

Goethe-Universität Frankfurt am Main
Fachbereich 15 „Biowissenschaften“

Herunterregulation von Endozytose beteiligten Proteinen und deren Einfluss auf die Aufnahme von polymeren Nanopartikeln

**Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Grades
Bachelor of Science
in der Biowissenschaft
im September 2013**

**Simone-Franziska Glaser
geboren am 11.04.1991 in Frankfurt am Main**

Angefertigt am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz

Arbeitskreis: Prof. Dr. Katharina Landfester - Physikalische Chemie der Polymere

Projektleiter: PD Dr. Volker Mailänder - Nanopartikel Aufnahmemechanismen/
Nanopartikel für zelluläre Therapeutika in der regenerativen Medizin

Erstgutachter: PD Dr. Volker Mailänder
(Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Enrico Schleiff
(Goethe Universität, Frankfurt am Main)

Matrikelnummer: 4459172

Abgabedatum: 10.09.2013

Meiner Familie.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katharina Landfester und meinem Projektleiter Herrn PD Dr. Volker Mailänder, die es mir ermöglicht haben in diesem fachübergreifenden, interessanten Gebiet meine Bachelorarbeit anzufertigen.

Ebenfalls ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schleiff für die Bereitschaft das Zweitgutachten und die universitätsinterne Betreuung zu übernehmen, sowie für die hilfreichen Besprechungen.

Meinem Projektbetreuer Daniel Hofmann danke ich sehr für die hervorragende Betreuung und das positive Klima, welches in unserer Zusammenarbeit immer vorherrschte. Seiner Hilfestellung und Unterstützung ist das Gelingen dieser Arbeit zuzuschreiben.

Bei allen Mitgliedern der zellbiologischen Arbeitsgruppe von PD Dr. Volker Mailänder, sowie bei Sabine Pütz, bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung bei Fragen jeglicher Art, sowie für die unterhaltsamen Mittagspausen.

Ohne Markus Bannwarth hätte ich keine Nanopartikel zur Verfügung gehabt, deswegen gilt mein Dank auch ihm und seiner aufgewandten Zeit für deren Herstellung.

Mein herzlichster Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit tatkräftig unterstützt, an mich geglaubt und für genügend Ausgleich gesorgt haben.

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	5
II. Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	10
1.1 Endozytose	10
1.2 Intrazelluläre Weiterleitung und Prozessierung	12
1.3 Aufnahme von Nanopartikeln	12
1.4 Tetraspanine	13
1.5 RNS-Interferenz über shRNS-Konstrukte und siRNS	14
1.6 Ziele der Arbeit	15
2 Materialien	16
2.1 Verbrauchsmaterialien	16
2.2 Geräte.....	16
2.3 Chemikalien	17
2.4 Puffer	18
2.5 Medien	18
2.6 Antikörper	19
2.7 Kits.....	20
2.8 Enzyme.....	20
2.9 Bakterien.....	20
2.10 Zelllinien	20
2.11 Nanopartikel.....	21
2.12 Oligonukleotide	21
2.12.1 Primer	21
2.12.2 Doppelsträngige DNS.....	22
2.12.3 siRNS.....	22
2.13 Vektoren	23
2.14 Software	23
3 Methoden.....	24
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	24
3.1.1 Entwurf von Oligonukleotiden.....	24
3.1.2 Hybridisierung	24
3.1.3 Ligation	25
3.1.4 Transformation von Plasmid-DNS	25

Inhaltsverzeichnis

3.1.5	Bakterienkultivierung	26
3.1.6	Plasmidisolierung	26
3.1.7	DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen	26
3.1.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
3.1.9	Zellkultivierung	28
3.1.10	Transfektion von HeLa-Zellen	28
3.1.11	RNS Isolation	29
3.1.12	Komplementäre DNS-Synthese.....	30
3.1.13	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	30
3.1.14	Nanopartikelzugabe	32
3.1.15	Immunodetektion der Proteine - Antikörperfärbung für die Auswertung mit dem cLSM	32
3.1.16	Durchflusszytometrie.....	33
3.1.17	Herstellung von Zelllysaten	34
3.1.18	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.1.19	Western Blot.....	35
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Hybridisierung der Einzelstränge	37
4.2	Kontrollverdau der hybridisierten Oligonukleotide in pRNAi-H1-green.....	39
4.3	cLSM-Nachweis der Protein-Herunterregulation mit shRNS-Konstrukten.....	41
4.4	qRT-PCR der mit siRNS transfizierten HeLa-Zellen	43
4.5	Nachweis der Protein-Herunterregulation im Western Blot.....	44
4.6	Kinetik der Nanopartikelaufnahme	47
4.7	Nanopartikelaufnahmestudien.....	48
5	Diskussion.....	51
5.1	shRNS-Konstrukt- und siRNS-induzierte Protein-Herunterregulation	51
5.2	Aufnahme der superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikel in HeLa-Zellen ..	52
5.2.1	Proteinunabhängige Aufnahmemechanismen	55
6	Zusammenfassung.....	57
III.	Tabellenverzeichnis	58
IV.	Abbildungsverzeichnis	59
V.	Literaturverzeichnis	60
7	Eidesstattliche Erklärung	66

II. Abkürzungsverzeichnis

3d / 6d	3 days / 6 days (zu Deutsch: 3 Tage / 6 Tage)
A	Adenin
a. u.	arbitrary unit (zu Deutsch: willkürliche Einheit)
AF	Alexa Fluor
AK	Antikörper
AMP ⁺	enthält Ampicillin
ATG7	Autophagy-related 7
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cav-1	Caveolin-1
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA (zu Deutsch: komplementäre DNS)
CI SK	Clathrin (schwere Kette)
cLSM	confocal laser scanning microscope (zu Deutsch: konfokale Laser-Rastermikroskop)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ct-Wert	cycle threshold
DL	Durchlicht
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline (zu Deutsch: Phosphat gepufferte Salzlösung)
dsDNS	Doppelsträngige DNS
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (zu Deutsch: Ethylendiamintetraessigsäure)
EGTA	Ethyleneglycoltetraacetic acid (zu Deutsch: 1,2-Bis-(2-aminoethoxy)-ethan- <i>N,N,N,N</i> -tetraessigsäure)
Et al.	et alli / et aliae (zu Deutsch: und andere)
FACS	Fluorescence activated cell sorting (zu Deutsch: Durchflusszytometrie)
FBS	Fetal bovine serum (zu Deutsch: fetales Bovines Serum)

Abkürzungsverzeichnis

FSC	F orward s catter (zu Deutsch: Vorwärtsstreuung)
G	G uanin
GAPDH	G lycerinaldehyd-3-phosphat- D ehydrogenase
GFP	g reen f luorescent p rotein (zu Deutsch: grün fluoreszierendes Protein)
GTP	G uanosintriphosphat
HeLa-Zellen	H enrietta L acks- Z ellen
Hepes	H ydroxyethylpiperazin- E thansulfonsäure
IF	I mmunfluoreszenz
IgG	I mmungolbulin G
IL2R β	I nterleukin 2 R ezeptor β -Kette
ILV	I ntraluminale V esikel
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KD	K nockdown (zu Deutsch: Herunterregulation)
KOH	Kaliumhydroxid
LB	L ysogeny b roth (zu Deutsch: lysogene Nährlösung)
LiDS-Puffer	L ithium D odecylsulfat- P uffer
m	M ouse (zu Deutsch: Maus)
MeOH	Methanol
MES	2-(N - M orpholino)ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miRNA	M icro R NA (zu Deutsch: Mikro RNS)
mRNA	M essenger R NA (zu Deutsch: Boten RNS)
MVBs	M ultivesicular b odies (zu Deutsch: Multivesikuläre Körperchen)
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NK	N egativkontrolle
NP	N anopartikel
Nt	N ukleotiden
P	Signifikanzwert
P/S	P enicillin und S treptomycin
PCR	P olymerase c hain r eaction (zu Deutsch: Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	P araformaldehyd
PVDF	P olyvinylidenfluorid

Abkürzungsverzeichnis

qRT-PCR	quantitative Real-time PCR (zu Deutsch: quantitative Echtzeit-PCR)
Rac-1	Ras-verwandtes C3 Botulinumtoxinsubstrat-1
rb	Rabbit (zu Deutsch: Kaninchen)
RhoA	Ras homologes Genfamilienmitglied A
RISC	RNA-induced silencing complex (zu Deutsch: RNS induzierter Stilllegungskomplex)
RNS	Ribonuklein Säure
RNSi	RNS Interferenz
RT	Raumtemperatur
S.O.C	Super optimal broth with catabolic repressor (zu Deutsch: super optimale Nährlösung mit katabolischem Repressor)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (zu Deutsch: Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese)
shRNA	Short hairpin RNA (zu Deutsch: Haarnadelstruktur-RNS)
siRNA	Small interfering RNA (zu Deutsch: kurze interferierende RNS)
SSC	Sideward scatter (zu Deutsch: Seitwärtsstreuung)
ssDNS	Single stranded DNS (zu Deutsch: einzelsträngige DNS)
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat EDTA Puffer
TEM	Tetraspanin-enriched microdomain (zu Deutsch: Tetraspanin-angereicherte Mikrodomäne)
TEMs	Tetraspanin-enriched microdomains (zu Deutsch: Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
u. a.	unter anderem
WB	Western Blot
HIV-1	Humaner Immundefizienz Virus Typ-1
HCV	Hepatitis C Virus
esiRNA	Endoribonuclease-prepared siRNA (zu Deutsch: Endoribonuklease-vorbereitete siRNS)

1 Einleitung

In den letzten Jahren fanden Nanosphären immer größere Anwendungsbereiche in der Biomedizin (Hans und Lowman, 2002). Ein wichtiges Anwendungsgebiet liegt im Transport von instabilen Arzneimitteln, nicht-membranpassierbaren Therapeutika oder Biomolekülen, wie z.B. Peptide oder Nukleinsäuren, die bis zu ihrem Wirkort geschützt transportiert werden müssen (Vercauteren et al., 2011). Verschiedene Herstellungsprozesse von Nanosphären erlauben es eine hohe Dosis einer Vielzahl an Medikamenten einzukapseln und diese in verschiedenen Körperregionen des Menschen zu transportieren. Dort kann anschließend eine intrazellulär kontrollierte Freisetzung der Medikamente erfolgen (Hofmann und Mailänder, 2013). Für eine erfolgreiche Anwendung der Nanopartikel ist es notwendig, die Interaktionen der Nanosphären mit den Zellen zu verstehen. Wichtig ist hierbei vor allem die Untersuchung der Aufnahme- und Weiterleitungsmechanismen dieser Partikel in den Zellen.

1.1 Endozytose

Menschliche Zellen besitzen eine Vielzahl an Mechanismen, welche die Aufnahme und den Transport kleiner Moleküle, Makromoleküle und Partikel zu Zielstrukturen bewerkstelligen (Mukherjee et al., 1997). Prozesse, die supramolekulare Komplexe in membranumschlossene Vesikel aufnehmen, fallen unter den Oberbegriff Endozytose (de Duve, 1963). Die Endozytose umfasst viele Mechanismen der Aufnahme in die Zelle (siehe Abbildung 1). Zu diesen Mechanismen gehören u. a. die Phagozytose, Pinocytose, Clathrin-abhängige Endozytose, Caveolin-abhängige Endozytose und die Clathrin- / Caveolin-unabhängige Endozytose (Mukherjee et al., 1997). Den Mechanismus der Phagozytose, also die Aufnahme von μm -großen Partikeln wie z.B. Bakterien, benutzen nach Aderem et al. (1999) nur spezialisierte Zellen wie z.B. Makrophagen. Dieser Mechanismus beruht auf der Ausbildung von Aktin-abhängigen Pseudopodien, welche die Partikel umschließen und somit in das Zellinnere transportieren (Aderem et al., 1999). Alle anderen Zellen sind nur in der Lage kleinere Partikel zu internalisieren (Dausend et al., 2008). Die am besten untersuchte Form ist die Clathrin-abhängige Endozytose (Iversen et al., 2011). Eine Form der Clathrin-abhängigen Aufnahme wird durch Rezeptoren vermittelt. Durch das Binden eines Liganden an die Rezeptoren der Zelloberfläche wird die Internalisierung der Liganden ausgelöst. Die Internalisierung des Rezeptor-gebundenen Proteins wird durch die Ausbildung von Einbuchtungen der Membran, sogenannten „coated pits“, ermöglicht. Diese Einbuchtungen sind auf der zytosolischen Seite von einem Proteinnetzwerk und Clathrin umgeben (Goldstein et al., 1979). Mit Hilfe von Dynamin, einer GTPase, werden die Einstülpungen von der Membran abgeschnürt und gelangen in die intrazelluläre Matrix, wo sie bestimmten Die Clathrin-unabhängige Endozytose umfasst die Makropinozytose, welcher zur Ausbildung von

Aktin-abhängigen Membraneinstülpungen, den Makropinosomen, führt (Mercer et al., 2009). Die Makropinozytose ist in den meisten Fällen Dynamin-unabhängig (Iversen et al., 2011). Allerdings gibt es Studien zur Aufnahme von Viren, welche von einer Dynamin-abhängige Makropinozytose berichten (Mulherkar et al., 2011; Liu et al., 2008; Sandvig et al., 2011). Ein weiterer Clathrin-unabhängiger Endozytoseweg geht über sogenannte Caveolae. Caveolae sind 50–80 nm große, kolbenförmige Membraneinstülpungen, welche von Caveolin ummantelt sind und eine hohe Anreicherung von Phospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterol besitzen (Iversen et al., 2011). Caveolin-1 interagiert über Grundgerüstdomänen mit Caveolae-assoziierten Signalproteinen (Miyawaki-Shimizu, 2005). Dieser Aufnahmeweg ist wie der Clathrin-abhängige Aufnahmeweg von Dynamin abhängig (Nabi und Le, 2003). Ein weiterer bekannter Weg ist die Aufnahme über Flotillin-1. Dieser wurde in Endosomen und Lysosomen gefunden (Kokubo et al., 2003). Flotillin-1 definiert ebenfalls einen Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytoseweg, welcher über einfache Membraneinstülpungen gekennzeichnet ist (Glebov et al., 2005).

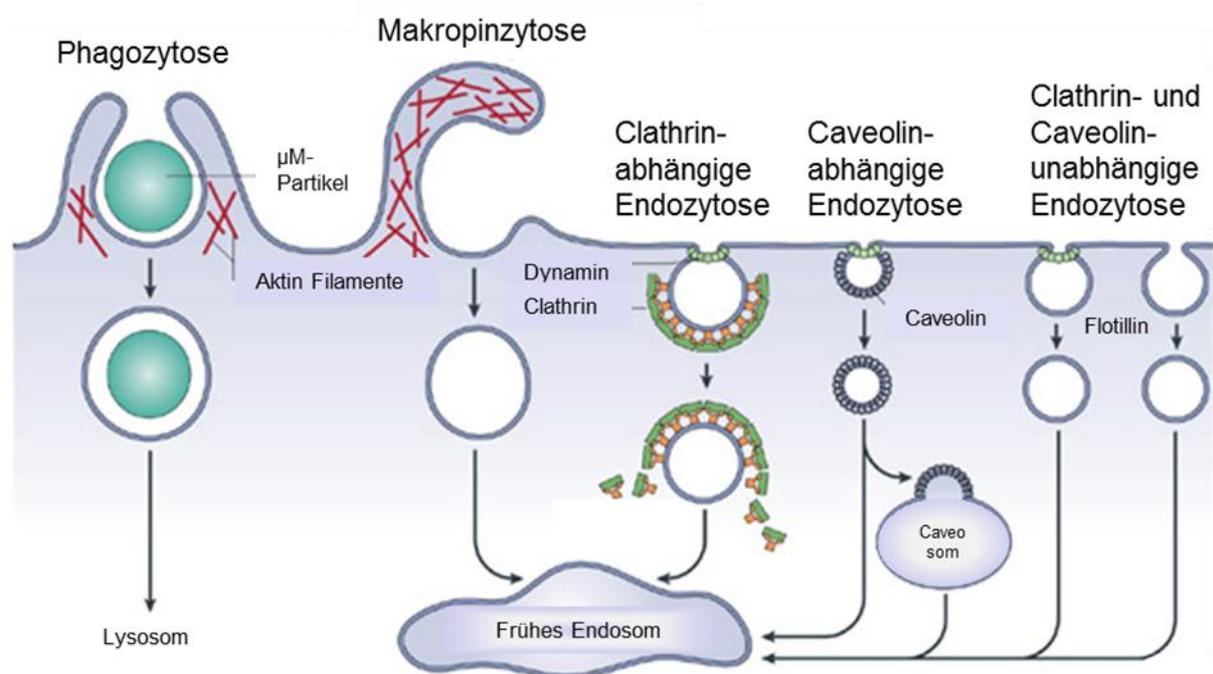


Abbildung 1: schematische Darstellung möglicher Endozytosewege. Verändert nach: Parton, R. G., Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8, 185–194.

Nach Endozytose der Frachtmoleküle über verschiedene Aufnahmewege, kommt es anschließend zur intrazellulären Weiterleitung und Prozessierung der abgeschnúrten Vesikel.

1.2 Intrazelluläre Weiterleitung und Prozessierung

Die weitere Prozessierung der Zelleinstülpungen ist unterschiedlich. Phagosomen können direkt mit Lysosomen verschmelzen und der Inhalt wird phagozytiert (Desjardins et al., 1994). Nach der Internalisierung der Clathrin und Caveolin-1 umgebenen Membraneinstülpungen werden die Mantelproteine über Enzyme abgespalten (Merrifield et al., 2002). Diese Kompartimente werden frühe Endosomen genannt und sie besitzen auf Grund des Vorhandenseins von ATP-abhängigen Protonenpumpen einen spezifischen pH-Wert von 6,4 – 6,5 (Mukherjee et al., 1997). Frühe Endosomen können sortierende oder recycelnde Endosomen sein. Der Inhalt der recycelnden Endosomen besteht nur aus Molekülen, die nicht degradiert, sondern nur recycelt werden sollen (Mukherjee et al., 1997). Die sortierenden Endosomen und Makropinosomen reifen zu späten Endosomen an, welche durch einen pH-Wert im Sauren von 5,0 charakterisiert sind (Mukherjee et al., 1997). Späte Endosomen werden auch multivesikuläre Körperchen (MVBs) genannt. Sie besitzen eine Größe von 100-600 nm und können zahlreiche intralumenale Vesikel (ILV) bis zu 50 nm im Durchmesser internalisieren (Hanson und Cashikar, 2012). Diese MVBs können mit der Plasmamembran fusionieren und ILV in Form von Exosomen in die extrazelluläre Matrix abgeben (Hanson und Cashikar, 2012). MVBs und Lysosomen scheinen eine wichtige Rolle u.a. beim Transport von Nanopartikeln zu spielen, wobei diese als wichtige Schaltzentralen beim intrazellulären Transport dienen (unpublizierte Daten).

1.3 Aufnahme von Nanopartikeln

Im Vergleich zu den vorhandenen Kenntnissen über die Aufnahmewege von beispielsweise Viren, fehlen genauere Informationen über die Faktoren, die in der Nanopartikelaufnahme eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass die Aufnahme von Nanopartikeln Zelltyp-abhängig ist und zwischen den verschiedenen Nanopartikeln variiert (Iversen et al., 2011). Bei Nanopartikeln kann es sich u.a. um polymere Strukturen handeln, welche bei Kontakt mit Serum eine Proteinhülle aus diversen Serumproteinen ausbilden (Lynch et al., 2008). Diese können auf Grund von verschiedenen Proteinladungen die Aufnahme der Nanopartikel maßgeblich beeinflussen (Treuel et al., 2013). Partikel mit einer positiven Ladung können an die negativ geladene Zelloberfläche binden und somit, zumindest bei HeLa-Zellen, zu einer effizienteren Endozytose führen, als negativ geladene Partikel (Iversen et al., 2011). Weiterhin ist bekannt, dass die Aufnahme der Nanopartikel größenabhängig ist. Nach Zhang et al. (2009) liegt der optimale Radius der Nanopartikel für eine effiziente Endozytose bei 25 - 30 nm. Kleinere und größere Nanopartikel werden langsamer aufgenommen (Iversen et al., 2011).

