



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Lectin-mediated targeting strategies for drug delivery
to cultured bladder epithelial cells“

Verfasserin

Agnes Zidar

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuer: a.o. Univ.- Prof. Mag. Dr. Michael Wirth

DANKSAGUNG

„Herzliches Dankeschön“

UNIV.- PROF. MAG. DR. MICHAEL WIRTH

... für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie zu schreiben, für das sehr interessante Thema sowie für die Hilfeleistung bei zahlreichen Fragestellungen.

„Herzliches Dankeschön“

UNIV.- PROF. MAG. DR. FRANZ GABOR

... für die Begleitung und Unterstützung während meiner Diplomarbeit und die liebevolle Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

„Herzliches Dankeschön“

MAG. LUKAS NEUTSCH

... für die umfangreiche Betreuung während meiner gesamten Diplomarbeit. Vielen Dank für die Motivation und Faszination, die du an mich weitergegeben hast.

„Herzliches Dankeschön“

MAG. DR. CHRISTIAN FILLAFER

... für alle Ratschläge während der Nanopartikelversuche und besonders für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

„Herzliches Dankeschön“

MAG. DR. VERENA PLATTNER

... für die Einführung in mein Diplomarbeitsthema und alle Geräteeinschulungen. Desweiteren danke ich dir für die Freude bei der Arbeit, die du an mich übertragen hast.

„Herzliches Dankeschön“

DER GESAMTEN ARBEITSGRUPPE

... für die wunderbare Zusammenarbeit, das hervorragende Arbeitsklima und den dadurch immerwährenden Spaß, den ich bei der Arbeit hatte.

„Herzliches Dankeschön“

DEM WILHELMINENSPITAL - UROLOGISCHE ABTEILUNG

UNIV.- PROF. DR. OTHMAR ZECHNER und

DR. SONJA POLSTER-WILDHOFEN

... für die Präparation der Primärzellproben und die freundliche Zusammenarbeit.

„Herzliches Dankeschön“

MEINEN ELTERN ELISABETH und PETER

... für die seelische und finanzielle Unterstützung meiner ganzen Studienzzeit besonders auch während meiner Diplomarbeit.

Ohne euch wäre mir das Studieren nicht möglich gewesen!

„Herzliches Dankeschön“

MEINEN GROSSELTERN und VERWANDTEN

... für das Interesse an meinem Studium und für die vielen Unterstützungsleistungen.

„Herzliches Dankeschön“

MEINEN GESCHWISTERN, STUDIENKOLLEGEN und FREUNDEN

... für die Abwechslung zwischen den Lernzeiten sowie für die Hilfe und Motivation während meiner gesamten Studienzzeit.

„Herzliches Dankeschön“

KARLHEINZ

... für deine liebevolle Begleitung und Beratung in allen Situationen.

Danke für die Kraft nie aufzugeben sondern immer das Ziel vor Augen zu halten.

*„Freude an der Arbeit
lässt das Werk trefflich geraten.“*

Aristoteles

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	9
ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	15
ANHANG A	21
Publikation	21
ANHANG B	41
Ergänzungen zur Publikation	41
ANHANG C	47
Nanopartikel.....	47
Urothel-Primärzellen	57
LITERATURVERZEICHNIS	63
LEBENS LAUF	65

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1. Die Harnblase

Die Harnblase liegt im kleinen Becken direkt hinter dem Schambein. Ihre Innenwand ist mit Übergangsepithel ausgekleidet, das bei geleerter Blase Falten bildet. Die darunterliegende Wand besteht aus einer Basallamina und drei Schichten glatter Muskelfasern [1].

Die Blase dient als Reservoir für den Urin. Ihr Fassungsvermögen beträgt beim Erwachsenen 0,6 bis 1,0 Liter. Jedoch tritt bereits bei einer Urinansammlung von 150 bis 300 ml, also lange bevor dieses Fassungsvermögen erreicht wird, die Empfindung der Blasenfüllung auf. Mit beginnender Füllung steigt der Druck innerhalb der Blase, wobei sich die Blasenmuskulatur dem jeweiligen Füllungszustand anpasst, sodass ein weitgehend konstanter Blasentonus aufrechterhalten wird. Dieses Verhalten ist auf die viskös-elastischen Eigenschaften der glatten Blasenmuskulatur zurückzuführen. Bei stärkerer Füllung setzt dann die aktive Blasenentleerung ein [1].

Die essentielle physiologische Aufgabe des Blasenepithels ist die Aufrechterhaltung einer dichten Barriere zwischen dem Harn im Lumen und dem umgebenden Gewebe. Ermöglicht wird dies durch einen speziellen Feinbau der Epithelzellen, die als besonderes Kennzeichen eine Plaque-besetzte Oberfläche zur luminalen Seite hin besitzen. Dabei spielt eine bestimmte Familie membranständiger Proteine, die sogenannten Uroplakine, eine sehr wichtige Rolle. Diese decken 90% der luminal exponierten Zelloberfläche ab und bieten einen äußerst effektiven Schutz gegen das unwirtliche Milieu des Harns. Das Epithel der Harnblase wird wegen dieser speziellen Eigenschaften auch als „Urothel“ bezeichnet und stellt die am schwierigsten zu penetrierende Gewebsbarriere im menschlichen Körper dar [2]. Therapiekonzepte, die auf einer lokalen Administration des Wirkstoffes am Urothel beruhen, wie z.B. die instillative Behandlung nicht-muskelinvasiver Tumore, werden durch diese Barrierefunktion entschieden in ihrer Effizienz eingeschränkt.

2. Maligne Tumore der Harnblase

2.1 Inzidenz und Epidemiologie

Das Blasenkarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Harntraktes und der zweithäufigste des Urogenitalsystems gleich nach dem Prostatakarzinom. In der Häufigkeit der Tumorerkrankungen stehen maligne Tumore der Harnblase beim Mann an vierter, bei der Frau an achter Stelle. Die höhere Tumorrates bei Männern wird auf berufsbedingte Exposition mit Karzinogenen und auf stärkeren Tabakkonsum zurückgeführt. Das Blasenkarzinom ist eine typische Erkrankung des höheren Lebensalters. Weniger als 5% der Tumore treten in den ersten drei Lebensjahrzehnten auf. Die Tumorzinzidenz steigt ab dem 40. Lebensjahr und erreicht ein Maximum im sechsten und siebenten Lebensjahrzehnt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 70, für Frauen bei 73 Jahren. Die relative Fünfjahresüberlebensrate liegt für Männer bei 78% und für Frauen bei 72% [3].

2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Trotz zunehmender Erkenntnisse ist die Ätiologie von 80% der Blasentumore unbekannt. Erste dokumentierte Hinweise für das Auftreten urothelialer Blasentumore reichen bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts zurück. Etwa ein Drittel aller Blasentumorerkrankungen steht im Zusammenhang mit Zigarettenkonsum. Das Risiko einer Tumorentstehung steigt bei mehr als 20-jährigem Zigarettenkonsum auf das Zwei- bis Vierfache und fällt bei ehemaligen Rauchern erst nach 7 bis 15 Jahren auf das Niveau von Nichtrauchern. Eine gesteigerte Inzidenz findet sich auch infolge einer Exposition mit dem Chemotherapeutikum Cyclophosphamid. Bei einem langjährigen phenacetinassoziierten Analgetikaabusus besteht ebenfalls ein höheres Risiko, sowie nach Bestrahlungen der Beckenregion. Eigenständige Risikofaktoren sind ein hoher Nitritgehalt im Trinkwasser, Haloalkane (Trinkwasserchlorierung) sowie chronische Entzündungen der Harnblase [3].

2.3 Therapie

Das Blasenkarzinom erfordert stets eine individualisierte Therapie. Bestimmend dafür sind Tumorstadium, Malignitätsgrad, das Vorhandensein von Metastasen, die Rezidivrate, das Alter sowie der Allgemeinzustand des Patienten. Derzeit werden die verschiedenen Behandlungsverfahren (Operation, Chemo- oder Immuntherapie, Bestrahlung) als Monotherapie oder kombiniert eingesetzt [3]. Prinzipiell unterscheidet man für die Therapie, ob es sich um einen nicht-muskelinvasiven oder einen muskelinvasiven Tumor handelt. Entsprechend der Beteiligung von Muskelgewebe ist der muskelinvasive Tumor durch eine gute Versorgung des Tumorgewebes mit Blut- und Lymphgefäßen gekennzeichnet und daher schwieriger zu therapieren.

2.3.1 Nicht-muskelinvasiv wachsendes Blasenkarzinom

Etwa 70% der neu diagnostizierten Harnblasenkarzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnose nicht-muskelinvasiv, d. h. auf die Schleimhaut beschränkt. Hauptsymptom stellt hier eine asymptomatische Mikro- oder Makrohämaturie dar. Selten sind chronisch-zystitische Beschwerden zu verzeichnen [4].

Zur lokalen Behandlung des nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms sind verschiedene Verfahren allein oder in Kombination mit einer transurethralen Resektion verfügbar. Hierzu zählen Elektrokoagulation, Laserbehandlung zur thermischen bzw. photodynamischen Tumorzerstörung, topische Therapie mit Chemotherapeutika oder Immunmodulatoren sowie die Strahlentherapie [3].

2.3.2 Muskulinvasiv wachsendes Blasenkarzinom

Etwa 30% der Blasenkarzinome sind bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung muskelinvasiv. Desweiteren ist der Tumor bei 10 bis 15% der Patienten zu diesem Zeitpunkt schon metastasiert. Je nach pathologischem Stadium des Primärtumors und dem Lymphknotenstatus rezidivieren bis zur Hälfte der Tumore nach radikaler Zystektomie.

Das Hauptsymptom ist auch beim muskelinvasiven Blasenkarzinom die schmerzlose Hämaturie. Zusätzlich können Dysurie, Drangsymptomatik sowie

beim fortgeschrittenen Blasenkarzinom auch Schmerzen im kleinen Becken auftreten [4].

Ohne Therapie sterben mehr als 85% der Patienten mit muskelinvasivem Tumor innerhalb von zwei Jahren nach Diagnosestellung. Bei dem auf die Blase begrenzten invasiven Karzinom gilt die radikale Zystektomie als Standardverfahren. Mögliche Alternativverfahren hinsichtlich eines kurativen Ansatzes sind die Bestrahlung und die lokale Tumorexzision [3].

2.3.3 Einschränkungen derzeitiger Therapieverfahren

Da alle aufgezählten Therapiemöglichkeiten mit unvermeidbaren Nebenwirkungen einhergehen und ein optimales Behandlungsschema sowie eine Therapie mit hoher Spezifität auf Tumorzellen derzeit noch ausstehen, besteht die Notwendigkeit, nach neuen Ansätzen zu forschen, um die Überlebensrate und Compliance der Tumorpatienten zu erhöhen [3]. Insbesondere wird den adjuvanten lokalen Chemotherapie-Konzepten, die neben der transurethralen Resektion einen Grundpfeiler der Versorgung von nicht-muskelinvasiven Karzinomen darstellen, enormes Potential zugesprochen. Leider sind aber derzeit die Erfolgsquoten im Bezug auf die Verhinderung von Rezidiven und möglicher Tumorprogression, vor allem bei längeren Beobachtungszeiträumen, noch wechselhaft und beschränkt. Dies wird der sehr geringen Gewebepenetration der eingesetzten Wirkstoffe zugeschrieben. Könnte man hier eine verbesserte Gewebeinteraktion oder -penetration der Arzneistoffe erzielen, wäre der Vorteil der leichten lokalen Zugänglichkeit jedoch voll nutzbar.

3. Zielsetzung

Im Idealfall sollte sich die Interaktion zwischen Arzneistoff und Urothel auf erkrankte Gewebereiche beschränken. Dies sollte dann auch eine gesteigerte Therapieeffizienz ohne Erhöhung der Nebenwirkungsrate bedeuten. Da bei der intravesikalen Instillation das endgültige Zielgewebe direkt erreicht werden kann, sind in diesem Zusammenhang sowohl passive als auch aktiv physikalisch unterstützte Targeting-Konzepte denkbar bzw. werden bereits evaluiert. Von besonderem Wert wären dabei natürlich Delivery-Strategien, die einen eigenständig funktionierenden Mechanismus für die Verbesserung der Zellinteraktion nutzen und ohne spezielles Equipment bzw. ohne zusätzliche Manipulation von außen als gewöhnliche Instillation appliziert werden können. Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Thematik, zielgerichtete Arzneistoffabgabesysteme zur intravesikalen Anwendung an der Blase zu entwickeln, wobei eine biorekognitive Interaktion zwischen der luminal exponierten Oberfläche der Blasenepithelzellen und geeigneten Bindungsproteinen ausgenutzt werden soll.

3.1 Interaktion zwischen Blasenepithelzellen und Lektinen

Sämtliche tierische Zellen besitzen an ihrer Zellmembran eine sogenannte Glykokalyx, also einen Saum aus Kohlenhydraten, die in Form von meist verzweigten Oligosaccharid-Ketten als Glykolipide oder Glycoproteine vorliegen. Sie verleihen der Oberfläche jedes Zelltyps ein einzigartiges „Zucker-Muster“ und ermöglichen so die spezifische „Erkennung“ von Zellen über zuckerbindende Proteine. Solche „Selektine“ kommen endogen im Körper vor, beispielsweise als Teil des Blutgruppensystems oder als Linkermoleküle zur Anheftung an andere Zellen oder Wachstumsoberflächen. Daneben gibt es pflanzliche Lektine. Dabei handelt es sich um strukturspezifische Proteine nicht immunogenen Ursprungs, die mit hoher Selektivität bestimmte Zucker bzw. Polysaccharide erkennen [5].

