml fLCA vorlag. Nun wurde entweder 15, 30 oder 45 Minuten lang bei 37 °C im Wasserbad oder 60 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die RFI fluorimetrisch bestimmt. Die Internalisation in die Urothelzellen wurde einerseits mittels GlcNAc, andererseits über TCEP (siehe 3.3.5) überprüft, bevor erneut die RFI gemessen wurde.

3.4.3 Endozytoseinhibition nach Beladung mit Lektinen bei 4 °C (Pulse-Chase)

Eine Abwandlung der in 3.4.2 erläuterten Vorgehensweise stellte der Pulse-Chase-Versuch dar. Hier wurde nach der Zellkernfärbung mit H33342 (siehe 3.3.3) 60 Minuten lang bei 4 °C mit je 100 µl Lektinlösung (12,50 pmol/ml abWGA, 6,25 pmol/ml fLCA) inkubiert und nach dreimaligem Waschen (siehe 3.1.7) für 15, 30 oder 45 Minuten bei 37 °C bzw. für 60 Minuten bei 4 °C mit je 100 µl Endozytoseinhibitorlösung (siehe 3.3.4) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die RFI analysiert. Auch hier wurde versucht, die Internalisation in die Zelle durch GlcNAc bzw. TCEP (siehe 3.3.5) nachzuweisen.

Die Durchführung erfolgte entweder in 96-WP für eine Quantifizierung oder in FlexiPERMs, um die Fluoreszenzsignale mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops auszuwerten.

3.4.4 Darstellung des Zytoskeletts nach Behandlung mit Endozytoseinhibitoren

Um eventuell beobachtbare Veränderungen des Zytoskeletts nach Inkubation mit Endozytoseinhibitoren (siehe 3.3.4) sichtbar zu machen, wurde nach dreimaligem Waschen (siehe 3.1.7) der 5637 eine Stunde lang bei 4 °C mit der Lektinlösung (abWGA 12,50 pmol/ml, fLCA 6,25 pmol/ml) inkubiert. Anschließend wurde gewaschen und 90 Minuten lang mit den Endozytoseinhibitoren DYN100, CPZ, NOCO und EIPA bei 37 °C inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (siehe 3.3.3) angefärbt, um während der Internalisationsstudie die Zellkerne permeabilisierter Zellen sichtbar zu machen. Anschließend wurde das Zytoskelett der Zellen wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben mit Cytokeratin-AK gefärbt.

3.4.5 Exozytoseinhibition

Um eine eventuelle Exozytoseinhibition von vesikular gespeicherten Lektinen nach vorheriger Internalisation zu untersuchen, wurden die 5637 und SV-HUC-1 Zellen nach H33342-Färbung für 60 Minuten bei 37 °C mit 12,50 pmol/ml abWGA und 6,25 pmol/ml fLCA inkubiert und nach dreimaligem Waschen (siehe 3.1.7) und Behandlung bei 4 °C mit GlcNAc (siehe 3.3.5), um oberflächlich gebundene Lektine zu entfernen, für weitere 90 Minuten mit je 100 µl Inhibitorlösung inkubiert (DYN100, BFA, CPZ, NOCO, MβCD, EIPA; siehe 3.3.4). Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen.

3.5 Bindungs- und Internalisationsstudien von Lektinen unter Dehnung der Urothelzellen

Um den in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Effekt der Internalisations-Stimulation durch Dehnung der Harnblase zu untersuchen, wurde nach einer Methode gesucht, um in vitro einerseits eine möglichst physiologische Dehnung der Urothelzellen zu erzeugen bzw. die Dehnung durch Instillation z.B. eines Chemotherapeutikums verschiedener Volumina zu imitieren. Um eine mögliche erhöhte Bindung der Lektine an die vergrößerte Urotheloberfläche gedehnter Zellen von einer erhöhten Internalisation der Lektine zu unterscheiden, wurde weiters nach einer Methode gesucht, die einen direkten Vergleich der RFI bei 4 °C mit 37 °C erlaubt. Alle Dehnungsstudien wurden mit der Zelllinie 5637 durchgeführt.

3.5.1 Lektinbindungsstudien unter Verwendung kugelförmiger Dehnungskörper

Um Dehnungsversuche auch bei 4 °C durchführen zu können (Zellbindungsstudien), wurden die elastischen Membranen als Vorstudie bei 4 °C mit handelsüblichen Acrylperlen ($\varnothing = 1$ cm) gedehnt. Dadurch wurde die Oberfläche der Urothelzellen um 100 % vergrößert (Berechnung siehe Anhang A). Durch die Vergrößerung der Zelloberfläche wäre eine gesteigerte Zahl der Lektin-Bindungsstellen denkbar. Daher wurden Vorversuche zu gleichen Bedingungen bei 4°C und 37 °C durchgeführt, um zwischen dehnungsinduzierter Internalisation und verstärkter, oberflächlicher Bindung zu unterscheiden.

Die auf HT-Platten gewachsenen, präkonfluenten (80-90 %) 5637 Zell-Layer wurden dreimal mit je 800 μ l PBS gewaschen (siehe 3.1.7). Dann wurden je 600 μ l Lektinlösung zugesetzt (Konzentrationen siehe 3.3.2) und in einem oder in zwei Dehnungszyklen 30 oder 60 Minuten lang mithilfe der Acrylperlen (siehe Abbildung 9) bei 4 °C bzw. 37 °C gedehnt. Anschließend wurden die Zellen viermal mit je 800 μ l PBS gewaschen und die RFI analysiert. Färbungen mit H33342 wurden wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben durchgeführt.

Für die **Zellbindungsstudien** bei 4 °C wurden die Zellen, sowie alle verwendeten Puffer und Lösungen vor Versuchsbeginn 30 Minuten lang bei 4 °C vorgekühlt. Da bei 4 °C keine Endozytose stattfinden sollte [35], wurde so evaluiert, welche Rolle die Bindung an eine vergrößerte Oberfläche der gedehnten 5637-Zellen spielt.

Internalisationversuche wurden bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Hierfür wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen auf 37 °C vorgewärmt.

Die Dehnung erfolgte, indem die Perlen dem entsprechenden Versuchsprogramm gemäß auf eine Gummiplatte aufgelegt (siehe Abbildung 9) wurden und die HT-Platte mit präkonfluenten Zellen von oben zunächst nur leicht aufgelegt und erst danach langsam (~1 Umdrehung pro Minute) mit zwei seitlich befestigten Schraubzwingen fixiert wurde. Sowohl eine zu hohe Zelldichte, als auch eine zu schnelle Dehnung birgt die Gefahr der Ruptur des Monolayers.

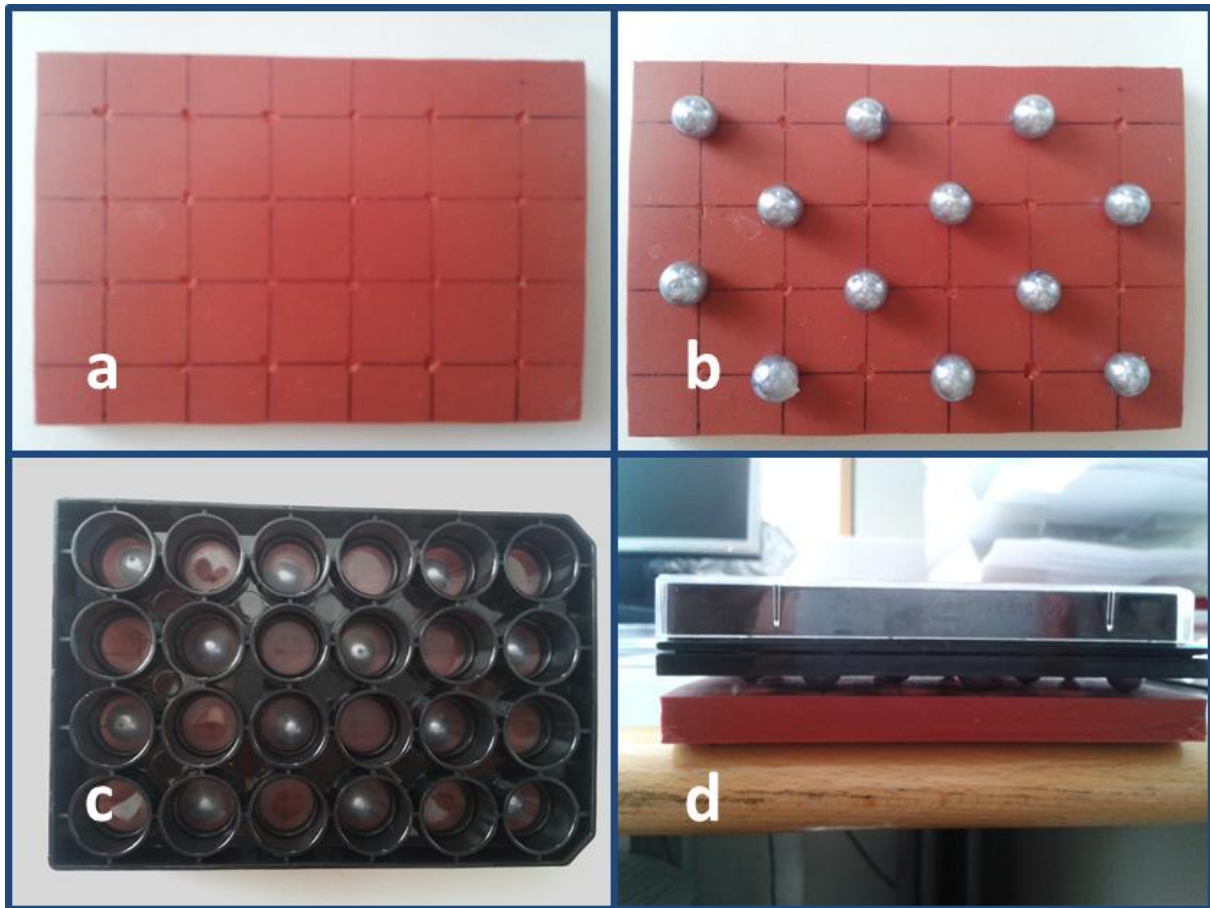


Abbildung 9: Dehnung durch kugelförmige Dehnungskörper. Auf eine Gummiplatte (a) wurden Acrylperlen ($\varnothing = 1 \text{ cm}$) entsprechend dem gewünschten Dehnungsprogramm platziert (b). Anschließend wurde die HT-Platte von oben auf die Perlen aufgelegt (c, d) und mit Schraubzwingen fixiert.

3.5.2 Etablierung eines Testsystems für das Flexcell® FX-5000™ Tension System

Beim Flexcell® FX-5000™ Tension System (FX-5000) handelt es sich um einen computergesteuerten Bioreaktor, der mithilfe von Vakuum den elastischen Boden spezieller Zellkulturplatten, wie zum Beispiel der HT-Platten (siehe 3.1.6), dehnt. Die HT-Platten werden, wie im Folgenden beschrieben, in die Baseplate (siehe Abbildung 10) eingelegt und im Inkubator (37°C , $95\% \text{ H}_2\text{O} + 5\% \text{ CO}_2$) mit den Vakuumschläuchen verbunden. So entsteht ein dichtes System, das sich durch den angeschlossenen Computer genau und reproduzierbar steuern lässt. Einstellbar sind unter anderem die Dauer der Dehnung, die nominelle Elongation (Stärke der Dehnung in %) und die Anzahl der Zyklen, die durchlaufen werden sollen [36]. Da alle Untersuchungen im Inkubator durchgeführt werden müssen, ist ein direkter Vergleich der Dehnung bei 4°C und bei 37°C nicht möglich. Daher wurde dieser Unterschied mithilfe kugelförmiger Dehnungskörper im Rahmen einer Vorstudie evaluiert (siehe 3.5.1). Ein weiterer Nachteil des Einsatzes des FX-5000 zur Dehnung ist die

Begasung mit CO₂, die zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals der Fluorescein-gekoppelten Lektine führen kann. Daher wurden auch Studien unter Verwendung der AlexaFluor®-gekoppelten Lektine durchgeführt und eine Rückstellung der Fluoreszenz-Signale mit Monensin (siehe 3.3.5) versucht.

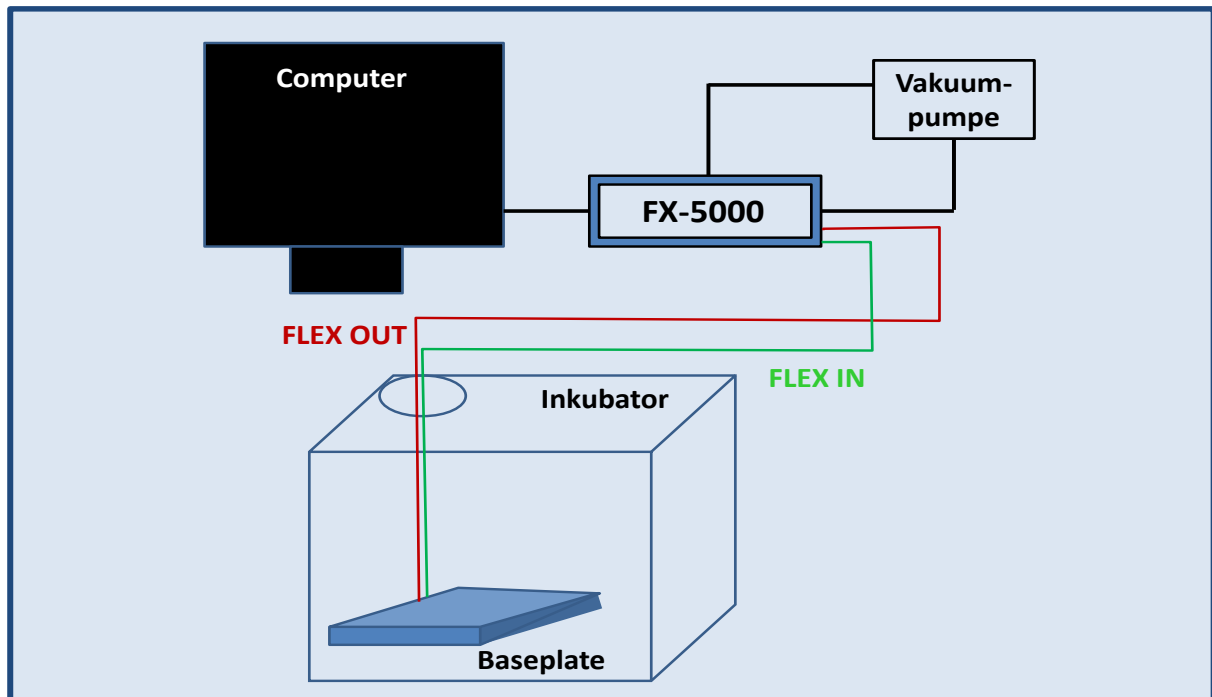


Abbildung 10: Flexcell FX-5000 Tension System - stark vereinfachte Darstellung (modifiziert nach [36]).

3.5.3 Entwicklung eines Dichtungssystems für das FX-5000 System

Um Internalisationsstudien mithilfe des FX-5000 durchführen zu können, musste erst ein Dichtungssystem entwickelt werden, das die Verwendung der HT-Platten in Kombination mit der BioFlex® Baseplate erlaubte, da diese für die etwas größeren BioFlex® Platten (6 Wells) entwickelt wurden. Außerdem wurde im nächsten Schritt versucht, ein Versuchsdesign zu entwickeln, das mit der Dehnung der Harnblase bei Instillationstherapie vergleichbar ist (siehe 2.2.3).

Anhand der Maße der Baseplate (siehe Anhang A), wurde ein Dichtungssystem bestehend aus 2 Einheiten (Dichtung 1 und Dichtung 2) entworfen. Dichtung 1 weist eine Stärke von 1 mm auf und wird gemäß Abbildung 11c nach vollständiger Benetzung mit Silikonschmiermittel auf die Baseplate aufgedrückt. Dichtung 2 ist 5 mm dick und wird anschließend über die eingefügte HT-Platte gedrückt (siehe Abbildung 11h). Als geeignetes Dichtungsmaterial stellte sich Silikon MVQ (40° Shore) heraus, da es dicht, leicht zuschneidbar und auch nach der Verwendung waschbar ist.

Die sogenannte Loading Plate (siehe Abbildung 11b) wurde aus einer PVC-Platte gemäß der Maße der Baseplate (siehe Anhang A) zugeschnitten und dient als Unterlage für die HT-Platte. Die PVC-Posts, die, wie in Abbildung 11e und f gezeigt, mittels Schablone auf der Loading Plate in die gewünschte Position platzierbar sind, wurden aus einem PVC-Stab zugeschnitten ($\varnothing = 12$ mm, Höhe = 6 mm). Sie dienen dazu, die Wells, die (als Vergleich) nicht gedehnt werden sollen, abzudichten und die Membran in ungedehnter Position zu halten. Sämtliche Teile des Dichtungssystems wurden vor jedem Gebrauch mit ausreichend Silikonschmiermittel (vom Hersteller empfohlen) eingefettet.

Im Inkubator wurde die Baseplate an die Vakuumschläuche angeschlossen und mithilfe eines schweren Gegenstands (hier eine Plastikflasche, gefüllt mit 1 l Wasser) beschwert, um sie ganz abzudichten. Die genauen Skizzen und Baupläne des Dichtungssystems befinden sich im Anhang A.



Abbildung 11: Dichtungssystem FX-5000. In die Baseplate **(a)** wird die Loading Plate **(b)** eingelegt und die mit reichlich Silikonschmiere eingefette Dichtung 1 aufgelegt **(c)**. Mithilfe einer Schablone **(d)** werden die Loading Posts **(e und f)** in die gewünschte Position gesetzt und die Schablone wieder entfernt. Anschließend werden die HT-Platte **(g)** und die Dichtung 2 **(h)** eingesetzt und das Dichtungssystem mithilfe eines schweren Gegenstands fixiert **(i)**.

3.5.4 Festlegen der Parameter der Dehnung und des Analysenprotokolls

Durch die üblicherweise beim FX-5000 verwendeten, sogenannten Loading Posts würde eine äquibiaxiale Dehnung erzeugt werden (siehe Abbildung 12a). Um der kugelförmigen Ausdehnung der Harnblasen bei zunehmender Füllung näher zu kommen, wurden diese weggelassen (siehe Abbildung 12b).

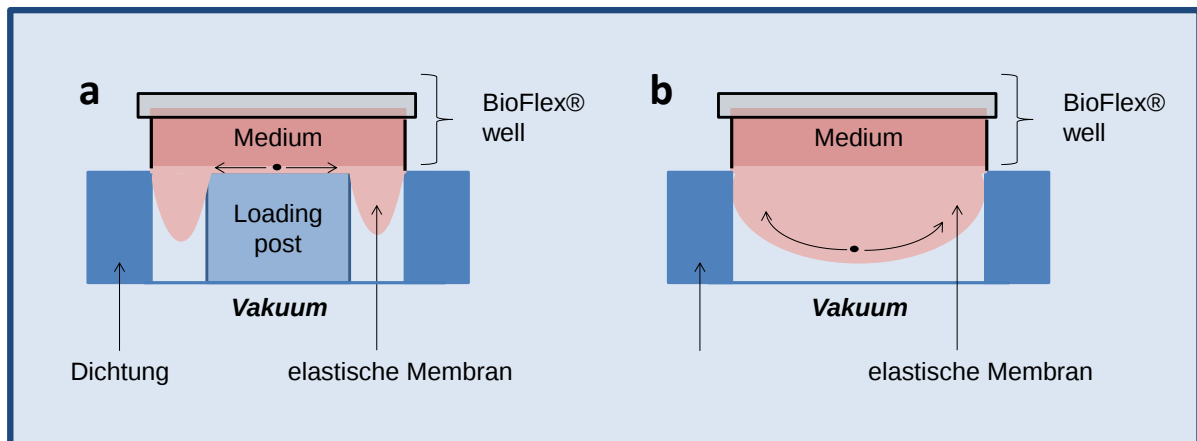


Abbildung 12: Schematische Darstellung der äquibiaxialen Dehnung durch Loading Posts (a) und der Dehnung durch Kugeln ohne Loading Posts (b) (modifiziert nach [36]).

Die Oberfläche der Urothelzellen vergrößert sich nach Entfaltung der Oberfläche durch den hydrostatischen Druck bei Füllung der Harnblase um bis zu 22 % [13]. Um die optimale Elongation zu bestimmen, wurde daher unter der Annahme, dass die Dehnung mittels FX-5000 einer Kugelsegmentvergrößerung gleichkommt, versucht, einen Zusammenhang zwischen der Vergrößerung der Oberfläche und der vom FX-5000 erzeugten Elongation zu ermitteln. Die Wells einer HT-Platte wurden genau ausgemessen und die Änderung des Flüssigkeitsstandes von einem Milliliter Wasser bei Dehnung gemessen. Daraus ließ sich die Oberflächenvergrößerung der Membran berechnen. Abbildung 13 zeigt diesen Zusammenhang, die Berechnungen dazu finden sich in Anhang A.

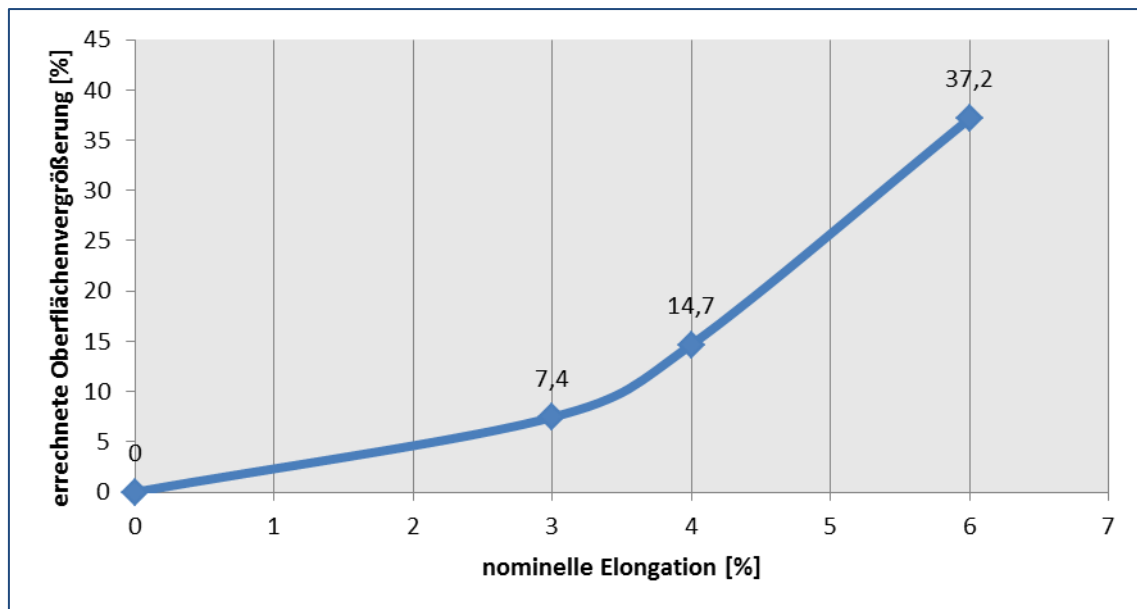


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen der am FX-5000 einstellbaren nominellen Elongation [%] und der berechneten Oberflächenvergrößerung eines Kugelsegments durch die Dehnung [%].

Experimentell hat sich gezeigt, dass über einer Elongation von 4 % die Gefahr einer Ruptur des Monolayers besteht, sodass für alle weiteren Studien Elongationen von 3 und 4 %, entsprechend einer Oberflächenvergrößerung von etwa 7-14 % gewählt wurden.

Um die Membran nicht durch zu schnelles Dehnen zu zerreißen, wurde die Dehnung - wie in Tabelle 5 und Abbildung 14 dargestellt um 0,5% bzw. 1 % nominelle Elongation pro Minute bis zu einem Maximum von 4 % gesteigert und anschließend um 1 % pro 30 Sekunden wieder entspannt, um die Miktion zu simulieren.

Tabelle 5: Programmablauf eines Dehnungszyklus im FX-5000.

Zeitdauer [Minuten]	Elongation [%]
1,0	1,0
1,0	1,5
1,0	2,0
1,0	3,0
15,0	4,0
0,5	3,0
0,5	2,0
0,5	1,0

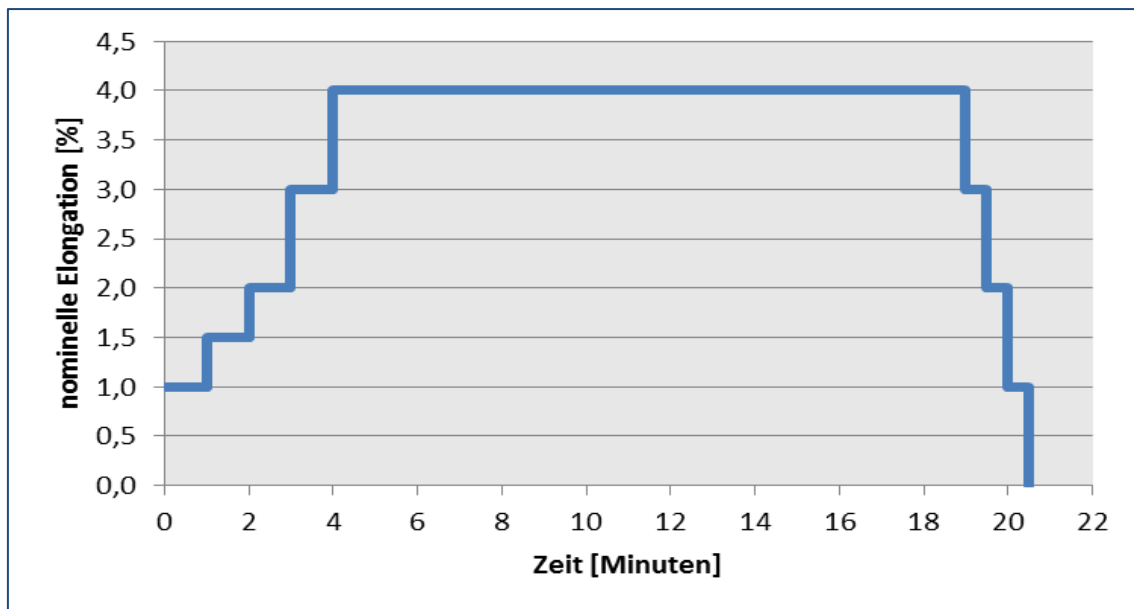


Abbildung 14: Dehnungsprofil der Dehnung durch FX-5000

Für eine Dehnungsuntersuchung wurden die Zellen zunächst dreimal mit je 1.000 μl PBS gewaschen (siehe 3.1.7), danach mit den entsprechenden Lektinlösungen versetzt und mit dem in Tabelle 5 dargestellten Dehnungsprogramms gedehnt. Nachdem das Programm beendet war, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die RFI bestimmt. Manchmal ging dem Versuch eine Markierung der Zellen mit H33342 voraus (siehe 3.3.3), oder sie wurden anschließend mit Monensin behandelt (siehe 3.3.5).

Der hier dargestellte Versuchsaufbau ist für alle mit dem FX-5000 durchgeführten Versuche gültig. Etwaige Abweichungen davon werden im Abschnitt 4.1.3 gesondert beschrieben.

