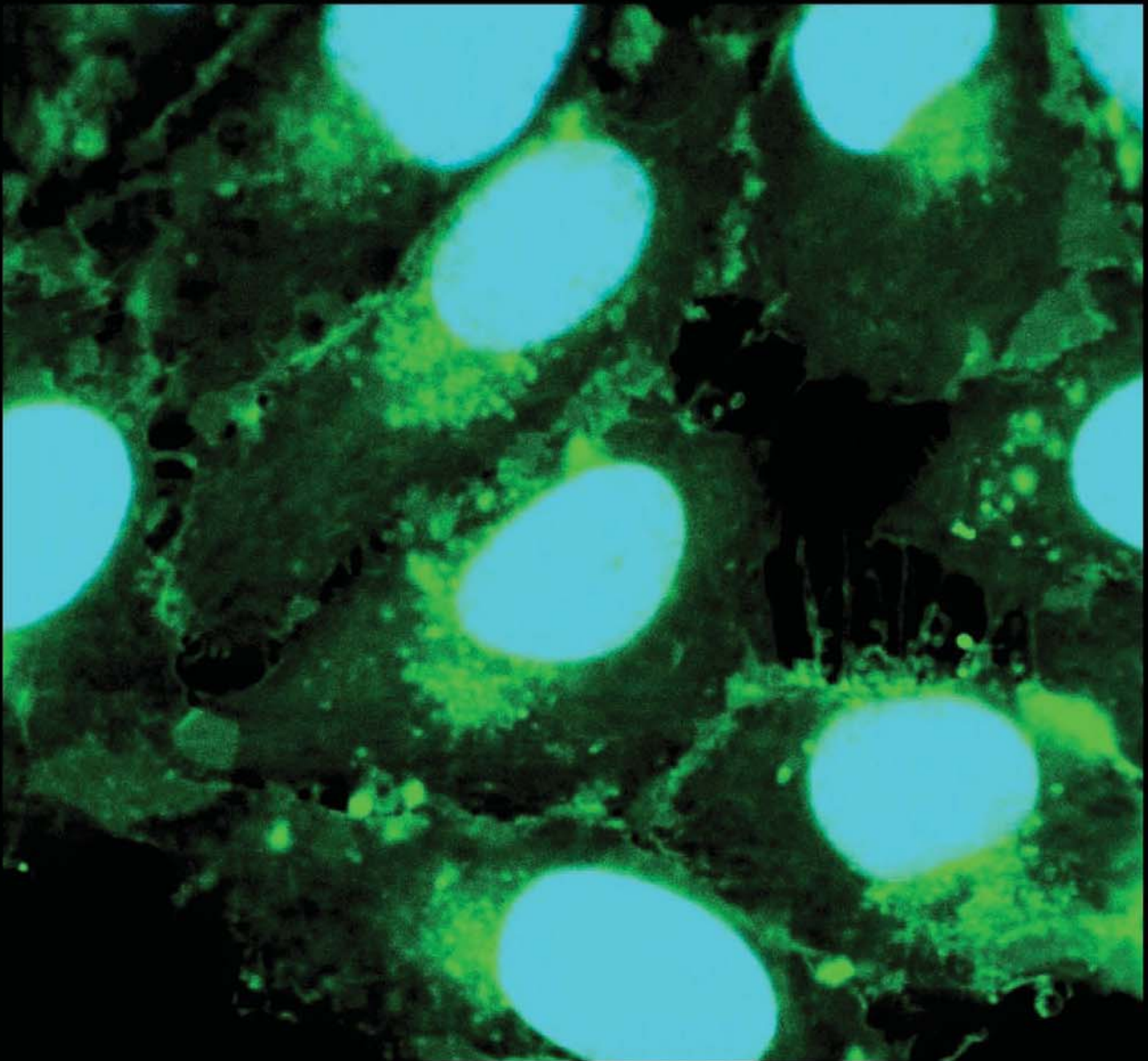




Larissa Kaufmann

Untersuchung der
Glykostrukturtopologie bei Tumor- und
Primärzelllinien



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Untersuchung der Glykostrukturtopologie bei Tumor- und Primärzelllinien





