

Durchflusszytometrie in der Biotechnologie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

André Jochums, M. Sc.
geboren am 09.04.1989 in Moers

2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Leibniz Universität Hannover

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Sascha Beutel
Institut für Technische Chemie
Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 13.09.2018

*„Es dürfte uns gut tun, uns manchmal daran zu erinnern, dass wir zwar in dem
Wenigen, das wir wissen, sehr verschieden sein mögen, dass wir aber in unserer
grenzenlosen Unwissenheit alle gleich sind“ -Karl Popper*

Abstract

Flow cytometry is a method that is broadly used for various purposes. This also applies for this thesis: Advanced flow cytometry techniques were utilized for two different aims: Cell line development and Nanoparticle uptake investigations. Aptamer and fluorescence-activated cell sorting (FACS) were combined to develop a time and cost-efficient method for cell line development. Here, an affinity matrix attachment-based system was used and two different aptamer-cell linking methods via amino-amino-coupling were investigated. One based on the selective linker cyanuric chloride and the other on BS³ (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat). The model system was build up with the highly relevant growth factor VEGF produced in *Chinese Hamster Ovary* (CHO) cells. VEGF turned out as a problematic target due to cell binding or penetrating properties. Therefore, this method needs further investigations.

In the second part of the thesis, the uptake and toxicity of titanium dioxide nanoparticles (UV100) were investigated in two different cell lines (A549 and NIH-3T3). The results show a different uptake of the examined nanoparticles in different cell lines. Various flow cytometric methods for investigating the uptake behavior were used. One of them utilizes the scattered light without further staining. Here, results clearly show the necessity of different cell lines for reliable nanoparticle *in vitro* testing.

Keywords: flow cytometry, titanium dioxide, nanoparticle, cell line development

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden fortgeschrittene durchflusszytometrische Methoden entwickelt und angewandt. Im ersten Teil wurde an einer Methode zur Selektion von hochproduzierenden Zelllinien gearbeitet. Diese sollte sowohl die Aptamertechnologie als auch das *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) kombinieren. Die Methode basiert auf dem *affinity matrix attachment* und soll Kosten und Zeitaufwand der Zelllinienentwicklung drastisch senken. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden zur Immobilisierung von Aptameren auf Zelloberflächen entwickelt und die Vor- und Nachteile aufgeführt. Es wurden die *crosslinker* Cyanurchlorid und BS³ (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat) verwendet. Beide basieren auf einer Amino-Amino-Kopplung der Aptamere mit den Zellen. Die Untersuchung wurde am Beispiel des industrierelevanten Wachstumsfaktors VEGF mit *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen durchgeführt. Aufgrund von zellbindenden oder penetrierenden Eigenschaften zeigte sich VEGF für die Untersuchungen problematisch. Die Methode bedarf also noch weiterer Überprüfungen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Aufnahme und Toxizität von Titandioxidnanopartikeln (UV100) auf zwei verschiedene Standardzelllinien (A549 und NIH-3T3) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Zelltypen die Partikel unterschiedlich schnell aufnehmen. Hierfür wurden verschiedene durchflusszytometrische Methoden zur Detektion der Aufnahme angewandt, darunter auch eine rein streulichtbasierte Methode. Die Ergebnisse zeigen, dass für eine *in vitro* Testung verschiedene Zelllinien herangezogen werden sollten.

Stichworte: Durchflusszytometrie, Titandioxid, Nanopartikelaufnahme, Zelllinienentwicklung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Teil 1: Die Selektion hochproduzierender Zelllinien durch <i>fluorescence-activated cell sorting</i>	3
2.1	Theorie	3
2.1.1	Modifikation von Zelloberflächen mit Aptameren	3
2.1.2	Selektion von hochproduzierenden Zellen	10
2.1.3	Aptamere und Antikörper im Vergleich.....	14
2.2	Praktischer Teil	16
2.2.1	Modifikation von Zellen mit Aptameren mittels Cyanurchlorid	17
2.2.2	Modifikation von Zellen mit Aptameren mittels Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS ³).....	32
2.2.3	Funktionalitätsprüfung von Aptameren auf der Zelloberfläche	38
2.3	Zusammenfassung und Ausblick – Teil 1	44
3	Teil 2: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme und Toxizität von Titandioxid-Nanopartikeln	46
3.1	Theorie	46
3.1.1	Nanopartikel – Definition und Kennzahlen.....	46
3.1.2	Nanopartikelaufnahme.....	47
3.1.3	Toxische Effekte und Wirkungen in der Zelle	53
3.2	Praktischer Teil	64
3.2.1	Partikeleigenschaften	65
3.2.2	Detektion der Nanopartikelaufnahme mittels Seitwärtsstreulicht (SSC).....	68
3.2.3	Detektion der Nanopartikelaufnahme mittels Fluoreszenzmarkierung der TiO ₂ Nanopartikel	72

3.2.4	Auswirkungen auf das Vorwärtsstreulicht	75
3.2.5	Mikroskopische intrazelluläre Lokalisation von Nanopartikeln	77
3.2.6	Detektion und Lokalisation mittels Propidiumiodid.....	78
3.3	Zusammenfassung und Ausblick – Teil 2	80
4	Fazit	81
A	Materialien	83
A.1	Verbrauchsmaterialien.....	83
A.2	Geräte	83
A.3	Chemikalien.....	85
A.4	Aptamere und Zielmoleküle	86
A.5	Puffer und Lösungen	88
A.6	Software.....	89
A.7	Durchflusszytometer – Technische Spezifikationen (Optik)	89
A.8	Zellkultur	89
A.9	Nanopartikel.....	90
B	Methoden.....	91
B.1	Zellkultivierung der CHO Zellen	91
B.2	Immobilisierung auf Zelloberfläche	91
B2.1	Immobilisierung mittels Cyanurchlorid.....	91
B2.2	Immobilisierung mittels BS ³	92
B3	Detektion der Immobilisierung	93
B3.1	Durchflusszytometrische Analyse.....	93
B3.2	Spektrophotometrische Anaylse	93

B4 Markierung der Ziel- und Kontrollmoleküle	94
B5 Färbung mit SYBR Green II.....	95
B6 Detektion der Funktionalität.....	95
B7 Zellkultivierung der A549 und NIH/3T3-Zellen.....	96
B8 FITC Markierung der Nanopartikel	96
B9 Inkubation und Messung der Nanopartikelaufnahme.....	96
B10 Durchflusszytometrische Analyse der Nanopartikelaufnahme.....	96
B11 Cell-Titer-Blue Assay.....	97
B12 Apoptose- und Nekrosemessung.....	97
B13 Time-Lapse Mikroskopie	98
B14 Fluoreszenzmikroskopie.....	98
Abkürzungsverzeichnis	99
Abbildungsverzeichnis.....	101
Literaturverzeichnis.....	109
Mitarbeit an Experimenten	130
Lebenslauf.....	131
Publikationen	132

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Durchflusszytometrie ist eine etablierte Analyse­methode und wird schon seit den 70er Jahren zur Identifikation bestimmter Zelltypen oder für toxikologische Untersuchungen angewandt. Das Potential dieser Methode ist jedoch bei weitem noch nicht ausgeschöpft. In dieser Arbeit sollen daher fortgeschrittene Methoden abseits der üblichen Anwendung aufgezeigt werden. Durch ihren hohen Durchsatz und die hohe sensorische Leistungsfähigkeit moderner Durchflusszytometer, sowie die Möglichkeit zur Einzelzellsortierung, weist die Durchflusszytometrie unter anderem ein großes Potential in der Zelllinienentwicklung und der Untersuchung der Interaktion von Nanopartikeln mit Zellen auf, was in dieser Arbeit untersucht werden soll.

Die industrielle Produktion von Biomolekülen (wie z.B. Wirkstoffe, Enzyme, oder Antikörper) ist ein milliardenschwerer und stetig wachsender Markt. Für die Produktion werden bevorzugt Säugetierzellen wie *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen verwendet, da diese säugetiertypische posttranslationale Modifikationen ermöglichen. Viel Zeit und Kosten werden dabei für die Zelllinienoptimierung (engl. *cell line development*) aufgewandt. Ein vielversprechender Ansatz ist die Anwendung von *fluorescence-activated cell sorting* (FACS), da hierbei Zellen einzeln und mit hohem Durchsatz hinsichtlich ihrer Produktivität analysiert und sortiert werden können. Problematisch ist dabei die Quantifizierung der Produktions- und Sekretionsleistung jeder einzelner Zelle. In dieser Arbeit wird daher die Aptamertechnologie verwendet, um die hochproduzierenden Zellen zu identifizieren. Aptamere sind in ihrer Funktion Antikörpern sehr ähnlich, bieten allerdings gegenüber der Antikörpertechnologie einige Vorteile, wie die Stabilität der Aptamere, die leichtere Selektion gegenüber nicht immunogenen Zielmolekülen, die proteinfreie Produktion und leichte Modifizierbarkeit bei der Aptamersynthese.

Im ersten Teil der Arbeit soll daher eine Aptamer- und FACS-basierte Selektionstechnik für hochproduzierende Zellen entwickelt werden. Hierfür wurde ein Modellsystem mit dem

Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) als Zielmolekül und dem Aptamer V7t1 als Fängermolekül aufgebaut. Als Produktionsorganismus dienten CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) welche als Produktionszellen industrielle Bedeutung haben. Ziel des Selektionssystems ist es dabei nicht nur die Menge an produzierten Molekülen zu detektieren, sondern gleichzeitig die Sekretionsleistung zu berücksichtigen und die Effektivität herkömmlicher Selektionsverfahren um ein Vielfaches zu steigern.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Nanopartikelaufnahme und Toxizität. Der Einsatz von Nanopartikeln nimmt immer weiter zu, wie in Kosmetik, Farben oder Medikamenten. Es gibt viele Einsatzgebiete. So gab es 2017 bereits mehr als 1000 Produkte, die Nanomaterialien enthielten [1]. Dies führt zu einer steigenden Besorgnis in der Bevölkerung. Umso wichtiger ist es, die Risiken und das Verhalten von Nanopartikeln genau untersuchen zu können, noch bevor sie *in vivo* getestet werden. Partikel in Nanogröße haben ganz andere Eigenschaften, als die gleichen Materialien in nicht-Nanoform. Risikoeinstufungen nach europäischen Chemikalienverbots-verordnung REACH (*registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals*) sind aufgrund der nicht berücksichtigten Partikelgröße unzureichend. Nanopartikel können z.B. auch in das Zellinnere gelangen und dort toxische Wirkungen aufweisen, welche die nicht-Nanoform von Materialien nicht aufweisen. Auch das deutlich höhere Oberfläche-zu-Größe Verhältnis verändert die Partikeleigenschaften.

Im zweiten Teil der Arbeit wird daher die durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme und Toxizität von Titandioxidnanopartikeln bei unterschiedlichen Zelltypen untersucht. Dabei ist das Ziel, durchflusszytometrisch das Aufnahmeverhalten der Standardzelllinien A549 und NIH-3T3 mittels verschiedener Methoden zu beobachten. Es wurden sowohl fluoreszenzbasierte als auch streulichtbasierte Methoden angewandt und verglichen. Dabei wurden konzentrations- und zeitabhängige Messungen und Vergleiche durchgeführt.

2 Teil 1: Die Selektion hochproduzierender Zelllinien durch *fluorescence-activated cell sorting*

In diesem Kapitel werden neue Methoden zur Selektion von hochproduzierenden Zellen vorgestellt. Dafür werden im theoretischen Teil der aktuelle Stand der Forschung und die etablierten industriell verwendeten Methoden dargestellt (Abschnitt 2.1). Im praktischen Teil werden zwei Verfahren zur Modifikation der Zelloberfläche mit dem Ziel der Selektion von hochproduzierenden Zellen erforscht (Abschnitt 2.2). Für den Modellassay wird die Produktionszelllinie chinese hamster ovaria (CHO) und das industrierelevante Zielmolekül VEGF (*vascular endothelial growth factor*) als Hauptzielmolekül verwendet. Die Detektion soll mittels Aptameren erfolgen.

2.1 Theorie

Der theoretische Teil ist in drei Hauptabschnitte gegliedert: Im ersten Abschnitt sollen die bereits in der Literatur beschriebenen Methoden zur Modifikation der Zelloberfläche dargestellt werden (Abschnitt 2.1.1) und im zweiten Abschnitt sollen die bereits bekannten Möglichkeiten zur Selektion von hochproduzierenden Zellen aufgezeigt werden (Abschnitt 2.1.2). Im dritten Abschnitt wird ein Vergleich zwischen Aptameren und Antikörpern vorgenommen (Abschnitt 2.1.3).

2.1.1 Modifikation von Zelloberflächen mit Aptameren

Die Anwendungsmöglichkeiten von Zelloberflächenmodifikationen mit DNA sind vielfältig. So wurden Zellen, die mit Aptameren modifiziert wurden, bereits als Sensoren eingesetzt [2,3] und ssDNA (*single stranded DNA*) als Kopplungsreagenz zur gezielten Immobilisierung von Zellen auf Oberflächen über DNA Hybridisierung genutzt [4,5]. Auf der Zellmembran befinden sich Lipide, Proteine und Kohlenhydrate, welche für eine Kopplung verwendet werden können. Als reaktive Gruppen kommen unter anderem Amino-, Thiol-, Carboxyl- und Carbonylgruppen infrage. Zu beachten ist jedoch, dass sich Membranen in einem ständigen Wandel- und Erneuerungsprozess befinden, wodurch Modifikationen der Zellmembran nur von vorübergehender Dauer sind [6]. Im Folgenden wird erläutert, wie die verschiedenen funktionellen Gruppen auf der Oberfläche für eine

Kopplung verwendet werden können und wie sogar neuartige reaktive Gruppen auf der Zelloberfläche hinzugefügt werden können.

2.1.1.1 Modifikation der Aminogruppen

Generell werden die meisten Modifikationen an Aminogruppen mit Carbonylgruppen bzw. Estern oder Aldehyden vorgenommen. Das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe ist dabei der Angriffspunkt für eine nukleophile Substitution durch Aminogruppen, wodurch Amide entstehen. Die wohl populärste Substanz für eine Kopplung an Aminogruppen ist der NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimid-Ester) (siehe Abbildung 1). Die NHS-Gruppe macht den Carbonylkohlenstoff noch reaktiver und trotzdem bleibt der NHS-Ester stabil gegenüber einer Hydrolyse [7]. Diese Methode wird häufig verwendet um Biotin an Zellen zu immobilisieren und dann weitere Moleküle über Biotin-Avidin-Brücken zu koppeln (Abbildung 2) [8]. Die EDC-Kopplung funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip. Es wird mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) ein reaktiver Ester aus einer Carbonsäure erstellt, welcher mit den Aminogruppen auf der Zellmembran reagieren kann (Abbildung 3) [8]. Auch diese Methode ist aufgrund der milden Reaktionsbedingungen für eine Kopplung auf Zellmembranen geeignet [9]. Bei der Reaktion zwischen Aldehyden und Aminogruppen bilden sich Imine welche durch Reduktion (z.B. durch Borhydrid) in stabile Amidbindungen umgewandelt werden können. Eine Amino-Amino-Kopplung über Aldehyde kann z.B. mit dem homobifunktionalen *crosslinker* Glutaraldehyd durchgeführt werden [8]. Ein homobifunktionaler *crosslinker* hat zwei identische reaktive Gruppen für die Kopplung. Die Nukleophilie von Aminogruppen kann auch zur Kopplung an einer Vielzahl weiterer Moleküle genutzt werden. Weitere Beispiele hierfür wären Cyanurchlorid und BS³, welche im praktischen Teil (Abschnitt 2.2.1 und Abschnitt 2.2.2) ausführlicher besprochen werden.

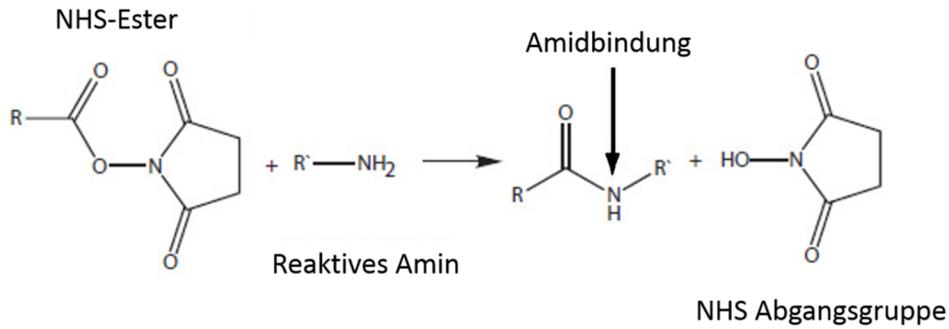


Abbildung 1: NHS-Ester Kopplungsreaktion mit einer Aminogruppe.

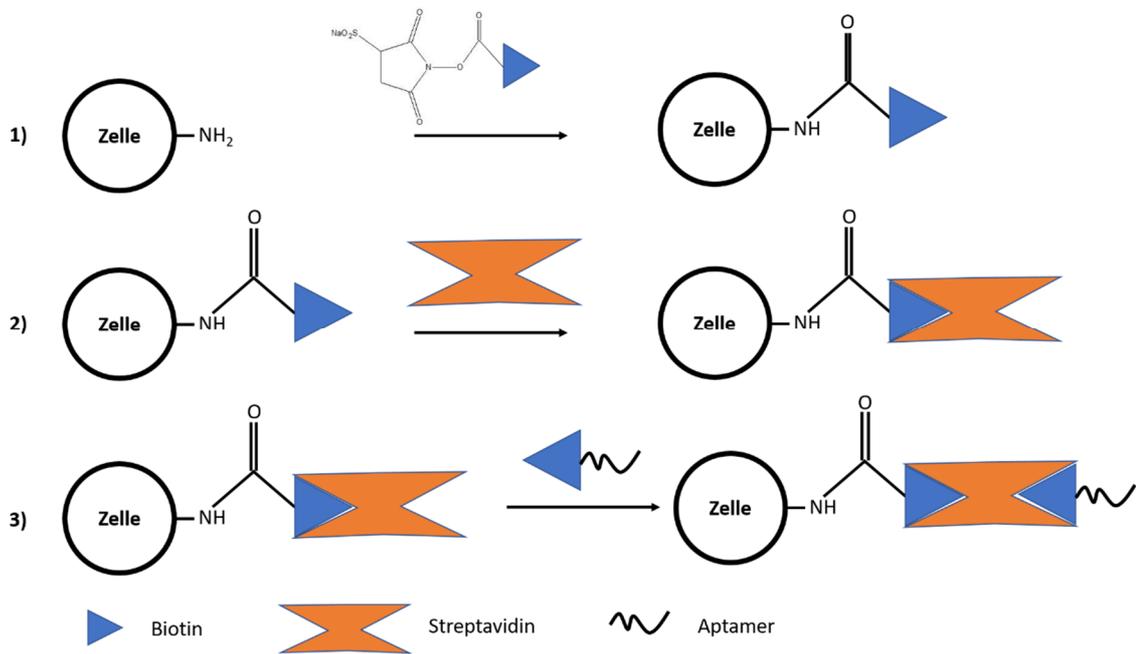


Abbildung 2: Einsatz von NHS-Estern zum Aufbau einer Biotin-Streptavidin-Brücke.

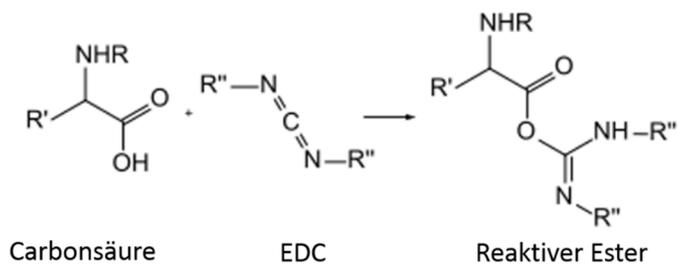


Abbildung 3: Aktivierung einer Carbonsäure (hier eine Aminosäure) mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid).

2.1.1.2 Modifikation der Carbonyl- und Thiolgruppen

Carbonylgruppen kommen vor allem in Form von Sacchariden wie Sialinsäure und Glykoproteinen auf der Zelloberfläche vor. Die Anzahl an Carbonylgruppen kann jedoch auch enzymatisch (Glukose-Oxidase) oder durch Reduktionsmittel wie Periodat erhöht werden [10]. Eine Bindung mit den Carbonylgruppen lässt sich mittels Alkoxyamin [11] oder Hydrazid-funktionalisierten Molekülen [8] herstellen (Abbildung 4).

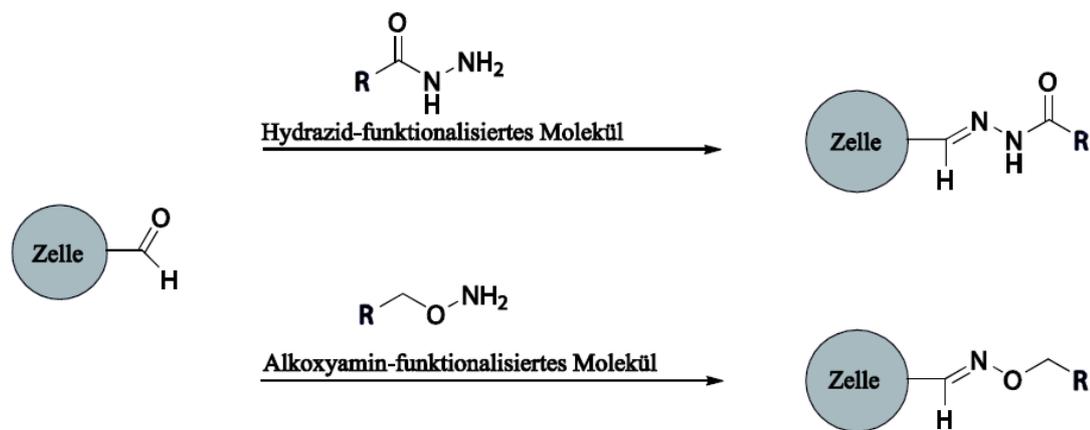


Abbildung 4: Modifikation mittels Hydrazid- und Alkoxydmodifizierten Molekül. Abbildung von Drömer.¹

Thiolgruppen kommen auf Membranen nicht so häufig vor wie Aminogruppen, lassen sich allerdings in der Aminosäure Cystein in Proteinen finden. Eine Besonderheit von Thiolgruppen ist, dass sie die Disulfidbrücken von Proteinen bilden und somit je nach Umgebung sowohl oxidiert (Disulfidbrücke) oder reduziert (freie Thiolgruppen) vorkommen können [12]. Für eine Kopplung an Thiolgruppen kommen Maleimid-, Iodacetamid und Pyridyldisulfid-funktionalisierte Moleküle als Kopplungsreagenzien infrage [8,11] (Abbildung 5).

¹ Aus Bachelorarbeit von B. Sc. Julia Drömer

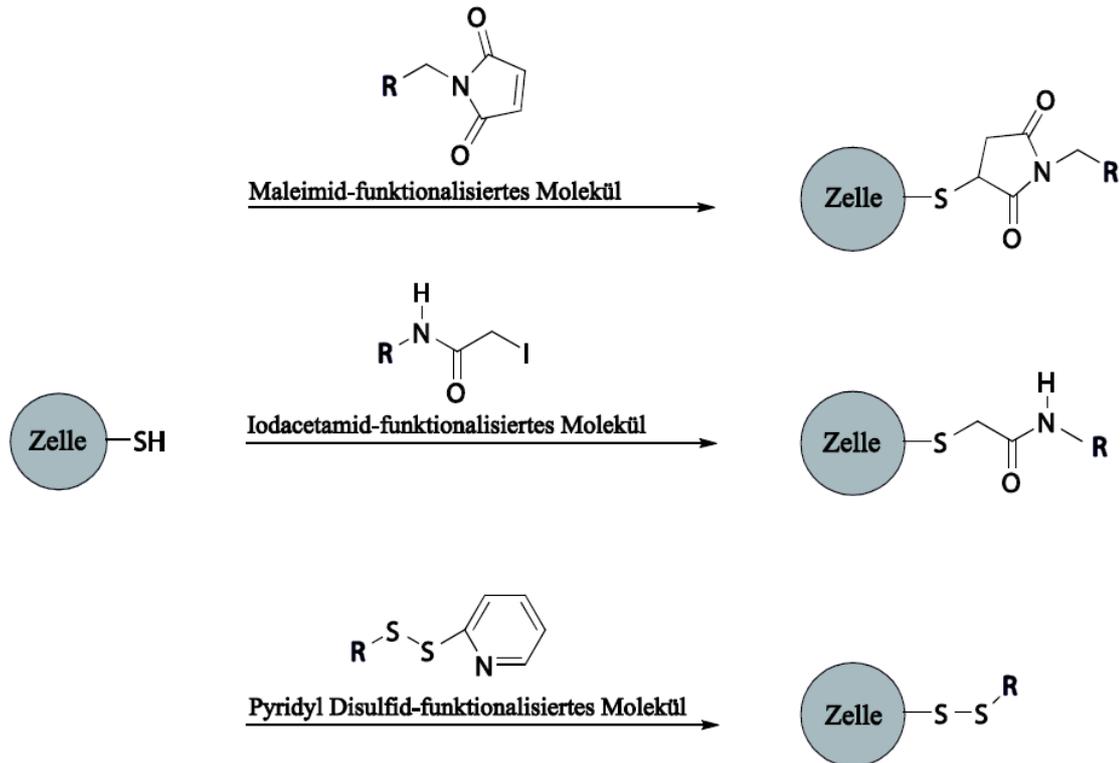


Abbildung 5: Modifikation von Thiolgruppen mittels Maleimid- Iodacetamid- und Pyridyldisulfid-funktionalisierten Molekülen. Abbildung von Drömer²

2.1.1.3 Weitere Modifikationsmöglichkeiten

Neben den kovalenten Modifikationen gibt es auch nicht-kovalente Möglichkeiten der Modifikation. Hier sind zum einen die hydrophoben Interaktionen mit der Phospholipidschicht zu nennen, und zum anderen elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Zelloberfläche. Für die hydrophobe Interaktionen eignen sich prinzipiell jede Art von Kohlenwasserstoffketten, welche spontan in die Lipidschicht aufgenommen werden (z.B. Fettsäuren) [3,13]. Es ist auch möglich modifizierte Liposomen mit der Zellmembran zu fusionieren und so neue funktionelle Gruppen zuzufügen [14]. Für elektrostatische Verankerungen können kationische Polymere wie Polyethylenimin (PEI) verwendet werden [15].

² Aus Bachelorarbeit von B. Sc. Julia Drömer

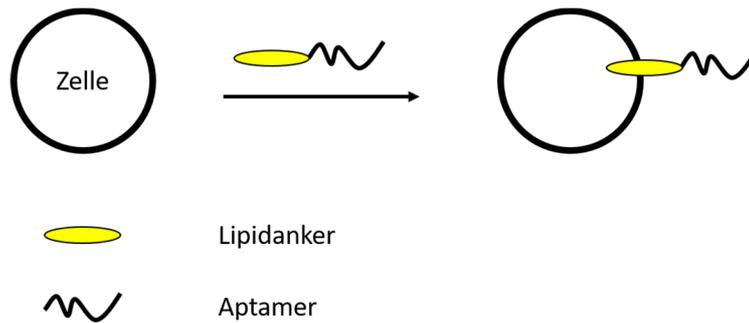


Abbildung 6: Kopplung über einen Lipidanker in die Lipiddoppelschicht (Zellmembran).

Neben den in Abschnitt 2.1.1.1 genannten homobifunktionalen *crosslinkern* gibt es auch die heterobifunktionalen *crosslinker*. Im Unterschied zu den homobifunktionalen *crosslinkern* haben diese zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen. Ein Beispiel ist N-Hydroxysuccinimid-Polyethylenglykol-Maleimid (Abbildung 8). Das Maleimid reagiert mit Thiolgruppen, welche z.B. an ein Aptamer angebracht werden können. Das Hydroxysuccinimid am anderen Ende des Moleküls reagiert mit Aminogruppen, wie sie sehr häufig auf Zelloberflächen vorkommen. So kann in einem ersten Schritt das Aptamer an den *crosslinker* gebunden und anschließend an die Zelle gekoppelt werden (Abbildung 8) [4].

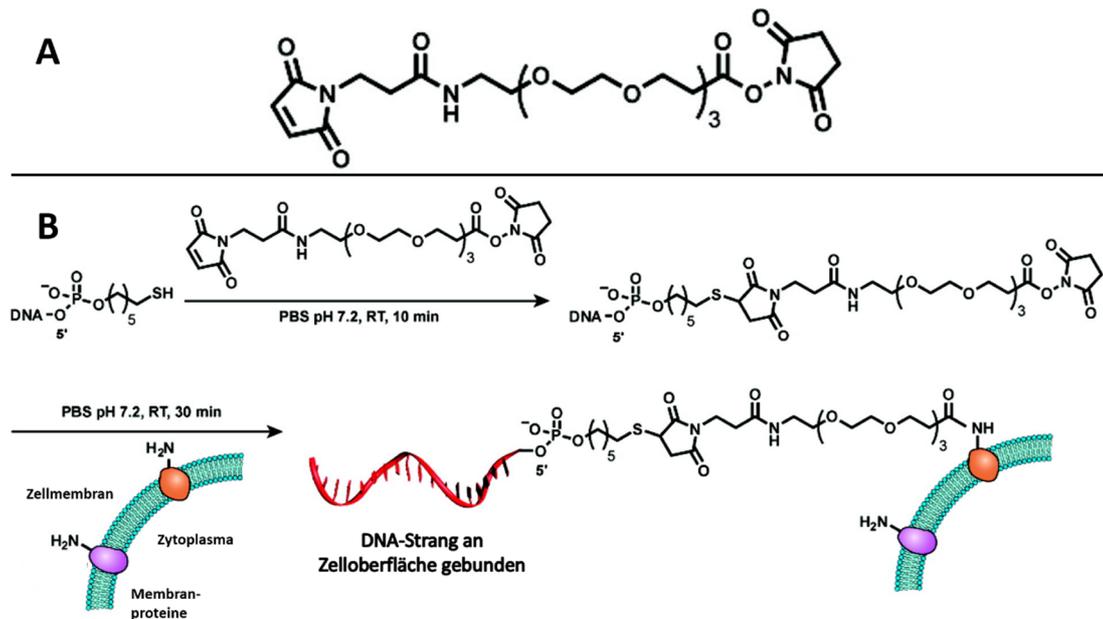


Abbildung 7: A: N-Hydroxysuccinimid-Polyethylenglykol-Maleimid ein heterobifunktionaler Crosslinker. Es befinden sich entsprechend an jedem Ende unterschiedliche funktionale Gruppen. B: Kopplung an Zelloberflächen mittels N-Hydroxysuccinimid-Polyethylenglykol-Maleimid, Modifiziert nach Sonny et al. [4]

Eine weitere interessante Möglichkeit ist das *metabolic oligosaccharid engineering* (MOE). Hierbei werden funktionalisierte Monosaccharide in die Glykoproteine der Membran eingebaut, indem die Zellen in Anwesenheit der funktionalisierten Monosaccharide kultiviert werden [16]. Die Zellen bauen die Saccharide über ihre natürlichen Stoffwechselwege ein. Ein Beispiel ist der Einbau von peracetylierten Azidoacetylmannosamin [17]. Der verstoffwechselt und in die Glykoproteine der Zelloberfläche eingebaute Zucker kann dann mit einer Phosphangruppe reagieren und so eine Kopplung eines phosphanmodifizierten Aptamers ermöglichen (siehe Abbildung 8) [18]. Der ausreichende Einbau neuer Zucker in die Glykoproteine dauert mehrere Tage und nicht alle Zelltypen bauen regelmäßig neue Glykoproteine in die Membran ein [4]. Daher ist diese Methode nur bedingt anwendbar.

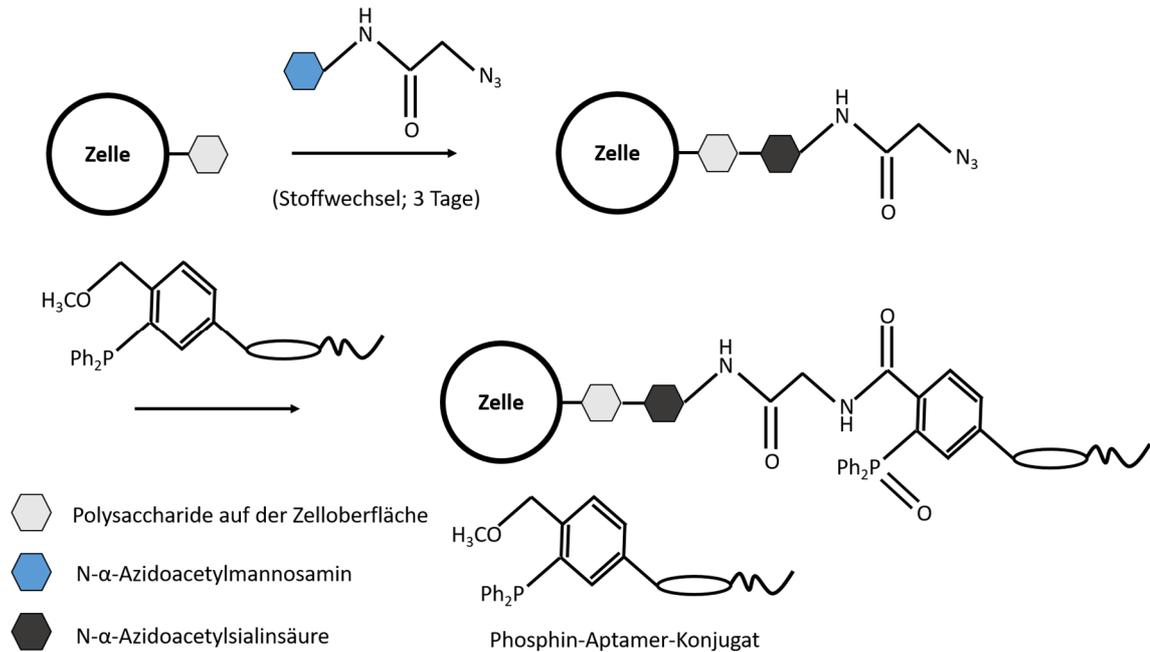


Abbildung 8: Kopplung mittel *metabolic oligosaccharid engineering* (MOS). Zuvor wurden modifizierte Zuckermoleküle an mit den Zellen kultiviert, welche durch den Metabolismus in die Zellmembran eingebaut wurden.

2.1.2 Selektion von hochproduzierenden Zellen

Die Selektion von hochproduzierenden Zellen ist ein entscheidender Faktor bei der Optimierung von Produktionsstämmen. Obwohl die Selektion entscheidend ist, sind die heute verwendeten Methoden sehr aufwändig (Abschnitt 2.1.2.1). Die Erforschung neuer effizienterer Methoden könnte die Kosten und den Zeitaufwand senken. Die Etablierung einer neuen Zelllinie dauert mit herkömmlichen Methoden ungefähr ein Jahr [19]. Ein optimaler Produktionsstamm sollte einen hohen Produkttiter erzeugen. Der Produkttiter korreliert mit der Produktivität der Zellen. Die Produktivität ist von der Zelldichte und der spezifischen Produktivität abhängig [20]. Die Zelldichte, die bei der Kultivierung von Zelllinien erreicht werden kann, konnte durch Optimierung des Kultivierungsprozesses und der Nährmedien in den letzten 30 Jahren um den Faktor 100 (für einzelne Zelllinien) gesteigert werden und befindet sich zwischen 10^7 - 10^8 Zellen/ml [21,22]. Die spezifische Produktivität ist von der Expressions- und Sekretionsleistung des Stammes abhängig [23]. Nach der Transfektion ist die spezifische Produktivität der Zellen in der Regel normalverteilt, was bedeutet das hochproduzierende und gering produzierende Zellen im gleichen Verhältnis vorliegen [24]. Das liegt u. A. am zufälligen

Insertionsort der eingebrachten DNA bei den meisten konventionellen Transfektionsmethoden, welcher maßgeblich für die Produktivität der Zelle ist [25]. Sehr hoch produzierende Zellen bilden demnach nur einen kleinen Anteil der Population. Zusätzlich ist das Wachstum von hochproduzierenden Zellen infolge der metabolischen Belastung durch die Produktbildung reduziert, wodurch sie von sogenannten *low-producing cells* überwachsen werden [26]. Daher muss die Selektion hochproduzierender Zellen besonders sorgsam durchgeführt werden, damit keine schnellwachsenden *low-producing cells* mit selektiert werden. Dank der Selektion von hochproduzierenden Zellen konnten Produkttiter von bis zu 10 g/l erreicht werden [27,28].