4 Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war die Entwicklung eines in-vitro-Testsystems zur Evaluierung des Einflusses des Füllungszustands der Harnblase auf die Bindung und Internalisation fluoreszenzmarkierter Lektine. Mit Hilfe eines standardisierten Analysenprotokolls (siehe 3.5) wurde eine Basis zur Untersuchung der Internalisation von Lektinen an gedehnten Zellen erarbeitet, das einen Vergleich verschiedener Lektine und auch Zelllinien bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Temperatur, Zeit) erlaubt.

Weiters wurde ein Analyseprotokoll zur in-vitro-Testung der Effizienz verschiedener Endo- und Exozytoseinhibitoren (siehe 3.3.4) erstellt und eine Evaluierung der Methoden zur Differenzierung zwischen oberflächlich gebundenen und internalisierten Lektinen mittels TCEP durchgeführt.

4.1 Internalisationsstudien unter Dehnung

Nachdem das Wachstum auf HT-Platten (3.1.6) optimiert und ein Dichtungssystem für das FX-5000-System (3.5.3) entwickelt worden war, musste im nächsten Schritt das Analysenprotokoll sowie der Messmodus festgelegt werden. Die HT-Platten bieten zwar gegenüber enzymatischen Analysen den Vorteil, dass die RFI direkt in der HT-Platte mit einem Plattenlesegerät (Tecan) gemessen werden kann, jedoch musste der Messmodus erst evaluiert und optimiert werden. Bei Bottom-Messungen ergab sich der große Nachteil, dass durch Applikation von Silikon-Schmiermittel auf die Unterseite der zu dehnenden Membranen eine veränderte Lichtdurchlässigkeit resultierte. Daher wurde die Messung im Top-Modus durchgeführt, obwohl hier bei den Ex/Em-Wellenlängen für Alexa-Farbstoffe auch ohne Zusatz von Lektinkonjugaten sehr hohe RFI-Werte zu beobachten waren. Ein Nachteil der Dehnung über das FX-5000 System ist überdies die mögliche pH-Wert-Verschiebung durch Inkubation in einem CO₂-begasteten Inkubator, die Auswirkungen auf die RFI der Fluorescein-gekoppelten Lektine haben kann.

Um eine erhöhte Internalisation der Lektine von der RFI-Zunahme durch eine erhöhte Lektinbindung (beispielsweise aufgrund von Oberflächenvergrößerung) differenzieren zu können, wurden Dehnungsstudien auch bei 4 °C durchgeführt. Dazu musste eine Methode entwickelt werden, die Dehnungsuntersuchungen unter Kühlung erlaubt. In Abschnitt 3.5.1 wird die Methode unter Verwendung kugelförmiger Dehnungskörper ($\varnothing = 1 \text{ cm}$) genauer beschrieben. Diese Dehnung entspricht einer Oberflächenvergrößerung um 100 % (siehe Anhang A) und ist somit mit den Elongationen des FX-5000 nur bedingt vergleichbar. Für eine direkte Vergleichbarkeit wurde daher auch eine Methode entwickelt, bei der

Internalisationsprozesse durch Dehnung bei 37 °C im Wasserbad untersucht werden können. Diese Methode macht es auch möglich, Exozytoseprozesse (möglicherweise durch Dehnung induziert, siehe 4.1.4) genauer zu beobachten. Der Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass die Dehnung hier nicht, wie bei einer Blasenfüllung in-vivo durch hydrostatischen Druck ausgehend von der luminalen Seite geschieht, sondern durch Druck auf die Unterseite der Silikonmembran der HT-Platten. Daher ist es besonders wichtig, die Unversehrtheit des Monolayers mikroskopisch und auch durch H33342-Färbung (siehe 3.3.3) der Zellkerne mit regelmäßiger Analyse der assoziierten RFI zu kontrollieren. Langsames Dehnen beugt einer Ruptur des Zellverbandes vor. Dazu wurde die Platte erst auf die Perlen aufgelegt, bevor sie durch schrittweises (~1 Drehung/Minute) Engerstellen der Schraubzwingen fixiert wurden.

4.1.1 Kontrolle der Intaktheit des Monolayers nach Dehnung

Die mikroskopische Kontrolle nach einem Dehnungszyklus am FX-5000 ergab, dass präkonfluente Monolayer bei nominellen Elongationen von 1-4 % intakt blieben. Eine geringfügig verstärkte Abnahme des H33342-Signals gedehnter Zellen verglichen mit nicht gedehnten Zellen (5,9 % nach anschließender Fixierung (siehe 3.3.5) und 9,2 % nach 15 Minuten bei nicht fixierten Zellen in PBS bei Raumtemperatur ohne weitere Dehnung (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16A)) war zwar messbar, eine Zellablösung konnte mikroskopisch aber nicht bestätigt werden. Allerdings nahm die Unversehrtheit durch weiteres Waschen nicht fixierter Zellen und durch anschließende Behandlung der Zellen mit GlcNAc ab (siehe Abbildung 16B). Dieser vermehrten Ablösung konnte durch möglichst rasches Messen nach Beendigung des Versuchs, sowie durch sofortiges Fixieren der Zellen mit PFA (siehe 3.3.5) vorgebeugt werden. Bei Dehnung durch Acrylperlen blieb die analysierte RFI des H33342-Signals auch bei längeren Versuchsabläufen mit zwei Dehnungszyklen weitgehend konstant (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Dabei wurden die Perlen so gesetzt, dass im ersten Dehnungszyklus (Minute 0-60) die Hälfte der Wells gedehnt wurde und die andere als Vergleich ungedehnt blieb. Nach einer Ruheperiode von 60 Minuten bei 37 °C wurden die Perlen so versetzt, dass nach dem zweiten Dehnungszyklus manche Zellen zweimal gedehnt waren (G-G), manche zweimal ungedehnt blieben (U-U) und manche einmal entweder im ersten Dehnungszyklus (G-U) oder im zweiten Dehnungszyklus gedehnt wurden (U-G).

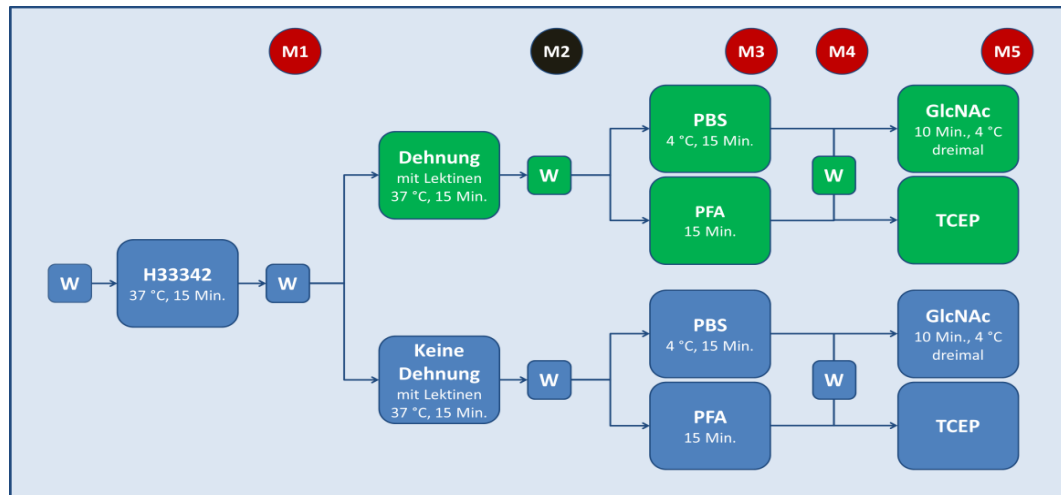


Abbildung 15: Versuchsaubau zur Kontrolle der Intaktheit des Monolayers nach Dehnung im FX-5000. M1-M5 stellen die Messungen der RFI (365/450 nm, Gain 100) dar, W dreimaliges Waschen. Die gedehnten Wells werden hier Grün, die ungedehnten in Blau dargestellt.

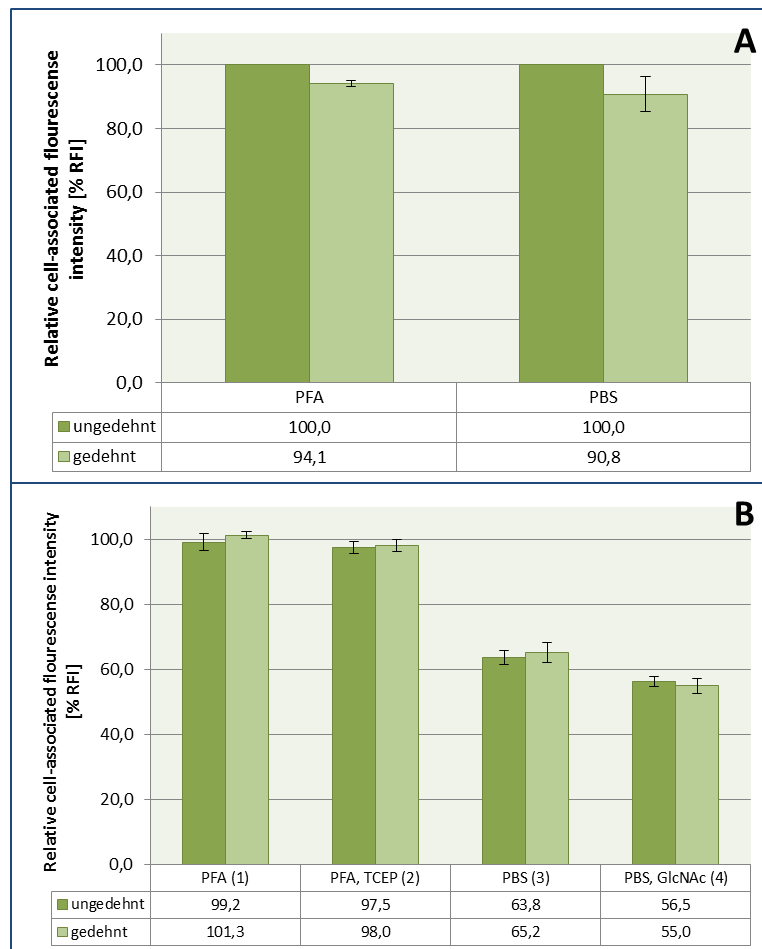


Abbildung 16: Gegenüberstellung der H33342-Signal-Abnahme bei unterschiedlich behandelten Zellen. Untersucht wurde die Signalabnahme fixierter (PFA) und nicht fixierter (PBS) Zellen nach Dehnung (FX-5000, 37 °C, 15 Minuten) bezogen auf die RFI ungedehnter Zellen (**A**, RFI 1135 bei 365/450 nm, Gain 100, n=6) und bezogen auf den Kontrollwert nach Messung 1 (**B**, RFI 1176 ungedehnt bei Gain 100). Nach der Dehnung wurden die Zellen entweder mit PFA fixiert, gewaschen (**B1**) und anschließend mit TCEP behandelt (**B2**) oder nach 15 Minuten in PBS bei 4 °C gewaschen (**B3**) und dreimal für 10 Minuten mit GlcNAc (**B4**) behandelt.

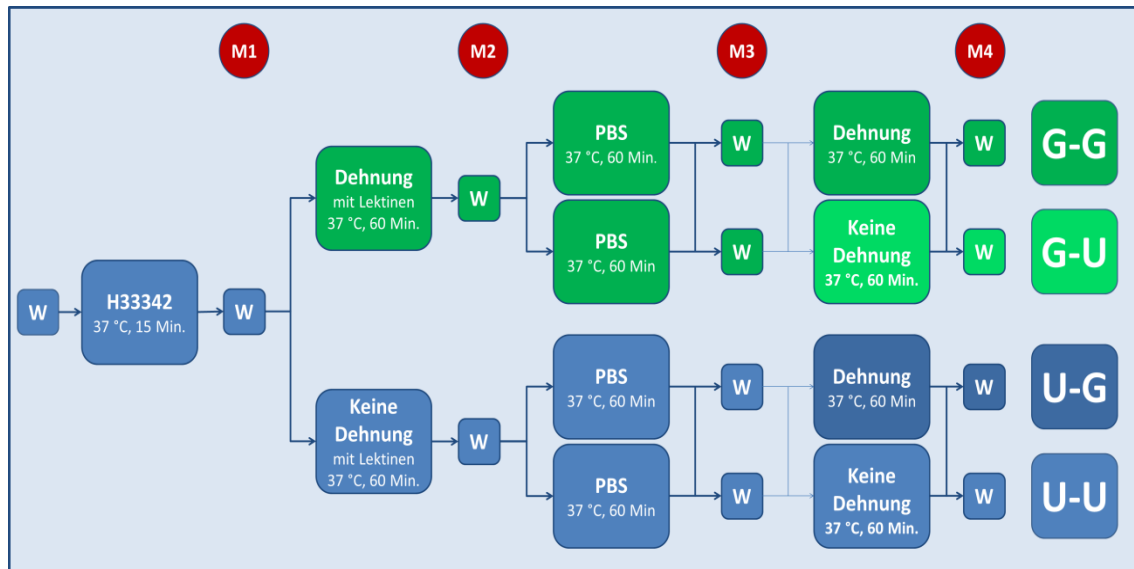


Abbildung 17: Versuchsaufbau zur Kontrolle der Intaktheit des Monolayers nach zweifacher Dehnung durch Kugeln (Ø = 1cm). M1-M4 stellen die Messungen der RFI (365/450 nm, Gain 100) dar, W dreimaliges Waschen. G: gedehnt, U: ungedehnt. Die gedehnten Wells werden hier Grün, die ungedehnten in Blau dargestellt.

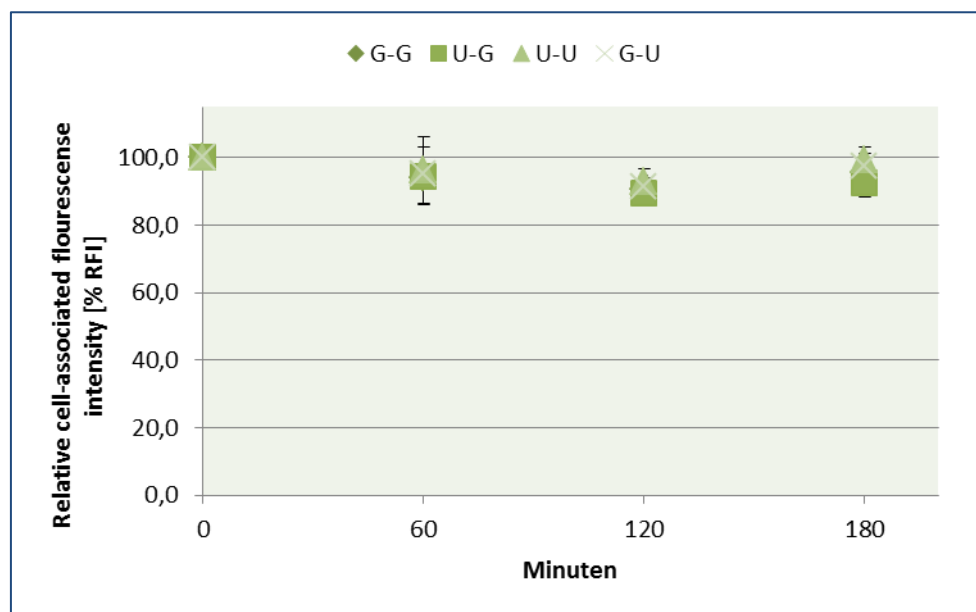


Abbildung 18: Einfluss von Dehnung durch Kugeln auf die H33342-Signale. Gedehnt wurde von Minute 0 bis Minute 60 und von Minute 120-Minute 180 bei 37 °C; (RFI gemessen bei 365/450 nm, Gain 100, n=3), alle Werte wurden auf die jeweiligen Kontrollmessungen zu Minute 0 bezogen (z.B. auf RFI 13984 bei G-G). G: gedehnt, U: ungedehnt.

4.1.2 Vergleich von Bindungs- und Internalisierungsstudien unter Dehnung mit kugelförmigen Dehnungskörpern

Bei 4 °C ruhen sämtliche energieabhängigen Internalisierungsprozesse. Dies wurde genutzt, um die Erhöhung der Internalisation durch Dehnung mit der Erhöhung der Zellassoziation der Lektine durch Oberflächenvergrößerung direkt zu vergleichen (siehe 3.5.1). So konnte einerseits bei 4 °C eine von der eingesetzten Lektinkonzentration unabhängige vermehrte Bindung an die Urothelkarzinomzellen gezeigt werden (10 ± 2 %, siehe Abbildung 19) andererseits war aber die Internalisationssteigerung bei 37 °C abhängig vom eingesetzten Fluorophor um 18 % (fWGA) bzw. 37 % (abWGA) erhöht (siehe Abbildung 20). Dies deutet darauf hin, dass eine vermehrte dehnungsinduzierte Internalisation stattfindet. Tabelle 6 fasst alle bei 4 °C und bei 37 °C bestimmten relativen Fluoreszenzintensitäten, sowie die daraus berechneten Erhöhungen (bezogen auf RFI ungedehnt) in Prozent zusammen. Die Unterschiede zwischen den beiden Fluorophoren könnten auf einen intrazellulären Transport der endozytierten Lektine in saure Zellkompartimente, wie z.B. den Lysosomen, zurückzuführen sein, da ein saurer pH-Wert die Fluorescein-Intensität im Gegensatz zur AlexaFluor-Intensität reversibel abschwächt [26].

Tabelle 6: Zusammenfassung der RFI-Werte nach Dehnung mit kugelförmigen Dehnungskörpern für 60 Minuten bei 4 °C bzw. bei 37 °C, sowie der prozentuellen RFI-Erhöhung durch Dehnung

Tabelle 6: Zusammenfassung der RFI-Werte nach Dehnung mit kugelförmigen Dehnungskörpern für 60 Minuten bei 4 °C bzw. bei 37 °C, sowie der prozentuellen RFI-Erhöhung durch Dehnung (Standardabweichungen siehe Abbildung 19 und Abbildung 20).

Lektin und eingesetzte Konzentration [pmol/ml]	RFI (4 °C)		Erhöhung [%]	RFI (37 °C)		Erhöhung [%]
	ungedehnt	gedehnt		ungedehnt	gedehnt	
fWGA 200	5629,5	6200,5	10			
fWGA 100	2772,5	3041,8	10			
fWGA 25	1484,2	1597,5	8	989,6	1170	18
abWGA 200	2567,8	2727,4	6			
abWGA 25	691,1	770,1	11	330,0	451,3	37

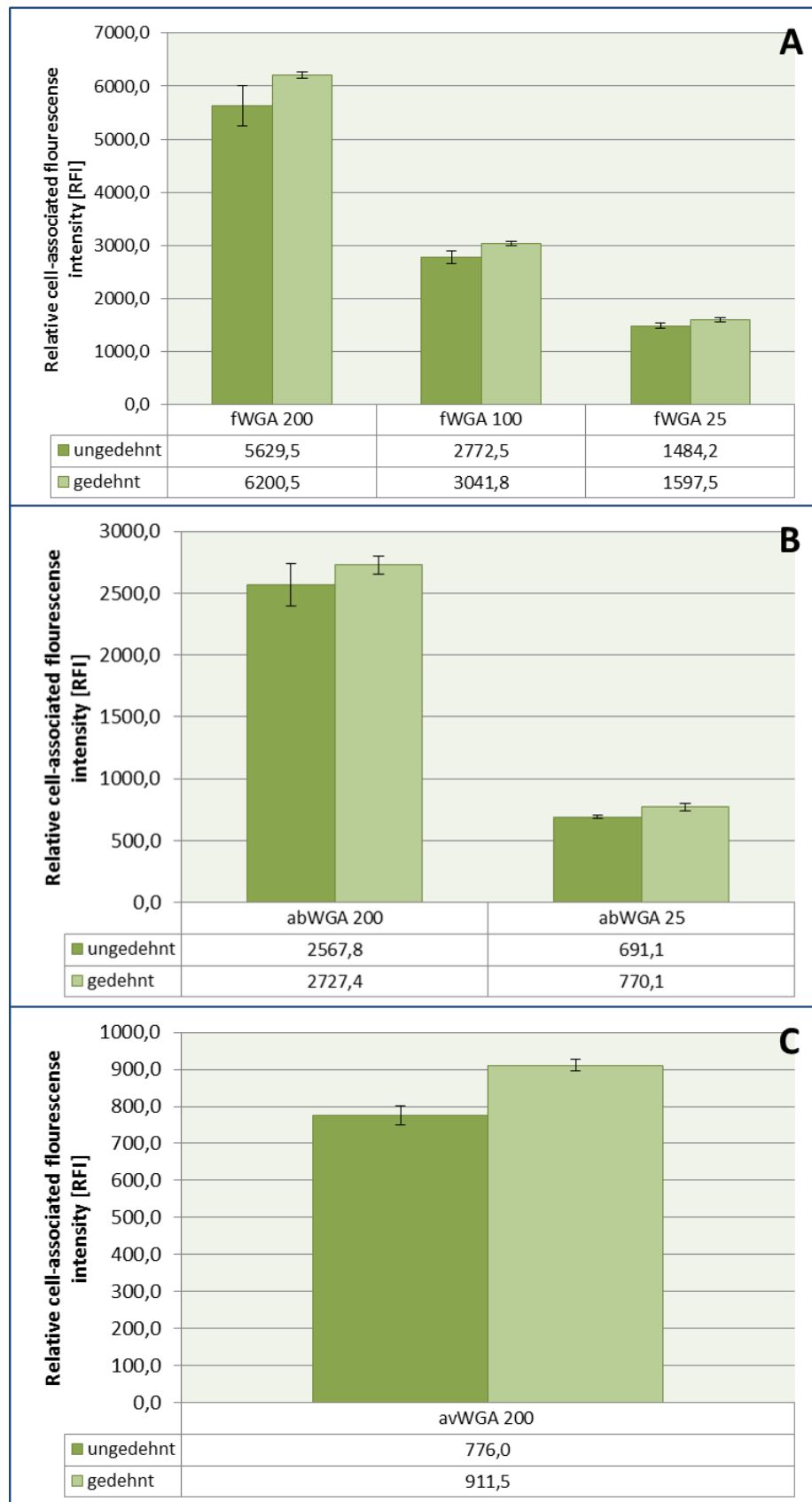


Abbildung 19: Evaluierung der Bindung von WGA an 5637 Zellen unter Dehnung durch kugelförmige Dehnungskörper ($\varnothing = 1$ cm) bei 4 °C. A) fWGA in Konzentrationen von 200, 100 und 25 pmol/ml (485/525 nm, Gain 100, 60 Minuten, n=3). B) abWGA in Konzentrationen von 200 und 25 pmol/ml (647/675 nm, Gain 120, 60 Minuten, n=3). C) avWGA in einer Konzentration von 200 pmol/ml (592/622 nm, Gain 120, 30 Minuten, n=3).

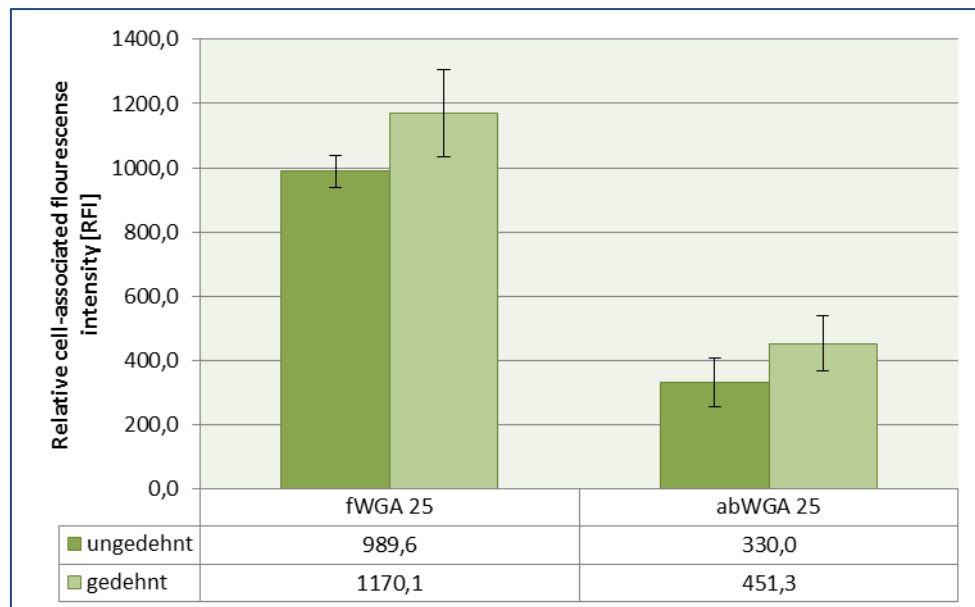


Abbildung 20: Evaluierung der Bindung von WGA an 5637 Zellen unter Dehnung durch kugelförmige Dehnungskörper ($\varnothing=1$ cm) bei 37 °C. fWGA (485/525 nm, Gain 100, n=3) und abWGA (647/675 nm, Gain 120, n=3) wurden in einer Konzentration von jeweils 25 pmol/ml eingesetzt und die Zellschicht für 60 Minuten gedehnt.

4.1.3 Internalisationsstudien bei 37 °C unter Dehnung mit FX-5000

Das FX-5000-System erlaubt die *in-vitro*-Evaluierung des Einflusses von Dehnung auf Urothelzellen. Die Versuchsdauer, Anzahl der Dehnungszyklen und Intensität der Dehnung (Elongation) können variiert werden. Die Entwicklung des Analysenprogramms, sowie der Versuchsaufbau sind in Abschnitt 3.5.2 dargestellt.

Es konnte bei einer maximalen Elongation von 4 % und einer Versuchsdauer von 15 Minuten gezeigt werden, dass die RFI-Werte von LCA um 11 %, die von WGA um 10 % und die von PNA sogar um 21 % anstiegen. Bei der anschließenden Analyse durch Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine gesteigerte Internalisation in die gedehnten Zellen, vor allem bei fPNA und abWGA (siehe Abbildung 23). Untersuchungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an WGA ergaben, dass mit zunehmender Lektinkonzentration das Ausmaß der Erhöhung der Fluoreszenzwerte infolge der Dehnung ansteigt (200 pmol/ml > 100 pmol/ml > 25 pmol/ml, siehe Abbildung 21).

Durch den Einsatz von Monensin (siehe 3.3.5), gelang es, die Fluoreszenzsignale von gedehnten und ungedehnten Zellen teilweise rückzustellen (siehe Abbildung 24). Möglicherweise findet also ein partieller Transport in saure Zellkompartimente statt. Da aber die prozentuellen Unterschiede zwischen der RFI der gedehnten und der ungedehnten Zellen nach Monensinbehandlung nahezu gleich waren, ergab sich dadurch kein Hinweis auf einen veränderten Endozytoseweg infolge der Dehnung. Möglicherweise spielen hier also

gleichzeitig auch Wege eine Rolle, die nicht in der lysosomalen Degradation münden (siehe 2.3.1).

Tabelle 7: Zusammenfassung der RFI-Werte nach Dehnung mit FX-5000 für 15 Minuten bei 37 °C, sowie der prozentuellen Erhöhung dieser infolge Dehnung fasst alle gemessenen RFI-Werte, sowie die daraus berechneten prozentuellen Steigerungen durch Dehnung (bezogen auf die RFI ungedehnter Zellen) zusammen.

Tabelle 7: Zusammenfassung der RFI-Werte nach Dehnung mit FX-5000 für 15 Minuten bei 37 °C, sowie der prozentuellen Erhöhung dieser infolge Dehnung (Standardabweichungen siehe Abbildung 21 und Abbildung 22).

