

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Einsatz von Nanopartikeln zur Aufreinigung von
Zellorganellen des Rezeptor-Recycling-Weges in
CHO-Zellen**

Masterarbeit

Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Carolin Müller

Hamburg-Bergedorf

Mai 2009

Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. Oliver Ullrich
Prof. Dr. rer. nat. F. Birger Anspach

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich, der es mir ermöglicht hat diese interessante Arbeit im Labor für Molekularbiologie und Zellkulturtechnik an der HAW Hamburg durchzuführen. Für seine Unterstützung und umfangreiche Betreuung während der theoretischen und praktischen Arbeit möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Birger Anspach möchte ich für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit danken. Auch für sein großes Interesse an diesem Projekt, sowie für seine theoretischen und praktischen Hilfestellungen bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.

Bei Frau Elisabeth Schäfer möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe und Unterstützung in beruflichen und privaten Angelegenheiten bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mutter und Torsten, bei meinen Großeltern und bei Max sowie meiner gesamten Familie bedanken, die mich mit viel Geduld und großem Verständnis in allen Lebenslagen begleiten und unterstützen und ohne die ich niemals soweit gekommen wäre.

Danke!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	3
1.1. Nanobiotechnologie.....	3
1.2. Anwendung der Nanobiotechnologie in der Krebstherapie	4
1.3. Endocytose und Krebs	5
1.3.1. Membrantransport.....	7
1.3.2. Rab-Proteine und endocytotisches Recycling	9
1.3.3. Rezeptor-Recycling-Weg des Transferrins	12
1.4. Strategische Überlegungen zur Isolierung der Recycling Endosomen	14
1.5. Verwendete Ferrofluide	15
1.5.1. Polar lösliche Nanopartikel	16
1.5.2. Unpolar lösliche Mikropartikel	17
1.6. Ziel der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Kopplung von holo-Transferrin an Nanopartikel.....	20
2.1.1 Fluoreszenzmarkierung von humanem holo-Transferrin	20
2.1.2 Trennung des Cy3-Tfn-Konjugats von freiem Farbstoff.....	21
2.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford	22
2.1.4 Pufferwechsel des markierten holo-Transferrin	23
2.1.5 Herstellung Liganden-gekoppelter Nanopartikel.....	23
2.1.6 Spektralphotometrische Messung der Nanopartikel	29
2.2 Zellkultur	30
2.2.1. Verwendete CHO-Zelllinie	30
2.2.2. Kultivierung der Zellen	30
2.2.3. Internalisierung von Cy3-Tfn bzw. Tfn-gekoppelten MNP	33
2.3 Optische Analyse der Zellen.....	35
2.3.1. Fixierung der Zellen	35
2.3.2. Lichtmikroskopie	35
2.3.3. Immunfluoreszenzmikroskopie	36
2.3.4. Quantitative Analyse des Fluoreszenzsignals	36
2.4 Quantifizierung der Internalisierung von Tfn-gekoppelten anionischen MNP ..	37
2.4.1. Herstellung des post-nuklearen Überstandes.....	37
2.4.2. Endosomenaufreinigung	38
2.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.4.4. Silberfärbung.....	42

2.4.5. Blotting und Immundetektion	43
3. Ergebnisse	47
3.1. Endocytotischer Transferrin-Zyklus in CHO-Zellen	47
3.2. Etablierung einer photometrischen Messung der MNP	48
3.3. Aufreinigung der Cy3-Tfn-gekoppelten-MNP über eine magnetische Separationssäule	49
3.3.1. Polar lösliche MNP	49
3.3.2. Unpolar lösliche MNP	53
3.4. Aufreinigung der Cy3-Tfn-gekoppelten MNP durch Gelfiltration	57
3.4.1. Gelfiltration von ungekoppelten Cy3-Tfn.....	57
3.4.2. Gelfiltration von Cy3-Tfn gekoppelten kationischen MNP	59
3.4.3. Gelfiltration von Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP	61
3.5. Aufreinigung Cy3-Tfn-gekoppelter MNP mittels FPLC	66
3.5.1. Gelfiltration des ungekoppelten Cy3-Tfn.....	66
3.5.2. Gelfiltration der Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP	68
3.5.3. Gelfiltration der Cy3-Tfn gekoppelten Dextran-MMP	70
3.6. Endosomenisolierung	71
3.6.1. Spektralphotometrische Messung.....	72
3.6.2. Immundetektion von Markerproteinen des Recycling Endosoms	73
3.6.3. Silberfärbung.....	75
4. Diskussion	77
4.1. Aufreinigung der Cy3-Tfn- gekoppletten MNP	77
4.1.1. Abtrennung des ungebundenen Cy3-Tfn von Cy3-gekoppelten MNP mittels Magnetseparation.....	77
4.1.2. Chromatographische Aufreinigung der Cy3-Tfn-gekoppelten Nanopartikel.....	79
4.2. Internalisierung der gekoppelten Nanopartikel	80
4.3. Proteinanalyse der isolierten Endosomen	81
5. Ausblick.....	83
6. Zusammenfassung.....	84
7. Literatur	85
Abkürzungsverzeichnis	90
Abbildungsverzeichnis	92
Tabellenverzeichnis	93
Anhang.....	i

1. Einleitung

1.1. Nanobiotechnologie

Die Nanobiotechnologie wird als eine Basis- und Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts angesehen. Sie stellt, als Brücke zwischen belebter und unbelebter Natur, eine Verbindung zwischen der Nano- und Biotechnologie dar. Hierbei werden biologische Prinzipien, chemische Verfahren, physikalische Gesetze und Ingenieurwissenschaften in Kombination miteinander so genutzt, dass Bausteine und Strukturen im Nanometerbereich (0-100 nm) entstehen, die spezifisch funktionelle Eigenschaften für biomedizinische Anwendungen und diagnostische Methoden besitzen [Sleytr *et al.*, 2007]. So wird z.B. die Anwendung von kleinen Eisenoxidpartikeln in der *in-Vitro*-Diagnostik seit fast 40 Jahren praktiziert, wobei die Entwicklung verschiedener magnetischer Eisenoxide im Nanobereich in den letzten Jahren stark zugenommen hat. Seit die Biokompatibilität von Magnetit bewiesen wurde, stellt dieses Material ein hohes Potential für den Einsatz verschiedener biomedizinischer Anwendungen dar [Gupta, 2004; Pantel *et al.*, 2008]:

- Hilfsmittel für zellbiologische Forschung, um Zellpopulationen zu separieren und aufzureinigen
- Wiederherstellung von Geweben
(Speziell beschichtete Nanopartikel werden zwischen zwei Gewebeoberflächen platziert. Durch Einfluss von Hitze oder Laserstrahlung können die benachbarten Gewebe verbunden werden.)
- Medikamentenentwicklung
(Nanopartikel als Trägerelement für Medikamente, um diese ohne Verlust der Bioverfügbarkeit zum Zielort im Körper des Patienten zu transportieren.)
- Magnetresonanztomographie (MRT)
- Hyperthermie als therapeutische Maßnahme
- Magnetofektion
(Transfektion von magnetischen, Vektor-DNA assoziierten Nanopartikeln)
- Affinitätsaufreinigungen von Molekülen (Proteine, DNA, RNA)

So ist nicht nur die Zahl der wissenschaftlichen Veröffentlichungen in den letzten Jahren um das Dreifache gestiegen, sondern auch die Zahl der europäischen Nanomedizin-Patentanmeldungen vervierfachte sich im gleichen Zeitraum. Den

größten Marktanteil dieser interdisziplinären Querschnittstechnologie nimmt hierbei die Medikamentenentwicklung (Drug-Delivery) ein (Abbildung 1-1) [Monzel, 2006].

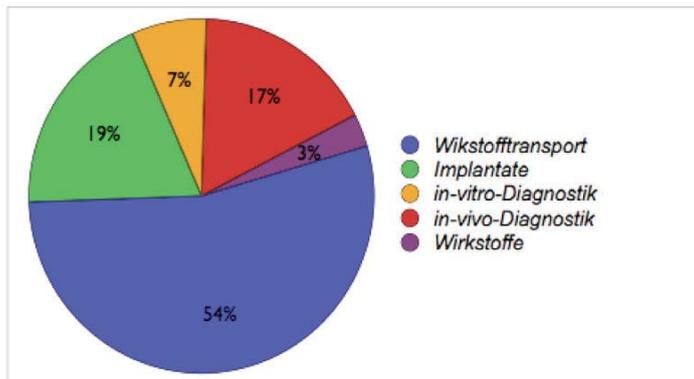


Abbildung 1-1: Tätigkeitsfelder von Unternehmen im Nanobiotechnologie-Sektor [Monzel, 2006].

1.2. Anwendung der Nanobiotechnologie in der Krebstherapie

Nanopartikel können auf verschiedene Weisen in der Krebstherapie eingesetzt werden. Eine Methode stellt die Hyperthermie dar. Hierbei handelt es sich um eine Thermotherapie mittels magnetischer Nanopartikel, die zur Bekämpfung des Prostatakarzinoms eingesetzt wird. Die Partikel gelangen durch ihre Applikation direkt in den Tumor des Patienten. Dort werden sie durch ihre spezielle Beschichtung in die Tumorzelle geleitet. Anschließend wird der Patient in ein mittelfrequentes, magnetisches Wechselfeld geführt, welches eine Spinumkehr der Teilchen bewirkt. Die Energieverteilung führt zu einer lokalen Erwärmung über 45 °C. Die damit verbundene Denaturierung von Proteinen verursacht eine Schädigung der Zellmembran sowie des Zytoskeletts. Damit verlieren die betroffenen Zellen ihre Funktionalität und sterben ab, wohingegen das umliegende Gewebe verschont bleibt. Die abgestorbenen Zellen können von immunkompetenten Zellen, wie Makrophagen bzw. durch die Milz und Leber, abgebaut werden [Gupta, 2004; Johannsen, 2007; Monzel, 2006; Roden, 2004].

Ein zweites Anwendungsbeispiel stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) dar. Hierbei werden die magnetischen Nanopartikel als Kontrastmittel zur Bildgebung von pathologischen Gewebe im Körper des Patienten eingesetzt [Berry *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2003; Wilhelm *et al.*, 2003]. Die Nanopartikel werden dabei mit Proteinen gekoppelt, die eine Bindung an spezifische Liganden an der Oberfläche bestimmter Zellen erlauben. So können z.B. Krebszellen durch ihre erhöhte Rezeptorkonzentration an der Oberfläche nachgewiesen werden. Veränderte Genexpressionen können durch die Kopplung von Markerproteinen an magnetische Nanopartikel detektiert werden und so insbesondere bei der Beurteilung einer Therapie eine wichtige Rolle spielen [Gupta,

2004; He *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2007]. Auf die gleiche Art und Weise können auch apoptotische Zellen in verschiedenen Geweben dargestellt werden [Gupta, 2004].

Für die Verwendung von Nanopartikeln in der Krebstherapie gibt es eine Vielzahl von Beispielen. Alle diese Anwendungen haben jedoch gemeinsam, dass sie bestimmte Oberflächenveränderungen entarteter Zellen ausnutzen. Die Nanopartikel können mit Liganden bestückt werden, die spezifisch an die jeweilige Modifikation der Zellmembran binden können. Sie wirken dadurch direkt an der entarteten Zelle.

1.3. Endocytose und Krebs

Transformierte Zellen sind Zellen, aus denen sich Tumore entwickeln können. Im Vergleich zu gesunden Zellen aus denen sie hervorgegangen sind, weisen diese eine Reihe von Wachstums- und Teilungsanomalien auf. So sind u.a. Veränderungen hinsichtlich der Morphologie, der Membraneigenschaften, der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Wechselwirkung sowie der Proteinsekretion zu verzeichnen [Illiger, 2003]. Zusätzlich interagieren die Membranproteine mit Rezeptortyrosinkinasen (RTKs). Die damit verbundene Weitergabe von Signalen verursacht eine veränderte Zell-Matrix-Adhäsion, wodurch die Beweglichkeit und Invasion bösartiger Tumore begünstigt wird (Abbildung 1-2) [Cavallo und Christofor, 2001].

Die Adhäsion von Zellen innerhalb eines Zellverbandes wird durch Zelladhäsionsproteine (CAMs) gesteuert. Die dazu zählenden Cadherine sind sowohl für die Zelladhäsion, als auch für die Differenzierung von Epithelien von großer Bedeutung [Gumbiner, 2005; Lodish, 2001]. Kürzlich wurde beobachtet, dass die Funktion der E-Cadherine während der Tumorentstehung häufig durch die Expression von mesenchymalen N-Cadherin oder Cadherin 11 ersetzt bzw. überlagert wird [Cavallo *et al.*, 2002]. Außerdem ist die Abnahme der E-Cadherin-Konzentration an der Zelloberfläche, und der damit verbundene Zell-Zell-Adhäsion-Verlust in den meisten epithelialen Krebsarten Voraussetzung für die Zellinvasion und Metastasierung [Christofori, 2003].

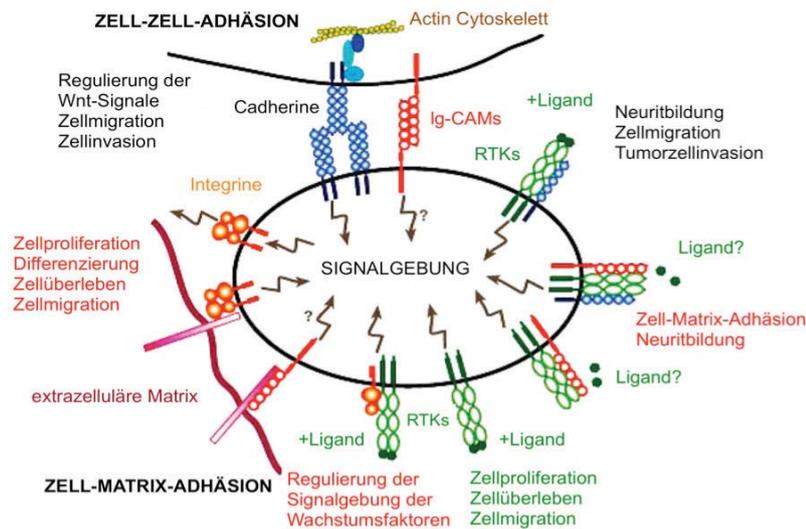


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Interaktionen von Cadherinen, Ig-CAMs, Integrinen und RTKs, die veränderte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen sowie veränderte Membraneigenschaften bei transformierten Zellen verursachen [Christofori, 2003].

Die Architektur eines Gewebes wird nicht nur durch Zell-Zell- sondern auch durch Zell-Matrix-Verbindungen beeinflusst. Dabei binden membrangebundene Zelladhäsionsmoleküle an Bestandteile der zellumgebenden Matrix [Bonifacino und Rojas, 2006; Lodish, 2001]. Die dazu zählenden Integrine sind an der Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt, wobei die Funktion dieser Proteine zwischen den verschiedenen Integrinfamilien sowie den unterschiedlichen Tumortypen variiert [Christofori, 2003].

Bei einer Vielzahl von Tumoren ist zudem häufig eine Überexpression von membranständigen Rezeptoren, wie beispielsweise des Transferrinrezeptors (TfnR) oder des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (epidermal growth factor receptor = EGFR) zu beobachten. Beide werden bereits als Marker für bestimmte Krebserkrankungen beim Menschen angesehen [Högemann-Savellano, 2003; Ritorto *et al.*, 2007]. In gesunden Zellen erfolgt –wie im Beispiel des EGFR- durch die Bindung des Wachstumsfaktors ein intrazelluläres Signal, welches die Proliferation bzw. die Zellteilung stimuliert. Treten Mutationen oder eine Überexpression dieser Rezeptoren auf, kann dies zur unkontrollierten Proliferation und Inhibition der Apoptose führen [Liang *et al.*, 2006]. Somit spielt gerade der EGFR eine entscheidende Rolle in der Krebsentstehung [Ceresa *et al.*, 2006; Voldborg 1997].

Die Zelloberflächenkonzentration der aufgeführten Beispiele für Membranproteine, die bei der Entstehung von Krebszellen eine entscheidene Rolle spielen, wird u.a. durch den endocytotischen Recycling-Weg reguliert [Cheng *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2006; Le *et al.*, 1999 Look und Stow, 2005]. Da diese Regulation in Krebszellen gestört sein könnte, liegt der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Identifizierung möglicher Störungen des Recycling-Weges als Ursache für die Entstehung entarteter Zellen. Hierbei wurde bereits gezeigt, dass insbesondere Rab-Proteine an der Regulation der Konzentration von Membranproteinen beteiligt sind [Ceresa *et al.*, 2006; Ijzendoorn, 2006; Jones *et al.*, 2006; Look und Stow, 2005; Roberts *et al.*, 2004; Shipitsin und Feig, 2004].

Um neue Therapieansätze für die Bekämpfung von Krebs entwickeln zu können, ist es grundlegend, den endocytotischen Recycling-Weg sowie die daran beteiligten Proteine genauer zu untersuchen. Hierbei stellt die Proteomic ein Werkzeug zur Identifizierung relevanter Proteine in der Okogenese dar [Westermeier *et al.*, 2008]. Das Proteom ist die qualitative sowie quantitative Darstellung des gesamten Proteinexpressionsmusters einer Zelle bzw. Organelle unter genau definierten Bedingungen [Lottspeich, 2006]. Die Analyse eines Proteoms kann im Idealfall die aktuell vorhandene Menge jedes interessierenden Proteins liefern. Proteinmuster subzellulärer Fraktionen können sowohl durch eine hochauflösende 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese als auch mit der daran anschließenden Massenspektrometrie kartiert und charakterisiert werden [Huber *et al.*, 2003]. Damit können die Proteome der Zellorganellen gesunder Zellen denen von transformierten Zellen gegenübergestellt und verglichen werden. Dadurch können bestimmte Proteine identifiziert werden, die durch die Tumorgenese in veränderter Form, Konzentration oder Funktion vorliegen.

1.3.1. Membrantransport

Die kleinste Einheit aller Lebewesen ist die Zelle. Sie stellt ein energetisch offenes System dar, das in einem ständigen Stoff- und Energieaustausch mit seiner Umgebung steht. Die selektive Kompartimentierung von Molekülen wird bei jeder Zelle von einer flexiblen Membran, wie z.B. der Plasmamembran übernommen. Diese besteht aus einer 6-10 nm starken Lipiddoppelschicht-Struktur, die zu einem großen Teil aus amphiphatisches Phospholipiden besteht [Chmiel, 2006]. Die Plasmamembran stellt eine selektive Permeabilitätsbarriere zwischen der Zelle und der extrazellulären Umgebung dar, womit die Zelle die Zusammensetzung der Lösungen in ihrem Zellinneren konstant halten kann [Lodish, 2001]. Hierfür hat die Zelle verschiedene Möglichkeiten Substanzen aufzunehmen und abzugeben. Der Vorgang der

Substanzabgabe wird im weitesten Sinne als Sekretion bezeichnet, wobei die auffälligste Form der Stoffabgabe über Sekretvesikel erfolgt. Deren Membran verschmilzt zumindest zeitweise mit der Zellmembran. Diese sogenannte Exocytose gewährt somit eine Abgabe von Inhaltsstoffen über Exocytose-Vesikel, wobei die Integrität der Zelle gewahrt bleibt. Nach diesem Mechanismus werden zum einen Komponenten der Zellmembran ergänzt, wohingegen in den meisten anderen Fällen die leere Vesikelmembran in die Zelle zurückgeholt wird (Endocytose, Membran-Recycling), um einer fortwährenden Vergrößerung der Zellmembran entgegenzusteuern [Plattner und Hentschel, 2002].

Während kleine Moleküle, wie Aminosäuren, Zucker und Ionen von der Zelle durch Proteinpumpen oder Kanäle die Plasmamembran in das Zellinnere passieren, müssen Makromoleküle über an der Zelloberflächenmembran gebildete Vesikel in die Zelle transportiert werden. Diese Substanzaufnahme wird Endocytose bezeichnet. Endocytose erfolgt durch viele Mechanismen, die in zwei Kategorien eingeteilt werden können, Phagozytose (Aufnahme von großen Partikeln) und Pinocytose (Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Substanzen) (Abbildung 1-3) [Conner und Schmid, 2003].

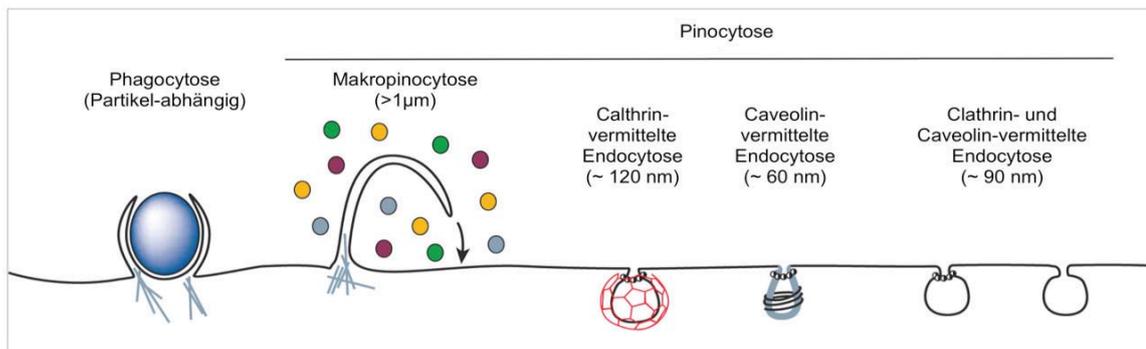


Abbildung 1-3: Verschiedene endocytotische Aufnahmemöglichkeiten von Säugetierzellen, die sich bezüglich der Größe des endocytotischen Vesikels, in der Beladung (Liganden, Rezeptoren und Flüssigkeiten) und im Mechanismus der Vesikelformation unterscheiden [Conner und Schmid, 2003].

Unter den verschiedenen Mechanismen der Internalisierung von Molekülen auf der Zelloberfläche ist die Rezeptorvermittelte Endocytose der am besten verstandene Endocytoseprozess [Maxfield und McGraw, 2004]. Hierbei befinden sich auf der Plasmamembran hochaffine transmembrane Rezeptoren, die mit ihrem gebundenen Liganden in Clathrin-gekoppelte Vertiefungen lokalisiert sind und anschließend in Clathrin-umhüllte Vesikel (clathrin coated vesicles = CCV) von der Plasmamembran abgeschnürt werden, um so in das Innere der Zelle zu gelangen [Conner and Schmid,

2003]. Dort werden sie durch verschiedene Endosomen geleitet. Diese Endosomen werden in frühe und späte Endosomen unterteilt. Internalisierte Moleküle können rezykliert werden, indem sie von den frühen Endosomen oder den späten Recycling Kompartimenten zurück zur Plasmamembran geführt werden. Dadurch können sie an mehreren aufeinanderfolgenden Endocytose-Zyklen beteiligt werden. Endocytotische Rezeptoren können auch in den Endosomen für eine längere Zeit verbleiben oder werden, wie die Rezeptor-Liganden, zu den späten Endosomen und Lysosomen zum Abbau transportiert (Abbildung 1-4) [Lakadamyali *et al.*, 2005; Sorkin und Zastrow, 2002].

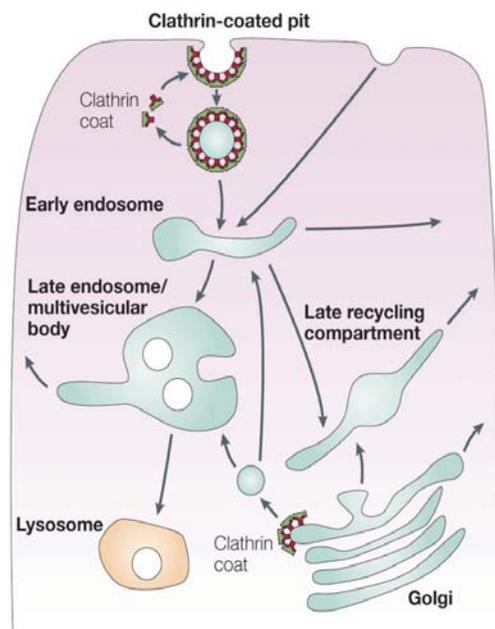


Abbildung 1-4: Rezeptorvermittelte Endocytose-Wege. Viele Makromoleküle gelangen durch die Rezeptorvermittelte Endocytose in die Zelle. Diese Moleküle binden an membranständige Rezeptoren. Der entstandene Rezeptor-Ligand-Komplex gelangt über Clathrin-umhüllte Vesikel, kleine Areale der Plasmamembran, die in das Cytoplasma eingestülpt und abgeschnürt werden können, in das Zellinnere. Nachdem die Vesikel ihre Clathrinschicht verloren haben, fusionieren diese mit bestimmten Membranorganellen, den Endosomen, von denen die Liganden zu ihren unterschiedlichen Zielorten dirigiert werden. Die Rezeptoren können über das späte Endosom zum Lysosom geleitet werden, wo die Rezeptoren abgebaut werden. Die internalisierten Rezeptoren können auch über die Recycling Kompartimente bzw. direkt vom frühen Endosom zurück zur Plasmamembran geführt werden, um dort an weiteren Endocytose-Zyklen teilnehmen zu können [Sorkin and Zastrow, 2002].

1.3.2. Rab-Proteine und endocytotisches Recycling

Die Familie der Rab-Proteine besteht aus mehr als 60 kleinen GTP-bindenden Proteinen, die in verschiedenen Zellkompartimenten spezifisch lokalisiert sind [Ullrich *et al.*, 1993; Maxfield und McGraw, 2004]. Hierbei handelt es sich um kleine monomerische GTPasen (20-30 kDa), die eine Schlüsselrolle in den meisten Membrantransportschritten innehaben. Diese „molekularen Schalter“ wechseln zwischen GDP-gebundener, inaktiver und GTP-gebundener, aktiver Form und können durch die Kombination von GTP-Hydrolyse mit katalytischen Prozessen einen spezifisch gerichteten intrazellulären Vesikeltransport im Zellinneren gewährleisten [Zerial *et al.*, 2001].

Rab4, Rab5 und Rab11 sind in den einzelnen Endosomen lokalisiert und spielen eine Rolle in der Regulation von Endocytose und Recycling. Diese Rab-Proteine werden in unterschiedliche Regionen der Membran sekretiert und begrenzen vermutlich bestimmte spezialisierte funktionelle Membrandomänen [Tischler *et al.*, 1999; Sönnichsen *et al.*, 2000]. Sowohl Rab4 als auch Rab5 weisen eine Lokalisation im Sorting Endosom auf. Wobei Rab4 zusätzlich mit dem endocytotischen Recycling Kompartiment (ERC) assoziiert wird. Die Beteiligung von Rab4 am vom Sorting Endosom ausgehenden Membranrücktransport lässt auf eine Beteiligung am direkten Recycling-Weg, durch das Recycling Endosom (RE), zurück zur Plasmamembran schließen [van der Sluijs *et al.*, 1992]. Rab11 ist in den Membranen des RE und im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert [Urbe *et al.*, 1993; Ullrich *et al.*, 1996] und spielt im Recycling-Zyklus während des Transportes zurück zur Plasmamembran eine Rolle [Ullrich *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1998]. Im Zustand einer gestörten Rab11- Funktion ist z.B. der TfnR im RE konzentriert. D.h. der Transport vom RE ist blockiert. Der Transport des Shiga Toxins vom ERC zum TGN, sowie des Glucosetransporters GLUT4 vom ERC zum insulinregulierten Kompartiment, lassen zudem auf die Beteiligung von Rab11 an vielen, RE-gekoppelten Transportwegen schließen [Wilke *et al.*, 2000; Zeigerer *et al.*, 2002]. Der Mechanismus, durch den Rab11 den Transport vom RE reguliert, ist allerdings noch nicht bekannt. Weitere Rab-Proteine sowie deren Lokalisation in der Zelle sind in Abbildung 1-5 dargestellt.

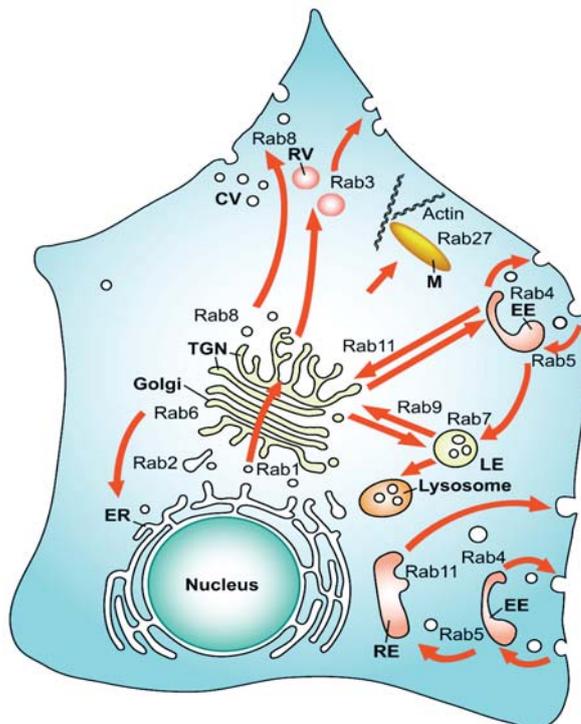


Abbildung 1-5: Intrazelluläre, vesikuläre Transportwege und Lokalisation von ausgewählten Rab-Proteinen. TGN = *trans*-Golgi Netzwerk (engl.: *trans*-Golgi Network), ER = Endoplasmatisches Retikulum, LE = Spätes Endosom (engl.: Late Endosome), RE = Recycling Endosom, EE = Frühes Endosom (engl.: Early Endosome), M = Melanin, CV = Konstitutives sekretorisches Vesikel (engl.: constitutive secretory vesicle), RV = reguliertes sekretorisches Vesikel (engl.: regulated secretory vesicle) [Stenmark und Olkkonen, 2001].

Bei einigen Krebserkrankungen wurde eine veränderte Konzentration der am endocytotischen Recycling Weg beteiligten Rab-GTPasen festgestellt. So findet bei der Entstehung von Brust- und Ovarienkrebs eine Überexpression von Rab25 in den betroffenen Zellen statt [Cheng *et al.*, 2005]. Eine Zusammenfassung der bisher bekannten Rab-Proteine, die eine Expressionsveränderung in Krebszellen zeigen, ist in Tabelle 1-1 aufgeführt.

Tabelle 1-1: Zusammenfassung von Rab-Proteinen, mit einer bekannten Expressionsveränderung bei menschlichen Krebserkrankungen [Chia und Tang, 2009]

Rab	Zelluläre/subzelluläre Membranassoziation	Beobachtete Konzentrations-änderungen bei menschlichen Krebsarten
Rab1	ER-Golgi	erhöhte Expression bei Plattenepithelkarzinom
Rab2	ER-Golgi	Erhöhung bei peripheren Lymphocyten einiger Krebspatienten
Rab3	Synaptische Vesikel, Plasmamembran	Erhöht bei Krebsarten des Nervensystems und neuroendocrinen Zellen
Rab5A	Frühes Endosom	Erhöht bei Kung Andenocarcinom, Leberhypertropie, Schilddrüsenadenom
Rab5B	Frühes Endosom	Senkung bei hoch-metastasierenden Melanomen
Rab7	Spätes Endosom	Erhöht bei Schilddrüsenadenom
Rab11	RE, TGN	Erhöht bei Dysplasie von Barrett's Epithelzellen, als Vorstufe zum Adenokarzinom
Rab20	Apikales Endosom in polarisierten Zellen	Erhöht bei Bauchspeicheldrüsenkrebs
Rab22B/ Rab31	Golgi/TGN	Erhöht bei verschiedenen Brustkrebsarten
Rab23	Plasmamembran, Endosom	Erhöht bei Leberhypertropie und Magenkrebs
Rab25A	ER-Golgi, Autophagosomen, Nucleus	Erhöht in Prostata-, Ovarien- und Brustkrebs

Die beobachtete Konzentrationsänderung vieler Rab-Proteine in Krebszellen verstärkt die Annahme, dass nicht nur die Expression bestimmter Membranproteine bei

entarteten Zellen gestört ist, sondern zudem der konzentrationsregulierende endocytotische Recycling-Weg in den Zellen.

1.3.3. Rezeptor-Recycling-Weg des Transferrins

Die rezeptorvermittelte Aufnahme von Tfn-gebundenen Eisen ist eine der am besten verstandenen Prozesse in der Zellbiologie [Quian *et al.*, 2002]. Aus diesem Grund kann der Rezeptor-Recycling-Weg des Tfn als Ausgangspunkt für die Proteomanalyse verwendet werden, um Erkenntnisse über die beteiligten Proteine gewinnen zu können, damit neue bzw. bessere Therapieansätze für die Bekämpfung von Krebs entwickelt werden können.

Eisen ist ein essentieller Nährstoff, der in vielen zellulären Funktionen, wie der Sauerstoffbindung, dem Sauerstofftransport, Redoxreaktionen, Entgiftung und der Nukleotidsynthese involviert ist [Nunez *et al.*, 1997]. Das Glycoprotein Transferrin (Tfn) ist im Blut das wichtigste Transportprotein für Eisen [Lodish, 2001]. Es gehört zu der Gruppe der Plasmaproteine und kann pro Molekül maximal zwei Fe^{3+} -Ionen binden [Thomas, 1998].

Um Zellen von höheren Lebewesen mit Eisen zu versorgen, wird Tfn über den rezeptorvermittelten Endocytose-Weg in die Zelle aufgenommen, und kann so als ein gut charakterisierter Marker des Rezeptor-Recycling-Weges verwendet werden [Sheff *et al.*, 2002; Tischler *et al.*, 1999]. Dieser Prozess wird durch die Bindung von eisenbeladenden Tfn (holo-Tfn) an einem spezifischen Rezeptor, dem Transferrin-Rezeptor (TfnR) an der Zelloberfläche bei einem neutralen pH-Wert ausgelöst. Dieser Rezeptor-Liganden-Komplex gelangt über Clathrin-umhüllte Vertiefungen, die von der Plasmamembran zu Clathrin-umhüllten Vesikeln abgeschnürt werden, in das Zellinnere. Hier verlieren die Vesikel ihre Clathrin-Beschichtung und werden zu den frühen endosomalen Kompartimenten, den peripheren Sorting Endosomen (SE) geführt. Diese sind durch einen ATPase-katalysierten Prozess in der Lage Protonen in das endosomale Kompartiment zu schleusen, wodurch das endosomale Lumen rasch auf einen pH-Wert von 6,2 absinkt. Dieser saure pH-Wert verursacht die Freisetzung der beiden Tfn-gebundenen Eisenionen, wobei die Affinität des Rezeptors zum entstandenen apo-Tfn erhöht wird. Das freie Fe^{3+} wird zu Fe^{2+} reduziert und anschließend durch den zweiwertigen Metalltransporter (divalent metal transporter = DMT1) von der endosomalen Membran in das Cytosol geleitet [Baravalle *et al.*, 2005]. Das rezeptorgebundene apo-Tfn wird schließlich vom peripher lokalisierten SE zur Plasmamembran zurücktransportiert (Recycling). Dies kann entweder direkt vom SE („schneller“ Zyklus) oder mit einer langsameren Kinetik indirekt („langsamer“ Zyklus)

über das perinukleare „Recycling Endosom“ (RE) erfolgen. Der an der Plasmamembran herrschende neutrale pH-Wert führt am TfnR zu einer Dissoziation von apo-Tfn und zur erneuten Assoziation von holo-Tfn. Dadurch kann ein neuer Zyklus beginnen (Abbildung 1-6) [Bleil und Bretscher, 1982; Daro et al.; 1996; Quian et al., 2002].

