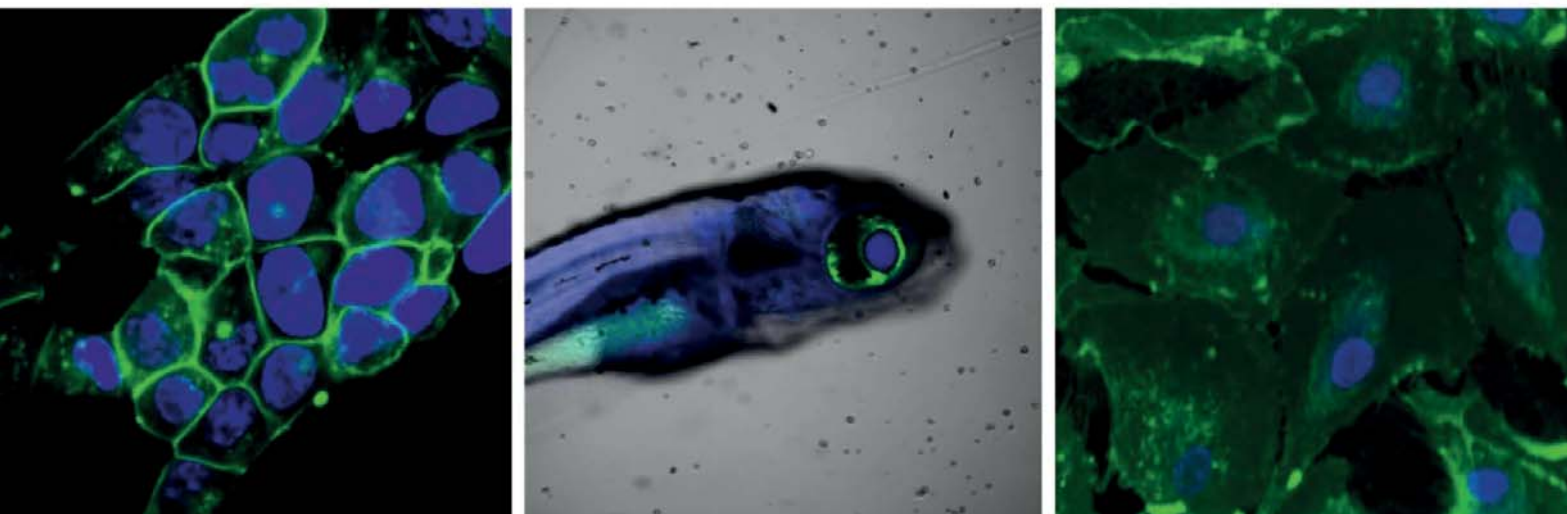


In vivo Markierung von Glykostrukturen mit Hilfe neuartiger, bioorthogonaler Azid-Alkin 1,3-dipolarer Cycloadditionen

Judith Seltenreich





In vivo Markierung von Glykostrukturen mit Hilfe neuartiger, bioorthogonaler Azid-Alkin 1,3-dipolarer Cycloadditionen





***In vivo* Markierung von Glykostrukturen mit Hilfe neuartiger, bioorthogonaler Azid-Alkin 1,3-dipolarer Cycloadditionen**

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

Der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
genehmigte

Dissertation

von
Dipl.-Chem. Judith Esther Seltenreich, geb. Bender
aus
Mosbach

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky
Referent: Priv.-Doz. Dr. Ute Schepers
Korreferent: Prof. Dr. Clemens Heske
Tag der mündlichen Prüfung: 18.07. 2014



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2014

Zugl.: Karlsruhe (KIT), Univ., Diss., 2014

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2014

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

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

1. Auflage, 2014

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-95404-778-9

eISBN 978-3-7369-4778-8



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Priv.-Doz. Dr. Ute Schepers vom 01. November 2011 bis zum 04. Juni 2014 am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG), Karlsruher Institut für Technologie (KIT), durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Clemens Heske danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

H. Möller, V. Böhrsch, J. Bentrop, J. Bender, S. Hinderlich and C. P. R. Hackenberger, Glycan-spezifisches metabolisches Oligosaccharid-Engineering von C7-substituierten Sialinsäuren, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**.