Lektin und eingesetzte Konzentration [pmol/ml]	RFI		Erhöhung [%]
	ungedehnt	gedehnt	
fWGA 200	9863,5	10888,0	10
fWGA 100	6822,3	7263,0	6
fWGA 25	2128,0	2182,5	3
	1174,9	1293,1	10
fLCA 25	747,0	827,5	11
fPNA 25	322,0	388,3	21
abWGA 25	150,9	170,9	13

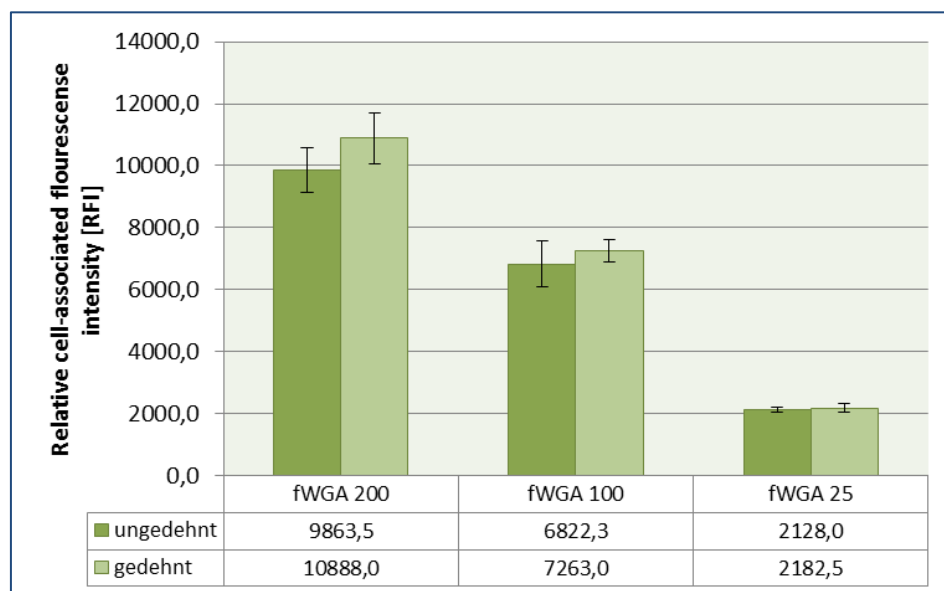


Abbildung 21: Konzentrationsabhängigkeit der dehnungsinduzierten Internalisation von WGA. Verwendet wurde fWGA in Konzentrationen von 200, 100 und 25 pmol/ml (VIKTOR, 485/525 nm, 0,1 Sekunden, n=4).

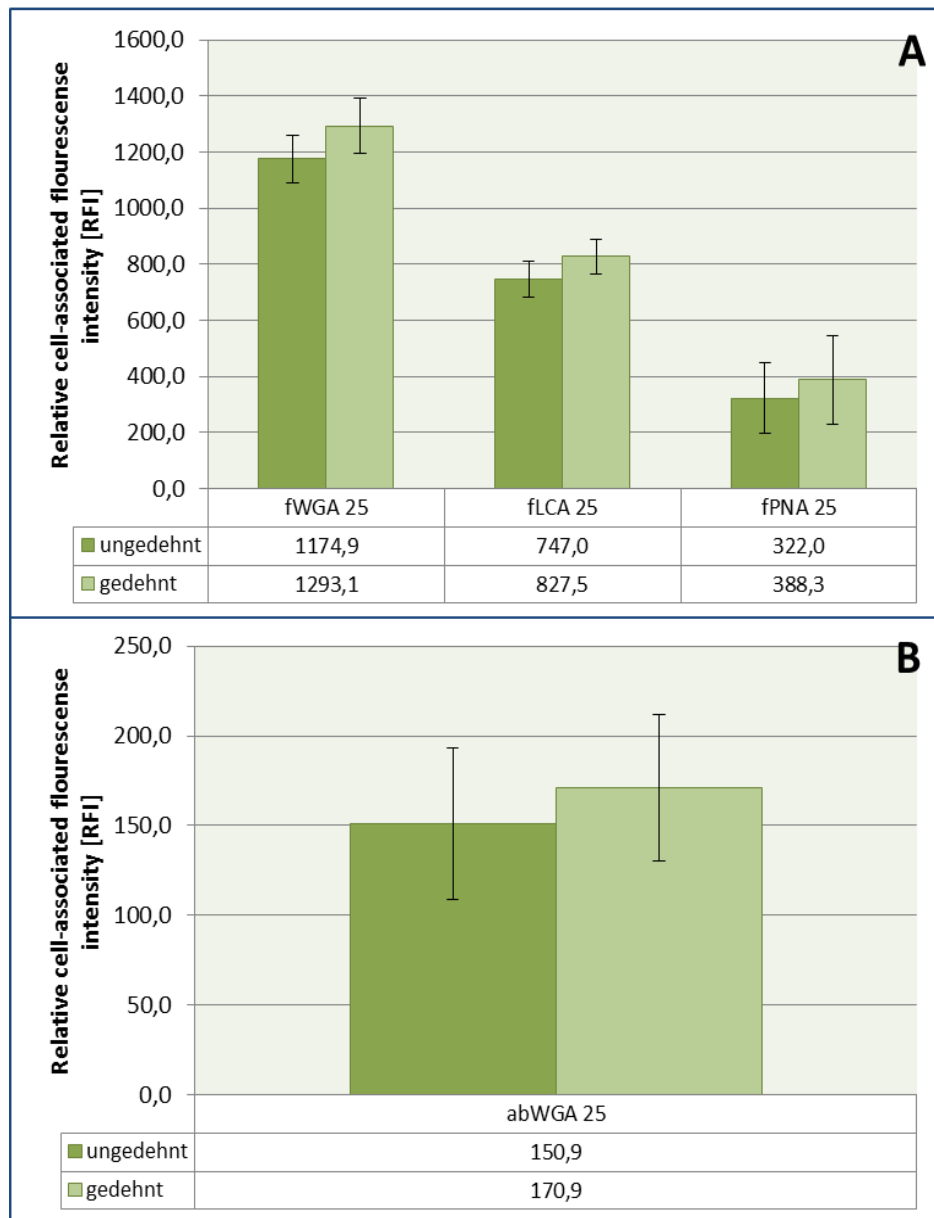


Abbildung 22: Evaluierung der Bindung von unterschiedlichen Lektinen an 5637 Zellen unter Dehnung mit FX-5000 (37 °C, 15 Minuten). **A)** fWGA, fLCA und fPNA in einer Konzentration von 25 pmol/ml (VIKTOR, 485/525nm, 0,1 Sekunden, n=9). **B)** abWGA in einer Konzentration von 25 pmol/ml (TECAN, 647/675 nm, Gain 140, n=3)

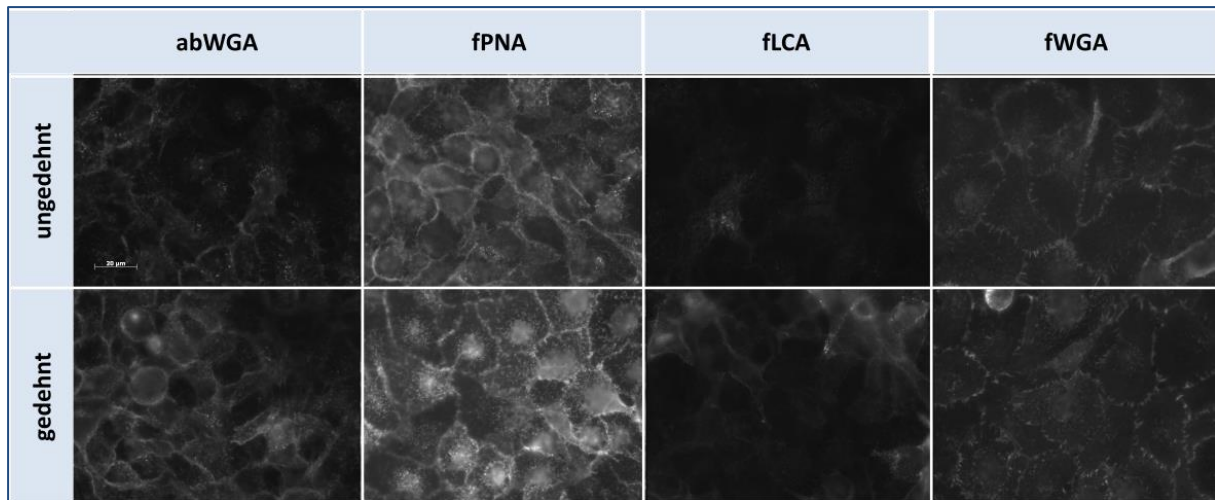


Abbildung 23: Mikroskopische Analyse von gedehnten und nicht gedehnten 5637-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Lektinen (15 Minuten Dehnung durch FX-5000 bei 37 °C, abWGA, fPNA, fLCA und fWGA)

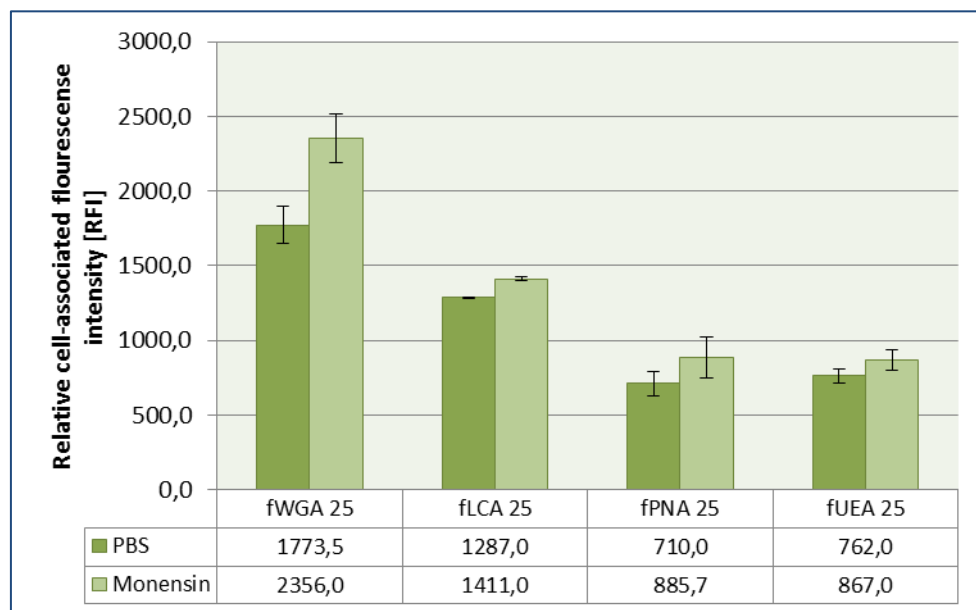


Abbildung 24 Rückstellen des Fluoreszenzsignals Fluorescein-markierter Lektine durch **Monensin**. Verwendet wurden fWGA, fLCA, fPNA und fUEA in einer Konzentration von 25 pmol/ml, 15-minütige Dehnung bei 37 °C durch FX-5000 (485/525 nm, Gain 100, n=3). Durch Monensin konnte eine Rückstellung um 33 % (fWGA), 10 % (fLCA), 25 % (fPNA) und 14 % (fUEA) erzielt werden.

4.1.4 Exozytose durch Dehnung

Im Wasserbad bei 37 °C wurde wie im Abschnitt 3.5.1 beschrieben neben der Zellossoziation und Internalisation auch eine mögliche Exozytose durch Dehnung evaluiert. Dazu wurden 5637-Zellen nach dreimaligem Waschen (siehe 3.1.7) und H333342-Markierung (3.3.3) unter Dehnung 60 Minuten lang bei 37 °C im Wasserbad mit abWGA in einer Konzentration von 12,50 pmol/ml und mit fLCA in einer Konzentration von 6,25 pmol/ml inkubiert. Danach wurde weitere 60 Minuten lang im Wasserbad ohne Dehnung inkubiert und

anschließend ein zweiter Dehnungszyklus für 60 Minuten bei 37 °C durchgeführt (siehe Abbildung 25). Abbildung 25: Versuchsaufbau zur Evaluierung eines etwaigen Lektinverlusts infolge mehrfacher Dehnung durch Kugeln. **M1-M4 stellen die Messungen der RFI (485/525 nm, Gain 100) dar, W dreimaliges Waschen. G: gedehnt, U: ungedehnt.** Vor den Dehnungszyklen wurden die Kugeln so positioniert, dass nach Beendigung des zweiten Zyklus die Zellen entweder zweimal gedehnt wurden (G-G), zweimal ungedehnt blieben (U-U) oder je einmal gedehnt wurden und einmal ungedehnt blieben (U-G, G-U). In dieser Studie konnte festgestellt werden, dass durch Dehnung der Zellen das Fluoreszenzsignal nicht wesentlich stärker abnahm als bei ungedehnten Zellen, unabhängig davon, ob während der Inkubation mit Lektinen gedehnt wurde oder nicht, (siehe Tabelle 8). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch Dehnung keine Exozytose induziert wird.

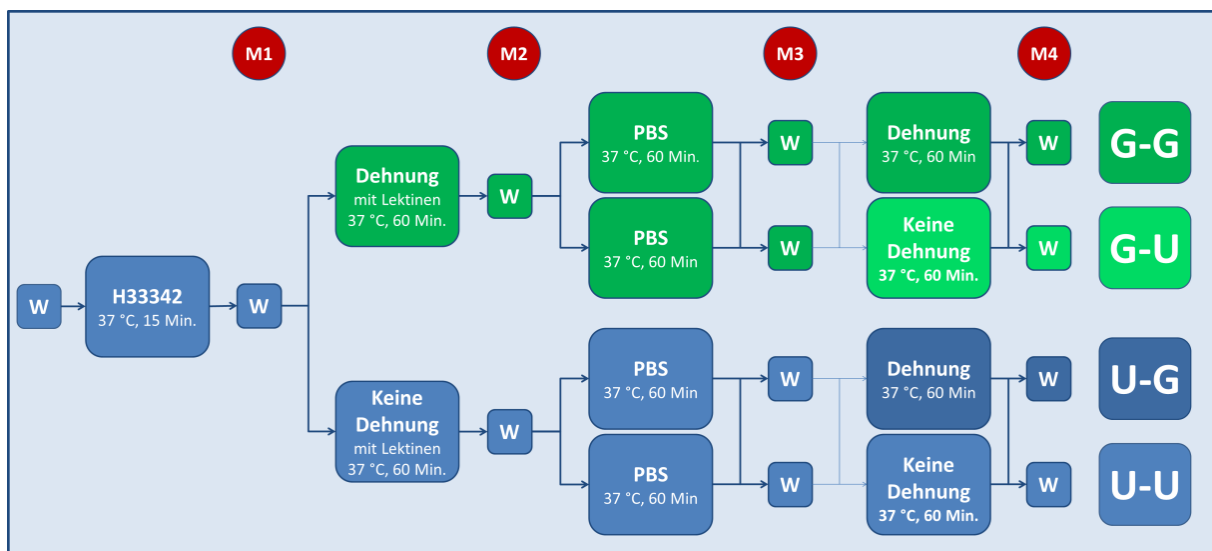


Abbildung 25: Versuchsaufbau zur Evaluierung eines etwaigen Lektinverlusts infolge mehrfacher Dehnung durch Kugeln. M1-M4 stellen die Messungen der RFI (485/525 nm, Gain 100) dar, W dreimaliges Waschen. G: gedehnt, U: ungedehnt. Die gedehnten Wells werden hier Grün, die ungedehnten in Blau dargestellt.

Tabelle 8: Evaluierung eines etwaigen Lektinverlusts infolge mehrfacher Dehnung. RFI-Werte nach erster (M2) und nach erneuter (M4) Dehnung inkl. Standardabweichungen (SA) dieser (485/525 nm, Gain 100, n=3), sowie prozentuelle Unterschiede bezogen auf ungedehnte Zellen (U-U).

Dehnungsprofil	M 2 [RFI]	SA M2 [RFI]	M4 [RFI]	SA M4 [RFI]	Unterschied M2 [%]	Unterschied M4 [%]
G-G	1147	81	1060	105	16	15
G-U	1150	173	1031	147	16	12
U-G	997	53	917	83	1	-0,4

U-U	988	49	921	49		
------------	-----	----	-----	----	--	--

4.2 Entwicklung und Vergleich verschiedener Testsysteme für die Inhibition von Endozytosewegen

In Abschnitt 2.3.1 wurden die unterschiedlichen Endozytosewege in Urothelzellen näher beschrieben. Mit Hilfe der Endozytoseinhibitoren DYN, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA (siehe 3.3.4) sollte ein genauerer Einblick in die verschiedenen Internalisationsrouten in Urothelzellen gewonnen werden.

4.2.1 Robustheit der Urothellinien gegenüber ausgewählten Endozytoseinhibitoren

Im Rahmen der Internalisationsstudien am Monolayer nach zweistündiger Vorinkubation mit Endozytoseinhibitoren (siehe 3.4.2), wurde auch eine mögliche Schädigung der Zellen oder deren Ablösung von der Mikrotiterplatte untersucht. Die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten des H33342-Signals nahmen direkt nach der Inkubation mit den verschiedenen Endozytoseinhibitoren weder bei 5637- noch bei SV-HUC Zellen stärker ab als ohne Inhibitor.

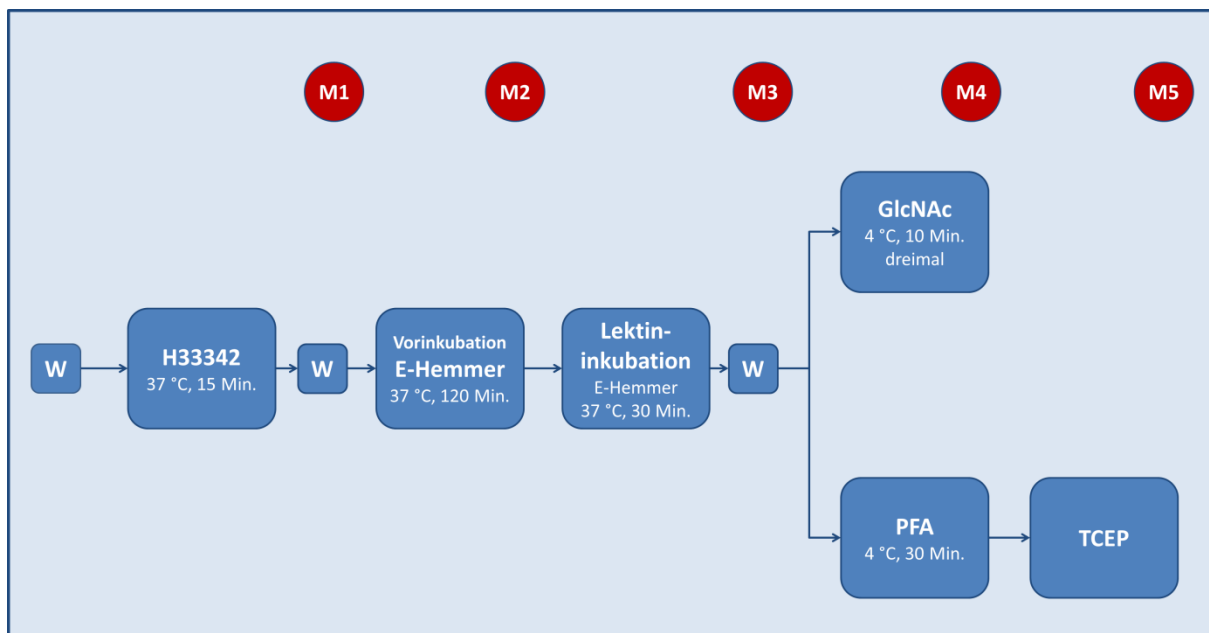


Abbildung 26: Versuchsaufbau zur Evaluierung der Robustheit der Urothelzellen gegenüber ausgewählten Endozytoseinhibitoren. M1-M4 stellen die Messungen der RFI (365/450 nm, Gain 100) dar, W dreimaliges Waschen.

Allerdings sank nach Lektininkubation der Zellen und einem anschließenden Waschschriff die RFI unter M β CD-Vorbehandlung bei SV-HUC auf 42%. Auch bei 5637-Zellen nahm die RFI bei M β CD am stärksten ab (auf 85 %). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Endozytoseinhibitoren DYN, CPZ, NOCO und EIPA keinen wesentlichen Einfluss hinsichtlich

Ablösung oder Permeabilisierung der Zellen haben. Für M β CD lässt sich jedoch eine gewisse Abnahme des RFI-Signals von H33342 (SV-HUC > 5637) feststellen. Auch mikroskopisch ließ sich diese Zellablösung durch M β CD bestätigen, jedoch erst nach einer anschließenden Behandlung mit GlcNAc. Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass die H33342-Methode zur Überprüfung der Intaktheit des Monolayers sensibler ist als die mikroskopische Kontrolle.

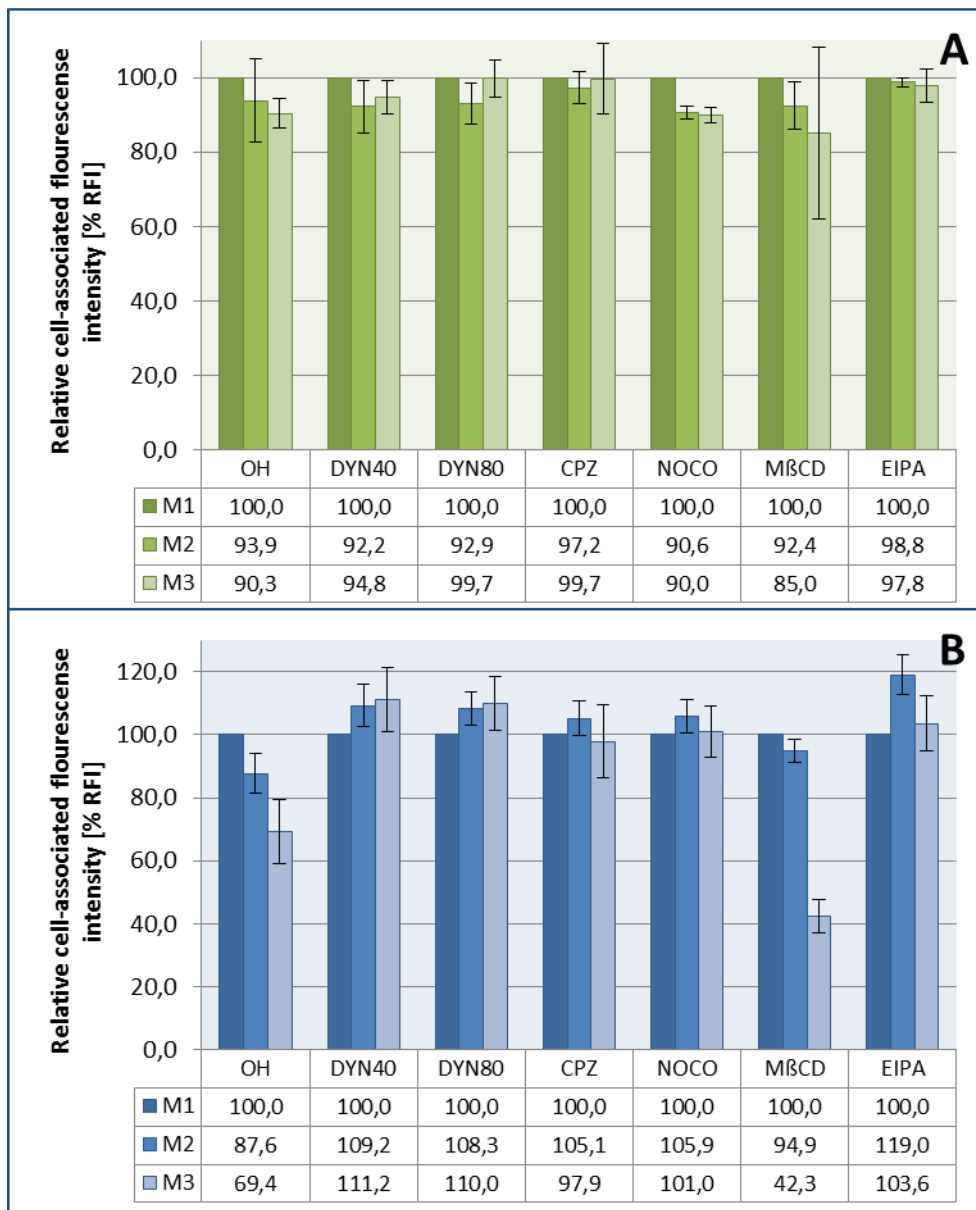


Abbildung 27: Evaluierung der Robustheit der Urothelzellen gegenüber ausgewählten Endozytoseinhibitoren. 5637 (A) und SV-HUC (B) wurden jeweils mit den Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN80, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA sowie ohne Inhibitor (OH) 120 Minuten lang bei 37 °C vorinkubiert (M2, 365/450 nm, Gain 100, n=3). Die RFI-Werte wurden dabei auf die H33342-Kontrollmessung M1 (RFI OH=1631 bei 5637 und 941 bei SV-HUC) bezogen. Nach 30-minütiger Lektininkubation und dreimaligem Waschen wurde erneut gemessen (M3, 365/450 nm, Gain 100, n=3).

4.2.2 Internalisationsstudien nach 120-minütiger Vorinkubation mit den Endozytoseinhibitoren

Nach 120-minütiger Vorinkubation mit DYN, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA und 30-minütiger Inkubation mit abWGA 12,50 pmol/ml und fLCA 6,25 pmol/ml bei 37 °C (siehe 3.4.2, Versuchsschema siehe Abbildung 28), zeigte sich bei 5637-Zellen, dass nur der Zusatz von M β CD eine Verminderung der RFI von LCA auf 42 % (bezogen auf die RFI ohne Inhibitor) bewirkte. Andererseits konnten aber durch alle Endozytoseinhibitoren die Internalisation von WGA in 5637-Zellen inhibiert werden (siehe Abbildung 29B), durch M β CD sogar auf 32 %. Nach Verminderung der oberflächlich gebundenen Lektine durch GlcNAc und auch durch TCEP zeigten DYN (13,5 %) und M β CD (13 %) niedrigere RFI-Werte als die RFI ohne Inhibitor (26,2 %). Auch bei den SV-HUC-1 Zellen zeigte bei LCA nur M β CD einen gewissen Einfluss (71 %). Vergleicht man mit den Werten ohne Inhibitor wiesen DYN40, DYN100, CPZ, NOCO und EIPA sogar erhöhte RFI-Werte für fLCA auf, DYN40, DYN100, NOCO und EIPA auch für abWGA. Bei WGA zeigte nur M β CD inhibierenden Einfluss auf die Lektininteraktion. Nach Differenzierung zwischen Lektinbindung und Internalisation durch GlcNAc war die RFI von DYN100, NOCO und M β CD im Vergleich zu OH leicht erniedrigt, nach TCEP zeigten noch DYN und, CPZ und M β CD eine schwache Verminderung der RFI (siehe Abbildung 30).

Generell ließ sich durch TCEP die RFI von abWGA stärker senken als durch GlcNAc. Das könnte entweder an einer möglicherweise nur teilweisen Unterdrückung der Fluoreszenzsignale zugänglicher Lektine durch TCEP, oder an einer unvollständigen Entfernung des oberflächlich gebundenen WGA durch GlcNAc liegen, und bedarf weiterer Evaluierung.

