Institut für Humangenetik - Universitätsklinikum Ulm

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Christian Kubisch

Revertierung von Neurofibromatose Typ 1 Haploinsuffizienzeffekten durch Proteintransduktion *in vitro*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.) der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Kevin Marcel Mellert

aus Albstadt

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Dieter Kaufmann

2. Berichterstatter: PD Dr. Christiane Maier

Tag der Promotion: 21.02.2014

Teile der Dissertation werden voraussichtlich noch veröffentlicht werden.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Proteinersatztherapien 1
1.2 Aufnahme von Makromolekülen in eukaryotischen Zellen 1
1.2.1 Clathrin-vermittelte Endozytose 3
1.2.2 Lipid raft Endozytose 3
1.2.3 Makropinozytose/Phagozytose 3
1.2.4 Caveolin-vermittelte Endozytose 4
1.3 Protein Transduktion 4
1.3.1 Protein Transduction Domains/Cell Penetrating Peptides 4
1.3.2 Lipidshuttlesysteme 6
1.4 Photochemical internalization 7
1.5 Neurofibromatose Typ 1 9
1.6 Neurofibromin 10
1.7 Mechanosensorik und Mechanotransduktion kultivierter Zellen 11
1.8 Fragestellung 12
2 Material und Methoden 14
2.1 Material 14
2.1.1 Verwendete primäre Zellen und Zelllinien 14
2.1.2 Kits 16
2.1.3 Chemikalien und Proteine 18
2.1.4 Gebrauchsgegenstände 20
2.1.5 Puffer und Zellkulturmedien 21
2.1.6 Antikörper 23
2.1.7 Software 24
2.1.8 Geräte 25
2.1.9 Verwendete Primer 27
2.2 Methoden 27
2.2.1 Zellkultur 27
2.2.2 Quantitative real-time PCR 30
2.2.3 Migrationstests 31
2.2.4 Gesamtprotein-Isolierung 32
2.2.5 Bestimmung der Gesamtproteinmenge 32
2.2.6 Immunopräzipitation von Neurofibromin 33
2.2.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 34
2.2.8 Western Blot 35
2.2.9 Silberfärbung von Acrylamidgelen 35
2.2.10 Kombinierte SDS-PAGE und Blot im Invitrogen-System 36
2.2.11 Direkte Immunofärbung mit Anti-Aktin-FITC Antikörpern (AAF) 38
2.2.12 Transduktion von Proteinen *in vitro* 39
2.2.13 Detektion von Lysosomen 42
2.2.14 Durchflusszytometrie-Versuche 42
2.2.15 Fluoreszenzmessung an Zelllysaten 42
2.2.16 Chloroquin- und TAT-HA2-Behandlung von Fibroblasten 43
2.2.17 Photochemical internalization (PCI) 43
2.2.18 Toxizitätsbestimmung durch Trypanblaufärbung 44
2.2.19 Messung des PCI-Effektes 44
2.2.20 β-Galaktosidase Aktivitätstest 45
2.2.21 Aufreinigung von synNF1 aus Insektenzellen 46
2.2.22 *NF1* knockdown durch siRNA Transfektion 47
2.2.23 Ausrichtung von Fibroblasten 47
2.2.24 Versuchsaufbau: Ausrichtung synNF1 transduzierter, PCI-behandelter Patientenfibroblasten 52
2.2.25 Versuchsaufbau: Phänotyprevertierung durch synNF1 Transduktion 53
2.2.26 Versuchsaufbau: Phänotyprevertierung durch TATsynNF1eGFP Inkubation 54
2.2.27 Statistik 54
3 Ergebnisse 55
3.1 Etablierung der Transduktion von Neurofibromin in lebende Zellen *in vitro* 55
3.1.1 Charakterisierung der Neurofibrosarkomzelllinie NFS4 55
3.1.2 Transduktion von Proteinen in lebende Zellen 59
3.1.3 Untersuchungen zur Freisetzung endosomal eingeschlossener, transduzierter Proteine 71
3.1.4 Photochemical internalization in Verbindung mit CPP-vermittelter Proteintransduktion 73
3.2 Synthetisch hergestelltes Neurofibromin 84
3.2.1 Isolierung von synNF1eGFP aus transfizierten HEK-Zellen 85
3.2.2 Isolierung von nicht fluoreszierendem synthetischen Neurofibromin (synNF1) aus Insektenzellen 87

3.3 Entwicklung eines zellulären Readoutsystems ... 89
3.3.1 Entwicklung eines Messsystems zur Messung des zellulären Phänotyps der partiellen mechanosensorischen Blindheit in *NF1*+/- Fibroblasten ... 89
3.4 Revertierung von *NF1*-Haploinsuffizienzeffekten durch Neurofibromintransduktion ... 96
3.4.1 Untersuchung der Funktion von Neurofibromin als Regulator der Zellausrichtung in Fibroblasten ... 96
3.4.2 Ausrichtung von *NF1* siRNA transfizierten Fibroblasten ... 98
3.4.3 Transduktion von synNF1eGFP in *NF1* Patientenfibroblasten ... 99
3.4.4 Zellausrichtung nach Transduktion von synNF1 in Patientenfibroblasten ... 100
3.4.5 Einfluss der PCI auf die Ausrichtung von Fibroblasten an Untergrundstrukturen ... 102
3.4.6 Revertierung der partiellen mechanosensorischen Blindheit in NF1 Patientenfibroblasten ... 105
3.4.7 NF1 knockdown und Phänotyprevertierung durch synNF1 Transduktion mit PCI-Behandlung ... 106
3.4.8 SynNF1 Transduktion revertiert die durch PCI induzierte Zellausrichtungsstörung ... 108
3.4.9 Messungen von phosphoryliertem ERK 1/2 nach synNF1-Transduktion ... 109
3.5 Transduktion von TAT-synNF1eGFP in KF3 Fibroblasten ... 110
4 Diskussion ... 113
4.1 Neurofibrosarkomzellen ... 113
4.2 Transduktion eines fluoreszenzmarkierten Anti-Aktin Antikörpers (AAF) in lebende Zellen ... 115
4.3 Transduktionen mit Proteoducin ... 116
4.4 Transduktion von Atto488-BSA in NFS4 Migr Zellen mit unterschiedlichen Transduktionsreagenzien ... 118
4.4.1 Die verschiedenen Systeme ... 118
4.5 Endosomale Lokalisation ... 119
4.6 Die Effizienz der Proteintransduktionen ... 119
4.6.1 Reproduzierbarkeit ... 119
4.6.2 Allgemein hoher Prozentsatz transduzierter Zellen ... 120
4.6.3 Unterschiede in der Toxizität ... 120
4.6.4 Menge des transduzierten Proteins ... 121
4.6.5 Freisetzung endosomal eingeschlossener Proteine ... 122
4.7 Photochemical internalization (PCI) ... 123
4.7.1 Die PCI Lampe ... 123
4.7.2 Abhängigkeit zwischen Photosensitizerkonzentration, Lampenstärke und PCI-Effekt ... 124
4.7.3 PCI an unterschiedlichen Zelltypen ... 125
4.7.4 Toxizität der PCI ... 125
4.7.5 PCI nach Atto488-BSA Transduktion mittels verschiedener Transduktionsreagenzien ... 126
4.7.6 Kombination aus Atto488 und $TPPS_4$ als Photosensitizer ... 127
4.7.7 Aktivität transduzierter Proteine nach PCI-Behandlung ... 127
4.8 Synthetisch hergestelltes Neurofibromin ... 129
4.9 Entwicklung eines zellulären Readoutsystems ... 131
4.9.1 Optimale Ausrichtungszeit ... 131
4.9.2 Unterschiede zwischen *NF1*+/+ und *NF1*+/- Fibroblasten ... 132
4.9.3 Problematik der Umrandung von Zellkonturen als Messmethode ... 133
4.9.4 Entwicklung einer verbesserten Auswertmethode zur Bestimmung des Abweichungswinkels der Fibroblasten ... 134
4.10 Revertierung von *NF1*-Haploinsuffizienzeffekten durch Neurofibromintransduktion ... 135
4.11 Untersuchung der Funktion von *NF1* in der Regulation der Zellorientierung an Untergrundstrukturen in Fibroblasten ... 137
4.12 Transduktion von synNF1eGFP ... 138
4.12.1 Zellausrichtung von *NF1*-Patientenfibroblasten nach synNF1 Transduktion mit und ohne PCI ... 138
4.13 Einfluss der PCI auf die Zellausrichtung ... 139
4.14 Phänotyprevertierung durch synNF1 Transduktion in siRNA transfizierten KF3 Fibroblasten ... 140
4.15 Messung der Änderung von phosphoryliertem ERK 1/2 durch synNF1 Transduktion mit und ohne PCI ... 141
4.16 Verwendung eines Fusionsproteins aus TAT, synNF1 und eGFP ... 142
4.16.1 Allgemeine Überlegung ... 142
4.17 Revertierung der knockdown induzierten Verschlechterung des Abweichungswinkels ohne und mit PCI-Behandlung ... 143
4.18 Offene Fragen ... 144
4.19 Fazit und Schlussfolgerung ... 144
4.20 Anwendbarkeit der PCI *in vivo* ... 146
4.21 Ausblick ... 147
5 Zusammenfassung ... 149
6 Literatur ... 151
7 Anhang – Ergänzende Abbildungen ... 165

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
AAF	Anti-Aktin-FITC Antikörper
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AP2	Adaptin-Komplex
AT	annealing temperature
bFGF	basic fibroblast growth factor
BP	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCP	Clathrin-coated pit
CCV	Clathrin-coated vesicle
cDNA	complementary DNA
CPP	cell penetrating peptide
DAPI	4‘,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol

ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced GFP
EP	Endo-Porter
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ERT	Enzymersatztherapie
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FPLC	fast protein liquid chromatography
GAP	GTPase activating protein
GFP	green fluorescent protein
GRD	GAP-related domain
GTP	Guanosintriphosphat
HA2	Hemagluttinin2
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IPSC	induced pluripotent stem cell
IWP	Immunopräzipitations-Waschpuffer
kDa	Kilodalton
LPA	lysophosphatidic acid
LR	Lysotracker red
M6P	Mannose-6 Phosphat
mA	Milliampere
MAPK	mitogen activated protein kinase

MM	Makromolekül
mRNA	messenger RNA
PBS	phosphate buffered saline
PCI	photochemical internalization
PCR	polymerase chain reaction
PDMS	Polydimethylsiloxan
PDT	photodynamic treatment
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
synNF1	synthetisch hergestelltes Neurofibromin
TAT	Trans-Activator of Transcription
TPP	Tetraphenylporphyrin
$TPPS_4$	5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonato-phenyl)-21,23H-porphyrin
ÜKT	Überkopftaumler
UV	ultraviolett
YFP	yellow fluorescent protein

1 Einleitung

1.1 Proteinersatztherapien

Die ersten erfolgreichen Proteinersatztherapien (Enzymersatztherapien (ERT)) für die Behandlung genetischer Erkrankungen des Menschen wurden in den 1970er Jahren beschrieben [14-15]. Die in Morbus Gaucher Patienten mangelnde Glucocerebrosidase wurde aus humanen Plazenten isoliert und Patienten durch Infusion zugeführt [14, 94]. Bis heute ist das Spektrum der durch Proteinersatztherapien behandelbarer Krankheiten deutlich angestiegen [27, 42]. Neben der Behandlung von Morbus Gaucher, Morbus Fabry, Morbus Pompe und verschiedener Mucopolysaccharidosen finden sich auch Ersatztherapien von Blutgerinnungsfaktoren, beispielsweise für Patienten mit Hämophilie A oder Willebrand-Jürgens-Syndrom [91, 95, 135]. Die durch ERT gut behandelbaren Krankheiten werden durchweg autosomal rezessiv vererbt, meist handelt es sich um die Behandlung lysosomaler Speichererkrankungen oder den Ersatz von Blutbestandteilen. Die Proteine, die durch ERTs ersetzt werden, wirken entweder extrazellulär oder im endolysosomalen System. Während extrazellulär wirkende Proteine durch intravenöse Applikation direkt ihren Wirkort erreichen, müssen lysosomal wirkende Proteine von Zellen aufgenommen werden, um ihren finalen Zielort zu erreichen. Diese Aufnahme lysosomal wirkender Proteine in Zellen wird über enzymeigene Mannose-6 Phosphate (M6P) gewährleistet, die an M6P-Rezeptoren an der Zelloberfläche binden können. Durch diese Bindung wird eine endozytotische Aufnahme der Proteine induziert, was dazu führt, dass diese Proteine ihren Zielort, die Lysosomen, erreichen [39, 68].

1.2 Aufnahme von Makromolekülen in eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen nehmen Makromoleküle hauptsächlich über 3 verschiedene Endozytosemechanismen ins Zellinnere auf: Makropinozytose, Caveolin- und Clathrin-vermittelte Endozytose [18, 136]. Besonders spezialisierte Zellen, wie Makrophagen, sind zusätzlich in der Lage, relativ große Festköper durch Phagozytose aufzunehmen [1]. Die Abbildung 1 stellt schematisch die Clathrin-

und Caveolin-vermittelte sowie die Clathrin und Caveolin unabhängige Endozytose und den Verbleib der entstehenden Vesikel dar [107].

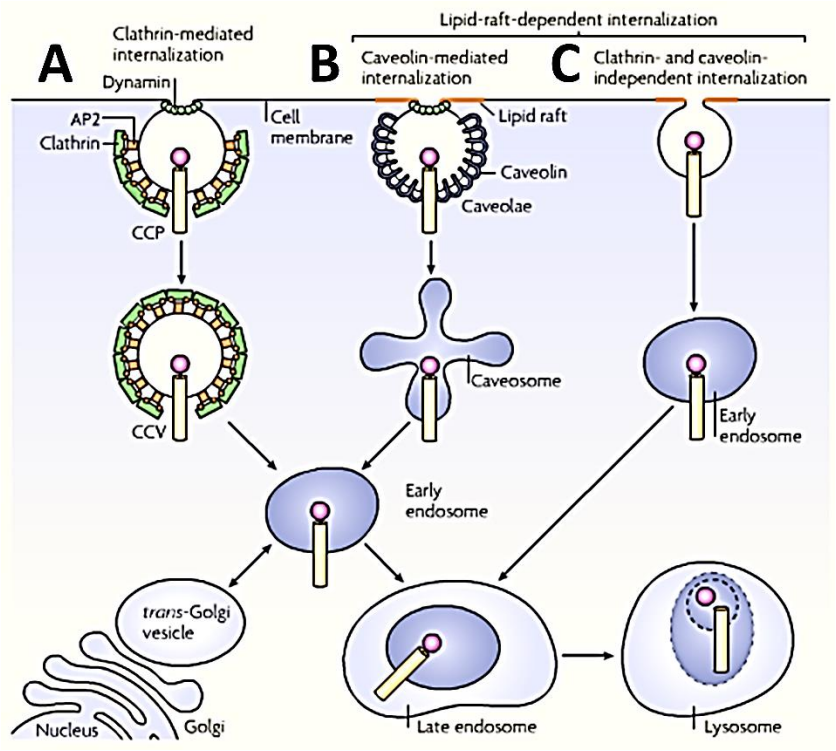

Abb. 1: Verschiedene Endozytosemechanismen. Schematisch dargestellt sind die (A) Clathrin-vermittelte Endozytose, (B) Caveolin-vermittelte Endozytose und (C) Clathrin und Caveolin unabhängige Endozytose (Ausschnitt aus [107]; Mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Molecular Cell Biology] (Schutze et al, Nat Rev Mol Cell Biol 9(8): 655-662.), copyright (2008)). Die gebildeten intrazellulären Vesikel fusionieren unabhängig vom Aufnahmemechanismus mit frühen Endosomen. Diese werden durch Ansäuerung zu späten Endosomen transformiert. Nach Fusion lysosomaler Vesikel entsteht das Lysosom, in dem der Abbau der aufgenommenen extrazellulären Stoffe (Proteine, Lipide, DNA) stattfindet.

(A) Über Adaptin-Komplexe (AP2) gebundene Clathrin Trimere (Clathrin) bewirken eine Einstülpung der Plasmamembran (CCP = Clathrin-coated Pits). Nach Dynamin-vermittelter Abschnürung dieser Einbuchtungen entstehen Clathrin beschichtete Vesikel (CCV = Clathrin-coated vesicles). Nach Ablösung der Adaptin-Komplexe und des Clathrins fusionieren die Vesikel mit dem frühen Endosom.

(B) Durch Einlagerung von Caveolin vorgeformte Einbuchtungen (Caveolae) werden Dynamin-vermittelt ins Zellinnere abgeschnürt. Die gebildeten Caveosomen verschmelzen im weiteren Verlauf mit frühen Endosomen.

(C) Bei der noch nicht besonders gut verstandenen Clathrin und Caveolin unabhängigen Endozytose spielen lipid rafts bei der Bildung der Vesikel eine Rolle. Die Abschnürung der Vesikel ist Dynamin unabhängig und daher möglicherweise Ergebnis zufälliger Membranbewegungen. Im Verlauf findet auch hier eine Fusion der entstehenden Vesikel mit frühen Endosomen statt.

1.2.1 Clathrin-vermittelte Endozytose

Die Clathrin-vermittelte Endozytose bezeichnet eine Aufnahme von rezeptorgebundenen Proteinen durch eine Interaktion von Ligand, Rezeptor und den intrazellulären Adaptin-Komplexe und Clathrin. Während am extrazellulären Teil des Rezeptors der Ligand binden kann, bindet am intrazellulären Teil der Adaptin-Komplexe. Adaptin rekrutiert Clathrin, welches als dreiarmiges Molekül in Form von Triskelen vorliegt. Getrieben von der räumlichen Struktur der Clathrin-Triskele und ihrer internen Bindungsmöglichkeiten bildet sich eine Kugelform [127]. Durch die Verbindung über Adaptin und Rezeptor folgt die Plasmamebran dieser Kugelbildung indem sich zunächst eine Einstülpung der Membran bildet, die schlussendlich in der Dynamin-vermittelten Abschnürung eines Vesikels in das Zellinnere mündet [30]. Im weiteren Verlauf lösen sich die Adaptin-Komplexe und Clathrin Moleküle wieder von den Vesikeln und die Vesikel fusionieren mit dem frühen Endosom [100]. Durch langsames Ansäuern des Endosomenlumens werden die Liganden von den Rezeptoren gelöst. Die Rezeptoren selbst werden durch Abschnürung von Vesikeln, die wieder mit der Plasmamembran der Zelle fusionieren, recycelt. In der Folge fusionieren lysosomale Vesikel mit dem nunmehr angesäuerten Endosom (spätes Endosom) und bringen auf diesem Weg pH-abhängige Hydrolasen in das Lumen des späten Endosoms, was dieses zum Lysosom transformiert. Die rezeptorvermittelt eingeschleusten Proteine (Liganden) werden schließlich durch pH-abhängige Proteasen degradiert und als einzelne Aminosäuren beziehungsweise sehr kurze Peptide ins Zytoplasma entlassen [97].

1.2.2 Lipid raft Endozytose

Unter dem Oberbegriff lipid raft Endozytose werden Clathrin-unabhängige Endozytosemechanismen zusammengefasst. Hierzu zählen die Makropinozytose, Endozytose über Caveolae und die bislang wenig verstandenen Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Aufnahmemechanismen von Makromolekülen in Zellen [77]. Als lipid rafts (Lipidflöße) werden Bereiche der Zellmembran bezeichnet, die aufgrund einer Anreicherung von Cholesterin, Sphingolipiden und Glykolipiden als zusammenhängende Strukturen zumindest zeitweise bestehen bleiben [63, 124].

1.2.3 Makropinozytose/Phagozytose

Makropinozytose und Phagozytose folgen an sich demselben Mechanismus. Getrieben durch verstärkte Aktinpolimerisation bilden sich Zellausläufer

(Pseudopodien). Im Falle der Phagozytose führen diese zum „Umfließen“ von großen Partikeln (wie Bakterien), im Falle der Makropinozytose werden Flüssigkeitströpfchen eingeschlossen. Die entstehenden Vesikel werden in das Zellinnere abgegeben und folgen entweder dem endolysosomalen Abbauweg (siehe Clathrin-vermittelte Endozytose) oder werden zurück zur Plasmamembran transportiert, was zur Exozytose des Inhaltes führt [61].

1.2.4 Caveolin-vermittelte Endozytose

Die Einlagerung von Caveolin in die Zytoplasmamembran führt zur Bildung von Einbuchtungen, den sogenannten Caveolae. Induziert durch Bewegung der Plasmamembran kann die Membran im Bereich der Öffnung dieser Caveolae fusionieren, was zur Bildung von Vesikeln führt, die die jeweiligen im Außenmedium der Zelle gelösten Stoffe enthalten. Das Schicksal dieser Vesikel ist nicht vollständig geklärt. Neben endolysosomalem Abbau wird diskutiert, dass es abhängig vom Inhalt zur Exozytose, Transzytose, einer Fusion mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder zur Freisetzung des Inhaltes ins Zytoplasma kommen kann [62, 83].

Die natürlich vorkommenden Aufnahmemechanismen von Makromolekülen in lebende humane Zellen eignen sich für Proteinersatztherapien, um Proteine einzuschleusen, die in Endo- und Lysosomen wirken. Möchte man Proteine mit anderen Wirkorten ersetzen, müssen alternative Aufnahmewege oder Möglichkeiten zur Freisetzung der endolysosomal gespeicherten Proteine angewendet werden. Eine mögliche Lösung dieses Problems bietet die Protein Transduktion. Hierbei werden Aufnahmemechanismen genutzt oder imitiert, bei denen natürlicherweise Proteine funktionsfähig in verschiedene Zellen eingeschleust werden.

1.3 Protein Transduktion

1.3.1 Protein Transduction Domains/Cell Penetrating Peptides

Die Einschleusung von Proteinen in lebende Zellen erfuhr mit der Entdeckung der protein transduction domain (PTD) des TAT-Proteins (Trans-Activator of Transcription) des HI-Virus eine bahnbrechende Weiterentwicklung. Im Vermehrungszyklus des HIV wird das komplette TAT-Protein in HIV infizierten T-

Lymphozyten gebildet und aus diesen ausgeschleust. Folgend wird es vermittelt durch die PTD des TAT-Proteins von anderen oder denselben wieder aufgenommen. Die Translokation des TAT-Proteins in den Kern führt schließlich zu einer starken Transkriptionsaktivierung des HIV in der Zielzelle [33, 43, 55]. In nicht HIV infizierten T-Lymphozyten hat das komplette TAT-Proteine zusätzlich eine toxische Wirkung, indem es Apoptose auslöst [17]. Chen und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Auslösung von Apoptose durch das Ende der sogenannten Region II und die Region III (also ein Peptid im Bereich der Aminosäuren 30-47 des TAT-Proteins) vermittelt wird [20]. Eine Sequenz von circa 12 Aminosäuren (Aminosäuren 48-60 des TAT-Proteins (Region IV)) wurde identifiziert, die für eine Aufnahme von TAT in eine Vielzahl verschiedener Zellen verantwortlich ist [129]. Diese Aminosäuresequenz wurde als PTD des TAT-Proteins definiert. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Fusionsproteine mit dieser TAT-PTD ebenfalls in verschiedene Zelltypen aufgenommen werden [3, 19, 92, 121]. Obwohl im Verlauf der folgenden Jahre viele weitere natürlich vorhandene und artifizielle PTDs entdeckt und exzessiv untersucht wurden, ist der genaue Aufnahmeweg dieser auch cell penetrating peptides (CPPs) genannten Peptide bis heute nicht zufriedenstellend aufgeklärt [86, 121]. Zunächst wurde von einer CPP-ausgelösten direkten Translokation durch Plasmamembran ausgegangen, was als Transduktion bezeichnet wurde [122]. Hierfür sprach, dass CPP-GFP-Fusionsproteine nach Behandlung der Zellen auch im Zellinneren detektiert werden konnten, wenn die Transduktionsversuche bei 4°C oder unter Verwendung von Endozytoseinhibitoren durchgeführt wurden. Später zeigte sich in Untersuchungen an lebenden Zellen *in vitro* jedoch, dass es sich bei vielen Daten zur Endozytose unabhängigen Aufnahme von CPP-Fusionsproteinen höchstwahrscheinlich um Artefakte handelte, die durch die Fixierung der Zellen vor der Fluoreszenzmikroskopie verursacht wurden [31]. Live cell imaging ermöglichte Beobachtungen an unfixierten Zellen *in vitro* und führte im Folgenden dazu, dass von einer ausschließlichen Aufnahme der CPPs über verschiedene Formen der Endozytose ausgegangen wurde. Auch wenn Makropinozytose als Hauptaufnahmeweg postuliert wurde, führten Inhibierungen von Clathrin- oder Caveolin-vermittelter Endozytose ebenfalls zu verringerten Aufnahmeraten. Der erfolgreiche Nachweis verschiedener CPP-fusionierter Targets im Zytoplasma der Zielzellen und deren Aktivität wurden dahingehend ausgelegt, dass sowohl eine

endosomale als auch in geringem Maße eine direkte Aufnahme in Zellen durch CPPs ausgelöst wird.

Dass endosomal aufgenommene Proteine nicht ausschließlich in Lysosomen degradiert werden, wurde am Beispiel des Shiga Toxins gezeigt. Die B-Einheit dieses von Shigellen produzierten Toxins erfährt nach endosomaler Aufnahme einen retrograden Transport von frühen Endosomen zum Golgi-Apparat [37, 73]. Denkbar wäre es daher, dass CPP-vermittelt eingeschleuste Proteine teilweise über diesen oder ähnliche Wege der Degradation in Lysosomen entgehen. CPPs konnten auf der Basis natürlich vorkommender Peptide auch synthetisch hergestellt werden, was aktuell zu einer sehr hohen Anzahl verschiedener PTDs geführt hat. Als ausschlaggebend für die Einschleusefähigkeit von CPPs in viele verschiedene humane und murine Zelltypen wurden mehrere positive Ladungen klassifiziert, die zur Aufnahmeinduktion erforderlich sind. Als einfachste der hergestellten CPPs dienen Polyarginine, Ketten, die typischerweise aus 7, 9 oder 11 hintereinandergeschalteten Argininen bestehen. Durch eine Fusion dieser Polyarginine wird die Nettoladung des zu transduzierenden Proteins ins Positive verschoben [38]. Diese werden elektrostatisch von den negativen Ladungen der extrazellulären Proteoglykane angezogen [49]. Die räumliche Nähe zur Zelloberfläche führt zu einer Co-Aufnahme der Proteine bei verschiedenen Formen der Endozytose. Dass positive Ladungen ein ausschlaggebender Faktor für die Aufnahme in Zellen darstellen, wird dadurch bestärkt, dass Proteine (5-41kDa) mit starker positiver Gesamtladung auch ohne weitere Hilfsmittel von Zellen aufgenommen werden [23, 80]. Hauptproblem der endosomalen Aufnahme bleibt das sogenannte „endosomal entrapment“, das Verbleiben der eingeschleusten Proteine im endolysosomalen Aufnahme- und Abbauweg [32].

1.3.2 Lipidshuttlesysteme

In vivo treten Zell-Zellkommunikationen durch Lipidshuttles in Form von Exosomen auf. Exosomen werden von vielen verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise Mastzellen, Tumor-Zellen, dendritischen Zellen oder T-Zellen an die extrazelluläre Umgebung abgegeben [11, 102, 123, 134]. Durch diese natürlich vorkommenden Lipidshuttles können verschiedene Proteine oder auch mRNAs und siRNAs von einer Zelle in andere Zellen transferiert werden [128]. Da Exosomen in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Blutplasma oder Urin nachgewiesen

werden konnten [16, 96], scheint eine Kommunikation zwischen Zellen durch diese Vesikel auch über weite Strecken im Körper möglich.

Künstlich hergestellte Lipidshuttlesysteme werden neben CPPs häufig genutzt, um Proteine, DNA oder RNA in Zellen einzuschleusen [90, 137]. Die theoretische Funktionsweise dieser Shuttles ist es, zunächst durch Mischen synthetische Vesikel zu bilden, die im wässrigen Kern die zu transduzierende/transfizierende Substanz einschließen. Die Lipidhülle des Shuttles fusioniert entweder direkt mit der Plasmamembran der Zielzelle oder zu einem späteren Zeitpunkt nach endosomaler Aufnahme mit der Endosomen- oder Lysosomenmembran. In beiden Fällen soll die innere Fracht des Shuttles durch die Fusion mit der Membran ins Zytoplasma der Zelle transloziert werden.

1.4 Photochemical internalization

Die photochemical internalization (PCI) wurde um die Jahrtausendwende von Kristian Berg und Mitarbeitern als eine Methode entwickelt, um die Effektivität typischer Zytostatika wie Bleomycin oder Gelonin zu verbessern [6, 8]. Es war bekannt, dass diese Medikamente von Zellen endosomal aufgenommen werden und nur ein kleiner Teil davon zytotoxisch war [111]. PCI ist eine erweiterte Anwendung und Modifikation der photodynamischen Therapie (PDT), in welcher Licht-aktivierbare Substanzen (Photosensitizer (PS)) genutzt werden, um in definierten Gebieten eines Organismus durch Bestrahlung mit definierter, PS-abhängiger Wellenlänge das Absterben von Zellen zu induzieren [54, 116]. Typischerweise werden sulfonierte Tetraphenylporphyrine wie $TPPS_{2a}$ oder $TPPS_4$ oder sulfonierte Aluminium Phthalocyanine wie $AlPcS_{2a}$ als PS in der PCI eigesetzt [6, 8]. Berg und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sich PS, die sich in die Plasmamembran behandelter Zellen integrieren, im zeitlichen Verlauf in endo-lysosomalen Membranen detektieren ließen [120]. Diesen Aspekt nutzten sie, um Endosomen und Lysosomen zu destabilisieren. Da die Stabilität der Plasmamembran höher als die endolysosomaler Membranen ist, war es möglich, ohne erhebliche Toxizität für die Zellen, endosomale und lysosomale Vesikel zu zerstören und ihren Inhalt so ins Zytoplasma zu überführen [29, 112, 133]. Die Abbildung 2 zeigt die schematische Wirkweise der PCI.

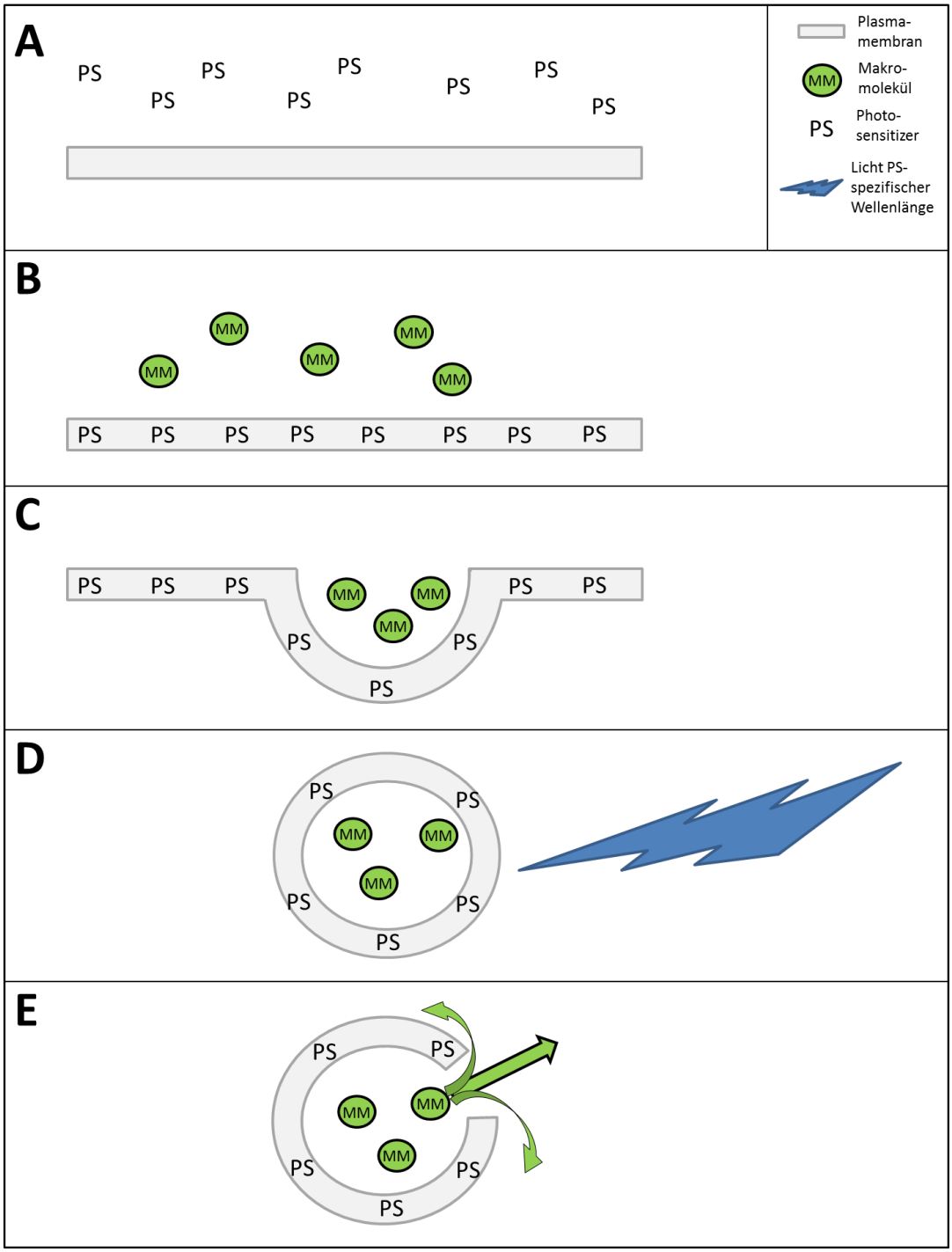

Abb. 2: Funktionsweise der photochemical internalization (PCI). (A) Zunächst werden die zu untersuchenden Zellen mit einer lichtaktiven Substanz (PS) inkubiert, welche sich (B) in die Plasmamembran der Zellen einlagert. (C) Bei endosomaler Aufnahme eines Makromoleküls (MM) wird PS ebenfalls endozytiert. (D) Belichtet man die Zellen mit Licht in PS-spezifischer Wellenlänge, kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffe. (E) Diese destabilisieren die endolysosomalen Membranen, wodurch das aufgenommene Makromolekül ins Zytoplasma gelangen kann.

PCI wurde erfolgreich in verschiedenen Xenotransplantat-Tumormodellen *in vivo* in Nacktmäusen getestet. Das Tumorwachstum konnte in diesen Mäusen durch Kombinationsbehandlungen aus Zytostatika und PCI verzögert werden. Teilweise konnte auch eine vollständige Rückbildung der Tumoren beobachtet werden [28, 89, 110]. Eine erste klinische Studie zur PCI im Menschen findet im University College London Hospital statt. Hier wird der Photosensitizer Amphinex, der wie $TPPS_4$ zur Klasse der Porphyrine zählt, zur PCI verwendet und so geprüft, ob eine Kombination aus PCI und Bleomycin-Behandlung bessere Erfolge bei der Behandlung von Krebs-Patienten hervorbringt als etablierte Behandlungen wie operative Tumorentfernung, Chemotherapie oder Bestrahlung (Studie erwähnt in [54]).

1.5 Neurofibromatose Typ 1

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine monogene, autosomal dominant vererbte Erkrankung mit einer Prävalenz von ungefähr 1 Fall auf 3500 Lebendgeburten [69]. Der genetische Hintergrund des Krankheitsbildes NF1 sind Defektmutationen oder der Verlust eines Allels des *NF1* Gens, welches auf dem Chromosom 17 gelegen ist [70]. Die Mutation hat zur Folge, dass in allen Körperzellen eine reduzierte Menge des Proteins Neurofibromin, das durch das *NF1* Gen codiert wird, funktionsfähig vorliegt. Dies führt unter anderem zu einer gesteigerten Zellproliferation, was beispielsweise in *NF1* haploinsuffizienten Astrozyten gezeigt werden konnte [47]. Neurofibromatose Typ 1 Patienten zeigen eine große Vielfalt verschiedener Symptome [57]. Sehr häufig treten Neurofibrome auf, gutartige Tumoren, die ihren Ursprung in den Schwann'schen Zellen haben, in welchen aufgrund eines „second hit" durch eine Mutation des verbliebenen *NF1* Allels ein *NF1*-/- Genotyp entsteht. Neurofibrome können vereinzelt oder auch sehr zahlreich verteilt über den gesamten Körper auftreten [60]. Sie können auch netzartig wachsen und sehr groß werden. In diesem Fall werden sie als plexiforme Neurofibrome bezeichnet. Das Risiko für maligne Tumoren ist in NF1 Patienten erhöht [64]. Ebenfalls treten weitere Hautveränderungen wie Café-au-lait-Flecken oder ein Freckling der Haut auf. Letzteres findet sich häufig unter den Armen oder im Lendenbereich. In selteneren Fällen kommt es zusätzlich zu Veränderungen des Skeletts und Pseudoarthrosen [118]. Des Weiteren findet man gehäuft

Optikusgliome und weitere Tumoren des zentralen Nervensystems [36]. Als diagnostisches Kriterium zählen ebenfalls kleine, runde und bräunliche Veränderungen der Iris, sogenannte Lisch-Knötchen, die in einer Großzahl der erwachsenen NF1 Patienten auftreten [22]. Zusätzlich zu körperlichen Symptomen werden eine leichte Progerie sowie Lern- und Konzentrationsschwierigkeiten beschrieben [114]. Während zur Behandlung der Lern- und Konzentrationsschwierigkeiten Untersuchungen zur Wirksamkeit von Methylphenidat und Lovastatin bei Kindern und Erwachsenen durchgeführt werden, gibt es ansonsten bislang keine medikamentöse Behandlung der NF1 [72, 76].

1.6 Neurofibromin

Neurofibromin ist das Protein, für welches das *NF1* Gen codiert. Mit 2818 Aminosäuren und einer Molekülmasse von ca. 320kDa zählt die häufigste Variante des Proteins zu den größten Proteinen, die in humanen Zellen vorkommen. Für das Neurofibromin wurden mehrere Funktionen beschrieben. Die bestuntersuchte Funktion ist die der „GAP-related domain (GRD)“, die im mittleren Bereich der Primärstruktur des Proteins angesiedelt ist. Diese wirkt als Ras-spezifisches GTPase aktivierendes Protein (Ras-GAP) und begünstigt in Astrozyten im Besonderen bei K-Ras den Umsatz von Ras-GTP zu Ras-GDP [26, 78]. Daher wirkt sich die Menge an endogenem Neurofibromin auf die Aktivierung des MAPK (mitogen activated protein kinase) Signalweges aus (Abbildung 3). Das am Ende dieses Signalwegs stehende ERK kann in den Zellkern eingeschleust werden und dort verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, was unter anderem die Zellproliferation beeinflusst [106].

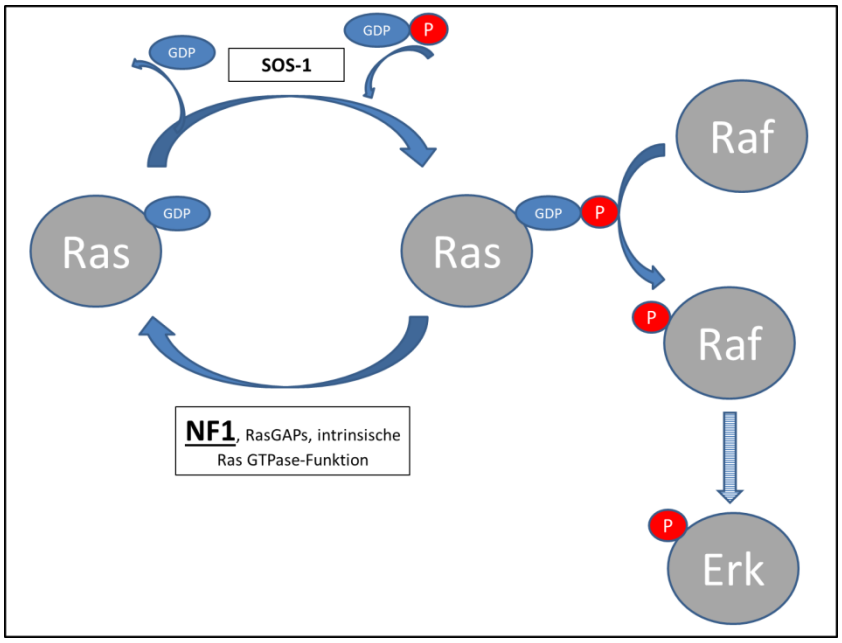

Abb. 3: Wirkweise des Neurofibromins im mitogen activated protein kinase (MAPK) Signalweg. Neurofibromin wirkt als Ras-GTPase aktivierendes Protein (Ras-GAP) und beschleunigt dadurch den Umsatz vom aktiven Ras-Guanosintriphosphat (Ras-GTP) zum inaktiven Ras-Guanosindiphosphat (Ras-GDP). Die Menge an Ras-GTP korreliert mit der Aktivität des MAPK Signalwegs, da durch Ras-GTP eine Phosphorylierungskette in Gang gesetzt wird, an deren Ende das phosphorylierte ERK steht (Die Phosphorylierungskette ist zum besseren Verständnis verkürzt dargestellt).

Als weitere Domänen des Neurofibromins wurden NF1-Sec, eine Lipid-bindende Sec14p-ähnliche und NF1-PH, eine Plextrin homologe Domäne beschrieben [24]. Zusätzliche Interaktionen konnten zwischen Neurofibromin und SPRED1, den Protein Kinasen A und C (PKA/C), Glycerophospholipiden und Caveolin-1 gezeigt werden [12, 79, 131]. Eine regulatorische Wirkung des Neurofibromins im ROCK-LIMK2-Cofilin Signalweg und eine Interaktion mit FAK (focal adhesion kinase) weisen auf eine Verbindung zwischen Neurofibromin und Zellanheftung und –ausrichtung hin, was eine Verbindung zur Mechanotransduktion und –sensorik vermuten lässt [12, 67].

1.7 Mechanosensorik und Mechanotransduktion kultivierter Zellen

Mechanosensorik und Mechanotransduktion stehen in enger Verbindung miteinander. Wenn überhaupt Abgrenzungen möglich sind, so steht die

Mechanosensorik für ein Erkennen mechanischer, äußerer Reize, während die Mechanotransduktion eine Weiterleitung der und teilweise auch eine Reaktion auf erkannte Reize beschreibt [50, 103]. Es kann sich um passive oder aktive Reize handeln. Ein passiver Reiz wäre beispielsweise die Steifigkeit des Untergrunds auf dem Zellen wachsen. Es wurde beschrieben, dass die Steifigkeit einen direkten Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen haben kann [87]. Modifiziert man die Steifigkeit der Zellkulturoberfläche, differenzieren sich Stammzellen zu Zelltypen, die im menschlichen Körper in Geweben vorkommen, die ähnliche Steifigkeiten aufweisen [34]. Ein Beispiel eines aktiven Reizes wäre die wiederholte Dehnung von Fibroblasten durch zyklischen Zug an elastischen Untergründen, auf denen diese kultiviert wurden. Diese Dehnung führt neben einer induzierten Ausrichtung zu einer Erhöhung der Spleißfehlerrate in diesen Zellen [41, 126]. Auch konnte gezeigt werden, dass sich humane Melanozyten an parallel verlaufenden Topografien im Mikrometerbereich orientieren können. Diese Orientierung war in *NF1*-haploinsuffizienten Melanozyten verändert [58].

1.8 Fragestellung

Am Beispiel der Neurofibromatose Typ 1 soll untersucht werden, ob sich Haploinsuffizienzeffekte *in vitro* durch Einschleusen des mengenmäßig reduzierten, funktionsfähigen Proteins revertieren lassen. Durch diese Untersuchungen soll überprüft werden, ob eine Proteineinschleusung als Behandlungsmöglichkeit monogener seltener Erkrankungen denkbar ist, auch wenn der Effektor des reduzierten Genproduktes zytoplasmatisch lokalisiert ist. Im Speziellen gehen die Untersuchungen der Frage nach, ob eine Proteinersatztherapie der Neurofibromatose Typ 1 grundsätzlich möglich ist. Im Einzelnen werden hierzu verschiedene Aspekte untersucht. Durch Nutzung verschiedener kommerziell erhältlicher Transduktionsreagenzien soll herausgefunden werden, ob sich verschiedene Proteine mit hoher Effektivität in verschiedene Zelltypen einschleusen lassen und ob die eingeschleusten Beispielproteine den Wirkort des Neurofibromins, das Zytoplasma der Zellen, erreichen. Im weiteren Verlauf soll der Frage nachgegangen werden, ob das sehr große synthetisch hergestellte Neurofibromin (circa 320kDa) ebenfalls in Zellen eingeschleust werden kann. Es wird zudem untersucht, ob *NF1* haploinsuffiziente

Fibroblasten einen zellulären Phänotyp der Neurofibromatose Typ 1 zeigen und ob sich read out Systeme etablierten lassen, um diesen Phänotyp zu quantifizieren. Abschließend soll überprüft werden, ob sich ein möglicher zellulärer Phänotyp der *NF1* haploinsuffizienten Fibroblasten durch Einschleusung des synthetisch hergestellten Neurofibromins revertieren lässt. Zusätzlich soll durch Western Blot Messungen geklärt werden, ob sich in *NF1*+/- Fibroblasten der beschriebene Effekt der Überaktivierung des MAPK Signalweges durch Transduktion ebenfalls revertieren lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete primäre Zellen und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten, Melanozyten und Neurofibrosarkomzellen stammen aus der Zellbank der Arbeitsgruppe Kaufmann (Institut für Humangenetik, Universität Ulm). Primäre Zellen wurden für Etablierungsversuche in den Passagen 5-15, für vergleichende Versuche in den Passagen 5-10 verwendet. Die Passagen eines Vergleichspaares unterschieden sich maximal um 1, um möglichst gleiche Grundvoraussetzungen zu gewährleisten. Alle Teilnehmer der Untersuchungen gaben ihr schriftliches Einverständnis und die Experimente wurden von der Ethikkommission der Universität Ulm genehmigt (Ethikkommission Universität Ulm, A185/09). Die HEK-293 Zellen waren eine großzügige Gabe der Arbeitsgruppe Kubisch (Institut für Humangenetik, Universität Ulm).

Tabelle 1: Verwendete primäre Zellen und Zelllinien. Angegeben sind die Bezeichnung der Zellen (Name), der Zelltyp, das ursprüngliche Gewebe, aus dem die Zellen stammen (Ursprung) und gegebenenfalls Besonderheiten.

Name	***Zelltyp***	***Ursprung***	***Besonderheiten***
NFS4	Neurofibrosarkom-zellen	Neurofibrosarkom eines 24jährigen Neurofibromatose Typ 1 (NF1) Patienten	
NFS4 Migr	Neurofibrosarkom-zellen	Neurofibrosarkom eines 24jährigen NF1 Patienten	generiert aus NFS4 Zellen durch Selektion auf gut migrierende Zellen
KF1	Fibroblasten	Vorhaut eines 3jährigen Jungen	*NF1* +/+
KF2	Fibroblasten	Hautstanze eines 40jährigen Mannes	*NF1* +/+

Name	***Zelltyp***	***Ursprung***	***Besonderheiten***
KF3	Fibroblasten	Vorhaut eines 3jährigen Jungen	*NF1* +/+
K5	Fibroblasten	Hautstanze eines 31jährigen Mannes	*NF1* +/+
K8	Fibroblasten	Hautstanze eines 23jährigen Mannes	*NF1* +/+
K9	Fibroblasten	Hautstanze einer 22jährigen Frau	*NF1* +/+
K14	Fibroblasten	Vorhaut eines 11jährigen Jungen	*NF1* +/+
K17	Fibroblasten	Vorhaut eines 3jährigen Jungen	*NF1* +/+
K19	Fibroblasten	Hautstanze eines 40jährigen Mannes	*NF1* +/+
K20	Fibroblasten	Hautstanze einer 24jährigen Frau	*NF1* +/+
K23	Fibroblasten	Hautstanze einer 55jährigen Frau	*NF1* +/+
K24	Fibroblasten	Hautstanze einer 29jährigen Frau	*NF1* +/+
NF82b	Fibroblasten	Haut eines 31jährigen NF1 Patienten	*NF1* +/-
NF82c	Fibroblasten	Haut eines 18jährigen NF1 Patienten	*NF1* +/-
NF84a	Fibroblasten	Haut einer 52jährigen NF1 Patientin	*NF1* +/-
NF183	Fibroblasten	Haut einer 26jährigen NF1 Patientin	*NF1* +/-
NF193	Fibroblasten	Haut einer 57jährigen NF1 Patientin	*NF1* +/-

Name	*Zelltyp*	*Ursprung*	*Besonderheiten*
NF196	Fibroblasten	Haut einer 32jährigen NF1 Patientin	*NF1* +/-
NF213	Fibroblasten	Haut eines 40jährigen NF1 Patienten	*NF1* +/-
NF324	Fibroblasten	Haut eines 39jährigen NF1 Patienten	*NF1* +/-
NF329	Fibroblasten	Haut einer 8jährigen NF1 Patientin	*NF1* +/-
HEK-293	Embryonale Nierenzellen	kommerziell erhältliche Zelllinie	
M NF29a	Melanozyten	Haut einer 24jährigen NF1 Patientin	*NF1* +/-

2.1.2 Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits. Angegeben sind der Name sowie der Hersteller mit Ortsangabe.

Name	*Hersteller*
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
DC Protein assay	Bio-Rad (Hercules, USA)
QuantiTect SybrGreen	Qiagen (Hilden)
Proteoducin	Jena Bioscience (Jena)
Endo-Porter	Gene Tools (Pilomath, USA)
TurboFect	Fermentas (St. Leon-Rot)
TransPassP	New England Biolabs (Ipswich, USA)

Name	***Hersteller***
Pro-DeliverIN	OZ Bioscience (Marseille, Frankreich)
Lipodin-Pro	Abbiotec (San Diego, USA)
Chariot	Active Motif (Carlsbad, USA)
Proteofectene	Biontex (Martinsried/Planegg)
ProJect	Pierce (Bonn)
Saint-PhD	Synvolux Therapeutics (Groningen, Holland)
DNAse I Amplification Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Superscript III reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
BCA Protein Assay Reagent	Thermo Scientific (Rockford, Illinois)
ECL Plus/Prime Western BlottingDetection Reagent	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning (Midland, USA)
Dylight 488 Microscale Antibody labeling Kit	Thermo Scientific (Rockford, Illinois)
X-Gal Staining Kit	Genlantis (San Diego, USA)
FlexiTube GeneSolution GS4763 for *NF1*	Qiagen (Hilden)
Lipofectamin	Life Technologies (Carlsbad, USA)
AllStars Negative Control siRNA (5nmol)	Qiagen (Hilden)
Roti- Black P Silberfärbungskit	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)

2.1.3 Chemikalien und Proteine

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Proteine. Angegeben sind Name und Hersteller der Chemikalien mit Ortsangabe.

Name	***Hersteller***
Ammoniumpersulfat	Merck (Darmstadt)
Atto488-BSA	Jena Bioscience (Jena)
25BP DNA Leiter	Promega (Mannheim)
Agarose, NEEO	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
Protein Marker VI (10-245), prestained	Applichem (Darmstadt)
Tetramethylethylendiamin	Merck (Darmstadt)
Acrylamid	Bio-Rad (Hercules, USA)
Bisacrylamid	Bio-Rad (Hercules, USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Protein A Sepharose	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
BSA Fraction V	Applichem (Darmstadt)
Tween-20	Merck (Darmstadt)
Choleratoxin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
TAT-HA2 Fusion Protein	Anaspec (Fremont, USA)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Name	***Hersteller***
DAPI Triton-free staining solution	Partec (Görlitz)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
HAMs F-10 (powder)	Biochrom (Berlin)
Trypanblau 0,5%	Biochrom (Berlin)
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
5,10,15,20-Tetrakis(4-sulfonato-phenyl)-21,23H-porphyrin ($TPPS_4$)	TriPorTech GmbH (Lübeck)
Glycerol 99%	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Halt Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail (100x)	Thermo Scientific (Rockford, Illinois)
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat	Biochrom (Berlin)

2.1.4 Gebrauchsgegenstände

Tabelle 4: Verwendete Gebrauchsgegenstände. Angegeben sind Name und Hersteller mit Ortsangabe.

Name	***Hersteller***
PVDF Membran Immobilon PSQ 0,2µm	Merck Millipore (Darmstadt)
NuPage Tris-Glycin 4-12%	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPage Tris-Glycin 10%	Invitrogen (Karlsruhe)
Fujifilm Super RX	Fujifilm (Tokyo, Japan)
Latex-Handschuhe	diverse Hersteller
Latex-freie Handschuhe	diverse Hersteller
Pipettenspitzen	Biozym (Hameln)
Schraubdeckelröhrchen (10ml)	Greiner (Solingen)
Schraubdeckelröhrchen (50ml)	Nunc (Wiesbaden)
Zellkulturflasche (T25, T75)	Nunc (Wiesbaden)
Multiwellplatten (6-well, 12-well, 24-well, 48-well, 96-well)	Nunc (Wiesbaden)
Zellschaber	Sarstadt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)

2.1.5 Puffer und Zellkulturmedien

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Zellkulturmedien. Angegeben sind der Name und die Zusammensetzung mit Auflistung der Bestandteile mit Mengenangabe. Hersteller mit Ortsangabe beziehen sich auf die Einzelreagenzien beziehungsweise auf die Gesamtlösung, falls diese kommerziell erstanden wurde.

Name	***Zusammensetzung***	***Hersteller***
Phosphatpuffer, isotonisch (PBS, 10fach)	80g NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	2g KCl	Merck (Darmstadt)
	2g KH_2PO_4	Merck (Darmstadt)
	Na_2HPO_4	J.T. Baker (Deventer, Holland)
	Ad 1l Aqua bidest	
SDS-PAGE Laufpuffer	72g Glycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	5g SDS	Serva (Heidelberg)
	15g Trizma Base	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	ad 1l Aqua bidest	
Blotting Puffer (5fach)	29,1g Trizma Base	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	14,65g Glycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	ad 1l Aqua bidest	
NuPage MOPS running buffer (20fach)		Invitrogen (Karlsruhe)
NuPage transfer buffer (20fach)		Invitrogen (Karlsruhe)
PBST 0,05%	1l PBS	
	500µl Tween-20	Merck (Darmstadt)

Name	***Zusammensetzung***	***Hersteller***
Laemmli Probenpuffer (5fach)	1M Tris-HCL pH 6,8	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	10% SDS	Serva (Heidelberg)
	50% Glycerol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	0,05% Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
	20% Mercaptoethanol	
Blocking Puffer BSA	5g BSA Fraction VI	Applichem (Darmstadt)
	ad 100ml PBS	
Blocking Puffer Milch	10g Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
	ad 100ml PBS	
Immuno-präzipitation (IP) Waschpuffer 1	0,5 g Natriumdeoxycholat	Serva (Heidelberg)
	2 ml EDTA (50mM)	Serva (Heidelberg)
	1 ml SDS-Lösung (10%ig)	Serva (Heidelberg)
	10 ml 10x PBS	
	1 ml TritonX-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Ad 100 ml H_2O bidest	
IP Waschpuffer 2	1,46 g NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	2 ml Tris (1M, pH 7,5)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	1 ml SDS-Lösung (10%ig)	Serva (Heidelberg)
	1 ml TritonX-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Ad 100 ml (pH 8,3)	
RIPA Lysispuffer	50mM Tris-HCl pH 8,0	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	150mM NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	0,1% SDS	Serva (Heidelberg)
	0,5% Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	1% Triton X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Name	*Zusammensetzung*	*Hersteller*
Opti-mem		Life Technologies (Carlsbad, USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium Stammlösung (DMEM Stock)	40mlDulbecco'sMEM(10x)	Biochrom (Berlin)
	20ml $NaHCO_3$ 7,5%	Merck (Darmstadt)
	5ml Penstrep	Biochrom (Berlin)
	4ml Na-Pyruvat Lösung	Biochrom (Berlin)
	5ml nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom (Berlin)
	400ml Viapur H_2O	
DMEM	500ml DMEM Stock	
	13ml L-Glutamin	Gibco (Carlsbad, USA)
	55ml FCS	Gibco (Carlsbad, USA)
DMEM -FCS	500ml DMEM Stock	
	13ml L-Glutamin	Gibco (Carlsbad, USA)

2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Antikörper. Angegeben sind der Name des Antikörpers, das Antigen, an dem der jeweilige Antikörper bindet und der Hersteller mit Ortsangabe.

Name	*Antigen*	*Hersteller*
SC-67	Neurofibromin (C-Terminus)	Santa Cruz (Dallas, USA)
SC-68	Neurofibromin (N-Terminus)	Santa Cruz (Dallas, USA)
SC-47724	GAPDH	Santa Cruz (Dallas, USA)
p44/42 MAPK (ERK½) (137F5) Rabbit mAb	ERK ½ (total)	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)

Name	*Antigen*	*Hersteller*
phospho-p44/42 MAPK (ERK½(Thr202/Tyr204) (197G2) Rabbit mAb	phosphoryliertes ERK½	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)
Goat Anti-Rabbit IgG HRP	IgG Hase	Santa Cruz (Dallas, USA)
Goat Anti-Mouse IgG HRP	IgG Maus	Santa Cruz (Dallas, USA)
Anti-Aktin-FITC Maus mAb	C-terminales Epitop, konserviert in allen Aktin-Isoformen	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.7 Software

Tabelle 7: Verwendete Software. Angegeben sind Name und Hersteller mit Ortsangabe.

Name	*Hersteller*
Microsoft Word	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Excel	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Powerpoint	Microsoft (Redmond, USA)
Adobe Photoshop 7.0.1	Adobe (San Jose, USA)
Image J	Freeware, Entwickler: Wayne Rasband
ISIS 3.0	MetaSystems (Altlussheim)
Axiovision	Carl Zeiss (Oberkochen)
Qcapture	QImaging (Surrey, Canada)

2.1.8 Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte. Aufgelistet sind Name und Hersteller mit Ortsangabe.

Name	***Hersteller***
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Laminar-Flow	BDK (Sonnenbühl)
Gefrierschrank	Heraeus (Hanau)
Kühlschrank	Bosch (München)
Nanophotometer NanoDrop	Implen (München)
Neubauer Zellzählkammer	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
Pipettboy Plus	Integra Bioscience (Fernwald)
Vortex Genie	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad (Hercules, USA)
Phero-stab. 300 Electrophoresis Powersupply	Bachofer, Reutlingen
7900HT Fast Real-time PCR System	Applied Biosystems (Foster City, USA)
SDS-PAGE/Blotting Kammer	Life Technologies (Carlsbad, USA)
PCI-Lampe	Universität Ulm (Ulm)
FPLC System	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)

Name	***Hersteller***
LKB Peristaltic Pump P-1	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Nanovue Plus	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Fluorstar Omega	BMG Labtech (Ortenberg)
Cyflow Space	Partec (Münster)
Mr. Frosty	Thermo Scientific (Rockford, Illinois)
Zeiss IM 35 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Jena)
Primo Vert Invertmikroskop	Carl Zeiss (Jena)
Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Jena)
Axioskop Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Jena)
Waage P2010	Mettler (Gießen)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)

2.1.9 Verwendete Primer

Tabelle 9: Verwendete Primer. Aufgelistet sind der Name des Primers, das Gen in welchem der Primer bindet, die Sequenz des Primers, die verwendete Annealing Temperatur (AT) und die Länge des PCR-Produktes in Basenpaaren (BP), das zusammen mit dem korrespondierenden Primer amplifiziert wird (Produkt).