1.4 Tetraspanine

Tetraspanine sind Transmembranproteine, die an der Zelloberfläche und in intrazellulären Membranen exprimiert werden. Die Struktur ist hoch konserviert. Tetraspanine bestehen aus vier Transmembrandomänen und konservierten Cystein- und CCG-Motiven in der extrazellulären Domäne (van Spriel et al., 2010). Sie bilden spezielle Netzwerke mit einer hohen Diversität von miteinander interagierenden Proteinen aus. Diese Netzwerke werden Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen (TEMs) genannt (Yáñez-Mó al., 2009).

Daniel Hofmann erstellte in Vorarbeiten zu dieser Arbeit ein Proteinprofil der endozytotischen Vesikel. Dieses Profil wurde auf Grund der magnetischen Isolation von Endosomen erstellt, welche superparamagnetische Polystyrol-Nanopartikel enthielten. Die Proteine dieser endozytotischen Vesikel wurden über die Peptidmassenspektrometrie analysiert. Dabei wurden ca. 150 verschiedene Proteine identifiziert, die in der Literatur mit der Endozytose assoziiert werden, u. a. die Tetraspanine CD63, CD9, CD81 und CD82.

In den Vorarbeiten wurde gezeigt, dass magnetische Nanopartikel über multivesikuläre Körperchen in multilamellare Lysosomen transportiert werden. Hier spielen Proteine wie z.B. CD63 möglicherweise eine entscheidende Rolle, da Tetraspanine sowohl auf der Plasmamembran als auch in diesen spezialisierten, internalisierten Organellen präsent sind (Pols und Klumpermann, 2009). In der Literatur findet man Informationen dazu, dass manche Tetraspanine die Endozytose von Viren beeinflussen. Die Untersuchungen von Spodon et al. (2008) ergaben, dass TEMs als Plattformen für einen Clathrin-, Caveolin- und Dynamin-unabhängigen Virus-Aufnahmeweg agieren können. Das Tetraspanin CD63 wurde in Makrophagen mit der Aufnahme des humanen Immundefizienz Virus Typ-1 (HIV-1) in Verbindung gebracht (Li et al., 2011). Es gibt Hinweise darauf, dass z.B. das Tetraspanin CD81 im Infektionsprozess involviert ist. Nach Pileri et al. (1998) wurde CD81 als wichtiger Interaktionspartner des Hepatitis C-Virus identifiziert. CD82 wurde in intrazellulären Kompartimenten gefunden und die Internalisierung ist Caveolin- und Clathrin-unabhängig (Xu et al., 2009). Des Weiteren wurde von Xu et al. (2009) berichtet, dass keine Colokalisation von TEMs mit Flotillin-1 besteht. Rubinstein et al. (1996) postulierte, dass die Tetraspanine CD63, CD9, CD81 und CD82 an der Membranoberfläche innerhalb der Tetraspanin-angereicherten Mikrodomäne miteinander interagieren.

Diese Publikationen besagen, dass Tetraspanine eine Rolle in der Endozytose spielen und diese beeinflussen können. Um Aussagen über die Aufnahmewege der Nanopartikel treffen zu können, ist die nähere Betrachtung der einzelnen Proteine notwendig. Dies wird in der vorliegenden Arbeit mit der RNS-Interferenz-Technik erreicht.

1.5 RNS-Interferenz über shRNS-Konstrukte und siRNS

Die RNS-Interferenz (RNSi) ist ein grundlegender Mechanismus der Genregulation (Meister und Tuschl, 2004). Hierbei handelt es sich um einen Prozess, welcher in Tieren und Pflanzen natürlicherweise vorkommt. Durch diesen Mechanismus kann die Expression eines Zielgens Sequenz-spezifisch und selektiv herunterreguliert werden (Rao et al., 2009).

Die natürlich in den Zellen vorkommenden Mikro RNS (miRNS) werden im Genom codiert. Über mehrere Schritte werden miRNS prozessiert und können dann zur Stilllegung führen (Lee et al, 2004). Studien haben gezeigt, dass die RNS-Interferenz auch durch chemisch synthetisierte, doppelsträngige, kurze interferierende RNS (siRNS) oder durch Vektor-basierte kurze Haarnadel RNS (shRNS) vermittelt werden kann (Rao et al., 2009).

Hierzu muss zuvor ein Vektor in die Zelle gebracht werden, welcher einen Genabschnitt enthält, der für die shRNS codiert (Paddinson, 2002). Das lange Vorläufer-Transkript der shRNS wird im Nukleus, wie bei der natürlich vorkommenden miRNS, von einem RNase III Enzym, genauer gesagt Drosha, prozessiert. Hierbei werden die Nukleotide, welche um die Haarnadelstruktur mit der shRNS liegen abgespalten (Rao et al., 2009). Die pre-shRNS wird über einen Kerntransportfaktor Exportin-5 erkannt und über einen Ran-GTP-abhängigen Mechanismus in das Zytoplasma transportiert (Yi, 2003). Hier folgt die Umsetzung der pre-shRNS zu einer haarnadelstruktur-freien doppelsträngigen dsRNS über einen Spaltungsschritt. An dieser Umsetzung ist das RNase III Enzym Dicer beteiligt (Pushparaj et al., 2008). Die andere Möglichkeit des RNSi Mechanismus ist das Einbringen einer siRNS direkt ins Zytoplasma durch beispielsweise den Mechanismus der Lipofektion (Dalby, 2004). Hierbei können entweder lange, doppelsträngige RNS Fragmente in die Zelle eingebracht werden, oder direkt siRNS der spezifischen Länge von 21-23 Nukleotiden (Zamore et al., 2000). Die längeren doppelsträngigen RNS Fragmente werden ebenfalls von Dicer zu einer siRNS mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden umgewandelt (Abbildung 2) (Ambesajir et al., 2012). Die nun prozessierten shRNS und siRNS werden von einer spezifischen RISC Einbaumaschinerie in einen Proteinkomplex geladen (Tomari, 2005). Bei diesem Proteinkomplex handelt es sich um den RNS-induzierten Stilllegungskomplex (RISC). Dieser Komplex ist sowohl für das Binden und Entwinden der siRNS zuständig als auch für den Abbau der Boten RNS (mRNS). Das Entwinden wird durch ein multifunktionales Protein, Argonaut 2, bewerkstelligt, welches im RISC beinhaltet ist und als Ribonuklease wirkt (Rand et al., 2005). In diesem Paper wird ebenfalls beschrieben, dass nach dem Entwinden der siRNS der Sinnstrang abgebaut wird und der nun aktivierte RISC nur noch den Gegenstrang der siRNS enthält. Durch komplementäre Basenpaarung des Gegenstranges mit der Ziel mRNS wird die mRNS identifiziert und gespalten (Whitehead et al., 2009; Martinez et al., 2002).

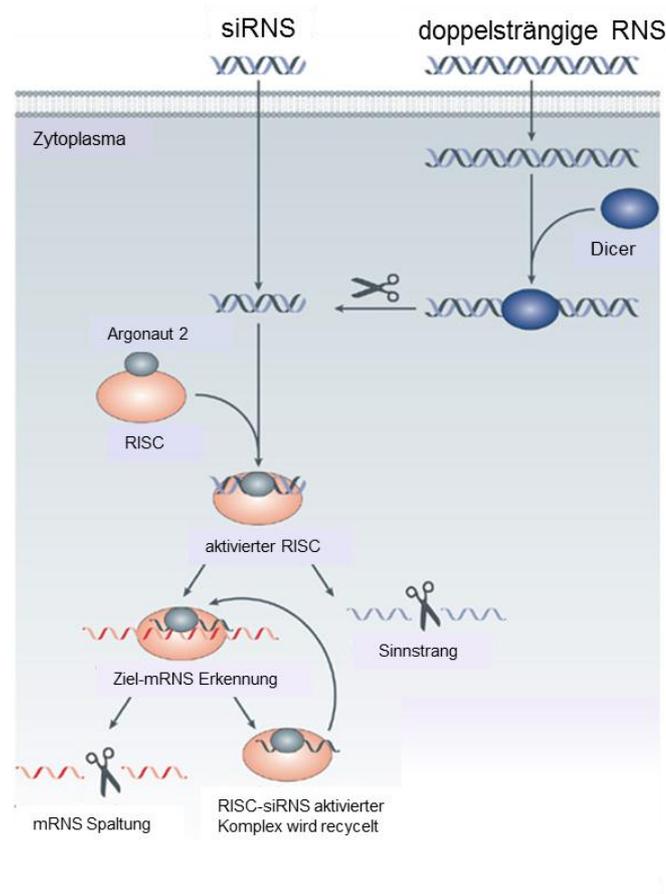


Abbildung 2: schematische Abbildung der RNS-Interferenz (Verändert nach: Whitehead, K., Langer, R., Anderson, D. (2009). Nature Reviews Drug Discovery 8, 129-138) In dieser Abbildung wird das Einbringen und Prozessieren einer kurzen siRNA oder einer längeren doppelsträngigen RNS dargestellt (RISC steht für RNS induzierter Stilllegungskomplex, mRNA für Boten-RNS, siRNA für kurze interferierende RNS). Das Symbol der Schere steht für den Abbau der jeweiligen Sequenz.

Mit diesem RNSi-Mechanismus ist es also möglich, spezifische Proteine in der Zelle herunter zu regulieren.

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob verschiedene Proteine nach der Herunterregulation einen Einfluss auf die Aufnahme von superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikeln haben. Ausgangspunkt war die Identifikation der Zielproteine in der Peptidmassenspektrometrie. Zusätzlich wurden Dynamin-1 und Clathrin (schwere Kette) mit in die Untersuchungen aufgenommen. Aufgrund dieser Auswahl wurde die Fragestellung bearbeitet, ob Proteine wie die Tetraspanine CD63, CD9, CD81, und CD82 sowie weitere Proteine wie Dynamin-1, Caveolin-1, Clathrin (schwere Kette) und Flotillin-1 einen Einfluss auf die Aufnahme haben.

Dazu wurden experimentell shRNA-Konstrukte kloniert und u. a. siRNA getestet. Nachdem die Herunterregulation gezeigt wurde, erfolgten die Nanopartikelenaufnahmestudien mit superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikeln in HeLa-Zellen.

2 Materialien

Im folgenden Kapitel sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte und Chemikalien aufgelistet.

2.1 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 1 sind die Verbrauchsmaterialien aufgelistet, welche für das Arbeiten im Labor benötigt wurden.

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.

Produktbezeichnung	Firma
Adhäsive PCR-Folie	Bio-Rad (U.S.A.)
iBlot [®] Anodenstapel	Invitrogen (U.S.A.)
Celltrics Einwegfilter	Partec (Deutschland)
Einweg-Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)	Greiner Bio-one (Deutschland)
FACS Röhrchen (3,5 ml)	Sarstedt (Deutschland)
Falkonröhrchen (10 ml; 50 ml)	Greiner Bio-one (Deutschland)
Filterpapiere	Invitrogen (U.S.A.)
Ibidi itreat μ -dishes	Ibidi (Deutschland)
iBlot [®] Kathodenstapel	Invitrogen (U.S.A.)
Lab-Tek Kammer	Thermo Fisher Scientific (U.S.A.)
Mikroschraubröhre (0,5 ml)	Sarstedt (Deutschland)
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf (Deutschland)
Multiwell-Platten	Corning (U.S.A.)
Nitrocellulose-Membran	Invitrogen (U.S.A.)
Nukleofektor-Küvetten 100 μ l	Lonza (Schweiz)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (U.S.A.)
PCR-Multiplatten 96-well	Bio-Rad (U.S.A.)
PCR-Röhrchen	Bio-Rad (U.S.A.)
Petrischalen	Greiner Bio-one (Deutschland)
Pipettenspitzen für Eppendorfpipetten	Starlab (Deutschland)
PVDF-Membran	Invitrogen (U.S.A.)
Rotiprotect Nitril Handschuhe	Roth (Deutschland)
iBlot [®] Schwämme für Western Blot	Invitrogen (U.S.A.)
Serologische Einmalpipetten	Brand (Deutschland)
Zählkammer für das TC 10-System	Bio-Rad (U.S.A.)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one (Deutschland)

2.2 Geräte

Tabelle 2 zeigt die verwendeten Geräte.

Tabelle 2: Verwendete Geräte.

Geräte	Firma
4D-Nukleofektor	Lonza (Schweiz)
CFX96-Real Time System	Bio-Rad (Deutschland)
cLSM Leica SP5 II mit CW-STED	Leica (Deutschland)
Durchflusszytometer CyFlow ML	Partec (Deutschland)
Feinwaage AE100	Mettler Toledo (Schweiz)

Materialien

Fluoreszenzmikroskop IX81-ZDC	Olympus (Japan)
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr (Deutschland)
Gefrierschrank -80 °C	Thermo scientific (U.S.A.)
Gelelektrophoresekammer Mini/Maxi	Biometra (Deutschland)
Gleichstromquelle 250-EX	Life technologies (U.S.A.)
Hamilton Pipette (25 µl)	Hamilton Company (U.S.A.)
iBlot® dry Blotting System	Invitrogen (U.S.A.)
Inkubator C200	Labotect (Deutschland)
Kühlschrank 4 °C	Bosch (Deutschland)
LAS-3000 Imager	Fujifilm (Japan)
Lichtmikroskop CKX41	Olympus (Japan)
Mastercycler EP S	Eppendorf (Deutschland)
Mikrozentrifuge Minispin plus	Eppendorf (Deutschland)
ND-800 Spektrophotometer (NanoDrop)	Peqlab (Deutschland)
Neubauerkammer	Marienfeld (Deutschland)
Pipetten (2,5 µl; 10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl)	Eppendorf (Deutschland)
Pipettierhilfe Accujet Pro	Brand (Deutschland)
Sicherheitswerkbank C-[MaxPro]3-130	Berner Interational (Deutschland)
Sicherheitswerkbank Safemate 1.2	Bioair (Italien)
TC 10-System Zellzähler	Bio-Rad (Deutschland)
Thermomixer	HLC by Ditabis (Deutschland)
Vacusafer comfort	Integra Bioscience (Deutschland)
Vortexer Reax top	Heidolph (Deutschland)
Wasserbad	Memmert (Deutschland)
Zentrifuge 5430	Eppendorf (Deutschland)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Deutschland)

2.3 Chemikalien

Die wichtigsten Chemikalien, die für die Laborarbeit benötigt wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Firma
Agar	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Agarose	Roth (Deutschland)
Ampicillin	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Ampuwa	Fresenius Kabi (Deutschland)
Adenosintriphosphat	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Bovines Serumalbumin	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Calciumchlorid	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth (Deutschland)
Ethanol absolut	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Fötales bovines Serum	Invitrogen (U.S.A.)
Glutathion	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Hefeextrakt	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Immersionsöl (Brechungsindex= 1,518)	Leica (Deutschland)
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Methanol	Sigma Aldrich (U.S.A.)

Materialien

Natriumchlorid	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Gentamicin	Invitrogen (U.S.A.)
Nuklease-freies Wasser	Qiagen (U.S.A.)
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (U.S.A.)
Pepton	Sigma Aldrich (U.S.A.)
RNase away Spray	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Saponin	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Triton-X-100	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Trypanblau (0,4 %-ige Lösung)	Sigma Aldrich (U.S.A.)

2.4 Puffer

Im Nachfolgenden sind die Puffer aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Puffer.

Puffer	Firma
6x DNS-Ladepuffer	Fermentas (U.S.A.)
1x Dulbecco´s Phosphat gepufferte Salzlösung	Invitrogen (U.S.A.)
10x Hybridisierungspuffer	Biosettia (U.S.A.)
10x Ligationspuffer	NEB (Deutschland)
2x LiSD-Puffer NuPAGE	Invitrogen (U.S.A.)
10x Restriktionspuffer 3	NEB (Deutschland)
10x T4 Ligase Puffer	NEB (Deutschland)
1x Tris-acetat-Ethylendiaminetetraessigsäure-Puffer	Sigma Aldrich (U.S.A.)

2.5 Medien

Tabelle 5 gibt die verwendeten Medien für die Zellkultur und Bakterienkultur wieder.

Tabelle 5: Verwendete Medien.

Medium	Zusammensetzung/Firma
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (U.S.A.)
Flüssige lysogene Nährlösung (LB-Medium)	Pro 500 ml: 5 g Pepton (Sigma Aldrich, U.S.A.) 5 g Natrium Chlorid (Sigma Aldrich, U.S.A.) 2,5 g Hefeextrakt (Sigma Aldrich, U.S.A.) Nuklease-freies Wasser (Qiagen, U.S.A.)
Lysogene Nährlösung mit Agar (LB-Amp ⁺)	Pro 500 ml: Wie das LB-Medium 7,5 g Agar (Sigma Aldrich, U.S.A.)
Super optimale Nährlösung mit katabolischem Repressor (S.O.C.-Medium)	Invitrogen (U.S.A.)

2.6 Antikörper

In Tabelle 6 sind die primären Antikörper und in Tabelle 7 die sekundären Antikörper aufgelistet.

Tabelle 6: Primäre Antikörper.

Antikörper	Wirt	Verdünnung (IF)	Verdünnung (WB)	Firma
CD82	M	1:100	1:500	ACRIS (Deutschland)
CD81	M	1:200	1:200	Santa Cruz Biotechnology (U.S.A.)
CD9	M	1:100	1:100	BD Bioscience (U.S.A.)
CD63	M	1:200	1:200	Biologend (U.S.A.)
Flotillin-1	M	1:200	1:200	BD Bioscience (U.S.A.)
Dynamamin	M	1:100	1:100	BD Bioscience (U.S.A.)
Caveolin-1	Rb	1:100	1:500	Santa Cruz Biotechnology (U.S.A.)
Caveolin-1	Rb	1:100	1:500	Abcam (England)
Clathrin (schwere Kette)	M	1:100	1:200	BD Bioscience (U.S.A.)
GAPDH	M	-	1:1000	Ambion (U.S.A.)

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper. Alle sekundären Antikörper wurden bei Invitrogen (U.S.A) bestellt.

Antikörper	Verdünnung (IF)
Anti-mouse IgG AF633	1:200
Anti-rabbit IgG AF633	1:200
WB sekundäre Antikörper-Lösung anti-mouse	-
WB sekundäre Antikörper-Lösung anti-rabbit	-

2.7 Kits

Tabelle 8 beinhaltet die verwendeten Kits.

Tabelle 8: Verwendete Kits.

Kits	Firma
5x iScript Reaktionsmix	Bio-Rad (U.S.A.)
Amaya-SE cell line 4D-Nucleofektor X Kit L	Lonza (Schweiz)
iQ SYBR [®] Green Supermix	Bio-Rad (U.S.A.)
Lipofektamin 2000 Transfektionsreagenz	Invitrogen (U.S.A.)
QIAgen Spin Midiprep Kit	Qiagen (U.S.A.)
QIAgen Spin Miniprep Kit	Qiagen (U.S.A.)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (U.S.A.)
Novex [®] Western Breeze	Invitrogen (U.S.A.)

2.8 Enzyme

Die eingesetzten Enzyme sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Eingesetzte Enzyme.

Enzyme	Firma
BamHI	NEB (Deutschland)
PacI	NEB (Deutschland)
Reverse Transkriptase	Bio-Rad (Deutschland)
T4 Ligase	Biolabs (New England)
Trypsin	Invitrogen (U.S.A.)
XhoI	NEB (Deutschland)

2.9 Bakterien

Mit den verwendeten Bakterien (Tabelle 10) wurde unter einer Bakterienwerkbank gearbeitet.

Tabelle 10: Bakterien.

Bakterienstamm	Firma
<i>Escherichia coli</i> Top10	Invitrogen (U.S.A.)

2.10 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde mit humanen HeLa-Zellen gearbeitet. Die Zelllinie (ATCC, U.S.A.) wird bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM mit 1 % FBS und 1 % Penicillin und Streptomycin kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert.

2.11 Nanopartikel

Für die Nanopartikelstudien wurden Nanopartikel von Markus Bannwarth (Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz) verwendet. Die Nanopartikel bestehen aus Polystyrol und eingelagertem Magnetit. Die durchschnittliche Größe der Nanopartikel beträgt 120 nm und sie tragen eine stark negative Ladung. Die Nanopartikel sind mit Bodipy II (Anregung bei 488 nm; Emission bei 527 nm) markiert.