Untersuchung der Glykostrukturtopologie bei Tumor- und Primärzelllinien

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) - Universitätsbereich
angenommene

Dissertation

von
Dipl.-Biol. Larissa Kaufmann
aus
Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. M. Bastmeyer
Referent: Priv.-Doz. Dr. U. Schepers
Korreferent: Prof. Dr. Burkhard Luy

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2012



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2012

Zugl.: Karlsruhe (KIT), Univ., Diss., 2012

978-3-95404-187-9

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2012

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2012

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-95404-187-9



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Priv.-Doz. Dr. Ute Schepers vom 01. November 2009 bis zum 31. Mai 2012 am Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie, durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Burkhard Luy danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt habe und alle Quellen aufzeige. Sinngemäße oder wörtliche Übernahmen fremden Gedankenguts sind nach bestem Willen als solches gekennzeichnet.

Karlsruhe, im Juli 2012

Larissa Kaufmann

Titelbild: Aufnahme von der HeLa wt Zelllinie, behandelt mit Ac₄ManNAz (peracetyliertes Azidomannosamin) und markiert mit FITC-gekoppeltem Cyclooctin (Click-Reagenz; in grün). Zellkernfärbung (in blau) mit Hoechst 33342 (Invitrogen). Aufgenommen mit SP5 Tandem Konfokalmikroskop (Leica).





Für meine Eltern Carl und Sabine Kaufmann
und für meine Großmutter Hildegard Kowallik
Danke

Falls Gott die Welt geschaffen hat, war seine Hauptsorge sicher
nicht sie so zu machen, dass wir sie verstehen können.

(Albert Einstein)

Es kommt nicht darauf an mit dem Kopf durch die Wand zu rennen,
sondern mit den Augen die Tür zu finden.

(Werner von Siemens)





Danksagung

Ein ganz großer Dank gilt meiner Mutter Sabine Kaufmann, die mich immer auf jede Art und Weise unterstützt hat. Und meinem Vater, Carl Kaufmann, der mir beigestanden hat.

Danke an meinen Freund Robert Reißmann für die Unterstützung! Ein großer Dank gilt meiner Großmutter Hildegard Kowallik und meiner Tante Ilona Krüger, sowie Arthur Krüger.

Ute Schepers und Stefan Bräse danke ich für die tolle Unterstützung während meiner Doktorarbeit und dafür, dass sie es mir ermöglicht haben die Doktorarbeit in dieser Form durchzuführen.

Danke unseren Kollaborationspartnern Urban Liebel für die Mikroskopie des Hochdurchsatzscreens, Jochen Gering für die Hilfe am Weitfeldmikroskop, und Markus Reischl für die Hilfe bei der Bildauswertung und der statistischen Auswertung. Der chemischen Arbeitsgruppe von Stefan Bräse gilt der Dank, besonders: Katarzyna Koroniak für die Synthese der Zucker und Tobias Hagendorn für die Synthese der Click-Reagenzien. Emanuel Bourcet danke ich für die Synthese der Plakoteninderivate. Ester Birtalan für die Synthese der Peptide. Der gesamten biochemischen Schepers-Arbeitsgruppe Dankeschön für ihre Unterstützung: Christin Bednarek, Judith Bender, Konstantin Demir, Olga Dürr, Christoph Grün, Isabella Hebeiß. Elena Heidenreich danke ich für die tatkräftige Unterstützung in den letzten Monaten der Laborarbeit, Judith Bender für die Korrektur. Wilko Thiele für die Hilfe beim FACS. Dem Institut für Toxikologie und Genetik, das mit seinen Mitarbeitern und seiner Ausrüstung diese Arbeit auch ermöglicht hat. Den Mitgliedern meines TAC (thesis advisory comittee) Jonathan Sleeman, Andrew Cato, Stefan Bräse und Ute Schepers für anregende und hilfreiche Diskussionen. Herrn Wolfgang Wentz danke ich für die finanzielle Unterstützung; der FAZIT Stiftung für den Reisekostenzuschuss für meine Chinareise im Rahmen der Doktorarbeit.





Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	3
2	Einleitung	4
2.1	Die Glykokalyx der Zelloberfläche	4
2.1.1	Glykoproteine	5
2.1.2	Proteoglykane	7
2.1.3	Glykolipide	11
2.2	Weitere Aufgaben der Glykokalyx	12
2.3	Salvage Pathway	17
2.4	Das Mapping der Proteoglykane (Methodik)	18
2.4.1	Click Chemie und Biologie	18
3	Ziel der Arbeit	24
4	Ergebnisse	24
4.1	Glykolabeling auf Zellen mit FITC-gekoppeltem Click-Reagenz (ClickFITC)	24
4.1.1	Inkubation mit Azido- Zucker und ClickFITC bei HeLa wt-Zellen	24
4.1.2	Das Mapping der Zuckerstrukturen bei verschiedenen Zelllinien	27
4.1.3	Unterschiedliche Konzentrationen und Inkubationszeiten	40
4.1.4	Zuckerlabeling bei der Stammzelllinie GNE-SC	49
4.1.5	Zuckeraufnahme/ Labeling mit fixierten Zellen	51
4.2	Biologische Verträglichkeit der Zucker und von ClickFITC: MTT-Test, FACS und Western Blots	69
4.2.1	MTT-Tests	69
4.2.2	FACS (Durchflusszytometrie)	74
4.2.3	Test auf Caspase-8 Spaltung (Apoptose)	77
4.3	Entwicklung des Hochdurchsatzverfahrens	80
4.3.1	Einfriertechnik	80
4.3.2	Mikroskopie Hochdurchsatz	82
4.4	Parallele Inkubation mit Peptoiden	84
4.5	Inkubation von L1210-Zellen mit Plakoteninderivaten	88
5	Diskussion	104
5.1	Plakoteninderivate	109
6	Experimenteller Teil	110
6.1	Zellkultur	110
6.1.1	Tumor- und Primärzelllinien	110



6.1.2	Stammzellen	110
6.1.3	Zellen Einfrieren und Auftauen	110
6.2	Fluoreszenzlabeling der Zucker (kupferfreie Clickreaktion) bei lebenden Zellen	111
6.2.1	Cyclooctin und Hochdurchsatzprotokoll	111
6.2.2	Diyn	112
6.3	Färbung der Zucker mit ClickIT (Invitrogen)	112
6.4	Hoechst Färbung	113
6.5	Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd	113
6.6	Phaloidinfärbung	113
6.7	Western Blot	114
6.7.1	Isolation der Proteine	114
6.7.2	SDS-PAGE- Gel und Blotting	114
6.7.3	Strippen der Membran	116
6.8	FACS (Fluorescence activated cell sorter)	116
6.9	RT-PCR	117
6.10	MTT-Test	121
6.11	Statistische Auswertung	122
7	Materialverzeichnis	122
7.1	Zelllinien	122
7.2	Zellmedien	125
7.3	Material und Reagenzien	127
7.4	Mikroskope	129
7.4.1	Abbildungseinstellungen	129
8	Abkürzungsverzeichnis	132
9	Literatur	135
10	Lebenslauf	145
11	Manuskripte	147