2.1.2.1 Konventionelle Methoden

Das in der Industrie etablierte Verfahren zur Selektion von hochproduzierenden Zellen ist das sogenannte *limiting dilution cloning* (LDC). Die Zellen werden dabei so verdünnt, dass im Schnitt pro *well* einer Mikrotiterplatte maximal eine Zelle aufgetragen wird [25]. Die Zellen werden nun in der Platte vermehrt und anschließend mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) die Produktkonzentration im Medium bestimmt [29] (Abbildung 9). Das LDC hat nur einen geringen Durchsatz und es ist kaum möglich alle transfizierten Zellen zu testen [30]. Bis zur Selektion eines neuen Produktionsstammes dauert es mit dieser Methode bis zu acht Monate [24]. Die Anwendung einer so aufwändigen Methode macht die Wichtigkeit der Suche nach neuen Selektionsmethoden deutlich.

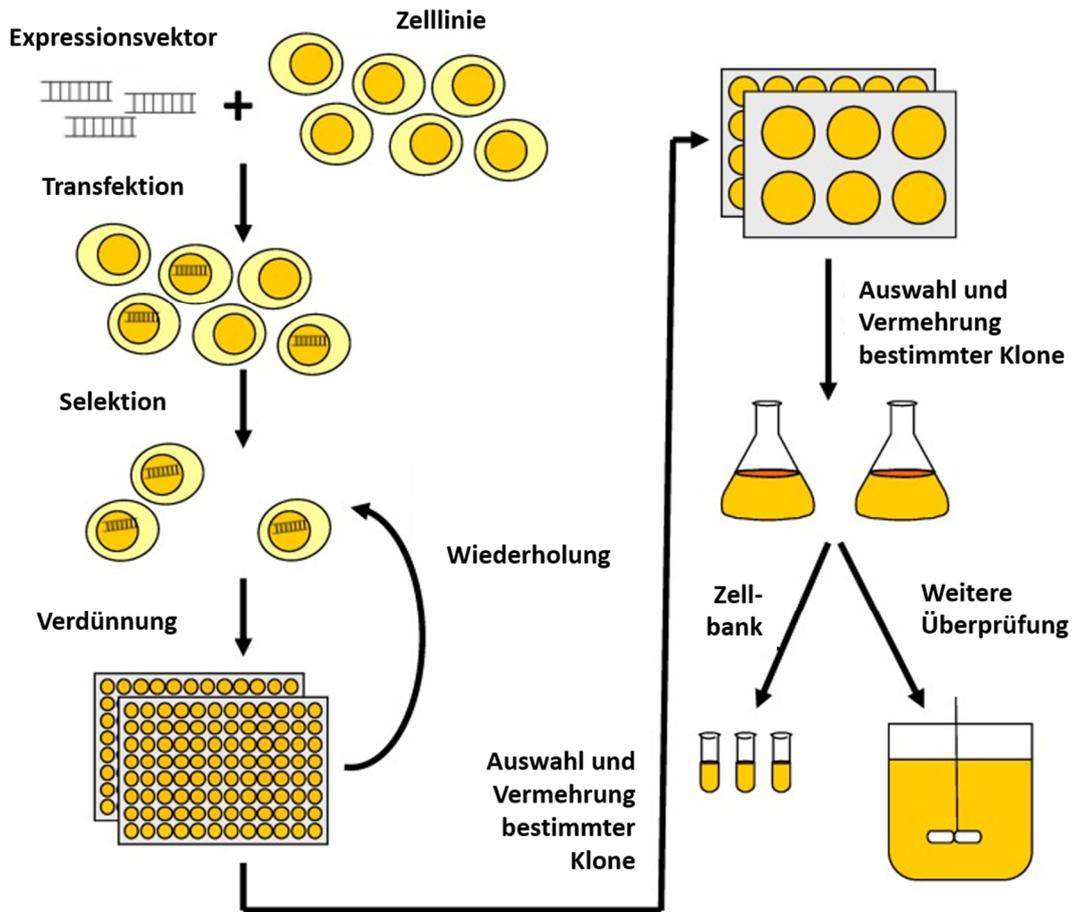


Abbildung 9: Ablauf des *limited dilution cloning* (LDC). In den Platten kann ein Screening z.B. durch ELISA durchgeführt werden. Abbildung modifiziert nach Lai et al. [29]

2.1.2.2 Durchflusszytometrie-basierte Methoden

Generell bieten alle durchflusszytometrie-basierten Verfahren einen höheren Durchsatz als die LCD Methode. Im Folgenden werden die drei populärsten durchflusszytometrie-basierten Verfahren zur Selektion von hochproduzierenden Zellen vorgestellt.

Die wohl simpelste Methode ist die Koexpression eines Fluorophors wie z.B. dem *green fluorescent protein* (GFP). Je stärker das Gen abgelesen wird, desto mehr GFP wird gleichzeitig mit dem Produkt gebildet. Die Zellen mit einem hohen Fluoreszenzsignal können dann mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) sortiert werden [31]. Statt eines Fluorophors kann das Protein auch mit einem Membranprotein koexprimiert werden, was dazu führt, dass das Produkt mittels Antikörpern von außen quantifiziert werden kann [32]. Die Koexpression hat immer den Nachteil einer zusätzlichen

metabolischen Belastung [33]. Darüber hinaus muss das Reporterprotein bei der Aufreinigung entfernt werden und kann zusätzlich einen toxischen Effekt auf die Zellen haben [23]. Auch die sekretorische Leistung der Zellen wird mit dieser Methode nicht berücksichtigt. Die sekretorische Leistung gibt an, wie gut Zellen das Produkt in das Medium abgeben. Ein sekretiertes Produkt hat den Vorteil, dass kein Aufschluss der Zellen nötig ist, und das Produkt direkt aus dem Medium gewonnen werden kann.

Eine Methode zur Selektion von Zellen unter Berücksichtigung der Sekretionsleistung beruht auf kleinen Geltröpfen (*gel microdroplets*). Hierbei werden die Zellen auf einzelne Agarosegeltröpfen aufgeteilt. Die Agarose ist biotinyliert und enthält über Avidin gebundene Fänger-Antikörper zur Detektion des Produktes. Durch das Hinzugeben eines zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen das Produkt, können die Tropfen in einem *cell sorter* sortiert werden [23,34] (Abbildung 10). Durch die Agarose befinden sich die Zellen in einem viskosen Medium, wodurch die Diffusion des Produktes reduziert wird. Von Vorteil ist, dass die Sekretionsleistung der Zellen bei dieser Methode berücksichtigt wird. Nachteilig ist, dass nur ca. jeder zehnte Tropfen eine Zelle enthält [35], was den Durchsatz etwas reduziert. Im Vergleich zur LCD Methode ist der Durchsatz natürlich dennoch enorm. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Agarose nach der Sortierung wieder entfernt werden muss.

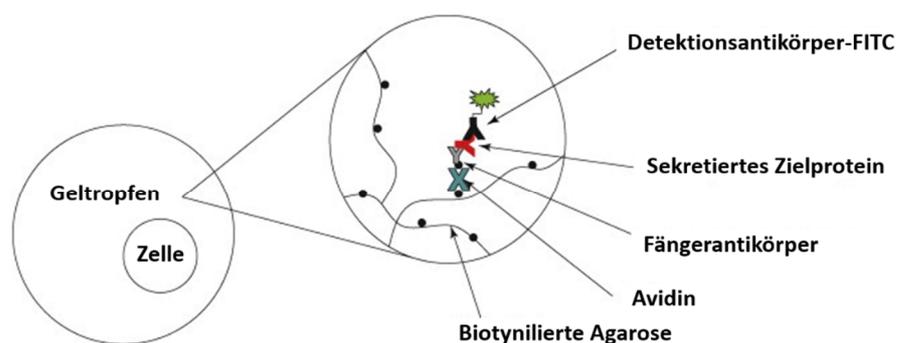


Abbildung 10: Selektion mithilfe von Mikrogelelektropfen aus Agarose. Die Fängerantikörper werden vorher in der Gelmatrix immobilisiert. Die Detektionsantikörper werden dann später hinzugegeben. Abbildung modifiziert nach Browne et al. [23]

Die letzte hier vorgestellte Methode ist die *affinity matrix attachment* Methode. Hierbei wird die Zelloberfläche mit Antikörpern modifiziert. Zur Immobilisierung sind Biotin-Streptavidin-Brücken geeignet. Die Fänger-Antikörper auf der Zelloberfläche bilden die sogenannte Affinitätsmatrix. Sekretierte Produktmoleküle werden von den Fängerantikörpern gebunden und können mit einem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper sichtbar gemacht werden [36]. Die Diffusion des Produktes sollte dabei durch ein viskoses Medium reduziert werden (Abbildung 11).

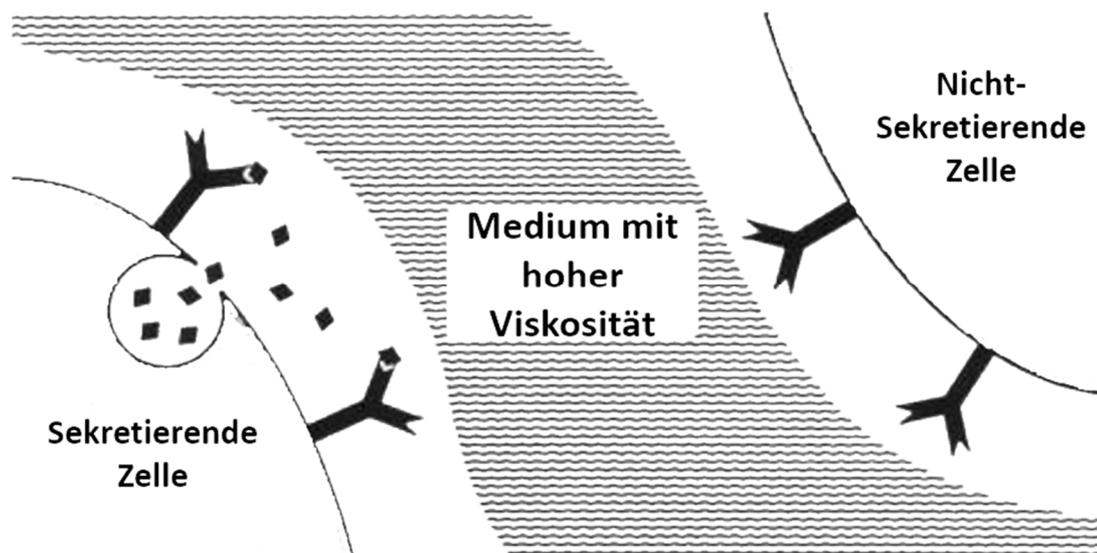


Abbildung 11: Antikörperbasiertes *affinity matrix Attachment* system zur Selektion von hochproduzierenden Zellen. Die auf der Oberfläche immobilisierten Antikörper fangen die sekretierten Zielmoleküle ab. Modifiziert nach Manz et al. [36]

Bisher wurde dieses Assay nur mit Antikörpern durchgeführt. In den praktischen Arbeiten sollen Aptamere und hocheffiziente Immobilisierungsmethoden zur effektiveren Assay Durchführung eingesetzt werden. Im Folgenden werden die Vorteile der Aptamertechnologie kurz erläutert.

2.1.3 Aptamere und Antikörper im Vergleich

Im Folgenden soll auf die Vorteile der Aptamere in durchflusszytometrischen Assays gegenüber Antikörpern eingegangen werden. Um einen besseren Überblick zu erhalten wird sehr kurz die Geschichte der Aptamere und Antikörper erläutert.

Die Antikörpertechnologie war eine Revolution für die molekularbiologische Analytik. Es wurde möglich bestimmte Moleküle mit einer nie dagewesenen Spezifität und Sensitivität zu markieren und so der qualitativen und quantitativen Analyse zugänglich zu machen. Daher wurde für die Erforschung des Herstellungsverfahrens von monoklonalen Antikörpern 1984 der Medizinnobelpreis verliehen. Während das Herstellungsverfahren von monoklonalen Antikörpern bereits 1974 veröffentlicht wurde, wurde gut 15 Jahre später (1990) ein Verfahren zur Entwicklung von RNA Liganden mit dem Beispiel der T4 DNA Polymerase veröffentlicht. Die Autoren nannten das Verfahren SELEX (*selection of ligands by exponential enrichment*). Dieses hat den Vorteil, dass es ohne Mehraufwand die Selektion von Aptameren gegen nicht-immunogene Zielmoleküle zulässt [37]. Im gleichen Jahr wurde der Begriff Aptamer (von lat. Aptus für „passend“) von Ellington und Szostack eingeführt [38]. Dies bildete den Startschuss für die Entwicklung weiterer Aptamere. Einen großen Vorteil stellt der Herstellungsprozess der Aptamere dar. Dieser erfolgt rein chemisch und so können Verunreinigungen mit Fremdproteinen oder gar Viren oder bakteriellen Toxinen ausgeschlossen werden, was besonders für pharmakologische Anwendungen einen Vorteil darstellt. Die Herstellung mittels chemischer Synthese bietet allerdings noch einen weiteren Vorteil: es können an beliebiger Stelle Modifikationen eingefügt werden. Eine Markierung mit Fluorophoren funktioniert auch bei Antikörpern, allerdings an zufälligen Positionen, bei Aptameren hingegen ist es sehr leicht möglich eine funktionelle Gruppe an einer spezifischen Position einzufügen (meist am Anfang oder Ende). Dies ist für die Immobilisierung von großem Vorteil, da so eine gerichtete Immobilisierung durchgeführt werden kann. Dies sollte zu mehr funktionsfähigen Aptameren führen, da sterische Hinderungen von Bindestellen vermieden und die korrekten Faltungen der Aptamere (für die Bindung essentiell) ermöglicht werden können. Dies ist gerade in Bezug auf das *affinity matrix attaching* Assay ein großer Vorteil, da so mehr Zielmoleküle von den Fängermolekülen abgefangen werden können.

2.2 Praktischer Teil

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Entwicklung eines aptamerbasierten *affinity matrix attachment* Assays zur Selektion von hochproduzierenden Zellen. Als Modell wurde hierfür der für Forschung und Industrie hochrelevante Wachstumsfaktor VEGF verwendet. Das Assay besteht dabei aus vier Schritten (siehe auch Abbildung 12):

1. Die Kopplung der Aptamere an die Zelloberfläche.
2. Die Produktion und Sekretion des Zielmoleküls durch Zellen
3. Die Detektion der sekretierten Zielmoleküle mit dem Aptamer
4. Die Sortierung der Zellen

Die kritischen Schritte sind die Kopplung der Aptamere an die Oberfläche und die Detektion der Zielmoleküle. Die Fähigkeit ein Zielmolekül spezifisch zu binden ist entscheidend von der Struktur des Aptamers abhängig. Für den Assay ist es wichtig, dass das Aptamer auch nach der Immobilisierung an der Zelloberfläche voll funktionsfähig bleibt. Sterische Hinderungen sind hierbei ein mögliches Problem, diese können durch die komplexen Strukturen auf der Oberfläche der Zelle auftreten, welche den Zugang zur Bindestelle blockieren können. Auf der Zelloberfläche befinden sich viele chemische Gruppen, die für eine Kopplung in Frage kommen, aber nicht jede Kopplungschemie ist auf Zellen anwendbar, denn es ist das Ziel, dass die Zellen nach der Kopplung noch funktionsfähig sind. Dementsprechend müssen die Reaktionsbedingungen sehr mild sein und die eingesetzten Chemikalien, dürfen im Verlauf der Immobilisierung, keine ausgeprägte toxische Wirkung auf die Zellen ausüben. Für den praktischen Teil wurden zwei infrage kommende Methoden untersucht: Die Immobilisierung durch Cyanurchlorid und Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³). Die Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode werden in den entsprechenden Kapiteln erörtert. Die genauen Versuchsbeschreibungen sind im Anhang zu finden (Abschnitt B1 bis B6).

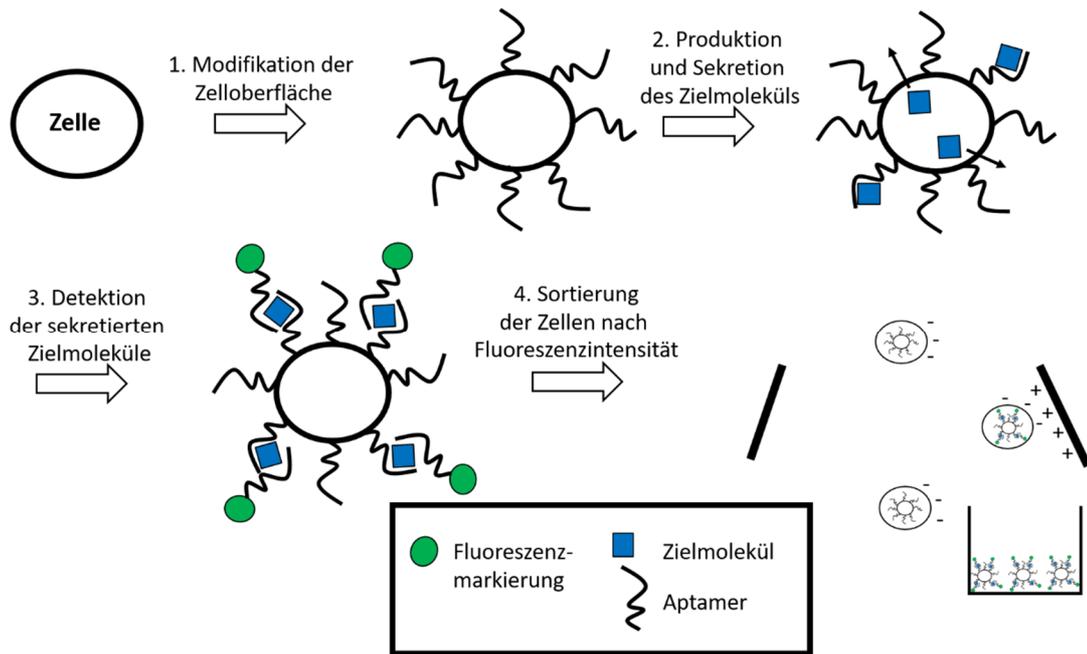


Abbildung 12: Fließschema des aptamerbasierten *affinity matrix attachment Assays*. Hier ist als Beispiel ein sogenannter *sandwich-assay* zur Detektion schematisiert.

2.2.1 Modifikation von Zellen mit Aptameren mittels Cyanurchlorid

Cyanurchlorid (Abbildung 13) oder seine Derivate sind in der Industrie häufig verwendete Chemikalien für Kopplungsreaktionen. Dazu zählen beispielsweise die Vernetzung von Plastik und Gummi [39]. Das Besondere ist die temperaturabhängige Reaktivität der Chloratome. Da die Reaktivität der Chloratome nach jeder Substitution abnimmt ist es möglich, die Reaktion temperaturabhängig zu steuern. Das erste Chloratom lässt sich bereits bei 4°C substituieren, während eine zweite Reaktion mit einem weiteren Chloratom bei dieser Temperatur kaum stattfindet. Erhöht man die Temperatur nun auf ca. 25°C wird die Reaktion des zweiten Chloratoms begünstigt. Um das dritte Chloratom zu substituieren würde eine Temperatur von über 80°C benötigt werden. So ist eine schrittweise Kopplung von verschiedenen Substanzen möglich. Die einzige Voraussetzung für die zu kuppelnden Substanzen ist, dass diese eine nukleophile Gruppe (z.B. eine -NH₂ oder -OH Gruppe) besitzen. Wobei anzumerken ist, dass Aminogruppen (-NH₂) eine höhere Nucleophilie besitzen als Alkoholgruppen (-OH). Darüber hinaus fördern basische Bedingungen (~pH 9) die nukleophile Substitution.

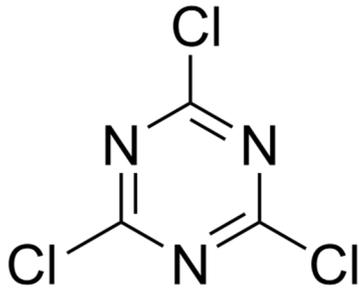


Abbildung 13: Strukturformel von Cyanurchlorid (2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin), auch bekannt als Trichlor-S-triazin

Cyanurchlorid zur Kopplung von Aptameren auf Zelloberflächen von intakten Zellen zu verwenden wurde bisher noch nicht durchgeführt und hat wesentliche Vor- und Nachteile, welche im Folgenden kurz erläutert werden.

Cyanurchlorid ist nach GHS (Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien) als giftig und ätzend eingestuft. Es gilt also den direkten Kontakt der Zellen mit Cyanurchlorid (bzw. seiner reaktivsten Form) zu vermeiden und toxische Effekte auf die Zellen auszuschließen. Dr. Michael Meyer konnte, im Rahmen seiner Dissertation am Institut für Technische Chemie, bereits im Vorfeld zeigen, dass im Wachstumsverhalten auch nach fünf Tagen kein Unterschied zu einer unbehandelten Kontrolle besteht [40]. In dieser Arbeit wurde auch die akute Toxizität des Assays betrachtet, um die Eignung von Cyanurchlorid zu prüfen.

Cyanurchlorid reagiert mit Nucleophilen, demnach auch mit Wasser. Da der Assay mit Zellen durchgeführt wird, wird entsprechend im wässrigen Medium gearbeitet (die Zellen sollen schließlich lebendig bleiben). Mit Wasser reagiert Cyanurchlorid zu Cyanursäure und Salzsäure, diese Reaktion verläuft jedoch deutlich langsamer als mit anderen Nucleophilen wie Aminogruppen. Die Stabilität im Wasser ist maßgeblich von der Temperatur abhängig. Um konkreter zu werden: Bei 0°C ist Cyanurchlorid für 12 h in Wasser stabil. Bei 30°C sind nach einer Stunde ca. 40 % hydrolysiert [41]. Es gilt also den Kontakt mit Wasser kurz zu halten. Ein gewisser Grad an Hydrolyse wird während des Assays sicher stattgefunden haben, jedoch sollte die Hydrolyse in Anbetracht der Temperatur und Dauer keinen großen Effekt auf die Proben gehabt haben. Es ist jedoch wichtig, dass die

Cyanurchlorid-Lösung stets frisch angesetzt und das Cyanurchlorid trocken gelagert wird, um eine Hydrolyse durch die Luftfeuchtigkeit zu reduzieren.

Cyanurchlorid ist trotz dieser Nachteile ein Kopplungsreagenz mit viel Potential für die Zellanwendung. Es ist günstig und leicht zu produzieren. In der Industrie wird es bereits vielfach angewendet und darüber hinaus ist die über die Temperatur zu regulierende Reaktivität ein großer Vorteil. Wie oben bereits erwähnt, liegt diese für die ersten beiden Chloratome bei 4°C bzw. 20-30°C. Dies ist ein optimaler Temperaturbereich für die Versuchsdurchführung, insbesondere bei der Anwendung für lebende Zellen. Eine funktionierende Kopplung an lebendige Zellen mittels Cyanurchlorid könnte eine interessante Methode für Industrie und Forschung sein und dürfte sich darüber hinaus für die Selektion hochproduzierender Zellen eignen.

Die Kopplung soll wie im Folgenden beschrieben ablaufen: Im ersten Schritt wird das Cyanurchlorid bei 4°C an das aminomodifizierte Aptamer gebunden und freies Cyanurchlorid abgetrennt, dadurch kommen die Zellen nicht mehr mit dem toxischen freien Cyanurchlorid in Kontakt. Im zweiten Schritt werden die cyanurchloridaktivierten Aptamere an freie Aminogruppen der Membranproteine der Zelle bei Raumtemperatur gebunden (Abbildung 14). Wird hierbei ein fluoreszenzmarkiertes Aptamer verwendet, kann die Immobilisierung des Aptamers direkt über eine Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden. Hierzu müssen die freien (bzw. ungebundenen) Aptamere abgetrennt werden. Indirekt kann die immobilisierte Menge des Aptamers über das Vermessen der Menge von ungebundenem Aptamer bestimmt werden. Das ist auch durch die Messung der Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) möglich. Eine Gefahr bei der Messung über die Absorption bei 260 nm ist, dass die Waschfraktion durch Zell-DNA verunreinigt werden kann und so die Messergebnisse verfälscht werden können. Eine Fluoreszenzmarkierung würde solche Fehler ausschließen. Darüber hinaus wäre es auch möglich die Aptamere mit DNA-Farbstoffen wie SYBR Green und Propidiumiodid zu färben, anstatt eine kovalente Fluoreszenzmarkierung zu verwenden. Das genaue Protokoll zur Immobilisierung ist in Abschnitt B1 zu finden.

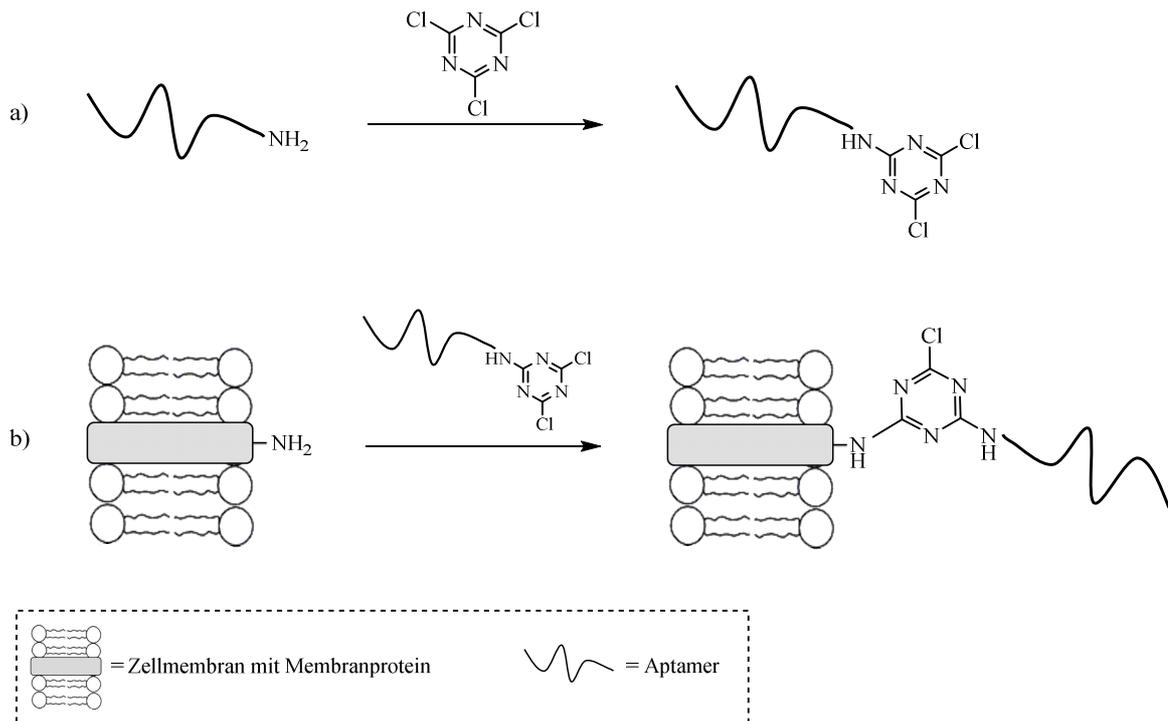


Abbildung 14: a) Cyanurchlorid wird bei 4°C an das Aptamer gebunden; b) Bei Raumtemperatur wird das Aptamer an die Zellen gekoppelt. Modifiziert nach Weitzenberg³

2.2.1.1 Direkter Nachweis

Für den direkten Nachweis der Immobilisierung wurden terminal fluoreszenzmarkierte Aptamere verwendet. Als Fluorophor wurde der Standardfarbstoff Fluorescein benutzt. Dieser wurde von der Firma IDT kovalent an das Aptamer gebunden. Ein Vorteil von Aptameren ist, dass so eine Modifikation ohne größeren Aufwand möglich ist, da Aptamere ohnehin schrittweise chemisch hergestellt werden und als letzter Baustein anstatt eines Nukleotids ein Fluorophor wie Fluorescein bzw. eine aktivierte Form wie FITC (Fluoresceinisothiocyanat) verwendet werden kann. Wenn die freien Aptamere nach der Kopplung an die Zellen abgetrennt werden, kann die Messung der Fluoreszenz zur Überprüfung der Immobilisierung angewendet werden. Mit Zellen als Kopplungspartner ist das Abtrennen sehr einfach: die Zellen werden bei niedriger Geschwindigkeit (ca. 300 rcf) zentrifugiert und der Überstand wird entfernt. Nun werden die Zellen erneut in Puffer suspendiert und zentrifugiert. Bereits nach einem Waschschrift ist der Großteil der freien Aptamere

³ Aus Bachelorarbeit von B. Sc. Merle Weitzenberg

abgetrennt und nach einem zweiten Waschschrift lässt sich kein freies Aptamer mehr im Überstand detektieren (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus eignet sich hier besonders die Durchflusszytometrie als Detektionsmethode. Denn hierbei wird weniger das umgebene Medium als vielmehr die einzelne Zelle vermessen. Hierdurch wird der Einfluss von nicht-gebundenem Aptamer auf die Messung neutralisiert. Es gibt jedoch stets unspezifische Bindungen, die beispielsweise aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen stattfinden. Aptamere sind aufgrund des negativ geladenen Phosphatrückgrades für ionische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Strukturen prädestiniert. Eine Kontrolle mit nicht-aktiviertem Aptamer (also ohne Cyanurchloridbehandlung) ist daher notwendig, um überhaupt Aussagen über eine erfolgreiche kovalente Kopplung machen zu können. Darüber hinaus besitzt jede Zelle eine gewisse Eigenfluoreszenz (sogenannte intrinsische Fluoreszenz) aufgrund von natürlich vorkommenden fluoreszierenden Molekülen in der Zelle. Das Auftreten von Fluoreszenz heißt also noch lange nicht, dass Aptamere detektiert wurden. Daher ist auch eine unbehandelte Kontrolle notwendig. Es ist auch möglich, die Eigenfluoreszenz der Zellen von den Werten der anderen Proben abzuziehen, um die Unterschiede besser zeigen zu können.

Die ersten Versuche sollten zum direkten Nachweis der Immobilisierung dienen. Hierfür wurde, wie oben beschrieben, ein FITC markiertes Anti-VEGF-Aptamer (V7t1) verwendet. Die Art des Aptamers spielt an dieser Stelle noch keine große Rolle, da es noch keine Funktionalität besitzen muss, sondern lediglich an die Zellen gekoppelt werden soll. Allerdings könnte durch die Faltung des Aptamers die terminale Aminogruppe, die zur Kopplung des Aptamers erforderlich ist, in der Aptamerstruktur verborgen vorliegen, wodurch eine Kopplung unmöglich wäre.

Die Ergebnisse zur Immobilisierung von Aptameren mittels Cyanurchlorid sind in Abbildung 15 gezeigt. Als Kontrolle wurden Proben ohne Cyanurchlorid und ohne Aptamer verwendet. Es konnte keine Kopplung der Aptamere detektiert werden. Ob Cyanurchlorid zu den Proben zugegeben wurde, spielte keine Rolle für die Signalthöhe. Es wäre möglich, dass keine Kopplung stattgefunden hat, auszuschließen ist eine Kopplung jedoch nicht. Messwerte, insbesondere Fluoreszenzsignale, können

mannigfaltigen Einflüssen unterliegen. Im Folgenden werden weitere solcher möglichen Ursachen für den fehlgeschlagenen Nachweis vorgestellt und untersucht.

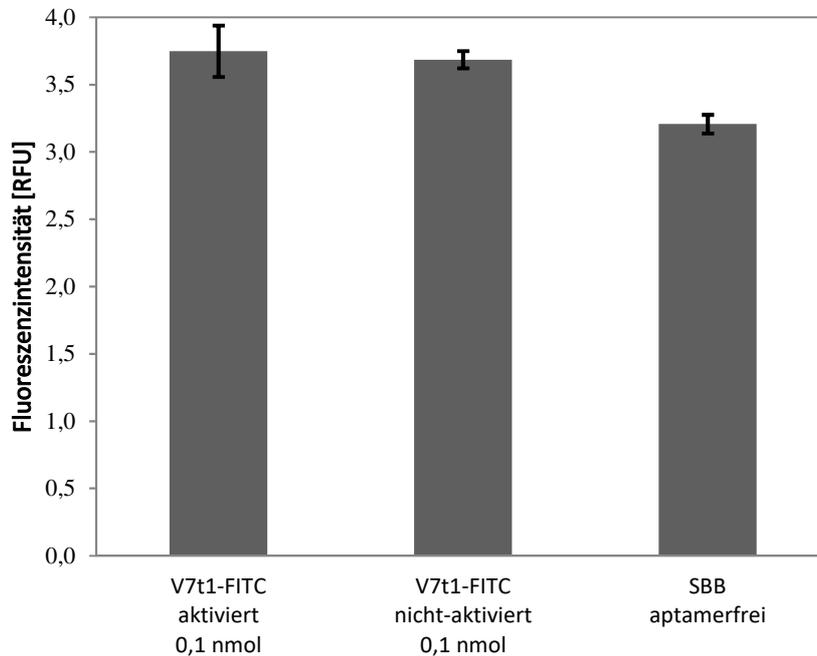


Abbildung 15: Mittlere Fluoreszenzintensität nach der Immobilisierung der fluoreszenzmarkierten Aptamere (V7t1-FITC). Aktiviert bedeutet unter Verwendung des Crosslinkers Cyanurchlorid. Nicht-aktiviert: ohne Crosslinker. SBB Aptamerfreie: Nur im Natriumboratpuffer (SBB) ohne Aptamere als Kontrollmessung der Eigenfluoreszenz. Das Cyanurchlorid wurde im 100fachen Überschuss gegenüber dem Aptamer eingesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 525/40 nm bandpassfilter.

Im Folgenden werden mögliche Störfaktoren des Cyanurchlorids auf die Fluoreszenz besprochen. Quenching -oder auch Fluoreszenzlöschung- durch einen Quencher bezeichnet den Energietransfer zwischen einem angeregten Fluorophor und einem Quenchemolekül. Ein Quencher kann verschiedenste Formen haben, Sauerstoff ist z.B. ein populärer Quencher [42]. Das Quenching führt zu einer Reduzierung oder sogar Eliminierung des Fluoreszenzsignals. Dieses Prinzip wird bei diversen Assays (z.B. Sauerstoffoptode) zu Nutze gezogen. Ungewolltes Quenching kann eine Fluoreszenzmessung jedoch stören. Cyanurchlorid könnte einen solchen Effekt auf die Messung haben.

Absorption bezeichnet die Aufnahme von Photonen und eine strahlungslose Umwandlung der aufgenommenen Energie. Es ist möglich, dass bestimmte Moleküle das Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren. Bei einer Fluoreszenzmessung kann die Absorption des eingestrahnten Lichts, aber auch die Absorption des abgestrahlten Lichts, die Messung stören.

Diese beiden Störfaktoren könnten auch bei dieser Untersuchung eine Rolle spielen. Die räumliche Nähe zu dem Fluorophor kann sich dabei besonders negativ auswirken, denn so kann ggf. das abgegebene Licht direkt absorbiert bzw. der Fluorophor direkt gequenchet werden. Die verwendeten Aptamere wurden so entworfen, dass die Kopplungsposition (5' terminal) und die Fluoreszenzmarkierung (3' terminal) einen maximalen Abstand zueinander haben. Durch die Faltung des Aptamers könnte es jedoch dennoch zu einer räumlichen Nähe kommen. In der folgenden Untersuchung sollte herausgefunden werden, ob Cyanurchlorid das Fluoreszenzsignal von FITC stört. Dazu wurde V7t1-FITC und Cyanurchlorid (in SBB), sowie jeweils das Lösungsmittel von Cyanurchlorid (Acetonitril und SBB) gemischt und die Fluoreszenz gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 zu sehen. Cyanurchlorid senkt das Fluoreszenzsignal, im Vergleich zu den Cyanurchlorid freien Proben, um den Faktor 8.