2.12 Oligonukleotide

Dieses Kapitel listet die eingesetzten Oligonukleotide. Es handelt sich um die, in der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) (Tabelle 11) eingesetzten, Primer und die shRNS Oligonukleotide (Tabelle 12), welche in den Plasmidvektor kloniert wurden. Des Weiteren sind in Tabelle 13 die eingesetzten siRNS angegeben.

2.12.1 Primer

Dieses Unterkapitel umfasst die Primer.

Tabelle 11: Eingesetzte Primer. Dargestellt sind an jeweilig erster Stelle die „vorwärts“- (5'→3') und an jeweilig zweiter Stelle die „rückwärts“- (3'→5') Primer. Alle Primer stammen von der Firma Eurofins MWG Operon (Deutschland).

Primer der Zielsequenz	Sequenz
CD82	5' ACTGGACAGACAACGCTGAG 3'
CD82	3' GTTGTCGAAAGACACTCCT 5'
CD81	5' CTCCAGCACACTGACTGCTT 3'
CD81	3' TCGTTGGAGAAGTTCCTCCT 5'
CD9	5' GCATGCTGGGACTGTTCTTT 3'
CD9	3' TAAGGGTGTTCTACTCCAC 5'
CD63	5' CGAAAAACAACCACACTGCT 3'
CD63	3' TTTAGGGAAGGTACAGCTTC 5'
Flotillin-1	5' GCATTGCCAGGTAAAAATC 3'
Flotillin-1	3' CTTCTGCCTCCGACTCTAAC 5'
Dynamamin-1	5' CGATATCGAGCTGGCTTACA 3'
Dynamamin-1	3' AGTCCCTTGGTCCTACTCTA 5'
Caveolin-1	5' GCGACCCTAAACACCTGAAC 3'
Caveolin-1	3' TGTGTGTCAAAAGTGCCGTA 5'
Clathrin (schwere Kette)	5' GAGCCTCTTGCTGACATCAC 3'
Clathrin (schwere Kette)	3' TTATTAGCGGGTAGACTTCC 5'
GAPDH	5' AAGGTGAACGTCGGAGTCAA 3'
GAPDH	3' GGTAGTTACTGGGGAAGTAA 5'

2.12.2 Doppelsträngige DNS

Die angegebenen shRNS werden in dieser Arbeit zur Herunterregulation spezifischer Proteine eingesetzt.

Tabelle 12: shRNS Konstrukte der verschiedenen mRNS. Die shRNS wurden mit dem shRNS-Design Programm von Biosettia entworfen. Der allgemeine Aufbau der Oligonukleotide erfolgte nach der Vorlage: 5'-**AAAAN**(21nt)**TTGGATCCAAN**(21nt)-3' (rot: Klonierungsüberhang; N: variable Oligonukleotidsequenz blau: Haarnadelsequenz). Alle doppelsträngigen DNS stammen von der Firma Biosettia (U.S.A).

Ziel mRNS	Sequenz (5' → 3')
CD82	AAAAGCTGGGTCAGCTTCTACAATTGGATCCAATTGTAGAAGCTGACCCAGC
CD81	AAAAGGATGTGAAGCAGTTCTATTTGGATCCAATAGAACTGCTTCCACATCC
CD9	AAAAGCTTCCTCTTGGTGATATTTTGGATCCAAAATATCACCAAGAGGAAGC
CD63	AAAAGGACTTTCTGGAAGTGTTTGGATCCAACAAACACTTCCAGAAAGTCC
Flotillin-1	AAAACCAGGACTATTTGCACTCTTTTTGGATCCAAAAGAGTGCAATAGTCCTGG
Dynamamin-1	AAAAGCAACCAGATGAACAAGAATTGGATCCAATTCTTGTTTCATCTGGTTGC
Caveolin-1	AAAAGGTCAAGATTGACTTTGAATTGGATCCAATTCAAAGTCAATCTTGACC
Clathrin (schwere Kette)	AAAAGCTTGATGCTCTGAAGAATTTGGATCCAAATTCTTCAGAGCATCAAGC

2.12.3 siRNS

Die angegebenen siRNS finden in dieser Arbeit ebenfalls Anwendung zur Herunterregulation von spezifischen Proteinen.

Tabelle 13: siRNS der verschiedenen mRNS.

Ziel mRNS	Sequenz (5' → 3')	Firma
CD82	GCCCUCAAGGGUGUGUAUATT	Ambion (U.S.A.)
CD81	UGAUGUUCGUUGGCUUCGUTT	Eurofins MWG Operon (Deutschland)
CD9	GGAGUCUAUAUUCUGAUCGTT	Ambion (U.S.A.)
CD63	UAUGGUCUGACUCAGGACAAGCUGUTT	Eurofins MWG Operon (Deutschland)
Flotillin-1	Santa Cruz, Katalognummer: sc-35391	Santa Cruz Biotechnology (U.S.A.)

Materialien

Dynamamin I/II	Santa Cruz, Katalognummer: sc-43736	Santa Cruz Biotechnology (U.S.A.)
Caveolin-1	GCCGUGUCUAUUCCAUCUATT	Ambion (U.S.A.)
Clathrin (schwere Kette)	UAAUCCAAUUCGAAGACCAAUTT	Eurofins MWG Operon (Deutschland)
ATG7-AF555	GGTCAAAGGACGAAGATAATT	Qiagen (U.S.A.)

2.13 Vektoren

Zur Klonierung der shRNS wurde der Plasmidvektor pRNAi-H1-green von Biosettia (U.S.A.) verwendet.

2.14 Software

Für die Auswertung der Agarosegele und Western Blots wurde der LAS 3000 Imager von Fujifilm mit der Software Image Reader LAS 3000 Version 2.2 verwendet. Die Quantifizierung der Western Blots erfolgte mit ImageJ. Die Nanodrop Auswertung erfolgte mit der Software ND1000. Die Auswertung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion erfolgte über den CFX Manager von Bio-Rad (Deutschland). Die Aufnahmen mit dem konfokalen LSM wurden mit dem Programm LAS AF light Version bearbeitet und exportiert. Die Auswertung der Durchflusszytometrie wurde über das Programm FCS Express 4.0 ausgeführt. Die Erstellung von Graphen und die statistische Auswertungen wurden mit dem Programm Graphpad Prism 6.0 durchgeführt. Für den virtuellen Restriktionsverdau wurde Geneious von Biomatters (U.S.A.) verwendet. Für die Zitation der Literatur der Bachelorarbeit wurde das Programm Citavi 4.1.0.3 verwendet.

3 Methoden

In diesem Kapitel werden die angewendeten Methoden näher beschrieben.

3.1 Molekularbiologische Methoden

Dieses Unterkapitel befasst sich mit den molekularbiologischen Methoden, welche in dieser Arbeit Anwendung gefunden haben.

3.1.1 Entwurf von Oligonukleotiden

Der Entwurf der Oligonukleotide erfolgte nach den Kriterien von Ui-Tei (2004). Dabei sollte sich am 5' Ende des Gegenstranges ein Adenin oder ein Thymin befinden und am 5' Ende des Leitstranges ein Guanin oder ein Cytosin. Ebenfalls sollten im 5' Endbereich Adenin und Thymin angereichert sein. Sowohl der Leitstrang als auch der Gegenstrang sollten eine Länge von 21 Nukleotiden (nt) aufweisen. Der Abschnitt zwischen beiden Strangabschnitten, welcher zur Ausbildung der Haarnadel verantwortlich ist, sollte eine feste Basenabfolge von 10 nt enthalten. Eine weitere wichtige Sequenz ist der 5' Überhang. Dieser ist für die Ligation des Konstrukts in pRNAi-H1-green notwendig und muss aus vier Adenin-Nukleotiden bestehen. Insgesamt bestehen die Oligonukleotide aus 52 nt.

3.1.2 Hybridisierung

Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden zu doppelsträngigen Oligonukleotiden hybridisiert. Hierzu wurde das Herstellerprotokoll von Biosettia (U.S.A.) („pRNAi Protocols - cloning shRNA“) verwendet, welches den Einsatz von 10 µl der 100 µM einzelsträngigen Oligonukleotide, 2 µl 10 x Hybridisierungspuffer (Biosettia, U.S.A.) 8 µl Nuklease-freiem Wasser (Qiagen, U.S.A.) vorsieht. Dieser Ansatz wurde bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abbildung 3 zeigt schematisch den Ablauf der Hybridisierungsreaktion.

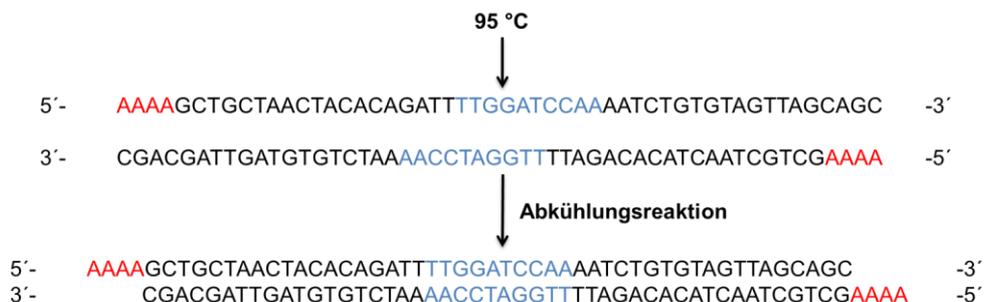


Abbildung 3: Hybridisierungsreaktion anhand des CD63 Oligonukleotids (in Anlehnung an Biosettia U.S.A.). In blau ist die Haarnadelsequenz dargestellt und in rot die Überhänge. Die 95 °C führen zur Denaturierung spontan hybridisierter Einzelstrangoligonukleotide, während sich die einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotide in der Abkühlungsphase partiell zu einem doppelsträngigen Oligonukleotid zusammenlagern.

Die Oligonukleotide aus der Hybridisierungsreaktion wurden anschließend mit Hilfe eines 4%-igen Agarosegel auf eine ungefähre Hybridisierungseffizienz überprüft und mit ImageJ quantifiziert.

Vor dem Beladen des Gels wurde ein Teil des Hybridisierungsansatzes 1:500 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, wovon 20 µl mit 4 µl Ladepuffer (6x) (Sigma Aldrich, U. S. A.) versetzt wurden und 17 µl der Probe und 10 µl eines 100 bp DNS-Markers (O'Gene ruler 100 bp DNA ladder, Thermo Scientific, U. S. A.) wurden auf das Gel aufgetragen. Die Oligonukleotide wurden für eine Stunde bei 80 V nach Größe aufgetrennt.

3.1.3 Ligation

Das doppelsträngige Produkt der Hybridisierungsreaktion wurde per Ligation in den pRNAi-Vektor eingebracht. Dazu wurde ebenfalls das Herstellerprotokoll von Biosettia (U.S.A.) verwendet. Es wurden 1 µl (10 ng) des pRNAi Vektors (Biosettia, U.S.A.) mit 2 µl, auf 50 nM verdünnten, doppelsträngigen Oligonukleotiden versetzt. Dieser Ansatz wurde zu einem weiteren Ansatz gegeben, welcher 2 µl 10 x Ligationspuffer (NEB, Deutschland), 2 µl T4 Ligase (NEB, Deutschland) und 13 µl Nuklease-freies Wasser (Qiagen, U.S.A.) enthält. Der Ligationsansatz wurde für drei Stunden bei RT inkubiert. Die Adeninüberhänge der doppelsträngigen Oligonukleotide sowie die Thyminüberhänge des Plasmidvektors dienen als überlappende Ligationsstellen (Abbildung 4).

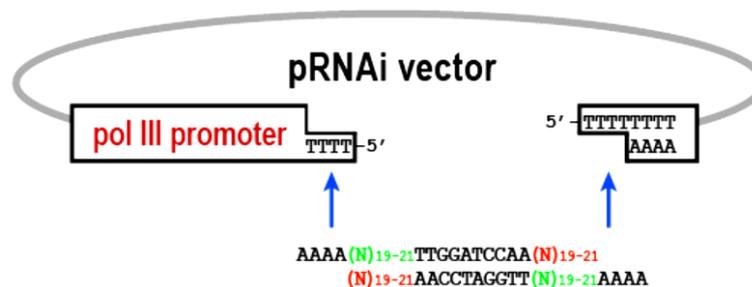


Abbildung 4: Ligation des Vektors mit dem Oligonukleotiden (Quelle: Biosettia „Single Oligonucleotide RNAi Technology für Gene Silencing“).

3.1.4 Transformation von Plasmid-DNS

Im Anschluss an die Ligation erfolgt die Transformation der Plasmide in kompetente *E. coli* Top10 (Invitrogen, U.S.A.). Hierbei wurde nach dem Protokoll von Daniel Hofmann gearbeitet, welches er in seiner Masterarbeit (Characterization of B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia; Max-Planck-Institut für Immunologie, Freiburg, 2011) beschrieben hat. Unter Transformation versteht man die Aufnahme von Nukleinsäuren in eine Bakterienzelle (Lorenz und Wackernagel, 1994). Für die Transformation wurden die bei -80 °C gelagerten Bakterien auf Eis aufgetaut und die später benötigten Agarplatten sowie das S.O.C. Medium

(Invitrogen, U.S.A.) auf 37 °C vorgewärmt. Die Bakterien wurden anschließend mit 2 µl des Ligationsansatzes für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Fremd-DNS wurde durch einen zwei-minütigen Hitzeschock bei 37 °C bewirkt. Der Ansatz wurde anschließend für 5 Minuten auf Eis inkubiert und mit 150 µl S.O.C. Medium versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C und 300 rpm wurde der Ansatz auf einer LB-Amp⁺-Agarplatte ausplattiert und für 16-18 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.1.5 Bakterienkultivierung

Um die transformierten *E. coli* zu kultivieren, wurden diese auf LB-AMP⁺ Agar ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden einzelne Kolonien von den Agarplatten gepickt und in Erlenmeyerkolben mit flüssigem LB-Amp⁺ Medium überführt. Die Bakterienkulturen wurden dann bei 37 °C und 200 rpm unter aeroben Bedingungen für ca. 15-18 Stunden kultiviert. Die Informationen zur Kultivierung wurden aus der Masterarbeit von Daniel Hofmann (2011) übernommen.

3.1.6 Plasmidisolation

Um Plasmide aus *E. coli* zu isolieren, wurden Plasmid Mini- und Maxipräparationen durchgeführt. Hierbei wurde exakt nach dem Protokoll QIAprep Spin aus dem Handbuch 12 / 2006 von Qiagen gearbeitet. Für eine Mini-Präparation wurde eine Bakterienkultur von 8 ml, für eine Midi Präparation eine 20 ml Bakterienkultur angesetzt.

Über eine spektralphotometrische Messung (Nanodrop von Peqlab, Deutschland) wurde die Konzentration der präparierten DNS in den Proben bestimmt.

3.1.7 DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen

Das Ergebnis der Ligation des shRNS Konstruktes in den pRNAi-Vektor wurde mit einem Restriktionsverdau überprüft. Hierbei werden zwei Restriktionsenzyme so gewählt, dass die Schnittstelle des einen Enzyms im shRNS-Insert liegt und die Schnittstelle des anderen Enzyms außerhalb des shRNS-Inserts lokalisiert ist (siehe Abbildung 5). Hierzu wurden je Plasmid mit shRNS-Insert vier Ansätze vorbereitet. Das Durchführungsprotokoll stammt aus der Masterarbeit von Daniel Hofmann (2011).

Der erste Ansatz blieb unverdaut und enthielt 10 µl Plasmid-DNS, 2 µl Puffer 3 (NEB, Deutschland) und 8 µl Nuklease-freies Wasser (Qiagen, U.S.A.). Der Zweite und Dritte, der Einzelverdau, beinhaltete jeweils 10 µl Plasmid-DNS; 2 µl Puffer 3 (NEB, Deutschland), 1 µl Enzym (entweder BamHI (NEB, Deutschland), PacI (NEB, Deutschland) oder XhoI (NEB, Deutschland) (1 U Enzym für 1 µg DNS) und 7 µl Nuklease-freies Wasser. Der vierte Ansatz war der Doppolverdau mit beiden Enzymen und enthielt 10 µl Plasmid-DNS; 2 µl Puffer 3, 1 µl BamHI, 1 µl XhoI und 6 µl Nuklease-freies Wasser.

Der Verdau wurde mit einem 1 %-igen Agarosegel überprüft. Als DNS-Marker wurde zusätzlich ein 1 kb DNS-Marker (O'Gene ruler 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific, U. S. A.) aufgetragen.

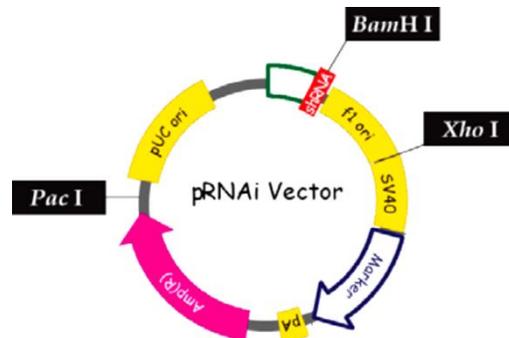


Abbildung 5: pRNAi-Vektor System mit den Restriktionsenzymstellen. BamHI schneidet innerhalb des shRNA-Inserts, XhoI und PacI außerhalb. (verändert nach Biosettia „Single Oligonucleotide RNAi Technology für Gene Silencing“)

3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNS Fragmente mit unterschiedlicher Größe aufzutrennen. Das Gel besteht aus Agarose (Roth, Deutschland), welches ein komplexes Netzwerk aus Molekülen bildet und je nach Menge der eingesetzten Agarose eine unterschiedliche Porengröße ausbildet. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes kommt es zur Wanderung der negativ geladenen DNS Fragmente durch die Agarosematrix in Richtung des positiven Pols. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird hierbei durch die Größe des Fragmentes reguliert. Längere Fragmente wandern langsamer durch die Matrix als kürzere Fragmente.

Um ein Agarosegel zu gießen, benötigte man Agarose, welche sich unter Erhitzen in Tris-Acetate-EDTA Puffer (TAE Puffer (1x); 50x TAE-Puffer: 2,00 mol/L Tris base; 1 mol/L Essigsäure; 0,05 mol/L EDTA (pH 8,5) (alle Komponenten von Sigma Aldrich, U.S.A.; Protokoll von AppliChem, Deutschland) löste. Nach der Polymerisation des Gels werden 1/10000 einer Lösung SYBR®-safe (Invitrogen, U.S.A.) als DNS Farbstoff dazugegeben. Die DNS-Fragmente, wie z.B. von der Hybridisierungsreaktion oder vom DNS Restriktionsverdau, wurden dann mit Ladebuffer (6x) (Fermentas, U.S.A.) vermischt und einzeln in die Taschen eines 4 %- oder 1 %-igen Agarosegels geladen. Um die genaue Größe der Fragmente zu bestimmen, wurde zusätzlich ein 50 bp- und / oder ein 1 kb-Größenmarker (Fermentas, U.S.A.) auf das Gel aufgetragen.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in TAE-Puffer (1x) bei 100 V für 60 Minuten durchgeführt. Die Visualisierung der Banden wurde mit einem UV-Illuminator mit Kamera (LAS-3000, Fujifilm) bei einer Belichtungszeit von 1/8 s durchgeführt. Die Stromstärke und Dauer wurden zuvor an Probegelen experimentell optimiert.

3.1.9 Zellkultivierung

In dieser Arbeit wurden HeLa-Zellen eingesetzt. Diese stammen ursprünglich von humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms ab. HeLa-Zellen wachsen adhären und in einer Monolage. Das Protokoll für die Zellkultivierung stammt aus der Dissertation von Daniela Baumann (Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz, 2012). Für die Kulturen wurden Zellkulturflaschen (Greiner, Deutschland) mit einer Fläche von 175 cm² verwendet. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die HeLa-Zellen passagiert. Nach einem Waschschrift mit DPBS, wurden die Zellen von der Zellkulturflasche mit 4 ml Trypsin (Invitrogen, U.S.A.) gelöst. Nach fünf-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde zur Blockierung dieser Reaktion 6 ml DMEM Vollmedium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin und Streptomycin (P/S) (Invitrogen, U.S.A.) dazugegeben. Die Zellsuspension wurde drei Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 in neue Zellkulturflaschen passagiert und in DMEM Vollmedium kultiviert.