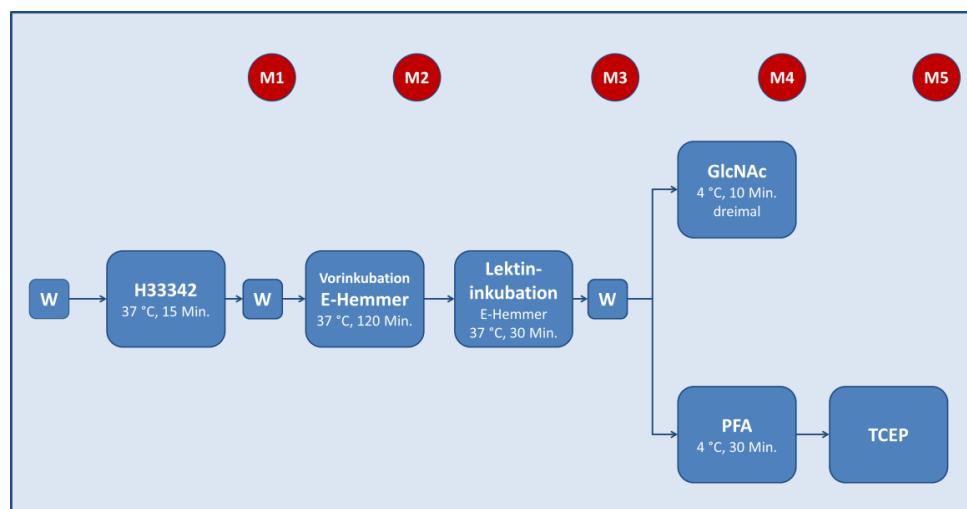


Abbildung 28: Versuchsaufbau der Internalisationsstudien nach 120-minütiger Vorinkubation mit Endozytoseinhibitoren (E-Hemmer). M1-M5 stellen die Messungen der RFI (485/525 bzw. 647/675 nm) dar, W dreimaliges Waschen.

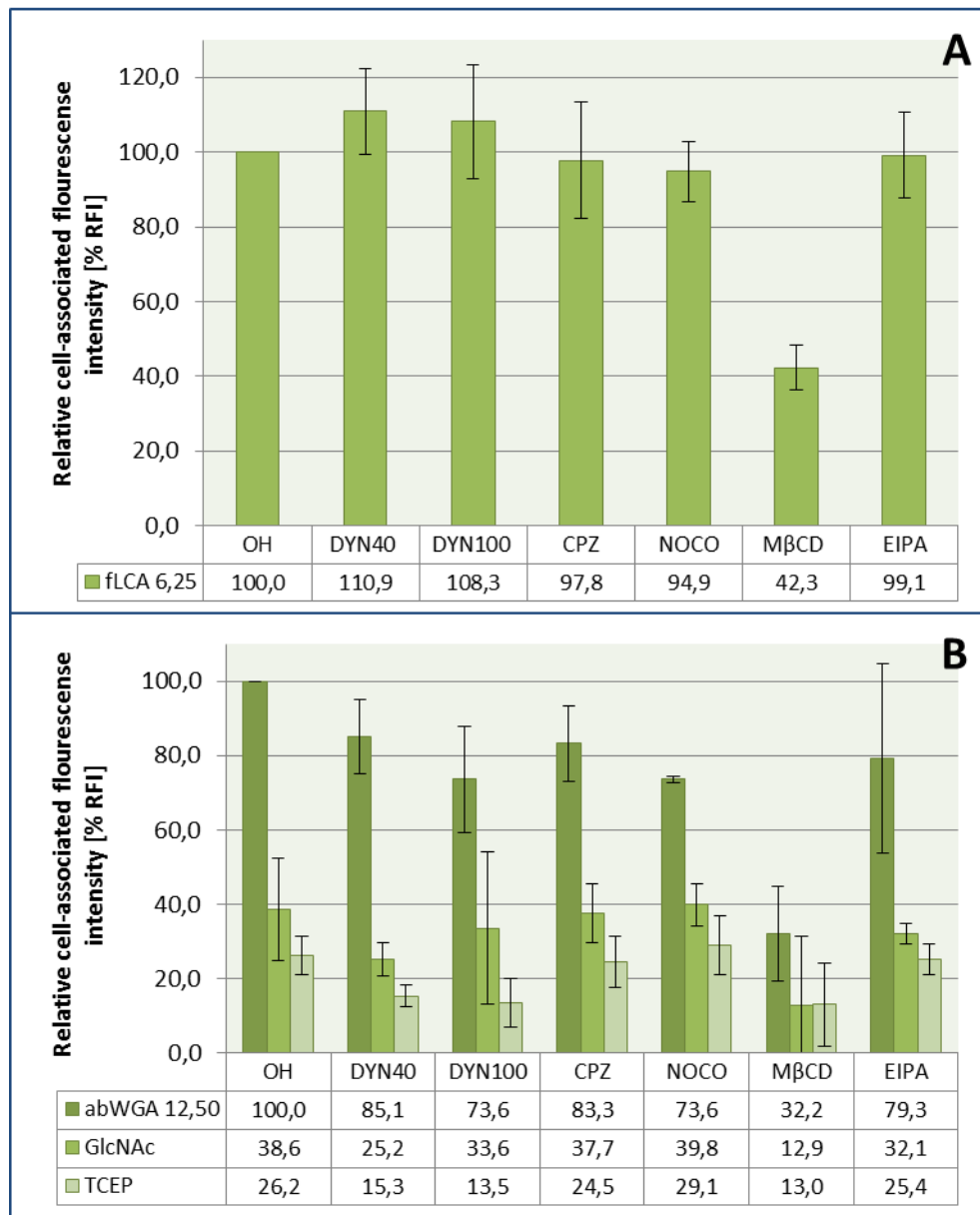


Abbildung 29: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA bei 5637-Zellen. Nach 120 Minuten Vorinkubation mit den Inhibitoren bei 37 °C wurde 30 Minuten lang bei 37 °C mit fLCA 6,25 pmol/ml (**A**) bzw. abWGA 12,50 pmol/ml (**B**) inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder mit GlcNAc oder mit TCEP behandelt. Alle Werte [% RFI] wurden auf die RFI ohne Inhibitor (OH) nach Lektininkubation bezogen (RFI OH fLCA=849 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=68, bei Gain 140, n=3).

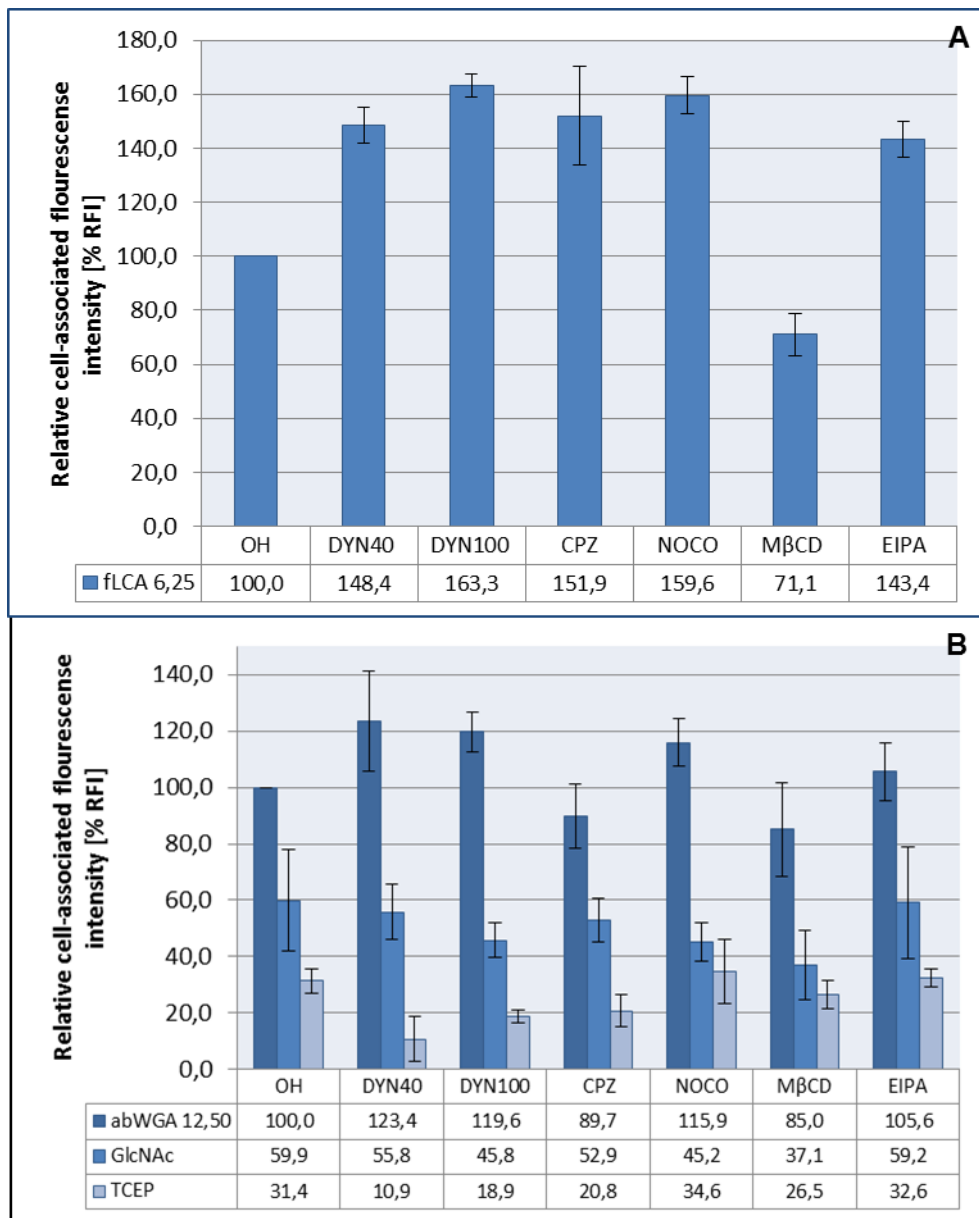


Abbildung 30: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA bei SV-HUC-Zellen. Nach 120 Minuten Vorinkubation mit den Inhibitoren bei 37 °C wurde 30 Minuten bei 37 °C mit fLCA 6,25 pmol/ml **(A)** bzw. abWGA 12,50 pmol/ml **(B)** inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder mit GlcNAc oder mit TCEP behandelt. Alle Werte [% RFI] wurden auf die RFI ohne Inhibitor (OH) nach Lektininkubation bezogen (RFI OH fLCA=761 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=51, bei Gain 140, n=3).

urch Anfärben des Zytoskeletts mit Cytokeratin-AK (siehe 3.3.5) nach 120-minütiger Vorinkubation mit abWGA (12,5 pmol/ml) bei 4 °C und 30-minütiger Inkubation mit Endozytoseinhibitoren bei 37 °C, konnte deutlich gezeigt werden, dass bei M β CD ein Ablösen der Zellen erfolgt (siehe Abbildung 31). Bei der optischen Beurteilung der mikroskopischen Bilder zeigte sich, dass DYN100 und M β CD inhibitorische Wirkung auf die Internalisation von abWGA in 5637 Zellen haben könnten.

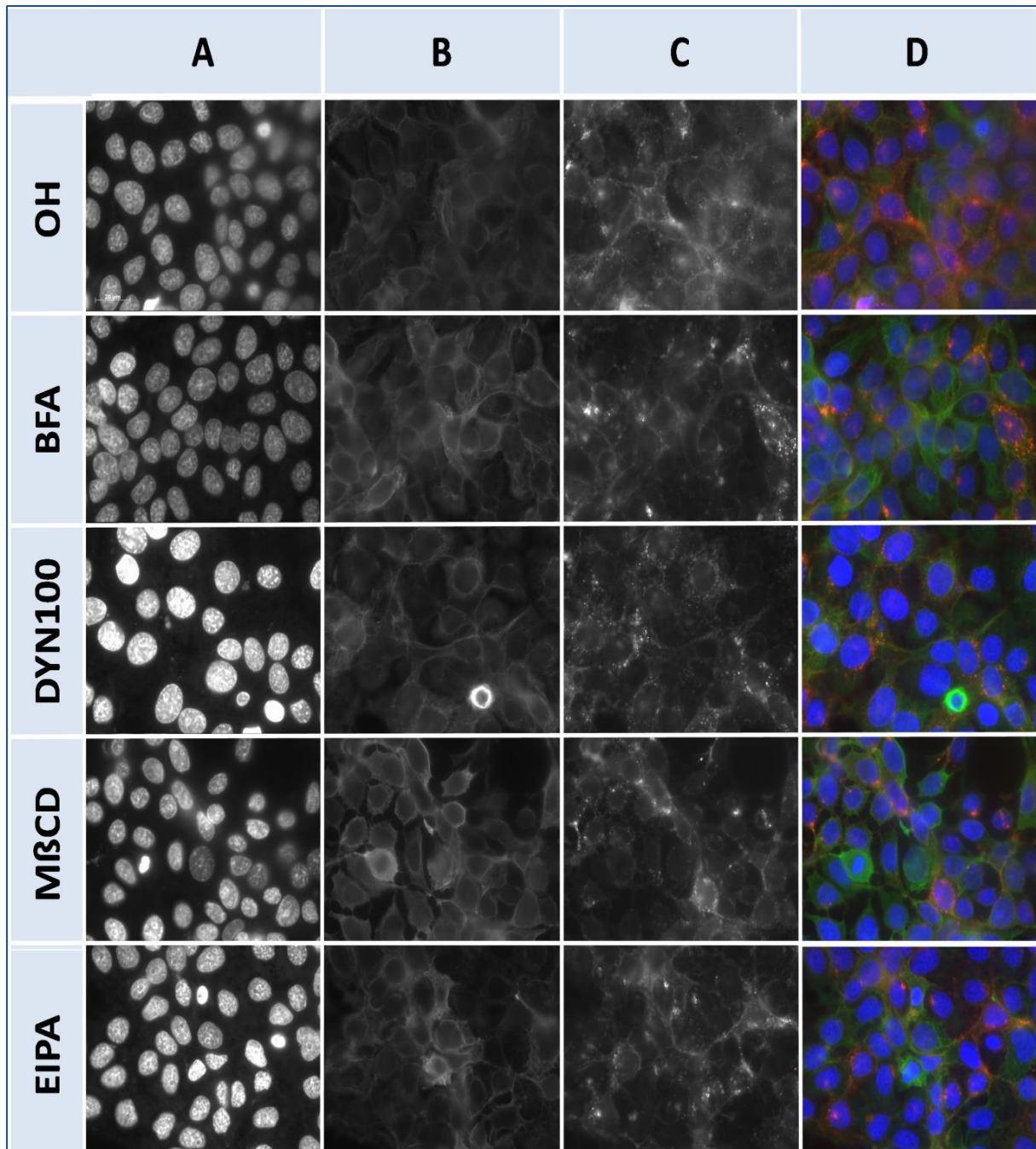


Abbildung 31: Mikroskopische Darstellung des Zytoskeletts von 5637 Zellen nach Behandlung mit ausgewählten Endozytoseinhibitoren (120 Minuten, 37 °C) und DAPI-Färbung. Anschließend wurde mit abWGA (12,50 pmol/ml) und Endozytoseinhibitoren inkubiert (30 Minuten, 37 °C) und das Zytoskelett mit Cytokeratin-AK angefärbt ((A) DAPI, (B) Cytokeratin-AK, (C) abWGA 37°C, (D) alle Kanäle übereinandergelegt).

Die mikroskopische Analyse von 5637 Zellen in Suspension nach 120-minütiger Vorinkubation mit Endozytoseinhibitoren und DAPI sowie anschließender Inkubation mit abWGA (12,50 pmol/ml) und fLCA (6,25 pmol/ml) (Versuchsaufbau siehe 3.4.1) ließ darauf schließen, dass vor allem DYN100 die Internalisation sowohl von LCA als auch von WGA in die Zellen inhibieren könnte (siehe Abbildung 32). DAPI färbt nur die Kerne permeabilisierter, also geschädigter Zellen und kann dadurch als Indikator für während des Versuchs entstandene Zellschäden herangezogen werden (siehe 3.3.3). NOCO scheint hier die Zellen am stärksten geschädigt zu haben.

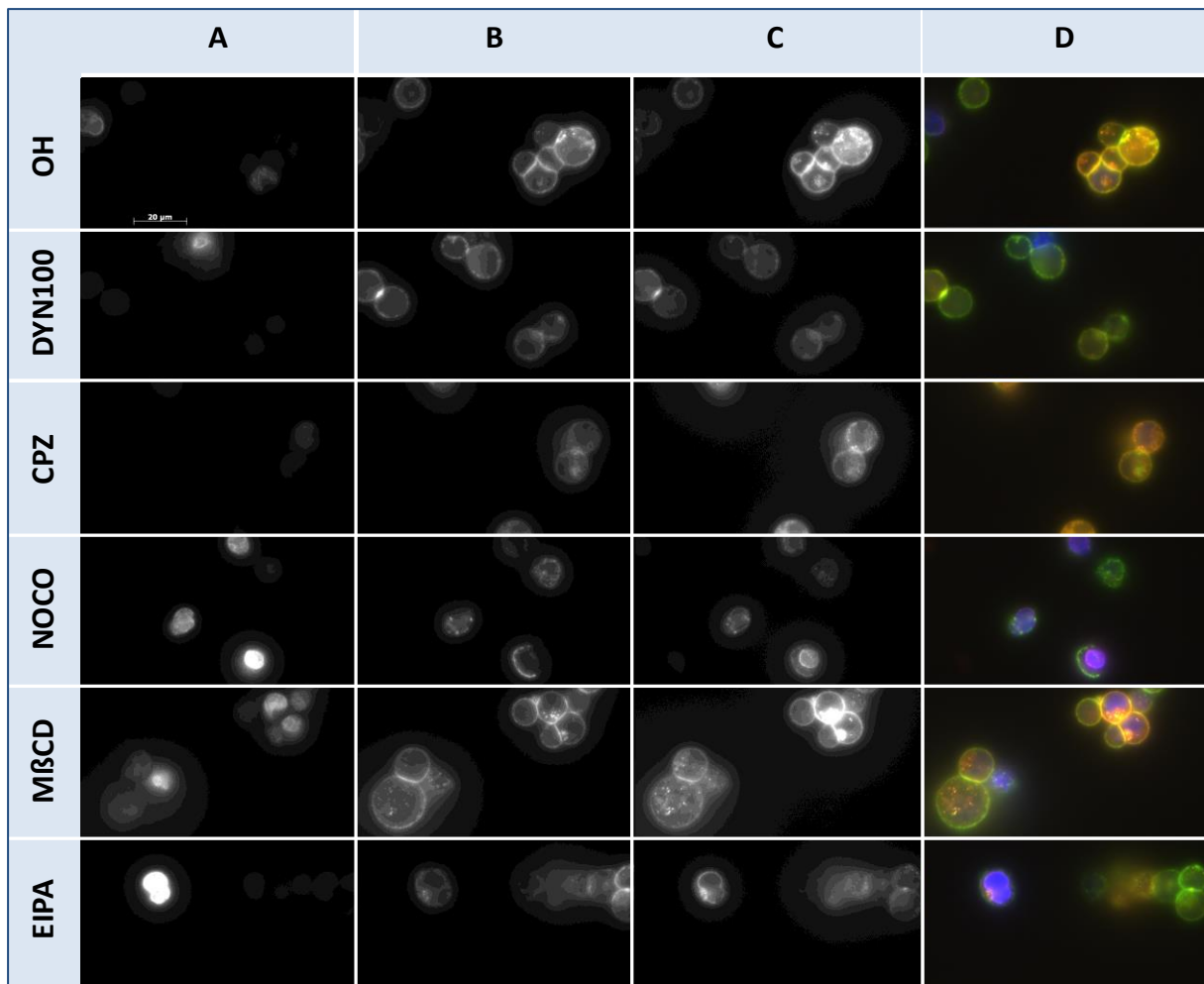


Abbildung 32: Mikroskopische Darstellung der Lektinininteraktion von SV-HUC Zellen nach 120-minütiger Vorinkubation mit Endozytoseinhibitoren und DAPI bei 37 °C (A). Anschließend wurde 30 Minuten lang bei 37 °C mit fLCA (6,12 pmol/ml, B), abWGA (12,50 pmol/ml, C) und Endozytoseinhibitoren inkubiert. ((A) DAPI, (B) fLCA 37 °C, (C) abWGA 37°C, (D) alle Kanäle übereinandergelegt).

4.2.3 Internalisationsstudie nach vorheriger Lektinbeladung (Pulse Chase)

Bei Pulse-Chase-Versuchen (siehe 3.4.3) wurde nach 60-minütiger Lektinbeladung der Zellen bei 4 °C, 30 Minuten lang bei 37 °C mit Endozytoseinhibitoren inkubiert (siehe Abbildung 33). Wie Abbildung 34 zeigt, konnte bei 5637-Zellen eine Inhibition der

Internalisation von fLCA durch M β CD auf 45 % des Kontrollwerts (Messung 2) erreicht werden. Auch DYN100 konnte die Lektin-Zellinteraktion im Vergleich zur Inkubation ohne Inhibitor etwas vermindern. Auf die Endozytose von abWGA scheint nur M β CD Einfluss zu nehmen. Nach Behandlung mit GlcNAc zeigten sich auch etwas gesenkte relative Fluoreszenzintensitäten bei DYN40, DYN100, NOCO und EIPA. Durch Löschung der Fluoreszenzsignale von oberflächlich gebundenem abWGA durch TCEP konnte dieses Ergebnis allerdings nicht bestätigt werden (hier nur DYN100). Bei SV-HUC-Zellen zeigte der Pulse-Chase-Versuch eine mögliche, wenn auch nur sehr schwach ausgeprägte, Inhibition der Internalisation von fLCA durch EIPA. Bei abWGA zeigte sich eventuell durch DYN40 eine gewisse Verminderung der RFI. Nach der Behandlung der Zellen mit GlcNAc und auch nach TCEP zeigte nur DYN schwache inhibitorische Wirkung auf die Endozytose. (siehe Abbildung 35). Generell, auch ohne Inhibitor, zeigte sich sowohl bei SV-HUC-1- als auch bei 5637-Zellen, dass LCA anscheinend stärker internalisiert wurde, wenn man fLCA und abWGA in Mischung einsetzt. Möglicherweise liegt das an der niedrigeren eingesetzten Konzentration (fLCA 6,25 pmol/ml, abWGA 12,50 pmol/ml, siehe Versuchsaufbau 3.4.3). Auch zeigte sich, dass bei 5637 ein höherer Anteil der gebundenen Lektine durch die Inkubation internalisiert wurde als bei SV-HUC (siehe Vergleich von Abbildung 34A und B und Abbildung 35A und B)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keiner der eingesetzten Endozytoseinhibitoren hier eindeutige Aktivität bei SV-HUC Zellen zeigte, M β CD aber die Internalisation in 5637 Zellen hemmen könnte. Dies könnte auf eine Beteiligung von sogenannten „Lipid rafts“, und somit der Caveolin-abhängigen Endozytose in 5637 Zellen hindeuten (siehe 2.3.1). Da jedoch M β CD auch zu einer Verminderung der RFI von H33342 führte (siehe 4.2.1), ist diese Erkenntnis mit Vorbehalt zu betrachten.

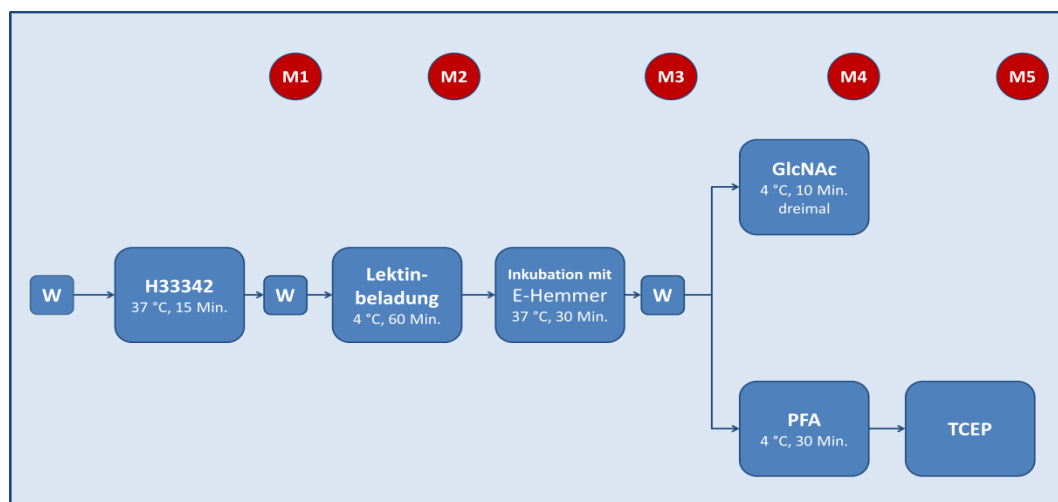


Abbildung 33: Versuchsaufbau der Pulse-Chase-Internalisationsstudien mit Endozytoseinhibitoren (E-Hemmer). M1-M5 stellen die Messungen der RFI (485/525 bzw. 647/675 nm) dar, W dreimaliges Waschen.

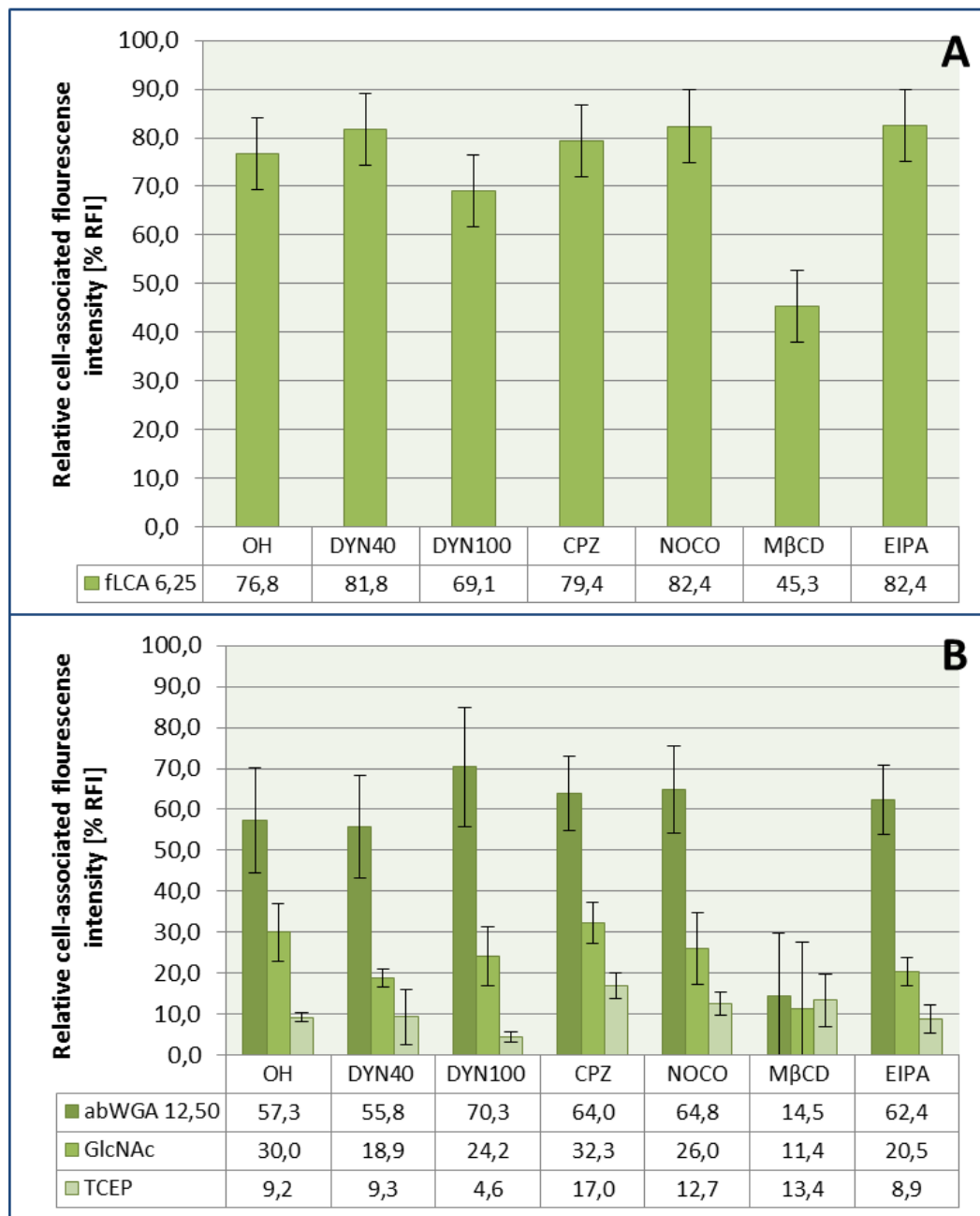


Abbildung 34: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA bei 5637 Zellen (Pulse-Chase Studie). Nach 60 Minuten Lektinbeladung mit fLCA 6,25 pmol/ml **(A)** bzw. abWGA 12,50 pmol/ml **(B)** bei 4 °C wurde 30 Minuten lang mit den Inhibitoren bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder mit GlcNAc oder mit TCEP behandelt. Alle Werte [% RFI] wurden auf die jeweiligen RFI-Werte nach Lektininkubation (Messung 2) bezogen (RFI OH fLCA=777 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=97, bei Gain 140, n=3).