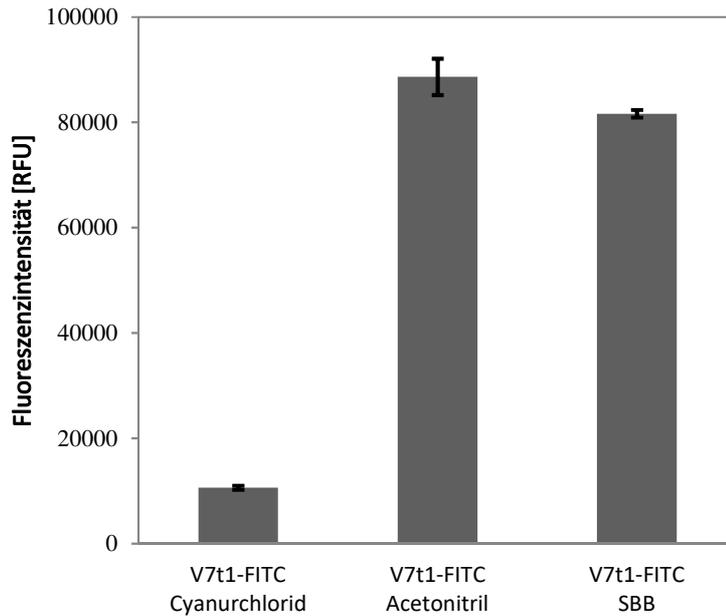


Abbildung 16: Fluoreszenzintensität bei 515 nm von V7t1-FITC in Lösung. Geprüft wurde die Wirkung von Cyanurchlorid auf die Fluoreszenz. Die Kontrollen sind Acetonitril (Lösungsmittel von Cyanurchlorid) und SBB (Bindepuffer des Aptamers). Die Proben wurden mittels Spektrofluorometer vermessen. Konzentration des Aptamers: 4,2 μ M. Cyanurchlorid in 100fachem Überschuss zum Aptamer.

Es gilt nun nach alternativen Detektionsmethoden zu suchen. Es ist möglich die DNA-Menge über die Absorption bei 260 nm zu bestimmen. Jedoch zeigen die vorherigen Ergebnisse (Abbildung 16), dass Cyanurchlorid optische Assays stark beeinflussen kann, entsprechend wurde zuerst untersucht, ob Cyanurchlorid auch auf diese Messmethode einen Einfluss hat. Dazu wurde das Aptamer mit Cyanurchlorid versetzt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Zur Kontrolle wurden die Aptamere ohne Zugabe (SBB) und mit Acetonitril (Lösungsmittel von Cyanurchlorid) versetzt. In Abbildung 17 ist zu sehen, dass Cyanurchlorid bei 260 nm stark absorbiert. Wenn die Probe Cyanurchlorid enthält, ist ein Anstieg der Absorption von über 60 % zu erkennen. Dies macht eine direkte Messung schwierig.

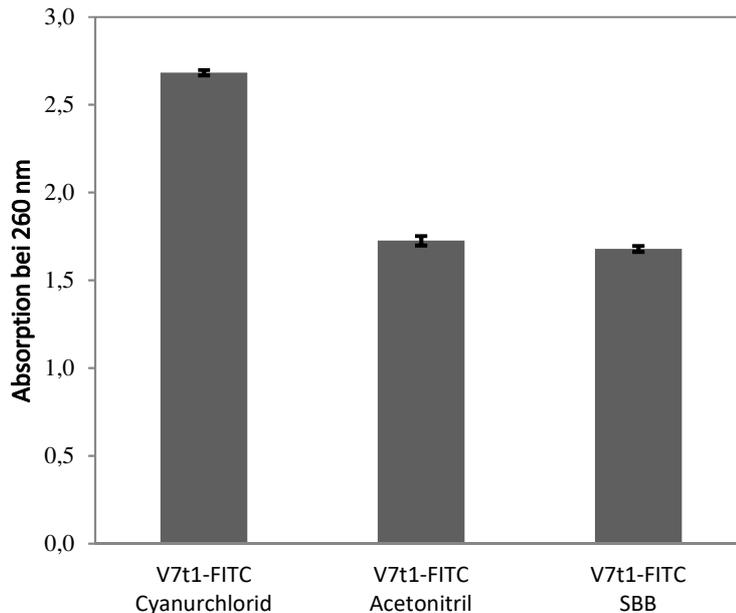


Abbildung 17: Absorption bei 260 nm von V7t1-FITC in Lösung. Die Kontrollen sind mit Zugabe von Acetonitril (Lösungsmittel von Cyanurchlorid) und reinem SBB (Bindepuffer des Aptamers) ohne Zugabe. Geprüft wurde die Wirkung von Cyanurchlorid auf die Absorption bei 260 nm. Die Proben wurden an einem Spektrofluorometer vermessen. Konzentration des Aptamers: 4,2 μ M. Cyanurchlorid in 100fachem Überschuss zum Aptamer.

Es stellt sich nun die Frage, ob das Cyanurchlorid in der Lösung an sich die Messung stört, beispielsweise durch Absorption des Anregungslichts, oder nur das räumlich sehr nahe gebundene Cyanurchlorid, durch Quenching. Wäre ersteres der Fall, könnte möglicherweise durch intensives Waschen das Cyanurchlorid soweit entfernt werden, dass eine Messung möglich wird, da ein sehr geringer Restanteil (ca. 1/3000) in den Proben verbleibt. Also wurden die Proben vor und nach dem Abtrennen von Cyanurchlorid überprüft. Zur Abtrennung des Cyanurchlorids wurde ein *spin-off* Filter mit 3 kDa *cut off* verwendet. Durch diesen Filter kann das Cyanurchlorid passieren und die größeren Oligonukleotide werden zurückgehalten. Auf diese Weise wurde das Cyanurchlorid entfernt.

Als Kontrolle wurden Proben ohne Cyanurchlorid vorbereitet. Es wurde erwartet, dass ein Teil des V7t1-FITC möglicherweise am Filter adsorbiert. Diese Erwartung erfüllte sich auch. In **Abbildung 18** ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal der Kontrolle nach dem Waschen um ca. 10 % abnahm. Bei Cyanurchlorid hingegen nimmt das Signal nach dem Waschen zwischen 10 – 20 % zu. Dieser Effekt spielt allerdings kaum eine Rolle. Das Kontrollsignal (ohne Cyanurchlorid) liegt um ca. 1000 %

höher. Den größten Einfluss auf die Signalverschiebung hat also das gekoppelte Cyanurchlorid. Das macht jede Fluoreszenzmessung äußerst schwierig.

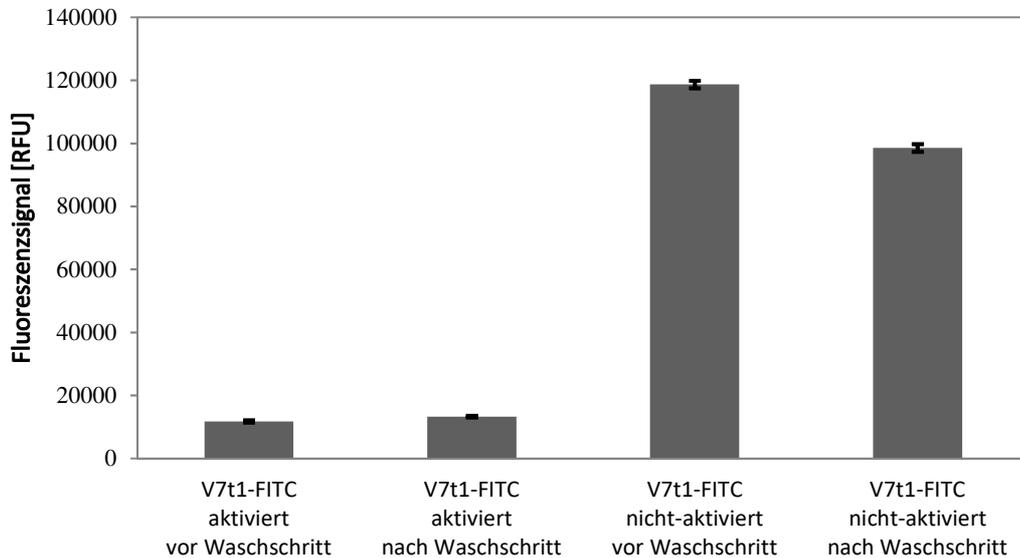


Abbildung 18: Fluoreszenzsignal von V7t1-FITC unter Einfluss von Cyanurchlorid. Hier wurde untersucht wie groß der Anteil des freien und des gebundenen Cyanurchlorids auf die Fluoreszenzlöschung ist. Nach dem Waschen ist das freie Cyanurchlorid weitestgehend entfernt. Bei der Kontrolle (nicht-aktiviert) wurde kein Cyanurchlorid verwendet. Verwendet wurden 0,32 nmol V7t1-FITC.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass ein direkter Nachweis von Cyanurchlorid aufgrund der Reduzierung des Fluoreszenzsignals nicht so einfach möglich ist. Daher wurde im nächsten Abschnitt versucht, die Konzentration der gebundenen Aptamere indirekt zu messen.

2.2.1.2 Indirekter Nachweis

Um die Menge des auf den Zellen immobilisierten Aptamers zu bestimmen, kann anstatt die Zellen direkt zu vermessen, auch der Anteil der verbliebenden Oligonukleotide in den Waschfraktionen bestimmt werden. Die Differenz der zugegebenen zu der in Lösung verbliebenen Menge an Aptameren ergibt dann die gekoppelte Menge. Der Vorteil ist, dass bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Aptamere mit einem Fluorospektrometer relativ leicht Kalibrationsreihen erstellt werden können, ohne die Zellen vermessen zu müssen. In **Abbildung 19** ist die

Kalibrationsgerade zu sehen. Der Unterschied zwischen den Fluoreszenzsignalen von FITC mit und ohne Cyanurchlorid wird hier sehr deutlich. Bei 0,8 μM FITC beträgt der Signalunterschied bereits mehr als Faktor drei. Auch wird deutlich, dass in Anwesenheit von Cyanurchlorid in diesem Konzentrationsbereich nur eine geringe Steigung der Fluoreszenzintensität mit steigender Aptamerkonzentration vorhanden ist und die Unterscheidung von Messwerten im nanomolaren Bereich nicht möglich ist, sondern –wenn überhaupt– nur im mikromolaren Bereich erfolgen kann. Zur Verdeutlichung: Es ist anhand der Werte erkennbar, ob die Konzentration zwischen 0,1 – 0,4 μM oder 0,5 – 0,8 μM liegt. Innerhalb dieser Konzentrationen lässt sich aber keine Unterscheidung treffen, da sich die Werte kaum voneinander unterscheiden. Trotz der geringen Genauigkeit wurde im Folgenden eine Quantifizierung über die Fluoreszenz durchgeführt, um zumindest eine Abschätzung der gebundenen Aptamermenge zu erhalten.

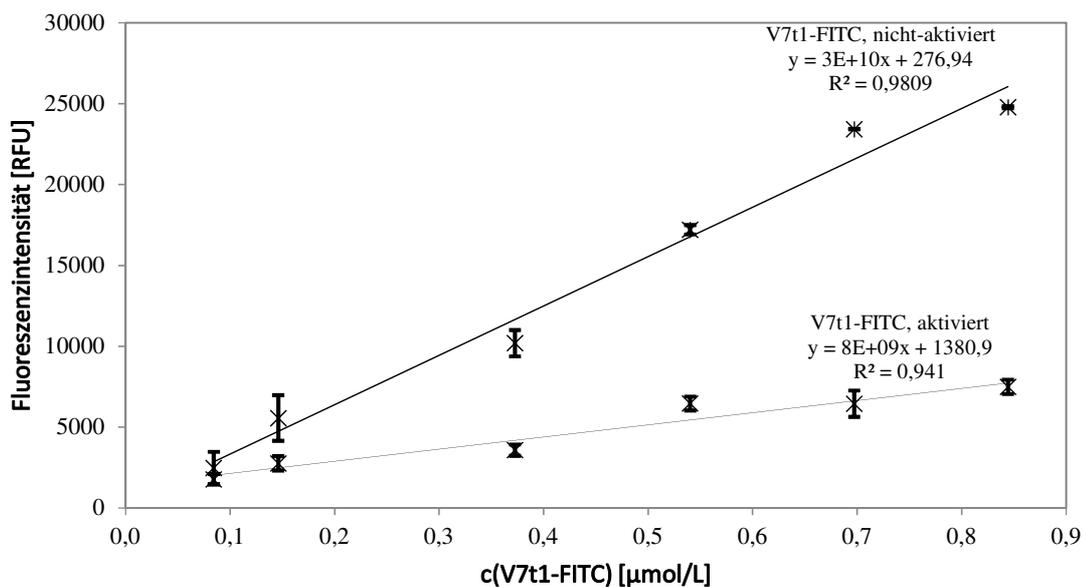


Abbildung 19: Kalibrationsreihe für das Fluoreszenzsignal von V7t1-FITC mit und ohne Cyanurchlorid. Konzentrationsbereich: 0,1 – 0,9 μM . Messung mittels Fluorospektrometer bei 488 nm. Cyanurchlorid wurde wie beim Protokoll vorgesehen in einem 100fachen Überschuss zum Aptamer zugegeben und das freie Cyanurchlorid anschließend entfernt. Fehlerbalken: Standardabweichung, $N=3$.

Das Ergebnis dieser wie oben erläutert stark fehlerbehafteten Analyse ist in **Abbildung 20** zu sehen.

Gemäß dieser Analyse haben nach einer Aktivierung mit Cyanurchlorid ca. 98 % der Aptamere an

Zellen gebunden, während ohne Einsatz von Cyanurchlorid ca. 65 % der Aptamere gebunden haben. Die Zahlenwerte sind hierbei, wie bereits dargelegt, nicht sehr genau, jedoch ist der Unterschied zwischen aktiviertem und nicht-aktiviertem Aptamer eindeutig, da durch Cyanurchlorid eine Steigerung von 50 % mehr gebundener Zellen erreicht werden konnte. Nachdem aufgezeigt wurde, dass die gewählte Messmethode ihre Schwächen hat, wurde im Folgenden versucht, mit DNA-bindenden Farbstoffen ein weiteres Verfahren zur Untersuchung der Aptamerimmobilisierung zu testen.

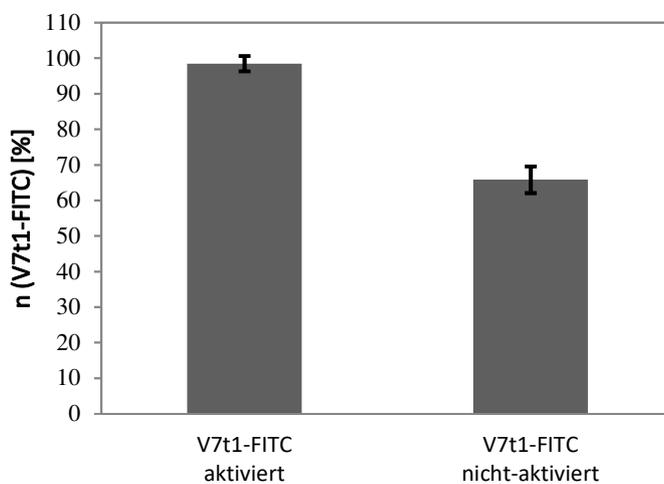


Abbildung 20: Berechnung der prozentual gebundenen Aptamermenge mit *crosslinker* (Cyanurchlorid) und ohne *crosslinker* an die Zellen. Fehlerbalken: Standardabweichung, N=3.

2.2.1.3 Nachweis durch DNA-Farbstoffe

Propidiumiodid (Abbildung 21) zählt zu den am häufigsten verwendeten DNA-Farbstoffen in der Durchflusszytometrie. Es absorbiert stark bei 488 nm und emittiert rotes Licht (um 600 nm). Eine Besonderheit ist, dass es bis zu 20-mal stärker leuchtet, wenn es in DNA interkaliert ist. Ein Nachteil dieser Anwendung ist, dass das Propidiumiodid nur in doppelsträngige Bereiche der DNA interkaliert. Aptamere bilden bei ihrer Faltung doppelsträngige Bereiche aus. Propidiumiodid hat den Vorteil, dass es intakte Membranen nicht durchdringt. Daher wird es normalerweise als Lebend-Tod-Farbstoff eingesetzt. Daher können wir es aufgrund dessen nach der Immobilisierung des Aptamers auf den Zellen einsetzen, weil es nicht die DNA im Zellkern erreicht. Allerdings könnte freigesetzte

DNA oder RNA aus toten Zellen die Messung stören. Eine hohe Viabilität ist deshalb bei dieser Methode besonders wichtig. Selbst wenn es zu einer Störung durch Zell-DNA kommen sollte, könnten die mit Aptamer gekoppelten Zellen ein signifikant höheres Signal geben.

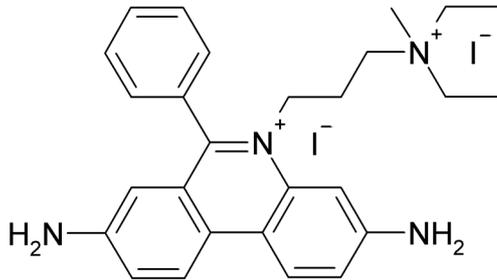


Abbildung 21: Strukturformel von Propidiumiodid. Ein gängiger lebend/tot-Farbstoff.

In den folgenden Versuchen wurden die Aptamere mittels Cyanurchlorid immobilisiert (außer bei der „nicht-aktiviert“ Kontrolle) und die Zellen mittels Propidiumiodid gefärbt. Anschließend wurden die Proben am Durchflusszytometer gemessen. Die Untersuchungen zeigen jedoch, dass Propidiumiodid nicht geeignet ist, um eine Immobilisierung mit Aptameren nachzuweisen (siehe **Abbildung 22**). Vermutlich machen die doppelsträngigen Bereiche des verwendeten Aptamers einen zu kleinen Anteil der Aptamersequenz aus. Jedoch konnte festgestellt werden, dass Cyanurchlorid keinen Einfluss auf die Fluoreszenz von Propidiumiodid hat.

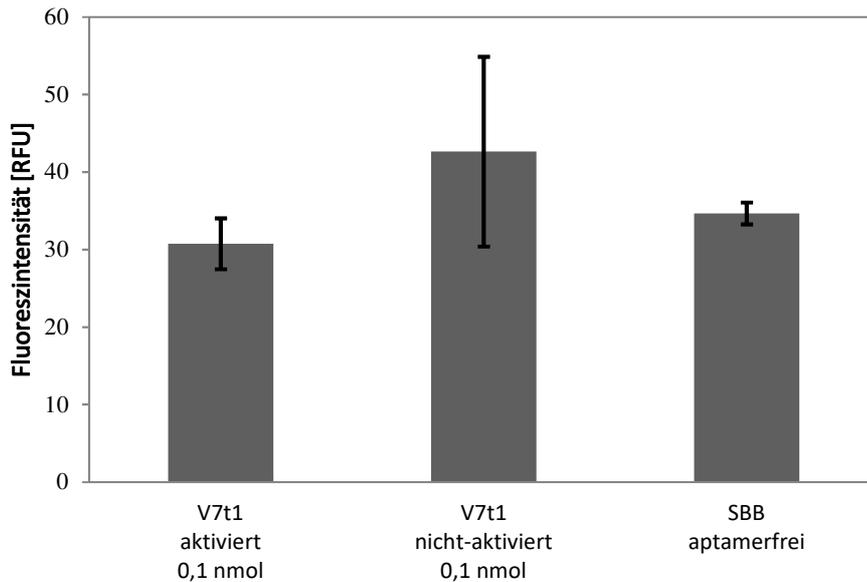


Abbildung 22: Fluoreszenzintensität der Propidiumiodid-gefärbten Aptamere. Jeweils mit und ohne Cyanurchlorid, sowie ohne Aptamer und ohne Cyanurchlorid. Pro 10^6 Zellen wurden $2,5 \mu\text{l}$ Propidiumiodid-Lösung (1 mg/ml) zugegeben. Fehlerbalken: Standardabweichung. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 675/30 nm Bandpassfilter.

Ein weiterer populärer DNA-Farbstoff ist SYBR Green. Er wird vor allem bei der quantitativen PCR (qPCR) zur Mengenbestimmung von DNA eingesetzt und hat ähnliche spektrale Eigenschaften wie Fluorescein oder GFP. Ein Vorteil ist, dass der Farbstoff SYBR Green II bevorzugt an einzelsträngige DNA/RNA bindet. Der Nachteil gegenüber Propidiumiodid ist, dass SYBR Green auch intakte Membranen durchdringt. In der Durchflusszytometrie kann SYBR Green eingesetzt werden um sehr kleine Zellen (z.B. Bakterien) besser sichtbar zu machen. Wenn mit einem membrangängigen Farbstoff gearbeitet wird, muss die Färbung der DNA vor dem Kontakt mit den Zellen erfolgen, ansonsten würde die DNA/RNA in den Zellen gefärbt werden. Das so vorgefärbte Aptamer könnte auch eine Alternative zu teuren kovalenten Labeln sein.

In dem folgenden Experiment wurden die Aptamere vor der Aktivierung und Immobilisierung auf den Zellen mit SYBR Green II gefärbt, anschließend immobilisiert und mittels Durchflusszytometer vermessen. Dabei wurde gezeigt, dass auch SYBR Green II von Cyanurchlorid stark beeinflusst wird. Bei der gleichen Menge an Aptamer wird die Fluoreszenz in Anwesenheit von Cyanurchlorid um den

Faktor fünf gesenkt (**Abbildung 23**). Das deutet darauf hin, dass auch in den vorangegangenen Versuchen, Cyanurchlorid die Fluoreszenz von FITC nicht durch eine spezifische Reaktion beeinflusst hat, sondern vermutlich aufgrund von Fluoreszenzlöschung. SYBR Green hat sehr ähnliche spektrale Eigenschaften wie FITC und wird ebenfalls stark beeinflusst.

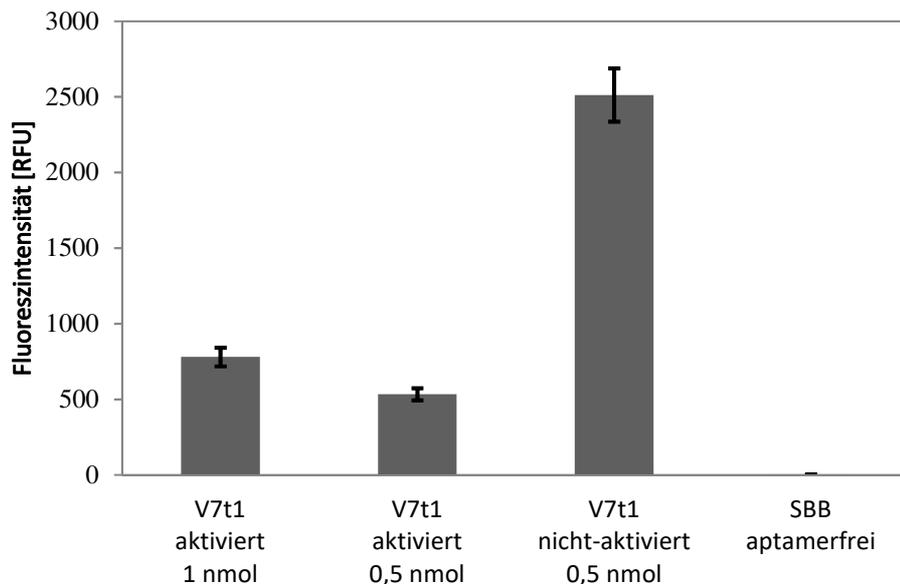


Abbildung 23: Mittlere Fluoreszenzintensität nach der Immobilisierung der SYBR Green II gefärbten Aptamere. Aktiviert bedeutet unter Verwendung des *crosslinkers* Cyanurchlorid. Nicht-aktiviert: ohne *crosslinker*. SBB aptamerfrei: Nur im Natriumboratpuffer (SBB) ohne Aptamere mit Cyanurchlorid als Kontrollmessung der Eigenfluoreszenz. Das Cyanurchlorid wurde im fünffachen Überschuss gegenüber dem Aptamer eingesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 525/40 nm Bandpassfilter. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Auch mit DNA-Farbstoffen konnte keine Lösung des Problems, des quantitativen Nachweises der Aptamerimmobilisierung, erzielt werden. Jedoch konnte es weiter eingegrenzt werden. Zumindest Propidiumiodid, welches im roten Bereich emittiert, wurde nicht durch Cyanurchlorid beeinflusst. In der Zukunft sollte darauf geachtet werden, dass ein Farbstoff mit anderen spektralen Eigenschaften als FITC angewendet wird. Dennoch stellt sich Cyanurchlorid für die Analytik als schwieriges Molekül dar. Mögliche Effekte auf die Fluoreszenz könnten auch auf spätere Untersuchungen der Bindung mit einem Zielmolekül Auswirkungen haben. Daher wurde im Folgenden ein alternatives Kopplungsverfahren untersucht (Abschnitt 2.2.2).

2.2.1.4 Schlussfolgerung zur Immobilisierung mit Cyanurchlorid

Cyanurchlorid ist eine für Kopplungen etablierte Substanz. Auch die Zellen überstehen die Prozedur, obwohl Cyanurchlorid toxisch ist. Das große Problem von Cyanurchlorid sind die stark fluoreszenzlöschenden Eigenschaften. Das Fluoreszenzsignal der getesteten Fluorophore wurde gestört und eine Interpretation der Ergebnisse wurde so schwierig. Das Herausrechnen mittels einer Kalibrationsreihe ist in Anbetracht der starken Signalreduktion ein nicht zufriedenstellender Ansatz, insbesondere im Hinblick auf die spätere Nutzung im Assay zur Detektion des Zielmoleküls. Daher ist Cyanurchlorid ungeachtet seiner Kopplungseigenschaften für einen fluoreszenzbasierten Assay nicht zu empfehlen. Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass Fluorophore mit anderen spektroskopischen Eigenschaften nicht gestört werden. Um die Probleme der Fluoreszenzlöschung der verwendeten Fluorophore zu umgehen, wurde eine alternative Kopplungschemie getestet, welche im folgenden Kapitel vorgestellt wird.

2.2.2 Modifikation von Zellen mit Aptameren mittels

Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³)

Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³) ist ein sogenannter homobifunktionaler *crosslinker*. Es besitzt zwei identische funktionelle Gruppen, die mit jeweils einem Kopplungspartner reagieren sollen. BS³ ist besonders für Amino-Amino-Kopplungen geeignet. Die benötigten Gruppen sind die gleichen, die für die Kopplung mit Cyanurchlorid benötigt werden. Ein Nachteil von BS³ gegenüber Cyanurchlorid ist, dass die Gruppen gleich reaktiv sind, also keine selektive Kopplung durchgeführt werden kann. Dadurch sind Kopplungen zweier gleicher Moleküle, welche nicht zum gewünschten Kopplungsprodukt, sondern zu dimerisierten Komponenten führen, deutlich häufiger. Das mag die Effizienz der Kopplung stören, für die durchflusszytometrische Analyse ist dies jedoch unerheblich. Sowohl aneinander gebundene Zellen als auch Aptamere können von der durchflusszytometrischen

Analyse ausgeschlossen werden. Vorteilhaft gegenüber Cyanurchlorid ist die bessere Wasserlöslichkeit. BS³ funktioniert ebenfalls sehr gut unter physiologischen Bedingungen (in PBS mit pH 7-9) und wurde bereits für die Kopplung von Proteinen an Zelloberflächen verwendet. Es existiert also ein Protokoll, die in der Literatur beschriebene Untersuchungen zur Anwendungen mit Zellen waren allerdings wenig umfangreich und wurden noch nie mit Aptameren durchgeführt. Das genaue Protokoll für die Immobilisierung mittels BS³ findet sich im Anhang im Abschnitt B2.2.

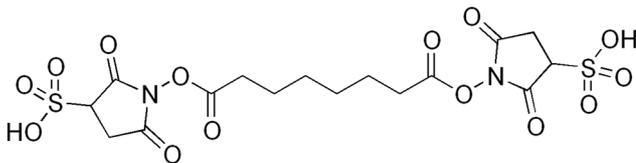


Abbildung 24: Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³). Den bifunktionalen Crosslinker erkennt man an den beiden identischen Abgangsgruppen. Angriffspunkt für die nukleophile Substitution sind die Carbonsäureamide. Die Sulfatgruppen dienen zur Steigerung der Löslichkeit im Wasser.

Die ersten Untersuchungen zielten also darauf ab, ein Protokoll zu etablieren, die Immobilisierung zu überprüfen und die immobilisierte Menge an Aptamer zu quantifizieren. Dazu wurde das gleiche fluoreszenzmarkierte Aptamer wie für die Untersuchungen zur Kopplung mit Cyanurchlorid verwendet. Die Quantifizierung erfolgte über die Messung der Fluoreszenz im Überstand der nicht-gebundenen Aptamere und der Differenz zu der eingesetzten Aptamermenge. Über eine Kalibrationsreihe konnte die Konzentration berechnet werden. Diese Ergebnisse wurden semi-quantitativ über die direkte Messung der Zellen mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 25** und **Abbildung 26** dargestellt.

Diese zeigen einen Fluoreszenzanstieg durch die Kopplung der fluoreszenzmarkierten Aptamere an die Zelle mittels BS³. Im Gegensatz zu den Messungen mit Cyanurchlorid ist mit BS³ ein deutlicher Fluoreszenzsignalanstieg zu beobachten. Umso weniger Zellen eingesetzt wurden, desto höher das Fluoreszenzsignal, da mehr Aptamere pro Zelle vorliegen. Das höchste Signal wurde entsprechend bei 5 Millionen Zellen beobachtet. Die Ergebnisse zwischen Fluoreszenzspektrometer und Durchflusszytometer sind hier deckungsgleich (vergleiche **Abbildung 25** und **Abbildung 26**). Die

Berechnungen aus der Differenz des eingesetzten Aptamers und des im Überstand verbliebenen Aptamers ergeben bei einer Kopplung der gleichen Aptamermenge auf 35 Millionen Zellen maximal ca. 290.000 Aptamere pro Zelle und bei einem Ansatz mit 5 Millionen Zellen maximal ca. 2.800.000 Aptamere pro Zelle (es handelt sich hier um eine Annahme über die Differenz im Überstand). Um genug Material zur Analyse zu erhalten, wurden keine niedrigeren Zellkonzentrationen verwendet. Während der Immobilisierung und der Waschschriffe gehen erfahrungsgemäß einige Zellen verloren. Bei 5 Millionen eingesetzter Zellen war die Zellzahl stets ausreichend um eine statistisch aussagekräftige durchflusszytometrische Analyse durchzuführen. Daher wurden in den folgenden Versuchen 5 Millionen Zellen eingesetzt. Die Protokolle befinden sich im Anhang im Abschnitt B3.

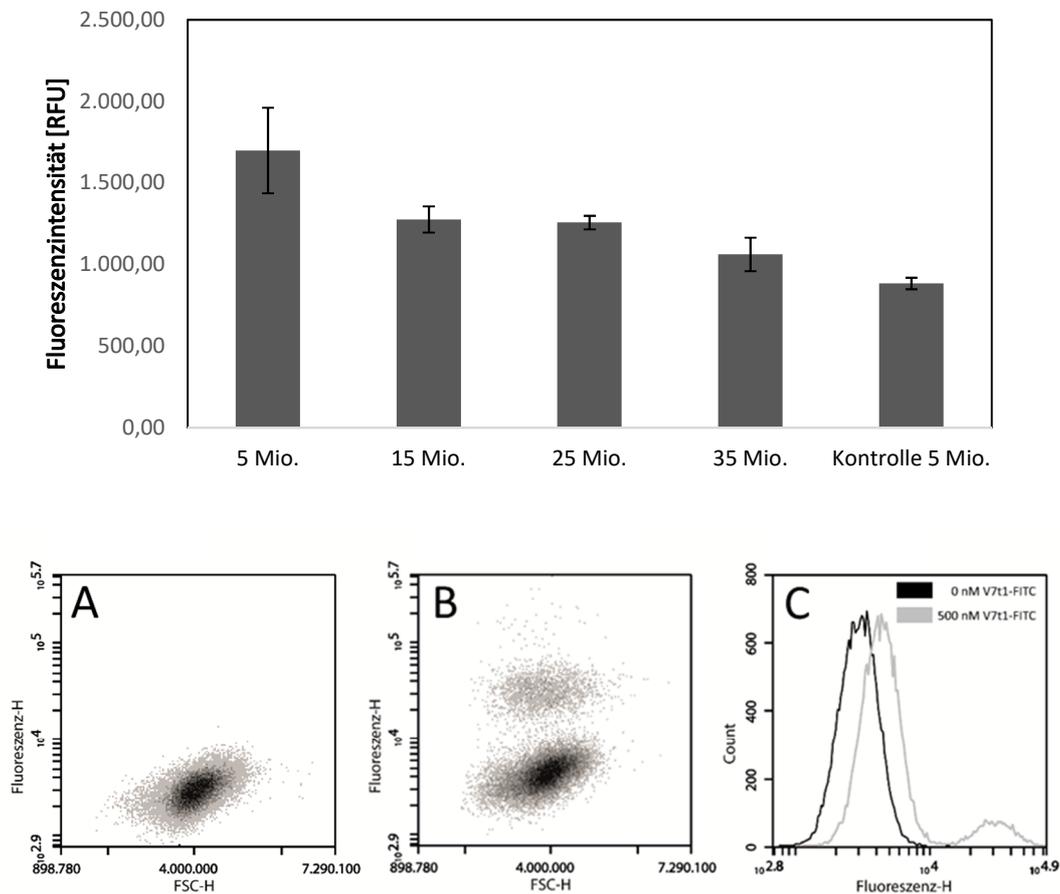


Abbildung 25: Mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen bei Zellkonzentrationen von 5 – 35·10⁶ Zellen/mL um Autofluoreszenz bereinigt. Kontrolle: Immobilisierung mit 100 nM V7t1-FITC und 5·10⁶ Zellen/mL durchgeführt ohne BS³, mit Aptamer. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung von mindestens 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm Bandpassfilter. A: Fluoreszenz einer unbehandelten Kontrolle. B: Fluoreszenz einer mit BS³ immobilisierten Probe (500 nM V7t1-FITC). C: Vergleich der Signale von einer Probe ohne immobilisiertes Aptamer und einer mit 500 nM immobilisierten Aptamer.

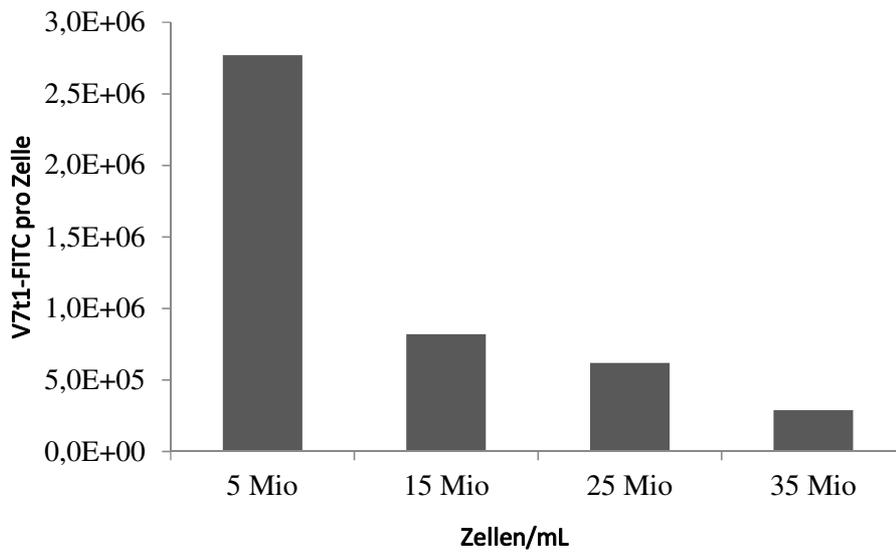


Abbildung 26: Anzahl der auf die Zelloberfläche gekoppelten V7t1-FITC pro Zelle bei Zellkonzentrationen von $5 - 35 \cdot 10^6$ Zellen/mL, einer Aptamerkonzentration von 100 nM und 1 mM BS³. Die Werte wurden durch Differenzbildung der Anfangskonzentration von 100 nM und der fluoreszenzspektrometrisch ermittelten V7t1-FITC-Konzentration im Reaktionsüberstand berechnet.