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Brutschrank, in einer 5 %-igen CO₂ Atmosphäre.

3.1.10 Transfektion von HeLa-Zellen

Um die HeLa-Zellen mit den Plasmiden zu transfizieren, wurden zwei verschiedene Methoden angewendet.

Eine Methode ist die Lipofektion. Hierbei wurde Lipofektamin 2000 unter Beachtung des Herstellerprotokoll von Invitrogen (U.S.A.) verwendet. In Tabelle 14 werden die benötigten Komponenten und deren eingesetzte Menge angegeben. In zwei Reaktionsgefäße wurden 50 µl DMEM gefüllt, und eines davon mit Lipofektamin 2000 versetzt. In das andere wurde 75 pmol der siRNS eingerührt. Nach kurzem Inventieren wurden die Inhalte beider Reaktionsgefäße miteinander vermischt und bei RT für fünf Minuten inkubiert. Daraufhin folgte die tröpfchenweise Zugabe zu den HeLa Zellen. Der Ansatz wurde dann für zwei Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 14: Reagenzien der Lipofektion.

Reagenzien	Eingesetzte Menge für einen Reaktionsansatz	Firma
DMEM ohne Zusätze	100 µl	Gibco [®] by life technologies (U.S.A)
Lipofectamine 2000 Transfection reagent	7 µl	Invitrogen (U.S.A.)
siRNS Konstrukt	75 pmol	Siehe Tabelle 13

Die zweite angewendete Methode ist die Nukleofektion. Mit dieser Methode wurden sowohl die zuvor isolierten Plasmide, als auch die siRNS transfiziert.

Die Nukleofektion basiert auf einer, hinsichtlich Pufferbedingungen, Spannungspulsstärke und Frequenz, optimierten Elektroporation (AMAXA, Schweiz). Es handelt sich um eine etablierte Methode, bei der die Zellmembran vorübergehend permeabilisiert wird und es somit zur Aufnahme der Fremd-DNS in den Zellkern kommt (Potter und Heller, 2001). Für HeLa-Zellen existieren ein kommerzielles Programm sowie ein entsprechendes Puffersystem.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Puffersystemoptimierung verschiedene Versuchsreihen mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt.

Eine Versuchsreihe wurde mit dem Kit „Cell line Nucleofector Kit L“ durchgeführt, wobei exakt nach dem Herstellerprotokoll (AMAXA) gearbeitet wurde. In einer weiteren Reihe wurde an Stelle des kommerziellen Puffers DPBS (Invitrogen, U.S.A.) eingesetzt und in einer dritten Reihe ein selbst hergestellter „Zytomix Puffer“ (van den Hoff et al., 1995) Hierbei handelt es sich um einen intrazellulären, dem Ionenniveau angepassten Puffer. Die Zusammensetzung dieses Puffers ist in Tabelle 15 zu finden.

Nach der Etablierung fand der intrazelluläre Zytomix Puffer weitere Anwendung. Das Protokoll von Lonza (Schweiz) wurde mit dem ersetzten Puffer befolgt. Die eingesetzten Mengen der shRNS und siRNS betragen jeweils 500 pmol pro 500000 HeLa-Zellen.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Zytomix Puffers. Der pH-Wert von 7,6 wurde mit Hilfe von KOH eingestellt.

Komponente	Finale Konzentration [mM]	Firma
KCl	120	Sigma Aldrich (U.S.A.)
CaCl ₂	0,15	Sigma Aldrich (U.S.A.)
K ₂ HPO ₄	10	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Hepes	25	Sigma Aldrich (U.S.A.)
MgCl ₂	5	Sigma Aldrich (U.S.A.)
EGTA	2	Sigma Aldrich (U.S.A.)
ATP	2	Sigma Aldrich (U.S.A.)
Glutathion	5	Sigma Aldrich (U.S.A.)

3.1.11 RNS Isolation

Für die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion musste zunächst aus den transfizierten Zellen die RNS isoliert werden. Hierbei wurde das Protokoll von Qiagen „RNeasy Mini Kit“ befolgt. Zusätzlich wurde ein DNase Verdau mit dem RNase-Free DNase Set von Qiagen (U.S.A.) durchgeführt. Pro Ansatz wurde 10 µl DNase mit 70 µl RDD Puffer vermischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die RNS wurde dann in 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der RNS wurde spektrophotometrisch (Nano Drop, Peqlap) bestimmt.

3.1.12 Komplementäre DNS-Synthese

Für die Analyse der Genexpression ist es auf Grund der Instabilität der RNS nötig die gesamte RNS mit Hilfe der reversen Transkriptase in komplementäre DNS (cDNS) umzuschreiben.

Für einen Reaktionsansatz wurde das Protokoll von Biorad (U.S.A.) angewendet. Dazu wurden 150 ng RNS, 4 µl 5x iScript Reaktionsmix (Bio-Rad, U.S.A.) und 1 µl iScript reverse Transkriptase (Bio-Rad, U.S.A.) eingesetzt. Der Ansatz wurde mit Nuklease-freiem Wasser (Qiagen, U.S.A.) auf ein Gesamtvolumen von 20 µl pipettiert. Die cDNS-Synthese wurde in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Maschine Mastercycler EP S durchgeführt.

Das folgende Programm wurde für die cDNS-Synthese verwendet:

Tabelle 16: Programm für die cDNS-Synthese.

Zyklus	Zeit [min]	Temperatur [°C]
1	5:00	25
2	30:00	42
3	5:00	85
4	∞	4

3.1.13 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Mit der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist es möglich, die Menge einer spezifischen Boten RNS (mRNS) zu bestimmen. Die qRT-PCR basiert auf der gleichzeitigen Amplifikation und Quantifizierung des Reaktionsprodukts. Um eine Quantifizierung der Produkte zu erreichen, stehen unterschiedliche Methoden zur Auswahl. In der vorliegenden Arbeit wurde die SYBR[®] Green-Methode angewendet. Hierbei handelt es sich um einen Cyanin-Farbstoff, der in doppelsträngige DNS interkaliert und nach Anregung bei 494 nm grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Sobald die Primer sich an die Einzelstränge anlagern und somit die Kettenverlängerung beginnt, nimmt der Anteil der doppelsträngigen DNS zu und es kommt zu einer erhöhten Fluoreszenz von SYBR[®] Green. Im Laufe der qPCR nimmt also mit jedem Zyklus die Intensität der Fluoreszenz von SYBR[®] Green zu, welche in einem exponentiellen Amplifikationsdiagramm dargestellt wird und somit für den Nutzer in Echtzeit nachverfolgt werden kann.

Für die Auswertung muss ein Schwellenwert (c(t)-Wert) der Fluoreszenz bestimmt werden, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt und in der linearen Amplifikationsphase liegt. Der c(t)-Wert hängt proportional von der in der Probe enthaltenen Menge an cDNS des Zielgens ab. Je kleiner der c(t)-Wert ist, desto mehr Ausgangsmaterial war vorhanden (Abbildung 6).

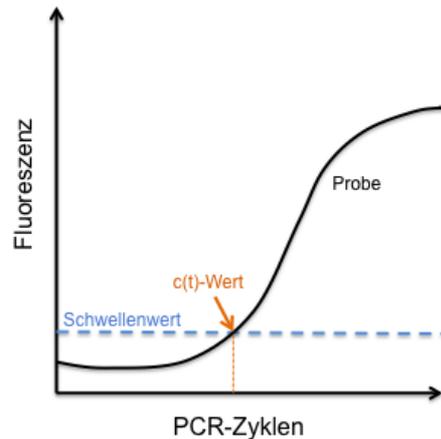


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines qRT-PCR Amplifikations-Zyklus.

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte nach der $\Delta\Delta C(t)$ Methode. Hierbei werden die $C(t)$ -Werte der zu untersuchenden Gene mit den $C(t)$ -Werten des Referenzgens verrechnet und somit das Expressionslevel der Marker Gene auf das Level des Referenzgens normiert (siehe Formel 1). Bei den Referenzgenen handelt es sich um Gene, welche in den Zellen in gleichen Ausmaßen exprimiert werden und deren Gehalt sich auch durch das Experiment nicht verändert. In dieser Arbeit wird als Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Formel 1: Formel zur Errechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) nach der $\Delta\Delta C(t)$ Methode. Hierbei ist der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle zum Referenzgen normalisiert und auf eine Negativkontrolle bezogen (nach Pfaffl, 2004).

$$\Delta C(t) = C(t)_{Zielgen} - C(t)_{Haushaltsgen}$$

$$\Delta\Delta C(t) = \Delta C(t)_{experimentell\ behandelte\ Probe} - \Delta C(t)_{Kontrolle}$$

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta C(t)}$$

Zusätzlich wurden die jeweiligen Schmelzkurven analysiert, um die Funktionalität der Primer nachzuweisen. Dies ist wichtig, da SYBR[®] Green beispielsweise auch mit Primerdimeren oder in unspezifisch entstandenen Amplifikationsprodukten interkalieren kann. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte nach einem Temperaturgradienten von 65 °C bis 95 °C und erlaubt die Unterscheidung einzelner Produkte an Hand ihrer Schmelztemperatur.

Die qRT-PCR wurde am CFX96 Real Time System (Bio-Rad, Deutschland) nach dem Protokoll in der Dissertation von Ivonne Brüstle (Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz, 2012) durchgeführt. Pro Ansatz wurde $50 \frac{ng}{\mu l}$ cDNS eingesetzt, 10 μl SYBR[®] Green (Bio-Rad, Deutschland), 25 pmol des Vorwärts-Primer und 25 pmol des Rückwärts-Primer (siehe Tabelle 11). Als Negativkontrollen diente die cDNS von nicht transfizierten HeLa-Zellen.

Methoden

Folgendes Programm wurde für die qRT-PCR verwendet:

Tabelle 17: Programm für die quantitative qRT-PCR.

	Zyklus	Zeit [min]	Temperatur [°C]
	1	3:00	95
45 x	2	0:10	95
	3	0:10	59
	4	Fluoreszenzdetektion	
	5	0:30	72
	6	Fluoreszenzdetektion	
Schmelz- kurven- Analyse	7	0:30	95
	8	0:05	59 (Gradient von 0,5 °C)
	9	0:05	95

3.1.14 Nanopartikelzugabe

Um die Aufnahme der Nanopartikel zu untersuchen, wurden zu den transfizierten HeLa Zellen die superparamagnetische Polystyrol-Nanopartikel (MB-P-107-ap) zugegeben. Zu 1 ml DMEM wurde 150 µg der Nanopartikelsuspension gegeben. Dann erfolgt eine 6-stündige Inkubation bei 37 °C.

3.1.15 Immunodetektion der Proteine - Antikörperfärbung für die Auswertung mit dem cLSM

Für den Nachweis von bestimmten Proteinen in den HeLa Zellen wurde die Methode der Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (Protokoll aus der Masterarbeit von Daniel Hofmann, 2011). Hierbei handelt es sich um eine indirekte Antikörperfärbung. Bei der indirekten Antikörperfärbung wird zunächst ein primärer Antikörper (AK) eingesetzt, der erst nach der Zugabe eines sekundären fluoreszierenden AK detektierbar wird. Eingesetzt werden u.a. monoklonale Primärantikörper, welche auf ein spezielles an den Proteinen vorkommendes Epitop gerichtet sind und dort eine affine Bindung zu diesem ausbilden. Vor der eigentlichen AK-Färbung werden die HeLa-Zellen fixiert. Bei der Methanol Fixierung wurden die HeLa Zellen zunächst mit 2 ml DPBS gewaschen. Nach dem Waschschrift folgte die Zugabe von 500 µl, bei -20 °C gelagertem, Methanol (Sigma Aldrich, U.S.A.). Die Inkubation erfolgte bei -20 °C für 15 Minuten. Nach dem zweiten Waschschrift mit 2 ml DPBS folgte die Behandlung der Zellen mit 500 µl 3 %-igen bovinem Serumalbumin (BSA) (Sigma Aldrich, U.S.A.) für 30 Minuten bei 37 °C. BSA blockiert freie Bindestellen an proteinbindenden Oberflächen und soll die unspezifische Bindung der Immunglobuline und somit ein Hintergrundsignal bei späterer Detektion verhindern. Nach der nötigen Inkubationszeit wurde 500 µl des jeweilig primären Antikörpers zu den Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die

jeweiligen Verdünnungen der AK in 1 %-igen BSA ist in Tabelle 6 dargestellt. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS und je 2,5 Minuten Inkubation wurde 500 µl des jeweilig sekundären AK auf die fixierte Probe gegeben. Diese sind in Tabelle 7 angegeben. Dabei ist der Wirt des sekundären AK zu beachten und an den primären AK anzupassen.

Die Proben mit dem sekundären AK wurden ebenfalls 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimalig mit je 2,5 ml DPBS gewaschen.

Die PFA Fixierung erfolgte mit der Zugabe von 500 µl 4 %-igem PFA (Sigma Aldrich, U.S.A.). PFA führt zur Quervernetzung der Proteine. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde das PFA mit einer Pasteurpipette (Brand, Deutschland) entfernt und 500 µl 0,1 %-iges Saponin (Sigma Aldrich, U.S.A.) dazugegeben. Saponin ist ein Detergenz, welches Cholesterol spezifisch aus der Zellmembran löst und die Zelle somit zugänglich für die spätere Zugabe der AK macht. Nach einer 10-minütigen Inkubation, ebenfalls bei RT, wird Saponin wieder mit einer Pasteurpipette entfernt. Die folgenden Schritte gleichen der Vorgehensweise der MeOH Fixierung nach dem zweiten Waschschrift mit DPBS.

Die Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop (cLSM). Für die Aufnahmen wurde ein 63 x Öbobjektiv (HCX PL APO CS 63x/1,4 -0,6 oil) verwendet. Die Aufnahmen wurden im seriellen Modus aufgenommen. Bei den Detektoren handelt es sich um Photoelektronenvervielfacher (englisch: photomultiplier), welche die Lichtsignale verstärken und in digitale Signale umwandeln.

3.1.16 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (englisch: fluorescent activated cell sorting; FACS) erlaubt eine quantitative Analyse der Zellgröße und der Granularität. Die Einzelzellen werden durch einen Laserstrahl geführt und streuen in Abhängigkeit der Größe und der Granularität das einfallende Licht. Im Falle fluoreszierender Partikel kommt es zur Farbstoffanregung durch den Laser und zur Detektion von zusätzlichen Fluoreszenzsignalen. Beim Passieren der Zellen durch den Laserstrahl, wird das Streulicht auf unterschiedliche Detektoren geleitet. Hierbei korreliert die Vorwärtsstreuung des Laserlichts (forward scatter FSC) mit der Größe und die Seitwärtsstreuung (sideward scatter SSC) mit der Granularität der Zelle. Bei fluoreszierenden Komponenten, wie z.B. aufgenommene Nanopartikel, werden diese mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt und die Fluoreszenz von unterschiedlichen, wellenlängenspezifischen Detektoren aufgenommen und in ein elektronisches Signal umgewandelt.

Für die FACS Experimente wurde das Protokoll von Daniela Baumann angewendet, welches aus ihrer Dissertation (Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz, 2012) stammt. Die Zellen wurden zunächst mit DPBS gewaschen und trypsinisiert. Nach einer Zentrifugation bei 800 rpm für 3 Minuten wurde das Zellpellet in 1 ml DPBS resuspendiert und über Zellfilter

(Celltrics Einwegfilter) (Partec, Deutschland) in 3,5 ml FACS-Röhrchen (Partec, Deutschland) überführt.

Für die Optimierung der Pufferbedingungen wurden HeLa-Zellen mit der siRNS ATG-7 (Qiagen, U.S.A.) transfiziert. Die siRNS war an AF55 gekoppelt. Die Aufnahme der siRNS in die Zellen wurde mit dem Bandpassfilter „IBP-610-30“ (Partec, Deutschland) bei einer Wellenlänge von ca. 580 nm gemessen.

Die Analyse der Nanopartikelaufnahme in die HeLa-Zellen erfolgte mit einem Bandpassfilter „IBP-527“ (Partec, Deutschland). Hierbei wird die Fluoreszenz von Bodipy II detektiert, welches bei 488 nm angeregt wird und bei 527 nm emittiert.

3.1.17 Herstellung von Zelllysaten

Um Proteine mit Hilfe des Western Blots nachweisen zu können, müssen die zu untersuchenden Zellen zuvor lysiert werden. Hierzu wurde das Protokoll aus der Masterarbeit von Daniel Hofmann (2011) genutzt, welches vorsieht, die adhärenen Zellen zunächst mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche abzulösen. Die Wirkung von Trypsin wurde mit der Zugabe von DMEM gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann bei 800 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach einmaligem Waschen mit DPBS (erneute Zentrifugation bei 800 rpm für 3 Minuten) mit 20 µl Lithium-Dodecyl-Sulfat-Puffer (LiDS-Puffer NuPage, 2x, Invitrogen, U.S.A.) versetzt und anschließend für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. LiDS-Puffer solubilisiert die Proteine und führt, durch den Einsatz von Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel, zur Spaltung der Disulfidbrückenbindungen und somit zur Denaturierung der Proteine.

3.1.18 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient als bioanalytisches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen. Die Auftrennung erfolgt nach den relativen Molekulargewichten der Proteine in einem elektrischen Feld.

Die zuvor hergestellten Zelllysate wurden nach dem Erhitzen auf ein Polyacrylgel in einer vertikalen Elektrophoresekammer aufgetragen. Als Polyacrylamidgel wurde das Novex NuPage Bis-Tris Gel (Invitrogen, U.S.A.) mit dem Laufpuffer NuPage MES-SDS Puffer (Invitrogen, U.S.A.) verwendet. Aufgrund der negativen Ladung wandern die LiDS-Proteinkomplexe in dem angelegten elektrischen Feld durch das Gel zur Anode. Pro Gel wird zunächst, wie vom Hersteller Invitrogen (U.S.A.) empfohlen, eine Spannung von 60 V für 20 Minuten angelegt, welche dann auf 100 V für 1,5 Stunden erhöht wird.

3.1.19 Western Blot

Um einen Nachweis der einzelnen Zielproteine zu erbringen, führt man nach der erfolgreichen LiDS-PAGE eine Western Blot-Analyse durch. Dazu werden die Proteine zunächst aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran oder eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Nach der Übertragung erfolgt der Nachweis der Proteine mit Hilfe einer Immunfärbung.

Für den Proteintransfer von dem SDS-Gel auf die PVDF Membran (Sigma Aldrich, U.S.A.), wurde die Western Blot-Apparatur „iBlot[®] dry blotting system“ (Invitrogen, U.S.A.) und deren Herstellerprotokoll verwendet. Hierbei wurde das SDS-Gel auf eine Anoden-Membran (Sigma Aldrich, U.S.A) gelegt, welche zuvor mit Ethanol aktiviert (Sigma Aldrich, U.S.A.) und mit Nuklease-freiem Wasser gespült wurde. Auf das SDS-Gel wurden die PVDF-Membran und zwei Filterpapiere gelegt, welche zuvor ebenfalls in Nuklease-freiem Wasser angefeuchtet wurden.

Die oberste Schicht umfasste die Kathoden-Membran (Sigma Aldrich, U.S.A), welche wie die Anoden-Membran behandelt wurde und einen Schwamm (Sigma Aldrich, U.S.A), um den Stromfluss zu gewährleisten.

Der Proteintransfer wurde bei einer fünf-minütigen Spannung von 25 V durchgeführt.

Für den Proteintransfer von dem SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte der Aufbau wie in Abbildung 7. Die Spannung betrug 100 V und wurde für eine Stunde angelegt. Die Filterpapiere wurden zuvor in Transferpuffer (Transferpuffer: 25 mM Glycin 20% Methanol; 192 mM Tris-Base, pH = 8,3) (alle Komponenten von Sigma Aldrich, U.S.A; Protokoll der Firma Carl Roth „Tris-Glycin Puffer nach Tobwin“) getränkt.