Name	***Gen***	***Sequenz 5'-3'***	***AT***	***Produkt***
WT 38,39 H NF1	*NF1*	GCAGTTCTGACCCGAGTTTACG	60°C	99 BP
WT 38,39 R NF1	*NF1*	ATGTCTCTAGTAACTGGCCCTCGAT	60°C	99 BP
G6PDH K3	*G6PDH*	GCCAGCCTCAGTGCCACTTGA	65°C	126 BP
G6PDH K8	*G6PDH*	TAGCAGAGAGGCTGCCTACGGG	65°C	126 BP
POLR2A WT H	*POLR2A*	GTTTTGGTGACGACTTGAACTG	59,5°C	145 BP
POLR2A WT R	*POLR2A*	CGCAGGAAGACATCATCATC	59,5°C	145 BP
ALAS1 H	*ALAS1*	TGATGAACTACTTCCTTGAGAATC	60°C	70 BP
ALAS1 R	*ALAS1*	GAATGAGGCTTCAGTTCCA	60°C	70 BP

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Arbeiten mit Zellen

Alle Arbeiten mit und an lebenden Zellen wurden an der sterilen Arbeitsfläche einer Laminar-Flow durchgeführt. Durch eine interne Luftzirkulation entsteht im Innenraum dieser Flow ein leichter Überdruck, wodurch ein leichter Luftstrom nach außen entsteht. So wird die Chance einer Verunreinigung der kultivierten Zellen durch Bakterien oder Pilze verringert. Vor und nach dem Arbeiten wurde die

Arbeitsfläche mit 70%igem Ethanol und durch Bestrahlung mit UV-Licht für ca. 30 Minuten desinfiziert.

2.2.1.2 Passagieren von Zellen

Alle Zellen wurden auf einem Stand der dauerhaften Zellteilung gehalten. Daher wurden Zellen, die in 25cm² Kulturflaschen eine Konfluenz von 90-95% erreicht hatten, passagiert. Hierzu wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen mit 37°C erwärmter Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen. Folgend wurden 2ml Trypsin/EDTA auf die Zellen pipettiert und bei 37°C/9% CO_2 für ca. 2 Minuten inkubiert. Die angelösten Zellen wurden durch leichtes Klopfen vom Zellkulturgefäß vollständig gelöst. Nach Zugabe von 5ml DMEM wurde die Zellsuspension in ein 10ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1ml DMEM gelöst, die Zellen in einer Neubauerkammer gezählt und in gewünschter Menge in einem neuen Zellgefäß ausgesät.

2.2.1.3 Zellzählung

Um die Menge der Zellen zu bestimmen, die sich in einer Kulturflasche befinden, wurden diese zunächst wie unter 2.2.1.2 beschrieben abtrypsiniert, zentrifugiert und das entstandene Pellet in einer definierten Menge Kulturmedium gelöst (beispielsweise 1ml). Ein Tropfen dieser Zellsuspension wurde in eine Neubauer Zählkammer gegeben. In der Zählkammer eingeschliffen befinden sich 8 Großquadrate, die aus jeweils 16 Kleinquadraten bestehen. Durch Zählen der Zellen in den Kleinquadraten wird die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat bestimmbar. Die mittlere Zellzahl pro Großquadrat ergibt multipliziert mit 10000 die Anzahl der Zellen pro ml in der Suspension.

2.2.1.4 Einfrieren von Zellen

Um Zellen einzufrieren, wurden die Zellen wie unter 2.2.1.2 gewaschen und abzentrifugiert. Circa 100000 Zellen wurden in 0,5ml Einfrier-Lösung A (DMEM +20% FCS) aufgenommen und in vorgekühlte Einfrierröhrchen überführt. Folgend wurden 0,5ml Einfrier-Lösung B (DMEM + 10% DMSO) zugegeben. Durch mehrfaches Invertieren wurden die Lösungen gemischt. Die Einfrierröhrchen wurden in das Einfriergerät „Mr. Frosty“ (Thermo Scientific) gesteckt und nach spätestens 30 Minuten in einen -80°C Gefrierschrank verbracht. Im Mr. Frosty

befindet sich Isopropanol, das dort um ca. 1°C pro Stunde abkühlt. Nach 3 Tagen im Gefrierschrank wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.5 Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden durch Schwenken in einem 37°C temperierten Wasserbad angetaut. Um die Zellen vom DMSO im Einfriermedium zu befreien, wurden tropfenweise 5ml DMEM über 10 Minuten zugegeben, die Zellsuspension für 10 Minuten bei 1000 rpm pelletiert, das Zellpellet in 1ml 37°C warmen DMEM gelöst und schließlich in eine Kulturflasche mit 4ml DMEM überführt. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium durch frisches Kulturmedium ersetzt, um das aus den Zellen ausgetretene DMSO zu entfernen.

2.2.1.6 RNA-Isolierung (RNeasy Mini Kit, Qiagen)

Zur Isolierung von RNA wurden die Zellen auf Eis verbracht und mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in RLT Puffer mit 1% Mercaptoethanol (300-700µl), abhängig von der Größe des Zellkulturgefäßes) für 5-10 Minuten lysiert. Zellen, die nach dieser Zeit noch intakt waren, wurden durch Lösen vom Untergrund mit einem Zellschaber und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren desintegriert. Die Lysate wurden mit gleichen Volumina 70%igem unvergälltem Ethanol (mit DEPC-Wasser angesetzt) verdünnt und auf eine RNeasy Säule geladen (10000rpm, 1min). Die auf der Säule gebundene RNA wurde in 3 Schritten gewaschen (1x 700µl RW1-Puffer, 2x 500ml RW2-Puffer). Zum Eluieren der RNA wurde die Membran für 1 Minute bei Raumtemperatur mit RNase freiem Wasser inkubiert und die RNA durch Zentrifugieren (10000 rpm, 1min) gewonnen. Die Güte der RNA wurde durch Messung der Ratio aus der Absorption bei 260nm (Nukleinsäuren) zu 280nm (Proteine) an einem Nanodrop bestimmt. Werte zwischen 1,8 und 2,2 gelten als gut. Auftragen der RNA auf ein Agarosegel ermöglicht es, die Güte der RNA anhand der 18S- und 28S-rRNA Banden zu bestimmen. Klare Banden sprechen für eine hohe Güte, während Schmierbanden auf eine Degradation der RNA hinweisen.

2.2.1.7 DNase-Behandlung der RNA

RNeasy Säulen (Qiagen) sind nicht ausschließlich spezifisch für RNA. Auch DNA-Fragmente können zunächst gebunden und schließlich mit der RNA eluiert werden. Um diese DNA zu entfernen wurden 5µg RNA mit 2,5µl 10fach Puffer (aus dem DNase Kit (Invitrogen)) und 5µl DNase für 15 Minuten bei

Raumtemperatur nach Auffüllen auf 25µl mit DEPC-Wasser inkubiert. Nach Zugabe von 5µl ETDA und einer weiteren Inkubation (10min, 65°C), wurde die RNA entweder zu cDNA umgeschrieben oder bei -70°C gelagert.

2.2.1.8 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription wurde mit dem Kit „Superscript III First Strand Synthesis“ (Invitrogen) durchgeführt. Hierzu wurde je 1µg DNase-behandelter RNA mit jeweils 1ml Zufallshexameren und dNTPs in einem 10µl Ansatz (aufgefüllt mit DEPC-Wasser) für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wurden 2µl Kit-eigener 10fach Puffer, 4µl MgCl2 (25nM), 2µl DTT (0,1M), 1µl RNase out und 1µl Super Script III zugefügt. In weiteren Inkubationen (10min bei 25°C, 50min bei 50°C und 5min bei 85°C) wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Abschließend wurde 1µl RNase H zugegeben und während einer 20 minütigen Inkubation bei 37°C die verbliebene RNA verdaut. Die cDNA wurde entweder direkt für Untersuchungen in der real-time qPCR verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.2 Quantitative real-time PCR

Die real-time qPCR wurde mithilfe des QuantiTect SybrGreen Kits (Qiagen) durchgeführt. Im Mastermix des Kits sind alle relevanten Substanzen (SybrGreen, dNTPs, Puffer und eine Hot-start Taq-Polymerase) bereits enthalten. Für Untersuchungen wurde darauf geachtet, dass gleiche Mengen an RNA (nach Möglichkeit ca. 100ng) eingesetzt wurden. Neben dem 2fach Mastermix und der RNA wurden noch die jeweiligen Primer (100-300nM) und RNase-freies Wasser zugefügt. Messungen wurden im 7900 HT fast Real-time PCR-System von Applied Biosystems durchgeführt. Zunächst wurde in 10 Minuten bei 95°C die Hot-Start Taq-Polymerase aktiviert. Es folgten 50 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei der Primer-spezifischen Annealing Temperatur. Abschließend wurde eine Schmelzkurve von 50-99°C durchgeführt, um überprüfen zu können, ob Nebenprodukte mit amplifiziert wurden und so die SybrGreen-Messungen beeinflusst wurden. Messungen wurden grundsätzlich als Triplikate durchgeführt. Bei jeder Messung wurden zusätzlich 1 oder 2 Housekeeping Gene zur relativen Quantifizierung gemessen.

2.2.3 Migrationstests

2.2.3.1 Boyden Kammer

Für Migrationsversuche in Boyden Kammern wurden NFS4 Zellen gewaschen, abtrypsiniert und das Zellpellet in 1ml DMEM ohne FCS gelöst. Die Boyden Kammer wurde in ein Well einer 12-Well Platte platziert, die 1ml DMEM enthielt (Abbildung 4). 100000 Zellen wurden in 500µl DMEM ohne FCS in die Kammer gesetzt. Angezogen vom FBS-Gradienten migrierten die Zellen durch die 8µm durchmessenden Löcher am Boden der Kammer.

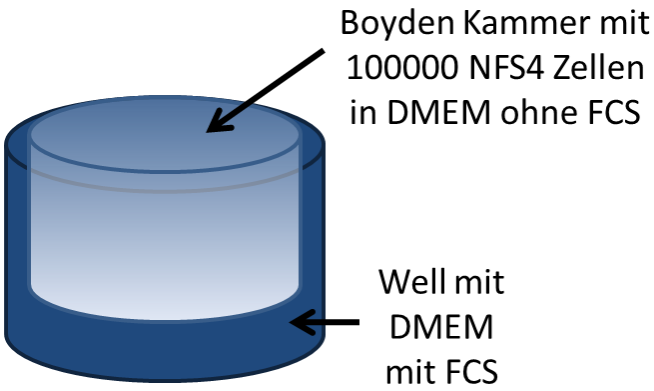

Abb. 4: Aufbau eines Boyden Kammer Migrationstests. In einem Well einer 12-Well Platte wurde 1ml Kulturmedium (DMEM) mit 10% fetalem Rinderserum (FCS) vorgelegt und die Boyden-Kammer in das Well eingesetzt. In die Kammer wurden 100000 NFS4 Zellen in 500µl DMEM ohne FCS pipettiert.

2.2.3.2 Nanotunnel

Aus Polydimethylsiloxan (PDMS [105]) wurden 2 Reservoirs hergestellt, die durch Nanotunnel mit verschiedenen Durchmessern (5µm, 7µm und 10µm) miteinander verbunden waren. Ein Reservoir wurde mit 50000 NFS4 Zellen in DMEM-FCS bestückt. Im zweiten Reservoir der Kammer befand sich DMEM. Das im DMEM enthaltene FCS diente als Attraktanz für die NFS4 Migr Zellen. Die Kammer wurde in einer Klimakammer (37°C, 5% CO_2) eines Invertmikroskops fixiert. Über Nacht wurden in 5 Minuten Takten Bilder aufgenommen, die als Bildsequenz ein Zeitraffervideo der Zellmigration ergaben. Abbildung 5 zeigt ein Schema der Herstellung und eine vergrößerte Darstellung des Nanotunnel Migrationsassays.

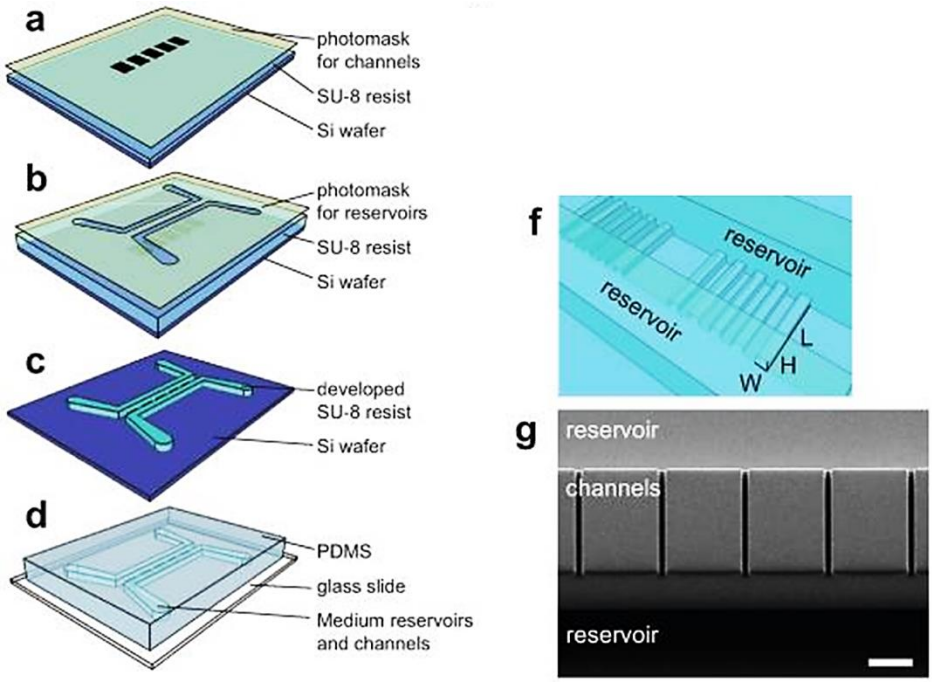

Abb. 5: Schema der Herstellung von Nanotunneln aus Polydimethylsiloxan- (PDMS) Gelen. (a-d) Herstellung der Nanotunnel durch zwei nacheinander durchgeführte Photolithographie-Prozesse. Die von der Abgussform abgegossenen PDMS-Gele werden auf eine Glasplatte gesetzt. Die entstehenden Reservoirs sind durch Nanotunnel miteinander verbunden (verändert aus [105]; Teilbild e entfernt).

2.2.4 Gesamtprotein-Isolierung

Zur Isolierung von Gesamtprotein wurden die jeweiligen Zellen mit 4°C kaltem PBS gewaschen und direkt auf Eis mit RIPA Puffer (ca. 10µl/cm²) lysiert. Dem RIPA Puffer wurden Protease-Inhibitoren zugefügt, um den Abbau der Proteine zu verhindern bzw. zu reduzieren. Zur Messung der Mengen phosphorylierter Proteine wurden dem RIPA-Lyse Puffer Phosphatase/Protease Inhibitoren zugesetzt. Die Lysate wurden zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren, wieder aufgetaut und dann bei 4°C und 13000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert, um Zellfragmente zu sedimentieren. Der Überstand wurde als Zytoplasmafraktion bzw. als Fraktion löslicher Proteine abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.5 Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Die Gesamtproteinmenge wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt:

2.2.5.1 DC-Assay Bio-Rad

Zunächst wurden 1ml Reagenz A mit 20µl Reagenz S gemischt, um die Reagenz A‘ herzustellen. Weiter wurden je 10µl der zu untersuchenden

Gesamtproteinproben mit 10µl RIPA in einem 1,5ml Eppendorf Gefäß verdünnt. Zu diesen 20µl verdünnter Probe wurden 100µl Reagenz A‘ und 800µl Reagenz B pipettiert, gemischt und bei RT dunkel für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde das Gemisch in eine Küvette umpipettiert und die Absorption bei 750nm gemessen. Die Auswertung erfolgte über eine Eichgerade, die durch das Messen der Absorption von 200, 300, 500 und 1000µg BSA pro ml RIPA erstellt wurde. Alle Messungen wurden als Doubletten oder Triplikate durchgeführt.

2.2.5.2 BCA Assay

Für die Bestimmung der Gesamtproteinmenge per BCA Assay wurde der BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific) genutzt. Die Gesamtproteinproben wurden 1:1 mit RIPA Puffer verdünnt. Hierzu wurden 5µl RIPA Puffer pro Well in einer 96-Well Platte vorgelegt und 5µl des zu untersuchenden Gesamtproteins hinzu pipettiert. Die Gebrauchslösung des Kits wurde durch Mischen der Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 hergestellt. Pro Well wurden 100µl dieser Lösung zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Folgend wurde das Gemisch für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Absorptionsratios bei 562nm in einem Multiwellreader gemessen. Zum Erstellen einer Eichgerade wurden parallel zu den Gesamtproteinmessungen zusätzlich definierte Mengen von BSA (1µg, 0,5µg, 0,25µg und 0,125µg) eingesetzt und vermessen.

2.2.6 Immunopräzipitation von Neurofibromin

2.2.6.1 Ansatz der Protein-A Sepharose

Zunächst wurden 0,5g Protein A Sepharose in 30ml destilliertem Wasser durch leichtes Drehen und Schwenken gelöst. Danach wurde die Lösung bei Raumtemperatur für 15 Minuten ruhen gelassen. Die Sepharose wurde durch Absaugen vom Überstand befreit. Diese Prozedur wurde weitere dreimal mit 20ml destilliertem Wasser wiederholt. Die so gequollene Sepharose wurde zu je 1ml aliquotiert und mit 10µl Pen/Strep versetzt. Um die gequollene Sepharose für den Gebrauch zu verdünnen, wurden zunächst 500µl in 5ml PBS verdünnt, durch Schwenken und Drehen gelöst und bei 500g für 1 Minute abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurde dieser Schritt wiederholt. Nach erneutem Lösen der Sepharose in 3ml RIPA Puffer, wurde erneut

zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Schließlich wurde der Protein A Sepharose 1 Volumen an RIPA zugefügt und sie darin gelöst.

2.2.6.2 Immunopräzipitation von Neurofibromin

In 1000µg Gesamtprotein wurden 20µl in RIPA verdünnte Protein A-Sepharose pipettiert und bei 4°C für 90 Minuten in einem Überkopftaumler (ÜKT) inkubiert, um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an die Protein A Sepharose binden. Die Sepharose wurde bei 11000rpm für 10 Minuten auf 4°C abzentrifugiert und verworfen. Dem Überstand wurden 15µl SC-68 Antikörper (Santa Cruz) hinzugefügt und im ÜKT bei 4°C für 1,5 Stunden inkubiert, um eine Bindung des Antikörpers an das Neurofibromin zu gewährleisten. Folgend wurden 40µl der verdünnten Protein A Sepharose hinzugegeben. In einem weiteren zweistündigen Inkubationsschritt (4°C) wurde die Bindung des Proteins A an die Antikörper durchgeführt. Durch Zentrifugieren bei 3000rpm für 1 Minute wurde die Sepharose sedimentiert und der Überstand verworfen. Folgend wurde die Sepharose 6mal mit je 750µl Immunopräzitations-Waschpuffer (IPW) gewaschen (2xIPW1, 2xIPW2, 2xIPW1). Nach dem letzten Waschschritt wurde der Puffer sorgfältig entfernt und 30µl eines 1fachen SDS-Probenpuffers zugegeben. Durch 5-minütige Inkubation bei 95°C in SDS-Probenpuffer wurden die Bindungen zwischen Neurofibromin, Antikörper und Protein A gelöst. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation (2min, 13000rpm, 4°C) sedimentiert und der Überstand entweder direkt für die SDS-PAGE verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde zu Beginn in selbstgegossenen Acrylamidgelen, später in Fertiggelen in einem Invitrogen Western Blot System durchgeführt.

2.2.7.1 Herstellung von Acrylamidgelen

Zur Detektion von Neurofibromin wurden 5,5%ige Acrylamidgele hergestellt. Zunächst wurden die Glasplatten der Gelkammer mit 70%igem Ethanol gereinigt, eine Gummidichtung eingepasst und die Platten mit 5 Klammern fixiert. Das Trenngel bestand aus 2,2ml 30%igem Acrylamid, 0,9ml 2%igem Bisacrylamid, 5,9ml Aqua Bidest, 3,0ml Trenngelpuffer (1,5M Tris/HCl, pH 8,8), 0,12ml 10%ige SDS-Lösung, 12µl TEMED und 60µl APS-Lösung. Nachdem das Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert wurde, wurden 200µl Isopropanol darauf

pipettiert, um die Oberfläche zu begradigen. Nach 20-30minütiger Polymerisierung des Trenngels, wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel aufpipettiert. Die Zusammensetzung des Sammelgels war: 530µl 30%iges Acrylamid, 220µl 2%iges Bisacrylamid, 2,67ml Aqua Bidest, 500µl Sammelgelpuffer (1M Tris/HCl pH 6,8), 40ml 10%ige SDS-Lösung, 4µl TEMED und 30µl 10%ige APS-Lösung. Nach Einpassung eines Taschenkamms polymerisierte das Sammelgel innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur aus. Durch vorsichtiges Herauszeihen des Kamms wurden die Taschen geformt.

2.2.7.2 SDS-PAGE

Alle Geräte und Puffer für die SDS-PAGE wurden auf 4°C vorgekühlt. Das Gel wurde vorn in die Gelelektrophorese-Kammer gespannt, als Rückwand diente eine Plexiglasscheibe. In beide Reservoir-Kammern wurde SDS-Laufpuffer gegeben und die Proteinproben in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese startete mit ca. 10 Minuten bei 30V, um die Proben ins Sammelgel einlaufen zu lassen. Danach wurde die Spannung auf 100V, nach Erreichen des Trenngels auf 200V erhöht. Der Lauf dauerte insgesamt 3-4 Stunden an.

2.2.8 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Tank-Blot Verfahren auf PVDF-Membranen geblottet. Hierzu wurde das Acrylamid-Gel aus der Gelkammer entnommen und das Sammelgel entfernt. Das Trenngel, Glasfasermatten und Filterpapiere wurden für 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Die PVDF-Membranen wurden ca. 5 Minuten in Methanol aktiviert und danach für 10 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Das Blotsandwich wurde folgendermaßen zusammengesetzt: Glasfasermatte, Filterpapier, Acrylamidgel, PVDF-Membran, Filterpaper, Glasfasermatte. Das Blotsandwich wurde in die Blotting Kammer eingesetzt und die Kammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer der Proteine auf die Membran fand wahlweise bei einer Spannung von 90V für 3,5 Stunden oder bei 30V über Nacht statt.

2.2.9 Silberfärbung von Acrylamidgelen

Die Silberfärbung der Acrylamidgele wurde mit dem Kit „Roti-Black P“ (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Nach Beenden der SDS-PAGE, wurde das Gel aus den Glasplatten genommen, das Sammelgel samt Taschen entfernt und das Trenngel für 60 Minuten in Fixierpuffer (20ml Methanol, 12ml Eisessig, 50µl Formaldehyd)

bei RT inkubiert. Es folgten drei 10minütige Waschschritte mit je 100ml Waschlösung (60ml Methanol, 240ml H_2O). Anschließend wurde das Gel 1 Minute in 100ml Sensibilisierungslösung überführt. Danach wurde das Gel 3mal für je 20 Sekunden mit H_2O gewaschen. Nach 40minütiger Inkubation in 100ml Imprägnierungslösung wurde das Gel erneut 2mal in H_2O gewaschen und schließlich in der Entwicklerlösung so lange inkubiert bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Nach 2maligem kurzem Waschen in H_2O wurde die Entwicklung durch Überführen des Gels in 2mal 100ml Stopplösung (40ml Methanol, 24ml Eisessig, 136ml H_2O) abgestoppt.

2.2.10 Kombinierte SDS-PAGE und Blot im Invitrogen-System

Das vorgefertigte Bis/Tris-Gel (Invitrogen) wurde in die Kammer gespannt, die Reservoirs mit Laufpuffer befüllt und der Kamm vorsichtig entfernt. Die Taschen wurden mit Laufpuffer gespült. Dem Laufpuffer im oberen Reservoir wurden 500µl eines Antioxidans zugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Proteinproben (maximal 25µl) wurden in die Taschen pipettiert und die Elektrophorese bei 200V (120mA) für 60 Minuten eingestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde der Lauf beendet und der Laufpuffer entfernt. Glasfasermatten, Filterpapiere und das Bis/Tris Gel wurden für 10 Minuten in Blot-Puffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde für 5 Minuten in Methanol aktiviert und dann für 10 Minuten in Blot-Puffer inkubiert. Das Blotsandwich wurde folgendermaßen aufgebaut: Glasfasermatte, Filterpapier, Gel, PVDF-Membran, Filterpapier, 7 Glasfasermatten. Nach Einspannen der Blot-Kammer, wurde diese mit Blot-Puffer aufgefüllt. Durch leichtes Klopfen wurden Luftblasen aus dem Sandwich entfernt. Der Transfer der Proteine wurde bei 32V (210mA) für 70 Minuten durchgeführt.

2.2.10.1 Immunodetektion von Proteinen

Nach dem der Transfer der Proteine abgeschlossen war, wurde die PVDF-Membran 2mal für 10 Minuten in PBS bei Raumtemperatur gewaschen und danach für 60 Minuten mit 3% BSA in PBS geblockt. Es folgten 2 Waschschritte zu je 10 Minuten in PBS mit 0,05% Tween-20 (PBST) und ein weiterer Waschschritt in PBS. Weiter wurde die Membran mit dem Primärantikörper in 3% BSA in PBS (Antikörperverdünnungen siehe Tabelle 10) inkubiert. Nach Wiederholung der Waschschritte wurde die Membran mit 10% Milchpulver in PBS erneut geblockt (30min). Nach zwei weiteren Waschschritten für 10 Minuten in

PBS wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in 10% Milchpulver in PBS (Verdünnung siehe Tabelle 10) inkubiert. Folgend wurde die Membran 4mal zu je 10 Minuten mit PBST gewaschen. Die Detektion der Sekundärantikörper über die horseradish peroxidase fand durch das ECL Plus, später ECL Prime Kit von Amersham statt. Je 1,5ml Reagenz 1 und Reagenz 2 wurden zusammen pipettiert und auf der abgetropften, noch feuchten PVDF-Membran verteilt. Nach einer 5minütigen Inkubation im Dunkeln, wurde überschüssiges ECL-Reagenz abgetropft und die Membran in eine Entwickler-Kassette gelegt. Durch Auflegen von Fotofilmen und deren Entwicklung wurde die Proteindetektion abgeschlossen.

Tabelle 10: Verdünnungen der genutzten Antikörper. Angegeben sind der Name des Antikörpers, die Verdünnungen und die Verdünnungsmedien, in denen die jeweiligen Antikörper verwendet wurden.

Name	***Verdünnung***	***Verdünnungsmedium***
SC-67	1:1500	3% bovine serum albumin (BSA) in phosophate buffered saline (PBS)
SC-68	1:1500	3% BSA in PBS
SC-47724	1:3000	3% BSA in PBS
p44/42 MAPK (ERK½) (137F5) Rabbit mAb (monoclonal antibody)	1:1000	3% BSA in PBS
phospho-p44/42 MAPK (ERK½(Thr202/Tyr204) (197G2) Rabbit mAb	1:1000	3% BSA in PBS
Goat Anti-Rabbit IgG HRP (horseradish peroxidase)	1:25000	10% Milchpulver in PBS
Goat Anti-Mouse IgG HRP	1:50000	10% Milchpulver in PBS
Anti-Aktin-FITC Maus mAb	1:50-1:200	PBS

2.2.10.2 Quantifizierung der Proteinbanden

Um die Banden der Western Blots zu quantifizieren, wurden die entwickelten Filme zunächst mithilfe einer Durchlichteinheit eingescannt und danach die Intensität der Banden in der ImageJ Software gemessen. Zunächst wurden die Bilder durch Konvertierung in ein 8-Bit Format in schwarz-weiße Bilder umgewandelt. Weiter wurde eine Spur durch das Rechteckwerkzeug der Software markiert und fixiert. Dieselbe Auswahlgröße wurde weiter verwendet, um weitere Gelspuren zu markieren. Durch den Befehl „Plot Lanes“ wurden Intensitätsdiagramme der Spuren erstellt. Der Hintergrund des Bildes wurde durch Begrenzen der Peaks durch eine horizontale Linie entfernt. Durch Nutzung des Zauberstabwerkzeugs wurden die einzelnen Peaks markiert. Die Funktion „Label Peaks“ berechnete schließlich die markierte Flächen und damit die Intensität der markierten Peaks. Bei Western Blots an aufgetrennten Gesamtproteinen wurde als Ladekontrolle der Gele immer GAPDH detektiert. Die GAPDH Bande der Kontrolle diente als Referenz bei der Auswertung der zu quantifizierenden Banden, um mögliche Schwankungen in der Beladung der Gele auszugleichen. Bei Mengenbestimmungen phosphorylierten ERK 1 und 2 wurden in einem zweiten Schritt die phosphorylierten Proteine auf die Gesamtmenge des ERK 1 und 2 referenziert. So konnten falsch-positive Resultate durch unterschiedliche ERK Expression eliminiert werden.

2.2.11 Direkte Immunofärbung mit Anti-Aktin-FITC Antikörpern (AAF)

Für die direkte Anfärbung der Aktinfilamente wurden NFS4 Migr Zellen in einer Dichte von 5000 Zellen pro cm² in 8-well Chamberslides ausgesät. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS (37°C) gewaschen. Es folgte eine Methanol – Aceton Fixierung. Hierzu wurde das PBS abgesaugt und 500µl Methanol (-20°C) pro Well auf die Zellen pipettiert. Nach 10minütiger Inkubation bei -20°C wurde das Methanol durch Aceton (-20°C) ersetzt und für 1 Minute bei -20°C erneut inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden pro Well 500µl PBS auf die Zellen gegeben und diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um die Zellen zu rehydrieren. Es folgte eine Inkubation (3min, RT) mit 0,4% Triton X-100 in PBS bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken auf einem Celloshaker. Dadurch wurden die Zellen permeabilisiert. Weiter wurden die Zellen mit in PBS verdünntem AAF (1:50 – 1:200) für 60 Minuten bei RT inkubiert. Final

wurden die Zellen 3mal je 5 Minuten mit PBS gewaschen, in Vecta Shield eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

2.2.12 Transduktion von Proteinen *in vitro*

2.2.12.1 Transduktion von Anti-Aktin-FITC Antikörpern mittels Chariot

Zunächst wurde 1µg AAF (1µl) mit 9µl PBS verdünnt. 0,5µl der Chariot Stock Solution wurden mit 10µl sterilem Wasser verdünnt. Beide Verdünnungen wurden vereint und für 30 Minuten bei RT inkubiert. 20µl dieser Transduktionsmischung wurden zusammen mit 80µl serumfreiem DMEM auf die Zellen (5000 Zellen pro Well in einem 8-well chamberslide) pipettiert und bei 5% CO_2 und 37°C für 1 Stunde inkubiert. Danach wurden 200µl DMEM zugefügt und weitere 2 Stunden inkubiert. Folgend wurden die Zellen durch 30minütige Inkubation mit 4% Paraformaldehyd bei RT fixiert, in Vecta Shield eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

2.2.12.2 Alternatives Protokoll

Da obiges Protokoll nicht erfolgreich war, wurde das Originalprotokoll für Chariot aus der Originalveröffentlichung [85] adaptiert. Hierzu wurden 50µl einer 0,2µM AAF-Lösung zu 50µl einer 10µM Chariot-Lösung gegeben und 30 Minuten bei RT inkubiert. 50µl dieser Lösung wurden zusammen mit 50µl serumfreiem DMEM auf die NFS4 Zellen in einem 8-well Chamberslide pipettiert und für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS (37°C) gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd fixiert, erneut gewaschen und mit Vecta Shield eingedeckelt.

2.2.12.3 Transduktion von Anti-Aktin-FITC Antikörpern mittels Saint-PhD

2µg AAF wurden in 30µl Hepes gepufferter Salzlösung (HBS) verdünnt und 20µl Saint-PhD Lösung zugegen. Nach 5 Minuten Inkubation auf RT wurden der Transduktionsmischung 200µl DMEM zugegen und die 250µl in ein Well eines Chamberslides auf die Zellen pipettiert. Nach 4 Stunden Inkubation bei 5% CO_2 und 37°C wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd fixiert, in Vecta Shield eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

2.2.12.4 Transduktion verschiedener Proteine mittels Proteoducin

Für Transduktionen mittels Proteoducin wurden die einzuschleusenden Proteine (Atto488-BSA, R-Phycoerythrin, AAF) in solchen Mengen PBS verdünnt, dass Lösungen von 2µg Protein pro 100µl resultierten. 1,4µl Proteoducin Stock Solution wurden mit 98,6µl PBS verdünnt. Beide Verdünnungen wurden zusammen pipettiert und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. 50µl der Transduktionsmischung wurde zusammen mit 100µl serumfreien DMEM auf die Zellen eines 8-well Chamberslides pipettiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden 250µl DMEM hinzu pipettiert. Es folgte eine Sekundärinkumbation für 21 Stunden. Danach wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd fixiert, in Vecta Shield eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. In späteren Versuchen wurde auf die Fixierung verzichtet und die Zellen lebend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.2.12.5 Transduktion von Atto488-BSA mittels verschiedener Transduktionsreagenzien

Für die Transduktion von Atto488-BSA in NFS4 Migr Zellen wurden verschiedene Transduktionsreagenzien getestet. Um Vergleichbarkeit zu schaffen, wurden die Proteinmenge (2µg = 2µl) und die Gesamtinkubationszeiten angeglichen. Die Transduktionen in 12-Well Platten setzten sich aus folgenden Schritten zusammen: Verdünnung des Proteins, Verdünnung des Transduktionsreagenz, Herstellung der Transduktionsmischung durch Mischen der zwei Verdünnungen, Primärinkubation und Sekundärinkubation (beide bei 37°C und 9% CO_2). Tabelle 11 zeigt die Unterschiede der Einzelschritte bei Verwendung der einzelnen Transduktionsreagenzien.

Tabelle 11: Unterschiede in der Transduktion von Atto488-BSA (bovine serum albumin) mit verschiedenen Transduktionsreagenzien. Die Verdünnungen der Reagenzien fanden entweder in Wasser (H_2O) oder phosophate buffered saline (PBS) statt. Die Zellen wurden in Kulturmedium (DMEM) mit oder ohne fetales Kälberserum (FCS) inkubiert.

Reagenz	*Verdünnung des Proteins*	*Verdünnung des Transduktions-reagenz*	*Herstellung der Transduktions-mischung*	*Primär-inkubation*	*Sekundär-inkubation*
Proteoducin	2µl Atto488-BSA +98µl PBS	1,4µl Proteoducin +98,6µl PBS	30min; 37°C	+400µl DMEM-FCS; 1std	+1ml DMEM; 21std
Chariot	2µl Atto488-BSA +98µl PBS	3,5µl Chariot + 96,5µl H_2O (steril)	30min; RT	+150µl DMEM-FCS; 3std	+1ml DMEM; 19std
Proteofectene	2µl Atto488-BSA +18µl PBS +4µl Proteofectene	---	20min; RT; +100µl serum-freies DMEM	+900µl DMEM; +100µl Mix; 22std	---
Lipodin-Pro	2µl Atto488-BSA +18µl PBS +4µl Lipodin-Pro	---	15min; RT; +100µl serumfreies DMEM	+1000µl DMEM-FCS;+100µl Mix; 3std	+1000µl DMEM; 19std
ProJect	2µl Atto488-BSA +18µl PBS	Verdünntes Protein zu getrocknetem ProJect	5min; RT; +480µl serum-freies DMEM	4std	+500µl DMEM; 18std
Pro-DeliverIN	2µl Atto488-BSA +18µl PBS +4µl Pro-DeliverIN	---	10-15min; RT; +100µl serumfreies DMEM	+900µl DMEM-FCS; +100µl Mix; 3std	+1000µl DMEM; 19std
TransPassP	2µl Atto488-BSA +100µl serumfreies DMEM +3µl TransPassP	---	20min; RT	+1000µl DMEM-FCS; +100µl Mix; 3std	+1000µl DMEM; 19std
TurboFect	2µl Atto488-BSA +200µl serumfreies DMEM + 2µl enhancer + 2µl TurboFect	---	20min; RT	+500µl DMEM-FCS; +200µl Mix; 2std	+500µl DMEM; 20std
Endo-Porter	2µl Atto488-BSA +1000µl DMEM +6µl Endo-Porter	---	---	22std	---

2.2.13 Detektion von Lysosomen

Zur Detektion von Lysosomen wurde Lysotracker Red verwendet. Die Stock Solution (1mM) wurde mit DMEM auf 50nM verdünnt und 300µl auf die Zellen (5000 pro Well im 8-well Chamberslide) pipettiert. Folgend wurden die Zellen für 1 Stunde bei 9% CO_2 und 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden die Kammern entfernt, die Zellen mit PBS mit 2% FCS eingedeckelt und unfixiert fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.2.14 Durchflusszytometrie-Versuche

Für die Untersuchung von transduzierten Zellen im Durchflusszytometer wurden 100000 NFS4 Migr Zellen pro Well in 12-well Platten ausgesät. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit verschiedenen Transduktionsreagenzien Atto488-BSA transduziert (siehe „Transduktion von Atto488-BSA mittels verschiedener Transduktionsreagenzien“). Folgend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abzentrifugiert, das Pellet 2mal in je 5ml PBS gelöst und erneut abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 1ml PBS ohne Calcium und Magnesium aufgenommen und bei 4°C bis zur Messung gehalten. Zur Detektion toter Zellen wurden dem PBS 10µg/ml Propidiumiodid beigefügt. Für die Grundeinstellung am Durchflusszytometer wurden unbehandelte NFS4 Migr Zellen vermessen und gegated. Die so entstandenen Gates wurden für die transduzierten Zellen verwendet und die Messung auf 20000 Einzelzellen beschränkt. In den Einzelzellen wurde die Atto488- und die Propidiumiodid-Signalstärke gemessen.

2.2.15 Fluoreszenzmessung an Zelllysaten

Zur Messung der Atto488-Fluoreszenzstärke in Zelllysaten wurden 100000 NFS4 Migr Zellen pro Well in 12-well Platten ausgesät, 2 Tage kultiviert und danach mit verschiedenen Transduktionsreagenzien Atto488-BSA transduziert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und das Pellet in 5ml PBS gelöst, erneut zentrifugiert und in 5ml PBS gelöst. Je 1ml wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 500µl RIPA Puffer lysiert. Das Lysat wurde 10 Minuten auf RT inkubiert und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Je 150µl des Lysates wurden schließlich in die Wells einer 96-well Platte pipettiert und in einem Multiwell-Reader die 523nm Emission nach 488nm Anregung gemessen. Als Kontrollen dienten nicht transduzierte NFS4 Migr Zellen.

2.2.16 Chloroquin- und TAT-HA2-Behandlung von Fibroblasten

Kombinationsbehandlungen aus Atto488-BSA Transduktionen und Chloroquin- oder TAT-HA2-Inkubationen wurden an NFS4 Migr Zellen durchgeführt, die mittels Proteoducin transduziert wurden. 5000/cm² NFS4 Migr Zellen wurden in 8-well Chamberslides ausgesät. 2µl Atto488-BSA Lösung (1µg/µl) wurden mit 98µl PBS verdünnt und mit 1,4µl Proteoducin-Stock, verdünnt mit 98,6µl PBS, gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurden je 50µl des Transduktionsgemisches in 4 Wells des Chamberslides pipettiert. Direkt gefolgt wurden 100µl DMEM ohne FCS hinzu pipettiert. Dieses DMEM enthielt die Menge an Chloroquin beziehungsweise TAT-HA2, die nötig war um die gewünschte Endkonzentration zu erreichen (beispielsweise 150µM Chloroquin für eine Endkonzentration von 100µM). Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und 9% CO_2, wurden den Zellen 250µl DMEM (mit FCS) mit Chloroquin respektive TAT-HA2 in Endkonzentration zugegeben. Nach einer 21stündigen Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und entweder fixiert (20 min 4% Paraformaldehyd) oder lebend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

2.2.17 Photochemical internalization (PCI)

2.2.17.1 PCI ohne weitere Behandlung

Für die PCI wurde folgendes Protokoll verwendet: Zunächst wurden die jeweiligen Zellen in einer Dichte von 5000 pro cm² ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Zellmedium durch DMEM mit 1µg/ml des Photosensitizers 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonato-phenyl)-21,23H-porphyrin ($TPPS_4$) ersetzt und für 20 – 24 Stunden inkubiert. Danach wurde das $TPPS_4$-haltige DMEM durch DMEM ersetzt und die Zellen für 22 Stunden weiterkultiviert. Dieser Schritt simuliert die 22stündige Transduktion der Zellen. Folgend wurden die Zellen mithilfe der PCI-Lampe zwischen 1 und 10 Minuten belichtet.

2.2.17.2 Freisetzung endosomal gespeicherten transduzierten Atto488-BSAs

Zur Freisetzung der endosomal gespeicherten Atto488-BSA Moleküle wurde eine Kombinationsbehandlung aus Protein Transduktion und PCI durchgeführt. Zunächst wurden die jeweiligen Zellen in einer Zelldichte von ca. 5000 Zellen pro cm² in 8-well Chamberslides ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium für 20-24 Stunden durch 500µl DMEM + 1µg/ml $TPPS_4$ ersetzt. Es

folgte die Transduktion von Atto488-BSA (0,5-1µg pro Well). Nach Ende der Transduktion wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen (je 500µl) und 500µl DMEM pro Well auf die Zellen pipettiert. Die Belichtung der Zellen wurde an einem Invertfluoreszenzmikroskop mithilfe eines FITC/GFP Filtersatzes durchgeführt. Dadurch konnte die Freisetzung des endosomal gespeicherten Atto488-BSAs als Veränderung der Signalart von punktuell hin zu diffusem Atto488 Signal während der PCI beobachtet und dokumentiert werden. Während der Dauer der Belichtung wurden im Abstand von 2 bis 4 Sekunden Fluoreszenzbilder aufgenommen. Diese wurden als Bildsequenz in Form von Zeitraffer-Filmen zusammengesetzt. Alternativ wurden Filme mithilfe einer Videokamera direkt während der Belichtung durchs Okular des Mikroskops aufgezeichnet, um live-Aufnahmen in Echtzeit zu erhalten.

2.2.18 Toxizitätsbestimmung durch Trypanblaufärbung

Um die Toxizität von Zellbehandlungen zu testen, wurden die Zellen nach der jeweiligen Behandlung mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und das Pellet in 1ml DMEM resuspendiert. Der Suspension wurden 250µl Trypanblau (0,5% in PBS) zugegeben und wurde für 3 Minuten bei RT inkubiert. Folgend wurden Aliquote in Neubauerkammern geladen und lebende und tote (blau gefärbt) Zellen gezählt.

2.2.19 Messung des PCI-Effektes

Um die Stärke des PCI-Effektes näher bestimmen zu können, wurde eine neue Auswertmethode entwickelt. Hierzu wurden Fluoreszenzsignale vor und nach der PCI-Behandlung und zusätzlich ein Phasenkontrastbild aufgenommen. In der ImageJ Software wurde eine Einzelzelle markiert, indem die Zellränder nachgezeichnet wurden (Freihand-Werkzeug). Die Bilder der Fluoreszenzsignale wurden in ein 8-Bit Format konvertiert (Image ➔Type ➔ 8-bit), was zu einem Schwarz-Weiß-Bild führt, dessen Grauwerte von 0 (schwarz) bis 255 (weiß) reichten. Die Markierung der Einzelzelle wurde auf die Fluoreszenzbilder übertragen und die Intensitäten der einzelnen Pixel innerhalb der Zellmarkierung gemessen (Analyse ➔ Histogram ➔ List). Aus der Menge der einzelnen Pixel wurde der Median als Maß der durchschnittlichen Signalintensität im Zytoplasma bestimmt. Einzelne, starke, endosomale Signale beeinträchtigten durch die Verwendung des Medians diesen Wert nicht. Abbildung 6 [81] zeigt das Schema der Messung des PCI-Effektes.

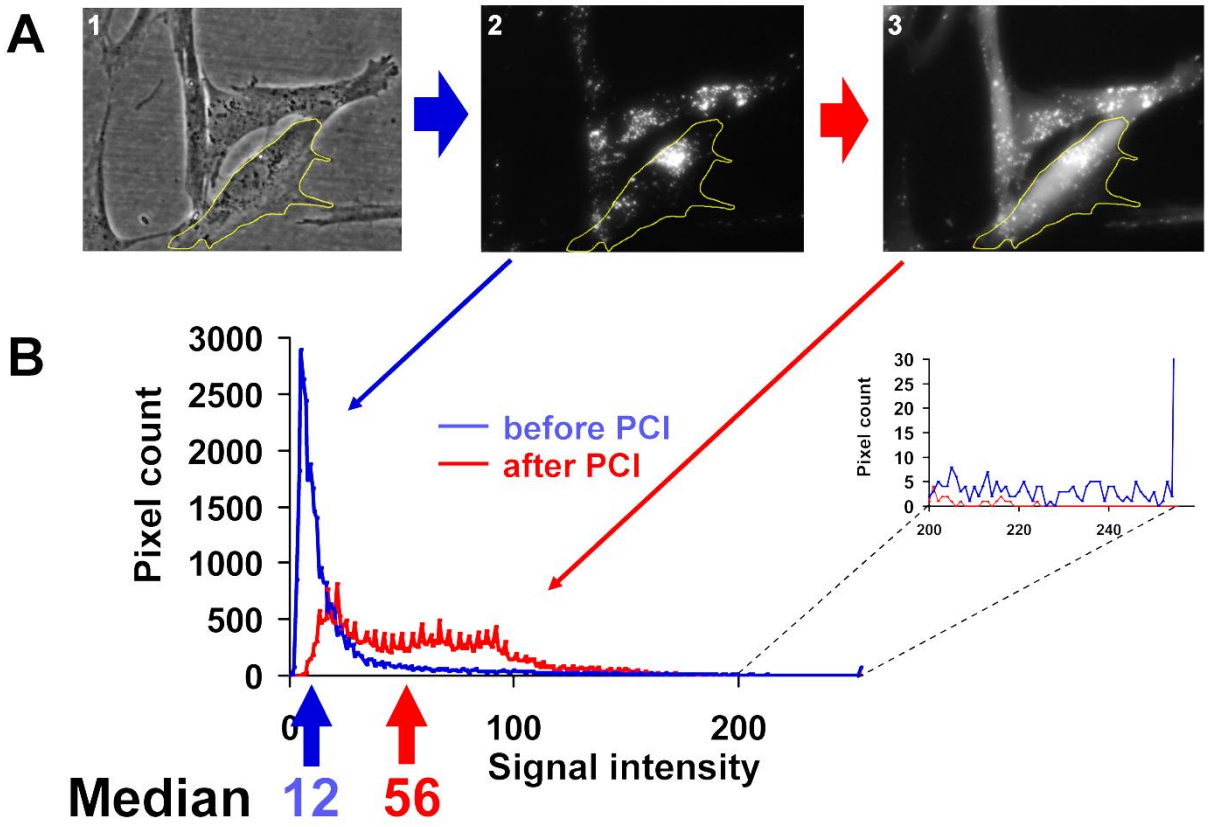

Abb. 6: Schema der Messung des Effektes der photochemical internalization (PCI). (A) Markierung einer Einzelzelle im Phasenkontrast (1) und Übertragung der Zellmarkierung auf die Fluoreszenzsignalbilder vor (2) und nach (3) der Photochemischen Internalisierung (PCI). (B) Intensitätszählungshistogramme und korrespondierende Mediane der Pixel innerhalb der Zellmarkierung vor (blau) und nach (rot) der PCI. Durch die Verteilung der primär punktuellen Fluoreszenzsignale vor der PCI zu diffusen Signalen verteilt über das Zytoplasma, erhöht sich der Grauwert des Medians von 12 auf 56 (Abbildung aus [81]).

2.2.20 β-Galaktosidase Aktivitätstest

Die Aktivität der β-Galaktosidase wurde mithilfe des X-Gal Staining Kits von Genlantis durchgeführt. NFS4 Migr wurde mit 5000 Zellen pro cm² in 12-well Platten ausgesät und mit $TPPS_4$ inkubiert. Mittels Chariot wurde 1µg einer funktionellen Untereinheit der β-Galaktosidase transduziert. Als Kontrollen dienten Zellen, die $TPPS_4$ inkubiert, jedoch nicht transduziert wurden. Nach Belichtung der Zellen für 10 Minuten durch die PCI-Lampe wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Folgend wurden je Well 500µl „Fixing Buffer“ auf die Zellen pipettiert und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit je 500µl „X-Gal Staining Solution“ für 3 Stunden inkubiert, erneut mit

PBS gewaschen und anschließend je Well 500µl PBS auf die Zellen gegeben. Lichtmikroskopisch wurden Zellen mit β-Galaktosidase Aktivität durch bläuliche Färbung detektiert.

2.2.21 Aufreinigung von synNF1 aus Insektenzellen

Zunächst wurde das gefrorene Pellet der synNF1 exprimierenden Insektenzellen in ein 50ml Falcon überführt und 15ml Lysispuffer hinzugefügt. Mit einem Stößel wurden die pelletierten Zellen vereinzelt und auf RT für 10 Minuten aufgetaut. Folgend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, auf RT aufgetaut, mit Lysispuffer versetzt mit Proteaseinhibitoren (3 Roche complete Tabletten ohne EDTA in 30 ml Lysispuffer) auf 30ml aufgefüllt und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Weiter wurde das Lysat in einem Branson Ultraschall-Desintegrator mit 3mal 10 Schlägen bei 30% maximalen Outputs behandelt, um noch nicht lysierte Zellen zu desintegrieren. Danach wurde das Lysat mit Protease-Inhibitor-Lysispuffer auf 50ml aufgefüllt und gemischt. Weiter wurde das Lysat bei 4°C für 30 Minuten bei 10000g zentrifugiert. Folgend wurden Pumpenschläuche mit Ethanol und H_2O gespült, zwei Histrap hintereinander geschaltet und das gesamte System mit je 4 Volumen H_2O und Lysispuffer gespült, auf Eis gelegt und die Schläuche an eine Pumpe angeschlossen. Danach wurde der Überstand des zentrifugierten Lysates durch einen 0,45µm Filter filtriert. Das Filtrat wurde insgesamt 3mal durch die Histrap Säulen gepumpt. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden die Histrap Säulen mit einem Gradienten von 100% Lysispuffer hin zu 100% Elutionspuffer gespült und das Eluat in verschiedenen Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und in eine Gruppe ohne synNF1, eine Gruppe mit synNF1 und Nebenprodukten und eine Gruppe mit besonders reinem synNF1 eingeteilt und die korrespondierenden Fraktionen vereint. Die vereinten Fraktionen der unreinen und besonders reinen Gruppe wurden über einen Protein Konzentrator mit 100kDa Sperrfilter aufkonzentriert, die Proteinmenge bestimmt, Aliquote zu je 300µl eingefroren und bei -80°C gelagert. Aus den Fraktionen mit Nebenprodukten konnten insgesamt 10 Aliquote zu 350µl (1,3µg/µl) und 10 Aliquote zu 300µl (1,4µg/µl) gewonnen werden. Die besonders reinen Fraktionen ergaben 10 Aliquote zu 200µl (0,85µg/µl) und 11 Aliquote zu 200µl (0,56µg/µl).

2.2.22 *NF1* knockdown durch siRNA Transfektion

Um die *NF1* Expression herunter zu regeln, wurden zunächst die siRNA Gebrauchslösungen auf Eis angesetzt. Für einen Ansatz von 50000 Zellen in einem Well einer 6-Well Platte wurden jeweils 1,25µl der 4 siRNA Stammlösungen gegen das *NF1* Gen (10µM) in einem Epi vorgelegt und mit 292µl Opti-mem (Life Technologies) gemischt. Folgend wurden 3,3µl Lipofectamin (Life Technologies) hinzu pipettiert, gemischt und kurz abzentrifugiert. Nach 15-20minütiger Inkubation bei RT zur Bildung der Transfektionskomplexe, wurden 300µl dieser Lösung in ein Well einer 6-Well Platte vorgelegt und gleichmäßig verteilt. Die zu transfizierenden Zellen wurden gewaschen, abtrypsiniert und gezählt. Weiter wurde die Zellsuspension so mit DMEM eingestellt, dass sich in 1,7ml 50000 Zellen befinden. 1,7ml der Zellsuspension wurden hinzu pipettiert und durch Horizontal- und Vertikalbewegung der Platte gemischt. Nach 48 Stunden siRNA Inkubation wurde ein Mediumwechsel zu 2ml DMEM durchgeführt.

2.2.23 Ausrichtung von Fibroblasten

2.2.23.1 Herstellung strukturierter Polydimethylsiloxan-Gele (PDMS-Gele)

Die strukturierten Gele wurden durch Abgießen einer Negativ-Platte (Wafer) unter Verwendung des Sylgard 184 Silicone Elastomer Kits hergestellt. Die Wafer wurden als großzügige Gabe der AG Kemkemer (MPI Stuttgart) zu Verfügung gestellt. Zur Herstellung eines Gels wurden 4g der Komponente A mit 0,4g der Komponente B in einem 50ml Falcon Röhrchen für 3-5 Minuten auf einem Vortexer und durch Invertieren gemischt. Das Gemisch wurde danach für ca. 2 Minuten auf RT ruhen gelassen und schließlich 3g in die aufgesetzte Form des Wafers gegossen. Um Luftblasen aus dem Gemisch zu entfernen wurde der Wafer in einen Exsikkator gelegt und für ca. 30 Minuten durch eine Wasserstrahlpumpe ein Vakuum angelegt. Danach wurde der Wafer für 8 Stunden beziehungsweise über Nacht in einen Trockenschrank bei 65°C gelegt, um das PDMS Gel auszuhärten (Abbildung 7).

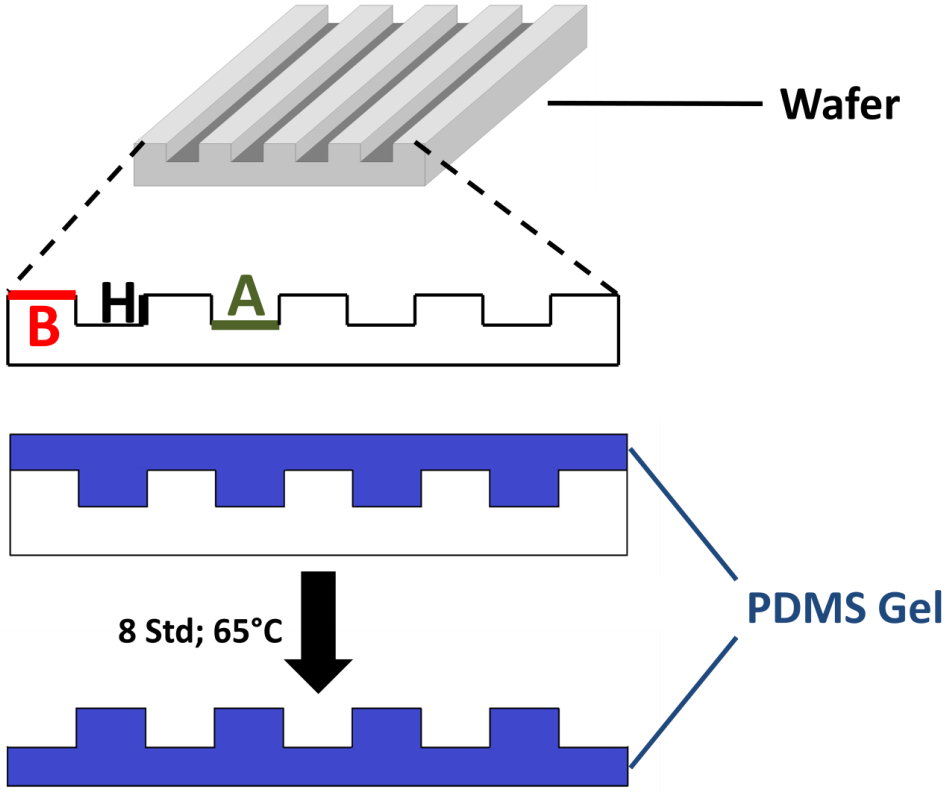

Abb. 7: Herstellung von Polydimethylsiloxan- (PDMS-) Gelen. Von der Abgussform (Wafer) wurden PDMS-Gele abgegossen. Diese wiesen parallele Längsstrukturen mit einer Breite (B) von 2µm, einer Höhe (H) von 200nm und einem Abstand voneinander (A) von 2µm auf. Die Aushärtung des Gels fand durch 8stündige Inkubation bei 65°C statt.

2.2.23.2 Aussaat von Zellen auf PDMS-Gele

Die ausgehärteten PDMS-Gele wurden für 30 Minuten auf RT abgekühlt und durch Einschneiden an den Rändern vom Wafer gelöst. Mithilfe einer Stanze wurden 9-11 kreisförmige Minigele herausgestochen. Diese wurden mit den Strukturen nach oben in eine 9cm durchmessende Petrischale gelegt und für 20-30 Minuten in 100% Ethanol desinfiziert. Weiter wurde die Petrischale komplett mit PBS aufgefüllt und die Gele darin für 15 Minuten gewaschen. Dieser Schritt wurde danach wiederholt, um mögliche Reste an Ethanol möglichst gänzlich zu entfernen. Danach wurde je ein Minigel in ein Well einer 48-Well Platte überführt und mit den Strukturen nach oben platziert. Auf jedes Minigel wurden 500µl FCS pipettiert. Es folgte eine 60minütige Inkubation bei 37°C und 9% CO_2, um die Oberflächen der Minigele zu coaten. Weiter wurde das FCS abgesaugt und durch 500µl DMEM ersetzt. In dieses Medium wurden 5000 Fibroblasten (je nach

Versuch behandelt, unbehandelt, *NF1*+/+ oder *NF1*+/-) hinein pipettiert und durch leichtes Schwenken der 48-Well Platte gemischt. Nach 48 Stunden wurden die adhärierten Zellen durch 15 minütige Inkubation in 500µl Ethanol (100%, RT) und anschließender 20 minütiger Inkubation in 500µl Methanol mit 5µg DAPI pro ml im Trockenschrank bei 37°C fixiert und parallel DAPI gefärbt. Abschließend wurden die Gele mit je 500µl PBS und Ethanol gewaschen und dann in 500µl frischem Ethanol bei 4°C bis zur Auswertung gelagert.

2.2.23.3 Messung der Ausrichtung von Fibroblasten an parallelen Nanotopografien

Da über verschiedene Versuche keine einheitliche Zuordnung der Abweichungsrichtung vorgenommen werden konnte, wurde allgemein nicht zwischen einer positiven und einer negativen Abweichung unterschieden. So ergab sich eine Winkelspanne zwischen 0 und 90° als Maß für die Abweichung der Zellen von Untergrundstrukturen. Unter diesen Bedingungen entspricht ein Abweichungswinkel von 0° einer perfekten Ausrichtung der Zelle an die parallelen Strukturen. Ein Abweichungswinkel von 90° entspricht einer orthogonalen Ausrichtung der Zelle. Über die Gesamtheit ausgewerteter Zellen eines Versuchs ergibt sich dann, dass ein kleiner medianer Abweichungswinkel für gut ausgerichtete Zellen spricht. Ein sehr hoher medianer Abweichungswinkel entspräche einer allgemein orthogonalen Ausrichtung der Zellen. Ein durchschnittlicher Abweichungswinkel von 45° entspricht einer Zufallsverteilung der möglichen Winkel und damit einem Maximum an „Nicht-Orientierung“. Zunächst wurde als Maß der Orientierung ein Orientierungsfaktor (S) als COS(2*α) definiert [59], da durch diese Rechnung dem Winkel 45° der korrespondierende Orientierungsfaktor 0, dem Winkel 0° der Faktor 1 mit dazwischenliegenden Abstufungen zugeordnet wird. Aufgrund der interpersonellen Schwankungen der Ausrichtungsfähigkeit von Fibroblasten wurde im Hinblick auf Vergleichbarkeit verschiedener Versuche vom Orientierungsfaktor wieder abgesehen. Stattdessen wurde eine Normierung der Abweichungswinkel auf den jeweiligen Abweichungswinkel einer definierten Kontrolle (*NF1*+/+ Fibroblasten bei Vergleichen von *NF1*+/+ versus *NF1*+/-; unbehandelte Fibroblasten bei Vergleichen von unbehandelt versus behandelt etc.) verwendet. Für die Messung der Ausrichtung der Zellen wurden 3 verschiedene Methoden angewandt: die Abweichungswinkelbestimmung der Zellen zu den Untergrundstrukturen durch

Umrandung der Zellen, durch die subjektive Winkelbestimmung und die Ausrichtung der Zellkerne.