Da sich die Glykokalyx von Blasen­zellen durch Malignisierung in charakteristischer Weise verändert, ist es sehr wahrscheinlich, dass sich dadurch auch eine Veränderung in der Bindung gewisser Lektine ergibt [6]. In weiterer Folge könnte es möglich sein, Lektin-Arzneistoff-Konjugate bzw. Lektin-modifizierte-Arzneistoffträgersysteme (z.B. Nanopartikel) einzusetzen, um diese gezielt im malignen Gewebe anzureichern. Voraussetzung dafür ist jedoch die Kenntnis jener Lektine, deren korrespondierende Bindungsstrukturen an der Zelloberfläche im Zuge der Malignisierung eine signifikante Änderung erfahren. Diese Arbeit beschreibt das Screening verschiedener fluoreszenz-markierter Lektine im Bezug auf deren Interaktion mit humanen urothelialen Zellen unterschiedlicher pathologischer Genese mit dem Ziel, deren Bindung und eventuelle Aufnahme zu charakterisieren und so vielversprechende Targeting-Liganden für eine zielgerichtete Therapieform zu identifizieren.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Lektinbindungsstudien

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden zunächst „single cell“-Bindungsstudien mit den Lektinen von *Triticum vulgare* (WGA), *Solanum tuberosum* (STL), *Lens culinaris* (LCA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Dolichus biflorus* (DBA), und *Ulex europaeus* (UEA) an den Blasenzelllinien SV-HUC-1 (gesundes Urothel), 5637 (Tumorgrad II) und HT-1376 (Tumorgrad III) durchgeführt.

Aus den in diesen Versuchen ermittelten mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) ergab sich - geordnet nach Affinitäten - folgendes Bindungsmuster: WGA >> STL ~ LCA ~ UEA ~ PNA >> DBA (siehe fig. 1 A, Anhang A). Charakteristisch war dabei, dass bei allen Zelllinien WGA die höchste MFI und PNA eine je nach Zelllinie stark vom Tumorgrad abhängige MFI zeigte. Davon ausgehend kann man annehmen, dass N-Acetyl-D-Glucosamin-Strukturen in der Glykokalyx aller Zelllinien in verhältnismäßig großer Anzahl vorkommen bzw. am leichtesten zugänglich sind und die Zugänglichkeit von N-Acetyl-D-Galactosamin in der Glykokalyx durch Malignisierung der Blasenzellen graduell zunimmt.

Um die Ergebnisse zu bestätigen und die Bedingungen noch näher dem Zustand *in vivo* anzupassen, wurden die Untersuchungen an Monolayern wiederholt. Auch hier zeigte WGA die höchste Bindung und PNA eine vom Tumorgrad abhängige Erhöhung der MFI (siehe fig. 1 B, Anhang A). Jedoch bindet PNA an SV-HUC-1 Zellen, die als Monolayer vorliegen, wesentlich stärker als an Einzelzellen, bei denen praktisch keine Bindung feststellbar war.

In weiter Folge wurde auch die Spezifität der Lektinbindung anhand kompetitiver Inhibition mit komplementären Zuckern überprüft. Bei einer spezifischen Wechselwirkung sollte eine Erhöhung der in löslicher Form zugesetzten Kohlenhydratmenge zu einer kontinuierlichen Abnahme der zellgebundenen Lektinmenge und damit zu einer Verringerung der MFI führen. Für alle analysierten Lektine konnte dabei eine hohe Bindungsspezifität von >80% (siehe tab. 1, Anhang A) nachgewiesen werden.

Basierend auf der Erkenntnis, dass WGA die höchste Bindungskapazität und PNA eine vom Tumorgrad abhängige Bindung aufweist, wurde anschließend für diese beiden Kandidaten untersucht, ob oberflächlich gebundenes Lektin von den Zellen internalisiert werden kann. Hierfür wurde ein Pulse-chase-Inkubationsprotokoll verfolgt, bei dem WGA und PNA zunächst bei 4°C an die Zelloberfläche gebunden werden und die Zellen anschließend nach Entfernen des überschüssigen Lektins für ein Zeitintervall von 0 bis 240 Minuten bei 37°C inkubiert werden. Da Zellen nur bei 37°C metabolisch aktiv sind, sollte das im ersten Schritt an die Oberfläche gebundene Lektin nun während dieser Chase-Inkubation auch von den Zellen internalisiert werden können.

Für Vergleichszwecke wurde dieser Versuch auch bei 4°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur wird der aktive Zellstoffwechsel fast vollständig inhibiert, so dass keine Internalisierung zu erwarten ist. Die Analyse erfolgte mittels Flowzytometrie und zeigte bei einer Inkubationstemperatur von 4°C über einen Zeitraum von 240 Minuten weder bei WGA noch bei PNA eine Änderung der zellassoziierten Fluoreszenzintensität. Nach gleich langer Inkubation bei 37°C konnte für WGA bei allen Zelllinien eine kontinuierliche Abnahme der MFI bestimmt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass WGA in saure Kompartimente der Zelle, wie Lysosomen, aufgenommen wird, wodurch ein Teil der Fluoreszenzintensität des Fluoresceins gelöscht wird. Der anschließende Zusatz von Monensin, das als Natrium-Ionophor den intrazellulären pH-Gradienten äquilibrieren kann, sollte zu einer Erhöhung des lysosomalen pH-Wertes und damit zu einem Anstieg der MFI führen. Auf diese Weise sollte wieder die ursprüngliche Fluoreszenzintensität messbar werden.

Nach Inkubation der Zellen bei 4°C wurde durch Monensin-Zusatz keine Veränderung der MFI festgestellt. Inkubiert man hingegen bei 37°C, konnte sowohl für WGA als auch für PNA nach Monensin-Zugabe ein Anstieg der MFI auf die Messwerte der Vergleichsgruppe bei 4°C beobachtet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass oberflächlich gebundenes WGA sowie PNA tatsächlich in saure Kompartimente der Zelle aufgenommen wird. Das Ausmaß der Internalisation von WGA über einen Zeitraum von 240 Minuten lag je nach Zelllinie zwischen 66 und 88% des ursprünglich oberflächlich gebundenen Lektins (siehe fig. 2 und fig. 4 A, Anhang A). Die Aufnahme von PNA erwies sich ebenfalls als stark zelllinien-abhängig. Für 5637 und HT-1376 Zellen wurde ab

etwa 120 Minuten ein Plateau erreicht, für SV-HUC-1 Zellen konnte hingegen weder PNA-Bindung noch eine Aufnahme festgestellt werden (siehe fig. 2 und fig. 4 B, Anhang A).

Um die Interaktion zwischen Lektin und Blasen Zellen auch grafisch zu analysieren, wurden WGA und PNA bei 4°C an die Zelloberfläche gebunden und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zur Visualisierung der Internalisation wurden lektinbeladene Zellen nachfolgend bei 37°C inkubiert und danach im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Wie zu erwarten war, fand bei 4°C keine Aufnahme in die Zellen statt. Die Fluoreszenzbilder zeigen im Querschnitt die lektinbeladene Zelloberfläche in Form eines grün fluoreszierenden Ringes. Bei 37°C konnte eine Aufnahme des Lektins in die Blasen Zellen beobachtet werden. Dies ist an einer punktförmigen Verteilung der Fluoreszenz im Zellinneren zu erkennen, die darauf hindeutet, dass WGA bzw. PNA nach der Aufnahme in intrazellulären Vesikeln akkumulieren (siehe fig. 2, Anhang A).

2. Lektin-modifizierte Nanopartikel

Im Anschluss an die Lektinbindungsstudien wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit Nanopartikel hergestellt, die an ihrer Oberfläche mit den Lektinen WGA bzw. PNA modifiziert waren. So sollte die prinzipielle Anwendbarkeit der Lektin-Strategie für Delivery-Systeme gezeigt werden. Dazu wurden die Bindungsstudien in analoger Weise mit den oberflächen-modifizierten Partikeln wiederholt. WGA-gekoppelte Nanopartikel zeigten hier bei allen Zelllinien die höchsten MFI-Werte. Verglichen mit den Lektinbindungsstudien an „single cells“, bei denen für WGA an SV-HUC-1 Zellen eine geringe, an 5637 Zellen eine erhöhte und an HT-1376 Zellen die stärkste Bindung festgestellt werden konnte, zeigte sich bei den Nanopartikel-Versuchen ein vergleichbarer Trend, der jedoch nicht so stark ausgeprägt war. So konnten beispielsweise bei einer MFI von 7500 kaum Unterschiede in der WGA-Bindungsstärke zwischen SV-HUC-1 und 5637 Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 4, Anhang C). Für PNA-gekoppelte Nanopartikel wurde ebenfalls eine Tumorgrad-abhängige Zunahme der Bindung festgestellt. Im Vergleich zu den Lektinbindungsstudien, bei denen fast keine Interaktion zwischen PNA und SV-HUC-1 Zellen zu beobachten war, sieht man bei den Partikelbindungen eine etwas erhöhte Zell-Assoziation. Dies lässt sich

vermutlich auf eine unspezifische Interaktion zwischen Zelloberfläche und Partikelmatrix zurückführen (vgl. unmodifizierte Partikel, Abbildung 4 C, Anhang C).

3. Primärzellversuche

Um eine bessere Vergleichbarkeit mit dem *in vivo*-Zustand zu erzielen, wurden bereits im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste Lektin-Versuche mit frisch isolierten Primärzellen aus Patienten durchgeführt. In erster Linie ging es dabei darum, ein adäquates Protokoll zur Isolierung von urothelialen Primärzellen zu erstellen und im Anschluss daran analog zu den Zelllinien die Interaktion zwischen WGA bzw. PNA und Primärzellen zu charakterisieren.

Um den Erfolg des Isolierungsprotokolls später überprüfen zu können, wurden zunächst Immunfluoreszenz-Färbungen mit verschiedenen Antikörpern an den drei humanen Urothelzelllinien durchgeführt, wobei ein Epithelzell-spezifischer Antikörper, ein Fibroblasten-spezifischer Antikörper und ein monoklonaler Antikörper gegen Uroplakin III zum Einsatz kamen.

Erwartungsgemäß war mit dem Fibroblasten-spezifischen Antikörper bei keiner der drei Zelllinien eine Färbung zu beobachten. Dies kann in der Primärkultur demnach als Hinweis auf das Nicht-Vorhandensein von Fibroblasten gewertet werden. Die Pancytokeratin-Färbungen waren bei allen Zellen positiv, jedoch deutlich unterschiedlich ausgeprägt. Dadurch lässt sich der urotheliale Ursprung aller drei Zelllinien nachweisen. Die Uroplakin III Färbung war bei keiner der Zelllinien positiv. Uroplakin III sollte aber auch nur im voll ausdifferenzierten Stadium eindeutig positiv sein, was bei länger *in vitro* kultivierten Zelllinien vermutlich nicht oder nicht mehr der Fall ist (siehe Abbildung 2, Anhang B).

Der Trend, dass WGA bei gesundem Urothel eine sehr hohe Bindung aufweist und PNA kaum Affinität zeigt, konnte in den Bindungsstudien an Primärzellen bestätigt werden. Die tatsächliche MFI variierte jedoch zwischen den Proben unterschiedlicher Patienten sehr stark. So ist beispielsweise die MFI von Probe 1 ungefähr 16-fach höher als die von Probe 2 (siehe Tabelle 3, Anhang C). Im Rahmen dieser Diplomarbeit ist es noch nicht gelungen, Tumorgewebe in Kultur zu bringen. Daher sind auch noch keine Aussagen über Malignizitäts-bedingte Unterschiede möglich.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass WGA bei allen untersuchten Blasenzelllinien (SV-HUC-1, 5637 und HT-1376) die höchste Affinität und PNA eine stark vom Tumorgrad abhängige Bindungsrate aufweist. Diese Lektine stellen daher die aus derzeitiger Sicht besten Kandidaten für ein zuckerspezifisches Targeting am Blasenepithel dar. Durch die Ergebnisse der Spezifitäts- und der Internalisationsuntersuchungen konnte die prinzipielle Anwendbarkeit der Methode weiter bestätigt werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Einsatz von Lektin-Arzneistoff-Konjugaten bzw. Lektin-modifizierten-Arzneistoffträgersystemen als zukünftige Therapieform bei Blasenkrebs durchaus interessant erscheint. Zuvor sollten die Ergebnisse allerdings in Primärzellversuchen und klinischen Studien weiter abgesichert werden.

ANHANG A

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte zur Publikation, „Lectin-mediated Biorecognition as a Novel Strategy for Targeted Delivery to Bladder Cancer“ maßgeblich beigetragen werden.

Publikation

To be submitted to *The Journal of Urology*, AUA, Elsevier

Lectin-mediated Biorecognition as a Novel Strategy for Targeted Delivery to Bladder Cancer,

Lukas Neutsch, Verena E. Plattner, Sonja Polster-Wildhofen, Agnes Zidar, Andreas Chott, Gerrit Borchard, Othmar Zechner, Franz Gabor, Michael Wirth*

From the Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna (LN, VEP, AZ, FG, MW), the Department of Urology (SPW, OZ) and the Department of Pathology and Microbiology (AC), Wilhelminenspital, Vienna, Austria, and the Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (GB), University of Geneva, Switzerland

* Correspondence: Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, Althanstrasse 14, A 1090 Vienna, Austria (telephone: (0043) 1-4277-55407; FAX: (0043) 1-4277-55; e-mail: michael.wirth@univie.ac.at)

Key Words: urinary bladder; carcinoma; drug delivery systems; lectins; administration, intravesical

ABSTRACT

Purpose: The inadequate urothelial delivery of drugs is considered a primary cause for current shortcomings in the adjuvant intravesical chemotherapy of bladder cancer. We here report on a novel, biorecognitive approach to gain a more regio-selective targeting of malignant tissue and improve urothelial uptake, based on the specific interaction between lectins and the glycocalyx of bladder cells.