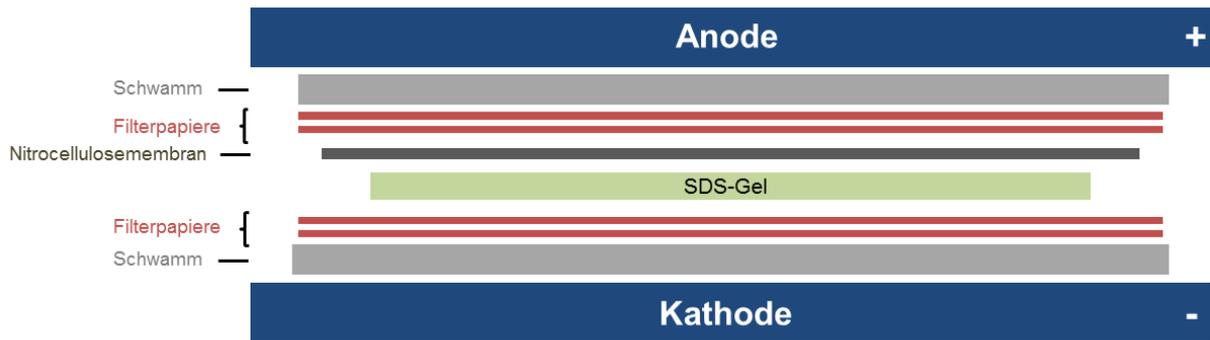


Abbildung 7: Allgemeiner Aufbau der Western Blot-Apparatur bei der Verwendung einer Nitrocellulosemembran.

Nach einem erfolgreichen Proteintransfer werden die Banden auf den Membranen mit Hilfe einer Immunfärbung nachgewiesen. Hierbei wurde das Herstellerprotokoll von Invitrogen (U.S.A.) befolgt, welches die Anwendung des Novex® Western Breeze Kits beschreibt. Die Auswertung erfolgte mit dem LAS 3000 Imager, welcher die auftretende Chemilumineszenz der Reaktion zwischen der alkalischen Phosphatase und deren Substrat detektieren kann.

4 Ergebnisse

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse der Bachelorarbeit dargestellt. Für die Herunterregulation der Tetraspanine (CD63, CD9, CD81 und CD82) und weiterer Proteine wie Flotillin-1, Caveolin-1, Clathrin (schwere Kette) und Dynamin-1 wurden shRNS Konstrukte hergestellt. Die Funktionalität dieser wurde anschließend mit Agarosegelelektrophoresen und dem konfokalen Laser-Rastermikroskop überprüft. Auf Grund von geringen Transfektionseffizienzen der HeLa-Zellen mit den shRNS-Konstrukten, wurden die Versuche mit siRNS weitergeführt. Die Überprüfung einer effizienteren Transfektion, und somit einer effizienteren Herunterregulation, erfolgte ebenfalls mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop sowie auf Proteinebene über den Western Blot und auf der mRNA-Ebene mit der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.

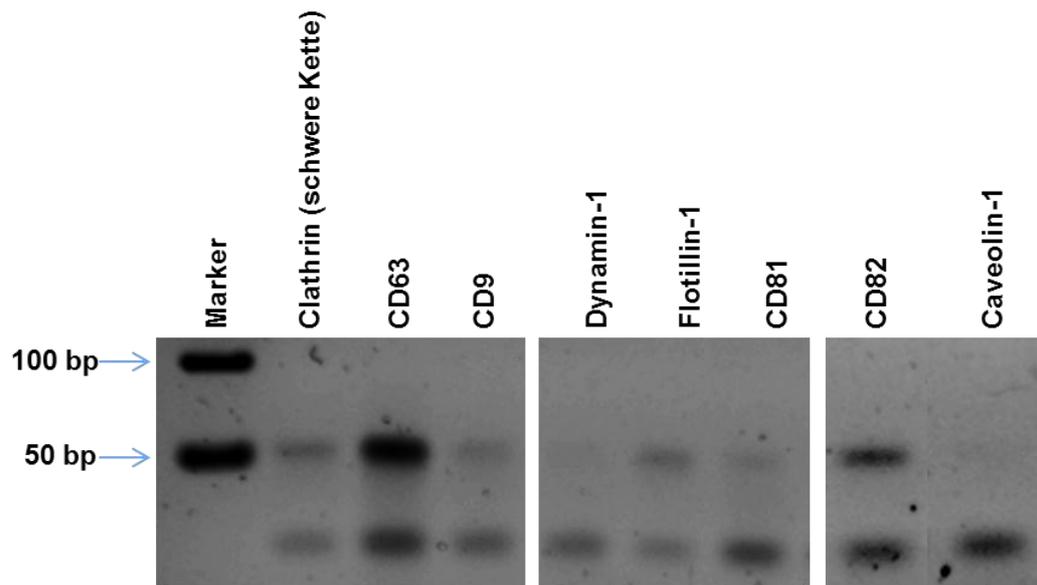
Nachdem die Herunterregulationen der spezifischen Proteine erfolgreich nachgewiesen wurden, erfolgten die Nanopartikelstudien. Hierzu wurden die Polystyrol-Magnetit-Nanopartikel MB-P-107-ap eingesetzt. Die Aufnahme der Nanopartikel in HeLa-Zellen wurde quantitativ über die Durchflusszytometrie und qualitativ über die konfokale Laser-Rastermikroskopie analysiert.

4.1 Hybridisierung der Einzelstränge

Für die Klonierung der shDNS in den Plasmidvektor pRNAi-H1-green wurden die komplementären Einzelstrangoligonukleotide in einer Reaktion zu Doppelstrangoligonukleotiden hybridisiert. Nach der Auftrennung der Fragmente in der Gelelektrophorese, wurden zwei unterschiedlich hohe Banden bei ca. 50-25 bp detektiert (siehe Abbildung 8 A). Die obere Bande repräsentiert die doppelsträngigen Oligonukleotide. Die untere Bande stellt die nicht-hybridisierten Oligonukleotide dar.

Alle Konstrukte, ausgeschlossen Caveolin-1, zeigten eine nachweisbare Hybridisierung. Die Hybridisierungseffizienz wurde mit dem Programm ImageJ quantifiziert (Abbildung 8 B). Caveolin-1 war hierbei nicht auswertbar.

A



B

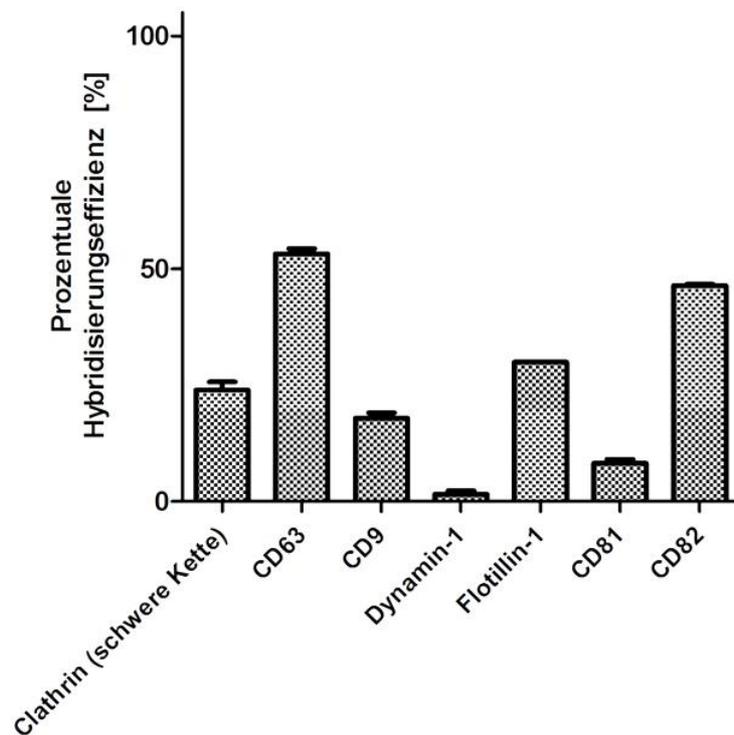


Abbildung 8: Hybridisierungsreaktion der Oligonukleotide und Quantifizierung der Hybridisierungseffizienz. (A) Nach der Hybridisierung der Einzel- und Doppelstrangoligonukleotide wurden diese in einer Gelelektrophorese in einem 4%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Spuren 2 bis 8 zeigen die hybridisierten Proben der Oligonukleotide. Die obere Bande repräsentiert die doppelsträngigen Oligonukleotide, die untere die nicht-hybridisierten Oligonukleotide (Marker = 50 bp Marker). (B) Die Quantifizierung der Hybridisierung erfolgte durch eine Bandenanalyse in ImageJ. Das Quantifizierungsdiagramm zeigt den prozentualen Anteil der erfolgreich hybridisierten Oligonukleotide. Die Hybridisierungen und deren Quantifizierung wurden dreifach durchgeführt.

Die erfolgreiche Hybridisierung war die Voraussetzung für die Klonierung der Oligonukleotide in den pRNAi-H1-green Vektor. Über einen Kontrollverdau wurde die Ligation überprüft.

4.2 Kontrollverdau der hybridisierten Oligonukleotide in pRNAi-H1-green

Um die erfolgreiche Ligation der shRNS in pRNAi-H1-green zu überprüfen, wurde ein Restriktionskontrollverdau durchgeführt. Die einzelnen Konstrukte wurden über eine Agarosegelelektrophorese analysiert (Abbildung 9). Zur Auswertung des Agarosegels wurden die Sequenzen der Zielproteine virtuell im Programm Geneious (Biomatters U.S.A.) verdaut und mit den Bandengrößen von Abbildung 9 verglichen.

Abbildung 9 zeigt den Restriktionsverdau der shRNS-Konstrukte im Vektor pRNAi-H1-green. Hier ist zu erkennen, dass in den Spuren der unverdauten Probe (Spur 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30 und 34) jeweils eine breite Bande im Bereich zwischen 4000 und 3000 Basenpaaren (bp) zu finden ist. Die Spuren mit den einzelverdauten Proben, mit XhoI oder BamHI, weisen jeweils eine größere Bande auf, welche bei einer Größe von ca. 4300 bp liegt. Die doppeltverdauten Proben mit XhoI und BamHI (Spuren 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29 und 33), weisen alle zwei Banden auf. Die obere befindet sich bei ca. 3700 bp und die untere Bande bei ca. 600 bp. Vergleicht man die entstandenen Banden mit der Restriktionskarte in Abbildung 5, so bestehen beide Banden jeweils aus unterschiedlich großen Vektorsequenzen und Teilsequenzen des shRNS-Insert.

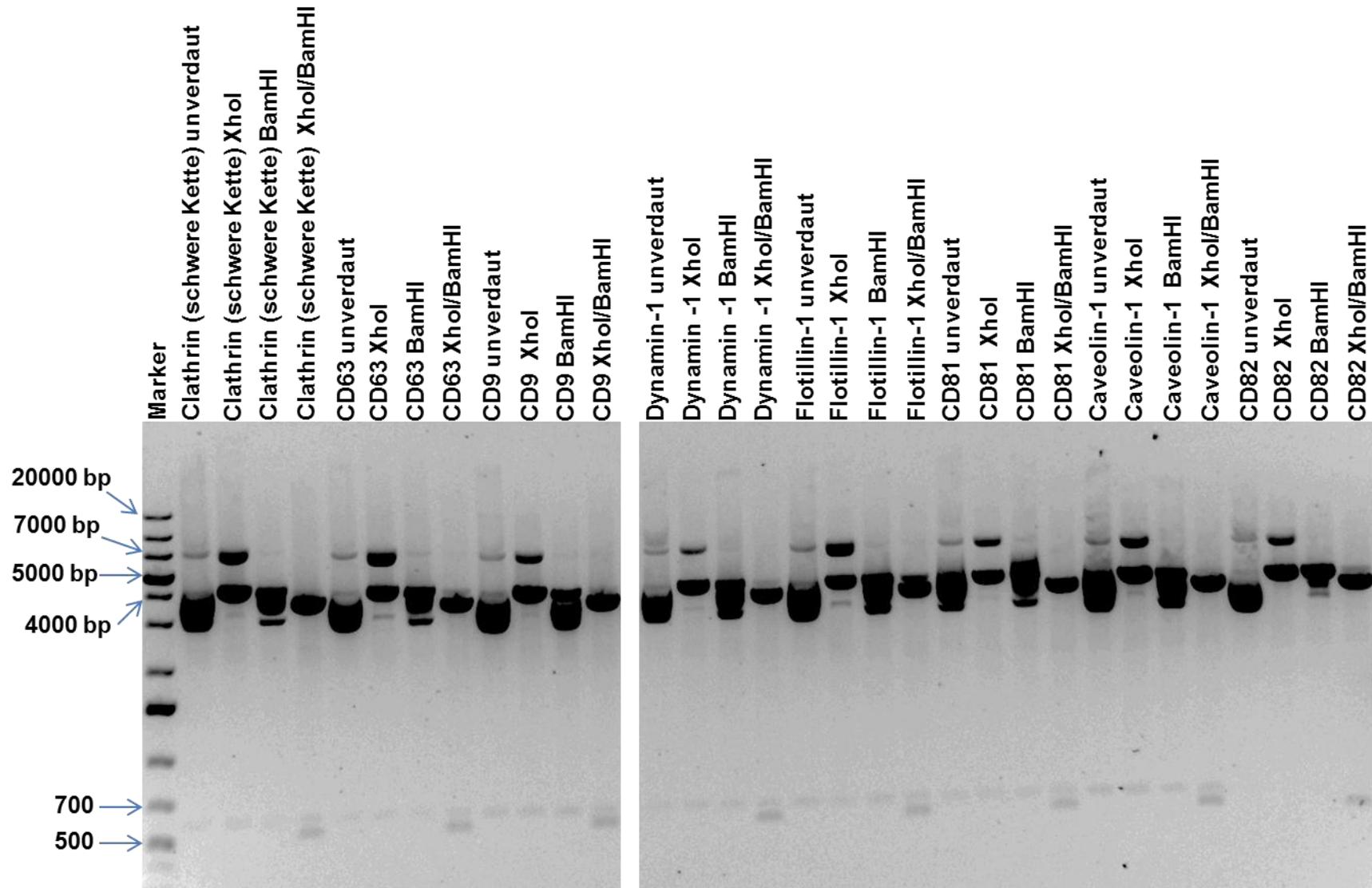


Abbildung 9: 1%-iges Agarosegel des Restriktionsverdaus der ligierten Probe im pRNAi-Vektor H1-green. Spur 1: 1 kb Marker, Spur 2-33 zeigen die verschiedenen Produkte des Kontrollverdaus der klonierten shRNS in pRNAi-H1-green. Der Restriktionsverdaus wurde dreifach überprüft.

Nach der Klonierung folgten die Isolation der Plasmide und die Transfektion dieser in HeLa-Zellen. Nach der Expression der spezifischen mRNA folgte der Nachweis der Protein-Herunterregulation.

4.3 cLSM-Nachweis der Protein-Herunterregulation mit shRNS-Konstrukten

Nachdem die Ligation erfolgreich nachgewiesen wurde, wurden die aus *E. coli* isolierten Plasmide in HeLa-Zellen nukleofektiert. Nach einer dreitägigen Zellkultivierung wurden diese mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop auf deren erfolgreiche Herunterregulation analysiert. Dazu wurden die Zellen fixiert und die zu untersuchenden Proteine in den Zellen mit Hilfe einer Antikörperfärbung durch spezifische Fluoreszenz markiert (Abbildung 10).

Abbildung 10 zeigt HeLa-Zellen mit den herunterregulierten Proteinen. In den Proben von CD82, CD9, CD63 und CD81 wurden GFP-positive Zellen detektiert, in denen keine Signale des Antikörpers (rot) für die jeweilig spezifische Zielsequenz (CD82, CD9, CD63 und CD81) sichtbar waren. Die GFP-positiven Zellen zeigten eine erfolgreiche Herunterregulation der Proteine. Der Durchlichtkanal zeigt alle Zellen in der Aufnahme, auch die GFP-negativen Zellen, welche noch das Zielprotein exprimieren.

In den anderen transfizierten Proben, wie z.B. in den Caveolin-1 oder Clathrin (schwere Kette) herunterregulierten Zellen, waren entweder keine Antikörpersignale zu detektieren, oder es wurden zu wenig GFP-positive Zellen gefunden, sodass keine zuverlässige Aussage über die Effizienz der Konstrukte gemacht werden konnte.

Ergebnisse

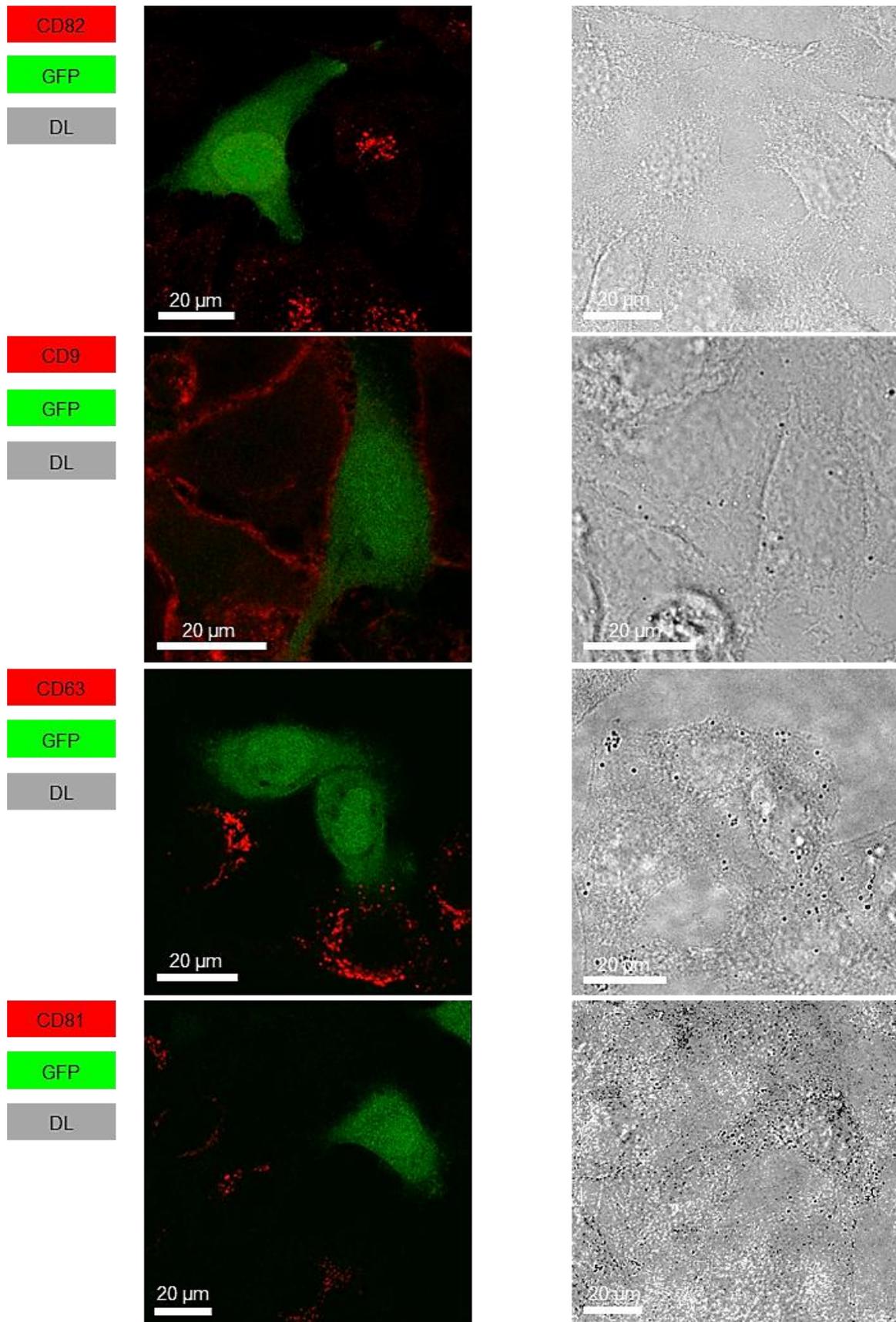


Abbildung 10: Analyse der spezifischen Protein-Herunterregulation in HeLa-Zellen. Die Aufnahmen erfolgten mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop. In grün ist das GFP-Signal der transfizierten Zellen dargestellt und in rot das Antikörpersignal der Zielproteine. Auf der rechten Seite befinden sich die Durchlichtaufnahmen der Proben (DL). Die Antikörperfärbung und dessen Auswertung wurden fünfmal überprüft.