1 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass polykationische Transporter auf der Zelloberfläche mit Proteoglykanen interagieren. Diese binden die Transporter (z.B. Peptide) an die Zellmembran und sorgen damit für deren Endozytose. Erste Studien zeigen dass eine spezifische Interaktion von der Zusammensetzung der Zuckerstrukturen abzuhängen scheint. Im Zuge der Arbeit sollte eine Kartierung der Proteoglykane von verschiedenen Zelltypen erarbeitet und die biologischen Eigenschaften untersucht werden, so dass sich zukünftige Interaktionen mit bestimmten polykationischen Verbindungen wie z.B. polykationischen Wirkstofftransportern voraussagen lassen. Dabei wurden bioorthogonal markierte Zuckermomere, wie z.B. das Azidgruppen-enhaltenen *N*-Azidoglukosamin, *N*-Azidomannosamin und *N*-Azidogalaktosamin gefüttert und metabolisiert. Die in die extrazelluläre Glykokalyx eingebauten Zucker wurden anschließend mit Hilfe einer bioorthogonalen Kupplungsreaktion, der sogenannten Click-Reaktion, mit einem Fluorophor gekuppelten Cyclooctin, detektiert und konnten somit mit Hilfe mikroskopischer Techniken sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe eines Hochdurchsatzscreens wurden die Proteoglykan-Signaturen verschiedener Zellen detektiert und topologisiert. Toxikologische Tests ergaben eine gute Verträglichkeit der Zucker und der Cyclooctine. Um diese Topologisierung vieler Zellen in einem Hochdurchsatzscreen zu etablieren, wurde ein spezielles Einfrierverfahren der Zellen im 96-well Format entwickelt. In einem ersten Hochdurchsatzscreen wurden verschiedene Zelllinien auf die entsprechende Zuckerpräsentation auf der Zelloberfläche getestet und der Zuckereinbau mit Hilfe einer speziell für dieses Verfahren und diese Fragestellung entwickelten Software quantifiziert. Erste Kolokalisationsstudien mit polykationischen Transportern wurden ebenfalls durchgeführt und ausgewertet. Getestet wurden auch Chemotherapeutika, deren Interaktion mit der Glykokalyx noch nicht bekannt ist. Diese waren Derivate des Plakotenins.





1.2 Abstract

So far, it is known that most of the polycationic and amphiphilic drug delivery systems such as cell penetrating peptides (CPPs) or their mimicking cell penetrating peptoids (CPPos) interact in a first contact with proteoglycans of the cell membrane, which present their anionic sugar moieties towards the extracellular space. They capture the peptoid molecules, tether them close to the membrane to facilitate either endocytosis or membrane penetration. However, the interaction is dependent of the composition of the different surface proteoglycans. We now established a High Throughput Screen (HTS) to map the composition of the proteoglycans of different cell types in a cell line library and explore their biological properties to characterize their physiological meaning during CPPo uptake. For this approach synthetic sugars like azidoglucosamine, azidomannosamine and azidogalactosamine, which are linked to proteins and lipids and are exposed towards the extracellular glycocalyx, can be made visible by fluorophore coupled Click reagents via HTS-fluorescence microscopy. For this approach we developed a special protocol for freezing cell line libraries in the 96-well format. In HTS-colocalization studies we correlated the uptake of CPPos with the decoration of sugars at the plasma membrane. Image analysis was done with for this study developed software. First Colocalization studies with polycationic transporters were performed. In further studies we aim to correlate these results with the in vivo tissue targeting in animals. Chemotherapeutics with unknown Glykokalyx interactions were tested. These were derivatives of Plakotenin.