Als nächster Schritt sollte die verwendete Aptamermenge optimiert werden, um bei geringem Ressourceneinsatz ein deutliches Signal zu erhalten und so auch die Sensitivität der Methode zu testen. Darüber hinaus wurde der Verlauf des Fluoreszenzsignals bei verschiedenen Aptamerkonzentrationen dokumentiert. Dabei wurden zwei verschiedene durchflusszytometrische Auswertemethoden auf die gleichen Daten angewandt. Dies soll zusätzlich verdeutlichen welchen Einfluss die Auswertemethode auf die Ergebnisse hat. Bisher wurde das Fluoreszenzsignal gegen die Konzentration aufgetragen. Eine weitere gängige Methode ist die Markeranalyse. Hier wird ein Schwellenwert festgelegt, ab welchem Zellen als positiv bzw. als negativ bewertet werden. Dieser Schwellenwert wird anhand einer Kontrolle festgelegt. Üblicherweise wird eine Negativkontrolle verwendet und der Schwellenwert so festgelegt, dass die Kontrolle 100 – 99,5 % negative Zellen enthalten soll. Meistens wird eine gewisse Toleranz gegenüber falschpositiven Messwerten eingeräumt, die bis zu 0,5 % falschpositive Messerwerte enthalten kann. Vorteil dieser Methode ist, dass nur Zellen berücksichtigt werden, die eine relativ hohe Fluoreszenz aufweisen und dadurch

leichte Fluoreszenzerhöhungen durch mögliche unspezifische Bindungen (z.B. durch elektrostatische Wechselwirkungen) zum Großteil nicht in die Ergebnisse mit einfließen. Da die Messwerte nur noch die beiden Werte „positiv“ oder „negativ“ annehmen, geht jedoch ein großer Teil der Informationen verloren. Allerdings kann so gut veranschaulicht werden, wie viele Zellen Aptamere gebunden haben, oder in anderen Fällen z.B. tot sind, oder bestimmte Antigene tragen. In solchen Fällen ist diese Methode sehr hilfreich in der Darstellung. Beide Methoden wurden in **Abbildung 27** und **Abbildung 28** dargestellt. **Abbildung 27** zeigt eine Markeranalyse der Immobilisierung und **Abbildung 28** das mittlere Fluoreszenzsignal.

In **Abbildung 27** ist also dargestellt, auf wie vielen Zellen Aptamer gebunden wurde. Der Verlauf zeigt, dass selbst bei der höchsten Aptamerkonzentration von 500 nM lediglich auf 11 % der Zellen eine detektierbare Menge an Aptamer gebunden wurde (ohne *crosslinker* mit ebenfalls 500 nM Aptamer sind es ca. 1 %). Der Anstieg ist also deutlich, und mit einer weiteren Erhöhung der Aptamerkonzentration könnte wahrscheinlich auch eine höhere Bindung an der Zelloberfläche erreicht werden. Um den Assay weiterhin ressourcenschonend zu gestalten, wurde die Aptamermenge nicht noch weiter erhöht und mit den 11 % modifizierten Zellen weitergearbeitet. Das entspricht ca. 550.000 Zellen, eine hinreichend große Menge für eine durchflusszytometrische Analyse und mit der konventionellen LDC-Methode (Abschnitt 2.1.2.1) deutlich aufwändiger zu erreichen. Darüber hinaus würde eine größere Konzentration an Aptameren auch die Bildung von Aptamer-Aptamer Dimeren durch den homobifunktionalen Crosslinker BS³ erhöhen. Gegen die Fluoreszenz aufgetragen (**Abbildung 28**) werden ähnliche Ergebnisse erhalten. Für die folgenden Experimente wurden auf Grundlage dieser Ergebnisse 500 nM Aptamer und 5 Millionen Zellen verwendet.

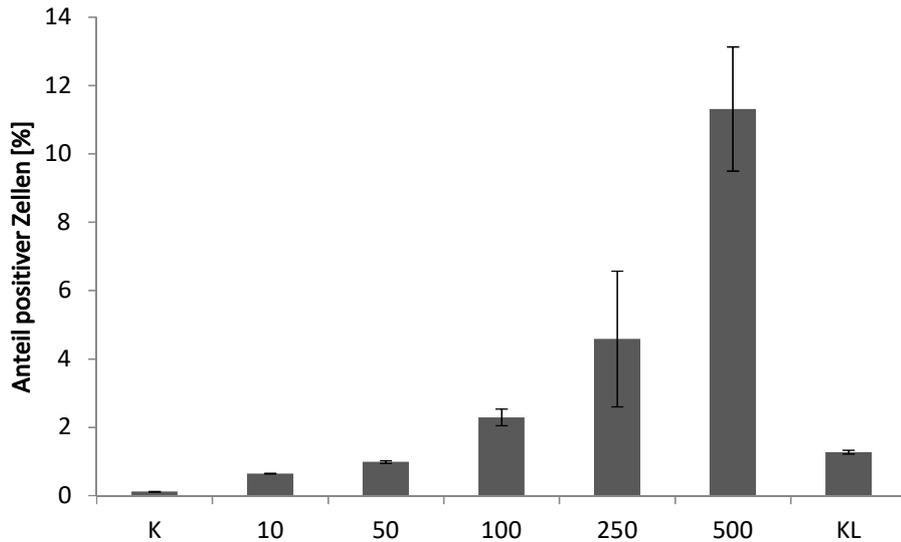


Abbildung 27: Anteil der Zellen mit einer Fluoreszenzintensität oberhalb des gesetzten Markers bei V7t1- FITC Konzentrationen von 10 – 500 nM. Die Immobilisierung wurde mit einer Zellkonzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL durchgeführt. K: unbehandelte Zellen in PBS. KL: Immobilisierung durchgeführt mit 500 nM V7t1-FITC und ohne BS³. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Duplikaten von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm bandpassfilter.

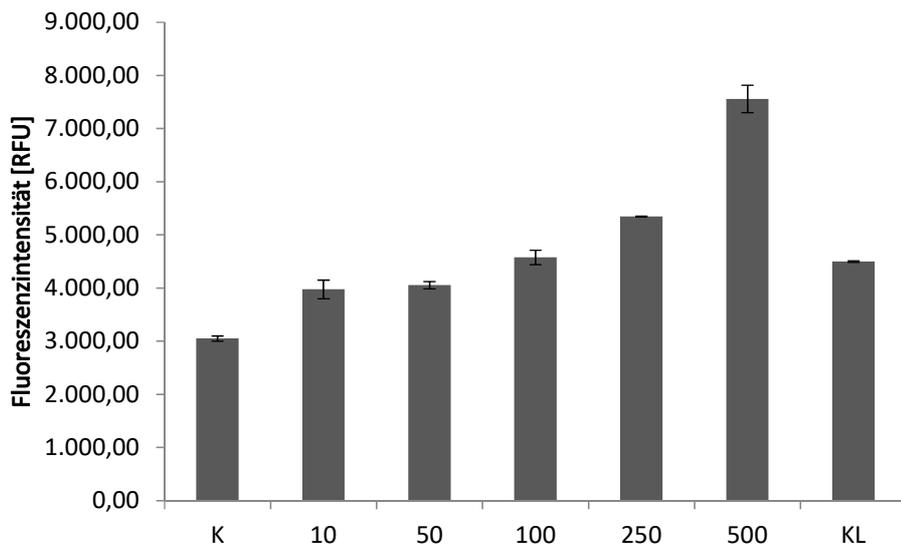


Abbildung 28: Fluoreszenzintensität gemittelt über alle Zellen bei V7t1-FITC Konzentrationen von 10 – 500 nM. Die Immobilisierung wurde mit einer Zellkonzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL durchgeführt. K: unbehandelte Zellen in PBS. KL: Immobilisierung mit 500 nM V7t1-FITC und $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL ohne BS³. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Duplikaten von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt.

Im Nachfolgenden sollte die Art der Bindung überprüft werden, also ob eine Amino-Amino-Kopplung oder eine andere Art von Bindung stattfindet. Beispielsweise könnte das BS³ an funktionellen Gruppen der DNA oder des Fluorophors binden. Es wurden hierfür FITC markierte DNA-Einzelstränge

ohne Aminogruppe als Kontrolle verwendet, wobei die Versuche sowohl mit als auch ohne BS³ durchgeführt wurden. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 29** dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Anwesenheit einer Aminogruppe die Anzahl der positiven Zellen fast vervierfacht. Auffällig war, dass die unspezifischen Bindungen des Kontrollnukleotids (randomisierte Sequenz) höher waren als die des verwendeten Aptamer V7t1. Das ist auf die unterschiedliche Größe und Sequenz zurückzuführen. Bei der Verwendung von Kontrollen sollten daher besser Oligonukleotide mit gleicher Größe und ähnlichen Anteilen an Basen verwendet werden, damit unspezifische Bindungen ähnlich groß sind. Für den Nachweis der Kopplung über die Aminogruppe genügt jedoch auch ein verschieden großes Oligonukleotid.

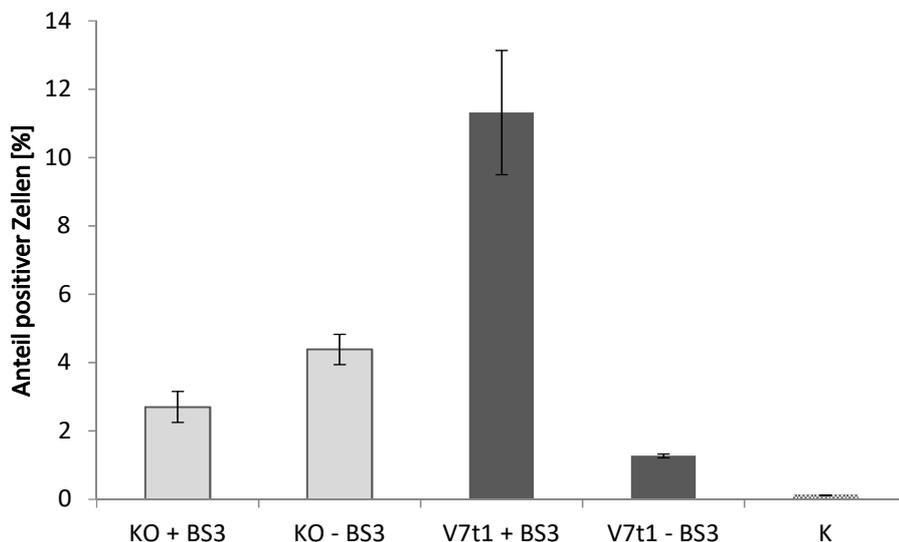


Abbildung 29: Anteil der Zellen mit einer Fluoreszenzintensität oberhalb des gesetzten Markers bei Immobilisierung von der Kontrollsequenz KO ohne Aminomodifizierung (hell) bzw. von V7t1-FITC (dunkel) mit Aminomodifizierung. K: unbehandelte Zellen in PBS. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Duplikaten von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm bandpassfilter.

2.2.3 Funktionalitätsprüfung von Aptameren auf der Zelloberfläche

Eine wichtige Fragestellung für dieses Assay ist, ob die immobilisierten Aptamere funktional sind, also in der Lage sind, ihr Zielmolekül zu binden. Aptamere benötigen hierfür ihren richtigen Faltungszustand. Voraussetzung dafür ist die richtige Umgebung. Vor allem werden metallische Ionen wie Magnesium, Kalium und Natrium benötigt. Auch der pH-Wert spielt für die Bindung eine

Rolle. Der korrekte Faltungspuffer wird bei Aptameren Selektions- oder Bindepuffer genannt. Es handelt sich dabei zumeist um den Puffer in dem das Aptamer selektiert wurde. Ebenfalls sehr relevant ist ein so genannter *spacer* (Abstandhalter), welcher zu einer räumlichen Distanz des Aptamers zur Oberfläche führt und so eine korrekte Faltung ermöglichen kann. Hierfür wird häufig eine Verlängerung der Sequenz eingesetzt.

In den folgenden Versuchen wurde das Aptamer V7t1 (Sequenz in Abschnitt A4) verwendet. In diesem Abschnitt ist nun erstmalig die Funktion des Aptameres relevant, weshalb sie hier kurz erläutert wird. V7t1 wurde gegen den Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) selektiert und bindet diesen unter optimalen Bedingungen mit einer Dissoziationskonstante (K_D) von 1,1 – 1,4 nM [43]. VEGF findet beispielsweise in Zellkulturmedien Anwendung und ist für die Industrie und Forschung hochrelevant. Der Versuch wird folgendermaßen durchgeführt: Die Aptamere werden nach den optimierten vorherigen Protokollen mit BS³ immobilisiert und dann mit fluoreszenzmarkierten VEGF-Molekülen inkubiert. Wenn die Aptamere funktional vorliegen, sollten sie die VEGF-FITC-Moleküle binden und zu einem durchflusszytometrisch detektierbaren Fluoreszenzanstieg führen (Abbildung 30).

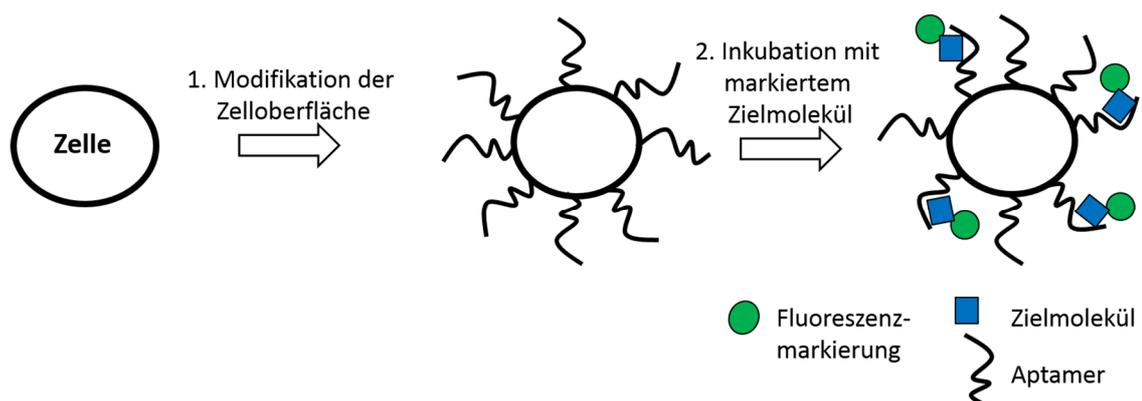


Abbildung 30: Ablauf der Funktionalitätsüberprüfung der immobilisierten Aptamere.

Als erstes wird die Funktionalität mit dem BS³-Crosslinker immobilisierten Aptameren betrachtet. In **Abbildung 31** sind die Ergebnisse mit VEGF-Konzentrationsreihe, jeweils mit und ohne V7t1, sowie

mit einem Oligonukleotid, welches eine randomisierte Sequenz enthält, dargestellt. Bei allen Proben ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der VEGF-FITC Konzentration festzustellen. Der Mittelwert von der Probe mit V7t1 liegt zwar höher, aber es ist klar zu erkennen, dass es sich nicht um ein signifikant höheres Signal handelt. Die Messwerte streuen hierfür zu stark. Das deutet darauf hin, dass die Aptamere möglicherweise nicht funktional sind. Die Ergebnisse könnten aber auch andere Ursachen haben, worauf im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

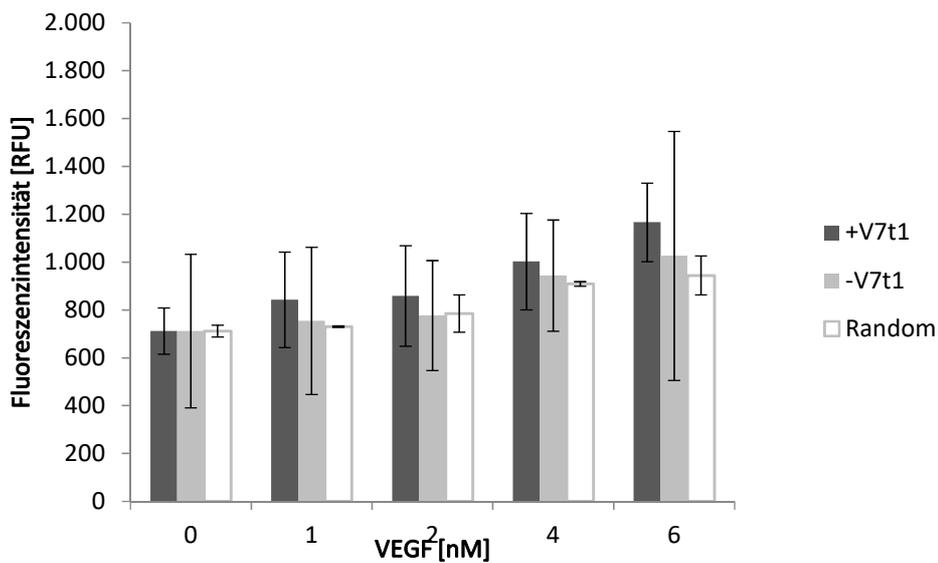


Abbildung 31: Mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen bei VEGF-Konzentrationen von 0-6 nM. Die Immobilisierung wurde mit 500 nM V7t1 (dunkelgrau) bzw. einer Randomsequenz (weiß), 1 mM BS³ und einer Zellkonzentration von 5·10⁶ Zellen/mL durchgeführt. Der gesamte Versuch erfolgte unter Verwendung von PBS-V7t1 Puffer. Als Negativkontrolle (hellgrau) dienen Zellen ohne Aptamere auf der Zelloberfläche. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung aus Duplikaten von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt.

Ähnliche Versuche wurden auch nach der Immobilisierung mit Cyanurchlorid durchgeführt. Die Immobilisierung konnte aufgrund der Fluoreszenzlöschung von Cyanurchlorid nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, jedoch könnte dennoch eine Immobilisierung stattgefunden haben, bzw. theoretisch müsste eine Immobilisierung stattgefunden haben. Für den folgenden Versuch wurde neben V7t1 das Aptamer Del5-1 verwendet. Es hat das gleiche Zielmolekül, nämlich VEGF. Darüber hinaus wurde Myoglobin-FITC als Negativkontrolle auf Zielmolekülebene verwendet. Bei Aptamerexperimenten werden in der Regel zwei Negativkontrollen verwendet, eine auf DNA/RNA-Ebene, eine definierte Zufallssequenz bzw. hier Kontrolloligonukleotid genannt, welches

optimalerweise die gleiche Länge und einen ähnlichen Basenanteil aufweist. Die zweite Kontrolle erfolgt auf der Zielmolekülebene und ist ein Nicht-Zielmolekül, welches üblicherweise eine ähnliche Ladung im verwendeten Puffer aufweisen sollte, ergo über einen ähnlichen isoelektrischen Punkt verfügen sollte. Dies ist damit zu begründen, dass DNA/RNA-Moleküle (bzw. Aptamere) ein negativ geladenes Phosphatrückgrad besitzen und so zu ionischen Wechselwirkungen neigen. Bei Myoglobin und VEGF sind die isoelektrischen Punkte ähnlich (VEGF: ~8,5 [44]; Myoglobin: ~7,9 [45]).

Im folgenden Experiment wurden die nicht-markierten Aptamere mittels Cyanurchlorid immobilisiert und dann die Zellen mit FITC-markierten Zielmolekülen inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer vermessen. In **Abbildung 32** sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Myoglobin-FITC zeigt keinen Signalanstieg. Während mit VEGF-FITC ein konzentrationsabhängiger Anstieg zu sehen ist. In **Abbildung 32** ist gut zu sehen, wie wichtig das randomisierte Nukleotid ist, um die Spezifität dieser Bindung zu erkennen. Diese ist nämlich nicht vorhanden. Es spielt hier keine Rolle, ob Aptamer oder randomisiertes Oligonukleotid verwendet wurde: das Signal steigt an. Dennoch ist die Ursache hierfür interessant und es zeigt sich auch, dass eine Kontrolle ohne Aptamer essentiell ist. Sonst kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob VEGF an die Oligonukleotide oder an die Zellen bindet. Sollte VEGF an die Zellen binden, ist Myoglobin als Negativkontrolle nicht sehr gut geeignet.

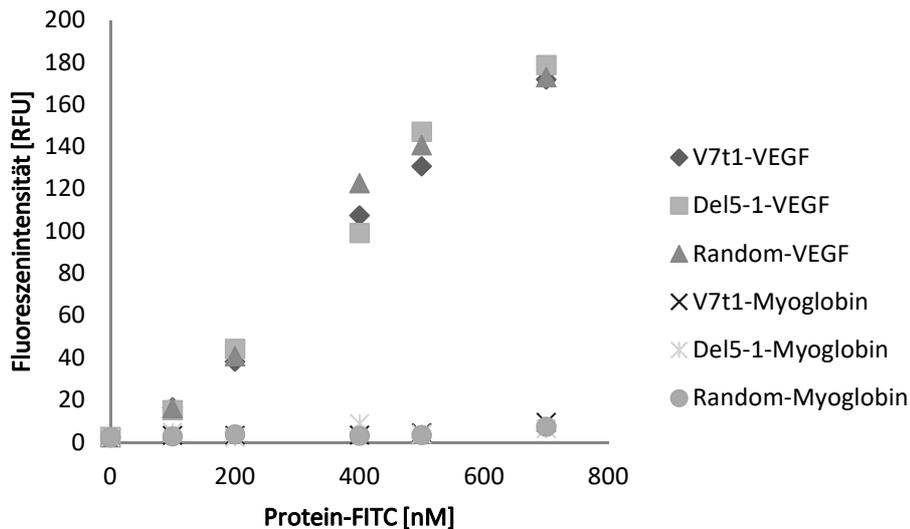


Abbildung 32: Mittlere Fluoreszenzintensität von mit VEGF-FITC oder Myoglobin-FITC inkubierten Aptameren/Randomnukleotiden in einem Konzentrationsbereich von 0 – 700 nM. Die Werte sind als Mittelwerte von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm Bandpassfilter.

Im Folgenden wurde daher getestet, ob VEGF auch ohne Aptamere an die Zellen bindet. Dies ist, wie in **Abbildung 33** zu sehen, der Fall. Die Kontrolle „nur VEGF-FITC“ enthielt überhaupt kein DNA-Molekül welches immobilisiert wurde, ansonsten wurden alle Kontrollen gleichbehandelt. Nur die 0-Kontrolle war unbehandelt und die Kontrolle „ohne Cyanurchlorid“ enthielt kein Cyanurchlorid, entsprechend konnte keine Immobilisierung stattgefunden haben. Ob ein beliebiges Oligonukleotid, verschiedene Aptamere oder gar kein Aptamer immobilisiert wurde, spielt keine Rolle. Lediglich wenn im gesamten Versuch keine Immobilisierung mit Cyanurchlorid stattgefunden hat, steigerte sich das Signal noch weiter. Also hat das gebundene Cyanurchlorid (freies Cyanurchlorid wurde abgetrennt) selbst auf das Zielmolekül noch einen kleinen Einfluss, wie in Abschnitt 2.2.1.4 bereits vermutet wurde. VEGF bindet stark an die Zellen, wie in **Abbildung 32** bereits zu sehen war (Vergleich: Myoglobin). VEGF scheint also von sich aus an die Zellen zu binden, obwohl es sich um humanes VEGF handelt und hier Hamsterzellen (CHO) verwendet wurden. Entweder bindet es unspezifisch, oder an Rezeptoren. Daher könnte das Aptamer V7t1 funktionsfähig sein, aber das Signal der Bindung von der VEGF Bindung an Rezeptoren oder einer möglichen Aufnahme von VEGF überdeckt werden.

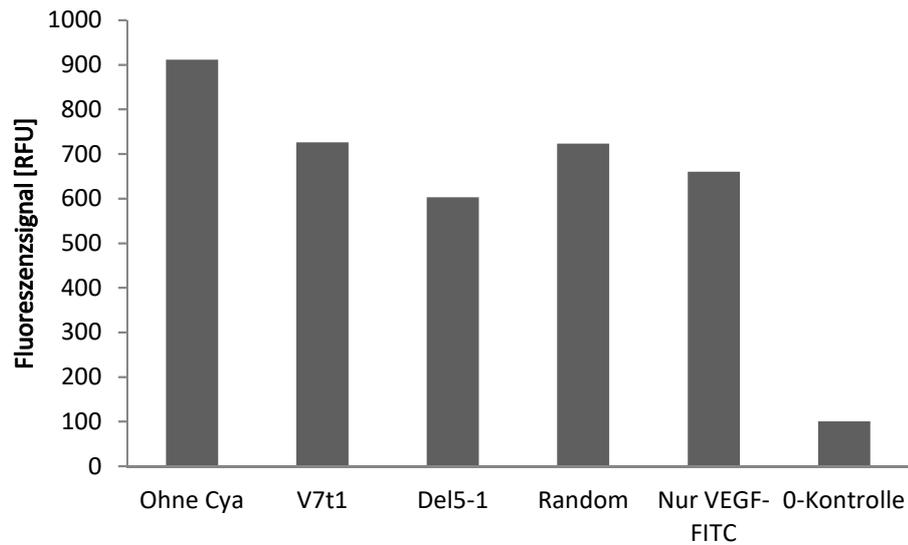


Abbildung 33: Mittlere Fluoreszenzintensität von VEGF-FITC (100 µM) inkubierten Zellen mit jeweiligen immobilisierten Aptameren. Die Immobilisierung wurde mit Cyanurchlorid durchgeführt. Cya: Cyanurchlorid, 0-Kontrolle: Aptamerfrei. Die Werte sind als Mittelwerte von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm bandpassfilter.

2.3 Zusammenfassung und Ausblick – Teil 1

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Cyanurchlorid für fluoreszenzbasierter Assays ein problematisches Molekül ist. Die Fluoreszenz aller hier verwendeten grün leuchtenden Fluorophore (Fluorescein und SYBR Green II) wurden sehr stark reduziert. Dass Propidiumiodid scheinbar nicht beeinflusst wurde, lässt die Vermutung zu, dass Fluorophore, die Licht anderer Wellenlänge emittieren, möglicherweise nicht beeinflusst werden. Ein Versuch mit einer Fluoreszenzmarkierung wie Cy5 z.B. könnte ein nächster Schritt sein um die Immobilisierung und später auch die Funktionalität der immobilisierten Aptamere nachweisbar zu machen. Die Toxizität von Cyanurchlorid beeinflusste die Zellen nicht. Attraktiv ist Cyanurchlorid besonders durch die Temperaturelektivität der reaktiven Gruppen.

Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³) zeigte sich im Hinblick auf die Fluoreszenz unproblematisch. Die Immobilisierung mittels BS³ konnte erfolgreich nachgewiesen werden, jedoch nicht die Funktionalität des immobilisierten Aptamers. Es könnte hier über verschiedenste Gründe spekuliert werden, jedoch zeigten die Ergebnisse, dass das Zielmolekül selbst eine Funktionalitätsüberprüfung erschwerte. Denn es zeigt eine starke Bindung an die verwendeten Zellen, möglicherweise aufgrund von Rezeptorbindungen. Dies ist ein starker Störfaktor, denn das VEGF bindet auch an nicht modifizierten Zellen und damit ist eine stärkere Bindung zu den modifizierten Zellen möglicherweise kaum detektierbar. Es konnte höchstens eine Tendenz erkannt werden. Die Schlussfolgerung ist hier: Das Zielmolekül sollte für einen solchen *high-producer* Assay nicht an die Zellen binden oder von ihnen aufgenommen werden. Für die Selektion von hochproduzierenden Zellen ist also nicht jedes Zielmolekül geeignet. Für zukünftige Untersuchungen sollten entsprechend andere Zielmoleküle gewählt werden. Es sollte ein Zielmolekül sein, welches nicht an die Zellen bindet oder diese zerstört und ein entsprechendes Aptamer mit hoher Affinität (Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich) gewählt werden.

Die Untersuchungen haben gezeigt, wie die Parameter für einen *high-producer* Assay optimiert werden können. Die Kopplung von Oligonukleotiden mit BS³, konnte erfolgreich nachgewiesen

werden. Darüber hinaus wurde ein Protokoll für die Kopplung von Aptameren auf Zelloberflächen mit BS³ optimiert, wobei der Anteil, der mit Aptameren modifizierten Zellen, möglicherweise noch erhöht werden kann. Mit einem – gemäß oben dargelegten Überlegungen – besser geeigneten Zielmolekül-Aptamer-Paar sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

3 Teil 2: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme und Toxizität von Titandioxid-Nanopartikeln

In diesem Kapitel sollen verschiedene durchflusszytometrische Methoden zur Beobachtung der Nanopartikelaufnahme getestet und verglichen werden. Dazu wird im Theorieteil, nach einer kurzen Einführung in den Bereich der Nanopartikel (Abschnitt 3.1.1), auf die Aufnahme (Abschnitt 3.1.2) und Toxizität (Abschnitt 3.1.3) von Nanopartikel eingegangen. Im praktischen Teil werden verschiedene fluoreszenz- und streulichtbasierte Methoden angewendet. Die Untersuchungen werden mit Titandioxidnanopartikeln an den beiden Standardzelllinien A549 und NIH/3T3 durchgeführt.

3.1 Theorie

3.1.1 Nanopartikel – Definition und Kennzahlen

Als Nanopartikel werden Partikel mit einer Größe zwischen 1–100 nm bezeichnet. Ein Synonym dafür ist die Bezeichnung „*ultrafine particle*“. Partikel mit einer Größe von 100 – 2500 nm werden als „fine“ bezeichnet [46]. In der medizinischen Forschung werden jedoch oft auch *fine particle* (>100 nm) als Nanopartikel bezeichnet [47]. Ebenfalls die gleiche Bedeutung hat die häufig zu findende Bezeichnung „PM_{0.1}“, was für *particular matter* (dt. Partikelmaterial/Feinstaub) mit einer Größe <0,1 µm steht. Manchmal taucht noch der Begriff Kolloid (engl. *colloid*) auf. Dieser Begriff bezeichnet Partikel oder Moleküle zwischen ungefähr 1 und 1000 nm, welche in einem Medium dispergiert sind. Typisch für Nanopartikel ist, dass sie sich zu Aggregaten zusammenfügen. Die Stärke der Aggregation hängt dabei von den Partikeln und dem umgebenen Medium ab [48]. Nanopartikel können in verschiedene Gruppen eingeordnet werden. Eine Einordnung umfasst ihre Herkunft und unterscheidet zwischen natürlichen in der Umwelt vorkommenden Partikeln (*natural*), ungewollt von Menschen freigesetzten Partikeln (*environmental*) und von Menschen designten Partikeln (*engineered*). Letztere sind meist am besten charakterisiert und bezeichnen all jene Nanopartikel, welche für einen bestimmten Zweck hergestellt wurden. Darüber hinaus wird zwischen metallischen und nicht-metallischen Nanopartikeln unterschieden. Die Beschaffenheit und Größe der Partikel

sind dabei entscheidend für die Interaktion mit Zellen, wie später noch näher beschrieben wird. Nanopartikel können aufgrund ihrer Größe und dem daraus resultierenden großen Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen besondere Eigenschaften aufweisen, die sich von dem gleichen Material in Nicht-Nanoform unterscheiden können [49]. Die Anwendung von Nanopartikeln ist dabei sehr vielfältig: von Imprägniersprays über Sonnencremes, bis zu Wandfarben. Nanopartikel spielen eine zunehmende Rolle in der Industrie und finden sich bereits in über 1800 Produkten wieder (Stand 2014) [50]. Auch medizinisch erfahren Nanopartikel eine zunehmende Bedeutung. Insbesondere beim *targeted drug delivery*, wodurch Medikamente gezielter wirken sollen als bisher. Die am meisten industriell verwendeten Nanopartikel sind TiO_2 , SiO_2 , ZnO , Kohlenstoffnanoröhrchen, Au, Ag, Quantum Dots, Fullerene und Fe_2O_3 sowie Fe_3O_4 . Das macht sie gleichzeitig zu den am besten untersuchten Nanopartikeln [47].

3.1.2 Nanopartikelaufnahme

Die meisten industriell hergestellten Nanopartikel sollen möglichst nicht mit biologischen Organismen interagieren, also möglichst wenig oder gar nicht von Zellen aufgenommen werden. Genau andersherum ist es bei medizinischen Nanopartikeln, diese sollen oft möglichst in die Zellen gelangen um dort ihre Wirkstoffe freizusetzen. Kleine Moleküle, wie z.B. Peptide oder Ionen, können über Pumpen oder Kanäle der Zellen aufgenommen werden. Dafür ist eine Größe von unter 1000 Da erforderlich [51]. Viele Nanopartikel müssen aufgrund ihrer Größe (>1000 Da) aktiv in die Zellen geschleust werden [52]. Die Aufnahmewege variieren dabei je nach Art der Partikel. Entscheidend hierbei ist die Größe, Form und Oberflächeneigenschaft der Partikel, sowie der Zelltyp bzw. die Membran auf welche die Partikel treffen [53]. Einen guten Überblick über einige aktive Aufnahmewege von Nanopartikeln findet man in dem Übersichtsartikel von Yameen et al. [54]. Generell agieren kationische Partikel schneller mit der negativgeladenen Membran [55–58]. Auch hydrophobe [59,60] und kleinere Partikel [61] werden schneller aufgenommen. Die Abhängigkeit von der Größe zeigt, dass sich auch das Agglomerationsverhalten auf die Aufnahme auswirkt, da

aggregierte Partikel einen größeren Durchmesser aufweisen. Nach dem Membrankontakt werden die Partikel von der Membran umschlossen und nach innen hinein „abgeschnürt“. Der membranumschlossene Partikel wird „frühes Endosom“ genannt und ist der erste Schritt der Endozytose [52–58,62]. Die Aufnahme rate kann auch sehr stark von der Form der Partikel abhängen. Sphärische Nanopartikel werden schneller aufgenommen als stäbchenförmige, und diese werden wiederum schneller aufgenommen wenn sie ein hohes Längenverhältnis haben [63,64]. Die folgende Illustration (Abbildung 34) gibt einen Überblick über die wichtigsten Einflussfaktoren auf die Nanopartikelaufnahme.

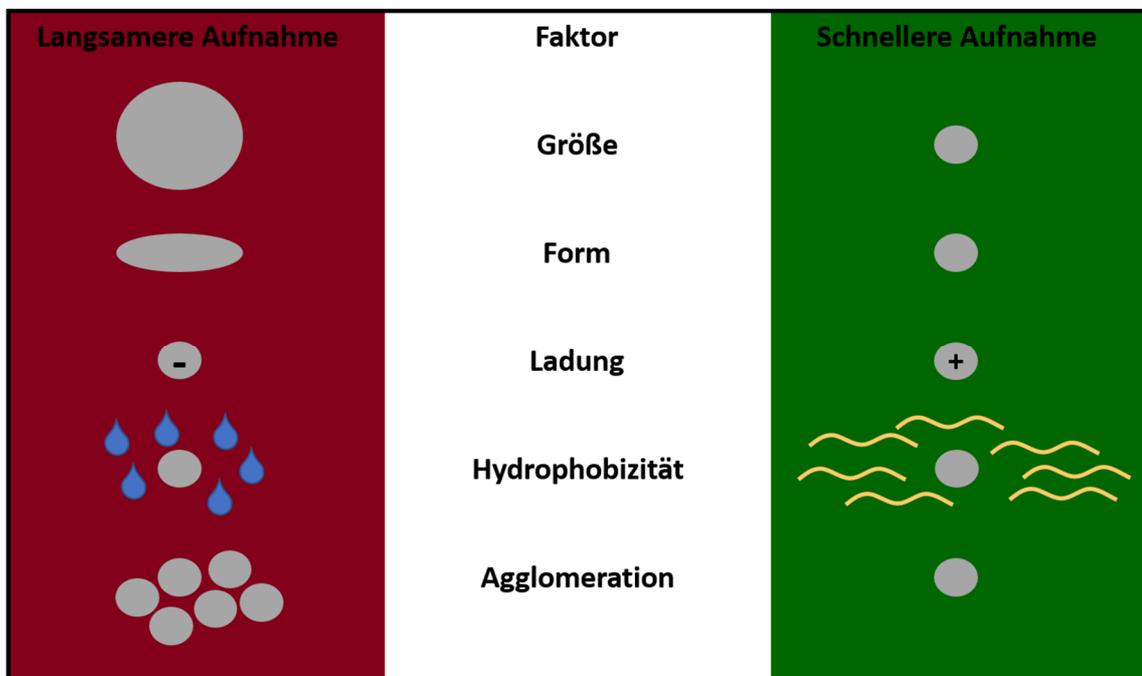


Abbildung 34: Überblick über die wichtigsten Einflussfaktoren auf die Nanopartikelaufnahme.

Es gibt einige mikroskopische Methoden um die Aufnahme der Nanopartikel zu messen, dazu zählen: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) [63,65–67], Scanning-Elektronenmikroskopie [68], reflektionsbasierte Mikroskopie [69–71], Dunkelfeldmikroskopie [72] und konfokale Mikroskopie [58,73]. Letztere kann für dreidimensionale Aufnahmen verwendet werden, was eine bessere intrazelluläre Lokalisation der Nanopartikel zulässt. Eine weitere Möglichkeit ist die Messung des Metallgehalts. Hierzu können ICP-OES (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*)

und ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) verwendet werden [66,74]. Die dritte Messmethode zur Bestimmung der Nanopartikelaufnahme ist die Durchflusszytometrie. Diese Methode wird im Folgenden näher betrachtet.