Zellumrandung zur Bestimmung des Abweichungswinkels von Fibroblasten zu parallel verlaufenden Nanotopografien

Für die Bestimmung der Abweichungswinkel durch Zellumrandung wurden Phasenkontrastbilder der Zellen verwendet, in welchen sowohl die Zellen an sich als auch die parallelen Nanotopografien erkennbar waren (Abbildung 8A). In der Software ImageJ wurden die Bilder zunächst so gedreht, dass die Strukturen horizontal verliefen (Abbildung 8B). Als nächstes wurden einzelne Zellen mithilfe des Freihand-Auswahlwerkzeugs markiert, in dem die sichtbaren Zellränder nachgezeichnet wurden (Abbildung 8C). Durch die Software wurde der jeweiligen Auswahl die am besten passende Ellipse zugeordnet (Abbildung 8D). Der Scheitel dieser Ellipse diente als Maß der Ausrichtung der Zelle (Abbildung 8E+F). Der Winkel zwischen diesem Ellipsenscheitel und der Horizontalen wurde gemessen, positiviert und als Abweichungswinkel α definiert (Abbildung 8G).

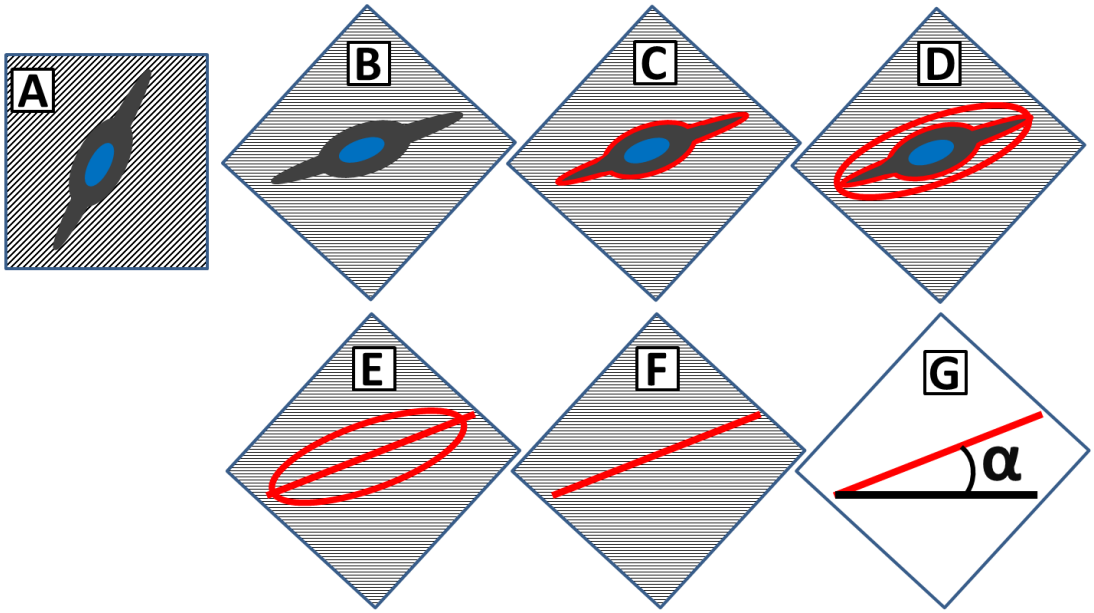

Abb. 8: Bestimmung des Abweichungswinkels α durch Umrandung der Fibroblasten. [A] Schematische Darstellung eines Phasenkontrastbildes eines auf parallelen Nanotopografien kultivierten Fibroblasten. Die Bilder wurden gedreht bis die Strukturen Parallelen der Horizontalen entsprachen [B]. Durch die Umrandung des Fibroblasten [C] wurden die zwei voneinander entferntesten Punkte durch eine Ellipse dargestellt [D], deren Scheitel [E] die Ausrichtung der Zelle repräsentiert [F]. In Verbindung zur Horizontalen dient der Ellipsenscheitel zur Berechnung des Abweichungswinkels α des Fibroblasten zu den Nanotopografien [G].

Subjektive Winkelbestimmung zur Bestimmung des Abweichungswinkels

Zur subjektiven Bestimmung der Abweichungswinkel von Fibroblasten wurden Phasenkontrastbilder von auf parallelen Nanotopografien kultivierten Fibroblasten verwendet. In der ImageJ Software findet sich ein Winkelwerkzeug, welches es ermöglicht, einen Winkel in einem Bild per Hand einzuzeichnen und diesen dann zu berechnen. Es wurde subjektiv eine Linie so durch die Zelle gelegt, dass diese der Ausrichtung der Zelle entsprach. Vom Ende dieser Linie aus wurde eine weitere Linie gelegt, welche parallel zu den Nanotopografien verlief. Der spitze Winkel zwischen diesen 2 Linien wurde als Abweichungswinkel berechnet.

Zellkernausrichtung als Maß zur Bestimmung des Abweichungswinkels der korrespondierenden Fibroblasten

Die Ausrichtung der Zellkerne entspricht bei den eher schmalen Fibroblasten ungefähr der Ausrichtung des gesamten Fibroblasten. Daher wurden auf Nanotopografien kultivierte Fibroblasten während der Ethanol-Methanol Fixierung parallel DAPI gefärbt (siehe 2.2.26.2). Zur Bestimmung der Kernausrichtung zu den Topografien wurden sowohl Phasenkontrast- als auch Fluoreszenzbilder der DAPI-Signale der Zellen aufgenommen. Im Phasenkontrast wurde unter Benutzung des Winkelwerkzeugs in ImageJ der Winkel zwischen den Topografien und der Horizontalen 5mal gemessen. Der Mittelwert dieser Messungen wurde als „Strukturwinkel“ definiert. Die Messung des Strukturwinkels wurde als ausreichend gut definiert, wenn die Standardabweichungen der Einzelmessungen höchstens 0,3° betrugen. Zur Bestimmung der Kernausrichtung wurden die DAPI-Fluoreszenz-Bilder in die ImageJ Software geladen. Durch Einstellung des Grenzwertes wurden die (weiß dargestellten) Zellkerne markiert und vom (schwarzen) Hintergrund getrennt. Über die Funktion „Analyze Particles“ wurden den Zellkernen die am besten passenden Ellipsen zugewiesen. Diese Prozedur konnte durch Laden der kompletten Fluoreszenzbilder eines Gels als Bildsequenz auf alle Bilder gleichzeitig angewendet werden. Die Winkel zwischen den Ellipsenscheiteln und der Horizontalen konnten so von sehr vielen Einzelzellen gleichzeitig berechnet werden. Von diesen Winkeln wurde der zuvor berechnete Strukturwinkel abgezogen. Der verbleibende Winkel entspricht dem Winkel zwischen den Nanotopografien und der Ellipsenscheitel der Zellkerne und in der Folge dem Abweichungswinkel der Zellen von den Topografien. Da die Winkel

definitionsgemäß zwischen 0 und 90° liegen, mussten Winkel, die größer als 90° waren in ihre negativen Pendants umgerechnet werden. Hierzu wurden 180° von diesem Winkel abgezogen. Für Winkel, die als keiner -90° detektiert wurden, wurde analog verfahren, indem 180° hinzugezählt wurden. In beiden Fällen wurden die Ergebnisse positiviert, was schlussendlich zu einer Winkelspanne von 0 – 90° führte. Die Abbildung 9 verdeutlicht die Auswertmethode.

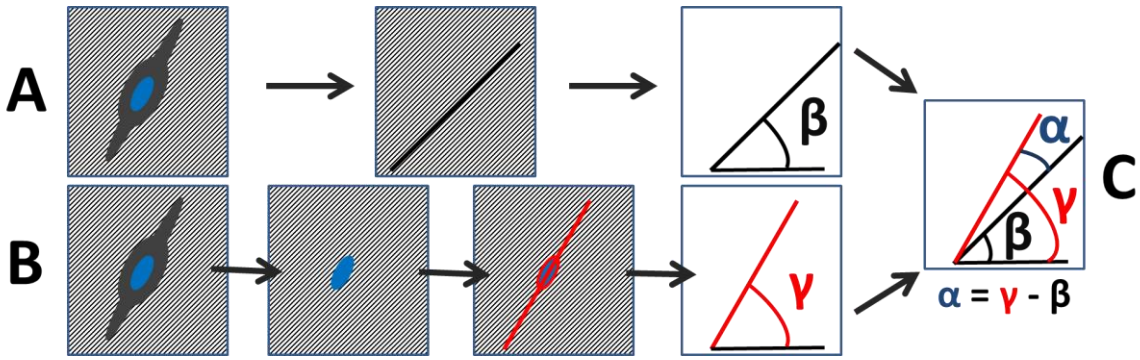

Abb. 9: Schema der Berechnung des Abweichungswinkels α durch Kernausrichtung von Fibroblasten kultiviert auf nanostrukturierten Polydimethylsiloxan-Gelen. [A] Bestimmung des Winkels β der Strukturen zur Horizontalen. [B] Bestimmung des Winkels γ des Ellipsenscheitels des Zellkerns zur Horizontalen. [C] Berechnung des Abweichungswinkels α aus den Winkeln γ und β.

2.2.24 Versuchsaufbau: Ausrichtung synNF1 transduzierter, PCI-behandelter Patientenfibroblasten

Um die Ausrichtung synNF1 transduzierter, PCI-behandelter Patientenfibroblasten zu bestimmen wurden 5000 Fibroblasten pro cm² in 12-Well Platten ausgesät und nach 24 Stunden für ca. 20 Stunden mit 2ml DMEM, welches 1µg/ml $TPPS_4$ enthielt, inkubiert. Folgend wurde das Photosensitizer beinhaltende DMEM durch 1500µl Transduktionsmedium ersetzt. Dieses enthielt 4,5µg synNF1 und 9µl Endo-Porter. Nach ca. 20 Stunden Inkubation bei 37°C und 9% CO_2 wurden die Fibroblasten mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und gezählt. 5000 Zellen wurden pro vorbereitetem Minigel (siehe 2.2.23.2) in 500µl vorgelegtem DMEM pipettiert und durch Schwenken gemischt. Danach wurde die 48-Well-Platte mit den beinhaltenden Minigelen für 10 Minuten unter der PCI-Lampe belichtet. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 9% CO_2 wurden die Zellen fixiert, DAPI-gefärbt und ausgewertet (Abbildung 10).

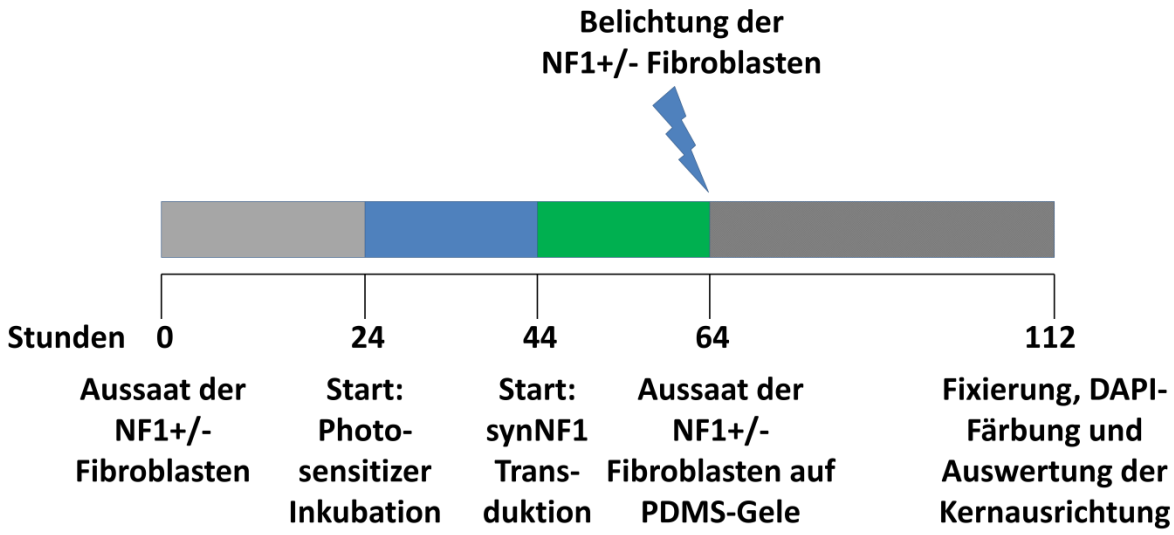

Abb. 10: Versuchsaufbau: Ausrichtung synNF1 (synthetisches Neurofibromin) transduzierter Neurofibromatose Typ 1 (NF1) Patientenfibroblasten (*NF1*+/-). Zeitskala der verschiedenen Behandlungen der *NF1*+/- Fibroblasten.

2.2.25 Versuchsaufbau: Phänotyprevertierung durch synNF1 Transduktion

Um zu prüfen, ob eine synNF1 Transduktion eine NF1-bedingte Ausrichtungsverschlechterung revertieren kann, wurden zunächst 50000 KF3 Fibroblasten pro Well einer 6-Well Platte ausgesät und die *NF1* Expression durch siRNA Transfektion reduziert (siehe 2.2.22). Je nachdem, ob der Folgeversuch mit oder ohne PCI durchgeführt wurde, wurde folgend das Kulturmedium der Zellen durch DMEM mit beziehungsweise ohne 1µg/ml $TPPS_4$ für 24 Stunden ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 9µg synNF1 und 18µl Endo-Porter in 3 ml DMEM für ca. 20 Stunden bei 37°C und 9% CO_2 transduziert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und ca. 5000 Zellen in 500µl DMEM pro Minigel in 48-Well Platten ausgesät. Bei Versuchen mit PCI-Behandlung wurden die Zellen anschließend für 10 Minuten durch die PCI-Lampe belichtet. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 9% CO_2 wurden die Fibroblasten fixiert, parallel DAPI gefärbt und schließlich ausgewertet (Abbildung 11).

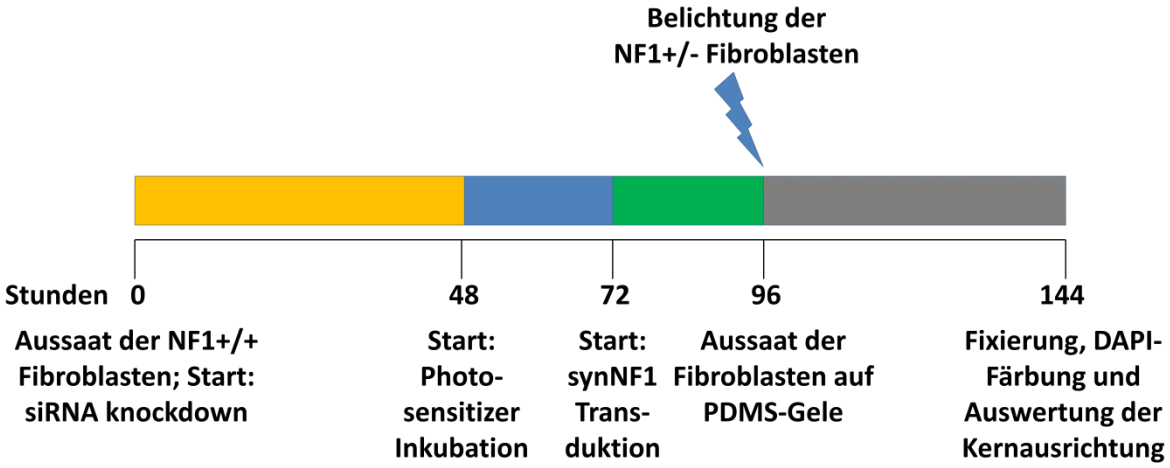

Abb. 11: Versuchsaufbau: Phänotyprevertierung durch synNF1 (synthetisches Neurofibromin) Transduktion. Zeitskala der verschiedenen Behandlungen von *NF1*+/+ Fibroblasten.

2.2.26 Versuchsaufbau: Phänotyprevertierung durch TATsynNF1eGFP Inkubation

Bis zum Transduktionsschritt wurden die KF3 Fibroblasten exakt gleich behandelt wie unter 2.2.25 beschrieben. Anstatt einer Transduktion mithilfe eines Transduktionsreagenz wurden die KF3 Fibroblasten mit 14µg TATsynNF1eGFP in 3 ml DMEM für ca. 20 Stunden bei 37°C und 9% CO_2 inkubiert. Die optionale PCI-Behandlung, Fixierung, Färbung und Auswertung entsprachen der Beschreibung unter 2.2.25.

2.2.27 Statistik

Zur Berechnung statistischer Unterschiede zwischen zwei Vergleichsgruppen wurden einseitige und zweiseitige studentische T-Tests durchgeführt. Wenn Zellen vor einer Behandlung mit denselben Zellen nach einer Behandlung verglichen wurden, wurden gepaarte T-Test durchgeführt. Das Signifikanzlevel α wurde auf 0,05 festgelegt. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert < 0,05 (*), hohe statistische Signifikanz (**) ab einem p-Wert < 0,01 und höchst signifikante Unterschiede (***) ab einem p-Wert < 0,001 angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Transduktion von Neurofibromin in lebende Zellen *in vitro*

Um ein Verfahren zur Einschleusung von Neurofibromin in Zellen von NF1 – Patienten zu entwickeln, waren Experimente an Zellmaterial und Etablierungen verschiedener Techniken erforderlich. Im Folgenden wird näher auf die Charakterisierung der für die Etablierungsversuche verwendeten Neurofibrosarkomzelllinie NFS4 Migr, Etablierungsversuche zur Einschleusung von Proteinen in lebende Zellen, der Freisetzung endolysosomal gespeicherter Proteine sowie Untersuchungen zur Toxizität der angewandten Methoden *in vitro* und die Aktivität eingeschleuster Proteine eingegangen. Die Verwendung der NFS4 Migr Zellen als ein Modell für *NF1*-/- Zellen beruhte auf dem Vorhaben, erfolgreiche Transduktionen an gut migrierenden Zellen in verschiedenen Migrationstests durchzuführen.

3.1.1 Charakterisierung der Neurofibrosarkomzelllinie NFS4

Als Beispielzellen für ein *NF1*-/- Zellsystem wurde eine Neurofibrosarkomzelllinie (NFS4) ausgewählt, die aus einem Neurofibrosarkom eines NF1 Patienten gewonnen wurde. Diese Zelllinie war zuvor noch nicht auf die genaue Neurofibromindosis hin untersucht worden. Um die Migration der NFS4 Zellen zu testen, wurden Versuche mit Boyden Kammern durchgeführt. Die Migration der NFS4 Zellen wurde mit der Migration von Fibroblasten verglichen. Die zu untersuchenden Zellen wurden in eine Kammer verbracht, die am Boden 8µm durchmessende Öffnungen hatte. Diese Kammer wurde in ein passendes Well einer Multiwellplatte gesetzt. In beiden Gefäßen befand sich Zellkulturmedium, jedoch war dem Well der Platte zusätzlich als Attraktanz Serum beigefügt. Die Versuche zeigten, dass nach 48 Stunden deutlich mehr NFS4 Zellen als Fibroblasten im jeweiligen Well der Platte nachzuweisen waren. Eine quantitative Auswertung der Versuche wurde dadurch erschwert, dass ein Teil der Zellen die Öffnungen der Boyden Kammern zwar passierte, jedoch nicht den Boden des Wells erreichten, wo sie gezählt werden konnten. Sie wanderten an der Unterseite der Kammer weiter. Ein Grund für dieses unterschiedliche Migrationsverhalten der NFS4 Zellen könnte in ihrer genetischen Heterogenität liegen. Um einheitliche

Grundvoraussetzungen für weitere Versuche zu schaffen, wurden einheitlich migrierende NFS4 Zellen selektiert. Dazu wurden die durch die Boyden Kammer migrierten Zellen wiederholt dem Migrationsassay ausgesetzt. Diese zusätzlich subklonierten Zellen wurden mehrfach gesplittet und schließlich als NFS4 Migr eingefroren. Als Alternative zu der Boyden Kammer bot sich ein weiterer Migrationsassay an, der in der Arbeitsgruppe Kemkemer im MPI Stuttgart neu entwickelt worden war und mit dem das Migrationsverhalten einzelner Zellen bei der Passage durch unterschiedlich breite PDMS Nanoröhrchen durch direkte mikroskopische Beobachtung quantifiziert werden kann [105]. Hier konnte gezeigt werden, dass die NFS4 Migr Zellen in der Lage sind, durch Nanoröhren zu migrieren, die einen Durchmesser von 10, 7 oder 5µm aufwiesen (Abbildung 12 (7µm Durchmesser)).

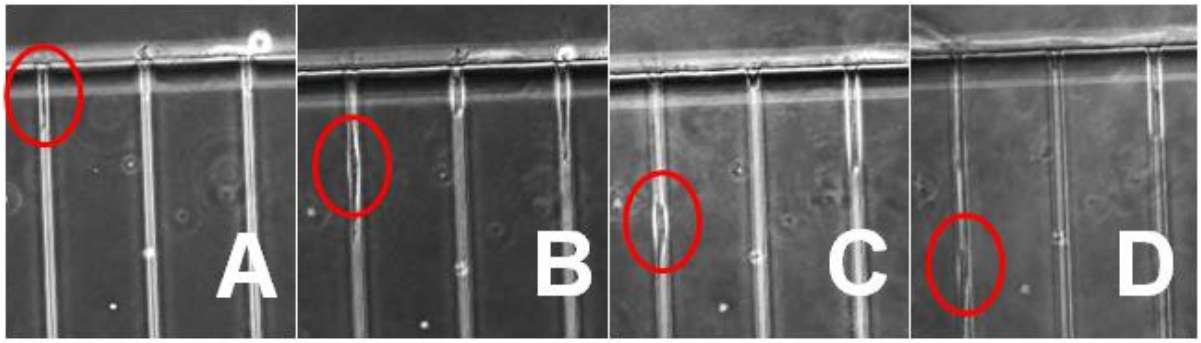

Abb. 12: Migration von NFS4 Migr Zellen durch Nanotunnel mit 7µm Durchmesser. Dargestellt sind 3 Nanotunnel, durch die NFS4 Migr Zellen migrieren. A, B, C und D stellen einen Zeitverlauf von ca. 8 Stunden dar. Eine Zelle ist durch einen roten Kreis markiert. Nach 0 Stunden (A) ist die Zelle teilweise in den Tunnel vorgedrungen. Nach ca. 2,5 Stunden (B) befindet sich die Neurofibrosarkomzelle vollständig im Tunnel. Nach ca. 5 Stunden (C) hat die Zelle die Hälfte, nach ca. 8 Stunden (D) dreiviertel des Tunnels passiert.

NF1-/- Zellen können noch über eine Restfunktion der mutierten *NF1* Allele verfügen. Um zu klären, ob in den NFS4 Migr Zellen noch *NF1* mRNA vorliegt, wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA und cDNA von Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (KF1) wurde in PCRs mit *NF1*-spezifischen Primern, die Transkripte der *NF1* Exons 38-39 detektieren (NF1 WT 38,39), als Template verwendet. Bei beiden Templates konnten PCR Produkte der erwarteten Größe von 99 Basenpaaren (BP) amplifiziert werden. Dies bedeutet, dass auch die NFS4 Migr Zellen über *NF1* mRNA verfügen (Abbildung 13 A).

Folgend wurde in einer relativen quantitativen PCR die Menge der *NF1* mRNA in NFS4 Migr im Vergleich zu Fibroblasten einer gesunden Vergleichsperson (KF1) und eines NF1-Patienten (NF 173c) mit *NF1* Haploinsuffizienz gemessen. Zur Messung der *NF1* mRNA wurden die NF1 WT 38,39 Primer verwendet. Als Bezugsgen wurde parallel die Menge der mRNA des Housekeeping Gens G6PDH gemessen. So konnten die relativen Mengen an *NF1* mRNA in cDNA der verschiedenen Zellen bestimmt und miteinander verglichen werden. Während die Menge der *NF1* mRNA in den Patientenfibroblasten auf ca. 20% reduziert war, war sie in den NFS4 Migr Zellen etwas höher als in der Kontrolle (Abbildung 13 B). Trotz des *NF1*-/- Status dieser Zellen war die relative Menge der *NF1* mRNA nicht reduziert. Daher wurde überprüft, ob die in den NFS4 Migr Zellen detektierte *NF1* mRNA zu intaktem, endogenem Neurofibromin translatiert wird. Hierzu wurden Immunopräzipitationen von Neurofibromin über an Protein A-Sepharose gekoppelte Anti-Neurofibromin Antikörper durchgeführt. Der verwendete Antikörper (SC-68, Santa Cruz) bindet an den N-terminalen Bereich des Neurofibromins. Abbildung 13 C und D zeigen die Präzipitate aus ca. 1000µg isolierten Gesamtproteins der Kontrollfibroblasten und der NFS4 Migr Zelllinie, die durch ein 5,5%iges Acrylamidgel in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Silberfärbung des Gels (C) zeigt, dass hochmolekulare Proteine (300-340kDa) präzipitiert wurden. Die Bande dieser Proteine ist bei der Kontrolle sehr schwach und erstaunlicherweise bei den NFS4 Migr Zellen deutlich stärker. Dies weist darauf hin, dass die NFS4 Migr Zellen wider Erwarten nicht wenig bis kein, sondern sehr viel Neurofibromin enthalten. Um zu überprüfen, ob es sich bei den präzipitierten Proteinen tatsächlich um Neurofibromin handelte, wurden die Proteine auf eine PVDF Membran geblottet und eine Immunodetektion über einen zweiten Anti-Neurofibromin-Antikörper (SC-67, Santa Cruz) durchführt (D). Hier zeigte sich, dass der C-terminale Anti-Neurofibromin-Antikörper SC-67 die präzipitierten Produkte der Kontrollfibroblasten sehr gut als Neurofibromin erkannte. Die präzipitierten Proteine der NFS4 Migr Zellen hingegen wurden durch den zweiten Neurofibromin-Antikörper nicht erkannt. Es ist daher davon auszugehen, dass die NFS4 Migr Zellen über kein komplettes, funktionsfähiges Neurofibromin mehr verfügen, da zumindest der C-Terminus der vorhandenen Proteine so stark verändert ist, dass er von spezifischen Antikörpern nicht mehr erkannt wird.

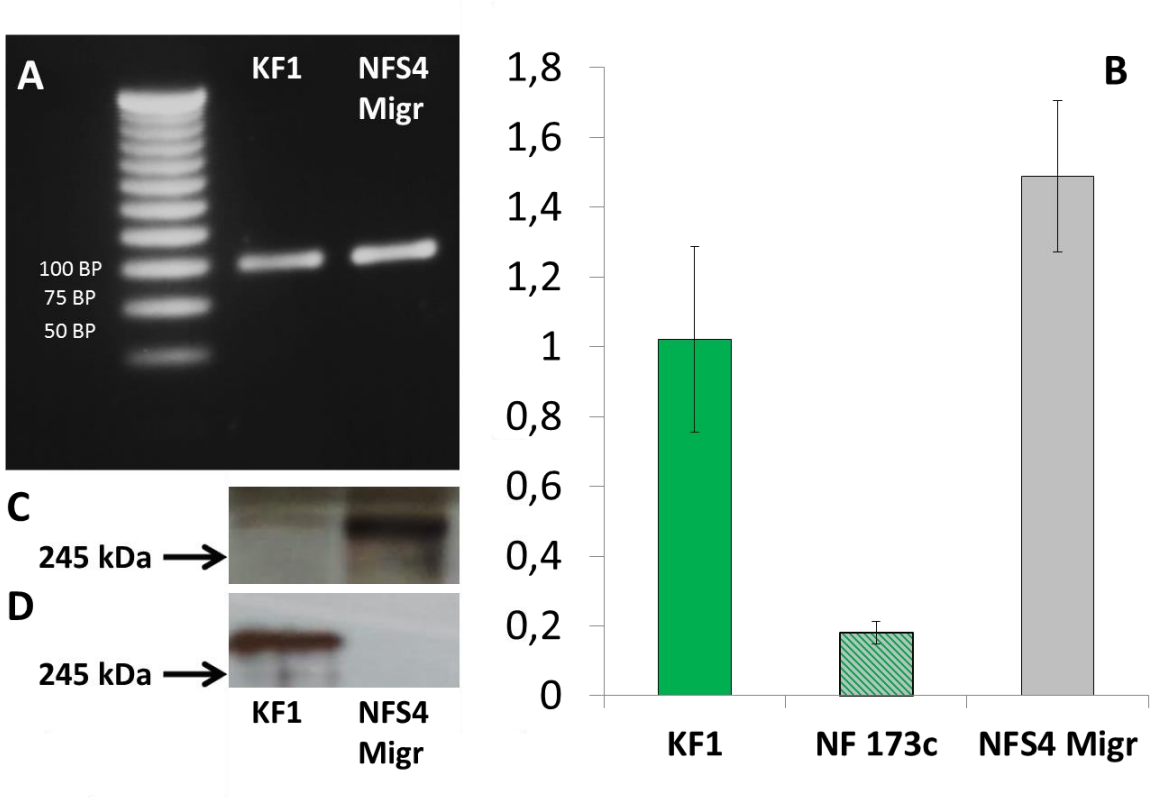

Abb. 13: Charakterisierung des *NF1*-Status der Neurofibrosarkomzelllinie NFS4 Migr.

(A) Auftragung der Polymerasekettenreaktions- (PCR-) Produkte nach 35 Zyklen mit *NF1*-spezifischen Primern an complementary DNA (cDNA) einer gesunden Kontrollperson (KF1) und an cDNA der NFS4 Migr Zellen (NFS4 Migr). Beide PCRs führten zu Amplifikaten der erwarteten Größe (99 Basenpaare (BP)).

(B) Quantifizierung der *NF1* mRNA Menge durch relative real-time quantitative PCR an cDNA der Kontrollfibroblasten (KF1), Fibroblasten eines Neurofibromatose Typ 1 (NF1) Patienten (NF172c) und der NFS4 Migr Zellen (NFS4 Migr). Die Patientenfibroblasten zeigen eine deutliche Reduktion der *NF1* mRNA im Vergleich zu den Fibroblasten mit *NF1*+/+ Hintergrund. Die NFS4 Migr Zellen weisen eine leicht gesteigerte Menge der *NF1* mRNAs auf. Als Haushaltsgene zur relativen Quantifizierung wurde *G6PDH* ausgewählt. Die gemessenen relativen messenger RNA (mRNA) Mengen (n=3) wurden auf dem Mittelwert der relativen *NF1* mRNA Mengen der KF1 Fibroblasten normiert.

(C) Silberfärbung eines 5,5%igen Acrylamidgels nach sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) von immunopräzipitiertem Neurofibromin aus je 1000µg Gesamtprotein aus Kontrollfibroblasten (KF1) und NFS4 Migr Zellen (NFS4 Migr). Der Pfeil stellt die 245 Kilodalton (kDa) Marke dar. Bei den Kontrollen ist eine schwache Bande im hochmolekularen Bereich erkennbar. Bei dem NFS4 Migr Präzipitat findet sich eine starke Bande in vergleichbarem Molekularbereich.

(D) Immunodetektion der geblotteten Präzipitate durch einen C-terminalen Anti-Neurofibromin Antikörper. Die präzipitierten Proteine der Kontrollfibroblasten werden durch den Antikörper erkannt, während bei dem Präzipitat aus NFS4 Migr Gesamtprotein die Bande nicht erkannt wird.

Zusammengefasst ergaben die Charakterisierungsversuche an den NFS4 (Migr) Zellen, dass es sich bei dieser Zelllinie um ein brauchbares System von *NF1-/-* Zellen handelt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Zellen migrieren und diese Migration sowohl auf Einzelzellniveau als auch in einer Gesamtzellpopulation beobachtet werden kann.

3.1.2 Transduktion von Proteinen in lebende Zellen

3.1.2.1 Transduktion eines Anti-Aktin-Antikörpers mithilfe der Reagenzien Chariot und Saint-PhD

Als Beispielprotein für eine Proteintransduktion wurde ein FITC-markierter Antikörper gegen Aktin (AAF) verwendet. Bei erfolgreicher Transduktion des funktionellen Antikörpers sollte in den Zellen unter Anregung mit 488nm Wellenlänge das typische Aktinskelettmuster zu erkennen sein. Wie in Abbildung 14 A zu sehen, detektiert der Anti-Aktin-Antikörper in NFS4 Migr Zellen in Paraformaldehyd-fixierten und zusätzlich permeabilisierten Zellen die Immunohistochemie Aktin. Es wurden Transduktionen mit 1µg AAF nach Standardbedingungen für Chariot durchgeführt. Vereinzelte Fluoreszenzsignale konnten in den Zielzellen detektiert werden (Abbildung 14 B). Diese kamen jedoch selten vor und konnten bei 100facher Vergrößerung in einem Fluoreszenzmikroskop als meist membranassoziiert erkannt werden (Abbildung 14 C). Zudem waren die Signale punktförmiger Natur und hatten daher keine Ähnlichkeiten mit den zu erwarteten Längsstrukturen der Aktinsignale. Änderungen der Protein- und Transduktionsreagenzmengen erbrachten keine Verbesserung der Natur der Fluoreszenzsignale. Während bei 5µM Chariot noch schwache Signale in den NFS4 Migr Zellen detektiert werden konnten, so waren diese bei 10µM noch stärker membranassoziiert (Abbildung 14 C). Nach einer weiteren Verdopplung der Transduktionsreagenzmenge wurden fast ausschließlich extrazelluläre Signale detektiert (Abbildung 14 D).

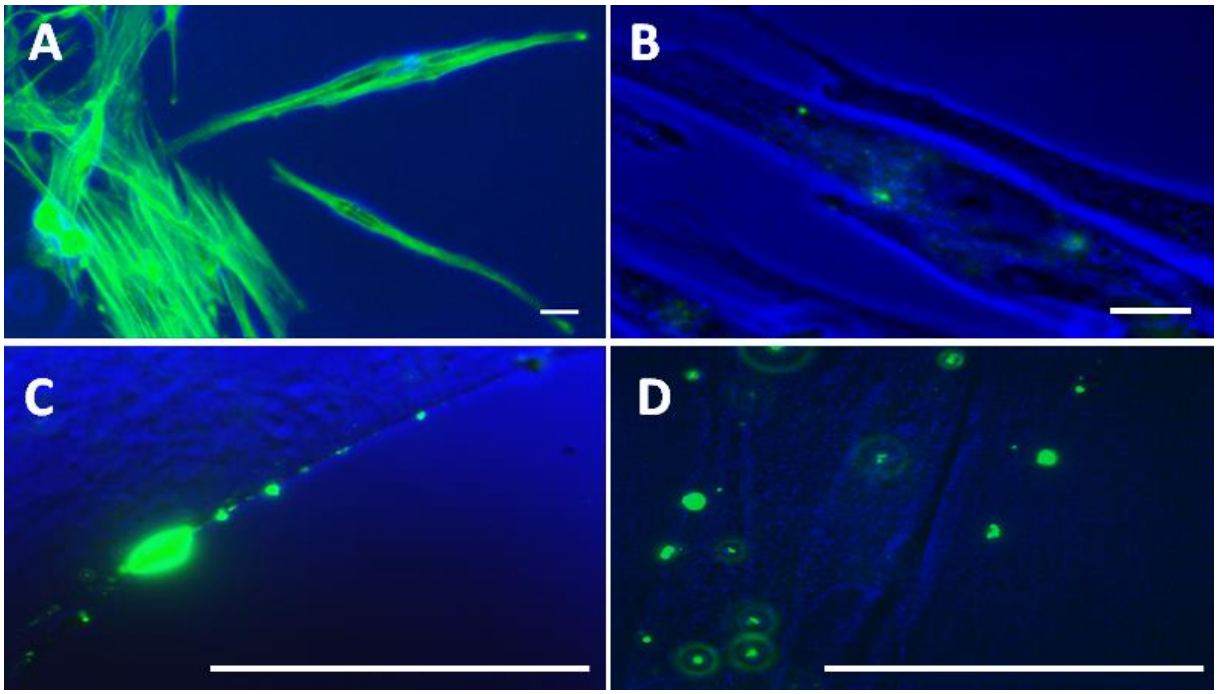

Abb. 14: Immunohistochemie von Aktin durch einen FITC-markierten Anti-Aktin-Antikörper (AAF) und Transduktion des AAF mittels Chariot-Reagenz. Das Phasenkontrastbild der Zellen ist blau, das FITC-Signal grün dargestellt. Der weiße Balken markiert eine Länge von 10µm. (A) Die NFS4 Migr Zellen wurden in Chamberslides kultiviert, anschließend mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Schließlich wurden die Zellen 1 Stunde in 1:50 Verdünnungen des Antikörpers bei Raumtemperatur inkubiert und mehrfach mit phosophate buffered saline (PBS) gewaschen. Das Anfärben der länglichen Aktinfilamente ist gut erkennbar. (B) Mit 20facher Vergrößerung aufgenommene NFS4 Migr Zellen nach Transduktion mit 5µM Chariot. Einzelne, größtenteils punktförmige Signale sind erkennbar. (C) Nach AAF Transduktion mit 10µM Chariot in 100facher Vergrößerung sind hauptsächlich membranassoziierte Signale erkennbar. (D) AAF Transduktion an NFS4 Migr Zellen mit 20µM Chariot: die Signale scheinen sich in erster Linie membranassoziiert oder oberhalb der Zellen zu befinden.

Durch den Gebrauch eines weiteren Transduktionsreagenz, Saint-PhD, konnte die Menge der Signale zwar erhöht werden, doch blieben die Signale zum einen ebenfalls punktuell, zum anderen wurden sehr viele Signale in zellfreien Bereichen detektiert (Anhang Abbildung 1). Variationen der Reagenzkonzentration führten zu keinen Änderungen der Natur der Fluoreszenzsignale. Dies spricht dafür, dass der Transport mittels Saint-PhD sehr unspezifisch ist. Durch die Transduktionsreagenzien Chariot und Saint-PhD konnte der Anti-Aktin-Antikörper nicht effektiv in die NFS4 Migr Zellen transduziert werden.

3.1.2.2 Transduktion verschiedener Proteine mittels Proteoducin in NFS4 Migr Zellen

Da auch mit verschiedensten Optimierungsversuchen mit den zunächst verwendeten Transduktionsreagenzien kein zufriedenstellender Erfolg zu erreichen war, wurde auf einen Komplett-Kit von Jena Bioscience gewechselt, das neben dem Transduktionsreagenz Proteoducin zusätzlich ein Atto488-gelabeltes Beispielprotein, Albumin aus Rinderserum (Atto488-BSA) bereitstellte. Proteoducin ist ein Gemisch verschiedener zellpenetrierender Peptide, wodurch eine effektive Einschleusung in verschiedene Zelltypen gewährleistet werden soll. Die Transduktionen erbrachten schnell vielversprechende Ergebnisse. Zwar blieben auch bei der Transduktion von Atto488-BSA mit Proteoducin die Fluoreszenzsignale punktförmig, doch waren die Signale fast ausschließlich zellassoziiert und die Anzahl der Signale war sehr hoch (Abbildung 15 A). Selbst erhebliche Waschschritte und das Passagieren transduzierter Zellen führten zu keinen nennenswerten Verlusten von Fluoreszenzsignalen, was in Verbindung mit Fluoreszenzdetektion bei 100facher Vergrößerung die Vermutung nahelegte, dass sich die Signale und damit auch das gelabelte Beispielprotein innerhalb der Zellen befand (Abbildung 15 B).

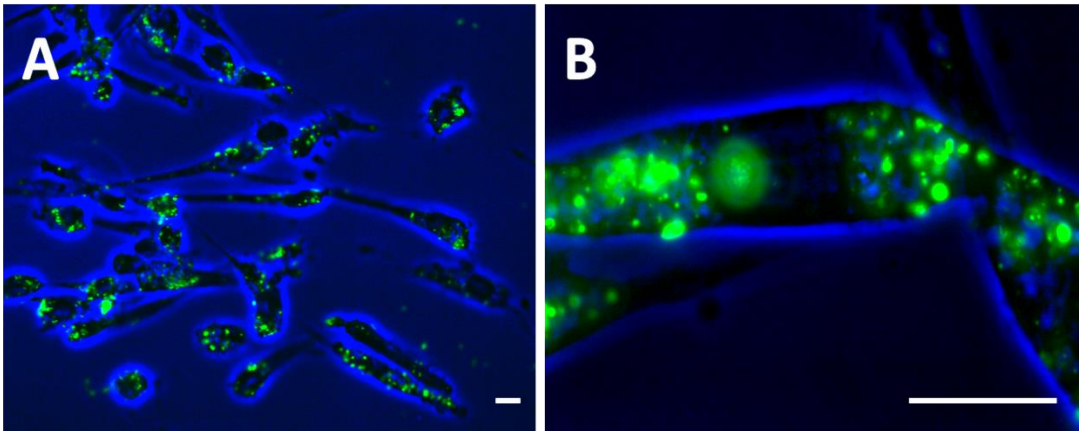

Abb. 15: Transduktion von Atto488-BSA (bovine serum albumin) mittels Proteoducin in NFS4 Migr Zellen. Das Phasenkontrastbild der Zellen ist blau, das Atto488-Signal grün dargestellt. Der weiße Balken stellt eine Länge von 10µm dar. (A) In 20facher Vergrößerung aufgenommenes Fluoreszenzbild: die Fluoreszenzsignale in den Zellen sind zahlreich und fast ausschließlich mit Zellen assoziiert. (B) In starker Vergrößerung zeigt sich, dass die punktförmigen Fluoreszenzsignale zumindest teilweise intrazellulär gelegen sind.

Eine Transduktion mit dem Anti-Aktin-Antikörper mithilfe von Proteoducin führte zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Wiederum waren die Signale punktueller Natur, sehr

zellspezifisch und zumindest teilweise intrazellulär lokalisiert (Abbildung 16 A und B). Als 3. Beispiel wurde R-Phycoerythrin (240kDa) in die NFS4 Migr Zellen transduziert. Auch hier konnten punktuelle Signale in den Zielzellen detektiert werden (Anhang Abbildung. 2). Es konnte daher gezeigt werden, dass mittels Proteoducin 3 verschiedene Proteine spezifisch in die NFS4 Migr Zellen transduziert werden können.

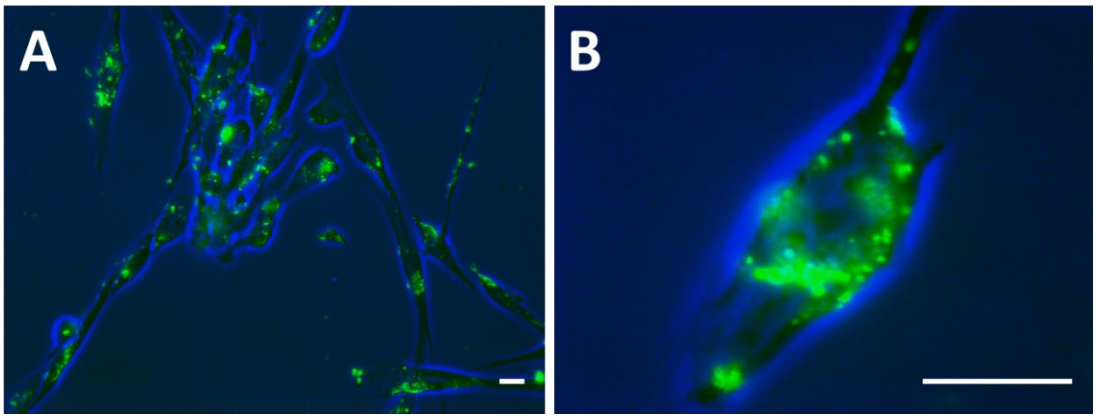

Abb. 16: Transduktion eines FITC-markierten Anti-Aktin-Antikörpers mittels Proteoducin in NFS4 Migr Zellen. Das Phasenkontrastbild der Zellen ist blau, das FITC-Signal grün dargestellt. Fluoreszenzaufnahmen in 20facher (A) und 100facher Vergrößerung (B). Der weiße Balken stellt eine Länge von 10µm dar. Die Signale sind zellspezifisch, punktförmig und zumindest teilweise intrazellulär angesiedelt.

Die Menge der pro Zelle detektierbaren Fluoreszenzsignale hängt direkt mit der Menge des in der Transduktion eingesetzten Proteins zusammen. Abbildung 17 zeigt Fluoreszenzaufnahmen von NFS4 Migr Zellen, in welche in je einem Well eines 8-well Chamberslides mittels Proteoducin verschiedene Mengen AAF eingeschleust wurden. Die Kontrollzellen, die ausschließlich mit Transduktionsreagenz inkubiert wurden (A) zeigen keine Fluoreszenzsignale. Das zeigt, dass das Reagenz allein keine Fluoreszenz in den Zellen generiert. Die Transduktion von 0,25µg AAF (B) ergab wenige Fluoreszenzsignale in den Zielzellen. Eine Verdopplung der Menge des AAF auf 0,5µg (C) führte zu deutlich mehr Signalen. Nach Transduktion von 1µg AAF (D) konnten sehr viele Fluoreszenzsignale detektiert werden. Spezifische Aktinsignale, die auf eine biologische Aktivität des Antikörpers hätten schließen lassen, ließen sich jedoch bei hohen Konzentrationen nicht nachweisen.

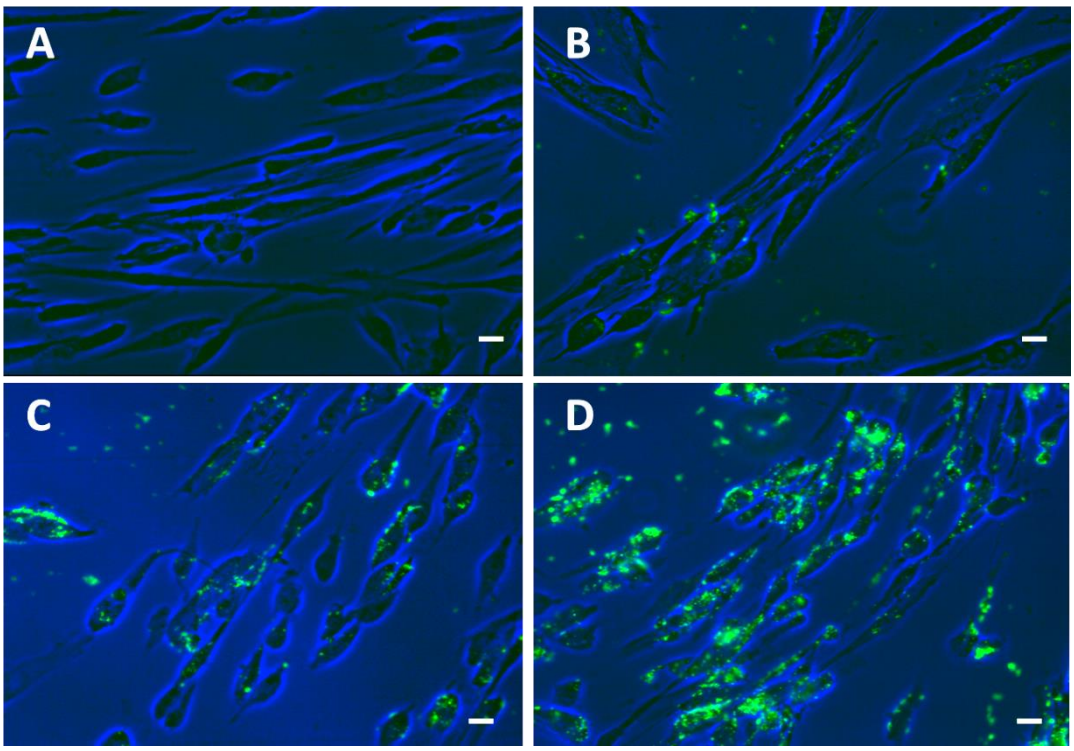

Abb. 17: Transduktion verschiedener Mengen des FITC-markierten Anti-Aktin-Antikörpers (AAF) mittels Proteoducin in NFS4 Migr Zellen. Das Phasenkontrastbild der Zellen ist blau, das FITC-Signal grün dargestellt. Weiße Balken stellen eine Länge von 10µm dar. (A) Bei einer Transduktion ohne AAF können keine Fluoreszenzsignale detektiert werden. Bei steigenden Mengen transduzierten AAFs (B: 0,25µg, C: 0,5µg, D: 1µg) können steigende Mengen an Fluoreszenzsignalen detektiert werden.

3.1.2.3 Transduktion von Atto488-BSA in weiteren Zelltypen

Im weiteren Verlauf wurde geklärt, ob die Transduktionen auch in anderen Zelltypen erfolgreich durchgeführt werden konnten. Hierzu wurde die Transduktion von Atto488-BSA mittels Proteoducin an Melanozyten gesunder Kontrollpersonen durchgeführt. Die Fluoreszenzsignale des Atto488-BSA nach Transduktion mit Proteoducin waren jedoch punktförmig mit einer häufigen Anhäufung im perinukleären Bereich (Abbildung 18). Es konnte gezeigt werden, dass eine Transduktion in einen anderen Zelltyp unter gleichen Bedingungen wie bei der Neurofibrosarkomzelllinie NFS4 Migr gelingt. Transduktionsversuche an HEK-Zellen und Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

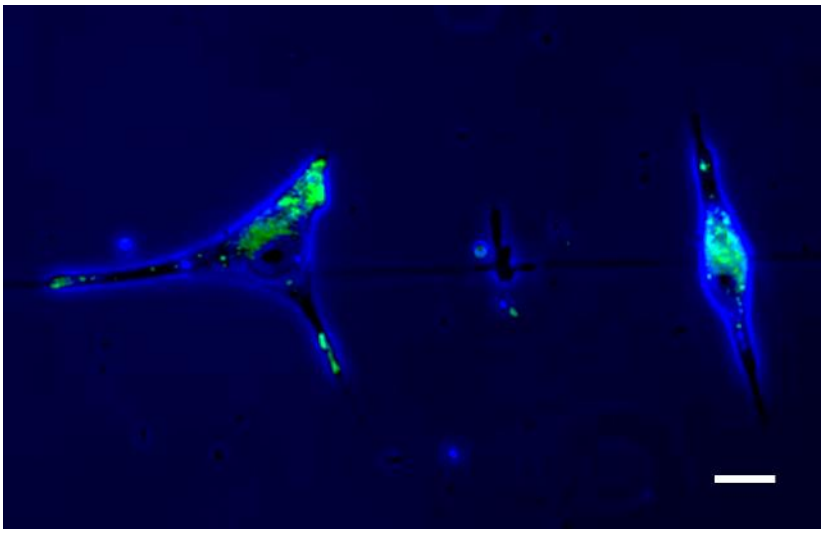

Abb. 18: Transduktion von Atto488-BSA (bovine serum albumin) in Melanozyten einer gesunden Kontrollperson. Das Phasenkontrastbild der Zellen ist blau, das Atto488-Signal grün dargestellt. Der weiße Balken zeigt eine Länge von 10µm. Nach Proteoducin vermittelter Transduktion von Atto488-BSA können in den Melanozyten punktförmige Signale mit einer Anhäufung im perinukleären Bereich detektiert werden.

3.1.2.4 Lokalisierung des transduzierten Atto488-BSA innerhalb der Zellen

Bei erfolgreicher zytoplasmatischer Translokation von BSA wären diffuse Fluoreszenzsignale in der gesamten Zelle zu erwarten. Das gefundene Signalmuster entsprach jedoch eher dem Muster von Endo- und Lysosomen. Um dies zu verifizieren, wurden Atto488-transduzierte Kontrollfibroblasten in verschiedenen Experimenten zusätzlich mit Lysotracker red behandelt. Dieses Reagenz ist zellgängig und emittiert nach spezifischer Anregung Licht, welches der Wellenlänge der Namensgebenden Farbe entspricht, wenn sie saurem Milieu ausgesetzt sind. Durch eine Strukturveränderung der Stoffe bei niedrigen pH-Werten verlieren sie die Fähigkeit, Membranen zu durchdringen, was zu einer Anreicherung in Organellen mit niedrigem pH wie späten Endosomen und Lysosomen führt. Abbildung 19 zeigt Fluoreszenzoverlaybilder von Lysotracker red behandelten, transduzierten Zellen. Es sind alle denkbaren Varianten der Signale zu erkennen. Rein grüne Signale entsprechen dem Fluoreszenzsignal des transduzierten Atto488-BSA, rein rote Signale spiegeln späte Endosomen und Lysosomen wider, die kein fluoreszierendes Protein enthalten. Bei einer Kolokalisation entsteht durch additive Farbmischung ein gelber Farbeindruck. Dies

entspricht den Erwartungen einer endosomalen Aufnahme der Proteine. Hier sollte sich ein Teil der aufgenommenen Proteine in frühen Endosomen mit annähernd neutralem pH-Wert befinden (grünes Signal), das gros der Signale eingeschleuster Proteine sollte sich im Bereich der späten Endosomen und Lysosomen befinden (Mischfarben aus grün und rot). Ebenfalls sollten Lysosomen ohne transduzierte Proteine vorliegen (rot). Die Lokalisationsexperimente bestätigen daher eine endosomale Aufnahme und den Verbleib in endolysosomalen Strukturen des transduzierten Atto488-BSA.

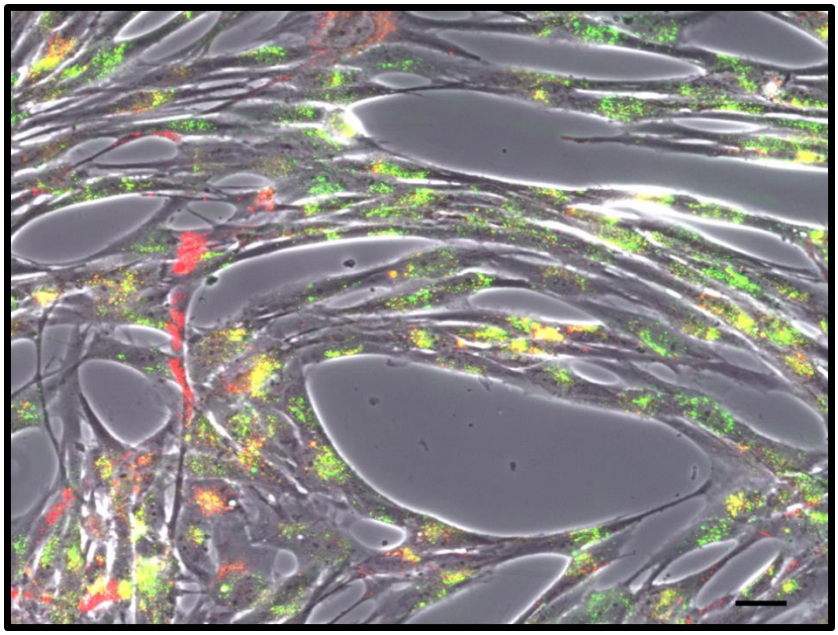

Abb. 19: Atto488-BSA (bovine serum albumin) transduzierte und mit Lysotracker red (LR) gefärbte Neurofibrosarkomzellen. Der schwarze Balken stellt eine Länge von 10µm dar. Grüne Signale geben die Atto488 Fluoreszenz wieder, rote Signale zeigen den akkumulierten LR in intrazellulären Vesikeln mit niedrigen pH-Wert (späte Endosomen und Lysosomen) an. Mischfarben aus grün und rot entsprechen daher Atto488-Signalen in angesäuerten Vesikeln. Das Bild wurde 60 Minuten nach einer 20stündigen Atto488-BSA Transduktion mittels Proteoducin aufgenommen.

3.1.2.5 Transduktion von Atto488-BSA mittels verschiedener Reagenzien in NFS4 Migr Zellen

Lokalisation der transduzierten Proteine

Da ein endosomales Verbleiben von Proteinen nach der Transduktion in Hinblick auf den zytoplasmatischen Wirkort des später zu transduzierenden

Neurofibromins unzureichend war, wurden 7 weitere, kommerziell erhältliche Proteintransduktionsreagenzien auf eine mögliche zytoplasmatische Translokation eingeschleuster Proteine hin untersucht. Um Vergleichbarkeit der Experimente zu schaffen, wurden in den Handbüchern vorkommende, sekundäre Inkubationszeiten so gewählt, dass allen Transduktionen dieselben Transduktionszeiten zugrunde lagen. Zudem wurde grundsätzlich dieselbe Menge Atto488-BSA transduziert. Verschiedene Reagenzien verfolgen unterschiedliche Strategien zur Aufnahme von Proteinen in lebende Zellen *in vitro*. Als Beispiele für zellpenetrierende Peptide (CPPs) wurden Proteoducin und Chariot gewählt. Nach Transduktionen mit diesen Reagenzien fanden sich primär endosomale Fluoreszenzsignale in den Zielzellen (Abbildung 20 A, B). Pro-Ject, PROTEOfectene, Pro-DeliverIN und Lipodin-Pro wurden als Beispiele für Proteineinschleusesysteme verwendet, die künstliche Lipidvesikel nutzen, welche das Protein in ihr Lumen aufnehmen und dieses dann durch Fusion mit der Zell- oder Endosomenmembran ins Zytoplasma der Zielzellen abgeben. Auch bei diesen Reagenzien konnten in den Zielzellen fluoreszenzmikroskopisch nur punktuelle, endo-lysosomale Signale detektiert werden (Abbildung 20 C, D, E, F). Auf der Basis von (kationischen) Polymeren funktioniert die Aufnahme der Reagenzien TransPassP und TurboFect. Auch diese Reagenzien konnten Atto488-BSA in die NFS4 Migr Zellen transportieren, doch ebenfalls nur durch endosomale Aufnahme (Abbildung 20 G, H). Auch im zeitlichen Verlauf zeigte sich nach Transduktionen mit diesen Reagenzien keine Translokation des eingeschleusten Proteins in das Zytoplasma der Zellen. Als einziges Reagenz, das primär eine endosomolytische Wirkung anstrebt, wurde Endo-Porter (EP) getestet. EP lagert sich in die Plasmamembran der Zelle ein und wird endosomal (zusammen mit möglichen Proteinen im Kulturmedium) aufgenommen. Bei zunehmender Ansäuerung der Endosomen tritt eine Protonierung des EP ein, was schließlich zu einer ladungsbedingten Abstoßung der EP und in der Folge zu einer Ruptur der Endosomen- bzw. Lysosomenmembran führt. Nach Transduktionen mit diesem Reagenz konnten neben den typisch endosomalen Signalen auch zytoplasmatische Fluoreszenzsignale detektiert werden (Abbildung 20 I). So konnte gezeigt werden, dass das Problem des endolysosomalen Einschlusses transduzierter Proteine ein Problem fast aller Transduktionsreagenzien und –systeme darstellt.