2 Einleitung

Kohlenhydrate haben in der Zelle und im Organismus der Vertebraten unterschiedliche Aufgaben, sei es als Energiespeicher (Glykogen) oder als Grundbaustein der DNS (Desoxyribonukleinsäure). Sie sind außerdem bei Eukaryonten mit Lipiden und Proteinen verbunden, die in der Glykokalyx der Zelle angereichert sind, wo sie eine Rolle bei der Zellerkennung spielen (Abb.2.1). Sie können aber auch Strukturformer bei der Zellwand von Pflanzen (Cellulose) oder Bakterien (gram negative Bakterien besitzen Lipopolisaccharide auf ihrer Oberfläche) (Hagge et al. 2006) sein. Gram negative Bakterien haben ebenfalls eine dicke Zuckerschicht, die für sie Schutz und Anhaftungshilfe ist (Mayberry-Carson et al. 1984). Die Glykokalyx, ein Zuckergerüst an der Zelloberfläche, bestimmt die Zelloberflächenbeschaffenheit der Zelle, die sehr wichtig für die Erkennung lebenswichtiger Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, andere Zellen, Proteine, Botenstoffe oder Pathogene ist. Sie besteht aus unterschiedlichen Zuckerstrukturen, die mit membranverankerten Proteinen oder Lipiden verlinkt sind (Paulson 1989). Neben den normalen Proteinrezeptoren können diese Strukturen auch rezeptorähnliche Funktionen übernehmen und auch selbst als Ligand agieren.

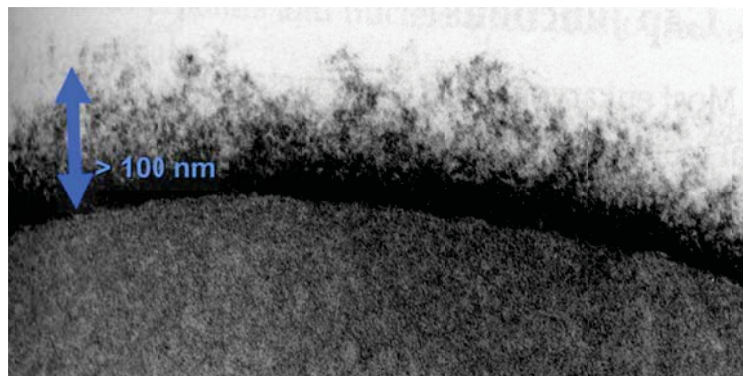


Abbildung 2.1 | TEM Bild der Glykokalyx

2.1 Die Glykokalyx der Zelloberfläche

Man unterscheidet bei den Glykanen zwischen zwei Arten: Den *N*-gebundenen Glykanen, die ein Glukosamin an einem Asparagin des Proteins assoziieren und die *O*-gebundenen, auch Mucin-artig genannt (Chen et al. 2008), die ein Galaktosamin an die OH-Gruppe von Serin oder Threonin anlagern (Voet and Voet 2004) (Abb.2.2). Die *O*-gebundenen Glykane kommen in dem Schleim unterschiedlicher Organismen vor, daher der Name (*mucus*: lat. Schleim).

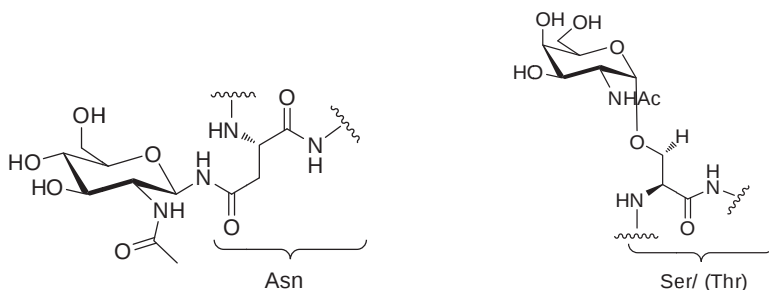


Abbildung 2.2| A, *N*-gebundenes Glykan

B, *O*-gebundenes Glykan (auch: Mucin-artig)



Es wird zwischen Proteoglykanen, mit den oben beschriebenen langkettigen, sulfatierten Polysacchariden und Glykoproteinen, mit verzweigtkettigen Zuckerstrukturen, unterschieden. Die Glykoproteine sind im Vergleich zu den Proteoglykanen verzweigtkettiger aufgebaut und haben weniger Sulfatreste. Die dritte große Gruppe bilden die Glykolipide, mit Lipidanker. Die Kontrolle über die Expression der Glykostrukturen erfolgt posttranskriptional durch die Expression von beispielsweise Glykosyltransferasen und posttranslational in ER und Golgi-Apparat (Ohtsubo and Marth 2006). Die Polypeptidkette wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat durch enzymatische Reaktionen posttranslational prozessiert.