Materials and Methods: The cytoadhesive and cytoinvasive potential of selected plant lectins was assessed on three human urothelial cell lines, corresponding to healthy tissue and low grade or high grade carcinoma, respectively. Flow cytometry and fluorimetry were used to determine binding capacity and specificity on single cells and confluent monolayers. Monensin quenching experiments, microscopic analysis and enzyme treatment allowed for a further characterization of internalization, uptake pathway and potential cause for tumor selectivity.

Results: Wheat germ agglutinin had the highest bioadhesive potential, while peanut agglutinin emerged as the most potent discriminator between healthy and cancerous tissue ($p < 0.01$). In both cases, cell interaction was highly specific ($>80\%$) and proved decisive for efficient uptake. Within 60 minutes after exposure, $>50\%$ of membrane-bound lectins were internalized in acidic compartments. Cancer-associated aberrant glycosylation is likely to represent the determining cause for PNA selectivity.

Conclusions: Given a careful choice of the targeting ligand, the development of carbohydrate-based delivery strategies for bladder cancer therapy seems feasible. Lectin bioadhesion may at this not only mediate preferential accumulation in malignant tissue but also promote cellular internalization via an increased recruitment of membrane-bound material to physiological uptake routes.

INTRODUCTION

The risk-adapted use of perioperative or adjuvant intravesical therapy is a key issue in the contemporary management of non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC).¹⁻³ By significantly reducing the incidence rate for early recurrence, it addresses one of the main complications associated with urinary cancer (UC) and offers the perspective of advancing from the currently established costly and extended follow-up protocols to more efficient and economic treatment schedules.^{4,5} However, many promising results in short term follow-up could not be confirmed for longer observation times, and effect on tumor progression as well as absolute survival benefit are still subject of controversial discussion.⁶⁻¹⁰ A variety of agents has so far been tested as monotherapy or in combination, but the ultimate goal of durably maintaining a tumor-free state while minimizing the tendency for adverse reactions is so far unmet.^{7,11}

From a functional perspective, the beneficial impact of intravesical chemotherapy is believed to be mediated via destruction of residual cancer tissue and hindrance of tumor cell reimplantation.¹⁰ Accordingly, poor treatment response is attributed mainly to an insufficient accumulation of drug in malignant urothelial cells.^{5,12} Several pharmacokinetic and technological approaches have so far been evaluated to improve cellular uptake, principally dividable in strategies that aim at prolonging the residence time at the bladder wall and methods that seek to increase epithelial permeability during instillation.¹²⁻¹⁴ The latter include device-assisted techniques such as electromotive drug administration (EMDA) or thermo-chemotherapy, and the use of penetration-enhancing excipients like DMSO or chitosan.^{6,14,15} Sustained delivery platforms have been realized using bioadhesive liposomes, micro- and nanospheres or hydrogels in order to extend the exposure time in the bladder cavity beyond the point of drainage.¹⁶⁻¹⁸ However, in comparison to other neoplastic disorders, there has been little progress in the development of more regio-selective therapy concepts for UC, which could offer improved treatment efficacy without also increasing the susceptibility for local or systemic side effects.^{5,12,19,20} Photodynamic therapy via 5-Aminolevulinic acid (5-ALA), though still in the clinical trial stage, is one promising option.^{6,12,21}

In the present study we report on a novel, biorecognitive approach for the tissue-specific delivery to bladder cancer. The glycosylation of urothelial membrane proteins is subjected to characteristic changes in the course of malignant transformation, and might thus enable a selective targeting of cancer cells via appropriate lectins.^{22,23} Furthermore, lectin-mediated adhesion was shown to facilitate the internalization of lumenally adsorbed material, and allows FimH-piliated *Escherichia coli* to invade superficial cells even under harsh environmental conditions.^{24,25} Provided a careful choice of the recognitive ligand, the combined effect of a more site-specific accumulation and a better access to cellular uptake routes may thus be utilizable for glyco-targeted delivery systems.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Fluorescein-labeled lectins from *Triticum vulgare*, *Arachis hypogaea*, *Dolichus biflorus*, *Lens culinaris*, *Solanum tuberosum* and *Ulex europaeus* were purchased from Vector laboratories (Burlingame, USA; confer table 1). Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA) and cell culture media from Life Technologies (Carlsbad, USA).

Cell culture

Human urothelial carcinoma cell lines (5637, HT-1376), as well as urothelial cells without history of malignant transformation (SV-HUC) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, USA). Cells were maintained and subcultivated according to the suppliers' instructions in media containing 10% fetal calf serum (Biochrom AG, Berlin, Germany), and used between passages 20 and 35. For monolayer binding studies, cells were seeded on tissue culture-treated 96-well microplates (Greiner, Kremsmünster, Austria) at a density of 1.2×10^4 cells/well and analyzed after growing to confluency. For imaging of monolayer samples, cells were seeded on pretreated ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 7+3) glass slides (\varnothing 20 mm) in a 25 well microplate at a density of 2.5×10^5 cells/cm², comprising either a single cell type only or SV-HUC and 5637 cells (coculture). To account for the diverging growth rate in coculture, the ratio of healthy to cancer cells was set at 3:1.

Lectin-binding capacity of single cells

After harvesting, 50 μl of cell suspension (6.0×10^6 cells/ml) were incubated with 50 μl of lectin solution (500 pmol/ml in PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, pH 7.4) for 30 minutes at 4°C. Cells were then washed three times with cold PBS to remove unbound lectin and relative cell-associated fluorescence (RFI) was determined using an EPICS XL-MLC analytical flow cytometer (488/525 nm; Beckman Coulter, Brea, USA). A forward versus side scatter gate was used to detect the single cell population and 2000 cells were accumulated for each analysis. To allow for comparison, RFI values were corrected to an apparent conjugation number of 1 mol fluorescein per mol of lectin (cf. F/P ratio, tab. 1). Unlabeled cells were

included to assess the autofluorescence and to check for potential alterations in viability after incubation with lectins. For PNA, the same experiment was repeated after pretreating the cells with neuraminidase (0.05 U/ml, 60 minutes) to cleave terminal sialic acid groups and assess the effect on lectin binding.

Lectin binding in monolayer culture

Confluent monolayer samples were washed three times with PBS and incubated with 50 μ l of lectin solution (500 pmol/ml in PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, pH 7.4) for 30 minutes at 4°C. After removal of unbound lectin by washing with cold PBS, RFI was determined using a fluorescence microplate reader (485/525 nm; Spectrafluor Fluorometer, Tecan, Austria). Monolayers incubated with PBS alone served as a negative control to account for autofluorescence of cells and culture plate.

Binding specificity and IC₅₀

Specificity of the lectin-cell interaction was verified by including serial dilutions of competitive carbohydrates (tab. 1) in the binding assays. 50 μ l of lectin solution (500 pmol/ml) and 100 μ l of the respective inhibitor (0.039 - 320 μ mol/ml) were incubated with the cells at 4°C, and fluorescence was determined as described above. IC₅₀ was defined as the carbohydrate concentration reducing lectin binding to 50% of the initial RFI value, and calculated from the inhibition curve obtained for each lectin.

Urothelial internalization of surface-bound lectins

A quantitative evaluation of cellular internalization was carried out by assessing the acidic quench of the fluorescein signal after uptake in late endosomal or lysosomal compartments. The surface of single cells in suspensions (50 μ l, 6.0×10^6 cells/ml) was first loaded with 50 μ l of WGA or PNA solution (500 pmol/ml) for 30 minutes at 4°C. After washing with PBS to remove unbound ligand, cells were either kept at 4°C or warmed to 37°C to initiate energy-dependent uptake processes. After 0 - 240 minutes, the quench in RFI was assessed via flow cytometry and compared to the initial value. Controls were carried out by comparing the restored value after addition of 40 μ l of monensin solution (2.4 mM in PBS) to the initial RFI.

Fluorescence microscopy

Cell layers of single and coculture samples were incubated with lectin solution (500 pmol/ml in PBS + Ca²⁺/Mg²⁺, pH 7.4) in 24-well microplates for 30 minutes at 4°C, followed by extensive washing to remove unbound ligand. Cells were fixed in paraformaldehyde (2% in PBS, pH 7.4), permeabilized and nuclei counterstained with propidium iodide. Images were acquired using a Nikon Eclipse 50i microscope (Nikon, Japan) equipped with an EXFO X-Cite 120 fluorescence illumination system.

Images of lectin internalization were taken from single cell suspensions after surface loading with lectins (500 pmol/ml) at 4°C as described above. Cells were then either kept at 4°C or warmed to 37°C for 30 minutes. The focus was set to the middle of the cell and exposure time was adjusted for each lectin individually to enhance clarity.

Statistical Analysis

In flow cytometry, the mean channel number of the logarithmic fluorescence intensities of the individual peaks was used for further calculations. Two-tailed Student t test and nonparametric ANOVA with Dunnett's multiple comparison posthoc test were used for evaluation of binding data, with $p < 0.05$ considered statistically significant.

RESULTS

Lectin-binding capacity of single cells

Binding capacity of single cells ($n = 2000$) was examined via flow-cytometry to assess the amount and distribution of lectin association across the cell population. As indicated in figure 1 A, overall binding potential decreased in the order WGA \gg STL \sim LCA \sim UEA \sim PNA \gg DBA. Furthermore, WGA showed a significant preference for malignant tissue, as indicated by an increase of cell associated lectin between $17.4 \pm 5.1\%$ for low grade (5637) and $38.9 \pm 11.1\%$ for high grade (HT-1376) carcinoma cells, respectively. Though having a comparatively lower average binding potential, PNA exhibited the clearest cancer selectivity, with almost no affinity to cells of non-malignant origin. Depending on the focus lying on either optimum bioadhesion or tissue selectivity, WGA or PNA may thus be the targeting moieties of choice.

Microscopic analysis revealed a homogeneous distribution of cell-bound lectins over the entire membrane (fig. 2, 4°C). No signs for lectin-mediated cytotoxicity were observed at the concentrations tested.

Lectin-cell interaction on monolayer samples

As cells in monolayer configuration might preferentially expose a certain subpopulation of membrane glycoproteins to the luminal surface, while others may be inaccessible, it was critical to check for alterations in binding potential with regard to the single cell state. No major changes were found for WGA (fig. 1 B), which still was most abundantly bound by all cell types. Likewise, a highly preferential binding of PNA to 5637 and HT-1376 cancer cells, amounting to 5.8 times and 8.6 times, respectively, that of SV-HUC, could be confirmed. STL and LCA, however, exhibited a more pronounced tumor selectivity as compared to the single cell level, and also a notable binding of DBA to 5637 cells (115.5 ± 0.3 RFI) seemed to be induced by the modified assay conditions.

A microscopic evaluation of lectin binding was carried out on individual cell lines as well as on coculture samples, and revealed a homogeneous staining with only minor differences between cells of the same population. In accordance to their common histogenic origin, cells in coculture samples displayed uniform and

intertwining growth, but populations were clearly distinguishable upon staining with PNA (fig. 3).

Binding specificity and IC₅₀

Specificity of the lectin-cell interaction was verified via competitive inhibition on the single cell and monolayer level. Addition of complementary carbohydrates (3.1 - 1600.0 µg/100µl) prior to lectin binding yielded the respective inhibition curves and allowed to calculate IC₅₀ (tab. 1). In all cases, a specific binding of >80% was found.

Lectin internalization

WGA and PNA, the two lectins of primary interest with regard to binding behavior, were chosen for a more detailed analysis of the internalization pathway. The cells were first incubated with lectin in a metabolically quiescent state at 4°C, washed to remove unbound ligand from the surface, and then warmed to 37°C to initiate energy dependent uptake. Marked microscopic clustering, accompanied by a cumulative loss in fluorescence intensity, was indicative of a rapid onset of internalization (fig. 2 and fig. 3). To verify accumulation in acidic compartments, cells were treated with monensin, which restores the pH-dependent quench of fluorescein. An almost complete recovery of RFI to the starting values gave evidence of a stable lectin binding without diffusion into the surrounding medium. Time lapse studies revealed a gradual and rather homogeneous internalization of up to 66 - 88% of surface-bound WGA for all cell lines (fig. 4 A), whereas uptake of PNA was strongly cell type-dependent and reached a plateau after 120 minutes (fig. 4 B). Importantly, no internalization was observed for lectins without sufficient cell interaction, such as PNA on SV-HUC (fig. 2 A and fig. 4 B).

DISCUSSION

The limited penetration of drugs into the urothelial tissue is considered a primary cause for the still variable and incomplete response of NMIBC upon intravesical pharmacotherapy.^{5,12-14} Though its straightforward local accessibility would render UC particularly susceptible for in situ targeted delivery systems, relatively few research has so far addressed this issue.¹⁹

In the present study we assessed the cytoadhesion and cytoinvasion of selected plant lectins (tab. 1) on three human urothelial cell lines, each of which corresponding to a different pathological staging (healthy urothelium, low grade and high grade carcinoma, respectively). For drug delivery, lectins offer the advantage of mediating a highly specific cell interaction while being more readily available than antibodies, robust, and versatile in coupling chemistry.²⁶ Conjugated to active pharmaceutical ingredients or immobilized at the surface of particulate drug carrier systems, they could modify tissue binding and help focusing the treatment impact on a region of interest.²⁷

WGA exhibited the highest binding potential on both single cells and monolayers, and a significant ($p < 0.05$) preference for malignant urothelium (fig. 1). This points to a high amount of lumenally accessible N-acetyl-D-glucosamine or sialic acid residues, which may be utilized to improve bioadhesion and prolong the local residence time. Depending on the toxicity profile of the agent applied, however, targeting strategies of even higher selectivity might be required in order to minimize the impact on healthy tissue. With at least fivefold preference for cancer cells ($p < 0.01$) and only negligible adhesion to SV-HUC, PNA emerged as the most promising ligand for targeted therapy. Previous studies on fixed or frozen tissue sections of UC and other epithelial carcinoma support this finding, showing increased PNA reactivity to be associated with disease progression and higher malignant potential.^{27,28} The selective binding of PNA most probably traces back to aberrant glycosylation during carcinogenesis and progression of UC, which was reported to cause loss of terminal sialic acid groups and an increased exposure of PNA-affine N-acetyl-D-galactosamine motifs.²² Mimicking this process by treatment with neuraminidase resulted in higher PNA binding on SV-HUC, but not cancerous cells (data not shown). The current study focused on characterizing lectin binding with emphasis on the actual surface accessibility of

corresponding carbohydrate moieties on living cells. While this was not necessarily expected to match the situation on processed tissue samples,^{27,28} the good correlation with histological results illustrates the significance of the cell models used.

