



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Etablierung und Charakterisierung eines primären  
porcinen Urothelmodells zur Evaluierung neuer  
Therapieansätze bei Harnwegsinfektionen“

verfasst von

Elena Elsa Sandrieser

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth



„ Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.“

(Marie Curie)



## **Danksagungen**

*Ich möchte mich recht herzlich bei a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth sowie bei a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für das Erwecken meines Interesses an der pharmazeutischen Technologie und insbesondere an der Arbeit mit Zellkulturen, sowie die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken.*

\*\*\*

*Weiters gilt mein Dank Mag. Clara Pichl für ihr aufopferndes Engagement und ihre hilfreiche Betreuung während der gesamten Arbeit an diesem Projekt.*

\*\*\*

*Bedanken möchte ich mich auch bei Mag. Dr. Lukas Neutsch für die Bereitstellung seines bemerkenswerten Wissens in wissenschaftlichen Belangen.*

\*\*\*

*Auch meinen DiplomandenkollegInnen, sowie der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die nette Atmosphäre danken.*

\*\*\*

*Besonders bedanken möchte ich mich des Weiteren bei meinen Eltern für einfach Alles.*

\*\*\*

*Ein weiterer Dank geht an Bonnie&Clyde sowie Charles&Diana, den Organspendern, dass sie ihren Körper nach ihrem Ableben nicht nur der Nahrungsmittelindustrie, sondern auch der Forschung zur Verfügung gestellt haben.*



# Inhaltsverzeichnis

<i>Einleitung und Problemstellung</i> .....	<b>11</b>
<i>Ergebnisse und Diskussion</i> .....	<b>16</b>
Isolierung und Kultivierung.....	16
Lektinbindungsstudien .....	19
Internalisationsstudien .....	23
<i>Zusammenfassung</i> .....	<b>26</b>
<i>Anhang A – Publikation</i> .....	<b>30</b>
<i>ABSTRACT</i> .....	<b>30</b>
<i>INTRODUCTION</i> .....	<b>31</b>
<i>MATERIALS AND METHODS</i> .....	<b>33</b>
1. Chemicals .....	33
2. Culture of primary porcine urothelial cells .....	33
2.1. Isolation of urothelial cells from a fresh porcine bladder .....	33
2.2. Subculture of primary porcine urothelial cells .....	34
2.3. Cryopreservation and thawing of primary porcine urothelial cells.....	34
3. Lectin-binding and internalisation studies on primary porcine urothelial cells .....	35
3.1. Flow Cytometry.....	35
3.2. Determination of the lectin binding capacity .....	35
3.3. Internalisation of cell-surface bound lectins .....	36
<i>RESULTS</i> .....	<b>37</b>
1. Isolation and cultivation .....	37
2. Lectin binding capacity of primary porcine urothelial cells.....	38
3. Lectin internalisation .....	39
4. Effect of long-term cultivation and cryopreservation on the lectin-cell interaction	40

<i>DISCUSSION</i> .....	<b>41</b>
<i>Anhang B – Weitere Ergebnisse im Rahmen der Diplomarbeit</i> ..	<b>59</b>
<i>1. Einleitung</i> .....	<b>59</b>
1.1 Harnwegsinfektionen: .....	59
1.2. uropathogener <i>Escherichia coli</i> (UPEC) .....	60
<i>2. Methoden</i> .....	<b>61</b>
2.1. Isolierung primärer porciner Urothelzellen.....	61
2.2. Subkultivierung primärer porciner Urothelzellen .....	62
<i>3. Ergebnisse und Diskussion</i> .....	<b>62</b>
3.1. Beurteilung des Kultivierungserfolges primärer porciner Urothelzellen .....	62
<i>4. Literaturverzeichnis</i> .....	<b>69</b>
<i>Curriculum Vitae</i> .....	<b>75</b>





## Einleitung und Problemstellung

Harnwegsinfektionen (urinary tract infection; UTIs) zählen weltweit zu den am häufigsten auftretenden bakteriellen Infektionen, wobei die Symptome davon abhängen, wie weit der Infekt im System der Harnwege aufgestiegen ist. Sie reichen von Schmerzen oder Jucken beim Urinieren (Algurie), häufigem Harndrang, bei dem nur kleine Mengen Urin abgesetzt werden können (Pollakisurie), und Unterbauchkrämpfen bis hin zu Bakteriämie [1]. Bei schwerem Verlauf besteht sogar ein beträchtliches Risiko an einer Pyelonephritis zu erkranken, die mit Symptomen wie hohem Fieber, Übelkeit und Erbrechen einhergeht und bei Nichtbehandlung zu Nierenversagen und Blutvergiftung führen kann [2].

Mit einer Häufigkeit von 40% nehmen UTIs eine führende Rolle unter den nosokomialen Infekten ein, aber auch bei nicht hospitalisierten älteren Patienten machen sie 25% der Infektionen aus [1,3,4,5], wobei Frauen weit häufiger betroffen sind als Männer [1,6]. Noch vor dem 24. Lebensjahr leidet rund ein Drittel aller Frauen zumindest einmal unter einem Harnwegsinfekt, bezogen auf das gesamte Leben steigt der Prozentsatz auf 50% an [1,7,8]. In 25-35% der Fälle erfolgt 3-6 Monate nach der Erstinfektion ein Rückfall [6,9], der eine neuerliche Behandlung erfordert.

In 70-95% der Fälle sind uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) für die UTI verantwortlich [10,11]. Beim UPEC handelt es sich um ein gram-negatives Bakterium, das auf seiner Oberfläche adhäsive, filamentöse Organellen trägt, die als Typ 1 Pili bezeichnet werden und den Krankheitserreger dazu befähigen, im Harntrakt aufzusteigen und die Harnblase zu besiedeln [1,2]. An der Spitze dieser Typ 1 Pili befindet sich das sogenannte FimH Adhäsion, mit dessen Hilfe das Bakterium mit Mannose-Bindungsstellen der Glykokalyx der Epithelzellen in Wechselwirkung treten und dadurch eine oberflächliche Anheftung erzielen kann. In weiterer Folge ist sogar eine Internalisation des Bakteriums durch die Wirtszelle möglich [12]. Im Inneren dieser Zellen können sich die Krankheitserreger rasch vermehren und Biofilm-ähnliche Einschlüsse, sogenannte intrazelluläre bakterielle Communities (IBCs) [13,14], bilden. Während die Keime im Lumen der Harnblase durch das Immunsystem des Wirtes und Antibiotika-Therapie beseitigt werden können, sind diese intrazellulär vorliegenden und in den IBCs eingeschlossen Keime für die Behandlung nicht oder nur sehr schwer erreichbar. Sie persistieren in der Harnblasenwand und stellen ein

Reservoir an Bakterien dar, die zu einem späteren Zeitpunkt für das Wiederauftreten des Infektes sorgen können.

Derzeit besteht die first-line Therapie von UTIs in der systemischen Gabe von Antibiotika wie Ampicillin, Fosfomycin, und Trimethoprim/Sulfamethoxazole [10,15]. Trotz korrekter Einnahme treten in einigen Fällen Rezidive auf, die einer neuerlichen Behandlung und somit einer weiteren Antibiotika-Gabe bedürfen. Der Dauergebrauch derartiger Wirkstoffe erhöht wiederum die Entwicklung von Resistenzen [15,16]. Aber nicht nur die Patienten leiden unter diesen Aspekten der momentanen Standardtherapie, auch die Wirtschaft und das Gesundheitssystem werden in Mitleidenschaft gezogen [1,9,10].

Eine mögliche Alternative zur systematischen Antibiotika-Behandlung stellt die intravesikale Therapie dar, bei der mittels Katheter der zur Behandlung eingesetzte Wirkstoff in gelöster Form direkt in die Blase instilliert wird und dort für 1-2 Stunden verbleibt. Die lokale Verabreichung erlaubt es, einerseits die Dosis des verwendeten Antibiotikums auf die minimale Hemm-Konzentration zu reduzieren und andererseits die Belastung des Patienten infolge der systemischen Administration und daraus resultierender Nebenwirkungen zu verringern. Jedoch sind auch dieser Therapieform Grenzen gesetzt, die einerseits auf dem anatomischen Aufbau der Blase und andererseits auf ihrer physiologischen Funktion beruhen. Die Epithelzellen der Harnblase zeichnen sich durch spezielle Eigenschaften aus, die das daraus entstehende Urothel zu der am schwierigsten zu penetrierenden Gewebebarriere im menschlichen Körper machen [17]. Die innerste Schicht der Blasenwand wird durch sogenannte Superfizialzellen gebildet, die die darunterliegenden Zelllagen schirmartig abdecken. Auf ihrer luminalen Seite bildet sich durch Verdichtung des Zytoplasmas eine unüberwindbare Barriere, die Crusta, aus. Eine bedeutende Rolle spielt dabei das für diesen Zelltyp spezifische Membranprotein *Uroplakin*, welches sich in Membranvesikeln befindet, die an der apikalen Seite der Superfizialzellen eingelagert sind. Aus physiologischer Sicht dient dieser Aufbau des Urothels dem Schutz der Epithelzellen und des umliegenden Gewebes vor dem unwirtlichen Milieu des Harns. Hinsichtlich der Therapie von Harnwegsinfekten, insbesondere chronischer und rezidivierender Formen der Erkrankung, stellt er jedoch ein bedeutendes Problem dar, da ein frei im Blasenlumen vorliegendes Wirkstoffmolekül oft nicht in der Lage ist diese Penetrationsbarriere zu überwinden und so keinen Einfluss auf die im Inneren der Epithelzellen als IBCs vorliegenden

Bakterien hat. Ein weiteres, generelles Problem der intravesikalen Therapie stellt die kontinuierliche Verdünnung des Wirkstoffes durch frisch sezernierten Urin und die Ausschwemmung desselben beim Absetzen des Harns dar. Da die Dauer der Instillation aufgrund des einsetzenden Harndrangs auch nicht beliebig verlängert werden kann, ist sehr oft eine häufige Wiederholung der Behandlung notwendig. Dies führt nicht nur zu einer verminderten Patienten-Compliance, sondern auch zu einer weiteren Belastung des Gesundheitssystems. Eine Möglichkeit den eben erwähnten Mängeln in der instillativen Therapie zu begegnen, besteht in der biorekognitiven Modifikation des Arzneimittels mit Lektinen. Dadurch könnte einerseits die Wirkung der Medikamente auf den Ort des Geschehens, nämlich die Blasenwand, konzentriert und andererseits die Verweildauer des Wirkstoffes in der Blase verlängert werden. Als natürliches Vorbild dient hier der die Entzündung auslösende Keim selbst. Er ist durch seine, an der Oberfläche ausgebildeten Typ 1 Pili in der Lage, an die Epithelzellen der Blasenwand zu adhären und so einer Ausschwemmung mit dem Urin zu entgehen. Als Ankerpunkt dienen ihm Mannose-Reste der Glykokalyx, ein alle tierischen Zellen umgebender Saum, der aus kovalent an Membranproteine oder seltener an Membranlipide gebundenen Oligosaccharidketten besteht, wobei jeder Zelltyp ein spezifisches Oberflächenmuster besitzt. Einen ähnlichen Mechanismus weisen auch die zur Modifikation des Arzneistoffes oder Trägersystems vorgeschlagenen pflanzlichen Lektine auf, die mit hoher Selektivität mit bestimmten Zuckern bzw. Polysacchariden interagieren [18,20]. Auf diese Weise sollte nicht nur eine Adhäsion des Wirkstoffes an der Zelloberfläche der Urothelzellen erzielt und die Ausspülung mit dem Urin verhindert werden, sondern es könnte auch die notwendige Inkubationsdauer mit dem Antibiotikum verkürzt und die Notwendigkeit wiederholter Instillationen verringert werden.

Um nicht nur die im Blasenlumen vorliegenden Keime sondern auch die in IBCs persistierenden UPEC erreichen zu können, muss der antibakterielle Wirkstoff, wie auch die Bakterien selbst, in das Zelllumen aufgenommen werden. In einigen Studien, die sich mit der Interaktion zwischen Lektinen und tierischen Zellen beschäftigten, konnte gezeigt werden, dass viele Lektine von Zellen internalisiert und in sauren Kompartimenten, wie Lysosomen, angereichert werden [20,21,22]. Lektin-dotierte Drug Delivery Systeme hätten demnach überdies den Vorteil, dass der Arzneistoff in die Nähe der persistierenden IBCs gebracht wird, um so auch auf diese schwer erreichbaren Krankheitserreger einwirken zu können. Durch eine derartige Verbesserung der intravesikalen Therapie sollte es möglich sein, die

Häufigkeit der Instillationen während eines Behandlungszyklus zu verringern und die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Rezidiven zu vermindern.

Um das vorgeschlagene alternative Therapiekonzept für Harnwegsinfektionen biopharmazeutisch evaluieren zu können, sollte für erste präklinische Studien ein geeignetes Zellkultur-Modell zur Verfügung stehen. Da es derzeit keine weltweit anerkannte, etablierte Zelllinie gibt, die die aktuelle Situation im nicht-malignen Blasengewebe widerspiegelt, sollte im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit ein Zellkultur-System etabliert und charakterisiert werden, das auf porcinen Primärzellen beruht. Dabei handelt es sich um Zellen, die direkt nach der Schlachtung aus einem intakten, gesunden Gewebestück gewonnen werden. Ein Einsatz menschlicher Primärzellen birgt nicht zu vernachlässigende Schwierigkeiten, wie der häufig nur eingeschränkte Zugang, die zeitlich unregelmäßige Verfügbarkeit nutzbarer Materials und die oft stark limitierte Überlebenszeit. Aufgrund der guten Vergleichbarkeit mit dem menschlichen Gewebe [23,24] und der besseren Verfügbarkeit adäquaten Gewebematerials scheinen porcine Urothelzellen ein geeignetes Ausgangsmaterial für die Etablierung eines Zellkultur-Modells für biopharmazeutische Fragestellungen zu sein.

Zunächst musste im Rahmen der Diplomarbeit überprüft werden, ob das aus der Literatur zur Verfügung stehende Protokoll [25], welches ursprünglich zur Isolierung primärer menschlicher Urothelzellen herangezogen wurde, auch für die Gewinnung von Urothelzellen aus Schweineblasen geeignet ist. Dabei sollte das vorliegende Protokoll auch hinsichtlich einiger interessant erscheinender Parameter, wie z.B. der Temperatur während des Stripping-Vorganges oder des Antibiotika-Zusatzes zum Kultivierungsmedium, variiert und für das neue Modell optimiert werden, um einerseits eine ausreichende Zellausbeute bei der Isolierung und andererseits einen zufriedenstellenden Kultivierungserfolg zu gewährleisten. Außerdem sollte überprüft werden, ob sich die erfolgreich isolierten Zellen für eine Langzeitkultivierung eignen und durch Kryo-Konservierung über einen längeren Zeitraum gelagert werden können, ohne dass es zu Veränderungen der Zellen kommt. Um dieses Zellkultur-Modell auch für die präklinische Evaluierung Lektin-dotierter Drug Delivery Systeme einsetzen zu können, war es darüber hinaus nötig, die Stabilität des Glykosylierungsmusters an der Oberfläche der kultivierten Zellen in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen und der Passagezahl zu charakterisieren, da bekannt ist, dass

Veränderungen in der Glykokalyx durch physiologische bzw. pathologische Prozesse, wie Zelldifferenzierung oder maligner Transformation, auftreten können.

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war demnach die Etablierung eines gesunden porcinen Urothelmodells, das sich für die biopharmazeutische Evaluierung biorekognitiv modifizierter Drug Delivery Systeme zur Optimierung der instillativen Therapie bei Harnwegsinfektionen eignet.

## **Ergebnisse und Diskussion**

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte zur Publikation

**„Primary porcine urothelial cells as a non-malignant in vitro model to evaluate advanced drug delivery strategies in the treatment of urinary tract infections“**

(siehe Anhang A) maßgeblich beigetragen werden.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag in der Etablierung und biopharmazeutischen Charakterisierung eines neuen Zellkultur-Modells für das Urothel, das für die Evaluierung Lektin-modifizierter Drug Delivery Systeme zur Behandlung von Harnwegsinfekten eingesetzt werden kann. Dieses Zellkultur-Modell sollte die Situation in nicht-malignem Blasengewebe widerspiegeln und zu einem späteren Zeitpunkt auch für Infektionsstudien zur Verfügung stehen, bei denen viabile Zellen mit UPEC infiziert werden, um das neue Therapiekonzept auf seine Anwendbarkeit hin überprüfen zu können. Da es momentan keine solche weltweit anerkannte, etablierte Zelllinie gibt, wurde für dieses neue Zellkultur-System von primären porcinen Urothelzellen ausgegangen. Dies hatte den Vorteil, dass etwaige Schwierigkeiten, die sich beim Einsatz menschlicher Primärzellen ergeben könnten, wie etwa der limitierte Zugang, die unregelmäßige Versorgung mit adäquaten, gesunden Gewebeproben und die eingeschränkte Überlebenszeit, unberücksichtigt bleiben konnten.