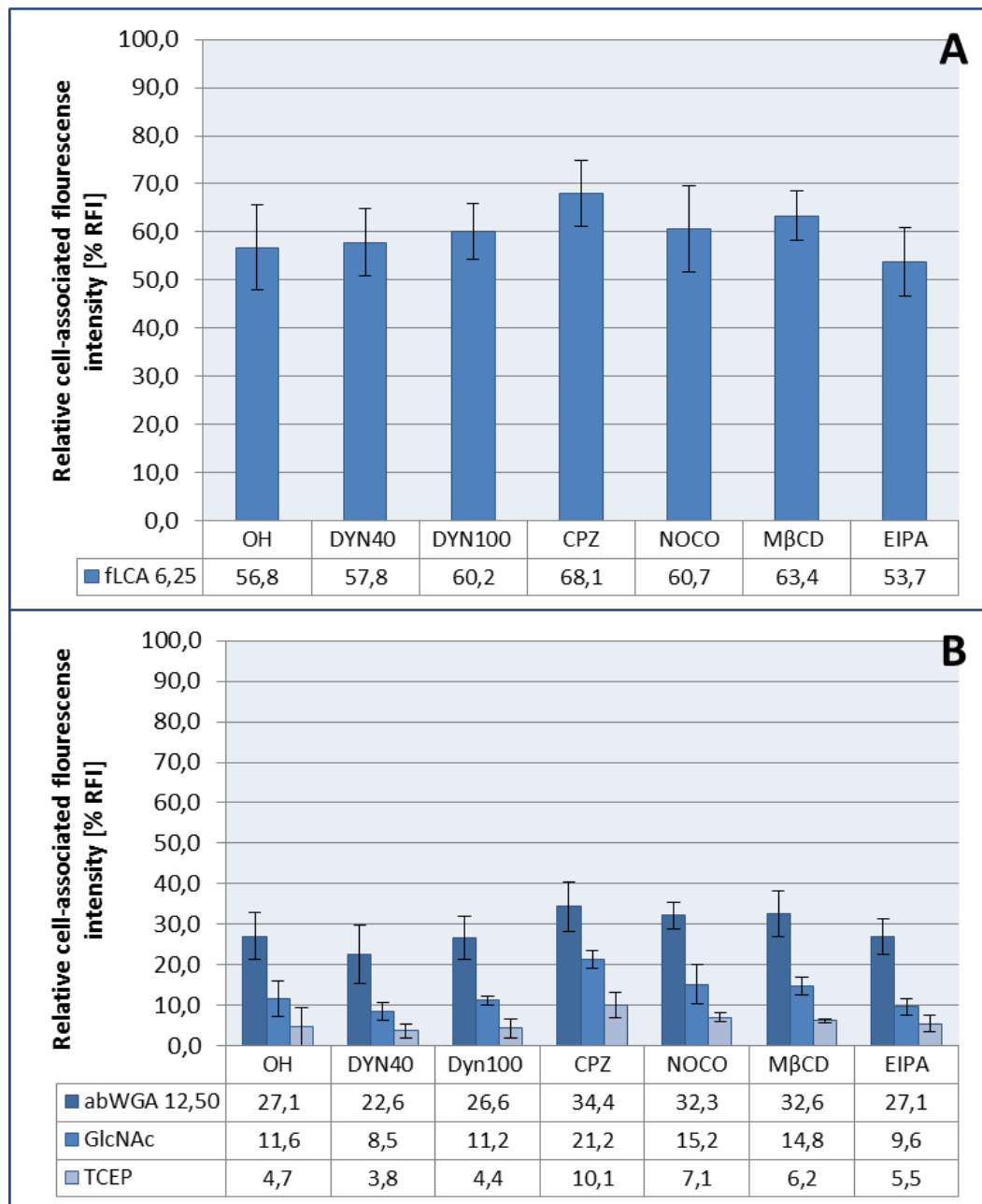


Abbildung 35: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA bei SV-HUC Zellen (Pulse-Chase Studie). Nach 60 Minuten Lektinbeladung mit fLCA 6,25 pmol/ml (**A**) bzw. abWGA 12,50 pmol/ml (**B**) bei 4 °C wurde 30 Minuten lang mit den Inhibitoren bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder mit GlcNAc oder mit TCEP behandelt. Alle Werte [% RFI] wurden auf die jeweiligen RFI-Werte nach Lektininkubation (Messung 2) bezogen (RFI OH fLCA=886 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=117, bei Gain 140, n=3).

4.2.4 Exozytoseinhibition

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch eine mögliche Inhibition der Exozytose durch DYN 100, BFA, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA evaluiert (Versuchsaufbau siehe 3.4.5 und Abbildung 36). Eine solche Exozytose könnte mit beteiligt sein am „Lektin-Verlust“ (Rückgang der RFI) von zuvor Lektin-beladenen Zellen. über die Zeit. Um die quantitativ erfassten Prozesse so weit als möglich auf die tatsächliche Exozytose (zuvor internalisierter) Lektine zu beschränken, wurden die Zellen nach der Lektin-Beladung bei 37 °C zunächst mit GlcNAc (bei 4 °C) gewaschen (Dissoziation oberflächlich gebundener Lektine), bevor für 90 Minuten mit den Inhibitoren bei 37 °C inkubiert wurde. Bei 5637-Zellen konnten alle Inhibitoren eine Exozytose von fLCA inhibieren, während EIPA, BFA, NOCO, CPZ und M β CD das Ausschleusen von abWGA inhibieren konnten. Bei SV-HUC-1 konnten ebenfalls alle Inhibitoren die Exozytose von fLCA etwas hemmen. während kein Hemmer Inhibition der Exozytose von abWGA zeigte. Zusammenfassend scheint es so zu sein, dass BFA die stärkste inhibierende Aktivität bei der Exozytose von fLCA und abWGA aus 5637-Zellen zeigt, während DYN100 bei SV-HUC Zellen eine gewisse inhibierende Rolle spielen könnte (siehe Abbildung 37). Generell scheint bei 5637 Zellen WGA stärker ausgeschleust zu werden als LCA, während bei SV-HUC abWGA und fLCA in vergleichbaren Mengen exozytiert wurde.

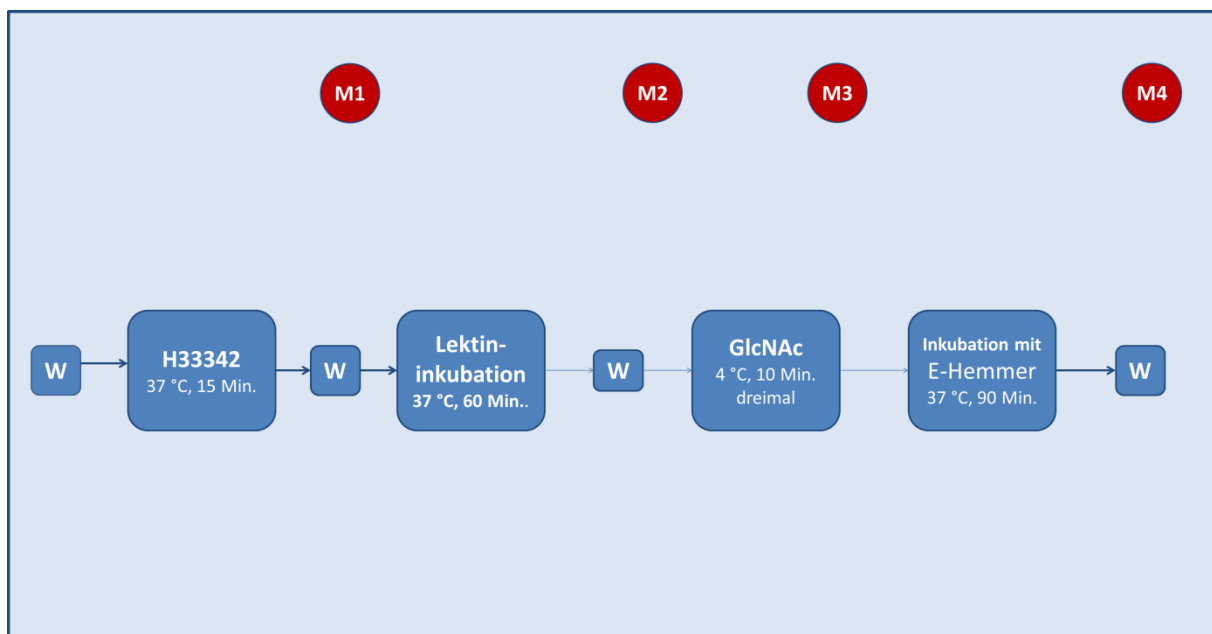


Abbildung 36: Versuchsaufbau zur Evaluierung der Exozytose mit Hilfe der Inhibitoren DYN100, BFA, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA (E-Hemmer). M1-M4 stellen die Messungen der RFI (485/525 bzw. 647/675 nm) dar, W dreimaliges Waschen.

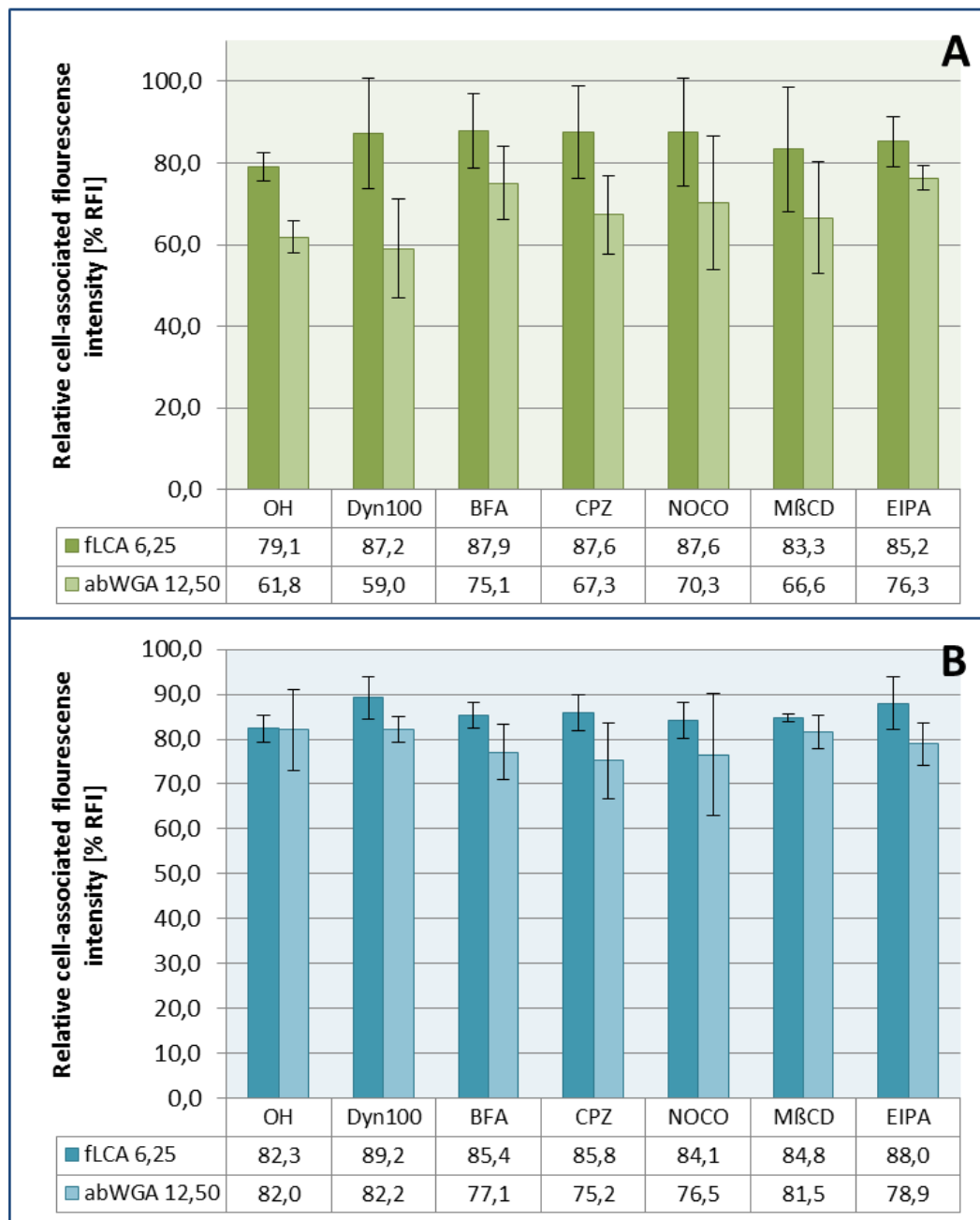


Abbildung 37: Exozytoseinhibition durch DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA. Nach 60 Minuten Lektininkubation von 5637 **(A)** bzw. SV-HUC **(B)** mit fLCA 6,25 pmol/ml bzw. abWGA 12,50 pmol/ml bei 37 °C wurden die Zellen mit GlcNAc behandelt und anschließend 90 Minuten lang mit den Inhibitoren bei 37 °C inkubiert. Alle Werte [% RFI] wurden auf die jeweiligen RFI-Werte nach GlcNAc (Messung 3) bezogen (RFI OH fLCA=1122 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=102, Gain 140, n=3).

5 Zusammenfassung

Zur Optimierung des Instillationsvolumens bei der intravesikalen Therapie von Harnblasenkarzinomen wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit ein Analysenprotokoll zur genau regulierbaren Dehnung von Urothelzellen entwickelt, um so die Internalisation fluoreszenzmarkierter Lektine unter Anwendung von Dehnung mit der Internalisation in Ruhe vergleichen zu können. Nach Entwicklung eines geeigneten Dichtungssystems zur Verwendung des Flexcell FX5000-Tension Systems wurden Internalisationsstudien an der Urothelkarzinomzelllinie 5637 bei 37 °C durchgeführt, die belegen, dass bei einer Dehnungsdauer von 30 Minuten und bei einer Elongation von 4 % die RFI von abWGA und fLCA um 10 %, von fPNA sogar um 20 % gesteigert werden konnte. Da die Dehnung mittels FX-5000 nur im Inkubator bei 37 °C durchgeführt werden kann, wurde weiter eine Methode entwickelt, die einen direkten Vergleich der RFI nach Dehnung bei 4 °C und bei 37 °C erlaubt. Dafür wurden die Zellen entweder im Wasserbad bei 37 °C oder im Kühlschrank bei 4 °C mithilfe kugelförmiger Dehnungskörper ($\varnothing=1$ cm) gedehnt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die erhöhte RFI nach Dehnung nicht nur auf eine erhöhte Zellassoziation an die vergrößerte Oberfläche zurückzuführen ist, sondern auch vermehrt Internalisation stattfindet. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass durch Erhöhung des Instillationsvolumens in Kombination mit der Kopplung der Wirkstoffe an Lektine eine Therapieverbesserung des Harnblasenkarzinoms erwirkt werden könnte. Um das optimale Volumen zu finden, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Die im Rahmen dieser Diplomarbeit entwickelte Methode zur Dehnung der Urothelzellen bietet für diese die optimale Basis. Auch eine eventuelle rasche Reversibilität der Internalisation wurde durch Kontrolle der Fluoreszenzsignale der Zellen sowie des Überstands nach Beendigung eines Dehnungszyklus aber auch während eines weiteren Dehnungszyklus evaluiert. Dabei wurde keine vermehrte Exozytose festgestellt, die RFI der gedehnten Zellen blieb durchwegs um denselben prozentuellen Wert erhöht.

Um einen Einblick in die möglichen Mechanismen der Endo- sowie der Exozytose zu gewinnen, wurden verschiedene Inhibitoren dieser evaluiert. Dabei zeigte sich, dass bei 5637-Zellen Methyl- β -Cyclodextrin und eventuell Dynasore einen Einfluss auf die Internalisation von WGA und LCA haben könnte. Diese Erkenntnisse deuten auf eine Beteiligung von Caveolin-abhängigen Endozytoseprozessen (Methyl- β -Cyclodextrin) sowie von Dynamin (Dynasore) hin.

Bei der Inhibition der Exozytose aus 5637-Zellen scheint Brefeldin A wirksam zu sein, bei SV-HUC-1-Zellen hingegen vor allem Dynasore. Ob dies durch einen unterschiedlichen Exozytosemechanismus bedingt ist, bedarf jedoch ebenfalls weiterer Evaluierung.

6 Summary

Against the backdrop of optimizing the instillation volume in intravesical therapy of urothelial carcinoma, this work deals with the development of an analysis protocol for accurate and controllable stretching of urothelial cells. With this method, it is possible to compare the internalization of fluorescence-labeled lectins into stretched cells with the internalization into cells at rest. After developing a suitable sealing system for use of the FlexCell FX5000 tension system, internalization studies were conducted on cell lines of urothelial carcinoma at 37 degrees Celsius. After 30 minutes of stretching time at an elongation of 4 %, the RFI of abWGA- as well as fLCA-treated cells increased by 10%, whereas that of fPNA-treated cells increased by 20%. Since the elongation by the FX-5000 could only be operated in an incubator at 37 degrees Celsius, a method was developed which allowed a direct comparison of the RFI after stretching at 4 degrees Celsius and at 37 degrees Celsius. For this, the cells were stretched in a water bath at either 37 degrees Celsius or in the refrigerator at 4 degrees Celsius using spherical expansion bodies (diameter of 1 cm). Together, this work shows that the increase in RFI after stretching is due not only to an elevated cell association caused by increased surface area, but also to increased internalization. An increased installation volume, in combination with coupling of pharmaceutically active ingredients to lectins, may thus allow for an improvement in the therapy of urothelial carcinoma. However, further research is needed to substantiate the results and define the optimum volume. The methodological framework presented within this thesis for stretching of urothelial cells provides a sound basis for this. Moreover, the possible reversibility of internalization (by exocytosis) was evaluated by monitoring the fluorescence signals of cells and supernatant by prolonged incubation (chase) after a prior loading period (pulse). Hereby, no increased exocytosis was observable; the RFI of stretched cells remained constant within the statistically valid percentage rate.

Furthermore, various inhibitors were evaluated to gain insights into the possible mechanisms of endocytosis and exocytosis. It was found that in 5637 cells, Methyl- β -Cyclodextrin and possibly Dynasore could affect the internalization of WGA and LCA. These findings suggest an involvement of Caveolin-dependent endocytosis processes (Methyl- β -Cyclodextrin) and of dynamin (Dynasore). Regarding the inhibition of exocytosis from 5637 cells, Brefeldin A appeared to be effective, whereas Dynasore seemed to inhibit the exocytosis from SV-HUC-1 cells. It is unclear if this is caused by different exocytosis mechanisms; also here, further research is needed.

7 Abkürzungsverzeichnis

BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BFA	Brefeldin A
CIS	Carcinoma in situ
CPZ	Chlorpromazin
Cytokeratin-AK	Cytokeratin-Antikörper
DYN	Dynasore
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid
FI	Fluoreszenzintensität
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
H33342	HOECHST 33342
HT-Platte	HT-Bioflex®-Kulturplatte
LAF	Laminar Airflow
LCA	Lens culinaris agglutinin
MIB	Muskelinvasives Blasenkarzinom
M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
NBI	Narrow-band Imaging
NMIB	Nichtmuskelinvasives Blasenkarzinom
NOCO	Nocodazol
PBS	PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PDD	Photodynamische Diagnosemethode
PNA	Peanut agglutinin
RFI	Relative, zellassozierte Fluoreszenzintensität
UEA	Ulex europaeus isoagglutinin
WGA	Wheat germ agglutinin

8 Literaturverzeichnis

1. Hautmann R. Urologie. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010;4:212-214
2. Apodaca G. The Uroepithelium: Not Just a Passive Barrier. Blackwell Munksgaard. 2004;5:117-128
3. Wang E., Lee J., Ruiz W., Balestreire E., Bodungen M., Barrick S., Cockayne D., Birder L. und Apodaca, G. ATP and purinergic receptor–dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. The Journal of Clinical Investigation. 2005;115(9):2412-2422
4. Lamm D., McGee W. und Hale K. Bladder Cancer: Current Optimal Intravesical Treatment. Urol. Nurs. 2005;25(5):323-332
5. Neusch L., Plattner V., Polster-Wildhofen S., Zidar A., Chott A., Borchard G., Zechner O., Gabor F. und Wirth M. Lectin mediated biorecognition as a novel strategy for targeted delivery to bladder cancer. The Journal of Urology. 2011;186(4):1481-14886.
6. Kirsch, J. *Taschenlehrbuch Anatomie*. s.l. : Thieme, 2010. S. 439-444
7. Hirth T. Morphologische und funktionelle Aspekte der Harnblase. Deutsche Zeitschrift für Osteopathie. 2010;1:2-5
8. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Thieme Verlag, 2012;4:52-59 und 443-464
9. Mutschler E., Schaible H. und Vaupel P. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2007;6:494-496
10. Linß W. und Fanghänel J. Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie. Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1998. S. 216-218, Abb.9-7
11. Hautmann R. Urologie. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2006: 212-214
12. Carattina M., Prakasam S., Ruiz W., Clayton D., McGuire M., Gallo L. und Apodaca G. Bladder filling and voiding affect umbrella cell tight junction organization and function. Am J Physiol Renal Physiol. 2013;305:1158-1168
13. Lewis S. A. und de Moura J. L. C. Apical membrane area of rabbit urinary bladder increases by fusion of intracellular vesicles: An electrophysiological study. The Journal of Membrane Biology. 1984;82(2):123-136

14. Babjuk M., Böhle A., Burger M., Compérat E., Kaasinen E., Palou J., Rhijn B., Rouprêt M., Shariat S., Sylvester R. und Zigeuner R. Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1 and CIS). s.l. : European Association of Urology, 2014:6-31
15. Scholz H. und Schwabe U. Taschenbuch der Arzneibehandlung. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2005;13:312-313
16. <http://www.bladdercancerguide.com/wp-content/uploads/2013/12/bladder-cancer-stage.jpg> (09.02.2015)
17. Oosterlinck W., Lobel B., Jakse G., Malmström P., Stöckle M. und Steinberg C. Guidelines on Bladder Cancer. European Urology. 2002;41:105-112
18. Neutsch L., Gabor F. und Wirth M. Glycan-targeted drug delivery for intravesical therapy: in the footsteps of uropathogenic bacteria. Therapeutical Delivery. 2014;5(5):537-553
19. Matteoni R. und Kreis T. Translocation and Clustering of Endosomes and Lysosomes Depends on Microtubules. The Journal of Cell Biology. 1987;105:1253-1265
20. Bathori G., Cervenak L. und Karadi I. Caveolae—An Alternative Endocytotic Pathway for Targeted Drug Delivery. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems. 2004; 21(2):67-95
21. Helms B. und Zurzolo C. Lipids as Targeting Signals: Lipid Rafts and Intracellular Trafficking. Traffic. 2004:247-254
22. Truschel S., Wang E., Ruiz W., Leung M., Rojas R., Lavelle J., Zeidel M., Stoffer D. und Apodaca G. Stretch-regulated Exocytosis/Endocytosis in Bladder Umbrella Cells. Molecular Biology of the Cell. 2002;13:830-846
23. Van Damme E., Peumans W., Pusztai A. und Bardocz S. Handbook of plant lectins: Properties and biomedical applications. Chinchester: John Wiley & Sons, 1998:15-22, 390-391
24. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-9.aspx?geo_country=at&slp=1#documentation (12.02.2015)
25. Junqueira L.C. und Carneiro J. Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen Unter Berücksichtigung der Histophysiologie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2013:9
26. <https://www.lifetechnologies.com> (12.02.2015)

27. Marcia E., Ehrlich M., Massol R., Boucrot E., Brunner C. und Kirchhausen T. Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. *Developmental Cell*. 2006;10(6):839-850
28. Stuart A. und Brown T. Entry of Feline Calicivirus Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis and Acidification in Endosomes. *Journal of Virology*. 2006;80(15):7500-7509
29. Wang L., Rothberg K. und Anderson R. Mis-Assembly of Clathrin Lattices on Endosomes Reveals a Regulatory Switch for Coated Pit Formation. *The Journal of Cell Biology*. 1993;123(5):1107-1117
30. Rodal S., Skretting G., Garred O., Vilhardt F. und van Deurs B. Extraction of Cholesterol with Methyl- β -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles. *Molecular Biology of the Cell*. 1999;10:961-974
31. Wangchareansak T., Sagma C. und Ngernmeesri P., Thitithanyanont A. und Lieberzeit P. Self-assembled glucosamine monolayers as biomimetic receptors for detecting WGA lectin and influenza virus with a quartz crystal microbalance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013;405(20):6471-6478
32. Tomasiak, M., Stelmach, H. und Bodzenta-Lukaszyk, A., et al. Involvement of Na⁺/H⁺ exchanger in desmopressin-induced platelet procoagulant response. *Acta Biochimica Polonica*. 2004;51(3):773-788
33. Vaughan J., Dempsey G., Sun E. und Zhuang X. Phosphine-Quenching of Cyanine Dyes as a Versatile Tool for Fluorescence Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(4):1197-1200
34. <http://www.progen.de/media/downloads/datasheets/61431.pdf>. (14.02.2015)
35. Mamdouh Z. Giocondi M. und Laprade R. Temperature dependence of endocytosis in renal epithelial cells in culture. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996;1282:171-173
36. www.flexcellint.com. (06. 02 2015)
37. Lehr C. Cell Culture Models of Biological Barriers: in vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery. s.l. : Taylor & Francis , 2004.
38. Simons K. und Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997;387(6633):569-572