J. E. Seltenreich, M. Wallesch, D. Volz, D. Wagner, C. Bednarek, C. Grabher, T. Baumann, S. Bräse and U. Schepers, In vivo bioorthogonal labeling of the glycocalyx using a luminescent, self-clickable copper complex in an intramolecular-catalyzed Click reaction, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014** (in Arbeit).

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.

Karlsruhe, im Juli 2014

Judith Seltenreich





Für Jens, Josia
und meinen Vater





Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Die Glykokalyx.....	4
2.2	Die endotheliale Glykokalyx	6
2.3	Zusammensetzung der Glykokalyx.....	7
2.3.1	Glykoproteine.....	7
2.3.1.2	O- Glykane.....	10
2.3.2	Proteoglykane	12
2.3.3	Glykolipide	14
2.4	Die Charakterisierung der Glykanstrukturen auf der Zelloberfläche	16
2.4.1	Darstellungsmethoden der Glykokalyx.....	16
2.4.2	Metabolisierung von unnatürlichen Monosacchariden	16
2.4.3	Click-Chemie.....	23
3	Ziel der Arbeit.....	31
4	Ergebnisse und Diskussion.....	33
4.1	Labelling von Glykostrukturen in diversen Zelllinien	33
4.1.1	Cu-freie Click-Reaktion (SPAAC) mit ClickFITC und ClickCy5	33
4.1.2	Hochdurchsatzverfahren zur Quantifizierung von Glykostrukturen auf der Zellmembran	49
4.2	Markierung von Glykan-gebundenen Sialinsäuren mit Hilfe der SPAAC.....	51
4.3	Intramolekulare CuAAC mit Cu(I)-Komplexen aus Emittermaterialien von organischen Leuchtdioden (OLEDs).....	62
4.3.1	Toxikologische Untersuchungen zur intramolekular-katalysierten CuAAC	71
4.3.2	Intramolekular-katalysierte CuAAC im Zebrafischmodell	72
4.3.3	PyrPHOS-Cu(I)-Komplexe mit heteroleptischen organischen Liganden	78
4.4	Neue Cu-basierte Fluoreszenzfarbstoffe aus Emittermaterialien von OLEDs.....	82
5	Experimenteller Teil	87
5.1	Zellkultur	87
5.1.1	Tumor- und Primärzelllinien	87
5.1.2	Kryokonservierung von Zelllinien	87



5.1.3	Verwendung von BG Matrigel™ bei SHSY5Y Zellen	88
5.2	Cu-freie Click-Reaktion mit ClickFITC- bzw. ClickCy5.....	88
5.3	Cu-katalysierte Click-Reaktion mit PyrPHOS-Cu(I)-Komplex	89
5.4	FACS Analyse	89
5.5	Zellkernfärbung mit Hoechst 33342.....	90
5.6	Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd.....	90
5.7	MTT-Test.....	90
5.8	Statistische Auswertung	91
5.8.1	MTT Test.....	91
5.8.2	Hochdurchsatzverfahren.....	91
5.9	Behandlung der Zebrafisch Embryonen	92
5.9.1	Gewinnung der Zebrafisch Embryonen.....	92
5.9.2	Haltung der Eier	92
5.9.3	Start der Zucker- und Click-Injektion.....	92
5.9.4	Unterdrückung der Pigmentierung und Narkotisierung	93
5.9.5	Dechorionieren mit Pronase und Entdottern	94
5.9.6	Fixierung, Permeabilisierung und Färbung von Zebrafischembryonen .	94
5.9.7	Einbettung der fixierten Embryonen.....	95
5.9.8	Fixierung mit Methanol als Alternative zur PFA-Fixierung	96
5.10	Western-Blot als Nachweis der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle	96
5.10.1	Probeaufbereitung und Verdau	96
5.10.2	Gießen des Gels	96
5.10.3	Vorbereiten des Gel-Gießstandes.....	97
5.10.4	Gießen des Trenngels	97
5.10.5	Gießen des Sammelgels.....	97
5.10.6	Probenaufbereitung und Gelelektrophorese	97
5.10.7	Semi-Dry Blot.....	98
5.11	Immunnachweis.....	98
5.12	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-4-azido-4-desoxy-(1,3,6- <i>O</i> -acetyl)-mannosamin (Ac ₃ -4-Azido-ManNAc)	99
5.13	Metabolischer Einbau von Azidozuckern, Click-Reaktion und Analyse des Glykaneinbaus in Glykoproteine	101
6	Materialverzeichnis	103
6.1	Zelllinien	103
6.2	Zellmedien	104