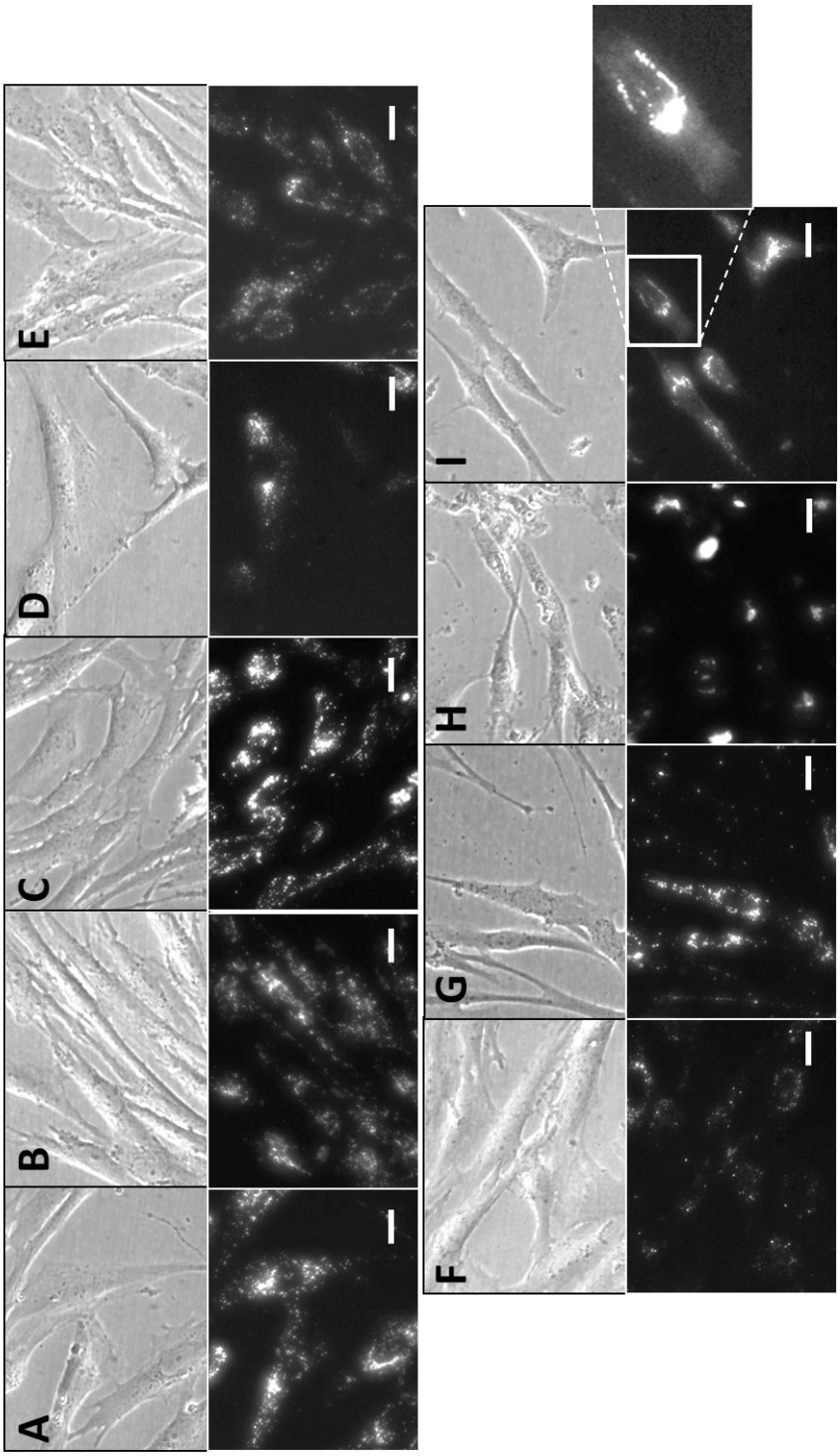

Abb. 20: Transduktion von Atto488-BSA (bovine serum albumin) in NFS4 Migr Zellen mittels verschiedener Transduktionsreagenzien. Dargestellt sind jeweils eine Phasenkontrastaufnahme und eine Fluoreszenzaufnahme des Atto488-Signals 30 Minuten nach Beendigung einer 20stündigen Atto488 Transduktion. Die weißen Balken stellen eine Länge von 10µm dar. Bei den Reagenzien Proteoducin (A), Chariot (B), ProJect (C), PROTEOfectene (D), Pro-DeliverIN (E), Lipodin-Pro (F), TransPassP (G), TurboFect (H) und Endo-Porter (I) wurden punktuelle, endolysosomale Atto488-Signale detektiert. Bei Zellen, die mittels Endo-Porter transduziert wurden können zusätzlich schwache zytoplasmatische Signale detektiert werden.

Effizienz der verwendeten Transduktionsreagenzien

Um die verschiedenen Transduktionsverfahren vergleichen zu können, wurden mehrere Parameter verglichen: (i) der prozentuale Anteil der Zellen, die transduziert wurden, (ii) die Toxizität der Transduktion und (iii) die Menge des eingeschleusten Proteins.

Der Anteil Atto488 positiver NFS4 Migr Zellen nach den Transduktionsversuchen mit den verschiedenen Reagenzien wurde in einem Flow Cytometer gemessen. Überraschenderweise lieferten alle Transduktionsreagenzien Atto488 positive Zellen im Bereich von ca. 90 – ca. 100% (Abb. 21, [81]). Das Reagenz TurboFect lieferte mit 89,2% den niedrigsten, Endo-Porter mit 96,8% den höchsten Anteil Atto488 positiver Zellen. Daher ist festzustellen, dass alle Proteineinschleusesysteme bei normierter, vergleichbarer Anwendung den größten Teil der behandelten Zellen transduzieren.

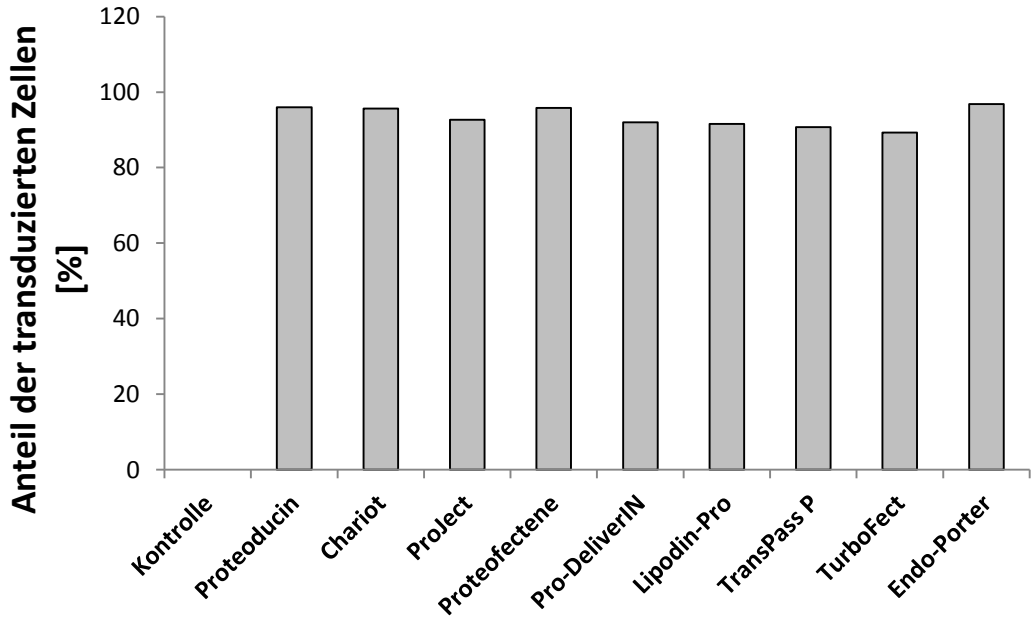

Abb. 21: Anteil der Atto488 positiven NFS4 Migr Zellen nach Atto488-BSA (bovine serum albumin) Transduktion mittels verschiedener Reagenzien. Die Transduktionsrate ist über alle Reagenzien einheitlich hoch. TurboFect liefert mit 89,2% den niedrigsten, Endo-Porter mit 96,8% den höchsten Anteil transduzierter Zellen (n=20000) (aus [81]).

Eine parallele Färbung der transduzierten NFS4 Migr Zellen mit Propidiumiodid (PI) ermöglichte eine gleichzeitige Einteilung der im Flow Cytometer untersuchten Zellen in lebende (PI-negative) und tote (PI-positive) Zellen, da Plasmamembranen nekrotischer und spät apoptotischer Zellen für PI durchlässig werden und so die DNA dieser Zellen gefärbt wird. Die Detektion PI-positiver

Zellen konnte am Flow Cytometer gleichzeitig mit der Detektion von Atto488 Signalen durchgeführt werden. Erhöhte Mengen PI positiver Zellen konnten nach Transduktion mit TransPassP, Pro-Ject und TurboFect gemessen werden (Abb. 22, [81]). Die hohe Anzahl nekrotischer Zellen von ca. 15% in Kontrollen ist auf mehrfache Wasch- und Zentrifugationsschritte zurückzuführen. Parallel getestete, unbehandelte NFS4 Migr Zellen, die nur einmalig abzentrifugiert wurden, zeigten übliche Nekroseraten von 0-4%.

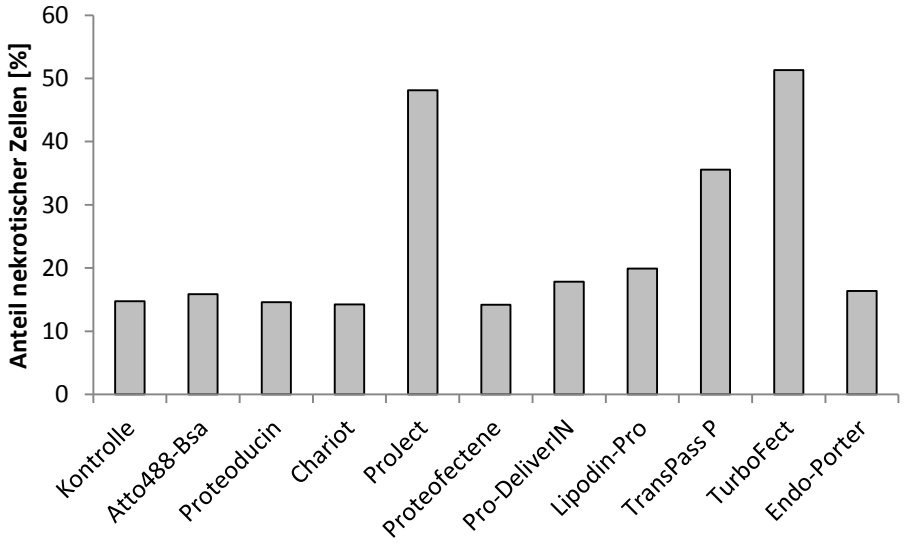

Abb. 22: Bestimmung der Nekroserate nach Atto488-BSA (bovine serum albumin) Transduktion mittels verschiedener Transduktionsreagenzien. Nekrotische NFS4 Zellen wurden durch Durchflusszytometrie mittels Propidiumiodidfärbung (PI-Färbung) detektiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der PI positiven Zellen (n=20000). Gesteigerte Mengen nekrotischer Zellen konnten nach Transduktionen mit ProJect, TransPassP und TurboFect gemessen werden. Eine Inkubation mit Atto488-BSA ohne Transduktionsreagenz führte zu keiner gesteigerten Nekroserate (aus [81]).

Die Menge Protein, die in die NFS4 Migr Zellen transduziert wurde, wurde über zwei verschiedene Messmethoden detektiert. Zum einen konnten im selben Ansatz für die prozentualen Anteile Atto488- bzw. PI-positiver Zellen die Fluoreszenzstärken der Atto488 Signale der Einzelzellen gemessen werden (Abbildung 23 A [81]). Zum anderen wurden Atto488-BSA transduzierte Zellen lysiert und die Lysate in einem Fluoreszenz-Reader in 96-well-Platten vermessen (Abbildung 23 B [81]). Obwohl die Ergebnisse der unterschiedlichen Versuche nicht exakt übereinstimmten, konnten dennoch 3 Transduktionsprotokolle (Proteoducin, Chariot und ProJect) erkannt werden, die im Direktvergleich zu den übrigen Protokollen zu sehr hohen Mengen an Atto488-Signalen in den Zielzellen

beziehungsweise den Lysaten der Zielzellen führten. Zusammenfassend ergaben die Effizienzuntersuchungen der verschiedenen Transduktionsreagenzien, dass die CPP-basierten Reagenzien (Proteoducin und Chariot) die effizientesten Reagenzien im Test waren.

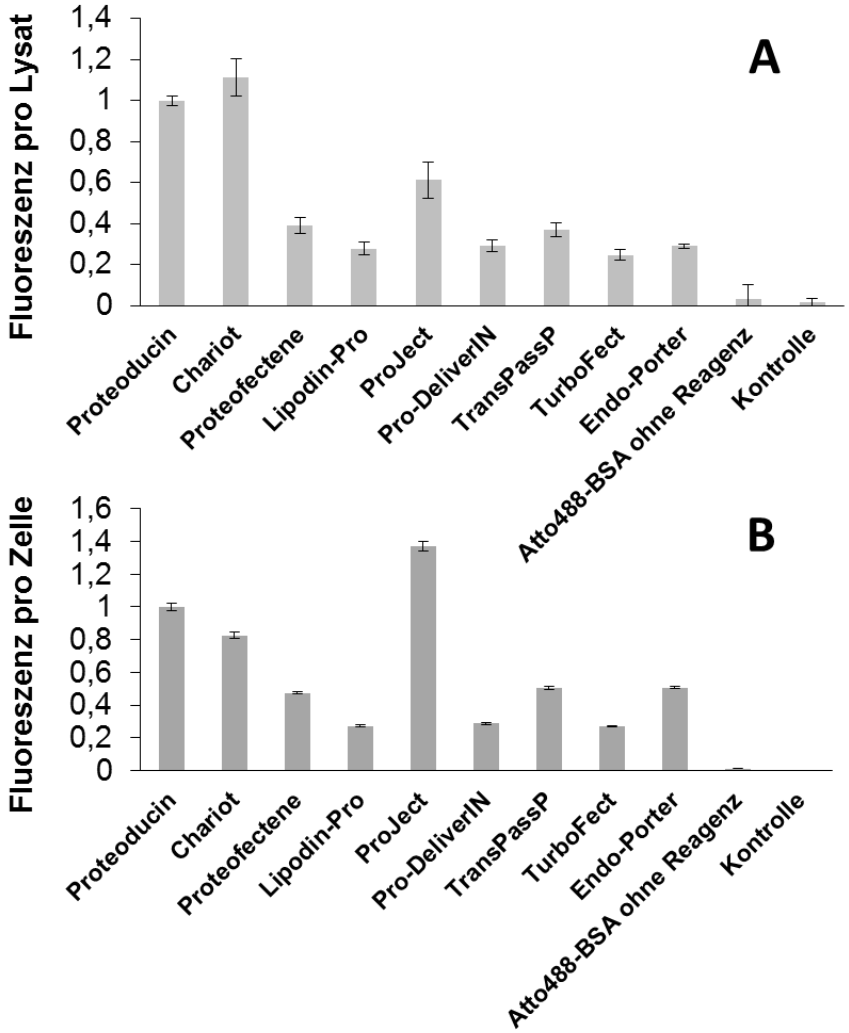

Abb. 23: Messung der Menge eingeschleuster Proteine nach Atto488-BSA (bovine serum albumin) Transduktion in NFS4 Migr Zellen mittels verschiedener Transduktionsreagenzien. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf den Mittelwert der Ergebnisse der Proteoducin-Transduktionen normiert. Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall dar (n=20000). (A) Die Messung der Fluoreszenz in Lysaten Atto488-BSA transduzierter Zellen in einem Multiwell-Fluorescence-Reader. Die stärkste mittlere Fluoreszenz wurde in Chariot-, gefolgt von Proteoducin- und ProJect-transduzierten NFS4 Migr Zelllysaten gemessen. Die übrigen Transduktionsreagenzien lieferten vergleichbare Ergebnisse. Eine Inkubation mit Atto488-BSA ohne Reagenz führte zu sehr schwachen Signalen. (B) Messung der mittleren Fluoreszenz pro Einzelzelle durch ein Flow Cytometer. Die stärkste mittlere Fluoreszenz wurde ProJect-, gefolgt von Proteoducin- und Chariot-transduzierten NFS4 Migr Zellen gemessen. Unbehandelte Kontrollen und Atto488-Bsa inkubierte Zellen ohne Reagenz lieferten keine nennenswerten Fluoreszenzsignale (aus [81]).

3.1.3 Untersuchungen zur Freisetzung endosomal eingeschlossener, transduzierter Proteine

Um Proteine aus endosomalen Vesikeln freizusetzen, werden verschiedene Behandlungen in der Literatur beschrieben, wie beispielsweise Behandlungen der Zellen mit Calcium, Wortmannin, Chloroquin und TAT-Hemagluttinin2. Da Veränderungen im Ca^{2+} Gehalt der Kulturmedien zu dramatischen, intrazellulären Veränderungen wie Änderungen in der Proliferation oder Induktion von Apoptose führen können [10], wurde auf diese Möglichkeit verzichtet. Auch von einer Behandlung mit Wortmannin wurde abgesehen, da Wortmannin als Inhibitor in einem Neurofibromin-relevanten Signalweg verwendet wird [138], was in Hinblick auf die zielgesetzten Neurofibromintransduktionen als erheblicher Störfaktor eingestuft wurde. Chloroquin wird *in vivo* zur Prophylaxe der Malaria in niedrigen Konzentrationen eingesetzt, um die Ansäuerung von Endosomen zu verhindern. Hohe Konzentrationen (> 150µM) führen zu Endosomenrupturen und daher zur Freisetzung der im Lumen der Endosomen befindlichen Stoffe. Dies wurde in den transduzierten Zellen erprobt. NFS4 Migr Zellen wurden mit Konzentrationen von 150, 200, 250, 300 und 350µM Chloroquin in DMEM für 21 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen zeigten bereits bei der niedrigsten Konzentration Anzeichen von Toxizität, die progressiv mit der steigenden Konzentration stieg (Abbildung 24 A-E). Niedrigere Konzentrationen bis zu 150µM Chloroquin wurden für bis zu 96 Stunden Inkubation getestet. Nach 24 Stunden zeigte sich bereits bei 90µM Konzentration ein erstes Abkugeln der Zellen, 140µM führten zum Ablösen von nahezu 100% der behandelten Zellen. Nach 48 Stunden wurden dieselben Ergebnisse bei ab 80 bzw. 130µM detektiert. Bei einer Inkubation von 96 Stunden zeigten erste Zellen bei 40µM Chloroquin Toxizitätserscheinungen. 70µM Chloroquin führten zum Abkugeln und Ablösen aller Zellen. Diese Ergebnisse deckten sich mit Literaturangaben, die besagen, dass die nötigen Chloroquin-Konzentrationen zur Endosomenruptur auf Zellen stark toxische Wirkung haben [21, 35, 109]. Da diese starke Toxizität für die Freisetzung transduzierter, endosomal eingeschlossener Proteine nicht akzeptabel war, wurden von weiteren Versuchen mit Chloroquin abgesehen.

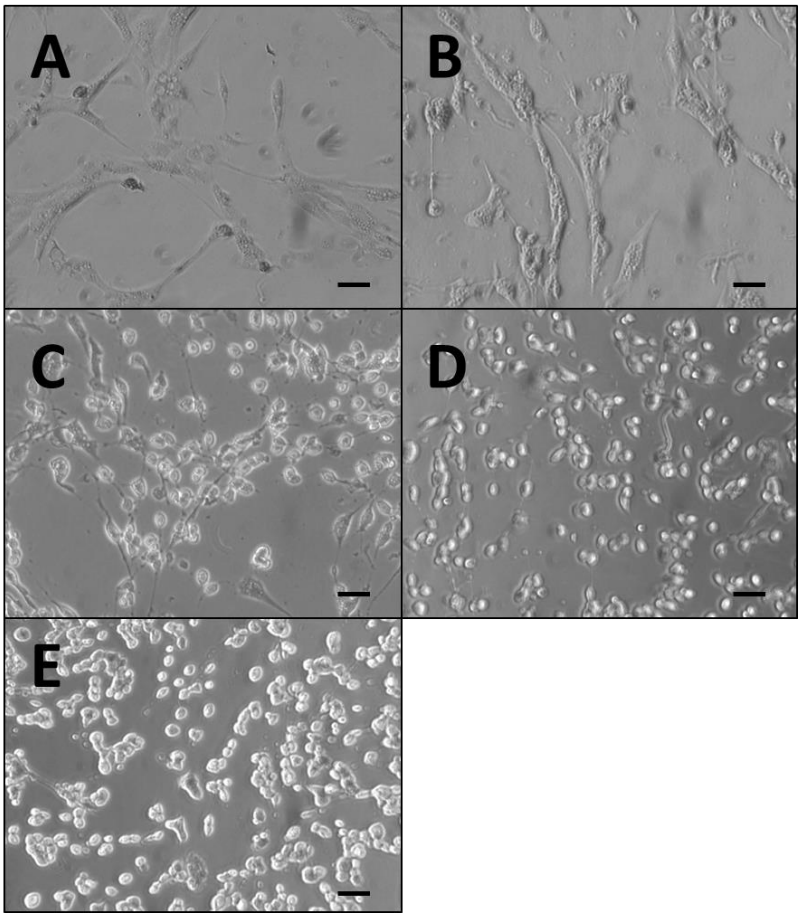

Abb. 24: Behandlung von NFS4 Migr Zellen mit verschiedenen Mengen Chloroquin. Schwarze Balken stellen eine Länge von 10µm dar. Nach 21 Stunden Inkubation der Zellen zeigen sich unterschiedlich starke toxische Effekte in Abhängigkeit der Chloroquinkonzentration. Während die Zellen bei 150µM (A) einen normalen Phänotyp zeigen, konnten bei 200µM erste Anzeichen von Abkugeln der Zellen gefunden. Diese Tendenz setzt sich bei 250µM (C) fort. Bei 300 (D) und 350µM (E) finden sich ausschließlich abgekugelte, sich ablösende Zellen in der Zellkultur.

Die Koinkubation von CPP-Fusionsproteinen mit separatem TAT-HA2-Peptid führten in der Literatur in *in vitro* Versuchen zu einer verstärkten Translokation transduzierter Proteine ins Zytoplasma der Zielzellen [121]. Daher wurden Atto488-BSA Transduktionen mit Inkubationen mit 10µM eines kommerziell erhältlichen TAT-HA2 Peptids kombiniert. Die endolysosomale Lokalisation der transduzierten Atto488-BSA Moleküle blieb jedoch bestehen (Abbildung 25).

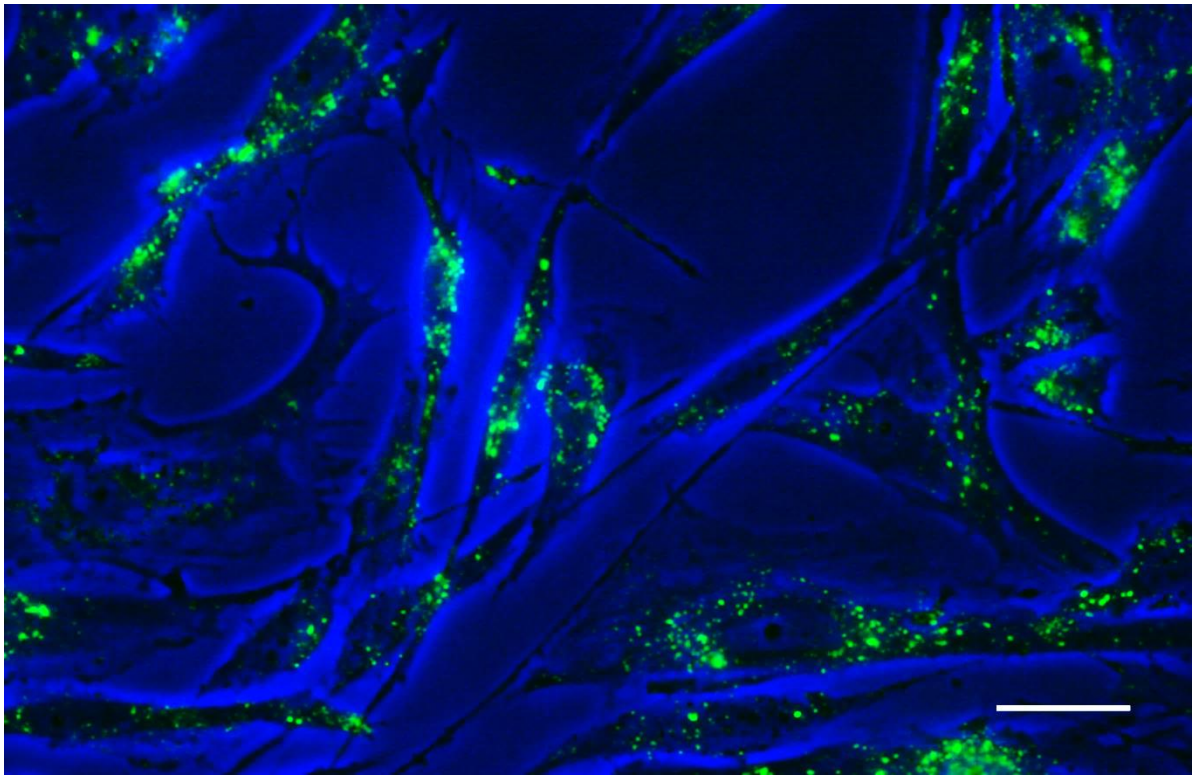

Abb. 25: Koinkubation eines TAT-Hemagluttinin2 Fusionspeptids (TAT-HA2) mit einer Chariot vermittelten Atto488-BSA (bovine serum albumin) Transduktion in NFS4 Migr Zellen. Der Phasenkontrast der Zellen ist blau, das Atto488-Signal grün dargestellt. Der weiße Balken stellt eine Länge von 10µM dar. Es sind ausschließlich punktförmige, endolysosomale Atto488-Signale detektierbar.

Da weder die Inkubationen mit Chloroquin noch Koinkubationen mit TAT-HA2 Fusionspeptiden zur Freisetzung der endolysosomal gespeicherten, eingeschleusten Proteine führten, wurden weitere Literaturrecherchen zum Thema Freisetzung von Stoffen aus Endo- und Lysosomen durchgeführt. Diese Recherchen führten schließlich zur Technik der Photochemischen Internalisation (photochemical internalization (PCI)).

3.1.4 Photochemical internalization in Verbindung mit CPP-vermittelter Proteintransduktion

Um die Jahrtausendwende entwickelten Berg und Mitarbeiter ein Verfahren zur Auflösung endolysosomaler Vesikel, die sogenannte photochemische Internalisation (PCI). Diese PCI wurde entwickelt, um die Effizienz von Gelonin bei der Behandlung verschiedener Krebsarten *in vivo* zu erhöhen [8]. Da die vorausgegangenen eigenen Tests zur Proteintransduktion gezeigt hatten, dass

transduzierte Proteine primär endosomal aufgenommen werden (siehe 3.1.2.5), wurde vermutet, dass dieses Licht-induzierte Verfahren zum Aufbrechen von endolysosomalen Vesikeln eine Translokation der transduzierten Proteine in das Zytoplasma der Zellen bewirken könnte. Als Photosensitizer, der durch lichtinduzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) die endolysosomalen Membranen beschädigen sollte, wurde 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonato-phenyl)-21,23H-porphyrin ($TPPS_4$) gewählt, da dieses sowohl als funktionell beschrieben [8] als auch leicht erhältlich war. Der optimale Anregungsbereich dieses Photosentizers liegt im Wellenlängenbereich sichtbaren blauen Lichts, welches laut Literatur durch kommerziell erhältliche Lampen appliziert werden konnte. Folgend wurde eine Leuchtröhrenlampe mit Halterungen für 4 Osram L 18W/67 Neonröhren konzipiert, die in der Höhe verstellbar sein sollte, um die Intensität des an den Zellen –und damit dem Photosensitizer- ankommenden Lichts variieren zu können. Aus Kombinationen von Beschreibungen von Lampen, die zur PCI verwendet wurden und eigenen Überlegungen entstand ein Bauplan einer PCI-Lampe. Der Bau dieser Lampe wurde von den universitätseigenen Werkstätten realisiert (Abbildung 26 A). Die ankommenden Lichtstärken wurden an verschiedenen Stellen des Belichtungsbereichs für die höchste und niedrigste Fassungseinstellung und die durch einen eingebauten Dimmer maximal und minimale Lichtstärke mit einem Luxmeter gemessen. Die maximal die Zellen erreichende Lichtstärke (8,32 mW/cm^2) fand sich erwartungsgemäß bei maximal eingestellter Lampenstärke und niedrigster Lampenhöhe im mittigen Bereich. Diese Lichtstärke blieb in Längsrichtung stabiler als in Querrichtung, was für die spätere Ausrichtung von Zellkulturgefäßen relevant war (Abbildung 26 B).

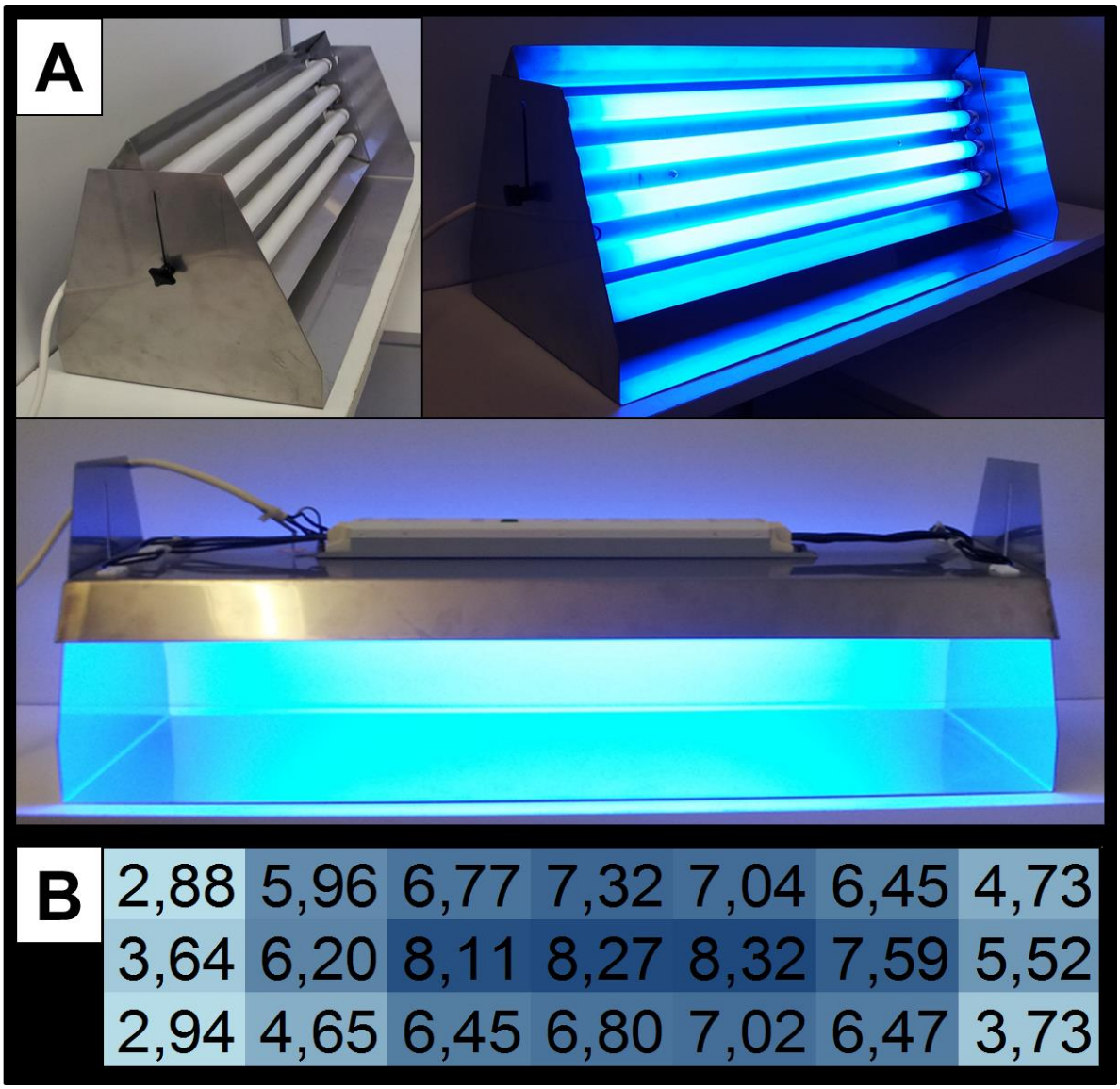

Abb. 26: Aufbau und Leuchtstärke der photochemical internalization- (PCI-) Lampe. (A) Die PCI Lampe besteht aus einem Aluminiumgehäuse in welches 4 Zünder für Leuchtöhren verbaut wurden, die parallel angeordnet sind. Die Fassung dieser Leuchtröhren ist schwenk- und höhenverstellbar. Zusätzlich ist ein Dimmer verbaut, der die Lichtstärke stufenlos regeln kann. (B) Gemessene Lichtintensitäten in mW/cm² der Leuchtröhrenbatterie in horizontaler Ausrichtung, niedrigster Fassungshöhe und höchster Lampenstärke in einer Heat-Map-Darstellung. Im mittleren Bereich bleiben die Intensitäten stabil (8,11-8,32 mW/cm²). Um eine gleichmäßige Belichtung zu gewährleisten, müssen Zellen für eine PCI-Behandlung in diesem Bereich platziert werden.

Für die Kombinationsversuche aus CPP-vermittelter Atto488-BSA Transduktion und PCI wurden Neurofibrosarkomzellen für ca. 20 Stunden vor der CPP-vermittelten Atto488-BSA Transduktion mit Nährmedium inkubiert, das 1µg/ml $TPPS_4$ enthielt. Das Photosensitizer beinhaltende Medium wurde kurz vor der

Transduktion der Zellen entfernt. Nach der 20stündigen Transduktion wurde das Transduktionsmedium entfernt, die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und schließlich mit der PCI-Lampe bei circa 8,3mW/cm² für 10 Minuten beleuchtet. Folgende Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass neben den bekannten, punktuellen, endolysosomalen Signalen auch diffuse zytoplasmatische Signale detektierbar wurden (Abbildung 27).

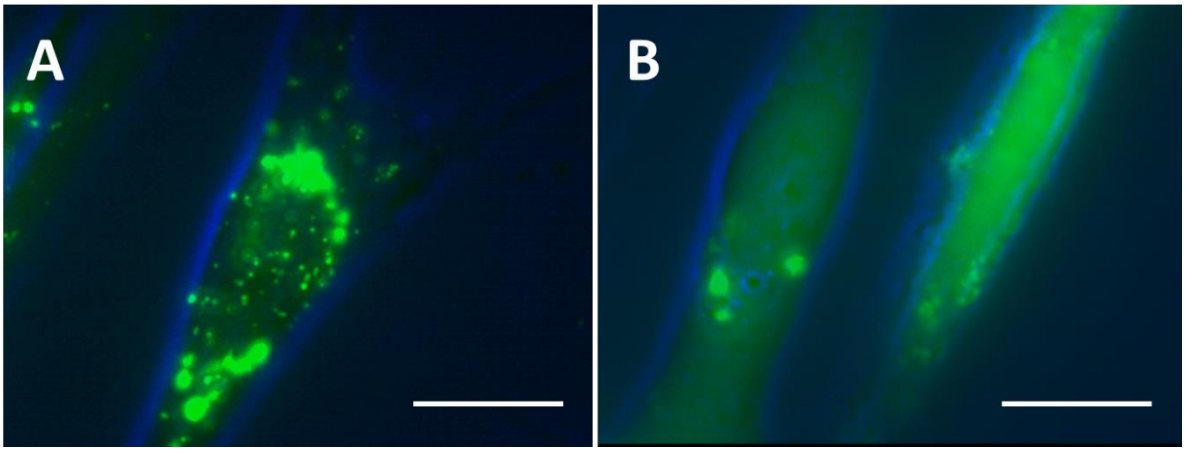

Abb. 27: Photochemical internalization- (PCI-) Behandlung Atto488-BSA (bovine serum albumin) transduzierter NFS4 Migr Zellen. Weiße Balken entsprechen einer Länge von 10µm. Der Phasenkontrast der Zellen ist blau, das Atto488-Signal grün dargestellt. (A) Mittels Chariot Atto488-BSA transduzierte NFS4 Migr Zellen zeigen eine endo-lysosomale Lokalisation der Fluoreszenzsignale. Nach einer PCI-Behandlung zeigen die Zellen neben punktuellen Signalen auch diffuse Signale über das gesamte Zelllumen hinweg (B).

Um den zeitlichen Verlauf der Freisetzung endosomal eingeschlossener Proteine zu erhalten, wurde in weiteren Versuchen die Lichtapplikation für die PCI über einen FITC Filtersatz direkt an einem Invertfluoreszenzmikroskop durchgeführt. Ein besonderer Vorteil der Verwendung von $TPPS_4$ und Atto488 als Fluoreszenz des Proteins liegt darin, dass beide Stoffe bei Licht derselben Wellenlänge angeregt werden. So konnte direkt beobachtet werden, was im Laufe der PCI-Behandlung der Zellen mit dem Atto488-Signal geschah und es ergab sich so auch die Möglichkeit eines live cell imagings der PCI an transduzierten Zellen. Die Freisetzung der Proteine aus den endolysosomalen Vesikeln ist zeitabhängig und sehr schnell. Abbildung 28 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen derselben transduzierten NFS4 Migr Zellen nach 0, 20, 40 und 80 Sekunden Anregung des Photosensitizers (vgl. auch Video auf Wikimedia http://commons.wikimedia.org/

iki/File:Enhancing-Endosomal-Escape-of-Transduced-Proteins-by-Photochemical-Internalisation-pone.0052473.s008.ogv [81]). Die Kombination aus CPP-vermittelter Atto488-BSA Transduktion und photochemischer Internalisation führte daher erfolgreich zu einer primär endosomalen Aufnahme der Proteine und sekundär zu einer Translokation ins Zytoplasma der Zielzellen.

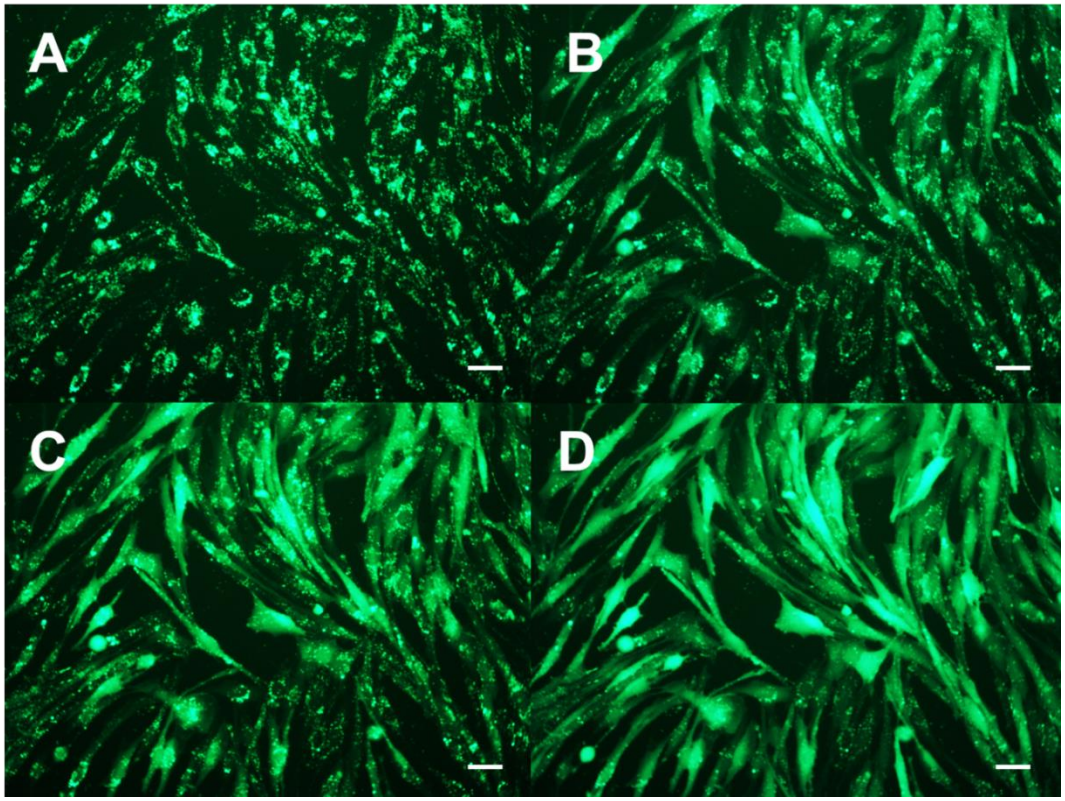

Abb. 28: Fluoreszenzaufnahmen während einer photochemical internalization- (PCI-) Behandlung an Atto488-BSA (bovine serum albumin) transduzierten NFS4 Migr Zellen. Die Transduktionen wurden mittels Chariot durchgeführt. Weiße Balken stellen eine Länge von 10µM dar. Das Atto488-Signal ist grün dargestellt. Die Aufnahmen wurden nach 0 (A), 20 (B), 40 (C) und 80 (D) Sekunden der Belichtung der Zellen durch eine HBO 100 Lampe gemacht. Ohne Belichtung sind die Signale punktueller, endolysosomaler Natur. Im Laufe der Behandlung lösen sich die Endo- und Lysosomen auf und die eingeschleusten Proteine verteilen sich im Zytoplasma.

3.1.4.1 Abhängigkeit zwischen $TPPS_4$-Konzentration und PCI-Effekt

Die Geschwindigkeit und Häufigkeit der Auflösung endolysosomaler Strukturen bei der PCI könnte mit der Menge des applizierten Photosensitizers $TPPS_4$ korrelieren. Dies wurde überprüft, indem NFS4 Migr Zellen vor der Transduktion mit Atto488-BSA durch Chariot für 20 Stunden mit 0,07-1µg $TPPS_4$ inkubiert wurden. Nach der Transduktion wurde durch Direktbelichtung einer HBO 50

Lampe und eines GFP-/FITC Filtersets in einem Invertfluoreszenzmikroskop die PCI durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Fluoreszenzbilder aufgenommen. So konnte der Verlauf des PCI-Effektes dokumentiert werden. Abbildung 29 zeigt die Phasenkontrastaufnahmen (PK) und die Fluoreszenzaufnahmen vor, während und nach der PCI Atto488-BSA transduzierter NFS4 Migr Zellen. Abhängig von der Konzentration des $TPPS_4$ ist eine abnehmende Wirkung in der endolysosomalen Auflösung zu erkennen.

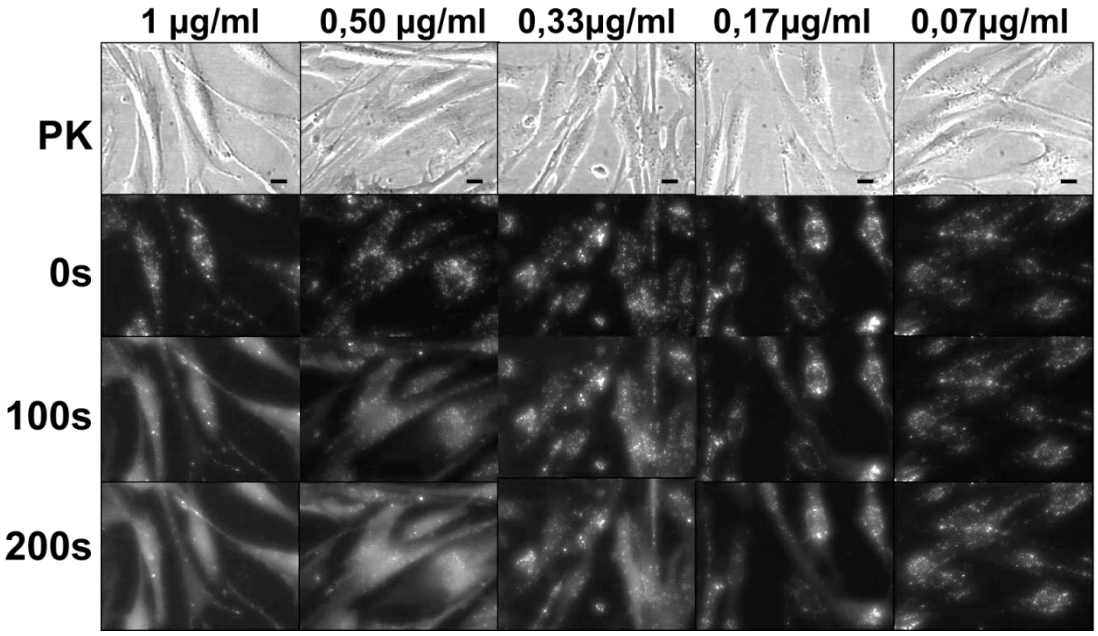

Abb. 29: Abhängigkeit des photochemical internalization- (PCI-) Effektes von der Photosensitizerkonzentration. Bei allen getesteten Konzentrationen zeigen die Zellen im Phasenkontrast (PK) keine phänotypischen Anzeichen von Toxizität. Schwarze Balken stellen eine Länge von 10µm dar. Zu Beginn der PCI-Behandlung (0s) zeigen die Atto488-BSA transduzierten NFS4 Migr Zellen vergleichbare punktuelle, endolysosomale Signale. Nach 100 Sekunden (100s) Belichtung kann bei den Konzentrationen 0,17 und 0,07µg/ml 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonato-phenyl)-21,23H-porphyrin ($TPPS_4$) noch kein PCI Effekt erkannt werden. 1 und 0,5µg/ml führen nach 100s bereits zu einer fast abgeschlossenen PCI, bei 0,33µg/ml kann ein beginnender Effekt erkannt werden. Nach 200 Sekunden Belichtung (200s) finden sich bei den 2 höchsten $TPPS_4$-Konzentrationen die stärksten, bei den mittleren Konzentrationen abnehmende und bei der niedrigsten Konzentration keine Effekte auf die endolysosomale Speicherung der transduzierten Proteine.

3.1.4.2 Transduktion und PCI an unterschiedlichen Zelltypen

Um zu überprüfen, ob die Kombinationsbehandlung aus Transduktion und PCI auch an anderen Zelltypen erfolgreich durchführbar ist, wurden Fibroblasten

gesunder Kontrollen, von verschiedenen NF1-Patienten und HEK Zellen mit $TPPS_4$ inkubiert und via Proteoducin Atto488-BSA transduziert. Abbildung 30 zeigt die Phasenkontrastaufnahmen und die Fluoreszenzaufnahmen von Beispielen dieser Zelltypen (A: Kontrollfibroblasten KF1; B: Patientenfibroblasten NF329; C: HEK) nach 0 und 200 Sekunden Belichtung der Zellen über einen FITC Fluoreszenzfiltersatz. Es ist zu erkennen, dass die PCI bei allen 3 Zelltypen zu einer Verlagerung der Fluoreszenzsignale von punktuell endolysosomalen Verteilungsmuster hin zu einem diffusen, über die kompletten Zellen verteilten zytoplasmatischen Verteilungsmuster führt. Daher konnte gezeigt werden, dass die PCI im selben Maße wie in den NFS4 Migr Zellen in anderen Zelltypen anwendbar ist.

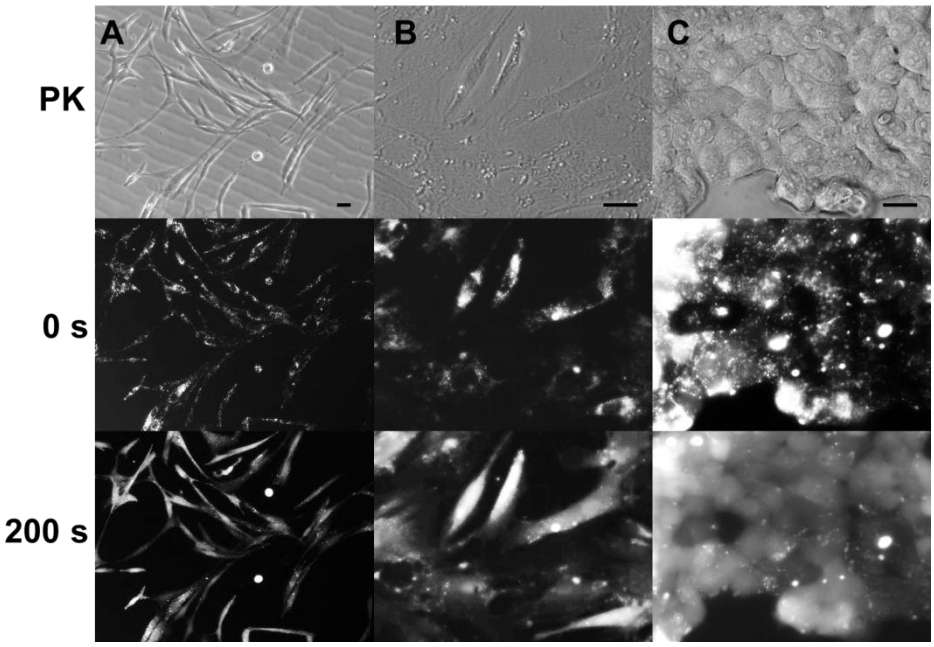

Abb. 30: Photochemical internalization (PCI) in verschiedenen Atto488-BSA (bovine serum albumin) transduzierten Zelltypen. Dargestellt sind der Phasenkontrast (PK), eine Fluoreszenzaufnahme zu Beginn (0 s) und nach Ende der PCI-Behandlung (200 s) an Fibroblasten der gesunden Kontrollperson FP1 (A), Fibroblasten des Neurofibromatose Typ 1 Patienten NF329 (B) und HEK-Zellen (C). Schwarze Balken stellen eine Länge von 10µm dar. Bei allen drei Zelltypen sind vor der PCI punktförmige Fluoreszenzsignale zu erkennen. Diese lösen sich zu diffusen, zytoplasmatischen Signalen auf.

3.1.4.3 Toxizität der PCI in Neurofibrosarkomzellen und Fibroblasten

Um zu testen, ob die PCI-Behandlung der Zellen zytotoxische Effekte nach sich zieht, wurden sowohl NFS4 Migr Zellen als auch Fibroblasten einer gesunden

Kontrollperson mit verschiedenen Mengen $TPPS_4$ inkubiert, unterschiedlich lang mit blauem Licht beleuchtet und schließlich durch Lebend-tot-Färbung mit Trypanblau und MTT-Cell viability Tests untersucht. Durch MTT-Cell viability Tests konnte gezeigt werden, dass die Toxizität der PCI im direkten Zusammenhang von Photosensitizer-Konzentration und Belichtungszeit der Zellen steht. Die Belichtungszeiten (0 - 10 min) und der Photosensitizer (1-10µg/ml) für sich gesehen stellten sich als nicht direkt toxisch heraus. Bei einer Belichtungsdauer von 10 Minuten konnte 2 Stunden nach der Belichtung erst bei höheren Konzentrationen (> 4µg/ml) $TPPS_4$ Toxizität in NFS4 Migr Zellen und Fibroblasten nachgewiesen werden. Bei Messungen 24 Stunden nach der Belichtung der $TPPS_4$-inkubierten Zellen waren die Mengen abgestorbener Zellen höher, sodass die Toxizitätsgrenze auf 2µg/ml herabgesetzt werden musste (Anhang Abbildung 3). Spätere Untersuchungen zeigten, dass zwischen 1,5 und 2µg/ml erste relevante Mengen an abgestorbenen Zellen sowohl bei Fibroblasten als auch bei NFS4 Migr Zellen beobachtet werden konnten. Die Freisetzung des transduzierten Atto488-BSAs aus den Endo- und Lysosomen schien zwar mit erhöhten Mengen des Photosensitizers verbessert, jedoch wurde aufgrund der toxischen Wirkung auf diese Konzentrationen verzichtet. Bei den im Folgenden verwendeten 1µg/ml $TPPS_4$ wurden keine nennenswerten zytotoxischen Effekte mittels MTT Test beobachtet (Anhang Abbildung 3). Um dies genauer zu untersuchen, wurden die einzelnen Komponenten bei dieser Konzentration für sich und in Kombination mit einer Proteoducin vermittelten Atto488-BSA Transduktion in NFS4 Migr Zellen durch Trypanblau Lebend-tot Färbung untersucht (Abbildung 31 [81]). Die Toxizitätsraten wurden durch eine Trypanblau-Färbung mit Auszählung der angefärbten Zellen bestimmt. Die verschiedenen Behandlungen der Zellen waren auf das später verwendete Transduktions-PCI Protokoll ausgelegt. 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen wurden diese für 20 Stunden mit dem Photosensitizer (PS; 1µg/ml in DMEM) im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine 20stündige Atto488-BSA Transduktion mittels Proteoducin (T). Im Anschluss wurde nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS die PCI durch 10minütige Belichtung (L) der Zellen unter der PCI-Lampe durchgeführt. Die Toxizität wurde 3, 24 und 48 Stunden nach der PCI-Behandlung gemessen. Versuche, in denen die Zellen ausschließlich mit der PCI-Lampe belichtet wurden (L), führten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Erhöhung des Anteils toter Zellen im Vergleich

mit unbehandelten Zellen. Dasselbe konnte bei einer ausschließlichen Inkubation der Zellen mit $TPPS_4$ (PS) und der vollständigen PCI (PS+L) beobachtet werden. Die verwendete Konzentration des Photosensitizers und Lichtapplikation führte daher weder direkt noch innerhalb der folgenden 48 Stunden zum Absterben der Zellen. Die Transduktion (T) führte ohne weitere Behandlung zu einer leichten Steigerung der Toxizitätsrate im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dieser Effekt verlor sich jedoch zeitabhängig. So war der Anteil toter Zellen nach 48 Stunden bereits wieder auf dem Niveau unbehandelter Zellen. Die Kombination der Transduktion sowohl mit $TPPS_4$-Inkubation (T+PS) als auch mit einer vollständigen PCI (T+PS+L) lieferte vergleichbare Ergebnisse. Daher konnte gezeigt werden, dass die PCI weder für sich gesehen noch in Kombination mit einer Proteintransduktion eine toxische Wirkung auf die NFS4 Migr Zellen hat.

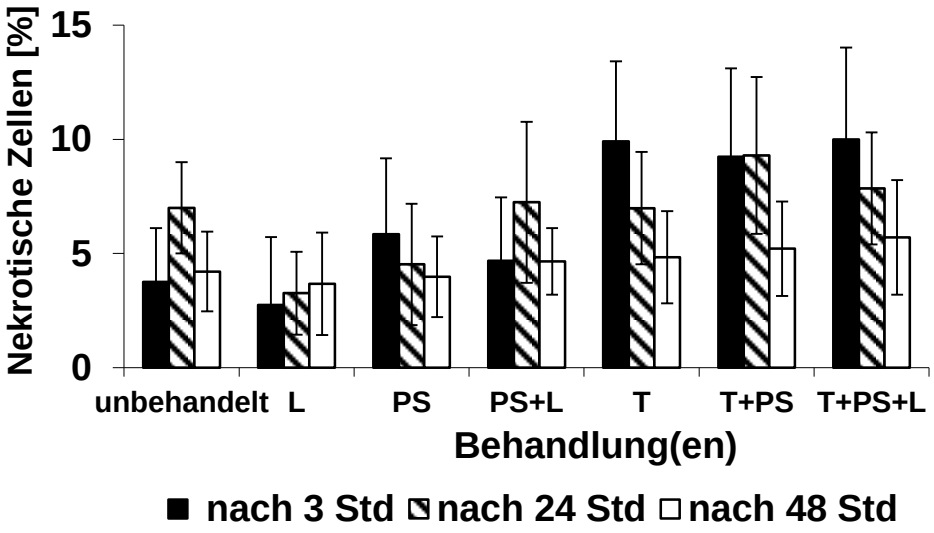

Abb. 31: Toxizitätstest der photochemical internalization (PCI) und ihrer Bestandteile mit und ohne Proteintransduktion. Dargestellt sind die Anteile toter NFS4 Migr, die durch Trypanblaufärbung 3, 24 und 48 Stunden nach der jeweiligen Behandlung gemessen wurden. (unbehandelt) Kontrollzellen, die zur Bestimmung des Grundlevels toter Zellen in dieser Kultur dienten. (L) Zellen, die ausschließlich unter einer PCI-Lampe mit sichtbaren blauen Licht belichtet wurden. (PS) Zellen, die mit dem 1µg Photosensitizer 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonato-phenyl)-21,23H-porphyrin ($TPPS_4$) pro ml Kulturmedium inkubiert wurden. (PS+L) Vollständige PCI-Behandlung, die sich aus der Kombination aus Photosensitizerinkubation und Belichtung der Zellen zusammensetzt. (T) Zellen, die mittels Proteoducin eine Transduktion mit Atto488-BSA (bovine serum albumin) erfuhren. (T+PS) Kombination aus Transduktion und $TPPS_4$-Inkubation. (T+PS+L) Kombination aus Transduktion und vollständiger PCI. Von allen getesteten Behandlungen zeigte nur die Transduktion einen leichten initialen toxischen Effekt, der sich innerhalb von 2 Tagen verlor. Die PCI und deren Komponenten sind nicht toxisch (aus [81]).

3.1.4.4 Effektivität der PCI bei verschiedenen Transduktionsmechanismen

Es stellte sich die Frage, ob das Aufbrechen der Endosomen durch die PCI bei allen Transduktionsreagenzien zu vergleichbar guten Freisetzungen der Proteine aus den Endo- und Lysosomen ins Zytoplasma führt. Untersucht wurde dies, indem NSF4 Migr Zellen mit Hilfe verschiedener Reagenzien der 4 Transduktionsklassen CPP-, Lipid-Shuttle-, Polymer-vermittelt und endosomolytisches Reagenz mit Atto488-BSA transduziert und darauffolgend eine PCI-Behandlung der Zellen durchgeführt wurden. Inkubationszeiten und Proteinmenge wurden angepasst, sodass sich die Behandlungen ausschließlich durch das verwendete Reagenz unterschieden. Aufnahmen derselben Zellen wurden vor und nach der PCI an einem Invertfluoreszenzmikroskop an unfixierten Zellen erstellt. Diese wurden mit einem selbst entwickelten Auswertverfahren (siehe Methoden) auf Proteinentlassungskapazität aus den Endo- und Lysosomen hin ausgewertet. Hierzu wurden die Fluoreszenzsignale des Atto488 weiß dargestellt und der mediane Grauwert im Zytoplasma einzelner Zellen im 8-Bit Format gemessen. Schwache Signale werden durch einen Grauwert nahe 0 (=schwarz), stärke Signale durch einen höheren Grauwert (255=weiß) dargestellt. Es zeigte sich, dass der PCI-Effekt nach Transduktionen mit CPP-basierten Transduktionsreagenzien am stärksten war (Abbildung 32 [81]). Auch bei Lipidshuttle basierten Transduktionen konnte ein, wenn auch etwas geringerer Effekt beobachtet werden. Ebenfalls konnte der an sich bereits vorhandene endosomolytische Effekt der Endo-Porter Reagenz weiter verstärkt werden. Bei den Reagenzien, die auf Polymeren basieren, konnte jedoch keine Translokation des transduzierten Atto488-BSAs detektiert werden.

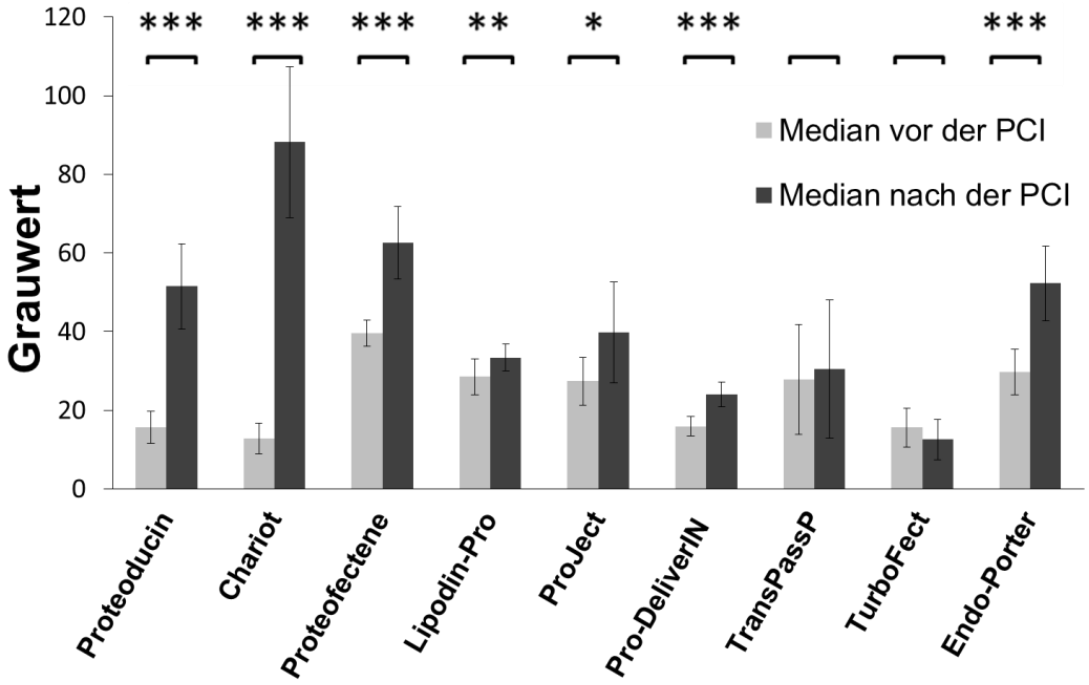

Abb. 32: Messung des photochemical internalization- (PCI-) Effektes bei Atto488-BSA (bovine serum albumin) Transduktionen in NFS4 Migr Zellen mittels verschiedener Transduktionsreagenzien. Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall (n=10). Gezeigt ist der Mittelwert der medianen Grauwerte der Einzelzellen vor und nach der PCI-Behandlung. Eine Erhöhung des Medians repräsentiert eine Atto488-Signalerhöhung im Zytoplasma der Einzelzellen. Diese Erhöhung ist am stärksten bei CPP-vermittelten Transduktionen (Proteoducin und Chariot). Bei Lipid-vermittelten Transduktionen (Proteofectene, Lipodin-Pro, ProJect und Pro-DeliverIN) wurden schwächere, jedoch ebenfalls signifikante Erhöhungen gemessen. Der endosomolytische Effekt von Endo-Porter konnte auch signifikant gesteigert werden. Nach Transduktionen mit nicht Lipid-basierten, kationischen Polymeren (TransPassP und TurboFect) konnte durch die PCI keine Erhöhung der zytoplasmatischen Signale erreicht werden. Die Signifikanzprüfung fand durch einen studentischen T-Test statt ((***) = $p<0,001$; (**) = $p<0,01$; (*) = $p<0,05$; ( ) = $p>0,05$) (aus [81]).