Es gibt zwei Möglichkeiten die Aufnahme von Nanopartikeln durchflusszytometrisch zu bestimmen: Durch Streulicht und durch Fluoreszenz. Der Vorteil gegenüber der Mikroskopie ist die hohe Sensitivität und der Durchsatz. Die Durchflusszytometrie ermöglicht es mehrere tausend Zellen pro Sekunde zu vermessen, und somit schnell statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Gerade händisch erstellte Mikroskopbilder haben hier einen hohen Nachteil bei Geschwindigkeit und Aufwand. Eine Möglichkeit der Detektion ist die Markierung der Nanopartikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie z.B. FITC (Fluoresceinisothiocyanat). Dies erlaubt meist eine höhere Sensitivität der Messung hat aber die Nachteile von höheren Kosten, zusätzlichen Arbeitsschritten und der möglichen Beeinflussung des Partikelverhaltens. Wie gut sich Partikel ohne Markierung detektieren lassen ist von ihrer Beschaffenheit und Größe abhängig. Metallische Nanopartikel wie Gold und Titan, geben sehr starke Streusignale aufgrund von Oberflächenplasmonenresonanz [75–79]. Auch das Messgerät selbst kann ausschlaggebend sein. So können die Sensitivität und Spannung der Detektoren, das Lichtleitsystem und die Laserwellenlänge die Sensitivität der Messung beeinflussen. Ein hervorzuhebender Nachteil der Streulichtmessung ist, die Beeinflussung durch verschiedene Faktoren wie die Morphologie und Viabilität der Zelle. Daher sollten durchflusszytometrische Untersuchungen mikroskopisch und durch Viabilitätsmessungen zusätzlich überprüft werden. Die Messung der Aufnahme von Partikeln mittels Seitwärtsstreulicht wurde erstmals von Stringer et al. 1995 gezeigt [80]. Weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen metallischen Partikeln folgten von Suzuki und Zucker [61,81]. Zucker et al. zeigten auch, dass Silber-Nanopartikel zu einem Fluoreszenzsignal führen können, wenn sie sich in der Zelle befinden. Zucker führt diesen Effekt auf Oberflächenplasmonenresonanz zurück, was zu einer Verstärkung der intrazellulären Fluoreszenz von zellulären Molekülen führen könnte [82].

Ein genereller Nachteil der durchflusszytometrischen Detektion ist, dass die Partikel nur begrenzt lokalisiert werden können. Es kann nicht unterschieden werden ob sich die Partikel in oder an einer Zelle befinden. Es wurde beispielsweise nachgewiesen, dass SiO_2 -Partikel an der Oberfläche der Zelle adsorbieren können [83]. Eine mögliche Lösung ist die Verwendung von bildgebenden Durchflusszytometern [84]. Hierbei wird die Mikroskopie mit der Durchflusszytometrie kombiniert und jede Zelle fotografiert. Die Auflösung der Bilder kommt zwar nicht an die eines Konfokalmikroskops heran [85], ist aber dennoch eine interessante Möglichkeit, da die Ansammlung von Partikeln in bestimmten Zellkompartimenten ein Zeichen für eine Aufnahme ist. Weitere Methoden zur Validierung der Aufnahme sind das Quenching von extrazellulärer Fluoreszenz und die Verwendung von Propidiumiodid. Ein extrazelluläres Quenchen kann mit Trypanblau durchgeführt werden. Trypanblau quencht FITC und kann eine intakte Zellmembran nicht passieren [86,87]. Dadurch fluoreszieren nur noch Partikel, die sich innerhalb der Zelle befinden. Propidiumiodid ist ein DNA-Farbstoff, der eine intakte Membran ebenfalls nicht durchdringen kann. Ist Propidiumiodid in die DNA interkaliert, verzwanzigfacht sich sein Fluoreszenzsignal. Ein Signalanstieg mit Propidiumiodid markierten Partikeln könnte also auf eine Aufnahme hindeuten. Ein solches Assay wurde von Neumeyer et al. durchgeführt [88].

3.1.2.1 *Interaktion mit der Zelle*

Um eine direkte toxische Wirkung auf eine Zelle zu haben, oder in eine Zelle aufgenommen zu werden, muss der Partikel erst einmal in Interaktion mit der Zelle treten. Der erste Kontaktpunkt ist die Cytoplasmamembran und der erste wichtige Punkt ist, ob und wie viele Partikel mit der Membran überhaupt in Kontakt kommen. Das ist abhängig von dem Medium, den Partikeleigenschaften und der Durchmischung der Partikel. In der Zellkultur ist das Medium meistens relativ ähnlich, aber in natürlicher Umgebung kann das Dispersionsmedium der Nanopartikel sehr variieren. Ein Beispiel sind die Schleimhäute, welche von einer Schleimschicht umgeben sind. Nanopartikel verhalten sich in einer Schleimschicht völlig anders als in einem wässrigen Medium [89]. Auch die Aggregation der

Partikel ist für die Interaktion mit Zellen entscheidend. Eine hohe Aggregation bedeutet eine Reduzierung der Anzahl an freien einzelnen Partikeln und eine Verringerung der Gesamtoberfläche der Nanopartikel. Hier gilt: Je höher die Ladung der Nanopartikel, desto niedriger ist die Aggregation. Dies ist auf die Ladung bedingte verstärkte Abstoßung der Partikel zurückzuführen. Auch die erste Interaktion zwischen Membran und Partikeln ist von der Ladung abhängig. Die Interaktion erfolgt mit der negativ geladenen Membran, welche durch kationische Partikel begünstigt wird. Als Charakteristikum für die Ladung der Partikel wird das Zeta-Potential verwendet. Das Zeta-Potential ist das elektrische Potential an der sogenannten „Abscherschicht“. Die Abscherschicht ist die äußere Schicht des Partikels, die sich aus geladenen Molekülen des Dispersionsmediums bildet, welche an dem Partikel binden (Abbildung 35). Das Ladungspotential der Partikel ist von dem pH-Wert des umgebenen Mediums abhängig. Proteine, Peptide und Ionen binden an die Partikel und bilden eine Korona um die Partikel. Die Korona beeinflusst die Aufnahme und die Biokompatibilität der Partikel [90,91]. Die Auswirkungen der Korona können mannigfaltig sein. Die Ladung kann überdeckt werden, was zu einer erhöhten Aggregatbildung und einer Reduzierung der Aufnahme führen kann. Die Korona kann aber auch eine Rezeptor vermittelte Aufnahme in die Zelle bewirken [51].

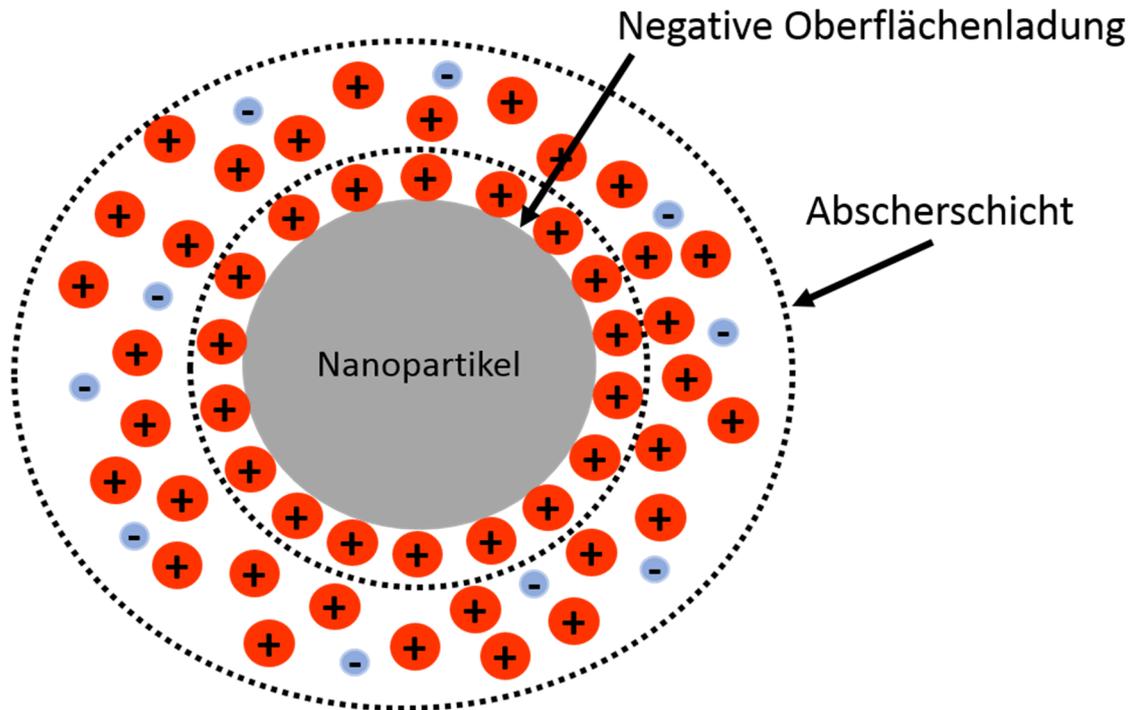


Abbildung 35: Ladungsschichten eines negativ geladenen Nanopartikels.

3.1.2.2 Verbleib in der Zelle

Nach der Aufnahme der Nanopartikel ergeben sich drei Möglichkeiten: Akkumulation, Abbau oder Exozytose bzw. Ausscheidung der Partikel. Üblicherweise wird in der Zelle ein hydrolytischer oder enzymatischer Abbau versucht. Ist das nicht erfolgreich, erfolgt ein Weitertransport oder eine Exozytose. Kationische Partikel können die Endosomen zerstören. Sie haben eine hohe pH-Pufferkapazität. Das führt zu einem starken Protonenzufluss in das Endosom und kann aufgrund des osmotischen Drucks zu der Zerstörung des Endosoms führen [47]. Wenn die Freisetzung der Partikel gewollt ist (z.B. bei medizinischen Anwendungen) können sogenannte penetrierende Peptide eingesetzt werden, welche eine Signalkaskade auslösen, die zu einer Freisetzung der Nanopartikel führt [92]. Die Zerstörung von Endosomen kann für die Zelle verschiedene toxische Auswirkungen haben: oxidativer Stress, Störung der Mitochondrien, Apoptose oder Nekrose (dazu näheres im nächsten Kapitel) [47]. Die meisten Nanopartikel werden in späte Endosomen oder Lysosomen überführt wo sie neutral geladene Aggregate bilden [59,93]. Sind die Partikel abbaubar, kann dies

zwei Konsequenzen haben: Die Partikel sind verstoffwechselbar (biodegradierbar) und werden dem Stoffwechsel zugeführt (z.B. Peptide, Lipide) oder sie werden aufgelöst (z.B. Cu, Zn) (Abbildung 36) [94]. Der Abbau von Nanopartikeln kann Wochen oder Monate dauern [95].

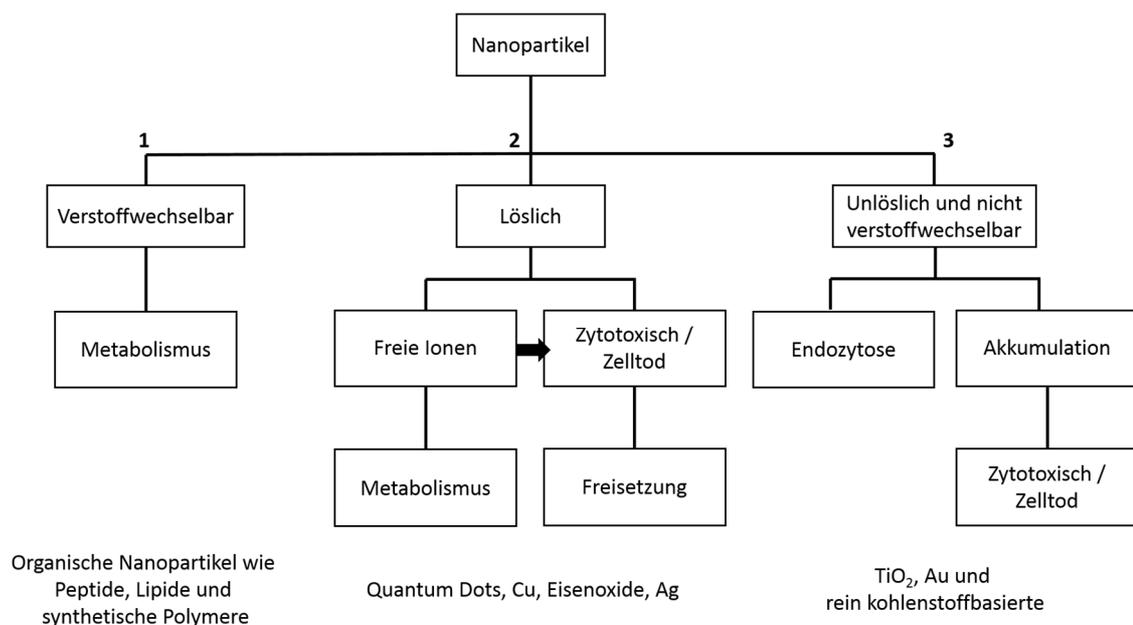


Abbildung 36: Übersicht über den Verbleib von Nanopartikeln in der Zelle. Aufgeteilt in die drei Haupteigenschaften für den Verbleib in der Zelle.

3.1.3 Toxische Effekte und Wirkungen in der Zelle

Die möglichen toxischen Effekte von Nanopartikeln können mannigfaltig sein. Wo und wie Nanopartikel intrazellulär wirken, hängt von den jeweiligen Partikeln ab. Ein Überblick über Wirkorte verschiedener Nanopartikel ist in Abbildung 37 gegeben. Die Toxizität von metallischen Nanopartikeln ist von der chemischen Stabilität und der Löslichkeit in Körperflüssigkeiten abhängig [96]. Gut lösliche Nanopartikel sind toxischer als schlechter lösliche Partikel. Nanopartikel aus Silber, Eisen und Zinkoxid sind unter physiologischem pH-Wert gut löslich [47,97]. Eine Ummantelung der Nanopartikel, welche die Löslichkeit und das Ablösen von Metallionen reduziert, kann die Toxizität deutlich senken. Mögliche Ummantelungen können Peptide oder Lipide sein, aber auch z.B. eine stabile metallische Hülle aus Zinksulfid (ZnS) [60,98,99]. Wie schon erwähnt ist auch die Ladung der

Nanopartikel entscheidend. Negativgeladene Partikel sind weniger toxisch als positivgeladene, was auch mit der Aufnahmerate zusammenhängt. Es wurde gezeigt, dass negativ geladene COOH-Gruppen zu einer geringeren Toxizität führen als positiv geladene NH₂-Gruppen [100]. Die positive Ladung der Aminogruppen kann durch Polyethylenglykol (PEG) maskiert werden und so die Toxizität gesenkt werden [58]. Eine weitere interessante Frage ist, ob die Partikel durch Exozytose wieder aus der Zelle ausgeschleust werden können. Gold und kleine Polystyrol Nanopartikel scheinen je nach Größe wieder aus den Zellen ausgeschleust zu werden [47,63]. Sollten die Nanopartikel in den Zellen verbleiben könnten selbst stabile Nanopartikel über längere Zeiträume freie Ionen freisetzen, welche zu oxidativem Stress in der Zelle führen oder mit Zellkomponenten reagieren könnten.

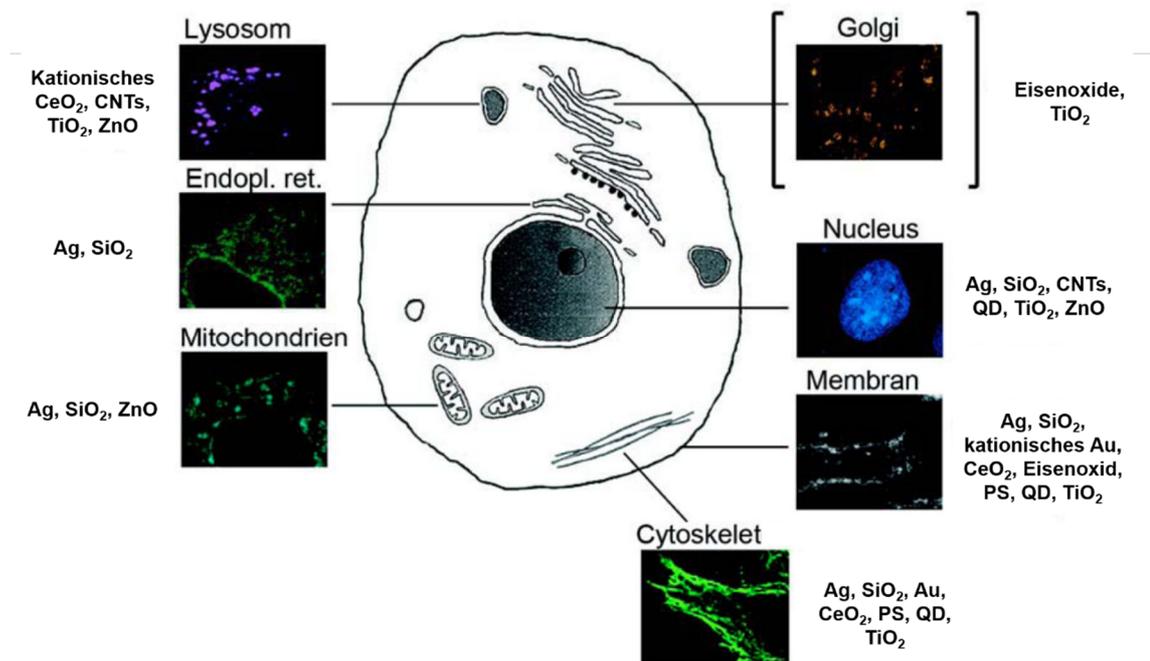


Abbildung 37: Übersicht über toxische Wirkorte von verschiedenen Nanopartikeln. Modifiziert nach Fröhlich [47]

3.1.3.1 Interaktion mit Proteinen

Proteine können auf vielfältige Weise von Nanopartikeln beeinflusst werden: Die Proteinstabilität, die Bioaktivität, sowie die Proteinaggregation [47]. Wie in Abschnitt 3.1.2.1 besprochen bildet sich um fast alle Nanopartikel eine Proteinkorona. Diese Korona bestimmt maßgeblich die Aufnahme und Toxizität der Partikel [101]. Aktin ist das *in vitro* am meisten gebundene Protein in der Korona [102].

Die Bindung von Aktin durch die Nanopartikel könnte zu diversen Fehlfunktionen in der Zelle führen, wie zum Beispiel die Beeinträchtigung von Transport- und Signalprozessen, Zell-Zell-Verknüpfungen, Motilität und Zellteilung [103]. Viele NP führen zu Proteinaggregatbildungen, welche die Proteinfunktion einschränken [104]. Die Wirkung von Nanopartikeln ist allerdings nicht immer negativ für die Zelle: So zeigt sich, dass diverse Nanopartikel die Bildung von Proteinaggregaten verhindern können [105–107]. Es wurde darüber hinaus beobachtet, dass TiO_2 -NP als Chaperone fungieren können und bei dem Renaturieren von Proteinen helfen können [108]. Die gleiche Art von Partikeln führen allerdings auch zu einer schädlichen Strukturänderung von Tubulinen und verhindern ihre Polymerisation [109]. Nanopartikel führen oft zu einer Oxidation, unter anderem werden die Thiolgruppen von Disulfidbrücken oxidiert. Je leitfähiger der Nanopartikel ist, desto höher ist die oxidative Kapazität des Partikels und desto stärker die Wirkung auf die Disulfidbrücken [110–112]. Auch Cysteine die nicht an einer Disulfidbrücke beteiligt sind, sind ein Ziel der Oxidation. So wurde nachgewiesen, dass Cysteine in der Glutathion-Reduktase gebunden werden und so die Regeneration der Glutathione inhibiert, was zu einem Zusammenbruch der ATP-Produktion führt. Auch Transportproteine können beschädigt werden, was die Aufnahme von Phosphat in die Zelle stören kann [113,114]. Nanopartikel können auch mit Membranrezeptoren interagieren und so Signalkaskaden auslösen. Dies wurde mit Kohlenstoff, Eisen, Silizium und Silber Nanopartikeln nachgewiesen [115–118]. Kohlenstoff Nanopartikel binden beispielsweise an Calciumkanäle und führen zu einem verstärkten Zustrom von Calcium in die Zelle [119]. Nanopartikel können auch Metallionen freisetzen, welche an Thiolgruppen von Proteinen binden und so deren Funktion stören [98].

Die genannten Wirkungen von Nanopartikeln auf Proteine können den Stoffwechsel der Zellen beeinflussen und zu zellulärem Stress führen.

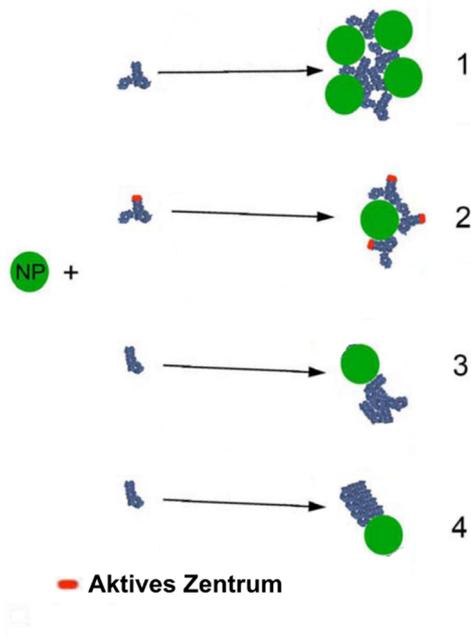


Abbildung 38: Auswirkungen auf Proteine: 1: Aggregation, 2: Einschränkung der Funktionalität, z.B. durch sterische Hinderung von aktiven Zentren, 3: Fehlfaltung von Proteinen, 4: korrekte Faltung wird begünstigt (chaperonartiger Effekt). Abbildung modifiziert nach Fröhlich [47]

3.1.3.2 Membranintegrität

Der Verlust der Membranintegrität ist gleichzusetzen mit dem Tod der Zelle. Einige Lebend-/Tot-Assays basieren daher auf der Messung der Membranintegrität. Bei der Durchflusszytometrie ist hier Propidiumiodid zu nennen. Ebenfalls gängig ist die Messung der Aktivität freigesetzter Enzyme wie der Lactat-Dehydrogenase, deren Aktivität kolorimetrisch dargestellt werden kann [120].

Kleine positiv geladene Nanopartikel (wenige nm) können auch ohne Endozytose in Zellen gelangen. Dies führt zu kleinen Löchern in der Membran (<1 µm Durchmesser). Diese kleinen Löcher können von der Zelle wieder repariert werden. Dies konnte mit 14 nm großen Kupfernanopartikeln nachgewiesen werden [121]. Die Plasmamembran kann durch zwei verschiedene Mechanismen zerstört werden: durch direkte mechanische Einwirkung (z.B. durch AU-NPs)[122] oder durch ROS Bildung (Siehe dazu Abschnitt 3.1.3.5). Vor allem große positivgeladene Nanopartikel können zu einer Zerstörung der Membranintegrität führen. Durch die positive Ladung der Partikel kommt es zu einer Interaktion mit der negativgeladenen Glykokalyx. Aufgrund der Bildung von größeren Löchern

in der Membran kommt es zu einem Calciumeinstrom welcher zytotoxisch ist [98,100,123]. Zinkoxid und Silbernanopartikel führen beispielsweise zu einem starken Verlust der Membranintegrität [112,124]. Organische Nanopartikel (bzw. organisch ummantelte Partikel) können von der Membran eingekapselt werden. Pristine Graphen und Graphen Oxid Nanopartikel können sich in der Membran einlagern und schwere Schäden hervorrufen [125]. Einen Verlust der Membranintegrität konnte auch mit Eisen Oxid und bestrahlten TiO₂ Nanopartikeln festgestellt werden [126,127].

3.1.3.3 *Apoptose und ihre durchflusszytometrische Detektion*

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein natürlicher Schutz des Organismus vor Krebs, Virusinfektionen und Autoimmunreaktionen. Apoptose kann auch durch Toxine ausgelöst werden. Es wird zwischen zwei Formen der Apoptose unterschieden: der intrinsischen (Typ 2) und der extrinsischen (Typ 1). Wie die Namen suggerieren, wird die intrinsische Apoptose durch zellinterne Signale ausgelöst, während die extrinsische Apoptose rezeptorgesteuert ist. Der unregulierte Zelltod wird als Nekrose bezeichnet. Apoptotische Zellen werden kleiner, während nekrotische Zellen größer werden. Es lassen sich klare Unterschiede im Streulicht zwischen lebenden und nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen beobachten. Es ist allerdings nicht eindeutig möglich zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen aufgrund des Streulichts zu differenzieren. Dies ist der Grund warum ein weiterer Analyseschritt zur Apoptose/Nekrose Differenzierung durchgeführt werden muss. Im Folgenden werden durchflusszytometrische Untersuchungsmethoden zur Apoptosedetektion vorgestellt, welche unterschiedliche Vorgänge und Stadien des Apoptoseprozesses sichtbar machen.

Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ist ein Weg, welcher zu Apoptose führt und kann somit als ein möglicher frühester Schritt der Apoptose beobachtet werden [128–130]. Das mitochondriale Membranpotential kann mittels lipophiler kationischer Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden. Eine Depolarisierung führt zu einem Eintritt der Fluoreszenzfarbstoffe in die Mitochondrien. Diese ältere Methode kann beispielsweise mit Rhodamin

123 durchgeführt werden [131,132]. Sensitiver sind neuere Farbstoffe wie JC-1, die auf Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) basieren. JC-1 leuchtet in seiner Monomerform grün. Bei einer Aufkonzentrierung durch Ansammlung in den Mitochondrien bilden sich rot fluoreszierende Aggregate [133–137]. Wie bereits angedeutet ist eine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials keine notwendige Bedingung für eine Apoptose. So konnten einige Arbeiten belegen, dass eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials keine zwingende Voraussetzung für Apoptose darstellt [132,138]. Es wurde sogar eine Depolarisation während eines Nekroseprozesses gezeigt [139]. Darüber hinaus kann die Untersuchung durch die Membranstruktur, Lipid- oder Proteinkonzentration und zelluläre Pumpen beeinflusst werden [140]. Daher ist es trotz der Möglichkeit einer sehr frühen Apoptosedetektion nur bedingt zu empfehlen. Es wurde allerdings für diverse Nanopartikel (Ag, SiO₂, TiO₂, CNTs und QDs) eine Beeinflussung der Mitochondrien nachgewiesen [47,141–143].

Sehr verbreitet für die Apoptosedetektion sind Annexin V basierte Assays. Annexin V bindet an Phosphatidylserine. Diese membranassoziierten Strukturen befinden sich normalerweise an der Innenseite der Zellmembran, führen aber während der Apoptose eine Translokation an die Außenseite der Membran durch. Mit markierten Annexin V Molekülen kann die Translokation detektiert werden. Annexin V dringt allerdings auch durch permeabilisierte Membranen wie es im Nekroseprozess vorkommt. Daher ist zusätzlich ein Nekrosefarbstoff wie Propidiumiodid erforderlich um zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen unterscheiden zu können [144–146]. Nanopartikel können Assays allerdings auf besondere Weise beeinflussen. So wurde nachgewiesen, dass Goldnanopartikel zu einer Aufnahme von Propidiumiodid führen können, obwohl die Membran noch intakt ist [147]. Ähnliche Effekte wurden in dieser Arbeit unter Anwendung von TiO₂ beobachtet (Abschnitt 3.2.6). Daher müssen die Ergebnisse solcher Assays sehr genau analysiert werden.

Als früher Schritt des Apoptoseprozesses wird die Anzahl von Proteasen, oder präziser: Caspasen (*cysteinyI-aspartic acid proteases*), erhöht [148,149]. Insbesondere die Caspasen 3, 8 und 9 sind im

Apoptoseprozess involviert [150–153]. Caspasen können über spezifische Antikörper oder die Caspasen codierende RNA detektiert und quantifiziert werden. Der Nachteil bei dieser Methode ist, dass die Zellen für die Analyse fixiert oder lysiert werden müssen. Ein Anstieg der Caspase Konzentration wurde bei Au, CuO, Ag und TiO₂ Nanopartikeln nachgewiesen [154–156].

Als letzte Methode zur Detektion von Apoptose wird im nächsten Kapitel das TUNEL Assay zur Detektion von DNA Fragmentierung/Beschädigung vorgestellt. Die Fragmentierung von DNA ist Teil des späten Apoptoseprozesses. Da eine Beschädigung der DNA auch apoptoseunabhängig von Nanopartikeln bewirkt werden kann, wird das Assay erst im nachfolgenden Abschnitt erläutert.

3.1.3.4 DNA Schädigung

Sehr kleine Nanopartikel sind in der Lage in den Nukleus von Zellen zu gelangen und damit direkt in den Kontakt mit der zellulären DNA zu kommen. Neben dem direkten Einfluss auf die DNA können auch Reparaturproteine, die Transkription oder Replikation beeinflusst werden. Dies kann durch im Kern gebildete Proteinaggregate passieren, welche durch Nanopartikel gebildet werden können [157]. Die Penetration des Nukleus wurde mit 2 nm großen QDs nachgewiesen, während 3,4 nm große QDs nicht durch die Membran des Nukleus dringen konnten [87]. Es ist nachgewiesen, dass Cadmium beinhaltende QDs zu einer erhöhten Methylierung der DNA führen [158], während TiO₂ Nanopartikel sich in Nucleotiden einlagern können [159]. Ag Nanopartikel können DNA verdichten und den Zellzyklus stoppen, was zu Apoptose führen kann [160–162]. CdTE-QDs führen zu einem Anstieg der DNA-Reparaturprozesse (vermutlich als Reaktion auf DNA-Schäden) und Apoptose auslösender Reportermoleküle [163].

Auch wenn die Nanopartikel nicht in den Nucleus gelangen können, können sie während der Mitose mit der DNA in Kontakt kommen und Schäden verursachen [157]. Auch indirekt kann die DNA beschädigt werden: beispielsweise durch die Freisetzung und Translokation von ATP durch Cobalt-Chrom Nanopartikel [164], oder durch die Freisetzung von radikalen Sauerstoffspezies (ROS).

ROS können zu Strangbrüchen (Einzel- und Doppelstrang), Basenmodifikation und der Vernetzung von DNA mit anderen Molekülen (DNA-Vernetzung) führen [165].

Neben den direkten DNA-Schäden können Nanopartikel auch Entzündungsreaktionen auslösen, welche indirekt zu DNA-Schäden führen können. Bei Entzündungsreaktionen werden eine Vielzahl an Molekülen freigesetzt, insbesondere Cytokine (Interleukine, Tumornekrosefaktoren), *migration inhibition factors* sowie reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies [157]. Dies kann zu Chromosomenfragmentierung, Punktmutationen, alternativen Methylierungsmustern und einer Inhibierung der DNA-Reparatur führen [166,167]. Nanopartikel scheinen durch ihre kleine Größe und im Verhältnis große Oberfläche, stärker Entzündungsreaktionen auslösen zu können als sogenannte *fine particles* (>100 nm). Die Größenabhängigkeit der Reaktion konnte mit Kohlenstoffnanopartikeln gezeigt werden [168]. Auch die Art des Nanopartikels ist entscheidend für die Stärke der Entzündungsreaktion. Nickel und Eisen NP riefen keine Entzündungsreaktionen hervor, während andere Partikel in folgender stärkeabhängigen Reihenfolge Entzündungsreaktionen hervorriefen: Kobalt > Silicium > Titandioxid > Zinkoxid [169–171] (Zinkoxid bleibt dennoch wesentlich toxischer als Titandioxid). Eine Übersicht über die DNA Schädigungsmechanismen und deren Auswirkungen ist in Abbildung 39 dargestellt.

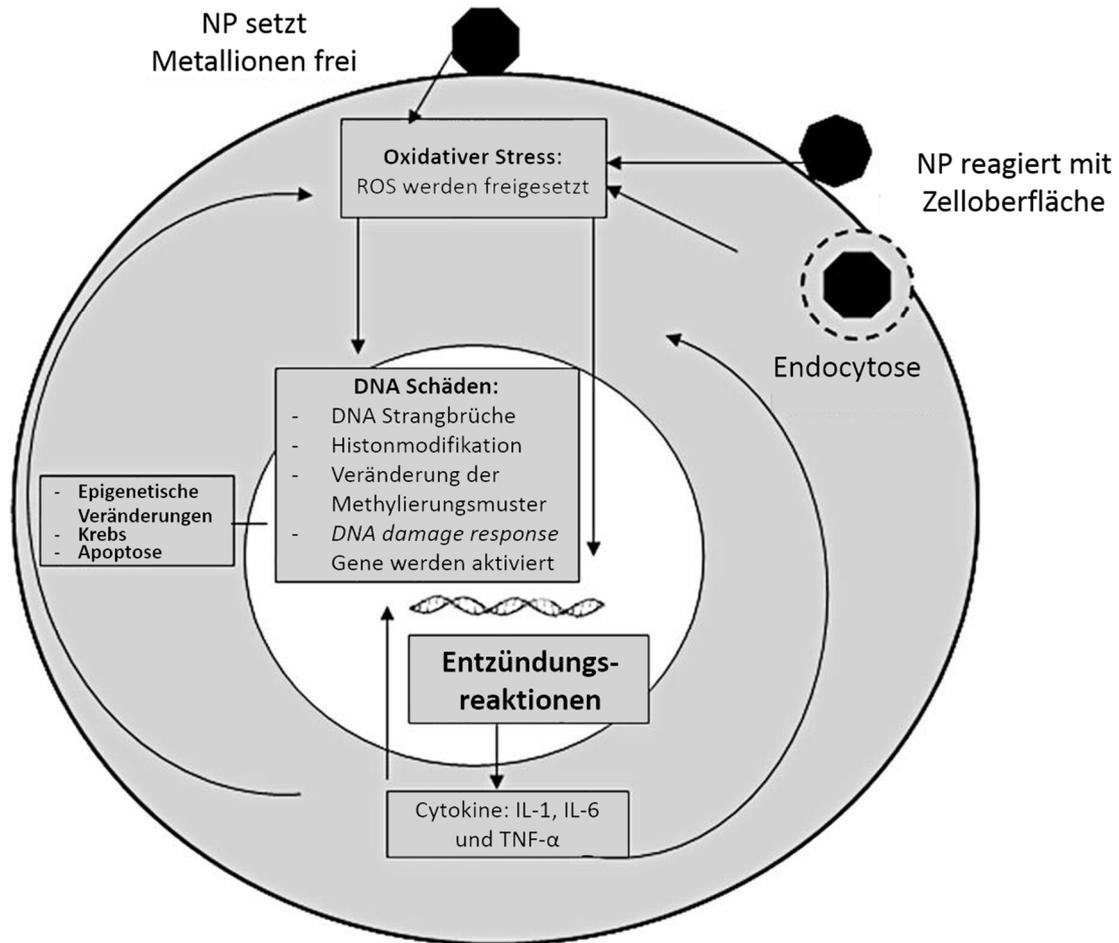


Abbildung 39: Übersicht über DNA-Schädigungsmechanismen und die Auswirkungen auf die Zelle. Modifiziert nach Singh et al. [157]

Die Genotoxizität kann durch das CA (*chromosom aberration*) Assay oder dem Comet Assay gemessen werden. Bei dem CA Assay wird der Zellzyklus in der Metaphase gestoppt und die Chromosomen werden auf Veränderungen hin untersucht [157]. Bei dem Comet Assay wird die Menge an DNA Fragmenten über eine Gelelektrophorese bestimmt [172]. Eine DNA Fragmentierung kann auch durch Apoptose ausgelöst werden und ist ein Indikator für eine späte Apoptose [173,174]. Während der Apoptose wird die DNA in Fragmente von ca. 50 Basenpaaren geschnitten [175]. Die Fragmentierung kann mit dem TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl-transferase dUTP nick end labeling*) Assay sichtbar gemacht werden. Durch die namensgebende terminale Transferase werden gelabelte Nukleotide in die Brüche eingebaut. Der Grad der Fragmentierung kann mittels Durchflusszytometrie

gemessen werden [176–178]. Ein Anstieg der DNA-Fragmentierung konnte bei Au, Ag, TiO₂ und ZnO Nanopartikeln gemessen werden [155,179–181].