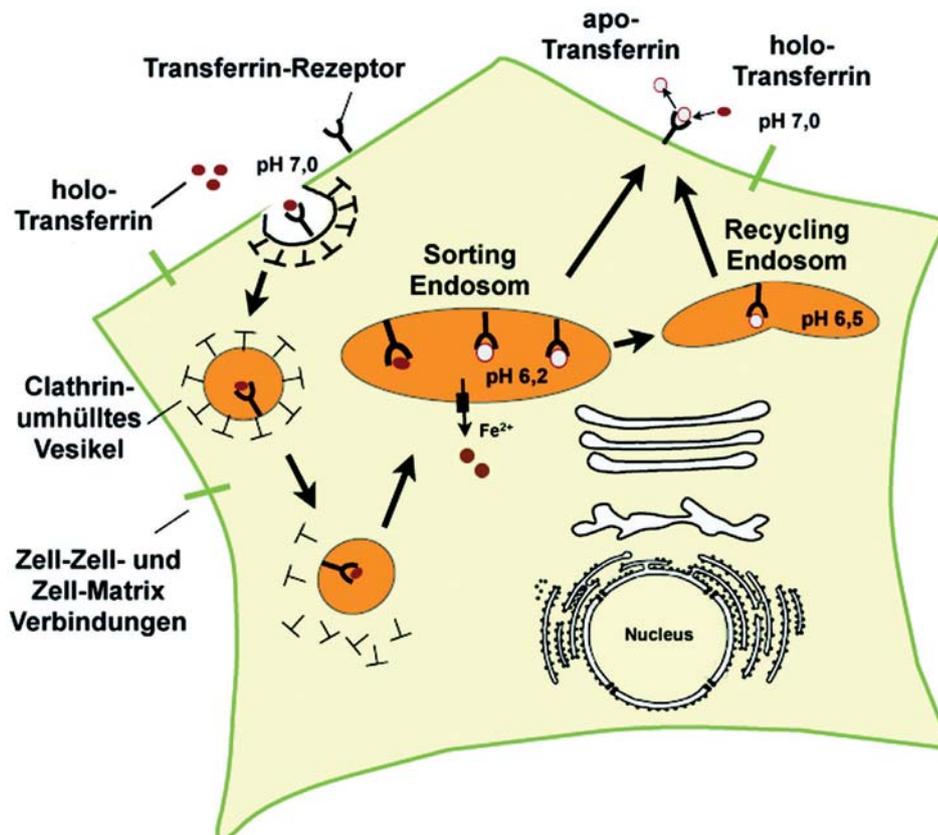


Abbildung 1-6: Der Tfn-Zyklus. Eisenbeladenes Tfn (holo-Tfn) bindet bei einem neutralen pH-Wert auf der Zelloberfläche an den TfnR. Der resultierende Komplex wird über Clathrin-umhüllte Vesikel in die Zelle transportiert. Hier verlieren die Vesikel ihre Clathrin-Hülle und fusionieren mit dem Sorting Endosom. Der dort herrschende pH-Wert von 6,2 verursacht die Freisetzung der Eisenionen vom Tfn und erhöht zugleich die Rezeptoraffinität zum entstandenen eisenfreien Tfn (apo-Tfn), sodass der Rezeptor-Ligand-Komplex bestehen bleibt. Dieser wird anschließend zur Plasmamembran zurückgeführt (Recycling). Entweder gelangt der Komplex direkt vom Sorting Endosom an die Plasmamembran (schnelle Kinetik) oder wird über das Recycling Endosom an die Zelloberfläche geführt (langsame Kinetik). Der hier vorherrschende neutrale pH-Wert bewirkt die Dissoziation von apo-Tfn und eine Assoziation von holo-Tfn, wodurch der Zyklus erneut beginnen kann.

1.4. Strategische Überlegungen zur Isolierung der Recycling Endosomen

Die Isolierung der RE soll mit Hilfe von magnetischen Nanopartikeln (MNP) durchgeführt werden. Damit diese zu ihrem Bestimmungsort, dem RE gelangen, muss eine Aufnahme der Partikel über die rezeptorvermittelte Endocytose geschehen. Da dieser Vorgang über hochaffine Rezeptoren an der Zellmembran realisiert wird, müssen die Partikel mit diesem Liganden gekoppelt werden. Hierbei bietet sich das holo-Tfn als passender Ligand an, denn wie bereits beschrieben, durchläuft das holo-Tfn den rezeptorvermittelten Endocytose- und Recycling-Weg. Auch andere Proteine, wie LDL (Low-Density-Lipoprotein) durchlaufen die rezeptorvermittelte Endocytose. Allerdings verbleiben diese Proteine durch eine Dissoziation von ihrem Rezeptor in der Zelle, wohingegen Tfn lediglich seine Eisenionen in die Zelle abgibt und zusammen mit dem TfnR wieder an die Zelloberfläche gelangt [Lodish, 2001]. Werden die MNP an das Tfn gekoppelt und anschließend von den Zellen internalisiert, könnten die Partikel bis in das Recycling Endosom gelangen. Um die Endosomen zu isolieren, können die Zellen anschließend aufgeschlossen und daraus der post nukleare Überstand hergestellt werden. Dieser Überstand könnte nun über eine magnetische Säule separiert werden, indem die Endosomen, in denen sich die MNP befindenden, durch ein magnetisches Feld in der Säule zurück gehalten, während die restlichen Zellbestandteile von der Säule eluiert werden. Eine Elution der Endosomen wird anschließend durch die Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld erreicht. Bei erfolgreicher Isolierung des RE würde eine Proteomanalyse dieser Zellorganellen erfolgen (Abbildung 1-7).

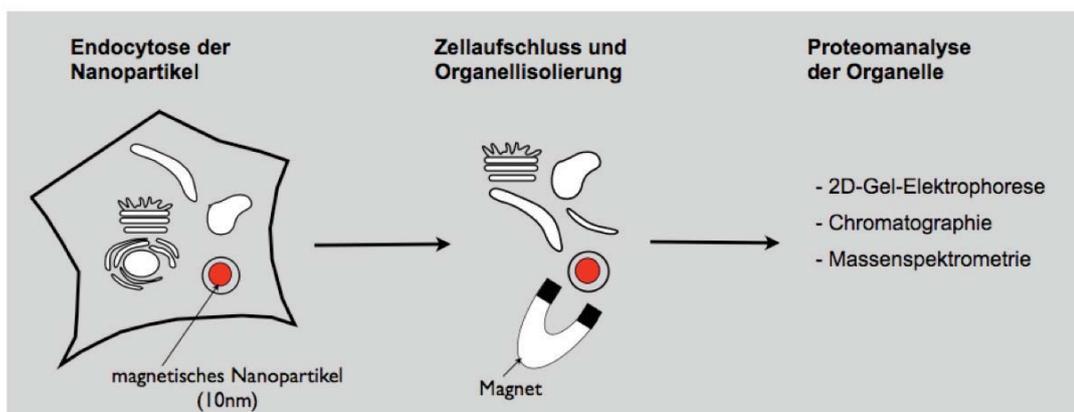
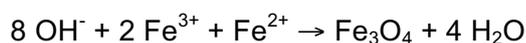


Abbildung 1-7: Strategie zur Isolierung der Recycling Endosomen zur anschließenden Proteomanalyse. Die MNP werden durch das daran gekoppelte Tfn durch rezeptorvermittelte Endocytose von den Zellen internalisiert. Nach dem Zellaufschluss werden die partikelhaltigen, endocytotischen Organellen durch einen Magneten isoliert und anschließend eine Proteomanalyse durchgeführt.

1.5. Verwendete Ferrofluide

Ein Ferrofluid ist eine Flüssigkeit, die magnetisierbar ist. Sie besteht aus ferromagnetischen Teilchen mit einem mittleren Durchmesser von 10 nm, die sich in einer Trägerflüssigkeit befinden. Um eine Agglomeration der Teilchen untereinander durch Van-der-Waals-Anziehungskräfte zu verhindern, sind die einzelnen Partikel mit einer Oberflächenbeschichtung versehen, die an die jeweilige Trägerflüssigkeit angepasst ist. Ein typisches Ferrofluid besteht demnach aus 5 % magnetischem Festkörperanteil, 10 % Oberflächenbeschichtung und 85 % Trägerflüssigkeit. Wird ein äußeres Magnetfeld angelegt, richten sich die Partikel bzw. deren Magnetisierung im Feld aus. Wird dieses Magnetfeld entfernt, so tritt sofort die Gleichverteilung der Richtungen der Partikel ein [Ferrotec, 2008; Odenbach, 2001].

Da Ferrofluide in der Natur nicht existieren, werden sie künstlich hergestellt. Das erste wasserbasierende Ferrofluid wurde bereits 1938 durch Elmore [Elmore, 1938] mit Hilfe einer Kugelmühle hergestellt. Das Mahlen der magnetischen Partikel erstreckte sich über mehrere Wochen und produzierte eine sehr breite Partikelgrößenverteilung. Heute wird eine Methode angewendet, die eine kürzere Herstellungszeit benötigt und zu einer engeren Partikeldurchmesserverteilung führt. Die Synthese von Magnetit wird durch das Zusammenführen einer stöchiometrischen Mischung aus Fe(II)- und Fe(III)-Salzen mit einer alkalischen Lösung realisiert [Maity und Agrawal, 2007].



In den 1960er Jahren entwickelten Rosenweig [Rosenweig, 1965] und Pappel [Pappel, 1965] die Synthese von Öl-basierten Ferrofluiden, die durch spezielle Oberflächenbeschichtungen stabilisiert wurden und bis heute Anwendung finden. Spätere Entwicklungen ergaben eine große Vielzahl von unterschiedlichen magnetischen Kolloiden. So wurden z.B. Partikel entwickelt, die über einen magnetischen Kern verfügen und mit Silikon umhüllt sind oder magnetische Partikel, die mit funktionellen Gruppen, wie Enzymen versehen sind und hauptsächlich in der Biologie und Medizin Anwendung finden [Butter, 2003].

In dieser Arbeit wurden ausschließlich wasserbasierende Ferrofluide zur Kopplung von Tfn an die Oberfläche MNP verwendet.

1.5.1. Polar lösliche Nanopartikel

Für biomedizinische Anwendungen stellt die Firma Ferrotec GmbH verschiedene Ferrofluide her. Da die MNP eine Anwendung in der Zellkultur finden sollen, ist die Auswahl auf wasserbasierende Ferrofluide begrenzt. Zum Testen verschiedener theoretischer Ansätze werden sowohl kationisch als auch anionisch geladene Ferrofluide verwendet.

Anionisch beschichtete MNP

In einer Veröffentlichung von Li *et al.* (2005) wurde beschrieben, dass Proteine wie Insulin und EGF durch eine einfache komplexe Adsorptionsprozedur an anionisch beschichtete MNP gekoppelt werden können. In Abbildung 1-8 ist die adsorptive Bindung von Cy3-konjugiertem Tfn an die Partikeloberfläche schematisch dargestellt.

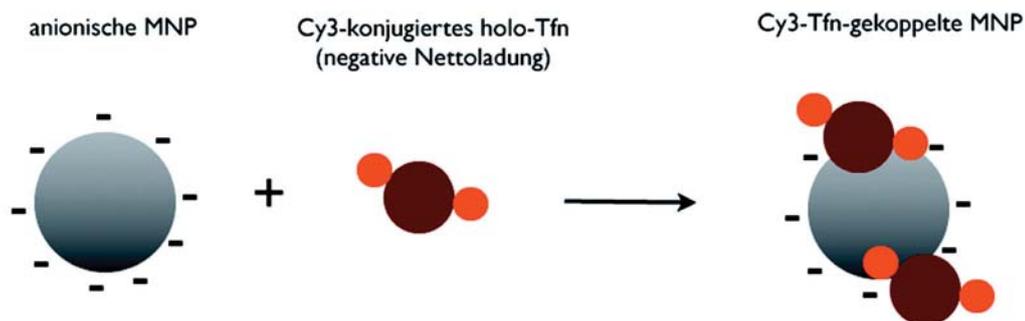


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung der adsorptiven Kopplung von anionisch geladenen MNP und Cy3-konjugiertem holo-Tfn.

Kationisch beschichtete MNP

Der pH-Wert wässriger Flüssigkeiten bestimmt die Ladungseigenschaften der sauren bzw. basischen Seitenketten der Proteine. Der pH-Wert bei dem ein Proteinmolekül die gleiche Anzahl an positiven und negativen Ladungen trägt, wird als isoelektrischer Punkt (Nettoladung = 0) bezeichnet [Chmiel, 2006]. Das in dieser Arbeit verwendete holo-Tfn besitzt einen pI-Wert von 5,2 [Hovanessian und Awdeh, 1976]. Für den Einsatz der MNP in der Zellkultur wird der physiologische pH-Wert von 7,2 benötigt. Das Protein besitzt demnach eine negative Nettoladung und kann über elektrostatische Kräfte eine adsorptive Bindung an die positiv geladenen MNP eingehen. In Abbildung 1-9 ist diese Kopplung schematisch dargestellt.

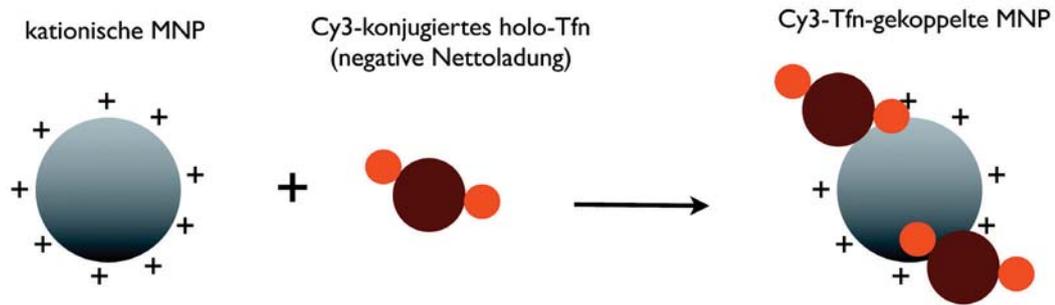


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung der Kopplung von kationisch geladenen MNP und Cy3-konjugiertem holo-Tfn.

1.5.2. Unpolar lösliche Mikropartikel

Neben den polarisierten Nanopartikeln werden zusätzlich Dextran-beschichtete MNP von der Firma Miltenyi Biotec GmbH bezogen. Dadurch die Dextran-Schicht der Partikeldurchmesser vergrößert wird, werden diese Partikel in die Klasse der Mikropartikel eingeordnet. Hierbei werden unkonjugierte Mikropartikel für die chemischen Bindung des Cy3-Tfn an ihre Dextran-Oberfläche sowie Mikropartikel die mit einem Anti-Biotin-Antikörper konjugiert sind, eingesetzt.

Unkonjugierte Mikropartikel

Dextran ist ein aus Glucose-Monomeren bestehendes Polysaccharid [Schlee, 1991]. Durch eine milde Oxidation der im Zuckermonomer benachbarten Diolen mit Natriumperjodat (NaIO_4) können Aldehydgruppen auf der Matrixoberfläche geschaffen werden. Das Perjodat bricht die Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen zwischen den benachbarten Hydroxyl-Resten in den Zuckermonomeren, wodurch zwei aliphatische Aldehyd-Gruppen entstehen. Durch diese Aktivierungsmethode entsteht eine hoch empfindliche Formylgruppe auf der Dextran-Matrix, die für die reduktive Aminierung verwendet werden kann. Da Cy3-Tfn über eine Aminogruppe verfügt, kann eine Kopplungs-Reaktion zwischen dem Tfn und der Formylgruppe erfolgen. Die dabei entstehenden Schiff'schen Basen zwischen dem Liganden und der aldehyd-haltigen Matrix können durch Natriumcyanoborohydrat (NaCNBH_3) reduziert werden [Hermanson *et al.*, 1992]. In Abbildung 1-10 wird diese Kopplungsreaktion schematisch dargestellt.

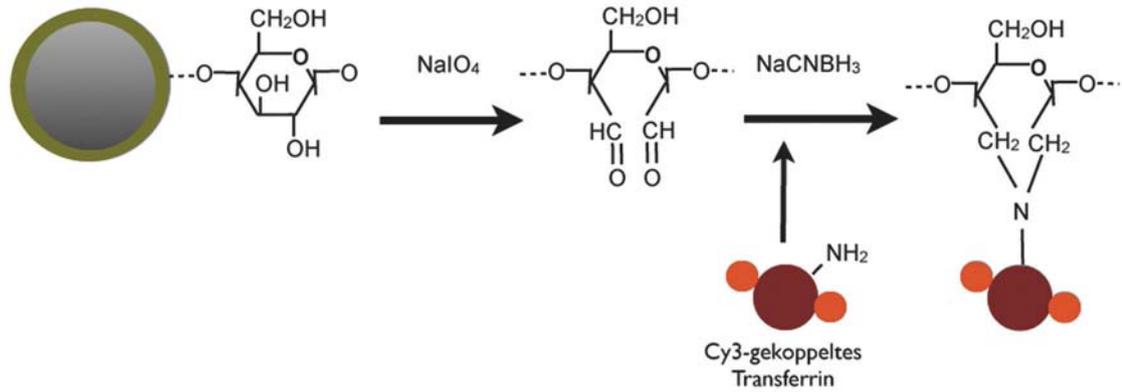


Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der reduktiven Aminierung zur chemischen Kopplung von Cy3-Tfn an die Dextran-Matrix der Mikropartikel.

Anti-Biotin-Antikörper konjugierte Mikropartikel

Des Weiteren sollen Dextran-beschichtete Mikropartikel eingesetzt werden, an die Anti-Biotin-Mausantikörper konjugiert sind. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, welches zur Markierung von Molekülen verwendet werden kann (Biotinylierung) [Boenisch, 2003]. Bei diesen Versuchen kommt nicht Cy3-Tfn zum Einsatz sondern biotinyliertes Tfn (humanes Biotin-Tfn). Somit kann das Tfn durch das konjugierte Biotin an die Antikörper der Mikropartikel binden. Der so entstandene Komplex soll anschließend über den TfnR in die Zelle gelangen. Da das hierbei verwendete Tfn nicht mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert ist, wird nach der Internalisierung der Partikel eine Antikörperinkubation der Zellen mit Cy3-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper durchgeführt. Die Partikel können so in der Fluoreszenzanalyse detektiert werden (Abbildung 1-11).

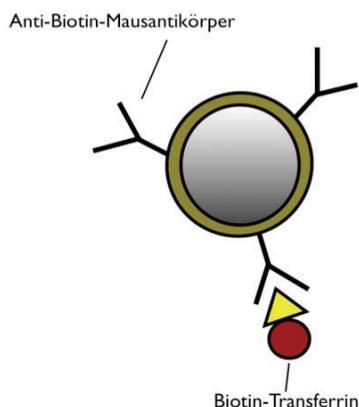


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der Anti-Biotin-Antikörper-konjugierten Mikropartikel. Biotinyliertes Tfn kann an die Antikörper binden damit der Komplex über die Bindung an den TfnR in die Zelle internalisiert wird.

1.6. Ziel der Arbeit

Wird Krebs auf zellbiologischer Ebene betrachtet, zeigen sich häufig veränderte Konzentrationen bestimmter Membranproteine auf der Zelloberfläche. Diese führen u.a. zu einem abnormalen Verhalten der betroffenen Zellen. Sie proliferieren verstärkt und lösen sich aus ihrem natürlichen Zellverband und bilden Metastasen, die wiederum zur Erkrankung weiterer Körperregionen führen. Die Zelloberflächenkonzentration vieler Membranproteine (z.B. EGFR, Cadherine, Integrine) wird durch den endocytotischen Rezeptor-Recycling-Weg reguliert. Um neue Therapieansätze in der Krebsforschung entwickeln zu können, muss geklärt werden, ob die beobachtete Veränderung der Oberflächenkonzentration membranständiger Proteine durch eine Störung des Recycling-Weges verursacht wird. Auffälligerweise zeigen viele Krebsarten veränderte Expressionsmuster der am endocytotischen Recycling-Weg beteiligten Rab-GTPasen. Eine umfassende Antwort auf die Frage nach den verantwortlichen Proteinmarkern für ein abnormales Recycling in Krebszellen kann jedoch nur die noch offene Bestimmung des Subproteoms der RE liefern.

Ziel dieser Masterarbeit ist es, ein Verfahren zur Isolierung des RE aus CHO-Zellen zu entwickeln. Hierfür sollen verschiedene MNP zum Einsatz kommen. Diese können aufgrund ihrer Größe (10 nm) von den Zellen internalisiert werden. Da rezeptorvermittelte Aufnahme und Recycling von Tfn eines der am besten verstandenen Prozesse in der Zellbiologie darstellt, werden die MNP mit eisenbeladenem holo-Tfn gekoppelt, um so eine Lokalisierung der Partikel im RE zu gewährleisten. Damit ein geeignetes Konjugat entwickelt werden kann, werden zunächst verschiedene Partikel mit unterschiedlicher Oberflächenbeschichtung ausgetestet. Zum einen kommen geladene MNP zum Einsatz, die aufgrund ihrer Oberflächenladung (anionisch bzw. kationisch) über Adsorptionskräfte bzw. elektrostatische Wechselwirkungen das Tfn binden sollen. Des Weiteren werden Dextran-beschichtete MNP getestet, an die das Tfn durch reduktive Aminierung gekoppelt werden kann. Eine vierte Methode stellt die Bindung von biotinylierten Tfn an Anti-Biotin-Antikörper, die an die Dextranoberfläche der MNP gekoppelt sind, dar. Der Erfolg der einzelnen Methoden soll über die optische Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Hierbei wird das Tfn mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt und dessen Endocytose in CHO-Zellen beobachtet. Sobald ein Konjugat aus MNP und Tfn von den Zellen erfolgreich internalisiert wird und sich seine Lokalisation in RE bestätigt, erfolgt die Herstellung eines PNS und die anschließende Aufreinigung der im RE lokalisierten MNP über eine magnetische Säule.

2. Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien und Reagenzien, sind im Anhang, unter genauer Auflistung der Hersteller bzw. der Bezugsquelle aufgeführt.

2.1 Kopplung von holo-Transferrin an Nanopartikel

Um das Recycling Endosom aus CHO-Zellen isolieren zu können, musste zunächst ein passendes Konjugat aus holo-Tfn, dem fluoreszierenden Cyanin-Farbstoff, sowie dem jeweiligem Ferrofluid gefunden werden. Eine erfolgreiche Kopplung aller Komponenten zeichnete sich durch ein, nach der Zell-Internalisierung des jeweiligen Konjugates, fluoreszierendes Kompartiment der Recycling Endosomen in den CHO-Zellen aus.

2.1.1 Fluoreszenzmarkierung von humanem holo-Transferrin

Die Fluoreszenzmarkierung ist die Konjugation einer biologischen Komponente mit einem Fluorophor. In dieser Arbeit wurde das Protein holo-Tfn (Tfn) mit dem rot fluoreszierenden Carboncyanin 3 (Cy3) gekoppelt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird vom Hersteller in getrockneter Form geliefert. Hierbei handelt es sich um die wasserlösliche, monoreaktive Form des N-Hydroxycysuccinimid-Cy3-Esters (NHS-Cy3). NHS-Cy3 reagiert vorwiegend mit zugänglichen primären Aminogruppen in deprotonierter Form des jeweiligen Proteins. Bei dieser Kopplung handelt es sich um eine nukleophile Substitution [Amersham pharmacion biotec, 1999]. Der Hersteller empfiehlt diese Reaktion bei einem pH-Wert von 9,3 durchzuführen. Allerdings findet bei diesem alkalischen Milieu auch die konkurrierende Reaktion der Hydrolyse des Esters statt [Mujumdar *et al.*, 1993]. Zudem weicht dieser pH-Wert stark vom physiologischen Milieu ab, was sich negativ auf die Bioaktivität des Proteins auswirken kann. Deshalb wurde ein etwas niedrigerer pH-Wert von 8,5 gewählt, bei dem die Konjugationsreaktion gegenüber der Hydrolysereaktion bevorzugt stattfindet [Hahn *et al.*, 2000].

Die Konjugation von Tfn und Cy3 erfolgte in abgepufferter Lösung in einem Mikroreaktionsgefäß. Die dafür benötigten Materialien sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Für die Fluoreszenzmarkierung von Tfn benötigte Materialien.

Konjugationspuffer	0,1 M Na ₂ CO ₃ in ddH ₂ O 0,1 M NaHCO ₃ in ddH ₂ O
Chemikalien	1 mg NHS-Cy3 1 mg humanes holo-Transferrin

Zur Herstellung des Konjugationspuffers wurde der pH-Wert der 0,1 M NaHCO₃-Lösung mit Hilfe der 0,1 M Na₂CO₃-Lösung auf 8,5 eingestellt. Das Protein wurde in 1 ml des Konjugationspuffers solubilisiert. Die so entstandene Proteinlösung wurde anschließend mit dem NHS-Cy3 durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Lösung unter Verwendung einer Mikro-Pipette vorsichtig vermischt. Dieses Fluorophor/Protein-Verhältnis zeigte bereits in voran gegangenen Arbeiten eine deutliche Fluoreszenz, ohne dabei die biologische Aktivität des Proteins zu verlieren [Khoury, 2006]. Die Konjugationsreaktion erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss, wobei der Ansatz alle 15 min durch invertieren gemischt wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Konjugationslösung für 5 min mit 15.000 x g bei 4 °C zentrifugiert, um eventuell entstandene Agglomerate zu entfernen. Im Anschluss folgte die Trennung des Konjugates vom freien Fluorophor durch eine Gelfiltration.

2.1.2 Trennung des Cy3-Tfn-Konjugats von freiem Farbstoff

Das Cy3-makierete holo-Transferrin (Cy3-Tfn) wurde mit Hilfe der Ausschlusschromatographie aufgereinigt. Die so genannte Gel-Chromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe. Hierbei können Moleküle ab einem bestimmten Durchmesser nicht in die Poren des Trenngels eindringen, und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschlussvolumen. Kleinere Moleküle bewegen sich nicht nur ungehindert zwischen den einzelnen Teilchen der stationären Phase, sondern dringen außerdem in ihre Poren ein, wodurch sie eine Verzögerung in der Elution erfahren [Lottspeich, 2006].

Das hier verwendete Säulenmaterial Sephadex G-25 hat ein Molekularmassen-Ausschlusslimit von 1000 bis 5000 Da [Sigma-Aldrich, 2003]. Im Gegensatz zum Cy3-Tfn dringt das ungebundene Cy3 in das Porensystem der stationären Phase ein, und wird zu einem späteren Zeitpunkt von der Säule eluiert. Verwendete Materialien finden sich in Tabelle 2-2.

Tabelle 2-2: Für die Trennung des Cy3-Tfn vom freien Farbstoff verwendete Materialien.

Elutionspuffer	20 mM Hepes, 150 mM NaCl in dd H ₂ O; pH 7,2
Säulenmaterial	2,5 g Sephadex G-25 Fine in 15 ml Elutionspuffer

Um ein Säulenvolumen von 10 ml zu erhalten, wurden 2,5 g des Sephadex-Trockenmaterials in ein 50 ml Falcon-Röhrchen eingewogen und in 15 ml Elutionspuffer gelöst. Diesen Ansatz ließ man zunächst für mindestens 3 h bei Raumtemperatur auf einem langsam rotierenden Inkubationsrad quellen. Anschließend wurde das gequollene Material für 1 min bei 300 x g zentrifugiert, um feine Partikel (fines), welche die Säule verstopfen könnten, zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet durch vorsichtiges Invertieren in Elutionspuffer resuspendiert. Diese Prozedur wiederholte sich zweimal. Danach wurde das Säulenmaterial in eine BioRad-Säule überführt. Nachdem der Elutionspuffer vollständig in die Säule eingetreten war, wurde das Säulenmaterial mit der Cy3-Tfn-Lösung überschichtet. Nach dem Eintritt der Cy3-Tfn-Lösung wurde zunächst 1 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben, und im Anschluss mit einem passenden Volumen des Elutionspuffers eluiert. Auf der Säule konnte das Ausbilden von zwei Banden beobachtet werden. Bei der schnelleren Bande handelte es sich um den Cy3-Tfn-Komplex, bei der langsameren Bande um den ungebundenen Cy3-Farbstoff. Das Eluat wurde in einzelnen Reaktionsgefäßen fraktioniert (500 µl) aufgefangen. Mit dem Bradford-Assay wurde im Anschluss die Proteinkonzentration bestimmt. Cy3-Tfn-Fractionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden vereinigt, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der während der Gelfiltration von Cy3-Tfn gesammelten Fraktionen wurde der Bradford-Assay gewählt. Grundlage dieser quantitativen Nachweismethode stellt der Säurefarbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 dar. Dieser kommt in drei Zuständen vor, die jeweils bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren. Durch die Bindung an ein Protein wird der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt. Somit kann die Absorption bei 595 nm gemessen werden. Coomassie Brilliant Blue-G250 bindet vorwiegend an basische Aminosäuren, woraus eine unterschiedlich starke Absorption verschiedener Proteine resultiert. Die Absorptionsmessungen sollten sich grundsätzlich auf eine Eichgerade beziehen. Hierfür kam als Eichprotein Rinderserumalbumin (BSA) zum Einsatz. Von diesem wurde eine Verdünnungsreihe in den Konzentrationen von 1-25 µg/ml in Elutionspuffer hergestellt. Als Probenpuffer und Nullwert diente hierbei

der Elutionspuffer. In Einmalküvetten wurden 80 % der zu messenden Probe (Probenpuffer/ Standards/ Proben) mit 20 % der 5 x Farblösung durch mehrmaliges Invertieren vermischt (bezogen auf das Endvolumen von 1 ml). Schließlich wurden die Proben nach 5 min Inkubationszeit gegen den Nullwert vermessen und analysiert [Roth, 2006].

2.1.4 Pufferwechsel des markierten holo-Transferrin

Cy3-Tfn liegt nach der Gelfiltration in einem Puffer vor (Elutionspuffer: 20 mM Hepes, 150 mM NaCl in dd H₂O; pH 7,2), welcher bei der späteren Kopplung von Cy3-Tfn an die Dextran-Mikropartikel einen negativen Einfluss hat. Die dabei stattfindende reduktive Aminierung wird durch die Puffersubstanz Hepes gestört, da das im Hepes enthaltene Amin um die Bindungsstellen der Dextran-Schicht mit dem Tfn konkurriert. Um dies zu verhindern, wurde für die Kopplung von Cy3-Tfn an die Dextran-beschichteten Mikropartikel eine Umpufferung des konjugierten Proteins in einem NaCl-Puffer durchgeführt. Diese Umpufferung geschah wiederum mit Hilfe der Gelfiltration. Die dabei verwendeten Materialien sind in Tabelle 2-3 aufgeführt.

Tabelle 2-3: Für die Umpufferung von markiertem Tfn benötigte Materialien.

Säule	HiTrap Desalting-Säule 5 ml, gepackt mit Sephadex G-25 Superfine
Lösungen	0,15 M NaCl; pH 6-8 20 % iger Ethanol in ddH ₂ O
Protein	200 µl Cy3-Tfn in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl in dd H ₂ O; pH 7,2

Die HiTrap Desalting-Säule wurde vom Hersteller in gebrauchsfertiger Form geliefert. Zur Umpufferung von Cy3-Tfn wurde die Säule zunächst mit NaCl-Puffer gespült. Dabei verdrängt der Puffer das in der Säule enthaltene Ethanol. Danach wurde die Cy3-Tfn-Lösung auf die Säule injiziert. Während der gesamten Gelfiltration musste darauf geachtet werden, dass keine Luft in das Säulenbett gelangt. Der Säulenaustritt wurde in 100 µl-Fractionen gesammelt. Nach der Elution der Cy3-Tfn-Lösung, wurde die Säule mit 20 %igem Ethanol solange gespült, bis keine Färbung der Säule mehr sichtbar war.

2.1.5 Herstellung Liganden-gekoppelter Nanopartikel

Für die Kopplung des Tfn an ein Ferrofluid wurden in dieser Arbeit unterschiedliche magnetische Nanopartikel (MNP) untersucht (Tabelle 2-4).

Tabelle 2-4: Zur Kopplung von Tfn an verwendete Ferrofluide benötigte Materialien.

Verwendete Ferrofluide	
Ferrofluid Ferrotec	kationisches Ferrofluid EMG 607 anionisches Ferrofluid EMG 707
Ferrofluid Miltenyi	Anti-Biotin-Mikropartikel
Bindungspuffer	
Ferrofluide	Bindungspuffer: 0,5 mg/ml BSA und 10 mM Hepes in Ham's F12 / PBS ⁻
Anti-Biotin-Mikropartikel	Bindungspuffer: 20 mM Hepes, 150 mM NaCl in ddH ₂ O, pH 7,2 Equilibrierungspuffer: 70 % Ethanol in ddH ₂ O Waschpuffer: 1 mg/ml BSA Bindungspuffer
Gekoppeltes Protein	
Ferrofluide	0,1 mg/ml Cy3-Tfn
Anti-Biotin-Mikropartikel	1 mg/ml humanes Transferrin-Biotin gelöst in Bindungspuffer
Weitere Reagenzien bzw. Lösungen und Materialien	
	PBS ⁻ Ham's F12 μ-Säule + μMACS Magnet

Sowohl ein anionisch, als auch ein kationisch geladenes, in Wasser gelöstes Ferrofluid wurden von der Firma Ferrotec GmbH bezogen. Beide Suspensionen wurden auf die gleiche Weise mit dem Cy3-Tfn-Konjugat nach einem von Li *et al.* (2005) veröffentlichten Protokoll gekoppelt. Außerdem wurden Anti-Biotin-Mikropartikel von der Firma Miltenyi Biotec GmbH bezogen. An die Dextranschicht dieser MNP ist zusätzlich ein Anti-Biotin-Antikörper gekoppelt. Die Partikel werden vom Hersteller in Suspension geliefert, welche 0,05 % Natriumazid enthält. Die Konzentration der Mikropartikel ist nicht angegeben.

Zur Herstellung Liganden-gekoppelter MNP wurde das Ferrofluid 400-fach in Bindungspuffer verdünnt. Diese Lösung wurde mit Cy3-Tfn (Endkonzentration von 0,1 mg/ml) in einem Mikroreaktionsgefäß vorsichtig vermischt.