Auf Grund der geringen Nukleofektionseffizienz der HeLa-Zellen mit den shRNS-Konstrukten wurden die Untersuchungen des Einflusses der Tetraspanine auf die Aufnahme von superparamagnetischen Nanopartikeln mit siRNS weitergeführt. Durch die Transfektion von Fluoreszenz-markierten siRNS wurde zunächst die Nukleofektion mit der Lipofektion verglichen. Die Transfektion über die Methode der Nukleofektion führte zu einer Effizienz von knapp 95 %. Aus diesem Grund fand die Nukleofektion eine höhere Anwendung als die Lipofektion. Die mit den shRNS-Konstrukten optimierten Bedingungen der Nukleofektion wurden nun für die Anwendung der siRNS weiter optimiert.

Es wurde unter anderem die Auswirkung von unterschiedlichen Puffern auf die Effizienz der Nukleofektion getestet. Dabei ergab ein selbsthergestellter Zytomix eine sehr gute Effizienz, welcher mit geringen Kosten verbunden war.

Nach der Optimierung folgten die Nukleofektionen der siRNS und deren Auswertungen.

4.4 qRT-PCR der mit siRNS transfizierten HeLa-Zellen

Nach der Optimierung des Nukleofektionsprotokolles für die siRNS wurden die Funktionalitäten der eingesetzten siRNS auf der mRNA-Ebene überprüft. Nach drei Tagen Inkubationszeit wurde die Herunterregulation mit der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion analysiert und quantifiziert (siehe Abbildung 11).

Abbildung 11 zeigt die prozentuale Herunterregulation der jeweiligen Proteine in den Zellen. Die Herunterregulation der einzelnen mRNA wurde in technischen und biologischen Triplikaten gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass CD63 im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) eine Herunterregulation von ca. 94 % aufweist. Außerdem wird sichtbar, dass CD81 in den Zellen zu 71 % herunterreguliert wurde, die Proteine CD9 67 % und CD82 85 % weniger Expression in der Zelle zeigt. Des Weiteren war Clathrin (schwere Kette) nur noch zu 49 % in den transfizierten Zellen vorhanden. Von Caveolin-1 wurde in den Zellen noch 12 % Protein nachgewiesen. Von Flotillin-1 war noch 32 % Protein vorhanden. Die geringste Herunterregulation erfolgte bei Dynamin I/II mit 43 %.

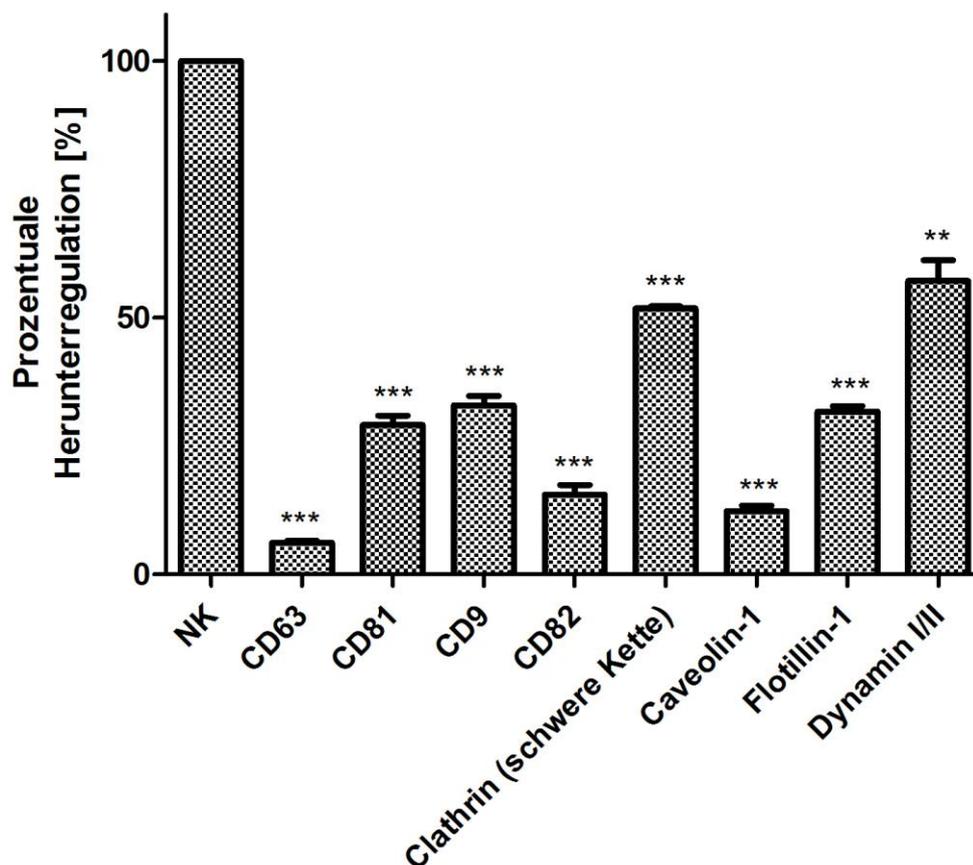


Abbildung 11: Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion der herunterregulierten mRNA in nukleofektierten HeLa-Zellen. Die Analysen fanden drei Tage nach der Nukleofektion statt. Die prozentuale Herunterregulation bezieht sich auf die Negativkontrollen (NK). Die Analyse erfolgte mit der SYBR[®] Green $\Delta\Delta$ CT-Methode. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test, bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle (* $p=0,01-0,05$; ** $p=0,001-0,01$; *** $p<0,001$) ($n=3$). Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder.

Neben der mRNA-Ebene wurde die Herunterregulation in den HeLa-Zellen auch auf Proteinebene untersucht.

4.5 Nachweis der Protein-Herunterregulation im Western Blot

Die Überprüfung auf Proteinebene wurde im Western Blot gezeigt und anschließend mit ImageJ quantifiziert (Abbildung 12 B). Als Ladekontrolle wurde im Western Blot ein Antikörper gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt.

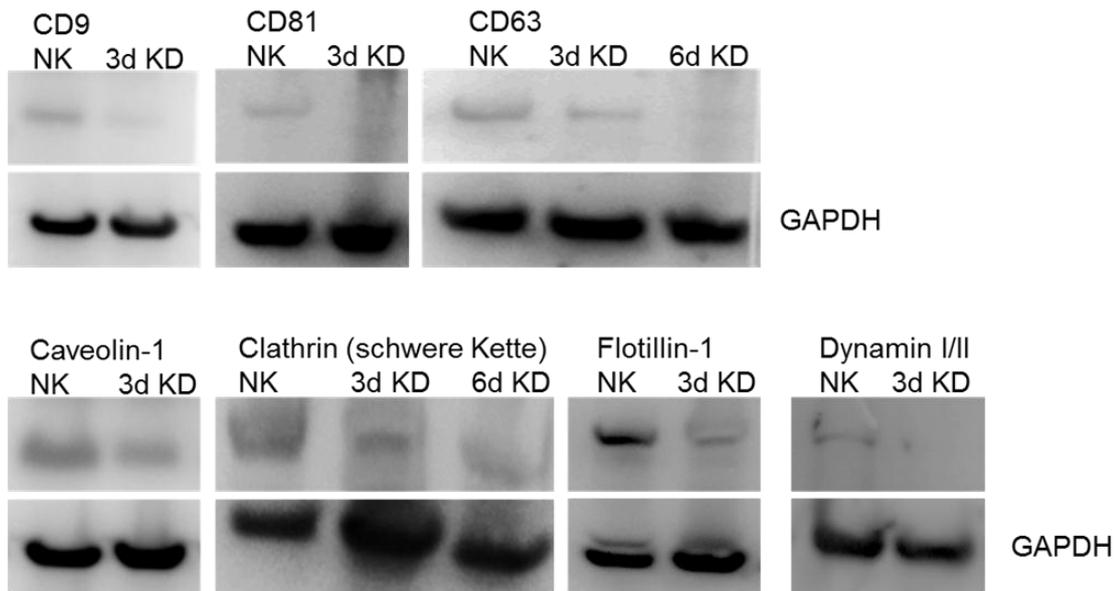
Der Western Blot zeigt, dass die jeweils erste Bande intensiver ist als die zweite. Bei CD63 und Clathrin (schwere Kette) ist eine dritte Bande sichtbar, welche noch schwächer als die zweite ist. Die Ladekontrolle GAPDH ist jeweils als untere Bande sichtbar (ca. 36 kDa). In der Quantifizierung des Western Blots wird deutlich, dass alle untersuchten Proteine auf mindestens 39 % herunterreguliert wurden. Ebenfalls wird sichtbar, dass die Analyse der

Ergebnisse

Nukleofektion nach 6 Tagen bei CD63 und Clathrin (schwere Kette) zu einer geringeren Proteinkonzentration in den Zellen führte, als eine Nukleofektion nach 3 Tagen.

Die Herunterregulation von CD82 konnte im Western Blot auf Grund eines nicht detektierbaren Antikörpers nicht nachgewiesen werden. Auch nach der Verwendung eines neuen Antikörpers konnte kein CD82 auf dem Western Blot detektiert werden.

A



B

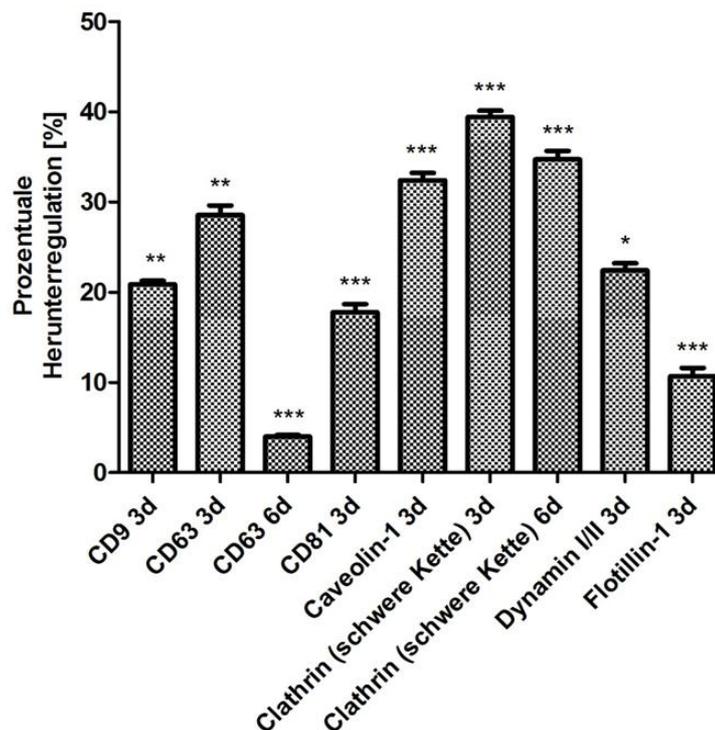


Abbildung 12: Western Blot-Analyse und Quantifizierung der Herunterregulationen (KD) auf der Proteinebene. (A) Immunfärbung der Negativkontrolle und der Herunterregulation gegen das jeweilige Zielprotein. In allen Fällen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle verwendet. Die Proteinanalyse erfolgte 3 Tage (3d) oder 6 Tage (6d) nach der Nukleofektion. Der Western Blot wurde je Konstrukt dreifach bis vierfach durchgeführt. (B) Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit ImageJ. Dargestellt ist die prozentuale Herunterregulation der Zielproteine, bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test, bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle (* $p=0,01-0,05$; ** $p=0,001-0,01$; *** $p<0,001$) ($n=3$). Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an.

Nachdem die Werkzeuge für die Herunterregulation der Proteine etabliert und überprüft wurden, erfolgten die Experimente zur Untersuchung der Aufnahme von Nanopartikeln.

4.6 Kinetik der Nanopartikelaufnahme

Vor den eigentlichen Nanopartikelaufnahmestudien wurde eine Aufnahmekinetik des verwendeten Nanopartikels durchgeführt. Die Kinetik in Abbildung 13 zeigt einen stetigen Anstieg der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit. In den vierstündig inkubierten Proben wurde eine höhere Fluoreszenz gemessen als in den zweistündig inkubierten Proben. Ein weiterer Anstieg ist nach 6 Stunden zu sehen.

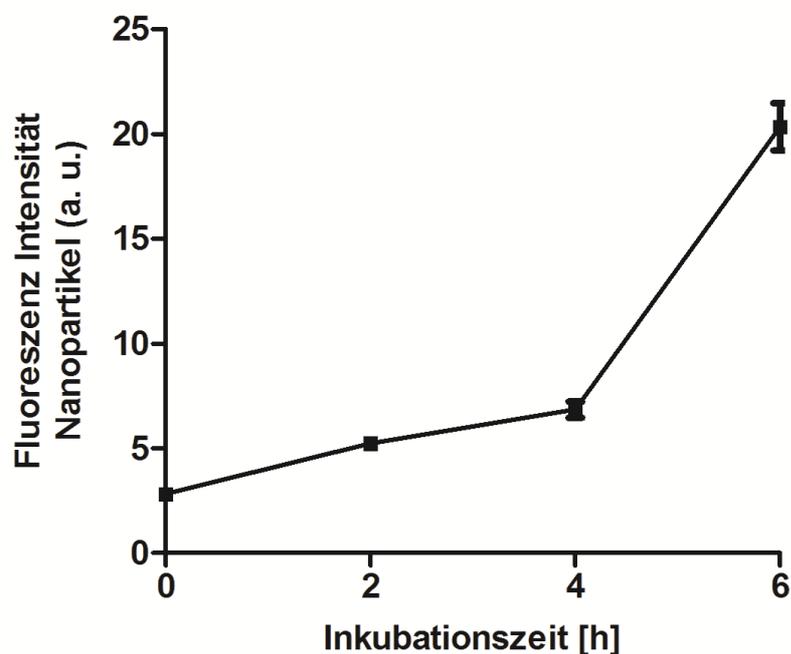


Abbildung 13: Kinetikstudie der Nanopartikelaufnahme in HeLa-Zellen. Analysiert wurde die Nanopartikelaufnahme mit der Durchflusszytometrie. Eingesetzt wurden 150 µg/ml Nanopartikel, welche bis zu sechs Stunden mit den HeLa-Zellen inkubiert wurden. Die Kinetikstudie wurde meinerseits zweifach bestimmt und deckte sich mit Kinetikstudien gleicher Bedingungen von Daniel Hofmann.

Nachdem die Bedingungen optimiert wurden, folgten die Nanopartikelaufnahme studien.

4.7 Nanopartikelaufnahme studien

Die quantitativen Analysen der Aufnahme der Nanopartikel erfolgten mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop (cLSM) (Abbildung 14), und die qualitativen Analysen über die Durchflusszytometrie (Abbildung 15). Für beide Analysen wurden siRNA behandelte HeLa-Zellen für sechs Stunden mit den Nanopartikeln MB-P-107-AP inkubiert. Für die Analyse mit dem cLSM wurden die behandelten Zellen anschließend fixiert und immunologisch mit Antikörpern gefärbt.

Abbildung 14 zeigt die cLSM Aufnahmen der jeweiligen Proben vor und nach der Herunterregulation. Die Herunterregulation zeigt qualitativ keine deutlichen Veränderungen in der Aufnahmekinetik der Nanopartikel.

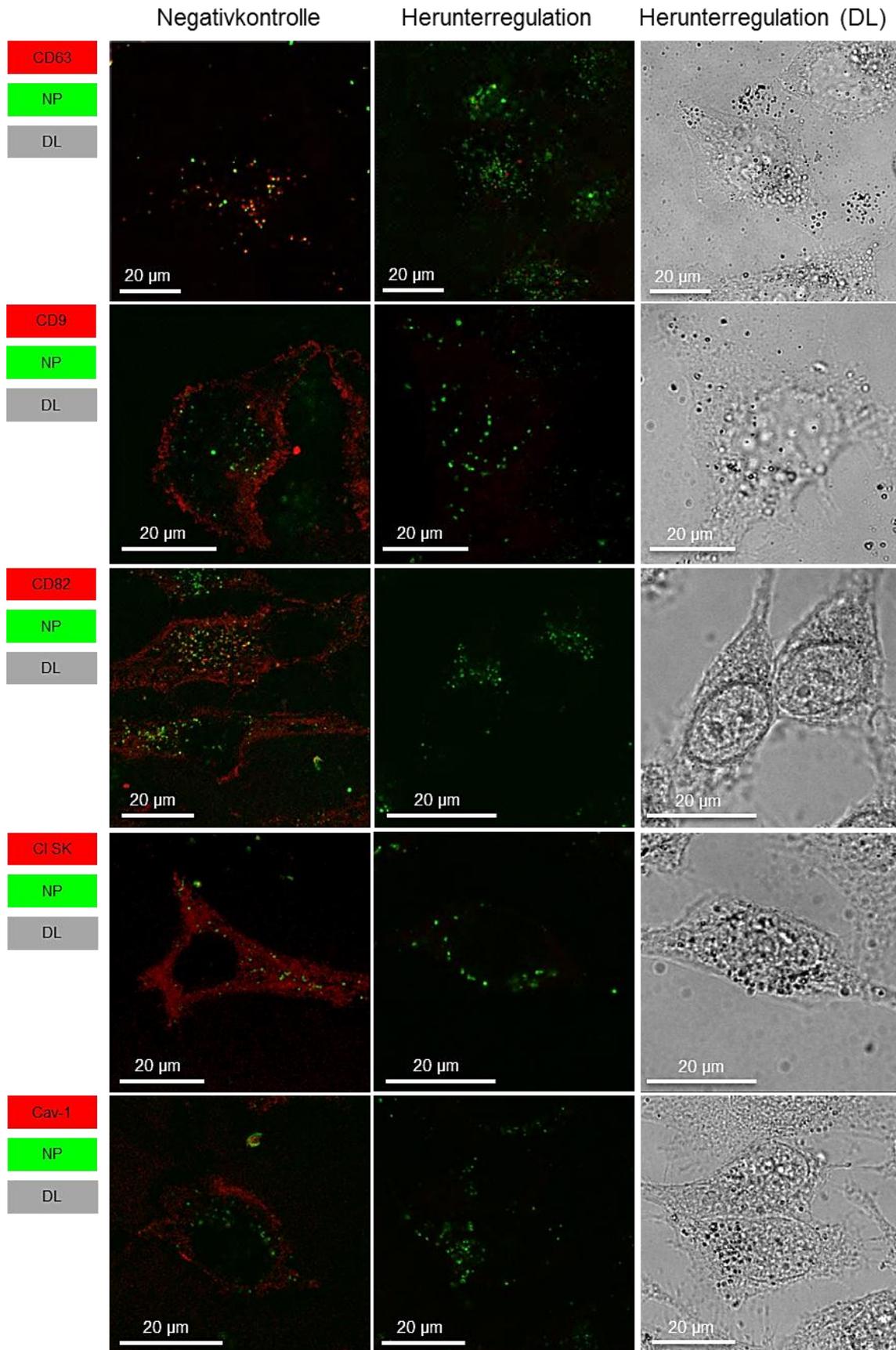


Abbildung 14: Qualitative Analyse der Nanopartikelaufnahme in siRNA behandelten HeLa-Zellen. Die Aufnahmen erfolgten mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop. Die Zielproteine wurden über eine Immunfluoreszenz mit dem jeweiligen Antikörper angefärbt (rot). In grün sind die Nanopartikel (NP) dargestellt, welche zuvor für sechs Stunden mit den HeLa-Zellen inkubiert wurden (DL= Durchlicht). Die Auswertung erfolgte nach dreifacher, teilweise auch vier- oder fünffacher experimenteller Durchführung.

Ergebnisse

Nach der qualitativen Begutachtung der Nanopartikelaufnahme wurde die quantitative Analyse der Nanopartikelaufnahme mit dem Durchflusszytometer durchgeführt. Aus Abbildung 15 wird deutlich, dass die prozentuale Aufnahme der Partikel in die transfizierten Zellen bei CD81 und Flotillin-1 signifikante Abweichungen von 14 % bzw. 13 % aufwiesen. Bei den anderen herunterregulierten Zellen ergab die Durchflusszytometrie keine signifikanten Abweichungen. Hierbei ist eine Schwankung von 0,98 % bis 3,34 % um den Wert der Negativkontrolle mit Nanopartikeln zu beobachten.