6.3	Versuchstiere	106
6.4	Verbrauchsmaterialien.....	106
6.5	Analytik.....	108
6.6	Chemikalien und Reagenzien.....	109
7	Abkürzungsverzeichnis	113
8	Literaturverzeichnis	119
9	Lebenslauf	129
10	Danksagungen.....	133





1 Zusammenfassung

Zuckerverbindungen, auch Glykostrukturen genannt, liegen in nahezu allen lebenden Systemen vor. Mit Hilfe der Massenspektrometrie oder anderen analytischen Techniken, wie der *Time-of-Flight*-Sekundärionenmassenspektrometrie (ToF-SIMS), ist die Charakterisierung dieser Glykane möglich. Allerdings sind diese Techniken sehr aufwendig und umfassen eine sehr komplexe Analytik. Aus diesem Grund ist die Entwicklung anderer, simplerer Methoden erforderlich. Dazu gehört die posttranslationale Modifizierung der Zuckerstrukturen mittels intramolekularer bioorthogonaler Click-Reaktion, die im Zuge der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Dabei wurden peracetylierte unnatürliche Azidozucker (Ac_4GalNAz (peracetyliertes *N*-Acetyl-azidogalaktosamin) und Ac_4ManNAz (peracetyliertes *N*-Acetyl-azidomannosamin)) als sogenannte Zuckervorläufer sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt, wobei eine Azid-Gruppe als bioorthogonale Gruppe fungierte. Nach 3-tägiger Metabolisierung werden die Glykostrukturen in die Zelloberfläche integriert. Um die Glykostrukturen zu visualisieren, wurden sowohl Kupfer(Cu(I))-katalysierte als auch Cu-freie Reagenzien als Fluorophore eingesetzt. Zur Markierung wurde die 1,3-dipolare Cycloaddition (Click-Reaktion) mit Alkinen durchgeführt. Dabei wurden neue Reagenzien sowohl für die etablierte *Strain-Promoted* Alkin-Azid 1,3-dipolare Cycloaddition (SPAAC) als auch für die Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) synthetisiert und in Zellen und *in vivo* getestet. Dabei standen besonders die Verbesserung der Reaktionskinetik und die Entwicklung bleichstabiler Fluorophore im Vordergrund. Des Weiteren wurde ein unnatürlicher Azidozucker (*N*-Acetyl-4-azido-4-desoxymannosamin, $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$) synthetisiert, der Sialinsäure-Spezifität zeigte. Dabei wurde die Azido-Gruppe vom C2- zum C4-Atom verschoben. $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ wurde in 24 hpf (engl. *hours post fertilization*, Stunden nach der Befruchtung) Zebrafisch Embryonen mikroinjiziert, um so den Verlauf der Verbreitung dieser Zucker während der Embryogenese zu beobachten und mittels Alexa Fluor[®] 488 DIBO zu visualisieren. Entlang des Zebrafisch-Rückgrats konnten Glykostrukturen beobachtet werden. Außerdem waren die Azidozucker im Neuralrohr vorzufinden. In den anderen Organen, wie Leber, Herz, Niere oder Magen-Darm-Trakt, konnten die Azidozucker mit Hilfe des Alexa Fluor[®] 488 DIBO nicht visualisiert werden. Neben der Cu-freien Methode wurde auch eine neuartige intramolekulare Cu-katalysierte Click-Reaktion ausgetestet. Dazu wurde ein neuer fluoreszenter, selbst-katalytisch clickender Cu(I)-Komplex (Butinyl-PyrPHOS-Cu(I)-Komplex) entwickelt, der überwiegend als Emittermaterial in organischen Leuchtdioden verwendet wurde. Durch diese Cu-katalysierte intramolekulare bioorthogonale Click-Reaktion konnte eine Verkapselung der Glykostrukturen tumorassoziierter Zellen beobachtet werden. Hinzu kommt noch, dass die Markierung der Glykostrukturen in nur zwei Reaktionsschritten ablaufen und im Zebrafisch Embryo bereits durch das simple „Baden“ in einer Lösung bestehend aus Azidozucker und Butinyl-PyrPHOS-Cu(I)-Komplex ausgetestet wurden. Eine Besonderheit war, dass in der Retina von 72-120 hpf Zebrafisch Embryonen eine starke Fluoreszenz auftauchte, die zuvor noch nie beobachtet wurde. Dabei ist die Cu(I)-Toxizität, die im Allgemeinen in Zellen