2.1.1 Glykoproteine

Die Synthese der verzweigtkettigen Zucker startet im ER (Abb.2.3). Dafür ist das Molekül Dolichol entscheidend, welches mit seinen lipophilen Isopreneinheiten in der ER-Membran verankert ist und auf cytosolischer Seite zwei Phosphatreste bindet (Voet and Voet 2004; Sharon and Spiegel 1993). Es gibt für jede Zuckeraddition an die Kette eine eigene Glykosyl- oder eben Mannosyltransferase. Dabei wird zunächst außen an der ER-Membran Dolicholdiphosphat hydrolysiert und an das so entstandene Dolicholmonophosphat werden zwei *N*-Acetylglukosamineinheiten angehängt (aktiviert durch UDP), des weiteren fünf Mannose-Einheiten (aktiviert durch GDP). Dann folgt ein Schritt, dessen Mechanismus unbekannt ist: Die Translokation des Dolichol-PP-Oligosaccharids von der cytosolischen Seite in das Lumen (Jessell et al. 1990; Cummings 2009). Mit diesem Mechanismus werden auch neue, an Dolicholmonophosphat gebundene Zucker in das Lumen geschleust, wo sie dann an die bereits bestehende Zuckerkette addiert werden. Zunächst transferieren Mannosyltransferasen vier weitere Mannosereste, dann erfolgt die Anlagerung von drei Glucoseresten. Zuletzt wird die Kette an ein Protein gebunden, dass durch die Anlagerung eines Ribosoms in das ER-Lumen translatiert wurde. Die enzymatische Reaktion von Oligosaccharidtransferasen basiert auf einer Struktur im Zielprotein, bei der Asparagin durch seine Amidgruppe mit der Hydroxylgruppe eines Threonins eine Wasserstoffbrücke ausbildet (bei *N*-gebundenen Glykoproteinen). Die Amidgruppe nimmt als Nucleophil die Oligosaccharidkette auf. Das wird von einem basischen Rest der Oligosaccharidtransferase katalysiert. Diese Reaktion kann durch ein Epoxyethyl-Glycin in der Proteinkette unterbunden werden, das die Base des Enzyms kovalent bindet und damit das Enzym blockiert. Bevor das Glykoprotein an den Golgi Apparat weitergeleitet wird, muss seine Proteineinheit im ER richtig gefaltet werden. Das geschieht durch den Calnexin/Calregulin- Zyklus, der mit dem Abbau von zwei Glucoseresten durch α -Glukosidase I und II beginnt. Das membrangebundene Calnexin (CNX) und das im Lumen befindliche Calregulin (CRT), beide Lektine, sind in der Lage das ungefaltete Glykoprotein so zu binden, dass die Proteinfaltung erlaubt ist und es nicht zum verfrühten Transport zu dem Golgi Apparat oder zur Degradation kommt. Löst sich das Protein zu früh, so sind beide Lektine in der Lage, es nochmals zu glykosilieren und wieder zu binden. Ebenso ist an CNX und CRT die Thioloxydoreduktase ERp57 assoziiert, die den korrekten Einbau von Disulfidbrücken katalysiert.

