

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE DER
NATURWISSENSCHAFTLICH-MATHEMATISCHEN GESAMTFAKULTÄT
DER
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT
HEIDELBERG

vorgelegt von
Apothekerin Verena Pohl
aus Braunschweig

Tag der mündlichen Prüfung:

Aufnahme von Albumin-Konjugaten in humane Tumor-Zelllinien

Gutachter: PD Dr. Heinz Schmeiser
Prof. Dr. Gert Fricker

Aus der Abteilung Präventive Onkologie
(Leitung Prof. Dr. Cornelia Ulrich)
am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg

Meinem Vater

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	3
3	Einleitung.....	5
3.1	Nanomedizin	5
3.2	Aktives und passives Targeting	7
3.2.1	Das Tumor-Microenvironment	8
3.2.2	Der EPR-Effekt	9
3.2.3	Aktives Targeting	10
3.3	Endozytose.....	11
3.3.1	Einteilung.....	11
3.3.2	Das endosomal-lysosomale System	14
3.3.3	Die Endozytose von Nanotherapeutika.....	15
3.3.4	Mechanismen	15
3.4	Humanes Serumalbumin	22
3.4.1	Bekannte Albumin-bindende Proteine und Rezeptoren	23
3.4.2	Humanes Serumalbumin in der Forschung und klinischen Anwendung	26
3.5	hnRNP A2/B1 und Calreticulin als Albumin-bindende Proteine	30
3.5.1	Heterogenous nuclear Ribonucleoprotein A2 /B1	30
3.5.2	Calreticulin.....	32
3.5.3	Die Arbeit von T. Fritzsche et al.	33
4	Zielsetzung.....	37
5	Material und Methoden.....	39
5.1	Material	39
5.1.1	Verbrauchsmaterial.....	39
5.1.2	Chemikalien.....	39
5.1.3	Antikörper und Streptavidin-Konjugate	39
5.1.4	Medien, Puffer und Lösungen	39
5.1.5	Zelllinien	41
5.2	Allgemeine Methoden und Zellkultur	42
5.2.1	Die laufende Kultivierung der Zelllinien	42
5.2.2	Herstellung von inaktiviertem FCS.....	43
5.2.3	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	43
5.2.4	Ablösen von adhärennten Zellen mit EDTA.....	43

5.2.5	Überprüfung der Zellvitalität und Messung der apoptotischen Zellpopulation	44
5.2.6	Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninic-Assay (BCA)	44
5.2.7	SDS-PAGE Gelelektrophorese	45
5.2.8	Western Blotting	45
5.2.9	Coomassie Färbung	46
5.2.10	MS-kompatible Silberfärbung	46
5.3	Methoden zum Nachweis von hnRNP A2/B1 und Calreticulin auf der Oberfläche von lebenden Zellen	46
5.3.1	Detektion membranständiger Proteine im FACS	46
5.3.2	Induktion der Apoptose durch Mitoxantron	47
5.4	Methoden zur Untersuchung der Clathrin-abhängigen Endozytose von HSA-Konjugaten	48
5.4.1	Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch hypertones Medium	49
5.4.2	Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch Kalium-Mangel	49
5.4.3	Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose mit Chlorpromazin	50
5.4.4	Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch siRNA gegen Clathrin-heavy-Chain (CHC)	51
5.4.5	Überprüfung der transienten Transfektion mit Western-Blotting	52
5.5	Methoden zur Identifizierung von HSA-bindenden Molekülen auf der Zellmembran von lebenden Zellen	53
5.5.1	Synthese von Biotin-Tf und Biotin-HSA	54
5.5.2	Synthese von Biotin-Tf-SDAD und Biotin-HSA-SDAD	55
5.5.3	Synthese von SBED-HSA und SBED-Tf	56
5.5.4	Überprüfung der Biotinylierung und UV-Stabilität von SDAD-Biotin-Tf und SDAD-Biotin-HSA	56
5.5.5	Methoden-Entwicklung im FACS	57
5.5.6	Herstellung von Zelllysaten mit und ohne Entfernung der Mitochondrien	58
5.5.7	Bindung der Biotin-Protein-SDAD Konjugate an Streptavidin-Agarose	60
5.5.8	Aufreinigung der Lysate durch Immunopräzipitation mit Streptavidin-Agarose	60
5.5.9	Detektion des Transferrin Rezeptor 1 (CD71)	61
6	Ergebnisse und Diskussion	62
6.1	Nachweis von hnRNP A2/B1 und Calreticulin auf der Zellmembran von lebenden Zellen	62
6.1.1	Markierung von CCRF-CEM Zellen mit anti-CRT und anti-hnRNP A2/B1	62
6.1.2	Induktion der Apoptose durch Mitoxantron	63
6.1.3	Markierung von CCRF-CEM Zellen mit anti-CRT nach Inkubation mit Mitoxantron	66
6.1.4	Markierung von A549 Zellen mit anti-CRT	68
6.1.5	Zusammenfassende Diskussion zur Detektion von CRT und hnRNP A2/B1	69
6.2	Untersuchung der Clathrin-abhängiger Endozytose von HSA	73
6.2.1	Generelle Anmerkungen zu den Experimenten	73
6.2.2	Inhibition der CME durch hypertones Medium	74

6.2.3	Inhibition der CME durch Kaliummangel.....	78
6.2.4	Inhibition der CME durch Chlorpromazin.....	80
6.2.5	Inhibition der CME durch transiente Transfektion mit siRNA.....	81
6.2.6	Zusammenfassende Diskussion zur CME von HSA.....	85
6.3	HSA-bindende Moleküle auf der Oberfläche von lebenden Zelllinien.....	92
6.3.1	Synthese von Biotin-HSA und Biotin-Transferrin.....	94
6.3.2	Synthese von Biotin-HSA-SDAD und Biotin-Tf-SDAD.....	95
6.3.3	Nachweis und UV-Stabilität des Biotin-Tags.....	96
6.3.4	Extrazelluläre Bindung und UV-induziertes Crosslinking.....	97
6.3.5	Herstellung von Zelllysaten.....	103
6.3.6	Immunopräzipitation mit Streptavidin-Agarose.....	107
6.3.7	Detektion des Transferrinrezeptors 1 (CD71).....	109
6.3.8	Zusammenfassende Diskussion zur Isolation von membranständigen ABPs.....	111
6.4	Abschließende Diskussion.....	115
7	Abkürzungsverzeichnis.....	123
8	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	125
9	Danksagung.....	127
10	Literaturverzeichnis.....	129

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung Nanomedizin-basierter Therapeutika (Nanomedizin = medizinische Anwendung der Nanotechnologie) hat zum Ziel, pharmakologische Substanzen zielgerichtet zu ihrem Wirkort zu transportieren und so die mangelnde Gewebsspezifität konventioneller Wirkstoffe zu überwinden. Humanes Serumalbumin bietet sich als Basis für die Entwicklung verschiedenster Nanotherapeutika an, unter anderem da für fluoreszenz-markiertes HSA eine selektive Anreicherung im Gewebe solider Tumoren nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der hohen metabolischen Aktivität eines Tumors und der Tatsache, dass Patienten mit progressiven malignen Erkrankungen häufig eine Kachexie und Hypoalbuminämie entwickeln, postulierten Stehle et al., dass HSA den Tumorzellen als Energie- und Stickstoffquelle dient und der Tumor selbst somit den Hauptort des Albumin-Katabolismus im Körper darstellt. In aufgereinigten Membranpräparationen von humanen Tumorzellen wurden Calreticulin und hnRNP A2/B1 als Albumin-bindende Proteine identifiziert. Zusammengenommen legt dies eine Beteiligung dieser beiden Proteine an der HSA-Aufnahme in Tumorzellen nahe.

In einem ersten Teil der Arbeit wurde die Anwesenheit von Calreticulin und hnRNP A2/B1 auf der Plasmamembran von lebenden Zellen durch Antikörperfärbung und FACS-Analyse überprüft. Keines der beiden Proteine konnte auf der Oberfläche von CCRF-CEM Zellen, einer humanen lymphoblastischen T-Zell Leukämie, nachgewiesen werden. Obwohl Calreticulin mittlerweile auf der Zellmembran von pre-apoptotischen, anthracyclin-vorbehandelten Zellen nachgewiesen wurde, konnte auch nach Induktion einer Apoptose durch Mitoxantron kein membranständiges Calreticulin auf CCRF-CEM Zellen detektiert werden.

Zur funktionellen Analyse der zellulären Albumin-Aufnahme wurde die Beteiligung der Clathrin-vermittelten Endozytose (CME), einem gut charakterisierten Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Endozytose, an der Internalisierung von Alexa488-BSA in A240286S Zellen, einem humanen Lungenadenocarcinom, durch FACS-Analyse untersucht. Die Hemmung der CME wurde durch hypertone Bedingungen, intrazellulären Kaliummangel, Chlorpromazin und transiente Transfektion mit siRNA gegen Clathrin Heavy Chain, einem essentiellen Protein der CME, erreicht. Die reduzierte Aufnahme von Alexa488-Transferrin, einem Protein das selektiv durch den Transferrin-Rezeptor über CME internalisiert wird, diente zur Überprüfung der erzielten Hemmung. Auch etablierte Methoden zur Hemmung einzelner Endozytose-Mechanismen sind nicht unbedingt selektiv und können einen Einfluss auf andere Mechanismen haben, zudem können sie in unterschiedlichen Zelllinien auch keine oder nur eine geringe Wirksamkeit zeigen sowie gegebenenfalls die Aufnahme des untersuchten Markers sogar verstärken. Die Ergebnisse der CME-Inhibition in A240286S Zellen bestätigen dies, da hypertone Bedingungen während der Inkubation zwar die Aufnahme von Alexa488-Transferrin und Alexa488-BSA hemmten, gleichzeitig aber auch die Endozytose von Dextran, einem Marker für die unspezifische Fluid-Phase Endozytose, reduzierten. Weder intrazellulärer Kaliummangel noch Chlorpromazin zeigten einen Einfluss auf die Alexa488-Transferrin-Aufnahme. Der erfolgreiche Knock-Down von Clathrin Heavy Chain (CHC) konnte durch Western Blotting nachgewiesen werden und führte zu einer deutlichen Verminderung der CME von Alexa488-Transferrin. Die Aufnahme von Alexa488-BSA hingegen zeigt nur eine geringe Hemmung durch siRNA CHC. Clathrin-vermittelte Endozytose leistet demzufolge entweder keinen oder nur einen geringen Beitrag zur Aufnahme von Albumin in A240286S Zellen.

Zusätzlich zu der funktionalen Analyse der Albumin-Aufnahme wurde ein Protokoll zur Isolation von HSA-Bindungspartnern aus der Plasmamembran von humanen Tumorzellen etabliert. Ein Teil des Protokolls war die Synthese eines HSA-Konjugates, das sowohl einen photoaktivierbaren Crosslinker (SDAD) zur Konjugation an Albumin-bindende Proteine der Plasmamembran als auch einen Biotin-Tag zur selektiven Aufreinigung der Crosslinking-Produkte nach der Zellyse enthielt. Zur Validierung des Protokolls wurde ein vergleichbares Transferrin-Konjugat hergestellt, das zur Isolation des Transferrin-Rezeptors CD71 dienen sollte. Die Synthese beider Konjugate war erfolgreich, insbesondere enthielten beide Endprodukte keine hochmolekularen Verunreinigungen, reagierten nicht mit sich selbst und das Biotin-Tag war auch unter UV-Belichtung stabil. Durch FACS-Analyse konnten für beide Konjugate eine extrazelluläre Bindung und ein UV-induziertes Crosslinking nachgewiesen werden. Ein Western Blotting der Zellysate bestätigte das erfolgreiche Crosslinking an Bindungspartner der Zellmembran. Das Protokoll zur Immunopräzipitation über die Streptavidin-Biotin-Interaktion wurde für beide Konjugate überprüft. Eine Isolation des CD71 aus A240286S Zellen durch das Transferrin-Konjugates war jedoch bisher nicht erfolgreich.

Eine rezeptorvermittelte Endozytose von HSA bzw. ein diskretes Albumin-bindendes Protein auf der Zellmembran von humanen Tumorzellen konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Der Schluss liegt nahe, dass die Anreicherung von HSA-Konjugaten in soliden Tumoren vor allem auf dem „Enhanced Permeability and Retention“ Effekt, wie er auch für andere Nanotherapeutika nachgewiesen wurde, und auf der langen Plasmahalbwertszeit des Proteins basiert.

2 ABSTRACT

The rational design of nanomedicine-based therapeutics (nanomedicine = medical application of nanotechnology) aims to improve the therapeutic effect of conventional drugs while reducing adverse reactions. A targeting strategy and increased bio-availability both enhance tissue specificity of a given drug. Human Serum Albumin (HSA) is a promising candidate for the development of future nanotherapeutics, especially due to its accumulation in solid tumour tissue. Based on the high metabolic activity of tumour cells and the fact, that patients with progressive malignancies often develop cachexia and hypoalbuminemia, Stehle et al. postulated that albumin serves as a source of energy and nitrogen to the tumour and that it is the main site of albumin-catabolism in the body. T. Fritzsche identified calreticulin and hnRNP A2/B1 in purified plasma membranes of human tumor cells. Taken together, this implies a role of those two proteins in albumin-uptake into tumor-cells.

The presence of calreticulin and hnRNP A2/B1 on the plasma membrane of viable tumour cells was examined using antibodies and FACS analysis. However, neither of the proteins was expressed on the cell surface of CCRF-CEM cells, a human T-cell lymphoblast cell line. Even though calreticulin has now been detected on the plasma membrane of pre-apoptotic, anthracycline-treated tumour cells, induction of apoptosis by mitoxantrone did not induce membrane expression of calreticulin in CCRF-CEM cells.

To analyse functional aspects of albumin uptake, the contribution of clathrin-mediated endocytosis (CME), a well characterized mechanism of receptor-mediated endocytosis, was examined. Intracellular delivery of albumin into A240286S cells, a human lung adenocarcinoma cell line, was quantified using Alexa488-BSA and FACS-analysis. Inhibition of CME was achieved by a set of different conditions, namely by hypertonic media, depletion of intracellular potassium, chlorpromazine and transient transfection with siRNA against clathrin heavy chain (CHC), an essential protein of clathrin-mediated endocytosis. The reduced uptake of Alexa488-transferrin, a protein that is rapidly internalized via CME by the transferrin receptor, was used to monitor degree of inhibition. Even established methods to inhibit a distinct pathway are prone to influence other mechanisms of endocytosis, show no or only limited effect in different cell lines or even induce the uptake of the analysed marker. Results of inhibiting CME in A240286S cells confirmed this as hypertonic media inhibited the uptake of both Alexa488-transferrin and Alexa488-BSA but also reduced the uptake of dextran, a marker of fluid-phase endocytosis. Neither potassium depletion nor chlorpromazine had any influence on the uptake of Alexa488-Transferrin in A240286S cells. Knock-down of clathrin heavy chain by transient transfection was verified using western blotting and substantial inhibition of Alexa488-transferrin endocytosis was achieved. Uptake of Alexa488-BSA however showed only limited inhibition by siRNA CHC. CME therefore does not or only partially contribute to endocytosis of albumin in A240286S cells.

In addition to functional analyses of albumin endocytosis, a protocol for the isolation of HSA-binding partners on the plasma membrane of human tumour cells was established. The protocol involved the synthesis of an HSA-conjugate that contained both a photo-activated crosslinker (SDAD) for conjugation to albumin-binding proteins on the plasma membrane and a biotin-tag for selective purification of crosslinked products after cell lysis. To validate the protocol, a similar transferrin-

conjugate was prepared with the aim to isolate the transferrin receptor CD71. Synthesis was successful in both cases, the conjugates neither contained any high-molecular weight impurities nor reacted with themselves and the biotin-tag remained stable during exposure to UV-light. For both conjugates, extracellular binding as well as UV-induced crosslinking to the plasma membrane was confirmed by FACS-analysis. Western blotting of cell lysates verified successful crosslinking. Immunoprecipitation by streptavidin-biotin interaction was examined for both conjugates, however, isolation of CD71 by the transferrin-conjugate failed so far.

Neither a distinct mechanism of HSA-endocytosis nor a discrete albumin-binding-protein on the plasma membrane of human tumour cells could be identified in the course of this work. It seems that accumulation of albumin-conjugates in tumour tissue is predominantly based on the enhanced permeability and retention effect, which is applicable for any nanotherapeutic, and the long plasma half-life of the protein.

3 EINLEITUNG

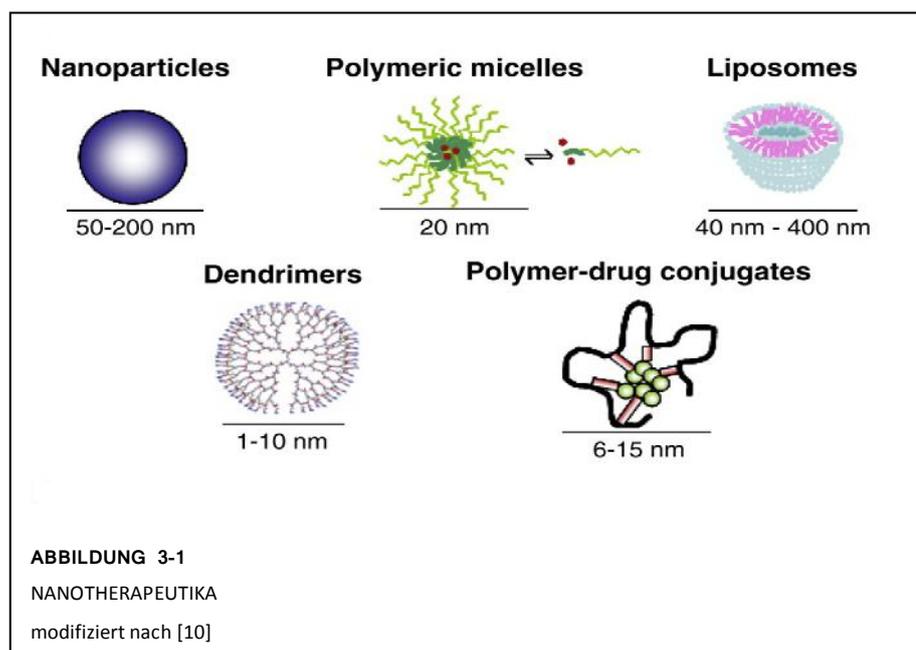
3.1 Nanomedizin

Konventionelle Chemotherapeutika werden unspezifisch verteilt und wirken deswegen sowohl in gesundem Gewebe als auch in Tumorzellen. Diese mangelnde Gewebsspezifität mit der daraus resultierenden Toxizität führt nicht nur zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen, sondern limitiert zudem die maximal einsetzbare Wirkstoffmenge und somit die innerhalb eines Tumors erreichbare Dosis. [10]

Nanotechnologie ist ein relative neues Feld in der Wissenschaft, die die Struktur, Eigenschaften und Verhalten von Materialien mit einer Größe unter einigen hundert Nanometern untersucht [12]. Nanomedizin-basierte Therapeutika (Nanomedizin = medizinische Anwendung der Nanotechnologie) haben das Ziel, pharmakologische Substanzen zielgerichtet zu ihrem Wirkort zu transportieren und so die mangelnde Gewebsspezifität zu überwinden. Der „European Science Foundation’s Forward Look on Nanomedicine“ definiert nanomedizin-basierte Therapeutika als „Nanometer große, komplexe Systeme aus mindestens zwei Komponenten, von denen eines die wirksame Substanz ist“ [10].

Nanomedizinische Therapeutika erreichen so im Idealfall, dass die Konzentration des Wirkstoffs im normalen Gewebe reduziert wird, indem ein Minimum während der Passage und ein Maximum am Wirkort freigesetzt wird. Sie können das pharmakokinetische und pharmakodynamische Profil des Wirkstoffs verbessern, indem sie die Löslichkeit erhöhen, den Abbau verhindern, die Elimination reduzieren und/oder die intrazelluläre Aufnahme erhöhen. Im besten Fall sind sie zudem nicht nur biokompatibel sondern auch bioabbaubar. Gerade die Entwicklung von Trägersystemen für schlecht lösliche Wirkstoffe ist ein interessanter Aspekt, da ungefähr 40 % der potentiellen Kandidaten aus den high-throughput Screenings und der kombinatorischen Chemie nicht weiterentwickelt werden, da sie so schlecht wasserlöslich sind [13] und in diesem Zustand auch eine schlechte Bioverfügbarkeit

haben [10]. Die Formulierung des sehr schlecht wasserlöslichen Paclitaxel (Taxol©) zum Beispiel benötigte Cremophor EL, einen Löslichkeitsvermittler mit bekannter Toxizität [10, 13]. Abraxane© hingegen ist eine Albumin-Nanopartikel Formulierung von Paclitaxel, die ohne



Cremophor EL auskommt (siehe auch 3.4.2.4 Albumin-Nanopartikel).

Nanomedizin-basierte Therapeutika, die momentan in der Forschung und zum Teil in der Klinik untersucht bzw. angewendet werden lassen sich in Nanopartikel, Polymer-Mizellen, Liposomen, Dendrimere und Polymer-Wirkstoff-Konjugate gliedern (vgl. Abbildung 3-1). Sie unterscheiden sich unter anderem dahingehend, dass der jeweilige Wirkstoff entweder kovalent direkt oder über einen sogenannten Linker mit dem Nanoträger verknüpft ist, oder nur innerhalb einer Matrix, Membran oder Mizelle eingeschlossen vorliegt.

Nanopartikel sind ungefähr 100 nm große Strukturen, bei denen der Wirkstoff entweder innerhalb einer Polymermatrix dispergiert wird („Nanospheres“) oder innerhalb einer Polymermembran verkapselt vorliegt („Nanokapseln“). Polymer-Mizellen (durchschnittliche Größe < 50 nm) bestehen aus amphiphilen Polymeren, die nach Innen einen hydrophoben Kern zur Aufnahme von hydrophoben Substanzen bilden, und nach Außen eine hydrophile Oberfläche formen. Ein Liposom hingegen besteht aus einem wässrigen Kern, der durch eine oder mehrere Phospholipid-Doppelmembranen umschlossen wird [10]. Diese Lipid-Doppelmembranen haben große Ähnlichkeit mit biologischen Membranen [12] und führen dazu, dass Liposomen sowohl hydrophile Moleküle (im wässrigen Kern) als auch hydrophobe Moleküle (innerhalb der Lipidmembranen) transportieren können [10]. Polymer-Wirkstoff-Konjugate bestehen aus einem Polymer-Grundgerüst, an das über modifizierte Endgruppen und gegebenenfalls spezifisch-spaltbare Linker (siehe auch 3.2.3 Aktives Targeting) verschiedenste Substanzen gebunden werden können. Dendrimere stellen eine spezielle Untergruppe der Polymerträger dar, da sie zwar ebenfalls durch die Polymerisation von Monomeren entstehen, aber anders als lineare Polymere von einem zentralen Kern ausgehen und so zu stark verzweigten Makromolekülen mit einer definierten dreidimensionalen Struktur führen. Pharmazeutische Wirkstoffe können dann über chemisch modifizierte Endgruppen an die Dendrimere gekoppelt werden [14].

Diese Nanotherapeutika können gegebenenfalls eine große Anzahl an Wirkstoffmolekülen aufnehmen, wobei Mizellen und Liposomen dafür eine größere Kapazität aufweisen als zum Beispiel Polymer-Konjugate. Ein weiterer Vorteil ist der potentiell hohe Grad an Kontrolle über die Freisetzungsprofile und Toxizität dieser Nanoträger. Dies kann zum Beispiel auch dadurch erreicht werden, dass die therapeutische Ladung als Antwort auf externe Stimuli wie Licht, Temperatur, pH oder andere Faktoren im Tumor Microenvironment freigesetzt wird [12]. Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von gewebsspezifischen Liganden auf der Oberfläche der Trägersysteme. Sowohl in Nanopartikeln als auch in Liposomen und Polymer-Wirkstoff-Konjugate können solche Strukturen für ein „aktives Targeting“ eingeführt werden (siehe 3.2.3 Aktives Targeting) [10].

Die ideale Größe eines Nanoträgers liegt zwischen 10 und 100 nm [10]. Anders als niedermolekulare Wirkstoffe werden therapeutische Nanosysteme, die größer als 10 nm sind, nicht sofort in der Niere filtriert und ausgeschieden, sondern zirkulieren über einen längeren Zeitraum [12]. Auf der anderen Seite behindert eine zu voluminöse Struktur die effiziente Extravasation aus den Blutgefäßen in das Tumorgewebe (siehe auch 3.2.2 Der EPR-Effekt). Ein weiteres Problem stellt das Retikuloendotheliale System (RES) der Leber dar, welches fremdes Material durch Phagozytose aus dem Blutkreislauf entfernt [10]. Der erste Schritt dieser Elimination durch das RES ist die Opsonisierung, wofür insbesondere hydrophobe Partikel anfällig sind. Hierbei werden die Nanoträger mit Opsonin-Proteinen besetzt, was sie für Phagozyten als körperfremde Partikel identifiziert und so zu ihrer Phagozytose und dementsprechend zu der Eliminierung aus dem Blutkreislauf führt. Die

Opsonisierung von hydrophoben Partikeln geschieht schneller als die Opsonisierung von hydrophilen Partikeln, da die Plasmaproteine leichter an einer hydrophoben Oberfläche adsorbieren [13].

Eine Möglichkeit, die nanomolekularen Trägersysteme vor dem Reticuloendothelialen System zu schützen, besteht in dem Überziehen der Oberfläche mit Polyethylenglycol (PEG), dem sogenannten PEGylieren [13]. Der hydrophile Schutzmantel verzögert die Anlagerung von opsonisierenden Proteinen, kann sie allerdings nicht komplett verhindern [13]. Sowohl Nanopartikel als auch Liposomen können PEGyliert werden, um eine Verlängerung ihrer Halbwertszeit im Blut zu erreichen [10].

Beispiele für bereits zugelassene nanomedizinische Systeme sind unter anderem Abraxane® (Albumin-Paclitaxel-Nanopartikel mit einer Zulassung für metastasierenden Brustkrebs), Transdrug® (Doxorubicin-Nanopartikel mit einer Zulassung für Hepatocarcinom), Doxil® (PEGyliertes, liposomales Doxorubicin unter anderem gegen Eierstockkrebs, metastasierenden Brustkrebs und Kaposi-Sarkom), Myocet® (liposomales Doxorubicin gegen Brustkrebs), DaunoXome® (liposomales Daunorubicin bei Kaposi-Sarkom) und Onco-TCS® (liposomales Vincristine bei Non-Hodgkin Lymphom). Genexol®-PM, eine Darreichungsform von Paclitaxel in Polymer-Mizellen, befindet sich in klinischen Studien zur Therapie gegen Brust-, Lungen und Pankreaskrebs. Ebenso werden aktuell verschiedene Polymer-Wirkstoff-Konjugate von Paclitaxel (Xyotax®, Taxoprexin®) und Doxorubicin (PK1) in Phase II und III Studien untersucht.

Systeme, die zusätzlich gewebsspezifische Liganden enthalten, befinden sich zum größten Teil noch in der Präklinik. Verwendet werden hier unter anderem Transferrin (Transferrin-Rezeptor), Folat (Folat-Rezeptor), Anti-Her-2 (Her-2 Rezeptor), Anti-EGFR-Mab (EGFR-Rezeptor), RGD-Peptide (Integrine), Anti-VEGF-Mab (VEGF), Anti-VCAM-1 (VCAM-1) oder gegen MMPs gerichtete Liganden.[10]

Obwohl die Systeme weniger toxisch sind als konventionelle Therapien, verursachen sie immer noch unerwünschte Arzneimittelwirkungen, wie zum Beispiel die sensorische Neuropathie und Übelkeit während der Therapie mit Albumin-gebundenem Paclitaxel (Abraxane®). Zusätzlich sind die neuen Therapeutika teuer und der bisherige Erfolg hinsichtlich des Gesamtüberlebens ist mäßig [15]. Eine weitere Entwicklung der nanomolekularen therapeutischen Wirkstoffträger ist also nötig, um durch rationelles Design das Ziel einer gewebsspezifischen und kontrollierten Freisetzung zu erreichen.

3.2 Aktives und passives Targeting

Tumor Targeting, also die zielgerichtete, selektive Wirkung eines Therapeutikums auf einen spezifischen Tumor, wird in „aktives“ und „passives“ Targeting unterteilt. Der aktive Prozess, der durch gewebs- oder tumorspezifische Liganden vermittelt wird, kann allerdings nicht vollständig getrennt von der passiven Akkumulation im Tumorgewebe betrachtet werden, da das aktive Targeting meist erst nach diesem passiven Targeting stattfinden kann. Eine Ausnahme ist das aktive Targeting der Endothelzellen eines Tumors, das keine vorgelagerte Akkumulation der Nanoträger im Tumor erfordert [10].

Der Transport eines Moleküls aus der systemischen Zirkulation zur Krebszelle ist ein dreistufiger Prozess. Zuerst wird die Substanz durch die Blutgefäße in die verschiedenen Regionen des Tumors transportiert, dann muss sie durch die Gefäßwand penetrieren und schließlich durch den interstitiellen Raum die Zielzelle erreichen [15]. Die Extravasation in das Gewebe kann durch Diffusion, dem Transport durch Zellmembranen entlang eines Konzentrationsgradienten ohne den Verbrauch von zellulärer Energie, Konvektion, der Bewegung von Molekülen in Flüssigkeiten, oder durch Transzytose, dem aktiven Transport durch das Endothel, geschehen [10, 15, 16]. Die Extravasation durch endotheliale Poren geschieht bei großen Molekülen hauptsächlich durch Konvektion, wohingegen der Transport im Interstitium wegen des hohen Drucks hauptsächlich durch Diffusion erfolgt [10].

Die Penetration durch die Gefäßwand und die Akkumulation im Gewebe wird im Falle der nanomedizin-basierten Therapeutika durch die Besonderheiten des Tumor-Microenvironment erleichtert. Dieses passive Targeting wird auch als „Enhanced Permeability and Retention“ (EPR)-Effekt (siehe auch 3.2.2 Der EPR-Effekt) bezeichnet. Das aktive Targeting hingegen fördert zumeist die selektive Aufnahme der Nanotherapeutika in die Krebszelle nach dem Transport in das Interstitium des Tumors.

3.2.1 Das Tumor-Microenvironment

Das Tumor Microenvironment, also die extrazelluläre Umgebung der Tumorzellen, unterscheidet sich hinsichtlich, der Sauerstoffversorgung, der Durchblutung, des pH-Wertes, des metabolischen Status und der Präsenz von vaskulären Abnormitäten von einem normalen Gewebe [10].

Solide Tumore haben einen niedrigeren extrazellulären pH-Wert als korrespondierendes gesundes Gewebe. Der durchschnittliche pH-Wert liegt hier, abhängig von der Lokalisation des Tumors, zwischen pH 6,0 und pH 7,0 im Gegensatz zu dem sonst üblichen pH-Wert 7,4. Niedriger pH-Wert und niedriger Sauerstoffgehalt sind normalerweise eng miteinander verknüpft, allerdings entsteht der niedrige pH-Wert im Tumorgewebe hauptsächlich durch eine hohe Glykolyse-Rate der Zellen, die unabhängig von dem vorhandenen Sauerstoffpartialdruck ist [10].

Neo-Angiogenese ist der Prozess, der die Bildung von neuen Blutgefäßen aus bestehenden vaskulären Netzwerken beschreibt. Unter normalen Umständen wird die Neo-Angiogenese bei Entzündungen, der Regeneration von Geweben und bei der Wundheilung beobachtet [12]. Sobald ein Tumor eine gewisse Größe erreicht (circa 2 mm³) führt der Mangel an Sauerstoff (Hypoxie) zu einer Initiierung der Angiogenese. So geformte, unreife Blutgefäße erfahren normalerweise nach ihrer Bildung einen extensiven Umbau, bei dem die Gefäße durch Pericyten und glatte Muskelzellen stabilisiert werden. Dieser Schritt ist bei der Neo-Angiogenese in Tumoren häufig unvollständig, was zu irregulär geformten, erweiterten und verdrehten Gefäßen innerhalb des Tumors führt [10]. Den Blutgefäßen des Tumors fehlt eine geordnete Hierarchie innerhalb des Netzwerkes, welches sich normalerweise vom größten Blutgefäß sukzessive zum kleinsten Gefäß, welches jeweils ein gleichmäßig großes Kapillarbett versorgt, verzweigt. Im Gegensatz dazu sind Tumorgefäße heterogen in ihrer räumlichen Anordnung, und die Gefäßwand zeichnet sich durch große endotheliale Junctions, abnormal dünne oder dicke Basalmembranen und einen maximalen Porendurchmesser von bis zu mehreren hundert Nanometern aus. Durch ihre irreguläre Struktur sind die Gefäßwände an einigen Stellen löchrig und hyperpermeabel, an anderen allerdings auch wieder nicht. Der Blutfluß ist

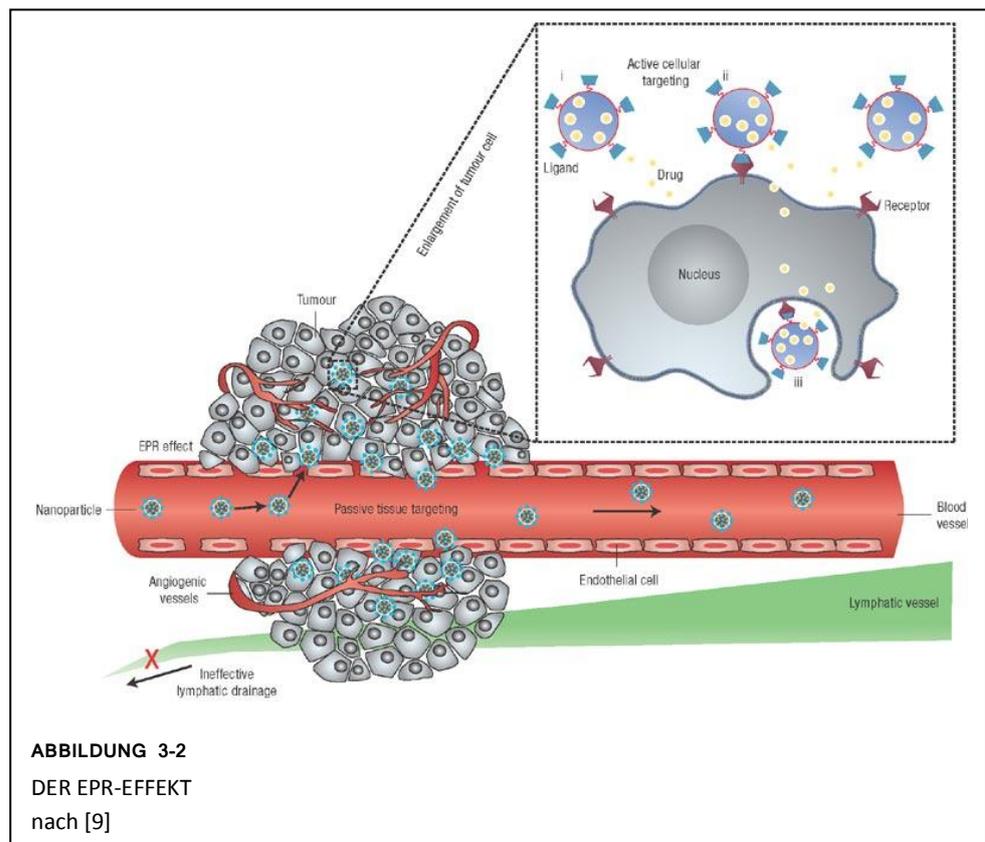
heterogen und führt zu unterversorgten Regionen in einem Tumor. Diese schlecht durchbluteten Bereiche werden so nur schwer von den vaskulär transportierten Tumorthapeutika erreicht.

Das normale lymphatische Netzwerk führt exzessive Flüssigkeit vom Gewebe ab. Im Tumorgewebe werden die lymphatischen Gefäße von proliferierenden Zellen zusammengedrückt, so dass sie kollabieren. Demzufolge existieren funktionelle lymphatische Gefäße nur in der Peripherie des Tumors [15].

Das Fehlen von funktionsfähigen lymphatischen Gefäßen und die vaskuläre Hyperpermeabilität führt zu einem interstitiellen Hochdruck (interstitial fluid pressure= IFP). Der IFP ist in den meisten soliden Tumoren erhöht, wobei er dazu tendiert, im Zentrum eines Tumors höher zu sein als in der Peripherie. Dies führt zu einer abfließenden Bewegung aus der Zentralregion des Tumors [15]. Ein erhöhter IFP trägt zu einem verminderten transkapillären Transport in Tumoren bei, was zu einer verminderten Aufnahme von Wirkstoffen in den Tumor führt. Der Transport von Wirkstoff-beladenen Nanoträgern wird, bedingt durch ihre Größe, jedoch weniger durch den erhöhten IFP in Tumoren beeinflusst als der Transport von niedermolekularen Wirkstoffen. Zusätzlich ist der microvaskuläre Druck in Tumoren sehr viel höher als im normalen Gewebe, was den Austritt der Nanoträger aus der Blutbahn fördert.[10]

3.2.2 Der EPR-Effekt

Anders als die Blutgefäße in den meisten gesunden Geweben haben angiogene Tumorgefäße Lücken zwischen nebeneinander liegenden Endothelzellen, die bis zu 700 nm groß sein können [12, 13]. Die endothelialen Junctions in normalen Geweben sind dagegen sehr eng und variieren zwischen 1 und 10 nm [13]. Durch



diese abnormal großen Poren in den tumoralen Blutgefäßen können Nanovehikel in das Tumorgewebe extravasieren [12], wobei die vaskuläre Durchlässigkeit trotzdem mit zunehmender Partikelgröße abnimmt [15]. Die lymphatischen Gefäße im Tumor sind zudem häufig nicht

funktionsfähig oder sogar fehlend, was zu einer ineffizienten Drainage der extravasierten Nanocarrier aus dem Interstitium des Tumors führt [10]. Diese passive Akkumulation nennt sich „Enhanced Permeability and Retention“ (EPR)-Effekt und wurde von Matsumera und Maeda entdeckt (vgl. Abbildung 3-2) [17, 18].

Das passive Targeting über den EPR-Effekt hängt vom Ausmaß der Neo-Angiogenese des Tumors ab, ist also, abhängig von der Art des Tumors und seiner Lokalisation, unterschiedlich stark ausgeprägt [10]. So verhindert ein hoher interstitieller Druck (IFP) zum Teil die Extravasation aus den Blutgefäßen und wirkt dem EPR-Effekt entgegen [15]. Der Zusammenhang von hohem IFP und schlechter Lymphdrainage erklärt die Abhängigkeit des EPR-Effekts von der Größe des Moleküls: größere und lang zirkulierende Moleküle reichern sich besser im Tumor an als kleine Moleküle, die das Interstitium leichter durch Diffusion verlassen können und nicht akkumulieren [10]. Allerdings ist die Diffusion durch die Collagenmatrix mit steigender Größe der Partikel (>60 nm) immer weiter eingeschränkt, was zu einer Konzentration um die Blutgefäße und geringen Penetration in den interstitiellen Raum des Tumors führen kann. Die Bewegung eines Partikels hängt also nicht nur von seiner Größe, sondern auch von seiner Ladung, seiner Konfiguration und den physikochemischen Eigenschaften der interstitiellen Matrix ab [15].

Der EPR-Effekt tritt bei nahezu allen stark wachsenden soliden Tumoren auf, Ausnahmen sind hypervaskuläre Tumore wie Prostata-Carcinome oder Pankreas-Carcinome [10]. Er wird zudem bereits in den frühen Stadien der Carcinogenese (z. B. Dysplasie und Hyperplasie) beobachtet. Auf der anderen Seite sind nicht alle Blutgefäße eines angiogenen Tumors „löchrig“ und durch die heterogene Verteilung der Porengröße im Endothel kann es auch zu einer heterogenen Extravasation und Verteilung im Tumorgewebe kommen [15].

Allein durch ihre Größe erreichen nanomedizin-basierte Therapeutika also eine verbesserte Akkumulation im Tumor durch den EPR Effekt und können so eine große Menge der Wirkstoffe spezifisch in der Nähe der Tumorzellen freisetzen [12]. Der EPR-Effekt ist am größten, wenn die Nanoträger das Immunsystem möglichst unerkant umgehen können und für eine lange Zeit im Blutkreislauf zirkulieren [10].

3.2.3 Aktives Targeting

Beim aktiven Targeting ist das Ziel, durch einen tumorspezifischen Liganden auf der Oberfläche der Nanocarrier eine höhere Selektivität und somit eine verbesserte Wirksamkeit des Therapeutikums zu erreichen. Ein idealer Ligand sollte an einen Rezeptor binden, der möglichst homogen von allen Tumorzellen oder der tumoralen Vaskulatur exprimiert wird, aber nicht oder nur kaum von normalen Zellen [10]. Man unterscheidet zwischen dem aktiven Targeting der eigentlichen Tumorzellen und dem Targeting der angiogenen Endothelzellen des Tumors.

Beim aktiven Targeting der Krebszellen ist das Ziel, über potentiell internalisierende Rezeptoren auf der Oberfläche der Krebszellen die zelluläre Aufnahme der Nanoträger zu verbessern. Beispiele für hierbei adressierte Rezeptoren sind der Transferrin Rezeptor mit seinem Liganden Transferrin, der Folat-Rezeptor, der Folate und dessen Konjugate bindet, auf der Zelloberfläche exprimierte Glykoproteine, an die die sogenannte Lektine binden können, und der Epidermal Growth Factor Receptor EGFR [10].

Das aktive Targeting des Endothels hat zum Ziel, durch die Zerstörung wachsender Blutgefäße und dem resultierenden Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen zur Zerstörung des Tumors zu führen. Beispiele sind Liganden die gegen den Vascular Endothelial Growth Factor VEGF, gegen das vasculäre Cell Adhesion Molekül VCAM-1 oder Matrix-Metalloproteasen MMPs gerichtet sind [10].

Zugelassene Medikamente mit einem aktiven Targeting sind unter anderem Trastuzumab (anti-ERB2, Herceptin©) und Bevacizumab (anti-VEGF, Avastin©), wobei bei beiden der Antikörper sowohl das Targeting als auch die Wirkung übernimmt. „Echte“ Konjugate, bei denen ein Wirkstoff oder Nanoträger mit einem Liganden für ein aktives Targeting verknüpft wird, sind bisher erst selten in klinischen Phasen untersucht worden. Hingegen existiert eine große Anzahl prä-klinischer Studien, die sich mit verschiedenen Nanoträgern und unterschiedlichsten Targeting-Liganden beschäftigen [10]. Ein Problem ist, dass tumorspezifische Liganden zwar die intrazelluläre Konzentration der Therapeutika erhöhen können, die Penetration in den Tumor im Vergleich zu anderen Nanoträgern aber nicht signifikant verbessern. Zudem erhöhen diese Liganden die Größe und potentielle Interaktion mit anderen Strukturen, was die Extravasation aus den Blutgefäßen und ihren interstitiellen Transport erschweren kann [15].

Ein weiterer Ansatz besteht in der Entwicklung von „aktivierbaren“ Nanoträgern, bei denen durch das Microenvironment des Tumors die Freisetzung des Wirkstoffes oder die Interaktion mit einer spezifischen Zielstruktur initiiert wird. Beispiele sind pH-sensitive Mizellen oder Linker, die enzymatische Aktivierung von Prodrugs oder die enzymatische Spaltung von Linkern durch die Proteasen des Tumors, sowie temperatursensitive Polymere, die entweder auf die häufig im Tumor auftretende Hyperthermie oder auf extern zugeführte Erwärmung z.B. durch Ultraschall reagieren [10, 15, 19].

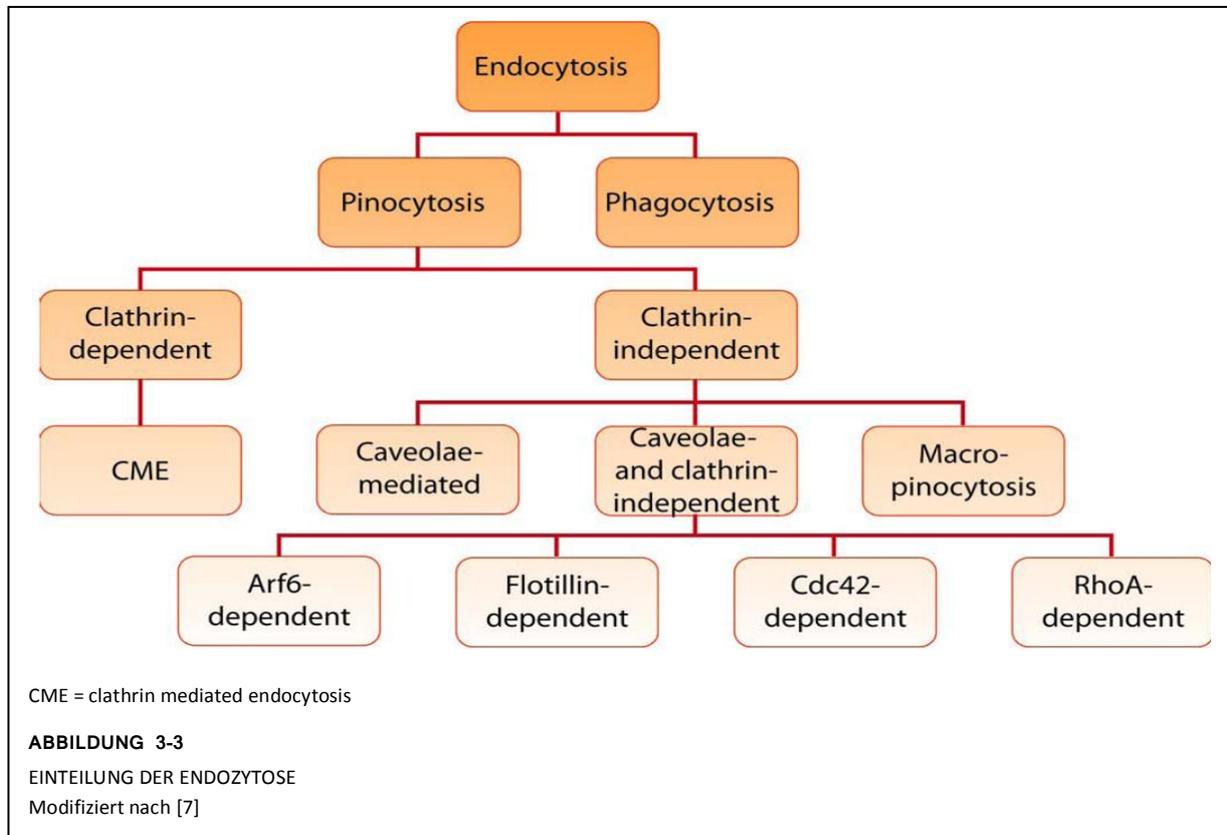
3.3 Endozytose

Die Zellmembran bildet eine Barriere, die von jeder Substanz auf dem Weg in die Zelle überwunden werden muss [6]. Die Zellmembran ist für kleine und ungeladene Moleküle permeabel, demzufolge können Wassermoleküle entlang eines Konzentrationsgradienten in die Zelle diffundieren. Einige größere Moleküle, wie zum Beispiel die ungeladene Form der schwachen Base Doxorubicin, sind dank ihrer Hydrophobizität ebenfalls in der Lage, die Plasmamembran ohne weitere Hilfe durch passive Diffusion zu durchqueren [7, 20]. Niedermolekulare Substanzen wie Aminosäuren, Zucker und Ionen gelangen dagegen durch spezifische Membranpumpen oder -kanäle in das Innere einer Zelle. Größere Makromoleküle werden über einen Prozess namens Endozytose aufgenommen, bei dem sich durch ein Einstülpen und Abschnüren der Membran Vesikel bilden, die dann innerhalb der Zelle entlang definierter „Routen“ weitertransportiert werden. Endozytose dient nicht nur der Aufnahme von Nährstoffen, sondern beeinflusst auch sehr komplexe Prozesse wie die Zellmigration, -polarität und -entwicklung oder die hormonell vermittelte Signaltransduktion. Sie findet demzufolge nicht willkürlich statt sondern unterliegt einer strengen Kontrolle [6, 7].

3.3.1 Einteilung

Die beiden Hauptkategorien der Endozytose sind die Phagozytose und die Pinozytose. Während Phagozytose auf spezialisierten Zellen, sogenannten Phagozyten, beschränkt ist, findet die

Pinozytose in allen Säugetierzellen statt. Die Pinozytose kann wiederum in verschiedene Mechanismen unterteilt werden, deren Bezeichnung sich zumeist an den jeweils essentiellen Proteinen orientiert. Generell bestimmt die Art des zu transportierenden Moleküls, über welchen der Mechanismen es in die Zelle gelangt [6].



Prinzipiell gibt es Clathrin-abhängige und Clathrin-unabhängige Endozytose. Bei der Clathrin-unabhängigen Endozytose wird weiter zwischen Caveolae-vermittelte Endozytose, Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose und Macropinozytose unterschieden. Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose teilt sich dann weiter in Arf6-abhängige, Flotillin-abhängige, Cdc42-abhängige oder RhoA-abhängige Endozytose auf (vgl. Abbildung 3-3) [7]. Neben diesen jeweils essentiellen Proteinen gibt es weitere Moleküle, die bei einer Anzahl von verschiedenen Aufnahmemechanismen eine Rolle spielen. Ein Beispiel hierfür ist die GTPase Dynamin, welche bei der Phagozytose, der Caveolae-vermittelte Endozytose, der Clathrin-vermittelte Endozytose und bei einigen Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose-Mechanismen die Abschnürung der Vesikel von der Zellmembran vermittelt [6]. Cholesterol wiederum ist essentieller Bestandteil der Zellmembran und hier insbesondere in Lipid Rafts und Caveolae präsent. Eine Entfernung von Cholesterol aus der Zellmembran scheint jedoch einen unspezifischen inhibitorischen Effekt auf verschiedene Endozytose-Mechanismen wie der CME, Fluid-Phase-Endozytose und Phagozytose zu haben [21]. Vergleichbares gilt für das Aktin-Zytoskelett, da ein Eingriff in die Reorganisation der Aktin-Filamente zusätzlich die Verteilung und Funktion zahlreicher Plasmamembranproteine verändern kann und zudem eine Zerstörung des Zytoskeletts den Transport aufgenommenen Ladung von den frühen Endosomen zu den späten Endosomen blockiert (siehe auch 3.3.2 Das endosomal-lysosomale System sowie Tabelle 3.1) [8, 21].

Aufnahmeweg	Cargo (u.a.)	beteiligte Proteine (u.a.)	Dynamin	Chemische Inhibitoren	Biologische Inhibition DN= dominant negativ
Clathrin-vermittelte Endozytose	Rezeptor-Tyrosinkinasen	Clathrin	Ja	Hypertone Sucrose	AP180 DN
	GPC-Rezeptoren	AP2		Kaliummangel	Dynamin 2 DN
	Transferrinrezeptor	Epsin		Chlorpromazin	CHC RNAi
	LDL-Rezeptor	Amphiphysin Rab5 (viele weitere)		Cytosol. Ansäuerung Monodansylcadaverin Phenylarsenoxid	AP2 RNAi
Caveolin-vermittelte Endozytose	Cholera Toxin B	Caveolin	Ja	Mangel an Cholesterol	Dynamin 2 DN
	SV40	Cavin		Genistein	Caveolin 1 DN
	(modifiziertes) Albumin	Src		PP2	Caveolin 1 RNAi
	GPI-verankerte Proteine	PKC			
Arf 6	MHC Klasse 1 Proteine	Arf 6	Nein	Mangel an Cholesterol	Arf6 DN
	Protectin			Genistein	
	Carboxypeptidase				
Flotillin	Choleratoxin B	Flotillin 1 und 2	Nein	Mangel an Cholesterol	
	Protectin			Genistein	
	Proteoglykane				
Cdc42	Fluid-Phase Marker	Cdc42	Unklar	Mangel an Cholesterol	Cdc42 DN
	Choleratoxin B	Arf1		Genistein	Clostridium Toxin B
	GPI-verankerte Proteine				
RhoA	Interleukin2 Rezeptor β	Rho A	Unklar	Mangel an Cholesterol	Rho A DN
	FC ϵ Rezeptor 1	Rac1		Genistein	Clostridium Toxin B

Abkürzungen:

Arf 1 bzw. 6 = Adenosindiphosphate-ribosylation Factor
Cdc42 = Cell division control Protein 42
GPI-verankerte Proteine = Glycophosphatidylinositol-verankerte Proteine
GPC-Rezeptoren = G-Protein gekoppelter Rezeptoren
LDL-Rezeptor = Low density Lipoprotein Rezeptor
PP2 = Protein Phosphatase 2
Rab = ras-like in rat brain
Rac1 = ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
ras = rat sarcoma
Rho A = ras homolog gene family, member A
PKC = Proteinkinase C
Src = sarcoma (protoonkogene Tyrosinkinase)
SV 40 = Simian Virus 40

TABELLE 3.1

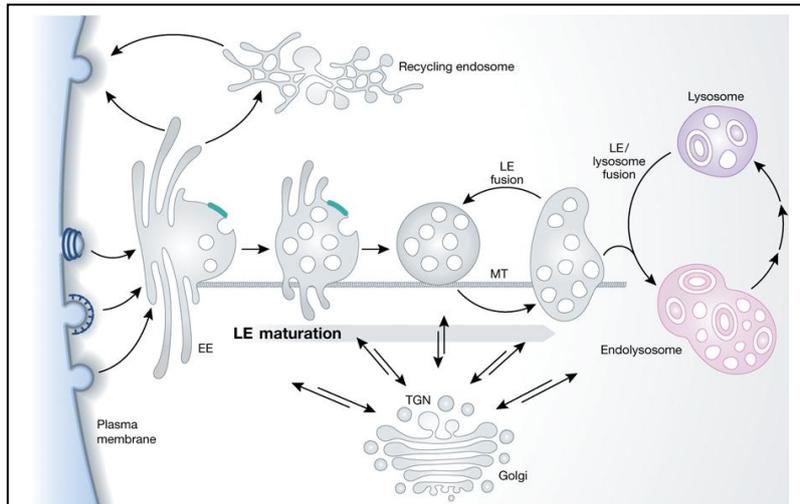
AUFSTELLUNG DER ENDOZYTÖSE-MECHANISMEN, IHRER LADUNG, BETEILIGTEN PROTEINE UND BEKANNTEN INHIBITOREN
Nach [7]

3.3.2 Das endosomal-lysosomale System

Vereinfacht dargestellt besteht das endosomal-lysosomale System aus drei Komponenten: einem Recycling-Kreislauf, der aufgenommene Substanzen und Membranproteine wieder zur Zelloberfläche befördert, einem abbauenden System, das für den Verdau aufgenommener Substanzen zuständig ist, und einer die beiden Elemente verbindenden Komponente [8].

Die bei der Abschnürung von der Zellmembran entstandenen Vesikel fusionieren und liefern ihre Ladung in sogenannten frühen Endosomen (early endosomes = EE) ab, die für durchschnittlich 10 min ankommende Flüssigkeit aufnehmen und den Inhalt der Vesikel sortieren (siehe Abbildung 3-4). Während dieser Zeit werden Membran, membranständige Proteine und Flüssigkeit sehr schnell aus dem EE zurück zur Zelloberfläche oder in ein „Recycling Endosome“ transportiert, und nur ein Bruchteil der aufgenommenen Substanzen akkumuliert im EE. Tatsächlich wird in einer typischen Säugetierzelle zwischen 50-180 % der Zellmembranfläche innerhalb einer Stunde internalisiert und wieder zur Oberfläche befördert. EEs bekommen aus dem Trans-Golgi-Netzwerk bereits Hydrolasen und sind leicht sauer (pH 6,8-5,9), in ihnen

beginnt auch die Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILV), die für die späten Endosomen (late Endosomes = LE) oder auch „Multivesicular bodies“ (MVB) charakteristisch sind. ILVs dienen zum einen der Inaktivierung von signalisierenden Rezeptoren, da diese so den Kontakt zum Cytosol verlieren, und zudem erleichtern sie den Angriff von Hydrolasen auf Lipide und Membrankomponenten, da die umschließende Membran der ILVs keinen Schutzmantel aus hochglycosylierten Proteinen besitzt. Late Endosomes entstehen aus ILV-reichen Gebieten der EEs und sind für den Transport der aufgenommenen Substanzen zum abbauenden System, den Lysosomen, verantwortlich. Zusätzlich transportieren sie auch neue lysosomale Hydrolasen und Membranproteine zu den Lysosomen, die ohne diese Lieferung aus dem endosomalen System ihre Integrität, ihren sauren pH-Wert und ihre perinucleäre Lokalisation verlieren. Die Eliminierung von endosomalen und die Ankunft von lysosomalen Komponenten während der endosomalen Reifung vom EE zum LE und wahrscheinlich auch noch nach der Fusion von LEs mit Lysosomen erfolgt über einen kontinuierlichen Austausch mit dem Trans-Golgi-Netzwerk. Nach ihrer initialen Bildung verändern sich die LEs während der nächsten 10-40 min hinsichtlich ihrer Membrankomponenten,



Abkürzungen:

- EE = early endosome
- LE = late endosome
- MT = maturation (Reifung)
- TGN = trans-golgi network

ABBILDUNG 3-4

DAS ENDOSOMAL-LYSOSOMALE SYSTEM

Nach [8]

ihrer möglichen Fusionspartner, der Bildung von zusätzlichen ILVs, des Abfalls des pH-Wertes und der Aquisition von lysosomalen Komponenten. Reife LEs besitzen bereits lysosomale Membranproteine wie LAMP-1, verschiedene saure Hydrolasen, einen pH-Wert zwischen 6,0 und 4,9 sowie oft mehr als 30 ILVs innerhalb eines MVBs. Während der Reifung bewegen sich die LEs in die perinukleäre Region der Zelle, wo sie miteinander, mit Lysosomen und mit bestehenden endosomalen-lysosomalen Hybridorganellen verschmelzen. Aus den so generierten Hybridorganellen werden schließlich reine Lysosomen, die den Endpunkt des abbauenden Systems markieren. Sie haben einen hohen Gehalt an Hydrolasen, der pH-Wert kann in ihnen bis auf pH 4,5 abfallen und sie dienen zudem als Speicher für lysosomale Komponenten, die auf einen erneuten Einsatz bei der Fusion mit einem LE warten [8].

Das endosomal-lysosomale System mit seinen unterschiedlichen Komponenten ist höchstgradig dynamisch und die einzelnen Vesikel reifen, fusionieren und teilen sich ständig. Spezifische Marker für die einzelnen Organellen sind demzufolge auch nur bedingt aussagekräftig, da konstant Komponenten aufgenommen, entfernt oder recycelt werden [8, 20].

3.3.3 Die Endozytose von Nanotherapeutika

Je nach Art der Interaktion mit einer Zellmembran kann die Aufnahme von Nanoträgern über Fluid-Phase Endozytose, adsorptive Endozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgen. Bei der Fluid-Phase Endozytose liegt das Molekül in der aufgenommenen Flüssigkeit gelöst vor, die intrazelluläre Aufnahme ist also direkt proportional zur Konzentration in der umgebenden Lösung und dem Volumen der aufgenommenen Vesikel. Eine verbesserte Aufnahme wird durch die unspezifische Bindung an der Zellmembran erreicht, der sogenannten adsorptiven Endozytose. Die effizienteste Aufnahme erfolgt hingegen über spezialisierte Rezeptoren, die nach Bindung ihres jeweiligen Liganden internalisiert werden (Rezeptor-vermittelte Endozytose) [6]. Verschiedenste Liganden, die über eine rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden, werden als Mediatoren für die Aufnahme von Nanopartikeln untersucht, unter den bekanntesten sind der Epidermal Growth Factor EGF und Transferrin. Die verwendeten Nanoträger sind allerdings häufig selber groß genug, um unspezifische Oberflächeninteraktionen mit der Zellmembran einzugehen, und diese könnten einen vergleichbaren Effekt auf die Aufnahme und intrazelluläre Verteilung haben, wie die spezifische Rezeptor-Liganden Interaktion. Zudem werden so konstruierte Nanoträger-Ligand-Konstrukte nicht unbedingt über den gleichen Endozytose-Mechanismus aufgenommen wie der unverknüpfte Ligand, und auch das intrazelluläre Trafficking kann sich unterscheiden. Auch unkonjugierte Nanomaterialien können häufig über mehr als einen Mechanismus in die Zelle aufgenommen werden, wobei Größe, Hydrophobizität, Ladung und Form einen entscheidenden Einfluss ausüben [7].

3.3.4 Mechanismen

3.3.4.1 Phagozytose

Phagozytose ist typisch für spezialisierte Phagozyten wie Macrophagen, Monozyten, Neutrophile oder Dendritische Zellen. Allerdings gibt es Hinweise, dass Phagozytose in sehr viel geringerem Maße auch in nichtprofessionellen Phagozyten wie Fibroblasten, epithelialen und endothelialen Zellen stattfindet [7]. Die Phagozytose ist für die Aufnahme von Partikeln größer als 300 nm essentiell und dient hauptsächlich der Entfernung von fremdem Material wie Bakterien oder Hefen aus dem

Organismus beziehungsweise der Entfernung von überschüssigen oder zerstörten körpereigenen Zellen. Phagozytose wird durch Zelloberflächenrezeptoren wie den Fc-Rezeptor vermittelt, der an den Fc-Teil von Antikörpern bindet und so die Internalisierung von mit Antikörpern besetzten körperfremden Partikeln initiiert. Die Rezeptor-Ligand Interaktion führt zu einer Signalkaskade, bei der es zu einer Umbildung des Aktin-Skelettes, Einstülpung der Plasmamembran und der Bildung eines Phagosoms kommt [6].

3.3.4.2 Macropinozytose

Die Macropinozytose gehört in die Klasse der Clathrin-, Caveolin- und Dynamin unabhängigen Endozytose. Als Antwort auf die Stimulation durch Wachstumshormone werden Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert, was zur Veränderung des Aktinskelettes und zur Ausbildung sogenannter Membran-„Ruffles“ führt. Zusätzlich können auch bestimmte Bakterien, Virusarten und apoptotische Körper die Ausbildung dieser Ruffles unabhängig von Wachstumsfaktoren induzieren. Durch das Kollabieren der Ausstülpungen und dem Verschmelzen mit der Zellmembran werden große endozytotische Vesikel, die Macropinosomen, generiert, die so Teile der Flüssigkeit und gelösten Nährstoffe des extrazellulären Raums enthalten. Macropinozytose ist, mit wenigen Ausnahmen wie zum Beispiel in Macrophagen oder den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, in allen Zelltypen möglich und erlaubt so auch die Aufnahme von großen Partikeln in Zellen, die keine Phagozytose durchführen können [7].

3.3.4.3 Clathrin- und Caveolin- unabhängige Endozytose

Die Mechanismen, die die Clathrin- und Caveolin- unabhängige Endozytose regulieren, sind bisher noch nicht abschließend untersucht, was auch durch die Tatsache illustriert wird, dass sie hauptsächlich in negativen Worten beschrieben werden [6]. Basierend auf den sie regulierenden Proteinen wird die Clathrin- und Caveolin- unabhängige Endozytose bisher in Arf6-abhängig, Flotillin-abhängig, Cdc42-abhängig und RhoA-abhängig beschrieben [7]. Diese Aufnahmemechanismen unterscheiden sich nicht nur in der Art der transportierten Ladung sondern auch bezüglich ihrer Vesikelformation [6]. So benötigt die RhoA-abhängige Endozytose wahrscheinlich Dynamin für die Bildung der Vesikel, die Cdc42-abhängige Endozytose hingegen wahrscheinlich nicht [22].

Gemeinsam ist ihnen die Abhängigkeit von Cholesterol und die Assoziation mit sogenannten „Lipid Rafts“ [7]. Das Lipid Raft Konzept beruht auf der Existenz von circa 40-50 nm großen, cholesterol- und sphingolipid-reichen Regionen der Zelloberfläche, die frei auf der Zellmembran diffundieren können [6]. Der Theorie nach können sich Sphingolipide mit langen gesättigten Karbonketten zusammen mit Cholesterol in Strukturen zusammenfinden, die eine hohe Ordnung aufweisen, wohingegen Phospholipide mit oft ungesättigten und daher geknickten Fettsäuren sich hier nicht integrieren können. Inwieweit weitere Lipide und Proteine sich innerhalb dieser Lipid Rafts aufhalten können, hängt also von ihrer Fähigkeit ab, ihre Fettsäureketten bzw. Transmembrandomänen ohne Störung in diese hohe Ordnung zu integrieren. Die Lipid Rafts könnten nach dieser Theorie bestimmte Lipide und Proteine in ihrer Struktur akkumulieren und die physikalische Basis für eine Konzentration von Membranproteinen und Glykolipiden in definierten Regionen auf der Zelloberfläche liefern [6, 22].

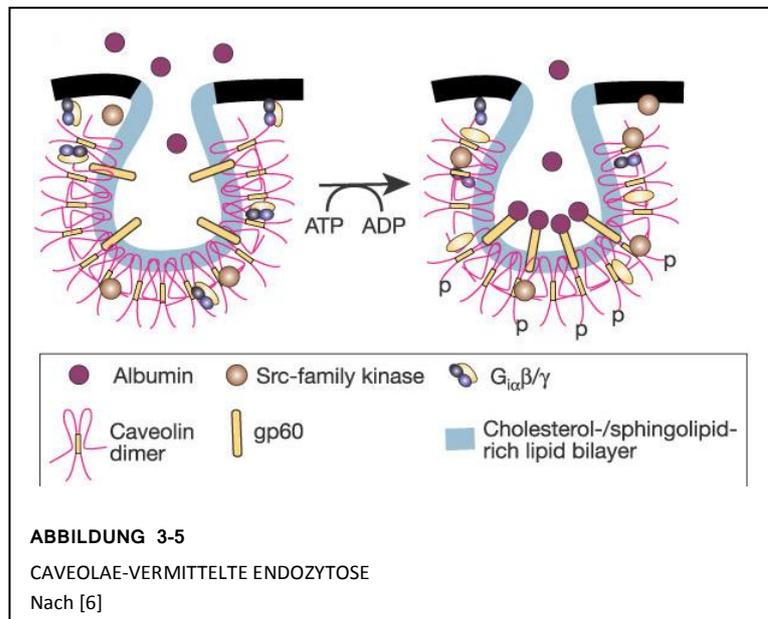
Beispiele für über Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose aufgenommene Substanzen sind der Interleukin-2 Rezeptor β auf Lymphozyten, der über RhoA-abhängige Endozytose internalisiert

wird sowie Glycophosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine, für die eine Cdc42-abhängige Endozytose gezeigt wurde [22].