3.1.3.5 Oxidativer Stress

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, kurz: ROS) tritt häufig bei Nanopartikeln auf. Als ROS werden Moleküle mit Sauerstoff bezeichnet, welche reaktiver sind als molekularer Sauerstoff, hierzu zählen u.a. die Super- bzw. Hyperoxide (O₂⁻), die Peroxide (O₂⁻, bzw. -O-O-) und das Hydroxylradikal (OH·). ROS kommen auch natürlicherweise in Zellen vor und sind dort sogar wichtig für die normale Zellfunktion. Eine toxische Wirkung findet erst durch einen starken Anstieg der ROS Konzentration statt. ROS richten dabei ungerichteten und breitgefächerten Schaden in der Zelle an, welcher so ziemlich alle biologischen Moleküle in der Zelle betreffen kann (insbesondere Proteine, Lipide, DNA). Der oxidative Stress kann zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials führen, was dann zum Zelltod führt [182]. ROS können auch zu Entzündungsreaktionen führen [157]. Einen Überblick über die Schadmechanismen von ROS ist in Abbildung 40 dargestellt.

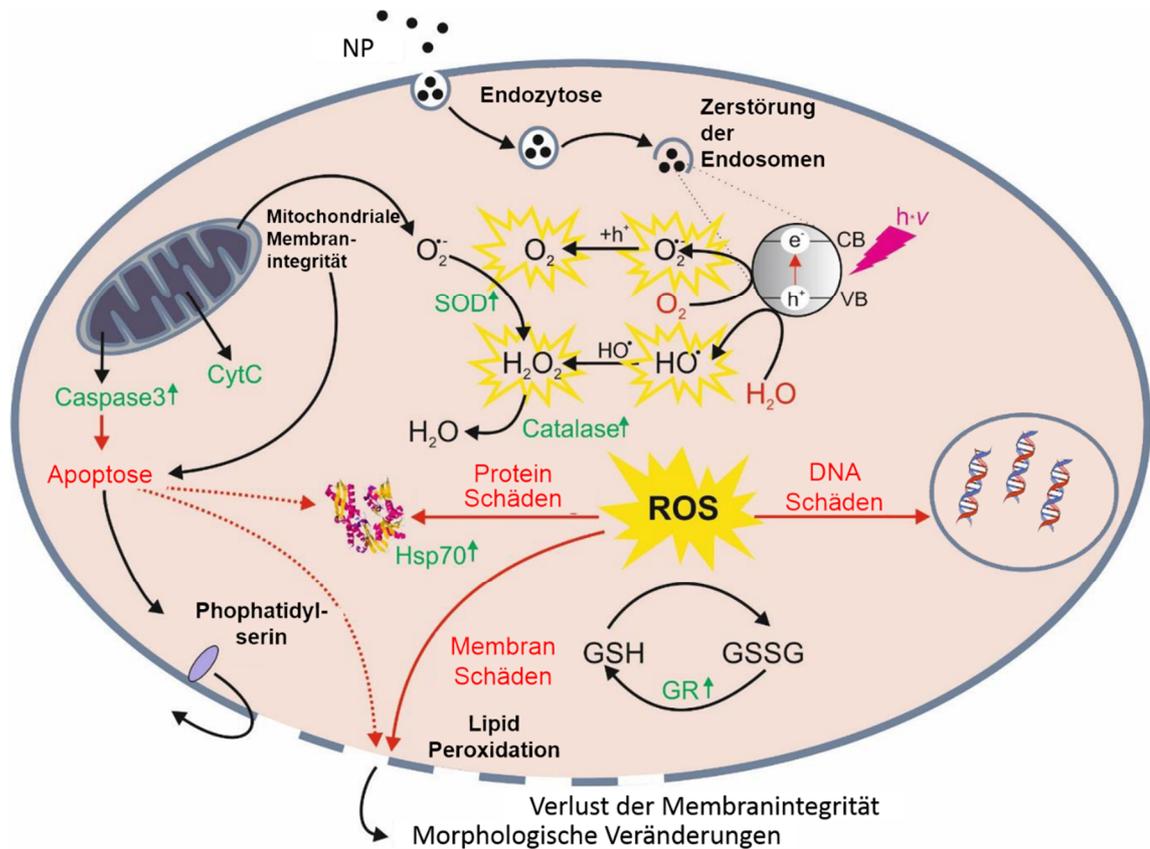
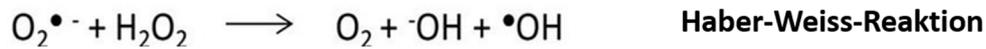
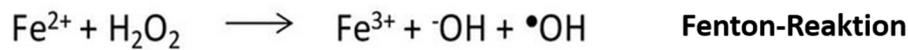


Abbildung 40: Übersicht über die Auswirkungen und Entstehung von ROS in der Zelle. Modifiziert nach Friehs et al. [183]

ROS können durch Reaktionen mit der Nanopartikeloberfläche, der Freisetzung von Metallionen und durch Beeinflussung von intrazellulären Vorgängen entstehen. Die Bildung von ROS wurde bei TiO_2 , CU und FeO NPs beobachtet. Die intrazelluläre Umgebung scheint einen inhibierenden Effekt auf die ROS Bildung zu haben [184]. Metallische Ionen können ROS über zwei verschiedene Reaktionswege freisetzen: Die Fenton-Reaktion und die Haber-Weiss-Reaktion.

Bei der Fenton-Reaktion können Fe^{2+} oder Cu^{2+} Ionen mit Wasserstoffperoxid in der Zelle reagieren, wodurch Hydroxylradikale entstehen. Bei der Haber-Weiss-Reaktion entstehen ebenfalls Hydroxylradikale, allerdings über ein Superoxid ($O_2^{\cdot-}$). Chrom, Kobalt und Vanadium Partikel können über beide Reaktionen ROS produzieren, während Eisen und Kupfer ROS nur über die Fenton-Reaktion bilden.



Auch bei einer Vielzahl weiterer Nanopartikel wurde ein Anstieg des ROS-Level festgestellt, darunter: Graphen, Kohlenstoffnanoröhrchen, *Quantum dots* und ZnO. SiO₂-Nanopartikel und Industrieruß (engl. Carbon Black) führen nur zu einem geringen Anstieg des ROS-Level [110,112,142].

Durchflusszytometrisch lässt sich das ROS-Level über den Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Dichlorfluorescein Diazetat (DCFH-DA) messen. Im ersten Schritt dringt der membrangängige Farbstoff in die Zelle ein. Anschließend wird das Azetat enzymatisch in der Zelle hydrolytisch abgespalten. Das übriggebliebene DCFH kann nun unter Vorhandensein von ROS zu Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert werden. DCF wiederum fluoresziert und kann somit durchflusszytometrisch detektiert werden [185]. Das Assay ist einfach und schnell durchführbar, ist aber dadurch limitiert, dass DCFH durch verschiedene Moleküle oxidiert werden kann. Insbesondere in Bezug auf Nanopartikel kann DCFH durch redoxaktive Metalle (z.B. Fe²⁺) in Anwesenheit von Sauerstoff oxidiert werden. Auch das während der Apoptose freigesetzte Enzym Cytochrom c kann DCFH oxidieren und die Ergebnisse verfälschen [186].

3.2 Praktischer Teil

Wie im theoretischen Teil beschrieben können die Nanopartikel die Zellen auf verschiedenen Ebenen beeinflussen, was bis zum Zelltod führen kann. Für die meisten negativen Effekte der Nanopartikel, müssen diese in die Zelle aufgenommen werden. Zuvor wurde beschrieben welche Methoden zur Detektion der Nanopartikelaufnahme existieren. Die Aufnahmedynamik ist, besonders in Hinblick auf verschiedene Zelltypen, noch kaum untersucht. In dieser Arbeit wird die Durchflusszytometrie

als leistungsfähiges Werkzeug zur Untersuchung der Nanopartikelaufnahme vorgestellt. Ziel dieses Teils der Arbeit war die Untersuchung verschiedener durchflusszytometrischer Analysemethoden zur Detektion und Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme in Säugetierzellen. Dafür wurden vier verschiedene Methoden, bzw. Parameter, betrachtet. Zum einen wurden zwei streulichtbasierte Verfahren untersucht, welche ohne eine Markierung der Partikel auskommen. Darüber hinaus wurden zwei fluoreszenzbasierte Verfahren betrachtet. Zur Lokalisation von Nanopartikeln wurden die Modellzellen zusätzlich mikroskopisch untersucht. Als Zellen wurden die zwei Standardzelllinien A549 (Lungenkrebszellen) und NIH/3T3 (Fibroblasten) verwendet. Als Modellpartikel wurden TiO₂ Nanopartikel (UV100, Anatas) verwendet, da dieser der weitverbreitetste industriell gefertigte Partikeltyp ist und keine Toxizität aufweisen sollte, welche die Messungen der Aufnahme ggf. stören könnten. Die Durchflusszytometrie ist hier die Methode der Wahl, da sie einen hohen Durchsatz und eine hohe Sensitivität hat. So sollte sich eine Partikelaufnahme reproduzierbar, schnell und präzise bestimmen lassen.

3.2.1 Partikeleigenschaften

In diesem Abschnitt soll möglichst kurz auf die eingesetzten Partikel und ihre für die Experimente relevanten Eigenschaften eingegangen werden. Um die Interaktionen von Nanopartikeln mit den Zellen zu untersuchen wurden in dieser Arbeit die am meisten verbreiteten Titandioxid Nanopartikel verwendet. Neben der Relevanz war für die Wahl des Partikels entscheidend, dass er nicht toxisch ist, da die Aufnahme der Partikel untersucht werden sollte. Nur wenn die Zellen überleben und die Membranintegrität noch intakt ist, lässt sich das Aufnahmeverhalten zuverlässig untersuchen. Um den toxischen Einfluss auszuschließen wurden zuerst *in vitro* Toxizitätsprüfungen durchgeführt, die gezeigt haben, dass die Partikel keine Nekrose, Apoptose oder einen ROS Anstieg während der Untersuchungsdauer von 24 h verursachen. Ein exemplarisches Ergebnis des durchflusszytometrischen Nekroseassays findet man in Abschnitt 3.2.6 (**Abbildung 50**). Zusätzlich wurde noch ein nicht-durchflusszytometrisches Verfahren zur Messung der Zellviabilität durchgeführt. Ein CellTiter-Blue Assay, bei dem die Stoffwechselaktivität gemessen wird und damit

Rückschlüsse auf die Zellviabilität zulässt. Dieser Test bestätigt zusätzlich, dass die Zellen noch eine volle Stoffwechselaktivität aufwiesen und toxische Effekte während der Untersuchung keine Rolle spielten (Abbildung 41).

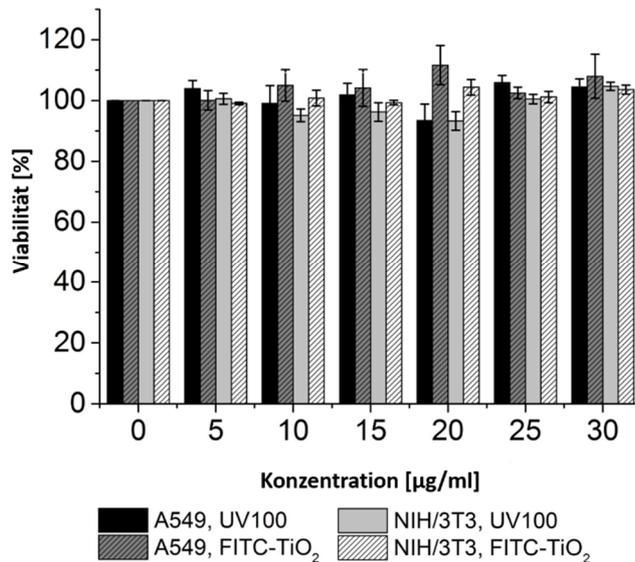


Abbildung 41: CellTiter-Blue Test: Die Viabilität von A549 und NIH/3T3 Zellen bleibt bis zur eingesetzten Höchstkonzentration von 30 µg/ml TiO₂-NP unbeeinflusst.

Eine weitere für die Versuche wichtige Partikeleigenschaft ist die Größe. Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, ist die Partikelgröße ein entscheidender Parameter für die Aufnahme der Partikel. Kleinere Partikel werden in der Regel schneller aufgenommen als größere und haben alternierende Aufnahmewege. Bei den Partikelgrößen können drei verschiedene Größen genannt werden:

- Die primäre Partikelgröße
- Der hydrodynamische Radius
- Der Aggregatdurchmesser

Die primäre Partikelgröße könnte man auch als die eigentliche Partikelgröße bezeichnen. Sie bezeichnet den gesamten kovalent zusammengebundenen Anteil und kann mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermittelt werden. Der hydrodynamische Radius ist die primäre Partikelgröße plus die ionisch gebundenen Ionen und Moleküle aus dem Lösemittel (siehe

hierzu auch Abbildung 35 in Abschnitt 3.1.2.1). Der hydrodynamische Durchmesser kann über dynamische Lichtstreuung (DLS) gemessen werden. Da Nanopartikel zu Aggregatbildung neigen (vor allem meist im wässrigen Milieu), ist der durchschnittliche Durchmesser der Aggregate im verwendeten Medium der wichtige Faktor. Dieser kann sowohl mittels DLS als auch mittels TEM oder REM (Rasterelektronenmikroskopie) bestimmt werden. Wie sehr sich der primäre Durchmesser von den unter realen Bedingungen auftretenden Aggregaten unterscheidet, zeigen die hier verwendeten Titandioxidpartikel: Die primäre Partikelgröße liegt lediglich bei <10 nm. Die Partikel bilden jedoch Aggregate mit einer Größe von bis zu $3\text{--}5\ \mu\text{m}$ (Abbildung 43) [187]. Dies zeigt deutlich, wie sich Partikel in unterschiedlichen Medien verhalten und dass Nanopartikel in wässriger/biologischer Umgebung ganz andere Eigenschaften annehmen können.

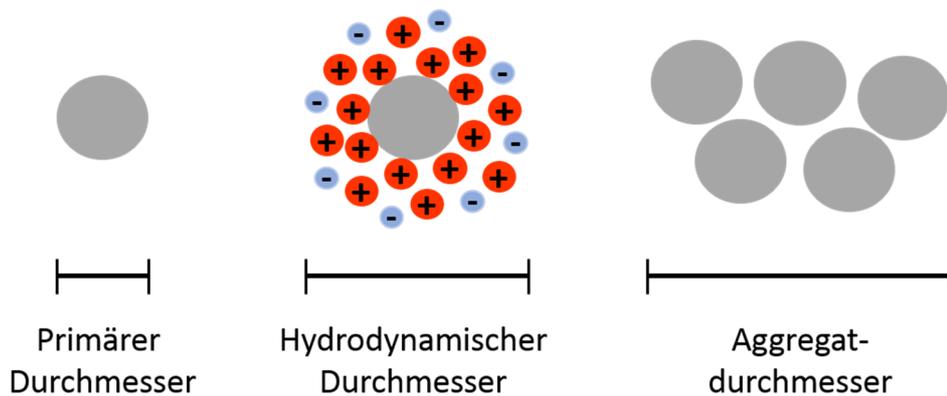


Abbildung 42: Übersicht über die verschiedenen Kennzahlen der Nanopartikelgröße.

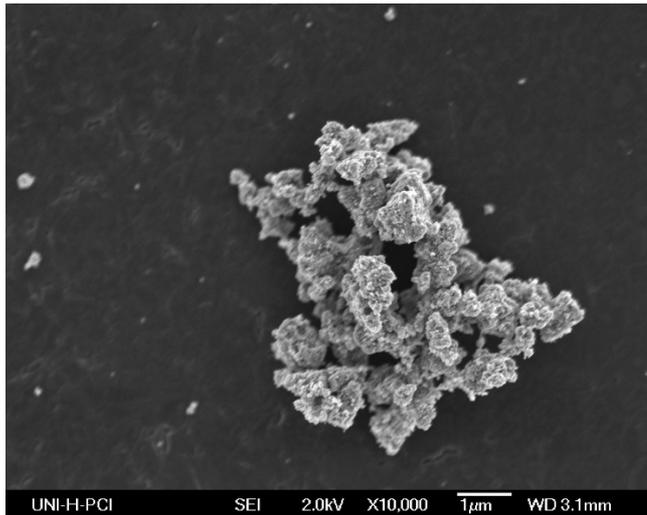


Abbildung 43: Rasterelektronenmikroskopie (REM) Aufnahme eines Aggregats der hier verwendeten Titandioxidpartikel.

Weitere Informationen über die verwendeten Partikel befinden sich im Anhang in Abschnitt A9.

3.2.2 Detektion der Nanopartikelaufnahme mittels Seitwärtsstreulicht (SSC)

Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *side scatter*) ist das Licht, welches ungerichtet in alle Richtungen gestreut wird, wenn Licht auf Partikel oder Moleküle trifft. Im Durchflusszytometer wird dieses Licht im 90°-Winkel zur Probe gemessen, es hat die gleiche Wellenlänge wie das eingestrahlte Licht. In der Regel wird für diese Messung der 488 nm Laser verwendet (wie auch in dieser Arbeit). Es ist bekannt, dass das Seitwärtsstreulicht Aussagen über die Granulierung der Zelle enthält. In der Regel bleibt der SSC-Wert von Zellen in einem konstanten Bereich. Daher wird der SSC, neben dem Vorwärtsstreulicht (FSC), als Standardparameter verwendet. Mit Hilfe des SSC und des Vorwärtsstreulichts ist es möglich:

- den gesuchten Zelltyp von anderen Zelltypen zu unterscheiden
- andere Partikel und Verschmutzungen aus der Analyse auszuschließen
- tote Zellen und Zellaggregate aus der Analyse zu ausschließen

Der SSC und FSC Wertebereich ist für verschiedene Zelltypen spezifisch. Bei so gut wie allen durchflusszytometrischen Experimenten ist daher der erste Schritt die Identifikation der

Zellpopulation mittels SSC und FSC. Es ist jedoch anzumerken, dass Partikel oder Moleküle, die sich an oder in einer Zelle befinden, besonders den SSC-Wert beeinflussen können. Daher empfiehlt es sich, diese Werte stets im Auge zu behalten. Besonders metallische Nanopartikel streuen Licht sehr stark. Eine solche Analysestrategie ist für Proben mit unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen nicht geeignet. Die nachfolgenden Ergebnisse werden das verdeutlichen. Es ist für eine gute Analyse dennoch wünschenswert, wenn tote Zellen, oder Nicht-Zellpartikel, sowie Zellaggregate, aus der Analyse entfernt werden. Bei der Verwendung einer einzelnen Zellpopulation ist der FSC als Parameter ausreichend, um Zellaggregate und Partikel aus der Analyse auszuschließen.

Im folgenden Versuch wurde getestet, ob die metallischen TiO_2 Partikel zur Detektion der Aufnahme in die Zelle mittels SSC-Wert geeignet sind. Genauer gesagt: die Adsorption oder Aufnahme der Partikel an oder in die Zelle. Denn ob ein Partikel auf oder in einer Zelle ist, kann ohne Hilfsmittel nicht mit einem Durchflusszytometer unterschieden werden. Auf die intrazelluläre Lokalisierung der Nanopartikel wird später in diesem Kapitel eingegangen. Vorerst sollten Methoden zur Nanopartikelaufnahme und die spezifische Aufnahme unterschiedlicher Zelltypen untersucht werden. Hierfür wurden die Lungenkrebszellen A549 und die Fibroblasten NIH/3T3 als Modellzelllinien verwendet. Sowohl Haut (Fibroblasten) als auch Lungenzellen sind ein möglicher Kontaktpunkt mit Nanopartikeln, welche in immer größerer Zahl Anwendung in Produkten finden [188]. Dieser Kontakt kann gewünscht sein (z.B. bei Sonnencreme) oder ungewollt durch Einatmung stattfinden. Ein Ziel der Untersuchung war die Feststellung, ob sich diese zwei unterschiedlichen Zelltypen in ihrem Aufnahmeverhalten unterscheiden. Dies würde zu dem Schluss führen, dass diese Methode sensitiv genug ist um solche Unterschiede zu detektieren und zur Untersuchung der Aufnahmeraten verschiedener Zelltypen geeignet wäre.

In **Abbildung 44** ist das Seitwärtsstreulicht gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen. Auf der linken Seite (a und c) befinden sich unbehandelte A549 und NIH/3T3 Zellen. Auf der rechten Seite (b und d) mit Nanopartikeln behandelte Zellen (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TiO_2). Der Anstieg des SSC-Signals, in

Anwesenheit der Partikel, ist deutlich zu erkennen. Dieser Unterschied wurde in **Abbildung 45** quantifiziert, und die Mittelwerte von den in z.B. in **Abbildung 44** zu sehenden Messwerten aufgetragen (nach vorheriger Analyse über den FSC). Für weitere Informationen wurden Verläufe gegen die Konzentration und die Inkubationszeit aufgetragen (**Abbildung 45**). Die Auftragung gegen die Nanopartikelkonzentration (a) zeigt einen linearen Anstieg bis 20 µg/ml und ein Abflachen des Signals zwischen 20 und 25 µg/ml. Die NIH/3T3 Zellen zeigen hierbei höhere SSC-Werte als die A549 Zellen. Im zeitlichen Verlauf (b) ist ebenfalls ein stärkerer Anstieg des SSC-Signals bei den NIH/3T3 Zellen zu sehen. Bereits nach zwei Stunden erreichen die NIH/3T3 Zellen einen Wert von über 10×10^6 während die A549-Zellen zu diesem Zeitpunkt einen Wert von weniger als 8×10^6 erreicht haben. Auffällig ist auch, dass die Werte bei 24 h Inkubation wieder abgesunken sind.

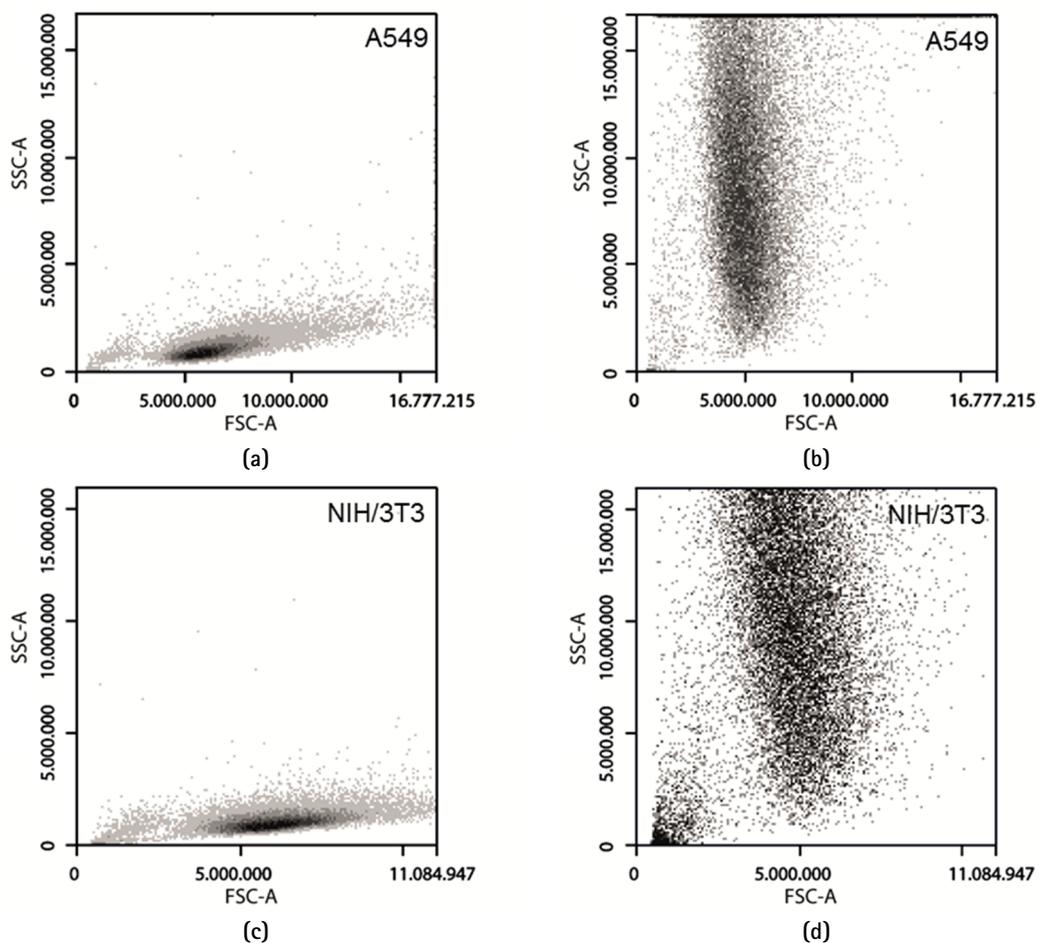


Abbildung 44: Density Plot des SSC und FSC-Signals von A549 und NIH-3T3-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den Partikeln inkubiert. (a) und (c) sind ohne Nanopartikel und (b) und (d) mit jeweils 25 µg/ml TiO₂-FITC inkubiert worden.

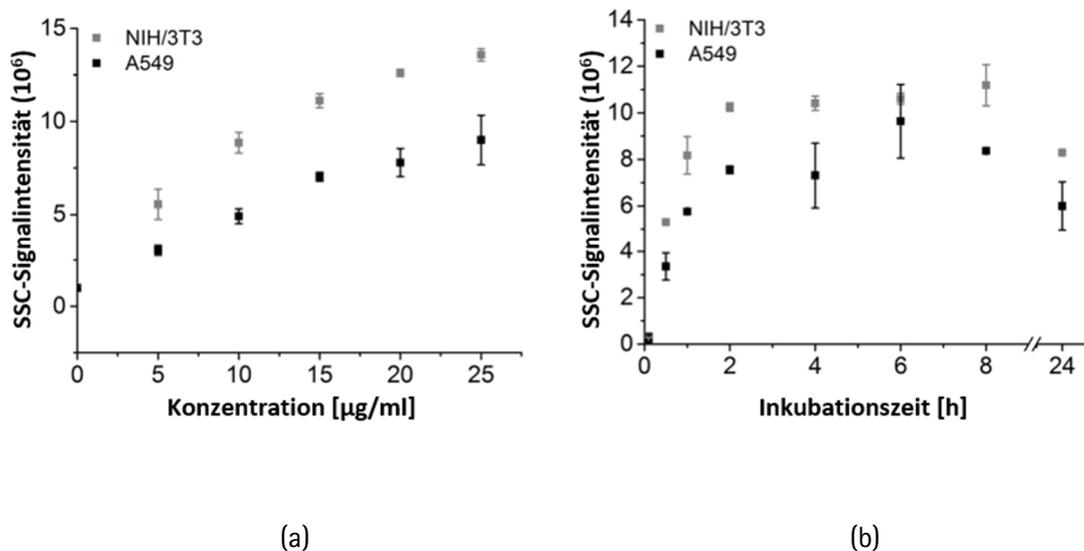


Abbildung 45: SSC-Signal von A549 und NIH/3T3-Zellen. (a): Auftragung nach Konzentration. (b): Auftragung nach Inkubationszeit mit 12,5 µg/ml TiO₂-FITC.

Die Ergebnisse zeigen, dass Titandioxidnanopartikel zu einem konzentrations- und zeitabhängigen starken Anstieg des SSC-Signals der A549 und NIH/3T3 Zellen führen. Das Signal steigt sogar so schnell an, dass zum Teil das Detektionslimit erreicht wird. Dem kann mit der Anpassung der Spannung an den Photoelektronenvervielfacher (engl. *photomultiplier tube*; kurz: PMT) oder einem Neutraldichtefilter (ND-Filter) entgegengewirkt werden. Es konnte ein unterschiedliches Nanopartikelaufnahmeverhalten zwischen den Zelltypen nachgewiesen werden. Die NIH/3T3-Zellen scheinen die Partikel schneller und in einer größeren Menge aufzunehmen oder zu adsorbieren. Ebenfalls auffällig ist der Signalabfall nach 24 h. Möglicherweise ist dies auf die Zellteilung und somit auf die Verteilung der Partikel auf die Tochterzellen zurückzuführen. Die Methode scheint ganz ohne Markierung der Nanopartikel schon geeignet zu sein die Aufnahme der Nanopartikel zu detektieren und das mit einer Sensitivität, die selbst Unterschiede zwischen zwei unterschiedlichen Säugetierzelllinien detektieren lässt.

3.2.3 Detektion der Nanopartikelaufnahme mittels Fluoreszenzmarkierung der TiO₂ Nanopartikel

Eine weitere durchflusszytometrische Möglichkeit die Aufnahme der Nanopartikel zu untersuchen, ist eine Fluoreszenzmarkierung der Partikel. In dieser Arbeit wurden die Partikel hierfür mit dem verbreiteten Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markiert. So konnte das Fluoreszenzsignal als weiterer sensitiver Parameter herangezogen werden um die Aufnahme zu untersuchen. Die höhere Sensitivität und die geringere Anfälligkeit gegenüber anderen Einflüssen im Vergleich zum Streulicht, stellen große Vorteile einer Fluoreszenzmarkierung dar. Nachteilig wären mögliche Effekte auf das Verhalten der Nanopartikel, insbesondere auf die zelluläre Aufnahme. Darüber hinaus sollte die Färbung möglichst stabil sein, um konstante Ergebnisse erzeugen zu können. In der Literatur wurden keine Einflüsse von Fluorescein auf das Verhalten der Nanopartikel beschrieben. In den eigenen Untersuchungen wurde das Streulicht von unmarkierten Partikeln als Kontrollparameter für das Aufnahmeverhalten herangezogen und es zeigten sich keine sichtbaren Unterschiede in der Aufnahme von markierten und unmarkierten Partikeln (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde die Signalstabilität über 22 Tage hinweg untersucht (Abbildung 46). Die Ergebnisse zeigen, dass das Fluoreszenzsignal (links) in den ersten vier Tagen sehr stark abfällt (Faktor 9) und dann ein stabiles Niveau erreicht. Das SSC-Signal dient als Kontrolle und zeigt, dass die Aufnahme der Partikel konstant blieb und sich nur das Fluoreszenzsignal veränderte. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Partikel erst vier Tage nach der Markierung verwendet werden sollten, dann liefern sie mindestens 22 Tage lang ein stabiles Signal. Die Erkenntnis ist wichtig um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

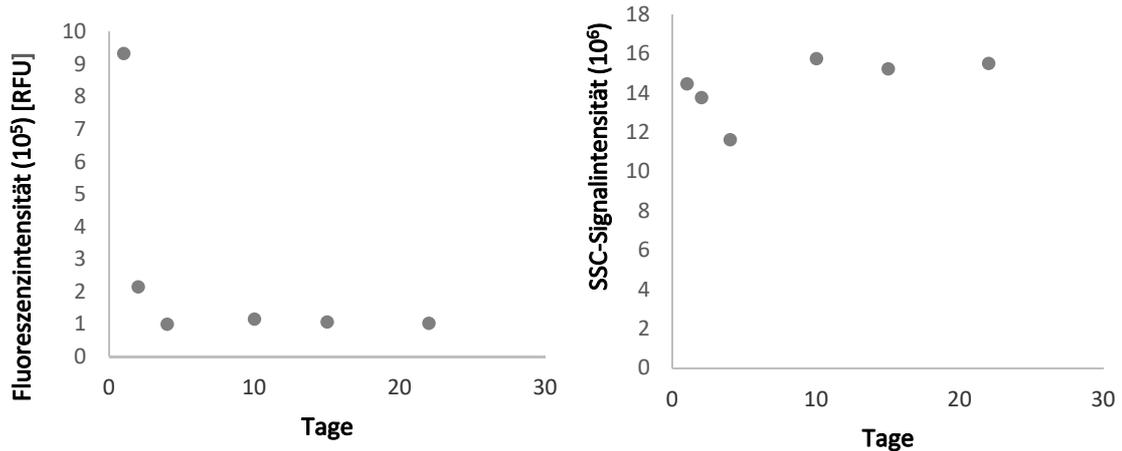


Abbildung 46: Messung der Stabilität der Fluoreszenzmarkierung. Exemplarisch mit A549 Zellen gezeigt. Links: die Fluoreszenzintensität der Partikel; Rechts: das Streulichtsignal.

In **Abbildung 47** sind die Ergebnisse der fluoreszenzbasierten Detektion der Nanopartikelaufnahme zu sehen. **Abbildung a** und **b** zeigen exemplarisch die Verschiebung der Fluoreszenzsignale durch die Zugabe der Nanopartikel und durch die Inkubation mit der Zeit. 0 h Inkubation bedeutet, dass die Nanopartikel nur für wenige Sekunden in Kontakt mit den Proben waren und quasi umgehend wieder entfernt wurden (selbst das hat schon einen Effekt). In **Abbildung c** und **d** ist der Konzentrations- und Zeitverlauf des Fluoreszenzsignals zu sehen. Hier ist der Unterschied zwischen den Zelltypen noch deutlicher zu erkennen als bei der reinen Streulichtmessung. NIH/3T3-Zellen scheinen bei gleicher Konzentration mehr Nanopartikel aufzunehmen als A549 Zellen (**Abbildung (c)**), was sich vor allem bei den höheren Konzentrationen widerspiegelt. Bei der Inkubationszeit (**b**) ist bereits nach 1,5 h ein deutlich höherer Anstieg zu erkennen, der Maximalwert liegt deutlich über den der A549 Zellen. Der Signalabfall bei 24 h ist hier nur bei den NIH/3T3 Zellen zu beobachten.

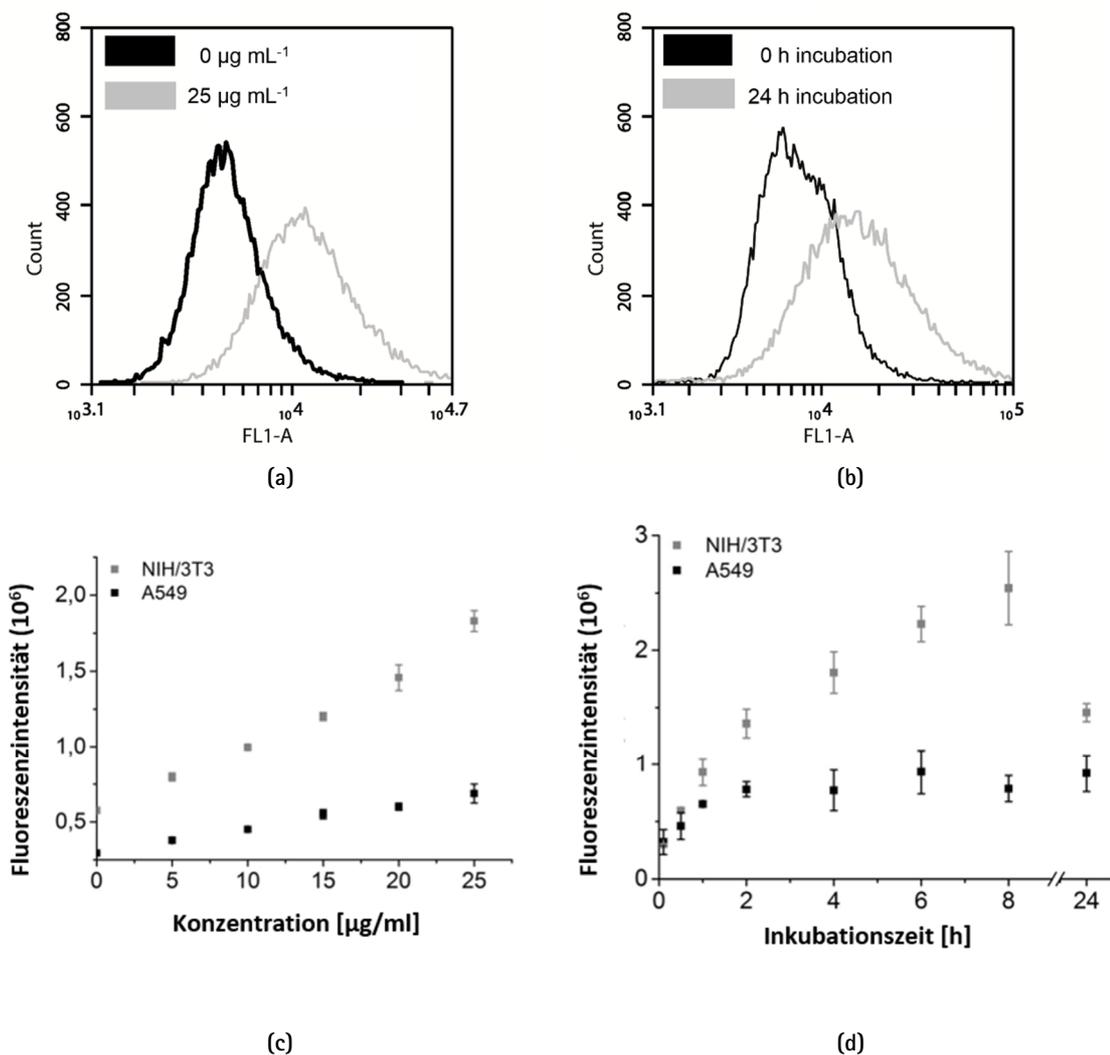


Abbildung 47: Fluoreszenzsignal von mit FITC markierten Partikeln behandelten A549 und NIH/3T3-Zellen. (a): Exemplarischer Vergleich des Fluoreszenzsignals von 0 und 25 µg/ml TiO₂-FITC. (b): Exemplarischer Vergleich des Fluoreszenzsignals von 0 h und 24 h mit 12,5 µg/ml TiO₂-FITC inkubierten Zellen. (c) und (d) zeigen das Fluoreszenzsignal im Verhältnis zur Konzentration (c) bzw. Inkubationszeit (12,5 µg/ml TiO₂-FITC) (b). Die Autofluoreszenz der Zellen wurde von den Werten abgezogen.