### **Isolierung und Kultivierung**

Für die Etablierung des porcinen Primärkultur-Modells war es zunächst notwendig, ein Isolierungsprotokoll [24], das in der Literatur für die Gewinnung menschlicher Urothelzellen beschrieben wurde, hinsichtlich der neuen Gegebenheiten zu modifizieren und zu optimieren. Für menschliches Gewebe gibt es offensichtlich keinen großen Unterschied, ob man den Stripping-Vorgang bei 4°C oder bei 37°C durchführt. Da dies nicht zwangsläufig auf porcine Gewebestücke übertragbar ist, wurde die geeignete Temperatur hier experimentell bestimmt. Ebenso wurde überprüft, welcher Antibiotika-Zusatz für das Kultivierungsmedium bei einer Langzeitkultivierung die besten Ergebnisse liefert. Dazu wurde einerseits Gentamycin in den Konzentrationen 20 bzw. 60 µg/ml (Genta 20 und Genta 60) und andererseits die ebenfalls häufig eingesetzten Antibiotika Penicillin/Streptomycin in

Kombination mit dem Antimykotikum Amphotericin B (P/S/A) dem Kultivierungsmedium zugesetzt.

Um die optimale Isolierungsstrategie feststellen zu können, wurden die einzelnen Samples hinsichtlich ihres Isolierungs- und Kultivierungserfolges in 3 Gruppen unterteilt. Gruppe 1 umfasst jene Samples, die sich sowohl erfolgreich isolieren ließen, als auch mindestens zweimal subkultiviert werden konnten. Zu Gruppe 2 zählen jene Samples, bei denen nach erfolgreicher Isolierung und Adhäsion an den Gewebekulturflaschenboden kein adäquates Wachstum zu beobachten und somit auch keine Subkultivierung möglich war. Gruppe 3 enthält jene Samples, bei denen nach der Isolierung keine erfolgreiche Adhäsion an den Boden der Gewebekulturflasche festgestellt werden konnte. Wie in *figure 1 (Anhang A)* ersichtlich, konnte bei 41 (62%) der insgesamt 66 Samples eine erfolgreiche Adhäsion (Gruppe 1 + 2) nachgewiesen werden, wobei 29 Samples (71%) davon auch erfolgreich subkultiviert werden konnten (Gruppe 1). Lediglich 25 Samples (38%) zeigten keinen ausreichenden Isolierungserfolg und mussten daher Gruppe 3 zugeteilt werden.

Einen entscheidenden Einfluss auf den Isolierungserfolg schien die Temperatur während des Stripping Vorganges auszuüben, wie aus Ebene 2 von *figure 1 (Anhang A)* zu erkennen ist. Obwohl ein Stripping bei einer Temperatur von 37°C über Nacht zu einer starken Trübung der Stripping-Solution führte, woraus abgeleitet werden könnte, dass sich die Urothelzellen hier problemlos vom restlichen Gewebe ablösen, zeigt der linke Ast von *figure1 (Anhang A)* deutlich, dass sich der Kultivierungserfolg nach Anwendung dieser Isolierungsmethode in Grenzen hielt. Während bei 22 Samples (64%) keine Adhäsion erfolgte und diese daher zu Gruppe 3 zu zählen sind, konnten lediglich 6 Samples (18%) bis zu Passage 2 oder mehr (Gruppe 1) kultiviert werden. Deutlich anders gestaltet sich das Bild bei einer Stripping Temperatur von 4°C über Nacht. Hier zeigten nur 3 Samples (9%) keine Anheftung an die Wachstumsunterlage, wohingegen 23 (72%) der auf diese Weise gestrippten 32 Samples erfolgreich in Kultur genommen werden konnten und daher Gruppe 1 zuzuordnen sind.

Der zweite Parameter, den es zu optimieren galt, war die Menge und Art des zum Kultivierungsmedium zugesetzten Antibiotikums. Der Einfluss antibiotischer Mittel auf den Wachstumserfolg wurde näher überprüft und charakterisiert, da zu einem späteren Zeitpunkt Infektionsstudien mit dem neu etablierten Zellkultur-System geplant sind, bei

denen gesunde Urothelzellen mit UPEC infiziert und anschließend einer gezielten antibiotischen Therapie mit neuen Drug Delivery Systemen unterzogen werden sollen. Um solche Infektionsstudien durchführen zu können, braucht man jedoch ein Zellkultur-System, das absolut frei von bereits bestehenden, anderen Infektionen ist. Da die Schweineblasen für die Isolierung der Primärzellen direkt vom Schlachthof bezogen wurden, wodurch eine unkomplizierte, billige und regelmäßige Versorgung mit stets frischem Material sichergestellt werden konnte, dort aber keine vollkommen aseptischen Bedingungen vorzufinden sind, konnte nicht gewährleistet werden, dass bei der Entnahme der Blase in der nicht sterilen Umgebung keine Kontamination von außen erfolgt. Außerdem kann auch nicht davon ausgegangen werden, dass die Schlachttiere selbst stets frei von jedweden Keimen sind. Insgesamt wurden 3 unterschiedliche antibiotisch wirkende Zusätze (Genta 20, Genta 60 bzw. P/S/A) zum Kultivierungsmedium untersucht. In Ebene 3 von *figure 1 (Anhang A)* ist der Einfluss der 3 getesteten Antibiotika vergleichend dargestellt. Da sich der Kultivierungserfolg im linken Ast (Stripping bei 37°C) generell in Grenzen hielt, lässt sich hier auch keine endgültige Aussage hinsichtlich des geeigneten Antibiotikums treffen. Konzentriert man sich jedoch auf den rechten Ast (Stripping bei 4°C), lässt sich feststellen, dass sich der Kulturerfolg bei Genta 60 (80% der Samples in Gruppe 1) und P/S/A (82% der Samples in Gruppe 1) kaum unterscheidet, wohingegen Genta 20 aufgrund der relativ geringen Anzahl an Samples in Gruppe 1 (55%) weniger geeignet erscheint. Obwohl es bis zu dieser Ebene den Anschein erweckt, als wären die beiden erstgenannten Zusätze, Genta 60 und P/S/A, äquivalent, muss, bezogen auf eine erfolgreiche Langzeit-Kultivierung, Genta 60 der Vorzug gegeben werden. Während von den in Medium mit P/S/A-Zusatz gezüchteten Samples nur 33% Passage 4 oder mehr erreichten, war dies bei 100% der Samples, die unter Genta 60 Einfluss kultiviert wurden, der Fall. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich eventuell das Antimykotikum Amphotericin B negativ auf das Zellwachstum auswirkt, wohingegen eine hohe Konzentration des Antibiotikums Gentamycin weder auf das Wachstum noch auf die Viabilität der Zellen einen negativen Einfluss zu haben scheint.

Um das neu etablierte Zellkultur-System noch detaillierter zu charakterisieren, wurden weitere allgemeine Daten zur Kultivierung der primären porcinen Urothelzellen erhoben und ausgewertet. Nach erfolgreicher Isolierung dauerte es durchschnittlich 14 (min.6 / max.20) Tage (n=35) bis die Monolayer konfluent waren und die Zellen subkultiviert werden konnten. Für die Weiterkultivierung wurde eine Zellsuspension mit  $2 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$

bzw.  $9 \times 10^5$  Zellen/25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche ausgesät und die Wachstumsdauer bis zur neuerlichen 80-100%igen Konfluenz betrug durchschnittlich  $13 \pm 4$  Tage, wobei die Zeitspanne zwischen Ansetzen und erneutem Passagieren von der für die Aussaat gewählten Zellzahl abhing. Setzt man die höchste Zellzahl ( $2 \times 10^6$  Zellen/25 cm<sup>2</sup>) ein, sind es  $12 \pm 2$  Tage bis zum Erreichen der Konfluenz, bei der mittleren ( $1 \times 10^6$  Zellen/25 cm<sup>2</sup>) und auch der niedrigsten Zellzahl ( $9 \times 10^5$  Zellen/25 cm<sup>2</sup>) dauert es jeweils  $15 \pm 3$  Tage, bis die Zellen wieder passagiert werden können (*figure 2, Anhang A*). Die Anzahl an Zellen, die aus einer 25 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche geerntet werden konnten, lag im Durchschnitt bei  $4.5 \times 10^6$ .

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich primäre porcine Urothelzellen, durch Einsatz eines optimierten Isolierungsprotokolls, das einen Stripping-Vorgang bei 4°C über Nacht vorsieht, in ausreichendem Maß isolieren und, wie aus den erhobenen Daten deutlich ersichtlich, auch unter Zusatz von Genta 60 zum Kultivierungsmedium erfolgreich in Kultur nehmen lassen. Sie sollten demnach als nicht-malignes Zellkultur-System für biopharmazeutische Fragestellungen geeignet sein. Durch die Möglichkeit des Antibiotikum-Einsatzes steht auch einer Anwendung dieses Zellkultur-Systems im Rahmen von Infektionsstudien nichts im Wege.

## **Lektinbindungsstudien**

Um die Eignung des neu etablierten Zellkultur-Systems, bestehend aus primären porcinen Urothelzellen, für die Entwicklung eines Therapiekonzeptes von Harnwegsentzündungen, das auf zielgerichteten, Lektin-modifizierten Arzneistoffen oder Trägersystemen beruht, zu evaluieren, wurden Bindungsstudien mit den für eine biorekognitive Modifikation geplanten Lektinen sowohl an Einzelzellen als auch an konfluenten Monolayern durchgeführt. Dadurch sollte die Glykokalyx der Urothelzellen in Kultur näher charakterisiert und deren Stabilität unter den zuvor optimierten Kulturbedingungen nachgewiesen werden. Lektine, die aufgrund der einfacheren Detektierbarkeit in fluoreszenzmarkierter Form eingesetzt wurden, sind pflanzliche Selektine und weisen daher eine ausgeprägte Selektivität für gewisse Mono- bzw. Oligosaccharide auf, an die sie mit zumeist hoher Spezifität binden (*table 1, Anhang A*). Für die vorliegende Studie wurden die kultivierten Zellen stets mit einer konstanten Menge an Lektin (500 pmol/ml) und unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen inkubiert. Um die Bindungskapazitäten der ausgewählten Lektine untereinander vergleichen zu können, wurde für die Auswertung

der Daten die gemessene Fluoreszenzintensität, zu deren Detektion ein Flowcytometer bzw. ein Mikrotiterplattenfluorimeter verwendet wurde, rechnerisch auf 1 Mol Fluorescein pro Mol Lektin bezogen. Insgesamt wurden fünf Lektine mit unterschiedlicher Zuckerspezifität für die Charakterisierung der Glykokalyx der porcinen Urothelzellen ausgewählt, wobei nicht nur das Bindungsmuster für frisch kultivierte Zellen bestimmt, sondern auch eine etwaige Änderung in den Zuckerstrukturen an der Zelloberfläche im Zuge einer Langzeitkultivierung bzw. Langzeitlagerung überprüft wurde. Deshalb wurden die Bindungsstudien an Samples mit unterschiedlicher Passagezahl sowie vor und nach einem Kryo-Konservierungs-Schritt untersucht. Um die Interaktion zwischen Lektin und Zelle auf die Zytoadhäsion zu beschränken, wurde die Inkubation bei 4°C durchgeführt. Bei derart niedrigen Temperaturen ist der zelluläre Stoffwechsel auf ein Minimum reduziert und es finden keine Energie-abhängigen Transportprozesse statt, die zu einer Internalisation von an die Zelloberfläche gebundenem Lektin führen könnten. Somit sollten die erhaltenen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) weitestgehend der rein oberflächlichen Membran-Bindung der Lektine entsprechen.

*Figure 3a (Anhang A)* zeigt die MFI-Werte und somit das Bindungspotential der ausgewählten Lektine an Einzelzellen nach 30 minütiger Inkubation mit 500 pmol Lektin/ml bei 4°C. Die höchste Bindungskapazität wies dabei WGA mit einer MFI von  $60.2 \pm 10.4$  auf, gefolgt von LCA, das mit einer MFI von  $18.9 \pm 3.8$  nur 31% der Affinität von WGA erreichte. PNA zeigte mit einer MFI von  $15.3 \pm 3.6$  nur 25% und UEA mit einem MFI-Wert von  $9.0 \pm 7.6$  lediglich 15% des Bindungspotentials von WGA. Mit einem Wert von  $1.3 \pm 1.9$  lag die mittlere Fluoreszenzintensität von DBA nur minimal über der Autofluoreszenz der Zellen ( $0.25 \pm 0.1$  MFI).

Um den tatsächlichen Gegebenheiten *in vivo* noch einen Schritt näher zu kommen und etwaige Veränderungen des Glykosylierungsmusters feststellen zu können wenn die Zellen in einem Gewebeverband vorliegen, wurden die Bindungsstudien unter gleichbleibenden Bedingungen (30 Minuten Inkubationsdauer, 50 µl einer 500 pmol /ml Lektin-Lösung, 4°C) auch an konfluenten Zellmonolayern durchgeführt (*figure 3b, Anhang A*). WGA zeigte mit einer MFI von  $610.8 \pm 84.0$  hierbei erneut die höchste Bindungsaffinität. Auch hinsichtlich des Bindungspotentials von LCA ( $203.2 \pm 44.1$  MFI), UEA ( $116.0 \pm 84.9$  MFI) und DBA ( $62.1 \pm 60.5$  MFI) konnten keine wesentlichen Unterschiede zu den Ergebnissen, die

für die Einzelzellen ermittelt wurden, festgestellt werden. Lediglich PNA wies mit einer MFI von  $314.3 \pm 91.0$ , verglichen zu den Ergebnissen der Einzelzellstudien, eine deutlich höhere Bindungskapazität auf. Dies lässt darauf schließen, dass Galaktosamin-Strukturen, mit denen das Lektin PNA interagieren kann, im Zuge der Entwicklung eines Zellverbandes stärker exprimiert werden, als dies bei Einzelzellen der Fall ist.

Diesen Ergebnissen zufolge scheint vor allem WGA ein geeigneter Kandidat für eine biorekognitive Modifikation der Arzneistoffe oder Trägersysteme zu sein, da es sowohl in den Untersuchungen an Einzelzellen als auch an Monolayern über das höchste Bindungspotential an Zuckerstrukturen in der Glykokalyx der Urothelzellen verfügte. Eine Alternative könnte die Verwendung von LCA darstellen, da dieses Lektin mit Mannose-Seitenketten in der Glykokalyx interagiert und daher ähnliche, oder sogar die gleichen Bindungsstellen wie der uropathogene E.coli (UPEC) erreichen könnte. Auch scheint das Bindungspotential von LCA sowohl an Einzelzellen als auch an Monolayern genügend stark ausgeprägt und konstant zu sein.

Durch Analyse des Lektin-Bindungsmusters von Samples unterschiedlicher Passagezahl konnte die Stabilität des Glykosylierungsmusters und damit die Eignung des Zellkultur-Modells für eine Langzeitkultivierung bestätigt werden. Hierfür wurden die Bindungskapazitäten der Lektine an Zellen einer frühen Passage (Passage 2) mit denen an Zellen einer höheren Passagezahl (Passage 6) verglichen. Bei Einzelzellen konnte dabei hinsichtlich der Lektine WGA ( $60.0 \pm 13.7$  bzw.  $60.4 \pm 6.7$  MFI), PNA ( $15.1 \pm 4.4$  bzw.  $15.4 \pm 2.0$  MFI) und LCA ( $19.6 \pm 1.2$  bzw.  $20.4 \pm 5.2$  MFI) keine signifikante Änderung der Bindung festgestellt werden (*figure 5, Anhang A*). Lediglich für UEA zeigte sich eine vergleichsweise starke Abnahme der Bindungskapazität von 60% ( $12.7 \pm 8.8$  auf  $5.2 \pm 3.3$  MFI). Ein ähnliches Bild ergibt sich auch bei Auswertung der Ergebnisse der Untersuchungen an Monolayern. Geringe Schwankungen wurden bei den Bindungsaffinitäten von WGA (+11%:  $573.7 \pm 98.5$  auf  $640.0 \pm 29.5$  MFI), PNA (+26%:  $263.6 \pm 102.5$  auf  $332.4 \pm 93.2$  MFI) und LCA (-20%:  $205.8 \pm 27.9$  auf  $163.9 \pm 37.4$  MFI) beobachtet, das Bindungspotential von UEA hingegen zeigte erneut stärkere Abweichungen (+60%:  $100.8 \pm 82.5$  auf  $160.3 \pm 106.6$  MFI) (*Daten nicht gezeigt*). DBA wurde aufgrund seiner sehr geringen MFI, die sehr nahe an der Autofluoreszenz der Zellen liegt, nicht weiter berücksichtigt. Das Bindungsverhalten des Lektins WGA an Einzelzellen wurde noch weiter im Detail untersucht, indem die mittleren

Fluoreszenzintensitäten über mehrere Passagen (1-21) hinweg miteinander verglichen wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass für alle 21 Passagen nur minimale Schwankungen im Bindungspotential dieses Lektins auftraten. Dies deutet erneut darauf hin, dass die Zusammensetzung der Glykokalyx im Hinblick auf die für eine WGA-Bindung essentiellen Zuckerketten auch über eine längere Kultivierungsdauer hinweg ausreichend konstant bleibt.