Die Hemmung der Clathrin- und Caveolin- unabhängigen Aufnahmemechanismen kann durch Aktin-Polymerisations-Inhibitoren und die Entfernung von Cholesterol aus der Zellmembran erfolgen. Allerdings haben beide Ansätze den Nachteil, zusätzlich auch Effekte auf andere Endozytose-Mechanismen zu zeigen [21, 23]. Genistein ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose über eine Zerstörung des Aktin-Skeletts am Ort der Endozytose und zudem die Rekrutierung von Dynamin II verhindert [24, 25]. Allerdings ist insbesondere die Caveolae-vermittelte Endozytose, die ebenfalls mit Lipid Rafts assoziiert ist, ebenso durch Genistein hemmbar und ebenso empfindlich gegenüber Aktin-Polymerisations -Inhibitoren und der Entfernung von Cholesterol wie die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose [21].

3.3.4.4 Caveolae-vermittelte Endozytose

Caveolae sind flaschenförmige Einbuchtungen in der Plasmamembran. Ihr charakteristisches Aussehen verdanken sie dem dimeren, haarnadelförmigen Protein Caveolin-1, das mit sich selbst assoziiert und so einen Caveolin-Mantel auf der Unterseite der Membraneinstülpungen bildet [6]. Caveolae sind mit Lipid Rafts assoziiert, sphingolipid- und cholesterolreichen Regionen der Plasmamembran (siehe auch 3.3.4.3) und Caveolin selbst bindet sowohl Cholesterol als auch andere Lipide, Fettsäuren und Membranproteine und trägt so zu deren räumlicher Anordnung auf der Zelloberfläche bei. Caveolae sind in Muskelzellen, Fibroblasten und Adipozyten nachweisbar, aber nicht in Neuronen und Leukozyten



[7]. Extrem häufig treten sie in Endothelzellen auf und können hier zwischen 10 % und 20 % der Oberfläche ausmachen [6]. Caveolae sind relativ statische Gebilde auf der Zellmembran [23] und werden in den meisten Zellen nur sehr langsam internalisiert (Halbzeit $t_{1/2} > 20$ min) [6]. Die Funktion der Caveolae sind vielfältig und schließt neben der Endozytose und der Transzytose auch die Regulation von verschiedenen Signaltransduktions-Vorgängen mit ein [26]. So sind zahlreiche Signaltransduktionsmoleküle und Membrantransporter mit Caveolae assoziiert, unter anderem heterotrimere G-Proteine, Tyrosinkinasen, der Insulin-Rezeptor und die endotheliale NO-Synthase [7]. Die Caveolae-vermittelte Endozytose ist zudem die wichtigste transendotheliale Route, so initiiert die Bindung von Serumalbumin an seinen gp60-Rezeptor die Caveolae-vermittelte Transzytose von Albumin durch das Endothel (siehe auch 3.4.1 Bekannte Albumin-bindende Proteine und Rezeptoren) [6].

Vergleichbar mit der Clathrin- und Caveolin- unabhängigen Endozytose wird die Caveolae-vermittelte Endozytose durch Inhibitoren der Aktinpolymerisation, durch die Entfernung von Cholesterol aus der Zellmembran und durch Genistein gehemmt (siehe auch 3.3.4.3). Insbesondere Filipin, ein Makrolid-Antibiotikum, das aufgrund seiner Struktur mit dem Cholesterol der Zellmembran interagiert und große Aggregate bildet, wird verbreitet zu Untersuchung der Caveolae-vermittelten Endozytose eingesetzt [21, 27-30]. Aufgrund des Wirkmechanismus wird jedoch die Aufnahme von Lipid-Raft Liganden ebenso gehemmt [21], und zusätzlich zerstört Filipin auch die Verbindung zwischen dem F-Aktin des Zytoskeletts und der Plasmamembran [31]. Nichtsdestotrotz gilt Filipin als relativ spezifischer Inhibitor für die Lipid Raft / Caveolae-vermittelter Endozytose [21]. PP2, ein Inhibitor der Src-Tyrosinkinase-Familie, inhibiert die Dynamin-abhängige Abschnürung der aus den Caveolae generierten Vesikel von der Zellmembran [32].

3.3.4.5 Clathrin-vermittelte Endozytose

Clathrin-vermittelte Endozytose (clathrin- mediated Endocytosis = CME) wurde früher synonym mit dem Begriff „Rezeptor-vermittelte Endozytose“ bezeichnet, aber mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur die CME sondern die meisten Mechanismen der Pinozytose über Rezeptor-Ligand Interaktion verlaufen [6]. CME ist in allen eukaryotischen Zellen aktiv [33] und hat neben der Aufnahme von essentiellen Nährstoffen auch weitergehende Funktionen, da durch sie die Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche reguliert werden kann. Über die Internalisierung von Membranrezeptoren und -pumpen hat die Clathrin-vermittelte Endozytose einen Einfluss auf Schlüsselfunktionen der Zelle wie der Homeostase, Wachstumskontrolle, Zelldifferenzierung und der synaptische Transmission [6, 7, 33].

Clathrin selbst besteht aus drei schweren Ketten (clathrin heavy chain = CHC), von denen jede mit einer leichten Kette assoziiert ist, wodurch die typische dreibeinige Struktur des Moleküls entsteht [6]. Diese Monomere polymerisieren miteinander zu hexagon- und pentagonartigen Strukturen, wodurch sie sich an unterschiedlichste Membraneinstülpungen bzw. -formen anlagern können. Clathrin ist nicht nur für die Clathrin-vermittelte Endozytose essentiell, sondern hat auch andere Funktionen, wie die ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) – abhängige Sortierung aufgenommener Substanzen im Endosom, der Proteinsekretion aus dem Golgi-Netzwerk und der Mitose. Obwohl Clathrin-ummüllte Vesikel so auch aus intrazellulären Membranen entstehen können, wird der Begriff CME nur für die Bildung von Clathrin-ummantelten Vesikeln aus der Zellmembran verwendet [33].

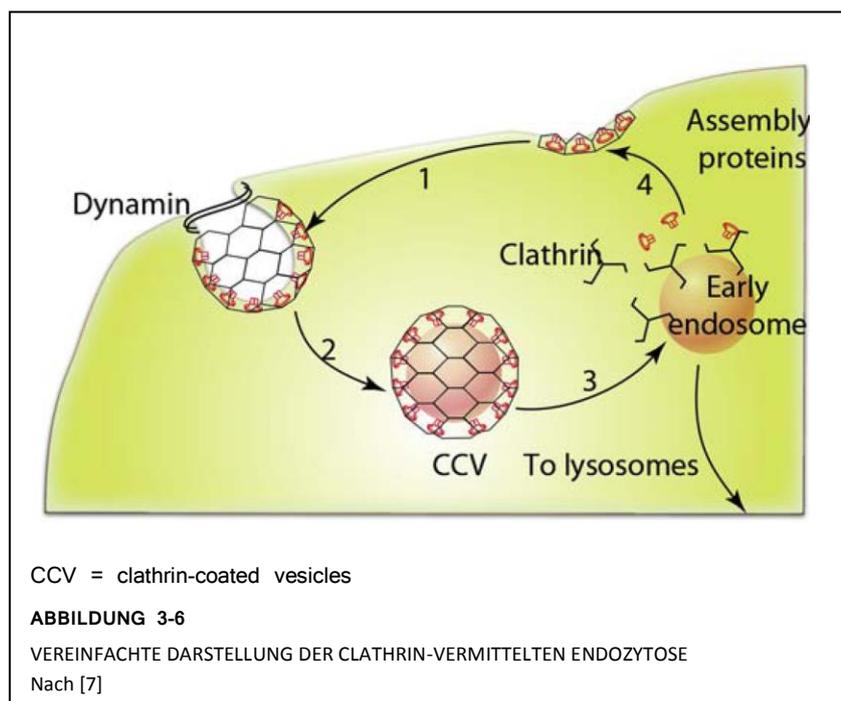
Die Bildung der Clathrin-ummüllten Vesikel in der CME entsteht in fünf Stufen. Clathrin selber bindet nicht an die Zellmembran oder an membranständige Rezeptoren und ist somit auf die Hilfe von Adapterproteinen bzw. -komplexen sowie von sogenannten Accessory Proteins angewiesen. Eines der Schlüsselproteine ist das Adapterprotein AP2, das sowohl an $\text{PtIns}(4,5)\text{P}_2$ in der Zellmembran als auch an Clathrin bindet. Nach der initialen Ausbildung einer Senke in der Membran wird AP2 rekrutiert und es bildet sich ein Clathrin-Netzwerk auf der Innenseite der Membran, weswegen diese erste Stufe in der CME als Bildung eines „clathrin-coated pit“ bezeichnet wird. Der nächste Schritt ist die Auswahl der aufgenommenen Substanzen, des Cargo. AP2 bindet direkt an die cytoplasmatische Region von vielen Transmembranrezeptoren und vermittelt so deren Konzentration in den clathrin-coated Pits. Zusätzlich kann diese Anreicherung von Membranrezeptoren indirekt über Cargo-spezifische Adapterproteine erfolgen, so exprimieren Leberzellen das Adapterprotein ARH, welches

die Bindung zwischen AP2 und dem Low-density Lipoprotein Rezeptor (LDLR) vermittelt. Die Expression der Adapterproteine kann je nach Zelltyp unterschiedlich sein, was die selektive Aufnahme einzelner Substanzen in spezifische Zellen ermöglicht. Zudem verhindern Cargo-spezifische Adapterproteine, dass ein stark exprimierter Membranrezeptor die Aufnahme eines weniger präsentierten Rezeptors hemmt [33].

Aus dem clathrin-coated Pit entsteht in einem nächsten Schritt eine Clathrin-ummantelte Einstülpung in der Membran, die schlussendlich mit Hilfe der GTPase Dynamin abgeschnürt wird und ein Clathrin-umhülltes Vesikel bildet (vgl. Abbildung 3-6). Die Polymerisation der Clathrin-Monomere reicht wahrscheinlich nicht für diese ausgeprägte Verformung der Membran, die wohl durch zusätzliche Effektoren wie Epsin hervorgerufen und durch den Clathrin-Käfig stabilisiert wird. Ein synaptisches Clathrin-umhülltes Vesikel benötigt z.B. ungefähr 100 Clathrin-Moleküle [33].

Nach der Abschnürung der Vesikel kommt es dann zu einem „Uncoating“, bei dem der Clathrin-Mantel durch die ATPase HSC70 (heat shock cognate 70) und dem dazugehörigen Co-Faktor Auxilin auseinandergenommen wird. Das so freigesetzte Vesikel ist dann in der Lage, mit einem Early Endosom zu verschmelzen. Sowohl Clathrin als auch die anderen Adapter- und Accessory Proteine stammen aus dem Cytosol und werden nach dem Uncoating auch wieder hierhin zurück recycelt, um an einem weiteren CME-Kreislauf teilzunehmen [33].

Aktin ist in vielen Zelltypen nicht essentiell für die Aufnahme von klassischen CME-Liganden wie Transferrin, dennoch kann es an der Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln beteiligt sein. Die Rekrutierung erfolgt meist erst kurz vor der Abschnürung und es wird vermutet, dass Aktin zusätzliche Energie für die Abschnürung von sehr großen Vesikeln liefert wie sie wahrscheinlich bei einer hohen Starrheit der Membran nötig ist [33].



Membranrezeptoren werden entweder konstitutiv internalisiert oder erst nach Ligandenbindung. Der Transferrinrezeptor TfR1 und der Low-density Lipoprotein Rezeptor LDLR sind Beispiele für konstitutiv internalisierte Rezeptoren, wobei TfR1 direkt an AP2 bindet, während LDLR das Protein ARH als cargospezifischen Adapter benötigt. Rezeptortyrosinkinasen wie der „Epidermal Growth Factor Receptor“ EGFR und G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie der β_2 -Rezeptor werden hingegen ligandeninduziert aufgenommen. Die Bindung des Liganden induziert eine Dimerisierung (bei Rezeptortyrosinkinasen) oder eine Konformationsänderung (bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren),

wodurch sie entweder AP2 (Beispiel EGFR) oder ihre jeweiligen cargo-spezifischen Adaptorproteine (Beispiel β_2 -Rezeptor) binden können und in die clathrin-coated Pits rekrutiert werden. Nach der Aufnahme in die Zelle werden die Rezeptoren von ihren Liganden getrennt und entweder zurück zur Zelloberfläche transportiert oder in den Lysosomen abgebaut [33]. Bei Transferrin führt die saure Umgebung zur Freisetzung von zwei Fe^{3+} -Ionen aus dem holo-Transferrin, also dem mit Eisen beladenen Transferrin-Molekül. Der Transferrin-Transferrinrezeptorkomplex wird dann zurück zur Zelloberfläche recycelt, wo er beim physiologischen pH-Wert 7,4 dissoziiert und apo-Transferrin, also das unbeladene Molekül, wieder freigesetzt wird [34]. Der TfR gelangt innerhalb von Minuten nach seiner Internalisierung wieder an die Zellmembran und ist neben dem LDLR einer der klassischen Membranrezeptoren, die benutzt werden, um CME zu untersuchen.

3.3.4.6 Methoden zur Hemmung der CME

Die Clathrin-abhängige Endozytose kann durch Monodansylcadaverin (MDC), Phenylarsinoxid (PAO), Chlorpromazin, hypertone Sucrose, Kaliummangel und cytosolische Ansäuerung gehemmt werden. [33]. Alle diese Techniken rufen jedoch auch unspezifische Effekte hervor. Spezifischere Effekte lassen sich durch RNAi-Interferenz, die gegen Clathrin Heavy Chain oder den α - bzw. μ_2 -Untereinheiten von AP2 gerichtet sind, erzielen. Die Überexpression von mutierten Adapterproteinen ist eine weitere Möglichkeit, die CME zu untersuchen [33].

Die Wirkung von Monodansylcadaverin (MDC) beruht wahrscheinlich auf der Stabilisierung von clathrin-coated Pits auf der Zellmembran und erfolgt in Konzentrationen von 100-300 μM . Obwohl keine inhibitorischen Effekte auf Lipid-Raft-abhängige bzw. Caveolae-vermittelte Endozytose bekannt sind, wird ein Einfluss auf die Phagozytose und Macropinozytose immer noch diskutiert. MDC hat zudem inhibitorische Effekte auf Mitglieder der Transglutaminasen, was wiederum zu Veränderungen in der Organisation und Dynamik des Aktin-Zytoskeletts führen könnte [21].

Warum Phenylarsinoxid (PAO) bereits in sehr niedrigen Konzentrationen (1-20 μM) die CME hemmt, ist bisher unklar. Neben der CME sind auch die Macropinozytose und die Phagozytose empfindlich gegenüber PAO. PAO hat einen starken Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts, wahrscheinlich sowohl durch die Inhibition von Hauptregulatoren wie Protein Tyrosin Phosphatasen und Rho GTPasen als auch über die Verminderung des intrazellulären ATPs. Durch die ausgeprägten Endozytose-unspezifischen Effekte ist PAO als Inhibitor der CME nur bedingt geeignet [21].

Chlorpromazin, eingesetzt in Konzentrationen von 50-100 μM , hemmt die CME wahrscheinlich durch den Zusammenschluss von Clathrin und dem AP2-Adapterkomplex auf endosomalen Membranen, wodurch die Moleküle nicht mehr auf der Zellmembran präsent sind [35]. Inhibitorische Effekte auf die Lipid-Raft- bzw. Caveolae-vermittelte Endozytose sind nicht bekannt, ein Einfluss auf die Phagozytose und eventuell die Macropinozytose allerdings schon. Chlorpromazin hemmt die Phospholipase C, welche für die Regulation der Aktin-Dynamik und der Macropinozytose wichtig ist, und kann sich zudem als amphiphiles Molekül in die Lipid-Doppelmembran einfügen, was zu Veränderungen der Membranfluidität und damit potentiell zur Störung der Bildung von großen Membraneinstülpungen führen könnte [21].

Kalium-Mangel inhibiert die CME wahrscheinlich über eine verminderte Ausbildung von Clathrin-Netzwerken auf der Plasmamembran [36]. Die Technik wird in zwei Schritten durchgeführt: nach einem initialen hypotonen Schock folgt eine Inkubation in isotonischem, kaliumfreien Medium.

Obwohl Kalium-Mangel einen Einfluss auf das Zytoskelett haben kann, gilt diese Art der Inhibition als relativ spezifisch für die CME. Es sind keine Effekte auf Caveolae-vermittelte Endozytose bekannt, allerdings wurde teilweise die verminderte Aufnahme von Fluid-Phase Markern gezeigt [21].

Cytosolische Ansäuerung wird eingesetzt, um über einen Abfall des cytosolischen pH-Wertes die Abschnürung der Vesikel von der Zellmembran zu verhindern. Gleichzeitig hat ein veränderter intrazellulärer pH-Wert jedoch auch ausgeprägt Effekte auf das Aktin-Zytoskelett, das intrazelluläre Trafficking und auf andere Aufnahmewege wie der Macropinozytose [21].

Hypertone Sucrose (0,4-0,5 M) zerstört die Clathrin-Netzwerke auf der Plasmamembran und inhibiert so die Clathrin-abhängige Endozytose. Allerdings verschwinden auch nicht-Clathrin-ummantelte Einstülpungen wie Caveolae [37] und die Aufnahme von klassischen Lipid-Raft-Liganden wie Cholera Toxin und des Fluid-Phase Markers Meerrettich Peroxidase wird ebenfalls gehemmt. Zusätzlich wurde in kardialen Myozyten nach Exposition mit moderat hypertoner Sucrose (150 mM) auch ein abnormales Anschwellen der Caveolae beobachtet und ein Verschwinden von Caveolae-residenten Proteinen. Zudem induziert eine extrazelluläre Hypertonizität ein Schrumpfen der Zellen, was im Gegenzug eine kompensierende Aktivierung von Ionen transportern, Pumpen und Kanälen auf der Plasmamembran verursacht. Neben diesen Effekten hat die hypertone Sucrose zudem einen Einfluss auf die Architektur des F-Aktins [21].

Keiner der oben genannten Techniken weist also eine absolute Selektivität für die CME auf, insbesondere hemmen viele Inhibitoren die Aufnahme von Fluid-Phase Markern und beeinflussen die Organisation des Zytoskeletts, was enorme Veränderungen hinsichtlich der Lokalisation und Funktion von Plasmamembranproteinen führen kann. Chlorpromazin, Kaliummangel und MDC sind dennoch für eine erste Untersuchung auf Clathrin-vermittelte Endozytose geeignet, während PAO und hypertone Sucrose eine so große Anzahl unspezifischer Nebeneffekte verursachen, dass die Interpretation der durch sie gewonnenen Daten stark erschwert wird [21].

Eine Untersuchung der CME durch die Verwendung von RNAi-Interferenz oder stabil transfizierten Mutanten ist ebenfalls möglich. Vorsicht bei der Interpretation der Ergebnisse ist trotz der spezifischen Blockade einzelnen Proteinen geboten, da die zur Transfektion benutzten Reagenzien ebenfalls einen Effekt auf die Zellphysiologie ausüben können [7]. Zudem ist Clathrin nicht nur für die Bildung von Clathrin-ummantelten Vesikeln aus der Zellmembran essentiell, sondern spielt auch eine Rolle beim Sortieren der aufgenommenen Ladung im Endosom und der Proteinsekretion aus dem trans-Golgi Netzwerk [38, 39]. So kann eine RNAi-Interferenz der CHC-Expression auch zu einer verminderten Präsentation eines Rezeptors auf der Zellmembran führen, indem es entweder sein Recycling oder auch seinen Transport aus dem Golgi-Apparat stört. Indirekt würde so die Aufnahme einer Substanz in die Zelle durch die CHC RNAi verhindert, auch wenn die eigentliche Endozytose Clathrin-unabhängig ist. AP2 ist eines der wichtigsten Proteine für die Bildung der clathrin-coated Pits auf der Zellmembran und bietet sich somit als weiteres Target für eine RNAi-Interferenz an. Allerdings ist ein extensives Knock-down nötig, da sich selbst bei 90 % Inhibition durch RNAi noch AP2 in den wenigen clathrin-coated Pits, die an der Zellmembran gebildet werden, befindet [33].

Dynamamin, dessen Funktion entweder durch RNAi, Inhibition mit Dynasore, Dynole-34-2 oder Dyngo 4a, sowie durch die stabile Transfektion mit disfunktionalen Mutanten gehemmt werden kann, hat neben der CME auch Aufgaben in anderen Prozessen wie zum Beispiel der Caveolae-

vermittelten Endozytose, weswegen eine verminderte Aufnahme einer Substanz nach der Inhibition von Dynamin keine Aussage über einen spezifischen Mechanismus ermöglicht [6, 33].

3.4 Humanes Serumalbumin

Humanes Serumalbumin ist ein aus 584 Aminosäuren bestehendes Protein [40] mit einem berechneten Molekulargewicht von 66438 Da [41]. Die Plasmakonzentration von Albumin bei einem gesunden Menschen liegt zwischen 33 und 52 g/l, damit repräsentiert HSA ungefähr 60 % der im menschlichen Plasma vorhandenen Proteine. Es trägt so zur Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks, für den es zu 80 % verantwortlich ist, sowie zur Stabilisierung des pH-Wertes bei und agiert zudem als Antioxidans [40]. Das HSA-Molekül besitzt Bindungsstellen für verschiedenste Substanzen und arbeitet so unter anderem als Solubilisator für schlecht wasserlösliche Moleküle wie langkettige Fettsäuren oder Gallensäuren. Weitere Aufgaben von HSA sind der Transport von Bilirubin, dem Abbauprodukt des Häm, sowie von Metallionen wie Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} und Zn^{2+} . Auch Steroid- und Schilddrüsenhormone binden an Albumin, wodurch eine Art Reservoir entsteht, da die an Albumin gebundene Fraktion biologisch inaktiv ist. Neben diesen endogenen Substanzen binden auch eine Reihe von pharmazeutisch eingesetzten Wirkstoffen an Albumin, unter anderem Salicylate, Ibuprofen und Furosemid [41].

Albumin ist extrem löslich in Wasser und verdünnten Salzlösungen, so können bis zu 50 %ige Lösungen hergestellt werden. Obwohl es ein komplexes Molekül ist, kann es sich von Strukturveränderungen, die durch normalerweise denaturierende Bedingungen hervorgerufen werden, erholen. Albumin ist stabil zwischen pH 4-9, löslich in 40 % Ethanol und kann bis zu 10 h auf 60° C erhitzt werden. Auch die vollständige Spaltung der Disulfid-Brücken ist reversibel. Es enthält insgesamt 35 Cysteine, wobei nur Cystein34 nicht an intramolekulare Disulfid-Brücken beteiligt ist [41].

HSA wird in der Leber synthetisiert, wobei die Regulation über den extravaskulären kolloid-onkotischen Druck erfolgt. Unter normalen Bedingungen beträgt die Produktion ungefähr 0,2 g/kg Körpergewicht am Tag, was bei einer 70 kg schweren Person circa 15 g entspricht. Die gesamte Menge an Albumin im menschlichen Körper beläuft sich auf ungefähr 360 g, basierend auf einem zwei-Kompartiment Modell verteilt sich diese Menge zu circa 40 % im intravaskulären Volumen und zu 60 % im extravaskulären Volumen. Die durchschnittliche Halbwertszeit von HSA beträgt 18-21 Tage, wobei diese umgekehrt proportional zur Plasmakonzentration ist. Eine höhere Albuminkonzentration kann also den Abbau um bis zu 50 % erhöhen, wohingegen eine niedrige Plasmakonzentration in einer verlängerten Halbwertszeit resultiert [40, 41]. Vermittelt wird dies durch den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn), der aufgenommenes HSA in den Endosomen bindet und anschließend wieder zur Zelloberfläche transportiert. Die an den FcRn gebundene Fraktion wird somit vor dem Abbau in den Lysosomen der Zelle geschützt, über die Bindungskapazität des FcRn hinausgehende Mengen hingegen nicht, wodurch die umgekehrte Proportionalität von Plasmakonzentration und Halbwertszeit des HSA entsteht (siehe auch 3.4.1) [42-44].

Eine verringerte Menge an zirkulierendem Albumin ist charakteristisch für verschiedene Erkrankungen, so für akute Sepsis, Trauma oder nach großen Operationen [40]. Hypoalbuminämie ist ein negativer prognostischer Faktor für Patienten mit neu diagnostizierten unheilbaren

Krebserkrankungen und assoziiert mit einem verkürzten Überleben der Patienten [45]. Im Gegenzug wurde eine im üblichen Bereich liegende Konzentration an Serumalbumin bei Patienten, die an gastrointestinalen Karzinomen erkrankten, in 26 von 29 Studien mit einem besseren Überleben assoziiert. Bis jetzt fehlt allerdings der Beweis, dass eine Erhöhung der Albumin-Konzentration durch Infusion oder Hyperalimentation die Mortalität verringert [46]. Obwohl die Anwendung von HSA und insbesondere von Albumin-Infusionen im klinischen Alltag weit verbreitet ist (siehe auch 3.4.2) und unter anderem auch bei hypovolämischen Patienten oder Patienten mit starken Verbrennung eingesetzt werden, ist hier bisher ebenfalls nicht bewiesen worden, dass ein Albumin-Ersatz die Sterblichkeit dieser Patienten verringert, insbesondere wenn man diese Therapie mit günstigeren Alternativen wie infundierten Salzlösungen vergleicht [47].

Ein erhöhter Abbau von Albumin bei progressiven malignen Erkrankungen wurde in den 1950er Jahren festgestellt [48]. C. Andersson et al. publizierten 1991, dass das Tumorgewebe in Sarkomtragenden Mäusen Albumin und andere Plasmaproteine im höheren Maße zur Nährstoffversorgung benutzten als normales Gewebe [49]. Stehle et al. postulierten 1997 auf der Basis von Versuchen mit radioaktiv markiertem Albumin in Ratten, dass der Tumor selbst den Ort des höchsten Albumin-Katabolismus im Körper darstelle und somit einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung der Kachexie und Hypoalbuminämie in Krebspatienten leiste. Albumin dient ihrer Theorie nach als Energie- und Stickstoff-Quelle für die stark proliferierenden Zellen des Tumors [50].

Auch Patienten mit aktiver rheumatoider Arthritis entwickeln häufig eine Kachexie und zeigen reduzierte Serumalbuminkonzentrationen [51-53]. Ein Merkmal der rheumatoiden Arthritis ist die im Vergleich zu gesundem Gewebe ungefähr 6-fach erhöhte Extravasation von Albumin in die entzündeten Gelenke [54]. Wunder et al. zeigten, dass sich Albumin in den entzündeten Zehen von Mäusen mit kollagen-induzierter Arthritis einlagert [55]. Die Aufnahme von Plasmaproteinen wie HSA in synoviale Zellen, deren Metabolismus durch die Entzündung hochreguliert ist, könnte durch den hohen Bedarf an Stickstoff und Energie begründet sein [56].

3.4.1 Bekannte Albumin-bindende Proteine und Rezeptoren

Wie bereits oben erwähnt, bindet der neonatale Fc-Rezeptor durch Endozytose aufgenommenes Albumin und ist durch einen Transport des gebundenen HSA zurück zur Zelloberfläche in der Lage, die Halbwertszeit von Albumin abhängig von der Plasmakonzentration zu verlängern. Für oxidierte, konformativ veränderte sowie stark glycosilierte Albumin-Moleküle hingegen gibt es „Scavenger Rezeptoren“, die so modifiziertes HSA binden und aus der Zirkulation entfernen. Albondin, oder auch gp60, ist hingegen ein Rezeptor, der die Caveolin-abhängige Transzytose von nativem Albumin durch das Endothel vermittelt. Im proximalen Tubulus der Niere wiederum befinden sich die Albumin-bindenden Proteine Megalin und Cubulin, durch die die Reabsorption des in den Primärharn gefilterten HSA erfolgt. Zusätzlich wird eine Albumin-Endozytose durch den Transforming Growth Factor beta Rezeptor Typ II (TGFβRII) und die Aktivierung der TGFβ-rezeptorabhängigen Signalkaskade durch HSA in der Literatur beschrieben.

3.4.1.1 Neonataler Fc-Rezeptor (FcRn)

Der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) transportiert während einer Schwangerschaft die IgG Moleküle der Mutter über die Plazenta zum Fötus und stellt so eine passive Immunität des heranwachsenden

Kindes sicher. Später sichert die Bindung von IgG an FcRn die lange Halbwertszeit dieser Proteine in der Zirkulation, da der neonatale Fc-Rezeptor in die Zelle aufgenommene IgG Moleküle wieder zur Zelloberfläche transportiert [57]. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass der FcRn nicht nur IgG bindet und vor dem Abbau in den Lysosomen schützt, sondern über einen vergleichbaren Mechanismus zudem eine entscheidende Rolle in der Albumin-Homeostase spielt [44, 58]. Die pH-abhängige Bindungsaffinität der Moleküle zueinander spielt hier eine entscheidende Rolle. Der neonatale Fc-Rezeptor befindet sich hauptsächlich in leicht sauren, endosomalen Kompartimenten, wo er eine hohe Bindungsaffinität zu IgG und Albumin besitzt. Die Bindung der Liganden an den FcRn resultiert in den Transport der Liganden-Rezeptor-Komplexe zurück zur Zelloberfläche, wo sie, bedingt durch den vorherrschenden physiologischen pH-Wert, wieder von dem Rezeptor dissoziieren [59]. Dieses Rezeptor-abhängige Recycling ist sättigbar, somit wird proportional mehr HSA in den Lysosomen abgebaut, wenn durch höhere Serumkonzentrationen größere Mengen an HSA vorliegen. Bei geringen Serumkonzentrationen ist hingegen der proportional durch FcRn von dem Abbau geschützte Anteil höher und die durchschnittliche Halbwertszeit des HSA wird so stark verlängert [42, 43].

Der FcRn-vermittelte Schutz von IgG gegen Katabolismus findet wahrscheinlich hauptsächlich im vaskulären Endothel statt. Zusätzlich wird der neonatale Fc-Rezeptor aber auch im Darmepithel, in den Epithelzellen der Nierentubuli, den Podozyten der Niere sowie von antigen-präsentierenden Zellen wie Monozyten und Macrophagen exprimiert. Eine starke Expression findet sich zudem im Endothel des zentralen Nervensystems (ZNS), wo es wahrscheinlich für den Rücktransport von IgG aus dem ZNS zurück in die Zirkulation verantwortlich ist. Die Expression in der Lunge ist beim Menschen hauptsächlich im Epithel der oberen Luftwege nachweisbar [57].

3.4.1.2 Scavenger Rezeptoren

Der Plasmahalbwertszeit von Albumin ist stark verkürzt, wenn das Protein oxidiert oder seine Konformation verändert ist [60-62]. Stark glykosiliertes Albumin gehört in die Gruppe der AGE (advanced glycation end products), die durch eine Maillard-Reaktion mit Glucose gebildet werden und im Zuge der Alterung und bei Diabetes entstehen [63]. Zu den Rezeptoren, die diese AGE aus der Zirkulation entfernen, gehören unter anderem das Zelloberflächenglykoprotein CD36 [64], LOX-1 (Lectin-like oxidizes low-density lipoprotein Rezeptor 1) [65], SREC-1 (Scavenger Receptor expressed by endothelial cells -1) [66], FEEL-1 und FEEL-2 (fasciclin EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-1 bzw. 2 [63], sowie die Scavenger Rezeptoren Klasse AI / AII [67, 68]. Chemisch modifizierte Maleyl- und Formyl-Derivate von Albumin hingegen binden an die Albumin Scavenger Rezeptoren gp 18 und gp30 auf den Endothelzellen der Leber [69, 70]. Stehle et al. zeigten 1997 am Beispiel von Methotrexat-Albuminkonjugaten in Ratten, dass Albuminmoleküle mit einer hohen Beladung an Methotrexat durch Scavenger-Rezeptoren in der Leber abgefangen wurden und nur Konjugate mit einer durchschnittlichen Beladungsrate von ungefähr einem Molekül Methotrexat zu einem Molekül Albumin eine selektive Anreicherung im Tumor zeigten [71].

3.4.1.3 Albondin

Natives Albumin bindet an Albondin (gp60) auf dem Endothel, was zu einer Transzytose von Albumin aus dem Blutgefäß in das umliegende Gewebe führt [72, 73]. Obwohl die ersten Arbeiten über gp60 aus den späten 1980er Jahren stammen [74], wurde die Rolle von gp60 als Albumin-bindender

Rezeptor, der einen Transport von Albumin durch die Endothelzellen hindurch vermittelt, bis Anfang der 2000er Jahre kontrovers diskutiert [75, 76]. Albondin sitzt in den Caveolae der Endothelzellen und die Bindung von Albumin führt wahrscheinlich zu einem Zusammenschluss mehrerer Rezeptoren [6]. Dieses „clustering“ wiederum aktiviert, durch $G_{i\alpha}$ -vermittelt, die Phosphorylierung von Caveolin-1 durch Src-Tyrosinkinasen [32, 77, 78] und führt schlussendlich zur Internalisierung der aus den Caveolae gebildeten Vesikeln [79].

Albondin wurde im Kapillarendothel von verschiedenen Rattengewebe nachgewiesen, so im Herzen, in der Lunge, im Fettgewebe und der Skelettmuskulatur. In den Gefäßen der Pankreas, der Leber und der Dünndarmmukosa, die nicht mit einem kontinuierlichen, sondern mit einem fenestrierten oder sinusoidalen Endothel ausgelegt sind, wurde es hingegen nicht gefunden [73]. Die einzige bisher bekannte Ausnahme sind die Kapillaren des Gehirns, welche trotz ihres kontinuierlichen Endothels keinen gp60-Rezeptor für die Transzytose von Albumin aufweisen [73, 80]. Zusätzlich zu dem Albumintransport im Endothel wurde die Transzytose von Albumin durch gp60 auch in alveolaren Epithelzellen der Ratte nachgewiesen [27].

3.4.1.4 Megalin und Cubulin

Zwei weitere Albumin-bindende Rezeptoren sind die Proteine Megalin und Cubulin, die ausgeprägt im proximalen Tubulus der Niere exprimiert werden und dort unter anderem für die Reabsorption gefilterter Proteine verantwortlich sind [81]. Megalin ist ein 600 kDa Transmembranprotein, das zur LDL (Low Density Lipoprotein) Rezeptorfamilie gehört [82]. Die Sequenz für Cubilin hingegen liefert weder Hinweise auf eine Transmembrandomäne noch auf Strukturen, die für eine Interaktion mit Adapterproteinen oder anderen Bestandteilen der Clathrin-vermittelten Endozytose nötig sind [83]. Megalin und Cubilin binden einander jedoch hochaffin und koloalisieren in verschiedenen Geweben [83], so auch im proximalen Tubulus der Niere [84]. Da Cubilin trotz der fehlenden Interaktion mit den Bestandteilen der Endozytose-Mechanismen für die Reabsorption des gefiltertem Albumins im proximalen Tubulus essentiell ist, wird vermutet, dass der Cubilin-Albumin-Komplex über die Bindung an Megalin internalisiert wird [85]. Megalin und Cubulin teilen sich neben Albumin eine Reihe weiterer Liganden, wobei für Megalin bisher die größere Anzahl an Bindungspartnern identifiziert wurde, unter anderem der Epidermale Growth Factor EGF, das Vitamin-D bindende Protein DBP und Insulin [81]. Für Cubulin wurde zusätzlich zum proximalen Tubulus auch eine starke Expression im Epithel des Dünndarms und der Plazenta nachgewiesen. Megalin hingegen wird in vielen endothelialen Zellen exprimiert, zusätzlich zum proximalen Tubulus unter anderem auch in der Schilddrüse, im Endometrium und in Typ II Pneumozyten [86]. Megalin soll zudem für einen clathrin-vermittelten transendothelialen Transport von Albumin aus den Alveolen der Kaninchenlunge verantwortlich sein [87].

3.4.1.5 Transforming Growth Factor beta Rezeptor Typ 2 (TGF β RII)

Der Transforming Growth Factor beta Receptor Typ 2 (TGF β RII) ist ein auf dem vaskulären Endothel präsent Albumin-bindendes Protein und vermittelt in Ratten die Endozytose von HSA in die Epithelzellen der Lunge. Albumin induziert hier zudem die TGF β R II abhängige Signalkaskade, wofür Sequenzhomologie von Albumin und TGF β verantwortlich sein könnten [88]. Auch in Astrozyten soll Albumin die TGF β R-abhängige Signalkaskade aktivieren [89] und durch den TGF β -Rezeptor vermittelt in die Zellen aufgenommen werden [90].

TGFβ1 wiederum soll die Megalin-Cubulin-vermittelte Endozytose von Albumin in OK-Zellen (opposum kidney cells), welche aus dem proximalen Tubulus des Opossums stammen, induzieren [91]. Im Gegensatz hierzu beschreiben andere Autoren die Hemmung der Albumin-Aufnahme durch TGFβ1 in IRPT Zellen, einer immortalisierten Zelllinie aus dem proximalen Tubulus der Ratte [92]. Eine weitere Publikation fand eine verstärkte Sekretion von TGFβ1 in proximalen Tubuluszellen nach der Exposition derselben gegenüber Albumin, dies allerdings unabhängig von einer Albumin-Endozytose sowie von der Interaktion mit dem TGF beta Rezeptor II und der Interaktion mit Megalin [93].

3.4.2 Humanes Serumalbumin in der Forschung und klinischen Anwendung

Albumin-Präparationen werden in der Klinik benutzt um Schock, Verbrennungen und Hypalbuminämie zu behandeln und zudem bei Operationen und akutem Trauma eingesetzt [94]. Zusätzlich wird HSA als Stabilisator für pharmazeutische Produkte wie Impfstoffe, rekombinante Therapien und Beschichtungen von Medizinprodukten benutzt [95].

Die Entwicklung von rekombinantem Serumalbumin ermöglicht die Herstellung von HSA ohne auf humanes Plasma angewiesen zu sein. Recombin™ von Novozym erfüllt als erstes die Anforderungen der Monographie für rekombinantes Albumin der USP-NRF (2009) und wird unter anderem für die Herstellung des Masern-Mumps-Röteln-Impfstoffs (MMRVaxpro) von Sanofi-Pasteur verwendet. Zusätzlich bietet Novozym seine Albufuse™-Technologie zur Herstellung von rekombinanten Albumin-Fusionproteinen an und hat zudem sequenz-modifizierte Varianten von Albumin im Programm, die durch eine verstärkte Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor eine bis zu doppelt so lange Halbwertszeit als natürliches Albumin aufweisen sollen [96].

Auch ohne gentechnische Herstellung besteht die Möglichkeit einer chemischen oder physikalischen Modifikation des HSA-Moleküls. An der Oberfläche zugängliche Carboxyl-Gruppen können zum Beispiel mit Hexamethyldiamin modifiziert werden, so dass primäre Amine entstehen und durch deren basische Eigenschaften sogenanntes kationisiertes Albumin entsteht [97]. Kationisiertes Albumin wird als Vektor für auf adsorptive Endozytose basierten Transport durch die Blut-Hirn-Schranke untersucht [97] und auch als Oberflächen-Modifikation für Nanopartikel [98, 99]. Unabhängig von dieser sehr speziellen Anwendung gibt es eine Vielzahl weiterer Ansätze, die vorteilhaften Eigenschaften von Albumin, insbesondere die lange Halbwertszeit, die Akkumulation in soliden Tumoren, die fehlende Immunogenität und die hohe Stabilität des Moleküls gegenüber Modifikationen und Lösungsmitteln, für die Entwicklung neuer Therapeutika auszunutzen. Neben klassischen Konjugaten werden Albumin-bindende Prodrugs untersucht, die erst *in vivo* an zirkulierendes Albumin binden sollen. Eine spezielle Abwandlung dieses Prinzips ist die verbesserte Albumin-Bindung von Wirkstoffen durch die Konjugation mit langkettigen Fettsäuren, wie sie zum Beispiel bei dem bereits zugelassenen Insulin Detemir erreicht wurde. Albumin-Fusionsproteine, die durch die Fusions des HSA-Gens mit dem eines therapeutischen Proteins und der nachfolgenden Expression in Hefezellen entstehen, wurden und werden zum Teil bereits in Phase III Studien untersucht. Im Bereich der seit langem in der Forschung präsenten Nanopartikel ist sicherlich Abraxane®, die Albumin-Nanopartikel Formulierung von Paclitaxel, eines der bekanntesten Albumin-Präparationen der letzten Jahre.

3.4.2.1 Konjugate

Das erste in klinischer Phase I/II untersuchte Konjugat des humanen Serumalbumins war Methotrexat-HSA (MTX-HSA). Methotrexat selbst hat verglichen mit anderen Zytostatika nur geringe antiproliferative Wirkung und wird nicht zur Therapie von soliden Tumoren verwendet [19]. MTX-HSA hingegen zeigte in zwei klinischen Phase II Studien mit Patienten, die an metastasierendem Nierenkarzinom erkrankt waren, bzw. mit Patienten, die eine Kombinationstherapie mit Cisplatin zur Therapie des fortgeschrittenen Blasenkarzinoms erhielten, bei jeweils 50 % eine Stabilisierung der Erkrankung. Eine komplette Remission konnte jedoch nur bei einem Patienten mit fortgeschrittenem Blasenkarzinom erzielt werden [100, 101]. Bemerkenswert ist, dass das Konjugat selbst nach Langzeit-Administration keine immunogene Reaktion bei den Patienten induzierte [102]. MTX-HSA wird derzeit dennoch nicht weiter als Tumorthapeutikum entwickelt [19]. In der Therapie der rheumatoiden Arthritis hingegen wird MTX-HSA als besser verträgliche und besser wirksame Alternative zu MTX untersucht [103].

Die Anreicherung von HSA in soliden Tumoren beziehungsweise in chronisch-entzündlichen Regionen des Körpers wird nicht nur für therapeutische Konjugate ausgenutzt, sondern auch bei der Entwicklung von spezifischen Kontrastmitteln. Mit Gadolinium-Komplexen konjugiertes HSA wurde als Kontrastmittel für die MRT zur Darstellung von Plattenepithelkarzinomen in Mäusen untersucht [104]. 5-Aminofluorescein-konjugiertes Albumin hingegen wurde bereits in Patienten erfolgreich zur Anfärbung von Hirntumoren (Glioblastomen) während der Operation benutzt [105].

Andere Ansätze in der Forschung beschäftigen sich mit Albumin-Konjugaten, die Liganden für ein aktives Targeting enthalten. Beispiele hierfür sind unter anderem mannosyliertes Albumin, welches an den Mannose-Rezeptor der nicht-parenchymalen Leberzellen binden soll [106] sowie ein Lactose-Albumin-Konjugat, das über den Galaktose-bindenden Asialoglycoprotein-Rezeptor eine spezifische Anreicherung in der Leber zum Ziel hat [107]. HSA-Konjugate mit Mannose-6-Phosphat hingegen sollen an den in verschiedenen Tumoren exprimierten Mannose-6-Phosphat/Insulin-like Growth Factor Rezeptor binden und wurden als Trägersystem für Doxorubicin an Mäusen mit B16 Melanom erfolgreich getestet [108].

3.4.2.2 Albumin-bindende Prodrugs

Doxo-EMCH (ein (6-maleimidocapryol)hydrazon)-Derivat des Doxorubicins) ist eine Prodrug, das nach *i.v.* Applikation an das Cys34 von zirkulierendem Albumin binden soll und einen säurelabilen Linker zur Freisetzung des Doxorubicins beinhaltet [109, 110]. Es zeigte eine höhere maximal tolerierbare Dosis als das freie Doxorubicin [111] und wird nach Angaben des Herstellers CytrRx als Aldoxorubicin (früher INNO-206) in Phase II Studien untersucht. Die FDA hat Aldoxorubicin den Status als „Orphan Drug“ zur Therapie von Weichteilsarkomen und duktalem Adenokarzinom des Pankreas in Aussicht gestellt. Eine Phase III Studie soll für 2013 geplant sein [112].

Kratz et al. haben eine Reihe weiterer Albumin-bindender Prodrugs synthetisiert, die ebenfalls über eine Maleimid-Gruppe an die Thiolgruppe des freien Cys34 von zirkulierendem Albumin binden sollen. Neben Derivaten des Doxorubicins wurden auch Derivate von 5-FU und Platin II-Komplexen hergestellt, sowie eine Reihe von enzymatisch spaltbaren Linkern untersucht, die die wirksame Substanz mit Hilfe von Matrix Metalloproteasen, Cathepsin b, Urokinase oder „Prostate Specific

Antigen“ freisetzen sollen. Weiterhin wurde ein MTX-Prodrug, das durch Cathepsin oder Plasmin spaltbar ist, für die Therapie der rheumatoiden Arthritis in Mäusen untersucht [56].

Die Firma ConjuChem modifizierte therapeutische Peptide mit einem Verbindungsstück und einer Maleimid-Gruppe, um sie an Albumin zu konjugieren, und bot dies entweder als „Drug Affinity Complex“ (DAC™) Technologie beziehungsweise „Preformed-Conjugate Drug Affinity Complex“ (PC-DAC™) Technologie an. Bei der DAC™-Variante sollte die Konjugation *in vivo* an zirkulierendes Albumin erfolgen, die „preformed conjugates“ der PC-DAC™ Variante wurden hingegen *ex vivo* an rekombinant hergestelltes HSA gekoppelt. CJC-1131, ein DAC™-basiertes Maleimid-Derivat des Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1), war angeblich nach subkutaner Injektion in der Lage, an endogenes Albumin zu binden und wies danach eine Halbwertszeit von 9-15 Tagen im Menschen auf [113]. Die klinische Entwicklung wurde jedoch nicht weiter verfolgt. Laut Herstellerangaben wurde stattdessen ein preformed Konjugat mit Exenidin-4, einem GLP-1 Rezeptoragonisten, in der klinischen Phase II untersucht [114]. Die Homepage des Unternehmens ist jedoch seit Sept. 2011 nicht aktualisiert worden, was zusammen mit den finanziellen Schwierigkeiten des Unternehmens in 2010 für eine Einstellung der Geschäfte von ConjuChem spricht [115].

Eine Alternative zur kovalenten Bindung eines Prodrugs an das zirkulierende Albumin ist die auf hydrophoben Wechselwirkungen basierende reversible Bindung durch langkettige Fettsäuren. Insulin Detemir (Levemir™ Novo Nordisk) ist ein Insulin-Derivat, dem das C-terminale Threonin fehlt und an dessen terminalem Lysin eine zusätzliche C14 Fettsäurekette (Myristinsäure) gebunden ist. Insulin Detemir ist vollständig wasserlöslich und muss vor der Injektion nicht aufgeschwemmt werden. Durch die starke Selbstassoziation der Moleküle werden sie nur langsam aus dem subkutanen Depot freigesetzt, zudem binden sie durch die hydrophobe Fettsäure reversibel an Albumin, was zu einer verlängerten Halbwertszeit und verlängerter Wirkung des Insulinderivates führt. Levemir ist seit 2004 in Europa zugelassen [116, 117]. Eine ähnliche Strategie verfolgt Liraglutid (Victoza™, Novo Nordisk) das ein mit Palmitinsäure modifiziertes GLP-1 Analog darstellt, welches bis zu 99 % reversibel an Albumin bindet. Victoza™ braucht so nur einmal täglich gespritzt werden und ist für die Behandlung von Typ 2 Diabetes seit 2009 in Europa zugelassen [118].

3.4.2.3 Albumin-Fusionsproteine

Albumin-Fusionsproteine entstehen durch die Fusion des Gens für humanes Serumalbumin mit dem Gen eines therapeutischen Proteins und der nachfolgenden Expression in Hefezellen [56](Kratz 2008). Albuferon- α (Zalbin® in den USA, Joulferon® in Europa) ist ein Fusionsprotein aus Albumin und Interferon α -2b, das ähnlich wie pegyliertes Interferon eine verlängerte Halbwertszeit, weniger Immunogenität und eine verbesserte Resistenz gegenüber Proteasen aufweisen soll, und zudem nur alle 2 Wochen appliziert werden muss. Albuferon- α wurde in klinischen Phase III Studien als Therapie gegen chronische Hepatitis C getestet, zeigte aber im Vergleich zu pegyliertem Interferon stärkere Nebenwirkungen und höhere Abbruchraten, zudem starb ein Patient während der Studie an einer durch das Albuferon- α hervorgerufenen interstitiellen Lungenerkrankung, weswegen Novartis und Human Genome Services auf die Zulassung verzichteten. Eine weitere Studie mit vierwöchiger Applikation an Patienten mit dem selteneren Hepatitis C Virus Genotyp 2/3 ist jedoch in Planung [119-121].

Albiglutide ist ein Albuminfusionsprotein aus rekombinantem humanem Serumalbumin mit zwei GLP-1 (Glucagon-like Peptide 1) Molekülen, die durch eine Aminosäuresubstitution (ala8→gly)

resistent gegen den Abbau durch DPP-4 (Dipeptidyl-Peptidase 4) sind [122]. Albiglutide ist derzeit in Klinischen Phase III Studien zur Therapie von Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 [123].

3.4.2.4 Albumin-Nanopartikel

Albumin-Nanopartikel sind bioabbaubar, relativ leicht zu reproduzieren und erlauben die Funktionalisierung ihrer Oberfläche, so dass weitere Liganden für ein aktives Targeting eingeführt werden können [124]. Ein Beispiel hierfür ist die Modifikation von Albumin-Nanopartikeln mit Trastuzumab, dem gegen Her2-positive Zellen gerichteten Antikörper [125]. Eines der bekanntesten Albumin-basierten Therapeutika der letzten Jahre ist jedoch die Albumin-Nanopartikel Formulierung von Paclitaxel, das sogenannte nab-Paclitaxel.

Nab-Paclitaxel (Abraxane™) entsteht durch die Mischung des schwerlöslichen Paclitaxel mit Albumin in einer wässrigen Lösung und der nachfolgenden Passage durch einen Jet mit hohem Druck, wodurch Albumin-Nanopartikel mit einer Größe von 100-200 nm entstehen [56, 124, 126]. Nab-Paclitaxel hat eine höhere maximal tolerierbare Dosis (MTD) und eine um circa 33 % höhere Anreicherung im Tumor im Vergleich zu reinem Paclitaxel, was einerseits eine höhere Wirkstoffgabe ermöglicht und andererseits in einer höheren Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe resultiert [126]. Einer der größten Vorteile von Nab-Paclitaxel ist seine Löslichkeit, weswegen der bisher verwendeten Lösungsvermittler Cremophor EL™, der für toxische Nebenwirkungen wie Neutropenien und peripheren Neuropathien bekannt ist, überflüssig ist [127]. Abraxane hat seit 2005 eine Zulassung für metastasierendes Mammakarzinom in den USA und seit 2008 in Europa [128-130].

Die Albumin-Nanopartikel Formulierung soll die transendotheliale Passage von Paclitaxel in das Interstitium des Tumors über eine Bindung an den gp60-Rezeptor vermitteln (siehe auch 3.4.1.3 Albondin) [126, 127]. Albondin, oder auch gp60, ist für die Caveolae-vermittelte Transzytose von nativem Albumin verantwortlich [131]. Als Basis für diese Theorie dient eine Publikation, die in einem Zellkulturmodell eine erhöhte Endothelbindung und einen erhöhten Transport durch ein endotheliales Monolayer von nab-Paclitaxel, jeweils im Vergleich zu cremophor-gelöstem Paclitaxel, feststellte. Letzteres wurde durch die Konzentration von fluoreszenzmarkiertem Paclitaxel in der Kammer unter dem Monolayer bestimmt, wobei eine Inkubation mit Methyl- β -Cyclodextrin, welches Cholesterol aus der Zellmembran entfernt, diesen transendothelialen Transport verhinderte und die Autoren auf eine gp60/Caveolae-vermittelte Transzytose schließen lies [126].

Zusätzlich zu der Albondin-vermittelten Transzytose wird diskutiert, dass nab-Paclitaxel durch die Bindung an SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) im Tumorgewebe akkumuliert [132]. SPARC ist ein glycosiliertes, 43 kDa großes Protein, das eine hohe Bindungsaffinität zu Albumin besitzt [133]. Es kann sowohl von Tumorzellen als auch von Stromazellen der Tumormatrix sezerniert werden und wird durch Hypoxie und Azidität induziert [134]. Eine Überexpression von SPARC, wie sie in vielen Tumoren nachweisbar ist, ist mit einer verstärkten Tumordinvasion und Metastasen assoziiert und ein negativer prognostischer Faktor in vielen Tumorarten, so von Brust-, Prostata-, Ösophagus-, Leber-, Lungen-, Nieren-, Blasen-, und Schilddrüsenkarzinomen sowie von Hirntumoren [135]. Die Daten zur Korrelation von SPARC-Expression und erfolgreicher Therapie mit Abraxane sind jedoch widersprüchlich. Für Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen war das Ansprechen auf eine nab-Paclitaxel basierte Therapie positiv mit einer erhöhten Expression von SPARC verknüpft, SPARC negative Patienten sprachen hingegen nur zu 25 % auf die Therapie an [132]. Eine andere Studie, die

allerdings keine Patienten sondern nur aus Patienten gewonne nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome in Mäusen untersuchte, stellte jedoch fest, dass die verbesserte Wirksamkeit von nab-Paclitaxel gegenüber Cremophor-gelöstem Paclitaxel unabhängig von der endogenen SPARC Expression ist [136].

3.5 hnRNP A2/B1 und Calreticulin als Albumin-bindende Proteine

Die Basis für die Versuche dieser Arbeit bildet die Doktorarbeit von T. Fritzsche, deren Ziel die Charakterisierung von Albumin-bindenden Proteinen (ABPs) auf der Oberfläche von humanen Krebszellen war [2]. Über ein Crosslinking membranständiger Proteine mit radioaktiv markiertem HSA sowie der Isolation von Albumin-bindenden Proteinen aus aufgereinigten Plasmamembranen und der nachfolgenden Charakterisierung dieser Proteine über MALDI-TOF MS identifizierte er verschiedene hnRNPs (hnRNP A1, hnRNP A3, hnRNP A2/B1 bzw. hnRNP B1) und Calreticulin als ABPs auf der Zelloberfläche drei verschiedener Zelllinien (Brustkrebs MCF7, Melanom MV3, humane T-Zell-Leukämie CCRF-CEM) (siehe auch 3.5.3). Wegen der bekannten Assoziation von hnRNP A2/B1 und Calreticulin mit malignen und Autoimmun- Erkrankungen, beides bereits publizierte Anwendungsgebiete von HSA-Konjugaten in klinischen Prüfungen (siehe auch 3.4.2) wurden diese beiden Proteine für eine weitere Untersuchung ihrer Funktion in der Albumin-Aufnahme ausgewählt.

3.5.1 Heterogenous nuclear Ribonucleoprotein A2 /B1

hnRNP A2/B1 gehört zur Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (heterogenous nuclear ribonucleoproteins = hnRNPs), einer Gruppe von RNA-bindenden Proteinen, die eine Schlüsselrolle im mRNA-Metabolismus spielen indem sie post-transkriptionale Vorgänge wie das Splicing, den Transport, die zelluläre Lokalisation, den Abbau und die Translation der mRNA koordinieren. In humanen Zellen wurden bisher mehr als 20 unterschiedliche hnRNPs identifiziert, die nach aufsteigendem Molekulargewicht als hnRNP A1 bis hnRNP U benannt wurden [137]. hnRNPs gehören zu den am meisten exprimierten Proteinen in der Zelle und ihr Expressionslevel ist vergleichbar mit denen von Histonen [138]. Obwohl hnRNPs größtenteils im Nucleus nachweisbar sind, sind einige von ihnen, zum Beispiel hnRNP A1, D, F/H und K auch im Zytoplasma vorhanden [139]. hnRNP A2/B1 und hnRNP Q kommen ebenfalls im Zytoplasma in den mRNA-Granules vor und regulieren so das Trafficking der mRNA [138]. Eine Isoform von hnRNP M ist zudem ein membrangebundener Rezeptor [138].

Die hnRNP A/B Gruppe besteht aus den Isoformen A1, A2/B1 und A3 mit einem Molekulargewicht zwischen 32-40 kDa [137]. hnRNP B1 ist eine Splice-Variante von hnRNP A2 und unterscheidet sich von diesem nur durch 12 zusätzliche Aminosäuren [140]. hnRNP A2/B1 gehören zu den in Zellen am meisten vorkommenden Proteinen [138]. Die Expression und die Relation von hnRNP A2 zu B1 unterscheidet sich in unterschiedlichen Zelltypen [141], wobei hnRNP B1 nur zu 2-5 % im Vergleich zu hnRNP A2 vorliegt [137]. Die Expression der hnRNP A/B Proteine ist in der Entwicklung streng reguliert, so sind in der embryonalen Entwicklung der Lunge hohe Level an hnRNP A2/B1 nachweisbar, in der erwachsenen Lunge jedoch nicht mehr. hnRNP A2/B1 reguliert das Splicing von mRNA und antagonisiert andere Splicing Faktoren wie ASF/SF2 A10 [137]. Es ist zudem wichtig für das zytoplasmatische RNA-Trafficking [138]. hnRNP A2/B1, ebenso wie hnRNP A1 und A3, bindet

ausserdem an humane telomerische DNA-Sequenzen [142] und könnte so als molekularer Adapter agieren, der die Interaktion zwischen Telomeren und Telomerase reguliert [138].

Eine Anzahl von hnRNPs, unter anderem A1, A2, B, C, H, I und R, wurden als Autoantigene bei Autoimmunerkrankungen identifiziert [139]. hnRNP A2, B1 und B2 bilden zusammen den RA33 Komplex, ein Autoantigen, das zuerst bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) gefunden wurde [143]. Anti-RA33 ist der am besten untersuchte Autoantikörper gegen hnRNPs [139], er wurde bei 35 % der Patienten mit rheumatoider Arthritis, sowie bei 20-30 % der Patienten mit Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) und bei bis zu 40 % der Patienten mit Mixed Connective Tissue Disease (MCTD) identifiziert [143]. Das synoviale Gewebe von RA-Patienten zeigt zudem eine Überexpression und zytoplasmatische Lokalisation von hnRNP A2 [143].

Das Protein hnRNP A2/B1 wird nicht nur in Bezug auf Autoimmunerkrankungen untersucht, sondern auch in einer Reihe von anderen Erkrankungen. Bei Patienten mit Morbus Alzheimer wurde eine über die verschiedenen Stadien der Erkrankung veränderte Expression der Isoformen von hnRNP A2/B1 im Hippocampus nachgewiesen. Eine veränderte Expression von hnRNPs ist auch charakteristisch für verschiedene Krebsarten [138]. hnRNP A2/B1 Expression ist erhöht in Brustkrebs, Pankreas- und Magenkrebs, sowie erniedrigt im Schilddrüsenkarzinom. Eine verstärkte Expression von hnRNP B1 wurde bei Lungenkrebs, Ösophaguskarzinom, Leukämie und Lymphom sowie bei oralen und gastrointestinalen Krebsarten nachgewiesen [142, 144]. hnRNP A2/B1 ist ausserdem im Glioblastom überexprimiert und mit einer schlechten Prognose assoziiert [145]. Das Protein wurde zudem als potentieller prognostischer Biomarker für das hepatozelluläre Carcinom identifiziert [146]. Wie hnRNP A2/B1 zur Carcinogenese beiträgt, ist noch immer nicht vollständig geklärt [144]. Bekannt ist, dass eine Korrelation zwischen hnRNP A2/B1 Überexpression, Microsatellit-Veränderungen und dem Verlust der Heterozygotie in frühen Stadien der Malignität existiert [137]. Eine Überexpression von hnRNP A2/B1 in immortalisierten Zellen führt zu einer malignen Transformation [145]. Da das Expressionslevel von hnRNPs eng mit der Zellproliferation verknüpft ist, ist die Etablierung von „normalen“ Kontrollzellen jedoch schwierig, da immortalisierte, nicht-karzinogene Zellen eine ähnliche Expression von hnRNP-Proteinen aufweisen wie karzinogene Zelllinien [137].

hnRNP A2/B1 wurde insbesondere im Zusammenhang mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (non small cell lung cancer = NSCLC) untersucht. Durch das Immunostaining von hnRNP A2/B1 in Speichelproben konnten frühe invasive Stadien von Lungenkrebs detektiert werden [147-150]. hnRNPA2/B1 sollte so als diagnostischer Marker NSCLC bis zu zwei Jahre vor klassischen Screening-Methoden wie dem Röntgen oder cytologischen Untersuchungen erkennen [137, 142]. Neuere Untersuchungen fanden hingegen, dass nur die Splice-Variante hnRNP B1 eine hohe Spezifität für Tumorzellen aufweist. Ein positiver Nachweis für hnRNP A2/B1 war allerdings mit einer schlechten Prognose assoziiert, was eine Verwendung als prognostischen Marker ermöglichen könnte [151]. Wegen der widersprüchlichen Ergebnisse gibt es noch keinen Konsens über die Verwendung von hnRNP A2/B1 oder hnRNP B1 als diagnostischen Marker für NSCLC, insbesondere da die Rolle der hnRNP A/B Proteine in der Carcinogenese unklar ist. Dennoch wird hnRNP B1 mittlerweile als ein spezifischerer und sensitiverer Biomarker als hnRNP A2/B1 angesehen [137].

3.5.2 Calreticulin

Calreticulin (CRT) ist ein 46 kDa großes Ca^{2+} -bindendes Protein, das zum größten Teil im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist [152]. Im ER bindet Calreticulin als Chaperon-Protein an neu synthetisierte (Glyco-)Proteine, verhindert deren Aggregation und assistiert bei der korrekten Faltung [153]. Durch seine Fähigkeit, große Mengen an Ca^{2+} zu binden, ist CRT wichtig für die Ca^{2+} -Homeostase und hat direkten Einfluss auf den Gehalt an Ca^{2+} im ER [153]. Die Regulation des Ca^{2+} Metabolismus durch CRT beeinflusst wiederum zahlreiche zellulären Funktionen wie die Signalübertragung sowie ER-Funktionen wie Apoptose, Lipid- und Steroidsynthese [4, 152, 153].

CRT besitzt eine C-terminale KDEL-Sequenz, mit der es im ER zurückgehalten wird. Es ist unklar, wie CRT trotzdem das Endoplasmatische Retikulum verlassen kann [4]. Wie CRT an die Zelloberfläche gelangt, ist ebenfalls nicht gesichert [153]. CRT besitzt keine Transmembrandomäne [4], wurde aber auf der Oberfläche einer Anzahl von Zellen nachgewiesen [152]. Es wird diskutiert, dass plasmamembranständiges Calreticulin von benachbarten Zellen stammt. So führt die Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht nachweislich zu einer Aktivierung der Caspase-1 sowie der Sekretion von CRT. CRT ist zudem ein Stress-Response Protein, das zum Beispiel als Reaktion auf Hypoxie, Hitze, chemischen oder physikalischen Stress und Bestrahlung exprimiert wird [4]. In Abwesenheit einer Transmembrandomäne wurde CD91 als ein verankernder Rezeptor für CRT vorgeschlagen [154].

Nicht im ER lokalisiertes CRT ist in der Zelladhäsion involviert [4] und induziert Zellproliferation und Wundschließung in humanen Keratinozyten und Fibroblasten [153]. Auf der Zelloberfläche beeinflusst CRT eine Reihe von zellulären Funktionen, so wird der (Thrombospondin-induzierte) Zerfall der Fokalen Adhäsionen während der Zellmigration durch plasmamembranständiges Calreticulin vermittelt [4, 152]. CRT auf der Zelloberfläche interagiert zudem mit dem Komplementfaktor C1q und aktiviert das Komplementsystem [153]. C1q ist für die Entfernung von Immunkomplexen zuständig [152] und spielt eine wichtige Rolle bei der Elimination von apoptotischen Zellen durch Macrophagen über eine indirekte Interaktion mit CD91 [153]. Eine mangelnde Elimination von Immunkomplexen und apoptotischen Zellen wiederum ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. So bekommen Patienten, die kein C1q aufweisen, fast immer einen

aktiven Systemischen Lupus Erythematodes (SLE). CRT kann mit Antikörpern um die Bindung an C1q konkurrieren [152]. Autoantikörper gegen CRT wurden bei ungefähr 40 % aller SLE-Patienten gefunden, und ebenso in Patienten mit rheumatoider Arthritis, Zöliakie und angeborenem Herzblock, einer Erkrankung der

Erkrankung	CRT	Anti-CRT	
Urotheliales Karzinom	Urin		
Rheumatoide Arthritis	Serum	X	IgG
Refraktäre Zöliakie		X	IgA
Cronisch-entzündliche Darmerkrankungen		X	
Blasenkrebs	Urin		
Alzheimer-Krankheit	Gehirn		
Systemischer Lupus erythematodes	Plasma, Serum	X	IgG
Primär biliäre Zirrhose		X	IgA

TABELLE 3.2
NACHWEIS VON CALRETICULIN UND CALRETICULIN-ANTIKÖRPERN BEI VERSCHIEDENEN ERKRANKUNGEN
Nach [4]

elektrischen Weiterleitung des Herzens [4, 152, 153]. Es wird postuliert, dass CRT nicht nur eine Rolle als Autoantigen in vielen Autoimmunerkrankungen spielt, sondern über die Interaktion mit C1q zudem an der Entstehung dieser Erkrankungen beteiligt ist [153].

Autoantikörper gegen Calreticulin wurden zudem in den Sera von Patienten mit Pankreaskarzinom gefunden, was die Verwendung von Calreticulin als Biomarker für diese Krebsart ermöglichen könnte. Calreticulin wurde ausserdem als Marker für Blasenkrebs identifiziert. In verschiedenen Krebsarten ist Calreticulin überexprimiert, so beim humanen Brustkarzinom und in Hepatomzellen. Es gibt allerdings keine Korrelation zwischen dem Expressionslevel von Calreticulin und dem Progressionsgrad des Karzinoms. Auf der anderen Seite inhibieren sowohl Calreticulin als auch seine N-terminale Region, genannt Vasostatin, die Neo-Angiogenese und die Zellproliferation in humanem Burkitt Lymphom, humanem Kolonkarzinom und Lungenkrebs [153].

Neueste Erkenntnisse zeigen, dass Calreticulin einen sogenannten „immunogenen“ Zelltod von Krebszellen induzieren kann. Die Behandlung von Tumorzellen mit Anthrazyklinen beziehungsweise mit Inhibitoren der Protein Phosphatase 1 (GADD34) führen durch ein Herabsenken des Calcium-Gehaltes im ER zu einer Translokation von vorsynthetisiertem Calreticulin auf die Zelloberfläche. Dies geschieht innerhalb von wenigen Minuten [4, 153, 155], so dass Calreticulin noch vor Phosphatidylserin auf der Plasmamembran von apoptotischen Zellen nachweisbar ist [155]. Dendritische Zellen eliminieren die Calreticulin-markierten Zellen und präsentieren die Tumorantigene nachfolgend auf ihrer Oberfläche, was zu einer Aktivierung von cytotoxischen, CD8⁺-positiven T-Zellen gegen die apoptotischen Krebszellen führt. Ohne CRT auf der Zelloberfläche fehlt diese adaptive Immunantwort gegen den Tumor. Die Adsorption von CRT an lebende Krebszellen alleine verstärkt die Phagozytose durch Dendritische Zellen *in vitro* und *in vivo*, ist aber abhängig von einer Zelltod-induzierenden Chemotherapie. Den Autoren gelang in Mäusen zudem eine Tumorregression durch eine Impfung der Tiere mit Calreticulin-exprimierenden Tumorzellen [155].