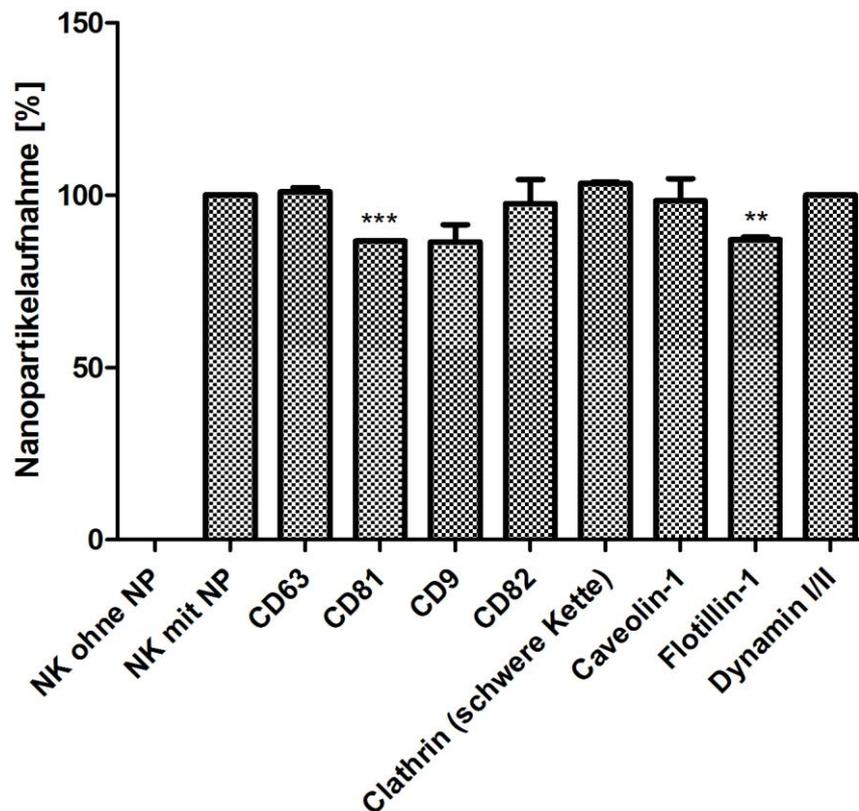


Abbildung 15: Quantitative Analyse der Nanopartikelaufnahme in der Durchflusszytometrie. Die Aufnahme in die nukleofektierten HeLa-Zellen bezieht sich prozentual auf die Aufnahme der Nanopartikel der nicht transfizierten HeLa-Zellen (NK). Die Messung erfolgte nach einer sechs-stündigen Nanopartikel-Inkubation. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test (** $p = 0,001 - 0,01$; *** $p < 0,001$) ($n = 3$). Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die siRNS eine höhere Transfektionseffizienz als die shRNS erbringt. Die Herunterregulation der Proteine über die siRNS hatte erfolgreich funktioniert. Die Nanopartikelaufnahmestudien der superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikel in die transfizierten HeLa-Zellen ergaben quantitativ bei CD81 und Flotillin-1 signifikante Veränderungen, bezogen auf die Aufnahme in nicht-transfizierten HeLa-Zellen. Bei den anderen transfizierten Zellen kam es zu keiner signifikanten Änderung des Aufnahmeverhaltens.

5 Diskussion

Dos Santos et al. (2011) veröffentlichten, dass die gleiche Art von Nanopartikeln von einem Zelltyp über viele unterschiedliche endozytotische Wege aufgenommen werden kann. Das heißt, dass Zellen trotz einer Herunterregulation oder Inhibition von spezifischen Endozytosewegen immer noch in der Lage sind, Nanopartikel aufzunehmen.

Die aktuelle Literatur lässt jedoch keine abschließende Charakterisierung der Aufnahme von Polystyrol-Nanopartikeln in HeLa-Zellen zu. Diese Bachelorarbeit hatte daher zum Ziel, die Rolle der Tetraspanine und der Proteine Caveolin-1, Clathrin (schwere Kette), Dynamin-1 und Flotillin-1 bei den Aufnahmemechanismen superparamagnetischer Polystyrol-Nanopartikel näher zu untersuchen. Ausgangspunkt der Arbeit war die Identifikation der Zielproteine mittels Peptidmassenspektrometrie. Zusätzlich wurden Dynamin und Clathrin (schwere Kette) wegen der Hinweise in der Literatur Rolle der Proteine in der Endozytose untersucht. Dazu wurden experimentell shRNS-Konstrukte kloniert und u. a. siRNS getestet. Nachdem die Herunterregulation über die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse, auf mRNA-Ebene durch die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion und auf Proteinebene durch die Western Blot Analyse gezeigt wurde, erfolgten die Nanopartikelaufnahmestudien mit superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikeln in HeLa-Zellen. Die Aussagen über das Aufnahmeverhalten der Nanopartikel in die transfizierten Zellen wurden durch die signifikanten Herunterregulationen der Proteine unterstützt.

5.1 shRNS-Konstrukt- und siRNS-induzierte Protein-Herunterregulation

Die Anwendung der shRNS Konstrukte benötigte eine vorherige Hybridisierung und Ligation der Oligonukleotide in einen pRNAi-Vektor. Abbildung 8 zeigt an Hand einer Bande bei 50 bp eine erfolgreiche Hybridisierung der Konstrukte, mit der Ausnahme von Caveolin-1. Abbildung 9 zeigt an Hand des Vorhandenseins von zwei Banden beim Doppelverdau mit BamHI und XhoI, dass die shRNS Oligonukleotide erfolgreich in den Vektor ligiert wurden. Wäre das Insert nicht im Vektor vorhanden, würde bei einem Doppelverdau nur ein lineares Plasmid entstehen, da sich die Schnittstelle für BamHI im shRNS-Insert befindet (siehe Abbildung 5). In diesem Fall wäre nur eine Bande im Gel sichtbar. Trotz fehlender Nachweis der Hybridisierung von Caveolin-1 und einer nur geringen Hybridisierung von Dynamin-1 (Abbildung 8) ist in Abbildung 9 (Spur 21 und 33) sichtbar, dass der geringe doppelsträngige Anteil der Ansätze für eine Ligation ausgereicht hat.

Die Betrachtung der transfizierten HeLa-Zellen unter dem konfokalen Laser-Rastermikroskop zeigte nur geringe Transfektionseffizienzen von unter 10 % (Abbildung 10). Ein möglicher Grund dafür könnte in der Größe der elektroporierten Poren und des Plasmids liegen. Laut Herstellerinformationen (Lonza, Schweiz) sollte jedoch die Größe von 4219 bp kein

limitierender Faktor bei der Transfektion darstellen. Möglicherweise spielen hier die Schutzmechanismen der Zelle eine Rolle, durch die das Plasmid oder das shRNS-Insert direkt von Enzymen geschnitten wird (Goebel und Schieß, 1975).

Die siRNS erzielte eine höhere Transfektionseffizienz und konnte somit qualitativ und quantitativ auf die Herunterregulation getestet werden. Die Untersuchung mittels der qRT-PCR (Abbildung 11) und dem Western Blot (Abbildung 12), ergaben dass CD63 im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) eine Herunterregulation von ca. 94 % aufweist, CD81 wurde in den Zellen zu 71 % herunterreguliert und die Proteine CD9 und CD82 waren jeweils zu 67 % bzw. 85 % herunterreguliert. Von Flotillin-1 war noch 32 % Protein vorhanden und von Caveolin-1 wurde in den Zellen noch 12 % Protein nachgewiesen. Die geringste Herunterregulation erfolgte bei Clathrin (schwere Kette) mit 49 % und Dynamin I/II mit 43 %. Auf dem Western Blot (Abbildung 12) waren bei Dynamin I/II noch 22 % und bei Clathrin (schwere Kette) noch 60 % Protein nachweisbar. Laut Herstellerinformationen liegt die prozentuale Herunterregulation von Dynamin I/II im erwarteten Normbereich. Es ist möglich, dass diese geringeren Protein-Herunterregulationen von Clathrin (schwere Kette) und Caveolin-1 biologisch keine relevanten Auswirkungen auf die Zellen haben. Um eine effizientere Herunterregulation in zukünftigen Experimenten zu gewährleisten, sind weitere Optimierungen notwendig. Eine mögliche Optimierung könnte die Nukleofektion der HeLa-Zellen mit mehreren, auf eine mRNA gerichtete, siRNS sein. Hier könnte beispielsweise eine Endoribonuklease-vorbereitete siRNS (esiRNS) eingesetzt werden (Kittler et al., 2004).

5.2 Aufnahme der superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikel in HeLa-Zellen

Die Aufnahmestudien mit negativ geladenen superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikeln erfolgten mit der Methode der Durchflusszytometrie und der indirekten Fluoreszenz-Analyse von transfizierten Zellen mit den entsprechenden Antikörpern. Auf Grund der Fluoreszenzmarkierung der Nanopartikel durch Bodipy II sind diese mit den aus der Literatur bekannten Absorption- und Emissionswerten detektierbar.

Betrachtet man die qualitativen (Abbildung 14) und quantitativen (Abbildung 15) Ergebnisse der Nanopartikelaufnahme der Zellen mit den Herunterregulationen von Clathrin (schwere Kette), Caveolin-1, Dynamin-1, und der Tetraspaninen CD63, CD9 CD82, so ist kein signifikanter Unterschied zur Aufnahme der Nanopartikel in nicht transfizierten HeLa-Zellen sichtbar. Die Ergebnisse der Herunterregulation von CD81 und Flotillin-1 zeigen jedoch signifikante Aufnahmeänderungen.

Mögliche Aufnahmemechanismen stellen u. a. die Clathrin-abhängige Endozytose, die Caveolin-abhängige Endozytose und die Clathrin- / Caveolin-unabhängige Endozytose dar (Mukherjee et al., 1997). Sowohl die Clathrin- und die Caveolin-abhängige Endozytose sind Dynamin-abhängig. Zu den Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Wegen gehört die

Aufnahme über Flotillin-1 und über die Tetraspanin-angereicherten Mikrodomänen (Glebov et al., 2005; Spodon et al., 2008).

Die Aufnahmeergebnisse von Clathrin (schwere Kette) und Caveolin-1 herunterregulierten Zellen decken sich mit der Literatur. In der Literatur sind einige Inhibitor-Experimente zur Aufnahme von negativ geladenen Nanopartikeln in Zellen zu finden. Diese Experimente zeigen, dass die Aufnahme von negativ geladenen Polystyrol- oder Polymilchsäure-Nanopartikeln nicht über den Clathrin- oder Caveolin-vermittelten Endozytoseweg erfolgt (Harush-Frenkel et al., 2007; dos Santos et al., 2011). Dies wurde auch für die Aufnahme von Ricin-Quantum Dots gezeigt (Iversen et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden an Stelle von Inhibitoren siRNS eingesetzt, welche Sequenz-spezifisch nur die einzelnen Proteine herunterreguliert (Whitehead et al., 2009). Dieser Ansatz stellt eine spezifische Ergänzung und Bestätigung zur bekannten Literatur dar. Jedoch ist zu beachten, dass von Clathrin (schwere Kette) nur eine Herunterregulation auf dem Proteinlevel von 51% vorliegt. Es ist also möglich, dass der noch vorhandene Anteil in den Zellen ausreicht, um Clathrin umgebene Membraneinstülpungen in ausreichender Menge zu bilden. In Zukunft sollten weitere Experimente mit einer Visualisierung von Transferrin gemacht werden. Transferrin ist ein Glykoprotein und stellt einen Marker für einen Clathrin-abhängigen Endozytoseweg dar (Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001).

Dausend et al. (2008) zeigten, dass die Aufnahme von positiv und negativ geladenen Polystyrol-Nanopartikeln Dynamin-abhängig ist. Dies bedeutet, dass es neben der Clathrin- und Caveolin-vermittelten Aufnahme noch weitere Aufnahmemechanismen für negativ geladene Partikel gibt, welche Dynamin-abhängig aber Clathrin- und Caveolin-unabhängig sind. Beispielsweise ist nach Herskovitz (1993) Dynamin ebenfalls an einfachen Membranabschnürungen beteiligt. Eine weitere Möglichkeit eines Clathrin- und Caveolin-unabhängigen, aber Dynamin-abhängigen Aufnahmeweges findet man in der Internalisierung des Interleukin 2 Rezeptors (IL2R β) (Doherty et al., 2009). Ebenfalls ist der Weg über die GTPase Proteine Ras homologes Genfamilienmitglied A (RhoA) und Ras-verwandtes C3 Botulinumtoxinsubstrat-1 (Rac-1) Dynamin-abhängig, aber Caveolin- und Clathrin-unabhängig (Sandvig et al., 2011).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Dausend et al. (2008) zeigen die Experimente dieser Arbeit jedoch, dass es zu keinem signifikanten Unterschied bei der Aufnahme in den Dynamin I/II siRNS behandelten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle kommt. Dies spricht für die Vermutung, dass negativ geladene Polystyrol-Nanopartikel über Dynamin-abhängige Wege aufgenommen werden können, aber auch andere Wege in die Zelle nutzen, welche Dynamin-unabhängig sind.

Beispielsweise führt nach Dausend et al. (2008) und dos Santos et al. (2011) die Inhibition von F-Aktin und Mikrotubulin vor allem bei größeren Partikeln zu einer Verminderung der

Aufnahme. Nach Mercer und Helenius (2009) spielt F-Aktin eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Makropinosomen. Es könnte also sein, dass die Partikel über die Makropinozytose aufgenommen werden, die laut Literatur sowohl Dynamin-unabhängig als auch Dynamin-abhängig ist (Iversen et al., 2011; Mulherkar et al., 2011). Zusätzlich ist in der Veröffentlichung von Harush-Frenkel et al. (2007) zu finden, dass die Inhibition der Caveolin- und Clathrin-abhängigen Wege zu einer Stimulation der Makropinosomen führt.

Ein weiterer Aufnahmeweg könnte in diesem Falle über die Tetraspanin-angereicherten Mikrodomänen sein, da dieser Weg nach Spodon et al. (2008) weder Clathrin- noch Caveolin- oder Dynamin-abhängig ist. Des Weiteren sind in der Literatur mögliche Aufnahmewege über Flotillin zu finden. Diese können sowohl Dynamin-abhängig als auch -unabhängig sein und somit auch in den Dynamin I/II herunterregulierten Zellen genutzt worden sein (Sandvig et al., 2011).

Flotillin-1 wird in der Literatur mit der Internalisierung von Glutamatrezeptoren und Dopaminrezeptoren in Verbindung gebracht (Cremona et al., 2011). Zur Rolle von Flotillin in der Aufnahme von Nanopartikeln ist bisher wenig in der Literatur zu finden. Nach Kasper et al. (2013) spielen in der Aufnahme von 30 nm bis 300 nm großen Silica-Nanopartikeln die konventionellen Wege über Clathrin oder Caveolin keine Rolle. Die Partikel wurden in dieser Studie über den Flotillin-Aufnahmeweg internalisiert. Diese Arbeit zeigt, dass die Herunterregulation von Flotillin-1 zu signifikanten Aufnahmeänderungen führte. Die geringe Verminderung der Aufnahme um 13 % zeigt jedoch, dass eine Vielzahl der Nanopartikel dennoch über andere Wege aufgenommen wurden, welche Caveolin-, Clathrin- und Flotillin-1-unabhängig sind.

Die Herunterregulation der Tetraspanine zeigte in dieser Arbeit bei drei der vier Tetraspaninen (CD63, CD9 und CD82) keine signifikante Verminderung oder Zunahme in der Aufnahme der Nanopartikel. Bei der Aufnahmestudie der CD81 herunterregulierten Zellen zeigte sich eine signifikante Verminderung (um 14 %) der Nanopartikelinternalisierung.

In der Literatur findet man zu der Rolle der Tetraspanine in der Endozytose viele Aufnahmestudien mit Viren. Die Untersuchungen von Spodon et al. (2008) ergaben, dass Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen (TEMs) als Plattformen für einen Clathrin-, Caveolin- und Dynamin-unabhängigen Aufnahmeweg für Viren agieren können. Rubinstein et al. (1996) und Nydegger (2006) postulierten, dass die Tetraspanine an der Membranoberfläche miteinander interagieren und nach Deneka et al. (2007), Xu et al. (2009) und Li et al. (2011) stellen diese Tetraspanine Eintrittswege für den humanen Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1) dar. In T-Zellen sind vor allem die Tetraspanine CD81 und CD9 am viralen Eintritt und an der Freisetzung von HIV-1 beteiligt (van Spriel und Figdor, 2010). Pileri und seine Kollegen (1998) demonstrierten, dass die extrazelluläre Schleife von

CD81 mit dem Glycoprotein E2 des Hepatitis C Virus (HCV) interagieren kann und somit einen zellulären Rezeptor für HCV darstellt. Nach Rocha-Perugini et al. (2011) ist CD81 notwendig, aber alleine nicht ausreichend für die Aufnahme des Hepatitis C Virus. Des Weiteren findet man Informationen über die Rolle von CD81 bei Aufnahme von parasitären Sporozoiten, z.B. von *Plasmodium falciparum* (Silvie et al., 2002).

Die Untersuchungen der Tetraspanine in dieser Studie zeigen, dass CD81 eine wichtigere Rolle in der Aufnahme der superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikel als CD9, CD63 und CD82 spielt. In der Literatur wird CD81 als ein wichtiger Parameter bei der Virusaufnahme genannt. Die verwendeten Nanopartikel besaßen eine durchschnittliche Größe von 120 nm, die humanen Immundefizienz Viren Typ 1 eine Größe von 100-120 nm (Campbell und Rein, 1999). Reduziert man die Ergebnisse der Virenaufnahmestudien auf den Größenparameter und wendet diese auf die vorliegenden Ergebnisse der Nanopartikelaufnahme über TEMs an, so bedeutet dies, dass die Nanopartikel unter anderem mit CD81 interagieren. Jedoch ist auch hier zu beachten, dass die Abweichung der Aufnahme nur 14 % beträgt. Dies bedeutet, dass die Polystyrol-Nanopartikel ebenfalls über CD81-unabhängige Wege internalisiert werden.

Ebenfalls veröffentlichte Xu et al. (2009), dass keine Colokalisation zwischen Komponenten der TEMs mit Flotillin besteht. Dies könnte bedeuten, dass die Nanopartikel in den Flotillin-1 siRNS behandelten Zellen eventuell einen Endozytoseweg über die TEMs genommen haben und in den CD81 siRNS behandelten Zellen eventuell einen Weg über Flotillin-1 Domänen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie ergaben, dass die Polystyrol-Nanopartikel keine der untersuchten Proteine und deren Endozytosewege als Hauptaufnahmeweg nutzten, es jedoch zu geringen signifikanten Aufnahmeverringeringen bei den Proteinherunterregulationen von CD81 und Flotillin-1 in HeLa-Zellen kam.

5.2.1 Proteinunabhängige Aufnahmemechanismen

4 °C Versuche von dos Santos et al. (2011) ergaben, dass die Endozytose ein energieabhängiger Prozess der Zelle ist. Dies würde bedeuten, dass die Aufnahme dennoch von Proteinen abhängig ist. Jedoch ergaben die Untersuchungen von Vranic et al. (2013), dass es ebenfalls passive Aufnahmeprozesse gibt, bei denen Nanopartikel auch bei 4 °C aufgenommen werden. Es gibt weitere Literatur zur mechanischen Aufnahme über endozytotisch-unabhängige Wege, wie z.B. in roten Blutkörperchen über starke lokale Membrandeformationen (Rothen-Rutishauser et al., 2006; Zhao et al., 2011). Weitere passive Aufnahmewege wurden von Le Bihan et al. (2009) untersucht, bei denen der Krümmungswinkel der Membran im Verhältnis zu den Nanopartikel eine entscheidende Rolle spielt. Ebenso spielen Bedingungen, wie die Konzentration der Nanopartikel und deren Größe, eine Rolle (Jaskiewicz et al., 2012).