Die Anti-Biotin-Mikropartikel mussten zunächst wegen dem, im Puffer enthaltenen, giftigen Natriumazids, in den Bindungspuffer umgepuffert werden. Dies geschah mit

Hilfe der μ -Säule, die zunächst in den μ MACS-Magneten platziert und gewaschen wurde. Das Volumen der aufgegebenen Lösungen betrug jeweils 100 μ l. Folgende Waschschriffe waren durchzuführen: einmaliges Waschen mit Equilibrierungspuffer, fünfmaliges Waschen mit PBS⁻ sowie zweimaliges Waschen mit Bindungspuffer. Danach wurden 100 μ l der Anti-Biotin-Mikropartikel auf die Säule gegeben, und zwei Mal mit 100 μ l Bindungspuffer gewaschen. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurde die Säule auf einem 15 ml Falcon-Röhrchen platziert. Die Partikel wurden mit 100 μ l Bindungspuffer durch Zentrifugation für 5 min mit 800 x g bei 4 °C eluiert. Die eluierten Mikropartikel wurden in 360 μ l Bindungspuffer aufgenommen und 40 μ l einer Biotin-Transferrin-Stammlösung dazu gegeben und vermischt.

Die einzelnen hergestellten Bindungssuspensionen wurden auf kleinere PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt, um die Grenzfläche der Gasphase und damit die Gefahr einer Oxidation zu minimieren. Die Reaktionsgefäße wurden auf dem Inkubationsrad bei 4 °C platziert und für 12 h (polar löslichen MNP) bzw. für 1 h (Anti-Biotin-Mikropartikel) inkubiert. Damit das Tfn nicht mit dem BSA um die Oberfläche der polar löslichen MNP konkurrierte, erfolgte die Zugabe der zuvor sterilfiltrierten BSA-Lösung erst nach der Inkubationszeit. Dadurch sollten freie Bindungsstellen auf der MNP-Oberfläche abgesättigt werden.

Nach der Inkubation erfolgte, die Aufreinigung der gebundenen Partikel entweder mit Hilfe der magnetischen μ -Säule oder durch Gelfiltration mittels Sepharose 4B, um die gebundenen MNP vom ungekoppelten Tfn zu trennen.

Dextran-Mikropartikel

Unkonjugierte Dextran-Mikropartikel (Basic MicroBeads) der Firma Miltenyi Biotec GmbH sind mit einer Dextran-Schicht umhüllte MNP. Diese Partikel liegen in einem PBS⁻-Puffer vor, welcher 5 mM EDTA sowie 0,05 % Natriumazid enthält. Die Konzentration der Partikel wird vom Hersteller nicht angegeben. Jegliche verwendete Materialien sind in Tabelle 2-5 aufgelistet.

Tabelle 2-5: Für die Kopplung von Cy3-Tfn an Dextran-Mikropartikel verwendete Materialien.

Verwendete Ferrofluide	
Mikropartikel	Dextran-Mikropartikel (Basic MicroBeads)
Puffer	
Equilibrierungspuffer	70 % Ethanol in ddH ₂ O
Acetatpuffer	0,1 M Natriumacetat und 0,15 M NaCl in ddH ₂ O; pH 6
Natrium-Bicarbonat-Puffer	0,02 M NaHCO ₃ und 0,15 M NaCl in ddH ₂ O; pH 8,7
Natriumchlorid-Puffer	0,15 M NaCl in ddH ₂ O; pH 6-8
Waschpuffer	1 mg/ml BSA in PBS ⁻
Gekoppeltes Protein	
	Cy3-Tfn in 0,15 M NaCl-Lösung
Weitere Reagenzien bzw. Lösungen	
	1 mg Natriumcyanoborohydrid
	1 mg Natriumperjodat
Weitere Materialien	
	μ-Säule + μMACS Magnet
	Dialyseschlauch: MWCO: 12000 -14000 Da

Die Kopplung von Cy3-Tfn an die Dextran-Mikropartikel basierte, auf dem von Wissleder *et al.* (2003) veröffentlichtem Patent. Hierbei wurden auf der Dextran-Matrix Formylgruppen aktiviert, an die das Cy3-Tfn durch reduktive Aminierung binden kann.

Die Dextran-Mikropartikel mussten zunächst auf den Acetatpuffer umgepuffert werden. Dazu wurde die μ-Säule in den μMACS-Magneten platziert. Das Volumen der aufgegebenen Lösungen betrug jeweils 100 μl. Folgende Waschschrte waren durchzuführen: einmaliges Waschen mit Equilibrierungspuffer, fünfmaliges Waschen mit PBS⁻ sowie zweimaliges Waschen mit Bindungspuffer. Im Anschluss wurden 100 μl der Dextran-Mikropartikel auf die Säule gegeben. Nachdem auch die Partikelsuspension vollständig in die Säule eingedrungen war, wurde diese zweimal mit Acetatpuffer gewaschen und anschließend aus dem Magnetfeld entfernt. Nach dem Platzieren der Säule in ein 15 ml Falcon-Röhrchen wurden die Partikel mit 200 μl Acetatpuffer durch Zentrifugation für 5 min mit 800 x g bei 4 °C eluiert [Miltenyi Biotec GmbH, 2008].

Um die partielle Oxidation von Dextran durchzuführen, wurde in einem Reaktionsgefäß Natriumperjodat vorgelegt. Die umgepufferten von der μ-Säule eluierten Mikropartikel

wurden zum Natriumperjodat pipettiert und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer Mikropipette vermischt. Die partielle Oxidationsreaktion geschah unter Ausschluss von Licht, für 40 min auf dem Inkubationsrad bei Raumtemperatur. Unterdessen wurde die im Anschluss stattfindende Dialyse vorbereitet. Zum Stoppen der Oxidationsreaktion erfolgte eine Dialyse gegen Natriumbicarbonat. Hierfür kam eine Dialysemembran mit einem MWCO 12000-14000 Da zur Anwendung, die vor ihrem Einsatz durch mehrfaches Spülen mit ddH₂O vom Natriumazid befreit wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die oxidierten Mikropartikel in den Dialyseschlauch überführt. Um ein Entweichen der Probe zu verhindern, waren die Enden des Schlauches jeweils mit einer Dialyseklammer verschlossen. Der Dialyseschlauch wurde nun in ein Becherglas, mit dem 100fachen Volumen der Probengesamtmenge an Puffer, gehängt. Die Dialyse wurde unter Rühren bei 4 °C durchgeführt. Nach 1,5 h wurde der Dialyseschlauch in ein neues, mit Natriumchloridpuffer gefülltes Becherglas überführt und die Mikropartikel-Lösung weitere 1,5 h dialysiert.

Im direkten Anschluss an die Dialyse erfolgte eine dreistündige Inkubation der umgepufferten Mikropartikel mit dem in Natriumchloridpuffer befindlichen Cy3-Tfn. Die so initiierte Kopplung von Cy3-Tfn mit den Mikropartikeln geschah unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur auf dem Inkubationsrad. Um die nun entstanden Schiff'schen Basen der mit Cy3-Tfn gekoppelten Dextran-Schicht zu reduzieren, wurde die Cy3-Tfn-Mikropartikel-Lösung in ein Reaktionsgefäß, in welches zuvor Natriumcyanoborohydrat vorgelegt wurde, überführt und vermischt. Die Inkubation der Lösung erfolgte unter Rotation bei 4 °C über 12 h. Danach wurde die Cy3-Tfn-Mikropartikel-Lösung entweder über eine magnetische Säule, oder über die Gelfiltration mittels Sepharose 4B sowohl vom Natriumcyanoborohydrat als auch vom ungebundenen Cy3-Tfn getrennt.

3.1.3.1 Trennung der Tfn-gebundenen MNP von ungebundenen Tfn

Im Anschluss an die zuvor beschriebene Kopplung der MNP an Tfn folgte die Trennung vom freien Konjugat. Diese Trennung wurde in Protokoll 1 nach einer von Li *et al.* (2005) veröffentlichten Prozedur durchgeführt. Hierbei kam die μ -Säule und der dazu gehörige μ MACS-Magnet der Firma Miltenyi Biotec GmbH zum Einsatz. Im 2. Protokoll wurde alternativ eine Gelfiltration mit Hilfe des Säulenmaterials Sepharose 4B zur Trennung des freien Konjugats von den gebundenen MNP entwickelt (Materialien in Tabelle 2-6).

Tabelle 2-6: Zur Trennung der Tfn-gebundenen MNP von ungebundenen Tfn benötigte Materialien.

Lösungen	Waschpuffer: 0,5 mg/ml BSA und 10 mM Hepes in Ham's F12 bzw. PBS ⁻ Equilibrierungspuffer: für μ -Säule: 70 % Ethanol in ddH ₂ O für Sepharose 4B-Säule: 20 % Ethanol in ddH ₂ O
	Ham's F12
	PBS ⁻
	Tfn-gekoppelte MNP

Für beide Protokolle wurde der Waschpuffer der jeweilige Equilibrierungspuffer sowie das PBS⁻ sterilfiltriert, um unerwünschte Luftblasen zu vermeiden.

Protokoll 1: Trennung der Tfn-gekoppelten MNP von freiem Cy3-Tfn über eine magnetische Säule

Die Säule wurde zunächst in den μ MACS-Magneten platziert und wie bereits beschrieben mit Equilibrierungspuffer, PBS⁻ und Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Cy3-Tfn-MNP-Ansatz auf die Säule gegeben. Nachdem der Ansatz vollständig in die Säule gelaufen war, folgte ein zehnmaliges Waschen der Säule mit 200 μ l Waschpuffer. Die Elution der Tfn-gekoppelten MNP konnte auf zwei Weisen erfolgen: Entweder wurde die jeweilige Säule aus dem Magneten entfernt und auf ein Reaktionsgefäß platziert, wobei die Elution durch einfache Schwerkraft erfolgte. Oder die Elution geschah durch Zentrifugation. Hierbei wurde die Säule in einem 15 ml Falcon-Röhrchen platziert und für 5 min mit 800 x g bei 4 °C zentrifugiert. Bei beiden Elutionsarten wurde mit 1 ml Waschpuffer eluiert. Sollte eine anschließende Detektion der Nanopartikel durch eine photometrische Messung stattfinden, musste darauf geachtet werden, dass der Waschpuffer nicht mit Ham's F12, sondern mit PBS⁻ angesetzt wurde.

Protokoll 2: Trennung der Tfn-gekoppelten MNP von freiem Cy3-Tfn durch Gelfiltration

Eine zweite Aufreinigungsmethode für die gekoppelten MNP wurde auf Grundlage der Gelfiltration entwickelt. Das hierfür verwendete Säulenmaterial Sepharose 4B verfügt über ein Molekularmassen-Ausschlusslimit von 60 bis 20.000 kDa [Sigma-Aldrich, 2006]. Sowohl das freie Tfn als auch die Tfn-gekoppelten MNP können in die Poren der stationären Phase eindringen und werden nach ihrer Größe getrennt, wobei die Tfn-gekoppelten MNP zuerst das Säulenbett verlassen. Zunächst wurde eine 5 ml Sepharose-Säule verwendet. Hierfür wurde das Sepharose 4B-Säulenmaterial in eine BioRad-Säule pipettiert. Nachdem sich das Material gleichmäßig in dieser Säule

abgesetzt hatte, wurde die Säule mit einem ausreichenden Volumen an Waschpuffer gespült. Die anschließende Elution der Cy3-Tfn-gekoppelten Nanopartikel erfolgte ebenfalls mit Waschpuffer solange, bis keine Färbung des Cy3-Tfn mehr auf der Säule zu beobachten war. Das Eluat wurde hierbei in 100 µl-Fractionen aufgefangen und analysiert.

Um eine bessere Trennung der Tfn-gekoppelten MNP zu erreichen, kam eine schmalere und zugleich längere, bereits vorbereitete Säule (Durchmesser: 0,5 cm, Länge 21 cm) zum Einsatz. Auch hierbei wurde das Säulenmaterial Sepharose 4B verwendet. Durch die veränderte Säulenform wurden für den Lauf des Puffers ein größerer Druck, sowie gleichmäßige Flußraten benötigt. Deshalb wurde die Säule an eine FPLC-Anlage angeschlossen. Zur Equilibrierung dieser Säule wurde eine Flussrate von 0,2 ml/min gewählt. Zunächst wurde das zweifache Säulenvolumen an Waschpuffer auf die Säule gegeben. Die aufzureinigende Partikelsuspension wurde über das Injektionsventil in die Probenschleife injiziert und gelangte somit auf die angeschlossene Säule. Über den gesamten Säulenlauf der Partikelsuspension wurde das Eluat in 200 µl-Fractionen aufgefangen. Nach der vollständigen Elution der jeweiligen Partikelsuspension wurde die Säule mit einem zweifachen Säulenvolumen Waschpuffer gespült. Um die Trennung der gekoppelten Partikel vergleichend auswerten zu können, wurde zudem ungekoppeltes Cy3-Tfn über die Säule gegeben.

Alle gesammelten Fractionen wurden zunächst im Spektralphotometer gemessen und anschließend zur Internalisierung auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Für die PNS-Herstellung wurden die im Spektralphotometer untersuchten Fractionen, welche Tfn-gekoppelte MNP enthielten, vereinigt, und zur Internalisierung auf die Zellen gegeben.

2.1.6 Spektralphotometrische Messung der Nanopartikel

Da die MNP weder mit dem Auge noch unter dem Mikroskop zu erkennen sind, wurden die einzelnen Ansätze spektralphotometrisch vermessen. Das hierfür eingesetzte NanoDrop 1000 Spektralphotometer (Thermo Scientific) hat den Vorteil, dass lediglich 2 µl der Probe in das Photometer injiziert werden müssen. Das Gerät nimmt die Extinktion der Proben über das gesamte Spektrum von 220 bis 750 nm auf. Somit konnte die Protein-Extinktion bei 280 nm, die Cy3-Extinktion bei 550 nm und die MNP-Extinktion (anionische und kationische Nanopartikel) bei 229 nm durch eine einzelne Probenmessung angegeben werden.

2.2 Zellkultur

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden alle zellbiologischen Arbeiten an der Sterilwerkbank, unter Anwendung steriler Arbeitstechniken durchgeführt. Verwendete Zellkulturutensilien (Zellkulturgefäße, Kulturmedien etc.) wurden vor Gebrauch sterilisiert bzw. lagen vom Hersteller in steriler Form vor.

Zur Kultivierung der Zellen wurde ein auf die zellspezifischen Wachstumsbedingungen angepasster Brutschrank eingesetzt. Dieser gewährleistete durch eine kontinuierliche Kohlendioxidzufuhr (5% CO₂) sowie einer konstanten Luftfeuchtigkeit ein kontrolliertes Klima. Zudem wurde eine für die Zelllinie optimale Temperatur von 37 °C eingestellt.

2.2.1. Verwendete CHO-Zelllinie

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde die Fibroblasten-ähnliche adhärent wachsende Zelllinie CHO-K1 (*CHO: Chinese Hamster Ovary Cell*) verwendet (Abbildung 2-1). Sie stellt einen Subklon der parentalen CHO-Zelllinie dar, die 1957 den Ovarien eines adulten chinesischen Hamsters entnommen wurde [Puck *et al.*, 1957].

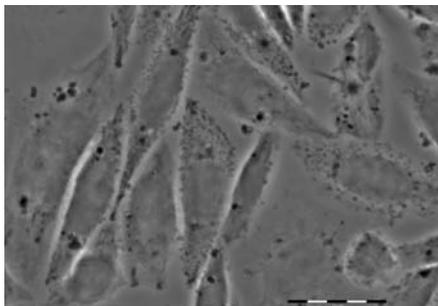


Abbildung 2-1: CHO-Zellen. Gezüchtet in serumhaltigen Ham's F12 bei 37 °C und 5 % CO₂-Zufuhr. Aufgenommen bei einer 100-fachen Vergrößerung nach 48 Stunden Kultivierungsdauer. Balken = 20 µm.

Die hier verwendete Zelllinie wurde von Prof. M. Zerial (Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden) zur Verfügung gestellt. Die Verdopplungszeit von CHO-K1-Zellen beträgt bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C ca. 24 Stunden [Kuwae *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2000; Zanghi *et al.*, 1999].

2.2.2. Kultivierung der Zellen

3.2.1.1. Materialien

Für die Kultivierung der adhärent wachsenden CHO-Zellen wurden die im Folgenden aufgeführten Lösungen und Kulturgefäße verwendet (Tabelle 2-7, Tabelle 2-8).

Material und Methoden

Tabelle 2-7: Für die Kultivierung der CHO-Zellen verwendete Lösungen

Kulturmedium	500 ml Ham's F12 5 ml 200 mM stabiles L-Glutamin 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 Units)
Einfriermedium	60 % Kulturmedium 30 % Kälberserum (dekomplementiert für 30 min bei 56°C) 10 % DMSO
PBS ⁻	0,8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,1 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Trypsin/ EDTA-Lösung	0,05 % / 0,02 % (w/v)

Tabelle 2-8: Für die Zellkultur verwendete Kulturgefäße und zum Passagieren benötigten Flüssigkeitsvolumina

Kulturgefäß	V _{Medium} [ml]	V _{PBS-} [ml]	V _{Trypsin/EDTA} [ml]	
			V _{benetzen}	V _{inkubieren}
75 cm ² -Kulturflasche	20	10	5	1
25 cm ² -Kulturflasche	7	4	2	0,5
55 cm ² -Kulturschale	10	5	5	1
24-Loch-Platte (Fläche 2 cm ²)	1	0,4	0,2	0,2

3.2.1.2. Auftauen der Zellen

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff in Kryoröhrchen aufbewahrt. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37 °C im CO₂-Inkubatorschrank. Anschließend wurde die Zellsuspension in 20 ml des Kulturmediums (37 °C) aufgenommen und in einer 75 cm²-Kulturflasche im CO₂-Inkubationsschrank inkubiert. Da sich das DMSO im Einfriermedium toxisch auf die Zellen auswirkt, wurde nach 4 Stunden Zellanheftungszeit ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.2.1.3. Passagieren der Zellen

Adhärente Zellen heften sich an die Plastikoberfläche der Kulturflasche oder -schale und müssen zur Subkultivierung vom Substrat gelöst werden. Sobald sich in den Kulturgefäßen ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte, wurde das Kulturmedium

abgenommen. Der Zellrasen wurde zweimal mit PBS⁻ gewaschen und anschließend auf die Zellschicht Trypsin/EDTA gegeben. Durch Schwenken des Gefäßes wurde eine komplette Benetzung des Zellrasens gewährleistet. Ein Teil des Trypsin/EDTA wurde wieder abgenommen. Mit den verbleibenden Trypsin/EDTA wurden die Zellen für 10 min bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in frisches Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert (siehe Tabelle 2-8). Je nach Verdünnungsfaktor wurde eine definierte Menge der Zellsuspension abgenommen und in eine neue mit Kulturmedium befüllte Kulturflasche überführt. Diese Flasche wurde leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen bei der jeweiligen Kultivierungstemperatur im CO₂-Inkubator kultiviert [Müller, 2007].

3.2.1.4. Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der CHO-Zellen benötigt man eine 60 – 80 %ige Zellrasenkonzentration in einer 75 cm²-Kulturflasche. Als diese erreicht war, wurden die Zellen wie beschrieben gewaschen, trypsinisiert und in 9 ml Kulturmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde je 1 ml dieser Zellsuspension in vorbereitete Kryoröhrchen aliquotiert und für 2 Stunden bei 4 °C gekühlt. Nach 12-stündiger Lagerung bei -20 °C und anschließender 12-stündiger Aufbewahrung bei -80 °C wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt [Müller, 2007].

3.2.1.5. Aussaat von CHO-Zellen auf sterilen Deckgläschen

Sollte mit CHO-Zellen eine Fluoreszenzanalyse durchgeführt werden, wurde die zu diesem Zweck benötigte Anzahl steriler Deckgläschen in die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte gegeben. Um die Sterilität der Deckgläschen zu gewährleisten wurden diese zunächst mit 70 %igem Ethanol und ddH₂O gewaschen und anschließend eine 20-minütige Sterilisation bei 121 °C im Autoklav durchgeführt. Die Überführung der Deckgläschen in die 24-Loch-Platte erfolgte mit Hilfe einer sterilen Pinzette. Im Anschluss wurden die Deckgläschen mit der Zellsuspension überschichtet und bis zur nötigen Zellkonzentration im Brutschrank kultiviert.

2.2.3. Internalisierung von Cy3-Tfn bzw. Tfn-gekoppelten MNP

Der Vorgang der Internalisierung bedeutet, die Aufnahme von extrazellulären Molekülen durch deren Bindung an membranständige Rezeptoren und die anschließende Aufnahme dieser Molekül-Rezeptor-Komplexe durch Endozytose [Kaiser, 2004].

Die hierfür verwendeten Materialien finden sich in Tabelle 2-9.

Tabelle 2-9: Zur Internalisierung verwendete Materialien.

Depletionsmedium	Ham's F12 200 mM stabiles L-Glutamin 0,1 mg/ml BSA
Internalisierungsmedium	Ham's F12 0,1 mg/ml BSA
Endozytotische Marker	60 µg/ml Cy3-Tfn-Lösung in Internalisierungsmedium Cy3-Tfn gekoppelte MNP Ungekoppeltes Tfn
Chemikalien	PBS ⁻

Die Internalisierung wurde mit Zellen durchgeführt, welche bis zu einer 80-90 %igen Konfluenz auf Deckgläschen kultiviert wurden. Um die TfnR der Zellen zu entladen wurden diese zunächst zwei Mal mit 500 µl Depletionsmedium (37 °C) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Deckgläschen in jeweils 1 ml Depletionsmedium für 60 min bei 37 °C im Inkubationsschrank. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das jeweilige Deckgläschen in eine vorbereitete Petrischale überführt. Diese Petrischale wurde zuvor mit feuchtem Filterpapier ausgelegt und mit Parafilm bedeckt. Diese Konstruktion verhinderte ein Austrocknen der Zellen. Die Platzierung des Deckgläschens erfolgte mit dem Zellrasen nach oben auf den Parafilm.

3.2.3.1. Puls Chase mit Cy3-Tfn

In der Molekularbiologie stellt die Puls-Chase-Analyse eine Methode zur Beobachtung von zellulären Prozessen da. Die Zellen werden hierfür mit einer markierten Substanz für kurze Zeit (Puls) und anschließend entweder ohne diese Substanz oder mit der unmarkierten Substanz (Chase) inkubiert [Alberts, 2002]. Das Cy3-Tfn wurde bis zu einer Endkonzentration von 60 µg/µl in Internalisierungsmedium verdünnt. Auf das bewachsene Deckgläschen wurden nun jeweils 50 µl des Cy3-Tfn-Ansatzes appliziert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 2 min bei 37 °C. In dieser Zeit sollte das Cy3-Tfn an die TfnR der Zelloberfläche binden (Puls-Markierung). Im Anschluss

wurde das Deckgläschen wieder in eine 24-Loch-Platte überführt und nach zweimaligen Waschen der Zellen mit Internalisierungsmedium (37 °C) für die verbleibende Zeit (3, 13, 28, 58 min) im Inkubationsschrank bei 37 °C inkubiert (Chase). Der Transport des Cy3-Tfn in den Zellen wurde durch Überführen des Deckgläschens in eiskaltes PBS⁻ gestoppt. Nach kurzem Schwenken des Deckgläschens in der Lösung wurden die Zellen sofort auf Objektträgern fixiert.

3.2.3.2. Internalisierung der Tfn-gekoppelten MNP

50 µl der Cy3-Tfn gekoppelten MNP wurden auf die mit Zellen bewachsenden Deckgläschen appliziert. Im Gegensatz zum Puls-Chase erfolgte hierbei eine 30-minütige Inkubation des Cy3-Tfn-MNP-Ansatzes bei 37 °C im CO₂-Inkubationsschrank. Nach der Inkubationszeit erfolgte auch hierbei die Beendigung des Tfn-Transportes in der Zelle durch die Überführung des Deckgläschens in eiskaltes PBS⁻. Im Anschluss wurden die Zellen auf einem Objektträger fixiert.

3.2.3.3. Internalisierung für die Endosomenaufräumung

Für die spätere PNS-Herstellung wurden pro Probenansatz sechs zellbewachsende 55 cm²-Zellkulturschalen im CO₂-Inkubator gezüchtet. Nachdem eine 95 %ige Zellrasenkonzentration erreicht war, wurden die einzelnen Kulturschalen mit jeweils 6 ml Depletionsmedium drei Mal gewaschen, wobei im letzten Waschschrift das Depletionsmedium auf den Zellen belassen wurde. Die Entladung der TfnR an der Zelloberfläche wurde durch eine 60 minütige Inkubation der Kulturschalen im CO₂-Inkubationsschrank erreicht. Für diesen Versuch wurde die zehnfache Menge an anionischen MNP mit unkonjugiertem Tfn gekoppelt, und über Gelfiltration mittels Sepharose 4B über die FPLC-Anlage aufgereinigt. Die gesammelten Fraktionen wurden im Spektralphotometer gemessen. Fraktionen, welche Tfn-gekoppelte MNP enthielten, wurden vereinigt und in Internalisierungsmedium verdünnt. Nach Ablauf der Depletions-Inkubation wurden das Medium abgenommen, und die Zellen mit 6 ml der Cy3-Tfn gekoppelten MNP-Suspension überschichtet. Daraufhin wurden die Zellen für weitere 30 min zur Internalisierung bei 37 °C und 4 °C inkubiert. Da die Zellen bei einer Temperatur von 4 °C jegliche Transportfunktionen einstellen, diente diese Inkubationstemperatur als Negativkontrolle. Die Internalisierung wurde durch das Überführen der Kulturschalen auf Eis gestoppt. Danach wurde das Inkubationsmedium durch PBS⁻ (4 °C) ersetzt und mit dem Protokoll zur PNS-Herstellung fortgeführt.

2.3 Optische Analyse der Zellen

2.3.1. Fixierung der Zellen

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert, damit der Tfn-Transport durch die Zelle mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops analysiert werden konnte. Die hierfür benötigten Materialien sind in Tabelle 2-10 aufgelistet.

Tabelle 2-10: Zur Fixierung von Zellen benötigte Materialien.

Lösungen	PBS ⁻
	3 %ige Paraformaldehyd-Lösung (Fixierlösung)
	Mowiol (Einbettungsmedium)

Die Fixierung der Zellen folgte auf die Internalisierung. Die Deckgläschen wurden in einer 24-Loch-Platte mit 1 ml eiskaltem PBS⁻ (4 °C) überschichtet, um Rückstände des Internalisierungsmediums zu entfernen. Zudem wurden bei dieser Temperatur alle zellulären Aktivitäten, insbesondere der Proteintransport gestoppt. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS⁻ wurden die Deckgläschen in 500 µl der Fixierlösung (4 °C) gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser und alle folgenden Inkubationsschritte wurden unter Schwenken der 24-Loch-Platte auf einem Kippschüttler durchgeführt. Zum Schluss wurden die Zellen drei Mal für jeweils 5 min mit 1 ml PBS⁻ (RT) gewaschen. 5 µl Mowiol pro Deckgläschen wurden auf ein zuvor mit 70 %igem Ethanol gereinigtem Objektträger vorgelegt. Das Deckgläschen wurde mit Hilfe einer Pipette zunächst in ddH₂O eingetaucht (überschüssiges Wasser wurde mit einem Papiertuch entfernt) und mit der Zell-bewachsenen Seite nach unten in das Mowiol eingebettet. Zur Trocknung des Mowiole wurde der Objektträger für 45 min bei 37 °C inkubiert. Das Präparat kann nun mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert und danach bei 4 °C gelagert werden.

2.3.2. Lichtmikroskopie

Um die Morphologie, Vitalität und das Wachstum der kultivierten CHO-Zellen zu analysieren, wurde ein inverses Mehrlinsenmikroskop der Firma Zeiss (Axiovert 40CSL) und ein Mehrlinsenmikroskop der Firma Olympus (BX 41) verwendet.

2.3.3. Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Fluoreszenzanalyse des Cy3-Tfn-Transportes in CHO-Zellen wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus (BX 41) gearbeitet. Verwendete Materialien sind in Tabelle 2-11 aufgeführt.

Tabelle 2-11: Für die Immunfluoreszenz benötigte Materialien.

Lösungen	PBS ⁻ 50 mM NH ₄ Cl in PBS ⁻ PBS ⁻ + 0,1 % Triton X-100 Mowiol (Einbettungsmedium) PBS ⁻ + 10 % FKS
Antikörper	Cy3-konjugierter Esel-Anti-Maus-Antikörper (1:500)

Wurde eine Internalisierung mit Anti-Biotin-Mikropartikeln durchgeführt, erfolgte im Anschluss an die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen ein dreimaliges Waschen mit 1 ml PBS⁻ für 5 min. Anschließend wurde das Quenchen der Aldehydgruppen für 30 min mit 1 ml NH₄Cl-Lösung unter schwenken durchgeführt. Es folgten drei weitere Waschschriffe mit 1 ml PBS⁻ für jeweils 5 min. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese für genau 4 min mit 1 ml der Triton X-100-Lösung unter schwenken inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml PBS⁻ sind die Zellen bereit für die Antikörperinkubation. Zu diesem Zweck wurde eine Petrischale mit feuchtem Filterpapier ausgelegt und mit Parafilm bedeckt. Das Deckgläschen wurde mit Hilfe einer Pinzette von der 24-Loch-Schale mit der Zell-bewachsenen Seite nach oben auf den Parafilm platziert. Der zuvor in 10 %igem FKS verdünnte Antikörper wurde nun zu 50 µl auf die Zellen pipetiert. Da die Anti-Biotin-Mikropartikel mit einem Maus-Antikörper versehen waren, wurde ein Cy3-konjugierter Anti-Maus-Antikörper eingesetzt, um so die Partikel unter dem Fluoreszenzmikroskop detektieren zu können. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Deckgläschen wieder in die 24-Loch-Platte überführt und drei Mal mit 1 ml PBS⁻ für 5 min unter Schwenken gewaschen. Zum Schluss wurde das Deckgläschen wie bereits beschrieben in Mowiol eingebettet (2.3.1).

2.3.4. Quantitative Analyse des Fluoreszenzsignals

Die quantitative Intensität der Zell-Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramm Photoshop CS3 bestimmt. Bildbearbeitungsprogramme

speichern die Intensität eines Bildes als Helligkeitsinformation (Grauwert) eines Pixels des jeweiligen digitalen Bildes.

Um das Fluoreszenzsignal verschiedener mikroskopischer Präparate vergleichen zu können, wurden die Zellen der interessierenden Region mit gleicher Belichtungszeit aufgenommen. Zur Analyse wurden die einzelnen Aufnahmen in Photoshop geöffnet und jeweils 5 Zellen pro Bild markiert und vermessen. Anschließend wurde der mittlere Grauwert abzüglich des Hintergrundsignals bestimmt und in die relative Fluoreszenz umgerechnet. Hierfür wurde der höchste Grauwert einer Messreihe als 100 % definiert.

2.4 Quantifizierung der Internalisierung von Tfn-gekoppelten anionischen MNP

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von MNP die Endosomen des Recycling-Weges aus CHO-Zellen zu isolieren. Hierfür wurden mit den Tfn-gekoppelten anionischen MNP, wie unter 3.2.3.2 beschrieben, eine Internalisierung vorgenommen. Im Anschluss folgte die Herstellung des postnuklearen Überstandes, Endosomen-Isolierung mit Hilfe einer magnetischen Säule und letztlich die Analyse von Markerproteinen des Receptor-Recycling-Weges durch Silberfärbung und Western Blot.

2.4.1. Herstellung des post-nuklearen Überstandes

Beim post-nuklearen Überstand (PNS = post nuclear supernant) handelt es sich um ein zellfreies Homogenisat, welches frei von Zellkernen und Zelltrümmern ist und durch den Aufschluss der Zellen gewonnen wird.

Zur Herstellung einer PNS-Präparation wurden jeweils 6 Zell-bewachsene 55 cm²-Kulturschalen benötigt, die über eine Konfluenz von mindestens 95 % verfügten. Die Zellen auf der Wachstumsoberfläche sollten sich hierbei gegenseitig berühren, um unspezifische Bindungen der MNP mit der Plastikoberfläche des Kulturgefäßes durch zellfreie Zwischenräume zu vermeiden.

Tabelle 2-12: Zur Herstellung des PNS verwendete Lösungen.

Lösungen	Homogenisierungspuffer: 250 mM Saccharose-Lösung, 3 mM Imidazol-Lösung in ddH ₂ O; pH 7,4 (mit HCl eingestellt), sterilfiltriert
	PBS ⁻
	PBS ⁻ + 0,5 % BSA (w/v)

Nach der Internalisierung der Cy3-Tfn gekoppelten anionischen MNP wurden die Kulturschalen auf Eis platziert. Jede Kulturschale wurde mit PBS⁻/BSA (4 °C) zwei Mal gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das PBS⁻/BSA bis zur mechanischen Ablösung der Zellen in der Kulturschale belassen. Zum Abschaben der Zellen wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgenommen und durch 2 ml frisches PBS⁻ (4 °C) ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst. Die Zellen der sechs Kulturschalen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und für 5 min bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und durch 2 ml Homogenisierungspuffer (4 °C) ersetzt. Nach der vorsichtigen Resuspendierung der Zellen folgte wiederum eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 3000 rpm. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl Homogenisierungspuffer (4 °C) mit Vorsicht resuspendiert. Die Zellen wurden nun mit einer 1 ml-Spritze (22G ½ Kanüle) aufgebrochen, wobei die Kontrolle der Effizienz mit Hilfe des inversen Mehrlinsenmikroskops erfolgte. War eine Aufbrucheffizienz von ca. 50 -70 % erreicht, wurden die Zellkerne und Zelldebris durch 15 minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 3000 rpm sedimentiert. Der Überstand (=PNS) wurde vorsichtig abgenommen und im Anschluss der Endosomenaufreinigung unterzogen.

2.4.2. Endosomenaufreinigung

Zur Isolierung der Endosomen aus dem PNS wurde dieser über die magnetische Säule aufgereinigt. Die sich in den Endosomen befindenden MNP sollten durch das herrschende Magnetfeld auf der Säule verbleiben und so vom PNS getrennt und anschließend eluiert werden. Verwendete Materialien finden sich in Tabelle 2-13.

Tabelle 2-13: Zur Endosomenaufreinigung verwendete Materialien

Materialien	µ-Säule µMACS-Magnet
Lösungen	Equilibrierungspuffer: 70 % Ethanol in ddH ₂ O PBS ⁻ Laemmli-Puffer: siehe Tabelle 2-14

Die benötigte Anzahl der Säulen wurde in den Magneten platziert und für die anschließende Endosomenaufreinigung vorbereitet. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 100 µl Equilibrierungspuffer gespült. Anschließend erfolge ein fünfmaliges Waschen der Säule mit jeweils 100 µl PBS⁻. Der PNS wurde nun auf die Säule apliziert,

woraufhin die Säule vier Mal mit PBS⁻ gewaschen wurde. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die Endosomen mit 100 µl PBS⁻ eluiert. Um eine komplette Elution des auf der Säule verbleibenden Materials zu erreichen, wurde die Säule ein weiteres Mal mit 100 µl Laemmli-Puffer bei 95 °C gespült, und eine anschließende Elution mit 100 µl 70 %igem Ethanol durchgeführt. Alle Elutionsschritte wurden getrennt in Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die hierbei angefallenen Proben wurden zunächst im Photometer vermessen und anschließend mit Probenpuffer und 2 % β-Mercaptoethanol für 5 min bei 95 °C aufgekocht und bei -20 °C gelagert.