3.5.3 Die Arbeit von T. Fritzsche et al.

Das Ziel der Arbeit war der Nachweis und die Charakterisierung von Albumin-bindenden Proteinen (ABPs) auf der Oberfläche von humanen Krebszellen. T. Fritzsche verwendete verschiedene Methoden, um die Existenz von ABPs auf der Zellmembran von Brustkrebszellen (MCF7), Melanomzellen (MV3) und einer humanen T-Zell-Leukämie (CCRF-CEM) nachzuweisen, die nachfolgend genauer erläutert werden [2, 5].

3.5.3.1 Crosslinking mit ¹²⁵I-ASD-HSA

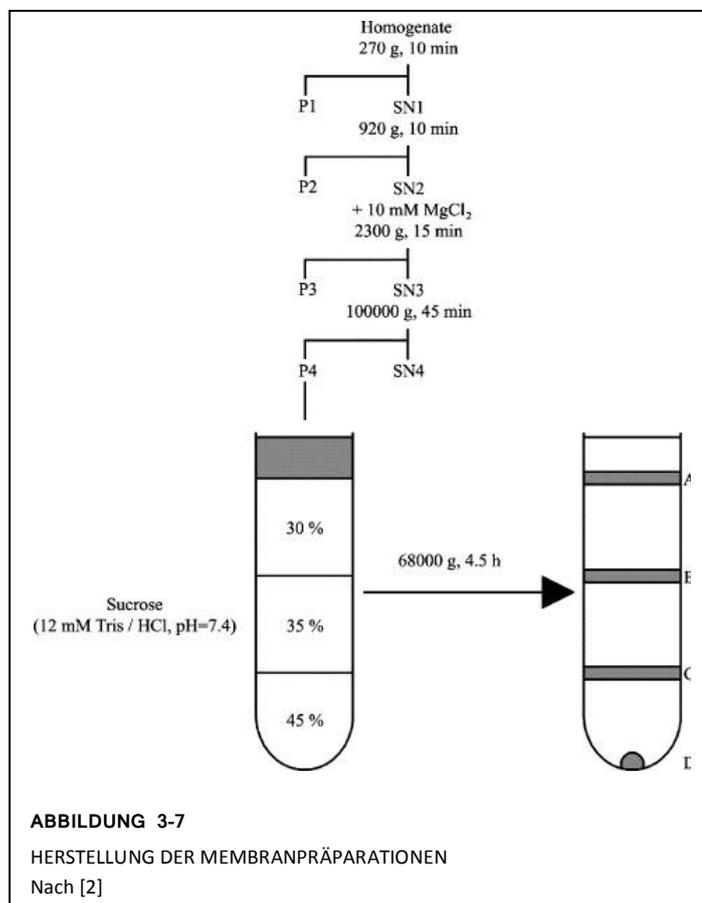
T. Fritzsche verwendete einen SASD-Crosslinker (Pierce), der an seinem Benzolring iodiert werden kann und zusätzlich eine UV-aktivierbare Azid-Gruppe enthält. Durch Iodierung und Konjugation an HSA entstand der ¹²⁵I-ASD-HSA Crosslinker, mit einem ungefähren Verhältnis von 6,9 Mol ¹²⁵I-SASD zu 1 Mol HSA. Nach Zugabe des synthetisierten Konjugats zu den Zellen diente die aktivierbare Azid-Gruppe zur kovalenten Kopplung an Albumin-bindende Membranproteine. Eine Disulfid-Brücke im Crosslinker ermöglichte im Anschluss die Abspaltung des HSA, so dass die ABPs nach einer Zellyse isoliert und nach Auftrennung mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese über das radioaktive ¹²⁵I in einer Autoradiographie sichtbar gemacht werden konnten.

Sowohl die Lysate der MCF7 als auch die der MV3 Zellen zeigten in der Autoradiographie eine 18 kDa und eine 40 kDa große Bande. Bei den Proben der MCF7 Zellen waren zusätzlich weniger deutliche Banden bei 28, 31, 36, 44 und 50 kDa sichtbar. In allen Proben war bei ca. 67 kDa noch die ¹²⁵I-markierte Bande des ursprünglich eingesetzten HSA-Crosslinker Konjugats klar zu erkennen. Deutlich wird, dass die hier gewählte Versuchsanordnung nur eine ungefähre Abschätzung des Molekulargewichts der ABPs erlaubt, aber keine weitgehenden Aussagen hinsichtlich ihrer Identität. Eine Kontrolle, die die unspezifische Bindung des Konjugats und / oder des Crosslinkers überprüft, fehlt ebenfalls.

3.5.3.2 Isolation von aufgereinigten Plasmamembranen

Aus allen drei Zelllinien wurden aufgereinigten Plasmamembranen durch differentielle Zentrifugation und einer nachfolgenden Auftrennung über einen Sucrose-Dichtegradienten (angelehnt an die Methode für Kaninchen-Enterozyten und für Caco-2 Zellen [156-158]) hergestellt.

Die Isolation der aufgereinigten Zellmembranen erforderte große Mengen an Zellen, insgesamt wurden von allen drei Zelllinien circa 2×10^8 Zellen für eine Membranpreparation verwendet. Die adhärenenten Zellen wurden dabei mit 1 % Na₂EDTA und Accutase abgelöst. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, in einem Micro-Dismembrator disintegriert und mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Weiter wurde verfahren wie das Fließschema in Abbildung 3-7 zeigt. Um das Endoplasmatische Retikulum aus der Membranpreparation auszufällen, wurden 10 mM MgCl₂ zur Probe hinzugegeben. Die Solubilisierung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit n-Octyl-β-D-glucopyranosid und Triton-X 100.



Zur Verifizierung der extrazellulären Orientierung der ABPs wurden aufgereinigte Plasmamembranen aus Zellen isoliert, die vorher mit Trypsin behandelt worden waren. Eine weitere Kontrolle bestand in der Isolation von Zellmembranen aus Zellen, die vorher mit einem Homogenat aus toten Zellen inkubiert worden waren. Hierdurch sollte die Artefakt-Bildung durch intrazelluläre Proteine toter Zellen überprüft werden.

3.5.3.3 Albumin-Affinitätschromatographie und Identifizierung der isolierten Proteine mit MALDI-TOF MS

Die solubilisierten Fraktionen des Sucrose-Dichtegradienten wurden zur Isolation der ABPs einer Albumin-Affinitätschromatographie mit einer HSA-Sepharose-Säule unterzogen. Die Eluation der ABPs von der Säule erfolgte mit 8 M Harnstoff, im Anschluss erfolgte die Auftrennung über eine 4-12%ige SDS-PAGE Gelelektrophorese und die Anfärbung mit kolloidalem Coomassie-Blau. Proteinbanden aus den SDS-Gelen der Fraktion B, der Fraktion mit der höchsten Ausbeute, (siehe auch Abbildung 3-7) wurden ausgeschnitten und mit MALDI-TOF MS analysiert. Für MCF7 und MV3 Zellen wurden eine 36 kDa große Bande ausgeschnitten, für die CCRF-CEM Zellen zusätzlich die 50, 40, 31 und 18 kDa großen Banden. Die fünf so identifizierten Proteine waren Mitglieder der hnRNP-Familie (hnRNP A1, hnRNP A3, hnRNP A2/B1 bzw. hnRNP B1, hnRNP C1) sowie Calreticulin (siehe Tabelle 3.3). Nicht erwähnt in der Veröffentlichung [2] aber in der Dissertation aufgeführt ist die Detektion von ATP Synthase subunit beta precursor.

Membranisolationen von lebenden Zellen, die vorher mit einem Homogenat aus toten Zellen exponiert worden waren, zeigten laut T. Fritzsche keine weiteren oder intensiveren Banden im Vergleich zu den nicht-exponierten Zellen.

Der Vergleich der Fraktionen von trypsinisierten und nicht-trypsinisierten Zellen zeigte laut T. Fritzsche keine ABPs in den trypsinisierten Proben, aber ein typisches ABP-Bandenmuster in den nicht-trypsinisierten Zellen.

Albumin-binding proteins identified with MALDI-TOF-MS and PSD		
Size on SDS-PAGE	Source	Identified protein
50 kDa	CCRF-CEM	Calreticulin
40 kDa	CCRF-CEM	hnRNP A3
36 kDa	CCRF-CEM, MV3, MCF7	hnRNP A2/B1
36 kDa	CCRF-CEM	hnRNP C1
36 kDa	MCF7	hnRNP A1
31 kDa	CCRF-CEM	hnRNP A1
31 kDa	CCRF-CEM	hnRNP A2/B1
18 kDa	CCRF-CEM	hnRNP B1
<i>50 kDa</i>	<i>CCRF-CEM</i>	<i>ATP synthase beta chain mitochondrial precursor</i>

kursiv = aus [5]

TABELLE 3.3
DURCH T. FRITZSCHE IDENTIFIZIERTE ABPS
Nach [2]

3.5.3.4 Western Blotting: Nachweis von ABPs in den Fraktionen und Ausschluss der Kontamination mit nukleären Membranen

Die Proteine in den solubilisierten Fraktionen des Dichtegradienten wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Membranen wurden mit HSA inkubiert und danach die an den Membranen gebundenen Albumin-Moleküle über einen anti-HSA Antikörper (Kaninchen), gefolgt von einem anti-Kaninchen Antikörper (Schwein) und einem Peroxidase-Anti-Peroxidase Komplex (Kaninchen), nachgewiesen. Als Kontrolle wurde die eine Hälfte der Membranen ohne Albumin inkubiert. Die in diesem Versuch nachgewiesenen Banden waren jedoch auch in der Kontrollmembran, welche ohne Albumin inkubiert worden war sichtbar. T. Fritzsche gesteht hier ein, keine Erklärung für dieses Phänomen zu haben.

Der Nachweis von Nucleopor-Proteinen, hier zur Kontrolle der Reinheit der isolierten Plasmamembranen und als Marker für eine Kontamination mit nukleären Membranen eingesetzt, erfolgte über einem primären anti-Nucleopor-Antikörper (Maus) gefolgt von einem Alkaline-Phosphatase-gekoppelten Kaninchen Anti-Maus Antikörper. In den untersuchten Fraktionen A-D von CCRF-CEM Zellen und MCF7 Zellen waren die Nucleopor-Proteine zunächst nicht detektierbar. Wurden dieselben Membranen danach mit Albumin, anti-Albumin Antikörper (Kaninchen) und der korrespondierenden Antikörper-Kaskade (Schwein anti-Kaninchen, dann Kaninchen Peroxidase/anti-Peroxidase Komplex) inkubiert, wurden zumindestens in Fraktion C (CCRF-CEM) und D (CCRF-CEM und MCF7) Nucleopor-Proteine sichtbar. Laut T. Fritzsche lag dies wahrscheinlich daran, dass durch die Detektion des Alkaline-Phosphatase konjugierten sekundärem Kaninchen Anti-Maus Antikörpers der Nucleopore-Detektion durch den Schwein anti-Kaninchen Antikörper der zweiten Antikörper Inkubation erhöht wurde. In der Plasmamembranfraktion B, die für die Albumin-Affinitätschromatographie und MALDI-TOF MS Analyse benutzt worden war, waren keine Nucleopor-Proteine sichtbar. Laut T. Fritzsche konnte damit ausgeschlossen werden, dass die identifizierten Proteine durch Verunreinigungen mit Zellkernen bzw. Kernmembranen in den Plasmamembranfraktionen auftraten.

4 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Albumin-bindenden Proteinen auf der Oberfläche von lebenden Tumorzellen sowie die Untersuchung des potentiellen Aufnahmemechanismus von Albuminkonjugaten in die Zelle.

Basierend auf der Arbeit von T. Fritzsche sollte die Expression zweier der von ihm identifizierten Proteine, hnRNP A2/B1 und Calreticulin, auf der Zellmembran von lebenden Zellen überprüft werden. Beide Moleküle sind sowohl mit malignen als auch mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen assoziiert (siehe 3.5). Da Albumin-Konjugate nachweislich in soliden Tumoren akkumulieren und auch eine Anreicherung in chronisch-entzündlichen Geweben beschrieben ist (siehe 3.4), empfahlen sich diese beiden Proteine als potentielle Kandidaten für eine Beteiligung an einer postulierten Rezeptor-vermittelten Endozytose von HSA. Der Nachweis wurde durch Quantifizierung der Oberflächenmarkierung von CCRF-CEM Zellen, einer humanen T-Zell Leukämie [159], die auch von T. Fritzsche in seinen Versuchen verwendet wurde, durch anti-CRT und anti-hnRNP A2/B1 Antikörper im FACS konzipiert.

In einem zweiten Teil sollte zur funktionellen Analyse der intrazellulären Aufnahme die Beteiligung der Clathrin-abhängigen Endozytose an der Internalisierung von HSA untersucht werden. Die Clathrin-abhängige Endozytose (CME) wurde aufgrund ihrer guten Charakterisierung und dem spezifischen Markermolekül Transferrin, das selektiv durch den Transferrin-Rezeptor über CME in die Zelle aufgenommen wird, ausgewählt. HnRNP A2/B1 wurde in der Literatur als Markerprotein für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (non-small-cell lung cancer = NSCLC) diskutiert, und 1996 durch Zhou et al. (noch als p31 (Antigen) bzw. 703D4 (Antikörperklon)) auf der Zellmembran von Adenokarzinomzellen in Gewebeschnitten identifiziert [160]. Aus diesem Grund sollten die Versuche mit A240286S Zellen, einer ursprünglich aus einer Metastase eines männlichen Patienten isolierten und später als NSCLC charakterisierten Zelllinie [161], durchgeführt werden. Die Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme sollte über eine Messung der Endozytose von fluoreszierendem BSA im FACS erfolgen, wobei verschiedene Methoden zur Hemmung der CME, nämlich hypertone Bedingungen während der Inkubation, intrazellulärer Kaliummangel, Chlorpromazin und eine transiente Transfektion mit siRNA gegen Clathrin Heavy Chain, einem essentiellen Protein der CME, verwendet werden sollten. In den Versuchen zur Inhibition der CME mit siRNA gegen Clathrin Heavy Chain wurden zusätzlich HeLa Zellen, Epithelzellen eines Zervixkarzinoms [162], als Kontrollen vorgesehen, da sie bereits erfolgreich mit der angewendeten Methode transfiziert worden waren [163].

Der dritte Teil dieser Arbeit sollte eine neue Methode zur Identifizierung von albumin-bindenden Proteinen auf der Zellmembran von humanen Tumorzellen etablieren. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit der Literatur zu gewährleisten, sollten anstelle der oben verwendeten Zelllinie A549 Zellen, eine Modellzelllinie für NSCLC [164], verwendet werden. Zur Isolation von Albumin-bindenden Proteinen wurde ein HSA-Konjugat entworfen, das sowohl einen photoaktivierbaren Crosslinker zur Konjugation an potentielle Bindungspartner als auch ein Biotin-Tag enthält. Nach einer Aufreinigung über Streptavidin aus dem Zell-Lysat sollten die ankonjugierten Bindungspartner durch die im Crosslinker vorhandene SS-Brücke von dem HSA-Konjugat abgespalten

und über MALDI-TOF MS charakterisiert werden. Ein vergleichbares Transferrin-Konjugat sollte eine Funktionskontrolle des Protokolls durch die Isolation des Transferrinrezeptors CD71 ermöglichen. Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, sollten die einzelnen Schritte des Protokolls, insbesondere die Reinheit der Konjugate, die extrazelluläre Bindung an die Zellmembran, das UV-induzierte Crosslinking sowie die Anwesenheit und Spaltbarkeit von Rezeptor-Ligand-Konjugaten in den Lysaten, jeweils gesondert überprüft werden.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

5.1.1 Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, entweder von Greiner Bio-One (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg) oder neoLab (Heidelberg) bezogen.

5.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien, soweit nicht anders angegeben, wurden in der höchsten Reinheitsstufe entweder von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA) bezogen.

5.1.3 Antikörper und Streptavidin-Konjugate

	Klon-Nr./ Katalog-Nr.	Hersteller
Anti- α -Tubulin	B-5-1-2	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti-Calreticulin	FMC75	Stressgen Biotechnologies (Victoria, CA)
Anti-CD4 (human)	RPA-T4	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Anti-CD71, Biotin konj.	MEM-75	Exbio Antibodies (Prag, CZ)
Anti-CD71	EPR4012	Biomol (Hamburg)
Anti-Clathrin Heavy Chain	23/CHC	BD Transduction Laboratories
Anti-hnRNP A2/B1	DP3B3	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
Goat anti-Mouse, Alexa488-konj.	1858413	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Goat anti-Mouse, HRP konj.	32430	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Goat anti-Rabbit , HRP konj.	10004301	Cayman Chemical Company (Michigan, USA)
Streptavidin, HRP konj.	SA-5010	Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, USA)
Streptavidin-FITC	BLD-405201	Biozol Diagnostica (Eching)
Streptavidin, Agarose-gebunden	SA-5010	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

TABELLE 5.1
ANTIKÖRPER UND STREPTAVIDIN-KONJUGATE

5.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

5.1.4.1 Medien und PBS

Vollmedium DMEM

DMEM (Biochrom, Berlin), 4 mM L-Glutamin, 10 % inaktiviertes FCS (Seraplus, Pan-Biotech, Aidenbach)

Vollmedium RPMI 1640

RPMI 1640 (Biochrom, Berlin), 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES, 5 % inaktiviertes FCS (Seraplus, Pan-Biotech, Aidenbach)

Vollmedium RPMI 1640 für HeLa Zellen

RPMI 1640 incl Glutamin (Invitrogen, Carlsbad, USA), 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % inaktiviertes FCS (Seraplus, Pan-Biotech, Aidenbach)

Serumfreie Medien (SFM)

Wie das jeweilige Vollmedium, ohne FCS

Trypsin-Lösung

0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA (w/v) in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

10x PBS

80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 , 2,4 g KH_2PO_4 , Aqua bidest ad 1 l

PBS

100 ml 10x PBS, 900 ml Aqua bidest
pH-Wert auf pH 7,4 mit HCl einstellen

PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}

1 l PBS, versetzt mit 0,9 mM CaCl_2 und 0,49 mM MgCl_2

5.1.4.2 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blotting

4x Probenpuffer

3,8 ml Aqua bidest, 1 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,8 ml Glycerol, 1,6 ml 10 % SDS, 0,4 ml 1 % Bromphenolblau

5x Laufpuffer

144 g Glycin, 25 g SDS, 30,4 g Tris (freie Base), 1 l Aqua bidest
Für den 1x konzentrierten Laufpuffer wurde die Stammlösung mit Aqua bidest 1:5 verdünnt.

Transferpuffer

22,5 g Glycin, 4,85 g Tris (freie Base), 400 ml Methanol, Aqua bidest ad 2 l

10x TBS

24,2 g Tris (freie Base), 80 g NaCl, Aqua bidest ad 1 l
pH-Wert auf pH 7,6 mit HCl einstellen

TBS-T, pH 7,6

100 ml 10x TBS, 1 ml Tween-20, 900 ml Aqua bidest

Blocking Solution

5 % Milchpulver in PBS

Blocking Solution für die Detektion mit Streptavidin

5 % Milchpulver in TBS-T

5.1.4.3 Puffer und Lösungen für Coomassie-Färbung und MS-kompatible Silberfärbung

Fixierlösung für Coomassie-Färbung

50 % Ethanol (v/v) in Aqua bidest mit 10 % (v/v) Essigsäure in Aqua bidest

Waschlösung und Entfärbelösung für Coomassie-Färbung

50 % Methanol (v/v) in Aqua bidest mit 10 % (v/v) Essigsäure

Färbelösung für Coomassie-Färbung

0,1 % (w/v) Coomassie Blau R350, 20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Aufbewahrung für Coomassie-gefärbte Gele

5 % (v/v) Essigsäure

Fixierlösung für Silberfärbung

30 % Ethanol (v/v) in Aqua bidest mit 10 % (v/v) Essigsäure

Waschlösung für Silberfärbung

20 % Ethanol (v/v) in Aqua bidest

Sensitivierungslösung für Silberfärbung

23,1 g Natrium Acetat-Trihydrat, 1 g Kalium Tetrathionat, 100 ml Ethanol, Aqua bidest ad 333 ml

Färbelösung für Silberfärbung

0,2 % (w/v) Silbernitrat in Aqua bidest

Entwicklerlösung für Silberfärbung

11,5 g Natrium Carbonat, 62 µl 10 % Natrium Thiosulfat Pentahydrat in Aqua bidest, 150 µl Formalin (37 %), Aqua bidest ad 500 ml

Stop-Lösung für Silberfärbung

10 g Tris (freie Base), 5 ml Essigsäure, Aqua bidest ad 250 ml

5.1.5 Zelllinien

5.1.5.1 CCRF-CEM

Die CCRF-CEM Zelllinie ist eine humane lymphoblastoide Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines an akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie erkrankten 4-jährigen Kindes gewonnen wurde [159].

5.1.5.2 A240286S

Die Zelllinie A240286S gehört zu den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (non-small-cell lung cancer = NSCLC) und wurde ursprünglich aus einem männlichen, 64jährigen Patienten mit einem Lungen-Adenocarcinom isoliert. Diese adhärenenten Zellen sind seitdem als DKFZ-eigene Zelllinie

etabliert, wobei in der Zellkultur eine Multidrug-Resistenz, unter anderem gegen Doxorubicin, nachgewiesen wurde [161].

5.1.5.3 A549

Die A549 Zellen wurden 1972 aus einem Lungen-Adenocarcinom (NSCLC) eines 58jährigen, männlichen Patienten isoliert [165] und dienen der Forschung als Modell für Typ II Pneumozyten [164].

5.1.5.4 HeLa

HeLa-Zellen stammen ursprünglich aus dem Epithel eines Zervixkarzinoms und wurden 1951 im John Hopkins Hospital einer afroamerikanischen Frau, der Patientin Henrietta Lacks, entnommen [162]. Es sind die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde, und werden mittlerweile weltweit in Labors kultiviert.

5.2 Allgemeine Methoden und Zellkultur

5.2.1 Die laufende Kultivierung der Zelllinien

5.2.1.1 Die laufende Kultivierung der Zelllinie CCRF-CEM

Die Suspensionszellen wurden in 30 ml Vollmedium RPMI1640 in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Passage erfolgte zwei Mal pro Woche nach folgender Methode: Die Zellzahl wurde mit dem CASY-1 Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen) bestimmt und 8x10⁵ Zellen (für 4 Tage) bzw. 10x10⁵ Zellen (für 3 Tage) wurden in eine neue Zellkulturflasche mit 30 ml frischem Medium übertragen.

5.2.1.2 Die laufende Kultivierung der Zelllinie A240286S

Die adhärente Zelllinie wurde in 30 ml Vollmedium RPMI 1640 in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Passage erfolgte zwei Mal pro Woche bei 80-90 % Konfluenz nach folgender Methode: Das Medium wurde entfernt, der Zellrasen 1x mit 8 ml PBS gewaschen und 1,5 ml Trypsin-Lösung hinzugegeben. Nach der Benetzung der Zellen wurde die Trypsin-Lösung wieder abgezogen und die Zellen für 5 min bei 37° C / 5 % CO₂ inkubiert. Die Trypsinierung wurde daraufhin mit 10 ml Vollmedium gestoppt und die abgelösten Zellen suspendiert. Die Zellkonzentration der Suspension wurde mit dem CASY-1 Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen) bestimmt und 8x10⁵ Zellen (für 4 Tage) bzw. 10x10⁵ Zellen (für 3 Tage) in 30 ml frischem Vollmedium in eine neue Zellkulturflasche übertragen.

5.2.1.3 Die laufende Kultivierung der Zelllinie A549

Die adhärente Zelllinie wurde in 30 ml Vollmedium DMEM in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Passage erfolgte zwei Mal pro Woche bei 80-90 % Konfluenz wie unter 5.2.1.2 beschrieben. Jeweils 6x10⁵ Zellen (für 4 Tage) bzw. 8x10⁵ Zellen (für 3 Tage) wurden in 30 ml frischem Vollmedium in eine neue Zellkulturflasche übertragen.

5.2.1.4 Die laufende Kultivierung der Zelllinie HeLa

Die adhärenente Zelllinie wurden in 30 ml Vollmedium RPMI 1640 für HeLa Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Passage erfolgte drei Mal pro Woche bei 80-90 % Konflueszenz. Die Zellen wurden wie unter 5.1.5.2 beschrieben trypsinisiert und danach bei 1500 g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 10 ml frisches Medium hinzugefügt, die Zellen suspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Jeweils 1,5x10⁶ Zellen wurden in eine neue Zellkulturflasche mit 30 ml Vollmedium übertragen.

5.2.2 Herstellung von inaktiviertem FCS

Das fötale Kälberserum (FCS) (Seraplus, Pan-Biotech, Aidenbach) wurde bis zur Verwendung bei -80° C gelagert. Für die Inaktivierung wurde es bei 4° C aufgetaut, für 30 min bei 56° C inaktiviert und danach in Aliquots bei -20° C eingefroren.

5.2.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

5.2.3.1 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden Zellen in der log-Phase ihres Wachstums verwendet. Adhärenente Zellen wurden wie in 5.2.1.2 beschrieben trypsinisiert, in 10 ml des jeweiligen Vollmediums aufgenommen und die Zellkonzentration mit dem CASY-1 Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen) bestimmt. Für die Suspensionzelllinie CCRF-CEM wurde die Zelldichte direkt mit dem CASY-1 Cell Counter bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden daraufhin zentrifugiert (RT, 10 min, 120 g), der Überstand verworfen und die Zellen in ihrem jeweiligen Einfriermedium (Vollmedium + 10 % DMSO) aufgenommen. Je 1ml mit einer Zelldichte von 5-10x10⁶ Zellen/ml wurden in ein Kryoröhrchen (Nunc, Thermo Electron) überführt und diese für 24 h in einem Einfrierbehältnis (Nalgene Cryo 1° C Freezing Container, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) mit 70 %igem Isopropanol auf -80° C gekühlt. Im Anschluss wurden die eingefrorenen Zellen in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff bei -196° C aufbewahrt.

5.2.3.2 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurde das gefrorene Kryoröhrchen rasch im Wasserbad bei 37° C aufgetaut und die Zell-Suspension in 9 ml Vollmedium (37° C) überführt. Die Zellen wurden suspendiert und danach zentrifugiert (RT, 10 min, 120 g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml Vollmedium (37° C) aufgenommen. Die Zelldichte und der Anteil an toten Zellen nach dem Auftauen wurde durch Trypanblau-Zählung bestimmt. Die Zellsuspension wurden vollständig in eine Zellkulturflasche mit 20 ml vorgelegtem Vollmedium überführt und 24 h nach dem Auftauen wurde entweder das Medium gewechselt (weniger als 70 % Konfluenz) oder die Zellen wie unter 5.2.1 beschrieben passagiert. Die weitere Kultivierung erfolgte wie unter 5.2.1 angegeben.

5.2.4 Ablösen von adhärenenten Zellen mit EDTA

Zum Ablösen von adhärenenten Zellen mit EDTA wurde der Zellrasen zweimal mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (4° C) gespült und danach eine 4° C-kalte EDTA-Lösung (0,02 % in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) hinzugegeben. Die Zellen wurden zuerst 5 min auf Eis und danach 10 min bei 37° C / 5 % CO₂ mit der

EDTA-Lösung inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden zusätzlich mit einem sterilen Zellschaber (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rockland, USA) abgelöst, in serumfreiem Medium (4° C) suspendiert und in Eppendorf-Gefäße übertragen. Die Zellen wurden danach zwei Mal mit serumfreiem Medium gewaschen (120 g, 3 min, 4° C) und dann wie jeweils angegeben weiterverwendet.

5.2.5 Überprüfung der Zellvitalität und Messung der apoptotischen Zellpopulation

5.2.5.1 Färbung mit Propidium Iodid (PI)

Nekrotische und spät-apoptotische Zellen mit defekter Membranintegrität können durch ihre schnelle Aufnahme des DNA-interkalierenden Farbstoffs Propidium Iodid von der lebenden Zellpopulation unterschieden werden [166]. Zu diesem Zweck wurde die Zellsuspension 1 min vor der Analyse im FACS mit PI (1 µg/ml Endkonzentration) (Biomol, Hamburg) versetzt. Die aufgenommene Menge PI wurde an einem BD FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) im FL-2 Kanal (564-606 nm) gemessen und ausgewertet. Für alle Zelllinien wurden die Positionen sowohl der PI-positiven als auch der PI-negativen Zellpopulation im Forward Scatter/Sideward Scatter Dotplot markiert und diese Einstellung für alle weiteren Versuche verwendet.

5.2.5.2 Nachweis der Apoptose durch Annexin-V FITC

Die Exprimierung von Phosphatidylserin auf der Zellmembran ist ein früher Marker der Apoptose und kann durch die Bindung von AnnexinV-FITC nachgewiesen werden. Nekrotische und Zellen im Spätstadium der Apoptose werden durch ihre schnelle Aufnahme von PI von den Zellen im Frühstadium der Apoptose unterschieden [166].

Die Zellen wurden zu je 1×10^6 Zellen/ml in Eppendorf-Gefäße übertragen und zwei Mal mit je 1 ml PBS (4° C) gewaschen. Im Anschluss wurden sie in 1 ml Annexin Binding Buffer (4° C) (Biozol Diagnostica, Eching) aufgenommen und 100 µl in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Je 5 µl fertige AnnexinV-FITC Lösung (Biozol Diagnostica, Eching) wurden hinzugegeben und die Proben für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Kurz vor der Messung wurden mit je 400 µl Binding Buffer (4° C) aufgefüllt und im Falle einer zusätzlichen Anfärbung mit Propidium-Iodid zusätzlich 0,2 µl Propidium-Iodid Lösung (Biomol, Hamburg) dazugegeben. Die Messung erfolgte an einem BD FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) und nur AnnexinV-FITC positive, aber PI-negative Zellen (beides im Vergleich zu einer nicht-behandelten Kontrolle) wurden zur Berechnung des Anteils an apoptotischen Zellen in der Gesamtpopulation berücksichtigt.

5.2.6 Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninic-Assay (BCA)

Diese Proteinbestimmung kombiniert die proteinabhängige Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ mit der Detektion von Cu^+ durch einen farbigen Chelat-Komplex mit der Bicinchoninsäure [167].

Die Bestimmung erfolgte in 96well-Platten mit einem Standard aus bovinem Serumalbumin (BSA) in dem jeweiligen Lösungsmittel der zu messenden Proben. Pro Well wurden 200 µl Reagenz aus 49 Teilen BCA-Lösung und 1 Teil Kupfersulfat-Lösung (beides Thermo Fisher Scientific, Rockland, USA) frisch hergestellt und zu 20 µl Probe beziehungsweise Standard hinzugegeben. Die Messung der Absorption erfolgte nach 20-30 min Inkubation (37° C) bei 550 nm. Die Proteinkonzentration der Proben wurde im Anschluss anhand des BSA-Standards berechnet.

5.2.7 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE Gelelektrophorese erfolgte in Anlehnung an die Methode von Laemmli [168]. Wenn nicht anders angegeben, wurde ein 4 %iges Bis-Acrylamid-Gel als Sammelgel und ein 8 %, 10 % oder 12 %iges Bis-Acrylamid-Gel als Laufgel verwendet. Der Laufpuffer wurde wie unter 5.1.4.2 beschrieben hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte für 90-150 min bei 20-40 mA. Im Anschluss wurden die Gele entweder anhand der Methoden für Coomassie Färbung (siehe 5.2.9) Western Blotting (siehe 5.2.8) oder MS-kompatibler Silberfärbung (siehe 5.2.10) weiterbehandelt.

	8 %iges Trenngel	10 %iges Trenngel	12 %iges Trenngel	4 %iges Sammelgel
Acrylamid-Lösung (40%) Mix 19:1 (Acrylamid:Bisacrylamid)	2 ml	2,5 ml	3 ml	1 ml
3 M Tris-HCl pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	
1 M Tris-HCl pH 6,8				1,3 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Aqua bidest	6,6 ml	6,1 ml	5,6 ml	7,6 ml
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	10 µl
APS 10 % (w/v)	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl

TABELLE 5.2
ZUSAMMENSETZUNG DER ACRYLAMID-GELE FÜR SDS-PAGE

5.2.8 Western Blotting

Das Western Blotting erfolgte in Anlehnung an die Methode von Towbin et al. [169]. Der Proteintransfer erfolgte auf Nitrocellulose-Membranen (Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) bei 4° C und 80 mA für 2 h bis 5 h. Im Anschluss wurden die Membranen für 1 h oder über Nacht im Kühlschrank mit Blocking Solution behandelt.

Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte direkt im Anschluss. Einzige Ausnahme war die Detektion mit Streptavidin, bei der die Membranen nach dem Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen je drei Mal für 5 min mit TBS-T gewaschen wurden. Alle Membranen wurden vor der Inkubation mit einem nachfolgenden HRP-konjugierten sekundären Antikörper (Dauer 1-2 h) sowie vor der Inkubation mit dem ECL (enhanced chemiluminescence)-Reagenz je drei Mal für 5 Minuten mit 5 % Milch / PBS bzw. mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion der HRP-vermittelten Oxidation von Luminol wurde das Supersignal West Pico ECL-Reagenz (Thermo Fischer Scientific, Rockland, USA), verwendet, welches frisch hergestellt und vor der Belichtung des photosensiblen Films für 5 min auf die Membranen gegeben worden war.

Antikörper-Lösungen

Anti-Clathrin Heavy Chain	1:500 in 5 % Milchpulver/PBS
Anti-alpha Tubulin	1:1000 in 5 % Milchpulver/PBS
HRP-konjugierter goat anti-Mouse	1:1000 in 5 % Milchpulver/PBS
Streptavidin-HRP	1:10 000 in 5 % BSA/TBS-T
Anti-CD71, Biotin-konjugiert	1: 4000 in 5 % Milchpulver /TBS-T

Antikörper-Lösungen (Fortsetzung)

Anti-CD71	1:1000 in 5 % BSA / TBS-T
HRP-konjugierter goat anti-Rabbit	1: 10 000 in 5 % BSA / TBS-T

5.2.9 Coomassie Färbung

Die Färbung der Acrylamid-Gele erfolgte in Anlehnung an die Methode von Sasse et al. [170]. Die Gele wurden direkt nach der Elektrophorese für 1 h in Fixierlösung inkubiert und danach über Nacht in Waschlösung gelagert. Am nächsten Tag wurden die Gele für 3-4 h in die Coomassie-Färbelösung gelegt. Danach wurden die Gele mehrmals mit Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden klar sichtbar waren. Zur Aufbewahrung wurden die Gele dann für 1 h in Aufbewahrungslösung gelegt und im Anschluss auch in Aufbewahrungslösung bei 4° C gelagert.

5.2.10 MS-kompatible Silberfärbung

Die MS-kompatible Silberfärbung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Chevallet et al. [171]. Alle Lösungen wurden am Tag des Experiments frisch hergestellt. Das Formalin wurde maximal eine Stunde vor Gebrauch zu der Entwicklerlösung hinzugegeben.

Jedes Gel wurde einmal für 1 h und danach über Nacht in frischer Fixierlösung fixiert. Im Anschluss wurden die Gele für 45 min in Sensitivierungslösung gelegt und danach zwei Mal mit Waschlösung und vier Mal mit Aqua bidest (je 10 min) gewaschen. Die Färbung erfolgte dann für 20 min - 2 h mit der Silbernitrat-Lösung. Für die Entwicklung wurden die Gele danach einzeln weiterbehandelt. Jedes Gel wurde für 10 s in Aqua bidest getaucht und danach in die Entwicklerlösung überführt. Je nach Proteinkonzentration der Banden wurden die Gele unter konstanter Bewegung zwischen 5 min - 45 min entwickelt. Im Anschluss wurde für 30 min mit Stop-Lösung inkubiert und die Gele schließlich mindestens zwei Mal für 30 min mit Aqua bidest gewaschen. Die fertigen Gele wurden in Aqua bidest gelagert.

5.3 Methoden zum Nachweis von hnRNP A2/B1 und Calreticulin auf der Oberfläche von lebenden Zellen

5.3.1 Detektion membranständiger Proteine im FACS

Die Inkubation der Zellen mit den Antikörpern erfolgte in Anlehnung an die Methode von Obeid et al. [155]. Um eine Internalisierung der Antikörper zu vermeiden, wurden alle Schritte bei 4° C bzw. auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt.

5.3.1.1 CCRF-CEM Zellen

Je 5×10^5 Zellen wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt, zentrifugiert (350 g, 4 min, 4° C) und ein Mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl SFM aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Vor der Zugabe der primären Antikörper wurden die Zellen erneut mit je 1 ml PBS gewaschen, in 500 µl SFM aufgenommen und Anti-CRT (1:20), Anti-hnRNP A2/B1 (1:20) bzw. Anti-CD4 (1:500) direkt hinzugegeben. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte

dann für 30 min auf Eis. Nach der ersten Inkubation wurden die Zellen zwei Mal mit 1 ml PBS und ein Mal mit 1 ml SFM gewaschen und in je 500 µl SFM mit sekundärem Antikörper (1:500 Alexa488-konjugierter Goat anti-Mouse) für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Vor der Messung im FACS wurde überschüssiger Sekundärantikörper durch zweimaliges Waschen (350 g, 4 min, 4° C) mit PBS entfernt und die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen, in FACS-Messröhrchen (5 ml Falcon Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt und auf Eis zum FACS transportiert.

Die Messung erfolgte an einem BD FACScan Gerät (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) im FL-1 Kanal (515-545 nm). Unbehandelte Zellen (Kontrolle I) sowie Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert worden waren (Kontrolle II), dienten als Negativ-Kontrolle. Zellen, die mit CD4-Antikörper behandelt worden waren, dienten als Positiv-Kontrolle. In jeder Probe wurde die Fluoreszenz von 15 000 lebenden Zellen (s.5.2.5.1) gemessen und das Geometrische Mittel (GM) der relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU) bestimmt. Für jede Probe wurde das Experiment fünf Mal an unterschiedlichen Tagen wiederholt.

5.3.1.2 A549 Zellen

Die adhärennten Zellen wurden in 6well-Platten ausgesät (5×10^5 Zellen / well) und 24 h unter Standardbedingungen (siehe 5.2.1) kultiviert. Am Tag des Experiments wurden die Zellen mit EDTA abgelöst (siehe 5.2.4), in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} aufgenommen und je 5×10^5 Zellen in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die abgelösten Zellen wurden daraufhin zentrifugiert (340 g, 5 min, 4° C), einmal mit je 1 ml eiskaltem PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und für 10 min auf Eis in PBS mit der doppelten Konzentration von Ca^{2+} und Mg^{2+} inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in 500 µl SFM (4° C) aufgenommen und anti-CRT Antikörper (1:100) bzw. anti-hnRNP A2/B1 (1:20) hinzugegeben. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte dann für 60 min auf Eis. Ungebundener Primärantikörper wurde daraufhin durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml eiskaltem PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} entfernt. Die Zellen wurden dann in 500 µl SFM (4° C) aufgenommen und der Sekundärantikörper (Alexa488-konjugierter Goat anti-Mouse Antikörper, 1:500) hinzupipettiert. Diese Inkubation erfolgte für 30 min im Dunkeln und auf Eis.

Vor der Messung im FACS wurden die Zellen zwei Mal mit je 1 ml eiskaltem PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen, in 300 µl PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} aufgenommen, in FACS-Messröhrchen (Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt, auf Eis zum FACS transportiert und wie unter 5.3.1.1 beschrieben vermessen.

5.3.2 Induktion der Apoptose durch Mitoxantron

5.3.2.1 CCRF-CEM Zellen

Die Zelldichte der Suspensionszellen wurden am Tag des Versuch mit dem CASY-1 Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen) bestimmt und je $1,75 \times 10^6$ Zellen mit 2 ml Vollmedium in ein Loch einer 12well-Platte überführt. Mitoxantron wurde für 8, 4 oder 2 h in einer Endkonzentration von 1 µM zu den Zellen gegeben und diese unter Standardbedingungen (siehe 5.2.1) inkubiert. Als Negativ-Kontrolle dienten Zellen ohne Zusatz von Mitoxantron in ihrem Medium.

Nach Ablauf dieser 8 Stunden wurden die Zellen in Eppendorf-Gefäße überführt, zentrifugiert (350 g, 3 min, 4° C), ein Mal mit 1,5 ml PBS (4° C) gewaschen und danach jeweils in ein 1000 µl Aliquot und in ein 500 µl Aliquot aufgeteilt. Die 1000 µl Aliquots wurden in einem nächsten Schritt in SFM aufgenommen und wie unter 5.3.1 beschrieben mit Anti-CRT Antikörper (1:20) und Alexa488-konjugiertem Goat anti-Mouse Antikörper (1:500) inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert worden waren. Die Messung erfolgte an einem BD FACScan Gerät (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) im FI-1 Kanal (515-545 nm), wobei jeweils 10 000 PI-negative Zellen ausgewertet wurden (siehe 5.2.5.1).

Parallel wurden die übrigen 500 µl Aliquots mit AnnexinV-FITC und PI auf ihren prozentualen Anteil an apoptotischen Zellen überprüft (siehe 5.2.5). Von jeweils 15 000 Zellen wurde der Anteil lebender ($PI^-/Annexin V^-$), nekrotischer bzw. spät-apoptotischer ($PI^+/Annexin V^+$) und apoptotischer ($PI^-/Annexin V^+$) Zellen bestimmt. Für jede Probe wurde das Experiment drei Mal an unterschiedlichen Tagen wiederholt.

5.3.2.2 A549 Zellen

Die adhärennten Zellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen (in 4 ml Medium pro Loch) 24 h vor dem Experiment in 6well-Platten ausgesät. Am Tag des Experiments wurde Mitoxantron (Endkonzentration 5 µM) für 4 h Stunden zu dem Medium der Zellen hinzugegeben, danach wurden die Zellen mit EDTA abgelöst (siehe 5.2.4), ausgezählt und wie unter 5.3.1 beschrieben mit anti-CRT Antikörper (1:100) bzw. anti-hnRNP A2/B1 Antikörper (1:20) und mit sekundärem Alexa488-konjugiertem Goat anti-Mouse Antikörper (1:500) inkubiert. Die Messung erfolgte ebenfalls wie unter 5.3.1 beschrieben. Für jede Probe wurde das Experiment drei Mal an unterschiedlichen Tagen wiederholt.

5.4 Methoden zur Untersuchung der Clathrin-abhängigen Endozytose von HSA-Konjugaten

Zur Untersuchung der Clathrin-abhängigen Endozytose (CME) von HSA wurde die Aufnahme von Alexa488-konjugiertem BSA in behandelten (s.u.) und unbehandelten Zellen im FACS quantifiziert. Die grundlegende Versuchsandordnung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Al Soraj et al. [11]. Die Aufnahme von Alexa488-konjugiertem Transferrin, das spezifisch über die CME aufgenommen wird, diente zur Kontrolle der jeweils induzierten Effekte [33]. Die Aufnahme von Tetramethylrhodamin (TMR)-Dextran, das über Fluid-Phase Endozytose internalisiert wird, diente gegebenenfalls zur Kontrolle unspezifischer Effekte [20]. Da Transferrin sehr schnell in die Zelle aufgenommen wird, wurden mit Alexa488-Transferrin inkubierte Zellen gegebenenfalls mit saurer Waschlösung behandelt, um extrazellulär bindendes Transferrin vollständig zu entfernen und die intrazelluläre Aufnahme nach der Inkubationszeit zu stoppen [172]. Bei allen Versuchen wurde PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} verwendet, um eine Ablösung der Zellen während der Vielzahl der Waschvorgänge zu minimieren [173].

5.4.1 Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch hypertones Medium

Die Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch hypertones Medium erfolgte in Anlehnung an die Methode von Heuser et al. [174]. Die adhärenenten A240286S Zellen wurden am Tag vor dem Versuch in einer Zelldichte von $3,5 \times 10^5$ Zellen mit je 4 ml Medium in 6well-Platten bzw. $1,8 \times 10^5$ Zellen mit je 2 ml in 12well-Platten ausgesät. Nach Ablauf von 24 h wurden die Zellen zwei Mal mit je 1 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (37° C) und ein Mal mit je 1 ml SFM (Kontrollen) bzw. hypertonem Medium (SFM + 0,45 M Sucrose) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit je 1 ml SFM bzw. hypertonem Medium für 30 min unter Standardbedingungen inkubiert.

Die Zellen wurden danach mit je 1 ml SFM bzw. hypertonem Medium gewaschen und im Anschluss entweder mit Alexa488-Transferrin-Lösung (100 nM in 625 μl SFM bzw. hypertonem Medium; Inkubationszeiten 32, 16, 8, 4, 2, 0 min) oder mit Alexa488-BSA-Lösung (0,1 mg / ml = 1,5 μM in 500 μl SFM bzw. hypertonem Medium, Inkubationszeiten 64, 32, 16, 8, 0 min) oder mit TMR-Dextran (MW 70 kDa; 1 mg / ml = 14,3 μM in 700 μl SFM bzw. hypertonem Medium, Inkubationszeiten 90, 60, 30, 0 min) unter Standardbedingungen inkubiert (Alexa488-Tf, Alexa488-BSA und TMR-Dextran von Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, USA). Abweichend hierzu wurden für die Quantifizierung der Aufnahme bei 4° C alle Schritte mit eiskühlten Lösungen und auf Eis durchgeführt.

Im Anschluss wurde pro Well jeweils 1 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) hinzugegeben und die Zellen danach sechs Mal mit eiskaltem PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Zellen, die mit Alexa488-Transferrin inkubiert worden waren, wurden zwei Mal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C), ein Mal für 1 min mit saurer Waschlösung (0,2 M NaCl, 0,2 M Essigsäure) und wiederum zwei Mal mit eiskaltem PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Im folgenden wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur trypsiniert (200 μl Trypsin-Lösung pro Well) und danach 700 μl Vollmedium (4° C) zu jedem Well hinzugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in Eppendorf-Gefäße überführt, ein Mal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) gewaschen (110 g, 3 min, 4° C), in 200 μl PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) suspendiert und zur Messung in FACS-Messröhrchen (Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt.

Die Messung erfolgte an einem BD FACScan Gerät (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) im FI-1 Kanal (515-545 nm; Alexa488-Transferrin, Alexa488-BSA) bzw. im FI-2 Kanal (564-606 nm, TMR-Dextran) wobei das geometrische Mittel (GM) der Fluoreszenz von 15 000 Zellen bestimmt wurde. Die Hintergrundfluoreszenz, hervorgerufen durch die Autofluoreszenz der Zellen und durch extrazellulär bindende fluoreszenz-markierte Proteine, wurde durch die 0 min-Probe bestimmt und deren GM-Wert von allen korrespondierenden Proben abgezogen. Jeder Versuch wurde insgesamt drei Mal an unterschiedlichen Tagen wiederholt.

5.4.2 Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch Kalium-Mangel

Puffer ohne K^+

140 mMol/l NaCl, 20 mMol/l HEPES, 1 mMol/l CaCl_2 , 1 mMol/l MgCl_2 , 1 mg/ml d-Glucose eingestellt auf pH7,4

Kontrollpuffer

Puffer ohne K^+ , versetzt mit 10mM KCl

Hypotonischer Puffer

Puffer ohne K^+ , 1:2 mit Aqua bidest verdünnt

Die Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch Kalium-Mangel wurde in Anlehnung an die Methode von Vercauteren et al. durchgeführt [175]. Abweichend wurde nach dem hypotonischen Schock für 30 min statt für 15 min mit Puffer ohne K^+ bzw. mit Kontrollpuffer inkubiert.

Am Tag vor dem Versuch wurden die adhären A240286S in einer Zelldichte von $1,8 \times 10^5$ Zellen mit je 2 ml Medium in 12well-Platten ausgesät. Nach Ablauf von 24 h wurden die Zellen zwei Mal mit je 1 ml Puffer ohne K^+ bzw. Kontrollpuffer gewaschen. Daraufhin wurde für 5 min mit 1 ml hypotonischem Puffer inkubiert, wobei die Kontrollen währenddessen je 1 ml Kontrollpuffer erhielten. Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 30 min mit je 1 ml Puffer ohne K^+ bzw. Kontrollpuffer unter Standardbedingungen inkubiert.

Die Zellen wurden dann erneut mit je 1 ml Puffer ohne K^+ bzw. Kontrollpuffer gewaschen, jeweils 500 μ l Alexa488-Transferrin-Lösung (100 nM in Puffer ohne K^+ bzw. Kontrollpuffer) für 0, 2, 4, 8, 16 bzw. 32 min hinzugegeben und für diese Zeit unter Standardbedingungen inkubiert.

Im Anschluss wurde jeweils 1 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} ($4^\circ C$) hinzugegeben und die Zellen danach zwei Mal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} ($4^\circ C$), ein Mal 1 min mit saurer Waschlösung (0,2 M NaCl, 0,2 M Essigsäure ($4^\circ C$)) und wiederum drei Mal mit eiskaltem PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Die Zellen wurden für 5 min bei Raumtemperatur trypsinisiert (200 μ l Trypsin-Lösung pro Well) und danach 500 μ l Vollmedium ($4^\circ C$) zu jedem Well hinzugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in Eppendorf-Gefäße überführt, ein Mal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} ($4^\circ C$) gewaschen (110 g, 3 min, $4^\circ C$), in 200 μ l PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} ($4^\circ C$) suspendiert und zur Messung in FACS-Messröhrchen (Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt.

Die Messung erfolgte an einem BD FACScan Gerät (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) im FI-1 Kanal (515-545 nm), wobei das geometrische Mittel (GM) der Fluoreszenz von 15 000 Zellen bestimmt wurde. Der Versuch wurde zwei Mal an unterschiedlichen Tagen wiederholt.

5.4.3 Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose mit Chlorpromazin

Die Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch Chlorpromazin erfolgte in Anlehnung an die Methode von Marina-Garcia et al. [176]. Die Inkubation mit Chlorpromazin erfolgte über zwei verschiedene Zeitspannen (30 min und 2 h) sowie mit fünf verschiedenen Konzentrationen (0, 2, 5, 8, 10 μ M). Die Aufnahme von Alexa488-Transferrin nach 16 min und 32 min wurde für beide Chlorpromazin-Vorinkubationszeiten und alle Konzentrationen bestimmt. Zellen, die weder mit Chlorpromazin noch mit Alexa488-Transferrin behandelt wurden, dienten für die jeweilige Zeitspanne als Kontrolle zur Messung der Autofluoreszenz. Der GM-Wert der so gemessenen Autofluoreszenz wurde von den Werten aller korrespondierenden Proben abgezogen und für die so korrigierten Werte das Verhältnis zu den nicht mit Chlorpromazin-behandelten Kontrollen bestimmt.

Am Tag vor dem Versuch wurden die adhären A240286S Zellen in einer Dichte von $3,5 \times 10^5$ Zellen mit je 4 ml Medium in 6well-Platten ausgesät. Nach Ablauf von 24 h wurden die Zellen zwei Mal mit je 1 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} ($37^\circ C$) und ein Mal mit jeweils 1 ml Chlorpromazin-Medium (0, 2, 5, 8 bzw. 10 μ M in SFM) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit je 2 ml der jeweiligen Chlorpromazin-Medium für 30 min oder für 2 h unter Standardbedingungen inkubiert.

Die Zellen wurden dann mit je 1 ml Chlorpromazin-Medium gewaschen, jeweils 700 µl Alexa-Transferrin Lösung (100 nM in dem jeweiligen mit Chlorpromazin-versetztem Medium) für 16 min oder 32 min hinzugegeben und unter Standardbedingungen inkubiert.

Im Anschluss wurde jeweils 1 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) hinzugegeben und die Zellen danach zwei Mal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C), ein Mal für je 1 min mit saurer Waschlösung (0,2 M NaCl, 0,2 M Essigsäure; 4° C) und wiederum zwei Mal mit eiskaltem PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Die Zellen wurden für 5 min bei Raumtemperatur trypsinisiert (300 µl Trypsin-Lösung pro Well) und danach 700 µl Vollmedium (4° C) zu jedem Well hinzugegeben. Die abgelösten Zellen wurden dann in Eppendorf-Gefäße überführt, ein Mal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) gewaschen (110 g, 3 min, 4° C), in 200 µl PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) suspendiert und zur Messung in FACS-Messröhrchen (Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt.

Die Messung erfolgte an einem BD FACScan Gerät (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) im FI-1 Kanal (515-545 nm) wobei das geometrische Mittel (GM) der Fluoreszenz von 15 000 Zellen bestimmt wurde. Jeder Versuch wurde insgesamt drei Mal an unterschiedlichen Tagen wiederholt.

5.4.4 Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch siRNA gegen Clathrin-heavy-Chain (CHC)

Die Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose durch den siRNA-vermittelten Knock-Down von Clathrin Heavy Chain (CHC) erfolgte in Anlehnung an die Methode von Al Soraj et al. [11]. Die Transfektion erfolgte mit dem Oligofectamin Transfection Agent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA), einem Lipid-basierten Reagenz zur Transfektion mit Oligonucleotiden. Für die verwendeten siRNA-Sequenzen vergleiche Tabelle 5.3. Zur Kontrolle der angewendeten Methode dienen HeLa Zellen, bei denen diese Methode der transienten Transfektion bereits erfolgreich angewendet wurde [177-179].

siRNA	Sequenz	Referenz
CHC	UAAUCCAAUUCGAAGACCAAUdTdT	[1]
Lamin- A/C	CUGGACUCCAGAAGAACAAdTdT	[3]
GFP	GGCUACGUCCAGGAGCGCAdTdT	[11]

TABELLE 5.3
SIRNA SEQUENZEN

Am Tag vor dem Versuch wurden A240286S- bzw. Hela-Zellen in 12well-Platten ausgesät (3×10^4 Zellen / well in 1 ml Vollmedium) und unter Standardbedingungen bis zu einer Konfluenz von mindestens 50 % kultiviert.

Nach Ablauf von 24 h wurden die benötigte Menge Oligofectamin und Opti-mem I Medium (2 µl Oligofectamine mit 8 µl Opti-Mem I Medium pro Well (beides Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA)) vermischt und bei Raumtemperatur für 5-10 min inkubiert. Parallel wurden pro Well 0,5 µl siRNA Stammlösung (50 µM) mit 89,5 µl Opti-Mem I Medium verdünnt. Beide Lösungen (Oligofectamine und Oligonucleotid-Vedünnung) wurden anschließend gemischt und für 15-20 min

bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen in den 12well-Platten ein Mal mit 400 µl Opti-Mem I gewaschen und danach zu jedem Well zunächst 400 µl Opti-Mem I und schließlich 100 µl der fertigen Transfektions-Lösung hinzugegeben. Die so behandelten Zellen wurden für 4 h unter Standardbedingungen inkubiert und danach jeweils 250 µl Opti-Mem I mit 30 % FCS zu jedem Well hinzupipettiert. Die Zellen wurden daraufhin für weitere 48h unter Standardbedingungen kultiviert.

5.4.4.1 Quantifizierung der Endozytose von Alexa488-Transferrin und Alexa488-BSA

48 h nach der Transfektion wurden die adhärennten Zellen (Hela bzw. A240286S) zwei Mal mit PBS (RT) gewaschen und für 30 min in serumfreien Medium unter Standardbedingungen inkubiert. Im Anschluss wurde erneut zwei Mal mit PBS gewaschen und dann jeweils 500 µl Alexa488-Transferrin Lösung (100 nM in SFM) für 32, 16, 8 und 0 min (A240286S) bzw. für 32, 16, 8, 4, 2 und 0 min (Hela) oder 300 µl Alexa488-BSA-Lösung (0,1 mg/ml = 1,5 µM) für 60, 20 und 0 min zugegeben und während dieser Zeit weiterhin unter Standardbedingungen inkubiert. Für die Untersuchung der Aufnahme von Alexa488-BSA bei 4° C wurde verfahren wie hier beschrieben, mit dem Unterschied, dass alle Schritte mit eisgekühlten Lösungen und auf Eis durchgeführt wurden.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Platten sofort auf Eis gestellt und zwei Mal mit eiskaltem PBS, ein Mal für 1 min mit saurer Waschlösung (0,2 M NaCl, 0,2 M Essigsäure) und wiederum drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 5 min bei Raumtemperatur trypsiniert (200 µl Trypsin-Lösung pro Well) und danach 600 µl Vollmedium (4° C) zu jedem Well hinzugegeben. Die abgelösten Zellen wurden dann in Eppendorf-Gefäße überführt, zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen (110 g, 3 min, 4° C), in 200 µl eiskaltem PBS suspendiert und zur Messung in FACS-Messröhrchen (Falcon 5ml Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt.

Die Messung erfolgte an einem BD FACScan Gerät (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) im FL-1 Kanal (515-545 nm), wobei das geometrische Mittel der Fluoreszenz von 10 000 Zellen bestimmt wurde. Die Hintergrundfluoreszenz, hervorgerufen durch die Autofluoreszenz der Zellen und durch extrazellulär bindende fluoreszenz-markierte Proteine, wurde durch die 0 min-Probe bestimmt und deren GM-Wert von allen korrespondierenden Proben abgezogen. Jeder Versuch wurde insgesamt drei Mal an unterschiedlichen Tagen wiederholt, mit Ausnahme der Aufnahme von Alexa488-BSA bei 4° C, die nur ein Mal durchgeführt wurde.

5.4.5 Überprüfung der transienten Transfektion mit Western-Blotting

5.4.5.1 Herstellung der Zelllysate und Probenvorbereitung

Lysepuffer ++

50 mM Tris (freie Base); 150 mM NaCl; 1 % Triton-X 100 in Aqua bidest
eingestellt auf pH 8
versetzt mit 1 Tablette Mini Protease Inhibitor/ 10 ml

HeLa- und A240286S Zellen wurden wie unter 5.4.4 beschrieben ausgesät und transfiziert. Nach Ablauf von 48 h wurden die Zellen nach folgender Methode lysiert:

Die 12well-Platten wurden auf Eis gestellt und die Zellen drei Mal mit PBS (4° C) gewaschen. Im Anschluss wurden 200 µl Lysepuffer++ (4° C) zu dem ersten Well hinzugegeben und für 5 min bei 4° C unter ständiger Bewegung inkubiert. Die entstandene Lösung wurde dann vollständig in das nächste Well gegeben und diese Zellen wiederum für 5 min unter kreisenden Bewegungen lysiert. Insgesamt wurden so die Zellen von jeweils 4 Wells in den 200 µl Lysepuffer++ lysiert. Das fertige Lysat wurde in Eppendorf-Gefäße überführt, für 10 min bei 13000 g und 4° C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß übertragen. Nach einer Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay (siehe 5.2.6) wurden die Lysate bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

Für die Analyse mit SDS-PAGE wurden für jede Probe 50 µg Protein mit Aqua bidest auf 60 µl verdünnt. Nach der Zugabe von 16,5 µl des 4x Probenpuffers und 2M DTT (Endkonzentration 100mM) wurde bei 95° C für 5-10 min erhitzt.

5.4.5.2 SDS-PAGE und Blotting

Die SDS-PAGE und das Western Blotting erfolgte wie unter 5.2.7 und 5.2.8 beschrieben mit einem 4 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel. Von jeder Probe wurden je 50 µg Protein auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese erfolgte für 90 min bei 110 V. Der Proteintransfer erfolgte bei 4° C und 100 V für 2 h. Im Anschluss wurden die Nitrozellulose-Membranen waagrecht zwischen 50 und 80 kDa in zwei Teile zerteilt.

5.4.5.3 Inkubation mit Antikörpern und deren Nachweis mit verstärkter Chemilumineszenz

Vor der Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Membranen für 1 h oder über Nacht in Blocking Solution (5 % Milchpulver in PBS) behandelt. Die eine Hälfte der Membranen (Molekulargewichte >80 kDa) wurde für 1 h mit anti-Clathrin Heavy Chain Antikörper (1:500 in 5 % Milchpulver / PBS), der andere Teil (Molekulargewichte < 80 kDa) wurde für 1 h mit anti-αTubulin (1:1000 in 5 % Milchpulver / PBS) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 5 min) wurden beide Membranhälften für 1 h mit HRP-konjugiertem goat anti-Mouse Antikörper (1:1000 in 5 % Milchpulver / PBS) inkubiert. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

Der Nachweis des HRP-konjugierten Sekundärantikörpers erfolgte direkt im Anschluss mit frisch hergestellter Chemilumineszenz-Entwicklerlösung Supersignal West Dura (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA).

5.5 Methoden zur Identifizierung von HSA-bindenden Molekülen auf der Zellmembran von lebenden Zellen

Zur Identifizierung und Isolation von HSA-bindenden Moleküle aus der Zellmembran von lebenden Zellen wurde ein HSA-Konjugat synthetisiert, das sowohl einen photoaktivierbaren Crosslinker (SDAD) als auch ein Biotin-Tag für die spezifische Aufreinigung der HSA-Bindungspartner-Konjugate nach der Lyse enthält. Parallel wurde zur Funktionskontrolle des Protokolls ein vergleichbares Transferrin-Konjugat synthetisiert. Die Synthesen gliederten sich in zwei Schritte, wobei zunächst jeweils ein Biotin-Protein Konjugat hergestellt und die Biotinylierung überprüft wurde, und in einem

nächsten Schritt der UV-aktivierbare Crosslinker SDAD an die Moleküle konjugiert wurde. Der Vollständigkeit halber wird hier zusätzlich die Synthese der SBED (Sulfo-Biotin-Label Transfer Reagent)-Konjugate aufgeführt, wobei mit dem so hergestellten SBED-HSA und SBED-Transferrin keine weiteren Versuche durchgeführt wurden, da das Biotin-Tag hier wenige Tage nach der Synthese nicht mehr nachweisbar war. Die Biotinylierung und Reinheit von Biotin-HSA-SDAD und Biotin-Tf-SDAD wurde durch Nachweis mit Streptavidin-HRP im Western Blotting überprüft. Die extrazelluläre Bindung der Konjugate an A549 Zellen wurde durch Streptavidin-FITC im FACS nachgewiesen, ebenso das UV-induzierte Crosslinking. Da endogene biotin-haltige Enzyme den Nachweis der biotinylierten Konjugate störten, wurde bei der Zellyse ein zusätzlicher Schritt zur Entfernung der Mitochondrien, der Hauptlokalisierung der endogenen biotinhaltenen Carboxylasen in der Zellen, eingeführt. Die Ausbeute an HSA-bzw. Transferrin-Bindungspartner-Konjugaten und die Spaltbarkeit durch die im SDAD-Crosslinker enthaltene SS-Brücke mit DTT erfolgte durch Detektion der biotinhaltenen Banden in den Lysaten mit Streptavidin-HRP im Western Blotting. Die Bindung der Ausgangskonjugate an Streptavidin-Agarose wurde überprüft. In einem abschließenden Versuch wurden im Anschluss an die Inkubation der Zellen mit den Konjugaten, dem UV-induzierten Crosslinking, der Lyse der Zellen, der Aufreinigung durch Streptavidin-Agarose und der Abspaltung der Bindungspartner durch DTT die so hergestellten Eluate über SDS-Page aufgetrennt und die enthaltenen Proteine mit MS-kompatibler Silberfärbung sichtbar gemacht. Ein parallel hergestelltes SDS-PAGE Gel wurde nach Western Blotting auf Nitrocellulose mit anti-CD71 und korrespondierendem Sekundärantikörper behandelt, um den Transferrinrezeptor im Eluat nachzuweisen.

5.5.1 Synthese von Biotin-Tf und Biotin-HSA

5.5.1.1 Synthese

Syntheselösung

0,1 N NaHCO₃ 100 ml

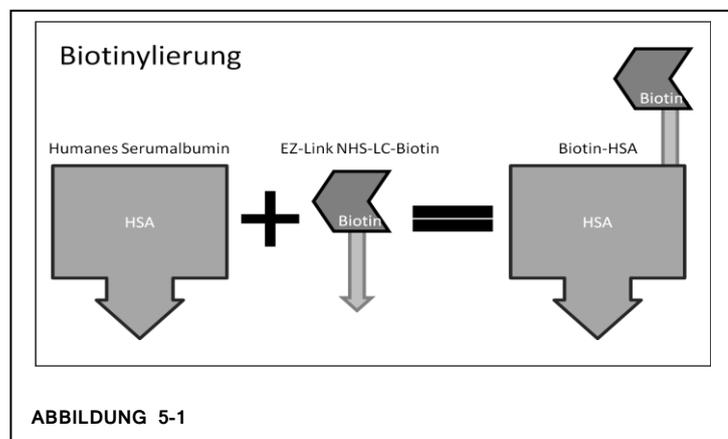
Acetonitril 25 ml

Waschlösung

0,9 % NaCl

10 % 1 N NaHCO₃

10 % EtOH



Die Synthese der biotinylierten Proteine erfolgte nach der vom Hersteller des verwendeten EZ-Link NHS-LC-Biotins (Thermo Fischer Scientific, Rockland, USA) empfohlenen Methode:

EZ-Link NHS-LC-Biotin (50 mg= 110 µMol) wurde vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt. Jeweils 380 mg humanes Serumalbumin (HSA= 5,7 µMol) bzw. 205 mg holo-Transferrin (Tf= 2,6 µMol) wurden eingewogen und in Synthesepuffer gelöst (HSA: 9,5 ml = 40 mg/ml; Tf: 5 ml = 40 mg/ml). EZ-Link NHS-LC Biotin wurde in 2 ml wasserfreiem DMF gelöst und sofort zu den Proteinlösungen hinzugegeben (HSA: 1350 µl; Tf: 640 µl). Dies entspricht einem 13,5 fachen Überschuss an NHS-LC-Biotin. Die Reaktion erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren.

Im Anschluss wurden die Proteine in Vivaspin Concentrators (15 ml, 10.000 MWCO PES) Sartorius, Göttingen) überführt und fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen (30-90 min, 3010 g, 4° C). Daraufhin wurde je ein Mal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und die fertigen Proteine in 9 ml (Biotin-HSA) bzw. in 5 ml (Biotin-Tf) 0,9 %iger NaCl aufgenommen. Die fertigen Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm Filtereinheit) und bis zur weiteren Verwendung unter Lichtausschluss bei 4° C gelagert.

5.5.1.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA-Assay wie unter 5.2.6 beschrieben.