Competitive inhibition with complementary carbohydrates served as a means to verify specificity of the lectin-mediated biorecognition and calculate IC₅₀ values (tab 1). A high degree of specific interaction (>80%), which is mandatory for targeted therapy concepts, could be demonstrated for all lectins. Moreover, the difference between IC₅₀ values and relative cell association found in binding experiments indicates that a complex interplay of capacity and affinity of lectin-reactive membrane components contributes to the overall effect.

Over the last two decades, the functional perception of the human urothelium changed from the classic view of a passive barrier to that of a more dynamic tissue with limited permeability but a constant rate of membrane turnover for accommodation to mechanical stimuli.²⁹ It is likely that also the uptake of membrane-bound ligands might be influenced by this turnover process. In the present study, more than 60% of cell-associated WGA was found to be internalized within 240 minutes regardless of cell type, while PNA, due to its selective interaction potential, was only taken up by 5637 and HT-1376 cells (fig. 2 and fig. 4). Glycorecognitive membrane binding thus seems indeed to act as an efficient promoter for urothelial uptake. Moreover, the selective binding may aid the prevention of side effects in case of PNA-modified delivery systems. Microscopic analysis and monensin treatment confirmed cellular internalization and pointed to accumulation in lysosomal compartments. This is consistent with observations in murine cell models, where surface-bound markers were found trapped in lysosomes while fluid phase markers were recycled back to the extracellular fluid.²⁴ Khandelwal et al. recently revealed a similar pathway in rabbit urothelium.³⁰ The differing internalization rate of WGA and PNA suggests that the corresponding lectin-reactive glycoproteins have individual membrane mobility and/or may get recruited to endocytosis via different mechanisms. Further research will be required to more exactly characterize the discrete uptake routes triggered by glycoprotein binding, and clarify to what extent they can be utilized for delivering conjugated payload inside the cells.

With a grade-dependent binding and uptake, our results demonstrate the potential lying in urothelial glyco-targeting. The concept of lectin-mediated delivery would in principle be applicable to most drugs currently used for intravesical therapy, and administration would be possible in form of conventional instillation without the need for complex instrumentation.

CONCLUSIONS

In cell culture studies, the biorecognitive interaction between lectins and human urothelium allows for a controlled membrane adhesion depending on the pathological staging. While WGA exhibited the highest general binding potential, PNA emerged as the most efficient discriminator between healthy and malignant tissue. Next to inducing a stronger and more selective cell adhesion, binding to surface glycoproteins was shown to drastically enhance urothelial internalization. Hence, lectin-modified drugs or delivery systems may provide a promising tool for a more efficient and regionalized adjuvant intravesical treatment of UC.

REFERENCES

1. Hall MC, Chang SS, Dalbagni G et al: Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol* 2007; 178: 2314.
2. van Rhijn BWG, Burger M, Lotan Y et al: Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol* 2009; 56: 430.
3. Montie JE, Clark PE, Eisenberger MA: Bladder cancer. *JNCCN* 2009; 7: 8.
4. Sievert KD, Amend B, Nagele U et al: Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol* 2009; 27: 295.
5. Lerner SP, Grossman HB, Messing EM et al: BCAN think tank session 3: prevention of bladder cancer. *Urol Oncol* 2010; 28: 338.
6. Witjes A and Hendricksen K: Intravesical pharmacotherapy for non-muscle-invasive bladder cancer: a critical review of currently available drugs, treatment schedules, and long-term results. *Eur Urol* 2008; 53: 45.
7. Hussain MHA, Wood DP, Bajorin DF et al: Bladder cancer: narrowing the gap between evidence and practice. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5680.
8. Sylvester RJ: Intravesical chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer: what schedule and duration of treatment? *Eur Urol* 2007; 52: 951.
9. Dobruch J and Herr H: Should all patients receive single chemotherapeutic agent instillation after bladder tumour resection? *BJUI* 2009; 104: 170.
10. Kamat AM and Lotan YR: Perioperative intravesical therapy after transurethral resection for bladder cancer. *J Urol* 2010; 183: 19.
11. Koya MP, Simon MA and Soloway MS: Complications of intravesical therapy for urothelial cancer of the bladder. *J Urol* 2006; 175: 2004.
12. Gasion JPB and Cruz JFJ: Improving efficacy of intravesical chemotherapy. *Eur Urol* 2006; 50: 225.
13. Au JLS, Badalament RA, Wientjes MG et al: Methods to improve efficacy of intravesical mitomycin C: results of a randomized phase III trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 597.
14. Shen Z, Shen T, Wientjes MG et al: Intravesical treatments of bladder cancer: review. *Pharm Res* 2008; 25: 1500.
15. Di Stasi SM, Giannantoni A, Stephen RL et al: Intravesical electromotive mitomycin C versus passive transport mitomycin C for high risk superficial bladder cancer: a prospective randomized study. *J Urol* 2003; 170: 777.
16. Bilensoy E, Sarisozen C, Esendagli G et al: Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of mitomycin C to bladder tumors. *Int J Pharm* 2009; 371: 170.
17. Le Visage C, Rioux-Leclercq N, Haller M et al: Efficacy of paclitaxel released from bio-adhesive polymer microspheres on model superficial bladder cancer. *J Urol* 2004; 171: 1324.

18. Lu Z, Yeh TK, Tsai M et al: Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7677.
19. Farokhzad OC, Dimitrakov JD, Karp JM et al: Drug delivery systems in urology – getting 'smarter'. *Urology* 2006; 68: 463.
20. DeCastro GJ and Steinberg GD: Are we making significant progress in the diagnosis and management of bladder cancer? *J Urol* 2010; 183: 1667.
21. Pinthus JH, Bogaards A, Weersink R et al: Photodynamic therapy for urological malignancies: past to current approaches. *J Urol* 2006; 175: 1201.
22. Ohyama C: Glycosylation in bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 2008; 13: 308.
23. Liebert M, Gebhardt D, Wood C et al: Urothelial differentiation and bladder cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999; 462: 437.
24. Kreft ME, Romih R, Kreft M et al: Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage. *Differentiation* 2009; 77: 48.
25. Dhakal BK, Kulesus RR and Mulvey MA: Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 2.
26. Gabor F, Bogner E, Weissenboeck A et al: The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 459.
27. Yi SMP, Harson RE, Zabner J et al: Lectin binding and endocytosis at the apical surface of human airway epithelia. *Gene Ther* 2001; 8: 1826.
28. Neal DE, Charlton RG and Bennett MK: Histochemical study of lectin binding in neoplastic and non-neoplastic urothelium. *BJU* 1987; 60: 399.
29. Truschel ST, Wang E, Ruiz WG et al: Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 830.
30. Khandelwal P, Ruiz WG and Apodaca G: Compensatory endocytosis in bladder umbrella cells occurs through an integrin-regulated and RhoA- and dynamin-dependent pathway. *EMBO J* 2010; 29: 1961.

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

BCA = bacillus Calmette-Guerin
 DBA = Dolichus biflorus agglutinin
 DMSO = Dimethyl sulfoxide
 EMDA = electromotive drug administration
 F/P = fluorescein/protein ratio
 LCA = Lens culinaris agglutinin
 NMIBC = non-muscle-invasive bladder cancer
 PBS = phosphate buffered saline
 PNA = Peanut agglutinin
 RFI = relative cell associated fluorescence intensity
 RT = room temperature
 STL = Solanum tuberosum lectin
 UC = urothelial carcinoma
 UEA = Ulex europaeus agglutinin I
 WGA = Wheat germ agglutinin

TABLES

Table 1

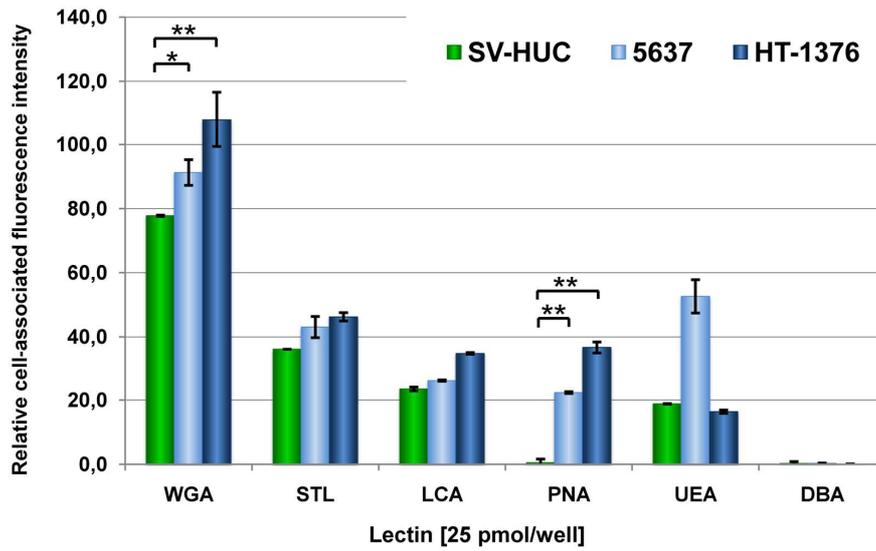
Lectin	MW	F/P Ratio	Carbohydrate Specificity	Inhibitory Sugar	IC ₅₀		
					SV-HUC	5637	HT-1376
WGA	36,000	2.9	GlcNAc, NANA	N-acetyl-D-glucosamine, Chitotriose*	0.012	0.025	0.062
STL	100,000	3.1	GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine, Chitotriose*	0.018	0.068	0.055
LCA	49,000	3.8	α -Man, α -Glc, α -GlcNAc	D-mannose*	7.145	33.230	5.000
PNA	110,000	5.2	β -D-Gal-D-GalNAc, β -D-GalNAc, Gal	D-galactosamine*	N/A	0.525	1.313
UEA	63,000	2.7	α -L-Fuc	L-fucose*	0.510	1.335	N/A
DBA	120,000	2.2	α -D-GalNAc, Gal	N-acetyl-D-galactosamine*	N/A	N/A	N/A

* Carbohydrate used for competitive inhibition assays
 NANA N-acetyl-neuraminic-acid, *GlcNAc* N-acetyl glucosamine, *Man* mannose, *Glc* glucose, *Gal* galactose, *GalNAc* N-acetyl galactosamine, *Fuc* fucose, *N/A* = not applicable