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt durch die Harnblasenwand	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der apikalen Membran der Deckzellen.	5
Abbildung 3: Stadien des Harnblasenkarzinoms.....	7
Abbildung 4: Verschiedene Formen der Pinozytose	11
Abbildung 5: Unterschiedliche Modelle des Endo- und Exozytosezyklus bei Dehnung der Urothelzellen.....	12
Abbildung 6: Modell der ATP-regulierten Endo- und Exozytose.....	13
Abbildung 7: HT BioFlex®-Kulturplatten	17
Abbildung 8: Verdünnungsreihe einer durch H33342-gefärbten 5637 Zellesuspension	20
Abbildung 9: Dehnung durch kugelförmige Dehnungskörper	27
Abbildung 10: Flexcell FX-5000 Tension System.....	28
Abbildung 11: Dichtungssystem FX-5000	30
Abbildung 12: Schematische Darstellung der äquibiaxialen Dehnung durch Loading Posts. 31	
Abbildung 13: Zusammenhang zwischen der am FX-5000 einstellbaren nominellen Elongation [%] und der berechneten Oberflächenvergrößerung eines Kugelsegments	32
Abbildung 14: Dehnungsprofil der Dehnung durch FX-5000	33
Abbildung 15: Versuchsaufbau zur Kontrolle der Intaktheit des Monolayers nach Dehnung. 36	
Abbildung 16: Gegenüberstellung der H33342-Signal-Abnahme durch unterschiedlich behandelte Zellen.....	36
Abbildung 17: Versuchsaufbau zur Kontrolle der Intaktheit des Monolayers nach zweifacher Dehnung durch Kugeln ($\varnothing = 1\text{cm}$).....	37
Abbildung 18: Einfluss von Dehnung durch Kugeln auf die H33342-Signale	37
Abbildung 19: Evaluierung der Bindung von WGA an 5637 Dehnung durch kugelförmige Dehnungskörper ($\varnothing = 1\text{ cm}$) bei 4 °C	39
Abbildung 20: Evaluierung der Bindung von WGA an 5637 unter Dehnung durch kugelförmige Dehnungskörper ($\varnothing=1\text{ cm}$) bei 37 °C	40
Abbildung 21: Konzentrationsabhängigkeit der dehnungsinduzierten Internalisation von WGA	42
Abbildung 22: Evaluierung der Bindung von WGA an 5637 unter Dehnung mit FX-5000	42
Abbildung 23: Mikroskopische Bilder von gedehnten und ungedehnten 5637-Zellen.....	43
Abbildung 24 Rückstellen des Fluoreszenzsignals Fluorescein-markierter Lektine durch Monensin	43
Abbildung 25: Versuchsaufbau zur Evaluierung des Lektinverlusts durch mehrfache Dehnung durch Kugeln	44

Abbildung 26: Versuchsaufbau zur Evaluierung der Robustheit der Urothelzellen gegenüber Endozytoseinhibitoren	46
Abbildung 27: Evaluierung der Robustheit der Urothelzellen gegenüber Endozytoseinhibitoren	47
Abbildung 28: Versuchsaufbau der Internalisationsstudien nach 120-minütiger Vorinkubation mit Endozytoseinhibitoren	48
Abbildung 29: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MßCD und EIPA an 5637 (30 Minuten).....	49
Abbildung 30: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MßCD und EIPA an SV-HUC (30 Minuten).....	50
Abbildung 31: Mikroskopische Darstellung des Zytoskeletts von 5637 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Endozytoseinhibitoren	51
Abbildung 32: Mikroskopische Darstellung von SV-HUC Zellen nach 120-minütiger Vorinkubation mit Endozytoseinhibitoren und DAPI bei 37 °C.....	52
Abbildung 33: Versuchsaufbau der Pulse-Chase-Internalisationsstudien mit Endozytoseinhibitoren	53
Abbildung 34: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MßCD und EIPA an 5637 (Pulse-Chase, 30 Minuten).....	54
Abbildung 35: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MßCD und EIPA an SV-HUC (Pulse-Chase, 30 Minuten).....	55
Abbildung 36: Versuchsablauf zur Evaluierung der Exozytose durch die Inhibitoren DYN100, BFA, CPZ, NOCO, MßCD und EIPA (E-Hemmer)	56
Abbildung 37: Exozytoseinhibition durch DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MßCD und EIPA..	57
Abbildung 38: Skizze der Baseplate	67
Abbildung 39: Bauplan der Loading Plate	68
Abbildung 40: Bauplan der Dichtung 1	68
Abbildung 41: Bauplan der Dichtung 2	69
Abbildung 42: Bauplan des Dichtungssystems	69
Abbildung 43: Bauplan des Dehnungssystems durch kugelförmige Dehnungskörper.....	70
Abbildung 44: Schematische Darstellung eines gedehnten Wells durch FX-5000 (links) und durch kugelförmige Dehnungskörper (rechts).	71
Abbildung 45: Eichkurve zur Berechnung von h aus V_{KK}	72
Abbildung 46: Gegenseitige Beeinflussung von Fluorescein und Alexa-Fluor-Farbstoffen ...	75
Abbildung 47: Kontrolle von fWGA (25 pmol/ml) im Überstand durch kugelförmige Dehnungskörper gedehnter 5637-Zellen	77

Abbildung 48: Kontrolle von fLektinen im Überstand durch FX-5000 gedehnter 5637-Zellen im Vergleich mit fLektinen im Überstand ungedehnter Zellen.....	78
Abbildung 49: Evaluierung der reversiblen Fluoreszenzlöschung durch TCEP.	79
Abbildung 50: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)- 15 Minuten.	81
Abbildung 51: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)- 45 Minuten	81
Abbildung 52: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)- 60 Minuten	82
Abbildung 53: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)– Pulse-Chase, 15 Minuten.....	82
Abbildung 54: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)– Pulse-Chase, 45 Minuten.....	83
Abbildung 55: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)– Pulse-Chase, 60 Minuten.....	83
Abbildung 56: Mikroskopische Bilder von 5637 Zellen nach Inkubation mit abWGA (12,50 pmol/ml) bei 4 °C.....	84
Abbildung 57: Mikroskopische Bilder von 5637 Zellen nach Inkubation mit abWGA (12,50 pmol/ml) bei 37 °C.....	85
Abbildung 58: Mikroskopische Bilder von SV-HUC Zellen nach Inkubation mit abWGA (12,50 pmol/ml) bei 4 °C.....	85
Abbildung 59: Mikroskopische Bilder von SV-HUC Zellen nach Inkubation mit abWGA (12,50 pmol/ml) bei 37 °C.....	86

ANHANG A

A1. Skizze der Baseplate und Baupläne des Dichtungssystems

Anhand dieses Bauplans wurde ein Dichtungssystem für das FX-5000-System entworfen (siehe 3.5.3), um die HT-Bioflex®-Kulturplatten in Kombination mit der BioFlex® Baseplate verwenden zu können.

Schnitt A-A:

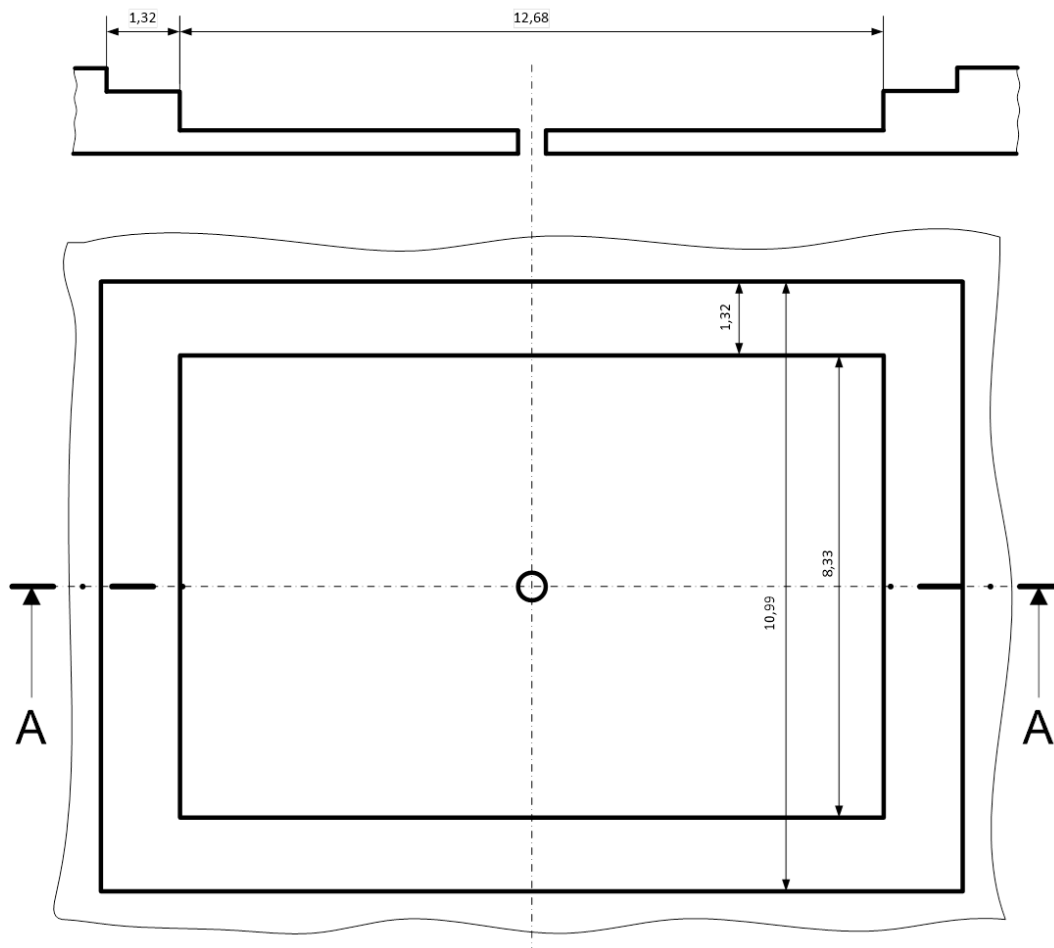


Abbildung 38: Skizze der Baseplate

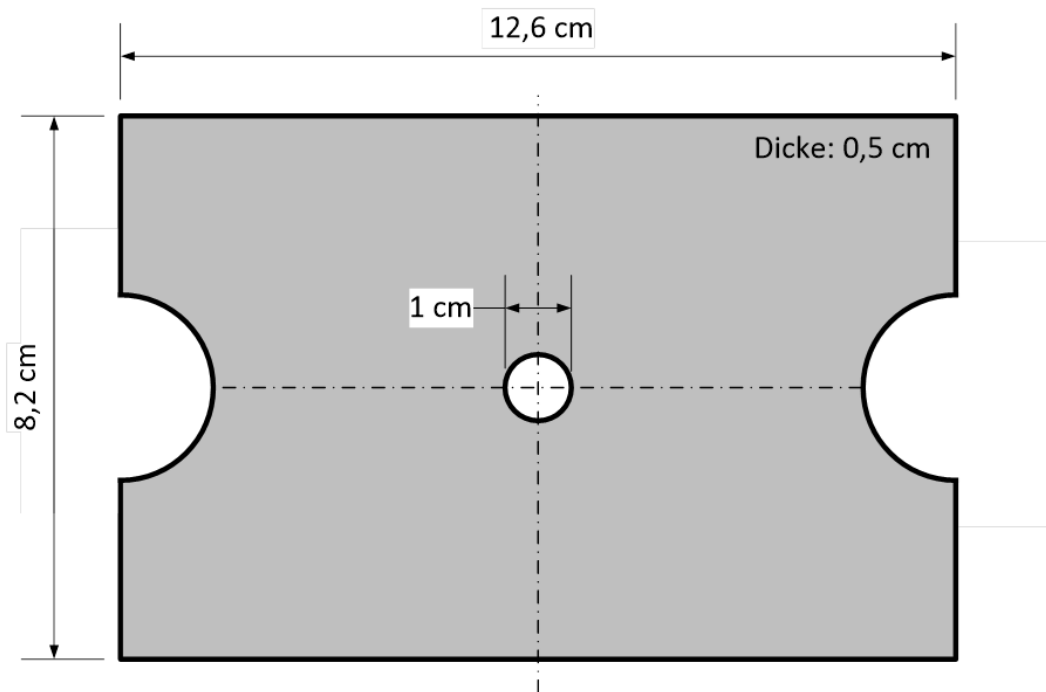


Abbildung 39: Bauplan der Loading Plate

Schnitt B-B:

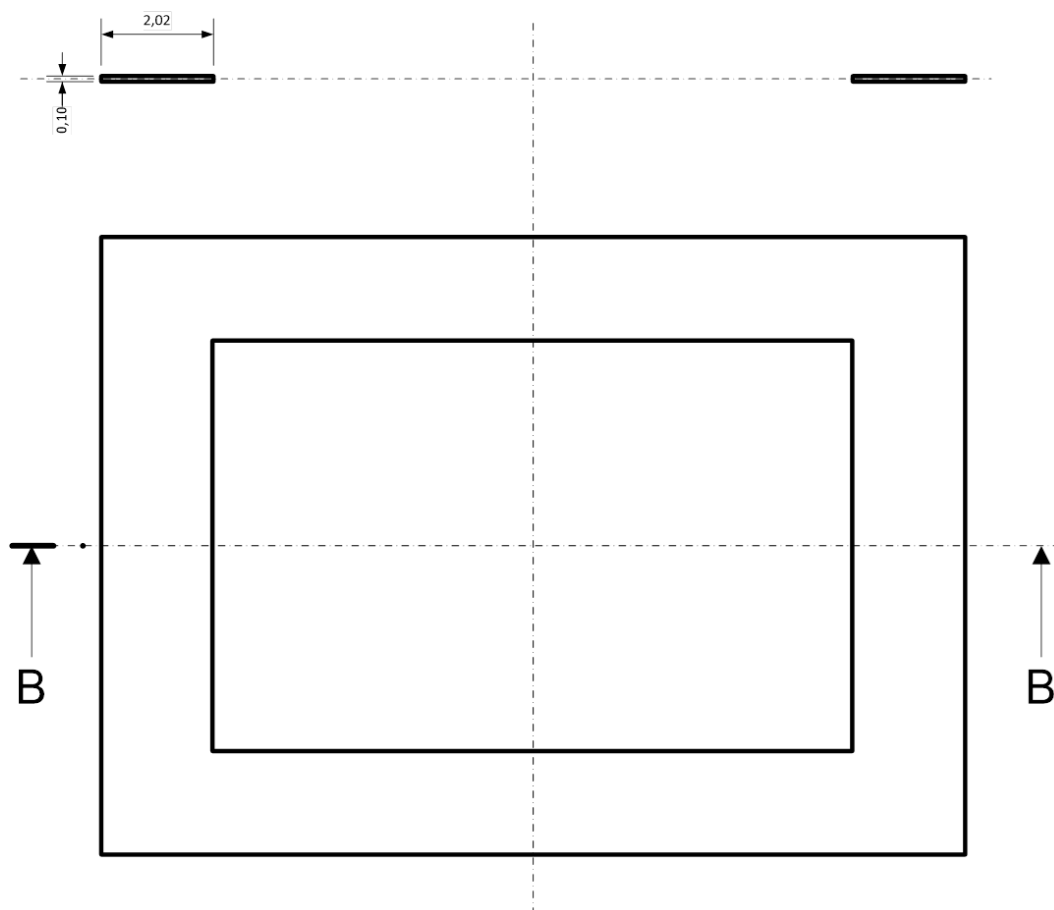


Abbildung 40: Bauplan der Dichtung 1

Schnitt C-C:

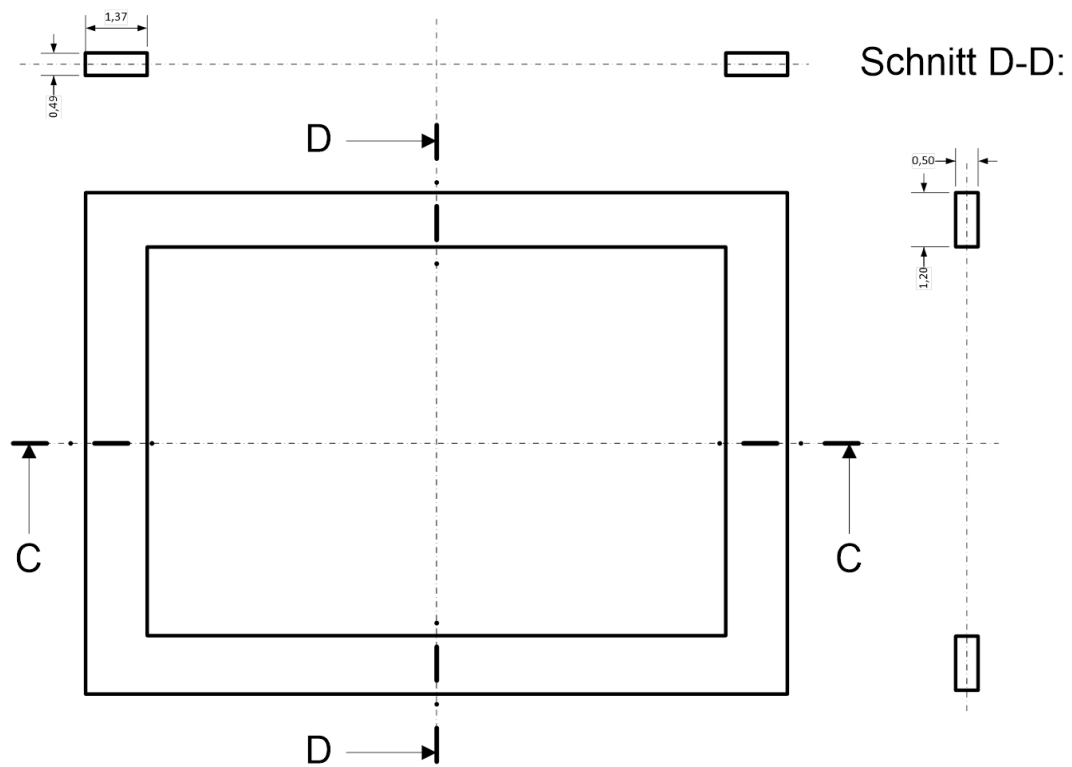


Abbildung 41: Bauplan der Dichtung 2

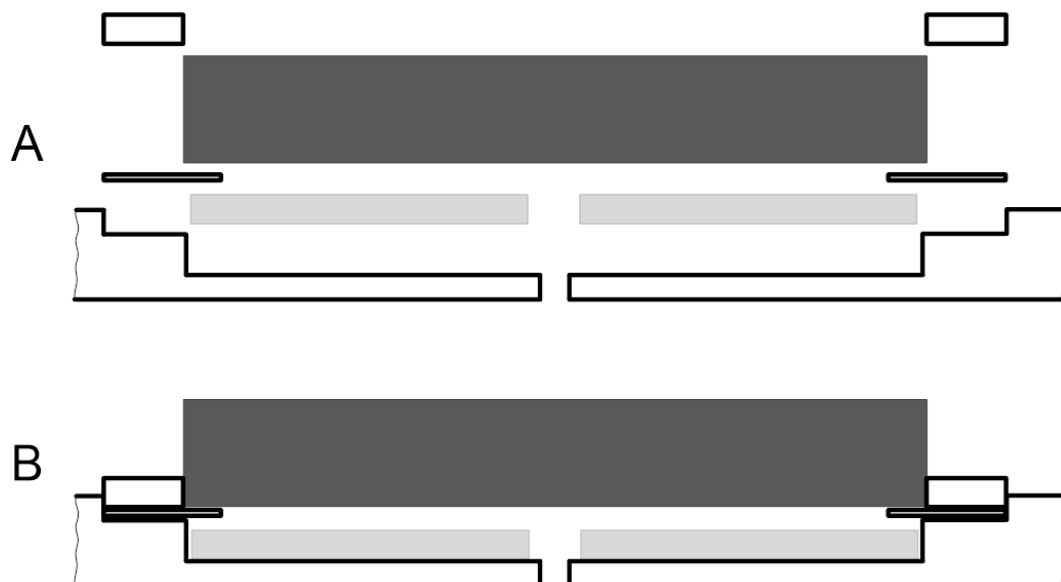


Abbildung 42: Bauplan des Dichtungssystems

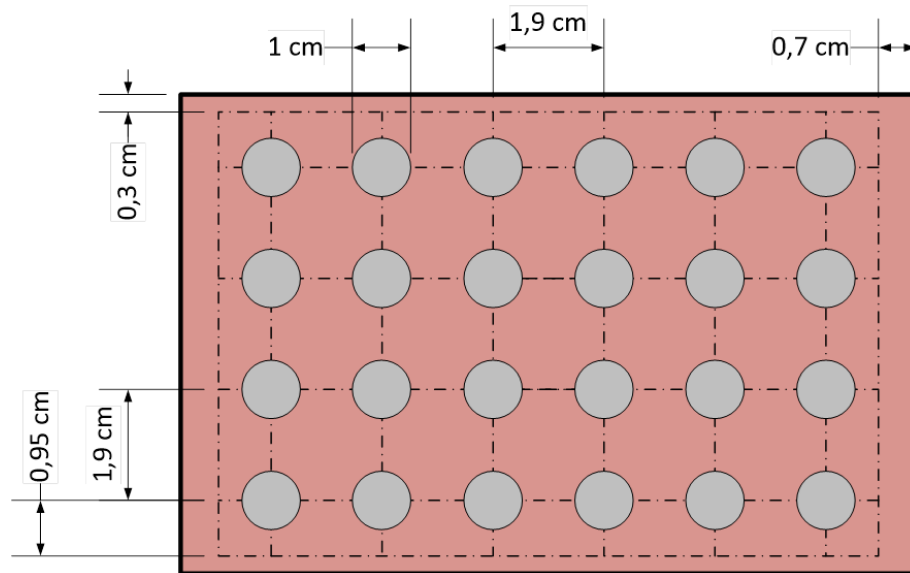


Abbildung 43: Bauplan des Dehnungssystems durch kugelförmige Dehnungskörper.

A2. Berechnung der prozentuellen Flächendehnung

Zur Berechnung der Oberflächenvergrößerung der elastischen Silikonmembran wurde der Flüssigkeitsstand eines Milliliters nach Dehnung (3,4 und 6 % Elongation) gemessen (h_1) und daraus die Oberfläche der Membran unter Annahme einer Kugelkalotte berechnet.

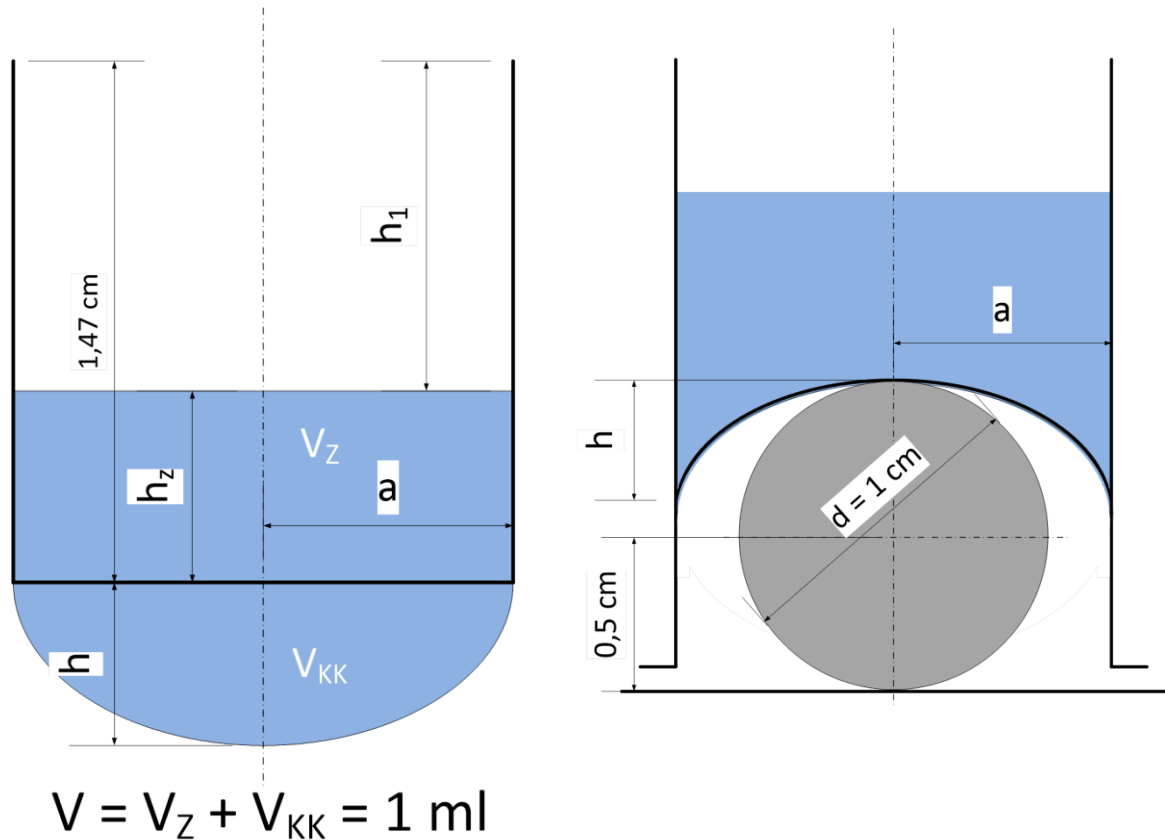


Abbildung 44: Schematische Darstellung eines gedehnten Wells durch FX-5000 (links) und durch kugelförmige Dehnungskörper (rechts).

Da die Tiefe eines leeren Wells 1,47 cm beträgt, konnte so die Höhe des Zylinders (h_z) berechnet werden.

$$h_z = 1,47 - h_1$$

Mithilfe von h_z und a ($= \sqrt[3]{1,56}$) wurde das Volumen des Zylinders und der Kugelkalotte berechnet.

$$V_Z = \pi a^2 h_z$$

$$V_{KK} = 1 \text{ ml} - V_Z$$

Zur Berechnung der Höhe der Kugelkalotte (h) aus dem Volumen wurde eine Eichkurve erstellt (Abbildung 45) und anschließend wurde die Mantelfläche der Kugelkalotte berechnet.

$$V_{KK} = \frac{h^2 \pi}{3} (3r - h)$$

$$h = -0,5104V_{KK}^2 + 1,3315V_{KK}$$

$$M_{KK} = \pi(\alpha^2 + h^2)$$

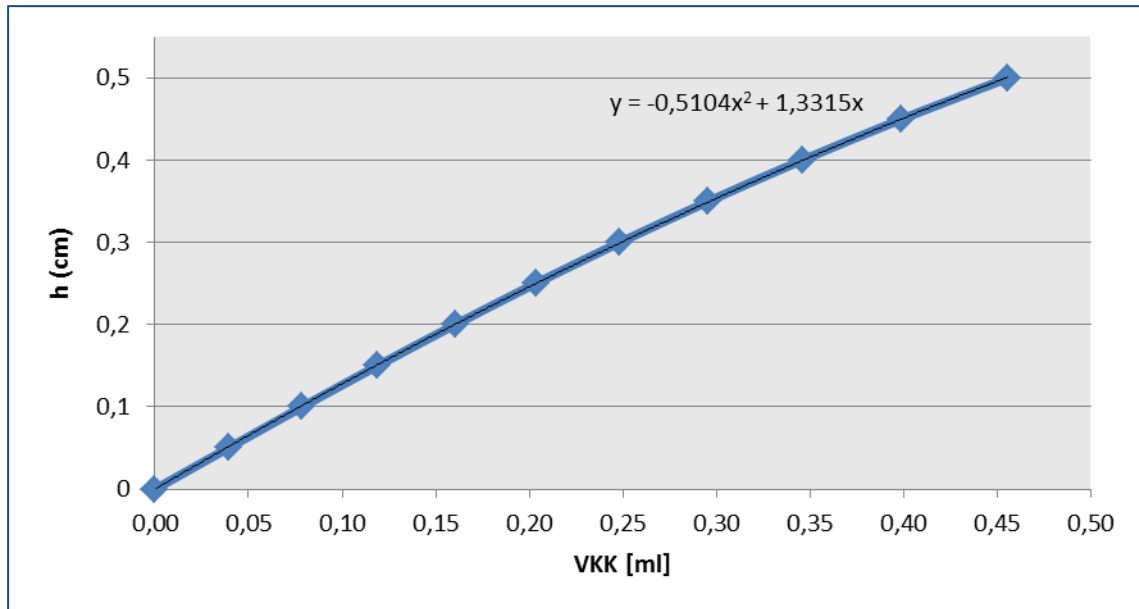


Abbildung 45: Eichkurve zur Berechnung von h aus V_{KK}

Mithilfe der oben genannten Formeln, wurde die Vergrößerung der Mantelfläche (MF) der elastischen Silikonmembran durch Dehnung (FX-5000) bei verschiedenen Elongationen (E) berechnet.