5.5.1.3 Bestimmung des Biotin-Gehalts mit dem HABA/Avidin-Assay

Die Biotinylierung der beiden Proben wurde mit Hilfe des HABA/Avidin-Assay berechnet, welcher die spektrophotometrische Bestimmung des Biotin-Gehalts einer Probe ermöglicht. In der Lösung ist der Farbstoff HABA (2(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure) an Avidin gebunden und wird nach Zugabe von Biotin aus der Bindungsstelle verdrängt. Dies führt zu einer Verringerung der Absorption bei 500 nm (mit bekanntem Extinktionskoeffizienten), da freies HABA im Gegensatz zu dem HABA/Avidin-Komplex hauptsächlich bei 348 nm absorbiert. [180, 181] Die Bestimmung des Biotin-Gehalts erfolgte wie vom Hersteller (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) beschrieben, abweichend hierzu wurde die Messung in 96well-Platten nach folgender Methode durchgeführt:

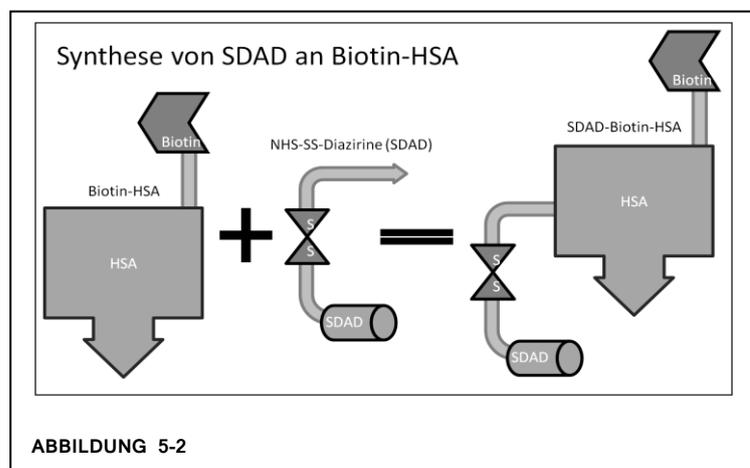
Das HABA/Avidin-Reagenz wurde in 10 ml Aqua bidest gelöst. Die Biotinbestimmung erfolgte gegen einen Standard aus in 0,9 %iger NaCl gelöstem D-Biotin (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit Konzentrationen zwischen 0 und 0,2 mM. Jeweils 20 µl Probe wurden zu 180 µl gelöstem HABA-Avidin-Reagenz gegeben, suspendiert, und die Absorption bei 500 nm nach 1 min gemessen. Für jedes Protein wurden die Absorption von vier verschiedenen Konzentrationen bestimmt und der Mittelwert von zwei separaten Messungen berechnet. Der Biotin-Gehalt wurde jeweils anhand einer Biotin-Eichkurve bestimmt.

5.5.2 Synthese von Biotin-Tf-SDAD und Biotin-HSA-SDAD

Die Synthese erfolgte wie vom Hersteller (Thermo Fisher Scientific, Rockland, USA) empfohlen nach folgender Methode:

NHS-SS-Diazirine (SDAD) (50 mg= 128 µMol) wurde vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt. Die nachfolgende Synthese wurde unter Lichtausschluss durchgeführt.

5,7 µMol Biotin-HSA bzw. 2,4 µMol Biotin-Tf wurden von ihren 4 %igen Stammlösungen (siehe 5.5.1) ausgehend mit sterilem PBS auf 18 ml (Biotin-HSA; ca 320 µM = 21 mg/ml) bzw. 9 ml (Biotin-Tf; ca 270 µM = 22 mg/ml) verdünnt. SDAD wurde in 3,2 ml wasserfreiem DMSO gelöst (= 40 mM



Stammlösung) und sofort zu den Proteinlösungen hinzugegeben (Biotin-HSA = 2 ml; Biotin-Tf = 1 ml). Dies entspricht einer Endkonzentration von circa 4 mM SDAD in der Reaktionslösung und einem 14,5fachen Überschuss im Vergleich zum Protein. Die Kopplungs-Reaktion erfolgte für 30 min unter ständigem Rühren.

Im Anschluss wurde überschüssiges Reagenz durch Zugabe von 1 M Tris-HCl (pH 8,8) und 5minütigem Rühren inaktiviert (Endkonzentration Tris-HCl in der Lösung 100 mM). Zur Aufreinigung wurden die Proteinlösungen in Vivaspin 15 ml Concentrators (MWCO 10.000 PES, Sartorius, Göttingen) übertragen und jeweils vier Mal mit Waschpuffer (siehe 5.5.1) gewaschen (30 min, 4500 rpm, 18° C). Die Konjugate wurden daraufhin je ein Mal mit sterilem PBS gewaschen und schließlich in 9 ml (SDAD-Biotin-HSA) bzw. 5 ml (SDAD-Biotin-Tf) aufgenommen. Die Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm Filtereinheit), aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung unter Lichtausschluss bei 4° C gelagert.

5.5.3 Synthese von SBED-HSA und SBED-Tf

Die Synthese erfolgte wie vom Hersteller (Thermo Fisher Scientific, Rockland, USA) empfohlen nach folgender Methode:

Jeweils 200 mg humanes Serumalbumin (= 3 µMol) bzw. 120 mg holo-Transferrin (= 1,5 µMol) wurden eingewogen und in PBS gelöst (HSA: 20 ml = 10 mg/ml; Tf: 12 ml = 10 mg/ml). Die nachfolgende Synthese wurde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss durchgeführt.

Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Reagent (10 mg = 11,3 µMol) wurde vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt, in 200 µl wasserfreiem DMF gelöst und sofort zu den Proteinlösungen hinzugegeben (HSA: 130 µl; Tf: 66 µl). Dies entspricht einem 2,5fachen Überschuss an Sulfo-SBED. Die Kopplungs-Reaktion erfolgte für 30 min unter ständigem Rühren.

Im Anschluss wurden die Protein-Lösungen in Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel-10k (Millipore, Merck, Darmstadt) überführt und vier Mal mit Waschpuffer (siehe 5.5.1) gewaschen (30 min, 4500 rpm, 18° C). Daraufhin wurde je ein Mal mit PBS gewaschen und die fertigen Konjugate in 4 ml (SBED-HSA) bzw. 2 ml (SBED-Tf) PBS aufgenommen (HSA: 50 mg/ml = 5 %ige Lösung; Tf: 60 mg/ml=6 %ige Lösung). Die Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm Filtereinheit) und aliquotiert. Bis zur Verwendung wurden die fertigen Konjugate unter Lichtausschluss bei 4° C gelagert.

5.5.4 Überprüfung der Biotinylierung und UV-Stabilität von SDAD-Biotin-Tf und SDAD-Biotin-HSA

Zur Überprüfung der Biotinylierung und der UV-Stabilität der Konjugate wurden je 30 µl SDAD-HSA-Biotin Stammlösung bzw. 60 µl SDAD-Tf-Biotin Stammlösung (entspricht ungefähr 3 µg (SDAD-HSA-Biotin) bzw. 3,66 µg (SDAD-Tf-Biotin) und je circa 0,05 µMol) zu 370 µl (SDAD-HSA-Biotin) bzw. 340 µl (SDAD-Tf-Biotin) SFM (RPMI1640) in die Löcher einer 12well-Platte gegeben und für 10 min auf Eis mit UV-Licht (366 nm) belichtet. Die Lösungen wurden dann in drei Stufen insgesamt 1:2000 mit SC-Puffer (siehe 5.5.6) verdünnt und je 10 µl mit 4 µl 4x Probenpuffer und 0,8 µl 2 M DTT versetzt. Zur Kontrolle wurden die gleichen Lösungen unter Lichtausschluss und ohne UV-Belichtung angesetzt.

Die Proteinlösungen wurden über ein 4 % / 8 % SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 5.2.7) und wie unter 5.2.8 beschrieben auf Nitrocellulose-Membranen (Whatman, GE Healthcare,

Little Chalfont, UK) geblottet und die biotinhaltigen Banden mit Streptavidin-HRP (1:10.000 in 5 % BSA/TBS-T; Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA) detektiert.

5.5.5 Methoden-Entwicklung im FACS

Die Inkubation der Zellen mit Biotin-HSA-SDAD und Biotin-Tf-SDAD erfolgte wie unter 5.4 beschrieben in Anlehnung an die Methode von Al Soraj et al. [163]. Das UV-induzierte Crosslinking erfolgte nach der Empfehlung des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, Rockland, USA) bei 366 nm, zur Reduktion der intrazellulären Aufnahme wurden die Zellen bei 4° C für 20 min belichtet. Die Detektion der membrangebundenen Konjugate erfolgte mit Streptavidin-FITC (Biozol Diagnostica, Eching) nach dem Ablösen der Zellen mit EDTA (siehe 5.2.4) in Suspension, in Anlehnung an die Methode von Schmutz et al. [182].

5.5.5.1 Detektion membrangebundener Konjugate mit Streptavidin-FITC

Am Tag vor dem Versuch wurden die adhärenenten A549 Zellen in einer Zelldichte von $4\text{-}5 \times 10^5$ Zellen mit je 4 ml Medium in 6well-Platten ausgesät. Nach Ablauf von 24 h wurden die Zellen zwei Mal mit je 1 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) gewaschen und daraufhin mit je 2 ml SFM (DMEM) 30 min auf Eis inkubiert.

Die Zellen wurden danach mit je 1 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) gewaschen, 700 µl SFM mit Biotin-Tf-SDAD (0; 0,5; 1; 4,7; 10; 50 und 100 µl entspricht ungefähr 0; 0,35; 0,7; 3,3; 7; 35 und 70 µM) bzw. mit Biotin-HSA-SDAD (0; 1; 10; 20; 50 und 100 µl entspricht ungefähr 0; 0,9; 9,3; 18,6; 46,6 und 93,2 µM) im Dunkeln hinzugegeben, und 30 min auf Eis in Alufolie und unter langsamer Bewegung inkubiert. Im Anschluss wurde jeweils 1 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) hinzugegeben und die Zellen danach zwei Mal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 800 µl PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) für 20 min auf Eis mit UV-Licht (365 nm) belichtet.

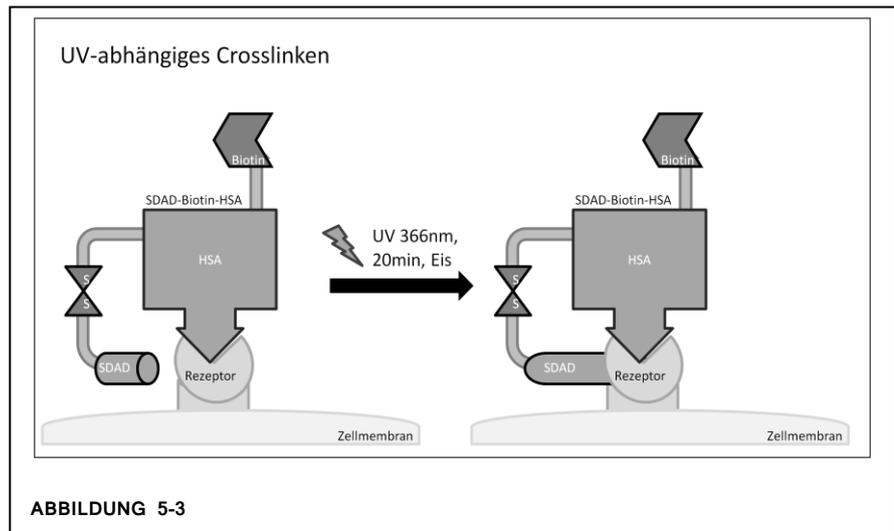
Im Anschluss wurde vier Mal mit 4° C kalter Waschlösung (Kontrollen: PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} ; Biotin-HSA-SDAD: 1 % BSA in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} ; Biotin-Tf-SDAD: 1 % apo-Tf in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) und zwei Mal mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend wie unter 5.2.4 beschrieben mit EDTA abgelöst und in 500 µl SFM suspendiert. Streptavidin-FITC (1:250; 1 µg) wurde zu jeder Probe hinzugegeben, suspendiert und für 1 h auf Eis und im Dunkeln inkubiert.

Vor der Detektion im FACS wurde ungebundenes Streptavidin-FITC durch dreimaliges Waschen (340 g, 4 min) mit je 1 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (4° C) entfernt, die Zellen in 200 µl PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} aufgenommen und in FACS-Messröhrchen (Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt.

Die Messung erfolgte an einem BD FACScan Gerät (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) im FI-1 Kanal (515-545 nm), wobei das geometrische Mittel (GM) der Fluoreszenz von 15 000 lebenden Zellen bestimmt wurde. Zellen, die nicht mit den Konjugaten, aber mit Streptavidin-FITC inkubiert worden waren, dienten zur Bestimmung der Autofluoreszenz und unspezifischen Bindung von Streptavidin-FITC an der Zelloberfläche. Der so jeweils bestimmte Nullwert wurde von allen korrespondierenden Proben abgezogen. Für jede Probe wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen bestimmt.

5.5.5.2 Überprüfung des UV-abhängigen Crosslinkings

Zur Überprüfung des UV-abhängigen Crosslinkings wurden mit Biotin-HSA-SDAD (50 µl in 700 µl SFM entspricht ungefähr 46,6 µM) sowie mit Biotin-Tf-SDAD (1 µl bzw. 10 µl in 700 µl SFM entspricht ungefähr 0,7 bzw. 7 µM) inkubierte Zellen entweder 20 min mit UV-Licht (366 nm) behandelt oder stattdessen direkt mit den Waschlösungen (siehe 5.5.5.1) gewaschen und abgelöst. Die weitere Behandlung und die Messung der relativen Fluoreszenz erfolgte dann wie unter 5.5.5.1 beschrieben. Wie oben dienten Zellen, die nicht mit den Konjugaten, aber mit Streptavidin-FITC inkubiert worden waren, zur Bestimmung der Autofluoreszenz und unspezifischen Bindung von Streptavidin-FITC an der Zelloberfläche. Der so jeweils für UV-belichtete und nicht-belichtete Zellen bestimmte Nullwert wurde von allen korrespondierenden Proben abgezogen. Von den so korrigierten RFU-Werten wurde jeweils das Verhältnis der nicht-belichteten zu den UV-belichteten Zellen berechnet.



5.5.5.3 Überprüfung der extrazellulären Bindung der Konjugate

Zur Überprüfung der extrazellulären Lokalisation der UV-induziert kovalent gebundenen Konjugate wurden mit Biotin-HSA-SDAD (0; 20; 50 und 100 µl in 700 µl SFM entspricht ungefähr 0; 18; 45 bzw. 90 µM) bzw. mit Biotin-Tf-SDAD (0; 1; 10 und 100 µl in 700 µl SFM entspricht ungefähr 0; 0,7; 6,9 bzw. 69 µM) inkubierte Zellen nicht mit EDTA, sondern mit Trypsin-Lösung (siehe 5.4) abgelöst. Die weitere Behandlung der Zellen war identisch zu 5.5.5.1.

5.5.6 Herstellung von Zelllysaten mit und ohne Entfernung der Mitochondrien

Die Herstellung der Zelllysate erfolgte in Anlehnung an das Subcellular Fractionation Protocol von Abcam (Cambridge, UK) [183].

Subcellular Fractionation (SC) – Puffer

250 mM Sucrose, 20 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA

1x Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Grenzach-Wyhlen)

gegebenenfalls wurde der Puffer bis zur Verwendung in Aliquots bei -18° C gelagert.

PBS+Proteaseinhibitor

PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

versetzt mit Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Grenzach-Wyhlen)

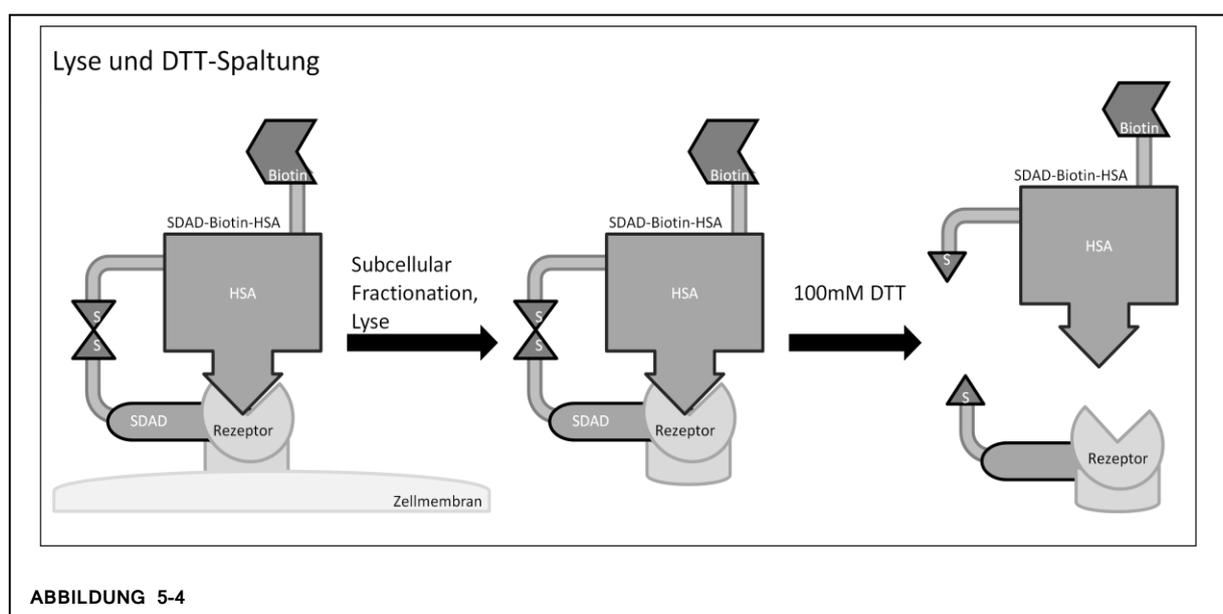
Die adhärennten A549 Zellen (jeweils 4 Wells einer 6Well-Platte pro Konjugat bzw. für die Kontrolle) wurden wie unter 5.5.5 beschrieben mit den Biotin-HSA-SDAD (50 µl = 46,6 µM in 700 µl SFM) bzw. Biotin-Tf-SDAD (10 µl = 7 µM in 700 µl SFM) inkubiert und gewaschen. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit SFM inkubiert wurden.

Im Anschluss an den letzten Waschschrift mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ wurden die Zellen einmal mit PBS+Proteaseinhibitor gespült und danach mit einem sterilen Cell-Scraper (Corning small Cell-Scraper, Corning Inc., Corning, USA) vom Boden gelöst. Die Zellen von jeweils 4 Wells wurden so in insgesamt 1000 µl PBS+Proteaseinhibitor (4° C) aufgenommen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (340 g, 3 min, 4° C) und in jeweils 400 µl Sc-Puffer (4° C) aufgenommen. Jede Probe wurden daraufhin zehn Mal durch eine Kanüle (27 G) gezogen und danach für 20 min auf Eis inkubiert.

Jeweils die Hälfte der 400 µl jeder Probe wurde dann zur Sedimentation der Mitochondrien und Zellkerne bei 11.000g für 40 min und 4° C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorff-Gefäße überführt, je 20 µl einer 10 %igen TritonX-100 Lösung hinzugegeben und mehrmals gevortext. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -18° C gelagert.

Zu den jeweils übrigen 200 µl der Proben wurden parallel je 10 µl einer 10 %igen TritonX-100 Lösung hinzugegeben, die Proben gevortext, erneut zehn Mal durch eine 27G Kanüle gezogen und mit weiteren 10 µl der Detergenz-Lösung versetzt. Die Proben wurden danach ebenfalls für 40 min bei 11.000 g und 4° C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorff-Gefäße überführt und wie oben bis zur weiteren Verwendung bei -18° C gelagert.

Zur Visualisierung der endogenen Biotin-haltigen Enzyme wurden je 30 µl der Zelllysate in einer SDS-PAGE (4 % / 8 %) aufgetrennt und mit Western Blotting (siehe 5.2.7 bzw. 5.2.8) analysiert. Die Proben wurden dafür einmal auf einem reduzierenden (je 100 mM DTT) und einmal auf einem nicht-reduzierenden Gel (keine Zugabe von DTT) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit STR-HRP (1:10.000).



5.5.7 Bindung der Biotin-Protein-SDAD Konjugate an Streptavidin-Agarose

Die Bindung der Biotin-Protein-SDAD Konjugate an Streptavidin erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Thermo Fisher Scientific [184] bzw. Koraha et al. [185].

Binding Buffer

48,5 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (steril), 1250 μl 10 % Triton X 100 (Endkonz. 0,25 %), 250 μl 10 % SDS (Endkonz. 0,05 %), Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Grenzach-Wyhlen)

Die Lösung wurde frisch hergestellt und sterilfiltriert.

Zur Überprüfung des Protokolls zur Immunopräzipitation wurden verschiedene Verdünnungen der Biotin-HSA-SDAD - bzw. Biotin-Tf-SDAD - Konjugate zu konstanten Mengen Streptavidin-Agarose (Vector Laboratories, Burlingame, CA) gegeben und die vorhandene Menge an Biotin-Konjugaten in Lösung vorher und hinterher durch Western Blotting und die Detektion mit Streptavidin-HRP überprüft.

Von beiden Biotin-Protein-SDAD – Konjugaten wurden je zwei verschiedene Konzentrationen getestet (alle Verdünnungen der Stammlösung wurden mit Binding Buffer hergestellt). Im Fall des Biotin-HSA-SDAD Konzentrationen von sowohl 5,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als auch 1,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gewählt (entspricht ca 80 nM bzw. 16 nM), für Biotin-Tf-SDAD wurden 5,13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 1,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (entspricht ca 65 nM bzw. 13 nM) untersucht.

Die Streptavidin-Agarose (STR-Agarose) Beads wurden vor der Zugabe der Proteinlösungen je sechs Mal mit PBS und danach zwei Mal mit Binding Buffer gewaschen. Im Anschluss wurden von den jeweiligen Protein-Lösungen je 400 μl (entspricht für Biotin-HSA-SDAD ca 2,1 μg und 0,42 μg ; entspricht für Biotin-Tf-SDAD ca 2,05 μg und 0,41 μg) zu 100 μl STR-Agarose (entspricht ca 50 μg) gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (610 g, 2 min) und der Überstand in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Dieser Überstand und die ursprüngliche Proteinlösung wurden miteinander anhand ihres Gehaltes an Biotin-Protein-SDAD – Konjugat verglichen (siehe 5.2.7 und 5.2.8). Die höher konzentrierten Lösungen wurden vor dem Auftragen auf die SDS-PAGE jeweils 1:4 verdünnt, um eine identische Menge an Protein auf dem Gel zu erreichen. Von jeder Probe wurden dann insgesamt 15 μl mit 5 μl 4x Probenpuffer gemischt und vor der Gelelektrophorese für 5 min bei 45° C erhitzt. Die Detektion der Biotin-haltigen Konjugate erfolgte dann mit STR-HRP wie unter 5.2.8 beschrieben.

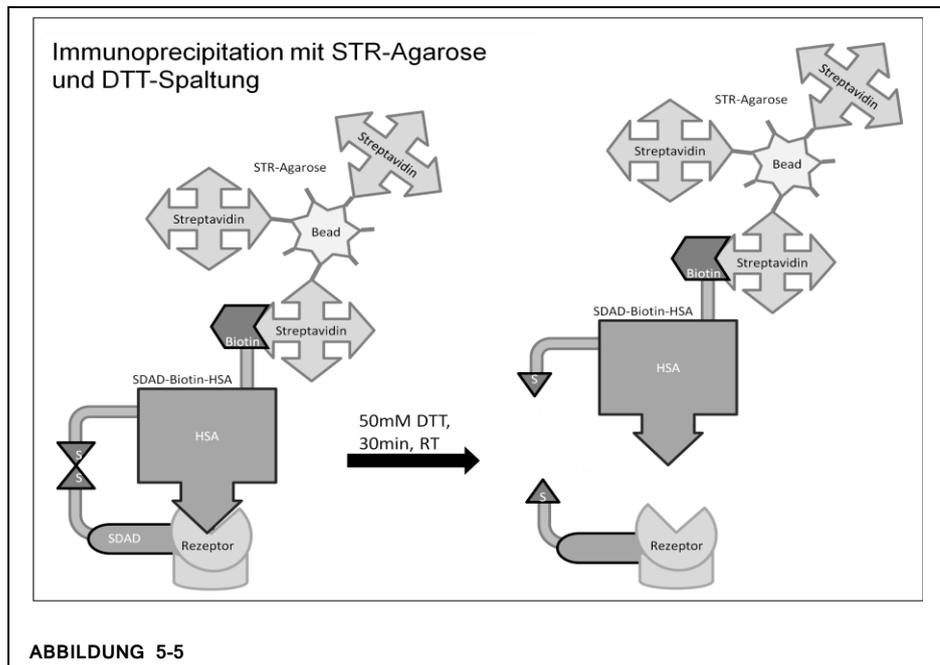
5.5.8 Aufreinigung der Lysate durch Immunopräzipitation mit Streptavidin-Agarose

Die Herstellung der Lysate erfolgte mit SC-Buffer, versetzt mit 0,5 % Triton-X 100 und 0,1 % SDS, wie unter 5.5.6 beschrieben. Für jede Probe (Biotin-HSA-SDAD, Biotin-Tf-SDAD, Kontrolle) wurde jeweils eine Probe mit subzellulärer Fraktionierung und eine Probe ohne subzelluläre Fraktionierung hergestellt. Bis zur Verwendung wurden die Lysate bei -18° C gelagert und vor der Zugabe zu den STR-Agarose Beads 1:1 mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (steril) verdünnt.

Je 600 μl der 50 %igen STR-Agarose Suspension wurden in 4 Eppendorff-Gefäße vorgelegt, sechs Mal mit je 600 μl PBS (RT) und danach zwei Mal mit je 600 μl Binding Buffer (siehe 5.5.7) gewaschen und auf 6 Eppendorff-Gefäße aufgeteilt. Der Überstand wurde erneut abzentrifugiert (610 g, 1 min) und danach jeweils 400 μl der Zellysate zu je einem Aliquot STR-Agarose hinzugegeben. Die

Immunopräzipitation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur, wobei die Proben alle 10 bis 15 Minuten suspendiert wurden.

Im Anschluss wurden die Agarose-Beads zehn Mal mit je 1 ml Binding Buffer gewaschen und schließlich je 120 µl Binding Buffer, versetzt mit 50 mM DTT, hinzugegeben. Die Spaltung der Thiol-Linker erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Die Agarose-Beads wurden daraufhin sedimentiert (610 g, 4 min) und die



Überstände in neue Eppendorff-Gefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -18° C gelagert.

5.5.9 Detektion des Transferrin Rezeptor 1 (CD71)

Die Herstellung der Zelllysate erfolgte wie unter 5.5.6 beschrieben. Die Aufreinigung durch Immunopräzipitation mit Streptavidin-Agarose und die Abspaltung der kovalent gebundenen Zellmembranproteine mit DTT erfolgte wie unter 5.5.8 beschrieben. Je 30 µl der von der Streptavidin-Agarose mit DTT abgespaltenen Proteinlösungen wurden mit 10 µl 4x Probenpuffer versetzt und jeweils zur Hälfte auf einem 8 %igen Acrylamid-Gel aufgetragen. Die weitere Auftrennung mit SDS-PAGE Gelelektrophorese und das Western Blotting erfolgten wie unter 5.2.7 (SDS-PAGE Gelelektrophorese) und 5.2.8 (Western Blotting) beschrieben. Jeweils ein Gel wurde mit MS-kompatibler Silberfärbung angefärbt (siehe 5.2.10), das andere Gel wurde zunächst mit Biotin-konjugiertem anti-CD71 (1:4000) inkubiert und danach mit STR-HRP wie unter 5.2.8 beschrieben. In einem zweiten Versuch wurden stattdessen anti-CD71 (1:1000) (Rabbit Monoclonal) und HRP-konjugierter Goat anti-Rabbit Antikörper verwendet (vergleiche auch 5.1.3 Antikörper und Streptavidin-Konjugate).

6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

6.1 Nachweis von hnRNP A2/B1 und Calreticulin auf der Zellmembran von lebenden Zellen

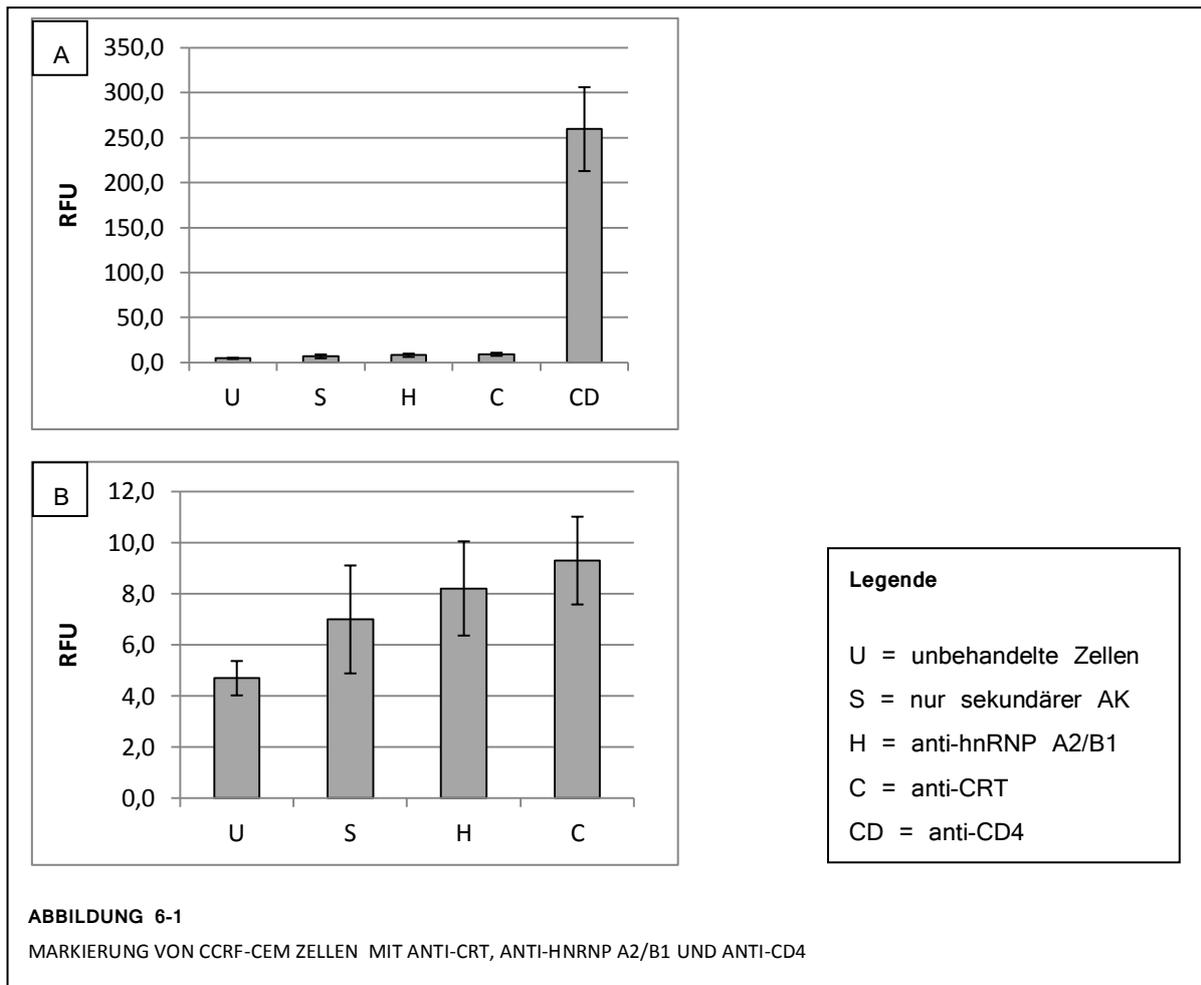
T. Fritzsche identifizierte in seiner Doktorarbeit mehrere Albumin-bindende Proteine auf der Zellmembran von drei verschiedenen Tumorzelllinien [5]. Er verwendete hierzu adhärente MCF7 und MV3 Zellen, die er mit einem UV-aktivierbaren und an HSA gekoppelten SASD-Crosslinker inkubierte, mit UV-Licht den Linker kovalent an potentiell Albumin-bindende Proteine koppelte und diese nach einer 2-Mercaptoethanol vermittelten Abspaltung des HSA durch ein im Crosslinker inkorporiertes ¹²⁵I per Autoradiographie sichtbar machte. Zusätzlich unterzog er durch einen Sucrose-Dichtegradienten isolierte Plasmamembranen von CCRF-CEM, MCF7 und MV3 Zellen einer Albumin-Affinitätschromatographie und identifizierte aus den über eine SDS-PAGE aufgetrennten Eluaten über MALDI-TOF MS mehrere Albumin-bindende Proteine. Als Kontrollen dienten in diesem letzten Versuch sowohl Zellen, die zur Überprüfung der extrazellulären Orientierung der ABPs vor der Plasmamembranisolation mit Trypsin behandelt worden waren, als auch Zellen, die vor der Plasmamembranisolation mit einem Zellhomogenat inkubiert worden waren um Artefaktbildung durch tote Zellen auszuschließen.

Um in einem ersten Schritt die von T. Fritzsche identifizierten Proteine auf der Zellmembran von lebenden Zellen nachzuweisen, wurden die beiden Proteine hnRNP A2/B1 und Calreticulin als Zielstrukturen ausgewählt. Eine erhöhte Expression von sowohl hnRNP A2/B1 als auch von Calreticulin ist mit verschiedenen malignen Erkrankungen assoziiert [142, 144-146, 153], weswegen ihre potentiell Albumin-bindende Funktion eine mögliche Erklärung für die Akkumulation von HSA-Konjugaten in soliden Tumoren [50, 186, 187] liefern würde. Beide Proteine sind zudem auch mit Autoimmunerkrankungen assoziiert, insbesondere der rheumatoiden Arthritis [139, 143, 152-154], einer weiteren Indikation für die Therapie mit HSA-Konjugaten [55].

6.1.1 Markierung von CCRF-CEM Zellen mit anti-CRT und anti-hnRNP A2/B1

Alle Schritte wurden bei 4° C durchgeführt, um eine Internalisierung der Antikörper zu vermeiden. Die Inkubationen erfolgten in serumfreiem Medium, um eine Maskierung von Calreticulin und hnRNP A2/B1 durch BSA aus dem fötalen Kälberserum zu verhindern. Die Inkubation erfolgte mit anti-hnRNP A2/B1 und anti-CRT in einer Verdünnung von jeweils 1:20. Als Negativ-Kontrollen dienten Zellen, die nur mit Sekundär-Antikörper (Alexa488-konjugierte Ziege anti-Maus Antikörper) inkubiert worden waren. Als Positiv-Kontrolle dienten Zellen, die mit anti-CD4, einem Antikörper gegen das Transmembran-Glycoprotein CD4 auf der Oberfläche von T-Zellen [188], in der Verdünnung 1:500 inkubiert worden waren. Alle verwendeten primären Antikörper waren vom Isotyp IgG (CRT: IgG2b; hnRNP A2/B1: IgG2a; CD4: IgG1κ).

Die folgende Abbildung 6-1 A zeigt die durchschnittliche relative Fluoreszenz (relative fluorescence units = RFU) von jeweils 15 000 lebenden Zellen, identifiziert durch eine fehlende Anfärbung mit dem nur nekrotisierende Zellen anfärbenden Farbstoff Propidium Iodid (PI). Die Abbildung B zeigt die RFU für alle Proben ausser den anti-CD4 behandelten Zellen.



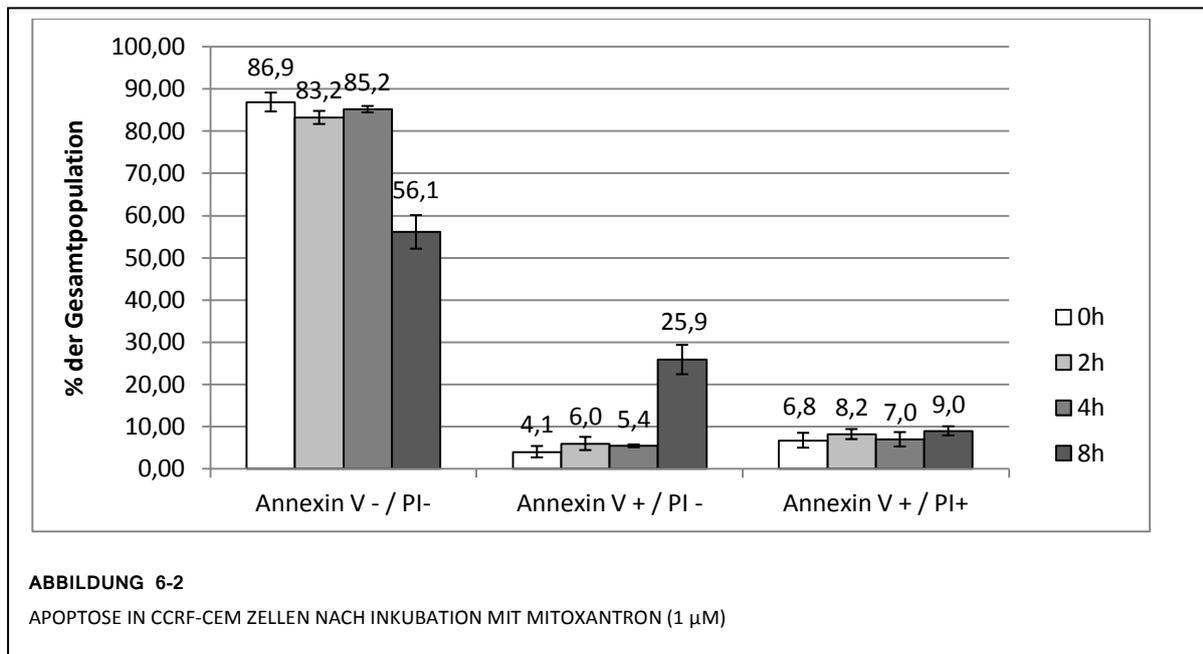
Die Zellen, die mit anti-hnRNP A2/B1 und auch diejenigen, die mit anti-CRT markiert worden waren, zeigten nur einen minimalsten Anstieg der durchschnittlichen Fluoreszenz. Im Vergleich mit den anti-CD4 inkubierten Proben ist dieser Anstieg vernachlässigbar. Demzufolge zeigte die von T. Fritzsche verwendete Zelllinie CCRF-CEM keine durch Antikörper detektierbare Expression von hnRNP A2/B1 oder Calreticulin auf ihrer Zellmembran. Zumindestens für Calreticulin könnte die Erklärung für diese Diskrepanz eine durch Apoptose induzierte Translokation auf die Zelloberfläche sein. Obeid et al. veröffentlichten 2007, dass eine Inkubation von Krebszellen mit Anthrazyklinen wie Doxorubicin und Mitoxantron zu einer Translokation von Calreticulin auf die Zellmembran von apoptotischen Zellen führt (siehe auch 3.5.2) [155]. Calreticulin zeigte sich bereits nach kurzen Inkubationszeiten und noch vor Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, und konnte hier durch Antikörper-Färbung im FACS nachgewiesen werden.

6.1.2 Induktion der Apoptose durch Mitoxantron

CCRF-CEM Zellen wurden mit Mitoxantron inkubiert um zu überprüfen, ob der von T. Fritzsche erbrachte Nachweis von Calreticulin auf der Zellmembran durch apoptotische Zellen in der von ihm verwendeten, sehr dichten Zellsuspension verursacht wurde. Die Zellen wurden hierzu mit 1 μ M Mitoxantron für 2 h, 4 h und 8 h inkubiert, als Kontrollen dienten nicht mit Mitoxantron behandelte Zellen. Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde durch Anfärbung mit Annexin V FITC und einer Gegenfärbung mit Propidium Iodid (PI) bestimmt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin auf der

Oberfläche von apoptotischen Zellen. Nekrotische Zellen, die ihre Membranintegrität bereits verloren haben, können durch eine Färbung mit PI identifiziert werden.

Die nachfolgende Abbildung 6-2 zeigt den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation zu verschiedenen Zeitpunkten. Der Anteil an Zellen, die nur PI-positiv, aber nicht Annexin V FITC positiv gefärbt waren, lag bei allen Proben unter 1 %, weswegen diese Daten hier nicht dargestellt werden.



Nach 8h waren durchschnittlich 25,9 % der Zellen Annexin V-FITC positiv und der Anteil an lebenden, Annexin V FITC und PI negativen, Zellen hatte sich auf 56 % reduziert.

Die durch Annexin V FITC angefärbte Population apoptotischer Zellen konnte auch in der Forward-Scatter (FSC) vs Sideward-Scatter (SSC) Darstellung identifiziert werden, welche die Zellpopulation abhängig von ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) zeigt. Die folgende Abbildung 6-3 zeigt die FSC vs SSC Graphik und die durch Anfärbung mit AnnexinV-FITC bzw. PI erzeugte Fluoreszenz für eine 8 h mit 1 µM Mitoxantron inkubierte Probe.

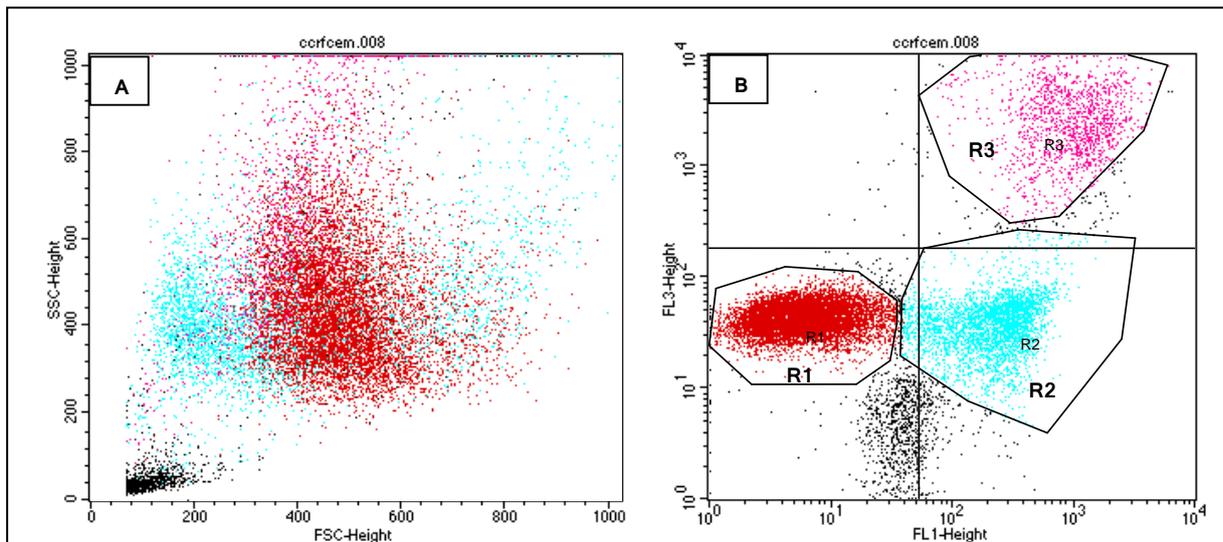


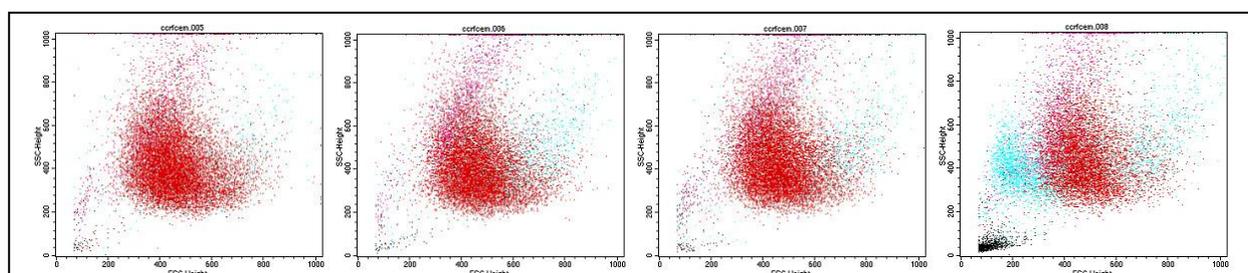
Abbildung A = FSC / SSC Dotplot Abbildung B = Annexin V-FITC (FL1) / PI (FL3) Dotplot

Region	Annexin V	PI		% der Gesamtpopulation
R1	-	-	lebend	58,89
R2	+	-	apoptotisch	22,92
R3	+	+	nekrotisch	9,29

ABBILDUNG 6-3
LOKALISATION DER APOPTOTISCHEN ZELLPOPULATION IM FSC/SSC DOTPLOT

Die hier türkis dargestellten Zellen der R2-Region wurden durch ihre positive Annexin V FITC-Markierung als apoptotische Zellpopulation identifiziert, und waren auch durch ihre Lokalisation im FSC-SSC Graphen von den lebenden Zellen in der Region R1 (rot) zu unterscheiden. Sie waren bei Proben, die entweder garnicht oder nur 2 h bzw. 4 h mit Mitoxantron inkubiert wurden, nicht in der FSC/SSC-Darstellung zu sehen.

Die nachfolgenden Bildern in der Abbildung 6-4 zeigen hierzu beispielhaft die FSC/SSC-Verteilung für 2 h, 4 h und 8 h mit 1 µM Mitoxantron inkubierten Proben sowie von unbehandelten Zellen.



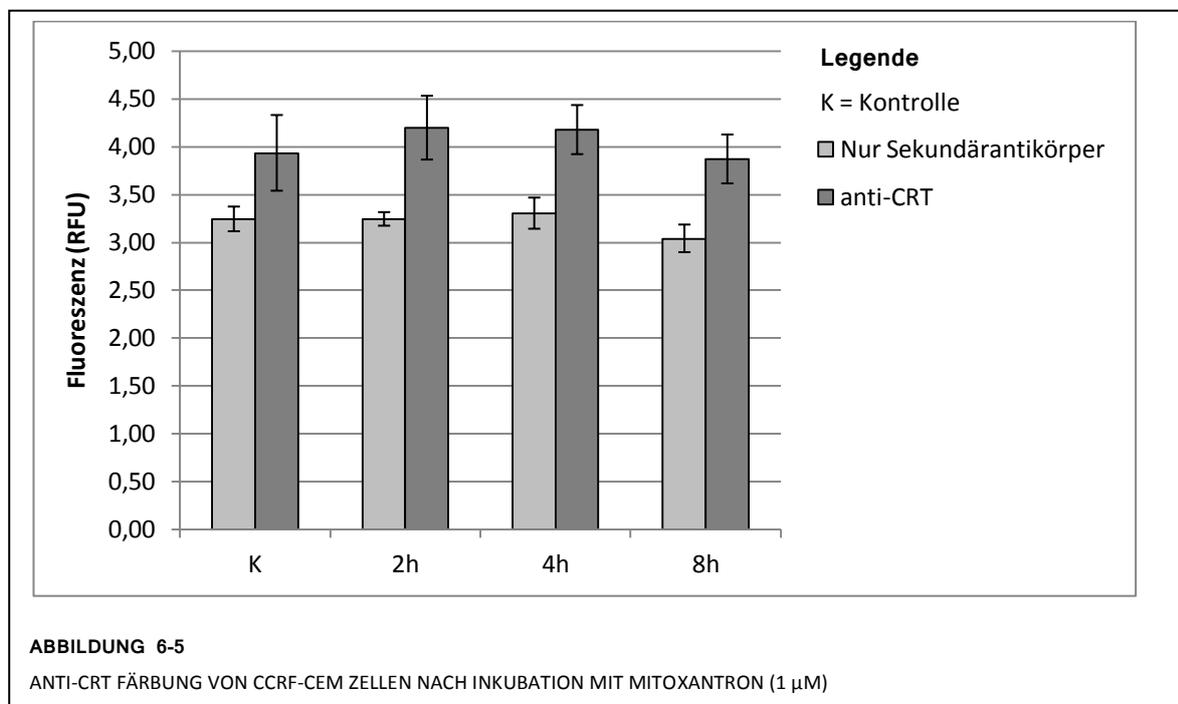
unbehandelte Zellen 2h Mitoxantron 4h Mitoxantron 8h Mitoxantron

ABBILDUNG 6-4
FSC/SSC DARSTELLUNG DER CCRF-CEM ZELLEN NACH DER INKUBATION MIT MITOXANTRON (1 µM)

6.1.3 Markierung von CCRF-CEM Zellen mit anti-CRT nach Inkubation mit Mitoxantron

Obeid et al. konnten CRT bereits nach 1 h auf der Zelloberfläche nachweisen, eine positive Annexin-Färbung war in den von ihnen verwendeten Zellen erst nach 24 h für ca. 20 % der Zellpopulation möglich, wobei zu diesem Zeitpunkt auch ca. 40-50 % nekrotische Zellen, in ihrem Fall identifiziert durch eine Anfärbung mit dem Farbstoff DAPI, vorhanden waren.

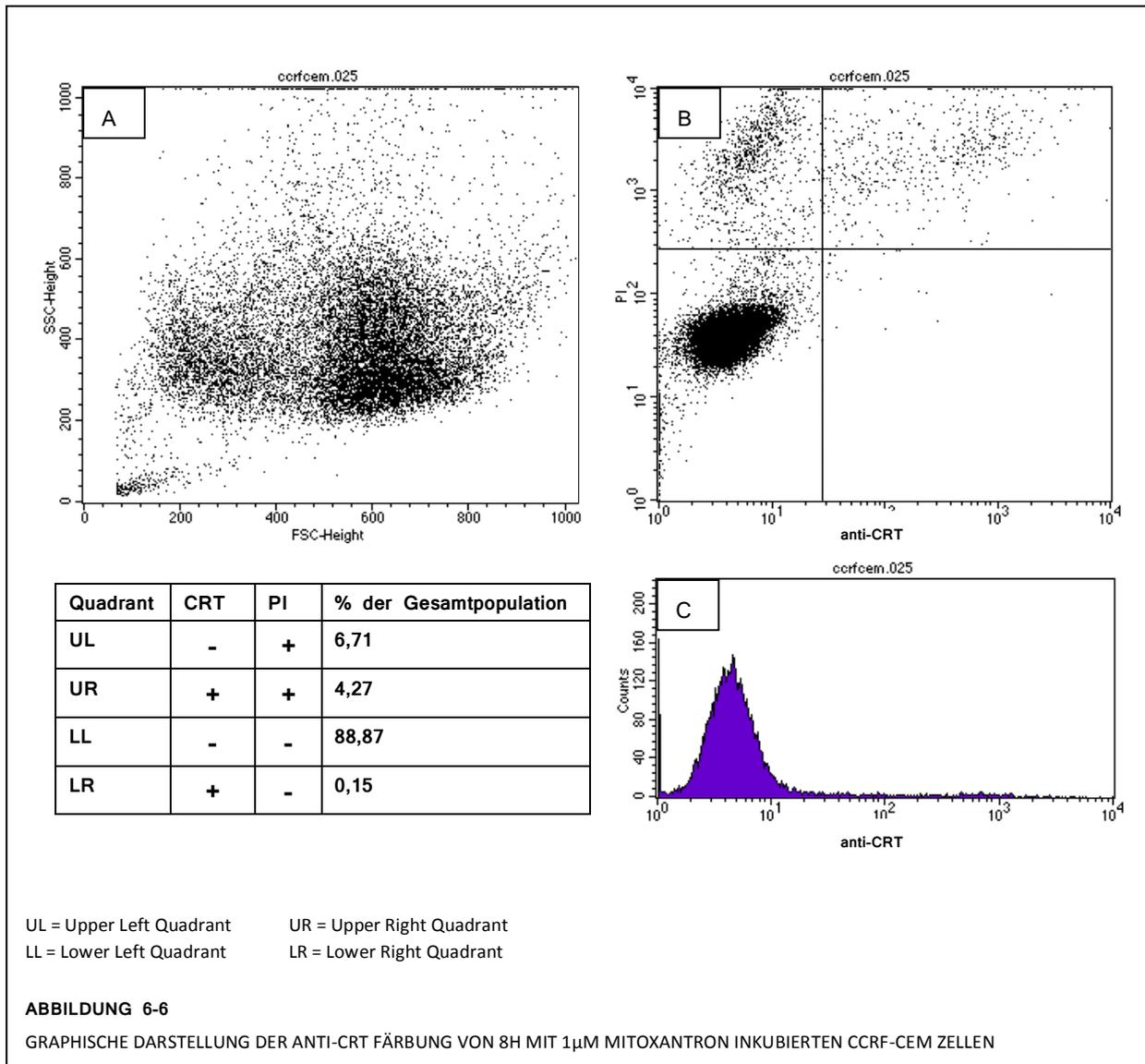
Aus diesem Grund wurden CCRF-CEM Zellen nach einer Vorinkubation mit 1 μ M Mitoxantron nach verschiedenen Zeitpunkten bis zu maximal 8 h, dem ersten Zeitpunkt, an dem eine apoptotische Zellpopulation nachgewiesen werden konnte, mit anti-CRT als primären und Alexa488-konjugiertem Sekundärantikörper angefärbt. Die Markierung erfolgte parallel zum Nachweis der Apoptose mit Annexin V-FITC und PI (Daten siehe oben). Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen sowie für jeden Zeitpunkt eine Probe, die nur mit Sekundärantikörper inkubiert worden war. Die dargestellten Daten zeigen absolute Werte. Eine Korrektur, bei der die Autofluoreszenz der Zellen abgezogen wurde, wurde nicht durchgeführt.



Bei allen untersuchten Zeitpunkten ist gegenüber der Kontrolle nur eine minimal erhöhte anti-CRT Bindung nachzuweisen. Insbesondere die Proben, die 8 h mit Mitoxantron inkubiert worden waren, zeigen eine anti-CRT Markierung, die mit den Kontrollen vergleichbar ist. Die parallel zu der anti-CRT-Markierung mit Annexin V-FITC und PI behandelten Zellen zeigten zu diesem Zeitpunkt jedoch einen ungefähren Anteil von 26 % an eindeutig identifizierbaren apoptotischen Zellen (vergleiche Abbildung 6-2). Durch die in der FSC/SSC-Darstellung bestimmten Lokalisation der apoptotischen Zellpopulation (vergleiche Abbildung 6-3 und Abbildung 6-4) war auch bei den mit Antikörpern inkubierten Proben eine klare Gruppe apoptotischer Zellen zu erkennen, die aber keine intensivere anti-CRT Färbung zeigten als die übrigen Proben.

Die nachfolgende Abbildung 6-6 zeigt hierzu beispielhaft die graphische Auswertung einer 8 h mit 1 μ M Mitoxantron inkubierten und im Anschluss mit anti-CRT eingefärbten Probe. In der Abbildung 6-6 A wird die FSC/SSC-Verteilung der Probe im Dotplot dargestellt. Zur Identifizierung von Zellen mit

intakter Membranintegrität wurden die Zellen mit PI angefärbt und Abbildung 6-6 B zeigt die Verteilung der Zellpopulation hinsichtlich der durch Annexin V-FITC und der durch PI hervorgerufenen Fluoreszenz. Die prozentualen Anteile der einzelnen Subpopulationen (LL = CRT⁻/PI⁻; LR = CRT⁺/PI⁻; UL = CRT⁻/PI⁺; UR = CRT⁺/PI⁺) werden in der zugehörigen Tabelle aufgelistet. Abbildung C zeigt zusätzlich die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten im FI-1 Kanal (515-545 nm, anti-CRT / Alexa488-konjugierter Sekundärantikörper).



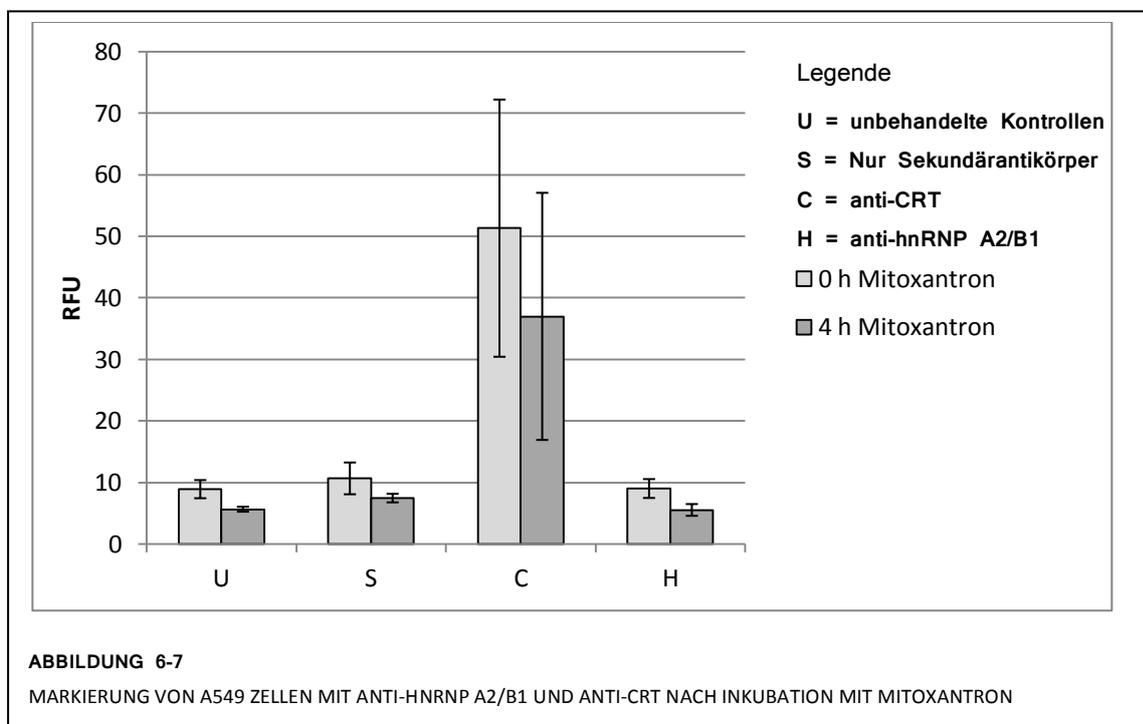
Deutlich zu erkennen ist die apoptotische Zellpopulation in der FSC/SSC-Darstellung (Abbildung A). In der Abbildung B liegt der größte Anteil der Zellpopulation im anti-CRT und PI negativem Quadranten (lower left = LL), insgesamt knapp 89 %. Nekrotische Zellen können anhand ihrer defekten Membranintegrität und der daraus resultierenden Anfärbung mit PI identifiziert werden, sie befinden sich in der Abbildung B im oberen linken Quadranten (upper left = UL). Ihr Anteil beträgt ungefähr 6,7 %. Anti-CRT positive Zellen mit intakter Membranintegrität befinden sich im unteren rechten Quadranten (lower right = LR), wobei ihr Anteil hier bei 0,15 % liegt. Im oberen rechten Quadranten (upper right = UR) liegen die restlichen 4,27 % an Zellen, die sowohl anti-CRT positiv als auch PI positiv fluoreszierten. Abbildung C zeigt die Fluoreszenz-Verteilung der Probe, die aus der anti-CRT Färbung resultiert.

Deutlich zeigt sich die Häufung im Bereich RFU 1-10, wobei ein schwaches Signal auch auf der restlichen x-Achse zu erkennen ist. Die Quadranten-Auswertung zeigt jedoch, dass insgesamt nur 4,42 % der Zellen anti-CRT positiv färbten, wobei hiervon nur 0,15 % nicht PI positiv waren. Zellen, deren Membranintegrität verloren gegangen ist, können unspezifisch Sekundärantikörper akkumulieren und somit positiv im FI1-Kanal erscheinen. Die restlichen 0,15 % der anti-CRT positiven Zellen sind im Hinblick auf die nachweisbare Apoptose von durchschnittlich 26 % einer Zellpopulation, die unter gleichen Bedingungen inkubiert worden war, vernachlässigbar.

Obwohl Mitoxantron folglich eindeutig eine Apoptose in CCRF-CEM Zellen induzierte, zeigte auch die apoptotische Zellpopulation der CCRF-CEM kein durch Antikörper-Färbung nachweisbares CRT auf der Zellmembran.

6.1.4 Markierung von A549 Zellen mit anti-CRT

Die durch Obeid et al. erzeugte Translokation von CRT auf die Zellmembran konnte von diesen auch in A549 Zellen, eine humane NSCLC-Zelllinie, nach der Inkubation mit Anthracyclinen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die Antikörper-Färbung mit anti-CRT sowie, als Kontrolle, mit anti-hnRNP A2/B1 für diese Zelllinie wiederholt. Die adhärenenten Zellen wurden zunächst für 4 h mit 5 µM Mitoxantron inkubiert, als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen. Im Anschluss wurden sie anstelle des üblicherweise verwendeten Trypsins mit EDTA abgelöst, um einen Abbau von zellmembranständigem CRT durch das Enzym zu vermeiden. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in Suspension und bei 4° C wie in den Methoden beschrieben. Die nachfolgende Abbildung 6-7 zeigt die durchschnittliche Fluoreszenz von jeweils 15000 lebenden Zellen.



Wie erwartet war die durchschnittliche Fluoreszenz der unbehandelten Zellen, der nur mit Sekundärantikörper inkubierten Zellen sowie der mit anti-hnRNP A2/B1 behandelte Zellen vergleichbar und gering. Mit anti-CRT behandelte Zellen zeigten eine eindeutig erhöhte durchschnittliche Fluoreszenz, allerdings mit einer hohen Varianz in den drei Versuchen. Zudem

konnten die Zellen auch mit anti-CRT markiert werden, wenn sie zuvor nicht mit Mitoxantron inkubiert worden waren. Für alle Proben war die Fluoreszenz des Alexa488-konjugierten Sekundärantikörpers geringer, wenn die Zellen vorher mit Mitoxantron inkubiert worden waren. Dieses „Quenching“ der Fluoreszenz durch Mitoxantron ist wahrscheinlich bedingt durch eine Absorption von Mitoxantron bei der Emissionswellenlänge von 520 nm des Alexa488-konjugierten Sekundärantikörpers. Das Absorptionsmaximum von Mitoxantron liegt zwar bei 610 nm (Emissionsmaximum bei 690 nm), aber eine geringe Anregung findet auch bei 520 nm statt [189]. Ein ähnlicher Effekt wird in den Untersuchungen der Aufnahme von Substanzen, die mit einem 488 nm/520 nm- Fluorophor konjugiert sind, ausgenutzt. Trypan Blau dient hier dazu, die Fluoreszenz von extrazellulär bindender Substanz zu löschen, da es bei 520 nm absorbiert. Übrig bleibt nur die Fluoreszenz der intrazellulär aufgenommenen Substanz [190, 191].

Die mit anti-CRT inkubierten Proben zeigten jeweils einen deutlichen Anstieg in ihrer durchschnittlichen Fluoreszenz im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, den Zellen, die nur mit Sekundärantikörper inkubiert worden waren und den mit anti-hnRNP A2/B1 markierten Zellen. Dieser Effekt kann nicht durch eine unspezifische Akkumulation von Antikörpern in Zellen mit zerstörter Membranintegrität hervorgerufen worden sein, da weder Proben, die nur mit sekundärem Antikörper inkubiert worden waren, noch Proben, die mit anti-hnRNP A2/B1 als primären Antikörper in 5fach höherer Konzentration inkubiert worden waren, diesen Effekt zeigten. Zudem wurden bei diesen Versuchen nur Zellen, die nicht mit PI angefärbt werden konnten, in der Auswertung berücksichtigt. Die positive Färbung mit anti-CRT Antikörper war zwar jeweils eindeutig, das Ausmaß war jedoch sehr unterschiedlich und zudem unabhängig von einer Inkubation mit Mitoxantron. Eine Erklärung hierfür könnte in dem experimentellen Ablauf liegen, dem die adhären A549 Zellen ausgesetzt wurden. Die Ablösung mit EDTA erforderte ein unterstützendes Abschaben mit einem Cell Scraper, zudem wurden die Zellen über einen längeren Zeitraum in Suspension gehalten, um eine Antikörper-Färbung zu ermöglichen. Diese Behandlung führte wahrscheinlich zu einer Apoptose der Zellen unabhängig von der Vorinkubation mit Mitoxantron, weswegen sich bei allen Proben bereits Calreticulin auf der Zelloberfläche zeigte. Auch wenn eine geringere Varianz wünschenswert wäre, zeigen die Ergebnisse jedoch, dass die anti-CRT Färbung prinzipiell funktioniert und im FACS quantifizierbar ist.

6.1.5 Zusammenfassende Diskussion zur Detektion von CRT und hnRNP A2/B1

Im Gegensatz zu den von T. Fritzsche publizierten Daten war es nicht möglich, die Anwesenheit von Calreticulin oder von hnRNP A2/B1 auf der Oberfläche von CCRF-CEM Zellen nachzuweisen. Auch die Hypothese, dass der Nachweis von Calreticulin in den von T. Fritzsche isolierten Zellmembranpräparationen aufgrund eines Anteils an apoptotischen Zellen gelang, lies sich nicht bestätigen. Die von ihm verwendeten CCRF-CEM Zellen zeigten trotz Mitoxantron-induzierter Apoptose keine positive CRT-Färbung im FACS. Die zur Kontrolle der verwendeten Methode untersuchten A549 Zellen hingegen konnten erfolgreich mit anti-CRT und dem korrespondierenden Sekundärantikörper markiert werden. Diese Markierung war zwar unabhängig von einer Inkubation mit Mitoxantron und zudem mit einer hohen Varianz behaftet, beweist aber dennoch, dass eine Anfärbung von auf der Zellmembran lokalisierten CRT mit dem verwendeten anti-CRT Antikörper im FACS funktioniert. Die Mitoxantron-unabhängige Färbung erklärt sich hier wahrscheinlich aus der verwendeten experimentellen Methode, die eine Inkubation der adhären Zellen in Suspension über einen längeren Zeitraum erforderte. Hinsichtlich der Auswahl des anti-CRT Antikörpers sei auch

erwähnt, dass ein Antikörper desselben von mir verwendeten Zellklons (FMC75) mit dem Fluorophor DyLight 488 konjugiert auch für Flow Cytometry angeboten wird (Calreticulin Monoclonal Antibody (FMC 75) DyLight 488 Conjugate, Stressgen, Ann Arbor, USA). Die vom Hersteller empfohlene Verdünnung (1:20) entspricht der in meinen Versuchen verwendeten.

Anders als für anti-CRT war es nicht möglich, eine positive Färbung der verwendeten Zellen mit anti-hnRNP A2/B1 in einem der Versuche zu erreichen. Der verwendete Antikörper ist laut Herstellerangaben in der Immunopräzipitation von Zelllysaten und der Immunofluoreszenz mit fixierten Zellen erprobt, eine Färbung von lebenden Zellen mit intakter Membran ist nicht publiziert, da es sich bei hnRNP A2/B1 um ein intrazelluläres, insbesondere im Nukleus lokalisiertes, Protein handelt. Im Anbetracht der Tatsache, dass es jedoch auch für Calreticulin, einem Protein mit nachgewiesener Lokalisation auf der Zellmembran von apoptotischen Zellen, nicht möglich war, die Ergebnisse von T. Fritzsche et al. zu verifizieren, ist der fehlende Nachweis von hnRNP A2/B1 meiner Ansicht nach jedoch kein methodischer Fehler sondern die Abbildung der Realität. Zur Begründung dieser These möchte ich im folgenden nochmals genauer auf die von T. Fritzsche verwendeten Methoden eingehen (vergleiche auch 3.5.3 Die Arbeit von T. Fritzsche et al.).