3.1.4.5 Aktivität der transduzierten Proteine nach einer PCI-Behandlung

Um zu prüfen, ob transduzierte Proteine nach einer PCI-Behandlung noch immer aktiv sind, wurde eine funktionelle Untereinheit (119kDa) der β-Galaktosidase mittels Chariot in NFS4 Migr Zellen transduziert und die Aktivität über einen Kit detektiert. Da auch unbehandelte Zellen nach langen Inkubationszeiten β-Galaktosidase Aktivität zeigen, wurden nicht transduzierte, PCI-behandelte NFS4 Migr Zellen als Kontrollen parallel mit dem Detektionskit behandelt. Die transduzierten Zellen zeigen nach X-Gal-Färbung ein klares blaues

Aktivitätssignal, während die nicht transduzierten Kontrollen nach derselben Inkubationszeit kein Signal zeigen (Abbildung 33 [81]). Es konnte daher gezeigt werden, dass dieses transduzierte Beispielprotein nach einer PCI-Behandlung weiterhin Aktivität zeigt.

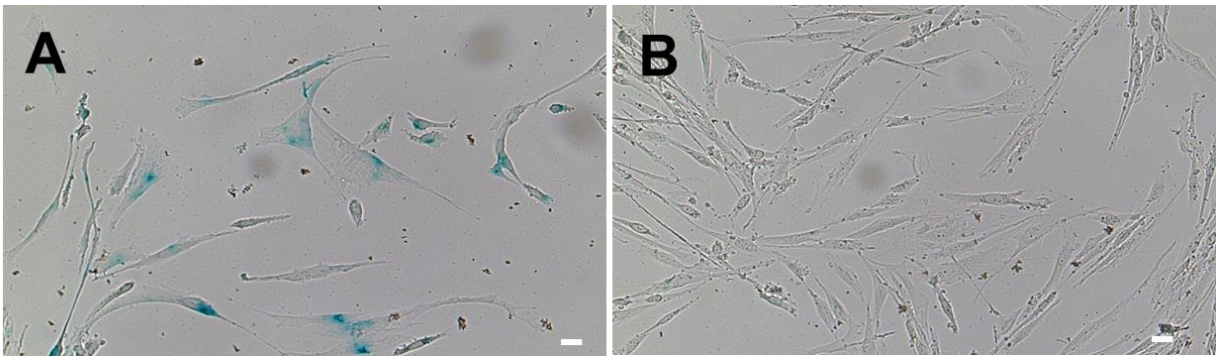

Abb. 33: Transduktion einer Untereinheit der β-Galaktosidase (β-Gal) mittels Chariot in NFS4 Migr Zellen. (A) Phasenkontrastaufnahme von β-Galaktosidase transduzierten und photochemical internalization (PCI) behandelten NFS4 Zellen nach β-Gal Aktivitätsdetektion. Die meisten Zellen zeigen deutliche Blaufärbung (β-Galaktosidaseaktivität). (B) Phasenkontrastaufnahme nicht transduzierter, PCI behandelter NFS4 Migr Zellen nach β-Gal Aktivitätsdetektion. Nach derselben Inkubationszeit zeigen die nicht transduzierten NFS4 Migr Zellen keine Aktivität von β-Galaktosidase (aus [81]).

Zusammengefasst ergaben die Untersuchungen verschiedener Transduktionsreagenzien und der PCI, dass eine Kombination aus CPP-vermittelter Transduktion zur Einschleusung von Proteinen und einer PCI zur Translokation der eingeschleusten Proteine ins Zytoplasma am vielversprechendsten für Versuche zur Proteinersatzbehandlung *NF1* haploinsuffizienter Zellen *in vitro* ist. Inkubationen mit Photosensitizerkonzentration von 1µg/ml waren für die Neurofibrosarkomzellen und Fibroblasten mit Belichtungszeiten bis 10 Minuten im nicht toxischen Bereich. Eingeschleuste Proteine zeigten nach einer PCI weiterhin Aktivität.

3.2 Synthetisch hergestelltes Neurofibromin

Das für Untersuchungen zur Proteinersatzbehandlungen nötige Komplettprotein wurde von der Kooperationsarbeitsgruppe von Klaus Scheffzek in

Heidelberg/Innsbruck produziert. Zunächst wurden ca. 100µg eines aufgereinigten und unmarkierten Neurofibromins zu Verfügung gestellt. Um die Transduktion dieses Proteins fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen, wurde die gesamte Menge vor der Transduktion von uns mittels eines Protein-labelling Kits mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert. Dieses Verfahren führte jedoch zu einem Verlust des Großteils an Neurofibromin, weswegen nur ein Pionierversuch gestartet werden konnte. Nach Transduktion des FITC-markierten Neurofibromins mittels Proteoducin konnten schwache, punktförmige Signale in den NFS4 Migr Zellen fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Um dem starken Verlust durch eine nachträgliche Fluoreszenzmarkierung des Neurofibromins entgegenzuwirken, wurde in der Kooperation vereinbart, ein Fusionsprotein aus HIS-getagten Neurofibromin und drei eGFPs (synNF1eGFP) herzustellen. In Heidelberg wurden HEK-Zellen, die mit einem entsprechenden Vektor transfiziert worden waren, kultiviert und uns als 5 Pellets zu je ca. 145 Millionen Zellen zur eigenen Isolierung des synNF1eGFP überlassen.

3.2.1 Isolierung von synNF1eGFP aus transfizierten HEK-Zellen

Ein Pellet der HEK-Zellen wurde in 50ml RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren lysiert. 20µl dieses Lysates wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Acrylamidgel einer Silberfärbung unterzogen. Im Bereich von ca. 400kDa (Neurofibromin: ca. 320 kDa + 3* 27kDa für die eGFPs) war keine stark ausgeprägte Bande zu erkennen. Dies deutete darauf hin, dass in den HEK-Zellen keine starke Überexpression des transfizierten synNF1eGFP stattgefunden hatte. Da Nickelbead-Isolationen an aufkonzentrierten Lysaten fehlschlugen, wurden immunohistologische Untersuchungen zum synNF1eGFP angestellt. Abbildung 34 zeigt aufgetrennte Gesamtproteinisolationen aus den HEK-Zellpellets, die nach der SDS-PAGE auf eine PVDF Membran geblottet und schließlich mit einem C-terminal spezifischen (A), einem N-terminal spezifischen Anti-Neurofibromin-Antikörper (B) und einem Antikörper gegen HIS-Tags (C) inkubiert wurden. Es ist zu erkennen, dass das native Neurofibromin der HEK-Zellen (ca. 320 kDa) von beiden Anti-Neurofibromin-Antikörpern erkannt wird. Der Anti-HIS-Antikörper detektiert die Bande in diesem Größenbereich nicht. Durch den Anti-HIS-AK werden insgesamt 4 Banden im relevanten Molekularbereich detektiert, wovon die 2 bei ca. 210 und 260 kDa detektierten Proteine jedoch eine kleinere Masse als das native Neurofibromin aufweisen. Die detektierte Doppelbande im Bereich von

ca. 400kDa würde rechnerisch zu einem synNF1eGFP passen. Diese Doppelbande wird durch den N-terminalen, aber nicht durch den C-terminalen Anti-NF1-AK erkannt. Da die drei eGFPs des synNF1eGFP C-terminal fusioniert wurden ist es denkbar, dass dieser Bereich des Fusionsproteins durch einen Antikörper gegen den nativen C-Terminus des Neurofibromins nicht erkannt werden kann. Es spricht daher vieles dafür, dass es sich bei der detektierten Doppelbande bei ca. 400kDA um das synNF1eGFP handelt.

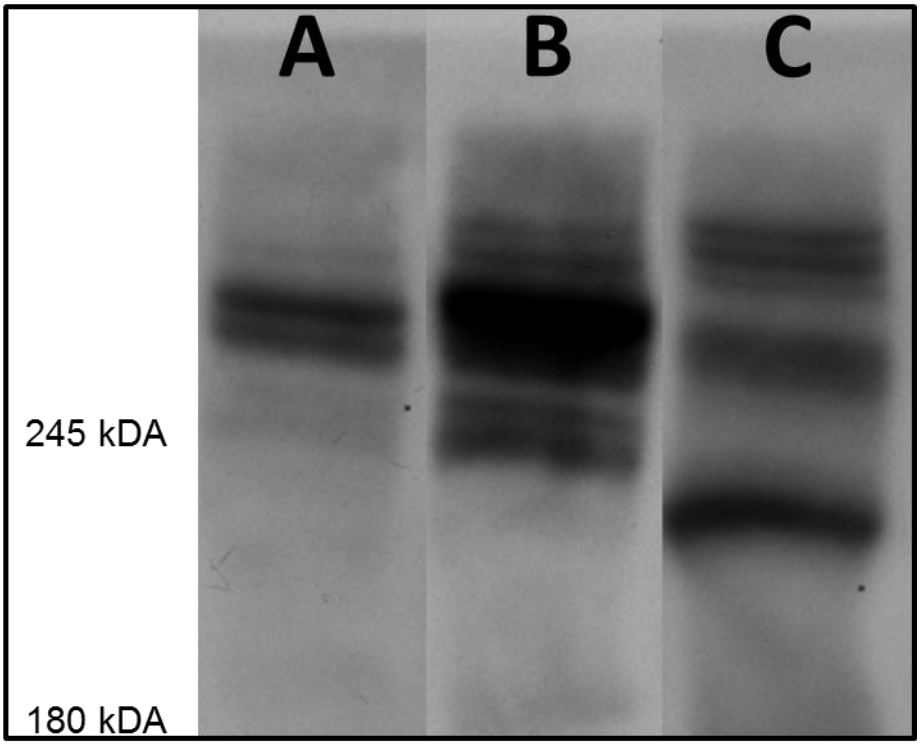

Abb. 34: Verschiedene Immunodetektionen an Gesamtlysat von synNF1eGFP exprimierenden HEK-Zellen. (A) Detektion durch den C-terminalen Anti- Neurofibromin-Antikörper SC-67 (Santa Cruz). Es werden primär zwei Banden im Bereich von ca. 300-320 Kilodalton (kDa) detektiert. Im Bereich von ca. 250kDa wurde sehr schwach eine Doppelbande gefärbt. Eine weitere Bande wird sehr schwach im Bereich von ca. 400kDa erkannt. (B) Detektion durch den N-terminalen Anti-Neurofibromin-Antikörper SC-68 (Santa Cruz). Als Hauptprodukt wird eine starke Bande im Bereich von ca. 300-320kDA detektiert. Zusätzlich werden etwas schwächer zwei Doppelbanden im Bereich von 250 und 400kDa erkannt. (C) Detektion durch einen Anti-Penta-His-Antikörper. Als Hauptprodukt wird eine Bande bei ca. 210kDa erkannt. Zusätzlich detektiert dieser Antikörper eine Bande bei ca. 300kDa und eine Doppelbande bei ca. 400kDa.

Densiometrische Auswertungen von Blots, die mit dem N-terminalen Anti-NF1-AK immunodetektiert wurden, lassen eine Abschätzung des synNF1eGFP im Vergleich zum nativen Neurofibromin zu. Nach diesen Abschätzungen stellt die Doppelbande weniger als 10% des nativen Neurofibromins dar. Daher enthielten die gelieferten HEK-Zellpellets zusammen weniger als 1µg synNF1eGFP und waren folglich für eine Isolation des Fusionsproteins ungeeignet. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen dieser HEK-Zellen durch die AG Scheffzek bestätigten, dass die Zelllinie keine eGFP-Signale mehr zeigte und daher wahrscheinlich im Laufe der Kultivierung die Expression des Fusionsproteins abgeschalten worden war.

3.2.2 Isolierung von nicht fluoreszierendem synthetischen Neurofibromin (synNF1) aus Insektenzellen

Um verwertbare Mengen von synNF1 zu isolieren, wurden in der AG Scheffzek mit einem synNF1 Vektor transfizierte Insektenzellen kultiviert. Pellets dieser Zellen wurden von mir im Labor in Innsbruck lysiert und die HIS-getagten synNF1 Proteine über HISTrap-Säulen aufgereinigt. Die Proteine wurden durch einen Elutionspuffer mit steigenden Mengen Imidazol von den Säulen gelöst und in einzelnen Fraktionen aufgefangen. Proben dieser Fraktionen wurden in einer SDS-Page aufgetrennt, gefärbt und in besonders reine und weniger reine Fraktionen eingeteilt (Abbildung 35 A). Fraktionen derselben Güte wurden vereint und durch eine Säulenchromatografie weiter aufgereinigt. Durch parallele Proteinmessung konnten Fraktionen mit hohem Proteingehalt identifiziert werden (Abbildung 35 B). Aus den verschieden reinen Fraktionen wurden insgesamt 11,7mg synNF1 isoliert, welches für Transduktionsversuche in *NF1*-haploinsuffizienten Zellen gebraucht werden konnte.

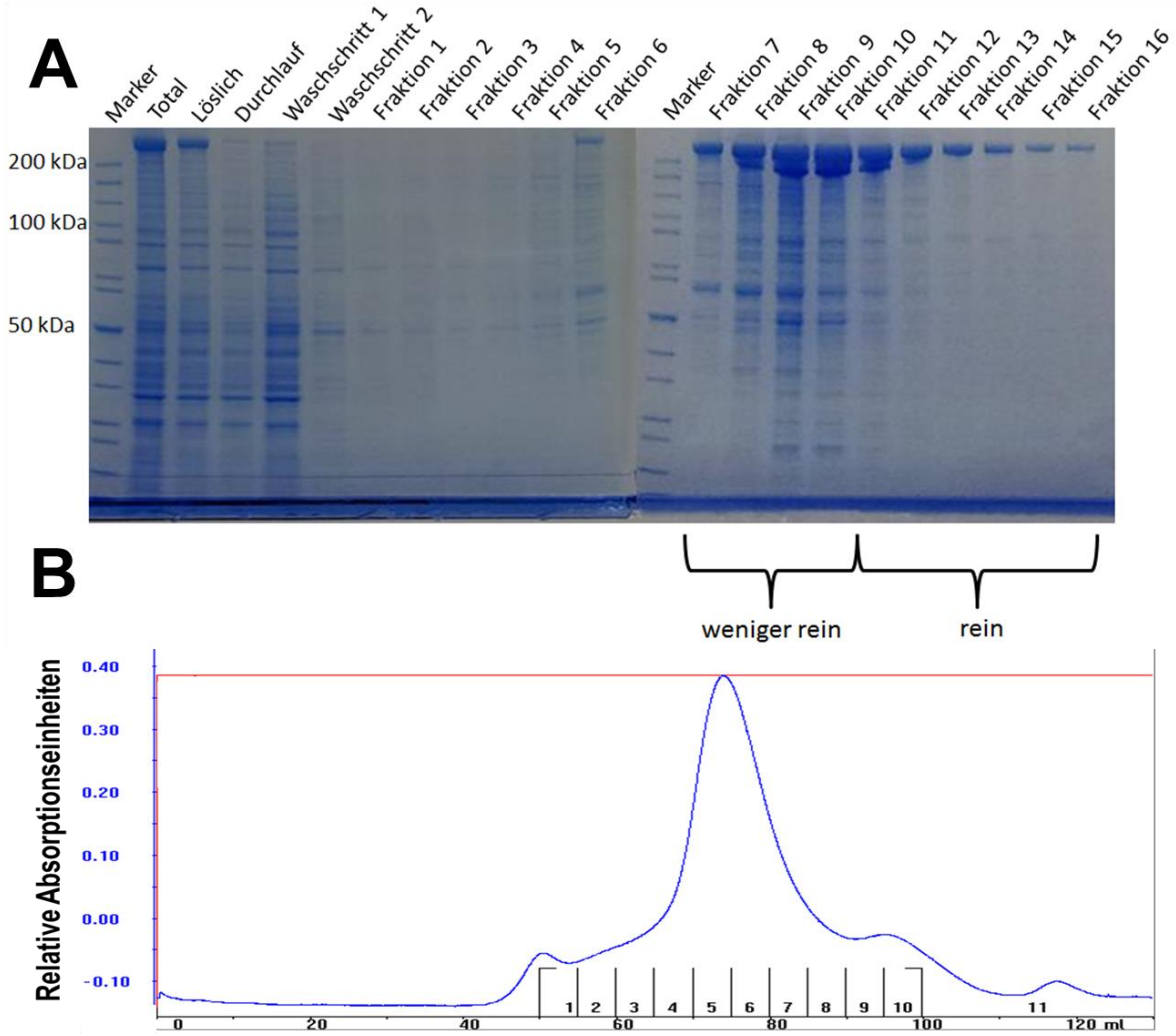

Abb. 35: Bestimmung der Reinheit, Proteinmessung und Fraktionierung der Eluate aus His-Trap Säulen nach Beladung mit Lysaten aus synthetisches Neurofibromin (synNF1) exprimierenden Insektenzellen. (A) Auftrennung von verschiedenen Proben im Zuge der synNF1-Aufreinigung. Aufgetragen wurden Proteinmarker (Marker), das Gesamtlysat der Insektenzellen (Total), das Lysat nach Abzentrifugation von unlöslichen Bestandteilen (Löslich), das Restlysat nach Beladung der His-Trap-Säulen (Durchlauf), die aufgefangenen Waschpuffer der Waschschritte vor der Elution (Waschschritt 1 und 2) und die verschiedenen Fraktionen (1-16) der Elution der Proteine von den Säulen. Die Fraktionen 7 bis 10 wurden als weniger rein, die Fraktionen 8 bis 16 als rein definiert und vereinigt. (B) Die X-Achse zeigt die Durchflussmenge des Proteinproben-haltigen Puffers (0-120ml) in der Säulenchromatografie der vereinigten weniger reinen synNF1 Eluate. Die Zahlen 1-10 spiegeln die aufgefangenen Fraktionen wider. Auf der Y-Achse sind die relativen Absorptionseinheiten bei 280nm dargestellt. In diesem Beispiel wurden die Fraktionen 4-7 jeweils weiter aufkonzentriert und weiter verwendet.

3.3 Entwicklung eines zellulären Readoutsystems

Um den Erfolg einer Transduktion von synNF1 zu überprüfen, wurde zum einen ein Auswertsystem für die Messung des zellulären Phänotyps der partiellen mechanosensorischen Blindheit in *NF1* haploinsuffizienten Fibroblasten entwickelt. Zum anderen wurde die Messung von phosphoryliertem ERK1/2 etabliert.

3.3.1 Entwicklung eines Messsystems zur Messung des zellulären Phänotyps der partiellen mechanosensorischen Blindheit in *NF1+/-* Fibroblasten

In einer ersten Studie konnte gezeigt werden, dass sich Fibroblasten von Neurofibromatose Typ I Patienten an längsstrukturierten Untergründen mit einer Breite und einem Abstand der Strukturen von je 2µm und einer Höhe von 200nm schlechter ausrichten als parallel getestete Fibroblasten gesunder Vergleichspersonen (Abbildung 36 [59]).

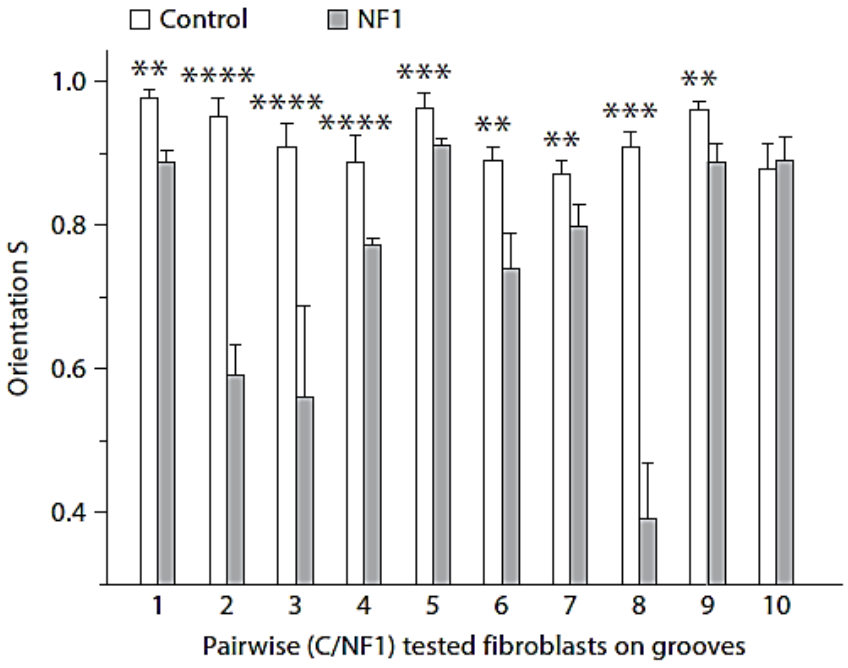

Abb. 36: Paarweise Vergleiche der Orientierungsfähigkeit von Neurofibromatose Typ 1 Patientenfibroblasten (NF1) und Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen (Control). Dargestellt ist der Orientierungsfaktor s (s= Cos(2*α); α= Abweichungswinkel zu den Untergrundstrukturen). Kontrollen und Patienten stimmten jeweils in Alter und Geschlecht überein, zusätzlich befanden sich die verwendeten Zellen der getesteten Paare in derselben Passage. (****) = p<0,0001; (***)= p<0,001; (**)=p<0,01 nach T-Test (aus [59]; © 2012 S. Karger AG, Medical and Scientific Publishers, Basel).

Zudem wurde festgestellt, dass die Gabe von Inhibitoren, die für NF1-spezifische Signalwege relevant sind, zu unterschiedlich starken Verbesserungen oder Verschlechterung der Fähigkeit zur Ausrichtung an Untergrundstrukturen in NF1 Patienten Fibroblasten beitragen [59].

In Kooperation mit der Stuttgarter MPI AG Kemkemer wurden Abgussmasken (Wafer) hergestellt, mit deren Hilfe man Polydimethylsiloxan- (PDMS-) Gele herstellen konnte, die parallel verlaufende Längsstrukturen mit einer Höhe von ca. 200nm, einer Breite von 2µm und einem Abstand voneinander von ebenfalls 2µm aufwiesen. Die Winkel, in dem die Einzelzellen von den Strukturen abwichen, wurden durch Umrandung der Zellen in der Bildbearbeitungssoftware ImageJ bestimmt. Das Programm weist den so markierten Zellen die am besten passende Ellipse zu. Der Hauptscheitel der Ellipse gibt die Ausrichtung der Zelle wieder. Durch diese kann die Abweichung der Zelle zur längsverlaufenden Untergrundstruktur berechnet werden (Abbildung 37).

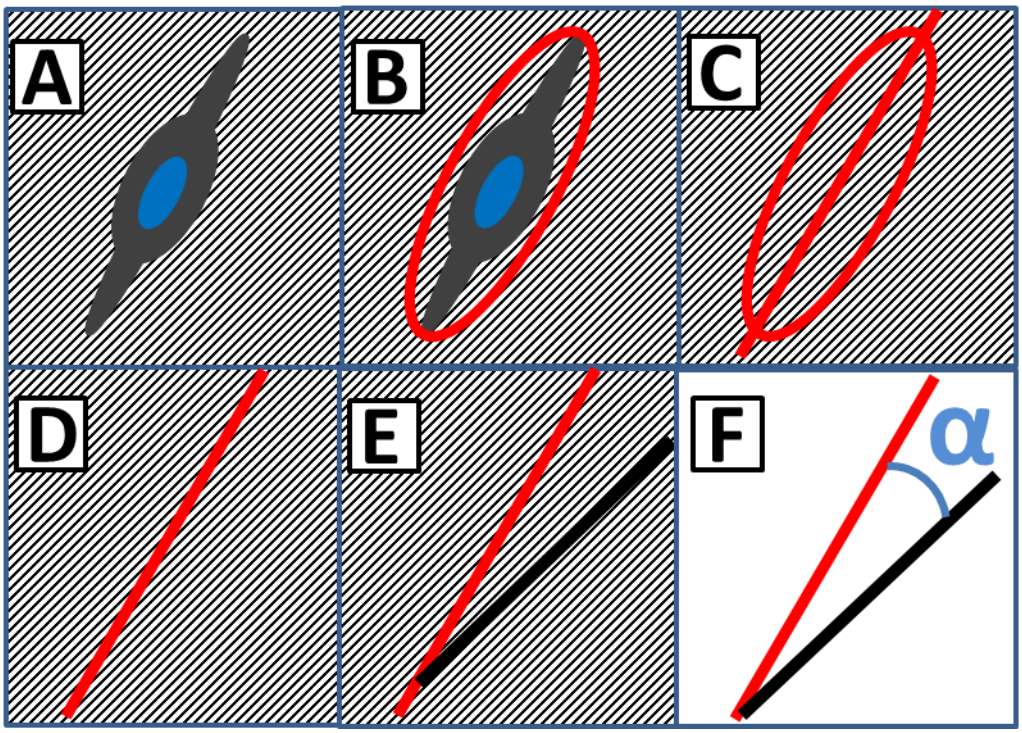

Abb. 37: Bestimmung des Ausrichtungswinkels der Zellen zu den Untergrundstrukturen. (A) Schematische Darstellung eines Fibroblasten, der auf einem Gel mit parallelen Längsstrukturen wächst. Durch Umrandung einer Zelle wird durch die Software ImageJ eine Ellipse generiert (B). Der Längsscheitel dieser Ellipse dient als Ausrichtungsmarker der Zelle (C+D). Dadurch ist es möglich, den Winkel α zwischen Zelle und Topographie zu bestimmen (E+F).

3.3.1.1 Optimale Ausrichtungszeit der Fibroblasten

Um eine optimale Dauer der Ausrichtungsversuche zu bestimmen, wurden 2 Pärchen aus jeweils Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson und Fibroblasten eines NF1 Patienten parallel getestet und die Ausrichtungswinkel nach 24, 48 und 96 Stunden bestimmt. Es zeigte sich, dass die Unterschiede in der Zellausrichtung zwar nach allen 3 untersuchten Zeiten erkennbar waren, die stärksten und eindeutigsten Ergebnisse wurden jedoch nach 48 Stunden gefunden (Tabelle 12). Daher wurde Fibroblasten bei allen weiteren Ausrichtungsversuchen 48 Stunden als Zeit für die Ausrichtung an Untergrundstrukturen festgelegt.

Tabelle 12: Bestimmung der optimalen Ausrichtungszeit von Fibroblasten an Topografien. Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen wurden paarweise mit Fibroblasten von im Alter übereinstimmenden Neurofibromatose Typ 1 (NF1) Patienten auf strukturierte Polydimethylsiloxan- (PDMS-) Gele ausgesät. Die Tabelle zeigt die auf den Mittelwert der gemessenen Abweichungswinkel der Kontrollen normierten Abweichungswinkel α. Die Bestimmung des Ausrichtungswinkels erfolgte nach 24, 48 und 96 Stunden. (A) und (B) bezeichnen zwei unabhängige Tests desselben Paares. (*NF1*+/+) = Zusammenfassung der Kontrollen, (*NF1*+/-) = Zusammenfassung der NF1 Patienten mit jeweils der Standardabweichung (±). Die p-Werte wurden über einseitige T-Tests bestimmt. Ein signifikanter Unterschied ($p<0,5$) zwischen den Ausrichtungen der Zellen konnte nach 48 Stunden festgestellt werden.

Name	***Nach 24 Stunden***	***Nach 48 Stunden***	***Nach 96 Stunden***
KF2 A	1,06	0,97	0,96
NF213 A	1,13	1,55	1,54
KF2 B	0,94	1,03	1,04
NF213 B	1,01	1,37	0,78
KF1	1,00	1,00	---
NF329	1,75	2,25	---
NF1+/+	1,00 ±0,06	1,00 ±0,03	1,00 ±0,05
NF1+/-	1,30 ±0,40	1,72 ±0,46	1,16 ±0,54
p-Wert	**0,14**	**0,03**	**0,36**

3.3.1.2 Entwicklung einer verbesserten Auswertmethode zur Bestimmung der Ausrichtung von Fibroblasten an strukturierten Untergründen

Da das Auswertverfahren der Zellumrandung, welches für die oben genannte Veröffentlichung angewandt wurde, sehr zeitaufwendig und somit nur für eine eng begrenzte Anzahl von Zellen durchführbar ist, wurde eine Methode entwickelt, mit der ein hoher Durchsatz an Zellen ausgewertet werden konnte.

Als erster Ansatz einer Weiterentwicklung der Bestimmungsmethode der Abweichungswinkel der Fibroblasten von den Topografien wurde das Software-interne Werkzeug zur Winkelvermessung genutzt, in dem die Ausrichtung der Zelle von der auswertenden Person selbst festgelegt und der Winkel zwischen Ausrichtung und Untergrundstruktur bestimmt wurde. Auch wenn keine signifikanten Unterschiede im Ergebnis der zwei verschiedenen Auswertmethoden gefunden werden konnten (Anhang 1 Abbildung 4), so ist die Winkelbestimmung doch sehr von der Person abhängig, die die Auswertung durchführt. Zudem konnte zwar eine Durchsatzerhöhung auf das ca. Dreifache erreicht werden, was für einen Hochdurchsatz jedoch weiterhin nicht ausreichte. Daher wurde weiter nach einer verbesserten Auswertmethode gesucht.

Für die finale Auswertungsmethode wurde die Morphologie von Fibroblasten genutzt. Da Fibroblasten meist längliche, schmale Zellen sind, ist der Zellkern elliptisch entsprechend der Zelle geformt. Durch ein Anfärben des Zellkerns mit DAPI, konnten kombinierte Bilder aus fluoreszierenden Zellkernen und dem Phasenkontrast der jeweilig untersuchten Zellen angefertigt werden. Über den Phasenkontrast konnte die Lage der Untergrundstrukturen bestimmt werden. Die separierten DAPI-Aufnahmen wurden genutzt, um die Ausrichtung der Einzelzellen bestimmen zu können. Durch eine Grenzwertfestlegung konnten in der ImageJ Software die DAPI-Kernsignale vom Hintergrund getrennt und die am besten diese Kerne widerspiegelnden Ellipsen erstellt werden. Der Hauptscheitel dieser Ellipsen spiegelt die Ausrichtung der Zellkerne wider, welche mit der durch Umrandung und direkte Winkelbestimmung gemessenen Ausrichtung der Zellen verglichen wurde. Es zeigte sich, dass die Kernausrichtung um wenige Grad von den gemessenen Zellausrichtungen abwich. Diese Abweichungen waren jedoch konstant über verschiedene Versuche in den untersuchten Fibroblasten (Anhang 1 Abbildung 4).

Bei jeder Messmethode gab es Unsicherheitsfaktoren. Bei der Umrandung der Zellen ist die automatische Berechnung der passenden Ellipsen bei Zellen mit weiten Ausläufern fehlerhaft, da hier der Hauptscheitel der Ellipse über die maximale Entfernung zweier Punkte der Umrahmung bestimmt wird. Die direkte Ausrichtungsbestimmung andererseits ist durch die Subjektivität des Auswertenden beeinträchtigt. Die Kernausrichtung ist als unabhängiges Auswertungsverfahren vorzuziehen, deckt sich jedoch nicht vollständig mit den beiden erstgenannten Auswertmethoden.

Für die Berechnung des Abweichungswinkels der Zellen von den Untergrundstrukturen wird davon ausgegangen, dass Zellen maximal um positiv oder negativ 90° von den Strukturen abweichen können. Da viele parallele Strukturen vorliegen, ist kein Einzelpunkt definierbar, der für die Ausrichtung allein Rechnung trägt. Daher entspricht beispielsweise eine Abweichung von +93° einer Abweichung von -87°. So ergibt sich ein Abweichungsspektrum der Zellen von der Topografie von +90° bis -90°. Es lässt sich pro Einzelversuch zwar festlegen, welcher Abweichungsrichtung positive und welcher negative Werte zugeordnet werden, doch ist es nicht möglich, dies über mehrere Versuche einheitlich zu gestalten. In den Versuchen zur Zellausrichtung wird daher bewusst die Zellausrichtung als Maß der Orientierungsfähigkeit der Zellen an Untergrundstrukturen insgesamt verstanden. Daher entspricht eine negative Abweichung derselben Abweichung im positiven Bereich. So konnten auch verschiedene Versuche miteinander verglichen werden. In diesem Szenario befinden sich alle Zellen demnach in Abweichungswinkeln von den Untergrundstrukturen zwischen 0 und 90°. Würden sich Zellen überhaupt nicht ausrichten, wäre durch die Zufallsverteilung der Ausrichtungswinkel der Zellen über eine Großzahl ausgewerteter Zellen ein mittlerer beziehungsweise medianer Abweichungswinkel von 45° zu erwarten (siehe Methoden). Untersuchungen an Fibroblasten auf unstrukturierten PDMS-Gelen zeigten, dass sich diese Erwartungen bei den Abweichungswinkeln, die durch Kernausrichtung bestimmt wurden, sehr genau erfüllen (Abbildung 38). NF191 Fibroblasten wurden auf unstrukturierte PDMS-Gele ausgesät und beispielhaft der „Abweichungswinkel“ zur Horizontalen durch Kernausrichtung, Winkelwerkzeug und Umrandung bestimmt. Die Gesamtheit der gemessenen Zellen unterschied sich nicht signifikant. Der erwartete Wert von 45° Abweichung spiegelte sich jedoch am

genauesten durch den Median der Kernausrichtung (45,3°) wider. Der mediane Abweichungswinkel, der durch die subjektive Winkelwerkzeugnutzung gemessen wurde, war mit 45,4° vergleichbar. Der mediane Ausrichtungswinkel, der durch Umrandung der Zellen gemessen wurde wich mit 49,3° etwas vom theoretischen Wert ab. Die Kernausrichtung als Maß der Zellausrichtung an Untergrundstrukturen konnte daher sowohl als genaues Maß der Zellausrichtung als auch als Messmethode mit hohem Durchsatz bestätigt, etabliert und verwendet werden.

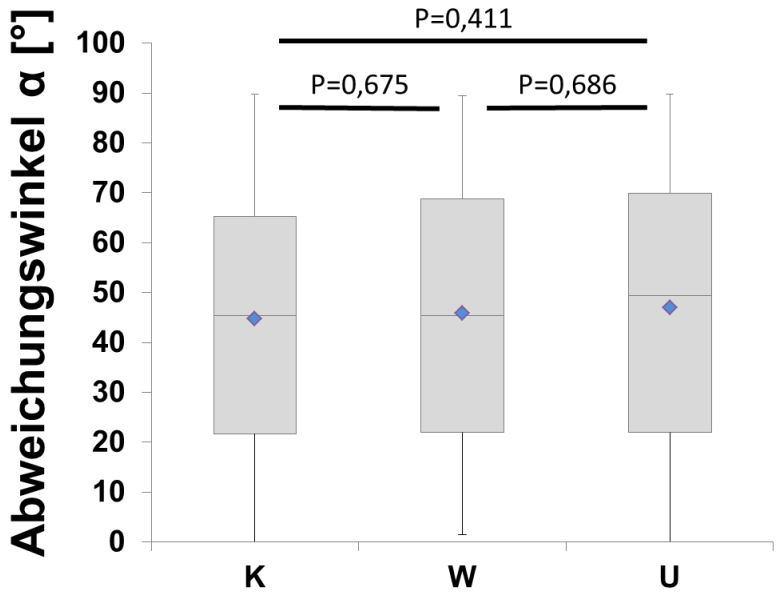

Abb. 38: Vergleich verschiedener Auswertmethoden zur Bestimmung von Abweichungswinkel an NF191 Fibroblasten auf Polydimethylsiloxan- (PDMS-) Gelen ohne Struktur. Der mediane Abweichungswinkel α wurde durch Kernausrichtung (K), Winkelwerkzeug (W) und Umrandung (U) bestimmt. Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen den Gesamtmengen der Zellen gefunden werden. Der erwartete mediane Winkel von 45° bei Zufallsverteilung an unstrukturierten Untergründen wurde am besten durch die Kernausrichtung (45,3°), gefolgt von der subjektiven Benutzung des Winkelwerkzeugs (45,4°), widergespiegelt. Durch die Umrandung der Zellen wurde ein medianer Abweichungswinkel von 49,3° gemessen.

3.3.1.3 Verteilung der Abweichungswinkel mit und ohne Untergrundstrukturen

Die Abweichungswinkel der dünn ausgesäten Einzelzellen auf unstrukturierten Gelen sind anfänglich durch die zufällige Ausrichtung der Zellen mangels Orientierungsinformation gleichverteilt. Um dies zu verdeutlichen, wurden NF244 Fibroblasten sowohl auf unstrukturierten als auch auf längsstrukturierten PDMS-Gelen ausgesät und die Ausrichtung der Zellen nach 2 Tagen Kultur durch die Kernausrichtung bestimmt. Die Winkel der Einzelzellen wurden nach Winkeln unter 30°, zwischen 30 und 60° und 60 bis 90° gestaffelt. Ohne Strukturen zeigen die Zellen eine Zufallsverteilung von jeweils ungefähr einem Drittel der ausgewerteten Zellen (Abbildung 39 A) in der Abweichung zur Horizontalen. Auf Längstopografien ändert sich die Verteilung der Abweichungswinkel. Der Anteil der Zellen mit einer Abweichung von bis zu 30° zu den Strukturen zeigt eine starke Zunahme (Abbildung 39 B).

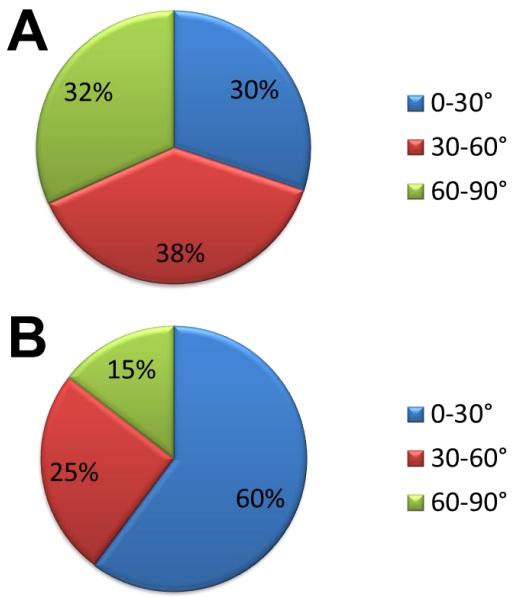

Abb. 39: Veränderung der Orientierung von Fibroblasten durch das Vorgeben von Längstopografien. Die Winkel wurden gestaffelt in schwache Abweichung (bis 30°), mittlere Abweichung (30-60°) und starke Abweichung (60-90°). (A) Verteilung der Winkel (gemessen zur Horizontalen) in einer Population von NF244 Fibroblasten nach 2 Tagen Kultur auf unstrukturiertem Polydimethylsiloxan- (PDMS-) Gel. Die Winkel der Einzelzellen sind nahezu gleichverteilt auf die 3 Staffelungen. (B) NF244 Fibroblasten nach 2 Tagen Kultur auf längsstrukturierten PDMS-Gelen. Der Anteil der Zellen mit schwacher Abweichung zur Topografie ist doppelt so hoch und liegt bei 60%, die Anteile der beiden anderen Staffelungen sind reduziert.

3.4 Revertierung von *NF1*-Haploinsuffizienzeffekten durch Neurofibromintransduktion

3.4.1 Untersuchung der Funktion von Neurofibromin als Regulator der Zellausrichtung in Fibroblasten

Die Zellausrichtung in den bislang getesteten primären Fibroblasten der NF1 Patienten war relativ inhomogen (Abbildung 36, [59]). Deshalb wurde anhand eines *NF1* siRNA knockdown in Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson KF3 getestet, ob eine Herabregulierung der *NF1* mRNA zu einer verschlechterten Zell(kern)ausrichtung führt. Zunächst wurde an leicht zu transfizierenden LnCAP Zellen geprüft, wie stark eine mögliche Herabregulation der *NF1* mRNA durch 4 *NF1* spezifische siRNAs ausfallen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass eine Transfektion mit einer Kontroll-siRNA die *NF1* mRNA Menge nicht beeinflusst. Die gleichzeitige Transfektion mit 4 verschiedenen *NF1* siRNAs hingegen reduzierte *NF1* mRNAs auf ca. 20% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abbildung 40 A). Bestimmt wurde die relative Menge der *NF1* mRNA durch relative quantitative PCR mit Primern, die spezifisch für die *NF1* Exons 38 und 39 sind. Als Referenzgene wurden ALAS1 und PolR2A gewählt und durch im Institut etablierte Primer bestimmt. Folgend wurde geprüft, ob diese Herabregulierung auf primäre Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (KF3) übertragbar ist. Hierzu wurden KF3 Fibroblasten zunächst für 48 Stunden mit den 4 verschiedenen *NF1* siRNAs (Qiagen) transfiziert und die Menge der *NF1* mRNA Moleküle für einen Zeitraum von bis zu 144 Stunden nach Transfektionsstart bestimmt. Der Zeitraum von 144 Stunden wurde gewählt, da dies der Zeitraum eines möglichen Versuchsplans aus siRNA Transfektion, synNF1 Transduktion, PCI-Behandlung und Zellkernausrichtung war. Nach 48 Stunden konnte eine Reduzierung der *NF1* mRNAs auf 15% der Menge der Kontrollen (Kontroll-siRNA transfiziert für 48 Stunden) gemessen werden. Nach 96 Stunden konnte noch eine Reduktion auf 28%, nach 144 Stunden auf ca. 33% detektiert werden (Abbildung 40 B). Durch diese Messungen wurde bestätigt, dass in diesen mit *NF1* siRNAs transfizierten Fibroblasten, über die gesamte Versuchsdauer eine deutlich reduzierte Menge an Neurofibromin vorliegt.

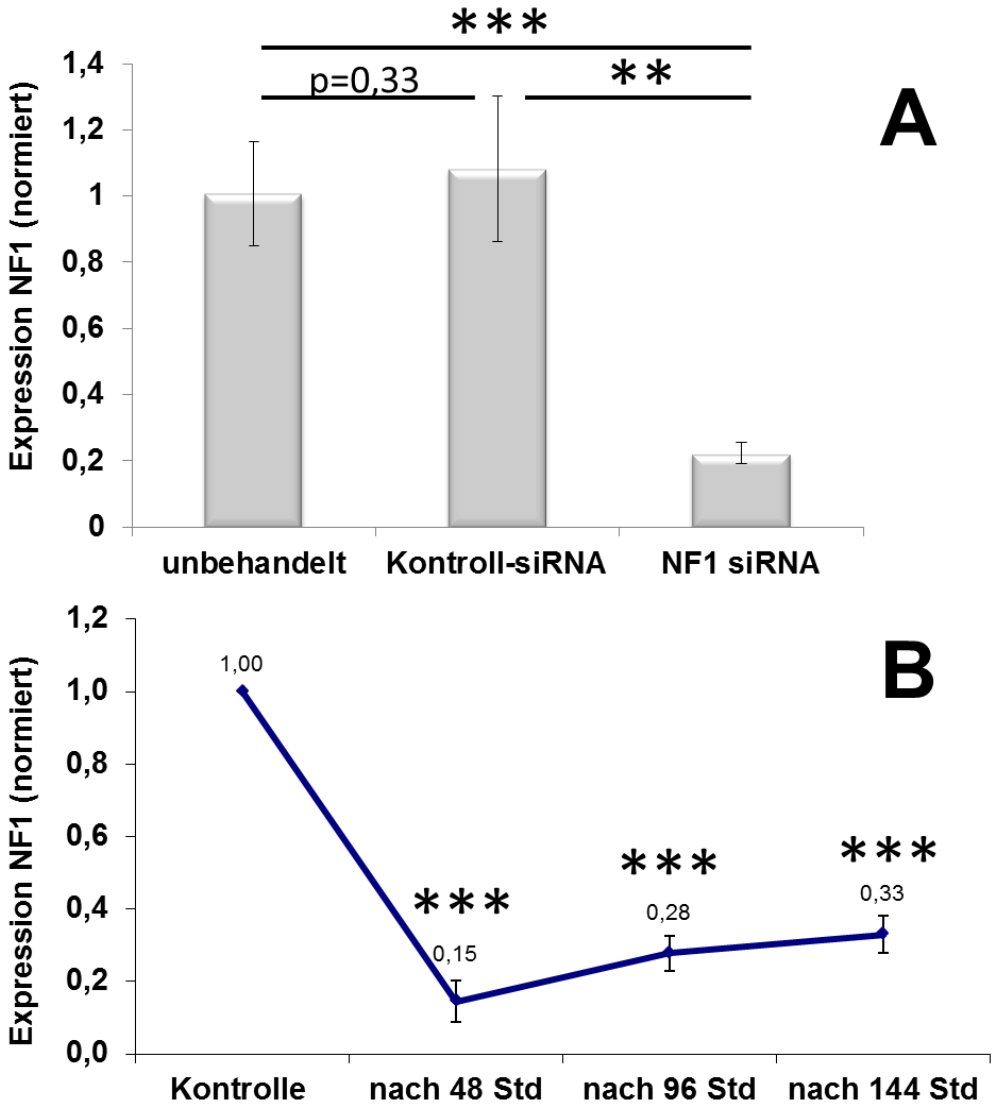

Abb. 40: *NF1* knockdown durch small interfering RNA (siRNA) Transfektion in LnCAP Zellen (A) und KF3 Fibroblasten (B). Gemessen wurden die relativen Mengen der *NF1* messenger RNAs (mRNA) durch real-time quantitative Polymerasekettenreaktionen (PCRs) mit *NF1* (Exon 38-39) spezifischen Primern. Als Referenzgene dienten *ALAS1* und *PolR2A*. Signifikante Unterschiede wurden durch einseitige T-Tests bestimmt (n=3, *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001).

(A) Transfektion von LnCAP Zellen mit Kontroll-siRNA und *NF1* siRNA für 48 Stunden. Die Transfektion mit Kontroll-siRNA führte zu keiner Veränderung in der *NF1* Expression. Eine Transfektion der Zellen mit 4 verschiedenen *NF1* siRNAs führte zu einer Reduktion der *NF1* mRNAs auf 22% verglichen mit unbehandelten LnCAP Zellen.

(B) Transfektion von primären *NF1*+/+ Fibroblasten (KF3) mit 4 verschiedenen *NF1* siRNAs für 48 Stunden und Expressionsmessungen im weiteren Verlauf bis zu 144 Stunden nach Transfektionsstart. Eine Reduktion der *NF1* Expression auf 15% im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten KF3 Fibroblasten konnte nach 48 Stunden gemessen werden. Nach 96 Stunden stieg das Expressionslevel auf 28%, nach 144 Stunden auf 33% an.

3.4.2 Ausrichtung von *NF1* siRNA transfizierten Fibroblasten

Ob Unterschiede in der Zellausrichtung zwischen Kontroll-siRNA transfizierten und *NF1* siRNA transfizierten KF3 Fibroblasten auftreten, wurde in 3 unabhängig angelegten Großversuchen zur Ausrichtung der Fibroblasten an Topografien getestet. Jeder Einzelversuch (Kontrolle A, B, C und siNF1 A, B, C) wurde durch 3-5 intern abhängige Versuche validiert, indem die jeweils behandelten Zellen auf 3-5 voneinander getrennte PDMS-Gele ausgesät und auf ihre Ausrichtung hin untersucht wurden. Abbildung 41 zeigt, dass die KF3 Fibroblasten ohne Herabregulierung der *NF1* mRNAs (Kontrolle A, B und C) einen niedrigeren Abweichungswinkel als die *NF1* siRNA transfizierten Fibroblasten aufweisen. Der mediane Abweichungswinkel der Kontroll-siRNA transfizierten KF3 Fibroblasten lag bei ca. 20°, was dem Abweichungswinkel unbehandelter KF3 Fibroblasten entsprach. Der Abweichungswinkel der siNF1 transfizierten KF3 Fibroblasten lag im Mittel bei ca. 28°.

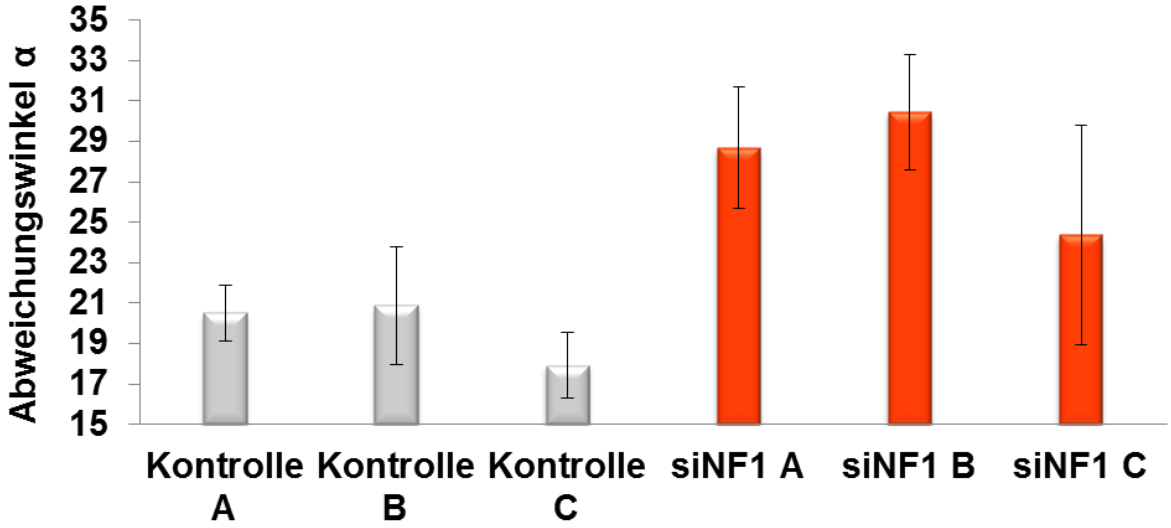

Abb. 41: Vergleich der Abweichungswinkel zwischen KF3 Fibroblasten mit und ohne Herabregulierung der *NF1* Expression. Es wurden 3 unabhängige, gepaarte Versuche durchgeführt (A, B, C). Die mit Kontroll-small interfering RNA behandelten 3 Fibroblastenkulturen (Kontrolle A, B, C) richteten sich mit einer medianen Abweichung von ca. 20° an parallelen Untergrundstrukturen in Polydimethylsiloxan- (PDMS-) Gelen aus. Die Herabregulierung der *NF1* Expression führte zu einer Erhöhung der Abweichung auf ca. 28° in den 3 mit small interfering RNAs behandelten Zellkulturen (siNF1 A, B, C).

Es konnte daher gezeigt werden, dass der Phänotyp der schlechteren Ausrichtung an bestimmten nanostrukturierten Untergründen in *NF1* haploinsuffizienten

Fibroblasten durch eine Herabregulierung der *NF1* Expression in Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (KF3) induziert werden kann. Die Verschlechterung der Ausrichtungsfähigkeit des induzierten Phänotyps (Abbildung 42 A) war in ihrer Ausprägung vergleichbar mit der mittleren verschlechterten Ausrichtung, die durch paarweises Testen von Fibroblasten von Kontrollpersonen und NF1 Patienten ermittelt werden konnte (Abbildung 42 B [59]).

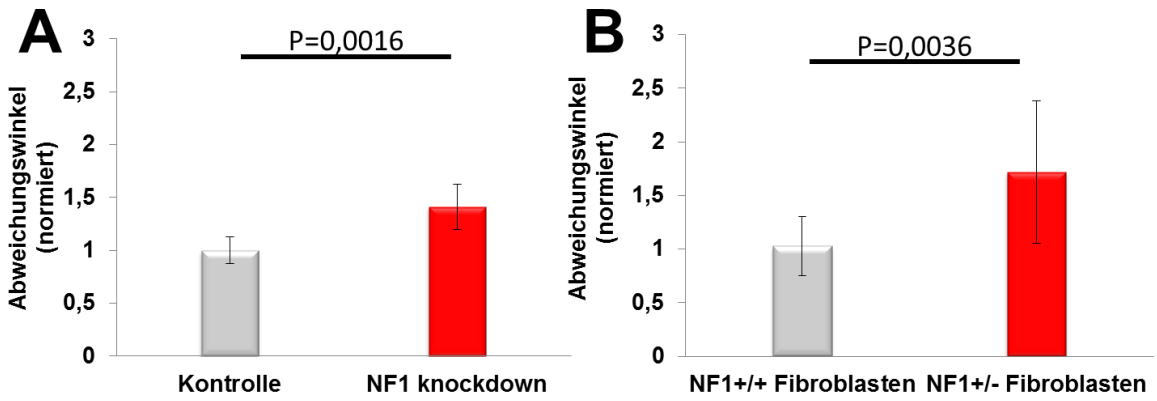

Abb. 42: Vergleich der Abweichungswinkel zwischen Fibroblasten mit normaler und Fibroblasten mit reduzierter *NF1* Expression auf strukturierten Polydimethylsiloxan-Gelen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzelversuche (A: jeweils n=3, Einzelversuche validiert durch je 3-5 abhängige Versuchswiederholungen; B: jeweils n=10). Die Fehlerindikatoren markieren ± 1 Standardabweichung. (A) Vergleich zwischen KF3 Fibroblasten, die mit einer Kontroll-small interfering RNA transfiziert wurden (Kontrolle) und KF3 Fibroblasten, die mit 4 verschiedenen siRNAs gegen *NF1* transfiziert wurden. Die Fibroblasten mit reduzierter *NF1* Expression zeigen eine Erhöhung des medianen Abweichungswinkels auf das 1,4fache des Abweichungswinkels der Kontrollen. (B) Zusammenfassung der ersten Studie der Abweichungswinkel von paarweise getesteten Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen und Fibroblasten von Neurofibromatose Typ 1 Patienten. Die Patientenfibroblasten zeigen eine Erhöhung des medianen Abweichungswinkels um das 1,7fache. In beiden Untersuchungen konnten hoch signifikante Unterschiede zwischen Fibroblasten mit normaler und Fibroblasten mit reduzierter *NF1* Expression gemessen werden (gepaarter T-Test).

3.4.3 Transduktion von synNF1eGFP in *NF1* Patientenfibroblasten

Zunächst wurde anhand des in Innsbruck isolierten, eGFP getagten synNF1 überprüft, ob eine Transduktion in *NF1* haploinsuffiziente Fibroblasten gelingt. Hierzu wurde 2µg synNF1eGFP zunächst mithilfe der Chariot Reagenz in die Zielzellen für 20 Stunden transduziert. Zusätzlich wurde in einem Parallelversuch

2µg synNF1eGFP für 20 Stunden unter Verwendung der Endo-Porter Reagenz in NF1 Patienten Fibroblasten transduziert. Abbildung 43 zeigt, dass nach der Chariot-vermittelten Transduktion nur wenige punktuelle Fluoreszenzsignale in diesen Fibroblasten detektiert werden konnten (A). Die EP-vermittelte Transduktion führte jedoch zu starken eGFP Signalen in den Zielzellen (B). Für die Revertierung von *NF1*-Haploinsuffizienzeffekten wurde daher auf das Endo-Porter Transduktionssystem zurückgegriffen.

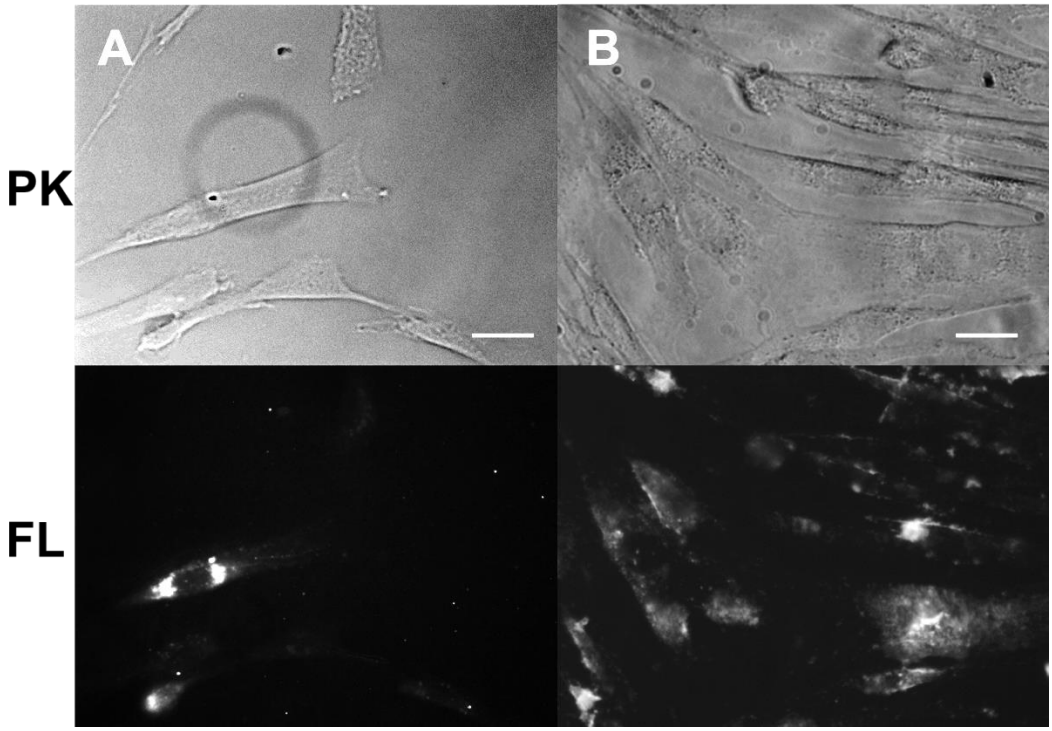

Abb. 43: Transduktion eines synthetisch hergestellten Fusionsproteins aus Neurofibromin und enhanced green fluorescent protein (synNF1eGFP) in NFS4 Migr Zellen. Weiße Balken markieren eine Länge von 10µm. Dargestellt sind die Phasenkontrastaufnahmen (PK) und die Fluoreszenzaufnahmen mit einem green fluorescent protein (GFP) Filtersatz (FL) nach synNF1eGFP Transduktion mittels Chariot (A) und Endo-Porter (B). Die Signale, die nach Chariot-Transduktion detektiert wurden, waren punktuell, perinukleärer und schwacher Natur. Nach Endo-Porter Transduktion konnten stärkere Signale und zudem Signale über große Teile der Zellen erkannt werden, teilweise mit einer möglichen Membranlokalisation.