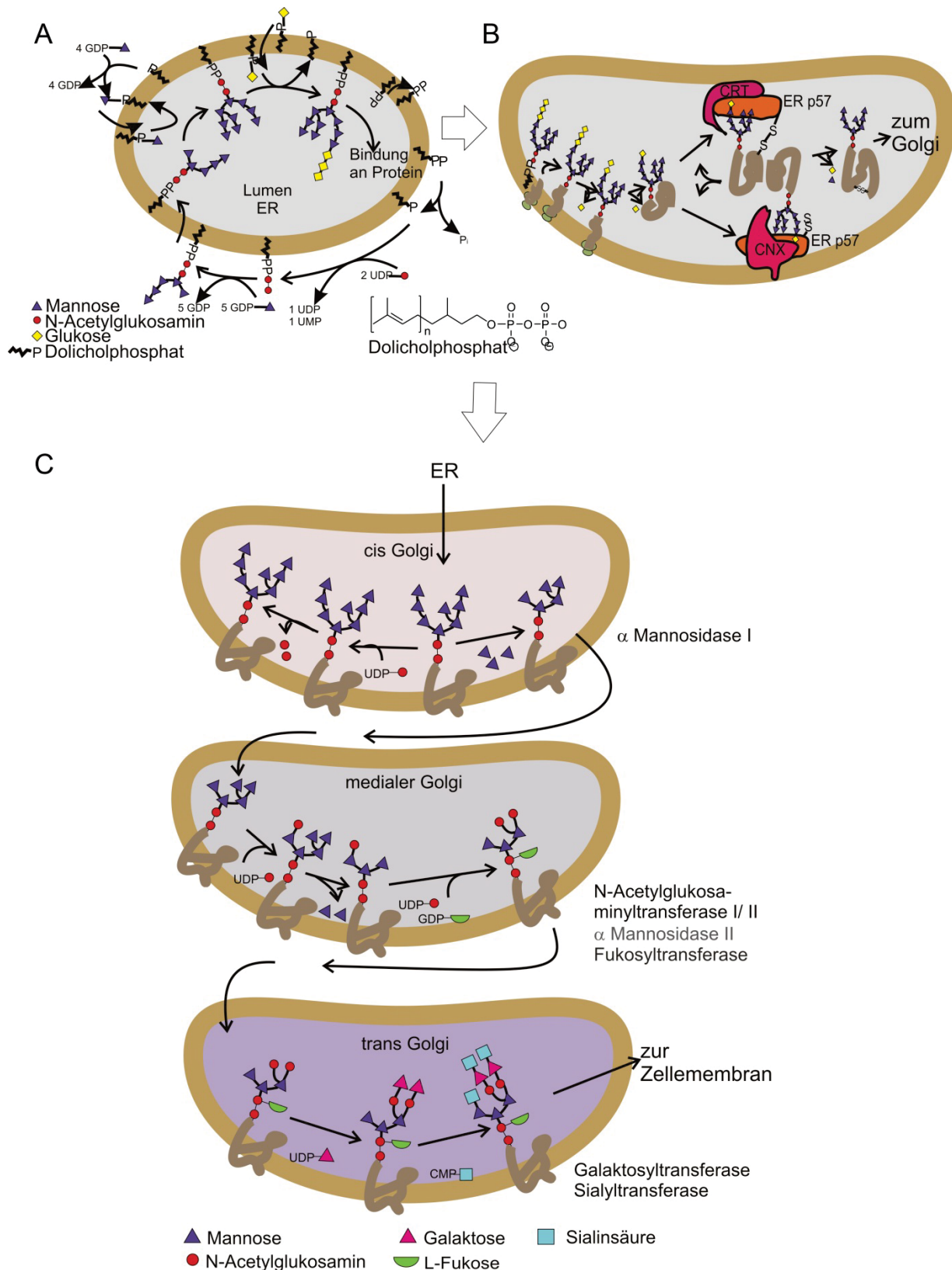


Abbildung 2.3 | Glykoproteinsynthese (nach (Voet and Voet 2004)) A, Der Aufbau von Glykoproteinen im ER erfolgt zunächst über die Bindung von Dolicholiphosphat B, Vor dem Transport zu dem Golgi-Apparat durchlaufen die Glykoproteine den sogenannten Calnexin/Calregulin-Zyklus: Bevor das Protein das ER verlässt, kann es durch Calnexin und Calregulin gebunden werden. Diese beiden Lektine binden ERp57, eine Thioloxidoreduktase, die die Disulfidbrückenbindung erleichtert. C, Glykoproteinaufbau im Golgi Apparat.