T. Fritzsche isolierte Zellmembranen aus CCRF-CEM Zellen und reinigte diese durch einen Sucrose-Dichtegradienten auf. Nach einer anschließenden Albumin-Affinitätschromatographie wurden die Eluate über eine SDS-PAGE aufgetrennt, mit kolloidalem Coomassie angefärbt, einzelne Banden ausgeschnitten und im MALDI-TOF MS analysiert. Alternativ wurden die solubilisierten Fraktionen des Sucrose-Dichtegradienten direkt über eine SDS-PAGE aufgetrennt und Albumin-bindende Proteine über eine Inkubation mit HSA und einer nachfolgenden Antikörper-Kaskade detektiert. Zusätzlich wurde hier die Kontamination mit nukleären Membranen durch anti-Nucleopor Antikörper überprüft.

Diskussionswürdig an der Arbeit von T. Fritzsche ist die Tatsache, dass er die Aufreinigung seiner isolierten Membranen als eine Methode zur absoluten Trennung der unterschiedlichen in der Zelle vorhandenen Organellen bzw. Membranen betrachtet. So überprüft er zwar die Anwesenheit von nucleären Proteinen, wobei hier erwähnt werden muss, dass die Zellkerne relativ gut durch eine initiale Zentrifugation von den restlichen zellulären Bestandteilen abgetrennt werden können, aber er überprüft nicht die Anwesenheit weiterer intrazellulärer Membranen wie zum Beispiel des endoplasmatischen Reticulums (ER), welches die Hauptlokalisierung von Calreticulin in der Zelle darstellt [152]. Zudem ist meiner Ansicht nach auch sein Beweis, dass keine nucleären Proteine in seinen Fraktionen vorhanden sind, fragwürdig. In einzelnen Fraktionen seiner Auftrennung über den Sucrose-Dichtegradienten konnten sie über eine Verstärkung des Signals durch weitere Antikörper im Rahmen der Albumin-Anti-Albumin Kaskade sichtbar gemacht werden. Die durch den Dichtegradienten erzielte Auftrennung bewirkt zwar eine Anreicherung bestimmter intrazellulärer Bestandteile in einzelnen Fraktionen, aber es handelt sich hierbei eben nicht um eine absolute, zu 100 % effektive Trennung. Ein Nachweis von Nucleopor-Proteinen in einigen, von ihm zugegebenermaßen nicht für die Identifikation von Albumin-bindenden Proteinen verwendeten, Fraktionen schließt demzufolge eine minimale Kontamination der für die Identifizierung von Albumin-bindenden Proteinen verwendeten Fraktionen nicht aus. Dies ist insbesondere hinsichtlich der hauptsächlich nucleären Lokalisation von hnRNP A2/B1 interessant.

Auffallend ist zudem, dass T. Fritzsche in seiner Dissertation eine frühere Methode erwähnt, in der die Auftrennung über einen Dichtegradienten und die Ausfällung des glatten ER über $MgCl_2$ fehlt.

Nach Charakterisierung der so isolierten Proteine über MALDI-TOF MS wurden eine ganze Anzahl Proteine aus dem ER und aus Mitochondrien identifiziert, unter anderem die ATP Synthase subunit alpha, die Untereinheit einer in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisierte ATPase, welche von T. Fritzsche selbst als Anzeichen einer Kontamination mit mitochondrialen Proteinen angesehen wurde. Durch die Fraktionierung mit dem Sucrose-Dichtegradienten postulierte T. Fritzsche eine „Anreicherung“ der Plasmamembranen in den Fraktionen A und B. Selbst wenn man dieser Argumentation folgt, schließt dies wie bereits erwähnt eine Kontamination mit anderen Membranen, insbesondere des ER, nicht aus. So wird in der von T. Fritzsche verfassten Publikation auch nicht erwähnt, dass auch nach der Modifizierung der Methode noch die „ATP Synthase subunit beta chain mitochondrial precursor“ als Albumin-bindendes Protein durch MALDI-TOF MS identifiziert wurde, der Vorläufer einer anderen Untereinheit der gleichen mitochondrialen ATPase. Hier sei angemerkt, dass die α/β Untereinheiten der ATP Synthase zuerst 1999 tatsächlich auf der Zelloberfläche von Endothelzellen gefunden wurden [192], die α -Untereinheit zudem auch auf der Zelloberfläche von humanen T-Zellen [193]. Allerdings identifizierte T. Fritzsche explizit den „mitochondrial precursor“ der β -Untereinheit, also den mitochondrialen Vorläufer. Meiner Ansicht nach ist dies ein klarer Hinweis auf eine trotz modifizierter Methode bestehende Kontamination der „aufgereinigten Zellmembranen“ mit intrazellulären Membranen.

Neben dieser experimentell bedingten Kontamination der aufgereinigten Plasmamembranen mit intrazellulären Membranen, setzte T. Fritzsche aufgrund hoher Verluste in der Ausbeute seine zunächst verwendete CNBr-Sepharose Vorsäule nicht mehr vor der Albumin-Affinitätschromatographie ein. Vor der Elution der „Albumin-bindenden Proteine“ wurde die HSA-Sepharose zudem nur drei Mal gewaschen. Bei der Verwendung von Streptavidin-Beads (siehe 5.5.8 Aufreinigung der Lysate durch Immunopräzipitation mit Streptavidin-Agarose) habe ich durch eigene Erfahrung feststellen müssen, dass ich auch nach doppelt so häufigem Waschen noch hauptsächlich unspezifische Banden der Lysate auf der SDS-PAGE anfärben konnte. Beides zusammen spricht dafür, dass sowohl eine unspezifische Bindung an die HSA-Sepharose als auch eine ungenügende Reinigung als weitere Ursache für eine Isolation von hnRNP A2/B1 und Calreticulin aus den Zellmembranen nicht ausgeschlossen werden können.

Diese methodischen Probleme sind deswegen von Bedeutung, weil die so extrahierten Proteine über eine sehr sensitive Analysenmethode, MALDI-TOF MS, identifiziert wurden. Auch kleine Kontaminationen bekommen so in der nachfolgenden Auswertung ein großes Gewicht. hnRNP A2/B1 ist eines der am häufigsten in der Zelle vorkommenden Proteine [138] und zudem konnte meiner Ansicht nach Restbestände von nucleären Bestandteilen in den verwendeten Fraktionen nicht nachweislich eliminiert werden. Zwar wurde von Zhou et al. 1996 eine „membrangebundene“ Lokalisation für hnRNP A2/B1 in Gewebeschnitten von NSCLC Proben gezeigt [160], nachfolgend ist dies jedoch nie wieder publiziert worden und auch eine intensive Literaturrecherche lieferte keine weiteren Ergebnisse oder Methoden zu diesem Thema. Calreticulin hingegen ist zwar mittlerweile auf der Plasmamembran von apoptotischen Tumorzellen identifiziert worden [155], dieser Nachweis war jedoch für die von T. Fritzsche verwendeten CCRF-CEM Zellen nicht möglich. Im Anbetracht der möglichen Verunreinigung mit ER-Membranen ist meiner Ansicht nach auch die Identifikation von Calreticulin in den von ihm verwendeten Fraktionen ein experimentelles Artefakt. Hinsichtlich der Aufnahme von Albumin-Konjugaten in humane Tumorzelllinien wäre aber auch die Lokalisation von Calreticulin auf der Zellmembran von bereits apoptotischen Zellen nicht für die Entwicklung von HSA-basierten Therapeutika relevant, selbst wenn Calreticulin hier als Albumin-bindendes Protein agieren

würde. Der letzte Teil der hier vorgelegten Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung einer Methode zur Identifizierung von Albumin-bindenden Proteinen auf der Oberfläche von lebenden Zellen, die die oben beschriebene Aufreinigung durch den Dichtegradienten und die mit hohen Verlusten behaftete Albumin-Affinitätschromatographie umgeht.

6.2 Untersuchung der Clathrin-abhängiger Endozytose von HSA

Die Akkumulation von HSA in dem Gewebe von soliden Tumoren wurde bereits mehrfach nachgewiesen [104, 187, 194-196]. Gleiches gilt für die Akkumulation in chronisch entzündlichen Geweben, wie sie zum Beispiel für die rheumatoiden Arthritis charakteristisch sind [55, 197]. Auch in der Zellkultur konnte die intrazelluläre Aufnahme von Albumin-Konjugaten sowohl in humane Tumorzellen [198, 199] als auch in synoviale Fibroblasten, die aus Rheuma-Patienten isoliert wurden [200], nachgewiesen werden. Der eigentliche Mechanismus dieser intrazellulären Aufnahme wurde jedoch bisher nicht weiter untersucht. Die Clathrin-abhängige Endozytose ist eine der am besten untersuchten Mechanismen der Rezeptor-vermittelten zellulären Aufnahme. Um eine Versuchsreihe für die Untersuchung des Endozytose-Mechanismus von HSA in humane Tumorzellen zu etablieren, wurde daher in einem ersten Schritt die Untersuchung der Clathrin-abhängigen Endozytose ausgewählt. Die CME wird durch Monodansylcadaverin, Phenylarsinoxid, Chlorpromazin, hypertone Sucrose, Kaliummangel, cytosolische Ansäuerung und RNAi Interferenz gegen CME-spezifische Proteine gehemmt [21]. In meiner Arbeit habe ich die Inhibition der CME durch hypertone Sucrose, Kaliummangel, Chlorpromazin und siRNA gegen Clathrin Heavy Chain (CHC) in A240286S Zellen untersucht und, wo möglich, den resultierenden Effekt auf die Internalisierung von Albumin quantifiziert. In den Versuchen zur Hemmung der CME mit siRNA gegen CHC wurden zusätzlich HeLa-Zellen, für die die verwendete Transfektions-Methode bereits etabliert war [163], als Kontrolle der Transfektionseffektivität in den A240286S Zellen eingesetzt.

6.2.1 Generelle Anmerkungen zu den Experimenten

Da Transferrin nach seiner Bindung an den Transferrinrezeptor spezifisch über CME in die Zelle aufgenommen wird [201], diente Alexa488-Transferrin (Alexa488-Tf) in allen Versuche als Kontrollsubstanz, um das erreichte Ausmaß der CME-Inhibition zu überprüfen. Transferrin wird sehr schnell internalisiert und nach der pH-bedingten Ablösung der gebundenen Eisenionen in den Early Endosomes auch sehr schnell wieder zur Zelloberfläche recycelt [201]. Die Transferrin-Aufnahme wurde demzufolge jeweils bis zu einem Zeitpunkt von maximal 32 min untersucht. Durch die spezifische Bindung an den Transferrinrezeptor und die schnelle Internalisierung ist es bei der Untersuchung der Aufnahme nötig, an der Membran adsorbiertes Transferrin sofort nach Beendigung der Inkubationszeit durch eine saure Waschlösung zu entfernen [172]. Im Gegensatz zu Transferrin wird Albumin sehr viel langsamer aufgenommen und die Inkubationszeit wurde deswegen in einigen Versuchen bis auf maximal 64 min ausgedehnt. Längere Inkubationszeiten sind wegen der nicht-quantifizierbaren Effekte von Recycling, Abbau und unspezifischer Fluid-Phase Endozytose der verwendeten Probe für eine Untersuchung des Aufnahmemechanismus nicht geeignet [20]. Im Falle der Inhibition der CME durch hypertones Medium wurde zusätzlich der Einfluss auf die Internalisierung von Tetramethylrhodamin-Dextran (TMR-Dextran) untersucht. Dextran ist ein Molekül, das als Marker für eine unspezifische Aufnahme, zum Beispiel über Fluid-Phase Endozytose, verwendet wird [20]. TMR-Dextran diente hier folglich zur Quantifizierung der durch das hypertone Medium induzierten Effekte auf CME-unabhängige Aufnahmemechanismen.

Die Quantifizierung der aufgenommenen Proben erfolgte jeweils anhand der intrazellulären Fluoreszenz im FACS. Neben der Aufnahme bei 37° C wurden die Versuche parallel bei 4° C durchgeführt, eine Temperatur, bei der keine energieabhängigen Vorgänge in der Zelle stattfinden

[20], um unspezifische Effekte wie Adsorption der Probe an die Zellmembran und Diffusion von freiem, als potentielle Verunreinigung in den Proben vorhandenem, Fluorophor in die Zelle zu überprüfen. In allen Versuchen wurde zudem die Hintergrundfluoreszenz der Zellen, hervorgerufen durch Autofluoreszenz und eventuell noch extrazellulär gebundene Probe, durch eine Inkubation bei „0 min“, also einer sich direkt nach der Zugabe anschließenden Entfernung der Inkubationslösung, bestimmt und von den Messwerten aller korrespondierenden Proben abgezogen.

Aminofluorescein- oder FITC-markiertes Albumin ist nicht für eine Quantifizierung der Aufnahme geeignet, da beide Fluoreszenzfarbstoffe eine pH-abhängige Fluoreszenz aufweisen [202, 203]. Die Aufnahme in zunehmend saure Organellen wie den Early oder Late Endosomes und auch den Lysosomen nach der initialen Internalisierung verändert die Fluoreszenz der Probe und verfälscht so das Messergebnis. Zunächst wurde ein selbst-synthetisiertes TRITC (= Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat)-HSA für Aufnahmestudien verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine minimale Verunreinigung der Probe mit freiem Fluorophor zu einer Anreicherung desselben in der Zelle führte. TRITC hat eine ähnliche chemische Struktur wie der zur Anfärbung von Mitochondrien verwendete Farbstoff Rhodamin 123 [204]. Unkonjugierter Farbstoff diffundiert deshalb unspezifisch in die Zelle und reichert sich in Mitochondrien an, die gemessene durchschnittliche Fluoreszenz konnte daher so nicht als Maß für die Aufnahme von TRITC-HSA verwendet werden. Zur Etablierung der Methoden wurde deshalb zunächst kommerziell erwerbliches Alexa488-BSA (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Alexa488 ist ein pH-unabhängiges Fluorophor mit geringem Ausbleichen und einer hohen Quantenausbeute, was insbesondere im Hinblick auf die langsame Aufnahme von Albumin eine wichtige Eigenschaft darstellt. Die durchschnittliche Beladung des verwendeten Alexa488-BSA war laut Herstellerangaben 7 Moleküle Fluoreszenzfarbstoff pro Proteinmolekül.

Eine Behandlung der mit fluoreszenz-markiertem Albumin inkubierten Zellen mit saurer Waschlösung, welche bei der Inkubation mit Alexa488-Transferrin verwendet wurde, um an der Zellmembran gebundene Probe zu entfernen, führte zu stark schwankenden Ergebnissen sowohl zwischen den einzelnen Versuchen als auch innerhalb der Zellpopulation. Letzteres war anhand der breiten Verteilung der im FACS bestimmten RFU deutlich zu erkennen. Anders als erwartet, reduzierte sich die Fluoreszenz der Zellen nach der Behandlung mit saurer Waschlösung nicht, sondern war im Vergleich zu den nicht mit Waschlösung behandelten Zellen erhöht. Da Albumin wie alle Proteine an seinem isoelektrischen Punkt (pH 4,7) am wenigsten in Wasser löslich ist [41], vermute ich, dass eine Absenkung des pH-Wertes zu einer verstärkten Adsorption der Probe an der Zellmembran führte, was die Fluoreszenz-Verstärkung und die unterschiedliche Intensität innerhalb der Zellpopulation erklären würde. Aus diesem Grund wurde die Behandlung mit saurer Waschlösung für mit Albumin-inkubierten Proben nur bei den Transfektions-Versuchen mit siRNA gegen Clathrin Heavy Chain durchgeführt. Alle Zellen wurden jedoch von der Kulturschale mit Trypsin abgelöst, einer Protease, die *per se* extrazelluläre (Membran)proteine spaltet, und die unspezifische Bindung zudem über die Inkubationen bei 4° C überprüft.

6.2.2 Inhibition der CME durch hypertones Medium

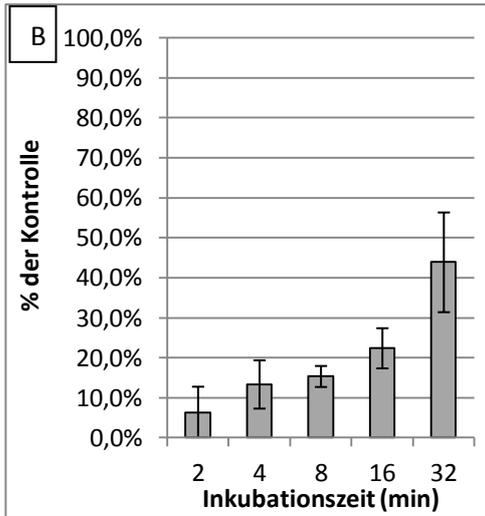
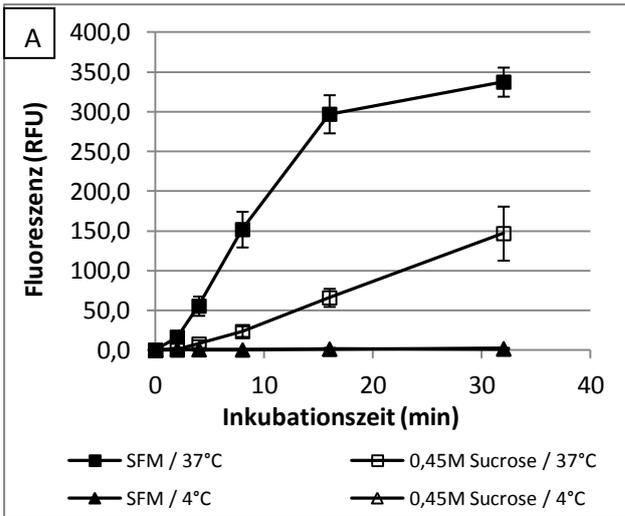
Hypertones Medium inhibiert die Clathrin-abhängige Endozytose durch eine Zerstörung der Clathrin-Netzwerke auf der Plasmamembran [205]. Angelehnt an die ursprüngliche Methode von Heuser et al. [174] wurden A240286S Zellen für 30 min mit serumfreiem Medium, das 0,45 M Sucrose enthielt,

vorinkubiert, bevor entweder Alexa488-Transferrin (100 nM), Alexa488-BSA (1,5 μ M) oder TMR-Dextran (14 μ M) zugegeben wurde. Der durch die Sucrose hervorgerufene Effekt ist reversibel, weswegen die Inkubation mit den verwendeten Proben ebenfalls in hypertonem Medium stattfinden muss [206]. Zellen, die zur Quantifizierung der ungehemmten Aufnahme verwendet wurden, wurden 30 min mit serumfreiem Medium vorinkubiert. Die Aufnahme von Alexa488-Transferrin, Alexa488-BSA bzw. TMR-Dextran wurde anhand der im FACS gemessenen, durchschnittlichen Fluoreszenz (RFU) von 15 000 lebenden Zellen verfolgt.

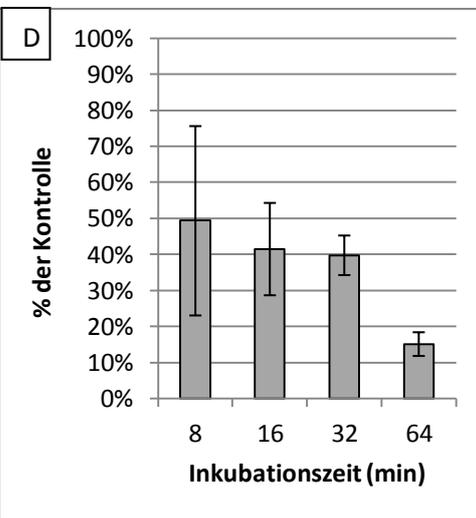
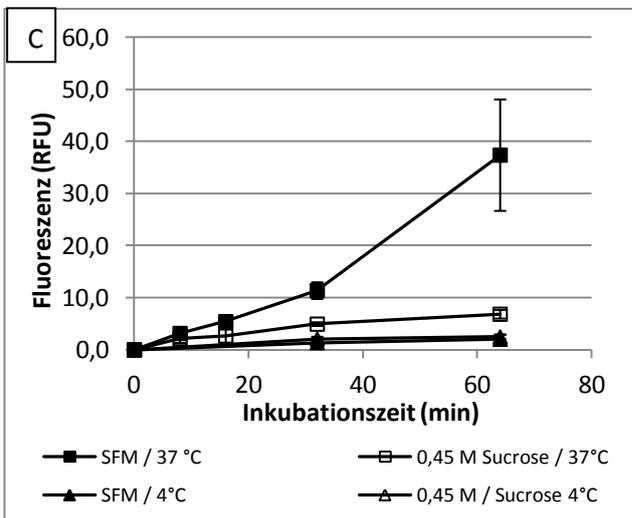
Die nachfolgende Abbildung 6-8 A zeigt die Aufnahme von Alexa488-Transferrin in A240286S Zellen über 32 min. Parallel wird durch ein Balkendiagramm 6-9 B die Aufnahme von Alexa488-Transferrin unter hypertonen Bedingungen als prozentualer Anteil der Aufnahme in serumfreiem Medium dargestellt. Abbildung 6-8 C zeigt die Aufnahme von Alexa488-BSA in A240286S Zellen über 64 min. Das Balkendiagramm in Abbildung 6-8 D stellt parallel dazu die Aufnahme von Alexa488-BSA unter hypertonen Bedingungen als prozentualer Anteil der Aufnahme in serumfreiem Medium dar.

Dextran wird als Kontrollsubstanz für die Fluid-Phase Endozytose einer Zelle eingesetzt. Es wird nur unspezifisch aufgenommen und wurde hier verwendet, um den Einfluss des hypertonen Mediums auf andere Endozytose-Mechanismen als der CME zu überprüfen. Die nachfolgende Abbildung 6-8 E zeigt die Aufnahme von TMR-Dextran in A240286S Zellen über 90 min unter hypertonen Bedingungen. Parallel wird durch das Balkendiagramm in Abbildung 6-8 F die Aufnahme von TMR-Dextran in die mit hypertonem Medium vorbehandelten Zellen als prozentualer Anteil der Aufnahme in die unbehandelten Kontrollen dargestellt.

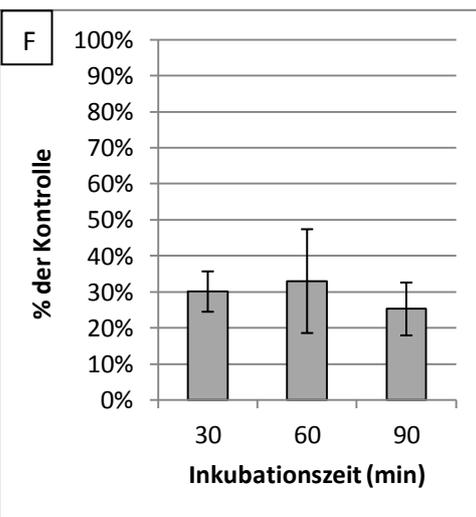
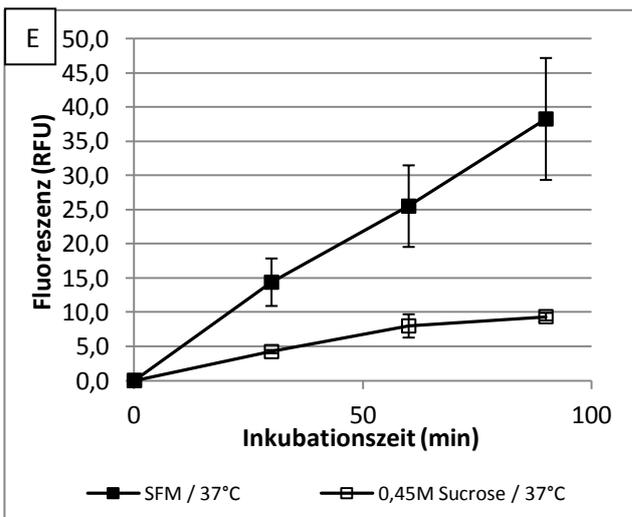
Aufnahme von Alexa488-Transferrin



Aufnahme von Alexa488-BSA



Aufnahme von TMR-Dextran



SFM = serumfreies Medium; Kontrolle = SFM ohne Sucrose

ABBILDUNG 6-8

AUFNAHME VON ALEXA488-TF, ALEXA488-BSA UND TMR-DEXTRAN IN A240286S ZELLEN UNTER HYPERTONEN BEDINGUNGEN

Die Aufnahme von Alexa488-Transferrin ist ein energieabhängiger Prozess, da A240286S-Zellen, die bei 4° C inkubiert wurden, nur eine sehr geringe Aufnahme zeigten. Der zeitabhängige Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz (Abbildung 6-9 A) verläuft, wie erwartet, nicht linear. Der charakteristische Kurvenverlauf einer Transferrin-Aufnahmestudie kommt durch die schnelle Aufnahme und das zu späteren Zeitpunkten bereits stattfindende Recycling der fluoreszenzmarkierten Probe zustande [207]. Die relative Hemmung der Aufnahme unter hypertonen Bedingungen (Abbildung 6-9 B) ist dementsprechend auch höher für die kürzeren Inkubationszeiten. Nichtsdestotrotz wurde in den behandelten Zellen auch nach 32 min nur ca 44 % der in den unbehandelten Zellen gemessenen Fluoreszenz nachgewiesen. Die Quantifizierung der Aufnahme von Alexa488-Transferrin in A240386S Zellen im FACS war also erfolgreich und eine Hemmung der CME-vermittelten Aufnahme von Alexa488-Transferrin in A240286S Zellen durch das hypertone Medium konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Vergleichbar mit der Aufnahme von Alexa488-Tf war auch die Aufnahme von Alexa488-BSA in A240286S Zellen energieabhängig, wie die niedrigere Fluoreszenz der Zellen bei 4° C zeigen. Insgesamt ist die aufgenommene Menge an Albumin-konjugiertem Fluorophor jedoch sehr viel geringer als die von Alexa488-Transferrin. Die Messeinheit für die im FACS bestimmte Fluoreszenz wird als „Relative Fluorescence Units“ dargestellt, da die absolute Fluoreszenz abhängig ist von der jeweils verwendeten Einstellung am Gerät, dem „Fluorescence Gain“, also der Verstärkung des ursprünglichen Signals. Aus diesem Grund wurden jeweils Kontrollzellen („0 min Inkubation“) als Maß für die eingestellte Autofluoreszenz benutzt, da theoretisch auch das Signal der zellulären Autofluoreszenz der Zellen nahezu unendlich hoch verstärkt werden kann. Für die Versuche mit Alexa488-BSA wurde der Fluorescence Gain höher eingestellt als für die Versuche mit Alexa488-Transferrin. Die absoluten Messwerte sind deshalb nicht direkt vergleichbar, aber auch mit der höher eingestellten Verstärkung war die gemessene relative Fluoreszenz sehr viel geringer in den Versuchen zur Aufnahme von Alexa488-BSA als in den Versuchen zur Aufnahme von Alexa488-Transferrin, obwohl eine 15fach höhere Konzentration an Alexa488-BSA (1,5 µM gegen 100 nM für Alexa488-Tf) eingesetzt und die Inkubationszeit auf 64 min verlängert wurde. Nichtsdestotrotz konnte die Aufnahme von Alexa488-BSA durch hypertones Medium gehemmt und im FACS quantifiziert werden. Das Balkendiagramm zur prozentualen Aufnahme von Alexa488-BSA in behandelte Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigt jedoch klare Unterschiede zu dem vergleichbaren Diagramm für die Alexa488-Transferrin Aufnahme. Die stärkste Hemmung war nach 64 min zu beobachten, während kürzere Inkubationszeiten eine weniger ausgeprägte Inhibition zeigten, sowie mit höheren Schwankungen behaftet waren. Diese Unterschiede lassen sich zum Teil durch das oben erwähnte Recycling von Transferrin erklären, welches im Verlauf der 30 min zu einer stetig ansteigenden prozentualen Aufnahme führt. Für Alexa488-BSA ist dieser Recycling-Effekt nicht zu beobachten. Die mit hypertoner Sucrose erreichte Hemmung der Alexa488-BSA Aufnahme lag folglich konstant bei über 50 % und erreicht nach 64 min einen maximalen Wert von ca 85 %.

Das verwendete Tetramethylrhodamin-Dextran (TMR-Dextran) hat ein mit Albumin vergleichbares Molekulargewicht (70 kDa) und wurde, um eine im FACS quantifizierbare Aufnahme zu erreichen, in einer Konzentration von 1 mg/ml (14 µM) über 90 min eingesetzt. Die Abbildung E zeigt deutlich, dass auch die Aufnahme von TMR-Dextran in A240286S Zellen durch hypertones Medium in ausgeprägtem Maße gehemmt wird. Die eingesetzte Menge TMR-Dextran ist zwar im Vergleich zu den anderen beiden Proben (Alexa488-Transferrin und Alexa488-BSA) relativ hoch, allerdings

vergleichbar mit den von anderen Autoren eingesetzten Konzentrationen (0,75 mg/ml für TMR-Dextran 70 von Al Soraj et al. [163]). Da Dextran nicht über einen spezifischen Rezeptor sondern nur über Fluid-Phase Endozytose aufgenommen wird, ist trotz der eingesetzten Konzentration keine Sättigung der Aufnahme zu befürchten. Für alle Zeitpunkte beträgt die Aufnahme von TMR-Dextran nur ungefähr 30 % der unbehandelten Kontrollen. Anders als für Alexa488-Transferrin und Alexa488-BSA bleibt das Ausmaß der Hemmung über die gesamte Inkubationszeit relativ konstant. Dieser Versuch zeigt, dass die hypertonen Bedingungen nicht nur die Clathrin-vermittelte Endozytose in A240286S Zellen hemmt. Eine eindeutige Aussage über die CME-Abhängigkeit der Alexa488-BSA Endozytose in A240286S Zellen kann aufgrund der hier dargestellten Daten folglich nicht getroffen werden.

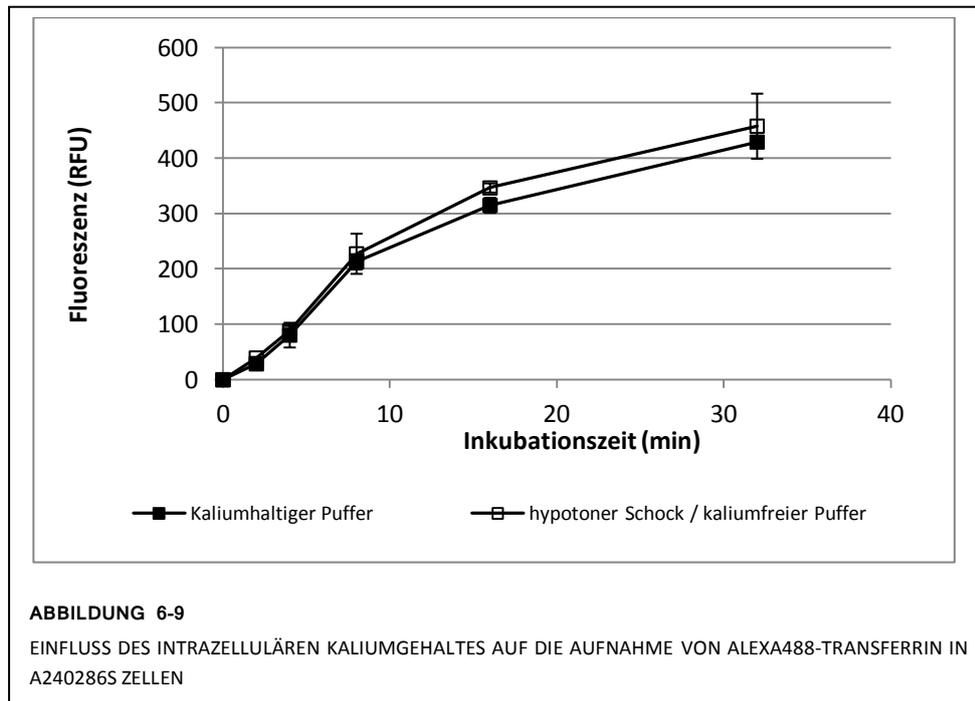
Die Aufnahme von Alexa488-Transferrin und von Alexa488-BSA in humane A240286S Zellen konnte im FACS quantifiziert werden. Die Aufnahme war energieabhängig, wie die Vergleichsversuche bei 4° C zeigen, und hemmbar durch hypertone Bedingungen. Obwohl die Inhibition der Aufnahme durch hypertone Sucrose als starker Hinweis auf einen Clathrin-vermittelten Mechanismus angesehen wird [21], zeigte ein Kontrollversuch, dass in meinen Zellen auch die Aufnahme des Fluid-Phase Marker TMR-Dextran in starkem Maße gehemmt wurde. Der durch das hypertone Medium hervorgerufene Effekt war in den A240286S Zellen demzufolge nicht spezifisch für die Clathrin-abhängige Endozytose. Auch andere Autoren haben bereits die verminderte Aufnahme von Fluid-Phase Markern nach einer Inkubation mit hypertoner Sucrose beschrieben [208, 209]. Zudem wurden Effekte von hypertonem Medium auf das Aktin-Zytoskelett beschrieben [21], was wiederum für eine unspezifische Beeinflussung verschiedener Aufnahmemechanismen verantwortlich sein kann (siehe auch 3.3.1). Eine hypertone Umgebung kann zusätzlich zu einem Schrumpfen der Zellen und kompensatorisch aktivierten Plasmamembran-Ionentransportern und -Kanälen führen [210]. Konsistent mit diesen Ergebnissen zeigten auch meine Zellen eine veränderte Lokalisation in der FSC/SSC-Darstellung während der Messung im FACS. Forward-Scatter und Sideward-Scatter dienen zur Abbildung von Größe und Granularität der untersuchten Zellen, wobei mit hypertonem Medium inkubierte Zellen durchschnittlich eine geringere Größe aufwiesen und eine breitere Verteilung hinsichtlich ihrer Granularität zeigten.

Eine eindeutige Aussage über die Beteiligung der CME an der Aufnahme von Alexa488-BSA in A240286S Zellen kann anhand der hier vorliegenden Ergebnisse folglich nicht getroffen werden.

6.2.3 Inhibition der CME durch Kaliummangel

Kaliummangel inhibiert die CME wahrscheinlich durch eine verminderte Ausbildung von Clathrin-Netzwerken an der Plasmamembran [211]. Die ursprüngliche Methode stammt von Larkin et al. [212], bei der Zellen für 5 min einem hypotonen Schock in 1:2 verdünntem, kaliumfreiem Medium ausgesetzt und im Anschluss in kaliumfreiem Puffer inkubiert werden. Angelehnt an die hinsichtlich der Pufferzusammensetzung modifizierte Methode von Hansen et al. [205] wurden A240286S Zellen für 5 min mit hypotonem Puffer und danach für 30 min mit kaliumfreiem Puffer inkubiert. Die Kontrollen wurden parallel mit Kontrollpuffer (kaliumfreier Puffer versetzt mit 10 mM KCl) behandelt. Die Aufnahme von Alexa488-Transferrin (100 nM in kaliumfreiem Puffer bzw. Kontrollpuffer) wurde wie oben nach verschiedenen Zeitpunkten (0-32 min) im FACS quantifiziert. Die „0 min“-Proben diente auch hier zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz und die für sie bestimmten RFU wurden von allen korrespondierenden Proben abgezogen.

Die nachfolgende Abbildung 6-9 zeigt die Aufnahme von Alexa488-Transferrin in A240286S Zellen nach der oben beschriebenen Vorbehandlung zur Reduktion des intrazellulären Kaliums.



Die hier dargestellten Ergebnisse stellen das Mittel aus zwei Versuchen nach der oben beschriebenen Methode dar. Die Daten zeigen keinen Unterschied zwischen der Aufnahme von Alexa488-Transferrin in Kontrollzellen und Zellen mit reduziertem intrazellulärem Kaliumgehalt. Eine Untersuchung zu Aufnahme von Alexa488-BSA wurde demzufolge nicht durchgeführt.

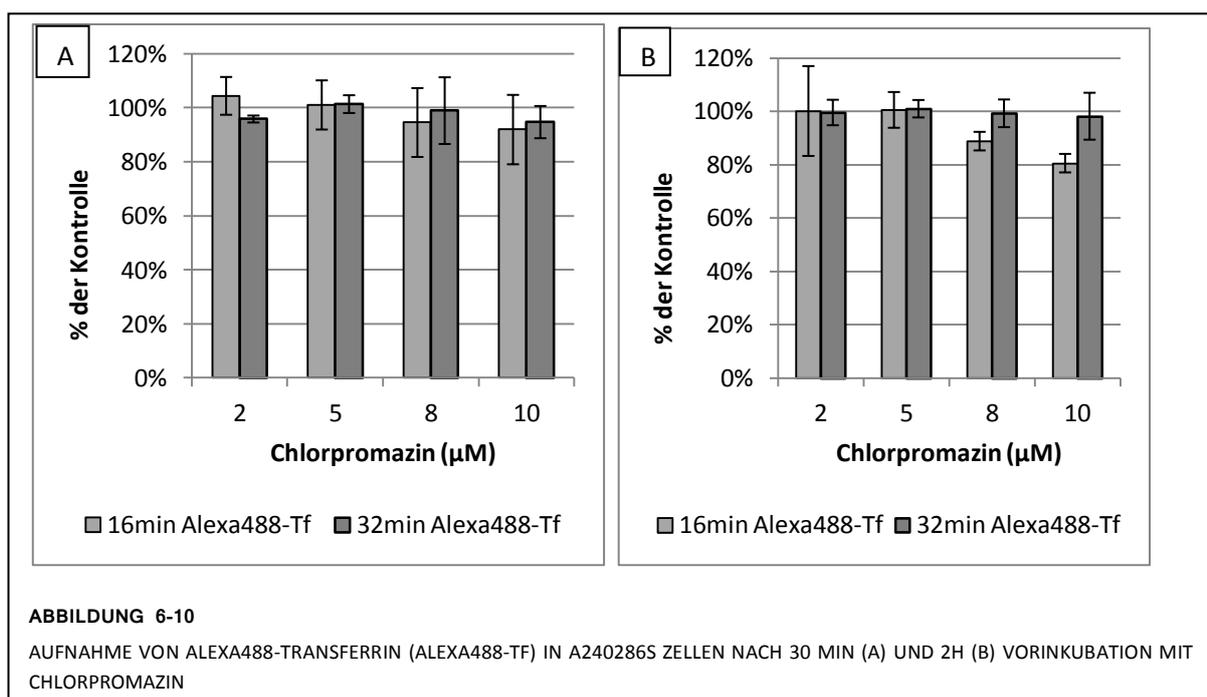
Zur Reduzierung des intrazellulären Kaliumgehaltes existieren verschiedenste Methoden in der Literatur. Abbildung 6-9 zeigt die Daten zur Alexa488-Transferrin Aufnahme, die nach einer leicht modifizierten Methode von Hansen et al. [205] gewonnen wurden. Anstatt wie von den Autoren beschrieben für 15 min, wurden die A240286S Zellen nach dem hypotonen Schock für 30 min in kaliumfreiem Puffer inkubiert, da die ursprüngliche Veröffentlichung von Larkin et al. zeigte, dass diese verlängerte Inkubationszeit den Kaliumgehalt der Zellen noch mal um die Hälfte reduziert [212]. Andere Methoden beinhalten zum Beispiel einen hypotonen Schock für 15 min und die direkt anschließende Inkubation der Zellen mit den untersuchten Proben in kaliumfreiem Puffer [175] oder eine Inkubation bei 4° C für 60 min im Anschluss an einen 5minütigen hypotonen Schock [213]. Insgesamt habe ich verschiedenste Methoden ausprobiert, inklusive einem 15minütigen hypotonem Schock, einer zweistündigen Inkubation in kaliumfreiem Puffer, einer einstündigen Inkubation in kaliumfreiem Puffer bei 4° C, sowie einer Inkubation mit Alexa488-Transferrin in serumfreiem Medium anstatt in kaliumfreiem/-haltigem Puffer. In keinem der Versuche konnte ich einen Unterschied zwischen der Aufnahme in behandelte und unbehandelte A240286S Zellen feststellen. Eine Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose von Alexa488-Transferrin in A240286S Zellen war durch die verwendete Methode zur Reduktion des intrazellulären Kaliumgehaltes folglich nicht möglich. Inwieweit der intrazelluläre Kaliumgehalt der Zelle nicht ausreichend abgesenkt werden konnte oder aber die CME der verwendeten Zellen unempfindlich gegenüber einem veränderten Kaliumgehalt ist, wurde hier nicht weiter untersucht. Vercauteren et al. zeigten 2010, dass der erfolgreiche Einsatz von Inhibitoren zur Untersuchung der CME abhängig ist von der verwendeten

Zelllinie. Sie wiesen unter anderem auch nach, dass ein reduzierter Kaliumgehalt der Zellen nur in zwei von fünf Zelllinien die erwartete Hemmung der Transferrin-Aufnahme erzielte. In den anderen untersuchten Zelllinien hatte die verwendete Technik entweder keinen messbaren Effekt oder steigerte die Aufnahme von Alexa488-Transferrin sogar um ca 20 %. Insbesondere waren diese Unterschiede auch zwischen zwei Linien der gleichen Tumorart zu beobachten, also keine gewebespezifischen Effekte [175]. Dieser von Vercauteren beobachtete zelltypspezifische Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren der CME konnte durch meine Daten bestätigt werden. Da die CME in A240286S Zellen offensichtlich nicht durch eine Reduktion des intrazellulären Kaliumgehaltes beeinflusst werden konnte, wurde auch die Aufnahme von Alexa488-BSA nicht mit dieser Technik untersucht.

6.2.4 Inhibition der CME durch Chlorpromazin

Chlorpromazin, eingesetzt in Konzentrationen zwischen 50-100 μM , hemmt die CME wahrscheinlich durch einen Zusammenschluss von Clathrin und dem AP2-Adapterkomplex, wodurch die Moleküle nicht mehr an der Zellmembran präsent sind [35]. Angelehnt an die Methode von Marina-Garcia et al. [176] wurden A240286S Zellen für 30 min oder 2 h mit Chlorpromazin (0, 2, 5, 8, 10 μM) vorinkubiert und im Anschluss die Aufnahme von Alexa488-Transferrin (100 nM) nach 16 min und nach 32 min im FACS bestimmt. Höhere Konzentrationen an Chlorpromazin (20 μM bzw. 50 μM) konnten nicht eingesetzt werden, da sie in Vorversuchen zu einer quantitativen Ablösung der Zellen von den Zellkulturplatten führten. Die Aufnahme von Alexa488-Transferrin in unbehandelte Zellen nach 16 min bzw. nach 32 min wurden als Kontrollwerte bestimmt und die Aufnahme in behandelte Zellen (2, 5, 8, 10 μM Chlorpromazin) als prozentualer Anteil des jeweiligen Kontrollwertes berechnet.

Die Balkendiagramme in Abbildung 6-10 zeigen die Aufnahme von Alexa488-Transferrin in A240286S Zellen, die für 30 min (Abbildung 6-10 A) oder für 2 h (Abbildung 6-10 B) mit verschiedenen Konzentrationen Chlorpromazin vorinkubiert wurden. Dargestellt wird der prozentualer Anteil der Aufnahme von Alexa488-Transferrin in unbehandelte Zellen nach 16 min bzw. nach 32 min.



Eine Inkubation der Zellen mit Chlorpromazin für 30 min zeigte keinen nachweisbaren Effekt auf die Alexa488-Transferrin Aufnahme in A240286S Zellen. Eine Inkubation für 2 h mit höheren Konzentrationen Chlorpromazin (8 und 10 μM) führte zu einem geringen Effekt auf die Alexa488-Transferrin Aufnahme. Relativ zu unbehandelten Kontrollen war jedoch nur eine ca 10 %ige (8 μM) bzw. eine ca 20 %ige (10 μM) Hemmung der Alexa488-Transferrin Aufnahme innerhalb von 16 min zu beobachten. Nach längeren Inkubationszeiten (32 min) mit Alexa488-Transferrin war auch dieser Effekt nicht mehr zu beobachten, da hier wahrscheinlich das Recycling des Transferrin-Rezeptors einsetzt (siehe auch Abbildung 6-8 A). Chlorpromazin in den eingesetzten Konzentrationen hemmt die Clathrin-vermittelte Endozytose in A240286S Zellen folglich nur in geringem Ausmaß.

Transferrin wird schnell und spezifisch über Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen. Eine schwache und nur kurzfristige Hemmung der Clathrin-vermittelten Aufnahme ist nicht ausreichend, um eine weitere Untersuchung zur Aufnahme von Alexa488-BSA nach der Vorinkubation mit Chlorpromazin durchzuführen. Höhere Konzentrationen (20 μM bzw. 50 μM) als die hier verwendeten konnten nicht eingesetzt werden, da sich die Zellen nach der Vorinkubation von den Wellböden ablösten. Dieser Effekt weist auf toxische Nebenwirkungen des Chlorpromazins in den A240286S Zellen hin. Auch die hier eingesetzten Konzentrationen zeigten bereits einen Einfluss auf die Zellmorphologie, was zu einer veränderten Lokalisation der Zellpopulation in der FSC/SSC-Darstellung während der Messung im FACS führte. Obwohl Chlorpromazin als ein relativ spezifischer Inhibitor für CME angesehen wird [21], zeigten Vercauteren et al., dass auch der durch Chlorpromazin hervorgerufene Effekt abhängig von der verwendeten Zelllinie ist [175]. In ihren Versuchen hatte Chlorpromazin nicht nur nahezu keinen Effekt in zwei der verwendeten Zelllinien, in einer anderen induzierte Chlorpromazin sogar die Aufnahme von Transferrin in geringem Maße. Zusätzlich wiesen die Autoren cytotoxische Effekte von Chlorpromazin nach zweistündiger Inkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Chlorpromazin nach (5,6 μM). Beides konnte hier auch für die A240286S Zellen gezeigt werden. Die von dieser Zelllinie durchgeführte Clathrin-abhängige Endozytose war nicht nur unempfindlich gegenüber Chlorpromazin, der Inhibitor zeigte zudem auch toxische Nebenwirkungen und induzierte deutliche Veränderungen in der Zellmorphologie. Weitere Untersuchungen mit Chlorpromazin zur Aufnahme von Alexa488-BSA wurde darum nicht durchgeführt.

6.2.5 Inhibition der CME durch transiente Transfektion mit siRNA

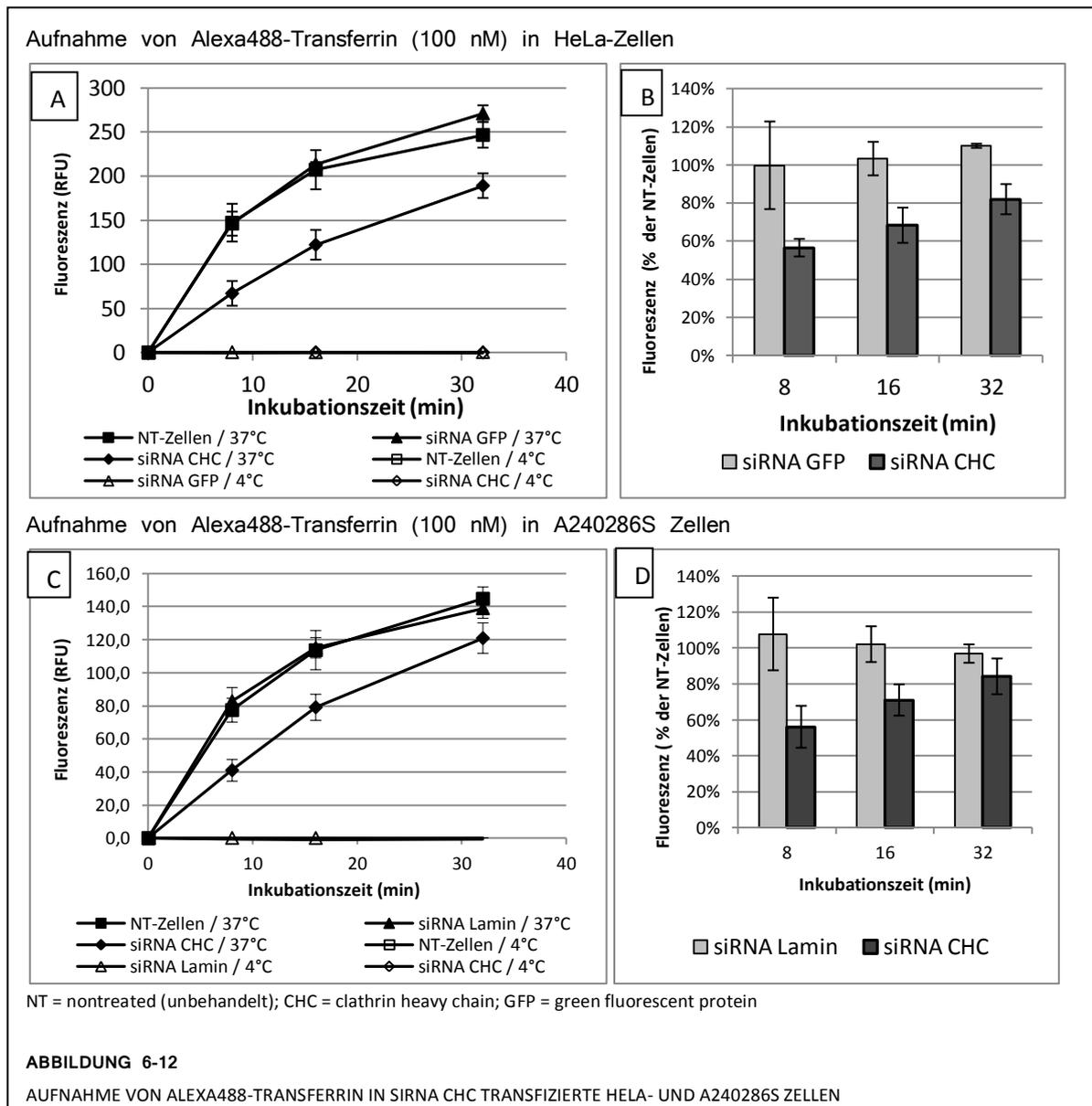
Um eine möglichst spezifische Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose in A240286S Zellen zu erreichen, wurden die Zellen mit siRNA gegen Clathrin Heavy Chain (CHC) transfiziert. Diese Versuche wurden von mir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Arwyn T. Jones während eines dreimonatigen Aufenthaltes an der Welsh School of Pharmacy, Cardiff, UK durchgeführt. Kleine, interferierende RNAs (small interfering RNA = siRNA) sind 19-21 Basenpaar lange, doppelsträngige RNAs, die durch ihre Bindung an komplementäre mRNA-Sequenzen einen Abbau derselben induzieren und so die intrazelluläre Konzentration eines Proteins verringern [214, 215]. Die Transfektion erfolgte in Anlehnung an die Methode von Al Soraj et al. mit dem Oligofectamin Transfection Agent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA) [163]. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden alle Versuche parallel mit HeLa-Zellen durchgeführt, für die die verwendete Methode bereits etabliert war. Der Knock-Down von CHC in A240286S Zellen wurde mit dem erreichten Knock-Down in HeLa-Zellen durch Western Blotting verglichen. In einem nächsten Schritt wurde die Aufnahme von Alexa488-Transferrin sowie von Alexa488-BSA für beide Zelllinien im FACS quantifiziert. Als Kontrollen dienten hier auf der einen Seite nicht-transfizierte Zellen sowie

Zellen, die mit siRNA gegen Lamin A/C, einem Bestandteil der Kernlamina, bzw. gegen GFP (green fluorescent protein), einem aus der Qualle *Acquorea victoria* stammenden und nicht in humanen Zellen vorhandenem Protein.

Die folgende Abbildung 6-11 zeigt den Knock-Down von CHC in HeLa-Zellen bzw. in A240286S Zellen 48h nach der Transfektion. Als Ladungskontrolle diente in beiden Fällen alpha-Tubulin. Abbildung 6-12 zeigt die Alexa488-Transferrin Aufnahme (100 nM) in HeLa-Zellen über 32 min (Abbildung 6-12 A) bei 37° C und bei 4° C sowie in einem Balkendiagramm die prozentuale Aufnahme in Kontroll- und siRNA CHC-transfizierten Zellen, bezogen auf die nicht-transfizierten Kontrollen (Abbildung 6-12 B). Abbildung 6-12 C und D zeigen die korrespondierenden Daten für A240286S Zellen.

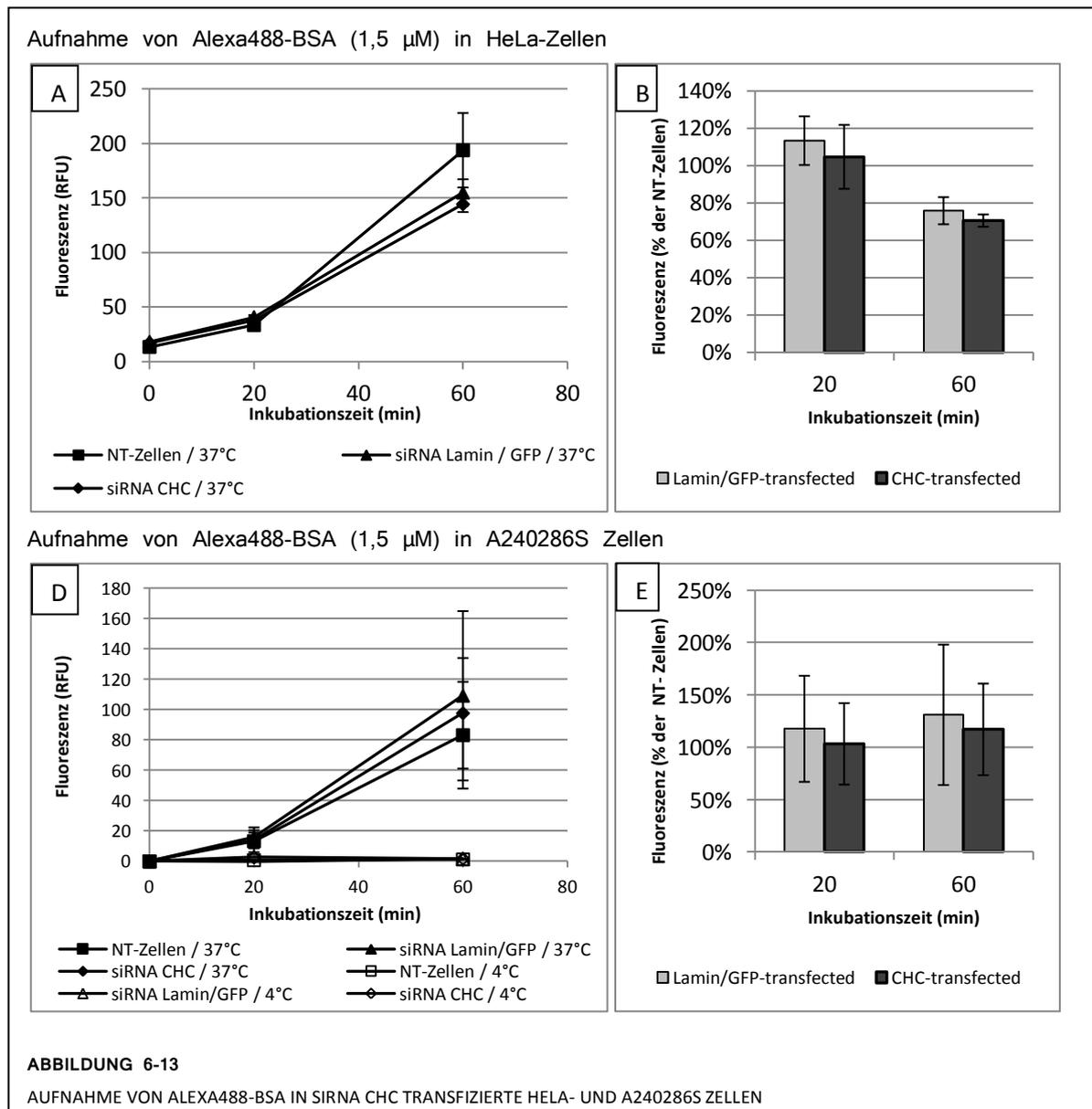


bei 37° C und bei 4° C sowie in einem Balkendiagramm die prozentuale Aufnahme in Kontroll- und siRNA CHC-transfizierten Zellen, bezogen auf die nicht-transfizierten Kontrollen (Abbildung 6-12 B). Abbildung 6-12 C und D zeigen die korrespondierenden Daten für A240286S Zellen.



In HeLa-Zellen und in A240286S-Zellen konnte ein vergleichbarer Knock-Down von CHC erreicht werden, wie der Western Blot in Abbildung 6-11 zeigt. Die Expression von CHC in kontroll-transfizierten Zellen hingegen war vergleichbar mit der Expression in nicht-transfizierten Zellen. Die Aufnahme von Alexa488-Transferrin konnte ebenfalls in beiden Zelllinien gehemmt werden. Das Ausmaß der Inhibition war wie erwartet in den frühen Zeitpunkten am höchsten (vergleiche auch 5.4.1). Insgesamt lag sie bei beiden Zelllinien zwischen 50 % und 80 %. Die Kontroll-transfizierten Zellen zeigten über die untersuchte Zeitspanne dagegen eine Alexa488-Transferrin-Aufnahme, wie sie auch in den nicht-transfizierten Zellen messbar war.

Die nachfolgende Abbildung 6-13 zeigt die Alexa488-BSA Aufnahme (1,5 μ M) in HeLa-Zellen (Abbildung 6-13 A) und A240286S Zellen (Abbildung 6-13 C) über 60 min, die entweder nicht-transfiziert (NT), mit Kontroll-siRNA transfiziert (siRNA Lamin bzw. siRNA GFP) bzw. mit siRNA gegen CHC transfiziert worden waren. In Abbildung 6-13 D ist zusätzlich die Aufnahme von Alexa488-BSA in A240286S Zellen bei 4° C (n=1) dargestellt. Abbildung 6-13 B und Abbildung 6-13 E stellen die jeweilige prozentuale Hemmung der Aufnahme wie oben in einem Balkendiagramm dar.



In HeLa-Zellen ist nach 60 min eine geringe Hemmung von ca 20 % der Alexa488-BSA Aufnahme zu erkennen, allerdings sowohl für die mit siRNA CHC als auch für die kontroll-transfizierten Zellen. Für 20 min hingegen ist die Aufnahme in den transfizierten Zellen im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen leicht erhöht und liegt hier jeweils zwischen 100-110 %. Die korrespondierenden Daten für die A240286S Zellen zeigen für beide Zeitpunkte (20 min und 60 min) eine erhöhte Aufnahme von Alexa488-BSA in die transfizierten Zellen. Dieser Effekt ist für die siRNA CHC transfizierten Zellen etwas weniger stark ausgeprägt, die hohen Standardabweichungen erlauben jedoch keine validierte Aussage. Eine Aufnahme von Alexa488-BSA in transfizierte A240286S Zellen fand bei 4° C nicht statt, allerdings wurde dieser Versuch nur einmal (n=1) durchgeführt.

Der Knock-Down von CHC durch die Transfektion mit Oligofectamin und den verwendeten siRNA Sequenzen (siehe 5.4.4) war erfolgreich, wie der Western Blot in Abbildung 6-11 zeigt. Die Aufnahme von Alexa488-Transferrin wurde auch in beiden Zelllinien gehemmt, durchschnittlich lag sie zwischen 50 % und 80 %. Wie bereits in 6.2.2 dargestellt, ist bei Alexa488-Transferrin die prozentuale Hemmung für kurze Zeitpunkte höher, da später bereits ein Recycling des Transferrins zurück zur Zelloberfläche stattfindet. Die durch die Transfektion erreichte Inhibition der CME war insgesamt weniger ausgeprägt als die durch hypertones Medium. Die hypertonen Bedingungen induzierten jedoch auch unspezifische Effekte in den untersuchten Zellen, wie die Hemmung der Aufnahme des Fluid-Phase Markers Dextran zeigte. Da auch die Transfektion der Zellen mit siRNA unspezifische Effekte induzieren kann, so zum Beispiel eine Immunantwort mit verstärkter Produktion von Zytokinen [216], oder ein Off-Targeting, also die Bindung an andere Nucleotid-Sequenzen als der Zielstruktur [217], wurden bei allen Versuchen auch Kontrollzellen untersucht, die entweder mit siRNA Lamin oder mit siRNA GFP transfiziert worden waren. Da auch bei siRNA Lamin ein Effekt auf die Zellmorphologie nicht ausgeschlossen werden kann, wurde die Kontroll-siRNA im Laufe der Versuche gegen siRNA GFP ausgetauscht, da hier keine durch die Hemmung von zellulären Proteinen induzierten Veränderungen auf die Endozytose zu befürchten sind. Die mit siRNA gegen Lamin bzw. gegen GFP transfizierten Zellen zeigten keine Änderung der Aufnahme von Alexa488-Transferrin, dies gilt sowohl für HeLa als auch für A240286S Zellen. In den Versuchen zur Aufnahme mit Alexa488-BSA zeigt sich jedoch ein anderes Bild. Beide siRNA, also sowohl siRNA CHC als auch siRNA Lamin/GFP, transfizierte HeLa-Zellen zeigten eine geringe Hemmung der Aufnahme von Alexa488-BSA, in transfizierte A240286S Zellen hingegen war die Aufnahme im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen sogar erhöht. Im Falle der HeLa-Zellen spricht dies für unspezifische Effekt des Transfektionreagenz Oligofectamin auf andere Endozytose-Mechanismen als der CME, eine weitere Kontrolle mit Dextran wurde allerdings nicht durchgeführt. Eine Erklärung für die erhöhte Aufnahme von Alexa488-BSA in die A240286S Zellen ist meiner Ansicht nach ebenfalls in dem Einfluss des Oligofectamins auf die untersuchten Zellen zu finden. In allen Versuchen konnte ich beobachten, dass die Transfektion das Wachstum der behandelten Zellen verlangsamte, weswegen sie zu dem Zeitpunkt der Aufnahmeversuche weniger dicht gewachsen waren als die unbehandelten. Da die Aufnahme von Substanzen auch von Bedingungen wie der Zelldichte abhängt [7], könnte dies die Ursache für die höhere Aufnahme in transfizierte Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierte Zellen sein. Zugegebenermaßen ist dieser Einfluss hinsichtlich der Alexa488-Transferrin Aufnahme nur sehr schwach und nur in HeLa-Zellen zu sehen (vergleiche Abbildung 6-12 A). Eine geringere Zelldichte hätte durch ein dünneres Aussäen der Zellen erreicht werden können, allerdings stagnierte das Wachstum von transfizierten Zellen, wenn sie bei weniger als 50 % Konfluenz behandelt wurden. Ein Aussäen in unterschiedlichen Zelldichten, also dünner für die Kontrollen und dichter für die Proben, hätte wiederum eine unterschiedliche Versuchsanordnung für Kontrollen und Proben bedeutet.

Offensichtlich ist auch, dass die Standardabweichungen in beiden Versuchsreihen zur Alexa488-BSA Aufnahme, und hier insbesondere bei den Versuchen mit den A240286S Zellen, sehr hoch ausfallen. Während mit Alexa488-Transferrin sehr reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten, schwankte die gemessene Fluoreszenz der mit Alexa488-BSA inkubierten Zellen sehr stark. Mögliche Erklärungen hierfür wären entweder eine variierende Transfektionseffizienz in diesen Versuchen, insgesamt eine stark variierende Aufnahme von Alexa488-BSA in die Zellen oder andere Versuchsbedingungen, die die hohe Varianz der Daten verursachen. Da die Transfektion in allen anderen Versuchen erfolgreich war und eine FACS-Messung der Alexa488-BSA Aufnahme durchaus reproduzierbare Daten liefern kann, wie die Aufnahme unter hypertonen Bedingungen zeigen (vgl. 6.2.2), wurden die hohen Standardabweichungen meiner Ansicht nach durch die in den früheren Versuchen nicht verwendete Behandlung der Zellen mit einer sauren Waschlösung verursacht. Diese wird bei der Aufnahme von Alexa488-Transferrin zur Entfernung extrazellulär bindenden Transferrins benutzt [172]. Diese Methode, die bei der Untersuchung der Transferrin-Aufnahme etabliert ist und hier die Messung von wirklich aufgenommenem im Gegensatz zu nur „zellulär assoziierter“ Fluoreszenz ermöglicht, scheint nicht auf Alexa488-BSA übertragbar zu sein. Im Falle des Alexa488-BSA war auffällig, dass die 0-Minuten Werte für mit Waschlösung behandelte Zellen höher lagen als die 0-Minuten Werte für unbehandelte Zellen, wie sie zum Beispiel unter hypertonen Bedingungen gemessen wurden. Eine Behandlung mit der sauren Waschlösung führte also zu einer höheren Fluoreszenz der Zellen, anstatt diese, wie eigentlich gewünscht, zu verringern. Meiner Ansicht nach verursachte die Absenkung des pH-Wertes in die Nähe des isoelektrischen Punktes von BSA ($pI = 4,7$) [41], dem Punkt der aufgrund der geringsten Ladung des Moleküls auch der Punkt der geringsten Löslichkeit in wässrigen Lösungen darstellt, dass die fluoreszenz-markierte Probe hydrophober wurde und eher an der Zellmembran adsorbierte als unter physiologischen Bedingungen bei pH 7,4.

Auch wenn bei dem Vergleich der Alexa488-BSA Aufnahme bei 37° C und bei 4° C deutlich wird, dass die Alexa488-BSA Probe aktiv in die A240286S Zellen aufgenommen wird und die gemessene Fluoreszenz nicht nur auf versuchsbedingten Artefakten beruht, ist eine klare Aussage über die CME-Abhängigkeit der Alexa488-BSA anhand dieser Daten nicht möglich.

6.2.6 Zusammenfassende Diskussion zur CME von HSA

Eine Clathrin-vermittelte Endozytose von Albumin in die untersuchte Zelllinie A240286S konnte in den Versuchen weder bestätigt noch eindeutig ausgeschlossen werden. Hypertones Medium inhibierte die Aufnahme des Alexa488-BSA zwar in hohem Maße, genauso wie die Aufnahme des CME-Markers Alexa488-Transferrin, allerdings wurde gleichzeitig die Aufnahme von TMR-Dextran gehemmt, einem Markermolekül für die Fluid-Phase Endozytose. Dieser Effekt ist auch von anderen Autoren bereits beschrieben worden [21]. Die Reduzierung des intrazellulären Kalium-Mangels zeigte in A240286S Zellen keinen Einfluss auf die Endozytose von Alexa488-Transferrin, gleiches gilt für eine Behandlung der Zellen mit dem CME-Inhibitor Chlorpromazin. Chlorpromazin konnte zudem nur in geringen Konzentrationen verwendet werden, da sich die adhärennten Zellen in höheren Konzentrationen von den Plattenböden lösten. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Vercauteren et al., die unter anderem für den intrazellulären Kalium-Mangel und für Chlorpromazin nachwies, dass die von den beiden Inhibitoren hervorgerufenen Effekte abhängig von der verwendeten Zelllinie sind. Zudem wiesen auch sie cytotoxische Effekte von Chlorpromazin in Konzentration ab 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (= 5,6 μM) nach. Die transiente Transfektion der A240286S Zellen mit siRNA gegen Clathrin Heavy Chain war zwar erfolgreich und konnte über Western Blotting sowie die Inhibition der Aufnahme von

Alexa488-Transferrin nachgewiesen werden, eine deutliche Hemmung der Aufnahme von Alexa488-BSA zeigte sich jedoch weder in A240286S Zellen noch in den als Kontroll-Zelllinie verwendeten Hela-Zellen. Insgesamt scheint die CME also keinen oder nur einen geringen Anteil an der Endozytose von Albumin in A240286S Zellen zu haben, wobei weitere Versuche nötig wären, um eine endgültige Aussage zu treffen.