2.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine Variante zur Trennung von Proteinen in einem elektrischen Feld ist die SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Hierbei wird eine elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen anhand ihres Molekulargewichts in einem Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Um Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen zu zerstören, wird bei der Probenvorbereitung SDS im Überschuss hinzugegeben. Reduzierende Thiolverbindungen, wie β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol werden dem Probenpuffer zusätzlich hinzugefügt, um vorhandene Disulfidbrücken durch Reduktion zu spalten. Die so denaturierten Proteinproben werden auf das Polyacrylamidgel geladen, in welchem sich geeignete Elektrolyten befinden. Das Anlegen einer elektrischen Spannung bewirkt eine Migration der negativ geladenen Proteine durch das Gel. Das Gel hat hierbei die Funktion eines Molekularsiebes. Während große Proteine zurückgehalten werden, wandern Proteine geringerer Größe relativ leicht durch das quervernetzte Polymer. Am Ende des Vorgangs liegen die zuvor aufgetragenen Proteine ihrer Größe nach im Gel vor. Durch weitere Verfahren, wie der Coomassie-Blue-Färbung oder immunologische Nachweismethoden, wie z.B. beim Western-Blot können die getrennten Proteine sichtbar gemacht werden [Manning *et al.*, 2004].

3.4.3.1. Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurde der Laemmli-Puffer nach der in Tabelle 2-14 aufgeführten Rezeptur angesetzt. Die einzelnen Eluate der PNS-Aufreinigung wurden mit der entsprechenden Menge an Laemmli-Puffer verdünnt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Bis zur Verwendung wurden die einzelnen Proben bei -20 °C aufbewahrt. Vor der Applizierung der Zelllysate auf das Polyacrylamid-Gel, wurden diese für 5 min bei 95 °C aufgekocht.

Tabelle 2-14: Rezeptur des für die Probenvorbereitung verwendeten Laemmli-Puffers.

Laemmli-Puffer	
50 mM	Tris-HCl pH 6.8
10 %	Glycerol
2 %	SDS
0,01 %	Bromphenolblau

Der Ansatz wurde mit einem 0,45 µm-Filter filtriert. Kurz vor der Verwendung wurden 2% β-Mercaptoethanol zur Reduktion der Disulfidbrücken zugeben.

3.4.3.2. Gießen der Gele

Das für die SDS-PAGE eingesetzte Trenn- bzw. Sammelgel besitzt die im Folgenden aufgeführten Rezepturen (Tabelle 2-15).

Tabelle 2-15: Rezeptur des benötigten Polyacrylamid-Gel für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel (12 % Acrylamid)	
4,0 ml	30 % Acrylamid/ 0,8 % Bis-Acrylamid
1,25 ml	3 M Tris-HCl pH 8,8
0,1 ml	20 % SDS
3,4 ml	ddH ₂ O
5 µl	TEMED
50 µl	frische 10 % APS (frisch aufgetaut)

Sammelgel (5 % Acrylamid)	
1,7 ml	30 % Acrylamid/ 0,8 % Bis-Acrylamid
1,25 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8
0,1 ml	20 % SDS
5,4 ml	ddH ₂ O
10µl	TEMED
50 µl	10 % APS (frisch aufgetaut)

Zunächst ist der Aufbau einer Gelapparatur für das korrekte Formen des Polyacrylamid-Gels zur Auftrennung der im Zelllysate befindlichen Proteine erforderlich. Hierfür wurden zwei Glasplatten mit 70-%igem Ethanol gereinigt und übereinander durch einen Gieß-Rahmen fixiert. Da eine der Glasplatten mit Spacern versehen war,

entstand zwischen den beiden Platten eine Kammer in die das Gel gefüllt werden konnte. Die fixierten Glaskammern wurden anschließend mit Hilfe eines Gießständers in eine vertikale Position überführt. Das unter Rühren, entsprechend der Rezeptur, hergestellte Trenngel wurde nun in die Kammer der beiden Glasplatten gegossen. Damit das Gel unter Luftausschluß polymerisieren konnte, wurde dieses mit VE-Wasser überschichtet. In der Zwischenzeit konnte, unter Rühren, das Sammelgel hergestellt werden. Nach dem das Trenngel polymerisiert war, wurde das überschüssige Wasser entfernt. Anschließend wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Ein eingesetzter Kamm im polymerisierenden Sammelgel sorgte für Aussparungen der Taschen die für die Probenauftragung benötigt wurden.

3.4.3.3. Aufbau der Elektrophorese-Apparatur

Um eine Auftrennung der Proteine in den SDS-Gelen zu erreichen, wurde der Elektrophorese-Puffer benötigt (Tabelle 2-16).

Tabelle 2-16: Für die Auftrennung der Proteine benötigter Puffer

Elektrophorese-Puffer	
25 mM	Tris Base
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

Nachdem auch das Sammelgel in polymerisierter Form vorlag, konnte das entstandene, zwischen den Glasplatten befindliche, Polyacrylamid-Gel aus dem Gieß-Ständer entnommen werden. Dieses wurde zusammen mit den Glasplatten in das Elektrophoresemodul überführt. Der im Sammelgel befindliche Kamm wurde entfernt und das Modul mit dem bereitgestellten Elektrophorese-Puffer befüllt. Entstandene Luftblasen an der unteren Seite des Polyacrylamid-Geles wurden beseitigt und die, durch den Kamm entstandenen, Probentaschen mit dem Elektrophorese-Puffer gespült. Die aufzutrennenden Zelllysate sind anschließend mit einer Gelloader-Spitze in die Geltaschen überführt und bei 150 V aufgetrennt worden.

2.4.4. Silberfärbung

Um Proteine nach der Gelelektrophorese im SDS-Gel detektieren zu können, können unterschiedliche Färbungen durchgeführt werden. Die Silberfärbung hat den Vorteil, bereits 0,1 – 1,0 ng eines Polypeptids detektieren zu können. Die Methode beruht auf der Reduktion der Silberionen, die an Seitenketten der Aminosäuren gebunden sind und ergibt so eine braun-schwarze Färbung [Sambrook und Russel, 2001].

Zunächst wurden die in Tabelle 2-19 aufgelisteten Lösungen hergestellt, wobei das Glutardialdehyd und Formaldehyd erst kurz vor Gebrauch zur jeweiligen Lösung gegeben wurde. Die gesamte Färbung fand unter dem Abzug auf einem Kippschwenker statt. Es war darauf zu achten, dass die silbernitratthaltige Lösung nach ihrem Gebrauch separat in einem entsprechenden Behälter entsorgt wurde. Sobald die Gelelektrophorese beendet war, wurde das Gel aus der Geloperatur entnommen, zugeschnitten und vorsichtig in eine Laborschale mit Fixierlösung überführt. Das Gel verblieb über den gesamten Färbevorgang in dieser Laborschale, wobei nach jedem Arbeitsschritt die jeweilige Lösung entfernt und durch die nachfolgende ersetzt wurde. Jede Lösung verblieb, zur Inkubation des Geles, für eine bestimmte Inkubationszeit in der Schale (Tabelle 2-20) Nach dem letzten Waschschrift wurde das gefärbte Gel in eine Plastikfolie gelegt und eingeschannt. Zur langfristigen Lagerung wurde das Gel mit etwas VE-Wasser in die Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2-17: Für die Silberfärbung benötigte Lösungen.

Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Sensibilisierungslösung	30 % (v/v) Ethanol 2 mg/ml Natriumthiosulfat 68 mg/ml Natriumacetat 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd (25 % (w/v))
Silbernitratlösung	2,5 mg/ml Silbernitrat 0,04 % (v/v) Formaldehyd (37 % (w/v))
Entwicklerlösung	25 mg/ml Natriumcarbonat 0,02 % (v/v) Formaldehyd (37 % (w/v))
Stopp-Lösung	146 mg/ml EDTA

Das Glutardialdehyd und Formaldehyd wurden jeweils erst kurz vor dem Gebrauch der Lösung dem Ansatz hinzugegeben.

Tabelle 2-18: Durchzuführende Schritte bei der Silberfärbung.

Schritt	Materialien
1	Das SDS-Gel wurde zugeschnitten und in eine, mit Fixierlösung befüllte Laborschale überführt. Inkubationszeit: 30 min
2	Die Fixierlösung wurde entfernt und durch die Sensibilisierungslösung ersetzt. <i>Inkubationszeit: 30 min</i>
3	Die Sensibilisierungslösung wurde durch VE-Wasser ersetzt. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. <i>Inkubationszeit: jeweils 10 min</i>
4	Nach den Waschschrinen wurde das VE-Wasser entfernt und durch die Silbernitratlösung ersetzt. <i>Inkubationszeit: 30 min</i>
5	Das Gel wird im Anschluss kurz mit VE-Wasser gewaschen <i>Inkubationszeit: 1 min</i>
6	Nachdem das VE-Wasser entfernt wurde, wurde das Gel mit der Entwicklerlösung überschichtet. <i>Inkubationszeit: 5 min, je nach Farbintensität</i>
7	Um die Farbreaktion zu stoppen, wurde die Entwicklerlösung entfernt und die Schale mit der Stopp-Lösung befüllt <i>Inkubationszeit: 10 min</i>
8	Zum Schluss erfolgte ein drei maliges Waschen des Gels mit VE-Wasser. <i>Inkubationszeit: jeweils 5 min</i>

2.4.5. Blotting und Immundetektion

2.4.4.1. Western-Blot

Mit diesem Verfahren werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran unter Einfluss eines elektrischen Feldes transferiert. Anschließend können die aufgetrennten Proteine mit spezifischen Bindungseigenschaften über Antikörper direkt auf der Membran nachgewiesen werden [Lottspeich, 2006].

Für diese Arbeit wurde das Verfahren des Tank-Blotting gewählt Folgende Materialien werden benötigt (Tabelle 2-19):

Tabelle 2-19: Für das Tank-Blotting benötigte Materialien.

Stückzahl	Materialien
sechs	Whatman 3MM-Filterpapiere, die etwas größer als das Gel zurechtgeschnitten wurden
eine	Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF), zurechtgeschnitten in der Größe der Filterpapiere
sechs	Schwämme
eine	Gitterkassette (zwei miteinander verbundene gelochte Plastikplatten)
eine	Tank-Blotkammer
	Transferpuffer 4 °C (2,42 g/l Tris Base, 11,26 g/l Glycin, 20 % (v/v) Methanol in VE-Wasser

Um die zurechtgeschnittene PVDF-Membran zu aktivieren, wurde diese kurz in 100-%igen Methanol p.a. geschwenkt und bis zur Verwendung in Transferpuffer gelagert. Das zuvor elektrophoretisch behandelte Polyacrylamid-Gel wurde dem Elektrophoresemodul entnommen und mit einem Skalpell passend zugeschnitten. Um das überschüssige SDS zu entfernen, erfolgte das Überführen des Gels in den Transferpuffer. Während der gesamten Prozedur musste sichergestellt werden, dass das Gel zu keinem Zeitpunkt austrocknen konnte.

Die geöffnete Gitterkassette wurde in eine ausreichend große, mit Transferpuffer gefüllte Schale überführt. Auf die untere Seite dieser Kassette wurden drei in Transferpuffer getränkte Schwämme und darauf drei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere geschichtet. Auf diese Schichten wurde anschließend die PVDF-Membran gebettet. Auf die Membran wurde nun das Polyacrylamid-Gel positioniert. Darauf wurden wiederum drei mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren sowie drei Transferpuffer-getränkte Schwämme geschichtet. Bei jedem Schritt war darauf zu achten, dass sich zwischen den Schichten keine Luftblasen bildeten, um optimale Transferbedingungen über die gesamte Fläche des Geles zu schaffen.

Die gepackte Gitterkassette wurde nun verschlossen, und senkrecht in die Tank-Blot-Kammer überführt, wobei die Membran zur Anode ausgerichtet war. Anschließend wurde der Tank vollständig mit Transferpuffer (4 °C) gefüllt und ein Strom von 69 mA für 12 Stunden angelegt. Somit wurden die Proteine aus der Polyacrylamidmatrix über das senkrecht angelegte elektrische Feld eluiert und auf die Membran transferiert [Lottspeich, 2006].

2.4.4.2. Ponceau S-Färbung

Ponceaurot färbt Proteine auf PVDF-Blots. Diese Färbung ist reversibel und verträglich mit einer anschließenden Immunfärbung [Rehm, 2000]. Diese unspezifische Färbung ermöglicht die Überprüfung des Blotting-Erfolges.

Um überschüssiges SDS zu entfernen, wurde die PVDF-Membran aus der Blot-Apparatur in PBS⁻ überführt und gewaschen. Anschließend folgte unter Schwenken eine Inkubation der Membran für 5 min in Ponceau S. Die Proteine wurden dabei durch rote Banden auf der Membran sichtbar. Zur Dokumentation wurde die Membran kurz in PBS⁻ entfärbt und, in eine Folie verpackt, eingescannt. Daraufhin folgte eine vollständige Entfärbung durch Schwenken der Membran in PBS⁻. Die Membran konnte nun, eingeschweißt in eine Folie, bei 4 °C, bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

2.4.4.3. Immunodetektion

Damit die Immunodetektion durchgeführt werden konnte, wurden folgende Materialien angesetzt bzw. bereitgestellt (Tabelle 2-20):

Tabelle 2-20: Bereitgestellte Materialien für die Immunodetektion

Puffer	
Blockierungspuffer	5 % (w/v) Milchpulver, 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS ⁻ ; pH 7,4
Waschpuffer	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS ⁻ ; pH 7,4

Antikörper	
Primärantikörper	Monoklonaler Anti-Rab4-Kaninchen-Antikörper (1:1000) Monoklonaler Anti-Transferrinrezeptor-Maus-Antikörper (1:1000)
Sekundärantikörper	HRP-konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:100) HRP-konjugierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper (1:100)

Weitere Reagenzien bzw. Lösungen	
	PBS ⁻
	Chemilumineszenzreagenz

Vor der Reaktion eines Blots mit Antikörpern wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Blotmembran mit einem Blocker abgesättigt. Hierfür musste die Membran für 60 min in Blockierungspuffer geschwenkt werden. Geblotete Antigene lassen sich mit Antikörpern detektieren. Um das Auftragungsvolumen der Antikörper zu

reduzieren, fand die Inkubation der einzelnen Antikörper auf der Membran in zugeschweißten Plastikfolien statt. Der geblockte Blot wurde zuerst mit dem Primärantikörper für 60 min inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min in Blockungspuffer gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend inkubierte der Blot für 30 min mit dem markierten Sekundärantikörper, damit dieser an den Primärantikörper binden konnte. Nach viermaligem, 10-minütigen Waschen des Blots mit Waschpuffer erfolgte die Detektion der spezifischen Proteinbanden auf einem Röntgenfilm. Hiefür wurde die Membran mit der Chemilumineszenzreagenz (Dura-Lösung 1:1 angesetzt) 5 min inkubiert. In einer Dunkelkammer wurden die Filme für ca. 5 sec auf die Membran gelegt. Zum Entwickeln kamen die Filme in eine Entwicklerlösung. Dort wurden sie bis zum Sichtbarwerden der Banden geschwenkt, kurz in VE-Wasser gewaschen und abschließend in die Fixierlösung gegeben. Nach dem Trocknen der entwickelten Filme konnten die Banden auf diesem vergleichend analysiert werden.

3. Ergebnisse

3.1. Endocytotischer Transferrin-Zyklus in CHO-Zellen

Die rezeptorvermittelte Aufnahme von Tfn-gebundenen Eisen durch Zellen höherer Organismen, ist eines der am besten erforschten Prozesse in der Zellbiologie [Qian *et al.*, 2002]. Der endozytotische Tfn-Zyklus lässt sich nicht nur an einem theoretischen Zellmodell, wie in Kapitel 1.3.3. erklären, sondern kann zudem durch eine Internalisierung von fluoreszenzmarkierten Tfn in CHO-Zellen sichtbar gemacht werden.

In Abbildung 3-1 sind die einzelnen Schritte des Cy3-Tfn-Zyklus in CHO-Zellen dargestellt. Nachdem das Cy3-Tfn durch die rezeptorvermittelte Endocytose von den Zellen aufgenommen wird, werden die internalisierten Rezeptor-Komplexe von der Plasmamembran zum Sorting Endosomen (SE) transportiert. Anschließend können zwei von einander unabhängige Routen zurück zur Zelloberfläche beschriftet werden. Der schnellere Weg führt vom SE direkt zur Zelloberfläche, während der langsamere Weg über das Recycling Endosom (RE) zurück zur Plasma-membran führt [Sheff *et al.*, 2002].

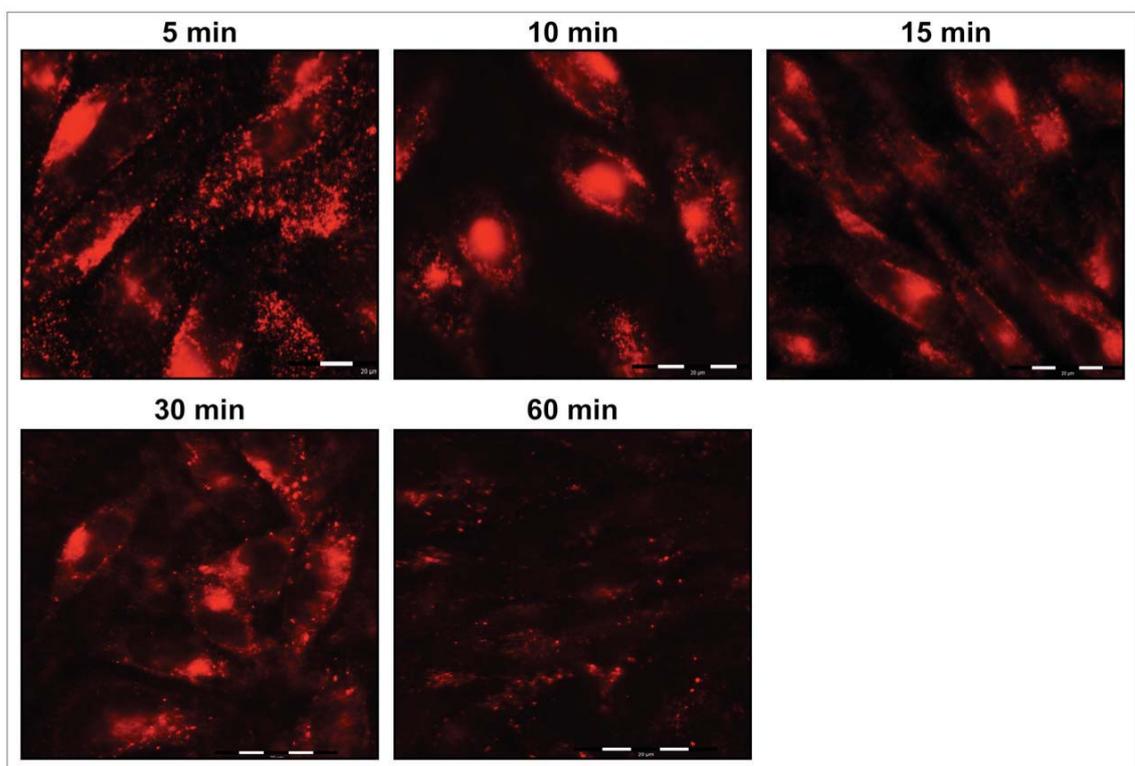


Abbildung 3-1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Cy3-Tfn internalisierter Zellen (Puls Chase). Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und für 2 min bei 37 °C mit Cy3-Tfn inkubiert (60 µg/ml). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert. Nach 5, 10, 15, 30 bzw. 60 min wurden die Zellen fixiert. Balken = 20 µm

Nach 5 min sind zunächst kleine Cy3-Tfn Vesikel in der Zellperipherie zu detektieren. Nach 10 bis 15 min befinden sich die Tfn-Moleküle im RE. In diesem sind sie als dichtes perinukleares Kompartiment zu beobachten. Nach 30 min sind zwar noch vereinzelt Tfn-Moleküle im RE sichtbar, das intrazelluläre Fluoreszenzsignal hat jedoch stark abgenommen, da sich die Tfn-Rezeptor-Komplexe wieder in vesikuläre Strukturen über die Zelle verteilen. 60 min nach der Internalisierung ist kein Fluoreszenzsignal in den Zellen detektierbar, da der Recycling-Zyklus nach dieser Zeit beendet ist und das Tfn vollständig zur Zelloberfläche zurückgeführt wurde.

3.2. Etablierung einer photometrischen Messung der MNP

Um neben der Fluoreszenzanalytik eine weitere Messmethode verwenden zu können, wurde zunächst untersucht, ob eine Detektion der MNP im Spektrophotometer möglich ist. Das hierbei verwendete Photometer (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) bietet die Möglichkeit, das gesamte Absorptionsspektrum von 220 bis 750 nm zu messen und darzustellen. Ziel ist es eine geeignete Wellenlänge für die Detektion der MNP zu finden sowie das Tfn bei 280 nm und das Cy3 bei 550 nm zu messen.

Da die jeweiligen MNP von CHO-Zellen internalisiert werden sollten, musste ein zellspezifischer Puffer gewählt werden. In voran gegangenen Studien wurde hierfür das Grundmedium Ham's F12 gewählt [Khouri, 2006]. In Abbildung 3-2 ist die Messung der jeweiligen MNP-Suspension über das gesamte UV-Spektrum dargestellt. Hierbei wurden 2,5 µl der MNP-Suspension in 997,5 µl Ham's F12 aufgenommen und anschließend mit dem selben Puffer zehnfach verdünnt. Die hier in rot dargestellten Absorptions-Spektren zeigen, dass das im Ham's F12 enthaltene Phenolrot ebenfalls bei 550 nm absorbiert. Mit diesem Puffer würde also eine Cy3-Messung bei der gleichen Wellenlänge verfälscht werden. Die in grau dargestellten Spektren der in PBS⁻ gelösten MNP zeigen bei 550 nm zwar eine erhöhte Absorption, jedoch nicht in dem Ausmaß, wie es bei den in Ham's F12 verdünnten MNP zu verzeichnen ist.

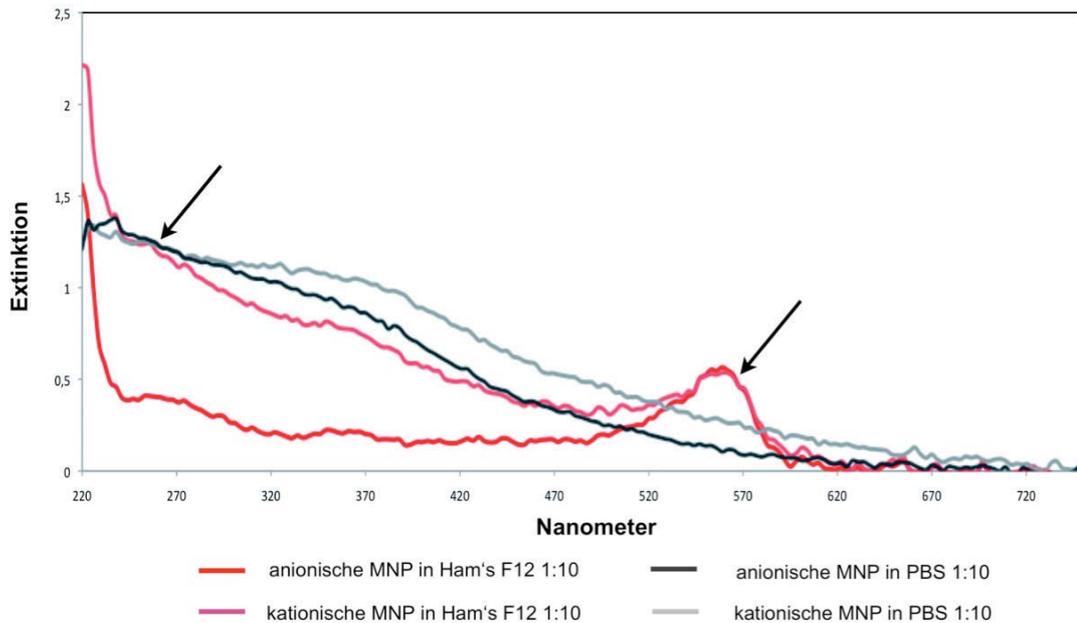


Abbildung 3-2: Spektrophotometrische Messung der kationischen und anionischen MNP. 2,5 µl der jeweiligen MNP-Lösung wurden in 997,5 µl Puffer (Ham's F12 bzw. PBS) aufgenommen und anschließend mit dem jeweiligen Puffer eine zehnfache Verdünnung hergestellt.

3.3. Aufreinigung der Cy3-Tfn-gekoppelten-MNP über eine magnetische Separationssäule

Grundlage für diese Masterarbeit ist eine von Li *et al.* (2005) veröffentlichte Arbeit zum Thema der Isolation von Endosomen mit Hilfe von MNP. Der dabei verwendete Permanentmagnet (MACS MultiStand) sowie die magnetischen Separationssäulen (µMACS) der Firma Miltenyi Biotec GmbH kamen auch in dieser Masterarbeit zum Einsatz. Allerdings wurden hierbei nicht, wie in der Veröffentlichung, das anionische Ferrofluid EMG 508 sondern EMG 707 sowie das kationische Ferrofluid EMG 607 der Firma Ferrotec GmbH verwendet. Außerdem fanden Dextran-beschichtete Mikropartikel der Firma Miltenyi Biotec GmbH Verwendung.

3.3.1. Polar lösliche MNP

Wie bereits unter 2.1.5 beschrieben, wurde das mit Cy3 konjugierte Tfn über Nacht mit den MNP inkubiert. Anschließend folgte eine Aufreinigung der gebundenen MNP nach der oben genannten Veröffentlichung. Hierbei sollten die gekoppelten MNP vom ungebundenen Cy3-Tfn isoliert werden. Die Stabilität der Bindung zwischen Tfn und MNP wurde anhand mehrerer Elutionsschritte kontrolliert (Abbildung 3-3).

Zunächst wurde der gesamte Cy3-Tfn-MNP-Ansatz (AL = Ausgangslösung) nach ca. 12 h Inkubationszeit auf die im Permanentmagneten platzierte Säule gegeben. Um anschließend eine Fluoreszenzanalyse unter dem Mikroskop durchführen zu können, wurde vom jeweiligem Säulendurchlauf 50 µl für eine spätere Internalisierung zurückgestellt.

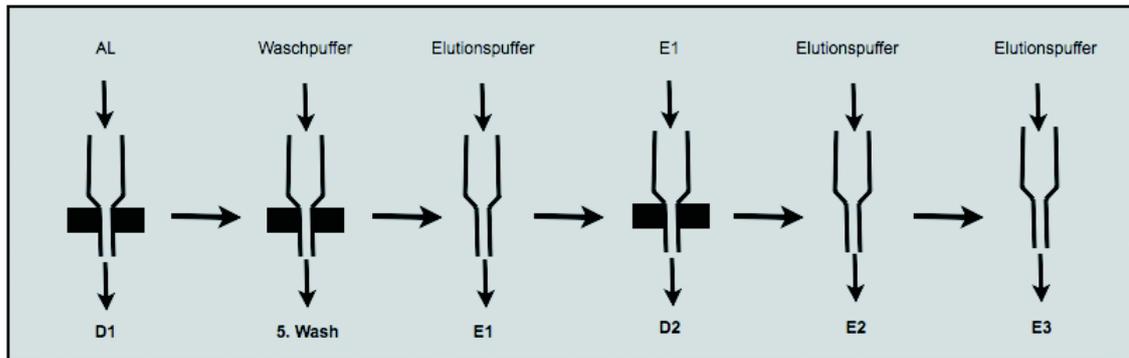


Abbildung 3-3: Aufreinigungsvorgang der Cy3-Tfn-gekoppelten MNP über eine magnetische Separationssäule. AL = Ausgangslösung, D1-2 = Säulendurchlauf 1-2, E1-2 = Eluat durch einfache Erdgravitation, E3 = Elution durch Zentrifugation (1000 x g, 5 min, 4 °C).

Nachdem der Durchlauf (D1) die Säule verlassen hatte, wurde diese Säule fünf Mal mit Waschpuffer (PBS⁻) gewaschen (5. Wash). Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten entfernt, um die Cy3-Tfn-MNP in Ham's F12 zu eluieren (E1). Dieses Eluat wurde ein weiteres Mal auf die vorher gereinigte Säule gegeben (aufgefangener Durchlauf = D2) und gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte zunächst wiederum die Elution der Cy3-Tfn-MNP von der Säule außerhalb des Permanentmagneten (E2). Zusätzlich wurde eine zweite Elution mit Hilfe der Zentrifugalkraft (1000 x g, 5 min, 4 °C) durchgeführt (E3). Anschließend erfolgte eine Internalisierung der einzelnen Säulendurchläufe auf den Zellen. Hierbei wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen mit 50 µl der jeweiligen Probe für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträgern fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Kationisch geladene MNP

Das hier verwendete humane holo-Transferrin besitzt einen pI-Wert von 5,2 [Hovaessian *et al.*, 1976]. Somit ist die Gesamtladung des Proteins, bei dem pH-Wert des physiologischen Optimums (pH 6,8 – 7,2) negativ [Chmiel, 2006]. Das negativ geladene Tfn kann somit an das positiv geladene Partikel adsorbieren. Auffällig bei diesem Versuch war, dass sich bereits während der Inkubation der MNP mit Cy3-Tfn Agglomerate in der Ausgangslösung gebildet haben. Diese Agglomerate blieben auf

der magnetischen Säule und gelangen nicht in das Säuleninnere. Die Ergebnisse der im Anschluss durchgeführten Internalisierung der einzelnen Versuchsproben sind in Abbildung 3-4 dargestellt.

Der erste Durchlauf des Versuches (D1) zeigt die typische Fluoreszenz der Recycling Endosomen in den Zellen. Das Kompartiment besitzt ein klares und starkes Leuchten, welches durch die Internalisierung von ungebundenen Cy3-Tfn begründet ist. Hierbei wird deutlich, dass ein großer Teil des Cy3-Tfn nicht an den kationischen MNP adsorbiert wurde, denn diese werden durch das magnetische Feld im Kern der Säule zurück gehalten. Die fluoreszierenden Kompartimente in D1 und D2 werden demnach von ungebundenen Cy3-Tfn verursacht.

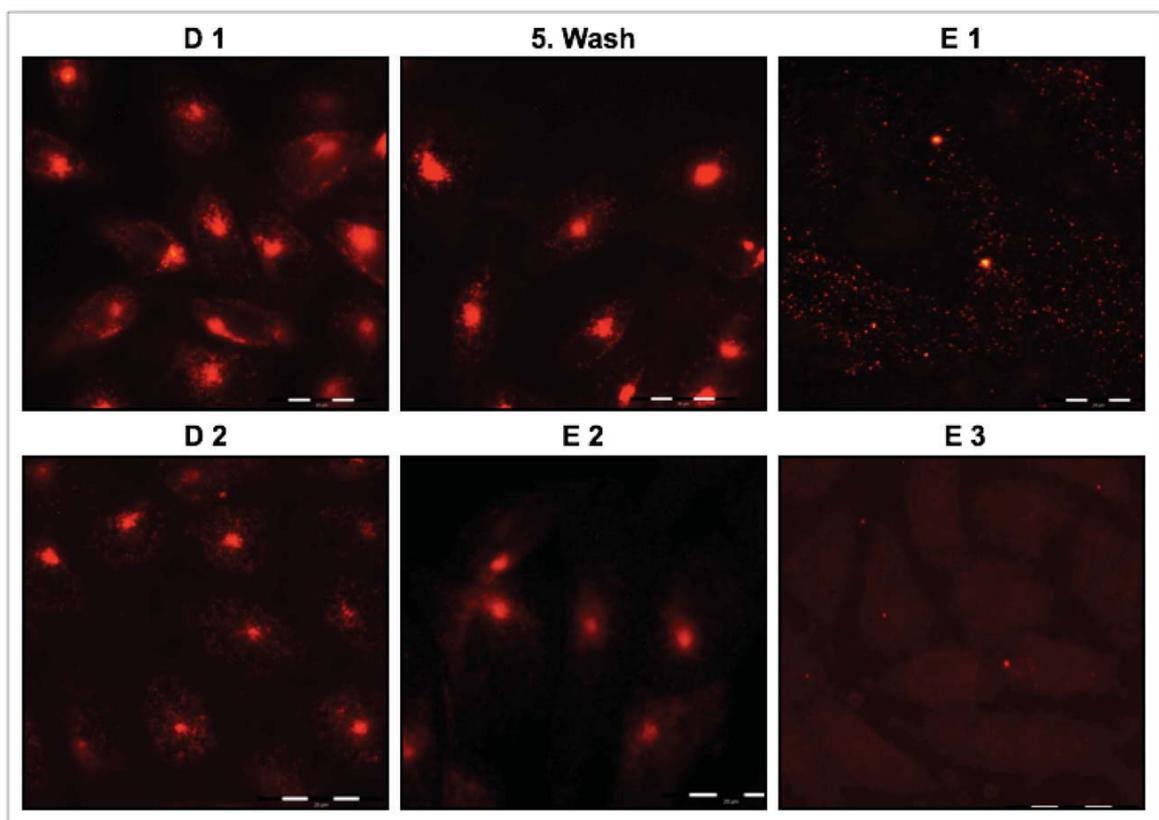


Abbildung 3-4: Internalisierte Proben der Aufarbeitung der Cy3-Tfn-gekoppelten, kationisch geladenen MNP. Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden für 30 min mit 50 µl der jeweiligen Probe bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert. Balken = 20 µm

Auch nach dem fünften Waschschrift (5.Wash) ist das fluoreszierende RE in den CHO-Zellen zwar abgeschwächt, dennoch deutlich erkennbar. Dies ist ein Hinweis darauf, dass durch die einzelnen Waschschriftte weiteres Cy3-Tfn von den MNP getrennt wird. Im folgenden Eluat (E1) sind hingegen lediglich fluoreszierende Agglomerate der MNP erkennbar. Diese besitzen eine Partikelgröße, die von den Zellen durch Endocytose

nicht mehr aufgenommen werden kann. Dadurch sind weder die Zellen noch die RE erkennbar. Auch nach der zweiten Aufgabe der Probe auf die magnetische Säule befindet sich freies Cy3-Tfn im Säulendurchlauf (D2). Die Zellen zeigen in diesem Bild eine schwache Fluoreszenz der RE. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich im Verlauf der Prozedur auch gebundenes Cy3-Tfn wieder von den MNP ablöst. Nach der zweiten Elution der MNP (E2) wird wiederum das typische Kompartiment in den Zellen sichtbar. Hierbei könnte es sich zum einen um nicht agglomerierte MNP handeln die durch die Zelle aufgenommen wurden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass es sich auch bei diesem Fluoreszenzsignal um freies Cy3-Tfn handelt, da auch bei der wiederholten Probenaufgabe auf die magnetische Säule agglomerierte Partikel auf dem Säulenkern sichtbar wurden. Bei einer weiteren, im Anschluss durchgeführten Elution durch Zentrifugation der Säule (1000 x g, 5 min, 4 °C) (E3) sind weder das charakteristische Kompartiment noch die einzelnen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Dieser Versuch ergab, dass die kationischen MNP unter Anwesenheit von Proteinen zu Agglomerationen neigen. Dieses Phänomen wurde durch einen weiteren Versuch mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen im MNP-Ansatz untermauert. Je mehr Protein in der Lösung enthalten war, desto höher war auch der Agglomerationsanteil in der Lösung. Der durchgeführte Aufarbeitungsvorgang ergab allerdings keine klaren Ergebnisse. Es konnte hierbei nicht festgestellt werden, ob die Zellen die Cy3-Tfn-gekoppelten MNP im Eluat 1 und 2 internalisieren, oder die fluoreszierenden Kompartimente lediglich von ungebundenen Cy3-Tfn verursacht wurden.