3.4.4 Zellausrichtung nach Transduktion von synNF1 in Patientenfibroblasten

Um zu überprüfen, ob eine Transduktion von synNF1 die verschlechterte Ausrichtung an speziellen Nanotopografien (parallel verlaufende Strukturen; Breite und Abstand: 2µm; Höhe: 200nm; siehe 2.2.26.1) von *NF1* haploinsuffizienten

Fibroblasten verbessern kann, wurden Patientenfibroblasten zunächst in einer Dichte von 20000 Zellen pro cm² in 12-well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel (DMEM) durchgeführt. Für Zellen, die später eine PCI-Behandlung erhalten sollten, enthielt das frische Medium 1µg/ml $TPPS_4$. Nach weiteren 20 Stunden Inkubation bei 37°C und 9% CO_2 wurden die Zellen mit 9µl Endo-Porter und 4,5µg synNF1 pro Well transduziert. Danach wurden ca. 5000 Zellen pro Gel auf die strukturierten PDMS-Gele ausgesät und ihre Ausrichtung 48 Stunden später bestimmt. Abbildung 44 zeigt die auf die jeweils unbehandelten Zellen normierten Ausrichtungswinkel der primären Patienten-Fibroblasten NF213, NF244, NF329, NF191 und NF282. Der mediane Abweichungswinkel der *NF1*+/- Fibroblasten NF213 und NF244 konnte durch Transduktion von synNF1 mittels Endo-Porter auf ca. 65% des Abweichungswinkels der jeweils unbehandelten Zellen reduziert werden (NF1 transduziert). Bei den *NF1* haploinsuffizienten Fibroblasten NF329 und NF191 führte eine Neurofibromintransduktion ohne weitere PCI-Behandlung zu keiner signifikanten Änderung der Ausrichtung. Eine anschließende PCI-Behandlung dieser Zellen reduzierte den medianen Ausrichtungswinkel bei NF329 auf ca. 60, bei NF191 auf ca. 90% des Winkels unbehandelter Zellen (NF1 transduziert + PCI). Eine Transduktion von synNF1 verringerte den Abweichungswinkel in NF282 Fibroblasten auf 68%. Bei NF282 Fibroblasten, die zusätzlich zur Transduktion einer PCI unterzogen wurden, konnte die Abweichung nur auf 75% des Winkels ihrer unbehandelten Pendants erreicht werden. Die synNF1 Transduktion mittels Endo-Porter ohne PCI-Behandlung führte daher bei einem Teil der getesteten Patientenfibroblasten zu einer Ausrichtungsverbesserung an den Nanotopografien, während bei den übrigen Patientenfibroblasten eine zusätzliche PCI-Behandlung nötig war, um die Ausrichtung zu verbessern. Endo-Porter vermittelte Transduktionen führen durch den endosomolytischen Effekt des Reagenz per se zu geringen zytoplasmatisch lokalisierten Signalen (siehe 3.1.2.5). Es ist daher möglich, dass die bei manchen Patientenfibroblasten geringen Mengen zytoplasmatisch von eingeschleustem synNF1 ausreichen, um die Ausrichtung der Zellen zu verbessern, während bei anderen größere Mengen des Proteins benötigt werden.

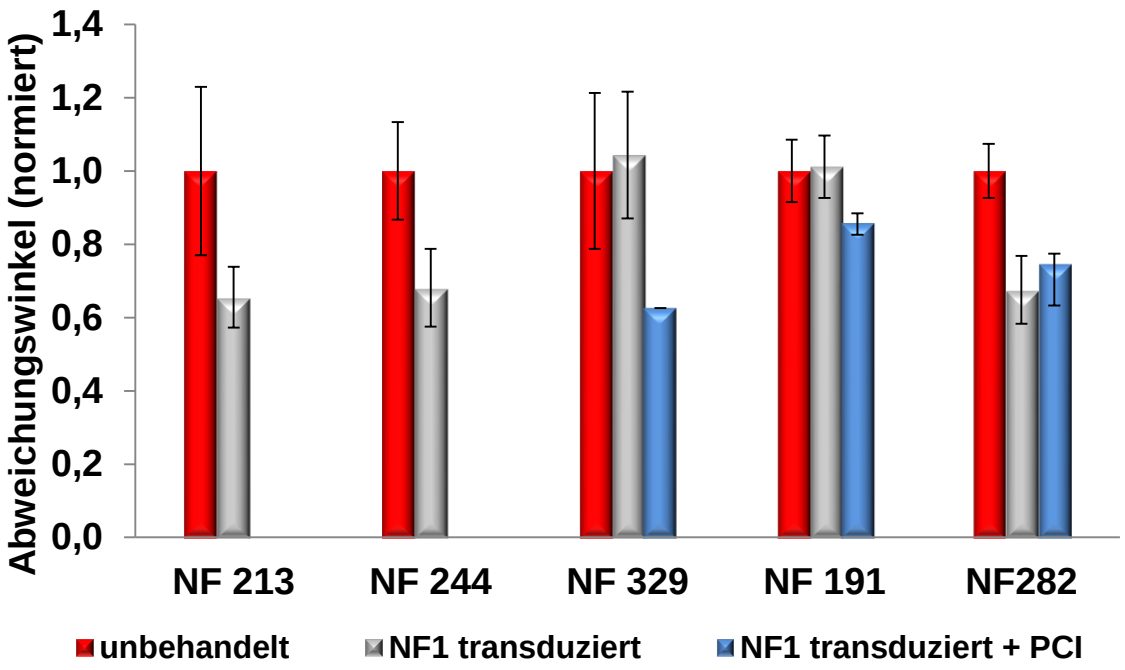

Abb. 44: Verringerung des medianen Abweichungswinkels in Patientenfibroblasten durch Einschleusung von synthetischem Neurofibromin (synNF1; NF1 transduziert) mittels Endo-Porter. Dargestellt sind die medianen Abweichungswinkel der Fibroblasten ohne und mit Proteineinschleusung. Die Fehlerbalken markieren ± 1 Standardabweichung (n≥3). Die Winkel wurden auf die Mittelwerte der medianen Abweichungswinkel der unbehandelten Fibroblasten normiert. Bei 2 Patienten (NF213 und NF244) konnte durch eine Endo-Porter vermittelte Transduktion von synNF1 eine Verbesserung des Abweichungswinkels auf 65 beziehungsweise 63% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erreicht werden. Bei den Patientenfibroblasten NF319 und NF191 führte eine synNF1 Transduktion zu keiner Verbesserung der medianen Ausrichtung der Zellen. Eine zusätzliche photochemical internalization- (PCI-) Behandlung führte in den NF329 zu einer Reduktion des Abweichungswinkels auf 62%. Bei den NF191 Fibroblasten konnte der Abweichungswinkel durch dieselbe Kombinationsbehandlung auf 86% des Winkels unbehandelter Kontrollen reduziert werden. Bei NF282 Fibroblasten konnte der Abweichungswinkel durch eine synNF1 Transduktion auf 68% reduziert werden. Eine zusätzliche PCI-Behandlung bewirkte eine weniger starke Verbesserung des Winkels auf 75%.

3.4.5 Einfluss der PCI auf die Ausrichtung von Fibroblasten an Untergrundstrukturen

Da die Kombinationsbehandlung aus Transduktion und PCI nicht bei allen Ausrichtungsversuchen zu einer besseren Ausrichtung der Zellen als bei einer Transduktion ohne PCI führte (s. Abbildung 44), wurden der Photosensitizer $TPPS_4$ allein und die gesamte PCI-Behandlung daraufhin untersucht, ob diese

sich negativ auf die Ausrichtung von Fibroblasten auswirkt. An NF244 Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit dem Photosensitizer ohne Belichtung keine signifikante Verschlechterung der Ausrichtung der *NF1*+/- Fibroblasten verursachte (+17%; p=0,06). Eine vollständige PCI-Behandlung ohne Transduktion verschlechterte hoch signifikant die Ausrichtung der Zellen erheblich (+77%; p<0,001; Abbildung 45).

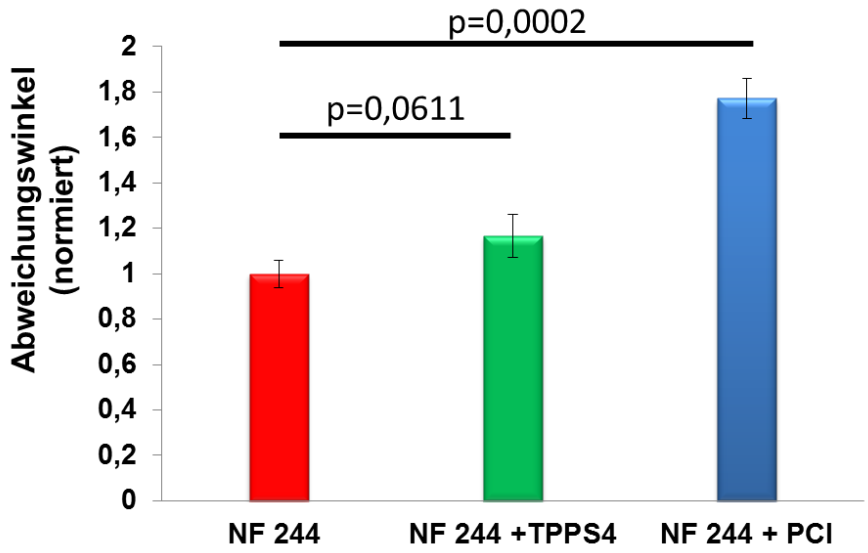

Abb. 45: Einfluss des Photosensitizers 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonato-phenyl)-21,23H-porphyrin ($TPPS_4$) und der kompletten photochemical internalization- (PCI-) Behandlung auf die Ausrichtung von NF244 Fibroblasten an Untergrundstrukturen. Dargestellt ist der auf den Mittelwert der medianen Winkel der unbehandelten NF244 Fibroblasten normierte Abweichungswinkel. Fehlerbalken repräsentieren ± 1 Standardabweichung. Fibroblasten des *NF1* Patienten NF 244 wurden entweder unbehandelt (NF244), mit $TPPS_4$ für 20 Stunden inkubiert (NF244 + $TPPS_4$) oder vollständig PCI behandelt und auf Polydimethylsiloxan-Gele mit parallelen Längsstrukturen ausgesät. Die Inkubation mit $TPPS_4$ bewirkte eine leichte Erhöhung des Abweichungswinkels, der sich jedoch nicht signifikant von den unbehandelten Kontrollen unterschied. Die vollständige PCI-Behandlung führte zu einer starken und signifikanten Erhöhung des Abweichungswinkels der Zellen zu den Längsstrukturen des Gels (Studentischer T-Test).

Kombinationsbehandlungen aus synNF1 Transduktion und PCI schienen daher als Folge nur leichte Ausrichtungsverbesserungen oder gar Ausrichtungsverschlechterungen zu haben, da sie mit falschen Kontrollen verglichen wurden. Um diesen Befund an einem *NF1*+/+ Hintergrund zu überprüfen, wurden unbehandelte KF3 Fibroblasten mit PCI-behandelten KF3

verglichen (Abbildung 46). Es ist zu erkennen, dass sich der Abweichungswinkel der Zellen signifikant verschlechterte ($p<0,01$). Eine zusätzliche Transfektion mit Kontroll-siRNA und eine Transduktion der Zellen mit Atto488-BSA verschlechterte die Ausrichtung der Zellen nicht weiter verglichen mit Fibroblasten, die ausschließlich PCI-behandelt wurden ($p=0,22$). Dies zeigt, dass sich weder eine Transfektion mit siRNA noch die Proteintransduktion an sich signifikant auf die Ausrichtung von Fibroblasten an Untergrundstrukturen auswirken. Die PCI wirkte sich jedoch sowohl in *NF1*+/+ als auch in *NF1*+/- Fibroblasten negativ auf die Ausrichtung an den getesteten Nanostrukturen aus.

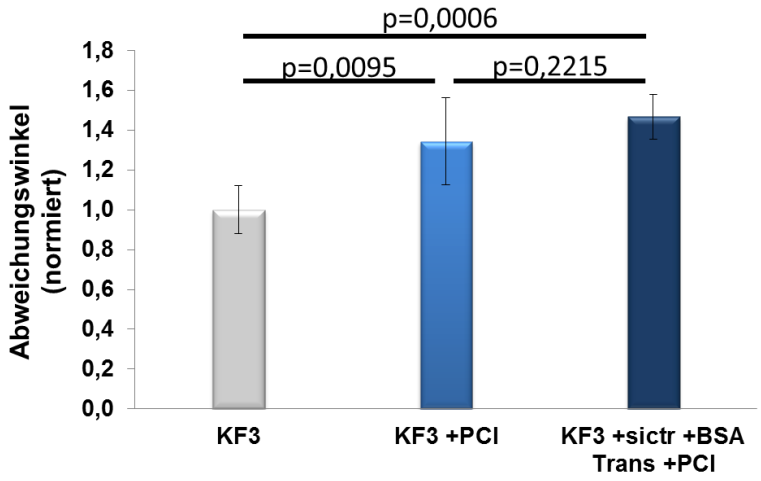

Abb. 46: Einfluss der photochemical internalization- (PCI-) Behandlung und der Kombination aus PCI, small interfering RNA (siRNA) Transfektion und Endo-Porter vermittelter Transduktion von Atto488-BSA (bovine serum albumin) in Fibroblasten der gesunden Kontrollperson KF3. Dargestellt ist der Abweichungswinkel der Zellen zu parallelen Untergrundstrukturen auf Polydimethylsiloxan-Gelen normiert auf den Winkel der unbehandelten KF3 Fibroblasten (KF3). Eine PCI-Behandlung der Zellen (KF3 + PCI) führt zu einer signifikanten Verschlechterung des Abweichungswinkels um 34%. Ein ähnlich starke Verschlechterung des Abweichungswinkels wird bei KF3 Fibroblasten gemessen, die neben der PCI-Behandlung zusätzlich eine Transfektion mit Kontroll-siRNAs und eine Transduktion mit Atto488-BSA erfahren haben (KF3 + sictr +BSA Trans + PCI). Zwischen PCI-behandelten und PCI-Transfektion- und Transduktion-behandelten KF3 Fibroblasten konnte kein signifikanter Unterschied in den Abweichungswinkeln festgestellt werden (p-Werte wurden mit einem zweiseitigen T-Test ermittelt).

3.4.6 Revertierung der partiellen mechanosensorischen Blindheit in NF1 Patientenfibroblasten

Normiert man die früher veröffentlichten Daten zur verschlechterten Ausrichtung *NF1* haploinsuffizienter Fibroblasten auf die NF1 Patientenzellen und gruppiert sie in *NF1+/-* und *NF1+/+* Fibroblasten so ergibt sich, dass der mediane Abweichungswinkel der *NF1+/+* Fibroblasten ca. 60% des medianen Abweichungswinkels der *NF1+/-* Fibroblasten entspricht (Abbildung 47 A [59]). Ein vergleichbares Ergebnis wird erreicht, wenn man unbehandelte *NF1+/-* Fibroblasten mit behandelten vergleicht (Abbildung 47 B).

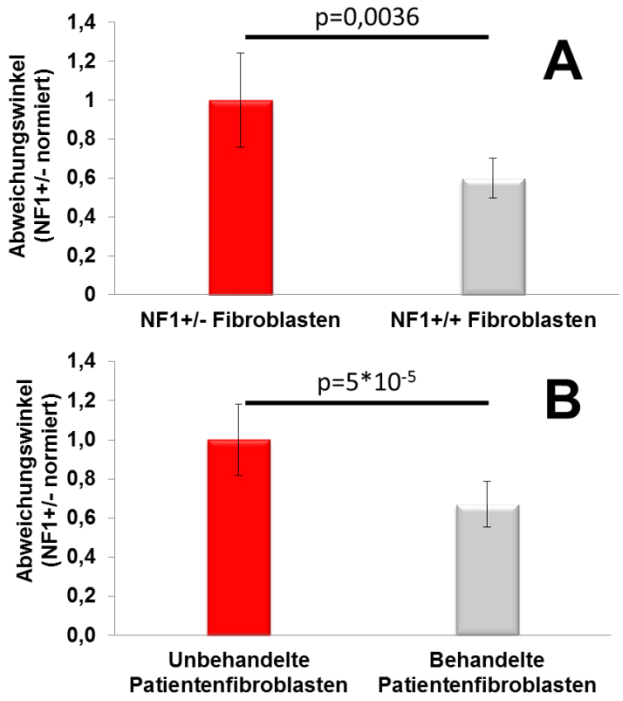

Abb. 47: Vergleich der Abweichungswinkel von Untergrundstrukturen von *NF1+/-* Fibroblasten, *NF1+/+* Fibroblasten und Fibroblasten in die synthetisches Neurofibromin (synNF1) eingeschleust wurde. Dargestellt ist der auf den Mittelwert der medianen Abweichungswinkel der Patientenfibroblasten normierte Abweichungswinkel der jeweiligen Zellkohorten. Fehlerindikatoren markieren die 95% Konfidenzintervalle der Mittelwerte. (A) Vergleich zwischen paarweise getesteten Fibroblasten von Neurofibromatose Typ 1 (NF1) Patienten (*NF1+/-* Fibroblasten) und von gesunden Kontrollpersonen (*NF1+/+* Fibroblasten). Die Abweichungswinkel der *NF1+/+* Fibroblasten betrugen 60% der Winkel der *NF1+/-* Fibroblasten. (B) Vergleich zwischen *NF1+/-* Fibroblasten (unbehandelte Patientenfibroblasten) und Fibroblasten derselben Patienten, in die durch Endo-Porter vermittelte Transduktion -teilweise mit zusätzlicher PCI-Behandlung- synNF1 eingeschleust wurde (Behandelte Patientenfibroblasten). Der Abweichungswinkel der behandelten Fibroblasten betrug 67% der Winkel der unbehandelten Fibroblasten. Zwischen beiden Gruppen konnten hoch signifikante Unterschiede beobachtet werden (A: p=0,0036; B: p=0,0034; gepaarter T-Test).

3.4.7 NF1 knockdown und Phänotyprevertierung durch synNF1 Transduktion mit PCI-Behandlung

Da der zelluläre Phänotyp der schlechteren Ausrichtungsfähigkeit von Fibroblasten durch siRNA-Transfektion bedingte Herabregelung der *NF1* mRNAs induzierbar war, stellte sich die Frage, ob eine Einschleusung des Proteins Neurofibromin in diese Zellen den Phänotyp revertieren kann. Hierzu wurden KF3 Fibroblasten zunächst 48 Stunden mit NF1- oder Kontroll-siRNA transfiziert. Folgend wurden die Zellen für ca. 24 Stunden mit 1µg $TPPS_4$ / ml DMEM inkubiert und danach für ca. 24 Stunden mithilfe des Endo-Porter Reagenz mit synNF1 respektive Atto488-BSA transduziert. Danach wurden die Zellen auf strukturierte PDMS-Gele ausgesät. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und der mediane Abweichungswinkel bestimmt (Abbildung 48).

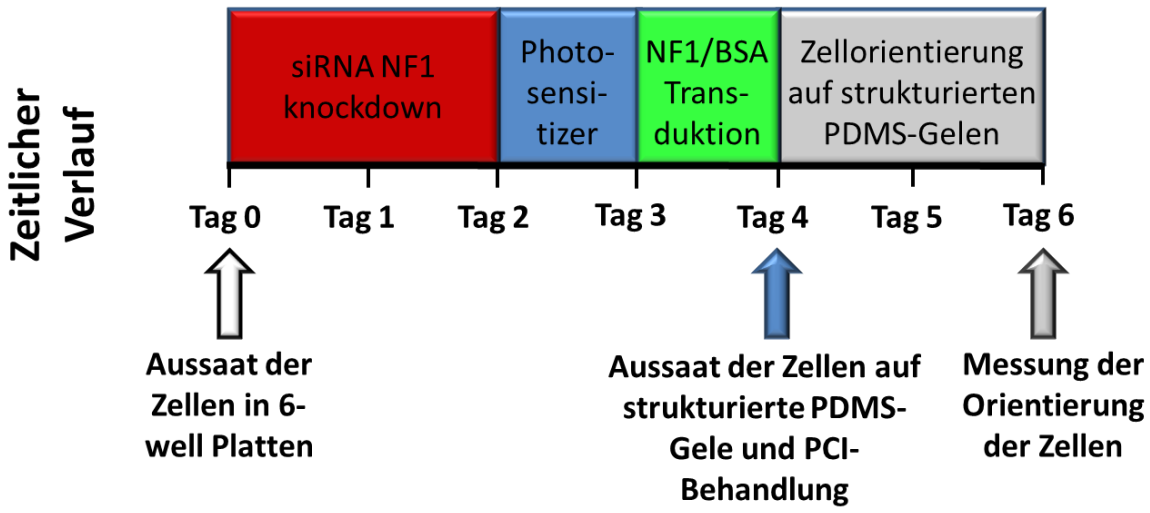

Abb. 48: Zeitlicher Verlauf der Revertierung des durch *NF1* knockdown induzierten zellulären Phänotyps der verschlechterten Orientierung in KF3 Fibroblasten. Die Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät und für 48 Stunden mit 4 verschiedenen *NF1* small interfering RNAs transfiziert. Danach wurden die Zellen für 24 Stunden mit 1µg/ml 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonato-phenyl)-21,23H-porphyrin ($TPPS_4$) inkubiert. Es folgte eine Transduktion mit entweder 2µg Atto488-BSA (bovine serum albumin) oder 9µg synNF1 (synthetisches Neurofibromin) durch das Endo-Porter Reagenz. Danach wurden die Zellen auf längsstrukturierte Polydimethylsiloxan-Gele ausgesät. Nach ca. 48 Stunden der Ausrichtung wurden die Abweichungswinkel der Zellen bestimmt.

Da die PCI selbst eine negative Wirkung auf die Zellausrichtung hat, wurden als Kontrollen für die Versuche immer KF3 verwendet, die bis auf die Wahl des eingeschleusten Proteins (im Fall der Kontrollen Atto488-BSA) exakt gleich behandelt wurden. Abbildung 49 zeigt, dass transduziertes synNF1 zu einer Verbesserung des Abweichungswinkels führt. Die mediane Abweichung Atto488-BSA transduzierter Zellen stieg nach *NF1* knockdown und PCI-Behandlung um 75% verglichen mit unbehandelten KF3 Fibroblasten. Diese Verschlechterung konnte durch Transduktion von synNF1 anstatt des Atto488-BSA nahezu vollständig revertiert werden (+2%). Zwischen dem medianen Abweichungswinkel unbehandelter KF3 und *NF1* siRNA-transfizierten, synNF1-transduzierten und PCI-behandelten KF3 Zellen konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden (p=0,33). Daher konnte gezeigt werden, dass eine Revertierung des Phänotyps durch synNF1 Transduktion erreicht werden kann.

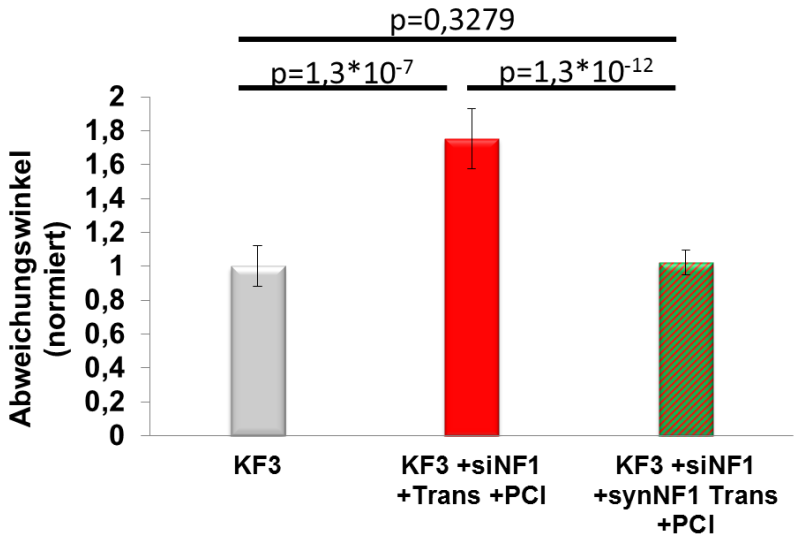

Abb. 49: Revertierung des durch *NF1* knockdown induzierten zellulären Phänotyps der verschlechterten Ausrichtung an Nanotopografien in Fibroblasten der gesunden Kontrollperson KF3. Dargestellt ist der auf den Mittelwert der medianen Abweichungswinkel unbehandelter KF3 Zellen normierte Abweichungswinkel. Die Fehlerbalken repräsentieren ± 1 Standardabweichung. Die Herabregulierung der *NF1* Expression durch siRNAs gegen *NF1* gekoppelt mit einer Endo-Porter vermittelten Atto488-BSA Transduktion und photochemical internalization- (PCI-) Behandlung (KF3 +siNF1 +Trans +PCI) führt zu einer höchst signifikanten Verschlechterung der Ausrichtung der Zellen. Fibroblasten, die dieselbe Behandlung erfuhren, jedoch mit einer ungefähr äquimolaren Menge synthetisches Neurofibromin (synNF1) anstatt mit Atto488-BSA transduziert wurden (KF3 +siNF1 +synNF1 Trans +PCI), zeigten keine signifikante Änderung des Abweichungswinkels verglichen zu unbehandelten Zellen (p-Werte wurden über einen einseitigen studentischen T-Test berechnet).

3.4.8 SynNF1 Transduktion revertiert die durch PCI induzierte Zellausrichtungsstörung

KF3 Fibroblasten, deren *NF1* mRNAs nicht durch siRNAs herabreguliert wurden, zeigen durch eine PCI-Behandlung eine verschlechterte Ausrichtungsfähigkeit an den nanostrukturierten Zellkulturgefäßoberflächen. Diese ist nicht so stark, wie die Verschlechterung, die durch siRNAs gegen *NF1* mit zusätzlicher PCI hervorgerufen wird (47% versus 75%). Da die *NF1* mRNA-Menge in PCI behandelten Fibroblasten nicht verändert ist, ist die durch PCI indizierte Ausrichtungsverschlechterung nicht direkt an die endogen vorhandene Menge Neurofibromin gekoppelt. Eine Transduktion von synNF1 in PCI-behandelten KF3, deren *NF1* Expression nicht reduziert ist, revertiert dennoch den Phänotyp der Zellen (Abbildung 50). Neurofibromin scheint daher eine allgemein regulatorische Wirkung auf die Zellausrichtung zu besitzen.

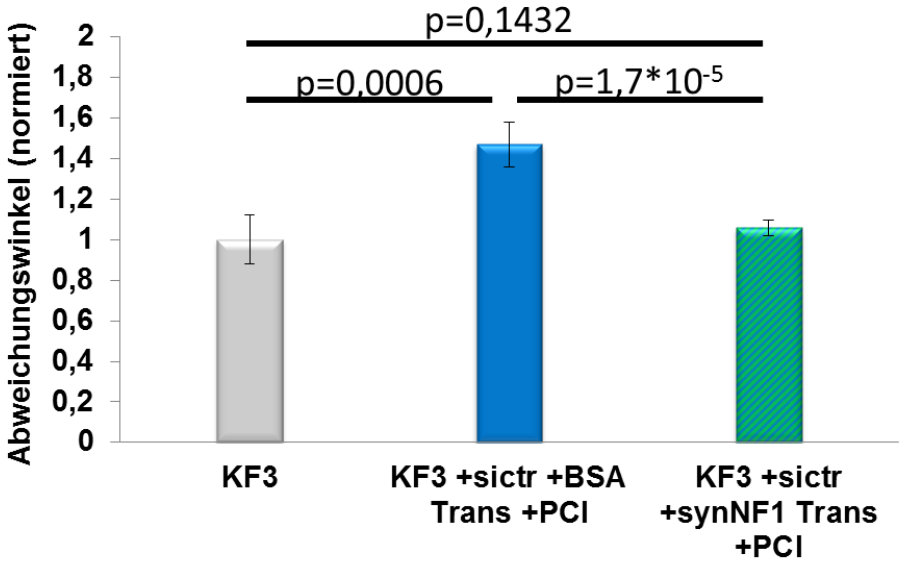

Abb. 50: Verringerung der durch photochemical internalization (PCI) induzierten Ausrichtungsverschlechterung durch Transduktion von synthetischem Neurofibromin (synNF1) in KF3 Fibroblasten. Dargestellt ist der auf den Mittelwert der medianen Abweichungswinkel unbehandelter KF3 Zellen normierte Abweichungswinkel. Die Fehlerbalken repräsentieren ± 1 Standardabweichung. Kontroll-small interfering RNA transfizierte und Atto488-BSA (bovine serum albumin) transduzierte KF3 Fibroblasten, die zusätzlich PCI-behandelt wurden (KF3 +sictr +BSA Trans +PCI) zeigen eine signifikante Veränderung (+ 47%) des Abweichungswinkels verglichen mit unbehandelten KF3 Fibroblasten. Durch eine Transduktion von synNF1 anstatt des Atto488-BSAs (KF3 +sictr +synNF1 Trans +PCI) wird die Erhöhung fast gänzlich revertiert (+6%). Es kann kein signifikanter Unterschied mehr zu den unbehandelten KF3 Fibroblasten festgestellt werden.

3.4.9 Messungen von phosphoryliertem ERK 1/2 nach synNF1-Transduktion

Um neben der Funktion des transduzierten synNF1 auf die Orientierung der Zellen an Nanotopografien noch einen weiteren Hinweis auf die Funktionsfähigkeit des transduzierten Proteins zu erhalten, wurde dessen Effekt auf einen Neurofibromin-vermittelten Signalweg gemessen. Da Neurofibromin in Fibroblasten als GAP für H-Ras wirkt, wurde die Aktivität von ERK1, einem Effektor von H-Ras im MAPK Signaltransduktionssignalweg untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in synNF1 transduzierten und PCI behandelten NF1 Patientenfibroblasten (NF244 und NF191) die Menge an phosphoryliertem ERK1 (pERK1) im Vergleich zu den unbehandelten Pendants halbiert (47%) ist, die Menge an phosphoryliertem ERK2 (pERK2) jedoch unverändert bleibt (Abbildung 51 A). Eine Erhöhung der pERK Menge wurde bei reduziertem Neurofibromin beschrieben [113]. Daher konnte auch auf diesem Weg gezeigt werden, dass das eingeschleuste synNF1 in den Zielzellen funktionell aktiv ist. Messungen an synNF1 transduzierten KF1 Fibroblasten zeigten, dass bei einem *NF1*+/+ Hintergrund die Menge an pERK1/2 weder durch eine synNF1 Transduktion mittels Endo-Porter noch durch eine zusätzliche PCI wesentlich verändert wird (Abbildung 51 B).

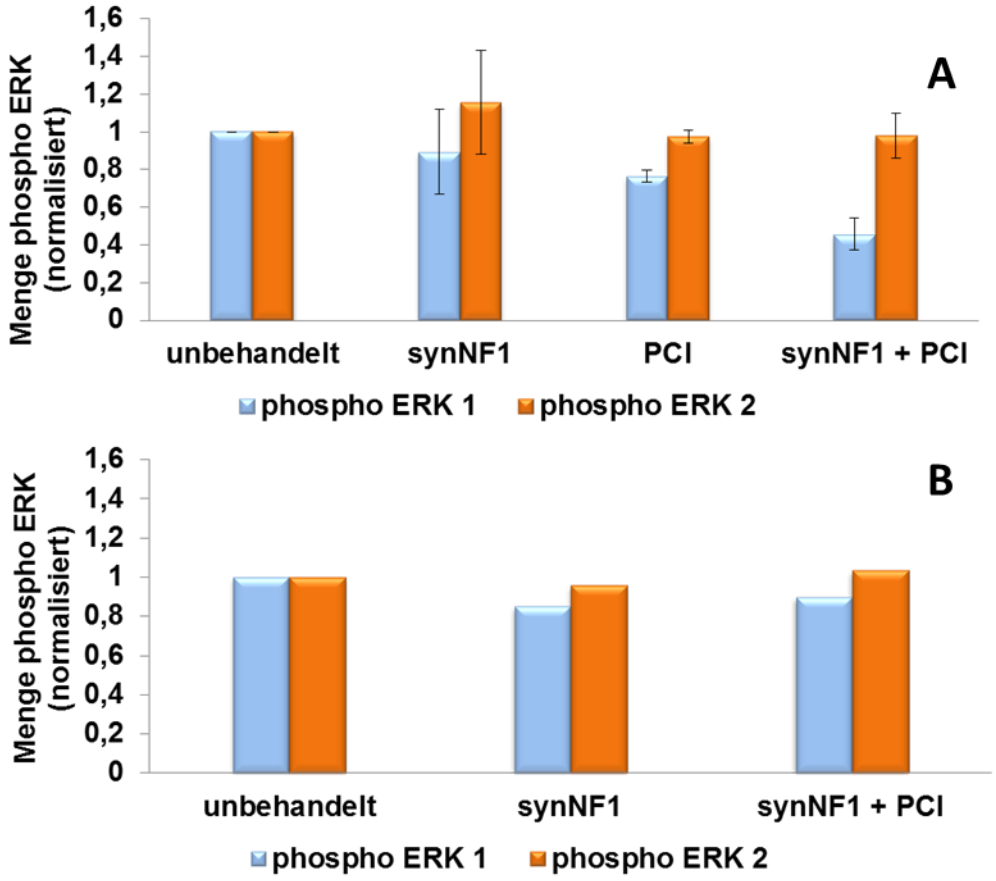

Abb. 51: Einfluss der Einschleusung von synthetischem Neurofibromin (synNF1) auf die Menge an phosphoryliertem ERK 1 und 2 in Fibroblasten von NF1 Patienten (A) und einer gesunden Kontrollperson (B). Dargestellt sind die auf die phospho ERK 1/2 Mengen unbehandelter Kontrollen normierte Mengen an phosphoryliertem ERK 1 und 2 von unbehandelten Fibroblasten (unbehandelt), Fibroblasten, die mittels Endo-Porter mit 5,5µg/ml synNF1 transduziert wurden (synNF1), Fibroblasten, die ausschließlich PCI behandelt wurden (PCI) und Fibroblasten, die transduziert und zusätzlich PCI behandelt wurden (synNF1 + PCI). Fehlerbalken stellen ± 1 SEM dar.

3.5 Transduktion von TAT-synNF1eGFP in KF3 Fibroblasten

Gegen Ende der Arbeit gelang es der Innsbrucker Gruppe ein Fusionsprotein aus der Proteintransduktionsdomäne des TAT und synNF1 herzustellen. Dieses Protein wurde in Innsbruck als His_6-TAT-synNF1-3xeGFP Fusionsprotein charakterisiert. 240µg wurden uns zur Verfügung gestellt. Das Fusionsprotein sollte in der Lage sein, ohne weiteres Transduktionsreagenz von den Zellen aufgenommen zu werden. Eine Inkubation von TAT-synNF1eGFP mit KF3 führte zu deutlichen Fluoreszenzsignalen bei einer vergleichbaren Inkubationszeit zu den

vorherigen, Reagenz-vermittelten Transduktionen. Es konnten sowohl punktförmige Signale als auch flächige eGFP Signale detektiert werden (Abbildung 52).

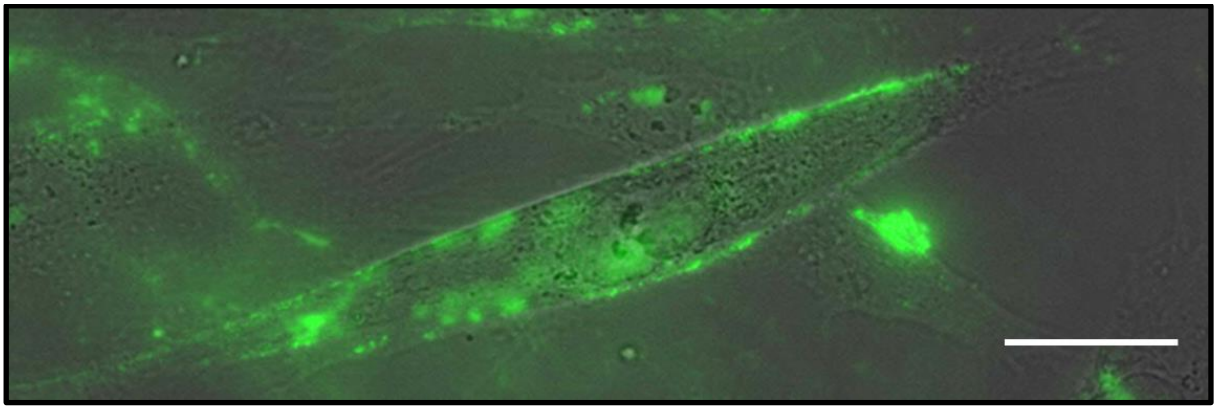

Abb. 52: Fluoreszenzüberlagerungsaufnahme nach Inkubation von KF3 Fibroblasten mit einem synthetischen Fusionsprotein aus TAT, Neurofibromin und enhanced green fluorescent protein (TATsynNF1eGFP). KF3 Fibroblasten wurden mit 4µg TATsynNF1eGFP in 500µl DMEM in 8-well Chamberslides für 20 Stunden inkubiert. Neben punktförmigen sind auch flächige und Membran-assoziierte eGFP Signale zu erkennen. Der weiße Balken stellt eine Länge von 10µm dar.

Die endosomale Speicherung schien beim TAT-Fusions-synNF1eGFP nicht so stark zu sein, wie bei dem früher getesteten Beispielprotein Atto488-BSA. Folgend wurden *NF1* siRNA transfizierte KF3 mit TAT-synNF1eGFP inkubiert. Abbildung 53 zeigt, dass der Abweichungswinkel durch eine TAT-synNF1eGFP Transduktion die verschlechterte Ausrichtung der KF3 Fibroblasten nach siRNA knockdown der *NF1* Expression auf einen Wert revertiert, der ungefähr dem unbehandelter Zellen entspricht. Die Resultate der Einschleusung des Fusionsproteins TATsynNF1eGFP sind somit mit den erreichten Ausrichtungsverbesserungen vergleichbar, die durch Reagenz-vermittelte Transduktion von synNF1 erreicht werden konnten. Zellen, deren Ausrichtung an Untergrundstrukturen durch eine zusätzliche PCI-Behandlung weiter verschlechtert wurde, richteten sich durch eine TATsynNF1eGFP Transduktion ebenfalls besser aus. Die Ausrichtung erreichte in diesen Versuchen jedoch nicht die Werte unbehandelter Zellen. Die zusätzlich durch die PCI induzierte Verschlechterung der Ausrichtung blieb durch die TATsynNF1eGFP Transduktion fast vollständig bestehen. Es konnte gezeigt werden, dass eine fusionierte TAT-Proteintransduktionsdomäne das synNF1eGFP

dazu befähigt, in die Zielzellen eingeschleust zu werden und ohne weitere Behandlung in ausreichender, funktionsfähiger Menge das Zytoplasma zu erreichen. Im Gegensatz zu Endo-Porter vermittelter Transduktion von synNF1 ohne C-terminalem TAT-Peptid und dreifachem eGFP, konnte das TATsynNF1eGFP Fusionsprotein die durch die PCI induzierte Verschlechterung der Ausrichtung der Fibroblasten nicht kompensieren.

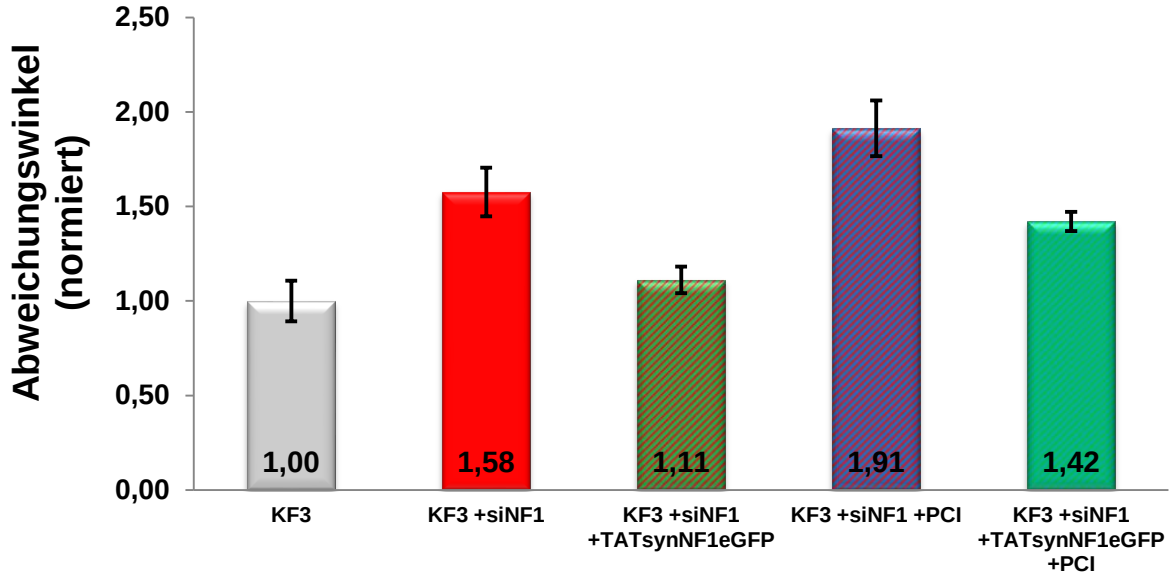

Abb. 53: Phänotyprevertierung durch Transduktion eines synthetischen Fusionsproteins aus TAT, Neurofibromin und enhanced green fluorescent protein (TATsynNF1eGFP). Dargestellt ist der auf den Mittelwert der medianen Abweichungswinkel unbehandelter KF3 Fibroblasten normierte Abweichungswinkel. Die Fehlerbalken repräsentieren ± 1 Standardabweichung. Ein *NF1* knockdown (KF3 +siNF1) bewirkt eine Vergrößerung des medianen Abweichungswinkel der KF3 Fibroblasten (+58%; $p=2,6*10^{-4}$). Durch Inkubation mit TATsynNF1eGFP haltigem Kulturmedium (5,5µg/ml; KF3 +siNF1 +TATsynNF1eGFP) kann die verschlechterte Ausrichtung der Fibroblasten revertiert werden (p=0,096). Eine Kombination aus *NF1* knockdown und photochemical internalization- (PCI-) Behandlung verschlechtert die Ausrichtung der KF3 Fibroblasten an Untergrundstrukturen erheblich (+91%; $p=2,6*10^{-5}$). Eine Inkubation dieser Zellen mit TATsynNF1eGFP verbessert die Ausrichtung zwar signifikant (p=0,002), es bleiben jedoch signifikante Unterschiede zu unbehandelten KF3 Fibroblasten bestehen ($p=6,4*10^{-4}$).

Es konnte daher schlussendlich gezeigt werden, dass die Einschleusung von synthetisch hergestelltem Neurofibromin in Fibroblasten mit verringertem Level an funktionellem, endogenen Neurofibromin zu einer Revertierung von Defizienzeffekten führt.

4 Diskussion

4.1 Neurofibrosarkomzellen

Die Auswahl der NFS4 Zellen war darin begründet, dass es sich um humane, *NF1* insuffiziente Neuralleistenzellen handelte. Zudem zeigten Vorbefunde, dass diese Zellen zur Migration fähig waren. Der *NF1*-/- Status der Zellen wurde angenommen, da diese aus einem Neurofibrosarkom gewonnen wurden. In den Charakterisierungsuntersuchungen zeigten die NFS4 Zellen nicht das erwartete Ausbleiben von *NF1* mRNAs. Zunächst ist dies nicht verwunderlich. Mutationen, die zum Verlust der Funktion eines Gens führen, verursachen nicht zwangsweise eine Expressionsveränderung oder Veränderung der Halbwertszeiten der messenger RNAs. Die erhöhte Menge der vorhandenen *NF1* mRNAs verglichen mit Fibroblasten einer gesunden Vergleichsperson beziehungsweise mit Fibroblasten eines NF1 Patienten weist in Richtung eines bislang unbekannten Rückkopplungsmechanismus. Hierbei würde der Mangel an funktionsfähigem Protein rückwirkend zu einer Steigerung der Expression führen, um den Mangel auszugleichen. Obwohl dergleichen für andere Gene beschrieben ist, so ist dies für *NF1* bestritten, da eine solche Rückkopplung dazu führen würde, dass eine *NF1* Haploinsuffizienz keine negativen Effekte zeigen könnte. Möglich wäre, dass die Fibroblasten, welche als Vergleich herangezogen wurden, ein anderes Expressionsmuster vieler Gene zeigen und daher für quantitative Vergleiche mit den Neurofibrosarkomzellen nicht geeignet sind. Bei Fibroblasten handelt es sich im Gegensatz zu Melanozyten nicht um Neuralleistenzellen. Ein quantitativer Vergleich zwischen NFS4 Zellen und Melanozyten hätte möglicherweise vergleichbarere Grundvoraussetzungen schaffen können. Der große Unterschied in den Mengen des Neurofibromins weist ebenfalls darauf hin, dass es bei den zwei verschiedenen Zelltypen die *NF1* Expression und die Neurofibromin-Produktion grundsätzlich unterschiedlich stark sind. In der Silberfärbung des präzipitierten und aufgetrennten Neurofibromins (Abbildung 13 C) lässt sich jedoch unabhängig von den Mengen der Proteine erkennen, dass das Neurofibromin der NFS4 Zellen eine etwas kleinere molekulare Masse hat. In Verbindung mit der ausbleibenden Erkennung durch einen C-terminalen Anti-Neurofibromin Antikörper (Abbildung 13 D) liegt die Vermutung nahe, dass der C-Terminus des

Neurofibromins der Neurofibrosarkomzellen verändert und das Gesamtprotein dadurch verkürzt ist. Möglich wäre daher, dass ein initiierender Faktor zur Tumorgenese in NF1 das Fehlen nicht des gesamten, sondern des funktionsfähigen C-Terminus des Neurofibromins ist. Um diese These zu prüfen, müssten jedoch viele Neurofibrosarkome verschiedener Patienten auf funktionslose C-Termini untersucht und durch eine jeweilige Proteinsequenzierung geprüft werden, ob nicht weitere Veränderungen im Neurofibromin der Neurofibrosarkomzellen vorliegen. Für die Untersuchungen dieser Arbeit war die Erkenntnis ausreichend, dass in den NFS4 Zellen kein unverändertes Neurofibromin vorlag, da diese Zellen nur als Beispielsystem von NF1 Tumorzellen und deren Transduzierbarkeit dienten.

Die Fähigkeit der NFS4 Zellen gut zu migrieren, zeigt, dass Neurofibrosarkome leicht streuen und Metastasen bilden können. Nebesion und Mitarbeiter konnten in Mäusen zeigen, dass LPA (Lysophosphatidic acid) behandelte *NF1*-/- Schwannzellen stärkere Migration zeigen als *NF1*+/+ Schwannzellen [88]. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Neurofibrominmenge und der Migrationsfähigkeit von Schwannzellen wurde von Huang und Mitarbeitern durch Tests in *NF1*-/-, *NF1* +/- und *NF1*+/+ Schwannzellen beschrieben [52]. Migrationsfähigkeit von adhärenten Zellen wird in der Literatur mit dem Anheften und Ablösen von Zellen am Untergrund in Verbindung gebracht, was an dieser Stelle die Frage aufwirft, ob Neurofibromin die Stärke der Zelladhärenz direkt beeinflusst. In diesem Fall würden *NF1* haploinsuffiziente Zellen weniger stark adhärieren als Vergleichszellen einer gesunden Kontrollperson. Kombiniert man eine verstärkte Migrationsfähigkeit von *NF1*-/- Neurofibrosarkomzellen mit den Expressionsanalysen der NSF4 Zellen ergibt sich, dass der C-Terminus des Neurofibromins relevante Funktionen in der Anheftungsfähigkeit von Zellen haben könnte.

Im Verlauf der Arbeit wurden die zunächst angedachten Migrationsversuche zur Auswertung der Effekte von transduziertem Neurofibromin verworfen. Der Grund hierfür lag bei Boyden Kammer Versuchen an der Ungenauigkeit der Auswertung. Da durch Boyden Kammern migrierte NFS4 Zellen nicht immer den Boden der Zellkulturplatte erreichten, sondern teilweise nach der Migration am Boden der Kammern weiterwuchsen, konnten exakte Bestimmungen der Anzahl migrierter

Zellen nicht durchgeführt werden. Versuche zur Migration durch PDMS Nanotunnel konnten zwar genau quantifiziert werden, sind versuchsbedingt jedoch nur an wenigen Zellen durchführbar. Die später etablierten Versuche zur Ausrichtungsverschlechterung *NF1* haploinsuffizienter Fibroblasten eröffneten die Möglichkeit, einen zellulären Phänotyp an vergleichsweise hohen Zellzahlen zu untersuchen. Daher wurde zu Gunsten der Messung der Zellausrichtung an Nanotopografien auf Untersuchungen zur Veränderung der Migrationsfähigkeit der NFS4 Zellen verzichtet.

4.2 Transduktion eines fluoreszenzmarkierten Anti-Aktin Antikörpers (AAF) in lebende Zellen

Bei den anfänglichen Transduktionsversuchen stand im Vordergrund, funktionell aktives Protein in lebende Zellen einzuschleusen. Als Beispielprotein wurde ein Anti-Aktin Antikörper mit FITC-Markierung (AAF) gewählt. Die Vorteile lagen in der Tatsache, dass das zu erwartende Fluoreszenzmuster der Aktin-Färbung recht klar zu bestimmen ist und dass davon auszugehen war, dass eine effektive Färbung des Aktinskeletts nur zustande kommen würden, wenn die relativ labile Zusammensetzung des Antikörpers durch die Transduktion nicht zerstört werden würde. So wäre bei einer erfolgreichen Transduktion des AAF ein vergleichbares Fluoreszenzmuster zu einer direkten Färbung von NFS4 Migr Zellen mit diesem Antikörper (siehe Abbildung 14) zu erwarten gewesen. Die Versuche mit den Reagenzien Chariot und Saint-PhD führten jedoch zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Die erreichten FITC-Signale in den Zellen mit Saint-PhD waren nicht spezifisch. Punktförmige Signale konnten an Positionen mit als auch an Positionen ohne Zellen detektiert werden. Zudem waren die Signale ausnahmslos punktförmig. Auch die Signale, die mit Zellen kolokalisierten, waren nicht eindeutig bestimmbar, daher blieb die Frage einer intrazellulären Lokalisation ungeklärt. Die Verwendung des Chariot-Reagenz erbrachte zwar Signale, die sehr viel spezifischer mit Zellen kolokalisierten, doch waren diese selten, punktförmig und oftmals an den Zellrändern zu finden (Abbildung 14 B), was für eine Anlagerung an, aber nicht für eine Aufnahme in die Zellen spricht. Nach diesen anfänglichen Versuchen musste davon ausgegangen werden, dass mithilfe dieser Reagenzien keine zufriedenstellende Transduktion des AAF in die NFS4 Zellen durchgeführt

werden konnte. Spätere, sehr erfolgreiche Transduktionsversuche mit neu bestelltem Chariot-Reagenz zeigten, dass zumindest bei diesem Reagenz eine Überschreitung der Mindesthaltbarkeit als Grund für den anfänglichen Misserfolg der Transduktion angenommen werden kann.

4.3 Transduktionen mit Proteoducin

Die Grundidee des Transduktionsreagenz Proteoducin liegt in der Vielfalt genutzter CPPs. Die Entwickler machten sich den Fortschritt in der Entwicklung der zellpenetrierenden Peptide (CPPs) zu Nutze, indem sie einen CPP-Cocktail aus verschiedenen CPPs bereitstellen. Durch die gleichzeitigen verschiedenen Ansätze soll eine einfache Transduzierbarkeit möglichst vieler verschiedener Zelltypen erreicht werden.

Die Verwendung des Atto488-BSAs brachte den großen Vorteil der Verwendung eines Atto Fluoreszenzfarbstoffs anstatt des FITC, da Atto488 bedeutend weniger stark ausbleicht als FITC. Dies sollte sich in späteren Versuchen als wichtiger Punkt erweisen. Zudem konnte das im Trockenzustand gelieferte Atto488-BSA in hochreinem Wasser gelöst werden, was die Anwendbarkeit *in vitro* deutlich erhöhte, da keine aufwendigen und verlustreichen Aufreinigungen und Pufferwechsel durchgeführt werden mussten. Antikörpern (wie auch bei dem verwendeten AAF) wird meist Natriumazid beigefügt, um mikrobielles Wachstum zu unterdrücken. Dies ist jedoch ebenfalls *in vitro* für andere Zelltypen toxisch und muss daher entfernt werden. Pufferwechsel über Dialyseschläuche oder Proteinkonzentrationssäulen sind langwierig und meist mit nicht geringem Verlust von Protein verbunden.

Die Transduktion von Atto488-BSA gelang in NFS4 Migr Zellen, doch konnten in den Zielzellen ausschließlich punktuelle Signale detektiert werden, was nicht der Erwartung entsprach. BSA ist ein Protein mit vergleichsweise hohem Molekulargewicht (67kDa) und sollte innerhalb der humanen Zellen kein spezifisches Atto488 Muster generieren. Daher wäre ein diffuses, zytoplasmatisches Atto488 Signal bei erfolgreicher Einschleusung des Atto488-BSAs in die Zellen zu erwarten gewesen. Die punktuellen Signale befinden sich innerhalb der Zellen, was zunächst durch mikroskopische Untersuchung mit

100facher Vergrößerung und später durch konfokale Mikroskopie bestätigt werden konnte. Weitere Transduktionen mit dem vorher verwendeten AAF und dem 240kDa großen R-Phycoerythrin bestätigten, dass verschiedene Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts durch das neu gewählte Transduktionsreagenz Proteoducin in die NFS4 Migr Zellen eingeschleust werden konnten. Die vermutete Lokalisation der eingeschleusten Proteine in Endo- und Lysosomen konnte durch eine parallele Färbung von Organellen mit niedrigem pH-Wert (späte Endosomen und Lysosomen) bestätigt werden. Auch konnte festgestellt werden, dass eine Inkubation von NFS4 Migr Zellen mit größeren Mengen Atto488-BSA zu stärkeren Atto488 Signalen in den Zellen führte, was eine Korrelation zwischen der eingesetzten Menge einzuschleusenden Proteins und der tatsächlich in den NFS4 Migr Zellen eingeschleusten Proteine impliziert. Zusätzliche Versuche zur Einschleusung von Atto488-BSA in Fibroblasten, *NF1* haploinsuffizienten Fibroblasten, Melanozyten und HEK Zellen zeigten, dass die Transduktion nicht auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt ist. Zu diesem Zeitpunkt lag daher ein System zur Einschleusung von Proteinen in lebende Zellen *in vitro* vor, das in der Lage war, fluoreszenzmikroskopisch erkennbare Mengen von Proteinen in verschiedene Zellen einzuschleusen. In Veröffentlichungen zur Einschleusung von DNA, RNA, PNA, Peptiden und Proteinen mithilfe von CPPs wird der Aufnahmemechanismus von CPPs in Zellen kontrovers diskutiert. Während ein Teil der Forscher eine direkte Translokation der CPPs und ihrer Fracht durch die Zellmembran vermutet [122], wird in anderen Publikationen von einer Einschleusung über endosomale Aufnahme ausgegangen [121]. Als Beweis für erstere Meinung werden Versuche mit Inhibierung der endosomalen Aufnahme (beispielsweise durch Kühlung der Zellen auf 4°C) herangezogen, die dennoch zu Signalen innerhalb der Zielzellen führten. Die zweite Meinung wird primär durch Wiederholung verschiedener Versuche im live cell imaging gestützt. Hier konnte gezeigt werden, dass einige der Aufnahmen von CPP-vermittelter Fracht Artefakte waren, die durch Fixierung der Zellen zustande kamen [104]. Die Atto488-BSA Moleküle, die durch Proteoducin in die NFS4 Migr Zellen eingeschleust wurden, befanden sich nachweislich in endolysosomalen Vesikeln. Die endolysosomale Aufnahme von Proteinen führt jedoch nicht zu deren Freisetzung ins Zytoplasma, sondern zum lysosomalen Abbau in Aminosäuren oder sehr kleiner Peptide, die dann ihrerseits ins Zytoplasma transferiert werden und als Ressource für die

Zellen genutzt werden. Für Makropinozytose bzw. Endozytose durch Caveolae wird angenommen, dass ein Teil der entstehenden Vesikel keine Acidifizierung erfährt und der Inhalt dieser Vesikel teilweise zu anderen Organellen (hauptsächlich zum Golgi-Apparat) oder zu anderen Zellen (Transzytose) geleitet wird. Die Gegenfärbung der späten Endosomen und Lysosomen durch den für Organellen mit niedrigem pH-Wert hoch spezifischen Lysotracker Red (Life Technologies) in Atto488-BSA transduzierten NFS4 Migr Zellen führte zu punktuellen Signalen, die entweder reine Atto488 Signale waren oder Mischsignale, welche eine Kolokalisation des Atto488-BSA mit Endosomen darstellen. Reine Atto488 Signale sind daher entweder frühe Endosomen, deren pH-Wert noch im nahezu neutralen Bereich ist oder es handelt sich um Makropinosomen oder Caveosomen, die nicht angesäuert werden. Atto488 ist nicht pH-sensitiv in einem Bereich von pH 2 bis pH 11, daher wird die Fluoreszenz dieses Farbstoffes in den verschiedenen Zellorganellen nicht beeinflusst. Zu einer Freisetzung des Atto488-BSAs ins Zytoplasma der NFS4 Migr Zellen in fluoreszenzmikroskopisch detektierbaren Mengen kam es jedoch nicht. Für den Ersatz mangelnden Neurofibromins in *NF1* haploinsuffizienten oder -defizienten Zellen war dieses System der Einschleusung daher nicht geeignet, da neben der Einschleusung die adäquate intrazelluläre Lokalisation des eingeschleusten Proteins gewährleistet werden muss. Folgend mussten weitere Transduktionssysteme auf Einschleusung ohne endolysosomale Speicherung in Zellen getestet werden.

4.4 Transduktion von Atto488-BSA in NFS4 Migr Zellen mit unterschiedlichen Transduktionsreagenzien

4.4.1 Die verschiedenen Systeme

Kommerziell erhältliche Reagenzien zur Transduktion von Proteinen können in 4 Kategorien unterteilt werden: CPP-vermittelte, Lipid-vermittelte, Peptid (kationisch) -vermittelte und endosomolytische Reagenzien. Abgesehen von dem hier getesteten Reagenz Endo-Porter als Beispiel eines endosomolytischen Reagenz ist der Grundmechanismus bei allen Reagenzien vergleichbar. Ob nun an CPPs oder Peptide non-kovalent gebunden oder in Lipidvesikel verpackt, sorgt das (meist stark) positiv geladene Reagenz für einen Transport zur Zelloberfläche und

dort oftmals zu einer Bindung an Proteoglykane [46, 84, 93]. Es folgt eine endosomale Aufnahme der Reagenz-gekoppelten Proteine. Meist werden weitere Prozeduren wie Veränderungen der Calciumkonzentration oder Koinkubationen mit Chloroquin oder Wortmannin genannt, die durch direkte Membranpenetration oder durch Fusion mit Membranen (Lipid-Vesikel) zu einer Translokation der Fracht ins Zytoplasma führen sollen [25, 115, 117].

4.5 Endosomale Lokalisation

Obwohl bei den meisten der kommerziellen Transduktionsreagenzien nicht nur eine Einschleusung der Proteinfracht in die Zellen, sondern auch eine Translokation dieser Fracht ins Zytoplasma der Zellen beschrieben wird, konnten bei keinem der getesteten CPP- (Proteoducin, Chariot), Lipid- (ProJect, PROTEOfectene, Pro-DeliverIN, Lipodin-Pro) oder Peptid-basierenden (TransPassP, TurboFect) Transduktionsreagenzien wesentliche, zytoplasmatische Atto488 Signale nach Transduktion mit Atto488-BSA detektiert werden. Es konnten ausschließlich endolysosomale Signale erkannt werden. Einzig nach Transduktionen mit dem endosomolytischen Reagenz Endo-Porter konnten neben den punktuellen auch schwache, diffuse zytoplasmatische Atto488 Signale ausgemacht werden. Das bedeutet, dass nur durch Endo-Porter neben einer endosomalen Aufnahme zusätzlich eine zytoplasmatische Translokation der eingeschleusten Proteine in ausreichender Menge stattfand, um fluoreszenzmikroskopisch erkannt werden zu können.

4.6 Die Effizienz der Proteintransduktionen

4.6.1 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden Transduktionsversuche mit Proteoducin, Endo-Porter, und TurboFect mehrfach (n= 2-5) wiederholt. Aufgrund der hohen Kosten der Transduktionsreagenzien wurde darauf verzichtet, Mehrfachtests mit allen Reagenzien durchzuführen, da sich bei den 3 überprüften Reagenzien nur geringe Variationen in den Ergebnissen ergaben.

4.6.2 Allgemein hoher Prozentsatz transduzierter Zellen

Der allgemein hohe Prozentsatz der Atto488 positiven Zellen nach Transduktion mit Atto488-BSA durch verschiedene Reagenzien ist zunächst überraschend. Da dieser jedoch zunächst unabhängig von der Stärke der Signale ermittelt wurde, wird hier tatsächlich nur erfasst, ob eine Zelle Atto488 positiv oder negativ ist. Der sehr vergleichbare Prozentsatz positiver NFS4 Migr Zellen über nicht weniger als 9 verschiedene Reagenzien legt nahe, dass der Aufnahmemechanismus, der zur Einschleusung der Proteine genutzt wird, derselbe oder sehr ähnlich ist. Es muss zu diesem Zeitpunkt daher davon ausgegangen werden, dass durch alle Reagenzien eine endosomale Aufnahme in die NFS4 Migr Zellen induziert wurde.