Insgesamt lässt sich aus der vergleichenden Studie ableiten, dass mit Ausnahme der UEA-spezifischen Fucose-Reste die Langzeitkultivierung keine signifikanten Auswirkungen auf die Zuckerstrukturen an der Membran von primären porcinen Urothelzellen hat. Die Anwesenheit von Fucose-Seitenketten wurde durch öfteres Passagieren doch relativ stark beeinflusst, wobei jedoch im Fall der Einzelzell-Untersuchung eine Reduktion und bei Monolayern ein Anstieg der UEA-Bindung beobachtet wurde. Eine genaue Abklärung dieses Phänomens muss allerdings späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

In einer weiteren Testreihe wurde überprüft, ob durch Kryo-Konservierung das Glykosylierungsmuster der porcinen Urothelzellen beeinflusst wird. Wie aus *figure 6 (Anhang A)* ersichtlich, unterschieden sich die Ergebnisse an Einzelzellen hinsichtlich der Bindung von WGA ( $60.4 \pm 6.7$  bzw.  $60.0 \pm 13.7$  MFI), PNA ( $15.4 \pm 2.0$  bzw.  $15.1 \pm 4.6$  MFI) und LCA ( $18.6 \pm 5.2$  bzw.  $19.2 \pm 1.2$  MFI) vor der Kryo-Konservierung und nach dem erneuten in Kultur Nehmen nicht signifikant voneinander. Für UEA wurde allerdings auch bei dieser Untersuchung eine Zunahme der Bindungskapazität um 60% ( $5.2 \pm 3.3$  auf  $12.7 \pm 8.8$  MFI) nach dem Auftauen ermittelt. Untersuchungen an Monolayern ergaben neben einer erhöhten Bindung von UEA ( $20.2 \pm 4.6$  auf  $68.8 \pm 29.0$  MFI) auch eine Änderung des Bindungspotentials von PNA ( $217.1 \pm 30.1$  auf  $440.3 \pm 70.3$  MFI) (*Daten nicht gezeigt*). Bei den anderen beiden Lektinen schien das Einfrieren und Auftauen der Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungskapazität auszuüben (WGA:  $477.3 \pm 46.8$  bzw.  $507.7 \pm 33.7$  MFI; LCA:  $242.1 \pm 8.5$  bzw.  $205.5 \pm 41.3$  MFI). Die DBA-Interaktion wurde aus den zuvor genannten Gründen auch hier nicht weiter charakterisiert. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass auch eine Lagerung der kultivierten porcinen Urothelzellen in flüssigem N<sub>2</sub> ohne wesentlichen Einfluss auf das Glykosylierungsmusters bleibt. Lediglich das Bindungspotential von UEA wies gewisse Schwankungen auf und im Monolayer-Versuch war auch eine Zunahme der Galaktosamin-Bindungsstellen zu beobachten, wie aus dem erhöhten

Bindungsausmaß von PNA abgeleitet werden konnte. Auch hier muss allerdings die endgültige Abklärung der Hintergründe weiteren Studien vorbehalten bleiben. Für WGA und LCA, die beiden Lektine, die für ein späteres Targeting von besonderem Interesse sein dürften, konnte jedoch erneut bestätigt werden, dass durch die Kryo-Konservierung der Zellen keine Änderungen im Bindungspotential zu erwarten sind.

## **Internalisationsstudien**

Neben der Verlängerung der Verweildauer und dem damit verbundenen retardierenden Effekt, die beide auf der Anheftung Lektin-modifizierter Drug Delivery Systeme an die Oberfläche der Urothelzellen beruhen, könnte ein Einsatz dieser pflanzlichen Selektine noch einen weiteren Vorteil mit sich bringen, der im Hinblick auf eine erfolgreiche Therapie von rezidivierenden Harnwegsinfekten nicht vernachlässigt werden sollte. In Studien zum Thema „Blasenkrebs“ konnte gezeigt werden, dass anfänglich oberflächengebundene Lektine aktiv in das Zelllumen aufgenommen werden und sich in endosomalen und lysosomalen Kompartimenten anreichern können [21,22]. Ein ähnlicher Vorgang ist auch für die Internalisation des UPEC und damit die Entstehung von IBCs (intrazellulären bakteriellen Communities), die am Auftreten von chronischen und rezidivierenden Harnwegsinfekten eine entscheidende Mitschuld tragen, mitverantwortlich. Könnte man nun mit den biorekognitiv modifizierten Arzneistoffen den gleichen Weg wie die Bakterien einschlagen und wäre somit in der Lage, auch die bis jetzt vor dem Antibiotika-Einfluss geschützten Keime zu eliminieren, wäre dies ein großer Fortschritt in der Behandlung schwer zu therapierender Formen von Harnwegsinfektionen.

Während man Bindungsstudien bei einer Temperatur von 4°C durchführt, um die Zellen in einem metabolisch inaktiven Zustand zu halten und Internalisations-Vorgänge zu unterdrücken, muss, wenn derartige Aufnahmemechanismen untersucht werden sollen, der Metabolismus der Zellen wieder in Gang gesetzt werden. Genau dies erfolgt bei der sogenannten *Pulse-Chase-Incubation* dadurch, dass man die Zellen zunächst 30 Minuten lang bei 4°C mit dem jeweiligen Lektin inkubiert (*Pulse*), wobei eine oberflächliche Adhäsion der Stoffe stattfindet. Anschließend wird der nicht-gebundene Lektin-Anteil durch mehrfaches Waschen der Zellsuspension entfernt. Für die weitere Inkubation wird die Temperatur jedoch wieder auf 37°C angehoben, um den Metabolismus-abhängigen Internalisations-Prozess zu reaktivieren (*Chase*). Es ist bekannt, dass das saure Milieu in den intrazellulären

Kompartimenten, in denen die Lektine nach der Internalisation angereichert werden, zu einer Abnahme der Fluoreszenz-Emission von Fluorescein führt. Der daraus resultierende Quench der MFI kann mittels Flowcytometer detektiert und dem Ausgangswert, der direkt im Anschluss an die *Pulse-Incubation* gemessen wurde, gegenübergestellt werden. Für Vergleichszwecke wurde der gesamte Versuch auch ausschließlich bei 4°C durchgeführt.

Die Internalisation wurde nur für die Lektine WGA, PNA und LCA bestimmt, da diese aufgrund ihres Bindungsverhaltens besonders interessant erschienen. Hierbei zeigte sich eine deutliche, zeitabhängige Reduktion der Fluoreszenzintensität bis zu einer *Chase-Incubations*-Dauer von 120 Minuten (*figure 4, Anhang A*). Die MFI von WGA nahm innerhalb dieser Zeitspanne um 48% ( $58.5 \pm 0.7$  auf  $30.4 \pm 2.7$  MFI), die MFI von LCA um 49% ( $16.7 \pm 0.4$  auf  $8.5 \pm 0.2$  MFI) und die MFI von PNA sogar um 61% ( $16.4 \pm 0.2$  auf  $6.4 \pm 0.3$  MFI) ab. Um zu bestätigen, dass sich die mit Fluorescein markierten Lektine tatsächlich in aziden Kompartimenten innerhalb der Zelle befinden, wurde die Zellsuspension nach Ende der *Chase-Incubation* mit Monensin behandelt. Monensin ist ein Ionophor, das in der Lage ist den pH-Gradienten zwischen dem Zytoplasma und endosomalen bzw. lysosomalen Kompartimenten aufzuheben und somit die reduzierte Fluoreszenzintensität von Fluorescein wiederherzustellen. Bei WGA stieg nach Monensin-Inkubation die MFI von  $30.4 \pm 2.7$  auf  $39.8 \pm 2.5$ , bei PNA von  $6.4 \pm 0.3$  auf  $9.4 \pm 0.4$  und bei LCA von  $8.5 \pm 0.2$  auf  $13.3 \pm 0.2$ . Für alle drei Lektine konnte somit die mittlere Fluoreszenz-Intensität zwar nicht vollständig, aber immerhin auf 63-80% des Ausgangswertes rückgestellt werden. Wie angenommen, ergab ein Zusatz von Monensin zu Samples, die über die gesamte Versuchsdauer hinweg bei 4°C inkubiert wurden, keinen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Damit kann angenommen werden, dass zumindest ein Teil des internalisierten Lektins tatsächlich in aziden intrazellulären Kompartimenten angereichert wird. Um ein detailliertes Wissen über die Aufnahmemechanismen von Lektinen in das Lumen kultivierter porciner Urothelzellen zu erhalten, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Dieser erste Einblick in das Internalisationsverhalten zeigt aber, dass es prinzipiell möglich sein sollte, mit eben diesen Lektinen modifizierte Antibiotika in das Zellinnere zu schleusen und somit zumindest in der Nähe der ansonsten unangetasteten IBCs anzureichern, wodurch sich eine verbesserte Behandlungsmöglichkeit für chronische und rezidivierende Formen von Harnwegsinfekten ergeben könnte.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass es durch Modifikation des Isolierungsprotokolls gelungen ist Zugang zu einem neuen nicht-malignen Zellkultur-System, basierend auf primären porcinen Urothelzellen, zu erlangen, das nicht nur durch einen passablen Isolierungserfolg sondern auch durch die Möglichkeit der Langzeitkultivierung und Langzeitlagerung überzeugt. Des Weiteren konnte durch Lektin-Bindungsstudien gezeigt werden, dass das neue Modell für die Evaluierung eines alternativen Drug Delivery Konzeptes zur Behandlung von Harnwegsinfektionen geeignet ist. Vor allem WGA und LCA scheinen für die beabsichtigte Modifikation der Arzneistoffe bzw. Trägersysteme geeignet zu sein, da sie eine ausreichend hohe Bindung an die Urothelzellen aufweisen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass ihre Zielstrukturen und somit ihr Bindungs-Potential weder durch häufiges Passagieren noch durch Kryo-Konservierung beeinflusst werden. Darüber hinaus konnte durch erste Internalisationsstudien festgestellt werden, dass die eingesetzten Lektine in das Zellinnere aufgenommen werden können. Somit besteht die Möglichkeit derart modifizierte Arzneistoffe näher an die in den IBCs vorliegenden Krankheitserreger zu bringen und damit eine vollständige Eradikation der Keime zu erreichen.

## **Zusammenfassung**

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde ein neues Zellkultur-Modell, basierend auf gesunden, primären porcinen Urothelzellen, etabliert, das für die biopharmazeutische Evaluierung biorekognitiv modifizierter Drug Delivery Systeme im Rahmen einer Verbesserung der Behandlung von schwierig zu therapierenden Formen von Harnwegsinfekten eingesetzt werden kann.

Das Hauptaugenmerk lag dabei zunächst auf der Optimierung eines Isolierungsprotokolls aus der Literatur, das ursprünglich für die Gewinnung primärer menschlicher Urothelzellen beschrieben wurde. Dabei wurde festgestellt, dass eine Stripping-Temperatur von 4°C über Nacht zu einer deutlich besseren Zellausbeute bei der Isolierung vor allem auch in Hinblick auf den nachfolgenden Kultivierungserfolg führte, als dies bei 37°C der Fall war. Bezüglich des antibiotischen Zusatzes zum Kultivierungsmedium führte Gentamycin in einer Konzentration von 60 µg/ml zum besten Ergebnis. Trotz der hohen Konzentration des Antibiotikums war hier kein negativer Einfluss auf das Wachstum oder die Viabilität der Zellen zu beobachten und eine Eradikation eventuell vorliegender Fremdkeime sollte dadurch gewährleistet sein. Generell konnte gezeigt werden, dass sich gesunde primäre porcine Urothelzellen erfolgreich in Kultur nehmen lassen und auch für eine Langzeitkultivierung geeignet sind.

Um zu eruieren, ob sich das neu etablierte Zellkultur-System auch zur Evaluierung Lektin-modifizierter Arzneistoffe oder Trägersystemen, die zur Behandlung von Harnwegsinfekten eingesetzt werden könnten, eignet, wurde eine erste Charakterisierung der Glykokalyx der porcinen Urothelzellen vorgenommen. Dazu wurden mit fünf ausgewählten Lektinen unterschiedlicher Zuckerspezifität Bindungsstudien durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass Weizenlektin sowohl für Einzelzellen als auch für Monolayer das höchste Bindungspotential besitzt, wobei dieses weder durch mehrmalige Subkultivierung noch durch Kryo-Konservierung beeinflusst wird. Weiters konnte festgestellt werden, dass auch LCA, das mit den gleichen oder zumindest ähnlichen Bindungsstellen wie der für viele Harnwegsinfekte verantwortliche UPEC interagiert, eine konstante Bindungskapazität aufweist und somit neben WGA einen geeigneten Kandidaten für eine biorekognitive Modifikation darstellen könnte. Bei den Lektine PNA und UEA waren Schwankungen in den Bindungskapazitäten in Abhängigkeit von der Passagezahl zu beobachten. Dies deutet auf

eine eventuelle Änderung in den Galaktosamin- und Fucose-Seitenketten an der Zelloberfläche der Urothelzellen im Laufe einer längeren Kultivierung hin.

Erste grundlegende Internalisationsstudien lieferten weitere Erkenntnisse, die im Rahmen einer Optimierung der instillativen Therapie von Harnwegsinfekten interessant sein könnten. So konnte mittels *Pulse-Chase-Incubation* und Einsatz des Ionophors Monensin die Aufnahme oberflächlich gebundener Fluoreszenz-markierter Lektine und deren Speicherung in endosomalen bzw. lysosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden. Lektine könnten somit dabei helfen, daran gekoppelte Arzneistoffe näher an die in den IBCs eingeschlossenen Bakterien heranzubringen, wodurch eine leichtere Eradikation der pathogenen Keime möglich sein sollte.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen also, dass primäre porcine Urothelzellen ein geeignetes Zellkultur-System für das Urothel im Rahmen erweiterter *in vitro* Untersuchungen im Bereich der Blase darstellen und auch zur biopharmazeutischen Evaluierung biorekognitiv modifizierter Drug Delivery Systeme zur instillativen Therapie und damit neuartiger therapeutischer Ansätze bei chronischen und rezidivierenden Formen von Harnwegsinfekten eingesetzt werden können.



**Primary porcine urothelial cells as a non-malignant *in vitro* model to evaluate advanced drug delivery strategies in the treatment of urinary tract infections**

Clara Pichl, Elena Sandrieser, Franz Gabor, Michael Wirth, Lukas Neutsch

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna,  
Vienna, Austria

To be submitted to BJU International

## ***Anhang A – Publikation***

### **ABSTRACT**

**Objective** To establish an optimised protocol for the isolation and cultivation of porcine primary urothelial cells and to evaluate their potential applicability in preclinical biopharmaceutics providing a valid and robust urothelial cell model for future eradication assays to improve the treatment of urinary tract infections.

**Materials and Methods** Primary cultures of porcine urothelium were established and characterised. The glycosylation state was assessed via lectin binding assays using both, single cells and monolayer culture. Internalisation studies should elucidate if energy-dependent uptake of lectins by porcine urothelial cells is possible. Furthermore, the impact of cryopreservation and long-term culture on the glycosylation pattern was determined via lectin binding assays.

**Results** The isolation efficiency and culturability of porcine primary urothelial cells was optimised. Wheat germ agglutinin revealed the highest surface binding capacity and energy-dependent uptake at 37°C was observed for all lectins. The glycosylation pattern showed reproducible results, independent of passage and cryopreservation.

**Conclusion** Primary porcine urothelial cells can serve as a valid, non-malignant model of the inner lining of the urinary bladder for preclinical assays. Due to the robust glycosylation pattern the presented cell culture model might be used to evaluate advanced glycan targeted delivery systems in the context of urinary tract infections.

**Keywords** porcine urothelium, UPEC, urinary tract infection, glycosylation pattern, WGA

## **INTRODUCTION**

Urinary tract infections (UTIs) are among the most common bacterial infectious diseases. They are characterised by a wide spectrum of symptoms ranging from mild irritative voiding to pain in the lower abdomen, but can also run a severe course with bacteraemia and progression to Pyelonephritis which can result in sepsis or renal failure if left untreated [1,2]. UTIs account for nearly 25% of all infections in non-hospitalised elderly patients and are the most common nosocomial infection, affecting 40% of patients annually [1,3,4,5]. Generally, women are afflicted at a much higher rate than men [1,6]. 50% of all women experience a UTI during their lifetime and one out of three women will experience at least one episode of UTI before the age of 24 [1,7,8]. Furthermore, 25-35% of the initial UTI episodes will progress to a recurrent infection within three to six months [6,9]. UTIs are generally treated systemically with antimicrobial agents including ampicillin, fosfomycin and trimethoprim/sulfamethoxazole [10,11]. However, the management of UTIs might become complicated when frequent retreatment or long-term prophylaxis are required that can lead to the problem of antibiotic resistance [10,12]. Due to their prevalence and high level of recurrence, UTIs are a burden not only for the patient but also for the health care system [1,9,11].