Tabelle 9: Berechnung der Oberflächenvergrößerung durch FX-5000 ($V=1$ ml) bei verschiedenen Elongationen und bei 4 % Elongation mit Loading Post.

E [%]	h_1 [cm]	h_z [cm]	V_z [ml]	V_{KK} [ml]	h [cm]	MF [cm ²]	OF-Vergrößerung [%]
0 %	0,82	0,65	1	-	-	1,560	
3 %	0,93	0,54	0,85	0,15	0,191	1,676	7,4
4 %	0,97	0,50	0,78	0,22	0,269	1,789	14,7
6 %	1,07	0,40	0,62	0,38	0,429	2,140	37,2
LP		0,65					

Tabelle 10: Übersicht der Abkürzungen und Werte zur Berechnung der Oberflächenvergrößerung durch Dehnung

Einheit	Abkürzung	Wert
Elongation [%]	E	-
Mantelfläche [cm ²]	MF	-
a [cm]		0,705 (FX-5000)
a [cm]		0,5 (Perlen)
Oberfläche ungedehnt [cm ²]		1,56
Volumen Kreissegment [ml]	V _{KS}	-
Volumen Zylinder [ml]	V _Z	-
Höhe Zylinder [cm]	h _Z	
Höhe der Kugelkalotte [cm]	h	-
Loading Post	LP	-

Auch die Vergrößerung der Silikonmembran durch Acrylperlen (siehe 3.5.1) wurde berechnet unter der Voraussetzung, dass die Perlen einen Durchmesser von 1 cm aufweisen.

Tabelle 11: Berechnung der Oberflächenvergrößerung durch kugelförmige Dehnungskörper

		Ø [cm]	a [cm]	h [cm]	MF [cm ²]	OF-Vergrößerung [%]
ungedehnt	0,5	-	0,5	0,5	0,79	
gedehnt	0,5	1	0,5	0,5	1,57	100,0 %

A3. Interaktion der Fluoreszenzsignale in Mischungen Alexa- und Fluorescein-gekoppelter Lektine

Da im Rahmen dieser Diplomarbeit mehrfach abWGA in einer Mischung mit fLektinen verwendet wurde, wurde der gegenseitige Einfluss dieser Fluorophore überprüft. 100 µl einer fWGA-Lösung wurden alleine oder in einer Mischung mit abWGA oder avWGA bzw. 100 µl von avWGA oder abWGA wurden alleine oder in einer Mischung mit fWGA fluorimetrisch analysiert. Alle Lektine wurden in einer Konzentration von 400 pmol/ml verwendet. Die Alexa-Farbstoffe (siehe 3.3.2) blieben unbeeinflusst von Fluorescein, jedoch war die RFI des Fluoresceinfarbstoffs in Kombination um 13 % (abWGA) bzw. um 14 % (avWGA) erniedrigt (siehe Abbildung 46). Da im Rahmen dieser Arbeit aber kein direkter, quantitativer Vergleich von Alexa-Fluor-gekoppelten mit Fluorescein-gekoppelten Lektinen in Mischung durchgeführt wurde, war dieser Effekt vernachlässigbar.

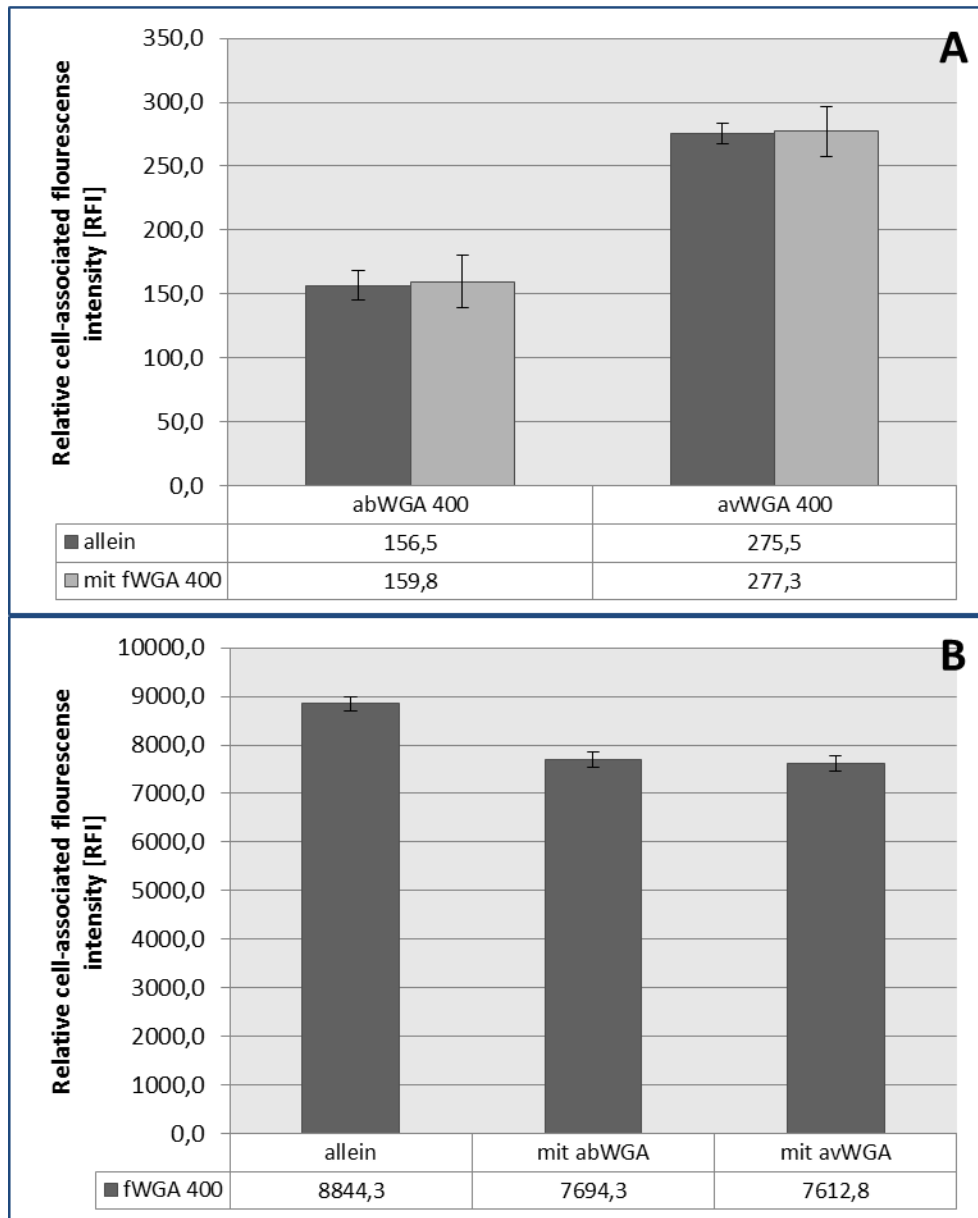


Abbildung 46: Gegenseitige Beeinflussung von Fluorescein und Alexa-Fluor-Farbstoffen. fWGA, abWGA und avWGA (je 400 pmol/ml, Gain 80, n=3) wurden in Mischung bei 647/675 nm **(A)** bzw. bei 485/525 nm **(B)** gemessen.

A4. Kontrolle der Überstände nach Dehnung durch kugelförmige Dehnungskörper

Während der Dehnung von 5637-Zellen durch kugelförmige Dehnungskörper wie in 3.5.1 beschrieben, wurden zur Kontrolle einer möglichen Exozytose nach der Dehnung bzw. während eines erneuten Dehnungszyklus alle 15 Minuten 100 µl des Überstands entnommen, fluorimetrisch analysiert und rückpipettiert. Um die Fluoreszenzintensitäten der Überstände trotz der erhöhten Werte der zellassoziierten Fluoreszenzsignale untereinander vergleichen zu können, wurden sie auf diese normiert (hier als % FI) bezeichnet. Es zeigte sich, dass während der ersten Entspannungsphase bei 37 °C nach einem Dehnungszyklus sogar die Fluoreszenzsignale aller ungedehnten Zellen höher lag als die der gedehnten (siehe Abbildung 47A). Während des zweiten Dehnungszyklus (siehe Abbildung 47B) fand sich im Überstand der gedehnten (U-G, G-G), sowie auch der zuvor gedehnten (G-U) mehr Lektin als im Überstand der durchwegs entspannten Zellen (U-U). Bei weiterer Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank (Abbildung 47C) befand sich nach 60 Minuten (Minute 240) gleichviel (G-U) oder weniger (G-G, U-G) Lektin im Überstand als zu Beginn (Minute 195), wodurch gezeigt wurde, dass bei 4 °C keine Exozytose stattfindet.

Die im Überstand gemessenen % FI-Werte geben die an den Zellen gemessenen Zustände nur teilweise wieder, sind aber auch nicht direkt quantitativ vergleichbar. Bei den FI-Werten der Zellen ändern sich die Unterschiede zwischen gedehnten und ungedehnten Zellen während des gesamten Versuchsablaufs kaum (siehe 4.1.4).

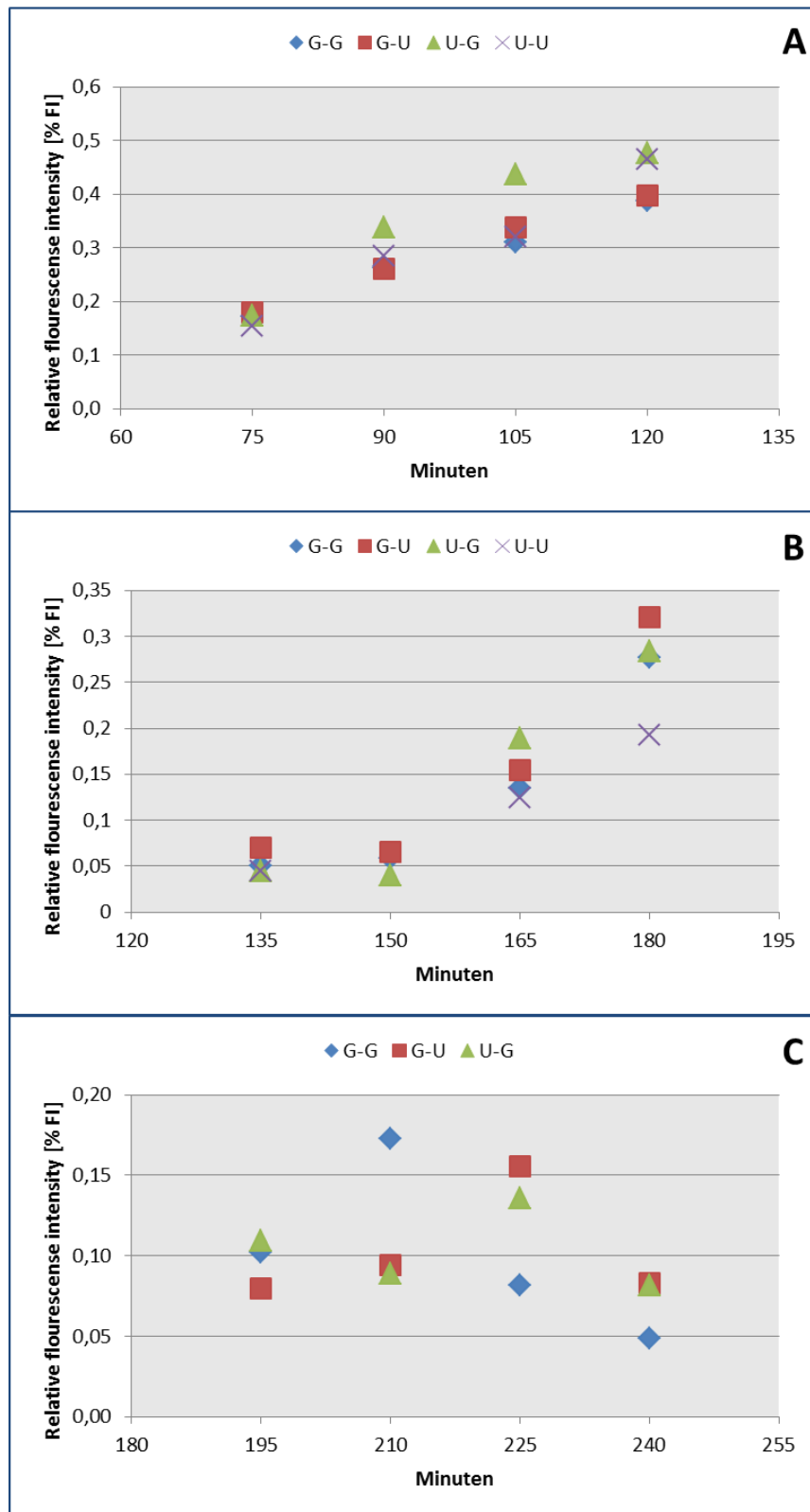


Abbildung 47: Kontrolle von fWGA (25 pmol/ml) im Überstand durch kugelförmige Dehnungskörper gedehnter 5637-Zellen im Vergleich mit fWGA im Überstand ungedehnter Zellen. Nach 60-minütiger Dehnung bei 37 °C wurden die Zellen dreimal gewaschen und für 60 Minuten ohne Dehnung bei 37 °C inkubiert **(A)**. Nach weiterem, dreimaligem Waschen, wurden die Zellen erneut für 60 Minuten bei 37 °C gedehnt **(B)** und nach weiterem, dreimaligem Waschen 60 Minuten bei 4 °C inkubiert **(C)** (FI 429 ± 32 bei G100 und 485/525 nm, $n=3$). % FI bezeichnet hier eine Hilfseinheit, die sich auf die Werte der entsprechenden, relativen zellassozierten Fluoreszenzintensitäten bezieht.

Auch nach Dehnung durch FX-5000 wurden die Überstände nach Dehnung der 5637-Zellen (siehe 3.5.4), dreimaligem Waschen (siehe 3.1.7) und anschließender Inkubation für 15 Minuten bei 4 °C fluorimetrisch analysiert. Um eine gewisse Vergleichbarkeit untereinander zu gewährleisten, wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wieder auf die zuvor gemessenen zellassoziierten Fluoreszenzintensitäten bezogen. Diese Einheiten werden auch hier als % FI bezeichnet, sind aber durch die Verwendung eines anderen Plattenlesegeräts (Viktor) nicht mit den % FI in Abbildung 47 vergleichbar.

Die Analyse ergab hier, dass durchwegs im Überstand der ungedehnten Zellen mehr Lektin detektierbar war, obwohl die RFI der Zellen nach Dehnung um 10 % (fWGA, fLCA) bzw. um 20 % (fPNA) erhöht waren.

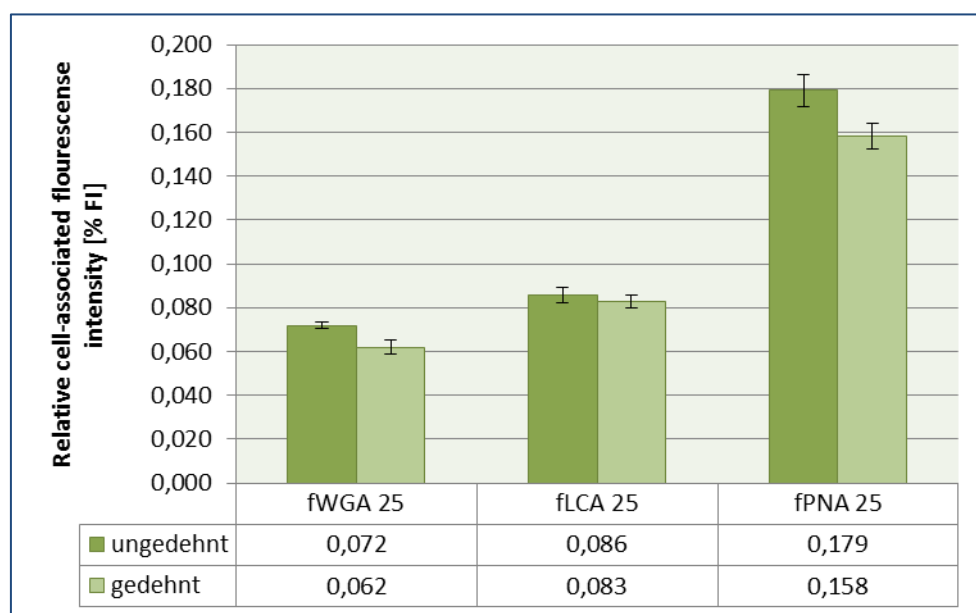


Abbildung 48: Kontrolle von fLektinen im Überstand durch FX-5000 gedehnter 5637-Zellen im Vergleich mit fLektinen im Überstand ungedehnter Zellen. Nach Dehnung (15 Minuten bei 37 °C) und anschließender Inkubation für 15 Minuten bei 4 °C wurden je 100 µl des Überstands von mit fWGA, fLCA und fPNA (je 25 pmol/ml) inkubierten Zellen analysiert (FI 625 ± 49 bei G100 und 485/525 nm, n=9). % FI bezeichnet hier eine Hilfseinheit, die sich auf die Werte der entsprechenden, relativen zellassoziierten Fluoreszenzintensitäten bezieht.

Anhang B

B1. Evaluierung des Einflusses von TCEP auf die Fluoreszenzintensitäten

TCEP wurde, wie im Abschnitt 3.3.5 beschrieben nach Durchführen eines Pulse-Chase Versuchs (siehe 3.4.3, 15, 30 und 45 Minuten 37 °C, 60 Minuten 4°C) verwendet, um die RFI zellassoziierter Lektine von der RFI Internalisierter Lektinen zu unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass die RFI von abWGA nach Behandlung mit TCEP deutlich sinkt, durch dreimaliges Waschen (siehe 3.1.7) und damit verbundenem Entfernen von TCEP aber wieder auf 76 % ($\pm 6,8$ %) rückgestellt werden konnte. Die Zunahme der RFI nach TCEP durch länger andauernde Inkubation (siehe Abbildung 49) deutet darauf hin, dass TCEP weitgehend nur die Fluoreszenz oberflächlich gebundener Lektine löscht, während die Signale von internalisiertem abWGA weiterhin detektierbar sind.

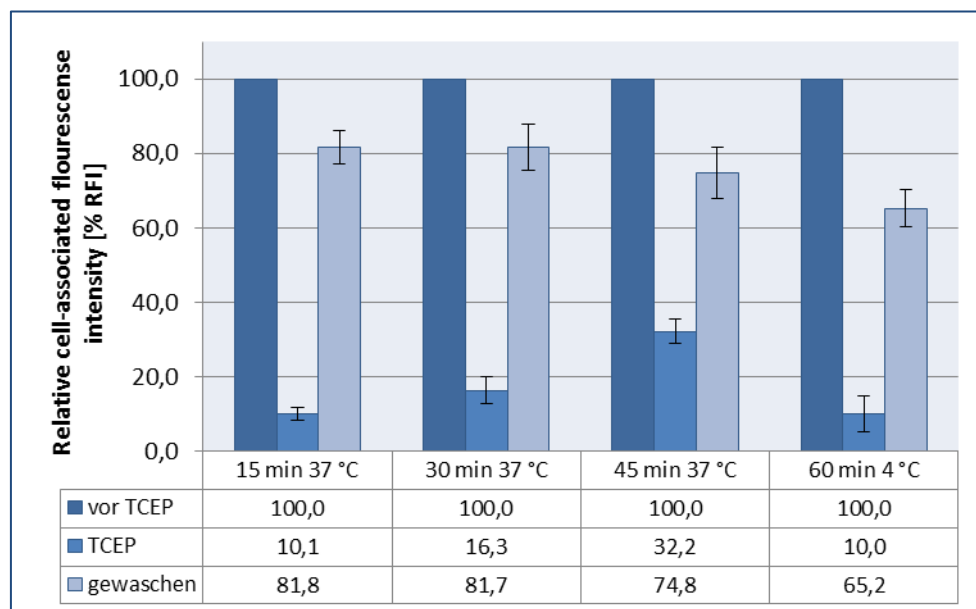


Abbildung 49: Evaluierung der reversiblen Fluoreszenzlöschung durch TCEP. Nach 15, 30 und 45 Minuten Lektininkubation (abWGA 12,50 pmol/ml) der 5637 Zellen bei 37 °C wurden die Zellen dreimal gewaschen, mit TCEP behandelt und anschließend wieder dreimal gewaschen. Alle Werte wurden auf die jeweiligen 100-%-Werte nach Lektininkubation (vor TCEP) bezogen: (30 Minuten RFI 71,8 abWGA G140).

B2. Internalisationsstudien mit Endozytoseinhibitoren (15, 45 und 60 Minuten)

In den Abschnitten 4.2.2 und 4.2.3 wurde der Einfluss der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, M β CD und EIPA auf die Internalisation von abWGA (12,50 pmol/ml) und von fLCA (6,25 pmol/ml) bei einer Inkubationsdauer von 30 Minuten beschrieben. Die Ergebnisse bei Inkubationszeiten von 15 und 45 Minuten bei 37 °C, sowie von 60 Minuten bei 4 °C nach vorheriger zweistündiger Vorinkubation (siehe 3.4.2) mit den Inhibitoren bzw. nach vorheriger Beladung mit Lektinen (siehe 3.4.3) werden hier kurz zusammengefasst.

Nach 120-minütiger Vorinkubation mit den Inhibitoren zeigte bei anschließender 15-, 45- wie auch bei 30-minütiger Lektininkubation (siehe 4.2.2) M β CD schwache inhibitorische Aktivität auf abWGA und fLCA in 5637- und SV-HUC Zellen (siehe Abbildung 50 und Abbildung 51). Dass auch bei 60-minütiger Inkubation bei 4 °C bei M β CD die RFI am niedrigsten ist (siehe Abbildung 52), könnte einerseits darauf hindeuten, dass auch die Zelladhäsion durch den Zusatz von Endozytoseinhibitoren vermindert wird, andererseits könnte eine durch diese Inhibitoren verursachte Zellschädigung der Grund sein. Dass M β CD eine Verminderung des H33342-Signals zur Folge hat, wurde schon in Abschnitt 4.2.1 erläutert. Auch der Pulse-Chase Versuch bestätigte, dass eine genauere Evaluierung des Endozytoseinhibitors M β CD sinnvoll sein könnte (siehe Abbildung 53 bis 55).

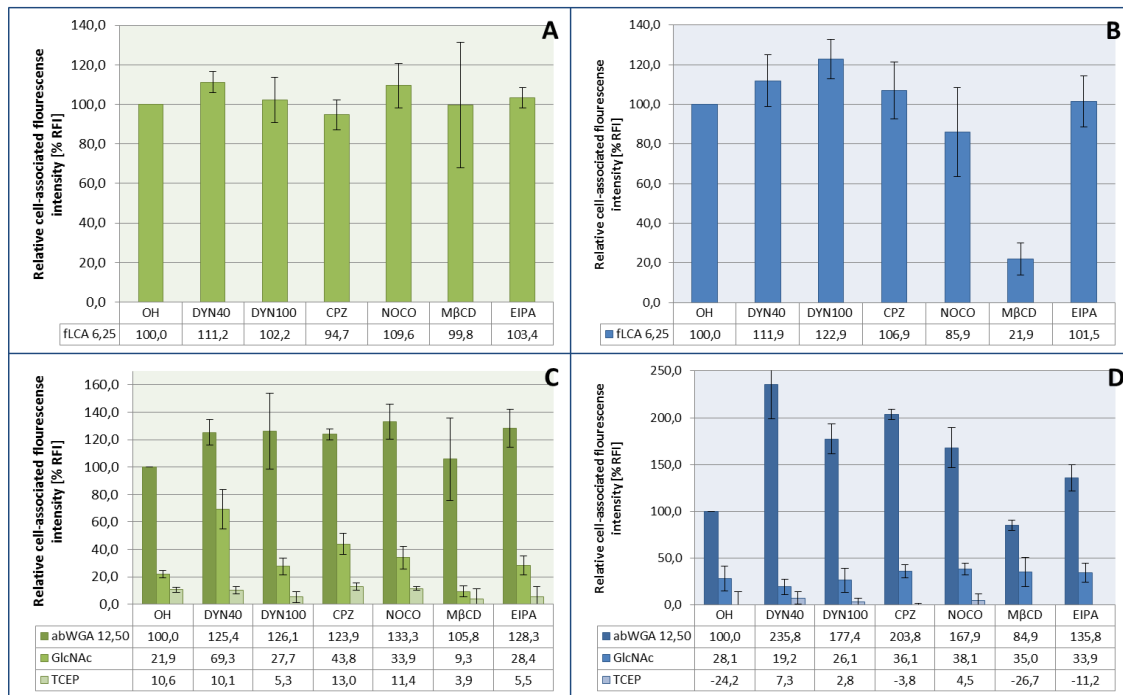


Abbildung 50: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)- 15 Minuten. Nach 120 Minuten Vorinkubation mit den Inhibitoren bei 37 °C wurde 15 Minuten lang mit fLCA 6,25 pmol/ml (A, B) bzw. abWGA 12,50 pmol/ml (C, D) bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder mit GlcNAc oder mit TCEP behandelt. Alle Werte [% RFI] wurden auf die jeweiligen RFI-Werte nach Lektinininkubation (Messung 2) bezogen (RFI 5637: OH fLCA=774,7 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=73,7, Gain 140, n=3; RFI SV-HUC: OH fLCA=638,4 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=44,4, bei Gain 140, n=3).