FIGURES

Figure 1

A



B

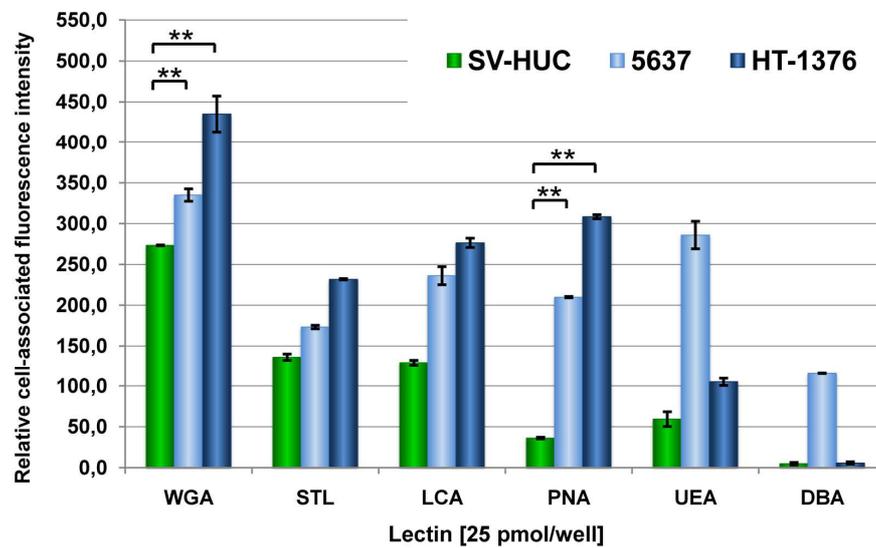


Figure 2

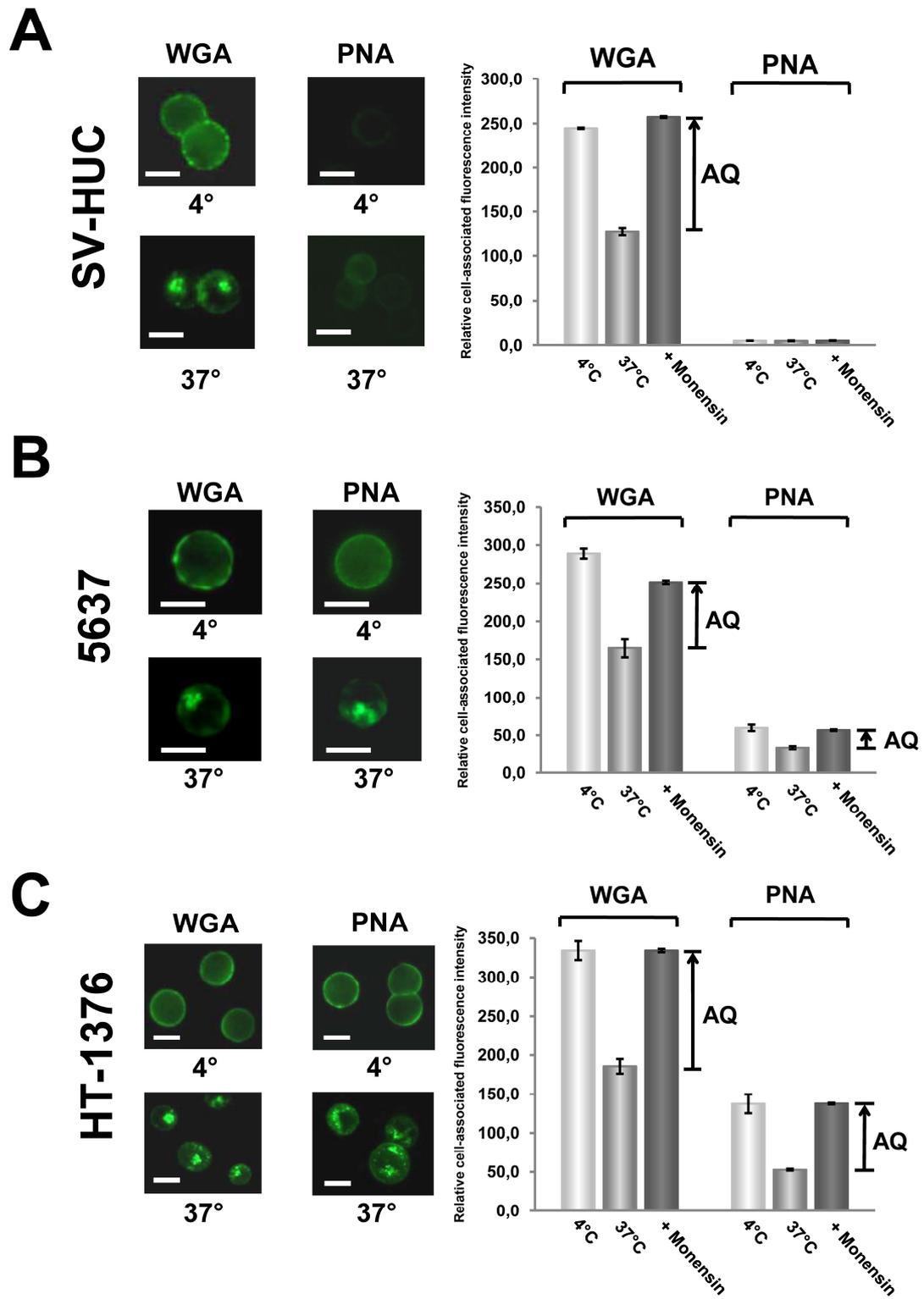


Figure 3

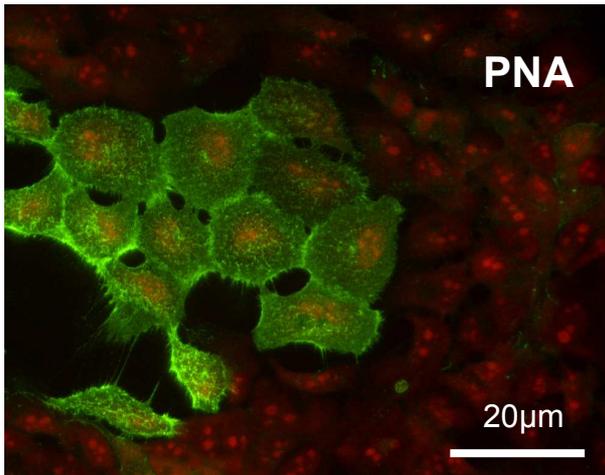
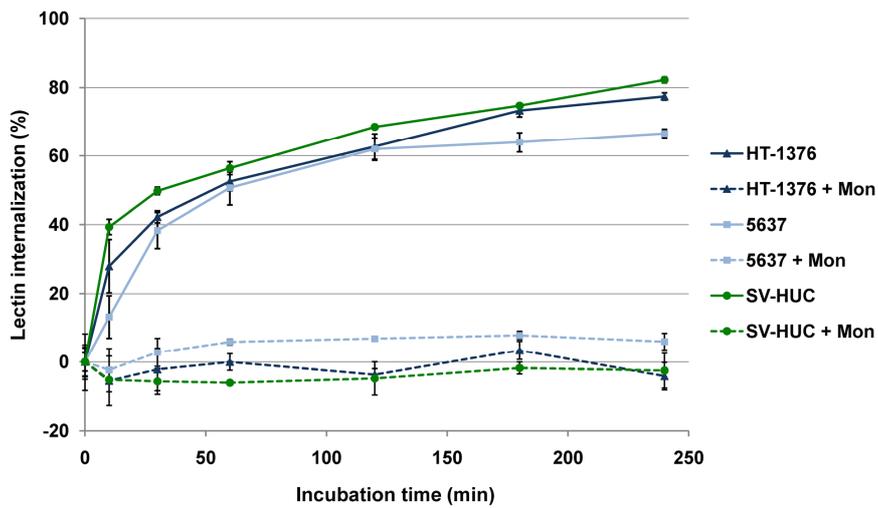
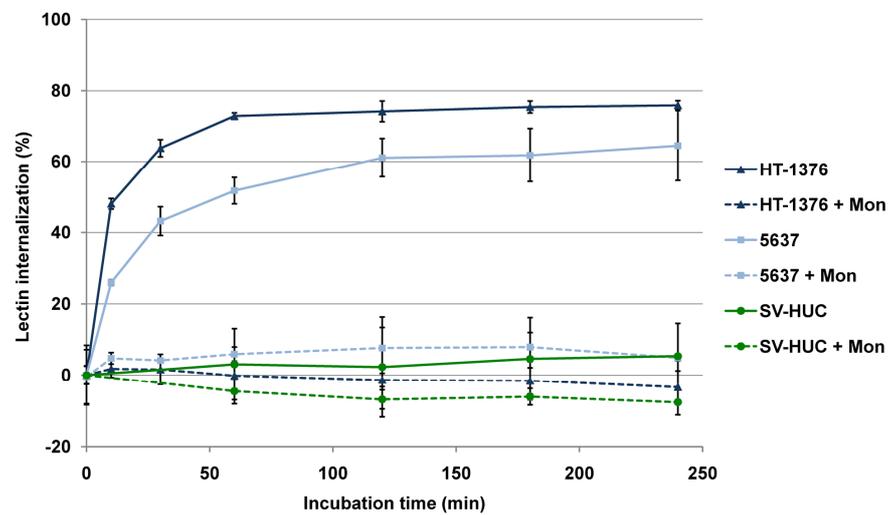


Figure 4

A



B



LEGENDS

Figure 1. Lectin-binding capacity of human cell lines corresponding to healthy urothelium (SV-HUC) and urothelial carcinoma of different pathological staging (5637 and HT-1376). *A*, surface association of fluorescence-labeled lectins to single cells after incubation for 30 minutes at 4°C. *B*, lectin binding to cell monolayers at 4°C. RFI values were related to an apparent F/P ratio of 1 (mean \pm SD, n = 3). Single asterisk indicates p <0.05 vs SV-HUC. Double asterisks indicate p <0.01 vs. SV-HUC.

Figure 2. Cellular internalization of WGA and PNA. SV-HUC (*A*), 5637 (*B*) and HT-1376 (*C*) cells were surface loaded with lectins at 4°C and warmed to 37°C to initiate energy-dependent uptake. After 30 minutes, internalization was visualized microscopically (*left panel*) and confirmed by restoring the acidic quench (AQ) of fluorescein with monensin (*right panel*, mean \pm SD, n = 3). Scale bars represent 10 μ m.

Figure 3. Specific binding of PNA to malignant cells. SV-HUC and 5637 cells grown in monolayer co-culture (5d) were incubated with fluorescence-labeled PNA (500 pmol/ml for 30 minutes at 4°C). Only 5637 cells show lectin reactivity with punctuate staining across the entire surface. Nuclei were counterstained with propidium iodide. Reduced from \times 500.

Figure 4. Uptake kinetics of surface-bound WGA (*A*) and PNA (*B*) in urothelial cells. Percentage of lectin internalization was calculated from the difference between quenched RFI after incubation for 0 - 240 minutes at 37°C and the initial RFI after surface loading at 4°C (*continuous lines*). Subsequent monensin treatment levels out intracellular pH gradients and the resultant quenching effects, verifying localization to acidic compartments (*dashed lines*). *Mon*, monensin (20 μ M). Values represent mean \pm SD (n = 3).

Table 1. Specifications of plant lectins used for urothelial glyco-targeting, and IC₅₀ values as determined in competitive binding assays. IC₅₀ is expressed as the carbohydrate concentration (μmol/ml) required to reduce lectin-cell association to 50% of the value without inhibition.

ANHANG B

Ergänzungen zur Publikation

1. Vergleichende morphologisch/immunochemische Charakterisierung der Zelllinien SV-HUC-1, 5637 und HT-1376

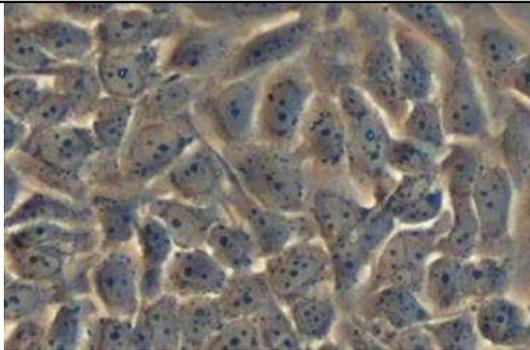
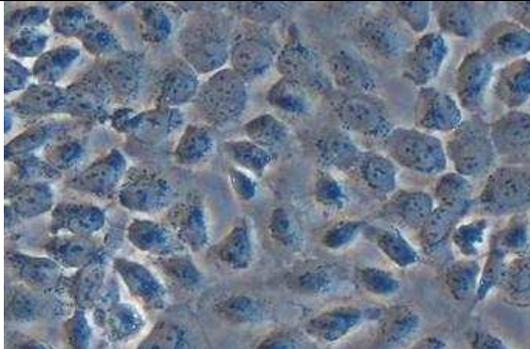
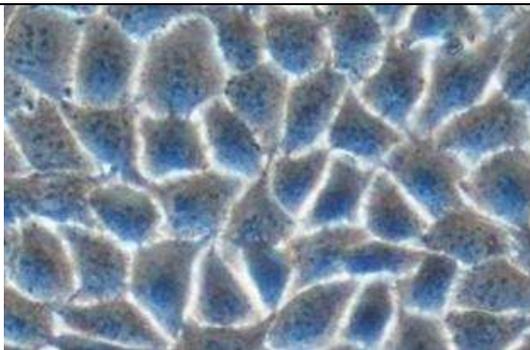
	Monolayer	Beschreibung
SV-HUC-1		Die Zellen dieser Zelllinie stammen von einem 11-jährigen Mann und sind urothelialen Ursprungs. Sie wurden mittels eines SV40 Virus immortalisiert [7].
5637		5637 Zellen stammen von einem 68-jährigen Mann und sind kanzerös/urothelialen Ursprungs. Ihr Differenzierungsgrad entspricht der des Tumorgrad II bzw. low grade carcinoma nach WHO [8].
HT-1376		Diese Zellen stammen von einer 58-jährigen Frau und sind kanzerös/urothelialen Ursprungs mit Tumorgrad III bzw. der Differenzierung eines high grade carcinoma [9].

Abbildung 1. Die Zellen der Zelllinien SV-HUC-1, 5637 und HT-1376 wurden in Gewebekulturflaschen bis zur Konfluenz gezüchtet und bei 200-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (Phasenkontrast) aufgenommen.

2. Fibroblasten-, Pancytokeratin- und Uroplakin III-Antikörperfärbungen

2.1 Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt, um damit den Erfolg einer Primärzellisolierung überprüfen zu können. Dazu wurden ein Epithelzell-spezifischer Antikörper (K5/K8 Pan Epithelial Keratin; ProGen 61431), ein Fibroblasten-spezifischer Antikörper (Fibroblast Surface Protein antibody [1B10]; ab11333) und ein monoklonaler Antikörper gegen Uroplakin III (AU1; ProGen 610108) eingesetzt.

Pancytokeratin ist ein allgemeiner Marker, der den epithelialen Ursprung der Zelllinien bestätigen soll. Daher sollte diese Färbung bei allen Zelllinien positiv sein [10].

Uroplakin III ist ein Marker für die terminale urotheliale Differenzierung. Eine Reaktivität liegt hier jedoch meist nur im voll ausdifferenzierten Stadium vor, bei länger in vitro kultivierten Zelllinien ist sie meistens nicht zu sehen [11].

Die Färbung mit Fibroblasten-spezifischem Antikörper soll die gewebsspezifische Reinheit der Zelllinien bestätigen, wäre aber auch als Nachweis für das erfolgreiche Entfernen von Fibroblasten aus Primärzellkulturen geeignet.

2.2 Chemikalien

PBS-Puffer (ohne Calcium und Magnesium, pH 7,4)

PBS-Puffer (10-fach konzentriert): 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 , 80 g NaCl, 15,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.

PBS-Puffer: 50 ml PBS-Puffer (10-fach konzentriert) werden mit 450 ml Aqua dest. verdünnt.

Paraformaldehyd-Lösung (PFA; 4% in PBS, pH 7,4)

1,2 g PFA werden mit 5 Tropfen 1M Natronlauge sowie ~25 ml Aqua dest. versetzt und bei 60°C im Wasserbad so lange gerührt, bis eine homogene Lösung entsteht. Anschließend werden der abgekühlten Lösung 3 ml PBS (10-fach konzentriert) zugesetzt und das Volumen mit Aqua dest. auf 30 ml ergänzt.

Ammoniumchlorid-Lösung 50 mM

0,2675 g Ammoniumchlorid werden in 100 ml PBS (ohne Calcium und Magnesium) gelöst.

Triton X-100 Lösung 0,1%

0,1 g Triton X-100 werden in 100 ml PBS (ohne Calcium und Magnesium) gelöst.