In 70-95% of all community-acquired UTIs, uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) are the causative pathogen [11,13]. By aid of adhesive filaments called type 1 pili, the gram-negative bacterium is able to ascend the urinary tract and colonize the bladder. Acting as a lectin, the FimH adhesin at the tip of these pili allows the bacterium to bind to mannosylated membrane proteins or lipids on bladder epithelial cells and thereby facilitates bacterial attachment to and invasion of uroepithelial cells [14]. Through replication inside the cytosol, UPEC form large biofilm-like bacterial inclusions, so-called intracellular bacterial communities (IBCs) [15,16]. In IBCs, the internalized bacteria are in a protective environment, making them less susceptible to various host defences and antibiotic treatments. Even if antibiotics are locally applied via instillation in the bladder cavity, a strategy performed in the framework of a rescue therapy in hospitalised patients, the drug is not able to sufficiently penetrate the epithelial barrier and therefore fails in the complete eradication of bacteria in the IBCs. The resurgence of UPEC from these quiescent reservoirs is believed to present a common source for recurrence.

The limitations of currently established therapy schedules require the development of innovative strategies for the improved delivery of antibiotics [10]. Constant washout processes and dilution with freshly secreted urine are critical deficiencies that could be overcome by extended residence time in the bladder cavity and resultant appropriate accumulation at the urothelial target. To date several approaches have been evaluated to improve the interaction between the ligand and complementary epitopes on the cell surface. In analogy to the efficient natural invasion of UPEC, which can not only bind, but actively trigger uptake in cells via its FimH lectin domain, the adhesion to mannose residues might be a promising biorecognitive delivery approach. The modification of drug molecules or drug carrier systems with carbohydrate-binding lectins [17] has emerged as a potent tool to implement such targeting strategies. The resultant increase in the drug-cell interaction might lead to a prolonged exposure time, appropriate accumulation at the urothelial target and could facilitate improved delivery to IBCs. This principle has successfully been demonstrated [18,19,20] for bladder cancer cells.

Initial biological data are required to develop and evaluate targeted drug delivery systems. To date, *in vitro* models have emerged to be a very useful tool to gain first biological/mechanistical insights without need for animal experiments and human testing. The cell culture model used should be as close as possible to the situation *in vivo*, therefore primary cells might be a promising approach. In contrast to human material from healthy donors that implies numerous difficulties such as restricted access to samples in sufficient quantity, porcine urothelial cells are easily obtainable and feature marked anatomical and physiological similarities to the human urinary tract [21,22].

To be of use for biopharmaceutical evaluation, the procedures to establish a porcine primary culture need to show isolation efficiency, selectivity and possible long-term culturability. To be of specific use for glycan-targeted strategies, it is necessary to check for potential heterogeneity in the respective target epitopes, in the present case the glycosylation pattern needs to be characterised in dependence of culture conditions and time.

Hence, in this study we present an optimised isolation and culturing protocol to establish a robust *in vitro* culture of primary porcine urothelial cells. Furthermore, we characterise the surface-exposed glycans via lectin-mediated binding and uptake assays to evaluate the suitability as a valid model for preclinical biopharmaceutical assays.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **1. Chemicals**

Fluorescein-labeled lectins from *Triticum vulgare*, *Arachis hypogaea*, *Lens culinaris*, *Ulex europaeus* and *Dolichus biflorus* were obtained from Vector laboratories (Burlingame, USA). Hanks' balanced salt solution (*HBSS plus Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>*; *HBSS without Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>*), Gibco® Antibiotic-Antimycotic (containing 10000 U/ml of penicillin, 10000 µg/ml of streptomycin, and 25 µg/ml of amphotericin B) (*P/S/A*), keratinocyte serum-free medium (*K-SFM*), epidermal growth factor (*EGF*) and bovine pituitary extract (*BPS*) were purchased from Gibco® Life technologies (Carlsbad, USA). Aprotinin, collagenase Type IV, cholera toxin, dimethyl sulfoxid (*DMSO*) and monensin were supplied by Sigma Aldrich® (Steinheim, Germany/St. Luis, USA). Gentamycin was from Biochrom AG (Berlin, Germany) and trypsin inhibitor was obtained from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany).

### **2. Culture of primary porcine urothelial cells**

#### **2.1. Isolation of urothelial cells from a fresh porcine bladder**

Porcine bladders were obtained from a local abattoir from healthy adult porks slaughtered under veterinarian surveillance. For transport, the harvested bladders were placed into transport buffer (*see table 1*). Further processing for isolation of viable urothelial cells was performed according to an established protocol with slight modifications [23] in order to optimise isolation efficiency and selectivity. Thereby, the bladders were carefully opened and cut into 1 cm<sup>2</sup> pieces under sterile conditions without harming the urothelium. After extensive rinsing with PBS containing 0.1% (w/v) EDTA, the bladder fragments were incubated in stripping solution (*table 1*) to loosen the urothelium from the underlying connective tissue. After at least 12 h of incubation at either 4°C or 37°C, subsequent processing steps were performed at 37°C. To detach the urothelial cells from the stroma, the tubes were vigorously shaken followed by a centrifugation step of the cell suspension (1000 rpm, 5 min, RT). After withdrawal of the

supernatant, the cell pellet was resuspended in 1 ml collagenase Type IV (100 U/ml in HBSS) and incubated for 20 min. The digested cells were diluted with 3 ml of K-SFM (*table 1*). Microbial contamination should be impeded by adding genta 20, genta 60 or 1% (v/v) P/S/A, respectively. After centrifugation (1000 rpm, 5 min, RT) and careful aspiration of the supernatant, the cell pellet was resuspended in 5 ml of K-SFM and seeded into 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks, coated with 1% (w/v) bovine skin gelatine (gelatine).

## **2.2. Subculture of primary porcine urothelial cells**

Cells were cultivated in K-SFM in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere at 37°C. After growing to 80 to 90% confluence, cells were subcultured by trypsination. An incubation step with 2 ml PBS containing 0.1% EDTA (w/v) for 5 min at 37 °C, resulting in cell rounding, was followed by a second incubation step (5 min, 37°C) with 1 ml Trypsin-EDTA in order to detach the cells from the surface. The trypsination was stopped by adding 5 ml of K-SFM, containing 2.5 mg of Trypsin Inhibitor. After centrifugation (1000 rpm, 5 min, RT) and careful aspiration of the supernatant, the cell pellet was resuspended in 5 ml of K-SFM. Further cultivation was performed on gelatine coated 25 cm<sup>2</sup> tissue flasks at a concentration of 1 x 10<sup>6</sup> cells.

For monolayer studies, cells were seeded in 96-well microplates (96-WMP) at a concentration of 50,000 cells/well and grown to confluence.

## **2.3. Cryopreservation and thawing of primary porcine urothelial cells**

For long-term storage, the cells were harvested by trypsination as described above. After centrifugation (1000 rpm, 5 min, RT), the cell pellet was resuspended in 1 ml of freezing-medium, consisting of 70% K-SFM, 20% FCS and 10% DMSO and transferred into a 2 ml CryoGen™ vial. For the freezing process, a Nalgene "Mr. Frosty" Freezing Container filled with 2-Propanol was used to provide a constant cooling rate of approximately 1°C/min. After pre-cooling for 30 min at 4°C, the container was transferred to -80°C for cell freezing. After 24 h, the CryoGen™ vials were finally placed in a Dewar vessel containing liquid nitrogen for long-term storage.

For recovery of frozen cells, the cell suspension was quickly thawed in a water bath at 37°C immediately after removal from the liquid nitrogen and diluted with 10 ml

K-SFM at the earliest possible time point. To remove excessive DMSO, the cell-suspension was centrifuged (1000 rpm, 5 min, RT) and the pellet resuspended in 5 ml of K-SFM and seeded into a gelatine-coated 25 cm<sup>2</sup> tissue flask.

### **3. Lectin-binding and internalisation studies on primary porcine urothelial cells**

#### **3.1. Flow Cytometry**

Flow cytometric measurements were carried out on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, California). Data were acquired using a forward versus side scatter gate to confine the analysis to the single cell population and exclude cell aggregates and debris. Cell-associated fluorescence intensity was detected at 485/525 nm (ex/em) and the mean channel number of the logarithmic fluorescence intensities of individual peaks was used for further calculations. Amplification of the fluorescence signals was adjusted to put the autofluorescence signal of unlabelled cells in the first decade of the four-decade log range. For each measurement, data of at least 4,500 cells were collected and all assays were performed in triplicate.

#### **3.2. Determination of the lectin binding capacity**

Binding of lectins at the surface of primary porcine urothelial cells was investigated using both single cells and monolayer culture at 4°C, where cells are in a quiescent state and energy-dependent turnover is reduced to a minimum.

Single cells were processed immediately after trypsination. 1 ml of cell suspension (500,000 cells) was incubated with 300 µl of the respective lectin (500 pmol/ml) (*see table 2*) in PBS plus Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (PBS) for 30 min at 4°C. To remove unbound lectins, cells were washed by centrifugation (1000 rpm, 5 min, 4°C), resuspended in 1 ml of particle-free PBS, followed by flow cytometric analysis to determine the relative cell-associated fluorescence intensity (RFI). In order to estimate the cell autofluorescence, control samples with unlabelled cells were included in all experiments and the obtained values were subtracted from the binding data quoted. Furthermore, RFI values were corrected to an apparent conjugation ratio of 1.0 mol fluorescein per mol lectin (F/P = one) to ensure direct comparability.

For monolayer experiments, cells were cultured in 96-well plates and used at 100% confluency which was typically obtained 4 to 6 days after seeding. Confluent monolayers were washed twice with 100  $\mu$ l of PBS prior to incubation with 50  $\mu$ l of the respective lectin solution (500 pmol/ml) for 30 min at 4°C. After removal of unbound lectin by conducting 4 washing cycles with 100  $\mu$ l of PBS, the relative fluorescence intensities were determined using a microplate fluorimeter (485/525 nm) (Infinite M200, Tecan, Grödig, Austria). Negative controls were prepared by using PBS instead of lectin solution for incubation, and the values obtained were subtracted from the data quoted. All data were corrected to an apparent F/P ratio of 1.0 as described above. All experiments were carried out in triplicate.

### **3.3. Internalisation of cell-surface bound lectins**

In order to assess energy-dependent uptake of lectins by primary porcine urothelial cells, internalisation of the respective lectins was studied in detail using single cells. As cell metabolism and therefore energy-dependent transport processes are down regulated at 4°C, interaction between the lectin and the cell are limited to mere cytoadhesion, whereas at 37°C cells are metabolically active allowing uptake and accumulation within acidic endosomal or lysosomal compartments. Since the fluorescence emission of fluorescein is known to be reduced in acidic environment, the resulting quench in RFI was determined by flow cytometry and was compared to the initial values. Therefore, 1 ml of single cell suspension (500,000 cells) was incubated with 300  $\mu$ l of lectin solution (500 pmol/ml) for 30 min at 4°C. After removing unbound lectins as described above, the samples were further incubated for 0 to 120 min at 4°C and 37°C, respectively. At 37°C the RFI was determined at 30, 60, 90 and 120 min, whereas the 4°C sample values were detected at 0 and 120 min. Finally, cells were incubated for 10 min at room temperature with 10  $\mu$ l of a 2.2 mM monensin solution and the RFI was assessed again.

## **RESULTS**

### **1. Isolation and cultivation**

In order to optimize the isolation efficiency and selectivity and to achieve successful long-term-cultivation, an established protocol for the isolation of porcine urothelial cells was evaluated and modified [23]. In total, 66 samples were established. The parameters varied were the temperature during the overnight stripping process comparing an incubation at 37°C (34 samples) and 4°C (32 samples), respectively and the concentration of the antibiotic used for supplementation of the culture medium (*see table 1*). In order to determine the most promising isolation strategy, the cell samples were classified in three groups according to their cultivation success (*figure 1*). Class 1 consisted of samples which could successfully be established and could be subcultivated at least twice. Class 2 included samples which adhered to the growth support, but failed to reach confluency. More than 90% of the urothelial cells of the samples in class 3 did not adhere to the growth support after isolation.

Overall, 41 out of 66 samples (62%) were seeded successfully and adhered to the culture flask (*figure 1*), of which 29 samples belonged to class 1. In further processing, a remarkable influence was observed regarding the temperature during the stripping process. In case of the 37°C stripping procedure, only 6 (18%) of the samples could be assigned to class 1, whereas 22 (64%) of the samples showed no adhesion at all. Reversed tendencies could be observed when the 4°C samples were taken into consideration, including 23 (72%) of successfully established samples, whereas just 3 (9%) did not adhere at all. Therefore, the stripping at 4°C conditions turned out to be the more effective strategy with 23 out of 32 successfully established samples.

Media with different supplementations of antibiotics, containing genta 20, genta 60 or P/S/A, respectively, were examined to investigate the influence of antibiotic treatment. In case of the 4°C samples, little influence on cultivation was observed. 80% of the samples treated with genta 60 and equally 82% of the P/S/A samples belonged to class 1, whereas genta 20 was ruled out as a possible supplementation strategy with just 55% of successfully established samples. Interestingly, the values of the 37°C samples showed considerable variations concerning their culturability, though they did not allow for further conclusions on the antibiotic influence, due to the low number of successfully cultivated samples. As indicated in *figure 1*, long-term culture revealed problems concerning the P/S/A treatment

as the cell growth was arrested and just 33% of the samples reached passage 4, potentially caused by the antimycotic component.

High-dose antibiotics were not observed influencing growth or viability of the cells, thus, depending on the focus lying on optimal (conditions of) isolation and cultivation genta 60 may be the antibiotic of choice.

In general, primary explant cultures achieved confluence in a mean of 14 (6-20) days (n=35). The confluence time of each passage is shown in *figure 2*. Subcultures were seeded at a concentration of  $2 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  and  $9 \times 10^5$  cells per  $25 \text{ cm}^2$  growth support, respectively. The mean time to reach confluence was  $13 \pm 4$  days ( $12 \pm 2$  days for the high,  $15 \pm 3$  days for the median and  $15 \pm 3$  days for the low concentration, respectively). The number of cells in one tissue culture flask achieved on an average  $4.5 \times 10^6$  cells/ $25 \text{ cm}^2$ .

## **2. Lectin binding capacity of primary porcine urothelial cells**

To estimate the applicability of the primary porcine urothelial cells as a valid *in vitro* model for biorecognitive interaction assays, fluorescein-labeled lectins with distinct carbohydrate specificities (*table 2*) were selected in order to determine the binding capacity and thus the glycosylation pattern at their surface. Since the cellular metabolism and therefore energy-dependent transport processes are down regulated at lower temperature levels, incubation temperature was set to  $4^\circ\text{C}$  limiting the interaction between the lectin and the cell basically to cytoadhesion. As shown in *figure 3a*, the binding potential to single cells decreases in the order: WGA  $\gg$  LCA  $>$  PNA  $>$  UEA  $>$  DBA. Highest surface binding capacity was assessed for WGA amounting to  $60.2 \pm 10.4$  RFI after incubation with 500 pmol/ml WGA. This fluorescence intensity was 3.1-, 3.9-, and 6.7-fold higher as compared to LCA, PNA and UEA, respectively. DBA generally yielded very low MFI values hardly above the autofluorescence of the cells.

Since cells in monolayer configuration might be characterised by differences in their glycosylation pattern, possible alterations of the lectin binding potential as compared to the single cell state should be evaluated (*figure 3b*). No essential differences were found for WGA, which still exhibited the highest cell interaction ( $610.8 \pm 84.0$  RFI). Also for LCA, UEA and DBA no major changes could be investigated. Interestingly, PNA with a RFI of  $314.3 \pm 91.0$  as compared to the single cell level revealed pronounced cell affinity in case of monolayers. This might be due to certain subpopulations of membrane glycoproteins

potentially exposed in monolayer configuration. Thus, depending on looking for an optimal bioadhesion target, WGA might be the moiety of choice.

### 3. Lectin internalisation

While lectin-binding to the cell membrane is predominant at 4°C, internalization of the membrane-bound lectin can be observed at 37°C. Since the fluorescence emission of fluorescein is known to be reduced in acidic environment, the decreasing RFI values at 37°C might be due to enrichment of the lectins within intracellular endosomal or lysosomal compartments. WGA, PNA and LCA were chosen for more detailed analysis of the internalization pathway, since they turned out to be the lectins of primary interest in regard to their binding behaviour.