und einem Organismus sehr hoch ist, aufgrund der Abschirmung durch die alkylierten Seitenketten des Cu(I)-Komplexes sehr gering. Dieser Cu(I)-Komplex kann demnach als selbst-clickendes Fluorophor zur Markierung der Glykokalyx in *in vivo* Experimenten eingesetzt werden ohne dabei die Glykokalyx zu beschädigen.



2 Einleitung

Kohlenhydrate spielen im lebenden Organismus eine sehr wichtige Rolle. Die Grundbausteine aller Kohlenhydrate sind Monosaccharide, sogenannte Einfachzucker, wie Glukose, Galaktose oder Mannose. Sie sind wichtige Energielieferanten. Außerdem sind sie an Prozessen, wie Zell-Zell Erkennung, Zellschutz und Bildung von neuem Gewebe, beteiligt. Kohlenhydrate sind außerdem ein wesentlicher Grundbaustein der DNS (Desoxyribonukleinsäure). Besonders die individuelle Oberflächenbeschaffenheit von Zellen ist essentiell für die Erkennung vieler lebenswichtiger Faktoren. Zu diesen Faktoren gehören ganze Zellen, Proteine, Wachstumsfaktoren, und Botenstoffe sowie Pathogene und Wirkstoffe. Die Erkennung solcher Faktoren ist hoch spezifisch und individuell für jeden Zelltyp und basiert häufig auf Interaktionen mit entsprechenden Rezeptoren auf der extrazellulären Seite der Zellmembran. Neben den klassischen Protein-Rezeptoren spielen Protein- und Lipid-gebundene Glykostrukturen eine wichtige Rolle bei der Zellerkennung. Die großen Oligosaccharidbestandteile der Glykokonjugate bilden dabei eine Zuckerschicht auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran, die als Glykokalyx bezeichnet wird. (Pavelka and Roth 2010) Die Glykokalyx ist für jeden Zelltyp spezifisch und ändert sich häufig signifikant während der Zelldifferenzierung in der Embryogenese und Morphogenese oder bei pathogenen Prozessen wie z.B. der Tumorbildung. So besitzen beispielsweise kanzerogene Zellen eine andere Zuckerdekoration als gesunde Zellen. (Rambourg and Leblond 1967) Die Kohlenhydratschicht von Zellmembranen ist zum einen für die Zell-Zell-Wechselwirkung und zum anderen für die Interaktionen zwischen Zellen und der Umgebung verantwortlich. Außerdem beeinflusst eine Veränderung der Kohlenhydratstruktur sowohl die Zelldifferenzierung, als auch die neoplastische Transformation (Umwandlung einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle durch Aktivierung eines Onkogens). Organe und Gewebe unterscheiden sich demnach im Aufbau der Kohlenhydratverbindung der Zelloberfläche. Jede eukaryotische Zelle besitzt Kohlenhydrate an der Zelloberfläche. (Dabelsteen et al. 1991) Zudem sind diese Bausteine individuell je nach Entwicklungsstadium einer Zelle oder auch in bestimmten Zellverbänden, beispielsweise Geweben, exprimiert. (Espinosa-Marzal et al. 2013) Es existiert demnach eine Vielzahl unterschiedlicher Glykostrukturen und Glykane in Abhängigkeit der physiologischen Umgebung. Die Gesamtheit aller Kohlenhydratstrukturen in der Zelle oder im Organismus nennt man Glykom. Sowohl Glykoproteine, Proteoglykane und Glykolipide bestehen in einfacher, als auch in konjugierter Form aus Oligosacchariden (Glykanen). Da das Glykom nicht genetisch kodiert, sondern durch posttranslationale Modifizierungen von Proteinen und Lipiden generiert wird, ist es trotz vieler Einzelstudien bisher nicht gelungen, seine Rolle bei Zellerkennungsprozessen umfassend zu klären. (Argüeso 2013)