Von den verwendeten Techniken zur Inhibition der CME hat hypertone Sucrose die ausgeprägtesten Nebeneffekte, aber auch für den intrazellulären Kaliummangel und für Chlorpromazin werden ein Einfluss auf die Macropinozytose und auf das Aktin-Zytoskelett diskutiert [21]. Gleiches gilt für die nicht untersuchten Inhibitoren Phenylarsinoxid (PAO) und Monodansylcadaverin, insbesondere Phenylarsinoxid führt zu einem intrazellulären Mangel an ATP [218], was für eine ganze Reihe an unspezifischen Effekten verantwortlich sein kann. Aufgrund der Unempfindlichkeit der A240286S-Zellen gegenüber den untersuchten Inhibitoren und den erwähnten unspezifischen Effekten von PAO und Monodansylcadaverin wurden diese nicht untersucht. Die Transfektion mit siRNA ist zwar eine Möglichkeit, gezielt einzelne Proteine des funktionellen Ablaufs spezifischer Endozytose-Mechanismen zu hemmen, aber auch sie kann unspezifische Nebeneffekte zeigen [7]. Neben dem Einfluss der Transfektionsreagenzien, in meinem Fall deutlich an der Wachstumshemmung der transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen sichtbar, kann durch den Knock-Down von Clathrin Heavy Chain auch der reduzierte Export eines Proteins aus dem Golgi-Apparat oder ein reduziertes endozytotisches Recycling induziert werden. Beide Vorgänge sind ebenfalls Clathrin-abhängig und könnten zu einer verminderten Präsentation eines potentiellen Rezeptors auf der Zellmembran führen [33, 38, 39]. Auch ein scheinbar spezifischer Effekt durch den Knock-Down mit siRNA müsste in weiteren Untersuchungen mit anderen essentiellen Proteinen der CME, wie zum Beispiel mit einer siRNA gegen das Adapterprotein AP2, verifiziert werden, um eine definitive Aussage über den für die Aufnahme verantwortlichen Mechanismus zu treffen. In meinem Fall zeigte jedoch schon die Transfektion mit siRNA gegen CHC keinen deutlichen Einfluss auf die Alexa488-BSA Aufnahme. Insgesamt wurde im Verlauf der durchgeführten Versuche deutlich, wie wichtig es ist, den mit Inhibitoren erreichten Effekt mit Kontrollsubstanzen, von denen der Aufnahmemechanismus bekannt ist, zu überprüfen. Neben Transferrin als Markermolekül für die CME und dem Fluid-Phase Marker Dextran sollte zudem auch ein Marker für die Caveolae-vermittelte Endozytose, z. B. Lactosylceramid, und die Clathrin- und Caveolin- unabhängige Endozytose, z. B. der anti-CD 95 Antikörper, untersucht werden, um eine validierte Aussage über den Einfluss der CME auf die Aufnahme einer Substanz treffen zu können [163]. Wie deutlich wird, ist die Evaluation eines distinkten Endozytose-Mechanismus einer Substanz sehr komplex. Neben den bereits erwähnten unspezifischen Effekten einzelner Inhibitoren, der Zelltyp-abhängigen Wirkung und eventuellen cytotoxischen Effekten kommt noch hinzu, dass eine Hemmung eines einzelnen Mechanismus zu einer kompensatorisch erhöhten Aufnahme über einen anderen Mechanismus führen kann [219, 220]. Einzelne Substanzen werden zudem konzentrationsabhängig von unterschiedlichen Mechanismen aufgenommen [7, 221]. Die Schwierigkeit, diese intrazellulären Vorgänge zu untersuchen, unterstreicht auch die Geschichte des „Caveosoms“, einer lange postulierten eigenen Entität unter den endosomal-lysosomalen Organellen [222], welche von denselben Autoren 9 Jahre später selbst als Artefakt ihrer Versuchsanordnung identifiziert wurde [223].

Dennoch haben auch andere Autoren die Aufnahme von Albumin in verschiedene Zelllinien untersucht, insbesondere im Hinblick auf die Clathrin-vermittelte Endozytose. Eine genauere Untersuchung der veröffentlichten Literatur zu diesem Thema unterstreicht jedoch die

Notwendigkeit, die gewählten Inhibitoren genau hinsichtlich ihrer Spezifität zu überprüfen, mehr als einen einzelnen Inhibitor zu verwenden und, bedingt durch die Zelltyp-abhängige Wirkung der Inhibitoren, eine Kontrolle des resultierenden Effekts auf die Aufnahme von Markermoleküle wie Transferrin durchzuführen.

So postulieren Gekle et al. seit langem eine Clathrin-vermittelte Endozytose für Albumin in den proximalen Tubuluszellen der Niere über den Megalin/Cubulin-Komplex. Dies wurde von den Autoren jedoch untersucht, indem einmal die Ansäuerung von Endosomen durch die Substanz EIPA gehemmt wurde [224] und auf der anderen Seite Cytochalasin D, eine Substanz, die die Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts induziert [21] eingesetzt wurde [225]. Beide Methoden sind nicht geeignet, um eine Clathrin-vermittelte von einer anderen, gegebenenfalls Rezeptor-vermittelten, Endozytose zu unterscheiden. Insbesondere wird EIPA eher als Inhibitor der Macropinozytose angesehen, der zudem zu einer stark veränderten intrazellulären Lokalisation der endosomal-lysosomalen Organellen führt [226]. Dennoch werden diese Veröffentlichungen von ihm selbst [91, 227] und anderen [228] immer wieder als Beweis einer Clathrin-vermittelten Endozytose zitiert. Die Bindung und Aufnahme von Albumin durch Megalin wurde zwar unter anderem durch Kompetitionsassays gezeigt [229], und auch andere Autoren untersuchten mit anderen Liganden als Albumin die Clathrin-vermittelte Internalisierung des Rezeptors Megalin [230], dennoch sind die von Gekle et al. durchgeführten Versuche hinsichtlich der Albumin-Aufnahme mit klaren methodischen Mängeln behaftet.

Noch ausgeprägtere Mängel zeigt die Veröffentlichung von Lambot et al. [231], die die Aufnahme von Albumin in die humane Placenta untersuchten und ebenfalls einen Clathrin-abhängigen Mechanismus postulierten. Abgesehen von der Tatsache, dass die Autoren eine Aufnahme über den Rezeptor Megalin sowie eine Clathrin- bzw. Caveolae-vermittelte Endozytose als drei separate Mechanismen ansehen und somit alle veröffentlichten Ergebnisse zur Clathrin-vermittelten Endozytose von Megalin ignorieren (s. oben), sowie Rezeptoren und Endozytose-Mechanismen vermischen, verwendeten sie Methyl- β -Cyclodextrin und Chlorpromazin zur Hemmung der CME. Methyl- β -Cyclodextrin verändert die Zusammensetzung von Lipid Rafts in der Zellmembran [21], hat primär also keinen direkten Einfluss auf die CME. Chlorpromazin ist zwar für die Inhibition der CME geeignet, allerdings in Konzentrationen zwischen 50-100 μ M oder geringer, unspezifische bzw. toxische Effekte der hier verwendeten Konzentration (1,4 mM) sind folglich absolut nicht auszuschließen. Die Autoren erwähnen zwar die unspezifischen Effekte von Methyl- β -Cyclodextrin, allerdings strikt im Zusammenhang mit Clathrin-vermittelter Endozytose, für die ausserdem eine (nicht weiter belegte) „Assoziation mit fluid-phase Endozytose“ beschrieben wird. Die Untersuchung von Gewebeproben (!) hinsichtlich der Aufnahme einer Substanz über einen spezifischen Mechanismen möchte ich nicht weiter diskutieren. Der Einfluss verschiedenster Effekte wie das Überleben der Zellen, die unspezifische Anreicherung im Gewebe, die Penetration des Inhibitors etc sind evident. Beispielhaft hierfür sei erwähnt, dass in den von den Autoren durchgeführten Versuchen die „placental capture“ von Albumin bei 4° C immerhin noch 52 % der bei 37° C durchgeführten Versuche betrug. Nichtsdestotrotz wurden die Ergebnisse 2006 (!) unter dem Titel „Evidence for a clathrin-mediated Recycling of Albumin in Human Term Placenta“ veröffentlicht.

Yumoto et al. untersuchten die Aufnahme von FITC-BSA in die alveolare Typ-2 Zelllinie A549, einer ähnlichen Zelllinie wie die von mir verwendeten A240286S Zellen [232]. Hierzu lysierten sie die Zellen nach der Inkubation und quantifizierten die Menge an aufgenommenem FITC-BSA an einem

Spektrophotometer, um die pH-Abhängigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes zu umgehen. Die Autoren überprüften neben der Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit auch den Einfluss von Phenylarsinoxid, Chlorpromazin, hypertonem Medium und intrazellulärem Kalium-Mangel auf die Albumin-Aufnahme. Zusätzlich benutzten sie Indomethacin und Nystatin zur Inhibition der Caveolae-vermittelten Endozytose und Cytochalasin D sowie EIPA zur Inhibition der Macropinozytose. Positiv anzumerken ist die große Auswahl an Inhibitoren, die die Autoren in ihren Experimenten untersucht haben, sowie die gewählte Inkubationszeit von 60 min. Allerdings betrug die in den Inhibitions-Versuchen verwendete Konzentration von Alexa488-BSA ganze 20 mg/ml, meiner Erfahrung nach bereits eine sehr konzentrierte Lösung von Albumin in der sich bereits Albumin-Nanopartikel bilden, und die Autoren wiesen eine „sättigbare“ Aufnahme durch Inkubation mit Konzentrationen zwischen 0 und 40 mg/ml nach. Hierzu ist anzumerken, dass auch eine unspezifische Fluid-Phase Endozytose ab einer bestimmten Substanzkonzentration „sättigbar“ ist, da eine Zelle nur eine bestimmte Menge an Volumen pro Zeiteinheit internalisieren kann und gleichzeitig ein Recycling der im Volumen der Early Endosomes gelösten Substanz wieder zur Oberfläche stattfindet. Interessant ist auch, dass laut den Autoren die Aufnahme von FITC-Albumin in die A549 Zellen 200mal (!) höher war als die Aufnahme von FITC-Dextran mit einem ähnlichen Molekulargewicht, dazu werden abgesehen von einer Erwähnung in den Resultaten und der Diskussion keine weiteren Daten oder graphische Darstellungen geliefert. Zudem wird leider der Einfluss der verwendeten Inhibitoren auf die Endozytose von FITC-Dextran nicht weiter untersucht. Auch eine Kontrolle mit Transferrin als Markermolekül der CME unterbleibt. Die Autoren selbst diskutieren eine Beteiligung der Makropinozytose an der Albumin-Aufnahme in A549 Zellen, basierend auf ihren Versuchen mit Cytochalasin D und EIPA. Zwar benötigt die Macropinozytose eine Re-Organisation des Aktinskeletts, allerdings sind die CME und die Caveolae-vermittelte Endozytose ebenfalls durch eine verminderte Aktin-Polymerisation, wie sie durch Cytochalasin D induziert wird, hemmbar. EIPA hingegen hemmt den Na^+/H^+ -Austausch und führt so zu einer reduzierten Ansäuerung der Endosomen sowie im Gegenzug zu einer Absenkung des zytoplasmatischen pH-Wertes. EIPA wird zwar als Inhibitor für die Macropinozytose eingesetzt, hat aber ausgeprägte Nebeneffekte wie die bereits oben erwähnten Veränderungen in der intrazellulären Lokalisation der endosomal-lysosomalen Organellen und führt zu morphologischen Veränderungen derselben [226]. Die Inhibition der Albumin-Aufnahme durch Cytochalasin D und EIPA muss also nicht zwangsläufig durch eine Beteiligung der Macropinozytose hervorgerufen worden sein. Insgesamt sind die von den Autoren gesammelten Daten meiner Ansicht nach schwierig zu beurteilen, vor allem durch die hohe Konzentration des verwendeten FITC-BSA sowie der Mangel an Kontrollen hinsichtlich unspezifischer Effekte der untersuchten Inhibitoren. Auch vor 2012 veröffentlichten Yumoto et al. eine Reihe weiterer Publikationen, die sich mit der Clathrin-abhängigen Aufnahme von Albumin in Lungenzellen beschäftigen, auf die ich wegen ihrer Ähnlichkeit zueinander hier nicht gesondert eingehen möchte [233-235].

John et al. hingegen untersuchten ebenfalls die Aufnahme von Albumin in alveolare Typ-2 Zellen [27, 236], postulieren jedoch eine gp60-vermittelte Aufnahme über Caveolae. Gleiches gilt für Kim et al., die ein 60 kDa Membranprotein mit Albumin-bindenden Eigenschaften in primären Epithelzellen von Rattenalveolen nachwiesen [237]. Buchäcker et al. hingegen untersuchten die Clathrin-vermittelte Aufnahme von Albumin in primären alveolaren Typ 1 und Typ 2 Zellen durch den Rezeptor Megalin [87]. Der neonatale Fc-Rezeptor FcRn, der im Endothel unter anderem für das Recycling von IgG und von Albumin zuständig ist [44], wird ebenfalls in der Lunge exprimiert [238, 239]. Die bisherigen Veröffentlichungen konzentrieren sich hier jedoch vornehmlich auf die FcRn-vermittelte Transzytose von Fc-gekoppelten Proteinen [240], Fc-Erythropoetin Fusionsproteinen [241] und Fc-dekorieren

Nanopartikeln [242] durch das Lungenepithel als Möglichkeit zur pulmonalen Administration von neuen Wirkstoffen.

Unabhängig von diesen Veröffentlichungen bleibt zu sagen, dass die genaue Untersuchung eines Aufnahme-Mechanismus für eine Zulassung eines neuen Therapeutikums offensichtlich keine bzw. nur eine geringe Rolle spielt, wie das Beispiel der Albumin-Nanopartikel Formulierung von Paclitaxel, Abraxane, zeigt. Für Abraxane wird die Caveolae-vermittelte Transzytose durch das Endothel nach Bindung an den gp60-Rezeptor postuliert, zusammen mit einer Anreicherung im Tumorgewebe durch das Albumin-bindende Protein SPARC, dessen Überexpression in vielen Tumoren nachweisbar ist. Dies basiert auf einem einfachen Versuch zur Inhibition der Transzytose von nab-Paclitaxel mit Methyl- β -Cyclodextrin in einer Veröffentlichung von Desai et al. [126]. Methyl- β -cyclodextrin verändert, wie oben bereits erwähnt, die Cholesterolzusammensetzung der Plasmamembran und hat neben einem Einfluss auf die Caveolae-vermittelte Endozytose auch nachgewiesene Effekte auf die Lipid-Raft-basierte, Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose [243], auf Fluid-Phase Endozytose [244, 245] und auf die Clathrin-vermittelte Endozytose [36, 246]. Die gp60-Bindung und Caveolae-vermittelte Transzytose von HSA wurde zwar nachgewiesen (siehe 3.4.1.3 Albondin), aber dass derselbe Mechanismus in der Lage sein soll, 130 nm große Albumin-Nanopartikel durch das Endothel zu transportieren, basiert auf dieser einen Veröffentlichung von Desai et al. und wird seitdem immer wieder zitiert [127, 132, 247]. Alternativ wird die HSA-Akkumulation im Tumorgewebe zum Nachweis der tumorspezifischen Anreicherung von Nab-Paclitaxel herangezogen, wobei hier auf kovalent mit Gadolinium(Gd)-Komplexen gekoppeltes HSA, welches als Kontrastmittel im MRT untersucht wurde, verwiesen wird [104]. Hierzu sei anzumerken, dass kovalent-gebundene Gd-Komplex / Albumin-Konjugate und Albumin-Nanopartikel, die durch eine simple Mischung von Paclitaxel mit Albumin und nachfolgender Sprühtrocknung entstehen, sehr unterschiedliche Nanotherapeutika darstellen, deren einzige Gemeinsamkeit die Verwendung von Albumin ist. Ähnlich dünn ist die Datenlage für die postulierte Anreicherung im Tumorgewebe durch eine Bindung des nab-Paclitaxels an SPARC, das zwar ein Albumin-bindendes Protein mit bekannter Überexpression in verschiedenen Tumorarten ist, eine Korrelation von SPARC-Expression und der Empfindlichkeit der Tumoren gegenüber Abraxane konnte jedoch nur von einigen Autoren nachgewiesen werden, von anderen hingegen nicht [132, 136]. Nichtsdestotrotz erhielt Abraxane 2008 die Zulassung in Europa und wird seitdem erfolgreich eingesetzt, unter anderem in der Therapie des Mammacarcinoms. Es muss auch gesagt werden, dass die Akkumulation von Abraxane im Tumorgewebe aufgrund des EPR-Effekts (siehe 3.2.2) wahrscheinlich durchaus gegeben ist und die Wirksamkeit von Abraxane nachgewiesen. Allein die Elimination der durch den Lösungsvermittler Cremophor El verursachten Nebenwirkungen stellt eine enorme Verbesserung hinsichtlich der Verträglichkeit dieses Taxolderivates dar.

Um auf den postulierten Mechanismus der Transzytose zurückzukommen, wurde hier meiner Ansicht nach jedoch keine detaillierte Untersuchung durchgeführt, anders als die Literatur bzw. die Firmenpräsentation suggerieren. Wie bereits erwähnt, ist dies ein Beispiel dafür, dass ein nachgewiesen wirksames Therapeutikum nicht genauer nachweisen muss, wie es an seinen Wirkort oder in die Zelle gelangt. In dieser Hinsicht interessant ist auch die postulierte Bindung von „Albumin-bindenden Prodrugs“ wie Doxo-EMCH, das an zirkulierendes Albumin binden soll und für das laut Herstellerangaben für 2013 eine Phase III Studie geplant ist. Mal abgesehen von der Tatsache, dass Doxorubicin als lipophiles Molekül *per se* an Albumin bindet, war ein ähnliches Albumin-bindendes Prodrug des Glucagon-like Peptide 1, CJC-1131, angeblich auch nach subkutaner (!) Injektion in der

Lage, seine gewünschte Wirkung zu erzielen, was mit Blick auf die subkutan „zirkulierende“ Menge an Albumin die postulierte *in vivo* Albumin-Bindung dieser Prodrugs fragwürdig erscheinen lässt [248].

Neben diesen, auch bei anderen Autoren evidenten, methodischen Problemen bei der Untersuchung eines spezifischen Endozytose-Mechanismus, gestaltete sich in meinem Fall auch die Auswahl des zu untersuchenden Albumin-Konjugats schwierig. Wie sich herausstellte, können auch kleinste Mengen freien Fluoreszenz-Farbstoffs nach der Synthese des Albumin-Konjugats die Ergebnisse massgeblich verfälschen. Insbesondere, wie in meinem Fall, wenn das verwendete Fluorophor (TRITC) eine strukturelle Ähnlichkeit zu sich in Mitochondrien anreichernden Farbstoffen wie Rhodamin 123 aufweist. FITC- oder Aflc-HSA Konjugate sind hingegen aufgrund der pH-Abhängigkeit ihrer Fluoreszenz nicht für eine Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme im FACS geeignet [202, 203]. Yumoto et al. benutzten FITC-Albumin und umgingen das Problem der pH-abhängigen Fluoreszenz des Fluorophors durch eine Lyse der untersuchten Zellen, einer Messung der Fluoreszenz des Lysats und einer nachfolgenden Standardisierung hinsichtlich der analysierten Zellzahl durch den Proteingehalt der Lösung [233]. Ich habe den gleichen Ansatz für die Untersuchung der Aufnahme von Alexa488-Transferrin verwendet, habe hierbei aber die Erfahrung gemacht, dass die resultierenden Ergebnisse enorm schwankten, insbesondere nach der Standardisierung auf den Proteingehalt. Dies kann sicherlich auch durch das in den Versuchen verwendete geringe Format in 96-well-Platten bedingt sein, ein größerer Ansatz mit mehr Zellen in größeren Wells hätte jedoch auch einen ungleich höheren Verbrauch an fluoreszenz-markierten Proben bedeutet. Die Analyse von lebenden Zellen im FACS erwies sich als eine sehr viel robustere Methode. Zur Etablierung der Versuche wurde zunächst ein kommerziell erwerbliches BSA-Konjugat untersucht, das mit durchschnittlich 7 Molekülen Alexa488 pro Molekül Protein markiert war. Aber selbst mit Alexa488 als Fluoreszenz-Farbstoff, welcher eine hohe Quanten-Ausbeute und nur geringe Bleicheffekte zeigt, war die im FACS gemessene Aufnahme von Alexa488-BSA sehr langsam und insgesamt nicht sehr hoch, gerade verglichen mit der schnellen und spezifischen Aufnahme von Alexa488-Transferrin. Auch wenn ich in meinen Versuchen nicht zeigen konnte, dass Alexa488-BSA über CME aufgenommen wird, wären weitere Versuche mit einem fluoreszenz-markierten HSA-Konjugat sicherlich wünschenswert. In Tierversuchen führte jedoch eine zu hohe Beladung des HSA-Moleküls zu einer Akkumulation der HSA-Konjugate in der Leber, wahrscheinlich weil das Protein als denaturiert wahrgenommen und konsequent aus dem Organismus eliminiert wurde [195]. Inwieweit dieser Effekt auch in der Zellkultur zum tragen kommt, ist unklar, dennoch müsste für eine genaue Analyse der Endozytose von natürlichem Albumin und um Hinweise auf die *in vivo* Situation zu erhalten, ein Konjugat untersucht werden, das eine geringe Beladung mit Fluoreszenz-Farbstoff zeigt. Da schon Alexa488 nicht für die hier durchgeführten Versuche ausreichte, bliebe eigentlich nur die Untersuchung der Aufnahme über radioaktiv-markierte Konjugate.

Zusammenfassend stellte sich, meiner Ansicht nach, durch die durchgeführten Versuche und eine intensive Literatur-Recherche heraus, dass eine genaue Analyse des Aufnahmemechanismus von HSA in humane Tumorzellen einen enormen methodischen Aufwand erfordern würde, der im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht geleistet werden konnte. Nicht nur die CME, sondern auch die Caveolae-vermittelte Endozytose und Clathrin- und Caveolin-unabhängige Aufnahmewege müssten mit jeweils verschiedenen Inhibitoren, am besten mit siRNA gegen mindestens zwei Zielproteine untersucht werden. Eine genaue Analyse der resultierenden Effekte anhand von Markerproteinen für jeden einzelnen Mechanismus, die Überprüfung unspezifischer Effekte auf die Endozytose von

Markermolekülen anderer Mechanismen, eine Untersuchung hinsichtlich cytotoxischer Nebenwirkungen und zudem eine Kontrolle der Fluid-Phase Aufnahme wären erforderlich. Zudem wäre hinsichtlich der Aufnahme von Albumin wahrscheinlich ein radioaktiv-markiertes Konjugat des humanen Serumalbumins mit geringer Beladung am besten geeignet, um die geringe Aufnahme in den erforderlichen kurzen Zeiträumen zu untersuchen. Aber selbst diese Versuche müssten für unterschiedliche Zelllinien wiederholt werden, um eine fundierte Aussage der Albumin-Aufnahme in einen bestimmten Zelltyp treffen zu können. Die von mir durchgeführte Etablierung der Inhibition der CME und ihrer Quantifizierung war zwar erfolgreich, reicht jedoch bei weitem nicht aus, um eine Aussage über den Aufnahmemechanismus von Albumin zu treffen, erst recht nicht über einen allgemein-gültigen Aufnahmemechanismus von Albumin in humane Tumorzelllinien.

6.3 HSA-bindende Moleküle auf der Oberfläche von lebenden Zelllinien

Das Ziel dieser Experimente war die Identifikation von Albumin-bindenden Proteinen auf der Zellmembran von Tumorzellen durch eine Methode, welche die vorgeschobene Isolation von Plasmamembranen und die daraus resultierenden Artefakte, wie ich sie für die Experimente von T. Fritzsche postuliere, umgeht. Diese Methode beinhaltet die Synthese eines HSA-Konjugats, das auf der einen Seite einen UV-aktivierbaren Crosslinker zur kovalenten Kopplung potentiell Albumin-bindender Proteine auf der Zellmembran besitzt und zusätzlich mit einem Biotin-Tag gekoppelt wurde. Nach der Inkubation mit dem Konjugat und der nachfolgenden UV-induzierten Kopplung können die Zellen lysiert und die HSA-Zielprotein-Konstrukte durch eine Immunopräzipitation mit Streptavidin, einem Protein, das spezifisch an Biotin bindet, isoliert und aufgereinigt werden. Da der verwendete Crosslinker zudem eine spaltbare Disulfid-Brücke besitzt, ermöglicht diese die Abspaltung der so isolierten Proteine von dem an das Streptavidin gebundenen Biotin-HSA und in einem nächsten Schritt die Auftrennung über SDS-PAGE und Analyse mittels MALDI-TOF MS.

T. Fritzsche setzte eine ähnliche Methode ein, wo er einen DTT-spaltbaren, UV-aktivierbaren Crosslinker mit I^{125} markierte und in einem nächsten Schritt an HSA konjugierte. Seine Inkubation, Kopplung, Lyse der Zellen und Spaltung des Konjugats ermöglichte ihm jedoch nur einen Nachweis der ungefähren Größen der isolierten Proteine über eine Autoradiographie eines SDS-PAGE Gels. Um bei meinen Versuchen den experimentellen Ablauf und die erfolgreiche Isolation der Proteine überprüfen zu können, wurde zusätzlich zu dem HSA-Konjugat ein vergleichbares Transferrin-Konjugat synthetisiert, mit dem über die oben erwähnten Schritte der Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1=CD71) aus den lysierten Zellmembranen zu isolieren sein sollte. Der TfR1 ist auf den meisten proliferierenden Zellen exprimiert [249], so auch auf den zur Etablierung der Versuche verwendeten A549 Zellen [250], die schon im ersten Teil dieser Arbeit zur Überprüfung der Calreticulin-Expression auf der Zellmembran dienten. Im Vergleich zu der hausinternen Zelllinie A240286S, die ebenfalls aus einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) etabliert wurden, werden die A549 Zellen auch in der Literatur als Modell-Zelllinie für NSCLC verwendet, wodurch die Ergebnisse auch mit Veröffentlichungen anderer Autoren verglichen werden können.

Die nachfolgende Abbildung 6-14 zeigt ein Schema des experimentellen Ablaufs und die zur Überprüfung der einzelnen Schritte durchgeführten Versuche.

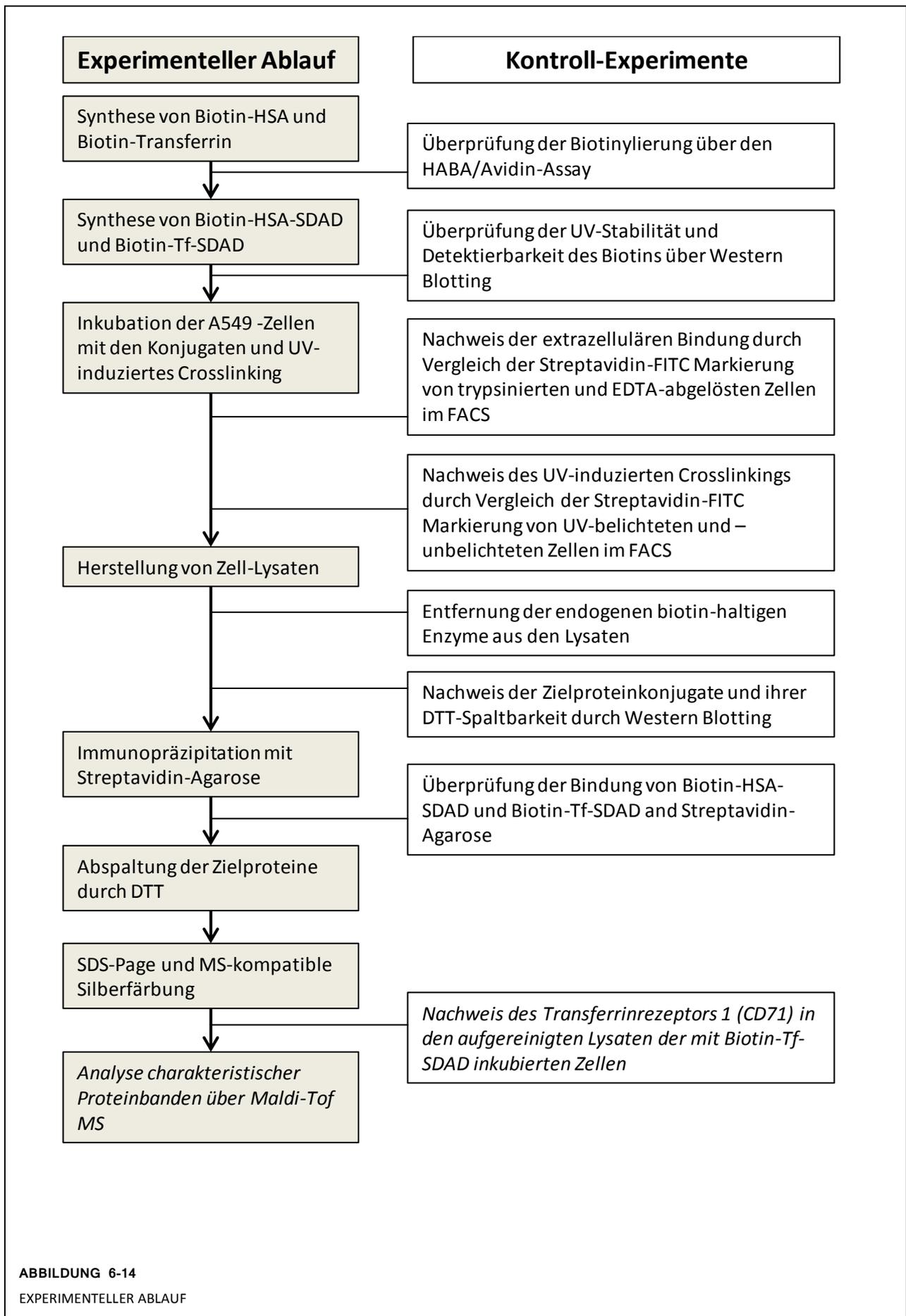


ABBILDUNG 6-14
EXPERIMENTELLER ABLAUF

6.3.1 Synthese von Biotin-HSA und Biotin-Transferrin

Biotin (Vitamin H) ist ein sehr kleines Molekül (244 Da) und kann an viele Proteine konjugiert werden, ohne deren biologische Eigenschaften zu verändern [251]. Eine charakteristische Eigenschaft von Biotin ist die starke Interaktion mit Avidin, einem aus Hühnereiweiß gewonnenem Protein. Streptavidin hingegen ist ein aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliertes Protein, das ähnlich wie Avidin eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin aufweist, aber negativ geladen und nicht-glycosiliert ist, weswegen es weniger unspezifische Interaktionen mit anderen Proteinen eingeht. Die Avidin/Streptavidin-Bindung mit Biotin ist eine der stärksten, nicht-kovalenten Bindungen in der Natur, formt sich sehr schnell und ist zudem über eine große Breite von Temperaturen, pH-Werten sowie gegenüber organischen Lösungsmitteln und anderen denaturierenden Substanzen stabil [252].

Biotin bindet in ungefähr 9 Å tiefen Taschen auf der Oberfläche des Avidins bzw. Streptavidins, weswegen bei der Konjugation eines Biotin-Tags an ein Protein ein zusätzlicher Spacer die Interaktion des Biotin mit Streptavidin verbessert [253, 254]. Das hier verwendete EZ-Link NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific (Rockford, USA)) enthält einen Spacer von 22,4 Å um eine sterische Hinderung bei der Bindung an Streptavidin zu minimieren. Während der Synthese reagiert die NHS-Gruppe des EZ-Link-LC-NHS-Biotins mit primären Aminen im Konjugationspartner zu stabilen Amid-Bindungen. Die Konjugation des EZ-Link-LC-NHS Biotins an HSA und Transferrin erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration der Proteine im Synthesepuffer betrug jeweils 40 mg/ml, weswegen, den Empfehlungen des Herstellers folgend, ein 13,5facher molarer Überschuss an EZ-Link NHS-LC-Biotin für die Synthese verwendet wurde. Nach der Konjugation wurden die entstandenen Biotin-Protein-Konjugate fünf Mal mit Waschpuffer (0,9 % NaCl, 10 % 1 N NaHCO₃, 10 % EtOH) sowie einmal mit 0,9 %iger NaCl gewaschen und im Anschluss sterilfiltriert.

Die Proteinkonzentrationen der fertigen Lösungen wurden mit dem BCA-Assay überprüft. Die Biotinylierung der beiden Proben wurde mit Hilfe des HABA/Avidin-Assay berechnet, welcher die spektrophotometrische Bestimmung des Biotin-Gehalts einer Probe ermöglicht. In der Lösung ist der Farbstoff HABA (2(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure) an Avidin gebunden und wird nach Zugabe von Biotin aus der Bindungsstelle verdrängt. Dies führt zu einer Verringerung der Absorption bei 500 nm (mit bekanntem Extinktionskoeffizienten), da freies HABA im Gegensatz zu dem HABA/Avidin-Komplex hauptsächlich bei 348 nm absorbiert [180, 181]. Da ich den Versuch in einem 96well-Platten Format durchgeführt habe und nicht in den vom Hersteller angegebenen 1 ml-Küvetten, wurde der Biotin-Gehalt der Proben über eine Standardkurve und nicht über Berechnung aus dem Extinktionskoeffizienten bestimmt.

Aus dem Proteingehalt, der über den BCA-Assay bestimmt wurde, und der Bestimmung des Biotin-Gehalts durch den HABA/Avidin-Assay wurde für Biotin-HSA eine durchschnittliche Konjugationsrate von 6 Molekülen Biotin pro HSA-Molekül errechnet. Für Biotin-Transferrin ergab sich eine durchschnittliche Beladung von 9 Molekülen Biotin pro Transferrin-Molekül. Da laut dem Hersteller die zusätzliche Masse pro konjugiertem Biotin-Molekül 339 Da beträgt, erhöht sich das Molekulargewicht von Biotin-HSA im Vergleich zum eingesetzten HSA um durchschnittlich ca 2 kDa auf 69 kDa und das Molekulargewicht von Biotin-Transferrin im Vergleich zum eingesetzten Transferrin um durchschnittlich ca 3 kDa auf 82 kDa.

Der Hersteller gibt für eine erfolgreiche Synthese eine durchschnittliche Beladung von 3-5 Molekülen Biotin pro Molekül Protein an, für große Proteine wie Antikörper eine durchschnittliche Beladung von

8-12 Molekülen Biotin pro Molekül Protein. Die von mir bestimmte Beladung des HSA und des Transferrin liegt also in dem vom Hersteller angegebenen Bereich.

Die Konjugation von Proteinen mit NHS-LC-Biotin erhöht deren Hydrophobizität und kann so zur Aggregation der Moleküle, zur Proteinpräzipitation oder Funktionsverlust führen. Durch die erhöhte Hydrophobizität kann sich zudem die unspezifische Bindung an die Zelloberfläche verstärken [255]. Die synthetisierten Konjugate Biotin-HSA und Biotin-Transferrin zeigten jedoch keine Präzipitation in den hergestellten Stammlösungen. Storm et al. konnten zudem für biotinyliertes Transferrin keinen Unterschied zu nicht-biotinyliertem Transferrin hinsichtlich der Bindung an den Transferrin-Rezeptor feststellen [255]. Inwieweit die Biotinylierung des HSA einen Einfluss auf unspezifische Wechselwirkung mit der Zelloberfläche hat, lässt sich jedoch erst nach der Auswertung der endgültigen Ergebnisse der Massenspektrometrie feststellen. Insbesondere können durch einen Vergleich der mit dem HSA-Konjugat isolierten Proteine mit den durch das Transferrin-Konjugat isolierten Proteinen solche unspezifischen, auf Hydrophobizität basierenden Interaktionspartner, die in beiden Datensätzen vorkommen, identifiziert werden.

6.3.2 Synthese von Biotin-HSA-SDAD und Biotin-Tf-SDAD

Der von T. Fritzsche verwendete Crosslinker (SASD von Thermo Fisher, Rockford, USA) ist nicht mehr im Handel. Für die hier synthetisierten Konjugate wurde stattdessen der SDAD-Crosslinker (NHS-SS-Diazirin) verwendet, der eine Thiol-spaltbare Disulfid-Brücke sowie einen Spacer von 13,6 Å enthält. Die Konjugation an Biotin-HSA und Biotin-Transferrin erfolgte wiederum über einen Amin-reaktiven N-Hydroxysuccinimid-Ester am Crosslinker, welcher mit primären Aminen zu einer stabilen Amid-Bindung reagiert. Die UV-induzierte Kopplung an einen postulierten Rezeptor auf der Zelloberfläche erfolgt durch die im Crosslinker enthaltene Diazirin-Gruppe, welche unter Abspaltung von Stickstoff eine Carben-Gruppe bildet, die nach den Angaben des Herstellers wiederum mit einer ganzen Reihe von funktionellen Gruppen reagiert. Die bei der Photoreaktion entstehenden Carbene reagieren zudem schnell mit Wasser, weswegen nur eng an ihre Rezeptoren gebundene Liganden an diese gekoppelt werden, ungebundene Konjugate aber durch die Reaktion mit Wasser inaktiviert werden, bevor sie unspezifische Reaktionen mit anderen Proteinen eingehen [256].

Die Synthese des Biotin-HSA-SDAD und des Biotin-Tf-SDAD Konjugats erfolgte wie vom Hersteller empfohlen und unter Rotlicht. Die Konzentration der Proteine Biotin-HSA und Biotin-Transferrin im Synthesepuffer betrug jeweils ca 20 mg/ml, weswegen, den Empfehlungen des Herstellers folgend, ein 14,5facher molarer Überschuss an NHS-SS-Diazirin für die Synthese verwendet wurde. Nach der Synthese wurde überschüssiges Reagenz durch die Zugabe von 1 M Tris-HCl inaktiviert und die fertigen Konjugate vier Mal mit Waschpuffer und einmal mit sterilem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Proteine in sterilem PBS aufgenommen, sterilfiltriert, und bis zur weiteren Verwendung unter Lichtausschluss bei 4° C gelagert.

Anders als bei der Synthese der Biotin-Konjugate war eine Quantifizierung der Menge an konjugiertem Crosslinker pro Molekül Protein nicht möglich. Stattdessen wurde die erfolgreiche Synthese von Biotin-HSA-SDAD und Biotin-Tf-SDAD direkt auf Zellen überprüft, indem die Bindung an die Zelloberfläche (s. 5.5.5.1), die Abhängigkeit dieser Bindung von der Aktivierung mit UV-Licht (5.5.5.2) sowie die Bildung von hochmolekularen (>MW der Ausgangskonjugate) Liganden-Rezeptor-Komplexe (s. 5.5.6) untersucht wurden.

6.3.3 Nachweis und UV-Stabilität des Biotin-Tags

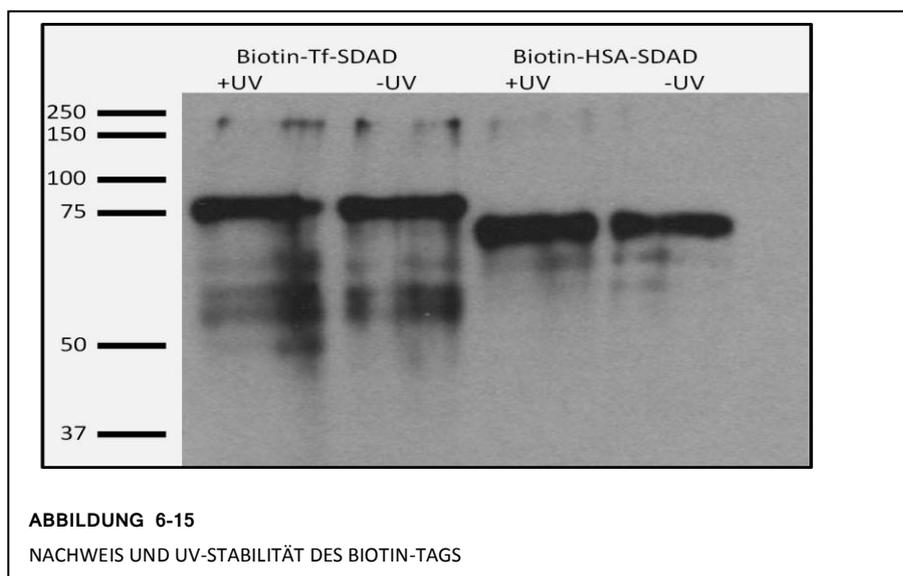
Dieser Versuch diente mehreren Zwecken: auf der einen Seite sollte die Stabilität des Biotin-Tags in wässriger Lösung überprüft werden, sowie die Stabilität des Biotin-Tags und der Proteine während der UV-Belichtung. Auf der anderen Seite sollte ein Abbild der Biotin-haltigen Banden in den reinen Konjugatlösungen erstellt werden, um diese später in den Western Blots der Lysate aus mit den Konjugaten inkubierten Zellen identifizieren zu können. Die Stabilität des Biotin-Tags wurde hier explizit überprüft, da in einem Vorversuch festgestellt wurde, dass Azid-basierten Crosslinker den Abbau von Biotin induzieren können.

In diesem Vorversuch wurde der von Thermo Fisher Scientific angebotene Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Reagent verwendet, der auf der einen Seite über eine NHS-Ester Gruppe an primäre Amine gekoppelt werden kann und auf der anderen Seite eine photoaktivierbare Aryl-Azid Gruppe enthält. Zusätzlich enthält der Crosslinker auch eine Biotin-Gruppe, die kovalent mit dem photoreaktiven Teil verknüpft, aber von dem Amin-reaktiven Teil durch eine Disulfid-Brücke getrennt ist. So kann nach dem UV-induzierten Crosslinking und der Aufreinigung über Streptavidin/Biotin die Verbindung zwischen Zielprotein und ursprünglichem Konjugat durch Thiole wie zum Beispiel DTT gespalten werden, wobei der Biotin-Tag so auf das Zielprotein übertragen wird. Der Sulfo-SBED Crosslinker vereinigt meine Strategie folglich in einem einzigen Konjugationspartner und hat zudem den Vorteil, dass die Zielproteine über den Biotin-Tag auch im Western Blotting identifiziert werden können. Er wurde von anderen Autoren unter anderem dafür benutzt, die Bindungspartner von Neurotensin durch MALDI-TOF MS und die Bindungsstelle von Alpha-Cristallin, einem Mitglied der small heat shock protein Familie, an ADH (Alkohol Dehydrogenase) zu identifizieren [257, 258]. Vergleichbar zu den Biotin-Protein-SDAD Konjugaten habe ich auch HSA- und Transferrin-Konjugate mit dem Sulfo-SBED Crosslinker hergestellt. Allerdings stellte sich hier heraus, dass die ankonjugierten Strukturen bzw. der enthaltene Biotin-Tag in Lösung nicht stabil war. Der Hersteller macht keine weiteren Angaben zur Stabilität, nach meiner Erfahrung war ungefähr eine Woche nach der Synthese der Biotin-Tag an den Proteinen nicht mehr im Western-Blotting nachweisbar. Weitere Untersuchungen zur Funktionalität und Stabilität des ebenfalls enthaltenen Crosslinkers (eine Arylazid-Gruppe) wurden daraufhin nicht weiter durchgeführt. Der Grund für die Instabilität des Biotin-Tags ist wahrscheinlich die Kombination von Biotin und Azid in wässriger Lösung, so sollten Biotin-Lösungen nicht mit Azid konserviert werden, da sie über einen unbekanntem Mechanismus die Degradierung von Biotin stark beschleunigen [259]. Anders als Arylazide, welche den photoreaktiven Teil des Sulfo-SBED darstellen, scheinen Diazirine, welche ich als Crosslinker in meinen Konjugaten verwende, stabiler zu sein [256]. Die Synthese der Crosslinker- und Biotin-Modifikation tragenden Proteine in zwei einzelnen Schritten und als separate Moleküle könnte zudem zu einer größeren räumlichen Distanz zwischen dem Biotin und der Diazirin-Gruppe führen. Aufgrund der Erfahrungen in den Versuchen von T. Fritzsche war die Möglichkeit zur Funktionskontrolle und Optimierung der Versuchsparameter ausserdem von entscheidender Bedeutung. Letztere können naturgemäß leichter mit einer identischen Probe erreicht werden als mit für jeden Versuch neu synthetisierten Konjugaten, wie sie der Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Reagent aufgrund der Instabilität in Lösung verlangt hätte.

Von den beiden Biotin-Protein-SDAD Konjugaten wurden Lösungen in serumfreiem Medium hergestellt und entweder für 10 min mit 366 nm UV-Licht belichtet oder nicht. Im Anschluss wurden die Lösungen über eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und Biotin-haltige

Banden mit Streptavidin-HRP detektiert. Von den fertigen Biotin-Protein-SDAD Konjugate wurden jeweils 50 nMol mit serumfreiem Medium verdünnt (Endvolumen 400 µl) und in einer 12well-Platte für 10 min mit UV-Licht (366 nm) auf Eis belichtet. Als Kontrolle dienten Proben, die nicht mit UV-Licht belichtet worden waren. Die Proteinlösungen wurden danach über eine reduzierende (Zugabe von 100 mM DTT zum Probenpuffer) SDS-PAGE aufgetrennt und Biotin-haltige Proteinbanden im Anschluss durch Western-Blotting mit Streptavidin-HRP detektiert. Da das üblicherweise für die Blockade von unspezifischen Bedingungen verwendete Milchpulver Biotin enthalten kann und somit den Nachweis von Biotin-haltigen Proteinen durch Streptavidin stört [260], wurden die Nitrocellulose-Membranen stattdessen vor der Inkubation mit Streptavidin-HRP mit einer 5 %igen BSA Lösung behandelt.

Die nachfolgende Abbildung 6-15 zeigt die über SDS-PAGE aufgetrennten belichteten und unbelichteten Konjugatlösungen beider Konjugate.



Biotin-HSA-SDAD und Biotin-Tf-SDAD sind nach der Auftrennung durch SDS-PAGE und dem Western-Blotting mit Streptavidin-HRP detektierbar. Wie erwartet liegt das Molekulargewicht von Biotin-Tf-SDAD leicht über 75 kDa (berechnet ca 82 kDa) und das Molekulargewicht von Biotin-HSA-SDAD leicht unter 75 kDa (berechnet ca 69 kDa). Der Blot zeigt keinen Unterschied in der Intensität der UV-belichteten und unbelichteten Proben. Bei beiden Proteinen sind in geringem Maße auch Biotin-haltige Banden im Bereich 50-75 kDa zu sehen, die aber in der gleichen Größe und Intensität sowohl bei belichteten als auch bei unbelichteten Proben auftauchen. Vermutlich sind sie durch Verunreinigungen in den Ausgangssubstanzen entstanden oder im Verlauf der Synthese. Beide Konjugate sind folglich über ihren Biotin-Tag über Streptavidin-HRP detektierbar und auch nach der Belichtung mit UV-Licht stabil.

6.3.4 Extrazelluläre Bindung und UV-induziertes Crosslinking

Das Ziel dieser Experimente war das UV-induzierte Crosslinking der Konjugate an membranständige Proteine zu überprüfen und zudem geeignete Konzentrationen für die weiteren Versuche zu ermitteln. Hierzu wurden zwei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Auf der einen Seite wurden A549 Zellen für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen der Biotin-Protein-SDAD

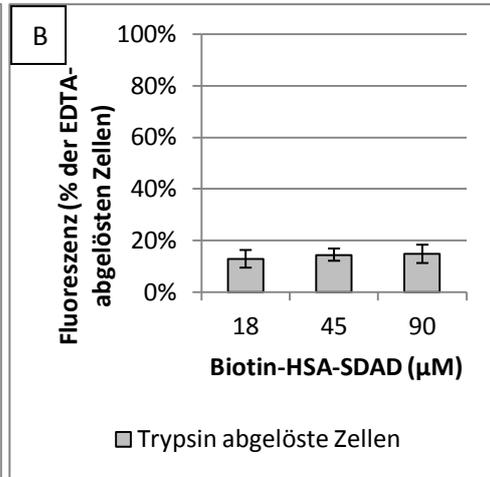
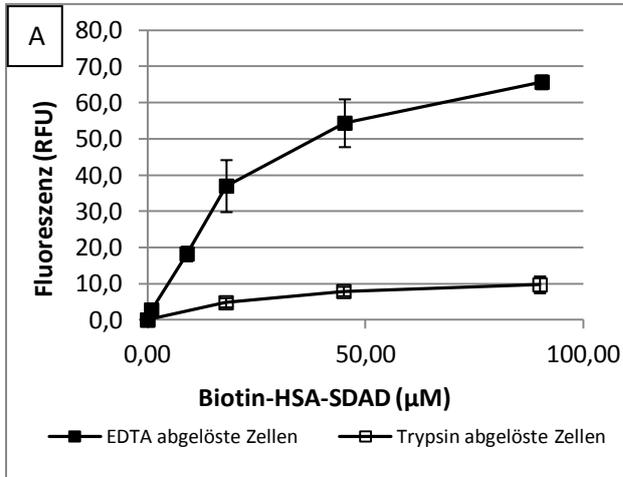
Konjugate inkubiert, gewaschen, belichtet und entweder mit 0,02 % EDTA in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (=“EDTA-abgelöste Zellen“) oder mit Trypsin/EDTA in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA (w/v)) (=“Trypsin-abgelöste Zellen“) abgelöst. Die Menge an extrazellulär bindenden Konjugaten wurde dann durch eine Markierung mit Streptavidin-FITC im FACS quantifiziert. Dies diente zur Verifizierung der extrazellulären Lokalisation der gecrosslinkten Konjugate, da die Behandlung mit Trypsin extrazelluläre Proteine spaltet und sich somit die Streptavidin-FITC Fluoreszenz der Trypsin-abgelösten Zellen im Vergleich zu den EDTA-abgelösten Zellen verringern sollte. Auf der anderen Seite wurden die mit den Konjugaten inkubierten Zellen entweder für 20 min mit UV-Licht belichtet oder nicht. Der Nachweis der an den Zellen bindenden Konjugate erfolgte dann analog zu oben. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Abhängigkeit der extrazellulären Bindung von dem UV-induzierten Crosslinking zu überprüfen. Die Inkubation der A549 Zellen mit den Konjugaten erfolgte in allen Fällen unter Lichtausschluss und auf Eis, um die Internalisierung der Konjugate zu minimieren.

6.3.4.1 Vergleich Trypsin- und EDTA-abgelöster Zellpopulationen

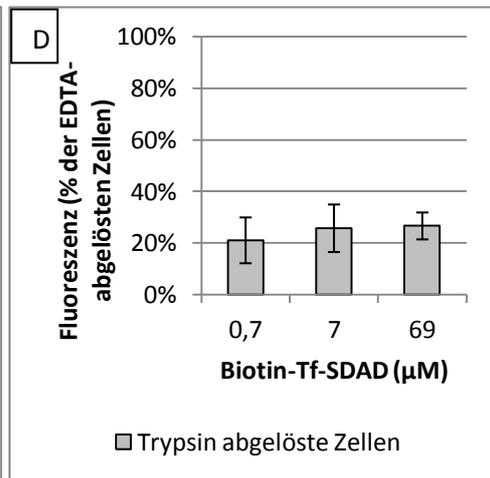
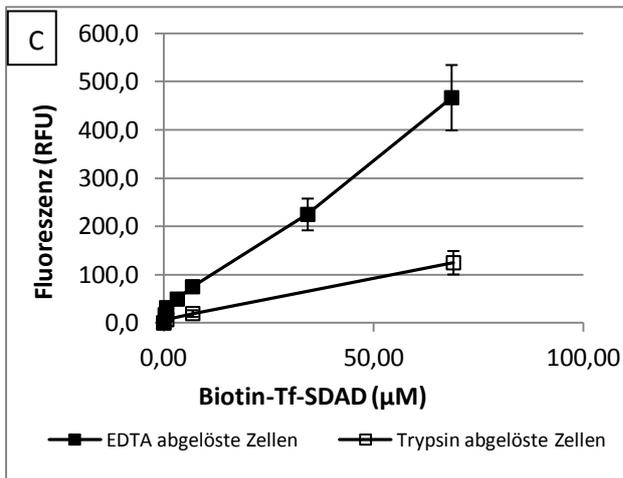
Trypsin ist eine Protease, die in der Zellkultur im allgemeinen zur Ablösung von adhären Zellen verwendet wird [261]. EDTA kann auch zur Ablösung von adhären Zellen genutzt werden, da es Ca^{2+} Ionen cheliert, die für die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion essentiell sind [262]. Der Vergleich von trypsinisierten und EDTA-abgelösten Zellpopulationen wurde hier verwendet, um die Konjugation von Biotin-HSA-SDAD bzw. Biotin-Tf-SDAD an extrazellulär-membranständige Proteine nachzuweisen. Die Konjugate wurden mit Hilfe ihres Biotin-Tags durch Streptavidin-FITC im FACS quantifiziert, es wurde also die Signalintensität von beiden Gruppen quantifiziert und verglichen. Zur Kontrolle der unspezifischen Bindung des Streptavidin-FITC an die Zellmembran dienten Zellen, die ohne Konjugate inkubiert und belichtetet worden waren. Dieser so ermittelte 0-Wert wurde von allen korrespondierenden Proben abgezogen. Gemessen wurde die durchschnittliche Fluoreszenz (relative fluorescence units = RFU) von jeweils 15 000 lebenden Zellen.

Abbildung 6.16 stellt die durchschnittliche Fluoreszenz der untersuchten A549 Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Biotin-Protein-SDAD Konjugat dar. Abbildung 6-16 A und Abbildung 6-16 C zeigen die Daten für Biotin-HSA-SDAD bzw. für Biotin-Tf-SDAD, wohingegen Abbildung 6-16 E eine vergrößerte Darstellung der unteren Konzentrationsbereiche aus Abbildung 6-16 C von Biotin-Tf-SDAD zeigt. In Abbildung 6-16 B (Biotin-HSA-SDAD) und Abbildung 6-16 D (Biotin-Tf-SDAD) wird die Fluoreszenz der Trypsin-abgelösten Zellen nocheinmal als prozentualer Anteil der jeweils korrespondierenden EDTA-abgelösten Zellen dargestellt.

Extrazelluläre Bindung von Biotin-HSA-SDAD



Extrazelluläre Bindung von Biotin-Tf-SDAD



Extrazelluläre Bindung von Biotin-Tf-SDAD (Detail)

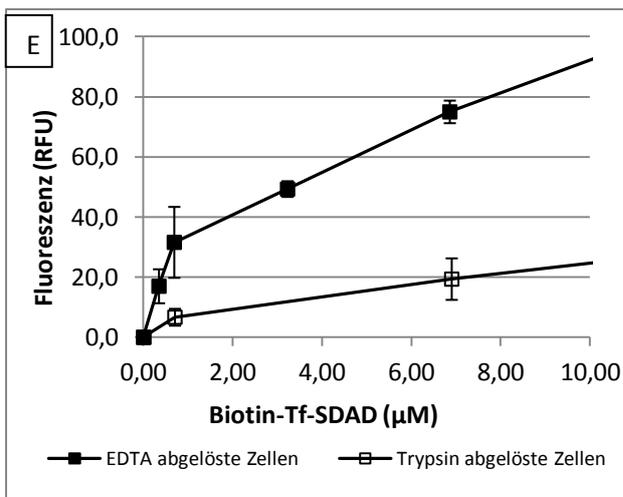


ABBILDUNG 6-16

KONZENTRATIONSABHÄNGIGE, EXTRAZELLULÄRE BINDUNG DER KONJUGATE

Sowohl die Zellen, die mit Biotin-HSA-SDAD, als auch die Zellen, die mit Biotin-Tf-SDAD inkubiert worden waren, zeigen eine konzentrationsabhängige Zunahme des Streptavidin-FITC Signals und somit der Biotin-Markierung. Im Gegensatz zu den mit EDTA/PBS abgelösten Proben zeigten die mit Trypsin behandelten Zellen eine stark reduzierte Fluoreszenz. Im Falle des Biotin-HSA-SDAD lag diese für alle Konzentrationen bei ca 14 % der Messwerte für die EDTA abgelösten Proben, im Falle des Biotin-Tf-SDAD bei jeweils ca 25 %. Die graphische Darstellung der konzentrationsabhängigen Bindung der Konjugate zeigt sowohl für Biotin-HSA-SDAD als auch für Biotin-Tf-SDAD einen abgeflachten Kurvenverlauf, im Falle des Biotin-Tf-SDAD bereits im Konzentrationsbereich von 1 bis 4 $\mu\text{Mol/l}$.

Die mit Trypsin behandelten Zellen zeigten eine deutlich verringerte Bindung von Streptavidin-FITC. Da das Streptavidin an den Biotin-Tag der Konjugate bindet, zeigt dieser Versuch, dass die Konjugate nach dem UV-induzierten Crosslinking hauptsächlich auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran nachweisbar sind. Durch die unspezifische Aufnahme von Streptavidin-FITC hervorgerufene Fluoreszenz wurde in Zellen, die ohne Konjugate inkubiert worden waren, bestimmt und als Leerwert von allen Proben abgezogen. Sowohl Biotin-HSA-SDAD als auch Biotin-Tf-SDAD zeigen bei höheren Konzentrationen eine Sättigung der Plasmamembran bzw. Bindungsstellen auf der Plasmamembran mit dem jeweiligen Konjugat. In der Darstellung dieser Sättigungskurven ist für den Beginn dieses Effekts jedoch ein deutlicher Konzentrationsunterschied zwischen dem Biotin-HSA-SDAD und dem Biotin-Tf-SDAD zu erkennen. Transferrin bindet sehr spezifisch an den Transferrinrezeptor, und für eine Sättigung desselben ist in A549 Zellen offensichtlich bereits eine Konzentration von ca 0,7 μM ausreichend. Die in Teil 2 dieser Arbeit für die Untersuchung der Endozytose in A240286S Zellen verwendete Konzentration von Alexa488-Tf lag bei 100 nM, also ungefähr einem Siebtel dieser Sättigungskonzentration. Für das Biotin-HSA-SDAD Konjugat lag die hier ermittelte Sättigungskonzentration mit 20-45 μM merklich höher, was sowohl für ein stark exprimiertes Albumin-bindendes Protein auf der Zellmembran von A549 Zellen als auch für eine relativ stark ausgeprägte unspezifische Bindung des HSA an die Plasmamembran, oder aber für eine Kombination aus beidem, sprechen könnte. Auch nach dem Erreichen der Sättigungskonzentration zeigen die A549 Zellen jedoch insbesondere für Biotin-Tf-SDAD auch bei höheren Konzentrationen einen weniger ausgeprägten, aber stetigen, konzentrationsabhängigen Anstieg der Streptavidin-FITC Bindung. Die Erklärung für dieses Phänomen liegt wahrscheinlich in der schnellen Internalisierung von Transferrin innerhalb von wenigen Minuten, wie sie auch schon bei den Experimenten zur Clathrin-abhängigen Endozytose beobachtet werden konnten (siehe 6.2). Die Zellen wurden zwar soweit möglich bei 4° C inkubiert, allerdings gab es zwei Punkte, an denen diese Temperatur überschritten wurde. Zum einen bedeutet eine Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht auch einen Energieeintrag, der zur Erwärmung geführt haben könnte, und zum zweiten war es zur Ablösung der A549 Zellen mit EDTA erforderlich, dass die Zellen für insgesamt 10 min bei 37° C mit der EDTA-Lösung inkubiert werden mussten, da sich die Zellen andernfalls nicht quantitativ von den Wellböden ablösten. Es wurde zwar zusätzlich ein Cell Scraper verwendet, um die Ablösung zu unterstützen, allerdings wurde bei der Messung im FACS die durchschnittliche Fluoreszenz von lebenden Zellen bestimmt, deren Anteil an der Gesamtpopulation sich stark verringerte, wenn anstatt der Inkubation bei 37° C nur das (forcierte) Abschaben mit dem Cell Scraper verwendet wurde. Da die Internalisierung von Transferrin und das Recycling des Transferrinrezeptors sehr schnell verläuft, ist es wahrscheinlich, dass somit während der Belichtung mit UV-Licht bereits an den Transferrinrezeptor konjugiertes Biotin-Tf-SDAD internalisiert und gleichzeitig „frischer“ Transferrinrezeptor zur Oberfläche recycelt wurde, wodurch insgesamt mehr Rezeptor für die

Konjugation zur Verfügung stand als der primär auf der Zellmembran vorhandene. Auch wenn bei 4° C energieabhängige Prozesse wie die Endozytose nur in sehr geringem Ausmaß stattfinden, ist es so möglich, insbesondere durch die vorherige Erwärmung der Zellen während der Inkubation mit EDTA, dass während der Inkubation mit Streptavidin-FITC zusätzlich zu den auf der Zellmembran vorhandenen Biotin-Tf-SDAD-Transferrinrezeptor-Konjugate weitere, im Verlauf des Crosslinkings gebildete und internalisierte Biotin-Tf-SDAD-Transferrinrezeptor-Konjugate wieder zur Oberfläche gelangt und mit Streptavidin-FITC markiert worden sein könnten. Da der Nachweis der Biotin-Tf-SDAD-Transferrinrezeptor-Konjugate durch die Bindung von Streptavidin-FITC nachgewiesen wurde, ist eine andere Erklärung, wie zum Beispiel die einer unspezifischen Fluid-Phase Endozytose des Konjugats, nicht möglich, da das Konjugat in diesem Fall im Verlauf der nachfolgenden Behandlung der Zellen entweder wieder zur Oberfläche gelangt und gewaschen worden wäre, oder im Zuge des endosomalen-lysosomalen Systems zu den inneren Organellen der Zelle transportiert worden wäre, wo es für eine Detektion mit Streptavidin-FITC nicht zur Verfügung gestanden hätte.

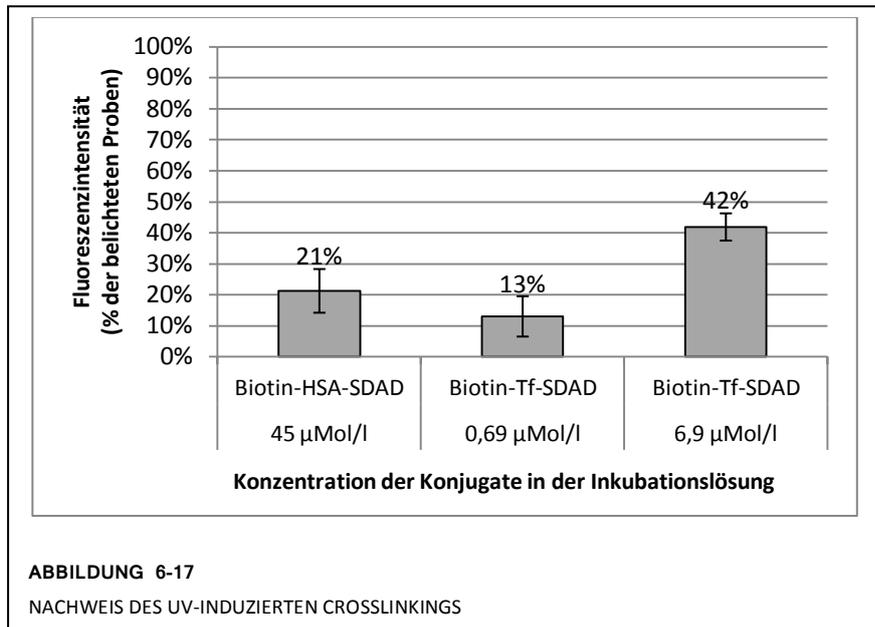
Auch die Trypsin-behandelten Zellen zeigten in dem Versuch eine konzentrationsabhängige, aber geringe Streptavidin-FITC Bindung und zudem bei höheren Konzentrationen, vergleichbar mit den EDTA-abgelösten Zellen, einen abgeflachten Anstieg der durchschnittlichen Fluoreszenz. Dieser abgeflachte Verlauf ist wahrscheinlich durch ähnliche Abläufe begründet, wie sie bereits oben für die EDTA-abgelösten Zellen diskutiert wurden. Dass auch Trypsin-behandelte Zellen eine gewisse Streptavidin-FITC Bindung zeigen, war zu erwarten und ist wahrscheinlich durch eine unvollständige Spaltung der extrazellulär gekoppelten Biotin-Protein-SDAD Konjugate bedingt.

Zusammenfassend zeigt dieser Versuch, dass die synthetisierten Konjugate an die extrazelluläre Membran der A549 Zellen binden, dass diese Bindung sättigbar ist und konzentrationsabhängig ansteigt, sowie dass die Biotin-Protein-SDAD Konjugate extrazellulär gebunden sind, da sie mit Streptavidin-FITC markiert und im FACS quantifiziert werden können.

6.3.4.2 Vergleich UV-belichteter und unbelichteter Zellpopulationen

In einem nächsten Schritt wurde überprüft, inwieweit die mit Streptavidin-FITC nachweisbare Bindung der Biotin-Protein-SDAD Konjugate an die Plasmamembran der A549 Zellen abhängig von der UV-Belichtung bei 365 nm - und damit von dem UV-induzierten Crosslinking des SDAD-Linkers - ist. Hierzu wurden A549 Zellen entweder wie oben beschrieben behandelt und mit UV-Licht belichtet oder direkt nach der Inkubation mit den Konjugaten gewaschen und mit EDTA abgelöst. Die Inkubation mit Streptavidin-FITC erfolgte für die unterschiedlich abgelösten Zellpopulationen parallel und wie bereits oben beschrieben. Für Biotin-HSA-SDAD wurde eine Endkonzentration von 45 µM (3,1 mg/ml) in der Inkubationslösung verwendet. Bei dieser Konzentration war in dem oben beschriebenen Versuch zur Konzentrationsabhängigkeit (siehe 6.3.4.1) ungefähr der Wendepunkt der Kurve in der graphischen Darstellung der Streptavidin-FITC Bindung. Für Biotin-Transferrin-SDAD wurden zwei verschiedene Endkonzentrationen, sowohl 0,69 µM (0,06 mg/ml) als auch 6,9 µM (0,6 mg/ml) untersucht, welche in dem oben beschriebenen Versuch einmal ungefähr den Wendepunkt der Kurve markierten und einmal in dem bereits abgeflachten Kurvenverlauf lagen.

Abbildung 6-17 stellt die RFU-Werte von unbelichteten Zellen als prozentualen Anteil der Fluoreszenz von den jeweils korrespondierenden belichteten Zellen dar.



Das Ausmaß der Streptavidin-FITC Bindung an Zellen, die nach der Inkubation mit den Biotin-Protein-SDAD Konjugaten nicht mit UV-Licht belichtet worden waren, war im Vergleich zu den jeweils belichteten Zellpopulationen stark reduziert. Wurden die A549 Zellen nach der Inkubation mit den Konjugaten direkt gewaschen und von den Wellböden abgelöst, lag der prozentuale Anteil des extrazellulär detektierbaren Biotins im Fall des Biotin-HSA-SDAD bei durchschnittlich 21 % der parallel bestimmten Referenzwerte, im Fall des Biotin-Tf-SDAD bei 13 % für die verwendete Endkonzentration 0,69 µM und bei 42 % bei der eingesetzten Endkonzentration 6,9 µM.