To achieve a first insight in the uptake pathway, single cells were incubated in a metabolically quiescent state at 4°C to allow interaction with the cell membrane, followed by removal of unbound ligand from the surface (*pulse incubation*). To initiate energy dependent uptake the subsequent *chase-incubation* was performed at 37°C up to 120 min. The resulting quench in RFI was determined by flow cytometry and compared to the initial values (*figure 4*). Concerning WGA, a time-dependent decrease in fluorescence intensity could be assessed resulting in a difference of 48% after 120 min ( $30.4 \pm 2.7$  RFI) as compared to the fluorescence values obtained after *pulse-incubation* ( $58.5 \pm 0.7$  RFI). For PNA and LCA, differences of 61% and 49% were determined during the *chase incubation* (between samples incubated at 4°C ( $16.4 \pm 0.2$  RFI for PNA and  $16.7 \pm 0.4$  RFI for LCA, respectively) and 37°C ( $6.4 \pm 0.3$  RFI and  $8.5 \pm 0.2$  RFI)). Upon treatment with monensin, resulting in a compensation of the pH-gradient between the cytoplasm and the acidic compartments, the reduced RFIs could be at least partially restored. For WGA the values increased from  $30.4 \pm 2.7$  RFI (120 min, 37°C, without monensin) to  $39.8 \pm 2.5$  RFI (120 min, 37°C, with monensin). Concerning PNA and LCA, an increase from  $6.4 \pm 0.3$  RFI to  $9.4 \pm 0.4$  RFI and from  $8.5 \pm 0.2$  RFI to  $13.3 \pm 0.2$  RFI was observed. However, the addition of the ionophore did not result in a complete recovery to the initial values measured immediately after the *pulse-incubation*. However, as restored to 63-80% of their initial values, WGA and LCA showed an adequate response. As expected, control samples retained at 4°C revealed no differences in their fluorescence intensity values prior and after monensin treatment (*data not shown*).

#### **4. Effect of long-term cultivation and cryopreservation on the lectin-cell interaction**

In order to follow alterations in the glycosylation pattern during cultivation and after cryopreservation, binding experiments were additionally performed on single cells of different age (passage 2 and passage 6, respectively). Interestingly, after prolonged cultivation steps, the binding capacity of WGA, PNA as well as LCA was only slightly altered ( $60.0 \pm 13.7$  to  $60.4 \pm 6.7$ ,  $15.1 \pm 4.4$  to  $15.4 \pm 2.0$  and  $19.6 \pm 1.2$  to  $20.4 \pm 5.2$ , respectively), whereas the binding capacity of UEA decreased notably by 60% (*figure 5*). Comparable results could be observed when examining the binding capacity of single cells after cryopreservation. At a concentration of 500 pmol lectin/ml, no significant alterations could be detected after the thawing step for WGA, PNA as well as LCA. The preservation step clearly influenced the binding capacity of UEA, showing a 60% increase in its binding capacity, however due to its huge standard deviation a high variability in the interplay between cell and lectin was indicated (*figure 6*). DBA yielded very low RFI values, scarcely above the autofluorescence of the cells and therefore was not taken into consideration.

## **DISCUSSION**

In an effort to develop novel strategies for the treatment of urinary tract infections, a cell culture model consisting of primary porcine urothelial cells was evaluated according to its selectivity, robustness and applicability. Primary urothelial cell culture turned out to be an ideal tool to provide important insights into the mechanisms regulating normal urothelium, since they are robust and aberrances caused by immortalization protocols are avoided. Human material implies numerous difficulties such as the restricted access to samples in sufficient quality, therefore we decided for a porcine urothelial model that provides easy access and comparable anatomical and functional behaviour to that of human [21]. For harvest of urothelial cells and establishment of a primary cell culture an established protocol was used. In contrast to the excellent growth of human urothelial cells stripped at either 4°C or 37°C, as observed by Southgate et al. [23], growth of porcine urothelial cells was limited when stripped under 37°C conditions. Though the dissociation of the urothelium from the basement membrane at 37°C led to increased numbers of cells (author's observation, data not shown), the number of successfully established primary cultures was rather low. In contrast, the cell samples stripped at 4°C showed excellent viability and plating efficiency.

UPEC is known for its ability to persist in IBCs that are supposed to be the source of recurrent UTIs [10,11]. To establish a valid model for future eradication assays, antibiotic supplementation to the culture medium must not impede cell viability and long-term culturability. Therefore, the impact of antibiotics at different concentrations was evaluated. While the growth of cells treated with P/S/A was arrested eventually due to the antimycotic component that revealed a negative impact on cell viability (data not shown), Genta 60 turned out to be a promising candidate with 80% of successful culturing attempts and satisfying long-term culturability. The antibiotic supplementation should lead to a valid, pathogen-free cell model enabling not only use of slaughterhouse-obtained material without problems, but also application in eradication assays.

In analogy to the natural invasion of UPEC via mannose residues, lectin-mediated targeting might be a promising approach for an enhanced treatment of UTIs. Former studies revealed that the biorecognitive interaction between lectins and the cell surface might allow for prolonged residence times and appropriate accumulation at the urothelial target. In addition, their comparatively robust nature allows for an application even in the harsh environment of the urinary tract [17,18,19,20]. To get an idea of the potential utility of

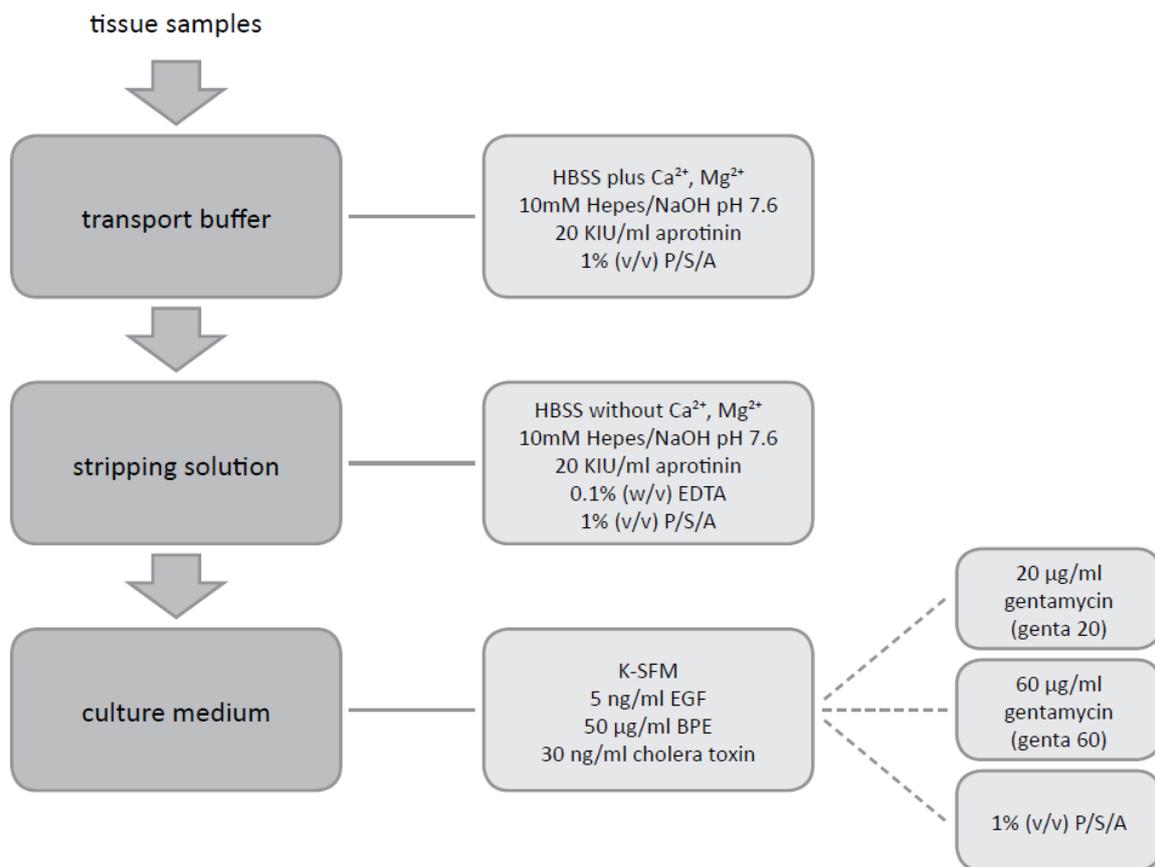
different lectins as bioadhesive tools for the delivery of drugs to urothelial cells, their interaction with the cell membrane was investigated. Lectin binding to single cells decreased in the order WGA >> LCA > PNA > UEA > DBA. Since WGA yielded the highest binding potential, N-acetyl-D-glucosamine and sialic acid residues seem to be highly abundant and easily accessible in the porcine urothelial glycocalyx. Due to its binding site which is similar to that of UPEC [9], also the binding of LCA was of particular interest. However, LCA binding was 3.1-fold lower as compared to WGA. When cells in monolayer configuration were examined, no essential differences to the single cell state were found except for PNA. This might be due to certain subpopulations of membrane glycoproteins potentially exposed in monolayer configuration. Since high binding rates are important for carbohydrate-mediated targeting, WGA would be the moiety of choice.

Since UPEC is known to persist in IBCs after invasion into uroepithelial cells [10,11], the potential uptake of the plant lectins was further investigated. Due to their promising binding behaviour, WGA, PNA and LCA were chosen for these assays. Since the fluorescence emission of fluorescein is reduced at acidic pH, a decrease of RFI values during chase-incubation at 37°C points to an accumulation of respective labelled lectins within acidic intracellular compartments [25]. Monensin is able to compensate the pH-gradient between these compartments and the cytoplasm and can thus be added to confirm the assumed internalisation. However, total recovery of the initial values could not be achieved, which might be due to a possible dissociation of initially membrane-bound lectins, but no fluorescence was detectable in the supernatant of the samples during additional studies (data not shown). Moreover, fluorescence microscopy demonstrated an uptake at 37°C. Hence, the lectins might accumulate in other, not exclusively acidic, intracellular compartments. Due to their cytotoxic effects, lectins are expected not only to mediate prolonged exposure time and accumulation at the urothelial target which counteract natural limitations, such as the loss of drug by urinary excretion, but also to enhance the therapeutic effect of coupled antibiotics via facilitating delivery also to IBCs.

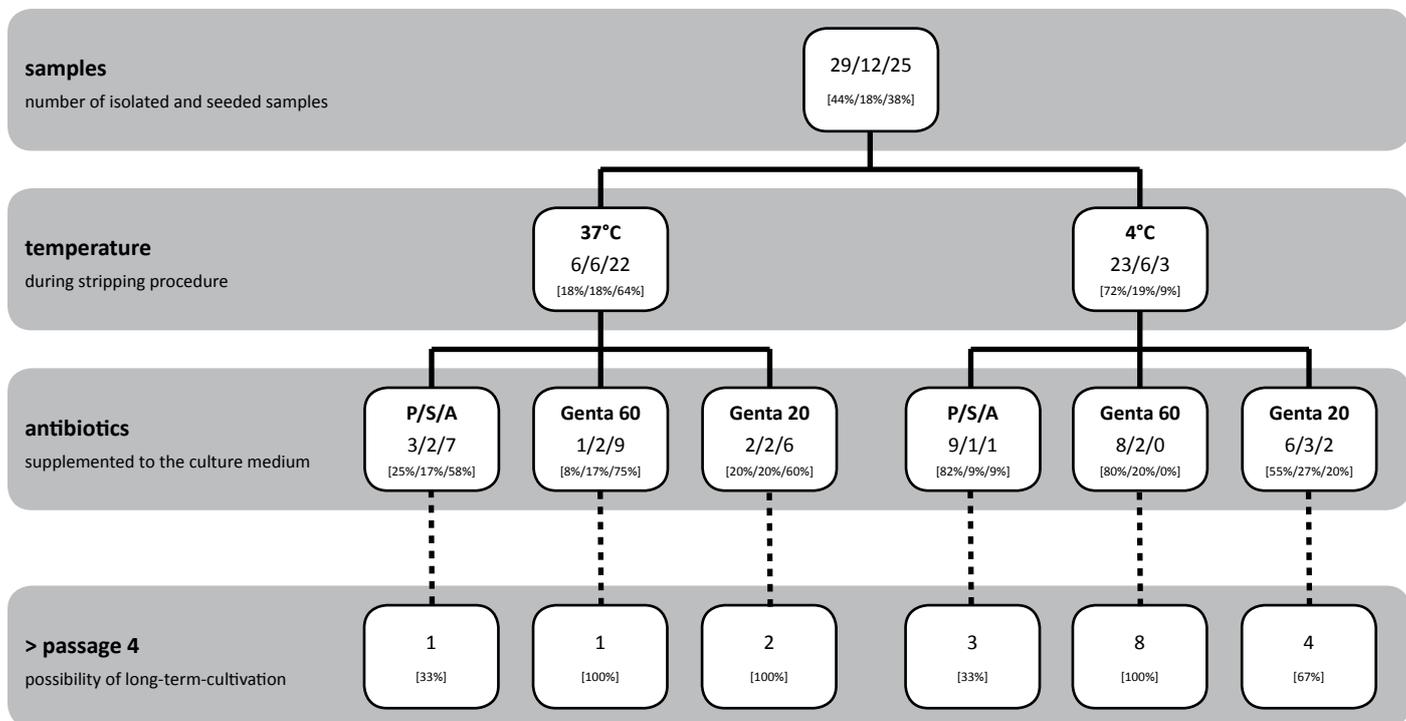
In contrast to limited survival times described in literature [24], the established porcine cell culture showed normal morphological behaviour even after a long time in culture. Furthermore, eventual alterations in the glycosylation pattern during cultivation and after cryopreservation were examined. In additional single cell experiments, no differences in the lectin binding capacity were found.

All in all, the presented primary porcine cell culture turned out to be a valid model for advanced biopharmaceutical assays in the urothelial setting. Moreover, the biorecognitive interaction between lectins and the porcine urothelium was characterised by a high binding strength and robustness. Thus the presented cell culture model might be applied also for the evaluation of glycotargeted delivery approaches in an effort to enhance the local residence time and accumulation at the urothelial target for a more efficient treatment of UTIs.

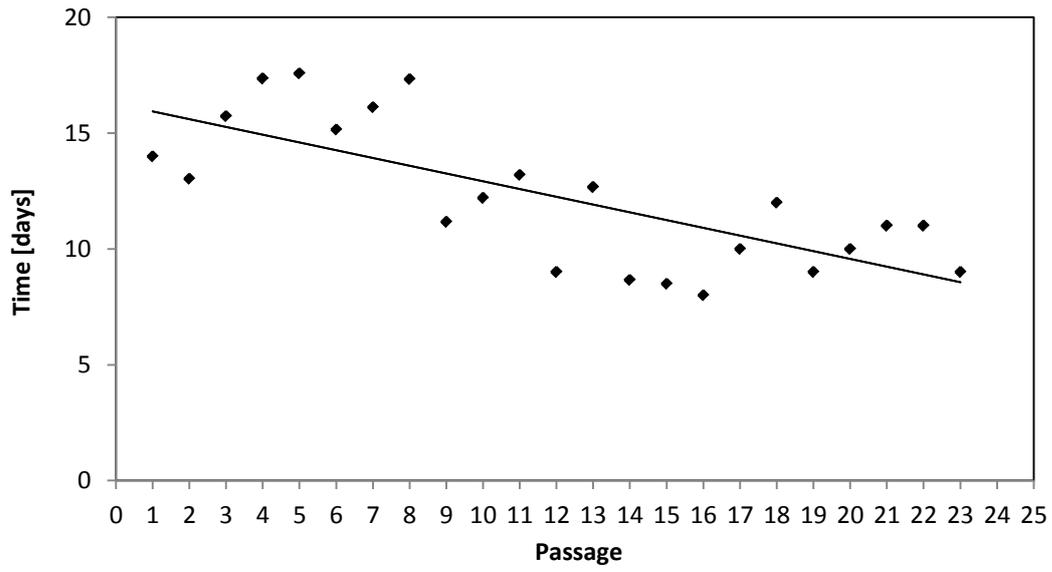




**Table 1.** Ingredients of chemicals used for isolation and cultivation of primary porcine urothelial cells.



**Figure 1.** Optimisation of the isolation and cultivation protocol. Samples were classified in three groups (class 1/class 2/class 3) due to their cultivation success. The parameters examined were the temperature during the overnight stripping process comparing an incubation at 37°C (left branch) and 4°C (right branch), respectively and the concentration of the supplemented antibiotics (P/S/A, genta 60 and genta 20, respectively).