4.6.3 Unterschiede in der Toxizität

Die Toxizität der Atto488-BSA Transduktionen mit verschiedenen Transduktionsreagenzien wurde durch Färbung der behandelten Zellen mit Propidiumiodid (PI) und anschließender Zählung PI-positiver Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. PI färbt die DNA der Zellen, aber wird von intakten Zellen nicht aufgenommen. Erst zu einem späten Zeitpunkt der Apoptose und bei nekrotischen Zellen kann PI in die Zellen eindringen [66]. Der Zeitpunkt der Messung wurde auf 1-3 Stunden nach Ende der Transduktion festgelegt. Daher fanden die Messungen zur Toxizität der verschiedenen Reagenzien circa 24 Stunden nach Beginn der Transduktion der Zellen statt. Effekte früher Apoptose können durch PI nicht detektiert werden, finden jedoch (abhängig von der jeweiligen Behandlung der Zellen) innerhalb der ersten Stunden einer Apoptoseauslösung statt [4].

Zunächst fällt bei den Messungen der Toxizität auf, dass der Grundlevel Propidiumiodid (PI)-positiver Zellen an unbehandelten Kontrollzellen sehr hoch ist. Dies lag an der rigiden Behandlung der Zellen aus Trypsinieren, mehrfachem exzessiven Waschen und Zentrifugieren der NFS4 Migr Zellen, um eventuelle extrazellulär anhaftende Proteine zu entfernen. NFS4 Migr Zellen, die ausschließlich trypsiniert und PI gefärbt wurden, befanden sich mit 3-5% nekrotischer Zellen im erwarteten Normalbereich. Eine toxische Wirkung des Atto488-BSA konnte durch eine Inkubation der NFS4 Migr Zellen ohne Transduktionsreagenz ausgeschlossen werden. Auch die Mehrzahl der Reagenzien führte nach vollständigen Transduktionen zu keiner Erhöhung der

Anzahl PI positiver Zellen. Ausschließlich das Lipid-basierte Reagenz ProJect und beide getesteten Peptid-basierten Reagenzien (TransPassP und TurboFect) führten zu erheblichen Steigerungen PI positiver Zellen. Daraus lassen sich 2 Schlüsse ziehen: 1) diese Reagenzien sind per se toxisch für die Zellen oder 2) diese Reagenzien schleusen so viel Atto488-BSA in die Zellen, dass dieses selbst toxisch wird. Es bleibt zu erwähnen, dass im Zusammenhang der Toxizitätsmessung durch die Propidiumiodid-Färbung nur Effekte geprüft wurden, die zum Absterben der Zellen führen. Andere Aspekte, wie eine Verringerung der Proliferationsrate wurden nicht überprüft.

4.6.4 Menge des transduzierten Proteins

Die Menge der transduzierten Proteine wurde mit zwei unterschiedlichen Messverfahren bestimmt. Zum einen wurden Zellen in Multiwellplatten kultiviert, transduziert und schließlich die Emission der Lysate dieser Zellen bei Atto488-spezifischer Anregung gemessen. Zum anderen wurde die Stärke des Atto488-Signals einzelner transduzierter Zellen in einem Durchflusszytometer bestimmt. Beide Verfahren bieten Vorteile. So können bei der Bestimmung der Lysatfluoreszenz relativ einfach hohe Versuchswiederholungen erzielt werden, während die Messung der Einzelzellen ein deutlich genaueres Messverfahren darstellt, das nicht durch Störanfälligkeit von Pipettieren und Zellzählung beeinflusst wird. Die Lysatmessungen ergaben, dass –von kleineren Schwankungen abgesehen- die CPP-basierten Reagenzien Proteoducin und Chariot zusammen mit dem Lipid-basierten ProJect die stärksten Atto488-Signale in den Lysaten der transduzierten Zellen hervorrufen. Dies wurde durch die Messung der Einzelzellen bestätigt. In beiden Messverfahren kann gezeigt werden, dass eine reine Inkubation mit Atto488-BSA ohne Transduktionsreagenz zu extrem geringen Signalen in den Zielzellen führt, was bedeutet, dass nur sehr geringe Mengen an Atto488-BSA ohne Reagenz aus dem Kulturmedium in die Zellen aufgenommen werden. Betrachtet man die Ergebnisse der verschiedenen Messmethoden genauer, erkennt man, dass sich bis auf den Messwert der Fluoreszenz nach ProJect vermittelter Atto488-BSA Transduktion die Ergebnisse sehr ähneln. Der starke Unterschied in den Fluoreszenzmessungen der Lysate und der Einzelzellen nach ProJect vermittelter Atto488-BSA Transduktion ist möglicherweise auf die Kombination vieler toter Zellen (PI positiv) und starken Atto488-Signalen zurückzuführen. Hier könnte es in den Messungen der

Einzelzellen zu Nebensignaleffekten (crosstalk) gekommen sein. In diesem Fall wäre das Atto488 Signal durch das starke PI Signal möglicherweise verstärkt detektiert worden, was den unpassend hohen Atto488-Wert bei Messungen der Einzelzellen erklären könnte.

Die erhöhte Toxizität durch ProJect-, TransPassP- und TurboFect-vermittelte Atto488-BSA Transduktion ist nach diesen Ergebnissen kein Effekt erhöhter Mengen transduzierter Proteine, da die CPP-vermittelten Transduktionen viel Protein in die Zellen einschleuste, aber keine toxischen Effekte auslöste.

Final kann festgehalten werden, dass CPP-vermittelte Atto488-BSA Transduktion im Test zu hohen Prozentzahlen transduzierter Zellen mit hohen Mengen an transduziertem Protein bei nahezu nicht vorhandener Toxizität führte. Die Transduktion mit dem endosomolytischen Reagenz Endo-Porter führte zwar zu geringeren Mengen von Atto488-BSA in den Zielzellen, jedoch als einzig getestetes Reagenz zu visuell detektierbaren Mengen von Atto488 im Zytoplasma der Zellen. Die großen Mengen endosomal eingeschlossenen Proteins stellten das nächste Problem dar, das es zu überwinden galt.

4.6.5 Freisetzung endosomal eingeschlossener Proteine

4.6.5.1 Chloroquin

Chloroquin wird *in vitro* als Mittel zur Anhebung des pH-Wertes intrazellulärer Organellen wie Endosomen und Lysosomen eingesetzt. Hierzu werden meist Konzentrationen von mehr als 150µM eingesetzt, was zu einer Akkumulation von Konterionen in den Endo- und Lysosomen führt. Dies bewirkt ein Anschwellen und schließlich ein Aufplatzen der Organellen. Inkubationen mit Chloroquin über 4 Stunden Dauer wirken jedoch *in vitro* in Zellen selbst bei niedrigen Konzentration sehr zytotoxisch [21]. Dies deckt sich mit den eigenen Ergebnissen. Die sehr hohen Raten toter Zellen machten eine Verwendung von Chloroquin obsolet, da sich die Proteintransduktionen durch Transduktionsreagenzien nur über längere Zeiträume durchführen lassen. Eine reduzierte Aufnahme von Liposomen in COS-7 und HUVEC konnte in Zellen nach Inkubation mit hohen Chloroquinkonzentrationen beobachtet werden [53]. Transduktionen in NFS4 Migr Zellen, die mit einer Chloroquin Koinkubation durchgeführt wurden, zeigten

ebenfalls schwächere Fluoreszenzsignale. Aufgrund dieser Befunde wurde auf weitere Versuche mit Chloroquin zur Überwindung der endosomalen Speicherung verzichtet.

4.6.5.2 Koinkubation mit TAT-HA2

Für den 20 Aminosäuren langen N-terminalen Bereich des Influenza Hemagluttinin2 (HA2) wird eine endosomolytische Funktion beschrieben [48, 82]. Fusionspeptide aus dem CPP TAT und HA2 sind jedoch in der Lage, von Zellen endosomal aufgenommen zu werden und die endosomale Speicherung (teilweise) zu überwinden [121]. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Koinkubation von TAT-HA2 zusammen mit CPP-vermittelter Transduktion von Venus (verbessertes gelb fluoreszierendes Protein (YFP)) zu einer Translokation der Venus-Signale von punktuellen, endosomalen zu diffusen, zytoplasmatischen Signalen führt. Die Koinkubationen von Proteoducin-vermittelter Atto488-BSA Transduktion und 10µM TAT-HA2 führten jedoch zu keinen Veränderungen der Atto488-Signale. Es konnten weiterhin ausschließlich punktuelle, endosomale Signale detektiert werden. Der Grund hierfür bleibt unklar. Möglich wäre eine unvollständige Lösung des kommerziell erhältlichen TAT-HA2 Fusionspeptids. Auch ein Abbau des Peptids in Lösung vor der Anwendung wäre theoretisch denkbar. Zu Gunsten der PCI-Behandlung wurde auf weitere Untersuchungen des TAT-HA2 Fusionspeptids verzichtet. Da parallel mit Versuchen zur photochemischen Internalisierung (PCI) begonnen wurde, die schnell zur gewünschten Freisetzung endosomal gespeicherter, transduzierter Proteine führte, wurden die Versuche mit TAT-HA2 Koinkubationen eingestellt.

4.7 Photochemical internalization (PCI)

4.7.1 Die PCI Lampe

Zur Konzeption der PCI Lampe trugen Beschreibungen ähnlicher genutzter Lampen in der Literatur bei. Wichtig war, dass im Handel erhältliche Leuchtröhren (Osram L 18W/67) zur Anregung der Photosensitizer $TPPS_{2a}$ und $TPPS_4$ beschrieben wurden. Zudem war die Verwendung mehrerer parallel geschalteter Leuchtröhren beschrieben, um eine gleichmäßige Belichtung zu gewährleisten [8]. Aus eigenen Überlegungen wurden die Verstellbarkeit in der Höhe der Lichtquelle

und ein Dimmer zur Regulierung der Lichtstärke hinzugefügt. Beides dient dazu, die Intensität des Lichts zu regulieren, das die Zellen erreicht. Die Messungen der Lichtintensitäten wurden nach Bau der Lampe durchgeführt, um zu überprüfen, wie stabil die ankommenden Intensitäten über die möglichen Positionierungen für Zellen sind. Erwartungsgemäß blieben die Intensitäten in Längsrichtung zu den Leuchtröhren stabiler als in orthogonaler Richtung. Zudem war sowohl die Intensität als auch die -stabilität zwischen Röhre 2 und 3, also in der Mitte der 4 Leuchtröhren, am höchsten. Für künftige PCI-Versuche war daher darauf zu achten, dass die Chamberslides oder Zellkulturplatten längs ausgerichtet im mittleren Bereich der Lampe platziert wurden. So konnte eine relativ gleiche Belichtung aller Zellen eines Versuchs gewährleistet werden.

4.7.2 Abhängigkeit zwischen Photosensitizerkonzentration, Lampenstärke und PCI-Effekt

Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration des Photosensitizers $TPPS_4$ direkten Einfluss auf die Stärke des PCI-Effektes, also die Freisetzung der endosomal gespeicherten Proteine, hat. Eine Reduktion des $TPPS_4$ führte bei konstanter Belichtungsdauer der Zellen zu einer reduzierten Verteilung der vorher punktuellen Atto488-Signale. Dies spricht dafür, dass bestimmte Mengen an reaktiven Sauerstoffen nötig sind, um Endo- bzw. Lysosomen stark genug zu destabilisieren, um die transduzierten Proteine freizusetzen. Weiter konnte durch direkte Beobachtung der PCI an verschiedenen Invertfluoreszenzmikroskopen erkannt werden, dass die Stärke der Belichtung der Zellen ebenfalls direkten Einfluss auf die Stärke des PCI-Effektes zu haben scheint. So tritt die Freisetzung der transduzierten Proteine an einem neueren Mikroskop mit einer HBO 100 Lampe für die Anregung fluoreszierender Stoffe schneller auf, als bei exakt gleich behandelten Zellen, die die Anregung des Photosensitizers an einem älteren Mikroskop mit einer HBO 50 Lampe erhielten. Daher scheint nicht die an den Zellen (bzw. dem Photosensitizer) ankommende Leistung der Lampe (mW/cm^2), sondern die ankommende Energie (J/cm^2) entscheidend für die Produktion ausreichender Mengen an reaktiven Sauerstoffen und damit der Destabilisierung der Endo- und Lysosomen zu sein. Die geringere Leistung schwächerer Lampen kann daher durch eine längere Belichtung kompensiert werden.

4.7.3 PCI an unterschiedlichen Zelltypen

Ob die PCI an verschiedenen Zelltypen vergleichbar gut funktioniert, wurde an NFS4 Migr Zellen, Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen, Fibroblasten von NF1-Patienten und HEK-Zellen überprüft. In allen Zelltypen konnte bei gleicher Behandlung mit $TPPS_4$ eine Translokation transduzierten Atto488-BSAs von punktuellen, endosomalen zu diffusen, zytoplasmatischen Signalen erreicht werden. Dies spricht dafür, dass in Zellen, die Formen der Endozytose betreiben, um transduzierte Proteine aufzunehmen, die PCI zur Freisetzung dieser Proteine durchführbar ist. Da die verschiedenen Formen der Endozytose der wichtigen Aufnahme verschiedenster Stoffe von außen in die Zelle dienen, ist davon auszugehen, dass nahezu alle Zellen durch eine PCI behandelbar sind.

4.7.4 Toxizität der PCI

Höhere Konzentrationen an $TPPS_4$ führen bei gleicher Belichtungsdauer zu höheren toxischen Effekten. Dies deckt sich mit der Erkenntnis, dass der PCI-Effekt schlussendlich der Produktion der reaktiven Sauerstoffe (ROS) durch Anregung des Photosensitizers geschuldet ist. Als Methode, die vom Verfahren „photodynamic treatment“ abgeleitet wurde, ist die PCI eine Anwendung, die starken Regularien unterliegt. Photodynamic treatment (PDT) bezeichnet eine Behandlung, die eine Inkubation mit großen Mengen von Photosensitizern an Zellen bzw. Geweben vorsieht, um diese dann durch starke Belichtung zur Produktion großer Mengen an reaktiven Sauerstoffen anzuregen. Dies destabilisiert in der Folge die Zytoplasmamembran der Zellen oder führt zur Initialisierung von Nekrose und Apoptose in diesen Zellen. Sowohl Zeitpunkt und Dauer der Lichtapplikation als auch Menge und Zeitpunkt der Inkubation mit dem Photosensitizer bestimmen darüber, ob durch eine PCI die Endo- und Lysosomen oder durch ein PDT ganze Zellen destabilisiert werden. Höhere Konzentrationen des Photosentizers führen bei gleicher Belichtungsdauer zu einer höheren Menge an produzierten reaktiven Sauerstoffen. Es sollte daher theoretisch ein Punkt erreichbar sein, an dem die Pufferfähigkeit der PCI behandelten Zellen für reaktive Sauerstoffe erreicht ist. Wird dieser Punkt überschritten, wird die Behandlung der behandelten Zellen toxisch. Eben dies konnte für NFS4 Migr Zellen und Fibroblasten gezeigt werden. Bleibt man unter dieser kritischen Grenze, ist die PCI-Behandlung für die untersuchten Zellen ein Stressfaktor, der jedoch nicht zu einer Erhöhung der Anzahl toter Zellen in der PCI-behandelten Kultur führt.

Das PCI Protokoll wurde so gewählt, dass die Zellen mit 1µg/ml $TPPS_4$ für 20 - 24 Stunden inkubiert wurden. Die folgende ca. 20stündige Transduktion wurde ohne $TPPS_4$ durchgeführt. Dies bedeutet, dass durch die verzögerte Belichtung (ca. 20 Stunden nach dem letzten Kontakt der Zellen mit frischem $TPPS_4$) davon auszugehen ist, dass die Menge an $TPPS_4$ in der Plasmamembran der Zellen zum Zeitpunkt der Belichtung gering ist. Im näher untersuchten Beispiel kann bei diesem Protokoll festgestellt werden, dass sich zwar genug $TPPS_4$ in den Membranen der Endo- und Lysosomen befand, um diese zu destabilisieren, die verbliebene Menge $TPPS_4$ in der Plasmamembran jedoch nicht ausreichte, um die gesamten Zellen zu töten. Die Tatsache, dass der Anteil toter Zellen auch 48 Stunden nach Belichtung der Zellen nicht anstieg, zeigt, dass durch dieses spezielle Protokoll der PCI weder direkter Zelltod durch Destabilisierung, noch Induktion der Apoptose stattfand. Es konnte gezeigt werden, dass die PCI zu Expressionsunterschieden unter anderem in Genen für Hitzeschockproteine führt [98-99]. Diese wirkten sich jedoch nicht innerhalb der ersten 48 Stunden auf die Raten toter Zellen aus.

4.7.5 PCI nach Atto488-BSA Transduktion mittels verschiedener Transduktionsreagenzien

Die Freisetzung der endosomal gespeicherten, transduzierten Atto488-BSA Moleküle durch PCI funktionierte nicht einheitlich gut bei Transduktion mit verschiedenen Transduktionsreagenzien. Bei CPP-vermittelter Transduktion konnte die größte Translokation von punktuellen hin zu zytoplasmatischen Signalen durch eine PCI beobachtet werden. Auch der bereits vorhandene endosomolytische Effekt durch Endo-Porter Transduktion wurde deutlich verstärkt. Die PCI nach Lipid-vermittelter Atto488-BSA Transduktion führte zu weniger starken Translokationen der transduzierten Proteine. Wurde die Transduktion jedoch durch (kationische) Peptide durchgeführt, konnte durch eine PCI-Behandlung keine Freisetzung der Proteine ins Zytoplasma erreicht werden. Der verringerte Effekt bei Lipid-vermittelter Transduktion ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass endosomal aufgenommene Lipid-Transportvesikel zwar durch eine PCI aus den Endosomen freigesetzt werden können, die Proteine jedoch in den Transportvesikeln verbleiben und daher auch weiterhin als punktuelle Signale detektiert werden. Eine Inkubation der Transportvesikel mit $TPPS_4$ vor der Transduktion könnte zu einer simultanen Destabilisierung der

Transportvesikel und der Endosomen bei der PCI-Behandlung führen. So könnte die Translokation endosomal gespeicherter, Lipid-vermittelt transduzierter Proteine ins Zytoplasma erhöht werden. Die vollkommen ausbleibende Translokation durch die PCI nach Peptid-vermittelter Atto488-BSA Transduktion ist durch zwei Theorien erklärbar. Denkbar wäre es, dass die Peptid-vermittelte Transduktion einen Aufnahmeweg nutzt, der zu Vesikeln führt, die keinen Photosensitizer beinhalten. Da die Einlagerung des $TPPS_4$ in die Plasmamembran jedoch zufällig stattfindet, ist diese Möglichkeit als extrem unwahrscheinlich zu verwerfen. Eine wahrscheinlichere Erklärung wären sehr starke Bindungen zwischen den Peptiden, dem Atto488-BSA und Bindungspartnern der Peptide an der Zelloberfläche. Diese könnten während der endosomalen Passage erhalten bleiben. Eine Destabilisierung der Endo- und Lysosomen würde in diesem Fall zu keiner Verteilung der Proteine im Zytoplasma führen, da die Bindung an die Membran der zerstörten Endo- und Lysosomen dennoch erhalten bliebe. Die Signale wären fluoreszenzmikroskopisch nicht von Signalen in intakten Endo- und Lysosomen zu unterscheiden.

4.7.6 Kombination aus Atto488 und $TPPS_4$ als Photosensitizer

Der größte Vorteil der Verwendung von $TPPS_4$ als Photosensitizer liegt darin, dass das Anregungsspektrum dem gängiger Fluoreszenzfarbstoffe wie FITC oder GFP sehr ähnelt. Es war daher möglich, während der PCI-Behandlung zu beobachten, wie sich die Fluoreszenzsignale verändern. FITC und GFP sind jedoch Farbstoffe, die bei Anregung schnell ausbleichen. Daher konnte beispielweise der Verlauf der PCI nach Transduktion des FITC-markierten Antikörpers AAF nicht dokumentiert werden. Der Farbstoff Atto488 ist jedoch sehr stabil. Dies ermöglichte es, Live-Aufnahmen der Freisetzung des transduzierten Proteins über mehrere Minuten der Anregung aufzuzeichnen.

4.7.7 Aktivität transduzierter Proteine nach PCI-Behandlung

Durch die Transduktion einer β-Galaktosidase Untereinheit konnte einfach getestet werden, ob die PCI-Behandlung durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffen (ROS) in direkter Nähe der Proteine diese zerstört oder soweit verändert, dass sie ihre Funktion nicht mehr erfüllen können. Die β-Gal transduzierten, PCI behandelten Zellen zeigten nach Detektion der β-Gal Aktivität deutliche Aktivität der eingeschleusten Proteine. Nicht transduzierte, PCI

behandelte Zellen zeigten keine Aktivität. Die Aktivitätsprüfung der eingeschleusten β-Gal Untereinheit ist jedoch ein rein qualitatives Verfahren. Es können dadurch keine Aussagen über die Menge des funktionsfähigen Proteins getroffen werden. Bisher gibt es keine Aussagen darüber, ob die Menge von funktionsfähigem Protein durch eine PCI reduziert wird. Eine Präzipitation zuvor in Zellen eingeschleuster Luciferasen mit und ohne PCI gefolgt von quantitativen Messungen der Luciferase-Aktivität wäre beispielsweise eine Möglichkeit, diese Frage zu beantworten.

Ob sich die Ergebnisse des β-Gal-Transduktionsversuchs auf transduziertes Neurofibromin übertragen lassen, ist nicht gesichert, da es sich bei synNF1 um ein Protein mit circa dreifachem Molekulargewicht mit spezifischen posttranslationalen Modifikationen verglichen zur transduzierten Untereinheit der β-Galaktosidase (119kDa) handelt. Die zumindest teilweise Erhaltung der β-Gal Aktivität nach einer PCI-Behandlung könnte durch die Beschaffenheit des $TPPS_4$ zu erklären sein. Tetraphenylporphyrine (TPP) sind stark hydrophob und daher nicht wasserlöslich. Durch die Sulfonierung der TPP wird eine gewisse Wasserlöslichkeit erreicht, die eine Inkubation von Zellen durch $TPPS_n$ im Kulturmedium ermöglicht. Berg und Mitarbeiter konnten zeigen, dass $TPPS_4$ nach Zellinkubation hauptsächlich in lysosomalen Kompartimenten nachzuweisen ist [9]. $TPPS_4$ lagert sich in den Membranen der Endo- und Lysosomen ein. Die transduzierten Proteine befinden sich jedoch in wässriger Lösung und daher ausschließlich im Lumen. Selbst wenn zu diesem Zeitpunkt eine mögliche Bindung an Proteoglykane über die CPPs noch nicht gelöst wurde, besteht dennoch eine räumliche Trennung zu den in der Membran verankerten Photosensitizern (siehe auch [7]). Die relativ kurze Reichweite der ROS scheint nicht auszureichen, um wesentliche Mengen der transduzierten Proteine zu zerstören. Die im Menschen zur photodynamischen Therapie (PDT) verwendeten Photosensitizer sind größtenteils Derivate von TPP, die sich durch unterschiedliche Modifikationen in ihren chemischen Eigenschaften jedoch stark unterschieden können [13, 40].

Es konnte daher in einem „proof of principle“ Versuch gezeigt werden, dass eine Untereinheit der β-Galaktosidase funktionsfähig durch Transduktion und PCI in NFS4 Migr Zellen transduziert werden kann.

4.8 Synthetisch hergestelltes Neurofibromin

Expressionssysteme für rekombinante, humane Proteine sind in vielerlei Hinsicht limitiert. Expressionen transient oder stabil transfizierter Vektoren in humanen Zelllinien liefern oft nur geringe Mengen an rekombinantem Protein. Zudem ist die stabile Transfektion eine schwierige und langwierige Prozedur. Selbst nach der Generation von stabil transfizierten Zelllinien kommt es häufig vor, dass im Laufe der Kultur dieser Zellen das eingeschleuste Gen verloren geht oder die Expression ausgeschalten wird (beispielsweise durch Promotermethylierung). Leichter zu transfizieren und auch schneller in großen Mengen kultivierbar sind Bakterienzellen [65] oder Insektenzellen [125, 132], wobei letztere in posttranslationalen Modifikationen größere Ähnlichkeiten zu humanen Zellen zeigen. Aktuell ist weltweit nur die Arbeitsgruppe Scheffzek in der Lage, komplettes Neurofibromin herzustellen, was mitunter an der Größe des *NF1* Gens und der Instabilität der *NF1* mRNA liegt. Zur Stabilisierung mussten einzelne Basen ausgetauscht werden, die jedoch die Aminosäuresequenz des resultierenden Neurofibromins nicht beeinträchtigten. Durch die stabile Transfektion einer Zelllinie (SF21) aus der Motte *Spodoptera frugiperda* gelang es der AG Scheffzek ein System zur Expression mäßig großer Mengen zu etablieren, da diese Zellen in großen Maßstab kultiviert werden können. Aus einer 5 Liter Kultur dieser Zellen lassen sich ca. 15mg synNF1 isolieren. Das synNF1 ist zur Aufreinigung mit einem His-Tag modifiziert, was die Funktion des Proteins möglicherweise beeinflusst. In den Transduktionsversuchen mit synNF1 zeigte sich jedoch, dass zumindest die Ras-GAP Funktion und der Einfluss des synNF1 auf die Ausrichtung von Fibroblasten hierdurch nicht ausgeschalten wird. Dass Aufreinigungsmodifikationen wie His-Tags nicht zwangsweise die Funktion von Proteinen negativ beeinflussen konnte beispielsweise von Zhang und Mitarbeitern gezeigt werden [139]. Sie zeigten, dass rekombinante Sox2, Klf4, Oct4 und c-MYC Proteine auch als Fusionsproteine mit einer TAT-PTD-Sequenz und einem His-TAG humane Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen (IPSCs) transformieren können.

Es stellt sich die Frage, ob Neurofibromin, das in Insektenzellen exprimiert wurde, für den Einsatz in menschlichen Zellen geeignet ist. Zwar werden Proteine in Insektenzellen ähnlich modifiziert, wie in Säugerzellen, doch bleiben Unterschiede

vor allem im Glykosylierungsmuster. Daher wurde zunächst versucht, eine Überexpression von Neurofibromin in HEK-Zellen zu nutzen. Es stellte sich jedoch heraus, dass die HEK-Zellen im Laufe der Vervielfältigungen, die nötig waren, um ausreichende Mengen Neurofibromin extrahieren zu können, die Überexpression des synNF1eGFP verloren. Es wurde von der Heidelberger Arbeitsgruppe leider versäumt, dies zu überprüfen, bevor die Zellen pelletiert und uns zur synNF1 Extraktion überlassen wurden. Bedingt durch den Umzug der Gruppe nach Innsbruck verzögerte sich eine Prüfung der Zellen. Als schließlich die Vermutung bestätigt wurde, dass die Zellen ihre synNF1 Überexpression verloren hatten, war es aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich, eine Kultivierung der synNF1 stark exprimierenden Zellen durchzuführen. Daher musste auf synNF1 aus Insektenzellen zurückgegriffen werden, die bereits in Form von gefrorenen Pellets in Innsbruck vorlagen.

Als weiter modifiziertes synNF1 wurde von der Innsbrucker Arbeitsgruppe ein Fusionsprotein aus synNF1 und drei eGFPs hergestellt. Dieses Fusionsprotein wurde dazu benutzt, die Lokalisation des transduzierten Neurofibromins zu detektieren. Für Versuche zur Revertierung von *NF1* Haploinsuffizienzeffekten wurde synNF1 ohne eGFP verwendet, da nicht auszuschließen war, dass die C-terminale Addition dreier eGFPs die Funktion des Neurofibromins beeinträchtigt. Spätere Versuche mit einem TAT-synNF1eGFP Fusionsprotein zeigten, dass dieses Protein Veränderungen in der Ausrichtung an Nanotopografien von *NF1*+/- Fibroblasten weniger effektiv revertiert als transduziertes synNF1. Ob dies ein Effekt der 3 fusionierten eGFPs oder der TAT Sequenz ist, kann zurzeit noch nicht geklärt werden, da aktuell kein TAT-synNF1 Fusionsprotein ohne eGFP zur Verfügung steht.

Der limitierende Faktor für spätere mögliche Behandlungen von NF1 Patienten ist sicherlich die Menge an herzustellendem Neurofibromin. Auch wenn diese durch die stabile Transfektion der Insektenzellen bereits erheblich gesteigert werden konnte, müssten für eine Großproduktion andere Verfahren entwickelt beziehungsweise genutzt werden. Sehr interessant hierzu sind beispielsweise neue Entwicklungen zur Expression rekombinanter Proteine in in Suspension wachsenden HEK293 Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass durch ein kommerziell erhältliches Komplettsystem (Expi293™ Expression System Kit, Life

Technologies) bis über 1 Gramm pro Liter Kultur von verschiedenen Proteinen (unter Anderem menschliches IgG) hergestellt werden konnte [56]. Systeme dieser Art nutzen transiente Transfektion und sind daher nicht durch die langwierige stabile Transfektion von Zellen eingeschränkt. Durch die relativ niedrigen Materialkosten (<2 US Dollar pro Milligramm Protein), die Möglichkeit, das Ansatzvolumen zu variieren und die Möglichkeit (durch die transiente Transfektion) ohne lange Etablierungszeiten verschiedene Proteine herzustellen, sind Systeme dieser Art zukünftig möglicherweise attraktiv für die industrielle Herstellung pharmazeutisch eingesetzter Proteine.

4.9 Entwicklung eines zellulären Readoutsystems

4.9.1 Optimale Ausrichtungszeit

Es war nötig, die optimale Zeit zu ermitteln, bei der sich die unterschiedlich gute Ausrichtung von *NF1*+/+ und *NF1*+/- Fibroblasten am stärksten zeigt. Signifikante Unterschiede in der Ausrichtung auf strukturierten PDMS Gelen konnten sowohl 24 als auch 48 und 96 Stunden nach Aussaat der Zellen gemessen werden. Die Unterschiede waren 48 Stunden nach Aussaat der Zellen am stärksten. Daher wurden alle weiteren Versuche zur Zellausrichtung nach 48 Stunden ausgewertet. Es ist davon auszugehen, dass innerhalb der ersten 24 Stunden die Spreitung der Zellen noch nicht vollständig abgeschlossen und daher die Ausrichtung noch unbeständig ist. Nach 48 Stunden ist die Spreitung der Zellen sicher abgeschlossen. Die Tatsache, dass nach 4 Tagen die unterschiedliche Ausrichtung der Kontroll- und *NF1* Patientenfibroblasten abnimmt, impliziert die Möglichkeit, dass die Orientierung eine maximale Güte hat, die von Kontrollzellen schneller erreicht wird als von *NF1*+/- Fibroblasten. Es wäre auch möglich, dass zusätzlich zur Oberflächenstruktur die Bildung extrazellulärer Matrix (ECM) eine entscheidende Rolle bei der Ausrichtung der Fibroblasten spielt. Da Fibroblasten ihre eigene ECM bilden [2, 5, 74], ist es möglich, dass nach 4 Tagen die mechanosensorische Information durch die Nanotopografien von Informationen der selbst gebildeten ECM überlagert wird. Durch eine Inkubation der Fibroblasten mit niedrig dosierten Proteasen während der Ausrichtung wäre es möglich, Störungen durch die ECM Bildung zu reduzieren.

4.9.2 Unterschiede zwischen *NF1*+/+ und *NF1*+/- Fibroblasten

Um die unterschiedliche Ausrichtungsfähigkeit zwischen Patienten- und Kontrollfibroblasten zu bestimmen, ist es wichtig, die jeweiligen Zellen zu parallelisieren. Das heißt, dass die Spender in Geschlecht und Alter möglichst übereinstimmen, sich die Zellen in vergleichbaren Passagen befinden und zur selben Zeit in gleichen Zelldichten in den gleichen Kulturschränken kultiviert werden. Zudem muss getestet werden, an welchen Nanostrukturen sich die Fibroblasten am besten ausrichten können und Unterschiede im Ausrichtungsphänotyp zwischen *NF1*+/+ und *NF1*+/- Fibroblasten am besten dargestellt werden. Tests verschiedener Nanotopografien ergaben, dass diese Voraussetzungen bei parallelverlaufenden Strukturen mit einer Höhe von 200nm und einer Breite und einem Abstand von 2µm voneinander gegeben waren [59]. Selbst unter diesen Umständen zeigte sich, dass es neben dem *NF1* Status auch starke individuelle Unterschiede gibt, welche die Ausrichtungsfähigkeit sowohl bei Kontrollen als auch bei *NF1*+/- Fibroblasten beeinflusst. Dies könnte daran liegen, dass verschiedene Allele des *NF1* Gens unterschiedlich stark exprimiert sein können [51]. So ist es wahrscheinlich, dass Schwankungen in der endogenen Neurofibrominmenge in Abhängigkeit der vorhandenen *NF1* Allele interpersonell auftreten können. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass verschiedene Faktoren im Kulturmedium wie PMA, bFGF oder steel factor die Menge an Neurofibromin in Melanozyten beeinflussen kann [45]. Daher könnten interpersonelle Schwankungen in der Ausrichtung an Nanotopografien bei gleichem *NF1* Genotyp auch auf nicht exakt gleich vorkommenden Substanzen im Zellkulturmedium zurückzuführen sein. Dies kann nur innerhalb eines getesteten Paares ausgeschlossen werden, da nur einzelne Paare zeitlich synchronisiert waren. Im Mittel zeigen die Zellen der Kontrollen jedoch eine bessere Ausrichtung als NF1 Patientenfibroblasten. Der zu Beginn der Messungen verwendete Orientierungsfaktor S war der Versuch, die Abweichungswinkel in einen überschaubareren Faktor umzuwandeln, der wiederspiegelt, dass eine Ausrichtung von 45° zu den Strukturen einer Zufallsverteilung der Ausrichtungen der Zellen darstellt. Daher wurde der Cosinus des doppelten Abweichungswinkels als Orientierungsfaktor S definiert. Hierzu ist jedoch wichtig zu bemerken, dass dieser Faktor gewichtet ist und durch die Cosinusfunktion ausgerichtete Zellen stärker einbezieht als nicht ausgerichtete. Aus diesem Grunde wurde bei allen

weiteren Auswertungen der Zellausrichtung eine Versuchsausrichtung definiert, auf die die Vergleichsgruppen normiert wurden (beispielsweise die Normierung auf den Mittelwert der Abweichungswinkel unbehandelter Kontrollzellen oder eine Normierung der behandelten Zellen auf den Mittelwert der Abweichungswinkel unbehandelter Zellen). Dies ermöglichte die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Versuche mit Zellen verschiedener Spender, da die individuellen Unterschiede auf diese Art herausgerechnet wurden.

4.9.3 Problematik der Umrandung von Zellkonturen als Messmethode

Die Umrandung der Konturen von Einzelzellen zur Bestimmung der Abweichung der Fibroblasten von den Untergrundstrukturen brachte verschiedene Probleme mit sich. Zunächst ist es ein Verfahren, dass nur für Auswertungen vergleichsweise weniger Zellen geeignet ist. Dies bringt mit sich, dass Ergebnisse, die auf dieser Auswertmethode beruhen, statistisch eine nicht allzu hohe Relevanz haben. Diese Problematik ließe sich durch einen hohen Zeitaufwand relativieren. Ein anderes Problem der Zellumrandung zur anschließenden mathematischen Bestimmung der Zellausrichtung über die Scheitel der am besten passenden Ellipsen ist, dass -je nach Qualität der mikroskopischen Aufnahmen der Fibroblasten- Zellausläufer mit geringer Höhe nicht erkannt werden können. Daher werden durch eine Umrandung der Zellen teilweise nur Teile der Zellen markiert, insbesondere bei Fibroblasten mit weiten Ausläufern. Ein weiteres Problem stellt die Auswertung durch die ImageJ Software dar. In der Auswahl –also dem Bereich, der durch die Umrandung markiert wird- werden die Punkte definiert, die am Weitesten voneinander entfernt liegen. Die Verbindung dieser Punkte dient als Längsscheitel der Ellipse, die ab diesem Zeitpunkt die Zelle wiederspiegelt und ist der wichtigste Faktor zur Bestimmung der Abweichung der Zelle von den Untergrundstrukturen. Bei schmalen, länglichen und bipolaren Fibroblasten entspricht dieser Längsscheitel sehr gut der Ausrichtung der Zellen. Verfügt die ausgewertete Zelle jedoch über lange Ausläufer ist es möglich, dass eine Strecke für den Längsscheitel gewählt wird, die zwar den voneinander am Weitesten entfernten Punkten, jedoch nicht der Ausrichtung der Zelle entspricht. Aus diesen Gründen schien es erforderlich, ein alternatives Auswertverfahren zur Bestimmung von Abweichungswinkeln von Fibroblasten an Untergrundstrukturen zu entwickeln.

4.9.4 Entwicklung einer verbesserten Auswertmethode zur Bestimmung des Abweichungswinkels der Fibroblasten

Die subjektive Festlegung des Ausrichtungswinkels der Fibroblasten durch den Beobachter unter Nutzung des ImageJ eigenen Winkelwerkzeugs erhöhte den Durchsatz bei der Auswertung auf ungefähr das Dreifache. Direktvergleiche zeigten, dass zwischen Abweichungswinkeln, die durch Umrandung der Zellen bestimmt wurden und den selbstbestimmten Winkeln keine signifikanten Unterschiede zu finden waren. Dies ist jedoch nicht pauschal auf eine andere auswertende Person übertragbar, da die Bestimmung des Winkels ausschließlich durch subjektive Wahrnehmung der auswertenden Person definiert wird. Um dieses Verfahren als verlässliche Methode nutzen zu können, wäre es erforderlich gewesen, dieselben Zellen von minimal 3 Personen in Blindproben auswerten zu lassen, um den Einfluss des Auswerters eliminieren zu können. Da dies einen höheren Arbeitsaufwand als die Durchsatzerhöhung verglichen zur Zellkonturumrandung bedeutet hätte, wurde ein unabhängiges Auswertungsverfahren mit hohem Durchsatz, die Kernausrichtung der Zellen, etabliert. Hierzu wurden die Zellkerne der auf den Nanotopografien ausgerichteten Fibroblasten durch DAPI gefärbt und deren Ausrichtung durch eine automatisierte Bildauswertung bestimmt. Die durch die Kernausrichtung bestimmten Abweichungswinkel weichen um durchschnittlich +4° von den Abweichungswinkeln ab, die durch Umrandung der Zellkonturen oder subjektive Winkelmessung bestimmt wurden. Die Abweichung blieb über verschiedene Versuche konstant.

Messungen der Abweichungswinkel, die an Fibroblasten durchgeführt wurden, die auf unstrukturierten PDMS Gelen kultiviert wurden, ergaben, dass die Kernausrichtung am genauesten den erwarteten Winkel von 45° einer Zufallsverteilung erbrachte. Daher konnte die Kernausrichtung als verlässliche Methode zur Bestimmung der Abweichungswinkel von Fibroblasten an Untergrundstrukturen etabliert werden. Die Kernausrichtung bot die Möglichkeit, in einer unabhängigen Hochdurchsatzmethode die Abweichungswinkel zahlreicher Zellen zu Untergrundstrukturen zu bestimmen. Voraussetzungen hierfür sind jedoch, dass die Zellen bipolar, länglich und schmal sind. Zudem darf pro Zelle nur ein Kern vorhanden sein und dieser muss sichtbar sein, was in mitotischen Zellen nicht der Fall ist. Zusätzlich sollten die Zellkerne eine elliptische Form haben.

Diese Voraussetzungen treffen auf Fibroblasten, jedoch nicht zwangsläufig auf andere Zelltypen zu und daher kann die Kernausrichtung als Maß für die Zellausrichtung nicht pauschal für andere Zelltypen adaptiert werden. Ein Vorteil bei der Bestimmung der Zellausrichtung durch die Zellkernausrichtung liegt in der Abbildung von Kräften, die von außen auf Zellen einwirken. Diese Kräfte, wie beispielsweise Druck von außen auf die Zelle, bilden sich in der dreidimensionalen Form des Zellkerns wieder, der über das Zytoskelett mit der Zellmembran in Kontakt steht. Mechanische Verformungen der Zelle führen daher durch die Mechanotransduktion zu Verformungen des Zellkerns. Dass sich die Fibroblasten an den Untergrundstrukturen ausrichten, lässt sich nach Kernausrichtungsbestimmung gut zeigen, wenn man die Winkel der Zellen auf unstrukturierten Gelen mit denen von Zellen auf strukturierten Gelen vergleicht. Es ist klar erkennbar, dass ohne Strukturen eine relativ gleichmäßige Verteilung der Abweichungswinkel (in den Beispielen zur Horizontalen) zwischen 0 und 90° vorliegt, was zu einem Median von ca. 45° führt. Dass der zu erwartende Winkel bei einer Zufallsverteilung durch die Bestimmung des Zellkernwinkels am besten dargestellt werden konnte, könnte darauf hinweisen, dass von außen wirkende, für die Orientierung der Zelle relevante Kräfte durch den dreidimensionalen Zellkern besser dargestellt werden als durch zweidimensionale (Ober-) Fläche der Zelle, die bei der Umrandung der Kontur als Ausrichtungsmarker verwendet wird. Auf strukturierten Gelen ist der Anteil der Zellen, die sich relativ gut parallel zu den längsverlaufenden Nanotopografien ausrichten (0-30° Abweichung) stark erhöht.

4.10 Revertierung von *NF1*-Haploinsuffizienzeffekten durch Neurofibromintransduktion

Zunächst musste weiter untersucht werden, ob die verschlechterte Ausrichtung der Fibroblasten eine Folge des verringerten *NF1* Spiegel in den Fibroblasten ist, da zu diesem Zeitpunkt ausschließlich NF1 Patienten gegen *NF1*+/+ Kontrollen getestet wurden. Um eine induzierbare Verringerung der *NF1* Expression zu etablieren, wurde zunächst eine einfach zu transfizierende Prostata Adenokarzinomzelllinie (LNCaP) mit 4 verschiedenen *NF1* siRNAs transfiziert. Die *NF1* Expression konnte auf 20% herabreguliert werden. Eine siRNA Transfektion von KF3 Fibroblasten über 24 Stunden erbrachte eine deutliche Reduktion der

NF1 Expression, die durch eine Verlängerung der Inkubation auf 48 Stunden bis zu einer *NF1* Expressionssenkung auf 15% verglichen mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen gesteigert werden konnte. Die Transfektion mit Kontroll-siRNAs selbst hatte keinen Einfluss auf die *NF1* Expression. Da kommende Versuche eine bis zu 96 stündige Weiterbehandlung der Fibroblasten voraussetzte, wurde der Verlauf der *NF1* Expression nach 48 stündiger siRNA Transfektion näher untersucht. Es konnte eine langsame Regeneration der *NF1* mRNAs auf ca. 33% innerhalb von 4 Tagen nach Ende der siRNA Transfektion gemessen werden. Dies spricht für eine lange Nachwirkzeit der siRNAs, da trotz langer Transkriptions- und Translationszeiten des sehr langen *NF1* Gens eine Regeneration bei kurzer siRNA Repression der Expression nach ein bis zwei Tagen abgeschlossen sein müsste. Die Halbwertszeit von Neurofibromin beträgt ohne weitere Behandlung der Zellen ungefähr 25 Stunden [45]. Kombiniert man die abnehmende Menge des endogenen Neurofibromins, das zum Zeitpunkt des Beginns der siRNA Transfektion vorhanden war, mit der reduzierten Expression im Laufe der Zeit und der Halbwertszeit der vorhandenen *NF1* mRNA, ergibt sich im gesamten relevanten Zeitfenster (48 – 144 Stunden nach Transfektionsstart) ein Neurofibrominlevel von weniger als 50% des Normalwertes. Daher konnten die siRNA transfizierten Fibroblasten als Modelsystem für Fibroblasten mit reduzierter Menge an *NF1* mRNA und in der Folge einer reduzierten Menge an Neurofibromin verwendet werden. Durch die Verwendung dieses Ansatzes konnten interpersonelle Schwankungen der Experimente eliminiert werden. Unterschiede zwischen den Einzelzellen können jedoch nicht ausgeschlossen werden, da durch die relative Quantifizierung nur die relative Menge der *NF1* mRNA der Gesamtpopulation vieler Zellen gemessen wird. Solche Unterschiede könnten durch eine ungleichmäßige Aufnahme der siRNAs hervorgerufen werden. Da jedoch bei der Auswertung der Zellkerne der Median einer erheblichen Anzahl von einzelnen Zellkernen als Maß der Ausrichtungsfähigkeit an Nanotopografien herangezogen wird, sind interzelluläre Schwankungen von untergeordneter Bedeutung. Eine mittlere Reduktion des Neurofibrominlevels würde sich daher aufgrund der Auswertung vieler Einzelzellen als Erhöhung des medianen Abweichungswinkels α äußern, selbst wenn interzelluläre Unterschiede in der Reduktion der *NF1* mRNA vorliegen sollten.

4.11 Untersuchung der Funktion von *NF1* in der Regulation der Zellorientierung an Untergrundstrukturen in Fibroblasten

KF3 Fibroblasten, die mit siRNAs gegen *NF1* transfiziert wurden, wiesen einen durchschnittlich 40% höheren medianen Abweichungswinkel auf als KF3 Fibroblasten, die mit Kontroll-siRNAs transfiziert wurden. Die Abweichungswinkel der Kontrollen unterschieden sich nicht von vollkommen unbehandelten KF3 Fibroblasten. Dies weist darauf hin, dass die Ausrichtungsverschlechterung kein Artefakt der Transfektion, sondern direkt mit der Menge endogenen Neurofibromins zusammenhängt. Die Ausrichtungsverschlechterung fiel etwas geringer aus, als der Unterschied zwischen *NF1*+/+ und *NF1*+/- Fibroblasten (+ ca. 70%). Die Schwankungen der einzelnen Ausrichtungsversuche von siRNA transfizierten KF3 Fibroblasten fielen jedoch erheblich geringer aus als bei Fibroblasten verschiedener NF1 Patienten oder innerhalb der Gruppe der Kontrollpersonen. Dies lässt vermuten, dass *NF1* zwar eine wesentliche Rolle in der Regulation der Zellausrichtung von Fibroblasten auf bestimmte Nanotopografien spielt, aber dennoch interpersonelle Unterschiede zusätzlich von Bedeutung sind. Dies könnte an der unterschiedlich starken Aktivität des verbliebenen funktionsfähigen *NF1* Allels in den Patientenfibroblasten liegen. So konnte gezeigt werden, dass die Menge an vorhandenem, endogenen Neurofibromin in NF1 Pateinten variiert [44, 51]. Auch könnten *NF1* Mikrodeletionen, die bei 5-10% der NF1 Patienten vorkommen, zu einer weiter verschlechterten Orientierung der Fibroblasten führen, falls dadurch weitere Ausrichtungs-relevante Gene betroffen sind. Dies ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch spekulativ. Das veränderte mechanosensorische Verhalten von Fibroblasten auf nanostrukturierten Oberflächen in Fibroblasten mit durch siRNAs reduzierter *NF1* mRNA weist zusammen mit den vergleichbaren Daten von NF1 Patientenfibroblasten auf eine neue Funktion des Neurofibromin in der Mechanosensorik hin.

4.12 Transduktion von synNF1eGFP

CPP-vermittelte Transduktionen von synNF1eGFP führten zu schwachen, endosomalen Signalen. Dies war nach den Vorversuchen der Atto488-BSA Transduktion unerwartet, da dort die CPP-vermittelten Transduktionen zu den stärksten Signalen führten. Transduktionen durch das Endo-Porter Reagenz führten jedoch zu vergleichsweise starken Signalen. Möglicherweise ist der Grund hierfür in der Art der non-kovalenten Bindung der kommerziellen CPP-basierten Transduktionsreagenzien zu finden. Diese Bindung basiert hauptsächlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Reagenz und dem Protein. Die Gesamtladung des synNF1eGFP ist nicht negativ (Ensemble Genome Browser, NF1 human, Protein ID: OTTHUMP00000163771), was die Bindung des Reagenz erschwert. Endo-Porter interagiert nicht direkt mit dem zu transduzierenden Protein. Das EP Reagenz wird stattdessen in die Plasmamembran integriert und zusammen mit dem im Kulturmedium vorliegenden Protein endozytotisch aufgenommen. Daher ist die Ladung des Proteins bei Endo-Porter vermittelter Transduktion weniger wichtig, was möglicherweise zu einer besseren Aufnahme in die Zielzellen als mit CPP-vermittelter Transduktion geführt hat.

4.12.1 Zellausrichtung von *NF1*-Patientenfibroblasten nach synNF1 Transduktion mit und ohne PCI

Zunächst fällt auf, dass Endo-Porter vermittelte synNF1 Transduktionen keine einheitlichen Ergebnisse bei der Ausrichtungsverbesserung erbrachten. Während bei Fibroblasten der Patienten NF213, NF244 und NF282 eine einfache Transduktion ausreichte, um eine erhebliche Verringerung des Abweichungswinkels herbeizuführen, war bei den Fibroblasten der Patienten NF191 und NF329 eine zusätzliche PCI-Behandlung nötig, um eine Verbesserung zu erreichen. Besonders auffällig ist, dass eine Verbesserung des Abweichungswinkels auf ca. 60% des Abweichungswinkels der unbehandelten Zellen begrenzt zu sein scheint. Dies weist darauf hin, dass die Regulationsfähigkeit des Neurofibromins auf die Ausrichtung der Fibroblasten ausschließlich in einem bestimmten Rahmen greift. Für eine mögliche zukünftige Behandlung in Mausmodellen oder folgend in Patienten ist diese Vermutung nicht uninteressant, da es aufgrund dieser Ergebnisse möglich scheint, dass –in einem gewissen Rahmen- keine Überdosierung an Neurofibromin stattfinden kann.

Alternativ wäre es ebenfalls möglich, dass für eine weitere Verbesserung der Ausrichtung der Fibroblasten an den Nanotopografien längerfristige Neurofibromineinschleusungen benötigt werden. Im Hinblick auf Behandlungen ist es daher nötig, den Effekt längerfristiger, wiederholter synNF1 Transduktionen zu testen, da Proteinersatztherapien bei genetischen Erkrankungen wie Neurofibromatose Typ 1 eine lebenslange Behandlung der Patienten voraussetzt.

Fasst man die Ergebnisse der unbehandelten und der behandelten (Transduktion mit bzw. ohne PCI) Patientenfibroblasten zusammen und vergleicht diese mit den Vergleichsstudien von NF1 Patienten und gesunden Kontrollen ergeben sich erstaunliche Ähnlichkeiten. Die Abweichungswinkel der Kontrollfibroblasten in der ersten Studie machten 60% des Abweichungswinkels der NF1 Patientenfibroblasten aus. Mit 67% finden sich bei synNF1 behandelten und unbehandelten Patientenfibroblasten sehr ähnliche Ergebnisse. Der Ausrichtungswinkel synNF1 behandelter NF1 Patientenfibroblasten entspricht bis auf geringe Unterschiede dem von Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen. Der Ersatz des fehlenden Proteins war daher durch Endo-Porter vermittelte Transduktion des synNF1 in *NF1*+/- Fibroblasten gelungen. Es blieb jedoch die Frage offen, warum die zusätzliche PCI-Behandlung nicht immer zu einer Verbesserung der Orientierung der Fibroblasten führte. Tatsächlich konnten auch Verschlechterungen des Abweichungswinkels verglichen mit ausschließlich transduzierten Fibroblasten beobachtet werden.

4.13 Einfluss der PCI auf die Zellausrichtung

NF1+/- Fibroblasten, die ausschließlich mit dem Photosensitizer $TPPS_4$ inkubiert wurden, zeigten keine signifikante Änderung des Abweichungswinkels, eine vollständige PCI jedoch verschlechterte die Ausrichtung der Zellen erheblich. Dieser Befund konnte an KF3 Fibroblasten bestätigt werden. Auch hier wurde die Ausrichtung der Zellen durch eine PCI-Behandlung erheblich verschlechtert. Zusätzliche Transfektionen mit Kontroll-siRNAs und Endo-Porter vermittelter Transduktionen mit Atto488-BSA führten zu keiner weiteren Verschlechterung. Daher stellte sich heraus, dass alle Versuchsteile außer der PCI die Ausrichtung der Zellen nicht beeinflussen. Für Versuche, die eine PCI-Behandlung beinhalten

ist es daher unerlässlich, die Kontrollen ebenfalls einer PCI zu unterziehen, da die Resultate ansonsten nicht vergleichbar sind. Die Gründe des Einflusses der PCI auf die Ausrichtung der Fibroblasten sind möglicherweise darin zu finden, dass PCI-Behandlungen zu zahlreichen Änderungen im Expressionsmuster der Zellen führen [98-99]. 390 Gene wurden nach PCI-Behandlung als signifikant verändert exprimiert beschrieben. Einige dieser Gene scheinen Einfluss auf die Ausrichtung von Fibroblasten zu haben. Tatsächlich wurden in einer Kolon Adenokarzinomzelllinie Expressionsänderungen in 17 Genen festgestellt, die mit dem MAPK Signalweg in Verbindung gebracht werden. Da Neurofibromin direkt regulatorisch in diesen Signalweg eingreift, ist es denkbar, dass die Phänotyprevertierung der PCI-induzierten Orientierungsverschlechterung zumindest teilweise durch den MAPK Signalweg und dessen Veränderung durch die PCI zustande kommt.

4.14 Phänotyprevertierung durch synNF1 Transduktion in siRNA transfizierten KF3 Fibroblasten

Um die Phänotyprevertierung in den Patientenfibroblasten weiter zu untersuchen, schien es sinnvoll, zu prüfen, ob dies im artifiziell erstellten System ebenfalls gelingt. Es wurde daher ein Versuchsplan erstellt, der alle bisherigen Versuche vereinigte. Zunächst wurde die *NF1* Expression für 48 Stunden durch siRNA Transfektion reduziert. Als Kontrollen wurden diese Zellen mit Atto488-BSA (via Endo-Porter) transduziert und einer PCI unterzogen. Erwartungsgemäß zeigten diese Zellen eine erheblich schlechtere Ausrichtung als unbehandelte KF3 Fibroblasten. In einem parallel geführten Versuch wurde statt des Atto488-BSAs synNF1 in äquimolarer Menge transduziert. Die so behandelten Zellen zeigten eine Orientierung, die vollkommen unbehandelten KF3 Fibroblasten entsprach. Es konnte daher bestätigt werden, dass die durch *NF1* knockdown und PCI induzierte Orientierungsverschlechterung durch Transduktion von synNF1 revertiert und daher der Phänotyp wiederhergestellt werden kann. Auffällig an diesen Resultaten ist, dass die gesamte Orientierungsverschlechterung durch die synNF1 Transduktion revertiert wird. Da jedoch nur ein Teil der Ausrichtungsverschlechterung durch den *NF1* knockdown verursacht wurde, wurde überprüft, ob synNF1 die PCI-induzierten Verschlechterung auch ohne *NF1*

knockdown revertieren kann. Hierzu wurden die KF3 Fibroblasten anstelle der *NF1* siRNAs mit Kontroll-siRNAs transfiziert, einer PCI unterzogen und entweder mit Atto488-BSA oder mit synNF1 transduziert. Auch hier zeigte sich eine Verschlechterung der Orientierung der Fibroblasten mit Atto488-BSA Transduktion, die erwartungsgemäß niedriger ausfiel als bei zusätzlichem *NF1* knockdown. Diese rein durch die PCI induzierte Erhöhung des medianen Abweichungswinkels konnte vollständig durch synNF1 Transduktion revertiert werden. Dies spricht sehr dafür, dass Neurofibromin über eine gewisse allgemeine Pufferkapazität bei Störungen in der Zellausrichtung verfügt.

4.15 Messung der Änderung von phosphoryliertem ERK 1/2 durch synNF1 Transduktion mit und ohne PCI

Die Empfindlichkeit des zellulären read outs der Ausrichtung von Fibroblasten an Nanotopografien zeigte, dass ein zweiter read out benötigt wurde. Hierfür wurde die Mengenbestimmung von phosphoryliertem ERK½ in Fibroblasten mit und ohne synNF1 Transduktion gewählt. ERK½ sind 2 der bislang 8 bekannten ERK Isoformen. Sie werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit vom selben Antikörper im Western Blot erkannt und daher zusammen detektiert. ERK2 wird vom Gen *MAPK1*, ERK1 vom Gen *MAPK3* codiert. Die Messungen ergaben, dass die Menge an phosphoryliertem ERK2 durch keine der getesteten Bedingungen verändert wird. Eine Endo-Porter vermittelte synNF1 Transduktion mit zusätzlicher PCI-Behandlung reduziert jedoch die Menge an phosphoryliertem ERK 1 (pERK1) um die Hälfte. Eine Transduktion ohne PCI führte zu keiner wesentlichen Veränderung des pERK1 Spiegels. Die PCI-Behandlung ohne Transduktion führte zwar ebenfalls zu einer Reduktion der Menge an pERK1, diese war jedoch mit ca. 20% deutlich geringer als die Kombinationsbehandlung aus synNF1 Transduktion und PCI. Dass die PCI den MAPK Signalweg beeinflusst, war durch die veränderte Expression 17 relevanter MAPK Gene vorhersehbar. Dass dieser Effekt für sich gesehen bedeutend geringer ist, als mit einer synNF1 Transduktion, bestätigt, dass das eingeschleuste synNF1 diese Funktion, die der GAP-related Domain (GRD) des Neurofibromins zugeschrieben wird, erfüllt. Der Zusammenhang zwischen der *NF1* Expression und der Menge an phosphoryliertem ERK½ wurde bereits beschrieben [71]. Prüfungen, in welcher

Form Neurofibromin unterschiedlich auf die Phosphorylierung des ERK1 oder ERK2 einwirkt, stehen aus.

Auch bei den pERK Mengenmessungen fällt auf, dass eine Mengenveränderung des Neurofibromins über den Status einer gesunden Kontrollperson hinaus zu keinen weiteren Veränderungen führt. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass die pERK Mengen in KF1 Fibroblasten durch eine Transduktion mit synNF1 nicht wesentlich verändert wurden. Eine sehr leichte Reduktion der pERK1 Menge lässt sich wahrscheinlich auf die PCI zurückführen.

4.16 Verwendung eines Fusionsproteins aus TAT, synNF1 und eGFP

4.16.1 Allgemeine Überlegung

Da der Ersatz des fehlenden Neurofibromins durch Transduktion mit PCI-Behandlung erfolgreich war, lag es nahe, ein synthetisches Neurofibromin herzustellen, das selbstständig in der Lage sein sollte, in Zellen aufgenommen zu werden. Die einfachste Möglichkeit, dies zu erreichen, war, das synNF1 als Fusionsprodukt aus synNF1 und dem am besten untersuchten CPP, der Proteintransduktionsdomäne (PTD) des TAT, herzustellen, obwohl synNF1 Transduktionen mit den kommerziell erhältlichen CPPs nicht sehr erfolgsversprechend waren. Um direkt fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können, ob dieses Fusionsprotein von Zellen aufgenommen wird, wurden zusätzlich C-terminal drei eGFPs fusioniert. Das dadurch entstandene TATsynNF1eGFP wurde ohne weiteres Transduktionsreagenz im selben Transduktionszeitraum (circa. 20 Stunden) von KF3 Fibroblasten aufgenommen. Es konnten darüber hinaus neben punktförmigen GFP Signalen zusätzlich flächige und membranassoziierte GFP Signale nach Inkubation mit TATsynNF1eGFP detektiert werden. Die endosomale Speicherung dieses Fusionsproteins war daher weniger stark als in allen vorher untersuchten Transduktionen. Es wurde beschrieben, dass Neurofibromin während der Interaktion mit H-Ras an die Zellmembran rekrutiert wird [119]. Daher könnten die membranassoziierten Signale funktionsfähiges, nicht endosomal gespeichertes TATsynNF1eGFP darstellen. Der Grund für die selbstständige Freisetzung des Fusionsproteins aus

den Endosomen bleibt offen, da dies nicht mit den Transduktionsvorversuchen konform geht. Möglich wäre, dass die Überwindung der endosomalen Speicherung durch die kovalente Bindung des TAT durch die Expression als Fusionsprotein zustande kommt. Es wird beschrieben, dass verschiedene TAT-Fusionsproteine ohne weitere Behandlung funktionsfähig in Zellen eingeschleust wurden [101, 139]. Ein TAT-β-Galaktosidase Fusionsprotein konnte intraperitoneal in eine Maus injiziert und aktiv in allen getesteten Geweben (auch im Gehirn) nachgewiesen werden [108].