1% Bovine Serum Albumin (BSA)- Lösung

0,1 g BSA werden in 10 ml PBS (ohne Calcium und Magnesium) gelöst.

Primäre Antikörperlösungen (AK1):

Fibroblasten 1:100 verd. (8 µl AK auf 800 µl 1% BSA/PBS)

Fibroblast Surface Protein antibody [1B10],
ab11333, Abcam, Cambridge, UK

Pancytokeratin 1:100 verd. (8 µl AK auf 800 µl 1% BSA/PBS)

Cytokeratin 5+8, Mouse monoclonal IgG1 FITC Conj.,
Cat. No. 61431, PROGEN Biotechnik, Heidelberg, DE

Uroplakin III 1:10 verd. (50 µl AK auf 500 µl 1% BSA/PBS)

Ms monoclonal IgG1 AU1,
Cat. No. 610108, PROGEN Biotechnik, Heidelberg, DE

Sekundäre Antikörperlösung (AK2):

FITC Polyclonal Goat-Anti Mouse Immunoglobulin

1:100 verd. (25 µl AK auf 2500 µl 1% BSA/PBS

+ 2,5 µl einer Propidiumiodid-Stocksolution - 1 mg/ml)

FITC Polyclonal Goat-Anti Mouse Immunoglobulins, Dako, Denmark

2.3 Durchführung der Antikörperfärbungen

Die Zellen werden in einer 12-well Mikrotiterplatte auf einem darin eingelegten Deckglas mit 18 mm Durchmesser so lange kultiviert, bis ein konfluenter Monolayer entstanden ist.

Jedes Sample wird zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Zum Fixieren werden die Zellmonolayer anschließend mit 1000 µl PFA-Lösung (4%) versetzt und 15 bis 20 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nach einem weiteren Waschschrift werden die Zelllayer mit 1000 µl Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und 30 Minuten bei RT stehen gelassen.

Nach erneutem Waschen mit PBS werden je Monolayer 1000 µl Triton X-100 zugesetzt. Nach einer 15- bis 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt ein weiterer Waschschrift mit zweimal je 1 ml PBS.

Anschließend werden die Zellmonolayer zusammen mit 400 µl AK1 1 h lang bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift werden 400 µl AK2 zugesetzt und die Samples für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach neuerlichem Waschen mit PBS werden die Zelllayer in FluorSave®-Lösung eingebettet.

Bis zur Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse 50i Mikroskop; Japan mit EXFO X-Cite 120 Fluoreszenzsystem) werden die Präparate unter absolutem Lichtschutz gelagert.

2.4 Diskussion der Ergebnisse

Keine der Zelllinien zeigte eine positive Fibroblastenfärbung. Dies ist auch die Grundvoraussetzung für eine Eignung des Antikörpers als Kontrollmarker für den Ausschluss von Fibroblasten in Primärzellkulturen, da hier eine Kreuzreaktivität mit urothelialen Zellen zu falsch-positiven Ergebnissen führen würde. Die fehlende Reaktivität an allen drei humanen urothelialen Zelllinien lässt eine solche Interferenz aber äußerst unwahrscheinlich erscheinen.

Die Pancytokeratin-Färbungen waren bei allen Zelllinien sichtbar positiv, jedoch deutlich unterschiedlich ausgeprägt. Daraus lässt sich der urotheliale Ursprung aller drei Zelllinien ableiten, gleichzeitig steht damit eine „Positivkontrolle“ für vergleichende Analysen mit Primärzellen zur Verfügung.

Eine Uroplakin III Färbung war bei keiner der Zelllinien zu erkennen, sie sollte aber auch nur bei voll ausdifferenzierten Zellen vorkommen. Für länger *in vitro* kultivierte Zelllinien stellt die fehlende Reaktivität mit dem Uroplakin III Antikörper also kein überraschendes Ergebnis dar.

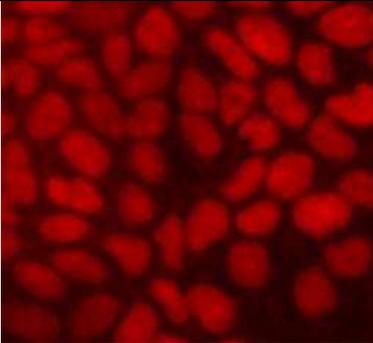
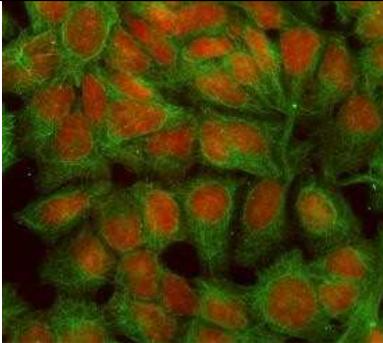
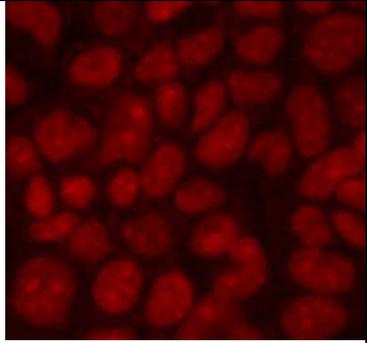
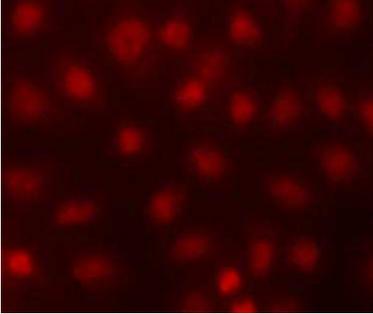
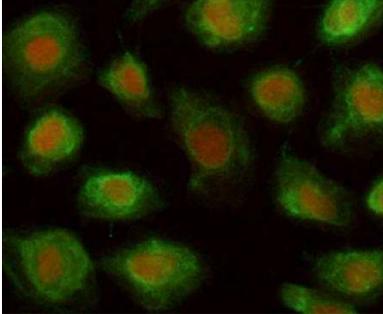
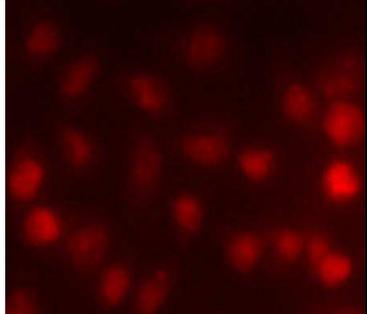
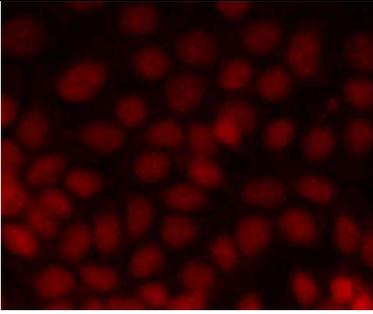
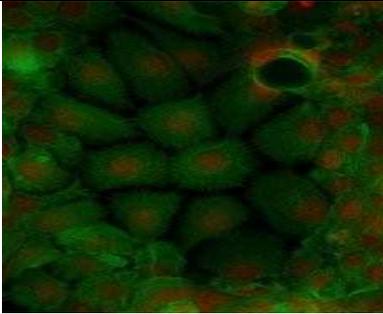
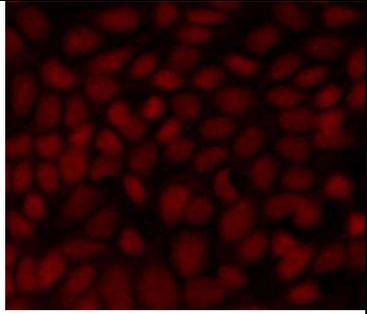
	Fibroblasten	Pancytokeratin	Uroplakin III
SV - HUC - 1			
	Belichtungszeit: 1 Sekunde	Belichtungszeit: 0.5 Sekunden	Belichtungszeit: 1 Sekunde
5637			
	Belichtungszeit: 2 Sekunden	Belichtungszeit: 1 Sekunde	Belichtungszeit: 2 Sekunden
HT - 1376			
	Belichtungszeit: 2 Sekunden	Belichtungszeit: 2 Sekunden	Belichtungszeit: 2 Sekunden

Abbildung 2. Immunofluoreszenzmikroskopische Analyse der SV-HUC-1, 5637 und HT-1376 Zelllinie mit Fibroblasten-, Pancytokeratin- und Uroplakin III-Antikörperfärbungen, aufgenommen bei 200-facher Vergrößerung nach Fixierung in PFA und Permeabilisierung mit Triton X-100. Der rote Kanal zeigt die Kernfärbung mit Propidiumiodid und der grüne die jeweilige Antikörperfärbung (FITC).

ANHANG C

Nanopartikel

1. Einleitung

Da die Lektinbindungsstudien an den Blasenzelllinien (SV-HUC-1, 5637, HT-1376) vielversprechende Resultate im Bezug auf eine mögliche Verbesserung und Spezifizierung der Zellinteraktion lieferten, stellte sich in weiterer Folge die Frage, ob auch für Lektin-modifizierte Nanopartikel ein vergleichbares Bindungsmuster bestätigt werden kann.

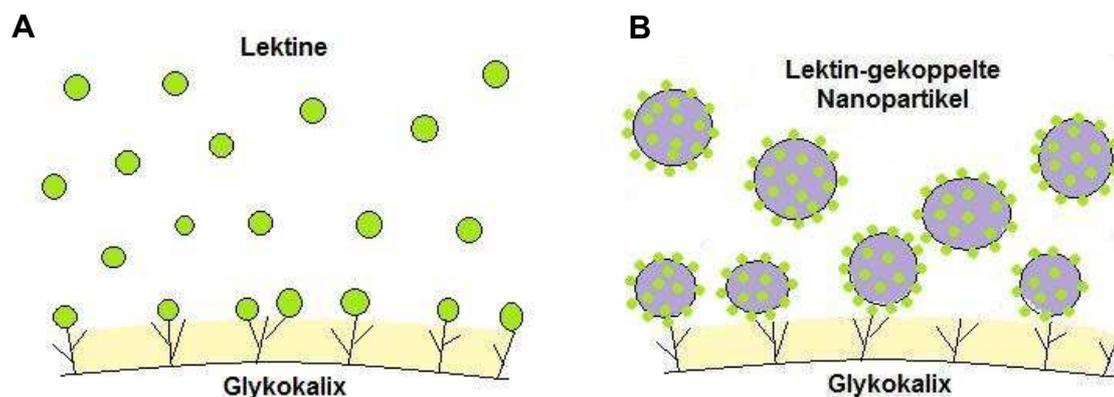


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Bindung von Lektinen (A) bzw. Lektin-gekoppelter Nanopartikel (B) an die Glykokalyx von Blasenzellen.

Biokompatible, polymere Nanopartikel spielen im Rahmen des „drug targeting“ eine wesentliche Rolle, da sie ein Carrier-System darstellen, in das ein Arzneistoff eingebaut werden kann. In weiterer Folge sollte durch Modifikation mit reaktiven Biomolekülen an der Partikeloberfläche eine gezielte Anreicherung der partikulären Systeme an der Oberfläche der Zielzelle möglich sein. Als Modellsystem in dieser Studie wurden Nanopartikel aus Poly(lactid-co-glycolid) verwendet, da sie hinsichtlich der Toxizität und Funktionalisierbarkeit alle Anforderungen an ein zukünftig *in vivo* einsetzbares System erfüllen [12].

Die Bindung von Lektinen an die Oberfläche solcher Partikel und der Nachweis einer anschließenden Interaktion mit urothelialen Zellen sollte primär darüber Aufschluss geben, ob die entsprechenden Lektine auch in immobilisiertem Zustand ihre Spezifität bewahren und ob eine Verbesserung der Zellassoziation im Vergleich zu nicht modifizierten Partikeln feststellbar ist.

Da im Vergleich der Lektine die Bindung von WGA bei allen Blasenzelllinien am höchsten war, also hierbei auch die stärkste Verbesserung der Zellinteraktion zu erwarten ist, und PNA eine vom Tumorgrad abhängige Bindungsstärke zeigte, also als beste Option für ein Tumor-spezifisches Targeting betrachtet werden kann, wurden diese beiden Lektine zur Partikelmodifikation und deren weiterer Analyse ausgewählt.

Ziel dieser Untersuchungen war es, zunächst stabile WGA- bzw. PNA-gekoppelte Nanopartikel herzustellen und im Anschluss daran die Zellbindungsstudien mit diesen Partikeln zu wiederholen.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Lectins from *Triticum vulgare* (WGA) and *Arachis hypogaea* (PNA) were purchased from Vector laboratories (Burlingame, USA).

4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (Bodipy®, BOD) was obtained from Molecular Probes (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA). Resomer® RG503H (PLGA; lactide/glycolide ratio 50:50, inherent viscosity 0.32 - 0.44 dl/g, acid number >3 mg KOH/g) was bought from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany).

Bovine serum albumin (BSA), 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC), N-hydroxysuccinimide (NHS), Pluronic® F-68 and all other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Vienna, Austria).

2.2. Cell culture

2.2.1 SV-HUC-1

The human urinary bladder cell line SV-HUC-1 was generously provided by Gerrit Borchard (University of Geneva, Switzerland).

Cells were cultured in HAM'S NUTRIENT MIXTURE- F12 medium (EuroClone, Italy; supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mM L-glutamine and 5 ml of a 10 µg/ml penicillin/streptomycin-solution) in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C and used at passages between 50 - 55.

2.2.2 5637

The human urinary bladder carcinoma cell line 5637 (grade 2) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA).

Cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum (Biochrom AG, Germany), 4 mM L-glutamine, and 150 µg/ml gentamycin in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C and used at passages between 25 - 32.

2.2.3 HT-1376

The human urinary bladder carcinoma cell line HT-1376 (grade 3) was purchased from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany).