Die Ergebnisse der SSC und Fluoreszenzmessung machen deutlich, dass NIH/3T3 und A549 Zellen eine unterschiedliche Nanopartikelaufrahme- und maximale Aufnahmemenge besitzen. Die Ergebnisse decken sich in der Tendenz, auch wenn diese in den Fluoreszenzmessungen stärker ausgeprägt war. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das verwendete Durchflusszytometer (BD Accuri) mit einer festen Spannung an den Photomultipliertubes arbeitet. Für die meisten Anwendungen ist das kein Problem, bei den hohen Streulichtsignalen stieß das verwendete Gerät

jedoch an seine Grenzen. Das bedeutet, dass sich manche Zellen am Detektionslimit befanden. Dadurch kann zwar immer noch die Tendenz erkannt werden, aber weniger genau. Eine Lösung neben der Senkung der Spannung sind Filter, die mehr Licht herausfiltern (ND-Filter). Leider ist dies für den SSC bei dem BD Accuri nicht möglich. Die Fluoreszenzsignale hingegen befanden sich alle im detektierbaren Bereich. Eine Verbesserung der SSC Messungen könnte durch die oben genannten Punkte erzielt werden. Die gezeigten Methoden erwiesen sich jedoch für die Messung der Aufnahme als sehr geeignet. Während die streulichtbasierte Methode durch ihre Einfachheit und ohne mögliche Beeinflussung der Partikeleigenschaften hervorsteicht, hat die Fluoreszenzmarkierung die unterschiedlichen Aufnahmeverhalten der Zellen noch besser herausgestellt.

3.2.4 Auswirkungen auf das Vorwärtsstreulicht

Das Vorwärtsstreulicht wird im niedrigen Winkel zum eingestrahlten Licht gemessen (BD Accuri: $0^\circ \pm 13^\circ$). Es ist im Wesentlichen von den Brechungen an den verschiedenen Oberflächen und Medien, insbesondere der Zellmembran, abhängig. Das führt dazu, dass im Schnitt besonders große Zellen das Licht stärker ablenken. Daher ist die Annahme gängig, dass das FSC-Signal mit der Zellgröße korreliert. Diese Annahme stimmt aber nicht immer. Es ist beispielsweise bekannt, dass die Membranintegrität den FSC-Wert stark beeinflussen kann. Im Laufe der Untersuchungen, wurde eine Beeinflussung des FSC-Wertes festgestellt und in **Abbildung 48** dargestellt. Das FSC-Signal sinkt in Folge der Nanopartikeleinwirkung, wie in **Abbildung 48** (c) und (d) zu sehen, abhängig von Zeit und Konzentration. Das FSC-Signal erreicht sein Minimum bei 20 $\mu\text{g/ml}$ bzw. nach 2 h Inkubation.

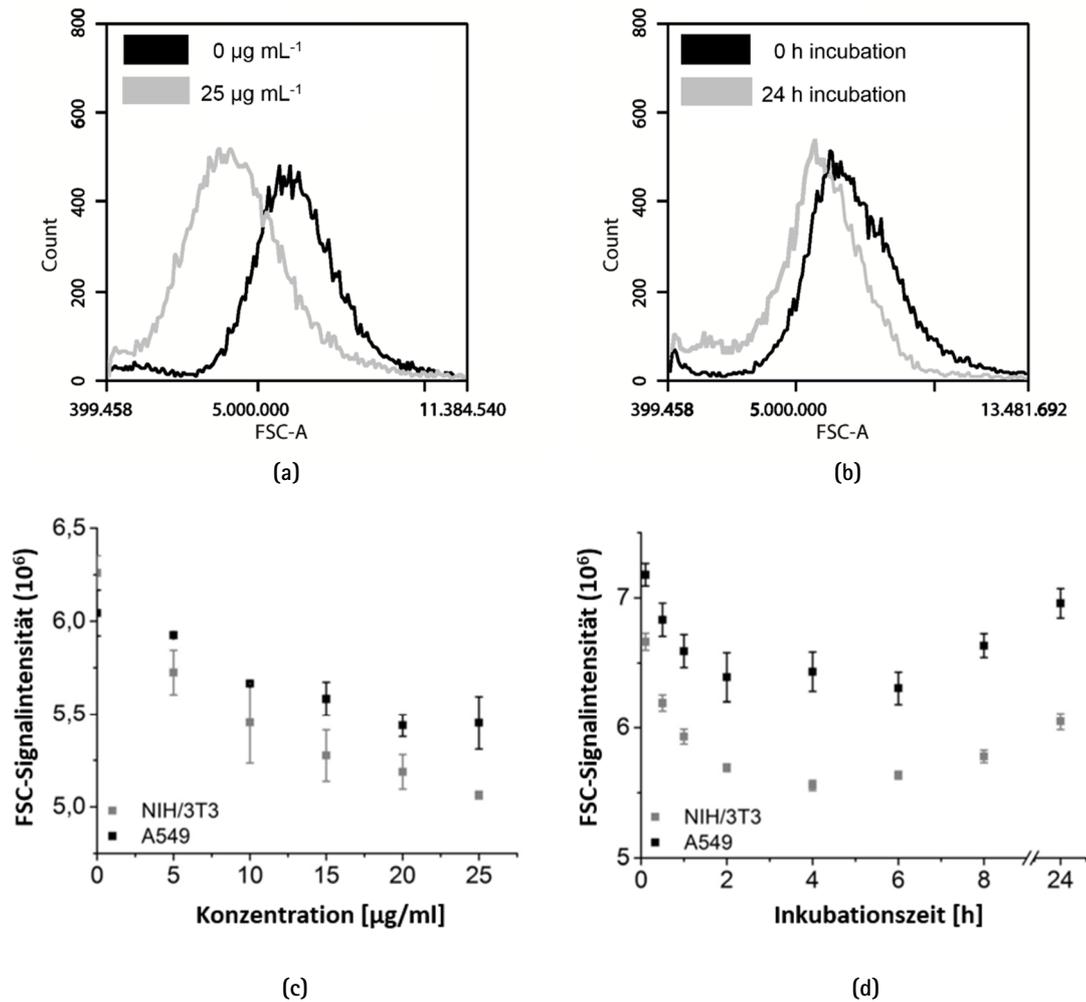


Abbildung 48: FSC-Signal von mit Nanopartikeln behandelten A549 und NIH/3T3-Zellen. (a): Exemplarischer Vergleich des Fluoreszenzsignals von 0 und 25 µg/ml TiO₂-FITC. (b): Exemplarischer Vergleich des Fluoreszenzsignals von 0 h und 24 h mit 12,5 µg/ml TiO₂-FITC inkubierten Zellen. (c) und (d) zeigen das Fluoreszenzsignal im Verhältnis zur Konzentration (c) bzw. Inkubationszeit (12,5 µg/ml TiO₂-FITC) (b).

Ein sinkender FSC-Wert deutet oft auf einen toxischen Effekt hin. Dieser konnte bei den vorliegenden Partikeln durch verschiedene Experimente (durchflusszytometrisch, mikroskopisch, fluoreszenzspektroskopisch) ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser toxikologischen Untersuchungen sind an anderer Stelle gezeigt (Abbildung 41, Abbildung 50). Eine weitere Möglichkeit wäre eine morphologische Veränderung der Zellen durch die Behandlung mit Nanopartikeln. Mikroskopisch konnte jedoch keine morphologische Veränderung festgestellt werden (Abschnitt 3.2.5). Die vorherigen Ergebnisse haben eine starke Zunahme des Seitwärtsstreulichts

gezeigt (Abschnitt 3.2.2). Möglicherweise führt die starke Seitwärtsstreuung dazu, dass weniger Licht zum FSC-Detektor gelangt und entsprechend das Signal sinkt, es sich also um eine Folge der starken Lichtstreuung handelt. Auffällig ist auch, dass das Signal im Laufe der Zeit wieder ansteigt. Dieser Effekt wurde umgekehrt zuvor auch bei den SSC- und Fluoreszenzsignalen beobachtet. Dieser Effekt könnte auf die Zellteilung zurückzuführen sein. Besonders stark trat dieser Effekt nach 24 h auf. Dies ist die ungefähre Zeit, nach der sich die Zellen einmal geteilt haben. Durch die Zellteilung würden die Nanopartikel wieder auf die Tochterzellen aufgeteilt werden und die Konzentration pro Zelle würde sinken. Weitere Möglichkeiten wären, dass die Nanopartikel aus den Zellen ausgeschleust werden oder dass die Partikel in bestimmten Kompartimenten angesammelt werden.

3.2.5 Mikroskopische intrazelluläre Lokalisation von Nanopartikeln

Wie anfangs erwähnt, lässt sich mittels Durchflusszytometrie nicht feststellen, ob sich die Nanopartikel in oder an der Zelle befinden. Für die Lokalisation von Nanopartikeln ist die Mikroskopie geeigneter. Mit Hilfe der Mikroskopie konnte die Aufnahme der Partikel indirekt nachgewiesen werden. Indirekt, weil mittels Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie nur eine zweidimensionale Ebene beobachtet wird. Für eine sichere Lokalisation in der Zelle wäre allerdings eine dreidimensionale Beobachtung nötig. In dieser Arbeit wurden die mit Nanopartikeln behandelten Zellen über einen Zeitraum von 24 h mikroskopisch beobachtet. Dafür wurden die Zellen mit einem *time-lapse* Mikroskop (LumaScope 600, Etaluma Inc., USA) untersucht, welches alle 60 Sekunden ein Bild bei 20facher Vergrößerung aufnimmt. Die Untersuchungen zeigen, dass sich die Nanopartikel um den Zellkern anzuordnen scheinen (**Abbildung 49**). Der Zellkern ist von einer zweiten Membrane umgeben, den die Nanopartikelaggregate scheinbar nicht durchdringen können. Eine solche Anordnung um den Zellkern kann keine zufällige Bildung auf der Oberfläche der Zellmembranen sein. So konnte die intrazelluläre Aufnahme der Nanopartikel mikroskopisch nachgewiesen werden.

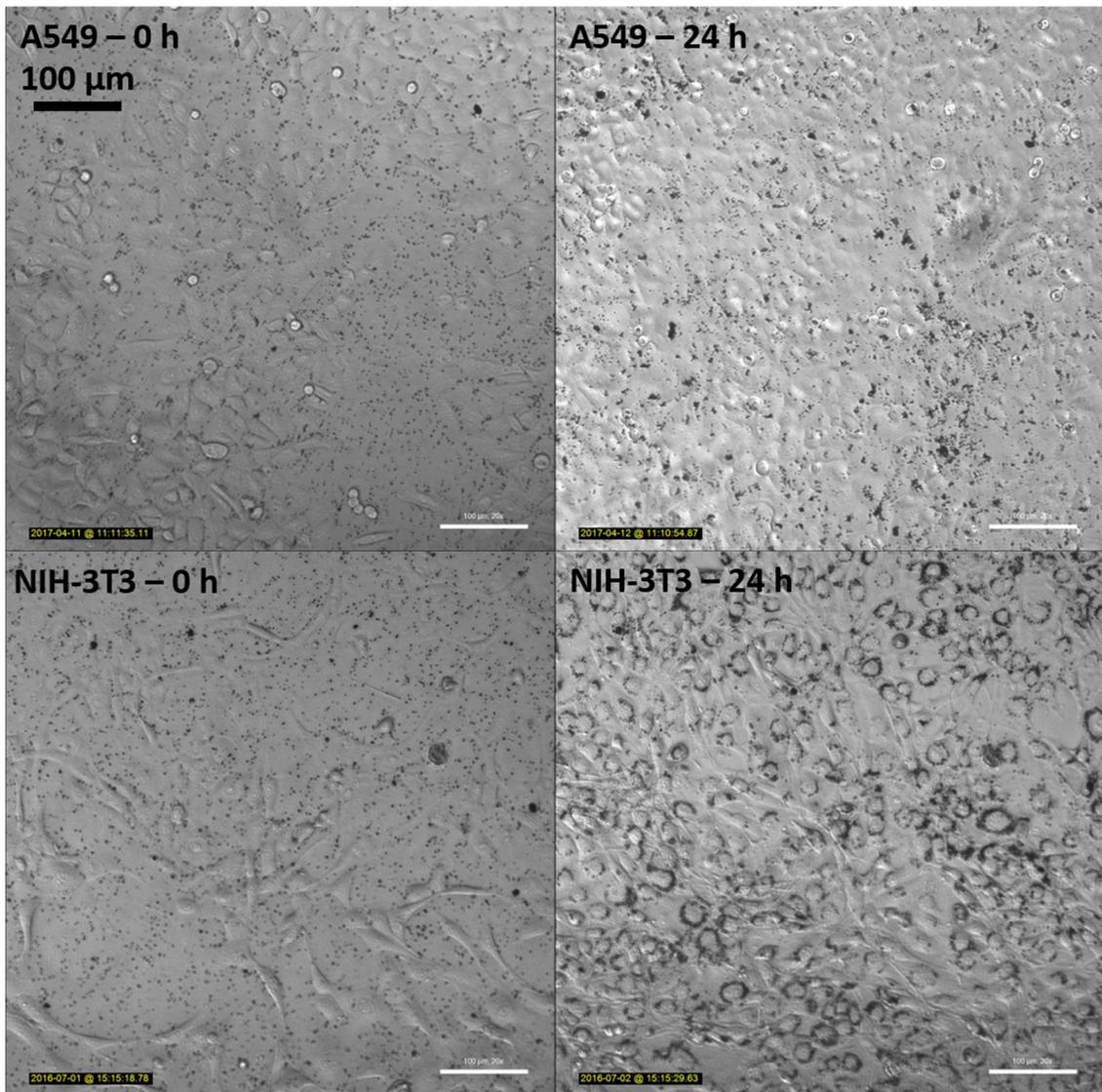


Abbildung 49: Mikroskopaufnahmen nach sehr kurzer Inkubation (0 h) und nach 24 h mit 12,5 µg/ml TiO₂-FITC Partikeln. Vergrößerung: 20x

3.2.6 Detektion und Lokalisation mittels Propidiumiodid

Ein weiterer entdeckter Effekt war, dass auch Propidiumiodid durch die Nanopartikel in die Zellen gelangen kann. Es wurde bei der Durchführung von Lebend-Tot-Färbungen mit Propidiumiodid festgestellt, dass sich die Fluoreszenzwerte der viablen Population nach Nanopartikelzugabe erhöhten. Es war zwar immer noch möglich, lebende und tote Zellen zu unterscheiden, aber der Effekt war dennoch sichtbar. In **Abbildung 50** wurde das Fluoreszenzsignal von Propidiumiodid analysiert, das Ergebnis ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg. Das mittlere durch Propidiumiodid

induzierte Fluoreszenzsignal hat sich zwischen 5 µg/ml und 15 µg/ml mehr als verdoppelt, auch wenn die Werte hier stark schwanken. Eindeutig ist der Unterschied des Fluoreszenzsignals zwischen 5 und 25 µg/ml Titandioxid. Eine Vergleichskontrolle ohne Propidiumiodid führte hingegen zu keinem Anstieg des Fluoreszenzsignals (nicht gezeigt). Anzumerken ist, dass das Propidiumiodid nur fünf Minuten vor der Messung zugegeben wurde. Es ist möglich, dass Propidiumiodid an die Nanopartikel adsorbiert und so in die Zellen geschleust wird. Diese Eigenschaft, dass organische Moleküle wie DNA an Titandioxid binden und so in Zellen geschleust werden, wird sich bereits zu Nutzen gemacht [189]. Denkbar wäre auch, dass Propidiumiodid an die Nanopartikel gebunden werden und so in die Zellen gebracht werden kann. So könnte sichergestellt werden, dass die Partikel in die Zelle gelangt sind. Propidiumiodid allein kann eine intakte Membran nicht durchdringen.

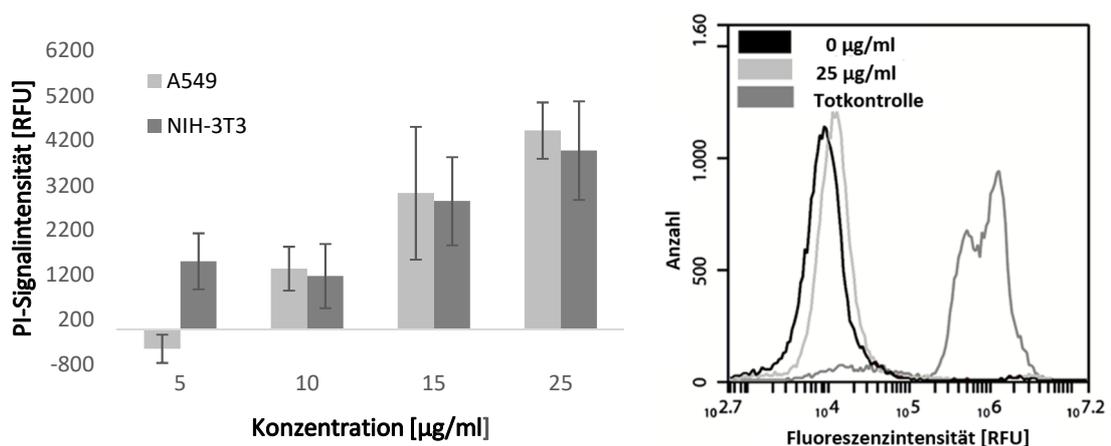


Abbildung 50: Propidiumiodid Fluoreszenzsignal von A549 und NIH/3T3-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Nanopartikelkonzentrationen. Die Werte wurden auf 0 (Kontrolle ohne Nanopartikel aber mit PI) normiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm bandpassfilter.

3.3 Zusammenfassung und Ausblick – Teil 2

In dieser Arbeit wurden verschiedene durchflusszytometrische Untersuchungsmethoden zur Detektion der Nanopartikelaufnahme evaluiert. Die Aufnahme wurde dabei mittels Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenz verfolgt. Die intrazelluläre Lokalisierung der Nanopartikel erfolgte mikroskopisch. Es wurde gezeigt, dass NIH/3T3-Zellen Titandioxid Nanopartikel schneller und in größerer Menge aufnehmen als A549-Zellen. Das führt zu dem Schluss, dass die Durchflusszytometrie eine geeignete Methode ist, um die Aufnahme von Nanopartikeln zu detektieren und sensitiv genug ist, um Unterschiede in der Aufnahmerate von verschiedenen Zelltypen messen zu können. Seitwärtsstreulicht- und FITC-Messung stellten sich als geeignete Detektionsmethoden der Nanopartikelaufnahme dar. Die Propidiumiodid-Messung bedarf noch näherer Untersuchungen. Alle evaluierten Methoden zur Nanopartikeldetektion mittels Durchflusszytometrie sind schnell, kostengünstig und einfach in der Handhabung. Bei der Verwendung des Seitwärtsstreulichts wird nicht einmal eine Markierung der Partikel benötigt, damit werden sowohl Zeit als auch Kosten gespart. Darüber hinaus können so Effekte der Fluorophore auf die Aufnahme oder Zellen ausgeschlossen werden. Es wurde gezeigt, dass die Durchflusszytometrie eine leistungsfähige Methode zur Detektion der *in vitro* Nanopartikelaufnahme in die Zellen ist.

4 Fazit

In dieser Arbeit konnten fortgeschrittene durchflusszytometrische Methoden entwickelt werden, welche die Möglichkeiten aufzeigen, die die Durchflusszytometrie für die Forschung und Industrie bietet. Im ersten Teil wurde an einem Assay zur Detektion von hochproduzierenden Zelllinien gearbeitet. Hierbei wurde eine erfolgreiche Immobilisierungsmethode für Aptamere auf der Oberfläche von CHO-Zellen etabliert. Dazu wurde der *crosslinker* BS³ verwendet. Die Immobilisierung konnte durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Als nächstes sollte die Funktionsfähigkeit über die Bindung eines Zielmoleküls nachgewiesen werden. Dafür wurde das Aptamer V7t1 gegen das Zielmolekül VEGF (Industrierelevanter Wachstumsfaktor) verwendet. Es zeigte sich allerdings das VEGF auch ohne Aptamer stark an die Zellen bindet, eine aptamerspezifische Bindung war sehr schwierig zu detektieren. Ein Wechsel des Zielmoleküls, zu einem Molekül mit weniger aptamerunabhängigen Bindungen zu den Zellen sollte den Nachweis der Bindung zwischen Aptamer und Zielmolekül ermöglichen. Auch bietet die Zelloberfläche eine noch größere Aufnahmekapazität für die Aptamere, eine weitere Optimierung ist hier noch möglich. Die Durchflusszytometrie bietet hier das Potential, die Effektivität klassischer Methoden zur Selektion hochproduzierender Zellen (*limiting dilution cloning*) drastisch zu erhöhen. Die hier etablierte Immobilisierungsmethode ist prinzipiell auch auf andere Systeme übertragbar, z.B. für die Kopplung an aminomodifizierten Oberflächen, oder Proteinen.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte die Sensitivität der Durchflusszytometrie bei der Aufnahme von metalloxidischen Nanopartikeln (hier TiO₂) gezeigt werden. Mögliche Auswirkungen von Nanopartikeln auf die Gesundheit sind für die Bevölkerung hochrelevant. Gleichzeitig steigt die Anzahl neuer Produkte mit Nanomaterialien. Neben direkten toxischen Einflüssen kann über eine Aufnahme und Agglomeration auch eine Langzeitauswirkung vermutet werden. Eine einfache Überprüfung der Nanopartikelaufnahme für die Risikobewertung der Partikel ist daher wünschenswert. Die

Ergebnisse zeigten, dass die durchflusszytometrische Methode genau genug ist, um rein über das Streulicht das unterschiedliche Aufnahmeverhalten von zwei verschiedenen Säugetierzelllinien aufzuzeigen. Verwendet wurden hierbei die beiden Standardzelllinien A549 und NIH/3T3. Die Sensitivität der Messung lässt sich durch eine Fluoreszenzmarkierung der Nanopartikel noch weiter steigern.

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, deren Potential bei weitem noch nicht ausgeschöpft wurde. In dieser Arbeit konnten zwei Anwendungen mit hohem Potential für die Forschung und Industrie entwickelt werden. Die Durchflusszytometrie wird auch in Zukunft ein wichtiges Werkzeug für die Einzelzellanalyse bleiben und der technische Fortschritt wird die Methode noch leistungsfähiger machen.

A Materialien

A.1 Verbrauchsmaterialien

Einmalhandschuhe, Nitril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Einmalpipetten; 1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Erlenmeyerkolben 125 und 250 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Konzentrator, Vivaspin 2 ml	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Kryoröhrchen 1,6 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Kulturplatte, 6- und 8-well (PCA)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen Typ A, B, D	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Spritzen 10 ml, 20 ml, 50 ml	Terumo Europe NV, Leuven
Vakuumsterilfilter, Sartolab 180C5 0,22 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Corning, USA

A.2 Geräte

Analysewaage, ED224S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Autoklav, Systec V-150	Systec, Wettenberg
Durchflusszytometer BD Accuri C6	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Durchflusszytometer EPICS XL-MCL	Beckmann Coulter, Florida
Eismaschine AF 103	Scotsman Ice Systems, USA

Feinwaage, MC1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop, Olympus IX 50	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Inkubator, Hybaid	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Inkubator, Heracell 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Lichtmikroskop Olympus BH-2	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
LumaScope 600	Etaluma Inc., Carlsband, USA
Magnetrührer	MSH Basic, IKA-Werke, Staufen
Orbitalschüttler, Unimax 1010	Heidolph Instruments
pH-Meter HI 221	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten, Transferpette	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand, Wertheim
Reinstwasseranlage, Arium 611	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Rotator, Revolver	Labner International, USA
Rotator für 1,5 und 2 ml Gefäße	VWR International, Darmstadt
Sicherheitswerkbank, Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Sicherheitswerkbank, MSC Advantage	Thermo Scientific, Waltham
Spektralphotometer, NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham
Spektralphotometer, NanoDrop 3300	Thermo Scientific, Waltham
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallbad, Sonorex Super RK 510 H	Bandelin, Berlin
Vortex-Schüttler	VWR International, Darmstadt

Wasserbad WNB 45	Memmert
Zellzähler, Cedex	Innovatis, Roche GmbH
Zentrifuge, 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, 5430	Eppendorf AG, Hambrug
Zentrifuge Micro Star 17R	VWR International, Darmstadt
Zentrifuge für 1,5 und 2 ml Gefäße, Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Zentrifuge für 1,5 und 2 ml Gefäße, X3	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL

A.3 Chemikalien

Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co KG
Accutase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bis(sulfosuccinimidyl)suberat	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Borsäure	Sigma Aldrich, USA
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich, USA
Calciumchlorid Dihydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Cyanurchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
DAPI	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich, USA
Ethanol	
Ethylendiamintetraessigsäure	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Fluoresceinisothiocyanat	Sigma Aldrich, USA

Glutamin	Biochrom
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co KG
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich, USA
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich, USA
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co KG
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, USA
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co KG
Natriumhydroxid	AppliChem
Natronlauge	Sigma Aldrich, USA
Propidiumiodid	Sigma Aldrich, USA
Salzsäure	Sigma Aldrich, USA
SYBR Green II	Amresco, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth GmbH & Co KG
Tween 20	AppliChem

A.4 Aptamere und Zielmoleküle

V7t1:

Zielmolekül: VEGF

5'-TGT GGG GGT GGA CGG GCC GGG TAG ATA GTA TGT GCA ATC-NH₂-3'

Extinktionskoeffizient: $386200 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

Molekulargewicht: 12415,1 g/mol

V7t1-FITC:

Zielmolekül: VEGF

5'-Fluorescein-TGT GGG GGT GGA CGG GCC GGG TAG ATA GTA TGT GCA ATC-NH₂-3'

Extinktionskoeffizient: $408000 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

Molekulargewicht: 13267,8 g/mol

Kontrolloligonukleotid:

5'-Fluorescein-CCC CGC CAC ACC-NH₂-3'

Extinktionskoeffizient: $110000 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

264-C12:

Zielmolekül: IgG-Antikörper

5'-TAC GAC TCA CTA TAG GGA TCC ATA GAA AAC CCC TAA ACG CCC GAA TTC CCT TTA GTG AGG

GTT-NH₂-3'

Extinktionskoeffizient: $614000 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

265-C6:

Zielmolekül: IgG-Antikörper

5'-TAC GAC TCA CTA TAG GGA TCC ATA GAA AAC CCC TAA ACG CCC GAA TTC CCT TTA GTG AGG GTT

-NH₂-3'

Extinktionskoeffizient: 626000 mM⁻¹ x cm⁻¹

Humanes VEGF-A165

selbst produziert

Gelabelt mit NT-647,

Kit: Monolith NT Protein Labeling Kit Red-NHS

NanoTemper Technologies

IgG aus Humanserum

Sigma Aldrich, USA

Mit Cy5 gelabelt

Kit: Cy5 Mono-Reactice Dyaе Pack

GE Healthcare

A.5 Puffer und Lösungen

Natriumcarbonat-Natriumbicarbonat Puffer: 0,1 M Na₂CO₃; 0,1 M NaHCO₃; pH 9,3

Phosphatgepufferte Saline (PBS): 137 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2,7 mM KCl; 1,2 mM KH₂PO₄;

pH 7,4

PBS-V7t1 (modifizierter Bindepuffer): 100 mM NaCl; 50 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,2 mM

KH₂PO₄; 0,05 mM EDTA; pH 7,0

Natriumborat-Puffer: 100 mM Borsäure; pH 8,3

Tris: 1 M Tris; pH 7,5

V7t1-Bindepuffer (ohne Tween): 100 mM NaCl; 50 mM KCl; 10 mM Tris; 0,05 mM EDTA; pH 7,0

V7t1-Bindepuffer (mit Tween): 100 mM NaCl; 50 mM KCl; 10 mM Tris; 0,05 mM EDTA; 0,05% Tween; pH 7,0

Annexin V-Bindepuffer: 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4

A.6 Software

BD Accuri C6 Software V1.0.264.21	BD Biosciences, USA
Cedex Software 2.2.1	Roche Diagnostics, SUI
Coulter System II Software for Epics XL 3.0	Beckman Coulter, USA
ND-1000 V3.8.1	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
ND-3300 V2.8.0	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
WinMDI 2.9	J. Trotter, Scripps Institute, USA

A.7 Durchflusszytometer – Technische Spezifikationen (Optik)

BD Accuri C6

Laser: 488 nm; 640 nm; Laser Profil: 10 x 75 µm; Streulicht: Vorwärts (0°, ± 13°), Seitwärts (90°, ± 13°); Filter: FL1 533/30 nm (FITC), FL2 585/40 nm, FL3 >670 nm (PI), FL4 675/25 nm (Cy5)

Epics XL-MCL

Laser: 488 nm, Filter: FL1 525/20 (FITC), FL2 575/15, FL3 675/15 (PI)

A.8 Zellkultur

NIH/3T3 Mausfibroblasten (AVV 59)	Collection of Microorganisms and cell cultures (DSMZ)
-----------------------------------	---

A549 Lungenkrebszellen (Mensch, ACC 107)

Collection of Microorganisms
and cell cultures (DSMZ)

Kultiviert in Dupleccos modifiziertes eagle Medium (DMEM)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Zusätze: 10% fetales Kälberserum (FCS) und 100 µg/ml Penicilin-Streptomycin.

Kultivierung: 37°C und 5% CO₂ bis 70–80% Konfluenz erreicht wurde. Dann erfolgte eine Subkultivierung. Die Passagenzahl überstieg niemals 20 Passagen.

Chinese Hamster Ovary K1 Zellen (CHO)

Kultiviert in CHO MACS

Miltenyi, Bergisch Gladbach

Zusätze: 8 mM Gluthamin.

Kultivierung: 37°C und 5% CO₂ bis zu einer Konzentration von 5–10 Millionen Zellen pro Milliliter. Dann erfolgte eine Subkultivierung.

A.9 Nanopartikel

Titandioxid Nanopartikel (TiO₂-NP), UV100

Sachtleben GmbH, Duisburg

Struktur: Anatas

Primäre Partikelgröße: <10 nm

Aggregatgröße: bis zu 3–5 µm

Die Aggregatgröße wurde mit einem Rasterelektronenmikroskop (JSM-6700F; JEOL, Japan) untersucht. Parameter: Spannung: 2,0 kV; Arbeitsdistanz: 3,1 mm.

B Methoden

Die Methoden B1 bis B6 beziehen sich auf den ersten Teil der Arbeit, während sich B7 bis B14 auf den zweiten Teil beziehen.

B.1 Zellkultivierung der CHO Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in CHOMACS (Miltenyi, Bergischgladbach) mit 8 mM Gluthamin kultiviert. Dabei wurden sie schüttelnd (170 rpm, 10 mm Orbit, Unimax 1010) in 250 ml Schüttelkolben in 50 ml Medium kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde 50 ml frisches Medium mit 4x10⁵ Zellen/ml angeimpft.

B.2 Immobilisierung auf Zelloberfläche

B2.1 Immobilisierung mittels Cyanurchlorid

Sofern mit fluoreszenzmarkiertem Aptamer gearbeitet wurde, wurde Lichteinstrahlung vermieden. Hier ist das finale Protokoll dargestellt, welches ursprünglich auf dem Protokoll von Walter et al. [190] basierte. Im Schnitt wurde bei dem Verfahren ca. 30 % des Aptamers verloren, entsprechend musste die Anfangsmenge an Aptamer erhöht werden. Pro Ansatz wurden 50 µl in der jeweiligen Konzentration angesetzt. Die Aptamere wurden hierfür in SBB (0,1 M, pH 8,3) gelöst. Gleichzeitig wurden 10 mg Cyanurchlorid in 1 ml Acetonitril gelöst. Es wurde nun das benötigte Volumen an Cyanurchlorid-Lösung zu der Aptamerlösung zugegeben bis ein molares Verhältnis von 1:100 oder 1:5 (je nach Versuch) hergestellt wurde. Die Aktivierung erfolgte durch eine einstündige Inkubation bei 4°C.

Um das ungebundene Cyanurchlorid zu entfernen, wurden die Proben fünfmal in einem Zentrifugalkonzentrator (3 kDa cut-off, Vivaspin 500) für je 8 Minuten bei 17.000 rcf und 4°C zentrifugiert. Dabei wurde vor jedem Zentrifugationsschritt die Lösung mit SBB auf 200 µl aufgefüllt.

Für die Kopplung wurden pro Probe eine Millionen CHO-Zellen verwendet. Hierfür wurden die Zellen durch Zentrifugation (300 rcf, 5 Minuten) von ihrem Medium getrennt. Anschließend wurden die

Zellen mit 3 ml PBS (pH 7,4) gewaschen (300 rcf, 5 Minuten) um Mediumreste zu entfernen. Im letzten Schritt wurde das PBS entfernt und das Zellpellet in je 100 μ l der Aptamerlösung suspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur rotiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand aufbewahrt und kühlgestellt. Die Zellen wurden in je 500 μ l Aptamerbindepuffer (für V7t1: TBSE ohne Tween) gewaschen und anschließend in der gleichen Menge suspendiert und mittels Durchflusszytometer vermessen. Auch hier wurden die Überstände verwahrt.

B2.2 Immobilisierung mittels BS³

Dies ist die Darstellung des finalen Protokolls. Die Durchführung erfolgte, falls nicht anders beschrieben, bei 4°C oder auf Eis. Es wurden pro Probe fünf Millionen oder je nach Versuch unterschiedliche Mengen an CHO-Zellen entnommen. Das Medium wurde durch Zentrifugation abgetrennt (300 rcf, 5 Minuten). Die Zellen wurden anschließend mit kaltem PBS (4°C) zweimal gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in 90 μ l PBS aufgenommen und 10 μ l Aptamerlösung zugegeben. Falls in dem Versuch nicht anders beschrieben, hatte die zugegebene Aptamerlösung eine Konzentration von 5 μ M um eine finale Konzentration von 500 nM zu erhalten. Die Lösung inkubierte nun eine Stunde rotierend bei 4°C um eine gleichmäßige Durchmischung zu erhalten.

Zur Kopplung wurde nun die BS³ Lösung zugegeben bis eine finale Konzentration von 1 mM erreicht wurde (falls nicht anders beschrieben). Die Kopplung erfolgte nun bei einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C rotierend. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 M Tris (pH 7,5) mit einer finalen Konzentration von 20 mM Tris gestoppt. Die Mischung inkubierte zur vollständigen Abstopfung der Reaktion noch weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Zum Abtrennen des ungebundenen Aptamers wurde der Überstand nach einer Zentrifugation (300 rcf, 5 min, 4°C) abgetrennt und aufbewahrt. Die Zellen wurden nun einmal mit PBS gewaschen um ungebundene Aptamere abzutrennen. Der Überstand wurde auch hier für spektroskopische Analysen

aufbewahrt. Zuletzt wurden die Zellen dann in 300 µl PBS suspendiert und am Durchflusszytometer vermessen.

B3 Detektion der Immobilisierung

B3.1 Durchflusszytometrische Analyse

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Analysefenster gesetzt, sogenannte Gates, um Schmutz, Zelltrümmer, Zellaggregate und tote Zellen nicht zu berücksichtigen. Hierfür wurde über das Seitwärts- (SSC) und Vorwärtsstreulicht (FSC) selektiert. Das Gate wurde dabei bewusst etwas größer gefasst um mögliche Streulichtänderungen durch die Oberflächenmodifikation zu berücksichtigen. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal (FL1, Ex 488/ Em 533/30) über eine Markeranalyse ausgewertet, um die Zellen mit Aptamer quantifizieren zu können. Die verwendeten Gates werden in Abbildung 51 dargestellt.