Die vorliegenden Untersuchungen und Vergleiche mit der Literatur führen zu der Annahme, dass die Vielzahl an unterschiedlichen Protein-abhängigen und -unabhängigen Aufnahmewegen von Polystyrol-Nanopartikeln in HeLa-Zellen ein möglicher Grund für die nicht signifikanten Ergebnisse sein könnte. Möglicherweise werden die Partikel gleichzeitig über die verschiedenen Wege aufgenommen, oder gleichwertige Alternativwege genutzt, sobald bestimmte Aufnahmewege herunterreguliert werden (Abbildung 16). Ein weiterer Grund könnte eine zu geringe Protein-Herunterregulation mit der siRNS sein. Die Anwendung der siRNS sollte in Zukunft weiter optimiert werden. Mögliche Ansätze für zukünftige Analysen sind, mehrere Aufnahmewege gleichzeitig in einer Zelle über siRNS herunter zu regulieren und mit diesen Zellen Aufnahmestudien durchzuführen. Damit könnten mögliche „Ausweich“-Wege identifiziert werden. Um nähere Aufnahmewegidentifikationen durchzuführen, ist die Kombination von Ergebnissen unterschiedlicher Herangehensweisen wichtig. Hierbei könnte man die siRNS Ergebnisse mit Experimenten vergleichen, in denen pharmakologische Inhibitoren der jeweiligen Aufnahmewege verwendet werden. Über den Einsatz von Immunfluoreszenz sind mögliche Colokalisationen zwischen Nanopartikeln und Proteinen zu detektieren. Ebenso sind Aufnahmen nicht nur mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop durchzuführen, sondern ebenfalls mit einem Transmissionselektronenmikroskop.

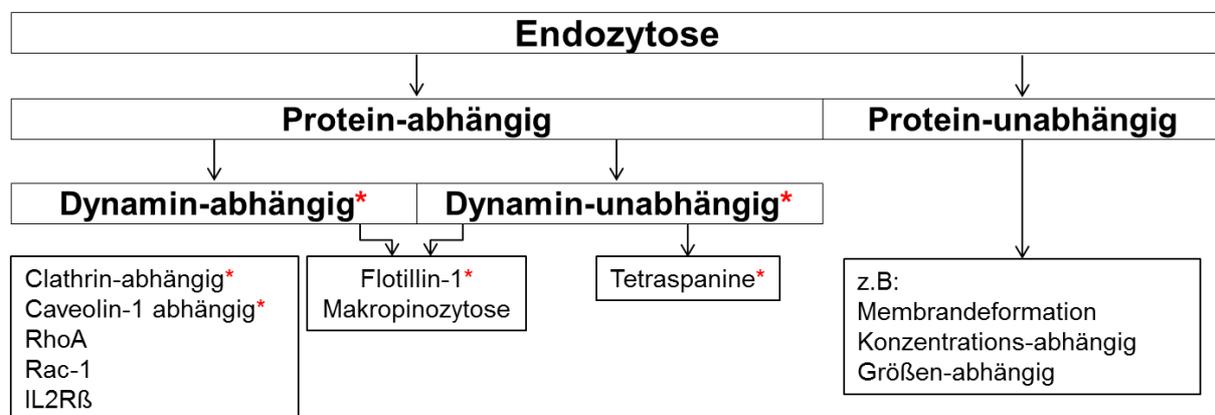


Abbildung 16: schematische Darstellung möglicher Endozytosewege von Nanopartikeln. Zusammengefasst an Hand der Literaturhinweise, die in der Einleitung und in der Diskussion beschrieben sind (*= in dieser Arbeit untersuchte Endozytosewege).

6 Zusammenfassung

Nanopartikel finden immer öfter eine wichtige Anwendung beim Transport von Medikamenten zu bestimmten Zielstrukturen (Soppimath et al., 2001). In der Literatur sind viele Aufnahmestudien mit Nanopartikeln zu finden. Die meisten Studien verwenden Inhibitoren, welche die Aufnahmewege teilweise nur unspezifisch blockieren (Vercauteren et al., 2008). Um eine nicht spezifische Blockierung zu umgehen, wurden in dieser Arbeit shRNS-Konstrukte und siRNS Konstrukte eingesetzt. Diese führen zu einer gezielten Herunterregulation der Proteine (Caplen, 2001). Nach der Herunterregulation der Proteine folgten die Aufnahmestudien der superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikel.

Der Einfluss der Tetraspanine und weiterer Proteine, wie z.B. Caveolin-1 und Dynamin-1, wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Dies erfolgte auf Grund von Literaturhinweisen zur Rolle dieser Proteine in endozytotischen Aufnahmewegen und der Identifikation der Tetraspanine auf Endosomen durch Daniel Hofmann.

Die Ergebnisse zeigen, dass die siRNS induzierte Herunterregulation eine höhere Transfektionseffizienz zeigte als die Herunterregulation mit shRNS-Konstrukten. Die siRNS führte bei allen untersuchten Proteinen zu einer Herunterregulation in den Zellen (34 % - 94 %). Die Nanopartikelenaufnahmestudien zeigten in den transfizierten Zellen bei CD81 und Flotillin-1 signifikante Abweichungen, bezogen auf die Negativkontrolle. CD63, CD82, CD9, Caveolin-1, Clathrin (schwere Kette) und Dynamin-1 zeigten keine signifikanten Aufnahmeabweichungen.

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass in dieser Studie sowohl die spezifische Herunterregulation der Tetraspanine CD9, CD63, und CD82 als auch die Herunterregulation von Caveolin-1, Dynamin-1 und Clathrin (schwere Kette) in HeLa-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme von superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikeln hatte. Bei CD81 und Flotillin-1 wurden Signifikanzen im Bezug zur Aufnahme der Nanopartikel in der Negativkontrolle gefunden. Hierbei kam es jeweils zu einer Verminderung der Aufnahme. Dies spricht für einen Einfluss von CD81 und Flotillin-1 auf die Internalisierung der superparamagnetischen Polystyrol-Nanopartikel.

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.	16
Tabelle 2: Verwendete Geräte.	16
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.	17
Tabelle 4: Verwendete Puffer.	18
Tabelle 5: Verwendete Medien.	18
Tabelle 6: Primäre Antikörper.	19
Tabelle 7: Sekundäre Antikörper.	19
Tabelle 8: Verwendete Kits.	20
Tabelle 9: Eingesetzte Enzyme.	20
Tabelle 10: Bakterien.	20
Tabelle 11: Eingesetzte Primer.	21
Tabelle 12: shRNS Konstrukte der verschiedenen mRNS.	22
Tabelle 13: siRNS der verschiedenen mRNS.	22
Tabelle 14: Reagenzien der Lipofektion.	28
Tabelle 15: Zusammensetzung des Zytomix Puffers.	29
Tabelle 16: Programm für die cDNS-Synthese.	30
Tabelle 17: Programm für die quantitative qRT-PCR.	32

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Darstellung möglicher Endozytosewege.....	11
Abbildung 2: schematische Abbildung der RNS-Interferenz	15
Abbildung 3: Hybridisierungsreaktion anhand des CD63 Oligonukleotids	24
Abbildung 4: Ligation des Vektors mit dem Oligonukleotiden	25
Abbildung 5: pRNAi-Vektor System mit den Restriktionsenzymststellen	27
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines qRT-PCR Amplifikations-Zyklus.....	31
Abbildung 7: Allgemeiner Aufbau der Western Blot-Apparatur.....	36
Abbildung 8: Hybridisierungsreaktion der Oligonukleotide	38
Abbildung 9: 1%-iges Agarosegel des Restriktionsverdau	40
Abbildung 10: Analyse der spezifischen Protein-Herunterregulation.....	42
Abbildung 11: Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion d	44
Abbildung 12: Western Blot-Analyse und Quantifizierung.....	46
Abbildung 13: Kinetikstudie der Nanopartikelaufnahme in HeLa-Zellen.....	47
Abbildung 14: Qualitative Analyse der Nanopartikelaufnahmestudie	49
Abbildung 15: Quantitative Analyse der Nanopartikelaufnahme	50
Abbildung 16: schematische Darstellung möglicher Endozytosewege.....	56

V. Literaturverzeichnis

Aderem, A.; Underhill, D. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17 (1), 593–623.

Ambesajir, A.; Kaushik, A.; Kaushik, J.; Petros, S. (2012). RNA interference: A futuristic tool and its therapeutic applications. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19 (4), 395–403.

Baumann, D. (2012). Nanopartikel und Nanokapseln als potentielle Wirkstofftransportsysteme: Zelluläre Aufnahme in Leukozyten in peripherem Vollblut und in Zellkultur. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Max-Planck Institut für Polymerforschung.

Brüstle, I. (2012). Einfluss unterschiedlicher polymerer Nanopartikel auf das Differenzierungsverhalten von humanen Stammzellen. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Max-Planck Institut für Polymerforschung.

Campbell, S.; Rein, A. (1999). In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain 73 (3), 2270–2279.

Caplen, N. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (17), 9742–9747.

Cremona, M.; Matthies, H.; Pau, K.; Bowton, E.; Speed, N.; Lute, B. et al. (2011). Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT. *Nature Neuroscience* 14 (4), 469–477.

Dalby, B. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33 (2), 95–103.

Dausend, J.; Musyanovych, A.; Dass, M.; Walther, P.; Schrezenmeier, H.; Landfester, K.; Mailänder, V. (2008). Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. *Macromol Biosci* 8 (12), 1135–1143.

Deneka, M.; Pelchen-Matthews, A.; Byland, R.; Ruiz-Mateos, E.; Marsh, M. (2007). In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J. Cell Biol.* 177 (2), 329–341.

Desjardins, M.; Celis, J.; van Meer, G.; Dieplinger, H.; Jahraus, A.; Griffiths, G.; Huber, L. (1994). Molecular characterization of phagosomes 269 (51), 32194–32200.

Doherty, G.; McMahon, H. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78 (1), 857–902.

- dos Santos, T.; Varela, J.; Lynch, I.; Salvati, A.; Dawson, K.; Schnur, J. (2011). Effects of Transport Inhibitors on the Cellular Uptake of Carboxylated Polystyrene Nanoparticles in Different Cell Lines. *PLoS ONE* 6 (9), e24438.
- Duve, C. de (1963). The Lysosome Concept. In: de Reuck, A. V. S und Margrate P. Cameron (Hg.): *Ciba Foundation Symposium - Lysosomes*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd (Novartis Foundation Symposia), 1–35.
- Glebov, O.; Bright, N.; Nichols, B. (2005). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8 (1), 46–54.
- Goebel, W.; Schieß, W. (1975). The fate of a bacterial plasmid in mammalian cells. *Molec. Gen. Genet.* 138 (3), 213–223.
- Goldstein, J.; Anderson, R.; Brown, M. (1979). Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279 (5715), 679–685.
- Hans, M.; Lowman, A. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting (6), 319–327.
- Hanson, P.; Cashikar, A. (2012). Multivesicular Body Morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28 (1), 337–362.
- Harush-Frenkel, O.; Debotton, N.; Benita, S.; Altschuler, Y. (2007). Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353 (1), 26–32.
- Herskovits, J. (1993). Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *The Journal of Cell Biology* 122 (3), 565–578.
- Hoff, M., van den; Christoffels, V.; Labruyère, W.; Moorman, A.; Lamers, W. (1995). Electrotransfection with "Intracellular" Buffer. In: Jac A. Nickoloff (Hg.): *Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols*, Bd. 48. New Jersey: Humana Press, 185–198.
- Hofmann, D. (2011). Characterization of B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia. Masterarbeit, Freiburg. Max-Planck Institut für Immunologie und Epigenetik.
- Hofmann, D.; Mailänder, V. (2013). Pharmacology of nanocarriers on the microscale: importance of uptake mechanisms and intracellular trafficking for efficient drug delivery. *Nanomedicine* 8 (3), 321–323.
- Iversen, T.; Frerker, N.; Sandvig, K. (2012). Uptake of ricinB-quantum dot nanoparticles by a macropinocytosis-like mechanism. *J Nanobiotechnol* 10 (1), 33.
- Iversen, T.-G.; Skotland, T.; Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* 6 (2), 176–185.

- Jaskiewicz, K.; Larsen, A.; Lieberwirth, I.; Koynov, K.; Meier, W.; Fytas, G. et al. (2012). Probing Bioinspired Transport of Nanoparticles into Polymersomes. *Angew. Chem.* 124 (19), 4691–4695.
- Kasper, J.; Hermanns, M.; Bantz, C.; Utech, S.; Koshkina, O.; Maskos, M. et al. (2013). Flotillin-involved uptake of silica nanoparticles and responses of an alveolar-capillary barrier in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84 (2), 275–287.
- Kittler, R.; Putz, G.; Pelletier, L.; Poser, I.; Heninger, A.-K.; Drechsel, D. et al. (2004). An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432 (7020), 1036–1040.
- Kokubo, H.; Helms, J.; Ohno-Iwashita, Y.; Shimada, Y.; Horikoshi, Y.; Yamaguchi, H. (2003). Ultrastructural localization of flotillin-1 to cholesterol-rich membrane microdomains, rafts, in rat brain tissue. *Brain Research* 965 (1-2), 83–90.
- Le Bihan, O.; Bonnafous, P.; Marak, L.; Bickel, T.; Tréput, S.; Mornet, S. et al. (2009). Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome. *Journal of Structural Biology* 168 (3), 419–425.
- Lee, Y.; Kim, M.; Han, J.; Yeom, K.-H.; Lee, S.; Baek, S.; Kim, V. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23 (20), 4051–4060.
- Li, G.; Dziuba, N.; Friedrich, B.; Murray, J.; Ferguson, M. (2011). A post-entry role for CD63 in early HIV-1 replication. *Virology* 412 (2), 315–324.
- Liu, Y.-W.; Surka, M.; Schroeter, T.; Lukiyanchuk, V.; Schmid, S. (2008). Isoform and Splice-Variant Specific Functions of Dynamin-2 Revealed by Analysis of Conditional Knock-Out Cells. *Molecular Biology of the Cell* 19 (12), 5347–5359.
- Lorenz, M.; Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment 58 (3), 563–602.
- Lynch, I.; Dawson, K.; (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 3 (1-2), 40–47.
- Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Urlaub, H.; Lührmann, R.; Tuschl, T. (2002). Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. *Cell* 110 (5), 563–574.
- Meister, G.; Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431 (7006), 343–349.
- Mercer, J.; Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* 11 (5), 510–520.
- Merrifield, C.; Feldman, M.; Wan, L.; Almers, W. (2002). Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat. Cell Biol.* 4 (9), 691–698.

- Miyawaki-Shimizu, K. (2005). siRNA-induced caveolin-1 knockdown in mice increases lung vascular permeability via the junctional pathway. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (2), L405.
- Motley, A. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *The Journal of Cell Biology* 162 (5), 909–918.
- Mukherjee, S.; Ghosh, R.; Maxfield, F. (1997). *Endocytosis* 77 (3), 759–803.
- Mulherkar, N.; Raaben, M.; de la Torre, Juan Carlos; Whelan, S.; Chandran, K. (2011). The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway. *Virology* 419 (2), 72–83.
- Nabi, I.; Le, P. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *The Journal of Cell Biology* 161 (4), 673–677.
- Nichols, B.; Lippincott-Schwartz, J. (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends in Cell Biology* 11 (10), 406–412.
- Nydegger, S. (2006). Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *The Journal of Cell Biology* 173 (5), 795–807.
- Paddison, P. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes and Development* 16 (8), 948–958.
- Parton, R.; Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (3), 185–194.
- Pfaffl M. (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung (10), 92–95.
- Pileri, P.; Uematsu, Y.; Campagnoli, S.; Galli, G.; Falugi, F.; Petracca, R. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81 282 (5390), 938–941.
- Pileri, P.; Uematsu, Y.; Campagnoli, S.; Galli, G.; Falugi, F.; Petracca, R. et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81 282 (5390), 938–941.
- Pols, M.; Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research* 315 (9), 1584–1592.
- Potter, H.; Heller, R. (2001). Transfection by Electroporation. In: Jacqueline N. Crawley, Charles R. Gerfen, Michael A. Rogawski, David R. Sibley, Phil Skolnick und Susan Wray (Hg.): *Current Protocols in Neuroscience*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Pushparaj, P.; Aarthi, J.; Manikandan, J.; Kumar, S. (2008). siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo Applications. *Journal of Dental Research* 87 (11), 992–1003.

- Rand, T.; Petersen, S.; Du, F.; Wang, X. (2005). Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. *Cell* 123 (4), 621–629.
- Rao, D.; Vorhies, J.; Senzer, N.; Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (9), 746–759.
- Rocha-Perugini, V.; Lavie, M.; Delgrange, D.; Canton, J.; Pillez, A.; Potel, J. et al. (2009). The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC Microbiol* 9 (1), 111.
- Rothen-Rutishauser, B.; Schürch, S.; Haenni, B.; Kapp, N.; Gehr, P. (2006). Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques. *Environ. Sci. Technol.* 40 (14), 4353–4359.
- Rubinstein, E.; Le Naour, F.; Lagaudrière-Gesbert, C.; Billard, M.; Conjeaud, H.; Boucheix, C. (1996). CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur. J. Immunol.* 26 (11), 2657–2665.
- Sandvig, K.; Pust, S.; Skotland, T.; van Deurs, B. (2011). Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Current Opinion in Cell Biology* 23 (4), 413–420.
- Silvie, O.; Rubinstein, E.; Franetich, J.-F.; Prenant, M.; Belnoue, E.; Rénia, L. et al. (2002). Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat Med* 9 (1), 93–96.
- Soppimath, K.; Aminabhavi, T.; Kulkarni, A.; Rudzinski, W. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices 70 (1-2), 1–20.
- Spoden, G.; Freitag, K.; Husmann, M.; Boller, K.; Sapp, M.; Lambert, C. et al. (2008). Clathrin- and Caveolin-Independent Entry of Human Papillomavirus Type 16—Involvement of Tetraspanin-Enriched Microdomains (TEMs). *PLoS ONE* 3 (10).
- Tomari, Y. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes and Development* 19 (5), 517–529.
- Treuel, L.; Jiang, X.; Nienhaus, G. (2013). New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *J R Soc Interface* 10 (82), 20120939.
- Ui-Tei, K. (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Research* 32 (3), 936–948.
- van Sriel, Annemiek B; Figdor, C. (2010). The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect.* 12 (2), 106–112.
- van Sriel, Annemiek B; Figdor, C. (2010). The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect.* 12 (2), 106–112.

- Vercauteren, D.; Deschout, H.; Remaut, K.; Engbersen, Johan F J; Jones, A.; Demeester, J. et al. (2011). Dynamic colocalization microscopy to characterize intracellular trafficking of nanomedicines. *ACS Nano* 5 (10), 7874–7884.
- Vercauteren, D.; Vandenbroucke, R.; Demeester, J.; Smedt, S. de; Braeckmans, K.; Sanders, N. (2008). The use of endocytic inhibitors to study uptake of gene carriers. *Journal of Controlled Release* 132 (3), e17.
- Vranic, S.; Boggetto, N.; Contremoulins, V.; Mornet, S.; Reinhardt, N.; Marano, F. et al. (2013). Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part Fibre Toxicol* 10 (1), 2.
- Whitehead, K.; Langer, R.; Anderson, D. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 8 (2), 129–138.
- Xu, C.; Zhang, Y.; Thangavel, M.; Richardson, M.; Liu, L.; Zhou, B. et al. (2009). CD82 endocytosis and cholesterol-dependent reorganization of tetraspanin webs and lipid rafts. *The FASEB Journal* 23 (10), 3273–3288.
- Yáñez-Mó, M.; Barreiro, O.; Gordon-Alonso, M.; Sala-Valdés, M.; Sánchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in Cell Biology* 19 (9), 434–446.
- Yi, R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development* 17 (24), 3011–3016.
- Zamore, P.; Tuschl, T.; Sharp, P.; Bartel, D. (2000). RNAi. *Cell* 101 (1), 25–33.
- Zhang, S.; Li, J.; Lykotrafitis, G.; Bao, G.; Suresh, S. (2009). Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv. Mater.* 21 (4), 419–424.
- Zhao, Y.; Sun, X.; Zhang, G.; Trewyn, B.; Slowing, I.; Lin, V. (2011). Interaction of Mesoporous Silica Nanoparticles with Human Red Blood Cell Membranes: Size and Surface Effects. *ACS Nano* 5 (2), 1366–1375.

Eidesstattliche Erklärung

7 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit

**Herunterregulation von Endozytose beteiligten Proteinen
und deren Einfluss auf die Aufnahme von polymeren Nanopartikeln**

selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Die Arbeit wurde noch nicht in einem anderen Studiengang als Prüfungsleistung verwendet.

Frankfurt am Main, den 10.09.2013

Simone-Franziska Glaser