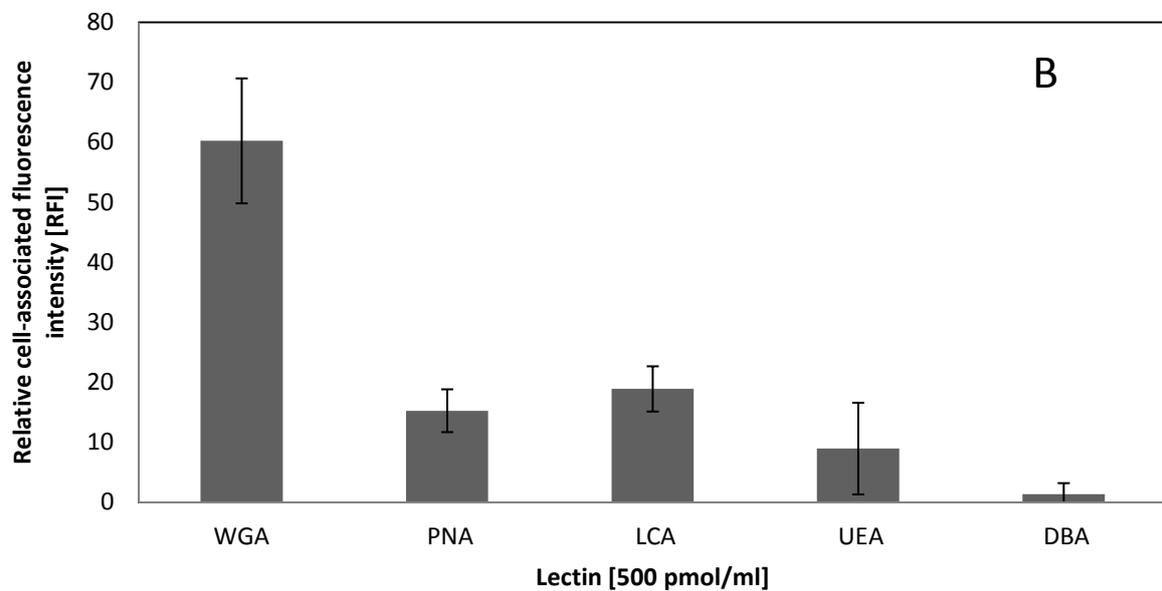
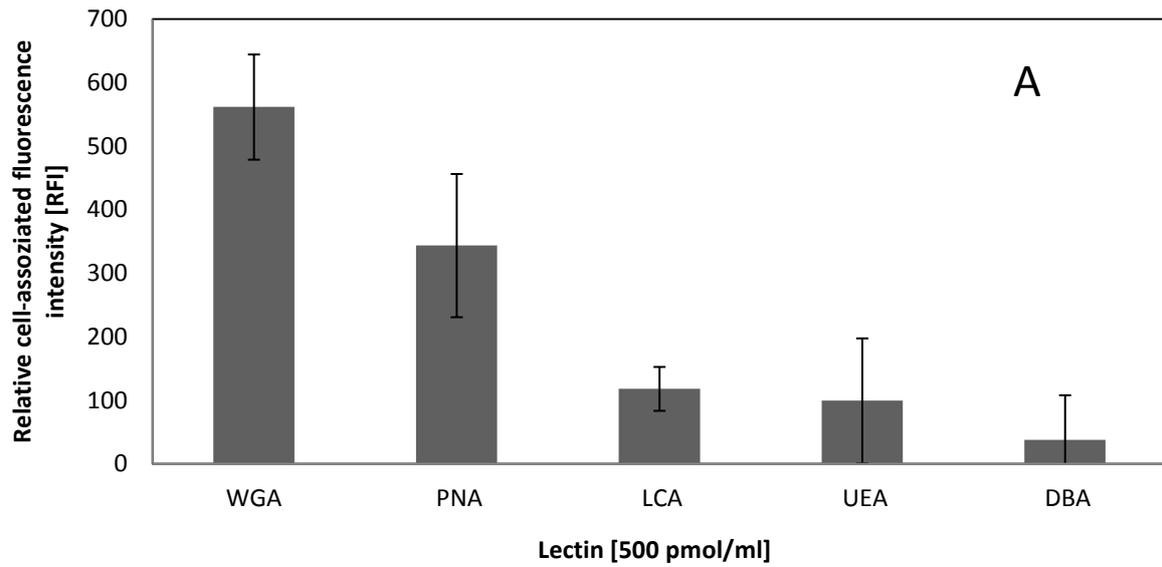


**Figure 2.** Mean cultivation time (days) until confluence in 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks for different cell passages (n=12).

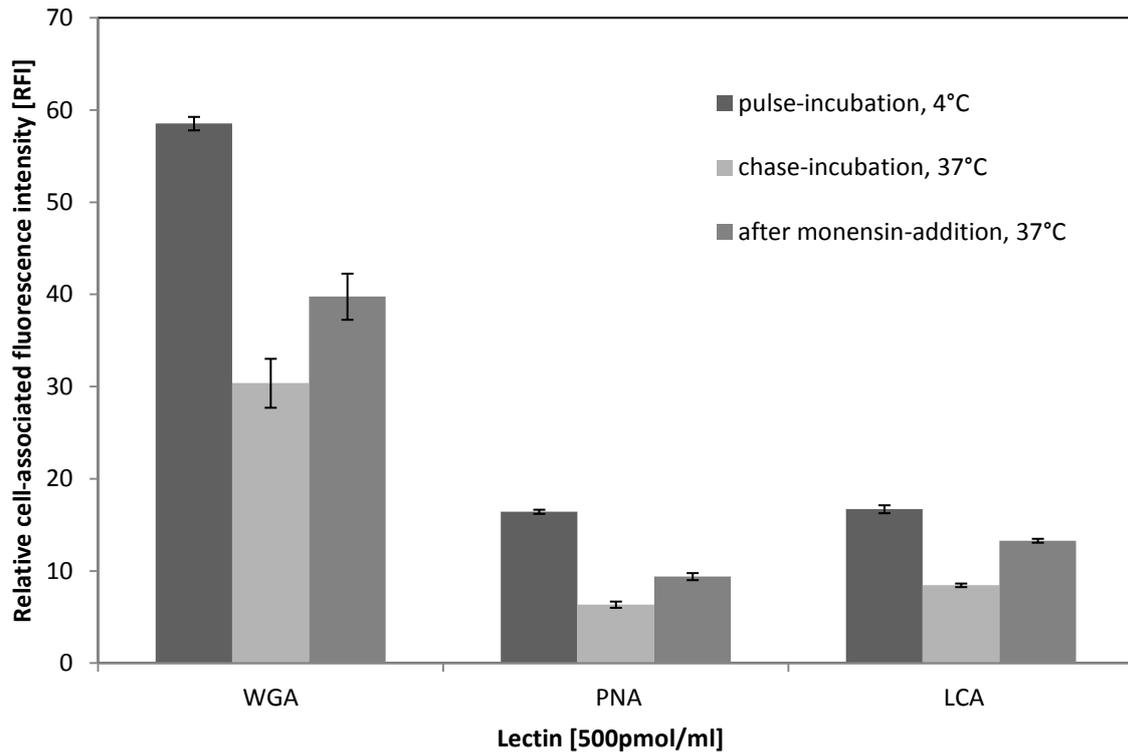
Lectin	Abbr.	Source	MW	Carbohydrate Specificity	F/P-Ratio
Wheat germ agglutinin	WGA	<i>Triticum vulgare</i>	36,000	GlcNAc, NANA	4.5
Peanut agglutinin	PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	110,000	$\beta$ -D-Gal-D-GalNAc, $\beta$ -D-GalNAc, Gal	3.7
Lens culinaris agglutinin	LCA	<i>Lens culinaris</i>	49,000	$\alpha$ -Man, $\alpha$ -Glc, $\alpha$ -GlcNAc	5.1
Ulex europaeus agglutinin	UEA	<i>Ulex europaeus</i>	63,000	$\alpha$ -L-Fuc	2.7
Dolichus biflorus agglutinin	DBA	<i>Dolichus biflorus</i>	120,000	$\alpha$ -D-GalNAc, Gal	2.2

NANA→N-acetyl-neuraminic-acid, GlcNAc→N-acetyl-glucosamin, Man→mannose, Glc→glucose, Gal→galactose, GalNAc→N-acetyl-galactosamin, Fuc→Fucose

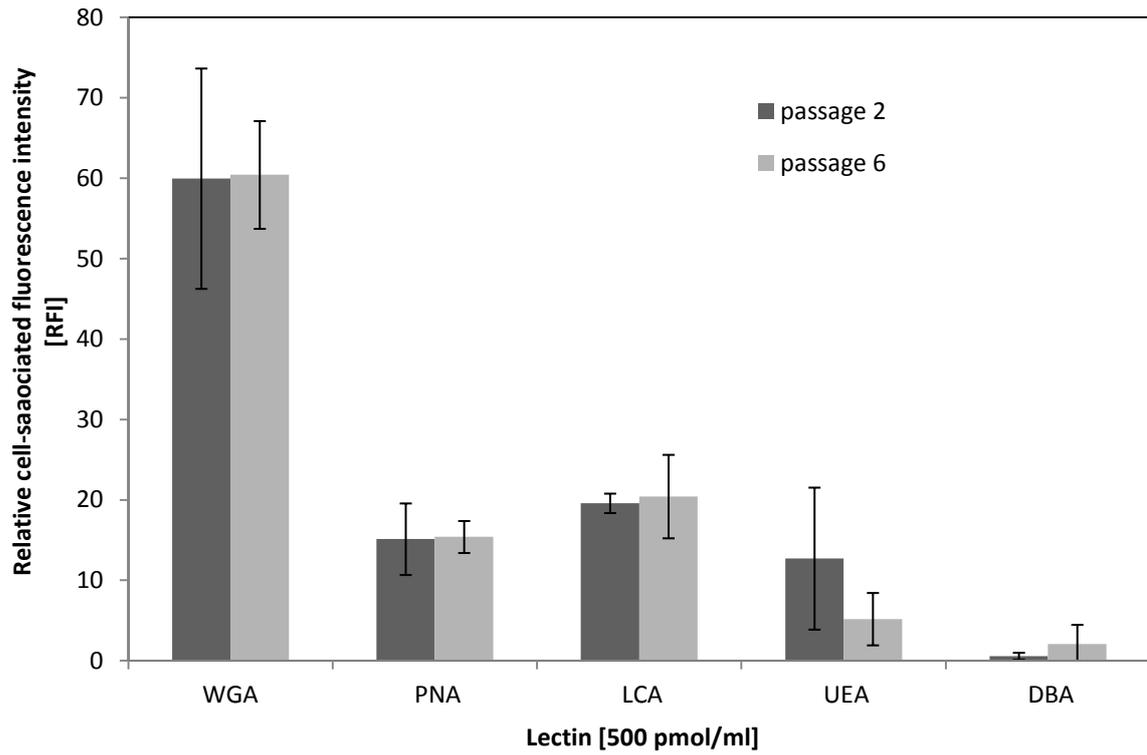
**Table 2:** Characteristics of the examined plant lectins used in the studies.



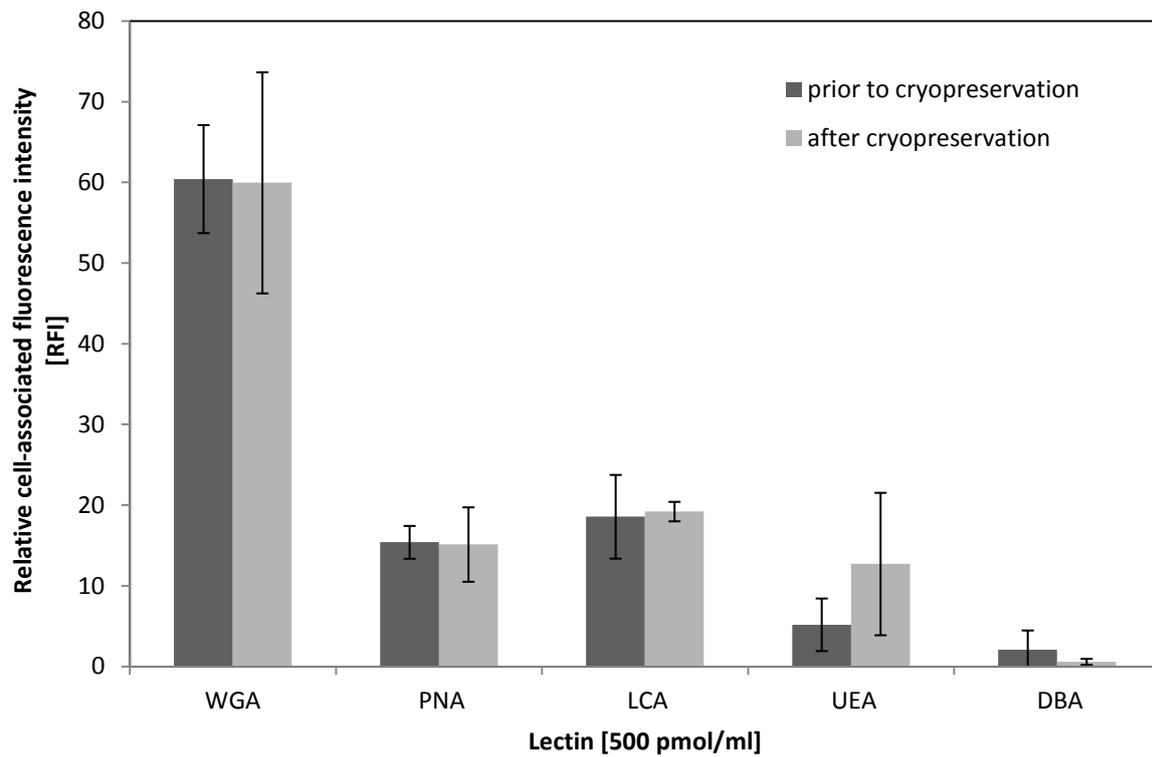
**Figure 3.** Lectin binding to cultured porcine urothelial single cells (A) and monolayers (B). Cells were incubated for 30 min at 4°C and analysed by flow cytometry (single cells) or fluorimetry (monolayers). The fluorescein-labelled lectins associated with the cell surface were related to an apparent F/P ratio of 1 (mean  $\pm$  SD, n=3).



**Figure 4:** Internalisation of WGA, PNA and LCA. Porcine urothelial single cells were *pulse-incubated* with lectins (500 pmol/ml) for 30 min at 4°C and warmed to 37°C to initiate energy dependent uptake. After the *chase-incubation* (120 min, 37°C), the RFI was determined by flow cytometry and internalisation was confirmed by restoring the acidic quench of fluorescein with monensin (mean  $\pm$  SD, n=3).



**Figure 5.** Effect of long-term cultivation (passage 2 vs. passage 6) on the binding potential of plant lectins (500 pmol/ml) to porcine urothelial single cells after incubation for 30 min at 4°C, followed by flow cytometric analysis (n=3).



**Figure 6.** Influence of cryopreservation on the lectin-cell interaction. Cells were incubated for 30 min at 4°C and RFIs were determined by flow cytometry (n=3).





## **REFERENCES**

- [1] Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* 2002 113:5-13.
- [2] Mehnert-Kay SA. Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. *Am Fam Physician* 2005 72:451–6.
- [3] Haley RW, Hooton TM, Culver DH et al. (1981) Nosocomial infections in US hospitals, 1975–1976: estimated frequency by selected characteristics of patients. *Am J Med* 70:947-959
- [4] Haley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG. The nationwide nosocomial infection rate: a new need for vital statistics. *Am J Epidemiol* 1985 121:159–67.
- [5] Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep* 2007 122:160–7.
- [6] Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med*, 2002 113(Suppl. 1A):14S–19S.
- [7] Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol* 2000 10: 509-15.
- [8] Grabe M, Bishop MC, Bjerkklund-Johansen TE, et al. EAU guidelines for the management of urinary and male genital tract infections. Urinary Tract Infection (UTI) Working Group of the Health Care Office (HCO) of the European Association of Urology (EAU). Arnhem, The Netherlands: EAU; 2006.
- [9] Foxman B, Gillespie B, Koopman J, et al. Risk factors for second urinary tract infection among college women. *Am J Epidemiol*. 2000 151:1194–1205.
- [10] Kostakioti M, Hultgren SJ, Hadjifrangiskou M. Molecular blueprint of uropathogenic *Escherichia coli* virulence provides clues toward the development of anti-virulence therapeutics. *Virulence*. 2012 Nov 15 3(7).

- [11] Hooton TM, Stamm WE. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997 11:551-581.
- [12] Hooton TM, Besser R, Foxman B, Fritsche TR, Nicolle LE. Acute uncomplicated cystitis in an era of increasing antibiotic resistance: a proposed approach to empiric therapy. *Clin Infect Dis*. 2004 39:75–80.
- [13] Svanborg C, Godaly G. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am*. 1997 11(3):513-29.
- [14] Thankavel K, Madison B, Ikeda T, et al. Localization of a domain in the FimH adhesin of Escherichia coli type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J Clin Invest*. 1997 100:1123–1136.
- [15] Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*. 2003 301:105–107.
- [16] Justice SS, Hung C, Theriot JA , et al. 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic Escherichia coli in urinary tract pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 101:1333–1338.
- [17] Bies C, Lehr CM, Woodley JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Delivery Rev*. 2004 56:425.
- [18] GuhaSarkar S, Banerjee R. Intravesical drug delivery: challenges, current status, opportunities and novel strategies. *J Control Release*. 2010 148:147–159.
- [19] Gabor F, Bogner E, Weissenboeck A, Wirth M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv Drug Del Rev*. 2004 56:459–480. doi: 10.1016/j.addr.2003.10.015.
- [20] Neutsch L, Eggenreich B, Herwig E, et al. Lectin bioconjugates trigger urothelial cytoinvasion - A glycotargeted approach for improved intravesical drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2012 82(2):367-75.