Dieser Versuch zeigt, dass die durch Streptavidin-FITC quantifizierte Bindung der Biotin-Protein-SDAD Konjugate an die Zellmembran der A549 Zellen abhängig von der UV-induzierten Aktivierung des SDAD-Crosslinkers in den Konjugaten ist. Wird auf die Belichtung der Zellen verzichtet, entfernen nachfolgenden Waschschrte die membrangebundenen Konjugate zu circa 80 % von der Zellmembran. Die Aktivierung der Konjugate und das kovalente Crosslinking an die Zellmembran mit der gewählten Methode war also erfolgreich. Allerdings liegt die quantifizierbare Membranbindung der Konjugate auch ohne UV-Belichtung bei 21 % (Biotin-HSA-SDAD) bzw. im Falle des Biotin-Tf-SDAD zwischen 13 % (Endkonzentration 0,69 µM) und ganzen 42 % (Endkonzentration 6,9 µM). Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Tatsache, dass die unbelichteten Zellen nach der Inkubation nicht im Dunkeln sondern bei normalem Raumlicht gewaschen und abgelöst wurden, was wahrscheinlich bereits zu einer Aktivierung von geringen Mengen der Konjugate und dementsprechend kovalenten Crosslinkings an die Zellmembran führte. Interessant ist hier, dass eine höhere Konzentration an Biotin-Tf-SDAD zu einer ausgeprägten Verstärkung dieses Effekts führte. Eine höhere eingesetzte Konzentration an Biotin-Tf-SDAD führte also zu einer merklichen Verstärkung der UV-unabhängigen Membranbindung. Dies spricht für eine ausgeprägt spezifische und stabile Interaktion des Biotin-Tf-SDAD Konjugats mit Membranproteinen, die oberhalb der oben ermittelten Sättigungskonzentration auftritt. Inwieweit dieses Phänomen durch den Transferrinrezeptor bedingt ist oder dem ganzen eine andere Erklärung zugrunde liegt, ist unklar. Zur genaueren Untersuchung würde eine Versuchsreihe, die belichtete und unbelichtete Zellen sowie

aufsteigende Konzentrationen an eingesetztem Biotin-Tf-SDAD miteinander vergleicht, genauere Angaben über die Konzentrationsabhängigkeit und das Ausmaß dieses Effekts liefern. Da hier jedoch nur die Methode für die erfolgreiche Aktivierung des SDAD-Crosslinkers überprüft werden sollte, wurden solche detaillierten Versuchsreihen nicht weiter durchgeführt.

6.3.5 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten aus mit den Biotin-Protein-SDAD Konjugaten inkubierten und im Anschluss belichteten Zellen wurden diese wie unter 6.3.4 behandelt und im Anschluss an den letzten Waschschrift einmal mit PBS, das mit Complete Protease Inhibitor versetzt war, gespült und danach mit einem sterilen Cell Scraper von den Platten abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden pelletiert, in Subcellular Fractionation Buffer [183] aufgenommen und durch die Passage durch eine 27G Kanüle mechanisch zerbrochen [263]. Die eigentliche Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von Triton-X 100 (Endkonzentration 0,5 %). Die so hergestellten Zelllysate wurden im Anschluss durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen geblotet und Biotin-haltige Banden durch Streptavidin-HRP nachgewiesen. Das Ziel dieser Versuche war der Nachweis von Biotin-Protein-SDAD-Zielproteinkonjugaten, also der an die ursprünglichen Biotin-Protein-SDAD-Konjugate durch das Crosslinking kovalent gebundener Zielproteine. Durch den Biotin-Tag können diese hochmolekularen Konjugate im Western Blotting durch Streptavidin-HRP sichtbar gemacht werden. Die Zugabe von DTT zu den Lysaten führt hingegen zu einer Spaltung der Biotin-Protein-SDAD-Zielproteinkonjugate aufgrund der im Crosslinker eingebauten SS-Brücke. Durch das Crosslinking erfolgreich gebundene Zielproteine können so wieder abgespalten werden, wodurch nur noch die Ausgangskonjugate durch ihr Biotin-Tag mit Streptavidin-HRP detektierbar sind.

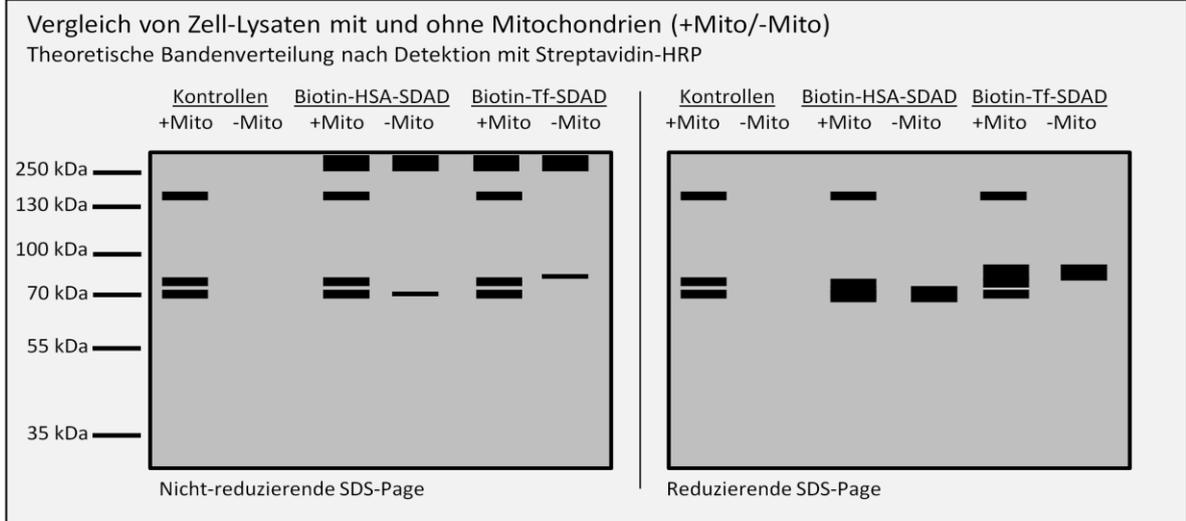
Zur Herstellung der Lysate wurde das nichtionische Detergenz Triton-X 100 verwendet. Generell verhalten sich die meisten Membranproteine aufgrund ihrer Hydrophobizität problematisch in Bezug auf ihrer Löslichkeit in wässrigen Puffern und tendieren zu unspezifischer Proteinaggregation und Denaturierung [264]. Die Wahl des richtigen Detergenz ist somit für jedes Membranprotein unterschiedlich und muss experimentell bestimmt werden [265]. Generell wird ein Screening von unterschiedlichen Detergentien bzw. eine sequentielle Membransolubilisierung, also die Anwendung von verschiedenen Detergentien hintereinander, empfohlen [265, 266]. Triton-X 100 solubilisiert Zellmembranen jedoch sehr effizient [267]. Eine prominente Ausnahme sind Lipid Rafts oder "detergent resistant membranes" (DRM), die sich durch ihre Unlöslichkeit in nichtionischen Detergentien wie Triton-X 100 auszeichnen [268]. Von dem Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1) ist jedoch bekannt, dass er nicht mit Lipid Rafts assoziiert [269, 270]. Triton-X 100 wurde bereits von anderen Autoren verwendet, um den TfR1 zu isolieren [268]. Aus diesem Grund wurde hier ebenfalls Triton-X 100 als erstes Detergenz zur Solubilisierung ausgewählt, um eine erfolgreiche Isolation des Transferrin Rezeptors 1 durch das Biotin-Tf-SDAD-Konjugat zu gewährleisten.

Bei der ersten Analyse von Zelllysaten stellte sich heraus, dass auch in unbehandelten Proben Biotin-haltige Banden in den Western Blots detektiert wurden. Andere Autoren beschreiben eine Störung ihrer Experimente durch endogene Biotin-haltigen Proteine bei der Verwendung von Streptavidin in der Immunohistochemie [271], *in-situ* Hybridisierung und Western Blotting [272, 273]. Vergleichbar mit meinen Experimenten wurden jeweils mindestens drei Biotin-haltige Proteine mit Molekulargewichten von circa 74 kDa, 80 kDa und 125 kDa detektiert. Diese Molekulargewichte passen jeweils zu Biotin-haltigen Carboxylasen, in denen das Biotin während des Transfers von CO₂

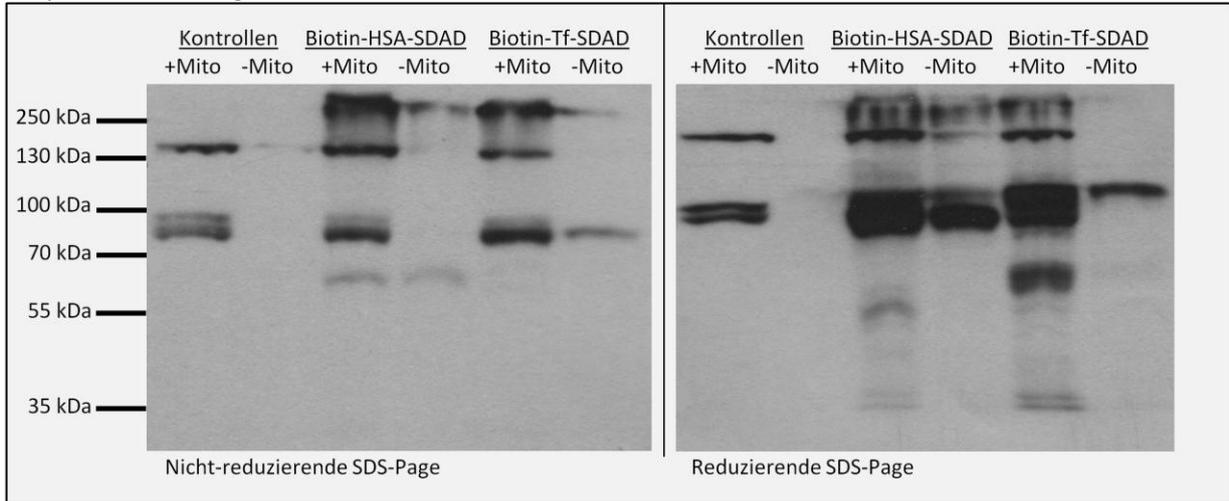
für die Bindung der Carboxylgruppe essentiell ist [273]. Wahrscheinlich handelt es sich bei den im Western Blot detektierten Proteinen somit um Propionyl CoA- (74 kDa), Methylcrotonyl CoA- (80 kDa) und Pyruvat CoA (125 kDa) Carboxylase [272, 273]. Offensichtlich stören diese Proteine die Detektion des Biotin-HSA-SDAD (69 kDa) und des Biotin-Tf-SDAD (82 kDa) sowie die Detektion von Biotin-Protein-SDAD-Zielproteinkonjugaten nach der UV-Belichtung, letzteres wird zusätzlich durch die Acetyl CoA Carboxylase (220 kDa), welche ebenfalls ein kovalent gebundenes Biotin enthält [273], gestört. Von anderen Autoren publizierte Lösungsansätze, die vor der Inkubation mit den biotin-konjugierten Antikörpern eine Inkubation der Membranen mit Streptavidin und ein nachfolgendes Blocken der Streptavidin-Bindungsstellen mit Biotin empfehlen [273], konnte für die Detektion meiner biotin-konjugierten Proteine auf der Membran offensichtlich nicht angewendet werden. Allerdings sind Propionyl CoA Carboxylase, Methylcrotonyl CoA Carboxylase und Pyruvat CoA Carboxylase hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert [274], weswegen bei der Herstellung der Zelllysate ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (11.000g, 40 min, 4° C) zur Entfernung Mitochondrien eingeführt wurde [275].

Abbildung 6-18 B zeigt die mit Streptavidin-HRP detektierten Banden in den unterschiedlichen Zelllysaten. Für jedes Konjugat (Biotin-HSA-SDAD, Biotin-Tf-SDAD) sowie für die ohne Konjugat inkubierten Kontrollen wurde jeweils eine Hälfte der Zellen direkt lysiert während bei der anderen Hälfte der oben erwähnte Zentrifugationsschritt zur Entfernung der Mitochondrien eingesetzt wurde. Die Proben werden in der Darstellung als +Mito bzw. -Mito bezeichnet. Zusätzlich wurde in diesem Versuch die Anwesenheit von „hochmolekularen“ Konjugaten überprüft. Die Inkubation der Zellen mit den Konjugaten und die nachfolgende UV-induziertes Crosslinking sollte zu einer kovalenten Verknüpfung der Konjugate mit Albumin-bindenden Proteinen (Biotin-HSA-SDAD) bzw. mit dem Transferrinrezeptor (Biotin-Tf-SDAD) führen. In einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE sind diese „hochmolekularen“ Zielproteinkonjugate (>MW der Ausgangskonjugate) aufgrund ihres Molekulargewichtes oberhalb der Ausgangskonjugate zu finden. In einer reduzierenden SDS-PAGE hingegen werden die Zielproteinkonjugate aufgrund der eingebauten SS-Brücke gespalten, und zwar in den Biotin-Protein-SDAD- und den eigentlichen Zielprotein- Molekülteil. In der reduzierenden SDS-PAGE sind folglich nur die ursprünglichen Ausgangskonjugate durch das Streptavidin-HRP detektierbar. Für eine bessere Übersicht zeigt Abbildung 6-18 A die theoretische Bandenverteilung. In Abbildung 6-18 C ist der Blot der nicht-reduzierenden SDS-PAGE nach einer längeren Belichtungszeit der photosensitiven Filme zu sehen, um die schwach entwickelte Banden aus Abbildung 6-18 B deutlicher sichtbar zu machen.

A Theoretische Bandenverteilung



B Experimentelle Ergebnisse



C Nicht-reduzierende SDS-PAGE mit längerer Belichtungszeit

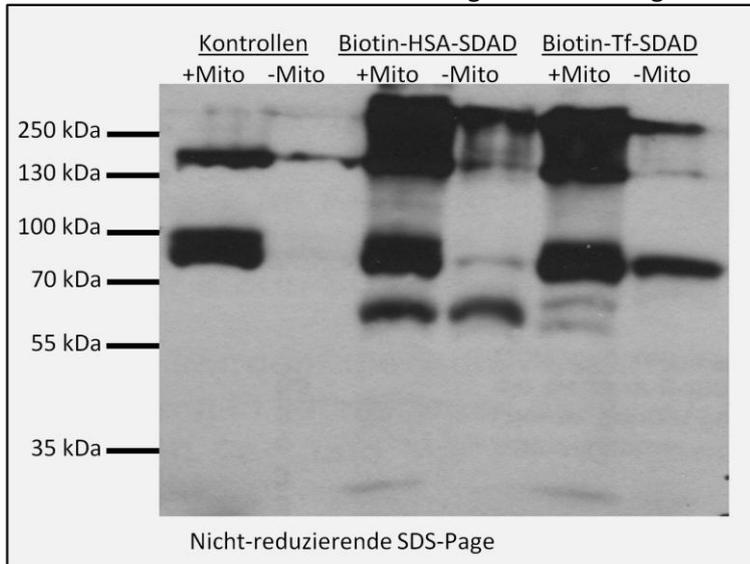


ABBILDUNG 6-18

BIOTIN-HALTIGE BANDEN IN DEN ZELLYSATEN

In den Lysaten der Kontrollzellen sind drei Banden mit endogenen Biotin-haltigen Enzymen deutlich zu erkennen. Wie bereits oben erwähnt, handelt es sich hier vermutlich um die Propionyl CoA Carboxylase (74 kDa), Methylcrotonyl CoA Carboxylase (80 kDa) und um die Pyruvat CoA Carboxylase (125 kDa). Ebenso wird deutlich, dass gerade die Propionyl CoA Carboxylase und die Methylcrotonyl CoA Carboxylase im selben Molekularbereich wie Biotin-HSA-SDAD (MW ca. 69 kDa) und Biotin-Tf-SDAD (MW ca. 82 kDa) detektiert werden. Ein Vergleich der Mitochondrien-freien und Mitochondrien-haltigen Lysate zeigt, dass der eingeführte Zentrifugationsschritt vor der eigentlichen Lyse die endogenen Biotin-haltigen Enzyme nahezu quantitativ entfernt. Anders als erwartet wird allerdings durch die verwendete Methode auch ein großer Anteil der Biotin-Protein-SDAD-Zielprotein-Konjugate entfernt, welche im Vergleich ebenfalls ein stark reduziertes Signal zeigen. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass auch größere Zellbruchstücke mit den Mitochondrien während der Zentrifugation pelletiert werden. Es ist bekannt, dass eine differentielle Zentrifugation zur Auftrennung der einzelnen Organellen der Zelle zunächst einmal langwierig ist und ausserdem häufig nur eine geringe Ausbeute erzielt. Oft wird ein großer Teil der Plasmamembranen in den ersten Schritten der Zentrifugation verloren [266]. Obwohl also ein großer Anteil der Proteinkonjugat-Zielprotein-Konjugate durch den Zentrifugationsschritt, der die endogenen Biotin-haltigen Enzyme aus dem Lysat entfernt, augenscheinlich ebenfalls abgetrennt wird, zeigt Abbildung 6-18 C durch die längere Belichtungszeit auch in den Mitochondrien-freien Lysaten noch klar detektierbare und deutlich zu erkennende hochmolekulare, Biotin-haltige Banden.

Bei beiden Konjugaten sind ohne die Entfernung der Mitochondrien zudem eine Reihe von kleineren Biotin-haltigen Banden sichtbar, die allerdings nicht in den Kontrollen erscheinen. Da ein ähnliches Phänomen auch in dem oben beschriebenen Versuch zur Detektierbarkeit des Biotins in den Konjugaten nach der Synthese (siehe 6.3.2) auftrat, sind diese vermutlich durch Verunreinigungen, die während der Synthese entstanden oder in den Ausgangssubstanzen *per se* vorhanden waren, bedingt. Das Verschwinden dieser Banden in den Mitochondrien-freien Lysaten ist somit nur eine Frage der Verdünnung bzw. Verstärkung, bei längerer Belichtungszeit tauchten diese Banden hier ebenso auf.

In der reduzierenden SDS-PAGE treten die Biotin-haltigen Banden sehr viel stärker in Erscheinung als in der nicht-reduzierenden SDS-PAGE. Dieses Phänomen war grundsätzlich bei dem Vergleich von reduzierender und nicht-reduzierender SDS-PAGE zu beobachten. Für die Biotin-Protein-SDAD-Zielproteinkonjugate entspricht dies den Erwartungen, da eine Zugabe von DTT die Disulfid-Brücke zwischen den Ausgangskonjugaten und den angekoppelten Zielproteinen spaltet. Anders als in der nicht-reduzierenden SDS-PAGE, bei der sich das detektierbare Biotin-Signal auf einen geringen Anteil an Ausgangskonjugaten sowie den Biotin-Protein-Zielprotein-Konjugate verteilt, sind somit in der reduzierenden SDS-PAGE nur noch von den Zielproteinen abgespaltenes Biotin-HSA-SDAD und Biotin-Tf-SDAD vorhanden, die somit sehr viel prominenter in Erscheinung treten. Anders als erwartet sind allerdings auch die endogenen Biotin-haltigen Carboxylasen in der reduzierenden SDS-PAGE sehr viel deutlicher zu erkennen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine bessere Detektierbarkeit von Biotin-Tags nach Aufspaltung der Disulfid-Brücken in den Proteinen.

In dem Blot der nicht-reduzierenden SDS-PAGE sind die hochmolekularen (ca 200 kDa und mehr) Biotin-Protein-SDAD-Zielproteinkonjugate deutlich in den mit Biotin-HSA-SDAD und Biotin-Tf-SDAD inkubierten Zellen zu erkennen, treten dagegen wie erwartet in den Kontrollzellen nicht in Erscheinung. Im Falle des Biotin-Tf-SDAD liegt das erwartete Molekulargewicht bei circa 270 kDa

bzw. bei ca 350 kDa, da der Transferrinrezeptor, ein über Disulfid-Brücken verknüpftes Homodimer, ein Molekulargewicht von 190 kDa besitzt und bis zu zwei Transferrinmoleküle binden kann [276]. Die hier detektierten Banden liegen folglich im erwarteten Bereich des SDS-PAGE Gels. Die hochmolekularen Banden der mit Biotin-HSA-SDAD inkubierten Zellen liegen in einem vergleichbaren Molekulargewichtsbereich. Ein Vergleich mit dem Western-Blot in 6.3.3 zeigt zudem, dass die hochmolekularen Banden nicht entstehen, wenn nur die Konjugate alleine belichtet werden. Deutlich wird jedoch für beide Konjugate, dass die hochmolekularen Anteile in den Zelllysaten nur schlecht auf dem Gel aufgetrennt werden. Dies kann zum einen an dem hohen Molekulargewicht liegen, auf der anderen Seite ist aber auch bekannt, dass Membranproteine sowohl unlösliche Aggregate bilden können, wenn sie im SDS-Probenpuffer erhitzt werden, aber sich ohne Erhitzen selbst in SDS in schlecht löslichen, großen Aggregaten befinden können, die ebenfalls nicht ins Gel eintreten [277].

Zusätzlich fällt bei den Lysaten, deren Mitochondrien entfernt wurden, auf, dass die Intensität der Ursprungskonjugate und der Zielproteinkonjugate auf dem Western Blot ungefähr vergleichbar ist. Durch die endogenen Biotin-haltigen Carboxylasen ist nicht zu erkennen, ob die Lysate ohne die Entfernung der Mitochondrien einen höheren Anteil an Zielproteinkonjugaten enthalten. Wahrscheinlich ist, dass ein nicht unbeträchtlicher Anteil an Zielproteinkonjugaten als membrangebundene Fraktion zusammen mit größeren Zellbruchstücken bei der Zentrifugation zur Entfernung der Mitochondrien mit entfernt wurde. Nichtsdestotrotz ist auch nach den Waschschritten noch nicht-gecrosslinkte Ausgangskonjugate deutlich nachweisbar. Diese könnten entweder aus sich noch auf den Zellen befindenden Flüssigkeitsreste vor der Lyse stammen, oder sich aufgrund einer nicht-kovalente Bindung an die Zellmembran noch in den Lysaten befinden. Der Versuch zu extrazellulären Bindung und UV-induziertem Crosslinking der Konjugate (siehe 6.3.4) zeigte, dass auch ohne UV-Belichtung ein gewisser Anteil der Konjugate auf der Zellmembran nachweisbar war, was insbesondere im Falle der Transferrinkonjugate für die starke Interaktion mit dem Transferrinrezeptor spricht. Eventuell kann sie jedoch auch durch die höhere Hydrophobizität der Proteine aufgrund des ankonjugierten Biotin-Tags entstanden sein [255]. Wie nach der Spaltung der Disulfid-Brücken im Konjugat zu erwarten, sind die Biotin-Protein-SDAD-Zielprotein-Konjugate in der reduzierenden SDS-PAGE nur noch sehr schwach zu sehen. Die DTT-induzierte Spaltung der kovalenten Verknüpfung war somit erfolgreich. Dies ist insbesondere für den nächsten Schritt, bei dem die Biotin-Protein-SDAD-Zielproteinkonjugate mit Streptavidin-Agarose aufgereinigt und im Anschluss die Zielproteine durch DTT abgespalten werden sollen, wichtig.

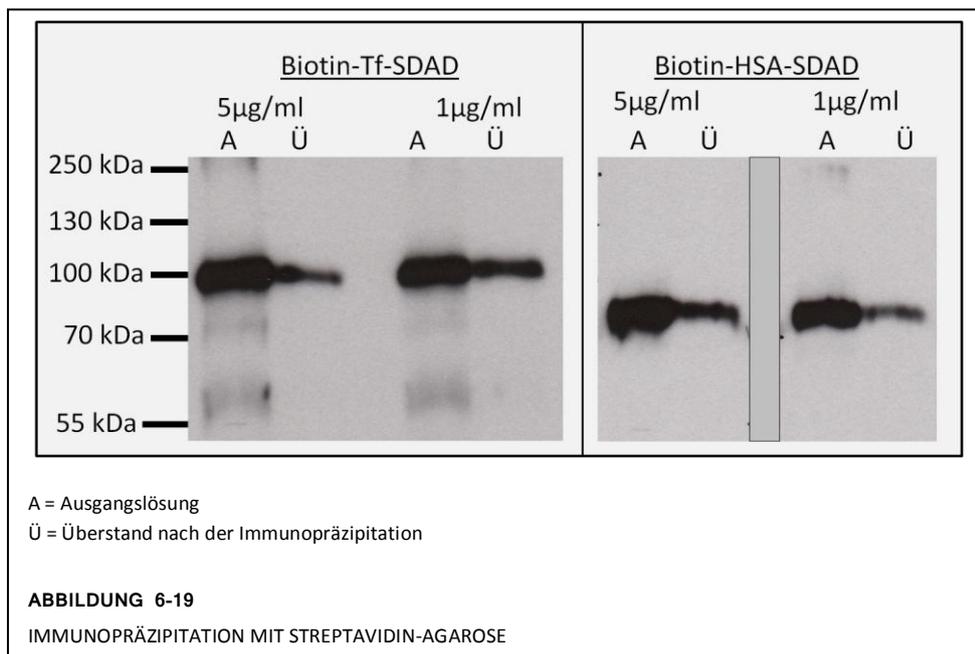
Insgesamt war die Entfernung der Mitochondrien und damit der endogenen Biotin-haltigen Carboxylasen aus den Konjugaten zwar erfolgreich, gleichzeitig scheint sie aber zu einem Verlust der Ausbeute an Zielprotein-Konjugaten zu führen. Natürlich ist auf der einen Seite die Detektion von Biotin-haltigen Banden mit Streptavidin-HRP abhängig von der eingesetzten Menge an Lysat und der gewählten Belichtungszeit der photosensiblen Filme, so dass eine längere Belichtung und eine höhere eingesetzte Menge an Lysat auch die Biotin-Protein-SDAD Konjugate bzw. Biotin-Protein-SDAD-Membranprotein Konjugate wieder deutlich sichtbar macht, aber dennoch könnte die so reduzierte Ausbeute die spätere Aufreinigung und Detektion der Zielproteine erschweren.

6.3.6 Immunopräzipitation mit Streptavidin-Agarose

Zur Etablierung der Immunopräzipitation wurde zunächst die Bindung der Ausgangskonjugate an Streptavidin-Agarose überprüft. Hierzu wurden von beiden Konjugaten zwei verschiedene

Konzentrationen (ca 5 µg/ml und 1 µg/ml) zu einer identischen Menge an Streptavidin-Agarose hinzugegeben, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, und der im Überstand verbleibende Anteil an Ausgangskonjugaten im Western Blot durch Streptavidin-HRP nachgewiesen. Der zur Inkubation verwendete Binding Buffer bestand aus PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺), Protease-Inhibitor, sowie den Detergentien Triton-X 100 und SDS, um deren Einfluss auf die Bindung des Biotin-Tags der Ausgangs- und Zielproteinkonjugate an die Streptavidin-Agarose zu untersuchen. Vor dem Auftragen der Überstandslösungen auf das SDS-Gel wurden die höher konzentrierten Lösungen 1:4 verdünnt, um die in der Lösung verbliebenen Mengen an Ausgangskonjugat direkt vergleichen zu können.

Die nachfolgende Abbildung 6-19 zeigt den Vergleich der Konjugatlösungen vor (A) und nach (Ü) der Zugabe zu Streptavidin-Agarose für beide Konjugate und jeweils zwei Konzentrationen in der Ausgangslösung.

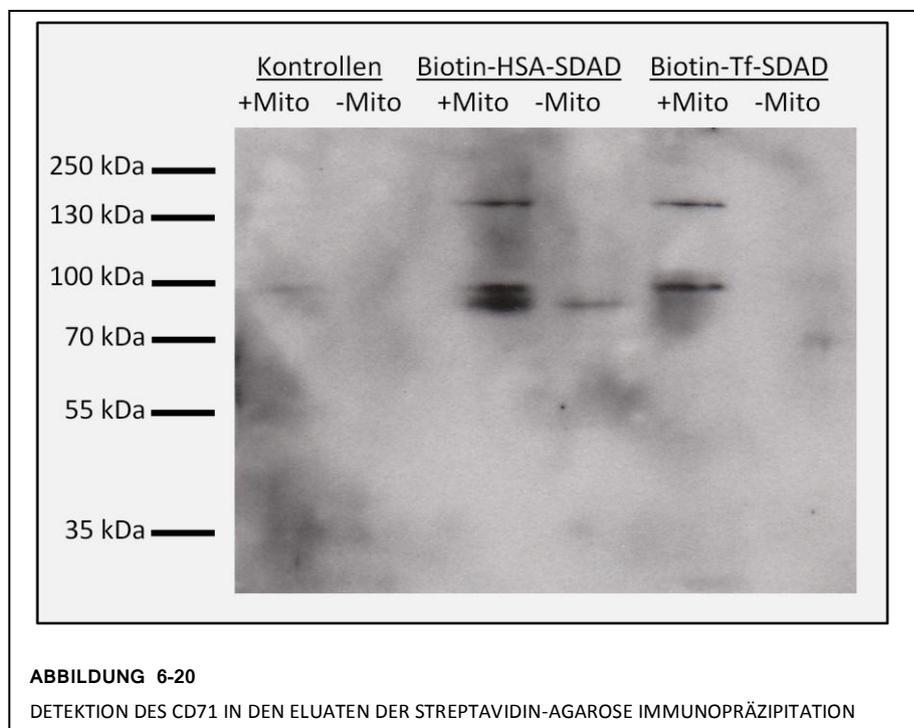


Die Abbildung zeigt deutlich, dass sich die Menge an detektierbarem Biotin in den Konjugatlösungen nach der Inkubation mit Streptavidin-Agarose deutlich verringert hat. Dies gilt jeweils für beide untersuchte Konzentrationen. Die Ausgangskonjugate Biotin-Transferrin-SDAD und Biotin-HSA-SDAD binden unter den oben angegebenen Bedingungen folglich an Streptavidin-Agarose. Zielproteinkonjugate, die durch die Inkubation der A549 Zellen mit den Konjugaten und der nachfolgenden Belichtung entstanden sind, können somit durch Immunopräzipitation mit Streptavidin-Agarose aus den Zelllysaten isoliert und aufgereinigt werden. Da die eigentlichen Zielproteine zudem über eine SS-Brücke mit den Ausgangskonjugaten verbunden sind, sollten sie nach der Aufreinigung mit DTT abgespalten werden können. Die Spaltbarkeit der Zielproteinkonjugate wurde in 6.3.5 bereits überprüft. Abgespaltene Zielproteine wiederum sollen in einem nächsten Schritt über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Da im Falle des Transferrin-Konjugats das Zielprotein bereits feststeht – der Transferrinrezeptor 1 (CD71), kann hier zusätzlich die Anwesenheit von CD71 durch Western Blotting und Inkubation mit anti-CD71 nachgewiesen werden.

6.3.7 Detektion des Transferrinrezeptors 1 (CD71)

Nachdem alle experimentellen Schritte überprüft wurden, also die Konjugation des Biotin-Tags an die Proteine und dessen Integrität nach der UV-Belichtung, die extrazelluläre Bindung der Ausgangskonjugate Biotin-Tf-SDAD und Biotin-HSA-SDAD und das UV-induzierte Crosslinking der Ausgangskonjugate an die Zellmembran, die Anwesenheit von Zielproteinkonjugaten in den Lysaten und deren Spaltbarkeit mit DTT sowie die Immunopräzipitation mit Streptavidin-Agarose, wurden alle Schritte zusammengeführt. A549 Zellen wurden mit den Ausgangskonjugaten inkubiert, gewaschen, UV-belichtet und lysiert, wobei wegen der geringen Ausbeute an Zielproteinkonjugaten in den Mitochondrien-freien Lysaten jeweils eine Probe mit Mitochondrien und eine ohne Mitochondrien hergestellt wurde. Die Lysate wurden mit Streptavidin-Agarose inkubiert, die Agarose-Beads zehn Mal mit Binding Buffer gewaschen und die SS-Brücke zwischen den Ausgangskonjugaten und den Ziellproteinen durch die Zugabe von 50mM DTT für 30 min bei Raumtemperatur gespalten. Die so entstandene Lösung mit den abgespaltenen Zielproteinen wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt, wobei identische Proben auf zwei SDS-Gelen aufgetragen wurden. Ein Gel wurde mit MS-kompatibler Silberfärbung angefärbt, das andere auf Nitrozellulose übertragen und mit anti-CD71 sowie dem korrespondierenden HRP-konjugierten sekundären Antikörper behandelt. Letzteres erfolgte zunächst mit einem biotin-konjugierten anti-CD71 und Streptavidin-HRP, in einem zweiten Versuch wurde stattdessen ein monoklonaler Kaninchenantikörper gegen CD71 und ein HRP-konjugierter Ziege gegen Kaninchen Sekundärantikörper verwendet.

Die nachfolgende Abbildung 6-20 zeigt den Western Blot nach Inkubation mit dem biotinylierten anti-CD71 und der nachfolgenden Inkubation mit Streptavidin-HRP.



Leider zeigten hier alle Versuche ein negatives Ergebnis. In den silbergefärbten Gele zeigten die mit den Konjugaten inkubierten und mit Streptavidin-Agarose präzipitierten Zelllysate keine zusätzlichen oder intensiveren Banden als die ohne Konjugate inkubierten und ansonsten parallel behandelten

Kontrollen. Der Western Blot, der mit biotin-konjugiertem anti-CD71 und Streptavidin-HRP inkubiert worden war, zeigte nur schwache Banden der Biotin-haltigen Carboxylasen, sowohl in den Kontrollen als auch in den mit den Konjugaten inkubierten Zellen (s. Abbildung 6-20). Bei den mit Biotin-HSA-SDAD inkubierten Zellen sind zudem noch schwache Reste des Ausgangskonjugats sichtbar. Aus diesem Grund wurde der Versuch wiederholt und ein unkonjugierter anti-CD71 mit korrespondierendem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper eingesetzt, aber in diesem Fall zeigten sich keine Banden auf dem photosensiblen Film.

Die verbleibenden Biotin-haltigen Carboxylasen zeigen, dass trotz des intensiven Waschens der Streptavidin-Agarose noch Reste der ursprünglichen Lysate in der mit DTT abgespaltenen Zielproteinlösung vorhanden waren. Auch in den Silbergelen sind diese Lysatrückstände nachweisbar, da alle Proben ein vergleichbares Muster an silbergefärbten Proteinbanden aufwiesen. Diese Proteinbanden waren insgesamt zwar nur schwach ausgeprägt, es zeigten sich aber keine zusätzlichen Banden, die auf ein erfolgreiches Aufreinigen und Abspalten von Zielproteinen wie den CD71 hinweisen. Ein Ausschneiden einzelner Banden und die Analyse durch MALDI-TOF MS war demzufolge nicht sinnvoll. Auch im Western Blotting konnte der CD71 nicht in den mit Biotin-Transferrin-SDAD-Konjugat inkubierten Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte auf der einen Seite durch einen nicht-funktionierenden primären oder sekundären Antikörper verursacht worden sein, aber für eine Wiederholung des Experimentes fehlte die Zeit. Ein nächster Schritt wäre die Titrierung der Antikörper, also die Bestimmung der zu verwendenden Konzentration, mit durch SDS-PAGE aufgetrennten Gesamtlysaten der A549 Zellen gewesen, sowie eine Wiederholung des Versuchs, bei der auf der SDS-PAGE eine Probe mit A549-Gesamtlysat als Kontrolle mitläuft. Zusätzlich müsste das Waschen der Streptavidin-Agarose noch stringenter erfolgen, um Reste der ursprünglichen Lysate wirklich vollständig zu entfernen.

Unabhängig von diesen nächsten (und nicht mehr durchgeführten) Experimenten stellt sich die Frage, ob die fehlende Detektion eines Zielproteins im Silbergel bzw. die fehlende Detektion von CD71 im Western Blot durch eine andere Versuchsanordnung behoben werden könnte. Anders gefragt: hat die Detektion nicht funktioniert oder befanden sich die Zielproteine in Mengen unterhalb der Nachweisgrenze im Lysat oder funktioniert das hier vorgestellte Konzept der Isolation von HSA- bzw. Transferrin-bindenden Membranproteinen aufgrund einer mangelnden Interaktion der Konjugate mit ihren Zielproteinen nicht oder gibt es *per se* keine Zielproteine für HSA und Transferrin, die so isoliert werden könnten?

Die Theorie, dass die Detektion nicht funktioniert hat, ist zumindestens im Hinblick auf die silbergefärbten Gele nicht valide, da sich zumindestens unspezifische Proteinbanden anfärben ließen. Diese waren sehr schwach ausgeprägt, so dass eine prominente, durch die Aufreinigung mit Streptavidin-Agarose isolierte Bande durchaus sichtbar gewesen wäre. Inwieweit eine sehr geringe Menge an Zielproteinen durch die unspezifischen Banden überdeckt wurde, lässt sich jedoch nicht sagen. Die Detektion mit dem anti-CD71 Antikörper wiederum wurde zwar so von mir nicht überprüft, allerdings wurde er in der höchsten vom Hersteller für initiale Versuche empfohlenen Konzentration (1:1000) eingesetzt und vom Hersteller zur Detektion von CD71 in A549 Zelllysaten durch Western Blotting empfohlen. Auch die Theorie, dass es keine Zielproteine gibt, die hier nachgewiesen werden können, ist offensichtlich zumindestens für Transferrin falsch. Inwieweit HSA hingegen Albumin-bindende Proteine als Interaktionspartner auf der Plasmamembran der A549 Zellen hat, ist unklar. Nichtsdestotrotz wurde aus genau diesem Grund diese Versuchsreihe so

konzipiert, dass das Transferrin-Konjugat als Kontrolle für die erfolgreiche Isolation eines Zielproteins dient. Wie bereits vorne erwähnt, ist die Isolation von Membranproteinen nicht trivial und das eingesetzte Detergenz sowie dessen Konzentration müssen individuell ermittelt werden [265]. Für Transferrin bzw. für den Transferrinrezeptor 1 wurde jedoch bereits eine erfolgreiche Isolation mit Triton-X 100 beschrieben [268], weswegen dieses hier zur Isolation der Zielproteinkonjugate eingesetzt wurde. Inwieweit ein anderes Detergenz oder eine andere Detergenz-Mischung eine bessere Ausbeute bei der Isolation zeigen würde, müsste in nachfolgenden Experimenten geklärt werden, auch um die Abwesenheit von Albumin-bindenden Proteinen definitiv auszuschließen.

Im Anbetracht der Tatsache, dass die experimentelle Abfolge Schritt für Schritt überprüft wurde, halte ich auch die Theorie, dass das Gesamtkonzept wie es hier vorgestellt wurde, *per se* nicht funktioniert, für falsch. Allerdings fand ich bei meiner Literaturrecherche im Anschluss an den experimentellen Teil meiner Doktorarbeit eine Veröffentlichung, die eine Störung der Biotin-Streptavidin Interaktion durch Zucker beschreibt [278]. Dies gilt insbesondere für Mannose, in geringerem Ausmaß allerdings auch für Glucose, Fructose und Saccharose. Die Autoren zeigen, dass sich die Bindung von alkalischer-Phosphatase-konjugiertem Streptavidin an biotinyliertes HSA bei 100 mM und 1 M Saccharose im Puffer auf ca. ein Drittel reduziert. Unglücklicherweise enthielt der von mir zur Entfernung der Mitochondrien verwendete SC-Puffer 250 mM Saccharose, da das Ursprungsprotokoll weitere Schritte zur subzellularen Fraktionierung vorsah [183]. Die Saccharose diente hier zu Stabilisierung der lysosomalen Membranen um ein Austreten von Proteasen zu verhindern. Die Bindung der Ausgangskonjugate an Streptavidin-Agarose wurde zwar von mir überprüft (siehe 6.3.6), allerdings nur im Hinblick auf die eingesetzten Detergentien, nicht hinsichtlich der dem SC-Puffer zugesetzten Sucrose. Wahrscheinlich führte die Anwesenheit von Sucrose in dem für die Immunopräzipitation eingesetzten Binding Buffer somit zu einer Störung der Biotin-Streptavidin Interaktion und folglich zu einer unvollständigen Extraktion der Zielproteinkonjugate aus den Lysaten. Eine Wiederholung der Experimente war mir jedoch zeitlich nicht möglich. Die Theorie, dass sich die Zielproteine, also der CD71 für Transferrin und potentielle Albumin-bindende Proteine für HSA, in Mengen unterhalb der Nachweisgrenze in der analysierten Lösung befanden, bedingt durch eine unvollständige Extraktion aus den Lysaten, halte ich demzufolge für die wahrscheinlichste Erklärung.

6.3.8 Zusammenfassende Diskussion zur Isolation von membranständigen ABPs

Die Synthese der beiden Ausgangskonjugate Biotin-Tf-SDAD und Biotin-HSA-SDAD war erfolgreich. Es wurden durchschnittlich 9 bzw. 6 Moleküle Biotin an Tf bzw. an HSA konjugiert, das Biotin-Tag war zudem auch unter UV-Belichtung stabil und konnte durch einen Western-Blot und Streptavidin-HRP nachgewiesen werden. Die Konjugate enthielten keine hochmolekularen Anteile und konjugierten auch unter UV-Belichtung nicht mit sich selbst, zeigten aber geringe Verunreinigungen im niedermolekularen Bereich. Die Aufreinigung der so synthetisierten Konjugate über eine Ultrafiltrationseinheit mit einem höheren MW-Cut-Off als den verwendeten (10 kDa) könnte diese beseitigen, eventuell wäre auch die Aufreinigung der Ausgangssubstanzen vor der Synthese sinnvoll gewesen.

Die Konjugate banden extrazellulär an die Plasmamembran der Zellen, die mit ihnen inkubiert wurden, was durch einen Vergleich der Biotin-Markierung von trypsinisierten und nicht-trypsinisierten Zellen im FACS nachgewiesen werden konnte. Das UV-induzierte Crosslinking der Konjugate an

Proteine der Plasmamembran war ebenfalls erfolgreich, was der Vergleich der Biotin-Markierung von belichteten und unbelichteten Zellen zeigte. Bei der Herstellung von Zellysaten aus inkubierten und UV-belichteten Zellen stellte sich jedoch heraus, dass endogene Biotin-haltige Enzyme, wahrscheinlich die Propionyl CoA Carboxylase (74 kDa), die Methylcrotonyl Co A Carboxylase (80 kDa) und die Pyruvat Co A Carboxylase (125 kDa), den Nachweis der Zielproteinkonjugate, also der durch das Crosslinking der Ausgangskonjugate an ihre Zielproteine auf der Plasmamembran entstandene Konstrukte, stören. Dies wurde auch von anderen Autoren bereits beschrieben [272, 273]. Aus diesem Grund wurde eine Methode zur Entfernung der Mitochondrien, der Hauptlokalisierung der endogenen Biotin-haltigen Enzyme in der Zelle, etabliert. Dieser Schritt war zwar erfolgreich, führte aber gleichzeitig zu einem Ausbeuteverlust an Zielproteinkonjugaten, was bei einem Vergleich von Mitochondrien-freien und Mitochondrien-haltigen Lysaten im Western Blotting deutlich wurde. Das erfolgreiche Crosslinking zeigte sich zudem durch die Anwesenheit von hochmolekularen Konjugaten im Western-Blotting, welche zudem durch die Zugabe von DTT zum Probenpuffer gespalten werden konnten. Durch die SS-Brücke im verwendeten SDAD-Crosslinker konnten so die eigentlichen Zielproteine wieder von den Ausgangskonjugaten abgespalten werden. Die Bindung der Ausgangskonjugate an Streptavidin-Agarose war auch in Anwesenheit der verwendeten Detergentien erfolgreich.

Zur Funktionskontrolle der gesamten Versuchsreihe sollte dann in einem nächsten Schritt das Zielprotein des Biotin-Tf-SDAD, der Transferrinrezeptor 1 (CD71), in den aus mit Biotin-Tf-SDAD inkubierten Zellen hergestellten Lysaten isoliert werden, nachdem die Zielproteinkonjugate aus diesen durch eine Immunopräzipitation mit Streptavidin-Agarose aufgereinigt und durch die Abspaltung mit DTT isoliert worden waren. Gleichzeitig sollten die so isolierten Zielproteine über SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine MS-kompatible Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Leider konnte der CD71 nicht nachgewiesen werden. Auch die Silbergele zeigten keine definierten Proteinbanden, die für die entweder mit Biotin-HSA-SDAD oder mit Biotin-Tf-SDAD bzw. ohne Ausgangskonjugate (Kontrollen) inkubierten Zellen charakteristisch waren. Eine Erklärung für diese Tatsache, insbesondere da die einzelnen experimentellen Schritte der Versuchsreihe vorher einzeln überprüft worden waren, ist wahrscheinlich eine Kombination aus geringer Ausbeute und der Tatsache, dass der Binding Buffer für die Immunopräzipitation mit Streptavidin Sucrose enthielt. Da Zucker die Bindung von Biotin an Streptavidin stören können [278], führte dies wahrscheinlich zu einer verringerten Interaktion der Zielproteinkonjugate mit der Streptavidin-Agarose. Der endgültige Nachweis, dass das hier vorgestellte Protokoll somit erfolgreich Interaktionspartner eines Proteins aus der Zellmembran einer untersuchten Zelllinie isolieren kann, fehlt somit. Eigentlich wäre eine Wiederholung mit größerer Zellzahlen, um eine größere Ausbeute an Zielproteinkonjugaten zu erreichen, und eine Optimierung der Immunopräzipitation hinsichtlich des Binding Buffers angezeigt, um nach einer SDS-PAGE in einem silbergefärbten Gel einzelne Banden ausschneiden und mit MALDI-TOF MS analysieren zu können. Für Biotin-Tf-SDAD ist das Zielprotein klar definiert und sollte auch unter den für die Lyse verwendeten Bedingungen, insbesondere hinsichtlich der verwendeten Detergentien, isoliert werden können. Triton-X 100 wurde bereits von anderen Autoren zur Isolation des CD71 verwendet [268]. Die Isolation von Membranproteinen ist jedoch nicht trivial, so ist das richtige Detergenz für jedes Membranprotein unterschiedlich und muss empirisch bestimmt werden [265]. Zudem sind die meisten Membranproteine nur in geringen Mengen in der Zelle vorhanden und manchmal nur für eine kurze Zeit innerhalb des Zellzyklus. Insgesamt finden sich in der Literatur viele Beispiele für sich widersprechende Ergebnisse hinsichtlich der Aufreinigung und Charakterisierung von Membranproteinen [264]. Da für HSA im Gegensatz zu Transferrin das oder die eigentlichen

Zielproteine nicht definiert sind, sollte zur Identifizierung von Albumin-bindenden Proteinen auf der Plasmamembran die hier vorgestellte Methode also mehrmals und unter Verwendung von unterschiedlichen Detergentien durchgeführt werden, um eine erfolgreiche Isolation sicherzustellen. Ein Vergleich der mit Biotin-Tf-SDAD und Biotin-HSA-SDAD isolierten Bindungspartner sollte zudem erfolgen, um unspezifisch isolierte Proteine auszuschließen. MALDI-TOF MS ist eine sehr sensitive Methode zur Charakterisierung einzelner isolierter Proteine, weswegen eine ausreichende Menge an Kontrollen nötig sind. Wie bereits im ersten Teil der Arbeit anhand der Ergebnisse von T. Fritzsche dargestellt, können auch geringe Verunreinigungen der analysierten Proteinlösungen die Identifikation eines neuen Bindungspartner vortäuschen. Auch in meinem Fall zeigte sich anhand der noch schwach sichtbaren unspezifischen Proteinbanden in den Silbergelen, dass trotz des stringenten Waschens noch Reste der ursprünglichen Lysate in der Zielproteinlösung nachweisbar waren. So gesehen wäre eine Identifikation von potentiellen Bindungspartnern für HSA durch MALDI-TOF MS Analyse nur ein erster Schritt, der vergleichbar zu den von mir durchgeführten Experimenten in Abschnitt 1 an lebenden Zellen weiter verifiziert werden muss. Insbesondere können die für die Aufreinigung und das Crosslinking eingeführten Modifikationen die Struktur der untersuchten Proteine verändern und somit auch unselektives Crosslinking fördern [257]. Im Hinblick auf die endogenen Biotin-haltigen Enzyme stellt sich die Frage, ob die Wahl von Biotin als Molekül zur spezifischen Aufreinigung der gecrosslinkten Proteine eine geschickte war, allerdings besitzt Biotin den Vorteil der hochaffinen und stabilen Interaktion mit Streptavidin – solange kein Zucker im verwendeten Puffer enthalten ist.

Auch der kommerziell erwerbliche Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Reagent benutzt Biotin als Tag zur spezifischen Aufreinigung und Identifizierung der isolierten Proteine. Dieser Crosslinker vereint die beiden separaten Konjugationsschritte meiner Methode in einem einzigen Molekül, das zudem durch eine andere Lokalisation der SS-Brücke in der Lage ist, das Biotin-Tag auf das Zielprotein zu übertragen. Bei meinen Versuchen mit dem SBED-Crosslinker stellte sich jedoch heraus, dass das Biotin-Tag ca eine Woche nach der Synthese nicht mehr nachweisbar war, was vermutlich an der Kombination von Biotin mit Azid als funktionellen Teil des Crosslinkers lag. So sollen Biotin-Lösungen nicht mit Azid konserviert werden, da dieses den Abbau von Biotin über einen unbekanntem Mechanismus beschleunigt [259]. Anders als Arylazide, welche den photoreaktiven Teil des Sulfo-SBED darstellen, scheinen Diazirine, welche ich als Crosslinker in meinen Konjugaten verwende, stabiler zu sein [256]. Die durchgeführten Versuche zur Stabilität des Biotin-Tags in Lösung und unter UV-Belichtung bestätigten die Integrität der von mir hergestellten Konjugate. Dennoch zeigt das Beispiel des Sulfo-SBED, dass das auch meiner Methode zugrundeliegende Konzept zur Isolation von Bindungspartnern einzelner Proteine aus der Zellmembran durchaus interessant ist. Frei et al. entwarfen einen Triceps-Crosslinker, ein Molekül mit einem Amin-reaktiven NHS-Ester zur Konjugation an das Ausgangsprotein und einer zusätzlichen Biotin-Gruppe zur Aufreinigung über Streptavidin. Das Crosslinking erfolgt über eine Aldehyd-reaktive Trifluoroacetyl-geschützte Hydrazin-Gruppe, die ohne weitere Entschützung unter neutralen Bedingungen reagiert, allerdings müssen die Aldehyd-Gruppen erst durch milde Oxidation der Zelloberflächenglykoproteine mit Metaperiodat hergestellt werden. Der Triceps-Crosslinker wurde von den Autoren unter anderem benutzt, um durch eine Konjugation an Transferrin den Transferrinrezeptor zu isolieren [279]. Freed et al. hingegen konjugieren nur Sulfo-NHS-LC-Biotin an das Ausgangsprotein und benutzen den chemischen Crosslinker DSP (Dithiobis(succinimidy-propionat)) zur Koppelung primärer Amine, in diesem Fall also der primären Amine des Liganden und des Interaktionspartners. Auch sie benutzten

Streptavidin zur Aufreinigung der so erhaltenen Konjugate und benutzten eine DTT-spaltbare Brücke im Crosslinker zur Abspaltung der Zielproteine. Die Charakterisierung erfolgte dann, wie auch von mir geplant, durch MALDI-TOF MS. Interessant ist hier auch, dass sie bei vier hintereinander durchgeführten Experimenten insgesamt 7 Proteine in vier Experimenten, 22 Proteine in drei von vier und 71 Proteine in jeweils 2 von vier Experimenten nachweisen konnten [280]. Dies zeigt, wie von Sinz et al. formuliert, dass das Crosslinking trotz des einfach wirkenden Ansatzes immer ein Versuch-und-Fehler Prozess für einen bestimmten Proteinkomplex war bzw. ist [281].

Wie erwähnt zeigen die auch von anderen Autoren publizierten Methoden zur Isolation von Bindungspartnern einzelner Proteine über Crosslinking der Interaktionspartner und Aufreinigung durch Biotin-Streptavidin, dass die von mir vorgestellte Methode durchaus auch für andere Proteine als HSA von Interesse ist. Zwar verlangt das Protokoll zwei nacheinander folgende Syntheseschritte, allerdings sind diese auch ohne großen experimentellen oder chemischen Aufwand durchführbar. Die Konjugate sind in Lösung stabil und erlauben so auch eine Charakterisierung der hergestellten Konstrukte und eine genaue Analyse der durchgeführten Experimente. Inwieweit die natürliche Interaktion der Proteine durch die Beladung mit zwei unterschiedlichen Liganden gestört wird, hängt sicherlich von dem jeweils untersuchten Protein ab und diese Problematik besteht offensichtlich nicht nur bei der von mir gewählten Methode, sondern bei allen Methoden, die die Struktur des Ausgangsproteins verändern. Nichtsdestotrotz war mir der endgültige Nachweis, dass das Protokoll zur Isolation einzelner Interaktionspartner aus der Zellmembran geeignet ist, nicht möglich. Auch das eigentliche Ziel, nämlich die Isolation und Charakterisierung von „neuen“ Albumin-bindenden Proteinen auf der Oberfläche von humanen Tumorzellen, gelang mir nicht.

Die Frage, inwieweit wirklich ein Rezeptor für HSA auf der Oberfläche von humanen Tumorzellen vorhanden ist und welchen Einfluss dieser schlussendlich auf die Entwicklung HSA-basierter Therapeutika in der Onkologie hätte, möchte ich im nächsten Abschnitt genauer diskutieren.

6.4 Abschließende Diskussion

Die zentrale Frage, die in dieser Doktorarbeit beantwortet werden sollte, lässt sich zusammengefasst so formulieren: Gibt es auf der Zellmembran von humanen Tumorzellen einen Rezeptor, der für die Aufnahme von Albumin über einen spezifischen Endozytose-Mechanismus verantwortlich ist? Meine Antwort auf diese Frage ist mehrteilig und, in einfachen Worten, folgende:

- a) Wahrscheinlich nicht.
- b) Ein gegenteiliger Beweis würde einen großen methodischen Aufwand bedeuten.
- c) Die so gewonnenen Daten wären immer noch nur bedingt aussagekräftig.
- d) Ein Nachweis eines spezifischen Albumin-internalisierenden Rezeptors auf Tumorzellen ist nicht nötig, um die Wirksamkeit von Albumin-basierten Therapeutika zu erklären.

Zunächst einmal: was spricht für die Existenz eines spezifischen Albumin-Rezeptors auf der Zellmembran von humanen Tumorzellen?

Bereits in den 1950er Jahren wurde ein erhöhter Abbau von Albumin bei Patienten mit progressiven malignen Erkrankungen festgestellt [48]. Stehle et al. postulierten 1997 auf der Basis von Versuchen mit radioaktiv markiertem Albumin in Ratten, dass der Tumor selbst der Ort des höchsten Albumin-Katabolismus im Körper darstelle und somit einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung der Kachexie und Hypoalbuminämie in Krebspatienten leiste. Albumin dient ihrer Theorie nach als Energie- und Stickstoffquelle für die stark proliferierenden Zellen des Tumors [50]. Unterstützt wird diese Theorie unter anderem durch die Tatsache, dass eine Hypoalbuminämie als negativer prognostischer Faktor für Patienten mit neu diagnostizierten unheilbaren Krebserkrankungen gilt und mit einem verkürzten Überleben assoziiert ist [45]. Interessant ist auch, dass Patienten mit einer aktiven rheumatoiden Arthritis häufig ebenfalls eine Kachexie entwickeln und reduzierte Serumkonzentrationen von Albumin zeigen [51-53]. Sowohl Tumorgewebe als auch chronisch-entzündliche Gewebe zeigen eine verstärkte Akkumulation von HSA, wie mit Hilfe von fluoreszenz- bzw. radioaktiv-markierten Konjugaten mehrfach gezeigt werden konnte [55, 104, 105, 195]. Auch in der Zellkultur wurde die Aufnahme und Wirksamkeit von Albumin-Konjugaten bereits mehrfach publiziert [198, 200]. In einem ersten Schritt auf der Suche nach einem spezifischen Rezeptor untersuchte T. Fritzsche in seiner Dissertation, die auch die Grundlage für diese Arbeit darstellt, verschiedene Zelllinien (CCRF-CEM, MCF7, MV3) und wies mehrere hnRNP-Proteine (hnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP B1, hnRNP A3, hnRNP C1) sowie Calreticulin als Albumin-bindende Proteine auf der Plasmamembran dieser Zellen nach [5]. Die Assoziation der von ihm identifizierten Proteine, insbesondere von hnRNP A2/B1 und Calreticulin, mit malignen Erkrankungen bzw. Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (vgl. auch 3.5 hnRNP A2/B1 und Calreticulin als Albumin-bindende Proteine) sind insbesondere wegen der Akkumulation von HSA in diesen Geweben (s.o.) sowie den für diese Erkrankungen durchgeführten klinischen Studien zur Therapie mit Albumin-Konjugaten [100-102, 282] bemerkenswert.

Warum bin ich trotzdem der Meinung, dass ein solcher universell auf der Zellmembran von Tumorzellen präsen- ter Rezeptor für die Albumin-Aufnahme nicht existiert?

Die Theorie von Stehle et al. zur Entstehung der Kachexie aufgrund eines hohen Albumin-Katabolismus des Tumors wird zwar immer wieder gerne zitiert, gerade auch im Zusammenhang mit dem postulierten Mechanismus der Tumoranreicherung von Abraxane (vgl auch 3.4.2.4 Albumin-Nanopartikel), allerdings sind seither keine weiteren, diese These untermauernden, Veröffentlichungen erschienen. Gegen die Theorie von Stehle et al. spricht hingegen, dass in der „acute phase“ - Reaktion, der Reaktion des Körpers auf ein größeres Trauma, auf Verbrennungen oder eine Infektion, die Konzentration an Albumin mRNA verringert ist, wahrscheinlich vermittelt durch hier freigesetzte Cytokine [41]. So wird die Gentranskription von humanem Serumalbumin durch TNF alpha inhibiert, was die Albumin mRNA um bis zu 90 % reduzieren kann [283]. Diese Theorie würde so nicht nur die Entstehung der Kachexie bei malignen Erkrankungen, sondern auch bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis erklären. Zusätzlich trägt die Umverteilung des Proteins in das Gewebe, verursacht durch eine verstärkte Extravasation aus den Blutgefäßen, wahrscheinlich ebenfalls zu der verringerten Konzentration von Albumin im Blutplasma bei [40]. Insgesamt wahrscheinlicher ist somit eine multifaktorielle Entstehung der Hypoalbuminämie in kachektischen Krebspatienten [284, 285]. Zudem basiert das von Stehle et al. entwickelte Modell auf Versuchen mit Ratten, bei denen die Turnover-Rate von Albumin im Vergleich zum Menschen höher und das Gewicht der Tumore im Vergleich zum Körpergewicht sehr viel größer ist, was demzufolge nur bedingt eine Aussage über den absoluten Beitrag eines soliden Tumors zum Albumin-Katabolismus bei Patienten zulässt [284, 285].

Unabhängig von dieser Diskussion über die Entstehung von Hypoalbuminämie in Krebspatienten ist die Akkumulation von Albumin im Gewebe von soliden Tumoren seit der Publikation von Stehle et al. noch mehrfach nachgewiesen worden (s.o.). Dennoch kann nicht allein von diesem Phänomen ausgehend ein Albumin-spezifischer Mechanismus postuliert werden. Der von Matsumara und Maeda entdeckte EPR-Effekt liefert eine Erklärung für die physikalische Akkumulation hochmolekularer Strukturen auf Basis der löchrigen Endothelwände und schlecht ausgebauten Lymphdrainage im Angio-System des Tumors (vgl auch 3.2.2) [17, 18]. So akkumulieren nicht nur Albumin, sondern zum Beispiel auch Polymerkonjugate [14] und andere hochmolekulare Strukturen. Allein die Akkumulation einer Substanz in einem bestimmten Gewebe beschreibt primär eine erhöhte Konzentration im untersuchten Gebiet. Dies bedeutet folglich nicht automatisch, dass die Anreicherung durch eine gesteigerte intrazelluläre Aufnahme in die einzelne Zelle des Gewebes hervorgerufen wird, sondern kann ebenso nur die Anreicherung im Interstitium des Gewebes beschreiben. Natürlich führt eine erhöhte Konzentration im Interstitium auch zu einer besseren Verfügbarkeit einer Substanz in dem Gewebe und in einem nächsten Schritt zu einer höheren zellulären Aufnahme. Der springende Punkt ist jedoch, dass alleine der EPR-Effekt bereits einen Mechanismus für die Akkumulation und in einem nächsten Schritt auch für eine verbesserte Wirksamkeit von hochmolekularen im Vergleich zu niedermolekularen Therapeutika liefert. Das verbesserte Targeting eines Nanotherapeutikums hängt somit einzig von dessen Größe ab und ist unabhängig von einem spezifischen Rezeptor. Inwieweit also ein Albumin-spezifischer Rezeptor einen merkbaren zusätzlichen Einfluss auf die Albumin-Akkumulation im Tumorgewebe zeigen würde, ist schwer abzuschätzen. Auch hier gilt, dass eine ähnliche Erklärung für die Akkumulation von HSA-Konjugaten in chronisch-entzündliche Geweben herangezogen werden kann, da das hier angrenzende Endothel ebenfalls durchlässiger ist und eine erhöhte Permeabilität für Proteine und Flüssigkeit aufweist [286].

Vergleichbar mit dem EPR-Effekt für die Akkumulation im Gewebe gibt es auch für die Aufnahme von Albumin-Konjugaten in verschiedene Zelllinien, wie sie bereits von anderen Autoren in der Zellkultur nachgewiesen wurde (s.o.), eine alternative Erklärung zu einem spezifischen Albumin-Rezeptor. Die Versuche wurden bisher mit sehr langen Inkubationszeiten von bis zu 48 h [200] durchgeführt. Nun wird jede Substanz, die im Medium gelöst ist, früher oder später über Fluid-Phase Endozytose in die Zelle aufgenommen. Eine Aussage über einen definierten Endozytose-Mechanismus, der über eine unspezifische Fluid-Phase Endozytose hinausgeht, erlauben die Experimente folglich nicht.

Die Daten der Dissertation von T. Fritzsche habe ich bereits in Abschnitt 6.1 diskutiert. Zusammenfassend sei gesagt, dass ich in meiner Arbeit die von ihm identifizierten Proteine hnRNP A2/B1 und Calreticulin nicht auf der Zellmembran der von ihm verwendeten CCRF-CEM Zellen nachweisen konnte. Meiner Ansicht nach basieren seine Ergebnisse auf einer unvollständigen Trennung seiner aufgereinigten Plasmamembranen von den übrigen Bestandteilen der untersuchten Zellen. Die Hauptlokalisierung von Calreticulin in der Zelle ist das Endoplasmatische Retikulum (ER) [152] und CRT wird in der subzellulären Fraktionierung als Markerprotein für das ER verwendet [287]. T. Fritzsche verwendete zugesetztes $MgCl_2$, um das ER auszufällen, was aber meiner Ansicht nach eine Kontamination seiner weiter verarbeiteten Lösung mit kleinen Mengen ER-Membran nicht ausschließt und was von ihm auch nicht weiter überprüft wurde. Calreticulin ist zwar auch schon auf der Oberfläche von Zellen, insbesondere Zellen in der frühen Apoptose, nachgewiesen worden [155], aber auch dieses Phänomen konnte ich für CCRF-CEM Zellen nicht bestätigen. hnRNP A2/B1 hingegen gehört zu den in Zellen am meisten vorkommenden Proteinen und ist hauptsächlich im Nucleus lokalisiert [138]. Obwohl T. Fritzsche die Verunreinigung mit nucleären Membranen überprüfte und hier zumindestens in den von ihm zur weiteren Analyse verwendeten Fraktionen keine detektieren konnte, schließt dies, meiner Ansicht nach, eine geringe Verunreinigung eben nicht aus. Bezeichnend ist, dass auch der mitochondriale Vorläufer der ATP-Synthase β -Untereinheit in seinen Fraktionen detektiert wurde, dieser aber in der Publikation [2] im Gegensatz zur Dissertation [5] nicht erwähnt wird. Da die Identifikation der Proteine über MALDI-TOF MS erfolgte, eine hochsensible Methode zur Charakterisierung der isolierten Proteine, sind somit auch kleinste Verunreinigungen detektierbar. hnRNP A2/B1 wurde zwar eine zeitlang als Marker für NSCLC diskutiert und von Zhou et al. mikroskopisch in Gewebeschnitten eine membrangebundene Lokalisation nachgewiesen [160], seitdem wurde dies jedoch nie wieder publiziert bzw. gilt hnRNP B1 mittlerweile als spezifischerer Marker für NSCLC [137]. Insgesamt konnte ich die Ergebnisse von T. Fritzsche folglich nicht verifizieren und bin der Ansicht, dass hnRNP A2/B1 und Calreticulin nicht auf der Oberfläche von CCRF-CEM Zellen exprimiert werden. Da auch die anderen Indizien, die für einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche von humanen Tumorzelllinien sprechen, ebenfalls durch alternative Mechanismen wie der Zytokin-induzierten verringerten Synthese von Albumin, dem EPR-Effekt und der Fluid-Phase Endozytose erklärt werden können, schließe ich somit, dass ebendieser Rezeptor wahrscheinlich nicht existiert.

Warum wäre ein gegenteiliger Nachweis mit einem so hohen methodischem Aufwand verbunden?

Ein gegenteiliger Nachweis würde sich in zwei Teile gliedern: einmal die Identifizierung eines spezifischen Endozytose-Mechanismus und in einem nächsten Schritt die Identifizierung des Albumin-transportierenden Rezeptors.