Möglich ist, dass bei non-kovalent bindenden Transduktionsreagenzien die non-kovalenten, elektrostatischen Bindungen zwischen Transduktionsreagenz und Frachtprotein während der Ansäuerung der Endosomen gelöst wird. Sollte diese Bindung bei CPP-vermittelter Transduktion jedoch erforderlich sein, um aus den endolysosomalen Vesikeln ausgeschleust zu werden, würde diese Ausschleusung bei den non-kovalent gebundenen kommerziellen CPP-Reagenzien ausbleiben, bei Fusionsprodukten jedoch bestehen bleiben. Einschleusung von TAT-Fusionsproteinen, die in den Zielzellen funktionsfähig waren, wurden beispielsweise bei der Generierung von induzierten, pluripotenten Stammzellen (IPSCs) gezeigt [139].

4.17 Revertierung der knockdown induzierten Verschlechterung des Abweichungswinkels ohne und mit PCI-Behandlung

Mangels eines Fusionsproteins aus TAT und synNF1 ohne eGFP wurde getestet, ob das TATsynNF1eGFP in der Lage ist, die verschlechterte Orientierung von KF3 Fibroblasten mit *NF1* knockdown zu revertieren. Die *NF1* knockdown induzierte Orientierungsverschlechterung konnte nahezu vollständig durch Inkubation der Fibroblasten mit TATsynNF1eGFP revertiert werden. Inkubationen mit dem Fusionsprotein revertierten die zusätzliche Orientierungsverschlechterung jedoch nicht die Orientierungsverschlechterung, die durch eine PCI-Behandlung induziert wurde. Dies ist möglicherweise auf die starke Modifikation mit 3 eGFPs zurückzuführen.

Die TATsynNF1eGFP inkubierten Fibroblasten zeigten im Zeitraum der Ausrichtung der Zellen auf den Nanotopografien (48 Stunden) optisch keine Anzeichen von Toxizität.

4.18 Offene Fragen

Verschiedene Rahmenbedingung, wie der Umzug der Arbeitsgruppe Scheffzek von Heidelberg nach Innsbruck, die dadurch nötig gewordenen Neuetablierungen der Neurofibrominexpression und –isolation oder die ausgebliebene Expression des synNF1 Vektors in HEK-Zellen brachten es mit sich, dass synNF1 erst mit großer Verspätung in der zweiten Hälfte der Doktorarbeit zur Verfügung stand. Auf das angedachte TAT-fusionierte synNF1 konnte erst wenige Monate vor Ende der praktischen Arbeiten zurückgegriffen werden. Daher sind zum Ende der Arbeit noch einige Fragen ungeklärt, auch wenn die „proof of principle“ Versuche erfolgreich waren. Eine Langzeit-Lokalisationsstudie könnte die genaue Aufnahme und Verteilung des TATsynNF1eGFP aufklären. Möglicherweise könnte die Funktion des Neurofibromins durch eine Membranlokalisation nach endosomaler Aufnahme und Freisetzung durch eine PCI-Behandlung im zeitlichen Verlauf gezeigt werden. Auch eine Bestimmung der Halbwertszeit von transduziertem synNF1 wäre sinnvoll, um prüfen zu können, wie lange das Protein nach Transduktion und PCI funktionsfähig in den Zielzellen vorliegt. Mit diesen Daten ließen sich dann auch direkte Dosis-Wirkungsrelationen überprüfen und damit auch die Mindestmenge an zu transduzierenden synNF1, um die partielle mechanosensorische Blindheit in Fibroblasten zu revertieren.

4.19 Fazit und Schlussfolgerung

Es gelang, synthetisch hergestelltes Neurofibromin funktionsfähig in Fibroblasten mit reduziertem endogenem Neurofibrominlevel einzuschleusen. Dies gelang sowohl in einem artifiziellen System als auch in *NF1*+/- Fibroblasten von NF1 Patienten. Das durch Endo-Porter vermittelte Transduktion eingeschleuste synNF1 unterscheidet sich vom TATsynNF1eGFP durch die C-terminalen Anhänge. Das synNF1 ohne diese Fusionsteile war in der Lage, in Fibroblasten sowohl die Ausrichtungsverschlechterung der Zellen durch Mangel an Neurofibromin als auch die PCI-induzierte Verschlechterung der Orientierung zu revertieren. Das Fusionsprotein war zu Letzterem nicht mehr in der Lage. Es wäre daher denkbar, dass der C-Terminus des Neurofibromins eine Funktion in der allgemeinen Regulation stressbedingter Orientierungsverschlechterung in Fibroblasten innehat. Ohne Stressstimulus scheinen andere Domänen des

Neurofibromins wie die GRD oder der N-Terminus für die *NF1* spezifische Regulation der Zellorientierung verantwortlich zu sein. Nähere Untersuchungen, die den oder die relevanten *NF1*-assoziierte Signalwege in ungestressten Fibroblasten identifizieren sollen, werden in der Arbeitsgruppe aktuell durch Inhibition der einzelnen *NF1*-assoziierten Signalwege untersucht. So könnte auch die jeweils für diesen Signalweg relevante Domäne des Neurofibromins identifiziert werden. Weiterhin könnten Teilproteine des Neurofibromins exprimiert und in haploinsuffiziente Fibroblasten als TAT-Fusionsproteine eingeschleust werden, um zu testen, welche der bekannten Domänen in welchem Maße zur Zellorientierung beiträgt. Zu guter Letzt wäre es möglich, bislang funktionell unbekannte Teile des Neurofibromins auf einen Einfluss auf die Zellorientierung zu testen. Die maximale Wirksamkeit des Neurofibromins auf den MAPK Signalweg scheint im Bereich des endogen vorhandenen Neurofibromins in Fibroblasten einer gesunden Vergleichsperson zu liegen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, dass die synNF1 Transduktion in *NF1* herabregulierten KF3 Fibroblasten maximal zu einer Ausrichtung führt, die vergleichbar zu der Ausrichtung unbehandelter KF3 Fibroblasten ist. Eine Verbesserung der Ausrichtung über den Wert der unbehandelten KF3 *NF1*+/+ Fibroblasten konnte nicht erreicht werden. Daher scheint es, dass Neurofibromin in einem gewissen Rahmen keine Negativeffekte durch Überdosierung induziert. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der erst kürzlich gezeigten Interaktion von Neurofibromin und SPRED1 [119]. Stowe und Mitarbeiter zeigten, dass die Bindung an SPRED1 benötigt wird, um Neurofibromin an die Zellmembran zu rekrutieren. Die Membranlokalisation des Neurofibromins ist nötig, um mit RAS-GTP zu interagieren. Da durch diese Interaktion zumindest die RAS-GAP Funktion des Neurofibromins direkt mit der Menge des vorhandenen SPRED1 gekoppelt ist, wäre es möglich, dass eine überhöhte Dosis an Neurofibromin zu keiner Fehlfunktion im MAPK Signalweg führt. Dies ist besonders im Hinblick auf zukünftige Behandlungen von NF1 Patienten wichtig. Eine lebenslange Transduktion aller Körperzellen als Ersatz für einen immer noch höchst gefährlichen Gentherapie-Ansatz könnte zu keiner gleichmäßigen Proteinmenge in allen Körperzellen führen. Zellen, die Fusionsproteinen aus CPPs und Neurofibromin länger und stärker ausgesetzt sind, würden zwangsweise mehr Neurofibromin einschleusen als andere, schwerer erreichbare Zelltypen. Könnte

man eine Überdosierung ausschließen, wäre es möglich, Neurofibromin-Dosen soweit zu erhöhen, dass schwerer erreichbare Zelltypen die mindest nötige Menge an Neurofibromin erreicht, ohne Toxizität in stärker exponierten Zellen auszulösen.

4.20 Anwendbarkeit der PCI *in vivo*

Eine PCI-Behandlung ist nur bedingt *in vivo* anwendbar. Es gelang zwar bislang durchaus, PCI-Behandlungen in Mäusen durchzuführen, um Tumor-Heterotransplantate zu behandeln, doch waren diese räumlich begrenzt und durch Bestrahlung definierter Areale zu erreichen [6]. Auch wurden Photodynamische Behandlungen von Blasenkarzinomen teilweise erfolgreich angewendet [75]. Auf Basis einer Proteinersatztherapie in allen Körperzellen ist die PCI jedoch ungeeignet, da sichtbares Licht nicht tief genug in Gewebe eindringen kann, um alle Zielzellen erreichen zu können. Eine Möglichkeit, die PCI *in vivo* zu nutzen, wäre es, Licht an den Stellen zu produzieren, an denen es gebraucht wird (Wolf, 2007). Adamantylylidenadamantan-1,2-dioxetane dienen beispielsweise als Substrat für ein Enzym des Influenza Virus, die Neuraminidase. Der durch die Neuraminidase katalysierte Zerfall der Dioxetane hat ein Reaktionsoptimum bei einem leicht sauren pH-Wert (6-7) und resultiert in der Emission von Licht mit 477nm Wellenlänge [130]. Dieses blaue Licht wäre in der Lage, Photosensitizer wie $TPPS_4$ anzuregen, um reaktive Sauerstoffe zu produzieren und daher eine PCI zu induzieren. Das Problem an diesem Ansatz liegt jedoch in der nötigen Mehrfachbehandlung. Zunächst müsste ein Photosensitizer appliziert werden. Danach müssten die Neuraminidase und ihr Substrat in alle Körperzellen transduziert werden. Parallel dazu müsste das einzuschleusende Protein transduziert werden. Die fortschreitende Ansäuerung der Endosomen führt in diesem Szenario zum Erreichen des pH-Optimums der Neuraminidase und damit zur Lichtemission. Dieses Licht würde zum Anregen der Photosensitizer in der Endosomenmembran führen, was seinerseits zur Produktion reaktiver Sauerstoffe führt. Diese ROS destabilisieren die endosomale Membran, was zur Freisetzung des einzuschleusenden Proteins (in diesem Falle das synthetische Neurofibromin) führt. Dieser theoretisch denkbare Ansatz würde jedoch höchstwahrscheinlich an den unterschiedlichen Mengen scheitern, die in verschiedenen Geweben ankommen. Verschiedene Mengen Enzym und Substrat führen zu

unterschiedlichen Lichtmengen, die gepaart mit unterschiedlichen Konzentrationen von Photosensitizern zu verschieden starken PCI Effekten führen würde. In manchen Geweben wäre der Effekt nicht groß genug, um die eingeschlossenen Proteine freizusetzen, während in anderen Geweben der Effekt durch extreme Stärke nicht mehr tolerabel für die Zellen wäre (Photodynamische Behandlung). Die PCI ist daher ausschließlich als Behandlung von kultivierten Zellen *in vitro* geeignet, um Grundsatzuntersuchungen durchzuführen.

In Krankheiten, die sich primär in Veränderungen der Haut zeigen, könnte die Kombinationsbehandlung aus systemischer Transduktion und PCI jedoch eine Anwendung finden. Bei der Vitiligo werden beispielsweise schon jetzt betroffene Hautareale mit UV-verstärkenden Cremes vorbehandelt und diese dann mit UVA-Licht bestrahlt. Da auch hier eine genetische Grundlage vermutet wird, wäre eine systemische Transduktion des reduzierten Proteins zusammen mit einer Photosensitizer-Applikation denkbar. Da die Hautareale separat bestrahlbar sind und keine besonders hohen Eindringtiefen des Lichts benötigt werden, wäre eine PCI-verstärkte Transduktion als Behandlung denkbar.

4.21 Ausblick

Durch die unerwartete eigenständige Funktion des TATsynNF1eGFP Fusionsproteins ergibt sich die Möglichkeit, direkt in ein *NF1* Mausmodell zu wechseln. Da das fusionierte eGFP zu einer Funktionseinschränkung des Neurofibromins zu führen scheint, könnte das synNF1eGFP Fusionsprotein dazu genutzt werden, herauszufinden, ob eine Injektion in die Schwanzvene zu einer Transduktion des Fusionsproteins in verschiedenen Geweben der Maus führt. Danach wäre die Produktion eines TATsynNF1 Fusionsproteins ohne eGFP, das injiziert werden kann, ratsam. Weitere Modifikationen gegen den Abbau im Blut wie beispielsweise eine PEGylierung wären denkbar, um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Versuchstiere, die regelmäßigen Injektionen des TATsynNF1unterzogen werden, könnten auf typische Neurofibromatose-bedingte Veränderungen wie Tumorbildung oder Lernschwäche hin untersucht werden. Auf diese Weise könnten große Schritte hin zu einer Behandlung von Neurofibromatose und in der

Folge vielleicht auch anderer monogener, genetischer Krankheiten durch Ersatz des reduzierten Proteins in allen Körperzellen gemacht werden.

5 Zusammenfassung

Seit den 1970er Jahren werden Proteinersatztherapien bei einigen menschlichen Krankheiten angewendet, die ihre Ursache im Mangel eines bestimmten Proteins im Blut oder im endolysosomalen System der Zellen haben. Analoge systemische Ansätze zum Ersatz von zytoplasmatisch wirkenden Proteinen, die bei bestimmten monogen bedingten Erkrankungen fehlen, sind aktuell nicht möglich. In dieser Arbeit wird dieser Ansatz am Beispiel der Neurofibromatose Typ 1 (NF1) untersucht. In den Zellen der Patienten mit dieser monogenen, autosomal dominant vererbten, genetischen Erkrankung ist die Menge des zytoplasmatischen Genproduktes des *NF1* Gens (Neurofibromin) reduziert. Am Beispiel von *NF1* haploinsuffizienten kultivierten Fibroblasten von Patienten wird untersucht, wie Neurofibromin effektiv transduziert werden kann. Neurofibrominmangel führt in diesen Zellen zu einer verstärkten Aktivierung des „mitogen activated protein kinase“ (MAPK) Signalweges und zur schlechteren Orientierung an Nanotopografien.

Proteine können mit verschiedenen, auch kommerziellen Proteintransduktions-methoden in kultivierte Zellen unterschiedlicher Genese eingeschleust werden. Neben artifiziellen Transduktionspeptiden werden dabei auch Peptide genutzt, die natürlich vorkommenden Proteintransduktionsdomänen wie die des „Trans-Activator of Transcription“ Proteins (TAT) entstammen. In Vorversuchen erwiesen sich zwar fast alle (8/9) der getesteten, kommerziell erhältlichen Transduktionsreagenzien als effektiv in der Transduktion der eingeschleusten Proteine in den als Testzellen verwendeten Neurofibrosarkomzellen und Fibroblasten von Kontrollpersonen und NF1 Patienten, bewirkten aber primär eine endosomale und keine zytoplasmatische Lokalisation. Die Translokation der endolysosomal gespeicherten Proteine ins Zytoplasma konnte durch eine zusätzlich neu etablierte „Photochemical Internalization“ (PCI) sicher überwunden werden. Die erfolgreich etablierte Translokation transduzierter Proteine aus dem endolysosomalen System ins Zytoplasma, wurde auf Fibroblasten angewendet, die mit synthetisch hergestelltem Neurofibromin (synNF1) transduziert wurden. Die durch *NF1* Haploinsuffizienz bedingte erhöhte Menge an phosphoryliertem ERK½

(extracellular signal-regulated kinases) konnte hierdurch erniedrigt werden. Ein weiterer *NF1* Haploinsuffizienz bedingter Effekt in Fibroblasten, die verschlechterte Ausrichtungsfähigkeit an Nanostrukturen, konnte durch die Kombinationsbehandlung revertiert werden. Fibroblasten mit *NF1* siRNA induzierter Reduktion der Neurofibrominmenge zeigten ebenfalls den Phänotyp der verschlechterten Ausrichtung an Nanotopografien. Auch hier konnte durch synNF1 Transduktion in Verbindung mit einer PCI der zelluläre Phänotyp revertiert werden. Anschließend wurde getestet, ob ein Fusionsprotein aus synthetischem Neurofibromin, der Proteintransduktionsdomäne des TAT und eGFP (enhanced green fluorescent protein) von *NF1* haploinsuffizienten Fibroblasten ins Zytoplasma eingeschleust wird und *NF1* Haploinsuffizienz-bedingte Effekte revertiert werden. Die Revertierung des Phänotyps der verschlechterten Ausrichtung an Nanotopografien durch Inkubationen mit einem TAT-synNF1-eGFP Fusionsprotein gelang ebenfalls.

Somit konnte auf der Ebene der Zellkultur gezeigt werden, dass in *NF1* haploinsuffizienten Fibroblasten die reduzierte Proteinmenge von außen ersetzt werden kann. Anhand zweier Testsysteme ließ sich verdeutlichen, dass die eingeschleusten Proteine Funktionen des mangelnden, endogenen Proteins erfüllen und dadurch Haploinsuffizienz-bedingte Effekte revertieren können. Die erfolgreiche Phänotyprevertierung durch ein TAT-synNF1-eGFP Fusionsprotein weist darauf hin, dass mit Proteintransduktionsdomänen modifizierte Proteine in der Lage sind, funktionsfähig in Zellen eingeschleust zu werden. Die PCI ist für eine systemische Anwendung im Patienten ungeeignet. Dennoch scheint es doch prinzipiell möglich zu sein, eine Proteinersatztherapie bei monogenen, autosomal dominanten, genetischen Erkrankungen wie NF1 durchzuführen. Weitere Modifikationen zur Erhöhung der Freisetzung eingeschleuster Proteine aus Endo- und Lysosomen ohne Einwirkung von außen könnten zukünftig wichtige Werkzeuge in der systemischen Behandlung von genetischen Erkrankungen durch Einschleusung mangelnder Proteine darstellen.

6 Literatur

[1] **Aderem, A. and Underhill, D. M.** "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623. (1999)

[2] **Agren, M. S. and Werthen, M.** "The extracellular matrix in wound healing: a closer look at therapeutics for chronic wounds." Int J Low Extrem Wounds **6**: 82-97. (2007)

[3] **Albarran, B., To, R. and Stayton, P. S.** "A TAT-streptavidin fusion protein directs uptake of biotinylated cargo into mammalian cells." Protein Eng Des Sel **18**: 147-152. (2005)

[4] **Aubry, J. P., Blaecke, A., Lecoanet-Henchoz, S., Jeannin, P., Herbault, N., Caron, G., Moine, V. and Bonnefoy, J. Y.** "Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity." Cytometry **37**: 197-204. (1999)

[5] **Banerjee, I., Yekkala, K., Borg, T. K. and Baudino, T. A.** "Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix." Ann N Y Acad Sci **1080**: 76-84. (2006)

[6] **Berg, K., Dietze, A., Kaalhus, O. and Hogset, A.** "Site-specific drug delivery by photochemical internalization enhances the antitumor effect of bleomycin." Clin Cancer Res **11**: 8476-8485. (2005)

[7] **Berg, K. and Moan, J.** "Lysosomes as photochemical targets." Int J Cancer **59**: 814-822. (1994)

[8] **Berg, K., Selbo, P. K., Prasmickaite, L., Tjelle, T. E., Sandvig, K., Moan, J., Gaudernack, G., Fodstad, O., Kjolsrud, S., Anholt, H., Rodal, G. H., Rodal, S. K. and Hogset, A.** "Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol." Cancer Res **59**: 1180-1183. (1999)

[9] **Berg, K., Western, A., Bommer, J. C. and Moan, J.** "Intracellular localization of sulfonated meso-tetraphenylporphines in a human carcinoma cell line." Photochem Photobiol **52**: 481-487. (1990)

[10] **Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D.** "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**: 11-21. (2000)

[11] **Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G. and Hivroz, C.** "TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex." J Immunol **168**: 3235-3241. (2002)

[12] **Boyanapalli, M., Lahoud, O. B., Messiaen, L., Kim, B., Anderle de Sylor, M. S., Duckett, S. J., Somara, S. and Mikol, D. D.** "Neurofibromin binds to caveolin-1 and regulates ras, FAK, and Akt." Biochem Biophys Res Commun **340**: 1200-1208. (2006)

[13] **Boyle, R. W. and Dolphin, D.** "Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers." Photochem Photobiol **64**: 469-485. (1996)

[14] **Brady, R. O., Pentchev, P. G., Gal, A. E., Hibbert, S. R. and Dekaban, A. S.** "Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease." N Engl J Med **291**: 989-993. (1974)

[15] **Brady, R. O., Tallman, J. F., Johnson, W. G., Gal, A. E., Leahy, W. R., Quirk, J. M. and Dekaban, A. S.** "Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease." N Engl J Med **289**: 9-14. (1973)

[16] **Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G. and Bonnerot, C.** "Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma." Int Immunol **17**: 879-887. (2005)

[17] **Campbell, G. R., Pasquier, E., Watkins, J., Bourgarel-Rey, V., Peyrot, V., Esquieu, D., Barbier, P., de Mareuil, J., Braguer, D., Kaleebu, P., Yirrell, D. L. and Loret, E. P.** "The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis." J Biol Chem **279**: 48197-48204. (2004)

[18] **Canton, I. and Battaglia, G.** "Endocytosis at the nanoscale." Chem Soc Rev **41**: 2718-2739. (2012)

[19] **Caron, N. J., Torrente, Y., Camirand, G., Bujold, M., Chapdelaine, P., Leriche, K., Bresolin, N. and Tremblay, J. P.** "Intracellular delivery of a Tat-eGFP fusion protein into muscle cells." Mol Ther **3**: 310-318. (2001)

[20] **Chen, D., Wang, M., Zhou, S. and Zhou, Q.** "HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim." EMBO J **21**: 6801-6810. (2002)

[21] **Ciftci, K. and Levy, R. J.** "Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts." Int J Pharm **218**: 81-92. (2001)

[22] **Crisan, M., Talu, S., Florea, M., Coprean, D., Cosgarea, R. and Crisan, D.** "[Lisch nodules. Markers for a non-invasive diagnosis in Recklinghausen neurofibromatosis]." Oftalmologia **52**: 56-61. (2008)

[23] **Cronican, J. J., Beier, K. T., Davis, T. N., Tseng, J. C., Li, W., Thompson, D. B., Shih, A. F., May, E. M., Cepko, C. L., Kung, A. L., Zhou, Q. and Liu, D. R.** "A class of human proteins that deliver functional proteins into mammalian cells in vitro and in vivo." Chem Biol **18**: 833-838. (2011)

[24] **D'Angelo, I., Welti, S., Bonneau, F. and Scheffzek, K.** "A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein." EMBO Rep **7**: 174-179. (2006)

[25] **D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P.** "ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **7**: 347-358. (2006)

[26] **Dasgupta, B., Li, W., Perry, A. and Gutmann, D. H.** "Glioma formation in neurofibromatosis 1 reflects preferential activation of K-RAS in astrocytes." Cancer Res **65**: 236-245. (2005)

[27] **Desnick, R. J. and Schuchman, E. H.** "Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges." Annu Rev Genomics Hum Genet **13**: 307-335. (2012)

[28] **Dietze, A., Peng, Q., Selbo, P. K., Kaalhus, O., Muller, C., Bown, S. and Berg, K.** "Enhanced photodynamic destruction of a transplantable fibrosarcoma using photochemical internalisation of gelonin." Br J Cancer **92**: 2004-2009. (2005)

[29] **Dietze, A., Selbo, P. K., Prasmickaite, L., Weyergang, A., Bonsted, A., Engesaeter, B., Hogset, A. and Berg, K.** "Photochemical internalization (PCI): a new modality for light activation of endocytosed therapeuticals." J Environ Pathol Toxicol Oncol **25**: 521-536. (2006)

[30] **Doherty, G. J. and McMahon, H. T.** "Mechanisms of endocytosis." Annu Rev Biochem **78**: 857-902. (2009)

[31] **Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A. R. and Temsamani, J.** "Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides." J Biol Chem **278**: 31192-31201. (2003)

[32] **El-Sayed, A., Futaki, S. and Harashima, H.** "Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment." AAPS J **11**: 13-22. (2009)

[33] **Emerman, M. and Malim, M. H.** "HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology." Science **280**: 1880-1884. (1998)

[34] **Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. and Discher, D. E.** "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." Cell **126**: 677-689. (2006)

[35] **Fan, C., Wang, W., Zhao, B., Zhang, S. and Miao, J.** "Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells." Bioorg Med Chem **14**: 3218-3222. (2006)

[36] **Ferner, R. E. and Gutmann, D. H.** "Neurofibromatosis type 1 (NF1): diagnosis and management." Handb Clin Neurol **115**: 939-955. (2013)

[37] **Fuchs, E., Haas, A. K., Spooner, R. A., Yoshimura, S., Lord, J. M. and Barr, F. A.** "Specific Rab GTPase-activating proteins define the Shiga toxin and epidermal growth factor uptake pathways." J Cell Biol **177**: 1133-1143. (2007)

[38] **Fuchs, S. M. and Raines, R. T.** "Pathway for polyarginine entry into mammalian cells." Biochemistry **43**: 2438-2444. (2004)

[39] **Gary-Bobo, M., Nirde, P., Jeanjean, A., Morere, A. and Garcia, M.** "Mannose 6-phosphate receptor targeting and its applications in human diseases." Curr Med Chem **14**: 2945-2953. (2007)

[40] **Geze, M., Morliere, P., Maziere, J. C., Smith, K. M. and Santus, R.** "Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications." J Photochem Photobiol B **20**: 23-35. (1993)

[41] **Goldyn, A. M., Rioja, B. A., Spatz, J. P., Ballestrem, C. and Kemkemer, R.** "Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding." J Cell Sci **122**: 3644-3651. (2009)

[42] **Gorzelany, J. A. and de Souza, M. P.** "Protein replacement therapies for rare diseases: a breeze for regulatory approval?" Sci Transl Med **5**: 178fs110. (2013)

[43] **Green, M. and Loewenstein, P. M.** "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." Cell **55**: 1179-1188. (1988)

[44] **Griesser, J., Kaufmann, D., Eisenbarth, I., Bauerle, C. and Krone, W.** "Ras-GTP regulation is not altered in cultured melanocytes with reduced levels of neurofibromin derived from patients with neurofibromatosis 1 (NF1)." Biol Chem Hoppe Seyler **376**: 91-101. (1995)

[45] **Griesser, J., Kaufmann, D., Maier, B., Mailhammer, R., Kuehl, P. and Krone, W.** "Post-transcriptional regulation of neurofibromin level in cultured human melanocytes in response to growth factors." J Invest Dermatol **108**: 275-280. (1997)

[46] **Gump, J. M., June, R. K. and Dowdy, S. F.** "Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction." J Biol Chem **285**: 1500-1507. (2010)

[47] **Gutmann, D. H., Loehr, A., Zhang, Y., Kim, J., Henkemeyer, M. and Cashen, A.** "Haploinsufficiency for the neurofibromatosis 1 (NF1) tumor suppressor results in increased astrocyte proliferation." Oncogene **18**: 4450-4459. (1999)

[48] **Han, X., Bushweller, J. H., Cafiso, D. S. and Tamm, L. K.** "Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin." Nat Struct Biol **8**: 715-720. (2001)

[49] **Heitz, F., Morris, M. C. and Divita, G.** "Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics." Br J Pharmacol **157**: 195-206. (2009)

[50] **Hoffman, B. D., Grashoff, C. and Schwartz, M. A.** "Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction." Nature **475**: 316-323. (2011)

[51] **Hoffmeyer, S., Assum, G., Griesser, J., Kaufmann, D., Nurnberg, P. and Krone, W.** "On unequal allelic expression of the neurofibromin gene in neurofibromatosis type 1." Hum Mol Genet **4**: 1267-1272. (1995)

[52] **Huang, Y., Rangwala, F., Fulkerson, P. C., Ling, B., Reed, E., Cox, A. D., Kamholz, J. and Ratner, N.** "Role of TC21/R-Ras2 in enhanced migration of neurofibromin-deficient Schwann cells." Oncogene **23**: 368-378. (2004)

[53] **Huth, U. S., Schubert, R. and Peschka-Suss, R.** "Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging." J Control Release **110**: 490-504. (2006)

[54] **Jerjes, W., Upile, T., Radhi, H. and Hopper, C.** "Photodynamic therapy vs. photochemical internalization: the surgical margin." Head Neck Oncol **3**: 53. (2011)

[55] **Jones, K. A.** "Taking a new TAK on tat transactivation." Genes Dev **11**: 2593-2599. (1997)

[56] **Jones, M. B., Liu, C. Y., Vasu, S., Cisneros, I., Chiou, H. and Zmuda, J. F.** "Mammalian Transient Transfection System." Genetic Engineering & Biotechnology News **32**: 50-51. (2012)

[57] **Jouhilahti, E. M., Peltonen, S., Heape, A. M. and Peltonen, J.** "The pathoetiology of neurofibromatosis 1." Am J Pathol **178**: 1932-1939. (2011)

[58] **Jungbauer, S., Kemkemer, R., Gruler, H., Kaufmann, D. and Spatz, J. P.** "Cell shape normalization, dendrite orientation, and melanin production of normal and genetically altered (haploinsufficient NF1)-melanocytes by microstructured substrate interactions." Chemphyschem **5**: 85-92. (2004)

[59] **Kaufmann, D., Hoesch, J., Su, Y., Deeg, L., Mellert, K., Spatz, J. P. and Kemkemer, R.** "Partial Blindness to Submicron Topography in NF1 Haploinsufficient Cultured Fibroblasts Indicates a New Function of Neurofibromin in Regulation of Mechanosensoric." Mol Syndromol **3**: 169-179. (2012)

[60] **Kaufmann, D., Tinschert, S. and Algermissen, B.** "Is the distribution of dermal neurofibromas in neurofibromatosis type 1 (NF1) related to the pattern of the skin surface temperature?" Eur J Dermatol **11**: 521-526. (2001)

[61] **Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H. and Harashima, H.** "Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery." Pharmacol Rev **58**: 32-45. (2006)

[62] **Kiss, A. L.** "Caveolae and the regulation of endocytosis." Adv Exp Med Biol **729**: 14-28. (2012)

[63] **Korade, Z. and Kenworthy, A. K.** "Lipid rafts, cholesterol, and the brain." Neuropharmacology **55**: 1265-1273. (2008)

[64] **Korf, B. R.** "Malignancy in neurofibromatosis type 1." Oncologist **5**: 477-485. (2000)

[65] **Korf, U., Kohl, T., van der Zandt, H., Zahn, R., Schleeger, S., Ueberle, B., Wandschneider, S., Bechtel, S., Schnolzer, M., Ottleben, H., Wiemann, S. and Poustka, A.** "Large-scale protein expression for proteome research." Proteomics **5**: 3571-3580. (2005)

[66] **Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D. and Schnekenburger, J.** "Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges." Eur J Pharm Biopharm **72**: 370-377. (2009)

[67] **Kweh, F., Zheng, M., Kurenova, E., Wallace, M., Golubovskaya, V. and Cance, W. G.** "Neurofibromin physically interacts with the N-terminal domain of focal adhesion kinase." Mol Carcinog **48**: 1005-1017. (2009)

[68] **Lachmann, R. H.** "Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases." Curr Opin Pediatr **23**: 588-593. (2011)

[69] **Lammert, M., Friedman, J. M., Kluwe, L. and Mautner, V. F.** "Prevalence of neurofibromatosis 1 in German children at elementary school enrollment." Arch Dermatol **141**: 71-74. (2005)

[70] **Ledbetter, D. H., Rich, D. C., O'Connell, P., Leppert, M. and Carey, J. C.** "Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation." Am J Hum Genet **44**: 20-24. (1989)

[71] **Li, F., Munchhof, A. M., White, H. A., Mead, L. E., Krier, T. R., Fenoglio, A., Chen, S., Wu, X., Cai, S., Yang, F. C. and Ingram, D. A.** "Neurofibromin is a novel regulator of RAS-induced signals in primary vascular smooth muscle cells." Hum Mol Genet **15**: 1921-1930. (2006)

[72] **Mainberger, F., Jung, N. H., Zenker, M., Wahllander, U., Freudenberg, L., Langer, S., Berweck, S., Winkler, T., Straube, A., Heinen, F., Granstrom, S., Mautner, V. F., Lidzba, K. and Mall, V.** "Lovastatin improves impaired synaptic plasticity and phasic alertness in patients with neurofibromatosis type 1." BMC Neurol **13**: 131. (2013)

[73] **Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B. and Johannes, L.** "Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport." J Cell Biol **143**: 973-990. (1998)

[74] **Manabe, I., Shindo, T. and Nagai, R.** "Gene expression in fibroblasts and fibrosis - Involvement in cardiac hypertrophy." Circulation Research **91**: 1103-1113. (2002)

[75] **Manyak, M. J. and Ogan, K.** "Photodynamic therapy for refractory superficial bladder cancer: long-term clinical outcomes of single treatment using intravesical diffusion medium." J Endourol **17**: 633-639. (2003)

[76] **Mautner, V. F., Kluwe, L., Thakker, S. D. and Leark, R. A.** "Treatment of ADHD in neurofibromatosis type 1." Dev Med Child Neurol **44**: 164-170. (2002)

[77] **Mayor, S. and Pagano, R. E.** "Pathways of clathrin-independent endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**: 603-612. (2007)

[78] **McClatchey, A. I.** "Neurofibromatosis." Annu Rev Pathol **2**: 191-216. (2007)

[79] **McClatchey, A. I. and Cichowski, K.** "SPRED proteins provide a NF-ty link to Ras suppression." Genes Dev **26**: 1515-1519. (2012)

[80] **McNaughton, B. R., Cronican, J. J., Thompson, D. B. and Liu, D. R.** "Mammalian cell penetration, siRNA transfection, and DNA transfection by supercharged proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **106**: 6111-6116. (2009)

[81] **Mellert, K., Lamla, M., Scheffzek, K., Wittig, R. and Kaufmann, D.** "Enhancing endosomal escape of transduced proteins by photochemical internalisation." PLoS One **7**: e52473. (2012)

[82] **Michiue, H., Tomizawa, K., Wei, F. Y., Matsushita, M., Lu, Y. F., Ichikawa, T., Tamiya, T., Date, I. and Matsui, H.** "The NH2 terminus of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides enhances the antitumor potency of polyarginine-mediated p53 protein transduction." J Biol Chem **280**: 8285-8289. (2005)

[83] **Mineo, C. and Anderson, R. G.** "Potocytosis. Robert Feulgen Lecture." Histochem Cell Biol **116**: 109-118. (2001)

[84] **Mislick, K. A. and Baldeschwieler, J. D.** "Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 12349-12354. (1996)

[85] **Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G.** "A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells." Nat Biotechnol **19**: 1173-1176. (2001)

[86] **Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J. C., Jones, A. T., Sugiura, Y. and Futaki, S.** "Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement." Mol Ther **10**: 1011-1022. (2004)

[87] **Nava, M. M., Raimondi, M. T. and Pietrabissa, R.** "Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues." J Biomed Biotechnol **2012**: 797410. (2012)

[88] **Nebesio, T. D., Ming, W., Chen, S., Clegg, T., Yuan, J., Yang, Y., Estwick, S. A., Li, Y., Li, X., Hingtgen, C. M. and Yang, F. C.** "Neurofibromin-deficient Schwann cells have increased lysophosphatidic acid dependent survival and migration-implications for increased neurofibroma formation during pregnancy." Glia **55**: 527-536. (2007)

[89] **Norum, O. J., Gaustad, J. V., Angell-Petersen, E., Rofstad, E. K., Peng, Q., Giercksky, K. E. and Berg, K.** "Photochemical internalization of bleomycin is superior to photodynamic therapy due to the therapeutic effect in the tumor periphery." Photochem Photobiol **85**: 740-749. (2009)

[90] **Oba, M. and Tanaka, M.** "Intracellular internalization mechanism of protein transfection reagents." Biol Pharm Bull **35**: 1064-1068. (2012)

[91] **Ohashi, T.** "Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases." Pediatr Endocrinol Rev **10**: 26-34. (2012)

[92] **Pan, C., Lu, B., Chen, H. and Bishop, C. E.** "Reprogramming human fibroblasts using HIV-1 TAT recombinant proteins OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC." Mol Biol Rep **37**: 2117-2124. (2010)

[93] **Payne, C. K., Jones, S. A., Chen, C. and Zhuang, X.** "Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands." Traffic **8**: 389-401. (2007)

[94] **Pentchev, P. G., Brady, R. O., Hibbert, S. R., Gal, A. E. and Shapiro, D.** "Isolation and characterization of glucocerebrosidase from human placental tissue." J Biol Chem **248**: 5256-5261. (1973)

[95] **Pisani, A., Visciano, B., Roux, G. D., Sabbatini, M., Porto, C., Parenti, G. and Imbriaco, M.** "Enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: state of the art and review of the literature." Mol Genet Metab **107**: 267-275. (2012)

[96] **Pisitkun, T., Shen, R. F. and Knepper, M. A.** "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 13368-13373. (2004)

[97] **Pisoni, R. L. and Thoene, J. G.** "The transport systems of mammalian lysosomes." Biochim Biophys Acta **1071**: 351-373. (1991)

[98] **Prasmickaite, L., Cekaite, L., Hellum, M., Hovig, E., Hogset, A. and Berg, K.** "Transcriptome changes in a colon adenocarcinoma cell line in response to photochemical treatment as used in photochemical internalisation (PCI)." FEBS Lett **580**: 5739-5746. (2006)

[99] **Prasmickaite, L., Hellum, M., Kaalhus, O., Hogset, A., Wagner, E. and Berg, K.** "Photochemical internalization of transgenes controlled by the heat-shock protein 70 promoter." Photochem Photobiol **82**: 809-816. (2006)

[100] **Puri, V., Watanabe, R., Singh, R. D., Dominguez, M., Brown, J. C., Wheatley, C. L., Marks, D. L. and Pagano, R. E.** "Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways." J Cell Biol **154**: 535-547. (2001)

[101] **Qing, G., Tienan, F., Han, C., Yiting, T., Xin, G., Judong, L., Jiao, X., Jinyong, W., Hongying, Y., Shuyu, Z. and Jianping, C.** "HIV-TAT mediated protein transduction of Cu/Zn-superoxide dismutase-1 (SOD1) protects skin cells from ionizing radiation." Radiat Oncol **8**: 253. (2013)

[102] **Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C. and Desaymard, C.** "Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation." Mol Biol Cell **8**: 2631-2645. (1997)

[103] **Ricca, B. L., Venugopalan, G. and Fletcher, D. A.** "To pull or be pulled: parsing the multiple modes of mechanotransduction." Curr Opin Cell Biol **25**: 558-564. (2013)

[104] **Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. and Lebleu, B.** "Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake." J Biol Chem **278**: 585-590. (2003)

[105] **Rolli, C. G., Seufferlein, T., Kemkemer, R. and Spatz, J. P.** "Impact of tumor cell cytoskeleton organization on invasiveness and migration: a microchannel-based approach." PLoS One **5**: e8726. (2010)

[106] **Roskoski, R., Jr.** "ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation." Pharmacol Res **66**: 105-143. (2012)

[107] **Schutze, S., Tchikov, V. and Schneider-Brachert, W.** "Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization." Nat Rev Mol Cell Biol **9**: 655-662. (2008)

[108] **Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. and Dowdy, S. F.** "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse." Science **285**: 1569-1572. (1999)

[109] **Seglen, P. O., Grinde, B. and Solheim, A. E.** "Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin." Eur J Biochem **95**: 215-225. (1979)

[110] **Selbo, P. K., Rosenblum, M. G., Cheung, L. H., Zhang, W. and Berg, K.** "Multi-modality therapeutics with potent anti-tumor effects: photochemical internalization enhances delivery of the fusion toxin scFvMEL/rGel." PLoS One **4**: e6691. (2009)

[111] **Selbo, P. K., Sandvig, K., Kirveliene, V. and Berg, K.** "Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization." Biochim Biophys Acta **1475**: 307-313. (2000)

[112] **Selbo, P. K., Weyergang, A., Bonsted, A., Bown, S. G. and Berg, K.** "Photochemical internalization of therapeutic macromolecular agents: a novel strategy to kill multidrug-resistant cancer cells." J Pharmacol Exp Ther **319**: 604-612. (2006)

[113] **Shapira, S., Barkan, B., Friedman, E., Kloog, Y. and Stein, R.** "The tumor suppressor neurofibromin confers sensitivity to apoptosis by Ras-dependent and Ras-independent pathways." Cell Death Differ **14**: 895-906. (2007)

[114] **Shilyansky, C., Lee, Y. S. and Silva, A. J.** "Molecular and cellular mechanisms of learning disabilities: a focus on NF1." Annu Rev Neurosci **33**: 221-243. (2010)

[115] **Shiraishi, T., Pankratova, S. and Nielsen, P. E.** "Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides." Chem Biol **12**: 923-929. (2005)

[116] **Shirasu, N., Nam, S. O. and Kuroki, M.** "Tumor-targeted photodynamic therapy." Anticancer Res **33**: 2823-2831. (2013)

[117] **Soldati, T. and Schliwa, M.** "Powering membrane traffic in endocytosis and recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **7**: 897-908. (2006)

[118] **Stevenson, D. A., Little, D., Armstrong, L., Crawford, A. H., Eastwood, D., Friedman, J. M., Greggi, T., Gutierrez, G., Hunter-Schaedle, K., Kendler, D. L., Kolanczyk, M., Monsell, F., Oetgen, M., Richards, B. S., Schindeler, A., Schorry, E. K., Wilkes, D., Viskochil, D. H., Yang, F. C. and Elefteriou, F.** "Approaches to treating NF1 tibial pseudarthrosis: consensus from the Children's Tumor Foundation NF1 Bone Abnormalities Consortium." J Pediatr Orthop **33**: 269-275. (2013)

[119] **Stowe, I. B., Mercado, E. L., Stowe, T. R., Bell, E. L., Oses-Prieto, J. A., Hernandez, H., Burlingame, A. L. and McCormick, F.** "A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1." Genes Dev **26**: 1421-1426. (2012)

[120] **Stromhaug, P. E., Berg, T. O., Berg, K. and Seglen, P. O.** "A novel method for the study of autophagy: destruction of hepatocytic lysosomes, but not autophagosomes, by the photosensitizing porphyrin tetra(4-sulphonatophenyl)porphine." Biochem J **321**: 217-225. (1997)

[121] **Sugita, T., Yoshikawa, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Imai, S., Nagano, K., Yoshida, Y., Shibata, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Kamada, H., Tsunoda, S. I. and Tsutsumi, Y.** "Comparative study on transduction and toxicity of protein transduction domains." Br J Pharmacol **153**: 1143-1152. (2008)

[122] **Ter-Avetisyan, G., Tunnemann, G., Nowak, D., Nitschke, M., Herrmann, A., Drab, M. and Cardoso, M. C.** "Cell entry of arginine-rich peptides is independent of endocytosis." J Biol Chem **284**: 3370-3378. (2009)

[123] **Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. and Amigorena, S.** "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." J Cell Biol **147**: 599-610. (1999)

[124] **Thomas, S., Preda-Pais, A., Casares, S. and Brumeanu, T. D.** "Analysis of lipid rafts in T cells." Mol Immunol **41**: 399-409. (2004)

[125] **Trometer, C. and Falson, P.** "Mammalian membrane protein expression in baculovirus-infected insect cells." Methods Mol Biol **601**: 105-117. (2010)

[126] **Uhl, M., Mellert, K., Striegl, B., Deibler, M., Lamla, M., Spatz, J. P., Kemkemer, R. and Kaufmann, D.** "Cyclic stretch increases splicing noise rate in cultured human fibroblasts." BMC Res Notes **4**: 470. (2011)

[127] **Unanue, E. R., Ungewickell, E. and Branton, D.** "The binding of clathrin triskelions to membranes from coated vesicles." Cell **26**: 439-446. (1981)

[128] **Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J. and Lotvall, J. O.** "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol **9**: 654-659. (2007)

[129] **Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B.** "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus." J Biol Chem **272**: 16010-16017. (1997)

[130] **Wang, Q., Chang, B. J., Mee, B. J. and Riley, T. V.** "Neuraminidase production by Erysipelothrix rhusiopathiae." Vet Microbiol **107**: 265-272. (2005)

[131] **Welti, S., Fraterman, S., D'Angelo, I., Wilm, M. and Scheffzek, K.** "The sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: mass spectrometry and structure of a lipid complex." J Mol Biol **366**: 551-562. (2007)

[132] **Wendeler, M., Lemm, T., Weisgerber, J., Hoernschemeyer, J., Bartelsen, O., Schepers, U. and Sandhoff, K.** "Expression of recombinant human GM2-activator protein in insect cells: purification and characterization by mass spectrometry." Protein Expr Purif **27**: 259-266. (2003)

[133] **Weyergang, A., Selbo, P. K. and Berg, K.** "Photochemically stimulated drug delivery increases the cytotoxicity and specificity of EGF-saporin." J Control Release **111**: 165-173. (2006)

[134] **Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. and Zitvogel, L.** "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." Nat Med **7**: 297-303. (2001)

[135] **Wraith, J. E.** "Enzyme replacement therapy with idursulfase in patients with mucopolysaccharidosis type II." Acta Paediatr Suppl **97**: 76-78. (2008)

[136] **Xu, S., Olenyuk, B. Z., Okamoto, C. T. and Hamm-Alvarez, S. F.** "Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances." Adv Drug Deliv Rev **65**: 121-138. (2013)

[137] **Yamaguchi, K., Inoue, M. and Goshima, N.** "Efficient protein transduction method using cationic peptides and lipids." J Biomed Biotechnol **2011**: 872065. (2011)

[138] **Zask, A., Kaplan, J., Toral-Barza, L., Hollander, I., Young, M., Tischler, M., Gaydos, C., Cinque, M., Lucas, J. and Yu, K.** "Synthesis and structure-activity relationships of ring-opened 17-hydroxywortmannins: potent phosphoinositide 3-kinase inhibitors with improved properties and anticancer efficacy." J Med Chem **51**: 1319-1323. (2008)

[139] **Zhang, H., Ma, Y., Gu, J., Liao, B., Li, J., Wong, J. and Jin, Y.** "Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors." Biomaterials **33**: 5047-5055. (2012)

7 Anhang – Ergänzende Abbildungen

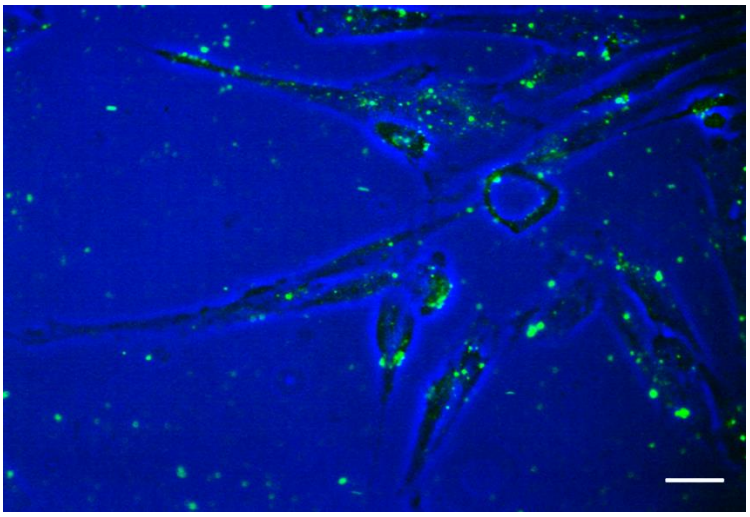

Abbildung Anhang 1: **Transduktion von NFS4 Migr Zellen mit FITC-markiertem Anti-Aktin-Antikörper mittels Saint-PhD Transduktionsreagenz.** Der Phasenkontrast ist blau, das FITC-Signal grün dargestellt. Der weiße Balken markiert eine Länge von 10µm. Viele punktförmige Signale sind in den Zellen erkennbar. Es finden sich jedoch auch viele Signale außerhalb der Zellen.

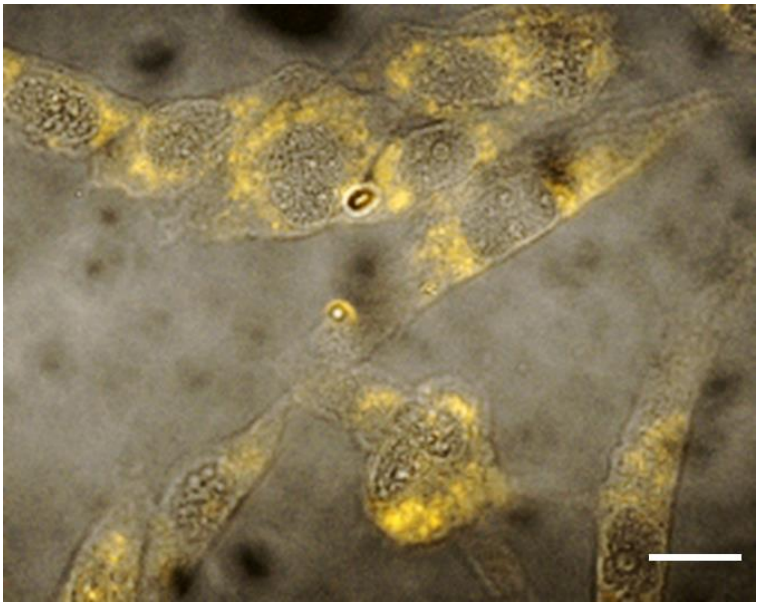

Abbildung Anhang 2: **Transduktion von R-Phycoerythrin in NFS4 Migr Zellen.** Dargestellt ist der Phasenkontrast von NFS4 Migr Zellen in einer ca. 1µm hohen Schichtaufnahme durch ein konfokales Mikroskop. Die R-Phykoerythrinsignale sind als gelbe Signale überlagert. Der weiße Balken markiert eine Länge von 10µm. Die Phycoerythrinsignale sind punktuell und perinukleär.

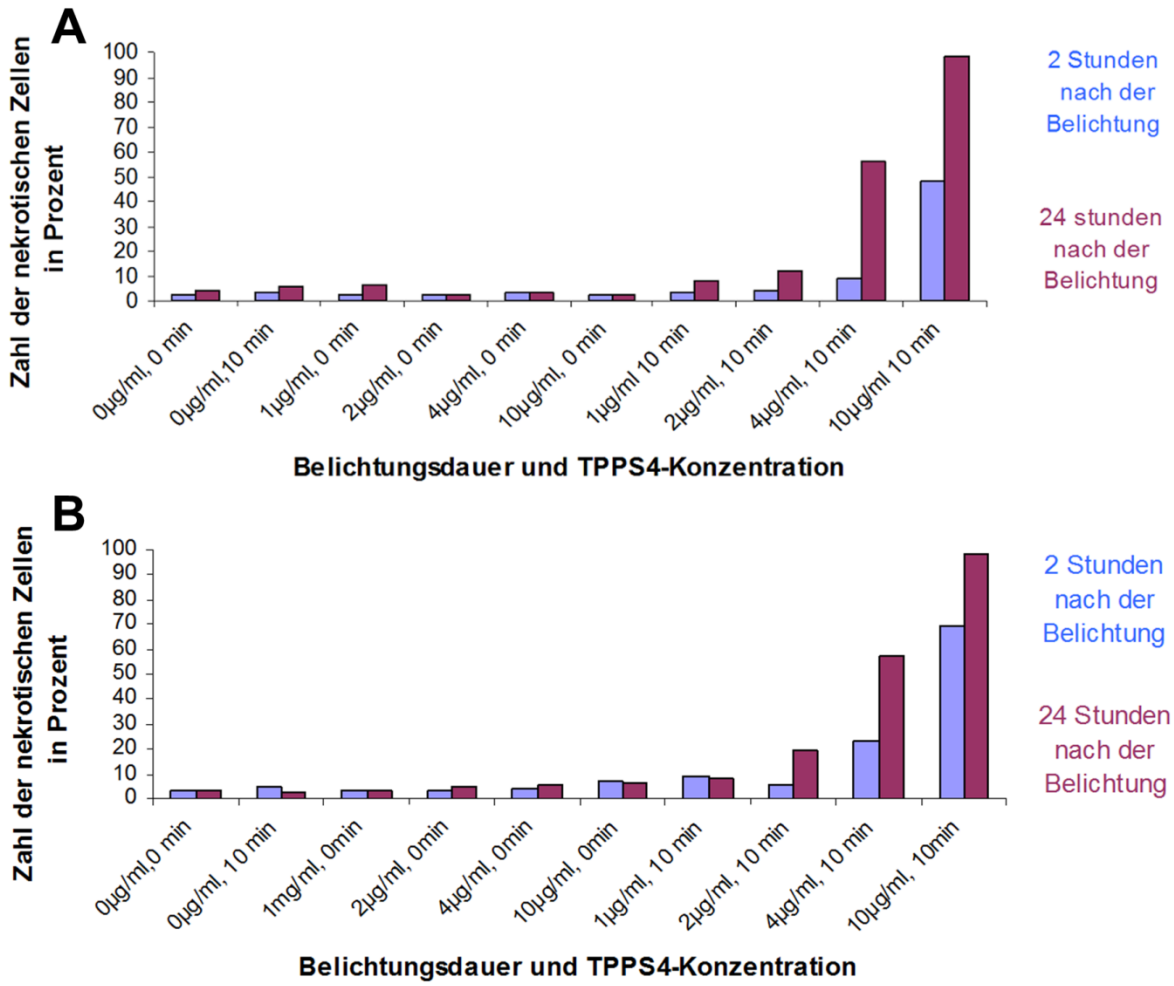

Abbildung Anhang 3: Messung der Toxizität der photochemical internalization (PCI). Die Toxizität wurde jeweils 2 und 24 Stunden nach der Belichtung der Zellen durch einen Trypanblau Test bestimmt. (A) Verschiedene Mengen des Photosensitizers 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonato-phenyl)-21,23H-porphyrin ($TPPS_4$) mit und ohne 10minütiger Belichtung durch die PCI-Lampe an NFS4 Migr Zellen. Ohne Belichtung sind alle gemessenen Konzentrationen des Photosensitizers weder nach 2 Stunden noch nach 24 Stunden toxisch. 2 Stunden nach der Belichtung konnte bei NFS4 Migr Zellen, die mit 4µg/ml $TPPS_4$ inkubiert worden waren, eine leichte Erhöhung nekrotischer Zellen festgestellt werden. Bei Inkubationen mit 10µg/ml $TPPS_4$ starben ca. 50% der Zellen innerhalb von 2 Stunden nach der Belichtung. Mit 10minütiger Belichtung wurden bei 4µg/ml 24 Stunden nach der Belichtung erhebliche Mengen toter Zellen detektiert. 10µg/ml führten nach 10 Minuten Belichtung zum Absterben nahezu aller Zellen nach 24 Stunden. Bei 2µg/ml ist 24 Stunden nach der Belichtung eine leichte Erhöhung der toten Zellen zu erkennen. (B) Test wie unter (A) jedoch an Fibroblasten der gesunden Kontrollperson K19. Ohne Belichtung sind die Fibroblasten tolerant für alle getesteten $TPPS_4$-Konzentrationen. Nach 10 Minuten Belichtung unter der PCI-Lampe konnten nach 2 Stunden erste gesteigerte Mengen toter Zellen bei 4µg/ml, nach 24 Stunden bereits bei 2µg/ml detektiert werden.

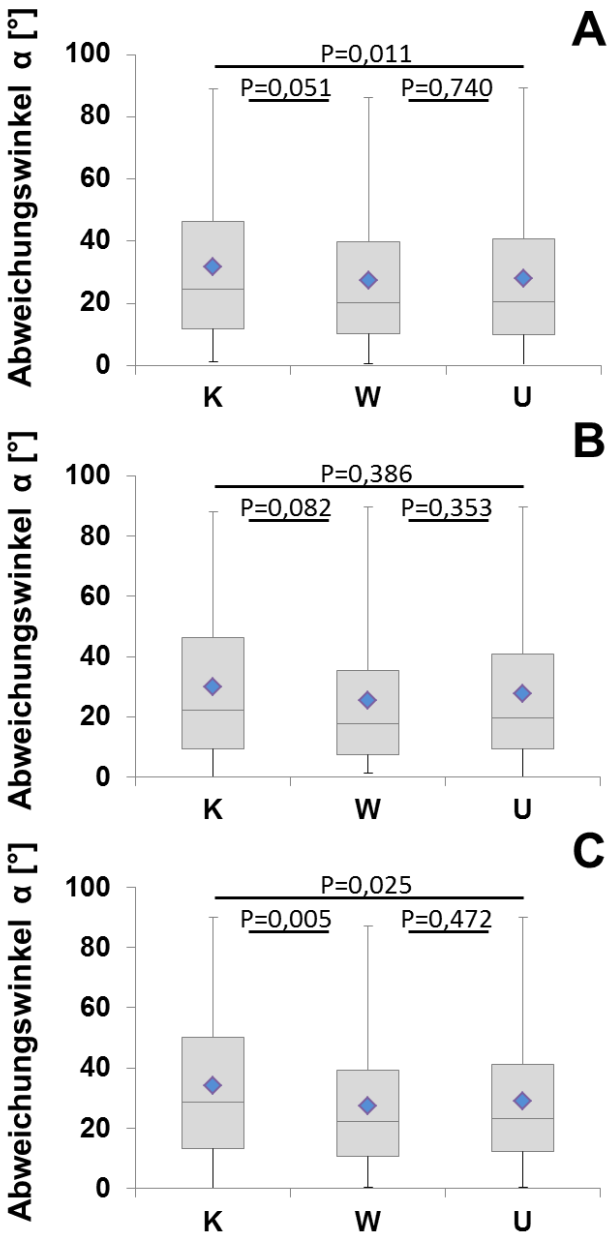

Abbildung Anhang 4: Vergleich verschiedener Auswertmethoden zur Bestimmung des Abweichungswinkels α von *NF1* haploinsuffizienten Fibroblasten an parallelen Nanotopografien. Die Abweichungswinkel von NF191 Fibroblasten wurden in 3 unabhängigen Versuchen (A, B, C) jeweils über die Kernausrichtung (K), ein Winkelbestimmungswerkzeug (W) und die Umrandung der Zellen (U) bestimmt. Obwohl die Gesamtheit der gemessenen Zellen (jeweils n>150) teilweise signifikante Unterschiede zwischen der Kernausrichtung und den anderen Auswertmethoden zeigt (A: K versus U p=0,011; C: K versus W p=0,005; K versus U p= 0,025; zweiseitiger T-Test), so weicht der relevante gemessene mediane Winkel bei allen 3 Messemethoden um nur wenige Grad ab. Der Winkel der Kernausrichtung weicht um durchschnittlich +4° ab.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an:

meinen Doktorvater **PD Dr. Dieter Kaufmann**, der es mir ermöglichte, meine Doktorarbeit im Institut für Humangenetik anzufertigen. Danke auch für die gute Betreuung über die Jahre der gemeinschaftlichen Arbeit in der AG Kaufmann. Deine immer wieder erfrischende Art, Dinge von einem anderen Blickwickel zu betrachten, hat sehr dazu beigetragen, meiner Arbeit neue Impulse zu geben.

PD Dr. Christiane Maier für die Übernahme der Funktion des Zweitgutachters meiner Arbeit.

Dr. Markus Lamla für die sehr angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit über meine gesamte Zeit in der Humangenetik.

Andrea Schwandt, **Monika Dodrimont-Lattke** und **Heidrun Götz** für die Unterstützung und das stets freundliche und unkomplizierte Miteinander.

Alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Kaufmann, die im Laufe der Jahre kamen und gingen und die ich teilweise mitbetreuen durfte. Ganz besonderer Dank geht hier an **Sebastian Biewener** und **Louisa Deeg**, die maßgeblich daran beteiligt sind, dass mir die Zeit in der Humangenetik als sehr positiv in Erinnerung bleiben wird.

Dr. Manuel Lüdeke für die fachliche Unterstützung, das immer offene Ohr und die gute Zeit über die vielen Jahre an der Universität Ulm.

Dr. Rainer Wittig, **Dr. Stefan Lechner** und **Prof. Dr. Ralf Kemkemer** für die unkomplizierte Kooperation auch über die Universität Ulm hinaus.

Dem restlichen **Institut für Humangenetik** für das ausnahmslos gute Arbeitsklima, besonders **Prof. Dr. Günter Assum**, **Prof. Dr. Josef Högel** und **Prof. Dr. Walther Vogel** für die angenehmen Gespräche und Diskussionen.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.