2.1 Die Glykokalyx

Die Glykokalyx leitet sich vom Griechischen, *glykos* = Zucker und *kalyx* = Mantel, ab. Sie ist ein Multikomponentensystem bestehend aus Glykoproteinen (Espinosa-Marzal et al. 2013), Glykolipiden, Proteoglykanen, Glykosaminoglykane (Dudas and Semeniken 2012; Gasimli et al. 2012), Bindungsproteinen, Enzymen, Rezeptorstellen und Antigenen. Unter anderem bildet sie auch die viskose Schleimhülle eukaryotischer Zellen und ist zwischen 200 nm und mehrere Mikrometer dick (Abbildung 2.1.1).

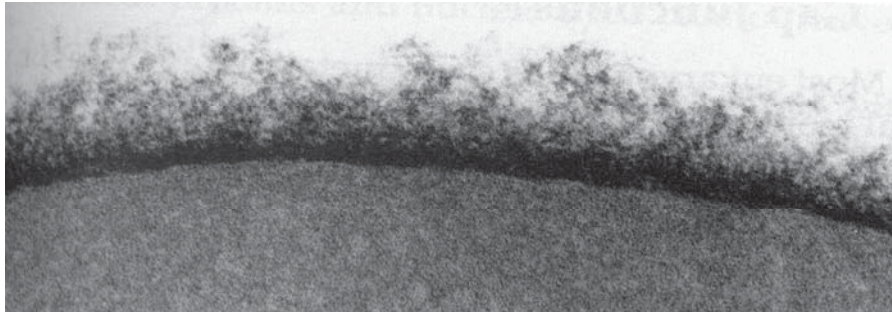


Abbildung 2.1.1| Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer Glykokalyx. Als Glykokalyx wird das Zuckergerüst auf der extrazellulären Seite der Zelloberfläche bezeichnet.(Voet and Voet 2004)

In vielen Fällen ermöglicht die Glykokalyx sogar erst, dass sich einzelne Zellen zu Zellverbänden zusammenschließen, indem sich gleichartig differenzierte Zellen an ihrem Oberflächenzuckermuster erkennen. Wie bereits oben erwähnt werden zahlreiche Funktionen, wie Zell-Zell-Erkennungsprozesse, Rezeptoreigenschaften, Zellhaftungsprozesse und Schutzfunktionen gegenüber Pathogenen der Glykokalyx zugeschrieben. Membranverankerte Glykoproteine und Glykolipide der Glykokalyx bilden eine essentielle Barrierefunktion.(Mauris et al. 2013) Beispielsweise schützen sie die Zelle vor Pathogenen, indem sie das Anhaften dieser vermeiden und somit deren Nährboden eliminieren. Außerdem verleiht die Glykokalyx den Zellen Antigen- und Blutgerinnungseigenschaften, die für das Immunsystem von außerordentlich großer Bedeutung sind.(Hudak et al. 2014) Schließlich kann gesagt werden, dass die Glykoproteine der Glykokalyx Träger der zellulären Immunisierung sind, da körpereigene Glykoproteine bereits eine starke Abwehr gegenüber körperfremden Glykoproteinen zeigen. Die wichtigsten Funktionen der Glykokalyx sind in der Tabelle 2.1.1 dargestellt.(Saladin 2011)

Tabelle 2.1.1| Die wichtigsten Funktionen der Glykokalyx.(Saladin 2011)