Anionisch geladene MNP

Auch die anionisch geladenen MNP wurden nach der von Li *et al.* (2005) entwickelten Methode mit Cy3-Tfn gekoppelt, aufgereinigt und analysiert.

Die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab nur sehr schwache Signale und konnten dadurch in dieser Arbeit nicht abgebildet werden. Bei den Proben D1, D2 und 5. Wash war eine sehr geringe Fluoreszenz der einzelnen Kompartimente in den Zellen sichtbar. In den einzelnen Eluaten war gar kein Leuchten der Zellen erkennbar.

Vergleich kationisch geladene MNP mit anionisch geladenen MNP

Sowohl die Proben der Aufreinigung anionischer als auch kationischer Cy3-Tfn-gekoppelter Nanopartikel wurden zusätzlich im Photometer bei 229 nm gemessen. In Abbildung 3-5 sind die einzelnen Extinktionen in einem Säulendiagramm abgebildet.

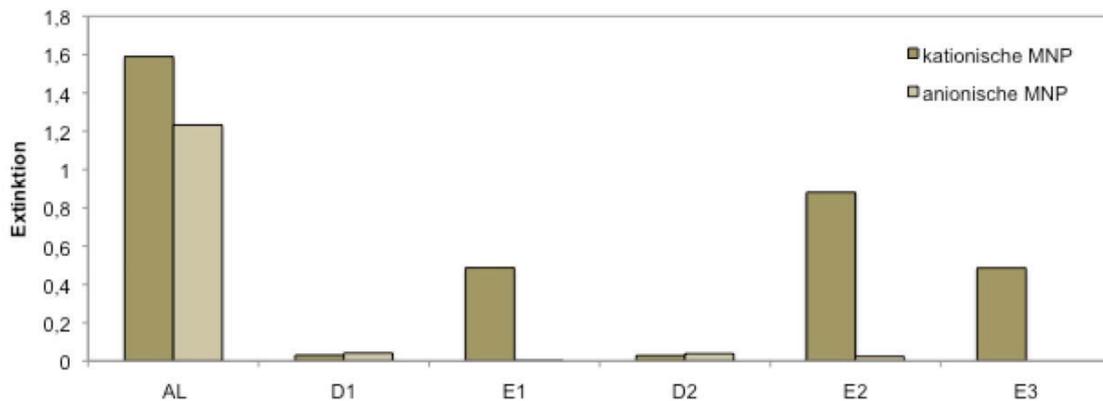


Abbildung 3-5: Extinktion der einzelnen Proben des Aufreinigungsversuches von Cy3-Tfn- gekoppelter kationisch und anionischen Nanopartikeln bei einer Wellenlänge von 229 nm. AL = Ausgangslösung, D1-2 = Durchlauf 1-2, E1-2 = Elution durch einfache Erdgravitation, E3 = Elution durch Zentrifugation (1000 x g, 5 min, 4 °C).

Nach Abbildung 3-5 sind in der Ausgangslösung sowohl die kationischen als auch die anionischen MNP detektierbar. Im weiteren Verlauf wird allerdings sichtbar, dass die anionischen MNP weder durch Gravitationskraft noch durch Zentrifugalkraft von der Säule eluiert werden können. Diese Erscheinung kann entweder dadurch begründet werden, dass die Partikel nicht in die Säule eindringen können, weil auf der Säulenoberfläche Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial passieren, die nicht auf Magnetismus beruhen. Oder die MNP dringen in die Säule ein, können jedoch von dort durch Agglomerationen nicht mehr eluiert werden.

Beide Versuche zur Aufreinigung der polar löslichen MNP zeigen, dass weder die kationischen noch die anionischen MNP durch die magnetisierbaren Separationssäulen (μ MACS) isoliert werden können. Die kationischen MNP können zwar von der Säule eluiert werden, neigen jedoch zu starken Agglomerationen in wässrigen Proteinlösungen. Die anionischen MNP zeigen zwar keine Agglomerationstendenzen in wässrigen Proteinlösungen, können jedoch nicht von der magnetisierbaren Säule eluiert werden, da hierbei vermutlich Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial auftreten.

3.3.2. Unpolar lösliche MNP

Da die MNP der Firma Ferrotec GmbH nicht mit den magnetisierbaren Säulen der Firma Miltenyi Biotec aufgereinigt werden konnten, wurden zusätzlich die von der

Miltenyi Biotec GmbH hergestellten Mikropartikel (MMP) untersucht. Hierbei standen zum einen die ungekoppelten Dextran-MMP (Basic MicroBeads) und zum anderen mit Maus-Anti-Biotin-Antikörper gekoppelte Dextran-MMP (Anti-Biotin MicroBeads) zur Verfügung.

Anti-Biotin-Mikropartikel

Die Anti-Biotin-MMP wurden mit Biotin-Tfn gekoppelt, und zur Internalisierung auf den dafür präparierten Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um die Partikel unter dem Fluoreszenzmikroskop detektieren zu können, wurde im Anschluss eine Antikörperinkubation durchgeführt. Diese Cy3-konjugierten Anti-Maus-Antikörper sollten hierbei an die Maus-Antikörper der Partikel binden. In Abbildung 3-6 werden die mit Biotin-Tfn-gekoppelten Anti-Biotin-MMP nach der Antikörperinkubation den unbehandelten Zellen vergleichend gegenübergestellt.

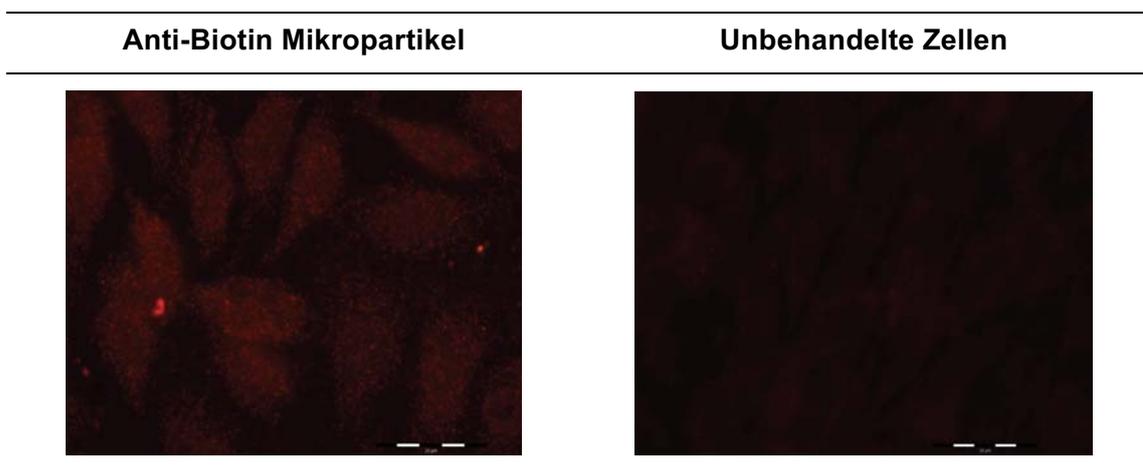


Abbildung 3-6: Vergleich von Zellen die mit Anti-Biotin-MMP behandelt wurden mit unbehandelten Zellen. Links: Internalisierte Biotin-Tfn gekoppelte Ant-Biotin-MMP. Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden für 30 min mit den Mikropartikeln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit einem Cy3-konjugierten Anti-Maus-Antikörper inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Rechts: Unbehandelte CHO-Zellen.

Die dargestellten Zellen, welche mit einer Biotin-Tfn-gekoppelten Anti-Biotin-MMP-Lösung inkubiert wurden, zeigen nicht das typische Fluoreszenzsignal des RE. Sie zeigen lediglich ein schwaches Fluoreszenzsignal der gesamten Zelloberfläche auf. Dieses Signal ist zwar stärker als das Grundrauschen der unbehandelten Zellen (rechtes Bild), dennoch muss es sich hierbei um eine unspezifische Wechselwirkung des Cy3-konjugierten Antikörpers mit der Zelloberfläche handeln. Wahrscheinlich wurden die Biotin-Tfn-gekoppelten Anti-Biotin-MMP nicht von den Zellen internalisiert, da die Partikelgröße durch die einzelnen Kopplungskomponenten einen zu großen Durchmesser erreichte. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass auch diese Mikropartikel nicht von der magnetischen Säule eluiert werden konnten. Ein Kontrollversuch mit Hilfe

der spektralphotometrischen Messung war in diesem Fall allerdings nicht möglich, da die Konzentration der Mikropartikel in der gelieferten Ausgangslösung sich als zu gering herausstellte. Auch diese geringe MMP-Konzentration in der Lösung könnte eine Ursache für das nicht vorhandene RE-Signal darstellen.

Ungekoppelte Mikropartikel

Die Kopplung der Dextran-MMP (Basic MicroBeads) mit Cy3-Tfn geschah auf Grundlage eines von Wissleder *et al.* (2003) veröffentlichten Patentes. In dieser Veröffentlichung wurde die Tfn-Konjugation durch partielle Oxidation der Dextranhülle, der anschließenden Proteinbindung sowie der darauf folgenden Reduktion der Schiff'schen Basen bewerkstelligt. In dieser Arbeit wurde das beschriebene Protokoll auf die im Labor herrschenden Bedingungen in zwei weiterentwickelten Protokollen angepasst. In beiden Protokollen wurden die in Tabelle 3-1 aufgeführten Schritte durchgeführt.

Tabelle 3-1: Protokollschritte zur Konjugation von Cy3-Tfn an Dextran-MMP.

Schritt	Methode
1	Umpufferung der MMP auf Acetatpuffer
2	Partielle Oxidierung der Dextran-Schicht
3	Umpufferung der MMP auf Natrium-Bicarbonat-Puffer
4	Umpufferung der MMP auf Natriumchlorid-Puffer
5	Inkubation der behandelten MMP mit Cy3-Tfn
6	Trennung Cy3-Tfn-gekoppelter MMP von ungekoppelten Cy3-Tfn

Protokoll 1

Die Kopplung des Cy3-Tfn an die ungebundenen Dextran-MMP wurde nach den oben aufgelisteten Schritten durchgeführt. Hierbei wurden alle Aufreinigungen bzw. Umpufferungen mit Hilfe der magnetischen μ -Säule durchgeführt. Die dadurch entstandene Cy3-Tfn-MMP-Lösung wurde anschließend in unterschiedlichen Verdünnungen (1:200; 1:12,5; 1:5 und 1:2,5 in Ham's F12) bei 37 °C bzw. 4°C für 30 min auf den zur Internalisierung vorbereiteten Zellen inkubiert. Bei diesem Versuch stellte sich heraus, dass nur bei einer Verdünnung von 1:2,5 ein schwach fluoreszierendes Kompartiment zu erkennen war (Abbildung 3-7).

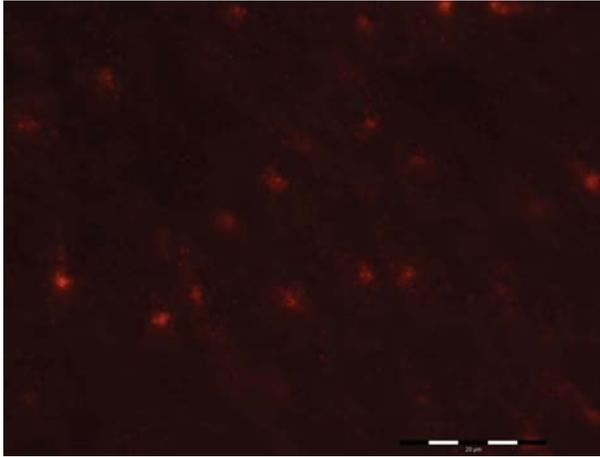


Abbildung 3-7: Internalisierte Cy3-Tfn gekoppelte Dextran-MMP (gekoppelt nach Protokoll 1). Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden für 30 min mit den Dextran-MMP bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

In Abbildung 3-7 ist die typische Fluoreszenz des RE schwach zu erkennen. Es ist anzunehmen, dass es sich bei diesem schwachen Leuchten um freies Tfn handelt. Nachdem die partielle Oxidation der Dextran-Schicht der MMP abgeschlossen war (Schritt 2), wurden die MMP mit Hilfe der magnetischen Säule aufgereinigt. Bevor die Lösung auf die Säule gegeben wurde, konnte eine schwach braune Färbung beobachtet werden. Nach der Elution der oxidierten MMP war keine Färbung der Lösung mehr zu erkennen. Es ist anzunehmen, dass die MMP die zuvor ohne Probleme von der Säule eluiert werden konnten (Schritt 1), nach der oxidativen Veränderung der Partikeloberfläche, Wechselwirkungen mit der Säulenoberfläche eingegangen sind. So konnten die Partikel weder von der magnetischen Säule eluiert, noch mit dem Cy3-Tfn konjugiert werden. Aus diesem Grund wurde das bestehende Protokoll zur Kopplung von Cy3-Tfn an die Dextran-MMP abgeändert.

Protokoll 2

Im veränderten Protokoll wurde die magnetische Säule nur für die Umpufferung der MMP auf Acetatpuffer verwendet (Schritt 1). Wohingegen die Umpufferungen in Schritt 3 und 4 durch einzelne Dialysevorgänge realisiert wurden. Die Aufreinigung der Cy3-Tfn-gekoppelten MMP (Schritt 6) wurde schließlich mit Hilfe einer Sepharose 4B gepackten Säule durchgeführt. In Abbildung 3-8 sind die durch Protokoll 1 bzw. 2 hergestellten und anschließend von CHO-Zellen internalisierte Dextran-MMP gegenüber gestellt. Die hier links dargestellten dar gestellten CHO-Zellen zeigen im Gegensatz zu den in Abbildung 3-7 dargestellten Zellen nicht das typische Fluoreszenzsignal des RE. Vielmehr ist diese Abbildung von einem hohen Hintergrundrauschen gekennzeichnet. Beide Abbildungen stammen aus unterschiedlichen Versuchen, wobei die MMP auf gleiche Art und Weise nach Protokoll 1 mit Cy3-Tfn konjugiert wurden. Die stark voneinander abweichenden optischen Ergebnisse lassen wiederum darauf schließen, dass die oxidierten MMP

Wechselwirkungen mit der μ -Säule eingehen und es sich in den Abbildung lediglich um freies internalisiertes Cy3-Tfn handelt. Im Gegensatz dazu wird in der rechten Aufnahme der Abbildung 3-8 deutlich, dass das veränderte Protokoll 2 zu einer erfolgreichen Kopplung des Cy3-Tfn an die Dextran-MMP führt. Nach der Internalisierung zeigen die Zellen ein deutliches und typisches Fluoreszenzsignal der einzelnen RE.

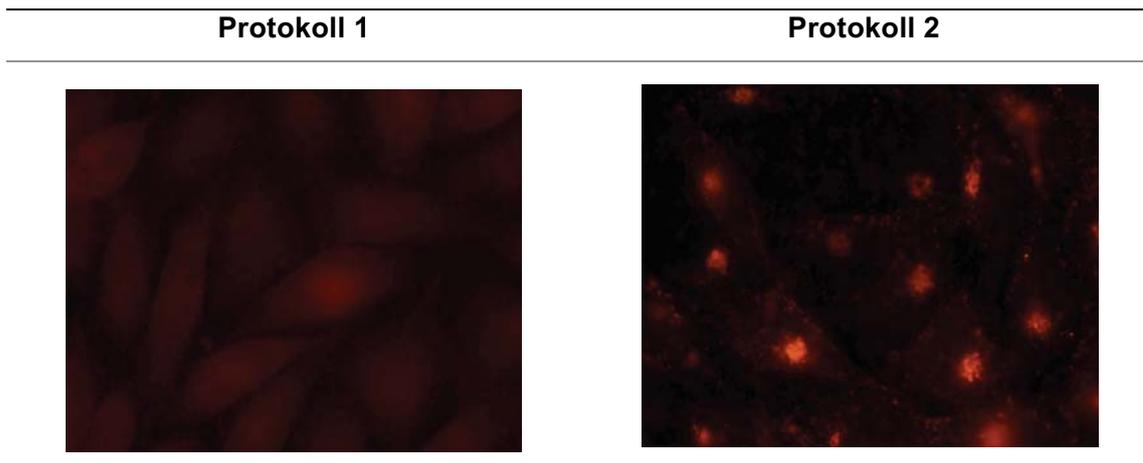


Abbildung 3-8: Internalisierte Cy3-Tfn-gekoppelte Dextran-MMP. Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden für 30 min mit den Dextran-MMP bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. (Links: nach Protokoll 1 gekoppelte MMP, Rechts: nach Protokoll 2 gekoppelte MMP).

3.4. Aufreinigung der Cy3-Tfn-gekoppelten MNP durch Gelfiltration

Aufgrund der überzeugenden Ergebnisse bei der Kopplung des Cy3-Tfn an die Dextran-MMP kam auch bei den folgenden Versuchen die Sepharose 4B-Säule anstatt der magnetisierbaren μ -Säule zum Einsatz. Hierbei wurde sowohl freies Cy3-Tfn als auch mit kationischen bzw. anionischen MNP gekoppeltes Cy3-Tfn über eine 5 mL Sepharose 4B-Säule aufgereinigt.

3.4.1. Gelfiltration von ungekoppelten Cy3-Tfn

In Abbildung 3-9 sind ausgewählte Fraktionen des Cy3-Tfn-Säulenlaufes dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass in Fraktion 7 bereits ein schwaches Fluoreszenzsignal des RE zu verzeichnen ist. Ab Fraktion 12 ist eine starke Zunahme des Cy3-Tfn-Signals in den RE der Zellen zu verzeichnen, das sich auch in Fraktion 16 widerspiegelt. Die visuelle Analyse der Zellen nach der Internalisierung von Cy3-Tfn lässt auf ein Signal schließen, das in Fraktion 7 beginnt, sich langsam steigert und bis

zum Elutionsende bestehen bleibt. Neben der qualitativen Fluoreszenzanalyse wurden die Aufnahmen der Zellen zudem quantitativ untersucht. Hiefür wurden die mit den einzelnen Cy3-Tfn-Fractionen behandelten Zellen bei einer Belichtungszeit von 4000 ms aufgenommen und anschließend vermessen. Der so erhaltene Grauwert wurde anschließend umgerechnet und als relative Fluoreszenz der einzelnen Fraktionen aufgetragen. Zudem wurden die gemessenen Extinktionswerte der einzelnen Fraktionen sowohl für Tfn als auch für Cy3 in diesem Diagramm (Abbildung 3-9) dargestellt. Bei der Extinktion kann ein deutlicher Peak des Cy3-Tfn beobachtet werden. Ab Fraktion 8 nimmt die Extinktion und somit die Konzentration an Cy3-Tfn in den einzelnen Fraktionen zu und findet in Fraktion 12 ihren Höhepunkt. Anschließend nimmt die Extinktion von Fraktion zu Fraktion langsam ab und ist in Fraktion 21 nicht mehr detektierbar. In Tabelle 3-2 sind die chromatographischen Kenngrößen für den Cy3-Tfn-Peak aufgelistet.

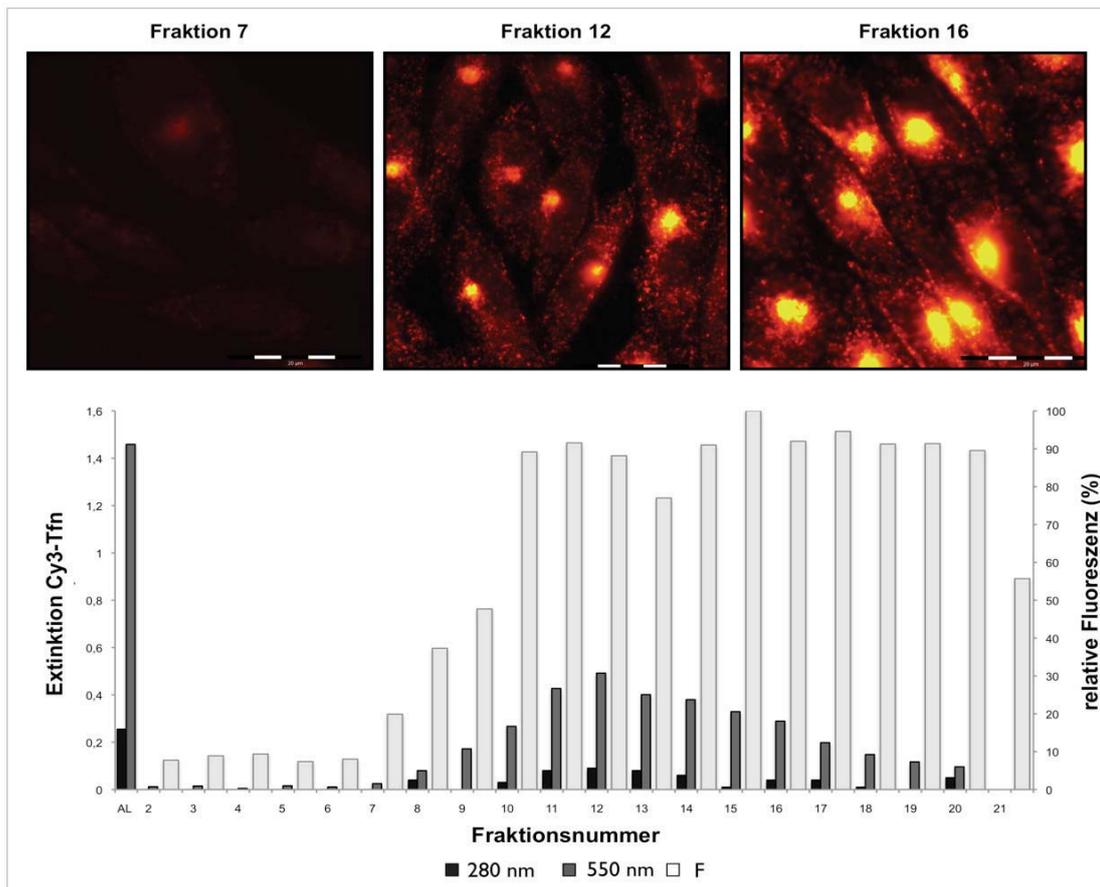


Abbildung 3-9: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (5ml Sepharose 4B-Säule) von Cy3-Tfn. Oben: Fluoreszenzanalyse. Die Fraktionen wurden für 30 min bei 37 °C zur Internalisierung mit den auf Deckgläsern kultivierten CHO-Zellen inkubiert und anschließend fixiert. Balken = 20 µm. Unten: Messwerte Fraktion dunkel-graue Balken = Extinktion von Tfn bei 280 nm, graue Balken = Extinktion von Cy3 bei 550 nm, hell-graue = durchschnittliche mittlere relative Fluoreszenz der durch Cy3-Tfn-markierten Zellen.

Tabelle 3-2: Chromatographische Kenngrößen der Cy3-Tfn-Gelfiltration

Kenngröße	Wert
Totvolumen	$V_0 = 1,4 \text{ ml}$
Retentionsvolumen	$V_R = 2,4 \text{ ml}$
Halbe Peakbreite der aufsteigenden Peakseite (bei 10 % Peakhöhe)	$a = 4 \text{ Fraktionen}$
Halbe Peakbreite der absteigenden Peakseite (bei 10 % Peakhöhe)	$b = 8 \text{ Fraktionen}$
Tailingfaktor nach IUPAC	$T = 2$

Der oben berechnete Tailingfaktor gilt als Maß für die Symmetrie eines chromatographischen Peaks. Der hier aufgezeigte Cy3-Tfn-Peak besitzt keine nach Gauß definierte, Peaksymmetrie. Vielmehr handelt es sich bei diesem Peak um das sogenannte Tailing, da $T > 1$. Hierbei ist ein schnelles Ansteigen sowie ein langsames Abfallen des Peaksignals zu verzeichnen. Der im Vergleich zu einem Idealpeak breitere Peakverlauf weist auf Dispersionseffekte innerhalb der Säule hin. Die Effizienz des verwendeten Trennsystems ist demnach nicht ideal und kann z.B. durch eine Verlängerung der Säule verbessert werden.

Auch beim Fluoreszenzsignal ist ein Anstieg der Messwerte ab Fraktion 8 zu verzeichnen. Allerdings wird hier kein deutlicher Peak sichtbar, vielmehr bildet sich eine Plateau-Form des Fluoreszenzsignals bis Fraktion 20. Dieser Effekt kann dadurch begründet werden, dass die Zellen das Cy3-Tfn nur bis zu einer bestimmten Konzentration internalisieren können. So erzeugt die Cy3-Tfn-Konzentration in Fraktion 10 bereits ein maximales Fluoreszenzsignal der RE. Dieses Signal bleibt bis Fraktion 20 unter geringen Messschwankungen auf dem gleichen Niveau von ca. 90 % relativer Fluoreszenz.

3.4.2. Gelfiltration von Cy3-Tfn gekoppelten kationischen MNP

Auch die Cy3-Tfn-gekoppelten kationischen MNP sollten mit Hilfe der beschriebenen Gelfiltration vom freien Cy3-Tfn getrennt werden. Bereits nach der Kopplungsinokubation konnten Agglomerate im Ansatz beobachtet werden. Diese Aggregationen blieben zu einem großen Teil während der Elution auf der Säule hängen. In Abbildung 3-10 sind ausgewählte, internalisierte Fraktionen des Eluates der Gelfiltration von Cy3-Tfn gekoppelten kationischen MNP dargestellt. Bereits in

Ergebnisse

Fraktion 7 ist ein deutliches Fluoreszenzsignal zu verzeichnen. Allerdings handelt es sich bei diesem Signal nicht um das gewünschte RE, sondern um fluoreszierende Agglomerate der MNP. Die Anziehungskraft zwischen den kationischen MNP und dem Cy3-Tfn scheint so stark zu sein, dass sich nicht nur Tfn-MNP-Verbindungen bilden, sondern zudem benachbarte Tfn-MNP-Verbindungen Bindungen eingehen, und somit der Durchmesser dieser Partikel stark zunimmt. Diese Agglomerate sind viel zu groß, als dass sie von den Zellen internalisiert werden könnten. Während die Agglomerate in Fraktion 7 noch sehr groß sind (ca. 40 μm), ist in Fraktion 12 bereits ein kleiner Partikeldurchmesser (20 nm) zu beobachten. Auch in dieser Fraktion ist keine Fluoreszenz des RE zu verzeichnen. Erst in Fraktion 16 wird das Cy3-Tfn von den Zellen internalisiert und das RE zeigt sein typisches perinukleares Fluoreszenzsignal.

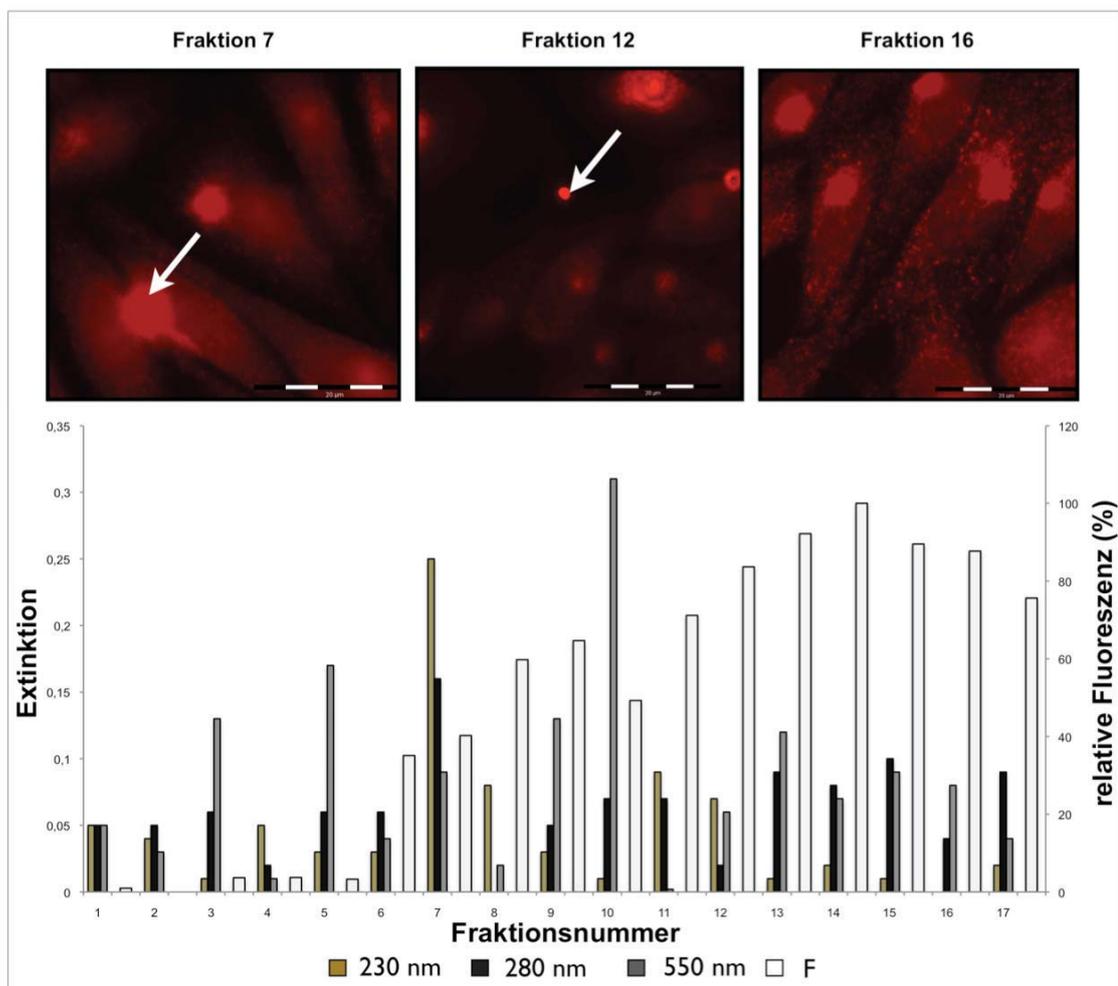


Abbildung 3-10: Analyse der 200 μl -Fraktionen der Gelfiltration (5ml Sepharose 4B-Säule) von Cy3-Tfn-gekoppelten kationischen MNP. Oben: Fluoreszenzanalyse. Die Fraktionen wurden für 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ zur Internalisierung mit den, auf Deckgläschen kultivierten CHO-Zellen inkubiert und anschließend fixiert. Balken = 20 μm . Unten: Messwerte der einzelnen Fraktionen. Dunkel-graue Balken = Extinktion von Tfn bei 280 nm, graue Balken = Extinktion von Cy3 bei 550 nm, braune Balken = Extinktion MNP bei 230 nm, hell-graue = durchschnittliche mittlere relative Fluoreszenz der durch Cy3-Tfn markierten Zellen.

Die Ergebnisse der spektralphotometrischen Messung sowie die Messwerte der Fluoreszenzanalyse sind im unteren Diagramm der Abbildung 3-10 vergleichend dargestellt. Im Gegensatz zum Säulenlauf des ungekoppelten Cy3-Tfn ist in diesem Versuch kein scharfer Peakverlauf zu erkennen. Wird nur die Extinktion der MNP bei 230 nm betrachtet, ist in Fraktion 7 ein Maximum festzustellen. Dieses Ergebnis bestätigt die Erkenntnisse der visuellen Fluoreszenzanalyse. Die erhöhten Extinktionswerte scheinen hierbei durch die Agglomerationen der gekoppelten MNP begründet zu sein. Bei 550 nm ist ein Maximum in Fraktion 5 und ein zweites Maximum in Fraktion 10 zu verzeichnen. Auch hierbei handelt es sich um agglomerierte MNP, da die Zellen dieser Fraktionen kein fluoreszierendes RE aufwiesen. Ab Fraktion 13 ist die Extinktion bei 230 nm so gering, dass das Vorhandensein von gekoppelten MNP in diesen Lösungen ausgeschlossen werden kann. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Signale des ungekoppelten Cy3-Tfn. Auch die visuelle Analyse der Zellen nach der Internalisierung dieser Fraktionen zeigte keine Agglomerationsbildung, sondern das typisch fluoreszierende RE in der Nähe des Zellkerns. Im Vergleich zum Säulenlauf des ungekoppelten Cy3-Tfn beginnt die relative Fluoreszenz nicht in Fraktion 7, sondern bereits in Fraktion 6. Zudem ist in diesem Diagramm keine Plateau-Form zu erkennen, sondern zwei in einander laufende Peaks. Hierbei hat der erste Peak bei Fraktion 8 und 9 sein Maximum, der zweite Peak bei Fraktion 14. Auch bei dieser Auswertung wird ersichtlich, dass zunächst die Aggregate der Cy3-Tfn-gekoppelten MNP von der Säule eluiert werden und später das ungekoppelte Cy3-Tfn. Im Diagramm ist das erste Extinktionsmaximum der MNP (230 nm) in Fraktion 7 und das relative Fluoreszenzmaximum in Fraktion 9 zu finden. Diese Verschiebung um zwei Fraktionen lässt sich durch die nach der Internalisierung stattfindenden Waschschriffe erklären. MNP die weder auf der Zelloberfläche noch auf der Oberfläche des Deckgläschens unspezifisch gebunden haben, werden dadurch vom Deckgläschen weggespült und sind anschließend nicht mehr unter dem Mikroskop sichtbar.

Zusammenfassend ist das Ergebnis dieses Versuches, dass sich die kationisch geladenen MNP durch ihr verstärktes Aggregationsverhalten in Gegenwart von Proteinen für eine Isolierung der RE als ungeeignet erweisen.

3.4.3. Gelfiltration von Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP

Die anionischen MNP wurden nach ihrer Kopplungsinkubation auf eine vorbereitete 5 ml Sepharose 4B-Säule gegeben. Im Gegensatz zu den kationischen MNP zeigten diese keine starke Agglomerationsbildung in Gegenwart von Proteinen. Während des Säulenlaufs waren bei dieser Probe keine unspezifischen Wechselwirkungen der MNP

mit dem Säulenmaterial zu erkennen. Zudem konnten zwei Banden auf der Säule visuell beobachtet werden. Bei der schnelleren braun gefärbten Bande handelte es sich um die gekoppelten MNP. Die langsamere hellrot gefärbte Bande kam durch das ungekoppelte Cy3-Tfn zu Stande. Nach der Elution wurden die gesammelten Fraktionen zur Internalisierung für 30 min bei 37°C auf die vorbereiteten Zellen gegeben. In Abbildung 3-11 sind ausgewählte Fraktionen dargestellt.