- [21] Desgrandchamps F, Moulinier F, Cochand-Priollet B, Wassef M, Teillac P, Le Duc A. Microscopic Study of the Pig Ureteral Urothelium *The Journal of Urology*. May 1997, Vol. 157, No. 5: 1926-1927
- [22] Ludwikowski B, Zhang Y.Y, Frey P. The long-term culture of porcine urothelial cells and induction of urothelial stratification. *BJU Int*. 1999, 84, 507–514
- [23] Southgate J, Hutton KA, Thomas DF, Trejdosiewicz LK. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. (PMID: 7967513)
- [24] Guhe C, Follmann W. Growth and characterization of porcine urinary bladder epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1994 266: F298-308
- [25] Gabor F, Klausegger U, Wirth M. The Interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. *Int J Pharm*. 2001 221(1-2):35-47.



# ***Anhang B – Weitere Ergebnisse im Rahmen der Diplomarbeit***

## **1. Einleitung**

### **1.1 Harnwegsinfektionen:**

Der Harnwegsinfekt (HWI) bezeichnet eine durch bestimmte Krankheitserreger verursachte Infektionskrankheit der ableitenden Harnwege. Er gehört zu den am häufigsten auftretenden bakteriellen Erkrankungen weltweit. Unter den nosokomialen, katheter-assoziierten Erkrankungen nehmen Harnwegsinfektionen eine führende Rolle ein, aber auch 25% aller Infekte nicht-hospitalisierter, vorrangig älterer Personen sind HWIs [1].

Abhängig von der Lokalisation des Keimes im Harntrakt werden zwei Erkrankungsformen unterschieden. Der untere Harnwegsinfekt betrifft die Harnröhre und/oder die Harnblase. Hat der Krankheitserreger bereits die Niere und/oder den Harnleiter befallen, spricht man von einem oberen Harnwegsinfekt [26]. Zu den charakteristischen Symptomen zählen vermehrter Harndrang, wobei nur geringe Mengen Urin abgesetzt werden können (Pollakisurie) und erschwertes Wasserlassen unter starken Schmerzen (Algurie) oder Juckreiz. In manchen Fällen zeigt sich ein eitriger Ausfluss (Pyurie) oder die Beimengung von Blut im Harn (Makrohämaturie). Ist die Niere betroffen führt dies, neben den bereits beschriebenen Symptomen, auch zu Fieber, Übelkeit, Erbrechen und Flankenschmerzen. Nichtbehandlung der Erkrankung kann zu Nierenversagen oder, bei Übertritt der Bakterien in den Blutkreislauf, zur Blutvergiftung (Sepsis) führen [2]. Des Weiteren ist eine Unterteilung, entsprechend der Schwere des Verlaufs, in unkomplizierte und komplizierte Infekte möglich. Bei der komplizierten Erkrankung gehört der Betroffene einer der bekannten Risikogruppen an. Dazu zählen unter anderem Säuglinge, Schwangere, ältere Personen, Personen mit Rückenmarksverletzungen und/oder Katheterisierung, Diabetiker, Personen, die an Multipler Sklerose oder AIDS, bzw. HIV erkrankt sind und Personen, die unter einer Fehlbildung der Harnwege leiden [1]. Frauen sind wesentlich häufiger von Harnwegsinfekten betroffen als Männer. 1 von 3 Frauen leidet noch vor ihrem 24. Lebensjahr an zumindest einem Harnwegsinfekt. Bezogen auf das gesamte Leben steigt

der Prozentsatz auf 50% an [1,27]. Diese geschlechtsspezifische Gegebenheit resultiert aus anatomischen Unterschieden zwischen Männern und Frauen. Die weibliche Harnröhre mündet sehr nahe am Anus, wodurch ein Eintritt der Bakterien in die Harnwege erleichtert wird. Durch die im Vergleich zu Männern verkürzte weibliche Harnröhre, müssen Bakterien nur eine geringe Entfernung überwinden, um in die Blase aufzusteigen [28]. Andererseits werden auch Hormonschwankungen, die während des Zyklus der Frau stattfinden, die hormonelle Veränderung während des Klimakteriums und übertriebene Intimhygiene zu den begünstigenden Faktoren gezählt [28].

Neben der Häufigkeit der Erkrankung stellt auch die Rezidivrate ein nicht zu unterschätzendes Problem dar. Um einen rezidivierenden Infekt handelt es sich bei einem erneuten Auftreten der Erkrankung innerhalb von sechs Monaten, bzw. bei mindestens drei Reinfektionen innerhalb eines Jahres. Dies ist bei 25-35% der Erstinfektionen der Fall [29]. Die derzeitige first-line Therapie bei HWIs beschränkt sich auf die orale Gabe von Antibiotika wie Ampicillin, Fosfomycin und Trimethoprim/Sulfamethoxazole [30]. Bei unkomplizierten Infekten beträgt die Dauer der Einnahme 3-5 Tage, wohingegen komplizierte Infekte über einen längeren Zeitraum mit einem Antibiotikum therapiert werden müssen. Bei chronischen Formen der HWI sind Wiederholungstherapien oder eine Langzeitprophylaxe mit Antibiotika nötig. Der beträchtliche Einsatz antibiotischer Substanzen resultiert häufig in systemischen Nebenwirkungen und erhöht die Bildung von Resistenzen, wodurch die Therapie maßgeblich erschwert wird.

Harnwegsinfekte können von einer Vielzahl von verschiedenen Bakterienarten ausgelöst werden. Dazu zählen unter anderem *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, Koagulase-negativer *Staphylococcus*, Enterococci und Stämme des uropathogenen *Escherichia coli* (UPEC) [31]. Der UPEC ist bei 90% der Erkrankungen der Auslöser und gilt als Ursprung rezidivierender Infekte.

## **1.2. uropathogener *Escherichia coli* (UPEC)**

Der uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) zählt zur großen Familie der enterovirulenten *Escherichia coli* und kann in verschiedene Untergruppen, die sich hinsichtlich ihrer genetischen Ausstattung stark voneinander unterscheiden, unterteilt werden [32]. Neben der Entstehung von Blutvergiftungen (Sepsis) und Säuglings-Meningitis,

ist der UPEC in erster Linie für das Auftreten von Harnwegsinfekten verantwortlich [27]. Die Übertragung erfolgt häufig über Schmier-, bzw. Kontaktinfektion. Befindet sich der Keim in der Harnröhre, kann es zum Aufstieg in höhere Regionen und zur Besiedlung der Harnblase und/oder der Nieren kommen. Die Oberfläche des Bakteriums weist verschiedene adhäsive Organellen, darunter S-Pili, Adhäsine der Dr-Familie, P-Pili, und Typ 1 Pili, auf [33]. Vor allem die Typ 1 Pili nehmen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Harnwegsinfekten ein [34]. Die Haar-ähnlichen Fimbrien werden auf der gesamten Oberfläche des Keims exprimiert. An ihrem Ende besitzen sie ein sogenanntes FimH Adäsin, welches mit Mannose-Bindungsstellen der Glykokalyx der Epithelzellen interagieren kann [27,33,35]. Nach Adhäsion des UPEC an die Urothelzelle, kommt es nach geraumer Zeit zur Internalisation des Keimes durch die Wirtszelle [27]. Dieser Übertritt des UPEC in das Zellinnere stellt einen bedeutenden Schritt bei der Entstehung von chronischen und persistierenden Formen der Harnwegsinfektion dar. Durch das Verlassen des Lumens ist der Keim sowohl vor Angriffen der wirtseigenen Immunabwehr als auch vor gängigen systemischen Therapien mit Antibiotika geschützt. Innerhalb der Zelle kommt es zur Vermehrung der Bakterien und zur Bildung von Biofilm-ähnlichen Einschlusskörpern, die als intrazelluläre bakterielle Communities (IBCs) bezeichnet werden [34]. In dieser weit über 1000 Bakterien umfassenden Gemeinschaft können Bakterien jahrelang symptomlos persistieren und durch einen späteren erneuten Übertritt in das Lumen zu einem chronischen Verlauf beitragen.

## **2. Methoden**

### **2.1. Isolierung primärer porciner Urothelzellen**

Die frisch entnommenen porcinen Blasen wurden in 500 ml Transportpuffer (*s. table 1, Anhang A*) unter möglichst aseptischen Bedingungen transportiert und gelagert. Die weitere Verarbeitung erfolgt in einer sterilen Werkbank.

Nach vorsichtiger Öffnung mit sterilen Instrumenten, wurde die Blase in 1 cm<sup>2</sup> große Stücke zerschnitten. Jedes Gewebestück wurde für 1 Minute in EDTA-Lösung 0.1% (w/v) überführt und anschließend in 10 ml Stripping Solution gelagert (*s. table 1, Anhang A*). Weitere, jedoch nicht obligatorische, Zusätze waren 20 KIU/ml Aprotinin und

Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (1% P/S/A (v/v)). Vier Varianten der Stripping Solution wurden eingesetzt (+ Aprotinin, + P/S/A; +Aprotinin, -P/S/A; -Aprotinin, + P/S/A; - Aprotinin, - P/S/A). Der Stripping-Vorgang erfolgte über Nacht bei 4°C, bzw. 37°C.

Am folgenden Tag wurden die 4°C Proben in den Brutschrank überführt. Die folgenden Arbeitsschritte fanden bei 37°C statt. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die Gewebestücke aus den Probevials entfernt und die Zellsuspension zentrifugiert (1000 RPM, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in 1 ml Kollagenase Typ IV (100 U/ml in HBSS) resuspendiert und 20 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 3 ml K-SFM (s. *table 1, Anhang A*) hinzugefügt und erneut zentrifugiert (1000 RPM, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in 5 ml K-SFM resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflasche, die zuvor mit 1% Gelatine-Lösung (w/v) beschichtet wurde, überführt.

## **2.2. Subkultivierung primärer porciner Urothelzellen**

Die Kultivierung erfolgte in befeuchteter 5% CO<sub>2</sub> /95% Luftatmosphäre bei 37°C. Subkultiviert wurde bei einer Konfluenz von 80-90%. Nach Entfernung des verbrauchten Mediums, wurde der Zelllayer 5min bei 37°C mit 2 ml PBS/EDTA (0.1% (w/v)) inkubiert. In diesem Zeitraum änderte sich das Erscheinungsbild von einem zuvor konfluenten Zelllayer zu abgerundeten Einzelzellen. Auf das Entfernen der PBS/EDTA-Lösung, folgte eine erneute Inkubation der Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA 0.25% (5 min, 37°C), wodurch die Adhäsion der Zellen am Boden der Gewebekulturflasche aufgehoben wurde. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml 1% Trypsin-Inhibitor (w/v) in K-SFM gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (1000 RPM, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 5 ml K-SMF resuspendiert und anschließend in einer mit 1% Gelatine gecoateten 25 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche weiterkultiviert.

## **3. Ergebnisse und Diskussion**

### **3.1. Beurteilung des Kultivierungserfolges primärer porciner Urothelzellen**

Um die Reproduzierbarkeit des optimierten Isolierungsprotokolls an unterschiedlichen Gewebequellen zu untersuchen wurden zwei porcine Harnblasen, die zur

Isolierung von Urothelzellen herangezogen wurden, getrennt voneinander betrachtet und die Ergebnisse gegenübergestellt.

Zur Verfügung standen Harnblasen eines weiblichen und eines männlichen Schweines. Die Tiere unterschieden sich hinsichtlich ihrer Haltung und Ernährung vor der Schlachtung voneinander. In *Abbildung A* sind die Ergebnisse des weiblichen Tieres, welches mittels Flüssignahrung ernährt wurde, dargestellt. *Abbildung B* enthält die Ergebnisse der Zellisolierung des männlichen Schweines. Dieses war, kastriert und wurde natürlich ernährt. Wie bereits in *Anhang A* beschrieben (s. 3.1.), wurden die Samples in drei Gruppen unterteilt, um den Isolierungs- und Kultivierungserfolg bewerten zu können.

Wie bereits in Ebene 1 der *Abbildungen A und B* ersichtlich, scheint die Ernährung und Haltung, der als Quelle herangezogenen Schweine einen bedeutenden Einfluss auf die Erfolgsrate der Isolierung zu haben. Bei dem natürlich ernährten, männlichen Schwein (*Abbildung B*) konnten 22 (71%) der insgesamt 31 angesetzten Samples zu Gruppe 1 gezählt werden, wohingegen nur 1 Sample (3%) nach erfolgter Adhäsion kein ausreichendes Wachstum zeigte und zu Gruppe 2 gezählt werden musste. 8 Samples (26%) wurden aufgrund unzureichender Anheftung der dritten Gruppe zugeteilt. Ein anderes Bild zeigt sich bei der Bewertung des Kultivierungserfolges des flüssig ernährten, weiblichen Schweines (*Abbildung A*). Von den insgesamt 35 angesetzten Samples waren 11 (31%) mit Pilzen oder Bakterien infiziert (Gruppe 2), 17 (49%) zeigten keine Adhäsion (Gruppe 3) und nur 7 (20%) der Samples konnten erfolgreich bis zu Passage 2 subkultiviert werden (Gruppe 1). Eine natürliche, biologische Haltung scheint einen positiven Einfluss auf die Gesundheit des Tieres und im Weiteren auf den Isolierungs- und Kultivierungserfolg porciner Urothelzellen zu haben.

Wie bereits in *Anhang A* beschrieben, hat auch die Temperatur während des Stripping Vorganges einen entscheidenden Einfluss auf den Kultivierungserfolg. Der linke Ast in Ebene 2 zeigt das Ergebnis des 37°C Strippings. Es ist ersichtlich, dass in *Abbildung A 0* (0%) bzw. in *Abbildung B* nur 6 Samples (46%) bis zu Passage 2 kultiviert werden konnten (Gruppe 1), wohingegen 21 (100%) bzw. 7 (54%) Samples zu Gruppe 2, bzw. 3 zu zählen sind. Betrachtet man den rechten Ast in Ebene 2 und somit das Ergebnis des 4°C Strippings, lässt die Sample-Zahl von 7 (50%) bzw. 16 (89%) in Gruppe 1 deutlich erkennen, dass diese

Methode wesentlich mehr Erfolg bei der Isolierung der Urothelzellen verspricht. Trotz des Vorhandenseins einer starken Trübung in der 37°C Stripping-Solution, die auf eine bessere Ablösung der Urothelzellen vom restlichen Gewebe hinweist, scheint eine Stripping-Temperatur von 4°C einen positiven Einfluss auf Viabilität und Adhäsionseffizienz zu haben. Dies wird sowohl in *Abbildung A* als auch in *Abbildung B* bestätigt.

Ein weiterer Parameter, der optimiert werden sollte und der auch in *Anhang A* berücksichtigt wurde, war der Zusatz eines geeigneten Antibiotikums zum Kultivierungsmedium, wobei das gängige Antibiotikum Gentamycin in einer hohen (60 µg/ml) und einer geringen (20 µg/ml) Konzentration (Genta 60 und Genta 20) und eine Kombination aus den ebenfalls häufig eingesetzten Antibiotika Penicillin/Streptomycin und dem Antimykotikum Amphotericin B (P/S/A) getestet wurden. Da im linken Ast der *Abbildung A* kein Kultivierungserfolg zu beobachten ist, kann hinsichtlich dieses Parameters keine Aussage getroffen werden. Im rechten Ast ist jedoch ersichtlich, dass bei einer Behandlung mit Genta 60 3 (75%), bzw. bei einem Zusatz von P/S/A ebenfalls 3 Samples (60%), der ersten Gruppe angehören, wohingegen Genta 20 mit 1 Sample (20%) in Gruppe 1 weniger geeignet scheint. Bezüglich der Infektionsrate konnte ebenfalls kein wesentlicher Unterschied zwischen Genta 60 (1/ 25%) und P/S/A (1/ 20%) festgestellt werden, wohingegen bei Genta 20 3 Samples (40%) wegen Kontamination von der Weiterkultivierung ausgeschlossen werden mussten. Die Samples des rechten Astes (14%), die keine ausreichende Adhäsion an den Gewebekulturflaschenboden zeigten und somit in Gruppe 3 zusammengefasst wurden, konnten zu gleichen Teilen der P/S/A und der Genta 20 Gruppe zugewiesen werden. Unter Einbezug der möglichen Langzeitkultivierung, die in Ebene 4 der *Abbildung A* dargestellt ist, kann man einen gewissen Vorteil von Genta 60 (100%) gegenüber P/S/A (67%) erkennen.