Wie meine Versuche und der Blick in die Literatur zeigen, ist die Untersuchung spezifischer Endozytose-Mechanismen ein weites und komplexes Feld. Die genaue Einteilung in verschiedene Mechanismen ist bisher nur vorläufig und noch lange nicht abgeschlossen [6]. Spezifische Inhibitoren und Marker sind sozusagen noch in der Entwicklung, die zugrundeliegenden Wirkmechanismen der Inhibitoren häufig nur bedingt bekannt. Gerade zum Thema „Endozytose von Albumin“ wird und wurde viel publiziert, das zum Teil einer genaueren Analyse nicht standhält (vgl auch 6.2.6). Problematisch ist die Anwendung von unspezifischen Inhibitoren, die Cytotoxizität gewisser Inhibitoren oder der Einsatz von Substanzen, die einen substantiellen Einfluss auf die generelle Zellphysiologie, das Aktin-Zytoskelett oder die Membranzusammensetzung haben wie zum Beispiel EIPA (ein Inhibitor des Na^+/H^+ -Ionenaustausches) oder Cholesterol-entfernende Substanzen wie Methyl- β -cyclodextrin [21]. Aber auch etablierte Inhibitoren der CME wie Chlorpromazin oder die Inkubation unter hypertonen Bedingungen können Auswirkungen auf die Morphologie und Viabilität der untersuchten Zellen haben. Vercauteren et al. zeigten, dass Chlorpromazin toxische Effekte aufweist, und dies selbst nach kurzen Inkubationszeiten und in für die Untersuchung der Endozytose verwendeten Konzentrationen. Zudem führte Chlorpromazin in den von den Autoren durchgeführten Versuchen bei zwei von vier verwendeten Zelltypen zwar zu einer Hemmung der Aufnahme von Transferrin, in einer Zelllinie hatte es jedoch keinen Effekt und in einer weiteren Zelllinie verstärkte Chlorpromazin die Aufnahme von Transferrin sogar. Zusätzlich verursachte es eine verstärkte Aufnahme des Lipid-Raft Liganden Lactosylceramid, in einem Fall sogar um 200 % [175]. Auch in meinen Experimenten konnte ich bei zwei verwendeten Techniken zur Inhibition der CME keinen Einfluss auf die Aufnahme von Transferrin feststellen, und in einem weiteren Fall war zwar eine starke Hemmung der Transferrin-Aufnahme zu beobachten, allerdings parallel dazu auch eine starke Hemmung der Fluid-Phase Endozytose von Dextran (vgl auch 6.2.6).

Dies zeigt, wie komplex das Feld der Endozytose-Mechanismen und ihrer Untersuchung wirklich ist, wenn man sich die Mühe macht, adäquate Kontrollen durchzuführen. Illustriert wird dies zum Beispiel auch durch die Tatsache, dass für die Caveolin-abhängige Endozytose lange Zeit ein alternatives intrazelluläres Trafficking postuliert wurde, welches in der Lage war, die Lysosomen und somit den Abbau der aufgenommenen Substanzen zu umgehen [7]. Das sogenannte „Caveosom“, mit dem die durch die Hilfe von Dynamin abgeschnürten Vesikel fusionierten, wurde 2001 von Pelkmans et al. entdeckt [222]. Neuere Untersuchungen derselben Autoren aus dem Jahr 2010 zeigten jedoch, dass diese neu entdeckten Organellen in Wirklichkeit identisch mit späten Endosomen (LE) bzw. Lysosomen (LYS) waren, in denen das verwendete Caveolin-GFP durch seine hohe Überexpression akkumulierte. So konnten jetzt typische Markerproteine für intraluminale Vesikel (ILV) und LE/LYS, wie zum Beispiel Rab7 und Lamp1, nachgewiesen werden und auch der zuvor gemessene neutrale pH-Wert war wahrscheinlich der Versuchsanordnung mit einer verspäteten Messung eines fluoreszenz-markierten SV-40 (Simian Virus 40) als pH-sensitive Probe geschuldet, welches sich zu diesem Zeitpunkt bereits zum größten Teil im ER, einem neutralen Kompartiment, aufhielt [223].

Insgesamt konnte ich keine Beteiligung der CME an der Aufnahme von Albumin nachweisen. Diese Formulierung ist durchaus bewusst gewählt, denn im Umkehrschluss konnte ich die Beteiligung auch nicht vollständig ausschließen. Wollte man hier jedoch eine wirklich aussagekräftige Untersuchung durchführen, reicht es nicht, nur einen Mechanismus der Aufnahme in die Zelle isoliert zu betrachten. Es müssten zumindestens die Caveolae-vermittelte Aufnahme, die Lipid-Raft Endozytose und die Fluid-Phase Endozytose parallel untersucht werden, zudem jeweils mit verschiedenen

Inhibitoren, die zuvor hinsichtlich ihrer wirksamen Konzentration und Cytotoxizität überprüft wurden. Für jeden analysierten Mechanismus sollte ausserdem ein spezifisches Markermolekül als Kontrolle etabliert werden, was, wie oben bereits erwähnt, nicht trivial ist. Idealerweise würden diese Versuche mit einer selektiven Inhibition durch die Transfektion mit siRNA komplementiert werden, wobei auch hier durch die Transfektions-Reagenzien induzierte Effekte sowie der Einfluss auf andere Vorgänge in der Zellphysiologie durch die verwendete siRNA berücksichtigt werden müssen. Zusätzlich zu dem experimentellen Aufbau gibt es noch weitere Faktoren, die bei der Analyse der Aufnahme in die Zelle eine Rolle spielen. So können Substanzen durchaus konzentrationsabhängig durch verschiedene Mechanismen aufgenommen werden, wie es bereits für verschiedene Nanopartikel und Polymere gezeigt wurde [7]. Das Beispiel des FcRN Rezeptors wiederum illustriert den konzentrationsabhängigen Unterschied zwischen Aufnahme und Recycling, so werden IgG und Albumin in niedrigen Konzentrationen recycelt, aber sobald die Kapazität des FcRN Rezeptors überschritten ist, verbleiben sie in der Zelle und werden im Lysosom abgebaut [42]. Hinzu kommt, dass die Hemmung eines einzelnen Endozytose-Mechanismus durchaus zu einer Kompensation und Hochregulierung anderer Mechanismen führen kann, was die Auswertung der gewonnenen Daten zusätzlich erschwert [175].

Die Anwesenheit eines spezifischen Endozytose-Mechanismus ist die Voraussetzung für eine gezielte, Rezeptor-abhängige Endozytose von Albumin. Ein alternativer Weg, der zunächst unabhängig von der Untersuchung der zellulären Aufnahme ist, besteht in der Identifizierung Albumin-bindender Proteine auf der Zellmembran und in einem nächsten Schritt der Charakterisierung dieser ABPs hinsichtlich ihrer potentiellen Funktion in der Endozytose von Albumin. Der letzte Teil dieser Arbeit beschreibt ein Protokoll zur Isolation der HSA-Bindungspartner durch die Synthese eines Biotin-HSA-SDAD Konjugats, das auf der einen Seite einen photoaktivierbaren Crosslinker zur kovalenten Bindung an Interaktionspartner und auf der anderen Seite einen Biotin-Tag zur selektiven Aufreinigung der HSA-ABP-Komplexe durch Streptavidin enthält. Auch andere Autoren haben ähnliche Ansätze publiziert, welche das eigentliche Crosslinking mit einer selektiven Aufreinigung verbinden [279, 288]. Unter anderem die Arbeit von T. Fritzsche hat gezeigt, dass eine möglichst stringente Aufreinigung der gesuchten Zielproteine nötig ist, um die Komplexität der zu analysierenden Proteinlösung zu verringern und eine eindeutige Identifikation durch MALDI-TOF MS zu erleichtern. Interessant ist dennoch, dass Freed et al. bei vier hintereinander durchgeführten Experimenten insgesamt 7 Proteine in vier Experimenten, 22 Proteine in drei von vier und ganze 71 Proteine in jeweils 2 von vier Experimenten nachweisen konnten [280]. Dies zeigt, wie von Sinz et al. formuliert, dass das Crosslinking trotz des einfach wirkenden Ansatzes immer ein Versuch-und-Fehler Prozess für einen bestimmten Proteinkomplex war und ist [281]. Eine mehrfache Durchführung eines solchen Experiments und der Vergleich der erzielten Ergebnisse ist somit essentiell. Der Vorteil an dem in dieser Arbeit vorgestellten Protokoll ist die Tatsache, dass durch die Stabilität der Konjugate in Lösung die Experimente mit den gleichen Ausgangssubstanzen mehrfach durchgeführt werden können. Dies ist zum Beispiel mit dem SBED Biotin Label Reagent von Thermo Fisher, der ein zu meinem Protokoll vergleichbares Prinzip in einer einzelnen Konjugation vereint, nicht möglich, da die so hergestellten Konjugate in Lösung nicht stabil waren. Unzweifelhaft ist jedoch, dass jegliche Modifikation eines Proteins seine natürliche Bindung an Interaktionspartner stören kann, insbesondere Biotinylierungen können zur einer Erhöhung der Hydrophobizität eines Proteins und somit einer Erhöhung von unspezifischen Interaktionen mit der Zellmembran führen [255]. Eine stringente Validierung des eingesetzten Protokolls und ausreichende Kontrollen, wie sie von mir

anhand des parallel synthetisierten Biotin-Tf-SDAD durchgeführt und geplant wurden, sind, wie bereits erwähnt, essentiell. Obwohl in dieser Arbeit alle experimentellen Schritte des Protokolls überprüft wurden, fehlt die endgültige Funktionskontrolle anhand der Isolation des Transferrinrezeptors. Nichtsdestotrotz wäre selbst die erfolgreiche Isolation eines neuen Albumin-bindenden Proteins eben nur genau das: ein Albumin-bindendes Protein. Eine Aussage, inwieweit ein solches Protein in die Albumin-Endozytose involviert ist, kann allein anhand dieser Charakteristik nicht getroffen werden. Ähnliche Versuche, wie ich sie in Teil 1 dieser Arbeit für Calreticulin und hnRNP A2/B1 durchgeführt habe, müssten zunächst einmal die Anwesenheit auf lebenden Zellen weiter verifizieren. Der nächste Schritt, die Untersuchung der Aufnahme von Albumin in die Zelle und die Beteiligung des neuen ABPs wiederum schließt den Kreis zur Untersuchung der CME im besonderen und der Endozytose-Mechanismen generell, und den hiermit verbundenen hohen methodischem Aufwand.

Warum hätten so gewonnene Daten nur eine geringe Aussagekraft?

Um im Umkehrschluss eine hohe Aussagekraft zu erreichen, sollten die gewonnenen Daten eine möglichst universelle Erklärung für die Aufnahme von Albumin in unterschiedlichste Tumorarten liefern, zumindestens für alle diejenigen, bei denen die Wirksamkeit oder Akkumulation von HSA-Konjugaten bereits gezeigt wurde. Es gilt aber zu bedenken, dass mehr als 200 unterschiedliche Zelltypen im menschlichen Körper existieren [20] und die Herkunft der Zelle einen entscheidenden Einfluss auf die Expression, Aktivität und Funktionalität der einzelnen Endozytose-Mechanismen hat. Je nach Zelltyp können diese unterschiedlich präsent sein oder sogar vollständig fehlen [7]. Ein universeller, auf verschiedensten Tumorarten (über)exprimierter Rezeptor wäre somit ein wahrer Glückstreffer. Ein Blick in die Literatur zeigt, dass verschiedene Labore unterschiedliche Zelltypen, teilweise heterogene Nanomaterialien und verschiedene Methoden benutzen, um die intrazelluläre Aufnahme zu untersuchen, was die Generalisierung dieser Untersuchungen stark erschwert. Wie ich bereits oben erwähnt habe, sollte eine gute Analyse folglich verschiedene Ansätze und unterschiedliche Zelltypen einschließen, um eine Aussage über den spezifischen Aufnahmemechanismus einer Substanz treffen zu können. Allerdings zeigten Vercauteren et al., dass auch in Zelllinien des gleichen Gewebetyps eine stark variierende Empfindlichkeit gegenüber Endozytose-Inhibitoren existiert [175], was wiederum für Unterschiede in der Ausstattung mit bzw. der Effektivität der einzelnen Endozytose-Mechanismen spricht. Wenn diese Unterschiede alleine zwischen Zellen der gleichen Tumorart bestehen, stellt sich die Frage: wieviele Zelllinien müssten für eine fundierte Aussage analysiert werden? Sowie: Inwieweit sind die so in der Zellkultur und mit verschiedenen Zelllinien gewonnenen Daten wirklich aussagekräftig für die spätere Situation *in vivo*? Durr et al. konnten zeigen, dass 41 % der *in vivo* exprimierten Proteine auf den Plasmamembranen von Endothelzellen der Rattenlunge später nicht mehr *in vitro*, also in der Zellkultur, detektiert werden konnten [289]. Eine Zelllinie in Kultur verändert sich naturgemäß und zeigt phänotypische Veränderungen, die in morphologischen Veränderungen sowie dem Verlust von nativen Funktionen und Proteinexpression resultieren [290]. Nichtsdestotrotz stellen Zellkultur und Zelllinien ein Modell für die Situation im eigentlichen Gewebe bzw. in einem ganzen Tier oder Menschen dar. Das eigentlich zugrundeliegende Interesse der hier durchgeführten Untersuchungen gilt jedoch der Aufnahme eines HSA-Konjugats in die Zielzellen eines Tumors oder einer Entzündung in einem Patienten. Ein gutes Beispiel für die Unterschiede zwischen Zellkultur und lebendem Organismus ist die Tatsache, dass Albumin-Konjugate mit zu hoher Beladung in der Leber akkumulieren und durch das RES aus der Zirkulation entfernt werden [195]. Auch Nanopartikel mit einer Größe von 1-3 μm

werden zu 90 % durch das RES der Leber abgefangen, wohingegen eine durchschnittliche Größe von 15-30 µm zu einer 99 % Ablagerung im Kapillarbett der Lunge führt.[95] Hier wird deutlich, dass jedes noch so gut durchdachte aktive Targeting an einfachen physiologischen Gegebenheiten scheitern kann. Es ist bezeichnend, wie viele unterschiedliche Nanopartikel, Liposomen, sowie Polymer- oder Proteinkonjugate *in vitro* weltweit untersucht werden und wie wenig es davon bisher in die Zulassung geschafft haben.

Warum ist ein spezifischer Rezeptor nicht nötig?

Gerade das Beispiel der Albumin-Nanopartikel Formulierung Abraxane zeigt meiner Ansicht nach, dass eine einfache Idee manchmal die beste ist, und, um auf den letzten Teil meiner Antwort zurückzukommen, dass weder eine genaue Analyse des intrazellulären Aufnahmemechanismus noch der Transzytose durch das Epithel noch der Akkumulation im Interstitium des Tumors nötig ist, um zugelassen und erfolgreich in der Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms eingesetzt zu werden (vgl auch 3.4.2.4). Um es noch einmal zu betonen: die Kritik der auf, meiner Ansicht nach, unzureichenden Daten basierenden Produktinformationen zum Wirkmechanismus von Nab-Paclitaxel heisst nicht, dass es kein Erfolg ist. Abraxane wirkt, es hat eine höhere Anreicherung im Tumorgewebe als freies Paclitaxel, es hat weniger Nebenwirkungen und es kann einfacher appliziert werden.

Dies beweist, dass HSA-basierte Therapeutika durchaus "up-to-date" sind. HSA zeigt aufgrund seiner Größe einen EPR-Effekt, wie ihn auch andere hochmolekulare Nanotherapeutika aufweisen, aber zusätzlich ist es *per se* bioabbaubar, hat eine lange Halbwertszeit wenn es nicht denaturiert ist, es bindet lipophile Substanzen und kann so als Transportprotein für Fettsäure-konjugierte Therapeutika (vgl. 3.4.2.2) oder wie im Falle von Abraxane einfach als Lösungsvermittler dienen, es ist nicht pathogen und selbst nach Langzeit-Administration nicht immunogen, wie die jahrzentelange Anwendung von Albumin-Infusionslösungen in der Klinik zeigt, und zudem ist durch rekombinantes Albumin auch eine Plasmaspender-unabhängige Herstellung möglich, die ausserdem Möglichkeiten für Modifikationen bietet, wie sie bereits hinsichtlich der verlängerten Halbwertszeit durch eine verbesserte FcRN-Bindung existieren (vgl 3.4.2). Die hohe Stabilität von Albumin in verschiedenen Lösungsmitteln und die große Anzahl an funktionellen Gruppen die für chemische Modifikationen zur Verfügung stehen, machen HSA für die Entwicklung von unterschiedlichsten Nanotherapeutika interessant.

Für ein bereits so erfolgreich eingesetztes Molekül ist ein spezifischer Aufnahmemechanismus folglich gar nicht nötig. Selbst wenn ein solcher Rezeptor auf der Plasmamembran von Tumorzellen existiert – existiert er dann auf allen Tumorarten? Wenn nicht, was sicherlich wahrscheinlicher ist, lohnt sich wirklich der Aufwand, auf diesen Rezeptor zu testen, wenn allein aufgrund des EPR-Effekts, des Endothelrezeptors gp60 und, gegebenenfalls, SPARC bereits genug andere Mechanismen existieren, um eine Akkumulation im Interstitium des Tumors zu gewährleisten? Eine Modifikation von HSA für eine verbesserte Bindung an so einen hypothetischen, auf einigen Tumoren exprimierten Rezeptor würde die Anwendungsmöglichkeiten folglich zudem nicht verbessern, sondern im Vergleich zum Original eher einschränken.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass ein Rezeptor für die spezifische Aufnahme von Albumin auf der Plasmamembran von Tumorzellen meiner Ansicht nach wahrscheinlich nicht existiert, vor allem nicht im Sinne eines ubiquitär exprimierten Rezeptors auf jeder Art von Tumor. Dafür sprechende

Daten sind entweder veraltet, nicht reproduzierbar oder aufgrund der Versuchsanordnung schwierig zu beurteilen. Ich gebe gerne zu, dass auch der experimentelle Teil meiner Arbeit noch weiter geführt werden könnte. Ich möchte dazu jedoch anmerken, dass es durchaus schwieriger ist, nachzuweisen, dass etwas nicht existiert, als das Gegenteil. Insbesondere da hier jeder Zweifel an den angewendeten Methoden ausgeräumt werden muss. Meiner Ansicht nach habe ich in meiner Arbeit etwas gesucht, das so nicht existiert. Wie ich hier und in der übrigen Arbeit allerdings dargestellt habe, ist ein spezifischen Rezeptor für die Albumin-Aufnahme in Tumorzellen nicht nur wahrscheinlich nicht existent, sein Nachweis übersteigt auch die methodischen und zeitlichen Möglichkeiten einer einzelnen Doktorarbeit und ist schlussendlich für die Entwicklung neuer HSA-basierter Therapeutika nicht erforderlich. Insgesamt denke ich somit, dass ich die grundlegende Aufgabenstellung meiner Arbeit damit durchaus erfolgreich bearbeitet habe.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABP	Albumin-bindende Proteine
AP2	Adapterprotein 2
BCA	Bicinchoninic-Assay
BSA	Bovines Serumalbumin
CHC	Clathrin Heavy Chain
CME	clathrin-mediated endocytosis = Clathrin-abhängige Endozytose
CRT	Calreticulin
ECL	enhanced chemoluminescence
EE	early endosomes = frühe / unreife Endosomen
EPR-Effekt	“Enhanced Permeability and Retention“-Effekt
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorting = Durchflusszytometrie
FcRN	neonataler Fc-Rezeptor
FSC	forward scatter
GFP	green fluorescent protein
GM	Geometrisches Mittel
hnRNP	heterogenous nuclear Ribonucleoprotein
HRP	horseradish peroxidase = Meerrettich Peroxidase
HSA	Humanes Serumalbumin
IFP	interstitial fluid pressure = interstitieller Flüssigkeitsdruck
ILV	Intraluminale Vesikel
LE	late endosomes = späte / gereifte Endosomen
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry
MDC	Monodansylcadaverin
MS	Massenspektrometrie
MTX-HSA	Methotrexat-HSA
MVB	multivesicular bodies
MW	molecular weight = Molekulargewicht
NSCLC	non small cell lung cancer = nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PAO	Phenylarsinoxid
PI	Propidium Iodid
RES	Retikuloendotheliales System
RFU	relative fluorescence units = relative Fluoreszenz-Einheiten
RNAi	RNA-Interferenz
SBED	Sulfo-Biotin-Label Transfer Reagent
SC	subcellular fractionation = subzelluläre Fraktionierung
SDAD	NHS-SS-Diazirin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFM	Serumfreies Medium

siRNA	small interfering RNA
SPARC	secreted protein acidic and rich in cystein
SSC	sideward scatter
STR	Streptavidin
Tf	Transferrin
TfR1	Transferrinrezeptor 1
TGFβRII	Transforming Growth Factor beta Rezeptor Typ 2
TMR	Tetramethylrhodamin

8 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3-1	5
Abbildung 3-2	9
Abbildung 3-3	12
Abbildung 3-4	14
Abbildung 3-5	17
Abbildung 3-6	19
Abbildung 3-7	34
Abbildung 5-1	54
Abbildung 5-2	55
Abbildung 5-3	58
Abbildung 5-4	59
Abbildung 5-5	61
Abbildung 6-1	63
Abbildung 6-2	64
Abbildung 6-3	65
Abbildung 6-4	65
Abbildung 6-5	66
Abbildung 6-6	67
Abbildung 6-7	68
Abbildung 6-8	76
Abbildung 6-9	79
Abbildung 6-10	80
Abbildung 6-11	82
Abbildung 6-12	82
Abbildung 6-13	83
Abbildung 6-14	93
Abbildung 6-15	97
Abbildung 6-16	99
Abbildung 6-17	102
Abbildung 6-18	105
Abbildung 6-19	108
Abbildung 6-20	109
Tabelle 3.1	13
Tabelle 3.2	32
Tabelle 3.3	35
Tabelle 5.1	39
Tabelle 5.2	45
Tabelle 5.3	51

9 DANKSAGUNG

Zunächst einmal möchte ich Dr. Eva Frei und PD Dr. Heinz Schmeiser von Herzen danken, für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen und insbesondere für ihre Geduld. Dr. Arwyn T. Jones gebührt besonderer Dank für seine Bereitschaft, mich für drei Monate in seinem Labor aufzunehmen und mir während dieser Zeit sowohl einen Einblick in die Untersuchung der Endozytose als auch in die walisische Bierkultur zu ermöglichen. Michael Pfrang und Karin Pekkip, den Inhabern „meiner“ beiden Apotheken, danke ich herzlich für ihr Verständnis und ihre Bereitschaft, meine Arbeitszeiten in den letzten Jahren so flexibel zu gestalten.

Meinen Rauchfreunden Bettina, Simon, Michael und Ralf danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr und manche gute Idee parat hatten, zudem häufiger eine Zigarette, wenn meine mal wieder leer waren. Allen Laborratten, also insbesondere Andrea, Hans-Herrman, Doro, Annette, Ulli, Ed, Cathryn, und Monhera, mit denen ich entweder hier in Heidelberg oder an der Welsh School of Pharmacy manche Stunde im weißen Kittel und an der Bench verbracht habe, danke ich für ihre Unterstützung und die Tatsache, dass sie mir die Zeit mit Gesprächen, Gelächter und ab und zu einem Feierabendbierchen versüßt haben. Bob und Gerd danke ich für die Tatsache, dass sie dafür gesorgt haben, dass immer eine Tasse Kaffee bereit stand. Beiden Apotheken-Teams danke ich zudem für die kurzweiligen Stunden während der Schichten, die mir häufig als Ausgleich zur Zeit am Schreibtisch dienten, sowie der Hilfsbereitschaft und Freundschaft in der ganzen Zeit. Indra Enterlein, Steffi Müller, Steffi Weeber und Hanna Seidling waren in den letzten Jahren immer mit einem offenem Ohr und einem guten Ratschlag für mich da. Clare Abbenhardt und Nina Habermann möchte ich für ihre Hilfe, Unterstützung und für unzählige weitere Dinge danken, deren detaillierte Aufzählung den Rahmen hier eindeutig sprengen würde. Meiner Familie danke ich für den Zusammenhalt und insbesondere für die Bereitschaft, mein stundenlanges Jammern am Telefon auch beim dritten oder vierten Anruf noch zu ertragen. Dem Internetportal „E-Darling“ danke ich für den besten Mann der Welt und dem besten Mann der Welt möchte ich dafür danken, dass er in den letzten zwei Jahren während aller Höhen und Tiefen an meiner Seite war.

10 LITERATURVERZEICHNIS

1. Motley, A., et al., *Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells*. J Cell Biol, 2003. **162**(5): p. 909-18.
2. Fritzsche, T., et al., *Isolation and identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) from purified plasma membranes of human tumour cell lines as albumin-binding proteins*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(4): p. 655-65.
3. Schmid, D., M. Pypaert, and C. Munz, *Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes*. Immunity, 2007. **26**(1): p. 79-92.
4. Gold, L.I., et al., *Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease*. FASEB J, 2010. **24**(3): p. 665-83.
5. Fritzsche, T., *Entwicklung von Methoden zur Isolierung albuminbindender Proteine aus der Plasmamembran humaner Tumorzelllinien sowie deren Identifizierung und Charakterisierung*, in *Abteilung Molekulare Toxikologie am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ)2003*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: Heidelberg. p. 105.
6. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
7. Sahay, G., D.Y. Alakhova, and A.V. Kabanov, *Endocytosis of nanomedicines*. J Control Release, 2010. **145**(3): p. 182-95.
8. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. EMBO J, 2011. **30**(17): p. 3481-500.
9. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nat Nanotechnol, 2007. **2**(12): p. 751-60.
10. Danhier, F., O. Feron, and V. Preat, *To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. J Control Release, 2010. **148**(2): p. 135-46.
11. Al-Soraj, M.H., et al., *siRNA versus pharmacological inhibition of endocytic pathways for studying cellular uptake of cell penetrating peptides*. J Control Release, 2010. **148**(1): p. e86-7.
12. Bae, K.H., H.J. Chung, and T.G. Park, *Nanomaterials for cancer therapy and imaging*. Mol Cells, 2011. **31**(4): p. 295-302.
13. Dong, X. and R.J. Mumper, *Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress*. Nanomedicine (Lond), 2010. **5**(4): p. 597-615.
14. Duncan, R., *The dawning era of polymer therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(5): p. 347-60.
15. Jain, R.K. and T. Stylianopoulos, *Delivering nanomedicine to solid tumors*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(11): p. 653-64.
16. Jain, R.K., *Transport of molecules in the tumor interstitium: a review*. Cancer Res, 1987. **47**(12): p. 3039-51.
17. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. J Control Release, 2000. **65**(1-2): p. 271-84.
18. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer Res, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
19. Neumann, E., et al., *Native albumin for targeted drug delivery*. Expert Opin Drug Deliv, 2010. **7**(8): p. 915-25.
20. Watson, P., A.T. Jones, and D.J. Stephens, *Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(1): p. 43-61.
21. Ivanov, A.I., *Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful?* Methods Mol Biol, 2008. **440**: p. 15-33.

22. Hanzal-Bayer, M.F. and J.F. Hancock, *Lipid rafts and membrane traffic*. FEBS Lett, 2007. **581**(11): p. 2098-104.
23. Parton, R.G., M. Hanzal-Bayer, and J.F. Hancock, *Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 5): p. 787-96.
24. Parton, R.G., B. Joggerst, and K. Simons, *Regulated internalization of caveolae*. J Cell Biol, 1994. **127**(5): p. 1199-215.
25. Nabi, I.R. and P.U. Le, *Caveolae/raft-dependent endocytosis*. J Cell Biol, 2003. **161**(4): p. 673-7.
26. Lajoie, P. and I.R. Nabi, *Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis*. Int Rev Cell Mol Biol, 2010. **282**: p. 135-63.
27. John, T.A., et al., *Evidence for the role of alveolar epithelial gp60 in active transalveolar albumin transport in the rat lung*. J Physiol, 2001. **533**(Pt 2): p. 547-59.
28. Schnitzer, J.E., et al., *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules*. J Cell Biol, 1994. **127**(5): p. 1217-32.
29. Hutchinson, T.E., et al., *Enhanced phosphorylation of caveolar PKC-alpha limits peptide internalization in lung endothelial cells*. Mol Cell Biochem, 2012. **360**(1-2): p. 309-20.
30. Yamano, S., et al., *Modified Tat peptide with cationic lipids enhances gene transfection efficiency via temperature-dependent and caveolae-mediated endocytosis*. J Control Release, 2011. **152**(2): p. 278-85.
31. Harder, T., et al., *Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(3): p. 533-45.
32. Shajahan, A.N., et al., *Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20392-400.
33. McMahan, H.T. and E. Boucrot, *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(8): p. 517-33.
34. Dautry-Varsat, A., *Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor*. Biochimie, 1986. **68**(3): p. 375-81.
35. Wang, L.H., K.G. Rothberg, and R.G. Anderson, *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation*. J Cell Biol, 1993. **123**(5): p. 1107-17.
36. Rodal, S.K., et al., *Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 961-74.
37. Carpentier, J.L., et al., *Potassium depletion and hypertonic medium reduce "non-coated" and clathrin-coated pit formation, as well as endocytosis through these two gates*. J Cell Physiol, 1989. **138**(3): p. 519-26.
38. Raiborg, C., et al., *Hrs recruits clathrin to early endosomes*. EMBO J, 2001. **20**(17): p. 5008-21.
39. Deborde, S., et al., *Clathrin is a key regulator of basolateral polarity*. Nature, 2008. **452**(7188): p. 719-23.
40. Boldt, J., *Use of albumin: an update*. Br J Anaesth, 2010. **104**(3): p. 276-84.
41. Peters, T., *All about Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*. 1996, San Diego: Academic Press.
42. Kim, J., et al., *Albumin turnover: FcRn-mediated recycling saves as much albumin from degradation as the liver produces*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(2): p. G352-60.
43. Kim, J., et al., *Kinetics of FcRn-mediated recycling of IgG and albumin in human: pathophysiology and therapeutic implications using a simplified mechanism-based model*. Clin Immunol, 2007. **122**(2): p. 146-55.
44. Chaudhury, C., et al., *The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan*. J Exp Med, 2003. **197**(3): p. 315-22.
45. Hauser, C.A., M.R. Stockler, and M.H. Tattersall, *Prognostic factors in patients with recently diagnosed incurable cancer: a systematic review*. Support Care Cancer, 2006. **14**(10): p. 999-1011.

46. Gupta, D. and C.G. Lis, *Pretreatment serum albumin as a predictor of cancer survival: a systematic review of the epidemiological literature*. Nutr J, 2010. **9**: p. 69.
47. Roberts, I., et al., *Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients*. Cochrane Database Syst Rev, 2011(11): p. CD001208.
48. Mider, G.B., E.L. Alling, and J.J. Morton, *The effect of neoplastic and allied diseases on the concentrations of the plasma proteins*. Cancer, 1950. **3**(1): p. 56-65.
49. Andersson, C., B.M. Iresjo, and K. Lundholm, *Identification of tissue sites for increased albumin degradation in sarcoma-bearing mice*. J Surg Res, 1991. **50**(2): p. 156-62.
50. Stehle, G., et al., *Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself--implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia*. Crit Rev Oncol Hematol, 1997. **26**(2): p. 77-100.
51. Ballantyne, F.C., A. Fleck, and W.C. Dick, *Albumin metabolism in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 1971. **30**(3): p. 265-70.
52. Fukuda, W., et al., *Malnutrition and disease progression in patients with rheumatoid arthritis*. Mod Rheumatol, 2005. **15**(2): p. 104-7.
53. Niwa, Y., et al., *Serum albumin metabolism in rheumatic diseases: relationship to corticosteroids and peptic ulcer*. J Clin Lab Immunol, 1990. **31**(1): p. 11-6.
54. Levick, J.R., *Permeability of rheumatoid and normal human synovium to specific plasma proteins*. Arthritis Rheum, 1981. **24**(12): p. 1550-60.
55. Wunder, A., et al., *Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4793-801.
56. Kratz, F., *Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles*. J Control Release, 2008. **132**(3): p. 171-83.
57. Roopenian, D.C. and S. Akilesh, *FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 715-25.
58. Chaudhury, C., et al., *Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction*. Biochemistry, 2006. **45**(15): p. 4983-90.
59. Ober, R.J., et al., *Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 11076-81.
60. Mego, J.L., *Role of thiols, pH and cathepsin D in the lysosomal catabolism of serum albumin*. Biochem J, 1984. **218**(3): p. 775-83.
61. Bito, R., et al., *Degradation of oxidative stress-induced denatured albumin in rat liver endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(3): p. C531-42.
62. Iwao, Y., et al., *The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP)*. drug metab pharmacokinet, 2006. **21**(2): p. 140-6.
63. Tamura, Y., et al., *FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 12613-7.
64. Ohgami, N., et al., *Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3195-202.
65. Jono, T., et al., *Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE)*. FEBS Lett, 2002. **511**(1-3): p. 170-4.
66. Adachi, H., et al., *Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31217-20.
67. Platt, N. and S. Gordon, *Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale*. J Clin Invest, 2001. **108**(5): p. 649-54.
68. Kodama, T., et al., *Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils*. Nature, 1990. **343**(6258): p. 531-5.
69. Schnitzer, J.E. and J. Bravo, *High affinity binding, endocytosis, and degradation of conformationally modified albumins. Potential role of gp30 and gp18 as novel scavenger receptors*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7562-70.

70. Otnad, E., et al., *Differentiation of binding sites on reconstituted hepatic scavenger receptors using oxidized low-density lipoprotein*. *Biochem J*, 1992. **281 (Pt 3)**: p. 745-51.
71. Stehle, G., et al., *Pharmacokinetics of methotrexate-albumin conjugates in tumor-bearing rats*. *Anticancer Drugs*, 1997. **8(9)**: p. 835-44.
72. Schnitzer, J.E., et al., *Segmental differentiation of permeability, protein glycosylation, and morphology of cultured bovine lung vascular endothelium*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **199(1)**: p. 11-9.
73. Schnitzer, J.E., *gp60 is an albumin-binding glycoprotein expressed by continuous endothelium involved in albumin transcytosis*. *Am J Physiol*, 1992. **262(1 Pt 2)**: p. H246-54.
74. Schnitzer, J.E., W.W. Carley, and G.E. Palade, *Specific albumin binding to microvascular endothelium in culture*. *Am J Physiol*, 1988. **254(3 Pt 2)**: p. H425-37.
75. Rippe, B., et al., *Transendothelial transport: the vesicle controversy*. *J Vasc Res*, 2002. **39(5)**: p. 375-90.
76. Schubert, W., et al., *Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo*. *J Biol Chem*, 2001. **276(52)**: p. 48619-22.
77. Shajahan, A.N., et al., *Gbetagamma activation of Src induces caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279(46)**: p. 48055-62.
78. Minshall, R.D., et al., *Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway*. *J Cell Biol*, 2000. **150(5)**: p. 1057-70.
79. Sharma, D.K., et al., *Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15(7)**: p. 3114-22.
80. Stewart, P.A., *Endothelial vesicles in the blood-brain barrier: are they related to permeability?* *Cell Mol Neurobiol*, 2000. **20(2)**: p. 149-63.
81. Christensen, E.I. and H. Birn, *Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **280(4)**: p. F562-73.
82. Raychowdhury, R., et al., *Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor*. *Science*, 1989. **244(4909)**: p. 1163-5.
83. Moestrup, S.K., et al., *The intrinsic factor-vitamin B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins*. *J Biol Chem*, 1998. **273(9)**: p. 5235-42.
84. Sahali, D., et al., *Characterization of a 280-kD protein restricted to the coated pits of the renal brush border and the epithelial cells of the yolk sac. Teratogenic effect of the specific monoclonal antibodies*. *J Exp Med*, 1988. **167(1)**: p. 213-8.
85. Amsellem, S., et al., *Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule*. *J Am Soc Nephrol*, 2010. **21(11)**: p. 1859-67.
86. Christensen, E.I., et al., *Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule*. *Int Rev Cytol*, 1998. **180**: p. 237-84.
87. Buchackert, Y., et al., *Megalin mediates transepithelial albumin clearance from the alveolar space of intact rabbit lungs*. *J Physiol*, 2012.
88. Siddiqui, S.S., Z.K. Siddiqui, and A.B. Malik, *Albumin endocytosis in endothelial cells induces TGF-beta receptor II signaling*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **286(5)**: p. L1016-26.
89. Ralay Ranaivo, H., F. Patel, and M.S. Wainwright, *Albumin activates the canonical TGF receptor-smad signaling pathway but this is not required for activation of astrocytes*. *Exp Neurol*, 2010. **226(2)**: p. 310-9.
90. Ivens, S., et al., *TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis*. *Brain*, 2007. **130(Pt 2)**: p. 535-47.
91. Gekle, M., et al., *Transforming growth factor-beta1 reduces megalin- and cubilin-mediated endocytosis of albumin in proximal-tubule-derived opossum kidney cells*. *J Physiol*, 2003. **552(Pt 2)**: p. 471-81.
92. Russo, L.M., et al., *Evidence for a role of transforming growth factor (TGF)-beta1 in the induction of postglomerular albuminuria in diabetic nephropathy: amelioration by soluble TGF-beta type II receptor*. *Diabetes*, 2007. **56(2)**: p. 380-8.

93. Diwakar, R., et al., *The role played by endocytosis in albumin-induced secretion of TGF-beta1 by proximal tubular epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(5): p. F1464-70.
94. Mendez, C.M., C.J. McClain, and L.S. Marsano, *Albumin therapy in clinical practice*. Nutr Clin Pract, 2005. **20**(3): p. 314-20.
95. Chuang, V.T., U. Kragh-Hansen, and M. Otagiri, *Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin*. Pharm Res, 2002. **19**(5): p. 569-77.
96. 2011 17.01.2013]; Available from: <http://www.biopharma.novozymes.com/en/half-life-extension/Pages/default.aspx>.
97. Bickel, U., T. Yoshikawa, and W.M. Pardridge, *Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46**(1-3): p. 247-79.
98. Lu, W., et al., *Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery*. J Control Release, 2005. **107**(3): p. 428-48.
99. Pang, Z., et al., *Intracellular delivery mechanism and brain delivery kinetics of biodegradable cationic bovine serum albumin-conjugated polymersomes*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 3421-32.
100. Vis, A.N., et al., *A phase II trial of methotrexate-human serum albumin (MTX-HSA) in patients with metastatic renal cell carcinoma who progressed under immunotherapy*. Cancer Chemother Pharmacol, 2002. **49**(4): p. 342-5.
101. Bolling, C., et al., *Phase II study of MTX-HSA in combination with cisplatin as first line treatment in patients with advanced or metastatic transitional cell carcinoma*. Invest New Drugs, 2006. **24**(6): p. 521-7.
102. Hartung, G., et al., *Phase I trial of methotrexate-albumin in a weekly intravenous bolus regimen in cancer patients*. Phase I Study Group of the Association for Medical Oncology of the German Cancer Society. Clin Cancer Res, 1999. **5**(4): p. 753-9.
103. Fiehn, C., et al., *Albumin-coupled methotrexate (MTX-HSA) is a new anti-arthritis drug which acts synergistically to MTX*. Rheumatology (Oxford), 2004. **43**(9): p. 1097-105.
104. Kiessling, F., et al., *Magnetic resonance imaging of nude mice with heterotransplanted high-grade squamous cell carcinomas: use of a low-loaded, covalently bound Gd-Hsa conjugate as contrast agent with high tumor affinity*. Invest Radiol, 2002. **37**(4): p. 193-8.
105. Kremer, P., et al., *Intraoperative fluorescence staining of malignant brain tumors using 5-aminofluorescein-labeled albumin*. Neurosurgery, 2009. **64**(3 Suppl): p. ons53-60; discussion ons60-1.
106. Hirata, K., et al., *Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective therapeutics*. J Control Release, 2010. **145**(1): p. 9-16.
107. Fiume, L. and G. Di Stefano, *Lactosaminated human albumin, a hepatotropic carrier of drugs*. Eur J Pharm Sci, 2010. **40**(4): p. 253-62.
108. Prakash, J., et al., *Tumor-targeted intracellular delivery of anticancer drugs through the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor*. Int J Cancer, 2010. **126**(8): p. 1966-81.
109. Kratz, F., et al., *A novel macromolecular prodrug concept exploiting endogenous serum albumin as a drug carrier for cancer chemotherapy*. J Med Chem, 2000. **43**(7): p. 1253-6.
110. Kratz, F., et al., *Probing the cysteine-34 position of endogenous serum albumin with thiol-binding doxorubicin derivatives. Improved efficacy of an acid-sensitive doxorubicin derivative with specific albumin-binding properties compared to that of the parent compound*. J Med Chem, 2002. **45**(25): p. 5523-33.
111. Unger, C., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of the (6-maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(16): p. 4858-66.
112. CytRx. INNO-206. 2012 17.03.2013]; Available from: http://www.cytrx.com/inno_206.
113. Giannoukakis, N., *CJC-1131. ConjuChem*. Curr Opin Investig Drugs, 2003. **4**(10): p. 1245-9.
114. Christensen, M. and F.K. Knop, *Once-weekly GLP-1 agonists: How do they differ from exenatide and liraglutide?* Curr Diab Rep, 2010. **10**(2): p. 124-32.

115. ConjuChem. *CJC-1134-PC*. 2011 17.01.2013]; Available from: <http://www.conjuchem.com/pipeline/cjc-1134-pc>.
116. Vague, P., et al., *Insulin detemir is associated with more predictable glycemic control and reduced risk of hypoglycemia than NPH insulin in patients with type 1 diabetes on a basal-bolus regimen with premeal insulin aspart*. *Diabetes Care*, 2003. **26**(3): p. 590-6.
117. Home, P. and P. Kurtzhals, *Insulin detemir: from concept to clinical experience*. *Expert Opin Pharmacother*, 2006. **7**(3): p. 325-43.
118. Buse, J.B., et al., *Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6)*. *Lancet*, 2009. **374**(9683): p. 39-47.
119. Pockros, P.J., *Why do we need another interferon?* *Gastroenterology*, 2010. **139**(4): p. 1084-6.
120. Zeuzem, S., et al., *Albinterferon Alfa-2b was not inferior to pegylated interferon-alpha in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus genotype 1*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(4): p. 1257-66.
121. Nelson, D.R., et al., *Albinterferon Alfa-2b was not inferior to pegylated interferon-alpha in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus genotype 2 or 3*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(4): p. 1267-76.
122. Rosenstock, J., et al., *Potential of albiglutide, a long-acting GLP-1 receptor agonist, in type 2 diabetes: a randomized controlled trial exploring weekly, biweekly, and monthly dosing*. *Diabetes Care*, 2009. **32**(10): p. 1880-6.
123. St Onge, E.L. and S.A. Miller, *Albiglutide: a new GLP-1 analog for the treatment of type 2 diabetes*. *Expert Opin Biol Ther*, 2010. **10**(5): p. 801-6.
124. Talekar, M., et al., *Targeting of nanoparticles in cancer: drug delivery and diagnostics*. *Anticancer Drugs*, 2011. **22**(10): p. 949-62.
125. Taheri, A., et al., *Trastuzumab decorated methotrexate-human serum albumin conjugated nanoparticles for targeted delivery to HER2 positive tumor cells*. *Eur J Pharm Sci*, 2012. **47**(2): p. 331-40.
126. Desai, N., et al., *Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(4): p. 1317-24.
127. Nyman, D.W., et al., *Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(31): p. 7785-93.
128. Foote, M., *Using nanotechnology to improve the characteristics of antineoplastic drugs: improved characteristics of nab-paclitaxel compared with solvent-based paclitaxel*. *Biotechnol Annu Rev*, 2007. **13**: p. 345-57.
129. Emea. *Abraxane*. 20.12.2012 22.01.2013]; Available from: http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000778/human_med_000620.jsp.
130. FDA. *Paclitaxel (Abraxane)*. 10.12.2012 22.01.2013]; Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm323668.htm>.
131. Schnitzer, J.E. and P. Oh, *Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(8): p. 6072-82.
132. Desai, N., et al., *SPARC Expression Correlates with Tumor Response to Albumin-Bound Paclitaxel in Head and Neck Cancer Patients*. *Transl Oncol*, 2009. **2**(2): p. 59-64.
133. Sage, H., C. Johnson, and P. Bornstein, *Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture*. *J Biol Chem*, 1984. **259**(6): p. 3993-4007.
134. Koukourakis, M.I., et al., *Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients*. *Cancer Res*, 2003. **63**(17): p. 5376-80.

135. Podhajcer, O.L., et al., *The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host*. *Cancer Metastasis Rev*, 2008. **27**(4): p. 691-705.
136. Shao, H., et al., *Improved response to nab-paclitaxel compared with cremophor-solubilized paclitaxel is independent of secreted protein acidic and rich in cysteine expression in non-small cell lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2011. **6**(6): p. 998-1005.
137. Boukakis, G., et al., *Deregulated expression of hnRNP A/B proteins in human non-small cell lung cancer: parallel assessment of protein and mRNA levels in paired tumour/non-tumour tissues*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 434.
138. Han, S.P., Y.H. Tang, and R. Smith, *Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives*. *Biochem J*, 2010. **430**(3): p. 379-92.
139. Op De Beeck, K., et al., *Heterogeneous nuclear RNPs as targets of autoantibodies in systemic rheumatic diseases*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(1): p. 213-21.
140. Kamma, H., et al., *Characterization of hnRNP A2 and B1 using monoclonal antibodies: intracellular distribution and metabolism through cell cycle*. *Immunol Lett*, 2001. **76**(1): p. 49-54.
141. Kamma, H., et al., *Molecular characterization of the hnRNP A2/B1 proteins: tissue-specific expression and novel isoforms*. *Exp Cell Res*, 1999. **246**(2): p. 399-411.
142. Carpenter, B., et al., *The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1765**(2): p. 85-100.
143. Caporali, R., et al., *Autoantibodies to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*. *Autoimmunity*, 2005. **38**(1): p. 25-32.
144. Tauler, J., et al., *hnRNP A2/B1 modulates epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines*. *Cancer Res*, 2010. **70**(18): p. 7137-47.
145. Golan-Gerstl, R., et al., *Splicing factor hnRNP A2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma*. *Cancer Res*, 2011. **71**(13): p. 4464-72.
146. Mizuno, H., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma*. *Liver Int*, 2012.
147. Tockman, M.S., et al., *Sensitive and specific monoclonal antibody recognition of human lung cancer antigen on preserved sputum cells: a new approach to early lung cancer detection*. *J Clin Oncol*, 1988. **6**(11): p. 1685-93.
148. Sueoka, E., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new marker of early detection for human lung cancers*. *Cancer Res*, 1999. **59**(7): p. 1404-7.
149. Zhou, J., et al., *Expression of early lung cancer detection marker: hnRNP-A2/B1 and its relation to microsatellite alteration in non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2001. **34**(3): p. 341-50.
150. Tockman, M.S., *Clinical detection of lung cancer progression markers*. *J Cell Biochem Suppl*, 1996. **25**: p. 177-84.
151. Zech, V.F., et al., *Prognostic and diagnostic relevance of hnRNP A2/B1, hnRNP B1 and S100 A2 in non-small cell lung cancer*. *Cancer Detect Prev*, 2006. **30**(5): p. 395-402.
152. Johnson, S., et al., *The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(3): p. 122-9.
153. Qiu, Y. and M. Michalak, *Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(3): p. 531-8.
154. Holoshitz, J., D.E. De Almeida, and S. Ling, *A role for calreticulin in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1209**: p. 91-8.
155. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. *Nat Med*, 2007. **13**(1): p. 54-61.
156. Colas, B. and S. Maroux, *Simultaneous isolation of brush border and basolateral membrane from rabbit enterocytes. Presence of brush border hydrolases in the basolateral membrane of rabbit enterocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 1980. **600**(2): p. 406-20.
157. Stieger, B. and H. Murer, *Heterogeneity of brush-border-membrane vesicles from rat small intestine prepared by a precipitation method using Mg/EGTA*. *Eur J Biochem*, 1983. **135**(1): p. 95-101.

158. Ellis, J.A., M.R. Jackman, and J.P. Luzio, *The post-synthetic sorting of endogenous membrane proteins examined by the simultaneous purification of apical and basolateral plasma membrane fractions from Caco-2 cells*. *Biochem J*, 1992. **283 (Pt 2)**: p. 553-60.
159. Foley, G.E., et al., *Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia*. *Cancer*, 1965. **18**: p. 522-9.
160. Zhou, J., et al., *Expression of early lung cancer detection marker p31 in neoplastic and non-neoplastic respiratory epithelium*. *Lung Cancer*, 1996. **14(1)**: p. 85-97.
161. Heuser, M., et al., *Cytotoxicity determination without photochemical artifacts*. *Cancer Lett*, 2005. **223(1)**: p. 57-66.
162. Scherer, W.F., J.T. Syverton, and G.O. Gey, *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix*. *J Exp Med*, 1953. **97(5)**: p. 695-710.
163. Al Soraj, M., et al., *siRNA and pharmacological inhibition of endocytic pathways to characterize the differential role of macropinocytosis and the actin cytoskeleton on cellular uptake of dextran and cationic cell penetrating peptides octaarginine (R8) and HIV-Tat*. *J Control Release*, 2012. **161(1)**: p. 132-41.
164. Foster, K.A., et al., *Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism*. *Exp Cell Res*, 1998. **243(2)**: p. 359-66.
165. Lieber, M., et al., *A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells*. *Int J Cancer*, 1976. **17(1)**: p. 62-70.
166. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. *J Immunol Methods*, 1995. **184(1)**: p. 39-51.
167. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150(1)**: p. 76-85.
168. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227(5259)**: p. 680-5.
169. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76(9)**: p. 4350-4.
170. Sasse, J. and S.R. Gallagher, *Staining proteins in gels*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2003. **Chapter 10**: p. Unit 10 6.
171. Chevallet, M., S. Luche, and T. Rabilloud, *Silver staining of proteins in polyacrylamide gels*. *Nat Protoc*, 2006. **1(4)**: p. 1852-8.
172. Sonnichsen, B., et al., *Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11*. *J Cell Biol*, 2000. **149(4)**: p. 901-14.
173. Zhang, K. and J. Chen, *The regulation of integrin function by divalent cations*. *Cell Adh Migr*, 2012. **6(1)**: p. 20-9.
174. Heuser, J.E. and R.G. Anderson, *Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation*. *J Cell Biol*, 1989. **108(2)**: p. 389-400.
175. Vercauteren, D., et al., *The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls*. *Mol Ther*, 2010. **18(3)**: p. 561-9.
176. Marina-Garcia, N., et al., *Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation*. *J Immunol*, 2009. **182(7)**: p. 4321-7.
177. Nijhawan, D., et al., *Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation*. *Genes Dev*, 2003. **17(12)**: p. 1475-86.
178. Chang, T.S., et al., *Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2002. **277(28)**: p. 25370-6.
179. Jeong, W., et al., *Roles of TRP14, a thioredoxin-related protein in tumor necrosis factor-alpha signaling pathways*. *J Biol Chem*, 2004. **279(5)**: p. 3151-9.
180. Green, N.M., [73] *Purification of avidin*, in *Methods Enzymol*, B.M. Donald and D.W. Lemuel, Editors. 1970, Academic Press. p. 414-417.

181. Janolino, V., J. Fontecha, and H. Swaisgood, *A spectrophotometric assay for biotinbinding sites of immobilized avidin*. Appl Biochem Biotechnol, 1996. **56**(1): p. 1-7.
182. Schmutz, S., et al., *Cutting edge: IL-7 regulates the peripheral pool of adult ROR gamma+ lymphoid tissue inducer cells*. J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2217-21.
183. Patten, D.R. *Subcellular Fractionation Protocol*. 06.02.2013]; Available from: www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11473.
184. Scientific, T.F. *Pierce Streptavidin Agarose Resins*. 2010 12.02.2013]; Available from: www.piercenet.com/instructions/2160187.pdf.
185. Koraha, J., et al., *Comparison of lipopolysaccharide-binding functions of CD14 and MD-2*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(11): p. 1292-7.
186. Wunder, A., et al., *Enhanced albumin uptake by rat tumors*. International Journal of Oncology, 1997. **11**: p. 497-507.
187. Kremer, P., et al., *Laser-induced fluorescence detection of malignant gliomas using fluorescein-labeled serum albumin: experimental and preliminary clinical results*. Neurol Res, 2000. **22**(5): p. 481-9.
188. Baz, A., et al., *Changes in the subunit distribution of prosomes (MCP-proteasomes) during the differentiation of human leukemic cells*. Int J Cancer, 1997. **72**(3): p. 467-76.
189. Bell, D.H., *Characterization of the fluorescence of the antitumor agent, mitoxantrone*. Biochim Biophys Acta, 1988. **949**(1): p. 132-7.
190. Wan, C.P., C.S. Park, and B.H. Lau, *A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay*. J Immunol Methods, 1993. **162**(1): p. 1-7.
191. Rejman, J., et al., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 1): p. 159-69.
192. Moser, T.L., et al., *Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2811-6.
193. Ohta, T., et al., *High affinity interaction between histidine-rich glycoprotein and the cell surface type ATP synthase on T-cells*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(5): p. 1099-107.
194. Clorius, J.H., et al., *Serum albumin (SA) accumulation by bronchogenic tumours: a tracer technique may help with patient selection for SA-delivered chemotherapy*. Eur J Nucl Med, 1995. **22**(9): p. 989-96.
195. Stehle, G., et al., *The loading rate determines tumor targeting properties of methotrexate-albumin conjugates in rats*. Anticancer Drugs, 1997. **8**(7): p. 677-85.
196. Wunder, A., et al., *Antitumor activity of methotrexate-albumin conjugates in rats bearing a Walker-256 carcinoma*. Int J Cancer, 1998. **76**(6): p. 884-90.
197. Fiehn, C., et al., *Methotrexate (MTX) and albumin coupled with MTX (MTX-HSA) suppress synovial fibroblast invasion and cartilage degradation in vivo*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(7): p. 884-6.
198. Weigand, M., et al., *Mode of action of methotrexate-albumin in a human T-cell leukemia line and activity against an MTX-resistant clone*. Anticancer Drug Des, 2001. **16**(4-5): p. 227-37.
199. Wosikowski, K., et al., *In vitro and in vivo antitumor activity of methotrexate conjugated to human serum albumin in human cancer cells*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(5): p. 1917-26.
200. Funk, D., *Entwicklung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis und Bildung von DNA-Addukten während entzündlicher Prozesse*, in *Präventive Onkologie am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg 2010*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: Heidelberg. p. 207.
201. Mayle, K.M., A.M. Le, and D.T. Kamei, *The intracellular trafficking pathway of transferrin*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(3): p. 264-81.
202. Geisow, M.J., *Fluorescein conjugates as indicators of subcellular pH. A critical evaluation*. Exp Cell Res, 1984. **150**(1): p. 29-35.
203. Fritzsche, M., et al., *Optical pH sensing using spectral analysis*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007. **128**(1): p. 133-137.

204. Johnson, L.V., et al., *Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy*. J Cell Biol, 1981. **88**(3): p. 526-35.
205. Hansen, S.H., K. Sandvig, and B. van Deurs, *Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification*. J Cell Biol, 1993. **121**(1): p. 61-72.
206. Li, N., K.S. Hill, and L.A. Elferink, *Analysis of receptor tyrosine kinase internalization using flow cytometry*. Methods Mol Biol, 2008. **457**: p. 305-17.
207. Ward, E.S., et al., *From sorting endosomes to exocytosis: association of Rab4 and Rab11 GTPases with the Fc receptor, FcRn, during recycling*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(4): p. 2028-38.
208. Synnes, M., et al., *Fluid phase endocytosis and galactosyl receptor-mediated endocytosis employ different early endosomes*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1421**(2): p. 317-28.
209. Bradley, J.R., D.R. Johnson, and J.S. Pober, *Four different classes of inhibitors of receptor-mediated endocytosis decrease tumor necrosis factor-induced gene expression in human endothelial cells*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5544-55.
210. Malek, A.M., et al., *Hypertonicity triggers RhoA-dependent assembly of myosin-containing striated polygonal actin networks in endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(5): p. C1645-59.
211. Larkin, J.M., W.C. Donzell, and R.G. Anderson, *Potassium-dependent assembly of coated pits: new coated pits form as planar clathrin lattices*. J Cell Biol, 1986. **103**(6 Pt 2): p. 2619-27.
212. Larkin, J.M., et al., *Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts*. Cell, 1983. **33**(1): p. 273-85.
213. Judah, J.D., et al., *Potassium depletion inhibits the intracellular transport of secretory proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex*. J Cell Sci, 1989. **92 (Pt 2)**: p. 173-85.
214. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
215. Hannon, G.J., *RNA interference*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 244-51.
216. Yoo, J.W., et al., *Inflammatory cytokine induction by siRNAs is cell type- and transfection reagent-specific*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(4): p. 1053-8.
217. Jackson, A.L., et al., *Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 635-7.
218. Gibson, A.E., et al., *Phenylarsine oxide inhibition of endocytosis: effects on asialofetuin internalization*. Am J Physiol, 1989. **257**(2 Pt 1): p. C182-4.
219. Damke, H., et al., *Tightly regulated and inducible expression of dominant interfering dynamin mutant in stably transformed HeLa cells*. Methods Enzymol, 1995. **257**: p. 209-20.
220. Harush-Frenkel, O., et al., *Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(1): p. 26-32.
221. Singh, R.D., et al., *Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(8): p. 3254-65.
222. Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius, *Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 473-83.
223. Hayer, A., et al., *Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation*. J Cell Biol, 2010. **191**(3): p. 615-29.
224. Gekle, M., et al., *Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum*. J Physiol, 1999. **520 Pt 3**: p. 709-21.
225. Gekle, M., et al., *Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases*. Am J Physiol, 1997. **272**(5 Pt 2): p. F668-77.
226. Fretz, M., et al., *Effects of Na⁺/H⁺ exchanger inhibitors on subcellular localisation of endocytic organelles and intracellular dynamics of protein transduction domains HIV-TAT peptide and octaarginine*. J Control Release, 2006. **116**(2): p. 247-54.
227. Gekle, M., *Renal tubule albumin transport*. Annu Rev Physiol, 2005. **67**: p. 573-94.

228. Caruso-Neves, C., S.H. Kwon, and W.B. Guggino, *Albumin endocytosis in proximal tubule cells is modulated by angiotensin II through an AT2 receptor-mediated protein kinase B activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(48): p. 17513-8.
229. Zhai, X.Y., et al., *Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1523-33.
230. Nagai, J., et al., *Megalins/cubilin-mediated uptake of FITC-labeled IgG by OK kidney epithelial cells*. drug metab pharmacokinet, 2011. **26**(5): p. 474-85.
231. Lambot, N., et al., *Evidence for a clathrin-mediated recycling of albumin in human term placenta*. Biol Reprod, 2006. **75**(1): p. 90-7.
232. Yumoto, R., et al., *Endocytic uptake of FITC-albumin by human alveolar epithelial cell line A549*. drug metab pharmacokinet, 2012. **27**(3): p. 336-43.
233. Yumoto, R., et al., *Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(5): p. L946-55.
234. Tagawa, M., et al., *Low-affinity transport of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN*. drug metab pharmacokinet, 2008. **23**(5): p. 318-27.
235. Ikehata, M., et al., *Comparison of albumin uptake in rat alveolar type II and type I-like epithelial cells in primary culture*. Pharm Res, 2008. **25**(4): p. 913-22.
236. John, T.A., et al., *Quantitative analysis of albumin uptake and transport in the rat microvessel endothelial monolayer*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(1): p. L187-96.
237. Kim, K.J., et al., *Absorption of intact albumin across rat alveolar epithelial cell monolayers*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(3): p. L458-65.
238. Sakagami, M., et al., *Expression and transport functionality of FcRn within rat alveolar epithelium: a study in primary cell culture and in the isolated perfused lung*. Pharm Res, 2006. **23**(2): p. 270-9.
239. Spiekermann, G.M., et al., *Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 303-10.
240. Low, S.C., et al., *Oral and pulmonary delivery of FSH-Fc fusion proteins via neonatal Fc receptor-mediated transcytosis*. Hum Reprod, 2005. **20**(7): p. 1805-13.
241. Bitonti, A.J., et al., *Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9763-8.
242. Vllasaliu, D., et al., *Fc-mediated transport of nanoparticles across airway epithelial cell layers*. J Control Release, 2012. **158**(3): p. 479-86.
243. Lu, L., et al., *Endocytosis of cholera toxin by human enterocytes is developmentally regulated*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(2): p. G332-41.
244. Liu, N.Q., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway*. J Virol, 2002. **76**(13): p. 6689-700.
245. Lu, H., et al., *Inhibition of endocytosis causes phosphorylation (S256)-independent plasma membrane accumulation of AQP2*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(2): p. F233-43.
246. Shigematsu, S., et al., *The adipocyte plasma membrane caveolin functional/structural organization is necessary for the efficient endocytosis of GLUT4*. J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10683-90.
247. Gradishar, W.J., *Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane*. Expert Opin Pharmacother, 2006. **7**(8): p. 1041-53.
248. Kim, J.G., et al., *Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate: the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 751-9.
249. Chen, J., et al., *Transferrin-directed internalization and cycling of transferrin receptor 2*. Traffic, 2009. **10**(10): p. 1488-501.

250. Anabousi, S., et al., *In vitro assessment of transferrin-conjugated liposomes as drug delivery systems for inhalation therapy of lung cancer*. Eur J Pharm Sci, 2006. **29**(5): p. 367-74.
251. Della-Penna, D., R.E. Christoffersen, and A.B. Bennett, *Biotinylated proteins as molecular weight standards on Western blots*. Anal Biochem, 1986. **152**(2): p. 329-32.
252. Holmberg, A., et al., *The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures*. Electrophoresis, 2005. **26**(3): p. 501-10.
253. Green, N.M., et al., *The use of bifunctional biotinyl compounds to determine the arrangement of subunits in avidin*. Biochem J, 1971. **125**(3): p. 781-91.
254. Bonnard, C., D. Papermaster, and J. Kraehenbuhl, *The streptavidin-biotin bridge technique: application in light and electron microscope immunocytochemistry*. Immunolabelling for electron microscopy. Elsevier, Amsterdam, 1984: p. 95-112.
255. Storm, D., M. Loos, and M. Kaul, *Biotinylation of proteins via amino groups can induce binding to U937 cells, HL-60 cells, monocytes and granulocytes*. J Immunol Methods, 1996. **199**(1): p. 87-99.
256. Dubinsky, L., B.P. Krom, and M.M. Meijler, *Diazirine based photoaffinity labeling*. Bioorg Med Chem, 2012. **20**(2): p. 554-70.
257. Hurst, G.B., T.K. Lankford, and S.J. Kennel, *Mass spectrometric detection of affinity purified crosslinked peptides*. J Am Soc Mass Spectrom, 2004. **15**(6): p. 832-9.
258. Santhoshkumar, P. and K.K. Sharma, *Identification of a region in alcohol dehydrogenase that binds to alpha-crystallin during chaperone action*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1598**(1-2): p. 115-21.
259. Ebner, A., et al., *Application of Biotin-4-Fluorescein in Homogeneous Fluorescence Assays for Avidin, Streptavidin, and Biotin or Biotin Derivatives*. 2007. p. 73-88.
260. Hoffman, W.L. and A.A. Jump, *Inhibition of the streptavidin-biotin interaction by milk*. Anal Biochem, 1989. **181**(2): p. 318-20.
261. Phelan, M.C., *Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture*, in *Current Protocols in Cell Biology*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
262. Kandikonda, S., et al., *Cadherin-mediated adhesion is required for normal growth regulation of human gingival epithelial cells*. Cell Adhes Commun, 1996. **4**(1): p. 13-24.
263. Mellgren, R.L., *A Plasma Membrane Wound Proteome: REVERSIBLE EXTERNALIZATION OF INTRACELLULAR PROTEINS FOLLOWING REPARABLE MECHANICAL DAMAGE*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(47): p. 36597-36607.
264. Chiu, M.L., *Introduction to membrane proteins*. Curr Protoc Protein Sci, 2012. **Chapter 29**: p. Unit 29 1.
265. Arnold, T. and D. Linke, *The Use of Detergents to Purify Membrane Proteins*, in *Current Protocols in Protein Science*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
266. Lin, S.H. and G. Guidotti, *Purification of membrane proteins*. Methods Enzymol, 2009. **463**: p. 619-29.
267. Holloway, P.W., *A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples*. Anal Biochem, 1973. **53**(1): p. 304-8.
268. Shogomori, H. and D.A. Brown, *Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly*. Biol Chem, 2003. **384**(9): p. 1259-63.
269. Janes, P.W., S.C. Ley, and A.I. Magee, *Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor*. J Cell Biol, 1999. **147**(2): p. 447-61.
270. Pralle, A., et al., *Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells*. J Cell Biol, 2000. **148**(5): p. 997-1008.
271. Satoh, S., et al., *Distribution of manganese superoxide dismutase in rat stomach: application of Triton X-100 and suppression of endogenous streptavidin binding activity*. J Histochem Cytochem, 1992. **40**(8): p. 1157-63.
272. Praul, C.A., et al., *Detection of Endogenous Biotin-Containing Proteins in Bone and Cartilage Cells with Streptavidin Systems*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **247**(2): p. 312-314.

273. Vaitaitis, G.M., et al., *Modification of enzyme-conjugated streptavidin-biotin western blot technique to avoid detection of endogenous biotin-containing proteins*. Biotechniques, 1999. **26**(5): p. 854-8.
274. Haneji, T. and S.S. Koide, *Transblot identification of biotin-containing proteins in rat liver*. Anal Biochem, 1989. **177**(1): p. 57-61.
275. Nedergaard, J. and B. Cannon, *Overview--preparation and properties of mitochondria from different sources*. Methods Enzymol, 1979. **55**: p. 3-28.
276. Aisen, P., *Transferrin receptor 1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(11): p. 2137-43.
277. Duquesne, K. and J.N. Sturgis, *Membrane protein solubilization*. Methods Mol Biol, 2010. **601**: p. 205-17.
278. Houen, G. and K. Hansen, *Interference of sugars with the binding of biotin to streptavidin and avidin*. J Immunol Methods, 1997. **210**(2): p. 115-23.
279. Frei, A.P., et al., *Direct identification of ligand-receptor interactions on living cells and tissues*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(10): p. 997-1001.
280. Freed, J.K., et al., *Isolation of signal transduction complexes using biotin and crosslinking methodologies*. Proteomics, 2007. **7**(14): p. 2371-4.
281. Sinz, A., S. Kalkhof, and C. Ihling, *Mapping protein interfaces by a trifunctional cross-linker combined with MALDI-TOF and ESI-FTICR mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(12): p. 1921-31.
282. Fiehn, C., et al., *Targeted drug delivery by in vivo coupling to endogenous albumin: an albumin-binding prodrug of methotrexate (MTX) is better than MTX in the treatment of murine collagen-induced arthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(8): p. 1188-91.
283. Chojkier, M., *Inhibition of albumin synthesis in chronic diseases: molecular mechanisms*. J Clin Gastroenterol, 2005. **39**(4 Suppl 2): p. S143-6.
284. Stehle, G., et al., *Albumin synthesis rates in cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response*. Ann Surg, 1998. **228**(5): p. 720.
285. Fearon, K.C., et al., *Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response*. Ann Surg, 1998. **227**(2): p. 249-54.
286. Pejovic, M., A. Stankovic, and D.R. Mitrovic, *Determination of the apparent synovial permeability in the knee joint of patients suffering from osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Br J Rheumatol, 1995. **34**(6): p. 520-4.
287. Cox, B. and A. Emili, *Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 1872-8.
288. Burger, A.M., et al., *Pre-clinical evaluation of a methotrexate-albumin conjugate (MTX-HSA) in human tumor xenografts in vivo*. Int J Cancer, 2001. **92**(5): p. 718-24.
289. Durr, E., et al., *Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface in vivo and in cell culture*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(8): p. 985-92.
290. Madri, J.A. and S.K. Williams, *Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components*. J Cell Biol, 1983. **97**(1): p. 153-65.