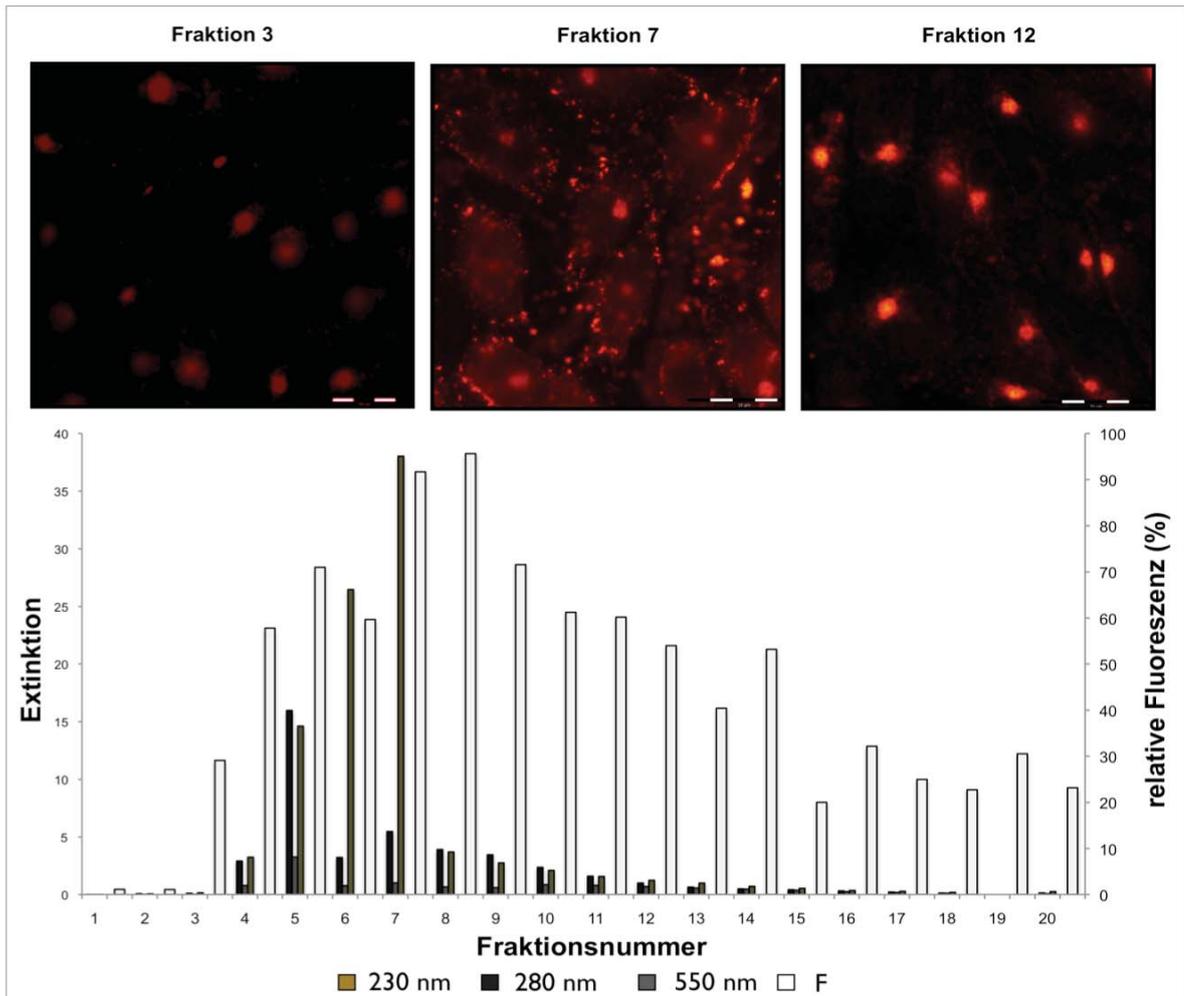


Abbildung 3-11: Analyse der 200 µl-Fraktionen der Gelfiltration (5ml Sepharose 4B-Säule) von Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP. Oben: Fluoreszenzanalyse. Die Fraktionen wurden für 30 min bei 37 °C zur Internalisierung mit den auf Deckgläschen kultivierten CHO-Zellen inkubiert und anschließend fixiert. Unten: Messwerte der einzelnen Fraktionen. Dunkel-graue Balken = Extinktion von Tfn bei 280 nm, graue Balken = Extinktion von Cy3 bei 550 nm, braune Balken = Extinktion MNP bei 230 nm, hell-graue = durchschnittliche mittlere relative Fluoreszenz der durch Cy3-Tfn markierten Zellen.

Im Gegensatz zum ungekoppeltem Cy3-Tfn, welches erst ab der achten Fraktion eine schwache Fluoreszenz des RE aufweist, ist bei den Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP schon ab Fraktion 4 ein Fluoreszenzsignal zu verzeichnen. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um das fluoreszierende RE, sondern um etwa 20 µm große

Ablagerungen zwischen den Zellen. Es treten demnach auch bei der Kopplung der anionischen MNP Agglomerate auf, die von den Zellen nicht aufgenommen werden können. In Fraktion 7 sind neben den an den Zellen haftenden Agglomeraten auch fluoreszierende perinukleare RE zu erkennen. Hierbei wird die Affinität der Agglomerate zu den sich an der Zelloberfläche befindenden TfnR sehr gut sichtbar. Die Zellen wirken hierbei, als ob sie durch eine Kette von aneinander gereihten MNP-Agglomeraten abgegrenzt werden. Ob die Fluoreszenz der RE durch Cy3-Tfn-gekoppelte MNP oder durch ungekoppeltes Cy3-Tfn verursacht wird, lässt sich durch die visuelle Analyse der Zellen nicht eindeutig klären. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass sich das Cy3-Tfn durch die wechselnden pH-Werte im Recycling-Weg von den MNP ablöst. Ab Fraktion 12 ist nur noch internalisiertes Cy3-Tfn unter dem Mikroskop sichtbar. Hierbei ist wiederum das typische Fluoreszenzsignal der RE in Zellkernnähe zu beobachten. Dieses Signal nimmt dann von Fraktion zu Fraktion weiter ab.

Weiterhin wurde die Extinktion sowie die relative Fluoreszenz der einzelnen Fraktionen vermessen bzw. berechnet. Die einzelnen Messergebnisse sind im Diagramm der Abbildung 3-11 aufgetragen. Bereits in Fraktion 3 ist eine messbare Fluoreszenz zu verzeichnen. Diese ist durch die MNP-Agglomerate zu erklären, welche zuerst von der Säule eluiert werden. In Fraktion 5 sind neben einer relativen Fluoreszenz von 70 % Extinktionswerte von ca. 15 Adsorptionseinheiten bei 230 nm und 280 nm zu verzeichnen, was auf einen Kopplungserfolg des Cy3-Tfn mit den anionischen MNP hinweist. In Fraktion 7 befindet sich die relative Fluoreszenz bei nahezu 100 %. Auch das Maximum der MNP-Extinktion bei 230 nm ist in dieser Fraktion lokalisiert. Ein deutlicher Peak der eluierten MNP erstreckt sich von Fraktion 4 bis Fraktion 12, wobei die Extinktion in Fraktion 8 sprunghaft um das siebenfache kleiner wird. Ab Fraktion 13 sind keine MNP in den einzelnen Proben messbar. Hierbei handelt es sich um das später eluierte Cy3-Tfn. Es wird deutlich, dass die 5 ml Sepharose 4B-Säule keine optimale Trenneffizienz aufweist. Die zu trennenden Substanzen zeigen keine aufeinander folgenden Peaks. Die Peaks laufen vielmehr ineinander und Dispersionseffekte entstehen. Wie bereits bei dem Säulenlauf von ungekoppelten Cy3-Tfn festgestellt, könnte eine längere Säule hierfür Abhilfe schaffen.

Um eine Agglomeration der MNP zu vermeiden, wurde dem Elutionspuffer BSA mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml hinzugefügt. Das BSA sollte hierbei freie Bindungsstellen auf den MNP und später auf der Deckgläschenoberfläche quenschen. In Abbildung 3-12 sind ausgewählte Elutionsfraktionen dieses Säulenlaufes dargestellt.

In der abgebildeten Fraktion 4 ist eine deutliche Fluoreszenz des RE zu erkennen. Hierbei tritt durch das im Elutionspuffer vorhandene BSA keine Agglomeration der MNP auf. Da ungekoppeltes Cy3-Tfn erst ab Fraktion 7 eine Fluoreszenz der RE in den Zellen bewirkt (Abbildung 3-9) ist davon auszugehen, dass die Fluoreszenz des RE in Fraktion 4 durch die gekoppelten MNP begründet ist. Diese werden durch ihre Größe während der Gelfiltration als erstes von der Säule eluiert. Ab Fraktion 7 handelt es sich wieder um ungebundenes Cy3-Tfn, was nach den gekoppelten MNP von der Säule eluiert wird. Auch in diesen Abbildungen ist ein klares Fluoreszenzsignal des Recycling Kompartiments in Zellkernnähe zu beobachten.

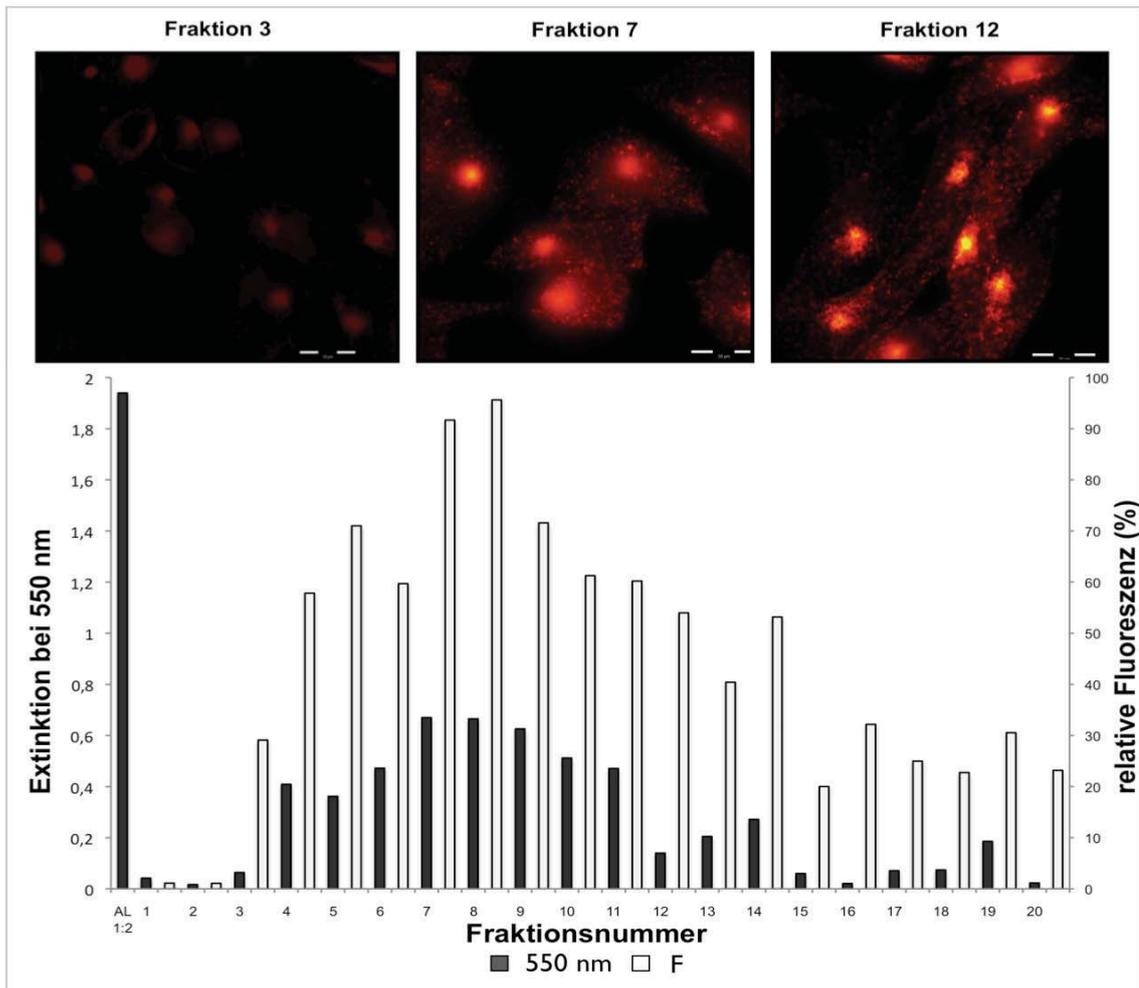


Abbildung 3-12: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (5ml Sepharose 4B-Säule) von Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP. Dem Elutionspuffer wurden 0,5 mg/ml BSA hinzugegeben. Oben: Fluoreszenzanalyse. Die Fraktionen wurden für 30 min bei 37 °C zur Internalisierung mit den auf Deckgläschen kultivierten CHO-Zellen inkubiert und anschließend fixiert. Balken = 20 µm. Unten: Messwerte der einzelnen Fraktionen. Dunkel-graue Balken = Extinktion von Tfn bei 280 nm, graue Balken = Extinktion von Cy3 bei 550 nm, braune Balken = Extinktion MNP bei 230 nm, hell-graue = durchschnittliche mittlere relative Fluoreszenz der durch Cy3-Tfn markierten Zellen.

Durch die Anwesenheit von BSA werden zudem unspezifische Bindungen des Cy3-Tfn an der Deckgläschenoberfläche vermieden. So erscheinen die Zellen mit einer klaren Fluoreszenz, ohne Hintergrundsignale unter dem Fluoreszenzmikroskop. Weiterhin sind die bei 550 nm photometrisch gemessenen Extinktionswerte sowie die relative Fluoreszenz der einzelnen Fraktionen dargestellt. Da sich in diesem Versuch zusätzlich BSA im Elutionspuffer befand, konnten keine Extinktionswerte bei 229 und 280 nm erstellt werden. Auch BSA absorbiert bei 280 nm und würde die Messergebnisse verfälschen. Wie bereits durch die visuelle Analyse der Zellen nach der Internalisierung der einzelnen Fraktionen festgestellt wurde, befindet sich bereits in Fraktion 3 ein deutliches Signal sowohl in der Extinktion als auch bei der gemessenen Fluoreszenz. Durch die Gelfiltration werden die gekoppelten MNP von Fraktion 3 bis Fraktion 4 eluiert. Der in Abbildung 3-9 dargestellte Säulenverlauf von ungekoppeltem Cy3-Tfn weist in Fraktion 12 das Maximum des Elutionspeaks auf. Die hier dargestellten Elutionspeaks weichen allerdings von diesem Lauf ab. Bei der Betrachtung der Extinktionsmesswerte sind drei ineinander laufende Peaks erkennbar. Der erste Peak befindet sich in Fraktion 3 und 4 und beinhaltet die gekoppelten MNP. Weitere Peaks zeigen sich zum einen von Fraktion 5 bis 12 sowie von Fraktion 12 bis 20. Die Extinktionswerte des letzten Peaks zeigen allerdings ein starkes Schwanken der Messwerte. Diese drei Elutionspeaks finden sich auch in den Werten der relativen Fluoreszenz wieder. Es lässt sich hierbei nicht eindeutig klären, ob es sich beim zweiten und dritten Peak um ungekoppeltes Cy3-Tfn handelt. Eine mögliche Erklärung wäre eine Dimerisierung zwischen dem Cy3-Tfn und dem sich im Elutionspuffer befindlichen BSA. Wobei diese Dimere im zweiten Peak eluiert werden würden und der dritte Peak ungekoppeltes Cy3-Tfn enthalten müsste.

Werden die einzelnen Säulenverläufe des ungekoppelten Cy3-Tfn sowie der gekoppelten kationischen bzw. anionischen MNP miteinander verglichen, stellen sich die anionischen MNP als das am besten geeignete Ferrofluid für die Kopplung von Cy3-Tfn heraus. Diese bilden in Anwesenheit von BSA keine Agglomerate und werden von den Zellen internalisiert, was für eine spätere Isolierung der RE von entscheidender Bedeutung ist. Allerdings stellt die Gelfiltration mit Hilfe einer 5 ml Sepharose 4B-Säule noch keine effiziente Trennmethode zur Isolierung der Cy3-Tfn- gebundenen MNP vom ungekoppelten Cy3-Tfn dar. Dieses Problem könnte eine Säule lösen, die zwar das gleiche Volumen, jedoch einen geringeren Durchmesser und eine größere Länge aufweist.

3.5. Aufreinigung Cy3-Tfn-gekoppelter MNP mittels FPLC

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die zur Gelfiltration verwendete Sepharose 4B-Säule weder eine effiziente (breite Peaks) noch eine selektive Trennung des freien Cy3-Tfn von den Cy3-Tfn-gekoppelten MNP ergab. Die Elutionspeaks beider Komponenten erschienen nicht nacheinander, sondern der Elutionspeak des ungekoppelten Cy3-Tfn lief in den früheren Elutionspeak der gekoppelten MNP. Der Retentionsunterschied und somit die Selektivität der chromatographischen Säule war bei diesen Versuchen zu gering. Um die Selektivität und somit Auflösung der beiden Komponenten zu verbessern, wurde eine Vergrößerung der Bodenzahl, sprich eine längere und zugleich schmalere Säule eingesetzt. Hierbei musste allerdings beachtet werden, dass durch die verlängerte Form der Säule eine Erhöhung des Gegendrucks nötig wurde. Aus diesem Grunde wurde die Säule an eine FPLC-Anlage angeschlossen. Diese garantierte während der Gelfiltration der einzelnen Proben einen kontinuierlichen und konstanten Fluss durch die Säule.

Die verwendete Säule verfügte über eine Länge von 21 cm sowie über einen Durchmesser von 0,5 cm. Die Flussrate wurde auf 0,2 ml/min eingestellt. Somit wurde pro min eine Fraktion (200 µl) in vorbereitete Reaktionsgefäße am Ausgang der Säule gesammelt. Da das im Elutionspuffer enthaltene BSA auch von der Säule aufgetrennt wurde, wurde in die Reaktionsgefäße zuvor BSA vorgelegt, so dass auch in den einzelnen eluierten Fraktionen eine Konzentration von 0,5 mg/ml enthalten war.

3.5.1. Gelfiltration des ungekoppelten Cy3-Tfn

Wie in den vorangegangenen Versuchen wurde zunächst ungekoppeltes Cy3-Tfn über die Säule gegeben, um Vergleichswerte für die Aufreinigung von Cy3-Tfn gekoppelten MNP zu erhalten. In Abbildung 3-1 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einzelner Fraktionen dargestellt.

In Fraktion 12 ist bereits das typische Fluoreszenzsignal des Recycling Kompartiments in der Nähe des Zellkerns zu beobachten. In Fraktion 16 ist ein stärkeres Signal dieser Kompartimente zu verzeichnen, welches in Fraktion 20 wiederum schwächer wird. Auch die Messwerte der einzelnen Fraktionen sind in Abbildung 3-13 vergleichend dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass die Zellen ab der Fraktion 11 bereits eine messbare Fluoreszenz aufweisen. Dieses Fluoreszenzsignal ist bis in Fraktion 21 erkennbar.

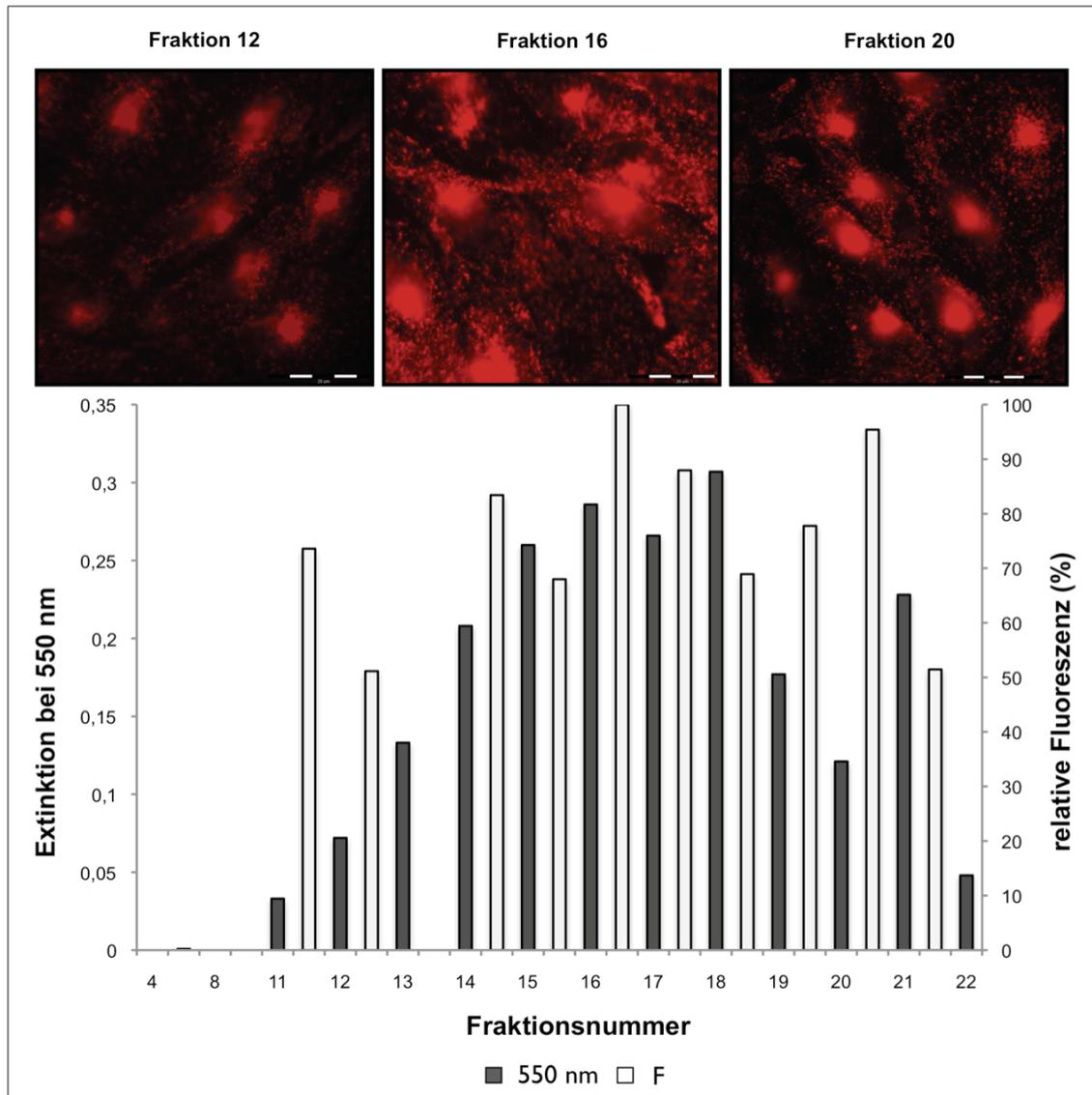


Abbildung 3-13: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (Sepharose 4B-Säule, FPLC) von Cy3-Tfn. Dem Elutionspuffer wurden 0,5 mg/ml BSA hinzugegeben. Oben: Fluoreszenzanalyse. Die Fraktionen wurden für 30 min bei 37 °C zur Internalisierung mit den auf Deckgläschen kultivierten CHO-Zellen inkubiert und anschließend fixiert. Balken = 20 µm. Unten: Messwerte der einzelnen Fraktionen. Graue Balken = Extinktion von Cy3 bei 550 nm, hell-graue = durchschnittliche mittlere relative Fluoreszenz (F) der durch Cy3-Tfn-markierten Zellen.

Auch bei diesem Versuch wird deutlich, dass die Zellen nur eine bestimmte Konzentration an Cy3-Tfn aufnehmen können, da im Fluoreszenzsignal kein idealer Peak zu erkennen ist. Betrachtet man hingegen die Extinktionswerte des Cy3 bei 550 nm, ist ein Maximum in Fraktion 16 zu erkennen. Auch dieser Peak erstreckt sich von Fraktion 11 bis Fraktion 21. Wird die Extinktion von Fraktion 18 und 21 nach unten korrigiert, entspricht die Form dieses Peaks nahezu der einer Gauß-Kurve. Der errechnete Tailingfaktor beträgt bei dieser Auftrennung lediglich 1,2. Bei der zuvor verwendeten kürzeren Sepharose-Säule nahm der Tailingfaktor einen Wert von 2 an (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Chromatographische Kenngrößen der Cy3-Tfn-Gelfiltration durch FPLC.

Kenngröße	Filtration durch FPLC	Filtration ohne FPLC
Totvolumen	$V_0 = 2 \text{ ml}$	$V_0 = 1,4 \text{ ml}$
Retentionsvolumen	$V_R = 3,2 \text{ ml}$	$V_R = 2,4 \text{ ml}$
Halbe Peakbreite der aufsteigenden Peakseite (bei 10 % Peakhöhe)	$a = 5 \text{ Fraktionen}$	$a = 4 \text{ Fraktionen}$
Halbe Peakbreite der absteigenden Peakseite (bei 10 % Peakhöhe)	$b = 6 \text{ Fraktionen}$	$b = 8 \text{ Fraktionen}$
Tailingfaktor nach IUPAC	$T = 1,2$	$T = 2$

In Tabelle 3-3 wird deutlich, dass die Gelfiltration über die an die FPLC angeschlossene längere Sepharose-Säule ein höheres Tot- und Retentionsvolumen mit sich bringt, wodurch zudem die Retentionszeit verlängert wird. Der erhöhte Zeit- und Pufferverbrauch bringt jedoch eine verbesserte Symmetrie des Cy3-Tfn-Elutionspeaks mit sich.

3.5.2. Gelfiltration der Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP

Nachdem das freie Cy3-Tfn vollständig von der Säule eluiert war, wurde die Säule zunächst mit Elutionspuffer ausgiebig gewaschen. Im Anschluss wurden die gekoppelten anionischen MNP vom ungekoppelten Cy3-Tfn getrennt. Auch die hier gesammelten Fraktionen des Eluats wurden mit den zur Internalisierung vorbereiteten Zellen inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Ausgewählte Fraktionen sind in Abbildung 3-14 dargestellt. Die hier abgebildeten Zellen der Fraktion 7 zeigen bereits schwache Fluoreszenzsignale, welche auf die Lokalisierung der internalisierten Makromoleküle im RE schließen lassen. In Fraktion 9 ist bereits ein stärkeres Signal zu erkennen. Hierbei sind Ablagerungen von ca. 5 μm großen fluoreszierenden Teilchen an der Zelloberfläche zu erkennen. Aber auch das RE innerhalb der Zelle zeigt ein deutliches Fluoreszenzsignal. Es lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass die Cy3-Tfn-gekoppelten MNP an der Zelloberfläche verbleiben und lediglich ungekoppeltes Cy3-Tfn in die Zellen aufgenommen wird. In Fraktion 18 und 19 ist wiederum das typische Fluoreszenzsignal von ungekoppeltem, im RE lokalisiertem Cy3-Tfn zuerkennen. Außerdem sind die Extinktionen bei 229 nm und bei 550 nm sowie die relativen Fluoreszenzwerte der einzelnen Fraktionen aufgetragen.

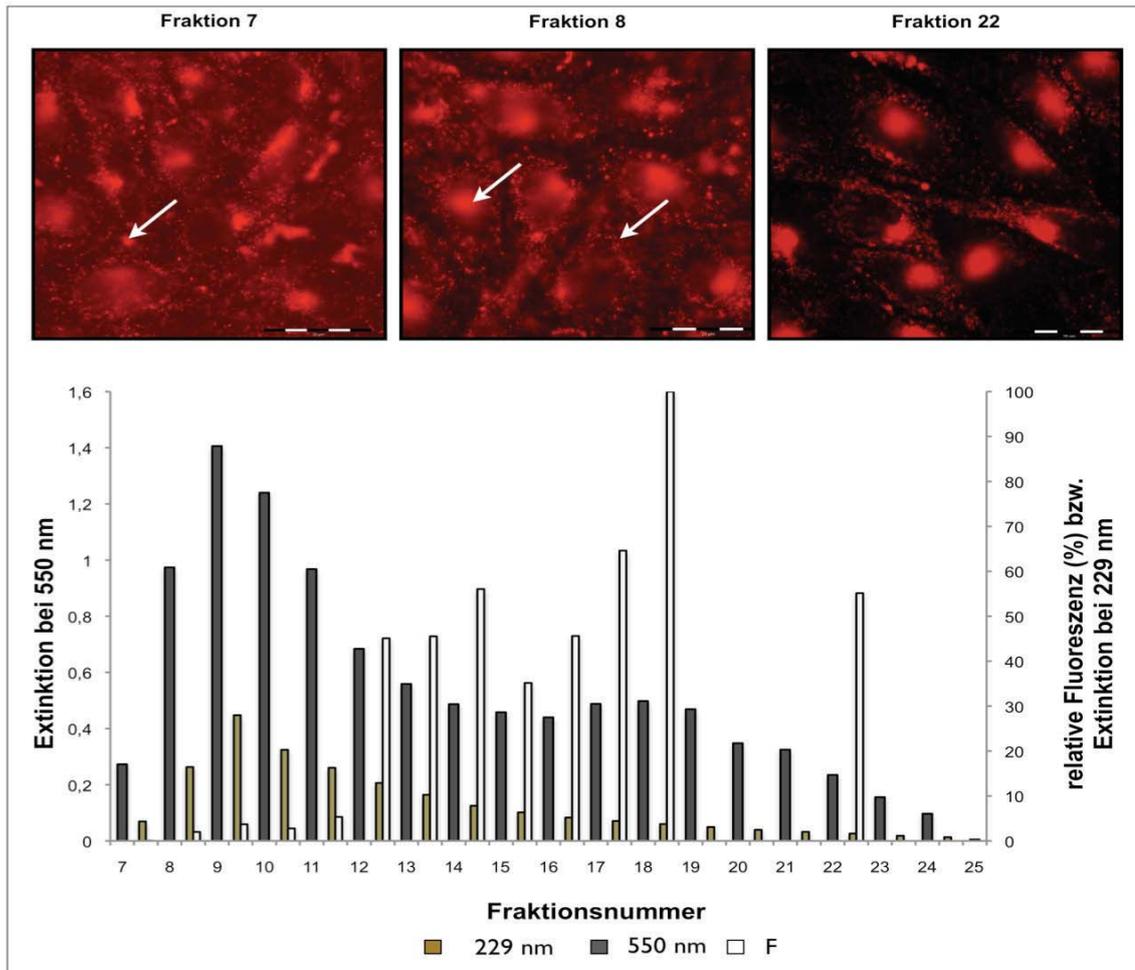


Abbildung 3-14: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (Sepharose 4B-Säule, FPLC) von Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP. Dem Elutionspuffer wurden 0,5 mg/ml BSA hinzugegeben. Oben: Fluoreszenzanalyse. Die Fractionen wurden für 30 min bei 37 °C zur Internalisierung mit den auf Deckgläschen kultivierten CHO-Zellen inkubiert und anschließend fixiert. Balken = 20 µm. Unten: Messwerte der einzelnen Fractionen. Graue Balken = Extinktion von Cy3 bei 550 nm, hell-graue = durchschnittliche mittlere relative Fluoreszenz (F) der durch Cy3-Tfn-markierten Zellen.

Hierbei handelt es sich um die Cy3-Tfn-gekoppelte MNP die durch ihre größere Masse als erstes von der Säule eluiert werden. Dieser Elutionspeak findet in Fraktion 9 sein Maximum. Allerdings überschneidet sich auch bei dieser Elution der Peak der gekoppelten MNP mit dem des ungekoppelten Cy3-Tfn. Es tritt eine Verschiebung des Cy3-Tfn-Peak-Maximums um zwei Fractionen von Fraktion 16 zu Fraktion 18 auf. In Fraktion 18 ist das stärkste Fluoreszenzsignal zu erkennen. Die gekoppelten MNP zeigen jedoch von Fraktion 7 bis 12 nur eine sehr schwache Fluoreszenz auf. Was darauf schließen lässt, dass ein Großteil der Partikel nicht internalisiert wurde. Vielmehr wurden diese bei den Waschschritten nach der Internalisierung von den Deckgläschen abgespült. Im Gegensatz zum Diagramm der Abbildung 3-14 sind hier bereits in Fraktion 7 Extinktionen sowohl bei 229 nm als auch bei 550 nm messbar.

3.5.3. Gelfiltration der Cy3-Tfn gekoppelten Dextran-MMP

Auch die Dextran-MMP wurden mit Cy3-Tfn gekoppelt und anschließend durch die Gelfiltration mittels FPLC aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Dextranschicht der Mikropartikel oxidiert und anschließend das Cy3-Tfn durch reduktive Aminierung an die Dextranschicht gekoppelt. Die Aufnahmen von einzelnen internalisierten Fraktionen dieses Versuches finden sich in Abbildung 3-15.

Die Internalisierung der Cy3-Tfn-gekoppelten Dextran-MMP zeigt nach der Aufreinigung durch die verlängerte Sepharose-Säule mittels FPLC nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal. Ab der Fraktion 5 ist ein Fluoreszenzsignal der RE zu erkennen. In Fraktion 17 sind neben dem fluoreszierenden RE in der Zelle auch Ablagerungen zwischen und auf den Zellen erkennbar. Hierbei könnte es sich um Agglomerate handeln, die während des Kopplungsvorgangs von Cy3-Tfn an die Partikel entstanden sind, und gleichzeitig mit dem ungekoppelten Cy3-Tfn eluiert wurden. In Fraktion 24, der letzten Fraktion dieser Elution, ist hingegen kein Fluoreszenzsignal mehr erkennbar. Gleiche Schlüsse lassen sich auch aus den Messwerten, der Extinktion, sowie der Fluoreszenz ziehen.

Die im Diagramm der Abbildung 3-15 dargestellte relative Fluoreszenz wurde lediglich in jeder dritten Fraktion gemessen. Bereits in Fraktion 5 ist hierbei eine messbare Fluoreszenz vorhanden. Auch die Werte des Extinktionssignals zeigen in dieser Fraktion eine erhöhte Absorption des Cy3. Hierbei könnte es sich um internalisierte Cy3-Tfn gebundene MMP handeln, da auch in der visuellen Analyse der Zellen ein zwar schwaches aber typisches Leuchten des Recycling Kompartiments zu verzeichnen war. Das Signal in Fraktion 7 begründet sich allerdings eher durch fluoreszierende Ablagerungen zwischen und auf den Zellen. Ab Fraktion 13 beginnt die Elution der ungekoppelten Cy3-Tfn, was sowohl in den Messwerten der relativen Fluoreszenz als auch in denen der Extinktion bei 550 nm erkennbar ist. Wie bei der Elution von Cy3-Tfn gekoppelten anionischen MNP befindet sich das Maximum des Cy3-Tfn-Elutionspeaks in Fraktion 18. Da während der Kopplung von Cy3-Tfn an die MMP mehrere Verdünnungsschritte vollzogen wurden, ist das Extinktionssignal im Vergleich zu anderen Elutionen sehr schwach ($<0,3$). Dennoch ist trotz dieser Verdünnungsschritte ein Fluoreszenzsignal des RE zu verzeichnen, was nur durch die Endocytose der gekoppelten MMP begründet werden kann. Da das Cy3-Tfn im Gegensatz zu den anionischen MNP chemisch an die Dextranschicht der Mikropartikel gebunden ist. Deshalb ist eine Endkopplung beider Komponenten durch eine Änderung des pH-Werts innerhalb des Recycling-Weges ausgeschlossen.