Cells were cultured in DMEM medium (Invitrogen, USA – supplemented with 15% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine and 1.2 ml of a 150 µg/ml gentamycin solution) in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C and used at passages between 15 - 19.

2.3. Preparation of BOD-labeled PLGA-Nanoparticles (BOP-NP)

Fluorescence-labeled PLGA-nanoparticles were obtained by an o/w solvent evaporation procedure. Initially, 0.25 mg BOD and 400 mg PLGA were dissolved in 2 g ethyl acetate. This solution was emulsified with a 10% aqueous solution of Pluronic® F-68 by sonication (Bandelin electronic UW 70/HD 70, Berlin,

Germany) for 50 s, yielding an o/w emulsion, which was poured into a 1% aqueous solution of Pluronic® F-68. After mechanical stirring (600 rpm) for 1 h at room temperature, the residual ethyl acetate was removed under reduced pressure resulting in the hardening of the nanodroplets. The final particle suspension was filtered through a syringe filter (1 µm pore size) to eliminate aggregates.

2.4. Modification of the Particle Surface

The proteins WGA and PNA were conjugated to the nanoparticle surface by a carbodiimide-mediated coupling procedure. Therefore, 40 ml of the nanoparticle suspension were purified with 40 ml of 20 mM HEPES/NaOH pH 7.0/+0.3% Pluronic® F-68 using a tangential flow filtration system (Vivaflow 50; 100,000 MWCO PES, Sartorius vivascience GmbH, Goettingen, Germany) to adjust the pH and to eliminate PLGA monomers as well as non-encapsulated BOD. Afterwards, 480 mg EDAC and 20 mg NHS, each dissolved in the same buffer (20 mM HEPES/NaOH pH 7.0), were added to 40 ml of the suspension and incubated end-over-end for 4 h at room temperature.

To remove excess cross-linking agent, the suspension was washed twice with 40 ml 20 mM HEPES/NaOH pH 7.0/+0.3% Pluronic® F-68.

For protein coupling, 0.667 mg WGA or 2.04 mg PNA, respectively, each dissolved in 1 ml 20 mM HEPES/NaOH pH 7.0, were added to 20 ml of the purified and activated particle suspension. After overnight incubation at room temperature on an end-over-end mixer, unreacted coupling sites were saturated by addition of 244 µl ethanolamine and further incubation at room temperature for 1 h.

To purify the suspension and eliminate unreacted protein, the nanoparticle suspension was splitted in 1.5 ml aliquots and layered on top of 500 µl of a glycerine-HEPES mixture (7+3) in a 2 ml Eppendorf tube. After centrifugation (Centrifuge 5804R, Eppendorf; 30 min/14 000 rpm/4°C) the supernatant was taken off and the nanoparticle-pellets were resuspended in 500 µl of 20 mM HEPES/NaOH pH 7.0 by aid of an ultrasonic bath (Bandelin electronic DK 102 P, Berlin, Germany).

2.4. Particle Size and Zeta Potential Analysis

The respective nanoparticle suspensions were diluted tenfold with double distilled water. The mean particle size and size distribution were determined by dynamic light scattering (DLS) on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). Zeta potential analysis was carried out at 25°C in disposable capillary cells and was performed in triplicate.

2.5. Flow cytometry

The association of plain and WGA/PNA-BOD-NP with SV-HUC-1, 5637 and HT-1376 single cells was determined by flow cytometry (Epics XL-MLC analytical flow cytometer; Coulter, USA). For each measurement 2000 cells were accumulated. Fluorescence emission was detected at 525 nm (10 nm bandwidth) after excitation at 488 nm. For further calculations, the mean channel number of the logarithmic fluorescence intensities of the individual peaks was used.

Data analysis was conducted using Coulter System II Software 3.0.

To ensure comparability between the nanoparticle suspensions, dilutions exhibiting the same relative fluorescence intensity were used. These were prepared with isotonic 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 prior to all experiments and controlled on a microplate reader (Spectrafluor Fluorometer, Tecan, Austria).

2.6. Determination of the nanoparticle-binding capacity of bladder cells

For cell binding studies, 50 µl of a freshly trypsinated cell-suspension (6×10^6 cells/ml HEPES/NaOH pH 7.0) were mixed with 50 µl of the adjusted nanoparticle suspension. Following incubation for 1 h at 4°C, unbound and loosely associated particles were removed by centrifugation (5 min/1000 rpm/4°C) and washing with 20 mM HEPES/NaOH pH 7.0. The cell pellet was resuspended in buffer and analysed by flow cytometry using a forward versus side scatter gate. In order to account for the autofluorescence of the cells, unlabelled cells were included as control experiments and the obtained data subtracted from the binding data of particle-treated samples.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung BOD-beladener PLGA-Nanopartikel (BOP-NP)

Im Anschluss an die Partikelherstellung wurden Masse und Volumen der Nanopartikelsuspension bestimmt und daraus die Dichte berechnet.

Diese betrug $0,993 \text{ g/cm}^3$.

Nach 1:10 Verdünnung der Partikelsuspension mit destilliertem Wasser wurde die Partikelgröße gemessen. Zur Zeta-Potential-Analyse wurde die Partikelsuspension 1:100 verdünnt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 (Partikel vor der Kopplung) angeführt.

3.2. Lektinkopplung an die BOP-NP-Oberfläche

Als Vergleich zu den oberflächenmodifizierten Partikeln wurde ein als PLAIN bezeichneter Teil der Partikelsuspension parallel mitgeführt. Dieser erfuhr bis auf die WGA- bzw. PNA-Kopplung alle Schritte der Oberflächenmodifikation in selber Art und Weise.

Nach erfolgter Partikelherstellung wurden für alle Produkte Partikelgröße und Zeta-Potential bestimmt (Tabelle 1).

Partikel	Partikelgröße [nm]	Pdl	Zeta-Potential [mV]
Partikel vor der Kopplung	113.9	0.12	- 17.37
PLAIN-Partikel	127.4	0.11	- 16.95
WGA-gekoppelte Partikel	130.1	0.12	- 12.34
PNA-gekoppelte Partikel	133.7	0.13	- 13.71

Tabelle 1. Die Mittelwerte der Größen- und Zeta-Potential-Bestimmungen vor bzw. nach der Kopplung für unmodifizierte (PLAIN) sowie Lektin-modifizierte (WGA, PNA) Nanopartikel.

3.3. Interaktion der Nanopartikel mit Basenzellen

Da die Anzahl der Partikel pro Volumeneinheit nicht exakt bestimmt werden konnte, wurde, um eine relative Vergleichbarkeit der Partikelsuspensionen zu gewährleisten, ein Kompromiss eingegangen.

Dabei wird die Partikelzahl durch jeweils gleich hohe mittlere Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt. Zuvor musste daher die MFI der frisch hergestellten Partikelsuspension (PLAIN-NP, WGA-modifizierte NP, PNA-modifizierte NP) mittels Fluoreszenzreader (485/525 nm; Spectrafluor Fluorometer, Tecan, Austria) bestimmt werden. Ausgehend von diesen „Stammlösungen“ wurden in weiteren Schritten definierte Verdünnungen mit einer MFI von 10000, 7500, 5000 bzw. 2500 hergestellt.

Mit diesen Verdünnungen konnten im Anschluss die Zellbindungsversuche durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und Abbildung 4 zusammengefasst.

	Partikelverdünnungen [MFI]	Zell-assoziierte Fluoreszenz	STABW
SV-HUC-1 - Einzelzellen	PLAIN-Partikel		
	2500	0.7	0.3
	5000	2.6	0.3
	7500	4.5	0.4
	10000	4.6	0.2
	WGA-gekoppelte Partikel		
	2500	1.1	0.3
	5000	9.1	0.3
	7500	13.4	0.7
	10000	17.6	0.6
	PNA-gekoppelte Partikel		
	2500	1.1	0.3
	5000	2.7	0.6
	7500	4.8	0.5
	10000	5.6	0.3
	5637- Einzelzellen	PLAIN-Partikel	
2500		2.2	0.3
5000		2.8	0.1
7500		5.8	1.0
10000		7.5	0.4
WGA-gekoppelte Partikel			
2500		3.0	0.5
5000		11.6	0.4
7500		13.8	0.3
10000		24.6	0.5
PNA- gekoppelte Partikel			
2500		3.0	0.3
5000		5.8	0.6
7500		9.1	0.5
10000		16.1	0.8
HT-1376- Einzelzellen		PLAIN-Partikel	
	2500	3.6	0.4
	5000	7.7	0.7
	7500	7.9	0.2
	10000	8.7	0.2
	WGA-gekoppelte Partikel		
	2500	8.0	0.4
	5000	21.0	1.6
	7500	28.8	1.9
	10000	37.4	0.3
	PNA-gekoppelte Partikel		
	2500	6.7	0.6
	5000	17.9	0.7
	7500	28.5	1.2
	10000	33.9	1.5

Tabelle 2. Nanopartikelbindung an Einzelzellen der Linien SV-HUC-1, 5637 und HT-1376.

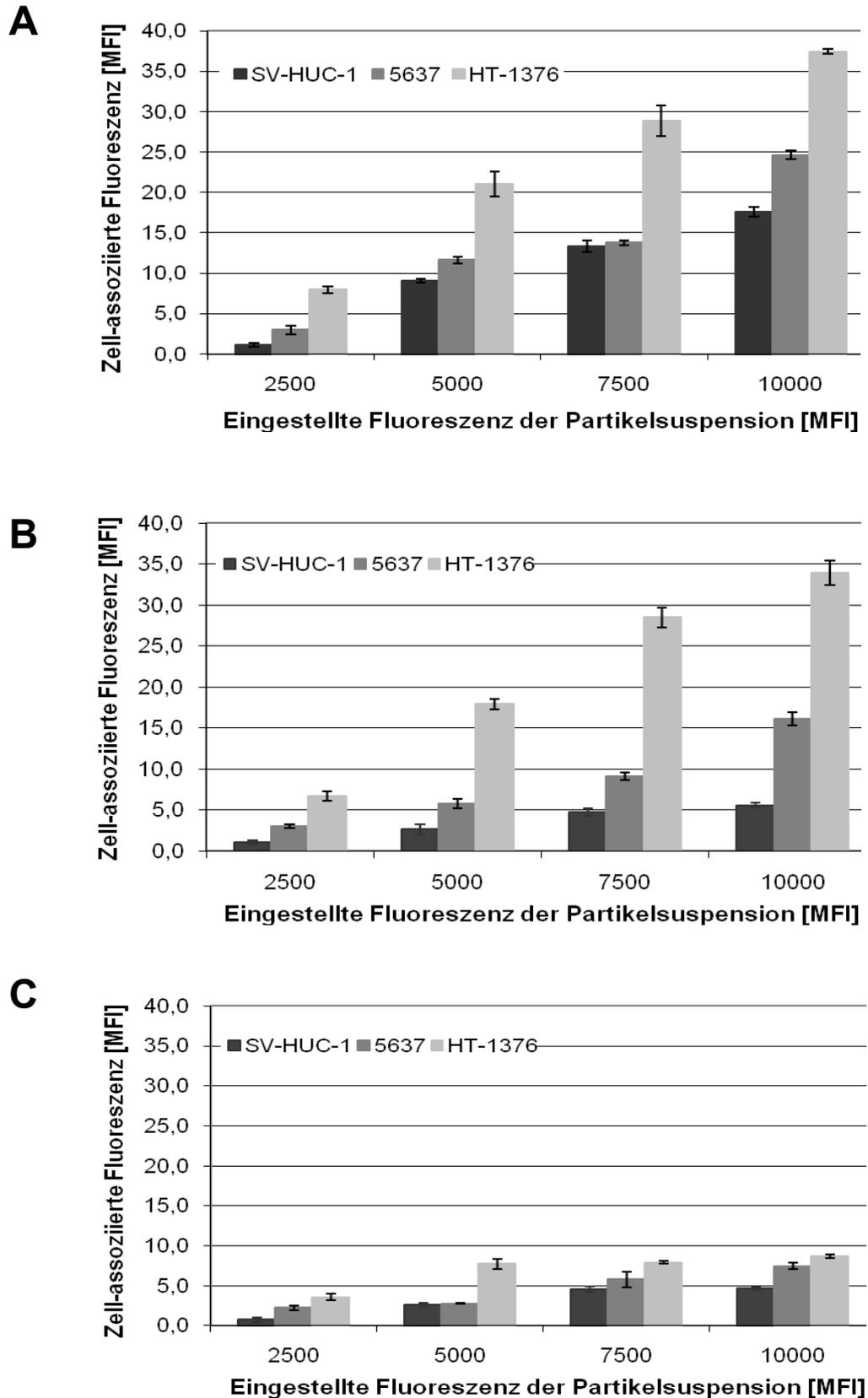


Abbildung 4. Bindung von WGA- (A) und PNA- (B) gekoppelten BOD-NP sowie Bindung der unmodifizierten PLAIN-(C) Partikel an unterschiedlichen Blasenzelllinien (SV-HUC-1, 5637, HT-1376) dargestellt als mittlere zellassozierte Fluoreszenzintensität (MFI) (mean \pm SD, n = 3).

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Partikelherstellung

Die Partikel waren über die gesamte Versuchsdauer stabil und konnten ohne Probleme im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

Die Partikelgröße hatte nach der Kopplung um etwa 10 - 20 nm zugenommen, das Zeta-Potential wurde leicht positiver. Dies kann als erster Hinweis auf eine erfolgreiche Oberflächenmodifikation gewertet werden.

4.2. Nanopartikel-Bindungsstudien

WGA-modifizierte Nanopartikel zeigten bei allen Zelllinien (SV-HUC-1, 5637, HT-1376) die höchste Bindung. Verglichen mit den Bindungsstudien der Lektine allein, bei denen WGA an SV-HUC-1 eine bereits gute, an 5637 eine noch etwas bessere und an HT-1376 die stärkste Interaktion zeigte, konnte also für die Nanopartikel prinzipiell der gleiche Trend beobachtet werden, der jedoch weniger stark ausgeprägt war. Insbesondere der Unterschied im Ausmaß der Nanopartikelbindung zwischen SV-HUC-1 und 5637 Zellen war teilweise deutlich geringer als bei den Versuchen mit Lektin allein.