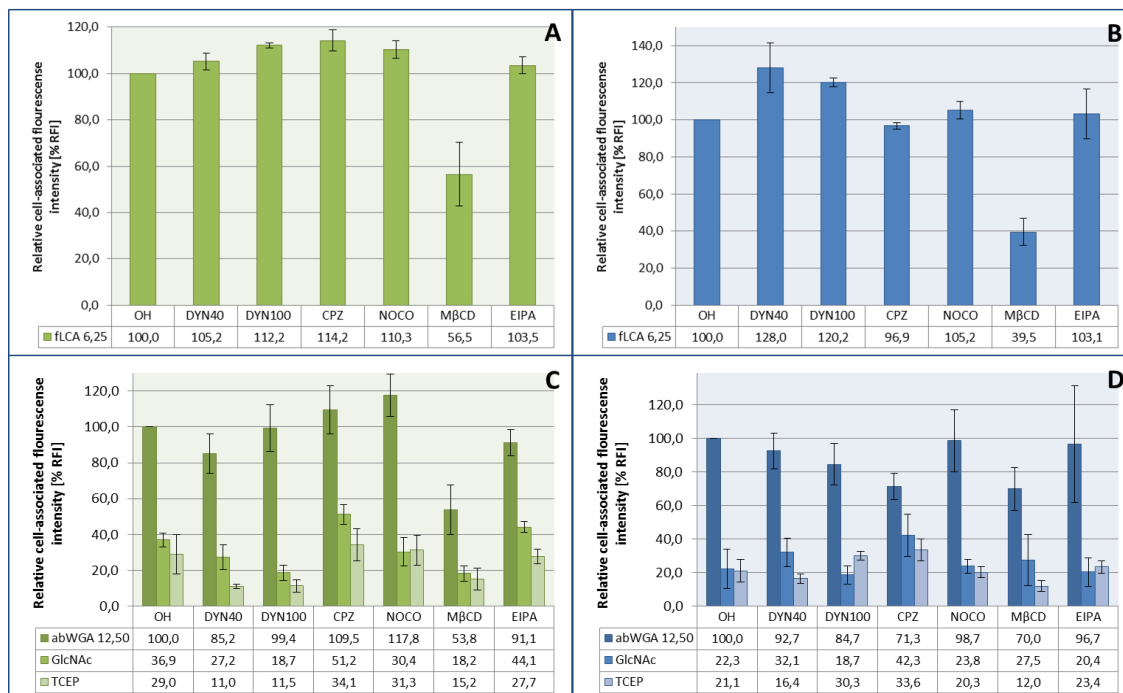


Abbildung 51: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)- 45 Minuten. Nach 120 Minuten Vorinkubation mit den Inhibitoren bei 37 °C wurde 45 Minuten lang mit fLCA 6,25 pmol/ml (A, B) bzw. abWGA 12,50 pmol/ml (C, D) bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder mit GlcNAc oder mit TCEP behandelt. Alle Werte [% RFI] wurden auf die jeweiligen RFI-Werte nach Lektinininkubation (Messung 2) bezogen (RFI 5637: OH fLCA=965,3 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=68,8, Gain 140, n=3; RFI SV-HUC: OH fLCA=807,0 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=58,3, bei Gain 140, n=3).

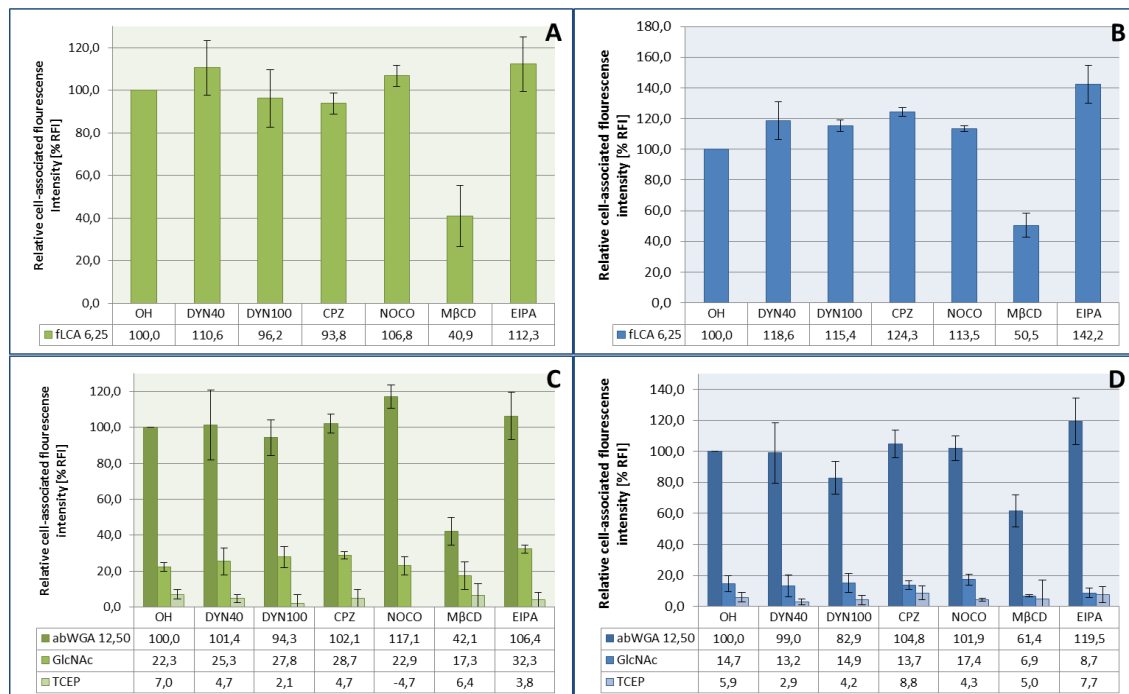


Abbildung 52: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)- 60 Minuten. Nach 120 Minuten Vorinkubation mit den Inhibitoren bei 37 °C wurde 60 Minuten lang mit fLCA 6,25 pmol/ml (A, B) bzw. abWGA 12,50 pmol/ml (C, D) bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder mit GlcNAc oder mit TCEP behandelt. Alle Werte [% RFI] wurden auf die jeweiligen RFI-Werte nach Lektininkubation (Messung 2) bezogen (RFI 5637: OH fLCA=767,4 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=72,4, bei Gain 140, n=3; RFI SV-HUC: OH fLCA=834,0 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=81,2, bei Gain 140, n=3)

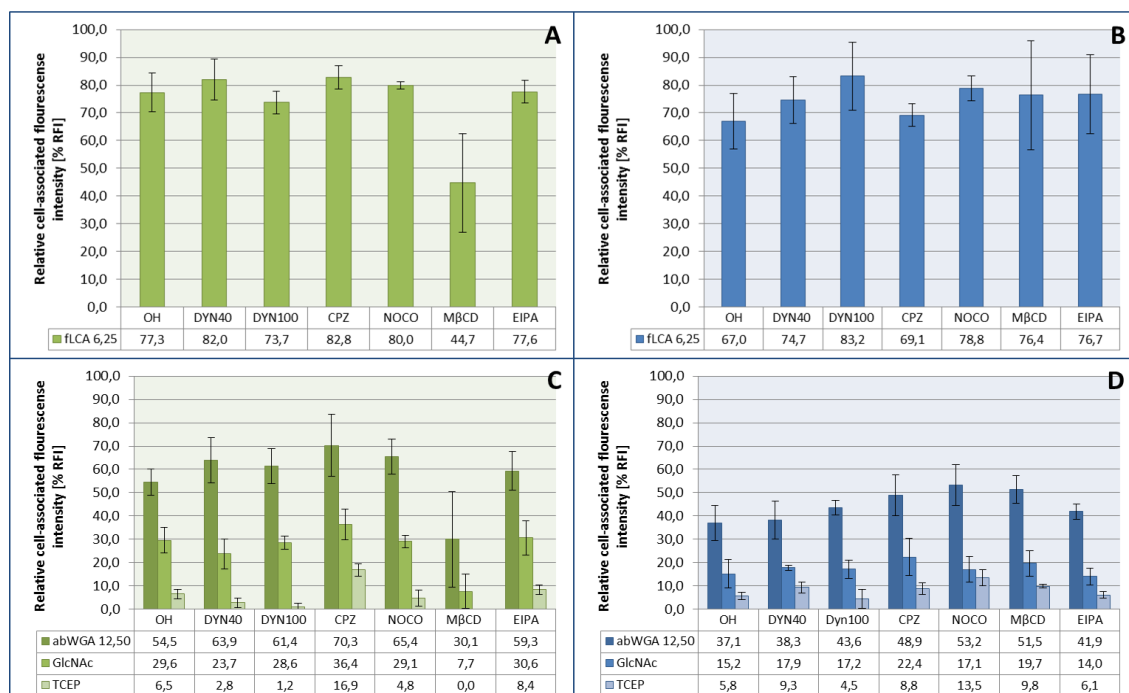


Abbildung 53: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)- Pulse-Chase, 15 Minuten. Nach 60 Minuten Lektinbeladung mit fLCA 6,25 pmol/ml (A, B) bzw. abWGA 12,50 pmol/ml (C, D) bei 4 °C wurde 15 Minuten lang mit den Inhibitoren bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder mit GlcNAc oder mit TCEP behandelt. Alle Werte [% RFI] wurden auf die jeweiligen RFI-Werte nach Lektininkubation (Messung 2) bezogen (RFI 5637: OH fLCA=871,6 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=87,8, bei Gain 140, n=3; RFI SV-HUC: OH fLCA=806,6 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=107,2, bei Gain 140, n=3).

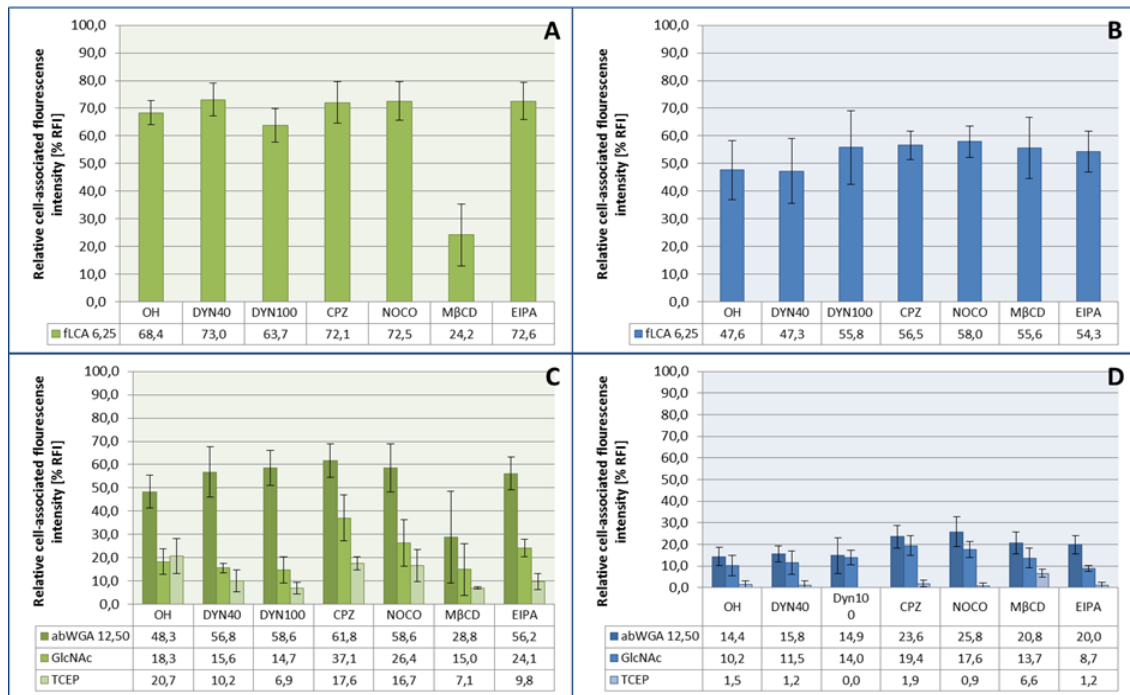


Abbildung 54: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)– Pulse-Chase, 45 Minuten. Nach 60 Minuten Lektinbeladung mit fLCA 6,25 pmol/ml (A, B) bzw. abWGA 12,50 pmol/ml (C, D) bei 4 °C wurde 45 Minuten lang mit den Inhibitoren bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder mit GlcNAc oder mit TCEP behandelt. Alle Werte [% RFI] wurden auf die jeweiligen RFI-Werte nach Lektininkubation (Messung 2) bezogen (RFI 5637: OH fLCA=822,0 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=78,8, bei Gain 140, n=3; RFI SV-HUC: OH fLCA=764,2 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=106,1, bei Gain 140, n=3).

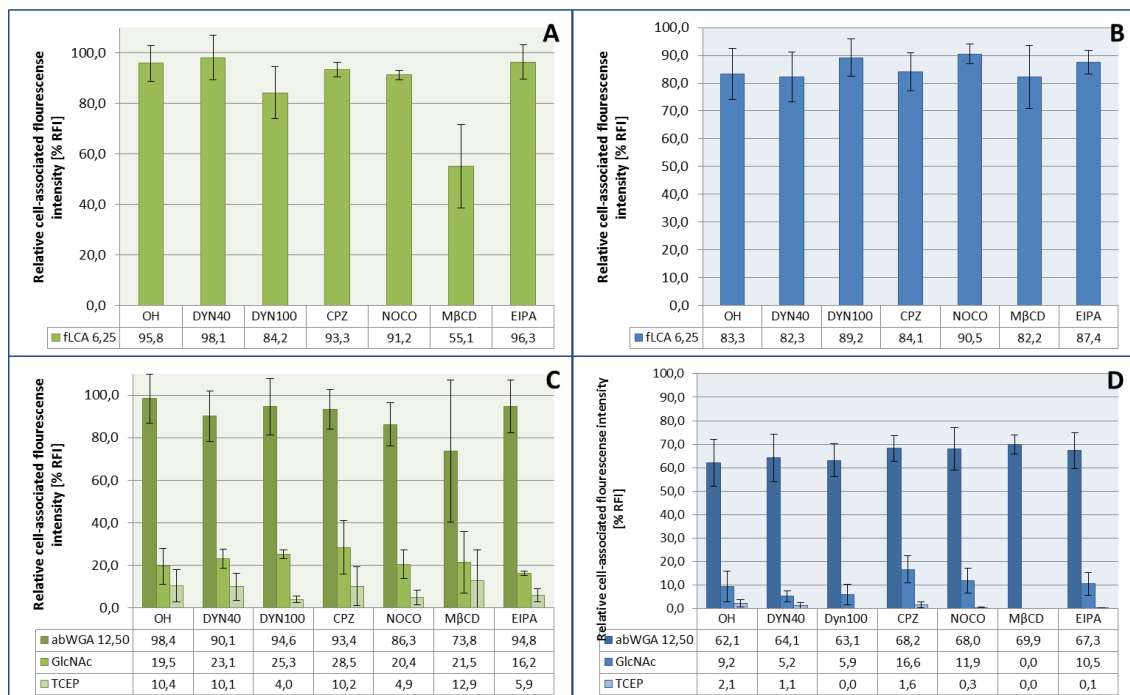


Abbildung 55: Vergleich der Endozytoseinhibitoren DYN40, DYN100, CPZ, NOCO, MβCD und EIPA an 5637 (A, C) und SV-HUC (B, D)– Pulse-Chase, 60 Minuten. Nach 60 Minuten Lektinbeladung mit fLCA 6,25 pmol/ml (A, B) bzw. abWGA 12,50 pmol/ml (C, D) bei 4 °C wurde 60 Minuten lang mit den Inhibitoren bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder mit GlcNAc oder mit TCEP behandelt. Alle Werte [% RFI] wurden auf die jeweiligen RFI-Werte nach Lektininkubation (Messung 2) bezogen (RFI 5637: OH fLCA=859,1 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=87,3, bei Gain 140, n=3; RFI SV-HUC: OH fLCA=673,7 bei Gain 140, n=3; RFI abWGA=68,3, bei Gain 140, n=3).

Anhang C

Ermittlung der optimalen Inkubationszeit

5637 und SV-HUC Zellen wurden zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit für je 105 Minuten bei 4 °C und bei 37 °C mit abWGA (12,50 pmol/ml) inkubiert und währenddessen immer wieder fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Es zeigte sich, dass bei beiden Zelllinien nach 30 bis 60 Minuten bereits annähernd die maximale Lektinbeladung bei 4 °C erreicht wurde (siehe Abbildung 57 und Abbildung 59). Auch bei 37 °C (Lektininternalisation) stieg das Fluoreszenzsignal nach 30-60 Minuten nicht mehr wesentlich an.

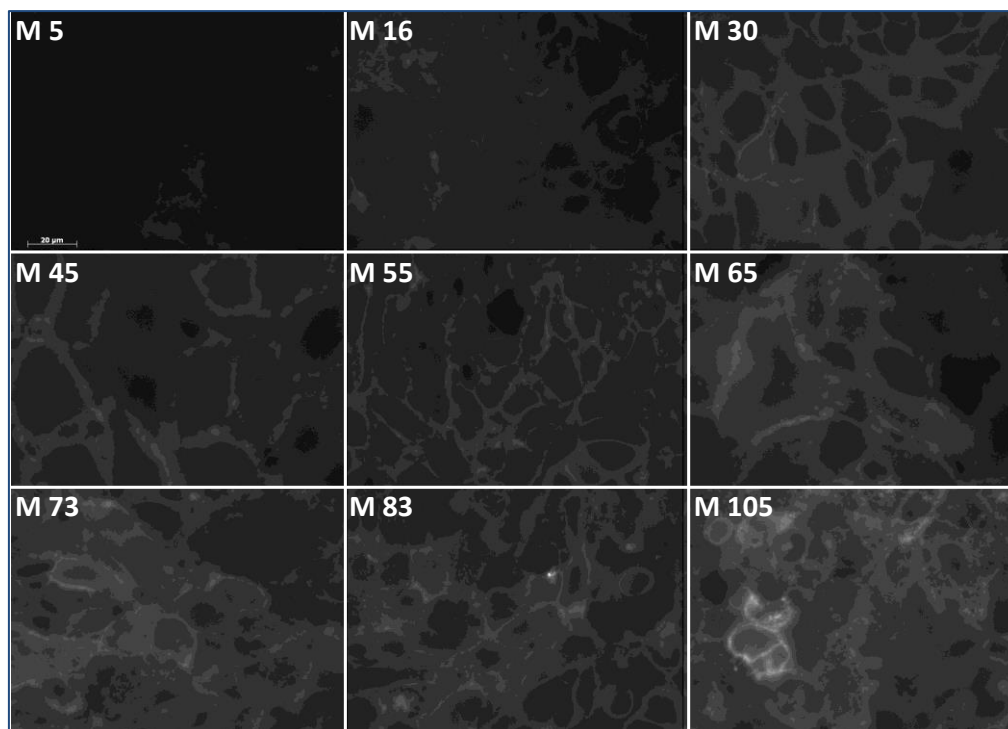


Abbildung 56: Mikroskopische Bilder von 5637 Zellen nach Inkubation mit abWGA (12,50 pmol/ml) bei 4 °C. Nach Minute (M) 5, 16, 30, 45, 55, 65, 73, 83 und 105 wurde jeweils mikroskopiert.

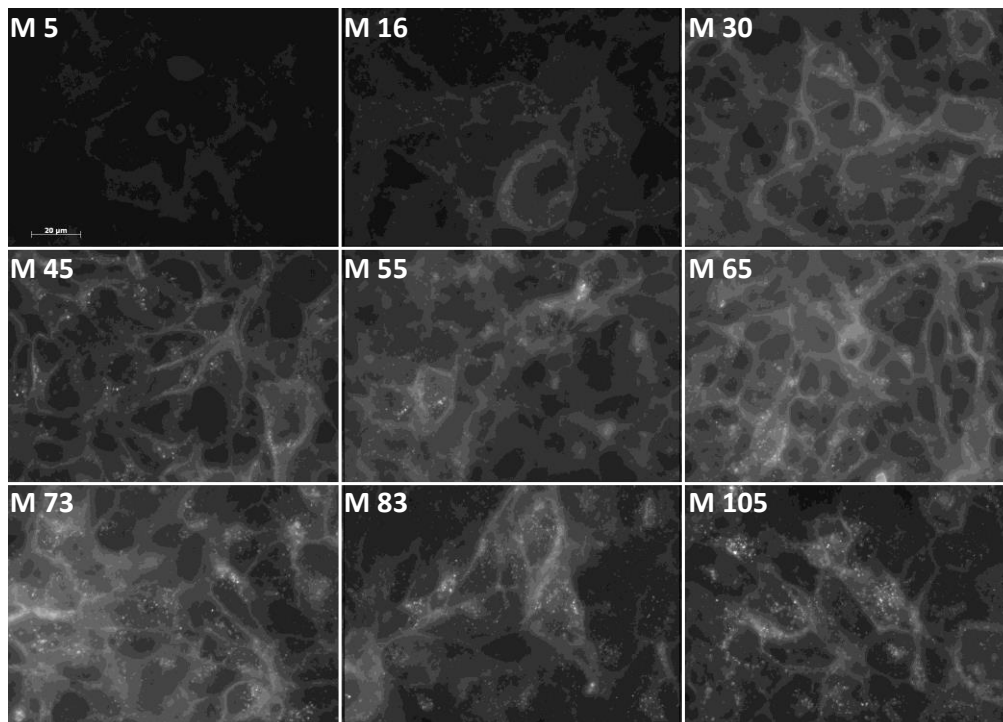


Abbildung 57: Mikroskopische Bilder von 5637 Zellen nach Inkubation mit abWGA (12,50 pmol/ml) bei 37 °C. Nach Minute (M) 5, 16, 30, 45, 55, 65, 73, 83 und 105 wurde jeweils mikroskopiert.

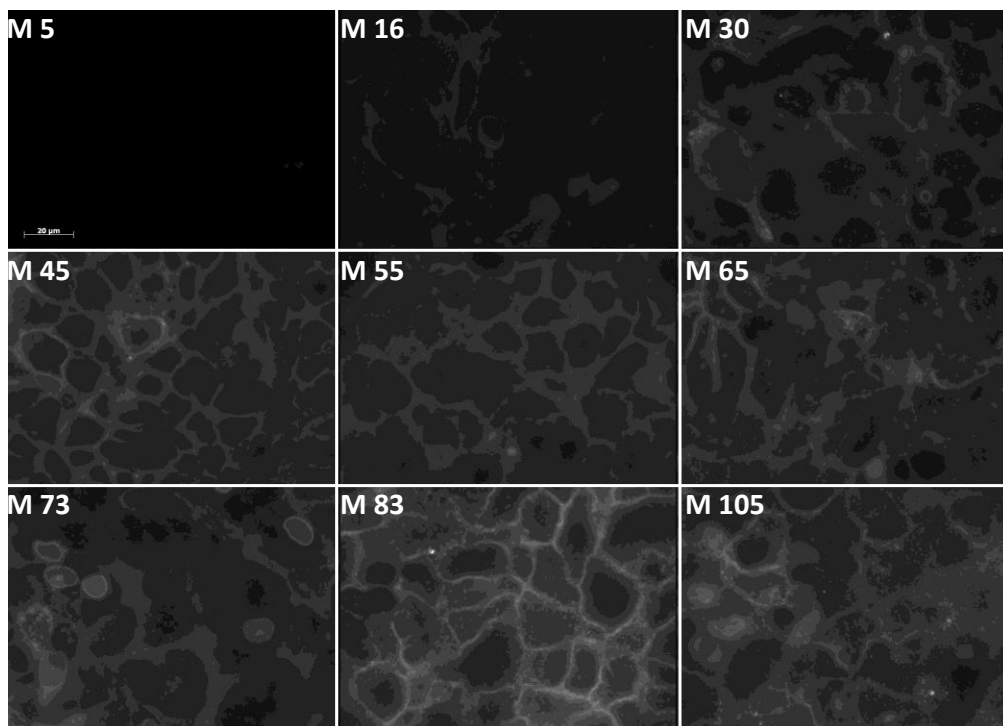


Abbildung 58: Mikroskopische Bilder von SV-HUC Zellen nach Inkubation mit abWGA (12,50 pmol/ml) bei 4 °C. Nach Minute (M) 5, 16, 30, 45, 55, 65, 73, 83 und 105 wurde jeweils mikroskopiert.

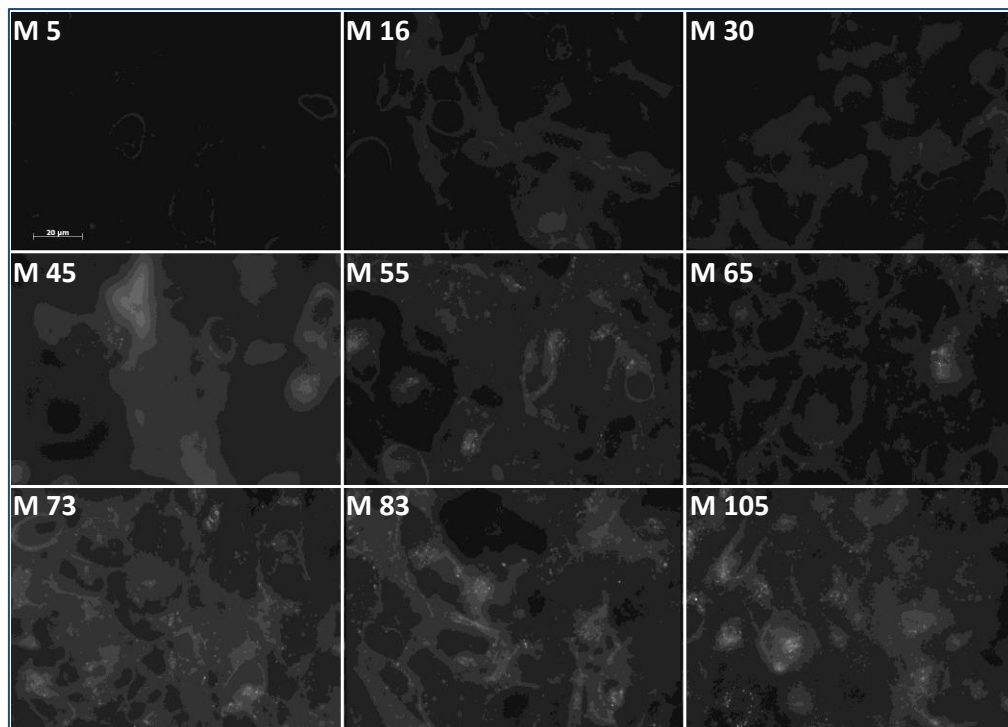


Abbildung 59: Mikroskopische Bilder von SV-HUC Zellen nach Inkubation mit abWGA (12,50 pmol/ml) bei 37 °C. Nach Minute (M) 5, 16, 30, 45, 55, 65, 73, 83 und 105 wurde jeweils mikroskopiert.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Informationen

Name: Nadine Skarek
Geschlecht: weiblich
Nationalität: Österreich

Berufserfahrung

März 2015-Juni 2015	Tutorin am Department für pharmazeutische Chemie, Universität Wien: Klinische Pharmazie und chemische Diagnostik, Arzneimittelanalytik und Wirkstoffentwicklung
Samstags, seit Juli 2014	Herz-Jesu-Apotheke, Kirchberg/Pielach
Samstags, Sept. 2012 – Nov. 2014	Apotheke zum Heiligen Geist, Ybbs
Oktober 2014 – Feb. 2015	Tutorin am Department für pharmazeutische Technologie, Universität Wien: Grundpraktikum aus pharmazeutischer Technologie, Anwendung von Zellkulturen in der Pharmazeutischen Technologie
September 2014	Apotheke zum Heiligen Geist, Ybbs
Juli 2013	Apotheke zum Heiligen Geist, Ybbs
August 2012	Apotheke zum Heiligen Geist, Ybbs
Juli 2011	Linden Apotheke Luks u Luks OHG, Persenbeug
Dez. 2010 – Nov. 2011	Enviro-chem GmbH, Wien
September 2010	Landschaftsapotheke Melk Mag Gradwohl KG, Melk
August 2010	Kwizda Pharmahandel GmbH, Wien

Ausbildung

Seit März 2009	Diplomstudium der Pharmazie, Universität Wien
Oktober 2008 – September 2009	Diplomstudium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien
September 2004 – Juni 2008	BORG St. Pölten, Musikalischer Zweig