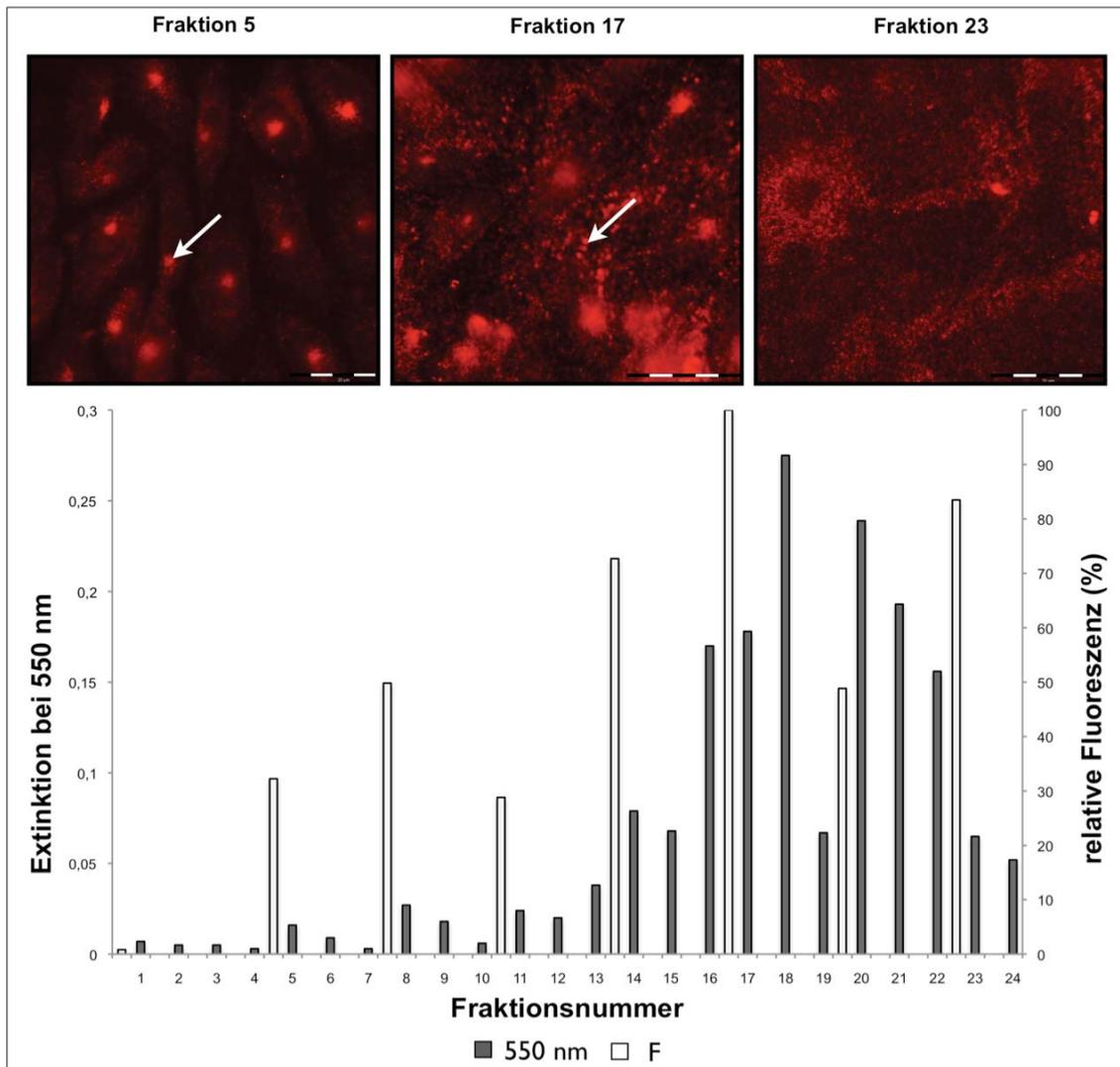


Abbildung 3-15: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (Sephacrose 4B-Säule, FPLC) von Cy3-Tfn-gekoppelten Dextran-MMP. Dem Elutionspuffer wurden 0,5 mg/ml BSA hinzugegeben. Balken = 20 µm. Oben: Fluoreszenzanalyse. Die Fractionen wurden für 30 min bei 37 °C zur Internalisierung mit den auf Deckgläschen kultivierten CHO-Zellen inkubiert und anschließend fixiert. Unten: Messwerte der einzelnen Fractionen. Graue Balken = Extinktion von Cy3 bei 550 nm, hell-graue = durchschnittliche mittlere relative Fluoreszenz (F) der durch Cy3-Tfn-markierten Zellen.

3.6. Endosomenisolierung

Zur Isolierung der Endosomen wurde unkonjugiertes holo-Tfn an anionische MNP mit einer 10-fach höheren Konzentration gekoppelt und mit Hilfe der Sepharose 4B-Säule mittels FPLC aufgereinigt. Nach der Internalisierung der Tfn-gekoppelten, anionischen MNP wurden die Endosomen aus dem hergestellten PNS mit Hilfe einer magnetischen Säule isoliert und analysiert (siehe 2.4.2). Die vorangegangene Internalisierung erfolgte bei 37 °C sowie bei 4 °C.

3.6.1. Spektralphotometrische Messung

Zunächst erfolgte die spektralphotometrische Messung der einzelnen Säulendurchläufe (Abbildung 3-16).

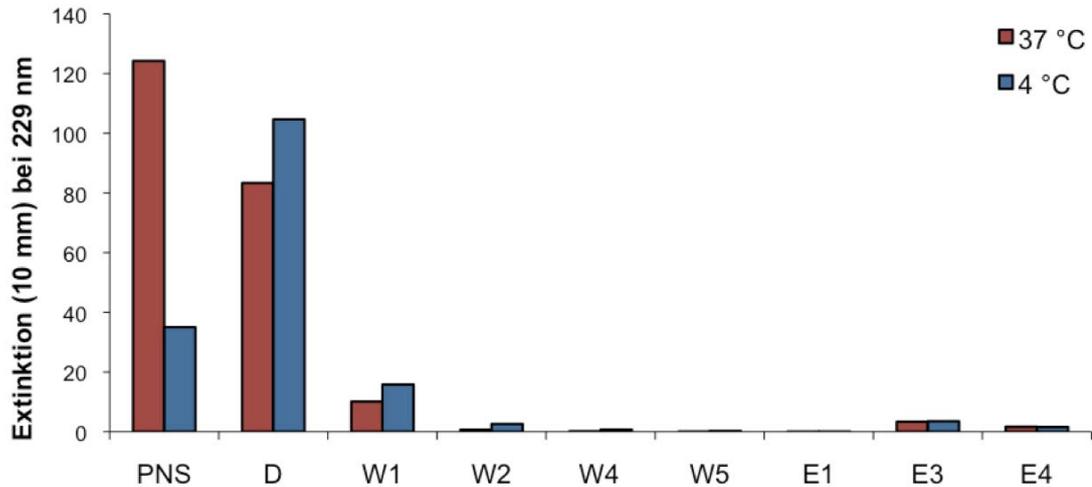


Abbildung 3-16: Spektralphotometrische Messung der einzelnen Säulendurchläufe der Endosomenaufreinigung. PNS = post-nuklearer Überstand vor der Aufreinigung, D = Säulendurchlauf, W 1-5 = Waschschrte 1-4, E1 = Elution in PBS⁻, E3 = Elution 1 in Ethanol mit Hilfe der Zentrifugation, E4 = Elution 2 in Ethanol mit Hilfe der Zentrifugation, nicht dargestellt: E2 = Elution in Probenpuffer bei 95 °C.

Die Auswertung der spektralphotometrischen Messung zeigt, dass ein großer Teil des PNS nicht auf der Säule zurückgehalten wird. Widersprüchlich ist hierbei der im Vergleich zur 4 °C-PNS-Probe zu Hohe Wert des Durchlaufes (D) der 4 °C-Probe. Das Extinktionssignal der einzelnen Waschschrte (W 1-5) nimmt bei beiden Proben jeweils ab. Eine Elution der Endosomen durch PBS⁻ ohne Zentrifugation (E1) scheint keinen Erfolg zu haben. Bei den späteren Elutionen mit Ethanol (E 3-4) erfolgte eine Zentrifugation der Säule (für 5 min, bei 1000 x g und 4 °C). Auch hierbei ist nur ein sehr schwaches Extinktionssignal bei beiden Proben zu verzeichnen, welches auch durch das Grundrauschen des Photometers verursacht werden kann. Es ist anzunehmen, dass ein Großteil des auf der Säule zurückgehaltenen Materials durch den zweiten Elutionsschritt mit Probenpuffer bei 95 °C eluiert wurde. Da die spektralphotometrische Messung durch das im Probenpuffer befindliche Bromphenolblau gestört wird, konnten diese Eluate nicht im Photometer vermessen werden.

3.6.2. Immundetektion von Markerproteinen des Recycling Endosoms

Die während der Endosomen-Aufreinigung entstandenen Proben wurden nicht nur spektralphotometrisch vermessen, sondern die enthaltenen Proteine wurden zudem über die Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Ein anschließender Westernblot lies die Detektion von Markerproteinen des Recycling Endosoms zu. Hierbei wurde das Vorhandensein des TfnR und der Rab-GTPase Rab4 untersucht. Während der Probenauftrennung durch die SDS-Gelelektrophorese läuft die Bande des Rab4-Proteins auf der Höhe der 29 kDa-Bande des Molekulargewichtsstandards, die Bande des TfnR auf Höhe der 90 kDa-Bande des Markers. In Tabelle 3-4 ist das Volumen der einzelnen auf das SDS-Gel aufgetragenen Proben dargestellt.

Tabelle 3-4: Pipettierschema für die auf das SDS-Gel aufgetragenen Proben. Jede Probe wurde, wenn nötig, auf ein Endvolumen von 20 µl mit Probenpuffer (PP) aufgefüllt und in die Taschen des Geles pipettiert.

Kenngroße	V_{Probe}	V_{PP}
Marker (M)	10 µl	10 µl
Post nuklearer Überstände (PNS)	1,5 µl	18,5 µl
Säulen-Durchlauf (D)	1 µl	19 µl
Waschschrift 1 (W 1)	20 µl	0 µl
Waschschrift 4 (W 4)	20 µl	0 µl
Elution 1 (E 1)	20 µl	0 µl
Elution 2 (E 2)	20 µl	0 µl
Elution 3 (E 3)	20 µl	0 µl

Die in Abbildung 3-17 dargestellten Banden entsprechen denen des TfnR. Hierbei ist zu erkennen, dass der PNS der 37 °C-Probe vor der Aufreinigung über die magnetische Säule eine stärkere Bande zeigt, als der PNS der 4 °C-Probe. Die Banden des Säulen-Durchlaufs weisen bei beiden Temperatur-Proben die gleiche Stärke auf. Auch die Banden des ersten Waschschriftes der Säule sind untereinander sehr ähnlich und weisen zudem die gleiche Bandenstärke wie die der PNS- und Säulendurchlaufproben auf. Von der magnetischen Säule wird demnach nur ein sehr geringer Teil auf der Säule zurückgehalten. Diese Banden sind bereits nach einer Detektionszeit von 3 s auf dem Film erschienen. Die Banden des vierten Waschschriftes, sowie die der Elution mit PBS⁻ sind erst nach einer Detektionszeit von 5 min schwach zu erkennen. Die 4 °C-Probe des vierten Waschschriftes gibt ein

stärkeres Signal als die 37 °C-Probe. Das eigentliche Ergebnis der Endosomenaufreinigung wird jedoch erst im ersten Elutionsschritt außerhalb des Magneten sichtbar. In dieser Probe ist eine sehr geringe Menge an TfnR enthalten. Es wird jedoch deutlich, dass die Bande der 37 °C Probe stärker ist als die der 4°C-Probe. Diese Ergebnis weist auf eine erfolgreiche Endosomenaufreinigung hin, da die MNP welche sich während ihrer Internalisierung im RE lokalisiert haben, ein stärkeres Signal geben, als die 4 °C-Probe. Da bei 4 °C keine Internalisierung statt findet, handelt es sich hierbei um unspezifisch gebundene TfnR des PNS, was auch als Hintergrundrauschen bezeichnet werden kann. Im Anschluss an die erste Elution erfolgten drei weitere Elutionsschritte. Der zweite Schritt wurde bei 95 °C mit Probenpuffer durchgeführt. Die starke Bande beider Proben zeigt, dass durch das im Probenpuffer befindliche SDS nochmals sehr viel TfnR-enhaltenes Material von der Säule gespült wird. Da die 4 °C-Probe und die 37 °C-Probe die gleiche Bandenintensität aufweisen ist fraglich, ob es sich hierbei um Material handelt, welches von den MNP auf der Säule zurückgehalten wurde oder um Material, das durch bestimmte Wechselwirkungen auf der Säule verblieb. Eine Elution mit Ethanol zeigte nicht den gewünschten Erfolg, da hierbei keine Banden detektiert werden konnten.

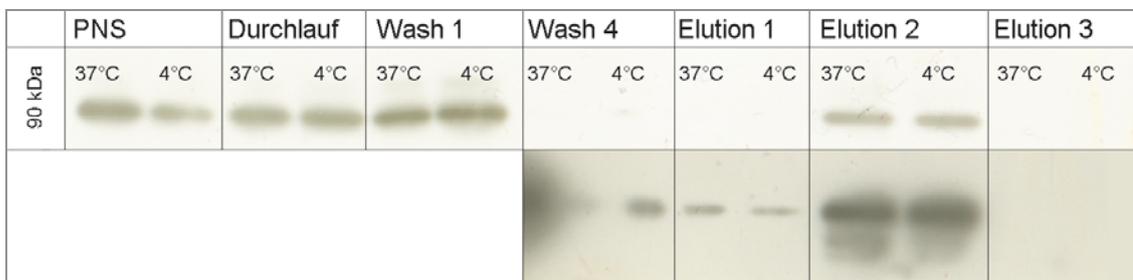


Abbildung 3-17: Immunoblotanalyse, Detektion des Transferrinrezeptors. Durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennte Proben der Endosomenisolierung, die aus dem PNS mit Hilfe einer magnetischen Säule isoliert wurden. PNS = post-nuklearer Überstand, Durchlauf = Säulendurchlauf, Wash 1-4 = Waschschrift 1 und 4, Elution 1 = Elution der Endosomen in PBS¹ bei 4 °C, Elution 2 = Elution der Endosomen in Probenpuffer bei 95 °C, Elution 3 = Elution der Endosomen in 70 %igem Ethanol durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 100 x g. Obere Bandenreihe = Detektionszeit von 3 s, untere Bandenreihe = Detektionszeit von 5 min.

Die durchgeführte Westernblotanalyse beinhaltet außerdem die Detektion der Rab-GTPase Rab4 bei 29 kDa. Die Banden der einzelnen Proben sind in Abbildung 3-18 dargestellt. Die Bande der 4 °C-Probe im PNS und im Säulen-Durchlauf erscheint etwas schwächer als die der 37 °C-Probe, wohingegen die Bande der 4 °C-Probe im ersten Waschschrift eine stärkere Intensität aufweist. Wie bereits bei der Detektion des TfnR gezeigt, wird auch ein Großteil des im PNS enthaltenen Rab4 nicht von der Säule zurückgehalten. Obwohl die hier dargestellten Banden des Rab4 durch eine

Detektionszeit von 5 min entstanden sind, können keine Banden weder im vierten Waschschrift noch im ersten Elutionsschrift detektiert werden. Im Eluat des zweiten Elutionsschrittes mit Probenpuffer ist Rab4 enthalten, wobei die 4 °C-Probe ein stärkeres Signal aufweist. Die Elution mit 70 %igem Ethanol weist wiederum eine stärkeres Rab4-Signal in der 37 °C-Probe auf. Auch hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Eluaten nicht um PNS-Rückstände handelt, welche von den MNP auf der Säule zurückgehalten wurden, sondern um Material, was durch unbestimmte Wechselwirkungen auf der Säule verblieb.



Abbildung 3-18: Immunoblotanalyse, Detektion des Rab4-Proteins. Durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennte Proben der Endosomenisolierung, die aus dem PNS mit Hilfe einer magnetischen Säule isoliert wurden. PNS = post-nuklearer Überstand, Durchlauf = Säulendurchlauf, Wash 1-4 = Waschschrift 1 und 4, Elution 1 = Elution der Endosomen in PBS⁻ bei 4 °C, Elution 2 = Elution der Endosomen in Probenpuffer bei 95 °C, Elution 3 = Elution der Endosomen in 70 %igem Ethanol durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 100 x g. Detektionszeit = 5 min.

3.6.3. Silberfärbung

Um das gesamte Proteinspektrum der einzelnen Proben untersuchen zu können, wurde im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben eine Silberfärbung durchgeführt. In Abbildung 3-19 zeigt das silbergefärbte Proteingel. Hierbei spiegeln sich die gleichen Ergebnisse wie die der Westernblotanalyse wider. Der PNS der 37 °C-Probe enthält eine höhere Proteinkonzentration, als der PNS der 4 °C-Probe. Auch die Proteinkonzentration im Säulen-Durchlauf sowie im ersten Waschschrift zeigt, dass nur eine geringe Konzentration der Proteine von der magnetischen Säule zurückgehalten wird. Im Waschschrift 4 werden Banden der 4 °C-Probe sichtbar, während die 37 °C-Probe lediglich sehr schwache, kaum detektierbare Banden aufweist. Die Elution mit PBS⁻ ergibt auch hier nur sehr schwache, kaum sichtbare Banden. Die zweite Elution mit Probenpuffer erzielt eine höhere Proteinkonzentration als die PBS⁻-Elution, wobei in der zweiten Elution keine deutlichen Unterschiede in der Stärke der Bandenmuster zwischen der 4 °C- und der 37 °C-Probe zu erkennen sind. Die Elution mit 70 %igem Ethanol zeigt keine analysierbaren Bandenmuster auf. Wird das gesamte Proteingel betrachtet fällt auf, dass die Konzentration kleinerer Proteine (< 47 kDa) auf der rechten Seite des Proteingels immer geringer wird. Bereits im vierten Waschschrift sind diese Proteine kaum noch detektierbar. Dieses Phänomen spiegelte sich auch in der vorangegangenen Westernblotanalyse wider. Der größere TfnR (90 kDa) zeigte eine

Ergebnisse

schnellere und zu gleich saubere Detektion, als das Rab4 (29 kDa). Im ersten Elutionsschritt tritt eine stärkere Proteinbande in Höhe der 90 kDa Bande des Markers in der 4 °C-Probe auf. Die Banden der zweiten Elution sind nicht voneinander zu unterscheiden. Somit lässt sich aus dem silbergefärbten Proteingel lediglich erkennen, dass von der magnetischen Säule überwiegend Proteine zurückgehalten bzw. aus dem PNS isoliert sind, die eine Größe von mehr als 47 kDa aufweisen.

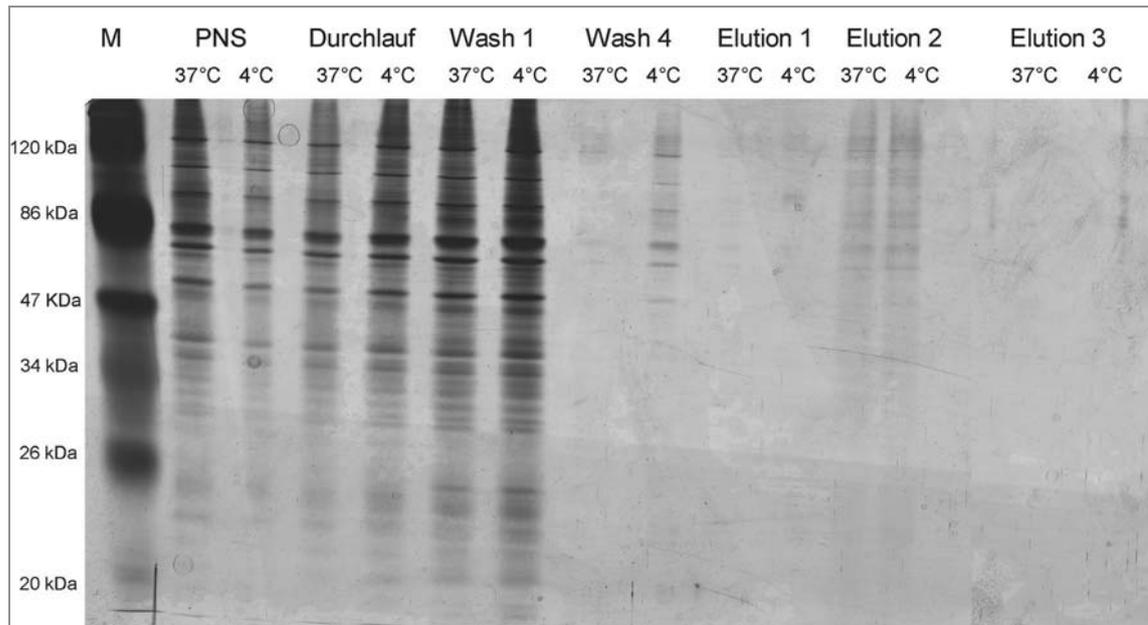


Abbildung 3-19: Silbergefärbtes Proteingel. Durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennte Proben der Endosomen-Aufreinigung, die mit Hilfe einer magnetischen Säule aus dem PNS isoliert wurden. M = Marker, PNS = post-nuklearer Überstand, Durchlauf = Säulendurchlauf, Wash 1-4 = Waschschrift 1 und 4, Elution 1 = Elution der Endosomen in PBS⁻ bei 4 °C, Elution 2 = Elution der Endosomen in Probenpuffer bei 95 °C, Elution 3 = Elution der Endosomen in 70 %igem Ethanol durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 100 x g.

4. Diskussion

4.1. Aufreinigung der Cy3-Tfn- gekoppelten MNP

Zur Abtrennung der Cy3-Tfn-gekoppelten MNP von überschüssigen Cy3-Tfn wurde zum einen die Auftrennung mittels magnetischer Säule (μ -Säule, Miltenyi), zum anderen mit Hilfe einer Gelfiltration (Sepharose 4B) durchgeführt. Hierbei wurden sowohl polar lösliche MNP als auch unpolar lösliche MMP verwendet.

4.1.1. Abtrennung des ungebundenen Cy3-Tfn von Cy3-gekoppelten MNP mittels Magnetseparation

Die zur Magnetseparation verwendete magnetische μ -Säule (Firma Miltenyi Biotec GmbH) ist eine mit Eisenkugeln gefüllte Säule, die zur Probenauftrennung in einen Magneten positioniert wird. Dadurch werden die Cy3-Tfn-gekoppelten MNP auf der Säule zurückgehalten, während das ungebundene, nicht magnetische Cy3-Tfn eluiert wird.

Die Magnetseparation polar löslicher MNP führte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Während die kationisch geladenen MNP nach der Elution eine starke Agglomeratbildung zeigten, konnten die anionischen MNP nicht von der magnetischen Säule eluiert werden. Die starke Agglomeration der kationischen MNP könnte hierbei in der Kopplung von Cy3-Tfn begründet sein. Die vorherrschende elektrostatische Anziehungskraft bewirkt nicht nur die Entstehung von Protein-MNP-Komplexen, sondern auch eine Anziehung der proteinbeschichteten Komplexe untereinander. Dadurch können sich größere Agglomerate in der Lösung entwickeln. Die schon während des Kopplungsvorgangs beobachtete Agglomerationsbildung wird durch die Probenauftragung auf die magnetische Säule noch weiter verstärkt. Das durch die Eisenpartikel verstärkte Magnetfeld führt nun zu einer Anreicherung der Protein-MNP-Komplexe. Diese haften vermutlich aneinander, wodurch der Partikeldurchmesser ein weiteres Mal erhöht wird. Die so entstandenen Agglomerationen können nach Ihrer Elution von der Säule aufgrund ihres zu hohen Partikeldurchmessers nicht mehr von den Zellen internalisiert werden.

Die Beschichtung der anionischen bzw. kationischen MNP zur Agglomerationsvermeidung wird vom Hersteller (Ferrotec GmbH) lediglich als Dispergentien beschrieben [Ferrotec, 2000]. In zahlreichen Veröffentlichungen wird der Einsatz bestimmter Tenside, wie z.B. Ölsäure, zur Oberflächenbeschichtung angegeben

[Gupta *et al.*, 2003; Berry *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2008]. Dispergentien bzw. Tenside werden während der Herstellung der MNP beigefügt, um eine Agglomeration durch gegenseitiges Abstoßen der Partikel in wässriger Lösung zu verhindern. Die elektrische Ladung der hier verwendeten anionischen MNP könnte durch ein angelagertes anionisches Tensid, welches z.B. über Carboxylat- (COO^-), Sulfonat- (SO_3^-) oder Sulfatgruppen (OSO_3^-) verfügt, begründet sein. Da diese MNP nur in sehr geringen Mengen bzw. gar nicht von der magnetischen Säule eluiert werden konnten, ist eine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial wahrscheinlich. Da die Säule mit wässrigen Lösungen equilibriert und gereinigt wird, ist anzunehmen, dass das Säulenbett aus Eisenkugeln oxidiert, also Korrosion stattfindet. Dabei würden sich auf der Oberfläche der Eisenkügelchen positiv geladene Eisenionen bilden die mit den negativ geladenen MNP eine Bindung eingehen. Somit verbleiben die MNP nicht nur durch magnetische Kräfte in der Säule sondern zusätzlich durch chemische Kräfte, die eine Elution in wässriger Lösung verhindern würde. Diese Annahme kann außerdem das Verbleiben der oxidierten Dextran-MMP erklären. Während unbehandelte Dextran-MMP ohne Probleme von der Säule eluiert werden können, verbleiben oxidierte Dextran-MMP auf der magnetischen Säule. Durch die Oxidation dieser Polysaccharidschicht sind auf der Oberfläche der MMP reaktive Aldehydgruppen entstanden. Diese Gruppen könnten mit den Eisenpartikeln ebenfalls eine chemische Reaktion tätigen. Zusammenfassend ist zu festzustellen, dass die Trennung der gekoppelten Cy3-Tfn-MNP vom ungekoppelten Cy3-Tfn durch die Magnetseparation keine optimalen Ergebnisse erzielt. Zum einen treten unerwünschte Wechselwirkungen der Partikel mit dem Säulenmaterial auf und zum anderen wird die Agglomeration unter den Cy3-Tfn-MNP-Komplexen verstärkt. Ob die mit Biotin-Tfn-gekoppelten MMP von der Säule eluiert werden konnten, ist unklar. Weder im Spektralphotometer noch in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnten diese Partikel detektiert werden. Außerdem muss beachtet werden, dass durch die in der Säule wirkenden mechanischen Kräfte (Gravitationskraft, magnetische Kräfte, Scherkräfte) die Bindung zwischen Protein und MNP leicht zerstört werden kann, da es sich hierbei lediglich um adsorptive Wechselwirkungen handelt [Mortimer, 2001]. Die Internalisierung der MPN von den CHO-Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose wäre dadurch nicht mehr möglich.

4.1.2. Chromatographische Aufreinigung der Cy3-Tfn-gekoppelten Nanopartikel

Alternativ zur Magnetseparation wurde die Trennung der Cy3-Tfn-gekoppelten MNP vom ungekoppelten Cy3-Tfn mit Hilfe der Gelfiltration durchgeführt. Hierbei wurden die kationischen MNP außer Acht gelassen, da in einem Testversuch deren Agglomeration zu einem irreversiblen Verstopfen der Säule führte. Die Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP sowie die gekoppelten Dextran-MNP wurden hingegen erfolgreich vom ungekoppelten Cy3-Tfn durch diese Gelfiltrationsmethode getrennt. Um die Auftrennung der einzelnen Substanzen noch effizienter und selektiver zu gestalten wurden verschiedene Parameter dieses Systems verändert:

- Zugabe von BSA in den Elutionspuffer, um Agglomerationen der Partikel zu vermeiden
- Verlängerung der Säule von 5 cm auf 21 cm, um die Peaksymmetrie zu verbessern und eine bessere Auftrennung der Materialien zu erlangen
- Gleichmäßige Probenaufgabe sowie gleichmäßiger Druck durch den Anschluss der Säule an eine FPLC
- Zentrifugation der gekoppelten Partikel vor der Säulenaufgabe, um bereits entstandene Agglomerationen zu entfernen

Die Peaksymmetrie vom eluierten Cy3-Tfn ist durch diese Maßnahmen zwar besser geworden (Tailingfaktor T ist von 2 auf 1,2 gesunken), aber die Elutionspeaks der Cy3-Tfn-gekoppelten Partikel und der des später eluierten ungekoppelten Cy3-Tfn verlaufen immer noch ineinander. Die Effizienz dieses Systems wurde gesteigert, wohingegen die Selektivität nicht optimal gestaltet wurde. Die Gelfiltration wird zumeist zur Trennung von verschiedenen Substanzen eingesetzt. Im hier vorliegendem Fall soll allerdings die gleiche Substanz, nämlich das Cy3-Tfn und an MNP gekoppeltes Cy3-Tfn aufgetrennt werden. Dabei muss beachtet werden, dass Tfn in der Säule durch vorherrschende Scherkräfte von den anionischen MNP abgelöst werden kann. Eine saubere Trennung beider Elutions-Peaks ist somit nicht möglich, da auch in den frühen MNP-Fraktionen immer ein Teil freies Tfn enthalten sein könnte. Tfn-gekoppelte MNP sind durch ihre Größe in den ersten Fraktionen der Elution lokalisiert. Das Potential aufgereinigte Tfn-gekoppelte MNP durch den Einsatz der Gelfiltration zu erhalten, ist bei diesem System also gegeben. Ob tatsächlich die Tfn-gekoppelten MNP oder lediglich das freie Tfn von den Zellen internalisiert wird, muss genauer geprüft werden.

4.2. Internalisierung der gekoppelten Nanopartikel

Von den vier getesteten Sorten magnetischer Partikel können nur die anionisch geladenen MNP sowie die Dextran-MMP für die Internalisierung von den CHO-Zellen verwendet werden. Während die kationischen MNP unter der Anwesenheit von Proteinen zu einer starken Agglomerationsbildung neigen, können die Anti-Biotin- MMP weder mit dem Spektralphotometer vermessen, noch in der Fluoreszenzanalyse detektiert werden. Hierfür können mehrere Ursachen verantwortlich sein. Vom Hersteller (Milteyi Biotec GmbH) wird keine Partikelkonzentration der Lösung angegeben. Eine mögliche Ursache dieser Ergebnisse wäre eine zu niedrig eingesetzte Partikelkonzentration. Durch zusätzliche Verdünnungsschritte während der Abtrennung des ungekoppelten Biotin-Tfn, sowohl durch die Magnetseparation als auch durch die Gelfiltration, ist die Konzentration weiter verringert worden. Die internalisierte Partikelmenge könnte somit nicht ausreichend sein, um sie durch Kopplung eines Cy3 markiertem Anti-Maus-Antikörper gegen den Biotin-Antikörper der MMP sichtbar zu machen. Eine andere Ursache wäre, dass die Internalisierung der Biotin-Tfn gebundenen MMP auf Grund der zu hohen Partikelgröße (Dextran-umhüllte Nanopartikel + Anti-Biotin-Antikörper + Biotin-Tfn) nicht stattgefunden hat. Die Partikel haften an der Zelloberfläche, wodurch die anschließende Antikörperinkubation lediglich ein oberflächliches Fluoreszieren der Zellen verursacht. Da in den Versuchen das Fluoreszenzsignal der Zelloberfläche kaum vom Hintergrundrauschen des Mikroskops zu unterscheiden war, sind beide Ursachen möglich.

Die erfolgreiche Internalisierung der Cy3-Tfn-gekoppelten, anionischen MNP über die rezeptorvermittelte Endocytose sowie der anschließende Transport der MNP über den Rezeptor-Recycling-Weg ist sehr unsicher. Das Cy3-Tfn ist lediglich über adsorptive Wechselwirkungen mit den anionischen MNP verbunden. Während des Recycling Weges werden unterschiedliche pH-Umgebungen durchlaufen [Hedman *et al.*, 1987]. Die Verringerung der pH-Werte in den einzelnen Endosomen hat eine Veränderung der Nettoladung des Proteins zur Folge. Zwar ist das Protein auch bei den vorherrschenden pH-Werten negativ geladen, die adsorptive Bindung des Proteins an die MNP könnte dennoch gestört werden, was ein Ablösen der MNP vom Tfn-TfnR-Komplex zur Folge hätte. Die MNP könnten deswegen das Endosom verlassen und den vom Rezeptor-Recycling-Weg in den lysosomalen Weg gelangen. Eine anschließende Isolierung der Recycling Kompartimente wäre dadurch nicht mehr möglich.

Auch die Cy3-Tfn gekoppelten Dextran-MMP können über andere Endocytose-Wege in die Zelle internalisiert werden. In einer Studie von Baravalle *et al.* (2005) wird Dextran als typischer Marker für den lysosomalen Weg in Zellen angesehen. Dextran wird demnach durch die Pinozytose aufgenommen und über die frühen und späten Endosomen zum Lysosom geleitet. Demnach können Cy3-Tfn-gekoppelte Dextran-MMP je nach Bindungsstelle auf der Zelle (TfnR oder unspezifische Bindung) entweder zum RE oder zum Lysosom transportiert werden. Um diese Wege unterscheiden zu können, müsste Cy3-gekoppeltes BSA an die Dextranschicht gekoppelt werden und anschließend eine Internalisierung dieser Partikel erfolgen. Der direkte Vergleich des Fluoreszenzsignals der Cy3-Tfn-gekoppelten MMP mit den Cy3-BSA-gekoppelten MMP würde Aufschluss über den endocytotischen Weg der Cy3-Tfn-gekoppelten MMP geben.

4.3. Proteinanalyse der isolierten Endosomen

Die Isolierung der Endosomen aus dem PNS von CHO-Zellen wurde mit Hilfe der Magnetseparation durchgeführt. Die Internalisierung der Cy3-gekoppelten anionischen MNP erfolgte bei 4 °C und 37 °C. Zuvor durchgeführte Untersuchungen ergaben, dass ungekoppelte anionische MNP nicht von der Säule eluiert werden können. Theoretische Überlegungen ließen allerdings den Schluss zu, dass die Endosomen, in denen sich die Cy3-Tfn-gekoppelten MNP befinden, wie eine Hülle agieren, was ungewollte Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial nicht zulässt.