Bei den PNA-modifizierten Nanopartikeln konnte man, wie erwartet, eine Tumorgrad-abhängige Zunahme der Partikelbindung feststellen. Im Vergleich zu den Lektinbindungsstudien, bei denen PNA an SV-HUC-1 Zellen fast keine Bindung aufweist, konnte für die Nanopartikel eine etwas stärkere Interaktion nachgewiesen werden. Dies lässt sich eventuell durch ebenfalls einflussgebende Wechselwirkungskräfte zwischen Partikelmatrix und Zelloberfläche erklären, wie sie auch für die PLAIN-Partikel zu beobachten waren.

Urothel-Primärzellen

1. Einleitung

Primärzellen werden aus frisch entnommenen Gewebeproben isoliert und anschließend *in vitro* kultiviert. Sie sind daher vergleichsweise weniger lang außerhalb des Organismus bzw. ihrer natürlichen Umgebung und sollten so im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen mit immortalisierten Zelllinien eine höhere Aussagekraft für den Zustand *in vivo* haben.

Ziel der nachfolgenden Versuche war es, zunächst ein adäquates Protokoll zur Isolierung von urothelialen Primärzellen zu erstellen. Die Herausforderung bestand dabei auch darin, sowohl gesunde Blasen­zellen als auch Tumorzellen zu kultivieren, wobei beide sehr unterschiedliche Anforderungen an die Kulturbedingungen stellen können. Danach sollten analog zu den Zelllinien Lektinbindungsversuche mit WGA und PNA durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede aufzuzeigen.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Transport Medium

500 ml HBSS with Ca^{2+} and Mg^{2+} were supplemented with 5 ml 1 M HEPES/NaOH pH 7.6 and 20 KIU [kallikrein inactivating units] of aprotinin.

Stripping solution

500 ml HBSS without Ca^{2+} and Mg^{2+} were supplemented with 5 ml 1 M HEPES/NaOH pH 7.6, 20 KIU of aprotinin and 50 ml of 1% EDTA (aqueous solution).

Collagenase solution

100 U/ml collagenase type IV were dissolved in HBSS with Ca^{2+} and Mg^{2+} , supplemented with 10 mM HEPES/NaOH pH 7.6.

Cholera Toxin (CT)

1 mg of CT was dissolved in 1 ml of sterile distilled water. 150 µl of this CT solution were added to 5 ml Keratinocyte Serum-Free Medium to give a 30 µg/ml cholera toxin working stock.

Complete Keratinocyte Serum-Free Medium (cKSFM)

500 ml of KSFM were supplemented with recombinant EGF (2.5 µg, Cat. No.: 10450), BPE (25 mg, Cat. No.: 13028), 50 µl of cholera toxin working stock and 500 µl of a 10 µg/ml penicillin/streptomycin-solution in PBS.

Trypsin Inhibitor

250 mg of sojabean trypsin inhibitor (Sigma) were added to 5 ml of PBS.

Fluorescein-labelled lectins from *Triticum vulgare* (molar ratio fluorescein/protein (F/P) = 2.9) and *Arachis hypogaea* (F/P = 5.2) were purchased from Vector laboratories (Burlingame, USA).

2.2. Cell culture

Primary bladder cells were generously provided by the Department of Urology, Wilhelminenspital (Vienna, Austria). After isolation from different regions of the human urinary tract, which was done at the Department of Urology in the course of routine surgical procedures, the samples were transferred into tubes containing 15 ml of transport medium.

After transport from the hospital to the Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna (Vienna, Austria), the samples were transferred into stripping solution and left overnight at 4°C. Then the samples were shaken vigorously and put in a water bath (37°C) for approximately 20 minutes to foster detachment of the urothelial sheets from the underlying stroma. After removing the residuent stroma, all cell sheets were collected by centrifugation at 1000 rpm for 5 minutes. The cell sheets were resuspended in 2 ml collagenase solution and incubated at 37°C for about 20 minutes.

Afterwards, 3 ml of Complete Keratinocyte Serum-Free Medium (cKSFM) were added to the samples, urothelial sheets were disaggregated by gentle pipetting with a fine-tipped pastette and collected by centrifugation at 1000 rpm for 5 minutes. All the cells were then transferred into 25 cm² cell culture flasks containing 5 ml cKSFM and cultivated in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C. In order to remove unattached cells, the medium was replaced after 24 h.

Subculturing of human urothelial cells was done when the cells were almost confluent, in order to avoid contact-dependent growth inhibition. Therefore, the medium was aspirated and 2 ml of 0.1% EDTA/PBS were added to the monolayer. Thereupon the cells started to separate from each other and acquired a round shape. After about 5 minutes, the solution was aspirated and 1 ml of concentrated trypsin solution (0.25% trypsin + 0.02% EDTA in HBSS) was added. Within 2 minutes most of the cells detached from the surface and 2 ml Trypsin Inhibitor supplemented medium (50µl Trypsin Inhibitor, diluted into 5 ml of cKSFM) were added.

The surface of the flask was rinsed several times to detach remaining cells and the cells were resuspended via repeated pipetting. The sample was then filled up with 3 ml of Trypsin Inhibitor supplemented medium. After collecting the cells by centrifugation at 1000 rpm for 5 minutes, the cell pellet was disaggregated by gentle pipetting with a fine-tipped Pastette. Approximately 0.5×10^6 cells were transferred into new 25 cm² flasks containing 5 ml of and cultivated in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C to confluency. To guarantee optimal growth conditions the medium was exchanged every other day.

2.3. Flow cytometry

Flow cytometric analysis was carried out on an Epics XL-MLC analytical flow cytometer (Coulter, USA). Cell-bound fluorescence intensities were determined using a forward versus side scatter gate to identify the single cell population. For each measurement 2000 cells were accumulated. Fluorescence emission was detected at 525 nm (10 nm bandwidth) after excitation at 488 nm.

For further calculations, the mean channel number of the logarithmic fluorescence intensities of the individual peaks was used.

Data analysis was conducted using Coulter System II Software 3.0.

2.4. Determination of the lectin-binding capacity of primary bladder cells

Binding of lectins to the surface of bladder cells was investigated in single cell populations via flow cytometric analysis. Cells were harvested by trypsination, collected via centrifugation, and processed immediately.

50 μl of cell suspension (6.0×10^6 cells/ml) were mixed with 50 μl of the respective lectin (25 pmol/50 μl) in PBS. After incubation for 30 minutes at 4 °C, the cells were washed with cold PBS to remove any unbound lectin. Then, the relative cell-associated fluorescence intensity (RFI) was determined by flow cytometry.

In order to account for the auto fluorescence of the cells, unlabeled cells (without lectin) were included in the measurements as a control and the obtained data were subtracted from the binding values determined after lectin incubation.

3. Ergebnisse

3.1 Kultivierung der Primärzellen

Zunächst musste das Kultivierungsprotokoll optimiert werden, da unterschiedliche Arten von endogenen bzw. exogenen Infektionen die Zellen am Wachstum hinderten.

Dazu wurden unterschiedliche Antibiotika in ansteigenden Konzentrationen untersucht. Eine Mischung von Penicillin und Streptomycin in einer Konzentration von je 10 $\mu\text{g/l}$ führte dabei zu den besten Ergebnissen. Diese Mischung sollte dem Complete Keratinocyte Serum-Free Medium erst möglichst kurz vor Verwendung zugesetzt werden. In weiterer Folge konnte die Anzahl an Infektionen deutlich verringert und somit die Zellen längere Zeit in Kultur gehalten werden. Allerdings wurden Wachstumsgeschwindigkeit und Kulturerfolg von jedem Antibiotikum in gewissem Ausmaß negativ beeinflusst.

3.2 Untersuchung der Lektinbindung an primären Blasenzellen

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnten die Zellen von zwei Gewebeproben so lange kultiviert werden, bis die Zellzahl für Lektinbindungsstudien ausreichte. Aus diesem Grund haben die nachfolgenden Ergebnisse nur eine begrenzte Aussagekraft. Es lässt sich allerdings ein erster Trend ablesen.

Probe 1

Bei diesem Gewebestück für die Gewinnung von Primärzellen handelte es sich um ein Stück Blasenhal (ca. 5 x 5 x 5 mm) einer 73-jährigen Patientin, das aus einem morphologisch gesund erscheinenden Bereich der Blasenwand reseziert wurde.

Probe 2

Auch bei diesem Gewebestück handelte es sich um ein Stück gesundes Urothel (ca. 3 x 3 x 5 mm), das von einer 58-jährigen Patientin stammte.

Die Analysen erfolgten nach 20-tägiger Kultivierung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Probe 1	Mittelwert [MFI]	STABW
WGA	744,9	22,1
PNA	1,9	0,1
Probe 2	Mittelwert [MFI]	STABW
WGA	47,3	1,2
PNA	0,7	0,0

Tabelle 3. Zusammenfassung des Lektinbindungspotentials von zwei Primärzellproben, entsprechend gesundem Urothel.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die Kultivierung primärer Blasen­zellen über einen längeren Zeitraum stellte sich zunächst als sehr schwierig heraus. Nach der Vorgabe aus Literaturquellen wurden die Primärzellen initial ohne Antibiotika kultiviert und waren daher sehr anfällig für jede Art von Infektion.

Desweiteren dauerte es mindestens eine Woche, bis ein konfluenter Monolayer entstand. Dies dürfte auf die doch relativ geringe Anzahl an Zellen zurückzuführen sein, die aus einem Sample isoliert werden konnte. Durch die lange Kultivierungsdauer war das Risiko einer Infektion natürlich weiter erhöht, wobei jedoch oftmals bereits im Primärmaterial vorhandene Kontaminationen ausschlaggebend gewesen sein dürften.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit ist es nicht gelungen, Proben von Tumorgewebe in Kultur zu nehmen. Daher gibt es diesbezüglich auch keine Lektinbindungsversuche. Die Zellen lagen hier zumeist in einem stärker ineinander verwachsenen Gewebeverband vor, was die Isolierung ausreichender Zellzahlen weiter erschwerte.

Nach ersten Ergebnissen der Lektinbindungsuntersuchung kann der prinzipielle Trend, dass WGA für gesundes Urothel eine sehr hohe Affinität aufweist, PNA hingegen kaum bindet, bestätigt werden.

Die Tumorgrad-abhängige Bindungsaffinität von PNA konnte im Rahmen dieser Diplomarbeit jedoch noch nicht an Primärzellen gezeigt werden, da die entsprechenden Vergleichssamples fehlten.

LITERATURVERZEICHNIS

[1] Thews, Mutschler, Vaupel:

Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1999; 5: 439, 440.

[2] Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G:

Cell biology and physiology of the uroepithelium.

Am J Physiol Renal Physiol. 2009; 297: F1477.

[3] Jocham, Miller: Praxis der Urologie, Band II.

Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 2007; 3: 63 - 65, 89 - 119.

[4] Scholz M, Bucher A, De Santis M, Klimpfinger M: Leitlinie Blasenkarzinom.

Journal für Urologie und Urogynäkologie 2010; 17: 23.

[5] Nultsch: Allgemeine Botanik.

Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 2001; 11: 50.

[6] Ohyama C: Glycosylation in bladder cancer.

Int J Clin Oncol 2008; 13: 308.

[7]

www.lgcstandards-

atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-9520&Template=cellBiology (Sa. 11.12.2010)

[8]

www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=35&from=cell_line_index&select=digit&term=&preselect=human;hamster;mouse;rat;insect;other&firstload=0 (Sa. 11.12.2010)

[9]

www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=397&from=cell_line_index&select=H&term=&preselect=human;hamster;mouse;rat;insect;other&firstload=0 (Sa. 11.12.2010)

[10] Southgate J, Masters JRW and Trejdosiewicz LK:

Culture of human urothelium. Culture of Epithelial Cells 2002 Wiley-Liss; 381.

[11] Southgate J et al:

Differentiation potential of urothelium from patients with benign bladder dysfunction. BJU International 2007; 99: 1506.

[12] Fillafer C, Friedl DS, Ilyes AK, Wirth M, Gabor F:

Bionanoprobes to study particle-cell interactions.

J Nanosci Nanotechnol. 2009; 9: 3239.

LEBENS LAUF



PERSÖNLICHE DATEN

Name	Agnes Zidar
Adresse	Wienerwaldgasse 424, 3034 Maria Anzbach
Geburtsdatum	26. Jänner 1984
Geburtsort	St. Pölten
Staatsbürgerschaft	Österreich
Eltern	Mag. Peter Zidar Elisabeth Zidar, geb. Frei
Geschwister	Jakob (1981), David (1986), Pia (1989), Lina (1992)

AUSBILDUNG

1990 - 1994	Volksschule, Maria Anzbach
1994 - 1998	Bundesrealgymnasium mit naturwissenschaftlichem Schwerpunkt, St. Pölten - Josefstraße
1998 - 2003	Höhere Bundes- Lehr- und Versuchsanstalt für chemische Industrie, Wien - Rosensteingasse
Ab Okt. 2004	Pharmaziestudium an der Universität Wien, Wien - Althanstraße
März - Okt. 2009	Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien

BERUFSERFAHRUNG

2000 - 2002	Drei Monate Ferialpraxis im Bereich Qualitätskontrolle, Voestalpine Krems Finaltechnik GmbH
Sept. 2003 - Okt. 2004	Forschung und Entwicklung, Zuckerforschung Tulln GesmbH
Ab 2005	Regelmäßige Ferialpraxis in der Apotheke zum heiligen Jakob, Böheimkirchen
2008 - 2010	Tutor am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Universität Wien