Ein etwas anderes Bild zeigt *Abbildung B*. Obwohl der Kultivierungserfolg nach dem Stripping bei 37°C (*Abbildung B*, linker Ast) mit weniger als 50% der Samples in Gruppe 1, äußerst gering ist, muss die Ebene des Antibiotika-Zusatzes gesondert betrachtet werden. Das Medium mit P/S/A-Zusatz zeigte mit 3 kultivierten Samples (60%) den größten Erfolg, wohingegen nach Genta 20-Zusatz nur 2 (50%) und nach Zugabe von Genta 60 1 (25%) Sample bis zu Passage 2 subkultiviert werden konnte. In keiner der 3 Antibiotika-Gruppen wurde ein Ausfall aufgrund von Bakterieninfektion oder Pilzbefall verzeichnet. Die übrigen

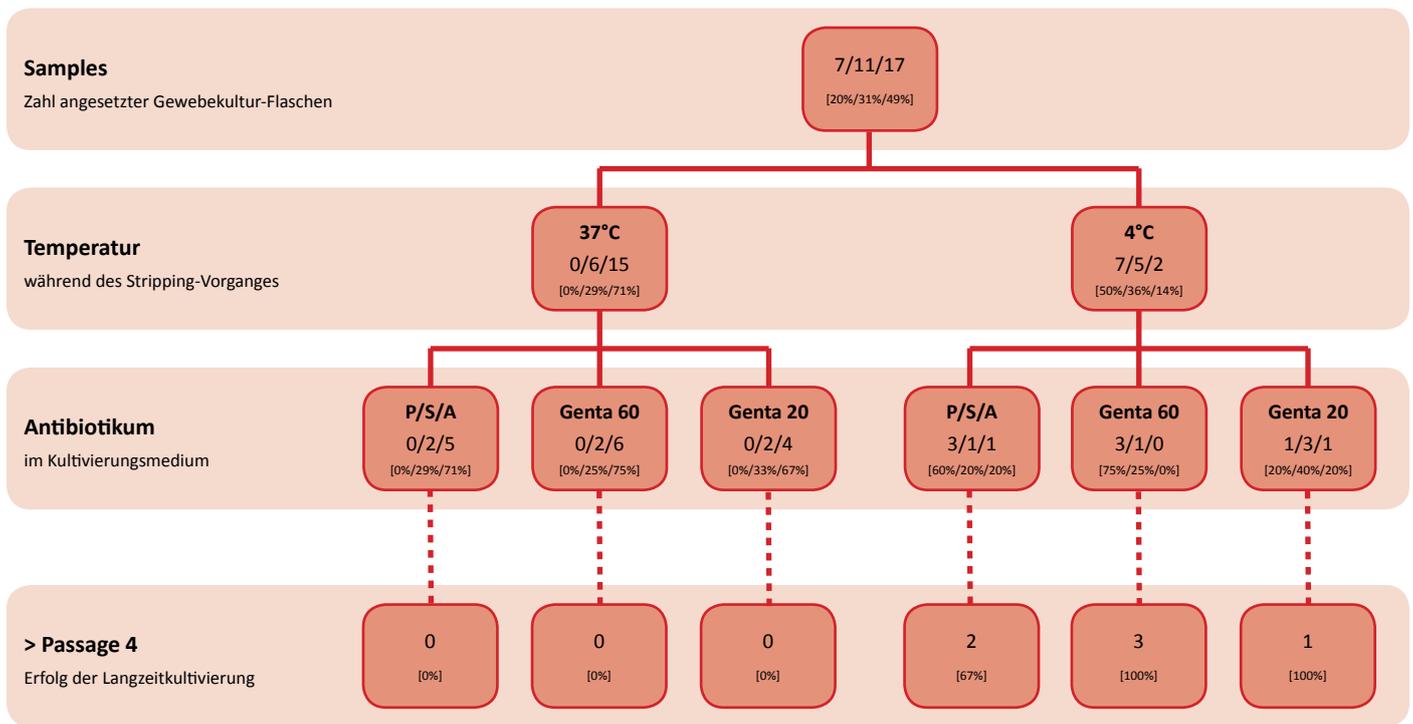
Samples wurden wegen unzureichender Adhäsion und somit ausbleibendem Wachstumserfolg aussortiert. Ebene 4 beinhaltet den Langzeitkultivierungserfolg, der einen deutlichen Vorteil des Gentamycin-Zusatzes gegenüber der Dreifachkombination zeigt. Während sowohl bei Genta 60 als auch bei Genta 20 alle vorhandenen Samples bis zu 4 Passagen kultiviert werden konnten, war dies bei keinem der Samples, die mit P/S/A in Kontakt kamen, der Fall. Ähnliche Ergebnisse ergeben sich aus dem rechten Ast von *Abbildung B*. Auch hier zeigte der P/S/A-Zusatz mit einer Sample-Zahl von 6 (100%), die bis zu Passage 2 kultiviert werden konnten, den größten Erfolg, wobei Genta 60 und Genta 20 mit einem Prozentsatz von jeweils 83% (5) in Gruppe 1 ebenfalls ein hervorragendes Ergebnis lieferten. Auch waren die Ausfallraten mit jeweils einem Sample (17%) in Gruppe 2 und 3 sehr gering. Wiederum zeigt die Langzeitkultivierung, dass Gentamycin mit jeweils 4 Samples (67%, bzw. 100%) der vielversprechendste Zusatz ist.

Genta 60 stellt den geeigneten antibiotischen Zusatz dar. Es konnte in keinem Fall ein negativer Einfluss auf die Wachstumsrate und die Viabilität der primären porcinen Urothelzellen festgestellt werden. Die hohe Konzentration des eingesetzten antibiotischen Agens trägt zur Verringerung möglicher mikrobieller Kontaminationen bei.

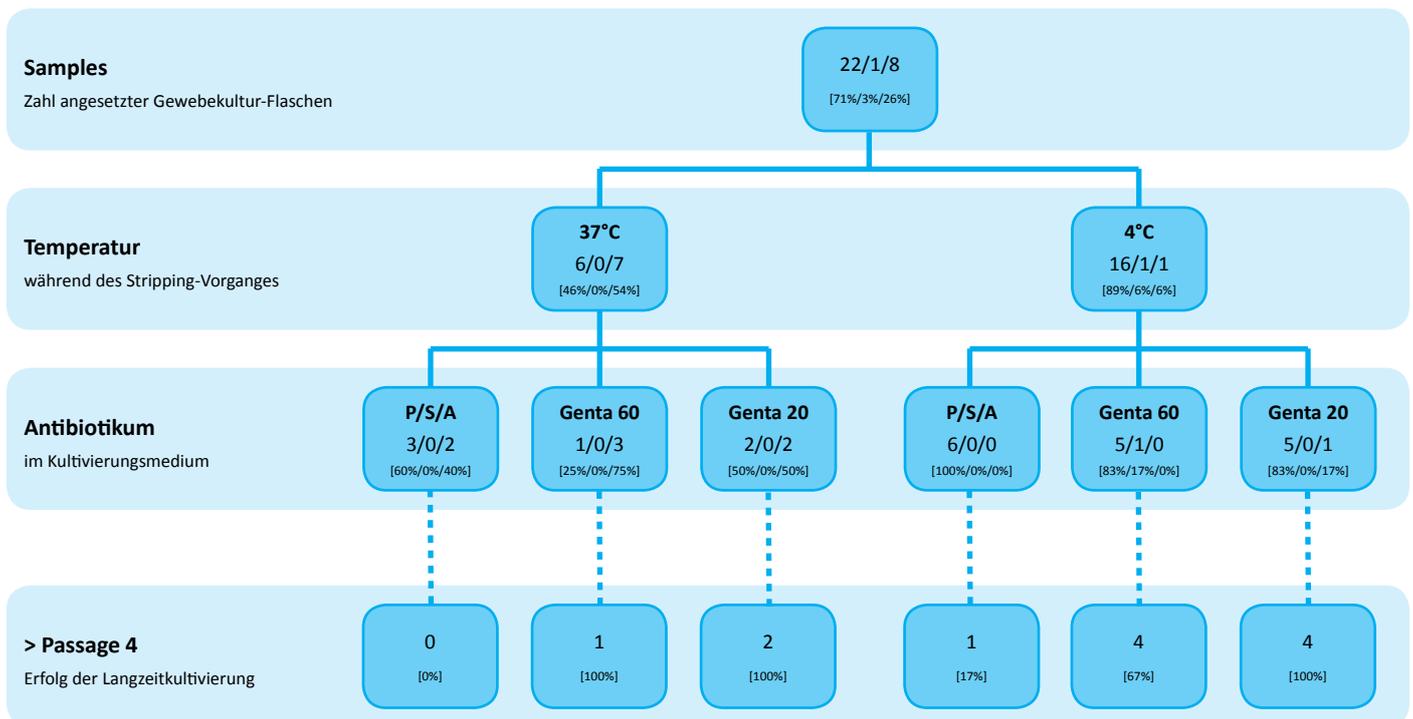
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bereits die Auswahl des Schlachttieres, in Abhängigkeit von seiner Ernährung und Haltungsbedingungen, einen entscheidenden Beitrag zum Erfolg der Kultivierung leistet. Weitere Parameter, die im Laufe der vorliegenden Arbeit optimiert wurden, sind die Temperatur während des Stripping-Vorganges und der Zusatz eines antibiotischen Agens zu dem verwendeten Kultivierungsmedium. Um ausreichende Zellzahlen bei der Isolierung und einen zufriedenstellenden Kultivierungserfolg zu sichern, sollte der Stripping-Vorgang bei 4°C stattfinden. Da es sich bei dem etablierten Zellkultur-System um ein keimfreies Zellmodell handeln soll, ist der Zusatz von 60 µg/ml Gentamycin zum Kultivierungsmedium erforderlich. Dies ermöglicht eine Minimierung der bereits im Gewebe vorliegenden, bzw. während der Schlachtung oder der Entnahme auf die Blase übertragenen Keime. Somit konnte ein primäres porcines Urothelmodell etabliert werden, das zur Durchführung zukünftiger Infektionsstudien herangezogen werden kann.



## A



## B



**Abbildung A&B.** Optimierung des Isolierungs- und Kultivierungsprotokolls. Die Samples wurden hinsichtlich ihres Kultivierungserfolges in 3 Gruppen unterteilt (Gruppe 1/Gruppe 2/Gruppe 3). Untersucht wurde die Temperatur während des Stripping-Prozesses, wobei eine Inkubation bei 37°C (linker Ast) mit einer Inkubation bei 4°C (rechter Ast) verglichen wurde und der Antibiotika-Zusatz zum Kultivierungsmedium (P/S/A, Genta 60 bzw. Genta 20).



## **Literaturverzeichnis**

- [1] Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* 2002; 113:5-13.
- [2] Mehnert-Kay SA. Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. *Am Fam Physician* 2005; 72:451–6.
- [3] Haley RW, Hooton TM, Culver DH et al. (1981) Nosocomial infections in US hospitals, 1975–1976: estimated frequency by selected characteristics of patients. *Am J Med* 70:947-959
- [4] Haley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG. The nationwide nosocomial infection rate: a new need for vital statistics. *Am J Epidemiol* 1985; 121:159–67.
- [5] Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep* 2007; 122:160–7.
- [6] Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med*, 2002; 113(Suppl. 1A):14S–19S.
- [7] Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol* 2000; 10: 509-15.
- [8] Grabe M, Bishop MC, Bjerklund-Johansen TE, et al. EAU guidelines for the management of urinary and male genital tract infections. Urinary Tract Infection (UTI) Working Group of the Health Care Office (HCO) of the European Association of Urology (EAU). Arnhem, The Netherlands: EAU; 2006.
- [9] Foxman B, Gillespie B, Koopman J, et al. Risk factors for second urinary tract infection among college women. *Am J Epidemiol*. 2000; 151:1194–1205.
- [10] Hooton TM, Stamm WE. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 551-581.
- [11] Svanborg C, Godaly G. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am*. 1997; 11(3):513-29.

- [12] Thankavel K, Madison B, Ikeda T, et al. Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J Clin Invest*. 1997; 100:1123–1136.
- [13] Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*. 2003; 301:105–107.
- [14] Justice SS, Hung C, Theriot JA, et al. 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:1333–1338.
- [15] Kostakioti M, Hultgren SJ, Hadjifrangiskou M. Molecular blueprint of uropathogenic *Escherichia coli* virulence provides clues toward the development of anti-virulence therapeutics. *Virulence*. 2012 Nov 15;3(7).
- [16] Hooton TM, Besser R, Foxman B, Fritsche TR, Nicolle LE. Acute uncomplicated cystitis in an era of increasing antibiotic resistance: a proposed approach to empiric therapy. *Clin Infect Dis*. 2004; 39:75–80.
- [17] van Rhijn BWG, Burger M, Lotan Y, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *European Urology*. 2009; 56(3):430–442.
- [18] Lerner SP, Grossman HB, Messing EM et al. BCAN think tank session3: prevention of bladder cancer. *Urol Oncol* 2010; 28: 338
- [19] Bies C, Lehr CM, Woodley JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Delivery Rev*. 2004; 56:425.
- [20] GuhaSarkar S, Banerjee R. Intravesical drug delivery: challenges, current status, opportunities and novel strategies. *J Control Release*. 2010; 148:147–159.
- [21] Gabor F, Bogner E, Weissenboeck A, Wirth M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv Drug Del Rev*. 2004; 56:459–480. doi: 10.1016/j.addr.2003.10.015.

- [22] Neutsch L, Eggenreich B, Herwig E, et al. Lectin bioconjugates trigger urothelial cytoinvasion - A glycotargeted approach for improved intravesical drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 82(2):367-75.
- [23] Desgrandchamps F, Moulinier F, Cochand-Priollet B, Wassef M, Teillac P, Le Duc A. Microscopic Study of the Pig Ureteral Urothelium *The Journal of Urology*. May 1997, Vol. 157, No. 5: 1926-1927
- [24] Ludwikowski B, Zhang Y.Y, Frey P. The long-term culture of porcine urothelial cells and induction of urothelial stratification. *BJU Int*. 1999, 84, 507–514
- [25] Southgate J, Hutton KA, Thomas DF, Trejdosiewicz LK. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. (PMID: 7967513)
- [26] Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J.: Basislehrbuch Innere Medizin mit StudentConsult-Zugang: kompakt-greifbar-verständlich, 4, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 7. März 2008, ISBN 3437410539.
- [27] Dhakal BK., Kulesus RR., Mulvey MA. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli* . *Eur j clin invest*. 2008;38(S2):2–11.
- [28] Wolf E. Zystitis Brennpunkt Blase. *pharmazeutische Zeitung online*
- [29] Stein G., Fünfstück R. Medikamentöse Therapie von Harnwegsinfekten. In: Der Internist, *Springer, Berlin, Heft Volume 49, 6 / Juni 2008, S. 747–755.*
- [30] Wagenlehner FME., Hoyme U., Kaase M., Fünfstück R., Naber KG., Schmiemann G. Clinical practice guideline:uncomplicated urinary tract infections. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108(24):415–23. DOI: 10.3238/arztebl.2011.0415
- [31] Oelschlaeger T., Fünfstück R. Rezidivierende Harnwegsinfektionen der Frau Erregervirulenz und Wirtsreaktion; *Urologe* 2006; 45:412–420
- [32] Russo TA., Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*.2003; 5:449–56.

[33] Mulvey MA., Schilling JD., Martinez JJ., Hultgren SC. Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defences. *PNAS* 2000 97 (16) 8829-8835; doi:10.1073/pnas.97.16.8829

[34] Jorgensen I., Seed PC. How to Make It in the Urinary Tract: A Tutorial by *Escherichia coli*; *PLOS Pathogens* | [www.plospathogens.org](http://www.plospathogens.org) 1 October 2012 | Volume 8 | Issue 10 | e1002907

[35] Andersen TE., Khandige S., Madelung M., Brewer J., Kolmos HJ., Møller-Jensen J. *Escherichia coli* Uropathogenesis *In Vitro*: Invasion, Cellular Escape, and Secondary Infection Analyzed in a Human Bladder Cell Infection Model; Published Ahead of Print 21 February 2012. *Infect. Immun.* 2012, 80(5):1858. DOI: 10.1128/IAI.06075-11.





# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten:

**Name:** Elena Elsa Sandrieser  
**Staatsangehörigkeit:** Österreich  
**Eltern:** Mag. Alfons Sandrieser  
Eva Sandrieser, geb. Cerny  
**Geschwister:** Esther (1887)

## Bildungsgang:

10.2006-2013: Diplomstudium der Pharmazie;  
Universität Wien

03.2012-09.2012: Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und  
Biopharmazie Wien  
Gegenstand der Diplomarbeit: Isolierung und Charakterisierung  
primärer porciner Schweineblasenzellen  
(eingereicht zur Publikation)

27.06.2006: Matura mit ausgezeichnetem Erfolg bestanden

1998-2006: Bundesgymnasium Porcia Spittal an der Drau

1997-1998: Volksschule Bad Kleinkirchheim

1995-1997: Volksschule Döbriach/Millstättersee

### **Berufliche Tätigkeiten:**

- 10.2012-07.2013: Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie Wien  
Tutorin der Lehrveranstaltung „Grundpraktikum aus pharmazeutischer Technologie“
- 10.2011-07.2012: Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie Wien  
Tutorin der Lehrveranstaltung „Industrielle Arzneimittelherstellung“
- 06.07.2009-31.08.2009: Kur-Apotheke Bad Kleinkirchheim
- 14.07.2008-31.08.2008: Kur-Apotheke Bad Kleinkirchheim
- 16.07.2007-09.09.2007: Kur-Apotheke Bad Kleinkirchheim