Funktion der Glykokalyx	
Schutzfunktion	Bedecken die äußere Zelloberfläche und dienen als Barriere- und Filterfunktion
Immunisierung	Fremde Organismen werden von ihr erkannt und an das Immunsystem selektiv weitergeleitet



Schutz vor Tumorzellen	Veränderungen der Glykokalyx durch Tumorzellen werden sofort vom Immunsystem erkannt und zerstört
Gute Transplantationsfähigkeit	Hauptverantwortlich für die Verträglichkeit von Bluttransfusionen oder Organtransplantationen und für die Gewebsbildung
Gewebsbildung	Sorgt für den Zusammenschluss einzelner Zellen zu Zellverbänden
Befruchtung von Eizellen	Ermöglicht Spermien an ein Ei zu binden
Embryonalentwicklung	Embryonale Zellen werden an den Bestimmungsort im Organismus geführt

Die wichtigsten Zucker der Glykokalyx sind Glukose, Galaktose, Fukose, *N*-Acetylglukosamin, *N*-Acetylgalaktosamin und *N*-Acetylneuraminsäure. Dabei sind die Zucker kovalent an Proteine und Lipide gebunden, die weit in den extrazellulären Raum hinausragen, aber auch fest in der Zellmembran verankert sind (Abbildung 2.1.2).

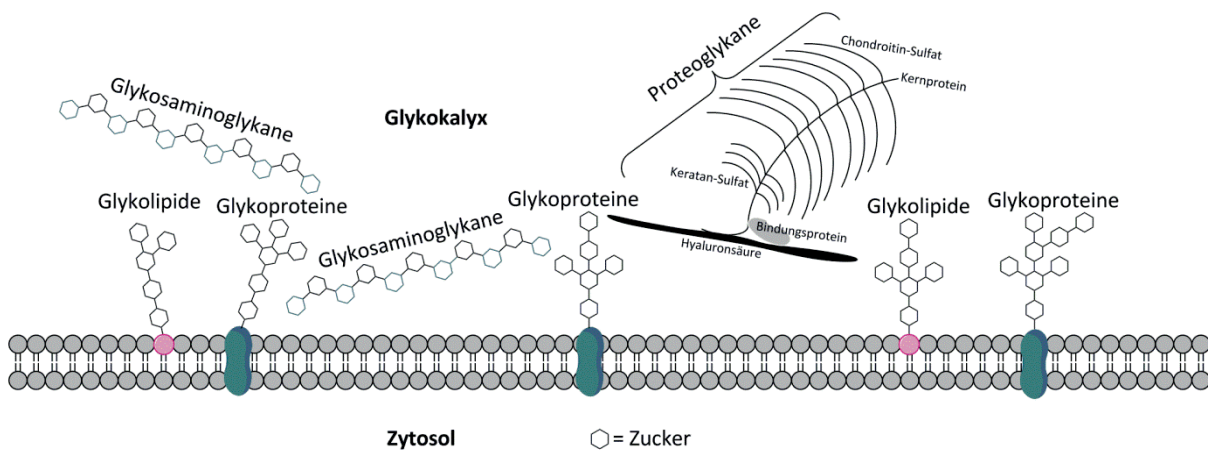


Abbildung 2.1.2| Aufbau der Glykokalyx. Zur Glykokalyx gehören Glykoproteine, Glykolipide, Proteoglykane, sowie Glykosaminoglykane. Die Oligosaccharide (Glykane) der Glykoproteinen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykolipiden bilden den äußeren Zellmantel.

Im Allgemeinen ummanteln die Kohlenhydratstrukturen die Zelle auf der extrazellulären Seite der Zelloberfläche (Abbildung 2.1.1).(Voet and Voet 2004) Durch die Neubildung von Glykoproteinen, Proteoglykanen, Glykolipiden, Glykosaminoglykanen (GAG), und assoziierten Plasmaproteinen wird die Glykokalyx ständig regeneriert.(Trouillon and Ewing 2013) Dabei werden die Proteinstrukturen der Glykoproteine im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) gebildet und in den