Die während der Endosomen-Isolierung gesammelten Proben der einzelnen Wasch- bzw. Elutionsschritte wurden mit Hilfe der Silberfärbung und der Immunodetektion analysiert. Die Immunodetektion wurde mit Antikörpern, die gegen bestimmte Markerproteine des RE, wie der TfnR und Rab4, durchgeführt [Morata und Casler, 1999]. Beide Analysemethoden ergeben, dass ein Großteil des im PNS enthaltenen Materials nicht von der Säule zurückgehalten wird. Die Elution der zurückgehaltenen Partikel mit PBS⁻ erzeugt sowohl in der Silberfärbung, als auch in der Immunodetektion ein sehr schwaches Signal. Die TfnR-Banden sind in der Immunodetektion zwar auch sehr schwach, weisen jedoch ein stärkeres Signal in der 37 °C-Probe auf. Ein deutlicher Beweis, dass eine Anreicherung der TfnR durch eine Internalisierung MNP stattgefunden hat, denn bei 4 °C ist jegliche Endocytoseaktivität eingestellt. Die Bande der 4 °C-Probe entspricht möglicherweise den TfnR der Plasmamembran, an welche die MNP durch das gekoppelte Tfn gebunden haben. Die Rab4-Proteine weisen keine Bande in der Immunodetektion auf. Eine mögliche Ursache könnte eine zu hohe

Verdünnung der eingesetzten Antikörper sein. Eine andere Ursache wäre, dass sich die Partikel nicht in den frühen Endosomen befinden, die durch die Rab4-Proteine charakterisiert werden. Hierbei könnten die MNP in anderen Zellorganellen lokalisiert sein. Die Anwesenheit von TfnR im Eluat weist zwar auf die Internalisierung der MNP über den TfnR hin, muss jedoch keine Lokalisierung der Partikel im RE darstellen. Die stärkere Bandenbildung der Probenpuffereluat zeigt allerdings, dass die Säule nicht nur die MNP durch magnetische Kräfte zurück hält, sondern auch PNS-Material, das durch ungewollte Wechselwirkungen auf der Säule verbleibt. Durch die erhöhte Temperatur (95 °C) und das im Probenpuffer enthaltene SDS werden diese Wechselwirkungen zerstört und das unspezifisch gebundene Material eluiert. Hierbei zeigt die Bande der 37 °C Probe keine starken Unterschiede zur 4 °C Probe auf, was weiterhin auf unspezifische Wechselwirkungen in der Säule schließen lässt. Es ist fraglich, ob es sich hierbei um isolierte RE handelt, oder um PNS-Material, welches unspezifisch auf der Säule hängen geblieben ist. Eine Erhöhung des zum PNS hergestellten Zellmaterials könnte eine Unterscheidung der Einflüsse erleichtern, da dabei stärkere Banden entstehen würden. Die Proteinanalyse des isolierten Materials kann jedoch kein endgültig sicheres Ergebnis liefern, da die Markerproteine nicht nur in den RE, sondern auch im PNS vorkommen. Die Detektion weiterer Markerproteine des Recycling-Weges wäre hierbei hilfreich.

5. Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Isolierung des RE aus CHO-Zellen für eine anschließende Proteomanalyse zu entwickeln. Die hierfür notwendige Kopplung von holo-Tfn an die MNP wurde erfolgreich durchgeführt.

Der Fokus weiterer Untersuchungen sollte auf der Internalisierung der Nanopartikel liegen. Es muss geprüft werden, ob die Tfn-gekoppelten MNP tatsächlich über die TfnR der Zellen aufgenommen werden und anschließend den Rezeptor-Recycling-Weg durch die Zellen passieren. Eine mögliche Abspaltung der Tfn-Moleküle von den MNP durch vorherrschende pH-Gradienten in der Zelle, sollte ausgeschlossen werden. Außerdem könnten die Partikel anstatt zum RE zu den Lysosomen geführt werden. Zur Klärung dieser Fragen sind weitere Internalisierungsversuche (Puls Chase-Internalisierung der MNP, Internalisierung von Cy3-BSA als Markerproteine des lysosomalen Weges) sowie Immunoblotanalysen durchzuführen. Der PNS sollte auf weitere Markerproteine der einzelnen Organellen untersucht werden (z.B. Rab11 als Marker für das RE, Lamp-1 als Marker für Lysosomen) [Haas, 2002]. Um ein besseres Signal in der Immunoblotanalyse zu erhalten, sollte die Zellzahl erhöht werden, um so über mehr Zellmaterial für die PNS-Herstellung verfügen zu können.

In dieser Arbeit wurden zur Endosomenisolierung lediglich die anionisch geladenen MNP mit Tfn gekoppelt und internalisiert. Die Kopplung von Tfn an die Dextran-beschichteten Mikropartikel erwies sich als eine weitere funktionierende Alternative um Tfn-Moleküle an die Oberfläche von MNP zu koppeln. Hierbei könnten weiterführende Versuche zur Kopplungsreaktion von Tfn an die Dextranoberfläche durchgeführt werden. Dabei gilt es herauszufinden, welche Partikel- und Proteinkonzentration eingesetzt werden muss, um stärkere Signale in der Fluoreszenzanalyse zu erhalten.

Der Einsatz der Magnetseparation zur Isolierung der Endosomen sollte auf unspezifische Wechselwirkungen der PNS-Bestandteile mit dem Säulenmaterial geprüft werden. Können solche Wechselwirkungen nicht ausgeschlossen werden, ist es notwendig alternative Isolationssysteme zu finden. Es könnte eine andere magnetische Säule (LS-Säule, Miltenyi Biotec GmbH [Sakrzewa, 2005]), oder die Gelfiltration eingesetzt werden, denn die Recycling Endosomen sollten aus dem PNS für eine anschließende Proteomanalytik weitestgehend ohne Verunreinigungen mit anderen Zellbestandteilen isoliert werden.

6. Zusammenfassung

Aufgrund der steigenden Zahl von Krebserkrankungen in den Industrieländern, nicht zuletzt durch eine zunehmende Lebenserwartung begründet, werden große Hoffnungen in die Entwicklung von neuen Therapiemöglichkeiten gelegt. Entartete Zellen sind durch veränderte Proteinkonzentrationen der Zellmembran gekennzeichnet. Deren Regulierung erfolgt zumeist durch den endocytotischen Recycling-Weg. Hierbei muss geklärt werden, ob die Veränderung der Oberflächenkonzentration membranständiger Proteine durch eine Störung des Recycling Weges verursacht wird, indem an der Krebsentstehung beteiligte Proteine durch die vergleichende Analyse des Subproteoms normaler Zellen und Krebszellen identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Isolierung des Recycling Endosoms (RE) aus CHO-Zellen mit Hilfe von magnetischen Nanopartikeln (MNP) entwickelt. Die MNP binden, durch deren Kopplung mit holo-Transferrin (Tfn), an den membranständigen Transferrinrezeptor (TfnR) und werden durch Rezeptorvermittelte Endocytose in die Zelle internalisiert und über den Rezeptor-Recycling-Weg in das RE geführt. Da MNP im Lichtmikroskop nicht direkt detektiert werden können, wurde zunächst eine Methode zur Absorptionsmessung der MNP im Spektralphotometer entwickelt. Dabei standen vier verschiedene MNP-Typen zur Verfügung, die auf ihre Kopplungs- und Internalisierungstauglichkeit geprüft wurden. Während sich sowohl die kationisch geladenen MNP als auch die Anti-Biotin-Mikropartikel als ungeeignet erwiesen, zeigten die anionisch geladenen MNP sowie die Dextran-umhüllten Mikropartikel positive Ergebnisse hinsichtlich ihrer Cy3-Tfn-Kopplungs- und Internalisierungseigenschaften. Die Partikelinternalisierung wurde mit der Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Bevor die Partikel von den Zellen internalisiert werden konnten, erfolgte eine Abtrennung des ungekoppelten Tfn von den Tfn-gebundenen Partikeln, da beide um die Bindungsstellen der TfnR konkurrieren würden. Die Magnetseparation mit Hilfe einer magnetischen Säule stellte sich aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen der MNP mit dem Säulenmaterial als nicht durchführbar heraus. Deshalb wurde eine Gelfiltration mit Sepharose 4B entwickelt.

Zur Isolierung der RE wurden Tfn-gekoppelte anionische MNP von den Zellen internalisiert. Der durch den Zellaufschluß entstandene PNS wurde über eine magnetische Säule aufgereinigt, wodurch die Endosomen isoliert wurden. Eine anschließende qualitative Analyse der Markerproteinkonzentrationen zeigte eine Anreicherung der TfnR jedoch nicht von Rab4.

7. Literatur

- Alberts, B.** : Molekularbiology of the cell, 4. Aufl. New York: Garland Science, 2005.
- Sambrook J.** ; Russel D. W. : Molekular Cloning, A laboratory Manual, 3. Aufl. . New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Amersham pharma biotec** Products specification FluoroLink Cy3 monofunctional dye 5-pack, PA 23001, 1999.
- Amersham pharma biotec** Desalting and buffer exchange with Sephadex G-25, AA 18-1127 73, 1998.
- Baravalle, G.** ; Schober, D .; Huber, M. ; Bayer, N. ; Murphy, R. F. ; Fuchs, R. : Transferrin recycling and dextran transport to lysosomes is differentially by bafilomycin, nocodazole, and low temperature. In: Cell Tissue Res. (2005), 320 ; S: 99-113.
- Berry, C.** ; Charles, S. ; Wells, S. ; Dalby, M. J. ; Curtis, A. S. G. : The influence of transferrin stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. In: International Journal of Pharmaceutics (2004), 269; S: 211-226.
- Bleil, J.D.** ; Bretscher, M.S. : Transferrinreceptor and its recycling in HeLa cells. In: The EMBO Journal (1982), 3, 1; S: 351-355.
- Boenisch, T.** : Handbuch Immunchemische Färbemethode. 3. Auflage 2003, DakoCytomation GmbH, Hamburg Deutschland.
- Bonifacino, J.S.** ; Rojas, R. : Retrograde transport from the endosomes to the trans-Golgi-network. In: Nature Reviews, Molecular Cell Biology (2006).
- Butter, K.** : Iron(oxide) ferrofluids: synthesis, structure and catalysis. Doktorarbeit, Universität Utrecht (2003).
- Ceresa, B. P.** : Regulation of EGFR endocytotic trafficking by rab proteins. In: Histology and Histopathology (2006), 21 ; S: 987-993.
- Chen, W.** ; Feng, Y. ; Chen, D. : Rab11 is required for trans golgi network to plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. In: Molecularbiology of Cell (1998), 9 ; S: 3241-3257.
- Chia, W. J.** ; Tang, B. L. : Emerging roles for Rab family GTPases in human cancer. In: Biochimica et Biophysica Acta (2009), 1795 ; S: 110-116.
- Chmiel, H.** : Bioprozesstechnik . 2. Aufl. . München : Elsevier Spektrum Akademischer Verlag , 2006.
- Christifori, G.** : Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. In: EMBO Journal (2003), 22, 10 ; S: 2318-2323.
- Conner, S. D.** ; Schmid S. L. : Regulated portals of entry into cell. In: Nature Reviews, Molecular cell Biology (2003) , 422, S: 37-44.
- Daro, E.** ; Van der Sluijs, P. ; Galli, T. ; Mellmann, I. : Rab4 and cellubrevin define different early andosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. In: Cell Biology (1996), 93; S: 9559-9564.
- Ferrotec GmbH** : Datentabelle EMG Ferrofluide, 1998.
- Ferrotec GmbH** : Technik im Überblick, 2006.

- Goldenring, J.R.** ; Ray, G.S. ; Lee, J.R. : Rab11 is Dysplasia of Barrett's Epithelia. In: Journal Biology and Medicine (1999), 72 ; S: 113-120.
- Gupta, A. K.** ; Berry, C. ; Gupta, M. ; Curtis, A. : Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis. In: IEEE Transactions on nanobioscience (2005), 2, 4; S: 255-261.
- Gupta, A. K.** : Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. In: Biomaterials (2005), 26; S: 3995-4021.
- Haas, A.** : Wenn Fresszellen Verdauungsstörungen haben – ungewöhnliche Phagosomenbiogenese in Makrophagen. In: Biospektrum (2002), 8 ; S: 243-247.
- Högemann, S. D.** ; Bos, E. ; Blonet, C. ; Sato, F. ; Abe, T. ; Josephson, L. ; Weissleder, R. ; Gaudet, J. ; Sgori D. ; Peters, P. ; Basilion, J. P. : The transferring receptor: A potential molecular imaging marker for human cancer. In: Neoplasia (2003) , 5, 6; S: 495-506.
- Hahn, C. D.** ; Riener C. K. ; Gruber H. J. : Labeling of Antibodies with Cy3-, Cy3.5, Cy5.5-monofunctional Dyes at defined Dye/Protein Ratios. Institute of Biophysik, J. Kepler University Linz, Austria (2002).
- Hovanessian, A. G.** ; Awdeh Z. L. : Gel isoelectric Focusing of human-serum Transferrin. In: European Journal of Biochemistry (1976) , S: 324-334.
- Illiger, J.** : Analyse der Genexpression von humanen T-Lymphocyten und Natural Killer-Zellen mittels Oligonucleotid Fingerprinting. Doktorarbeit Freie Universität Berlin (2003).
- Johannsen, M.** : Thermoerapie des Prostatakarzinoms unter Verwendung magnetischer Nanopartikel. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät Charite-Universitätsmedizin Berlin (2007).
- Jones, M. C.** ; Caswell, P. T. ; Norman, J. C.: Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. In: Current Opinion in Cell Biology (2006), 18 ; S: 649-657.
- Jorissen, R. N.** ; Wlaker, F. ; Pouliot, N. ; Garrett, T. P. J. ; Ward, C. W. ; Burgess, A. W. : Epidermal growth factor receptor: mechanism of activation and signalling. In: Experimental Cell Research (2003), 284 ; S: 31-53.
- Kaiser, B. P.** : Regulation der Internalisierung, Desensibilisierung und Down-Regulation von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren durch Rezeptorkinasen, Intersectin, Endophilin und Ubiquitin. Institute für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen, Deutschland, 2004.
- Khouri, L.** : Analyse des Rezeptor-Recycling-Weges durch RNS-Interferenzen der kleinen GTPasen Rab4 und Rab11. Diplomarbeit 2006.
- Kuwae, S.** ; Ohda, T. ; Tamashima H. ; Miki, H. ; Kobayashi, K. : Development of a Fed-Batch Culture Process for Enhanced Production of Recombinant Human Antithrombin by Chinese Hamster Ovary Cells. In: Journal of Bioscience and Bioengineering (2005), 5 , S: 502-510.
- Lakadamyali, M.** ; Rust, M.J. ; Zhuang, X. : Ligands for Clathrin-Mediated Endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. In: Journal of Cell (2005), 12 ; S: 37-44.
- Le, T. L.** ; Yap, A. S. ; Stow, J. L. : Recycling of E-Cadherin: A potential mechanism for regulating cadherin dynamics. In: The Journal of Cell Biology (1999), 146, 1; S: 219-232.

- Li, H.** ; Stolz D. B. ; Romero G. : Characterization of endocytic Vesicles using magnetic Microbeats coated with signalling ligands. In: Traffic, Blackwell Munksgaard (2005) , S: 324-334.
- Lock, J. G.** ; Stow, J. L. : Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. In: Molecular Biology of the cell (2005), 16, 4; S: 1744-1755.
- Lodisch, H.** ; Berk, A. ; Zipursky, S. L. ; Matsudaira, P. ; Baltimore, D. ; Darnell, J. E. : Molekulare Zellbiologie . 4. Aufl. . Heidelberg, Berlin : Spektrum Akademischer Verlag , 2001.
- Lottspeich, F.** ; Engels J. W. : Bioanalytik. 2. Aufl. . München: Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
- Maity, D.;** Agrawal, D. C. : Synthesis of iron oxide nanopartikles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous media. In: Journal of Magnetic Materials (2007) , 308, S: 46-55.
- Manning, M.** and Colón, W. : Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. In: Biochemistry (2004), 43(35) , S:11248-54.
- Maxfield, F. R.** ; McGraw T. E. : Endocytotic recycling. In: Nature Reviews, Molecular cell Biology (2004) , 5, S: 121-132.
- Miltenyi Biotec GmbH** : Product spezifaction μ columns. Macs molecular, 2008.
- Morata, G.** ; Basler, K. : Cells in search of a signal. In: Nature Cell Biology (1999), 1 ; S: 1137-1142.
- Morris, A. E.** and Schmid, J. : Effects of Insulin and LongR³ on Serum free Chinese Hamster Ovary Cell Cultures Expressing Two Recombinant Proteins. In: Biotechnol. Prog. (2000), 16, S: 693-697.
- Monzel, M.** : Nanobiotech-Anwendungen in der Biomedizin. In: Transkript (2006), 10, 12; S: 43-47.
- Monzel, M.** : Potente Zwerge. In: Biotec (2006), 5, 6; S: 34-35.
- Mujamar, R. B.** ; Ernst, L. A. ; Mujamar, S. R. ; Lewis C. J. ; Waggoner, A. S. : Cyanine dye labelling reagents: sulfoindocyanine succinimidylesters. In: Bioconjug Chem. (1993), 4 , S: 105-111.
- Müller, C.** : Entwicklung eines serumfreien Zellkulturmediums auf der Grundlage von Hefeextrakten und pflanzlichen Hydrolysaten. Diplomarbeit 2007.
- Nunez, M. T.** ; Nunez-Millacura, C. ; Beltran, M. ; Tapia V. ; Alvarez-Hernandez, X. : Apotransferrin and Holotransferrin Undergo Different Endocytic Cycles in Intestinal Epithelia (Caco-2) Cells. In: The J. of Biological Chemistry. (1997), 31 , S: 19425-19428.
- Odenbach, S.** : Ferrofluide – ihre Grundlagen und Anwendungen. In: Physik in unserer Zeit (2001), 3 ; 31 ; S: 122-127.
- Pan, X.** ; Guan, J. ; Yoo, J.-W. ; Epstein, A. J. ; Lee, L. J. ; Lee, R. J. :Cationic lipid-coated magnetic nanoparticles associated with transferrin for gene delivery. In: International Journal of Pharmaceutics (2008), 269; S: 263-270.

- Pantel, K.** ; Brakenhoff R. H. ; Brandt B. : Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumor cells. In: Nature Reviews cancer (2008); S: 1-12.
- Plattner, H.** ; Hentschel J. : Zellbiologie . 2. Aufl. . Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag , 2002.
- Puck, T. T.** ; Cieciura, S. T. ; Robinson A. : Long-Term Cultivation of Euploid Cells from Human and animal Subjects. In: J. Exp Med (1958), 108 , S: 945-953.
- Qiu, X.**; Winnik, F. : Preparation and characterization of PVA coated magnetic nanoparticles. In: Chinese Journal of Polymer Science (2000), 18, 6; S: 535-539.
- Quian, Z. M.** ; Li H. ; Sun H. ; Ho K. : Targed Drug Delivery via the Transferrin Receptor. Mediated Endocytosis Pathway. In: Pharmacological Reviews (2002), 54 , S: 561-587.
- Rehm, Hubert** : Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics. 3. Aufl. . Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl. 2000.
- Ren, M. et al.** : Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferring from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. In: Proc. Natl Acad. Science USA (1998), 95 ; S: 1729-1740.
- Ritorto, M.S.** ; Chatterji, B. ; Borlak, J. : Neue Biomarker für Leberkrebs In: Biospektrum (2007), 13 ; S: 14-15.
- Roden, K.** : Die Molekül-Spedition. In: Technology Review (2004); S: 9-10.
- Roth** : Gebrauchsanweisung Roti-Quant, Proteinbestimmung nach Bradford, 2006.
- Sakrazewa, T.** : Charakterisierung magnetischer Nanopartikel für die Diagnostik und Therapie. Doktorarbeit Friedrich-Schiller-Universität, Jena (2005).
- Sambrook J.** ; Russel D. W. : Molekular Cloning, A laboratory Manual, 3. Aufl. . New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Sheff, D.R.** ; Daro, E.A. ; Hull, M. ; Mellmann, I. : The Receptor Recycling Pathway Contains Two Distinct Populations of early Endosomes with Different Sorting Functions. In: Journal Cell Biology (1999), 145, 1 ; S: 123-139.
- Sheff, D.R.** ; Pelletier, L. ; O'Connell, C.B. ; Warren, G. ; Mellmann, I. : Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. In: Journal of Cell Biology (2002), 156, 5 ; S: 797-804.
- Sleytr, U. B.** ; Messner, P. ; Pum, D. ; Schäfer, C. ; Schuster, B. : Molekulare Baukastensysteme. In: Transkript (2007), 10 ; S: 64-65.
- Stenmark, H.** ; Olkkonen, V. M. : The Rab GTPase family. In: Genome Biology (2001), 2, 5 ; S: 18143-18150.
- Sonnichsen, B.** ; De, R. S. ; Nielsen, E. ; Rietdorf, J. ; Zerial M. : Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolour imaging of Rab4, Rab5 und Rab11. In: Journal Cell Biology (2000), 149 ; S: 901-914.
- Sorkin, A.** ; Zastrow M. : Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. In: Nature Reviews, Molecular cell Biology (2002) , 3, S: 600-613.
- Thomas L.** : Labor und Diagnose, 5. Aufl. . Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998.

- Tischler, M.** ; Stoorvogel W. ; Ullrich, O. : Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferring pathway. In: Journal of Cell Science (1999), 112; S: 4773-4783.
- Ullrich, O.** ; Stenmark, H. ; Alexandrov, K. ; Hubert L.A. ; Kaibuchi K. ; Sasaki T. ; Yoshimi T. ; Zerial, M. : Rab GDP Dissociation Inhibitor as a General Regulator for the Membrane Association of Rab Proteins. In: Journal of Biological Chemistry (1993), 268, 24 ; S: 18143-18150.
- Ullrich, O.** ; Horiuchi, H. ; Alexandrov, K. ; Zerial, M. : Use of Rab-GDP Dissociation Inhibitor for Solubilization and Delivery of Rab Proteins to Biological Membranes in Streptolysin O-Permeabilized Cells. In: Methods in Enzymology (1995), 257 ; S: 243-253.
- Ullrich, O.** ; Reinsch, S. ; Urbe, S. ; Zerial, M. ; Parton, R.G. : Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. In: Journal Cell Biology (1996), 135 ; S: 913-924.
- Urbe, S.** ; Huber, L.A.; Zerial, M. ; Tooze, S. ; Parton, R.G. : Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. In: FEBS Letters (1993), 334 ; S: 175-182.
- Van Ijzendoorn, S.** ; Recycling Endosomes. In: Journal of Cell Science (2006), 119 ; S: 1679-1681.
- Voldborg, B. R.** ; Damstrup, M. ; Spang-Thomsen, M. ; Poulsen H. S. : Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trial. In: Analysis of Oncology (1997) , 8, S: 333-338.
- Weissleder, R.** ; Basikion, J. P. ; Chiocca E. A. : Use of an internalizing Transferrin Receptor to image transgene expression. United States Patent (Jan. 28, 2003) , Patent-Nr: US 6,511,967 B1.
- Westermeier, R.** ; Naven, T. ; Höpker, H.-R.: Proteomics in Practice . 1. Aufl. . Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GmbH , 2008.
- Wilhelm, C.** ; Billotey, C. ; Roger, J. ; Pons, J. N. ; Bacri, J.-C. ; Gazeau, F. : Intracellular uptake of anionic supramagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. In: Biomaterials (2003), 24; S: 1001-1011.
- Wilke, M.** et al. : Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from the early endosomes to the trans-golgi network. In: Journal Cell Biology (2000), 151 ; S: 1207-1220.
- Zanghi, J. A.** ; Schmelzer, A. E. ; Mendoza, T. P. ; Knop, R. H. ; Miller, W. M. : Bicarbonate Concentration and Osmolality Are Key Determinants in the Inhibition of CHO Cell Polysiation Under Elevated pCO₂ or pH. In: John Willey & Sons, Inc. (1999).
- Zeiger, A.** : GLUT4 retention in adipocytes requires two intracellular insulin-regulated transport steps. In: Molecular Biology of Cells (2002), 12 ; S: 3489-4501.

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro-
al.	alii (andere)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CCV	clathrinumhültes Vesikel (engl.: clathrin coated vesicle)
CHO	chinesische Hamster Ovarien (engl: Chinese Hamster Ovary)
CV	Konstitutives sekretorisches Vesikel (engl.: constitutive secretory vesicle),
Cy3	Fluorochrom Carbon-Cyanin 3
Da	Dalton
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
EE	Frühes Endosom (engl.: Early Endosom)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERC	Endosomal Recycling Compartment
etc.	et cetera (und so weiter)
FKS	fötales Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k	Kilo-
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LE	Spätes Endosom (engl.: Late Endosom)
M	Molarität
m	Milli-
min	Minute
Mio.	Million
MNP	magnetische Nanopartikel
MMP	magnetische Mikropartikel
mol	Mol
MWCO	molecular weight cut off
n	Nano-

Abkürzungsverzeichnis

PBS ⁻	Phosphate buffered saline ohne MgCl ₂ und CaCl ₂ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
pI	Isoelektrischer Punkt von Proteinen
RE	Recycling Endosom
RTKs	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
RT	Raumtemperatur
RV	reguliertes sekretorisches Vesikel (engl.: regulated secretory vesicle)
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidendifluorid-Membran
SE	Sorting Endosom
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodiumdodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
t	Zeit
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamid
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tfn	humanes holo-Transferrin
TfnR	Transferrinrezeptor
u.a.	unter anderem
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Tätigkeitsfelder von Unternehmen im Nanobiotechnologie-Sektor	4
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Interaktionen von Cadherinen, Ig-CAMs, Intergrinen und RTKs	6
Abbildung 1-4: Verschiedene endocytotische Aufnahmemöglichkeiten von Säugetierzellen ..	8
Abbildung 1-5: Rezeptorvermittelte Endocytose-Wege.....	9
Abbildung 1-6: Intrazelluläre, vesikuläre Transportwege und Lokalisation von ausgewählten Rab-Proteinen.....	10
Abbildung 1-7: Der Tfn-Zyklus.....	13
Abbildung 1-8: Strategie zur Isolierung der Recycling Endosomen zur anschließenden Proteomanalyse.....	14
Abbildung 1-9: Schematische Darstellung der adsorptiven Kopplung von anionisch geladenen MNP und Cy3-konjugiertem holo-Tfn.....	16
Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der Kopplung von kationisch geladenen MNP und Cy3-konjugiertem holo-Tfn.....	17
Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der reduktiven Aminierung zur chemischen Kopplung von Cy3-Tfn an die Dextran-Matrix der MMP.	18
Abbildung 1-12: Schematische Darstellung der Anti-Biotin-Antikörper- konjugierten Mikropartikel.....	18
Abbildung 2-1: CHO-Zellen.....	30
Abbildung 3-1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Cy3-Tfn internalisierter Zellen (Puls Chase).....	47
Abbildung 3-2: Spektrophotometrische Messung der kationischen und anionischen MNP...	49
Abbildung 3-3: Aufreinigungsvorgang der Cy3-Tfn-gekoppelten MNP über eine magnetische Separationssäule.....	50
Abbildung 3-4: Internalisierte Proben der Aufarbeitung der Cy3-Tfn-gekoppelten, kationisch geladenen MNP.....	51
Abbildung 3-5: Extinktion der einzelnen Proben des Aufreinigungsversuches von Cy3- Tfn- gekoppelter kationisch und anionischen Nanopartikeln.....	53
Abbildung 3-6: Vergleich von Zellen die mit Anti-Biotin-MMP behandelt wurden mit unbehandelten Zellen.....	54
Abbildung 3-7: Internalisierte Cy3-Tfn gekoppelte Dextran-MMP (gekoppelt nach Protokoll 1).....	56
Abbildung 3-8: Internalisierte Cy3-Tfn-gekoppelte Dextran-MMP.....	57
Abbildung 3-10: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (5ml Sepharose 4B-Säule) von Cy3-Tfn-gekoppelten kationischen MNP.....	60

Abbildung 3-11: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (5ml Sepharose 4B-Säule) von Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP.....	62
Abbildung 3-12: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (5ml Sepharose 4B-Säule) von Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP.....	64
Abbildung 3-13: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (Sepharose 4B-Säule, FPLC) von Cy3-Tfn.	67
Abbildung 3-14: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (Sepharose 4B-Säule, FPLC) von Cy3-Tfn-gekoppelten anionischen MNP.	69
Abbildung 3-15: Analyse der 200 µl-Fractionen der Gelfiltration (Sepharose 4B-Säule, FPLC) von Cy3-Tfn-gekoppelten Dextran-MMP. Dem Elutionspuffer wurden 0,5 mg/ml BSA hinzugegeben.	71
Abbildung 3-16: Spektralphotometrische Messung der einzelnen Säulendurchläufe der Endosomenaufreinigung.	72
Abbildung 3-17: Immunoblotanalyse, Detektion des Transferrinrezeptors.	74
Abbildung 3-18: Immunoblotanalyse, Detektion des Rab4-Proteins.	75
Abbildung 3-19: Silbergefärbtes Proteingel.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Zusammenfassung von Rab-Proteinen, mit einer bekannten Expressionsveränderung bei menschlichen Krebserkrankungen.....	11
Tabelle 2-1: Für die Fluoreszenzmarkierung von Tfn benötigte Materialien	21
Tabelle 2-2: Für die Trennung des Cy3-Tfn vom freien Farbstoff verwendete Materialien	22
Tabelle 2-3: Für die Umpufferung von markiertem Tfn benötigte Materialien	23
Tabelle 2-4: Zur Kopplung von Tfn an verwendete Ferrofluide benötigte Materialien.	24
Tabelle 2-5: Für die Kopplung von Cy3-Tfn an Dextran-Mikropartikel verwendete Materialien.....	26
Tabelle 2-6: Zur Trennung der Tfn-gebundenen MNP von ungebundenen Tfn benötigte Materialien.	28
Tabelle 2-8: Für die Kultivierung der CHO-Zellen verwendete Lösungen.....	31
Tabelle 2-9: Für die Zellkultur verwendete Kulturgefäße und zum Passagieren benötigten Flüssigkeitsvolumina	31
Tabelle 2-10: Zur Internalisierung verwendete Materialien	33
Tabelle 2-11: Zur Fixierung von Zellen benötigte Materialien	35
Tabelle 2-12: Für die Immunfluoreszenz benötigte Materialien	36
Tabelle 2-13: Zur Herstellung des PNS verwendete Lösungen	37
Tabelle 2-14: Zur Endosomenaufreinigung verwendete Materialien.....	38

Anhang

Verwendete Geräte

Tabelle A. 1: In dieser Masterarbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	Binder
Brutschrank	Heraeus, Funktionline B6
Trockenschrank	Heraeus, Funktionline T12
Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific
Kühltruhe, 4 °C	Liebherr bzw. Beko
Kühltruhe, -20 °C	Liebherr
Kühltruhe, -80 °C	Heraeus
Stickstoffbehälter	AIR Liquide, GT 38
Autoklav	Systemec, V150
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX41
Inverses Mikroskop	Zeiss, Axiovert 40CSL
Photometer	Eppendorf, BioPhotometer
Sterilwerkbank	Hera Safe, Kendro Laboratory
Wasserbad	GFL
Zentrifuge	Heraeus, Multifuge 3 S-R
pH-Meter	InoLap, WTW pH 720
Pipetten (10 - 1000 µl)	Eppendorf Research
Pipettierhilfen	Brand, accu-jet
Permanentmagnet: µMACS-Multistand	Miltenyi Biotec GmbH
Magnetrührer	Heidolph MR 3001
Waage	Satorius, TE 1502s (max. 1500 g; d= 0,01 g)
Spülmaschine	Miele, Professional G7883
Drehinkubator	Fröbel Labortechnik, CMV
Vortexer	Heidolph, Reaxtop
Elektrophorese-System	Biorad, Mini-Protean 673/22667
Heizblock	Kleinfeld Labortechnik MBT 250

Spannungsgeber	Amersham Pharma Biotech, Elektrophoresis Power Supply EPS 3501
FPLC-System	Pharmacia
Pinzette	Rubis, Switzerland

Verwendete Materialien

Tabelle A. 2: In dieser Masterarbeit verwendete Materialien

Material	Hersteller
24-Loch-Platte	Biochrom, TPP p92424
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Nunc Brands Products, Nunclon
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Nunc Brands Products, Nunclon
Kryoröhrchen	Nunc Brands Products, Nunclon
Deckgläschen	Thermo Scientific
Objektträger	Carl Roth
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf
PCR-Gefäß	Biozym
Parafilm	American National Can
ADVANTAGE-Pipetten: 5ml 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson
Pipettenspitzen weiß, gelb, blau	Eppendorf
Röhrchen mit Rundboden 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson, Falcon
UV-Küvetten	Brand
Röntgenfilm	Kodak/Sigma-Aldrich, Bio Max light film
Magnetische μ -Säule	Miltenyi Biotec GmbH
FPLC-Säule	Pharmacia
Einmalsäule	Biorad
HiPrep-Säule	GE Healthcare
Präzisionswischtücher	Kimtech, Science, Kimperly Clark professional
Einmal-Injektionskanüle	B. Braun Melsung AG
Dialyseschlauch	Spectra/Por

3MM-Filterpapier (Gel-Blotting-Papier)	Carl Roth
Entgasungsfilter 0,45 µm	GE Water and Process Technologies

Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Tabelle A. 3: In dieser Diplomarbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/ Reagenz	Hersteller/ Bezugsquelle
Ham's F12	Biochrom
L-Glutamin	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
FKS	Biochrom
Natriumbicarbonat	Biochrom
DMSO	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% / 0,02%) in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom
PBS-Trockensubstanz ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Mowiol	Calbiochem
NaOH	Carl Roth
Ethanol vergällt ≥ 98 %	Carl Roth
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumcyanoborohydrid	Sigma-Aldrich
Natriumperjodat	Sigma-Aldrich
Sepharose 4B	GE Healthcare
Sephadex G 25	GE Healthcare
BSA	Sigma-Aldrich
Molekulargewichtsstandard	Biorad Laboratories
Trisma Base	Sigma-Aldrich
HCl	Carl Roth
SDS	Biorad Laboratories

APS	Biorad Laboratories
Glycerol	Biorad Laboratories
Glycin	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
Farblösung, Roti-Quant	Carl Roth
Bromphenolblau	Carl Roth
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Brilliant Blau R250	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth
Ponceau S Lösung	Serva Electrophoresis
Milchpulver, Blotting Grade	Carl Roth
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat)	Sigma-Aldrich
TEMED	Carl Roth
Humanes holo-Transferrin	Sigma Aldrich
Humanes Biotin-Transferrin	Sigma Aldrich
Antikörper α -mouse-HRP	Dianova
Entwickler	Sigma-Aldrich
Fixierer	Sigma-Aldrich