Sobald das Protein richtig gefaltet ist und eine α -1,2-Mannosidase einen Mannoserest entfernt hat, erfolgt der vesikuläre Transport zu dem Golgi-Apparat. Dieser gliedert sich in *cis*- medialer- und *trans*-Golgi. In dem *cis*-Golgi Bereich ist die α -Mannosidase aktiv, welche zunächst einen Mannoserest abbaut. Der Transport zum medialen und *trans*- Golgi erfolgt vesikulär. Im medialen Golgi kann *N*-Acetylglukosamin (*N*-acetylglukosamintransferase I und II) oder Fukose (Fukosyltransferase) addiert werden. Im *trans*-Golgi erfolgt die Anlagerung von Fukose, Galaktose (Galaktosyltransferase) und Sialinsäure (Sialyltransferase) (Iozzo 1998; Jessell et al. 1990). Glykoproteine, die in Lysosomen abgebaut werden sollen, erhalten bereits im *cis*- Golgi *N*-Acetylglukosaminphosphatreste (*N*-Acetylglukosaminphosphotransferase) und schließlich Phosphatreste (α -*N*-Acetylglukosaminidase). Mittels Exozytose gelangen die fertig prozessierten Glykoproteine dann an die Zelloberfläche (Abb.2.3,C). Durch die unterschiedlichen Prozessierungsmöglichkeiten im medialen- und *trans*-Golgi, erreichen die Glykoproteine eine sehr hohe Diversität.

Deren Oligosaccharide werden in drei Gruppen unterteilt:

- 1.Oligosaccharide mit viel Mannose, sie besitzen zwei bis neun Mannosereste
- 2.Komplexe Oligosaccharide, mit viel Galaktosamin, Sialinsäure und Fukose
- 3.Hybrid-Oligosaccharide, die viel Mannose und auch Fukose, Sialinsäure (Abb.2.4) und Galaktosamin besitzen

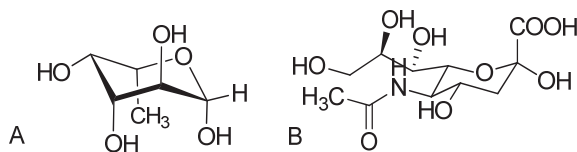


Abbildung 2.4 | A, Fukose B, Sialinsäure (auch: Neuraminsäure genannt)

Glykoproteine spielen in der Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle, da sie Erkennungsmoleküle für die Zell-Zell Interaktion binden. Ein prominentes Beispiel ist NCAM (Neural-cell-adhesion-molecule) und dessen Adhäsion zu Sialinsäure (Drake et al. 2008). Migration, Cytokin-Antwort und Differenzierung sind davon abhängig.

2.1.2 Proteoglykane

Proteoglykane (PGs) bestehen aus einem die Zellmembran durchspannenden Proteinrückgrat und den sogenannten anionischen Glykosaminoglykanen. Diese sind eine Form der komplexen Kohlenhydrate, die ihrerseits meist aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten bestehen, an die eine Aminogruppe gebunden ist (Weis 1997). Mindestens ein Kohlenhydrat besitzt eine negativ geladene Carboxyl- oder Sulfat-Gruppe. Zusammen mit einem Zellmembran-durchspannenden Proteinrückgrad bilden die Glykosaminoglykane, die auch als Gleitmittel in Gelenken oder als Strukturbestandteil des Bindegewebes vorkommen, die Glykokalyx. Aufgrund der Carboxylat- und Sulfatgruppen sind sowohl die Glykosaminoglykane als auch die durch sie modifizierten Proteoglykane stark negativ geladen und können elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Interaktionspartnern eingehen (Hacker et al. 2005). Diese setzen sich aus bis zu 1000