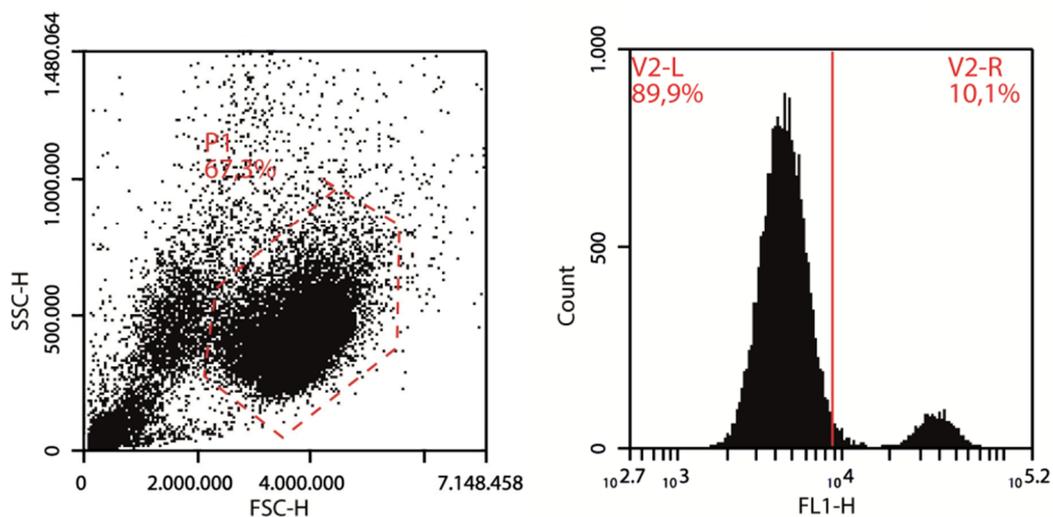


Abbildung 51: Gating für die Immobilisierung mittels BS³. Links: Gating nach Streulicht zur Unterscheidung zwischen Aggregaten, toten Zellen und Zelltrümmern/Fragmenten. Rechts: Gating nach Fluoreszenzsignal. Eine leicht positive Probe.

B3.2 Spektrophotometrische Analyse

Im Spektrophotometer (Nanodrop ND1000) wird die Absorption bei bestimmten Wellenlängen gemessen. Hierdurch wurde die Aptamerkonzentration bei 260 nm bestimmt (Protokoll: „*nucleic*

*acid*ⁿ). Da der Absorptionskoeffizient durch die Herstellerfirma bereits bekannt war, konnte so mittels der Formel 1 die Aptamerkonzentration bestimmt werden:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \quad (1)$$

c: Konzentration, ϵ : Absorptionskoeffizient, d: Schichtdicke (=1), A: Absorption

Mittels des Fluorospektrometers (Nanodrop ND3300) konnte die Fluoreszenz von Lösungen bestimmt werden. Bei den Versuchen wurden für die Messung von FITC und Cy5 folgende Einstellungen verwendet:

- Methode: Fluorescein, FITC, FAM
Exzitation: blaue LED (470 ± 10 nm)
Detektion: CCD Array (515 ± 20 nm)
- Methode: Cy5 Alexa Fluor 647
Exzitation: weiße LED (460 – 650 nm)
Detektion: CCD Array (670 ± 30 nm)

Dabei wurden jeweils 2 µl Proben aufgetragen und eine automatische Gainanpassung verwendet.

B4 Markierung der Ziel- und Kontrollmoleküle

Die Zielmoleküle (VEGF, Immunoglobulin) und das Kontrollmolekül (Myoglobin) wurden entweder mit Cy5 (Cy5 Mono-Reactive Dye Pack, GE Healthcare) oder FITC markiert. Für die Markierung mit Cy5 wurde das Protein in Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,3) auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. 1 ml Proteinlösung wurde dann in ein Reaktionsgefäß mit voraliquotiertem Cy5 gegeben und 30 Minuten schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Das freie Cy5 wurde mittels Zentrifugalkonzentrator abgetrennt (Vivaspin 2, 30.000 kDa cut-off, 7.000 x g; Sartorius). Die Membran wurde dabei mit PBS gewaschen. Der Prozess wurde solange wiederholt bis im Durchfluss keine Fluoreszenz mehr mittels Nanodrop ND 3300 nachgewiesen werden konnte.

Die FITC-Markierung wurde nach dem Protokoll der Herstellerfirma (FITC; Sigma Aldrich) durchgeführt. Dafür wurde das Protein in Carbonat-bicarbonat-Puffer gelöst und dann unter Rühren tropfenweise die FITC-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde 2 h rührend bei Raumtemperatur inkubiert. Das freie FITC wurde über eine Säule (G-25) abgetrennt. Die Proteine konnten dann in 1 % Serum und 0,1 % Natriumazetat gelagert werden.

B5 Färbung mit SYBR Green II

Zur Färbung der Aptamere mit SYBR Green II wurden je 50 µl Probe mit 50 µl 1 x konzentrierter SYBR Green II Lösung unter Lichtausschluss für 20 Minuten inkubiert. Die SYBR Green II Stocklösung (10.000 x konzentriert) wurde zuvor mit SBB (0,1 M, pH 8,3) auf 1fache Konzentration verdünnt. Das ungebundene SYBR Green II wurde mit 3 kDa cut-off Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 500) abgetrennt. Hierfür wurden die Zellen so oft zentrifugiert (17.000 rcf, 8 min, 4°C) und mit SBB auf 200 µl aufgefüllt, bis der am Spectrofluorometer vermessene Überstand nur noch ein Zehntel der Fluoreszenz des ersten Überstandes aufwies. Die Aptamere wurden anschließend im Dunkeln bei 4°C gelagert.

B6 Detektion der Funktionalität

Die Durchführung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, bei 4°C oder auf Eis. Zuerst erfolgte die Immobilisierung, die wie in Abschnitt B2.2 durchgeführt wurde, mit dem Unterschied, dass das Aptamer zuvor 5 Minuten bei 95°C erhitzt wurde (Thermomixer) und anschließend ca. 20 Minuten abkühlte. Nach der Immobilisierung wurden die Zellen in verschiedenen Puffern (je nach Versuch) aufgenommen. Anschließend wurde das Zielmolekül in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und für 5 – 60 Minuten (versuchsabhängig) bei 4°C rotierend inkubiert. Der Überstand wurde anschließend entfernt und die Zellen zweimal mit entsprechendem Puffer gewaschen (300 rcf, 5 min, 4°C). Als letztes wurden die Zellen in 300 µl Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer vermessen, sowie die Überstände spektrophotometrisch analysiert.

B7 Zellkultivierung der A549 und NIH/3T3-Zellen

Siehe Abschnitt „A.8 Zellkultur“.

B8 FITC Markierung der Nanopartikel

Für die Markierung wurden 200 µl der 10%igen UV100-Lösung in 500 µl FITC-Lösung (5 mg/ml in Ethanol) gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln bei 1000 rpm (Eppendorf Thermomixer) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Nanopartikel bei 7000 rcf aus dem Gemisch getrennt und mehrfach mit sterilem deionisiertem Wasser gewaschen, bis der Überstand vollständig farblos war. Die Nanopartikel wurden anschließend in PBS zu einer Konzentration von 1 mg/ml suspendiert und bei 4°C gelagert.

B9 Inkubation und Messung der Nanopartikelaufnahme

Es wurden entweder 200.000 NIH/3T3 oder 300.000 A549 Zellen in jeweils ein Nöpfchen einer 6-well Platte gegeben, zusammen mit 2 ml Medium. Die unterschiedliche Anfangskonzentration der Zellen liegt an der individuellen Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelltypen. Nach der Inkubation sollte eine ähnliche Anzahl an Zellen erreicht werden. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und neues Medium mit den Nanopartikeln zugegeben. Die Konzentration variierte entsprechend der Versuchsparameter. Anschließend wurden die Zellen weitere 24 h oder entsprechend der in den Versuchen angegebenen (0-24 h) mit den Nanopartikeln kultiviert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 500 µl Accutase abgetrennt. Daraufhin wurden die Zellen 5 Minuten bei 300 rcf zentrifugiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Am Ende wurden sie in 500 µl PBS aufgenommen und mittels Durchflusszytometer vermessen.

B10 Durchflusszytometrische Analyse der Nanopartikelaufnahme

Um die Nanopartikelaufnahme zu bestimmen wurden nur Events in einem definierten FSC-Bereich analysiert. So konnten sowohl Agglomerate als auch Zelltrümmer und Nanopartikelaggregate aus der Analyse ausgeschlossen werden. Üblicherweise wird zusätzlich der SSC als zweiter Parameter

verwendet, aufgrund der starken Streueigenschaften der Nanopartikel ist dies hier nicht möglich. Es stellte sich jedoch heraus, dass der FSC-Wert bereits recht genaue Analysen zuließ. Eine Lebend-Tod Unterscheidung wurde mit Propidiumiodid durchgeführt. Es wurden immer mindestens 10.000 Zellen analysiert.

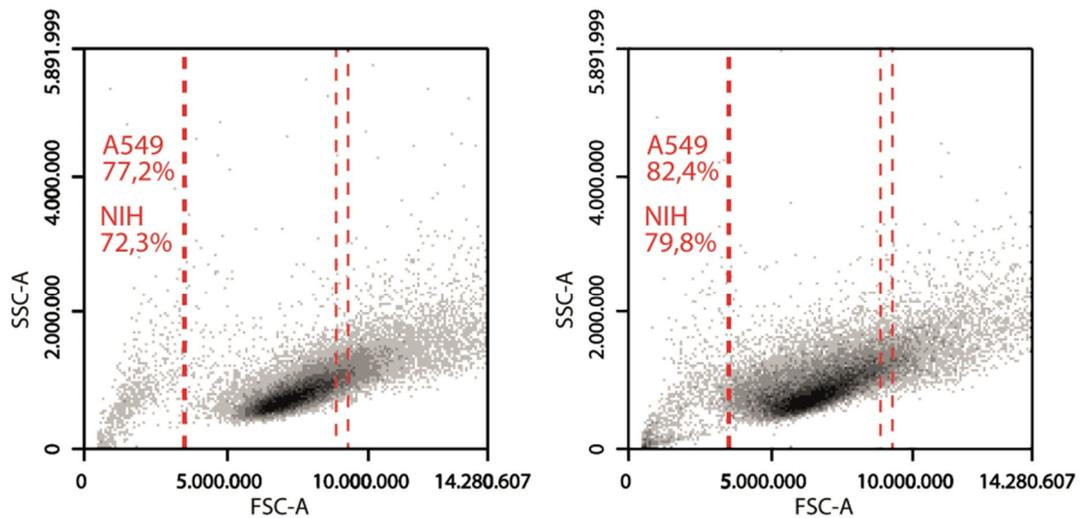


Abbildung 52: Gating für A549 (links) und NIH/3T3 (rechts).

B11 Cell-Titer-Blue Assay

Für das Assay wurden 8.000 (NIH/3T3) bzw. 10.000 (A549) Zellen pro Nöpfchen in einer 96-well Platte (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) mit 100 µl Medium pro Nöpfchen über Nacht kultiviert (37°C, 5 % CO₂). Anschließend wurde das alte Medium entfernt und 100 µl frisches Medium mit unterschiedlichen TiO₂-FITC Konzentrationen (0 – 25 µg/ml) versetzt. Nach 24 h wurde das Medium mit den Partikeln entfernt und 100 µl CellTiter-Blue Reagenz (1:10 in serumfreien DMEM; Promega Corp., USA) zugegeben. Die Zellen wurden 2 h mit dem Reagenz inkubiert und das Fluoreszenzsignal (544_{Ex}/590_{Em}) mittels Fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) gemessen.

B12 Apoptose- und Nekrosemessung

Die Nekrose wurde mittels Propidiumiodid bestimmt, hierfür wurden 2 µl einer 1 mg/ml konzentrierten Propidiumiodid-Lösung 5 Minuten vor der Messung hinzugegeben. Die Apoptose

wurde zusätzlich mit Annexin V-FITC gemessen. Dazu wurden 15 Minuten vor der Messung 5 μl Annexin V-FITC (Thermo Fisher) zu den in 100 μl Annexin V-Bindepuffer pro 1×10^6 gelösten Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und weitere 400 μl Annexin V-Bindepuffer zugegeben. Danach wurden die Zellen vermessen. Die Analyse erfolgte dann über FSC-, sowie die Propidiumiodid- und FITC-Fluoreszenz.

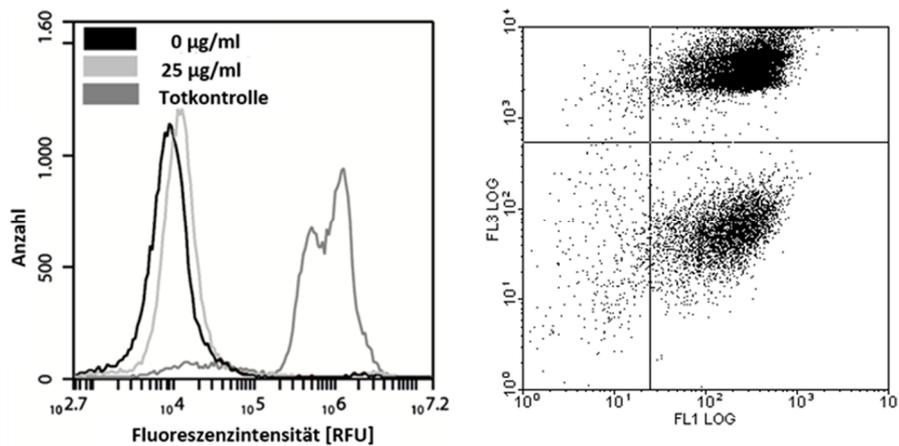


Abbildung 53: Gating bei Nekrose (rechts), sowie Apoptose/Nekrose (links). Rechts: positive Apoptose/Nekrose mit Zinkoxid (15 ppm) beim EPICS XL (Beckman Coulter). Links: positive Nekrose durch UV Bestrahlung beim Accuri C6 (BD Bioscience).

B13 Time-Lapse Mikroskopie

Es wurden jeweils 100.000 Zellen pro Nöpfchen in 8-well PCA slides (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) mit jeweils 400 μl Medium für 24 h kultiviert (37°C, 5 % CO_2). Das Medium wurde dann entfernt und 400 μl frisches Medium mit 12,5 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 -Nanopartikeln zugegeben. Die Aufnahmen wurden mit 20facher Vergrößerung aufgenommen und erfolgten alle 60 s für 24 h mit dem LumaScope 600 (Etaluma Inc., Carlsbad, CA, USA).

B14 Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden jeweils 100.000 Zellen pro Nöpfchen in 8-well PCA slides (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) mit jeweils 400 μl Medium über Nacht kultiviert (37°C, 5 % CO_2), anschließend das alte Medium entfernt und 400 μl Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 -FITC Nanopartikeln für 4 h inkubiert. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 15 Minuten bei 37°C mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI-Lösung inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

Abkürzungsverzeichnis

Ac ₄ ManNAz	peracetyliertes Azidoacetylmannosamin
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
Ag	Silber
AK-BP	Antikörper-Bindepuffer
Au	Gold
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BP	Bandpassfilter
BW	Bandwidth
CaCl ₂	Calciumchlorid
CeO ₂	Cerdioxid
CHO	chinese hamster ovary
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
Cy5	cyanine dye 5
Da	Dalton
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz

FSC	forward scatter
GFP	green fluorescent protein
GHS	global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
QD	Quantumdot
LDC	limiting dilution cloning
MOE	metabolic oligosaccharide engineering
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NP	Nanopartikel
PBS	phosphate-buffered saline
PBSE	phosphate-buffered saline with EDTA
PEG	Polyethylenglykol
PI	Propidiumiodid

PS	Polystyrol
Rcf	relative centrifugal force
RFU	relative fluorescence units
rpm	revolutions per minute
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SiaNAz	Azidoacetylsialinsäure
SiO ₂	Siliziumdioxid
SSC	side scatter
TBSE	tris-buffered saline with EDTA
TiO ₂	Titandioxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Handelsname für Polysorbat 20
VEGF	vascular endothelial growth factor
Y	Yttrium
ZnO	Zinkoxid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: NHS-Ester Kopplungsreaktion mit einer Aminogruppe.	5
Abbildung 2: Einsatz von NHS-Estern zum Aufbau einer Biotin-Streptavidin-Brücke.	5
Abbildung 3: Aktivierung einer Carbonsäure (hier eine Aminosäure) mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid).	5

Abbildung 4: Modifikation mittels Hydrazid- und Alkoxydmodifizierten Molekül. Abbildung von Drömer	6
Abbildung 5: Modifikation von Thiolgruppen mittels Maleimid- Iodacetamid- und Pyridyldisulfid-funktionalisierten Molekülen. Abbildung von Drömer	7
Abbildung 6: Kopplung über einen Lipidanker in die Lipiddoppelschicht (Zellmembran).....	8
Abbildung 7: A: N-Hydroxysuccinimid-Polyethylenglykol-Maleimid ein heterobifunktionaler Crosslinker. Es befinden sich entsprechend an jedem Ende unterschiedliche funktionale Gruppen. B: Kopplung an Zelloberflächen mittels N-Hydroxysuccinimid-Polyethylenglykol-Maleimid, Modifiziert nach Sonny et al. [4].....	9
Abbildung 8: Kopplung mittel <i>metabolic oligosaccharid engineering</i> (MOS). Zuvor wurden modifizierte Zuckermoleküle an mit den Zellen kultiviert, welche durch den Metabolismus in die Zellmembran eingebaut wurden.....	10
Abbildung 9: Ablauf des <i>limited dilution cloning</i> (LDC). In den Platten kann ein Screening z.B. durch ELISA durchgeführt werden. Abbildung modifiziert nach Lai et al. [29].....	12
Abbildung 10: Selektion mithilfe von Mikrogeltropfen aus Agarose. Die Fängerantikörper werden vorher in der Gelmatrix immobilisiert. Die Detektionsantikörper werden dann später hinzugegeben. Abbildung modifiziert nach Browne et al. [23].....	13
Abbildung 11: Antikörperbasiertes <i>affinity matrix Attachment</i> system zur Selektion von hochproduzierende Zellen. Die auf der Oberfläche immobilisierten Antikörper fangen die sekretierten Zielmoleküle ab. Modifiziert nach Manz et al. [36].....	14
Abbildung 12: Fließschema des aptamerbasierten <i>affinity matrix attachment</i> Assays. Hier ist als Beispiel ein sogenannter <i>sandwich-assay</i> zur Detektion schematisiert.....	17
Abbildung 13: Strukturformel von Cyanurchlorid (2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin), auch bekannt als Trichlor-S-triazin.....	18
Abbildung 14: a) Cyanurchchlorid wird bei 4°C an das Aptamer gebunden; b) Bei Raumtemperatur wird das Aptamer an die Zellen gekoppelt. Modifiziert nach Weitzenberg	20

Abbildung 15: Mittlere Fluoreszenzintensität nach der Immobilisierung der fluoreszenzmarkierten Aptamere (V7t1-FITC). Aktiviert bedeutet unter Verwendung des Crosslinkers Cyanurchlorid. Nicht-aktiviert: ohne Crosslinker. SBB Aptamerfreie: Nur im Natriumboratpuffer (SBB) ohne Aptamere als Kontrollmessung der Eigenfluoreszenz. Das Cyanurchlorid wurde im 100fachen Überschuss gegenüber dem Aptamer eingesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 525/40 nm bandpassfilter.	22
Abbildung 16: Fluoreszenzintensität bei 515 nm von V7t1-FITC in Lösung. Geprüft wurde die Wirkung von Cyanurchlorid auf die Fluoreszenz. Die Kontrollen sind Acetonitril (Lösungsmittel von Cyanurchlorid) und SBB (Bindepuffer des Aptamers). Die Proben wurden mittels Spektrofluorometer vermessen. Konzentration des Aptamers: 4,2 μ M. Cyanurchlorid in 100fachem Überschuss zum Aptamer.	24
Abbildung 17: Absorption bei 260 nm von V7t1-FITC in Lösung. Die Kontrollen sind mit Zugabe von Acetonitril (Lösungsmittel von Cyanurchlorid) und reinem SBB (Bindepuffer des Aptamers) ohne Zugabe. Geprüft wurde die Wirkung von Cyanurchlorid auf die Absorption bei 260 nm. Die Proben wurden an einem Spektrofluorometer vermessen. Konzentration des Aptamers: 4,2 μ M. Cyanurchlorid in 100fachem Überschuss zum Aptamer.	25
Abbildung 18: Fluoreszenzsignal von V7t1-FITC unter Einfluss von Cyanurchlorid. Hier wurde untersucht wie groß der Anteil des freien und des gebundenen Cyanurchlorids auf die Fluoreszenzlöschung ist. Nach dem Waschen ist das freie Cyanurchlorid weitestgehend entfernt. Bei der Kontrolle (nicht-aktiviert) wurde kein Cyanurchlorid verwendet. Verwendet wurden 0,32 nmol V7t1-FITC.	26
Abbildung 19: Kalibrationsreihe für das Fluoreszenzsignal von V7t1-FITC mit und ohne Cyanurchlorid. Konzentrationsbereich: 0,1 – 0,9 μ M. Messung mittels Fluorospektrometer bei 488 nm. Cyanurchlorid wurde wie beim Protokoll vorgesehen in einem 100fachen Überschuss zum Aptamer zugegeben und das freie Cyanurchlorid anschließend entfernt. Fehlerbalken: Standardabweichung, N=3.	27

- Abbildung 20:** Berechnung der prozentual gebundenen Aptamer Menge mit *crosslinker* (Cyanurchlorid) und ohne *crosslinker* an die Zellen. Fehlerbalken: Standardabweichung, N=3..... 28
- Abbildung 21:** Strukturformel von Propidiumiodid. Ein gängiger lebend/tot-Farbstoff..... 29
- Abbildung 22:** Fluoreszenzintensität der Propidiumiodid-gefärbten Aptamere. Jeweils mit und ohne Cyanurchlorid, sowie ohne Aptamer und ohne Cyanurchlorid. Pro 10^6 Zellen wurden $2,5 \mu\text{l}$ Propidiumiodid-Lösung (1 mg/ml) zugegeben. Fehlerbalken: Standardabweichung. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 675/30 nm Bandpassfilter..... 30
- Abbildung 23:** Mittlere Fluoreszenzintensität nach der Immobilisierung der SYBR Green II gefärbten Aptamere. Aktiviert bedeutet unter Verwendung des *crosslinkers* Cyanurchlorid. Nicht-aktiviert: ohne *crosslinker*. SBB aptamerfrei: Nur im Natriumboratpuffer (SBB) ohne Aptamere mit Cyanurchlorid als Kontrollmessung der Eigenfluoreszenz. Das Cyanurchlorid wurde im fünffachen Überschuss gegenüber dem Aptamer eingesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 525/40 nm Bandpassfilter. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung 31
- Abbildung 24:** Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS^3). Den bifunktionalen Crosslinker erkennt man an den beiden identischen Abgangsgruppen. Angriffspunkt für die nukleophile Substitution sind die Carbonsäureamide. Die Sulfatgruppen dienen zur Steigerung der Löslichkeit im Wasser..... 33
- Abbildung 25:** Mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen bei Zellkonzentrationen von $5 - 35 \cdot 10^6$ Zellen/mL um Autofluoreszenz bereinigt. Kontrolle: Immobilisierung mit 100 nM V7t1-FITC und $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL durchgeführt ohne BS^3 , mit Aptamer. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm Bandpassfilter. A: Fluoreszenz einer unbehandelten Kontrolle. B: Fluoreszenz einer mit BS^3 immobilisierten Probe (500 nM V7t1-FITC). C: Vergleich der

Signale von einer Probe ohne immobilisiertes Aptamer und einer mit 500 nM immobilisierten Aptamer.....	34
Abbildung 26: Anzahl der auf die Zelloberfläche gekoppelten V7t1-FITC pro Zelle bei Zellkonzentrationen von $5 - 35 \cdot 10^6$ Zellen/mL, einer Aptamerkonzentration von 100 nM und 1 mM BS3. Die Werte wurden durch Differenzbildung der Anfangskonzentration von 100 nM und der fluoreszenzspektrometrisch ermittelten V7t1-FITC-Konzentration im Reaktionsüberstand berechnet.	35
Abbildung 27: Anteil der Zellen mit einer Fluoreszenzintensität oberhalb des gesetzten Markers bei V7t1- FITC Konzentrationen von 10 - 500 nM. Die Immobilisierung wurde mit einer Zellkonzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL durchgeführt. K: unbehandelte Zellen in PBS. KL: Immobilisierung durchgeführt mit 500 nM V7t1-FITC und ohne BS ³ . Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Duplikaten von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm bandpassfilter.....	37
Abbildung 28: Fluoreszenzintensität gemittelt über alle Zellen bei V7t1-FITC Konzentrationen von 10 - 500 nM. Die Immobilisierung wurde mit einer Zellkonzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL durchgeführt. K: unbehandelte Zellen in PBS. KL: Immobilisierung mit 500 nM V7t1-FITC und $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL ohne BS3. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Duplikaten von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt.....	37
Abbildung 29: Anteil der Zellen mit einer Fluoreszenzintensität oberhalb des gesetzten Markers bei Immobilisierung von der Kontrollsequenz KO ohne Aminomodifizierung (hell) bzw. von V7t1-FITC (dunkel) mit Aminomodifizierung. K: unbehandelte Zellen in PBS. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Duplikaten von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm bandpassfilter.....	38
Abbildung 30: Ablauf der Funktionalitätsüberprüfung der immobilisierten Aptamere.....	39
Abbildung 31: Mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen bei VEGF-Konzentrationen von 0-6 nM. Die Immobilisierung wurde mit 500 nM V7t1 (dunkelgrau) bzw. einer Randomsequenz (weiß), 1 mM BS3	

und einer Zellkonzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL durchgeführt. Der gesamte Versuch erfolgte unter Verwendung von PBS-V7t1 Puffer. Als Negativkontrolle (hellgrau) dienten Zellen ohne Aptamere auf der Zelloberfläche. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Duplikaten von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt.....	40
Abbildung 32: Mittlere Fluoreszenzintensität von mit VEGF-FITC oder Myoglobin-FITC inkubierten Aptameren/Randomnukleotiden in einem Konzentrationsbereich von 0 – 700 nM. Die Werte sind als Mittelwerte von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm Bandpassfilter.....	42
Abbildung 33: Mittlere Fluoreszenzintensität von VEGF-FITC (100 μ M) inkubierten Zellen mit jeweiligen immobilisierten Aptameren. Die Immobilisierung wurde mit Cyanurchlorid durchgeführt. Cya: Cyanurchlorid, 0-Kontrolle: Aptamerfrei. Die Werte sind als Mittelwerte von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm bandpassfilter.	43
Abbildung 34: Überblick über die wichtigsten Einflussfaktoren auf die Nanopartikelaufnahme.....	48
Abbildung 35: Ladungsschichten eines negativgeladenen Nanopartikels.	52
Abbildung 36: Übersicht über den Verbleib von Nanopartikeln in der Zelle. Aufgeteilt in die drei Haupteigenschaften für den Verbleib in der Zelle.....	53
Abbildung 37: Übersicht über toxische Wirkorte von verschiedenen Nanopartikeln. Modifiziert nach Fröhlich [48].....	54
Abbildung 38: Auswirkungen auf Proteine: 1: Aggregation, 2: Einschränkung der Funktionalität, z.B. durch sterische Hinderung von aktiven Zentren, 3: Fehlfaltung von Proteinen, 4: korrekte Faltung wird begünstigt (chaperonartiger Effekt). Abbildung modifiziert nach Fröhlich [48]	56
Abbildung 39: Übersicht über DNA-Schädigungsmechanismen und die Auswirkungen auf die Zelle. Modifiziert nach Singh et al. [158].....	61
Abbildung 40: Übersicht über die Auswirkungen und Entstehung von ROS in der Zelle. Modifiziert nach Friehs et al. [184].....	63

Abbildung 41: CellTiter-Blue Test: Die Viabilität von A549 und NIH/3T3 Zellen bleibt bis zur eingesetzten Höchstkonzentration von 30 µg/ml TiO ₂ -NP unbeeinflusst.....	66
Abbildung 42: Übersicht über die verschiedenen Kennzahlen der Nanopartikelgröße.	67
Abbildung 43: Rasterelektronenmikroskopie (REM) Aufnahme eines Aggregats der hier verwendeten Titandioxidpartikel.....	68
Abbildung 44: Density Plot des SSC und FSC-Signals von A549 und NIH-3T3-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den Partikeln inkubiert. (a) und (c) sind ohne Nanopartikel und (b) und (d) mit jeweils 25 µg/ml TiO ₂ -FITC inkubiert worden.....	70
Abbildung 45: SSC-Signal von A549 und NIH/3T3-Zellen. (a): Auftragung nach Konzentration. (b): Auftragung nach Inkubationszeit mit 12,5 µg/ml TiO ₂ -FITC.	71
Abbildung 46: Messung der Stabilität der Fluoreszenzmarkierung. Exemplarisch mit A549 Zellen gezeigt. Links: die Fluoreszenzintensität der Partikel; Rechts: das Streulichtsignal.....	73
Abbildung 47: Fluoreszenzsignal von mit FITC markierten Partikeln behandelten A549 und NIH/3T3-Zellen. (a): Exemplarischer Vergleich des Fluoreszenzsignals von 0 und 25 µg/ml TiO ₂ -FITC. (b): Exemplarischer Vergleich des Fluoreszenzsignals von 0 h und 24 h mit 12.5 µg/ml TiO ₂ -FITC inkubierten Zellen. (c) und (d) zeigen das Fluoreszenzsignal im Verhältnis zur Konzentration (c) bzw. Inkubationszeit (12,5 µg/ml TiO ₂ -FITC) (b). Die Autofluoreszenz der Zellen wurde von den Werten abgezogen.....	74
Abbildung 48: FSC-Signal von mit Nanopartikeln behandelten A540 und NIH/3T3-Zellen. (a): Exemplarischer Vergleich des Fluoreszenzsignals von 0 und 25 µg/ml TiO ₂ -FITC. (b): Exemplarischer Vergleich des Fluoreszenzsignals von 0 h und 24 h mit 12.5 µg/ml TiO ₂ -FITC inkubierten Zellen. (c) und (d) zeigen das Fluoreszenzsignal im Verhältnis zur Konzentration (c) bzw. Inkubationszeit (12,5 µg/ml TiO ₂ -FITC) (b).....	76
Abbildung 49: Mikroskopaufnahmen nach sehr kurzer Inkubation (0 h) und nach 24 h mit 12,5 µg/ml TiO ₂ -FITC Partikeln. Vergrößerung: 20x.....	78

Abbildung 50: Propidiumiodid Fluoreszenzsignal von A549 und NIH/3T3-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Nanopartikelkonzentrationen. Die Werte wurden auf 0 (Kontrolle ohne Nanopartikel aber mit PI) normiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von min. 10.000 analysierten Zellen pro Probe dargestellt. Parameter: Exzitation: 488 nm, Detektor: 533/30 nm bandpassfilter.	79
Abbildung 51: Gating für die Immobilisierung mittels BS_3 . Links: Gating nach Streulicht zur Unterscheidung zwischen Aggregaten, toten Zellen und Zelltrümmern/Fragmenten. Rechts: Gating nach Fluoreszenzsignal. Eine leicht positive Probe.....	93
Abbildung 52: Gating für A549 (links) und NIH/3T3 (rechts).....	97
Abbildung 53: Gating bei Nekrose (rechts), sowie Apoptose/Nekrose (links). Rechts: positive Apoptose/Nekrose mit Zinkoxid (15 ppm) beim EPICS XL (Beckman Coulter). Links: positive Nekrose durch UV Bestrahlung beim Accuri C6 (BD Bioscience).....	98

Literaturverzeichnis

1. Nanowatch: Die Datenbank für Nanoprodukte – BUND e.V.
<https://www.bund.net/chemie/nanotechnologie/nanoprodukte-im-alltag/nanoproduktdatenbank/>
(accessed Mar 5, 2018).
2. Zhao, W.; Schafer, S.; Choi, J.; Yamanaka, Y. J.; Lombardi, M. L.; Bose, S.; Carlson, A. L.; Phillips, J. A.; Teo, W.; Droujinine, I. A.; Cui, C. H.; Jain, R. K.; Lammerding, J.; Love, J. C.; Lin, C. P.; Sarkar, D.; Karnik, R.; Karp, J. M. Cell-surface sensors for real-time probing of cellular environments. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 524–531.
3. Tokunaga, T.; Kuwahata, K.; Sando, S. Systematic Exploration of Lipophilic Tags That Allow Efficient Anchoring of Aptamers to Live Cell Surfaces. *Chem. Lett.* **2013**, *42*, 127–129.
4. Hsiao, S. C.; Shum, B. J.; Onoe, H.; Douglas, E. S.; Gartner, Z. J.; Mathies, R. A.; Bertozzi, C. R.; Francis, M. B. Direct Cell Surface Modification with DNA for the Capture of Primary Cells and the Investigation of Myotube Formation on Defined Patterns. *Langmuir* **2009**, *25*, 6985–6991.
5. Chandra, R. A.; Douglas, E. S.; Mathies, R. A.; Bertozzi, C. R.; Francis, M. B. Programmable Cell Adhesion Encoded by DNA Hybridization. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 896–901.
6. McMahon, H. T.; Gallop, J. L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **2005**, *438*, 590–596.
7. Pedone, E.; Li, X.; Koseva, N.; Alpar, O.; Brocchini, S. An information rich biomedical polymer library. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2825–2837.
8. Hermanson, G. T. *Bioconjugate techniques*; Academic Press, 2008.
9. Jaetao, J. E.; Butler, K. S.; Adolphi, N. L.; Lovato, D. M.; Bryant, H. C.; Rabinowitz, I.; Winter, S. S.; Tessier, T. E.; Hathaway, H. J.; Bergemann, C.; Flynn, E. R.; Larson, R. S. Enhanced Leukemia Cell Detection Using a Novel Magnetic Needle and Nanoparticles. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8310–8316.

-
10. Zhang, H.; Li, X.; Martin, D. B.; Aebersold, R. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 660–666.
 11. Karp, J.; Zhao, W. *Micro- and nanoengineering of the cell surface*.
 12. Torres, A. G.; Gait, M. J. Exploiting cell surface thiols to enhance cellular uptake. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 185–190.
 13. Borisenko, G. G.; Zaitseva, M. A.; Chuvilin, A. N.; Pozmogova, G. E. DNA modification of live cell surface. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e28.
 14. Dutta, D.; Pulsipher, A.; Luo, W.; Mak, H.; Yousaf, M. N. Engineering Cell Surfaces via Liposome Fusion. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 2423–2433.
 15. Rabuka, D.; Forstner, M. B.; Groves, J. T.; Bertozzi, C. R. Noncovalent Cell Surface Engineering: Incorporation of Bioactive Synthetic Glycopolymers into Cellular Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5947–5953.
 16. Alberch, L.; Yarema, K. J. Bioconjugation Reactions in Living Cells. In *Micro- and Nanoengineering of the Cell Surface*; Elsevier, 2014; pp. 43–62.
 17. Lusch, A.; Hinderlich, P. S. Entwicklung funktionalisierter Glykoproteine durch metabolisches Engineering der Sialinsäure. *Nachhalt. Forsch. Wachstumsbereichen – Band IV* **2013**, 41–44.
 18. Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* **2000**, *287*, 2007–10.
 19. Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1393–1398.
 20. Song, M.; Raphaelli, K.; Jones, M. L.; Aliabadi-Zadeh, K.; Leung, K. M.; Crowley, D.; Hughes, B.; Mahler, S.; Gray, P. P.; Huang, E. P.; Chin, D. Y. Clonal selection of high producing, stably transfected

- HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS screening. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2011, 86, 935–941.
21. De Jesus, M.; Wurm, F. M. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011, 78, 184–188.
22. Hacker, D. L.; De Jesus, M.; Wurm, F. M. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells – Where do we go from here? *Biotechnol. Adv.* 2009, 27, 1023–1027.
23. Browne, S. M.; Al-Rubeai, M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol.* 2007, 25, 425–432.
24. Sautter, K. Gentechnische Verfahren zur Erzeugung und Selektion von hochproduzierenden CHO-Zellen, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2003.
25. Klausning, S. *Optimierung von CHO Produktionszelllinien: RNAi-vermittelter Gen-knockdown und Untersuchungen zur Klonstabilität*; Logos Berlin, 2013; Vol. 10.
26. Borth, N.; Zeyda, M.; Kunert, R.; Katinger, H. Efficient selection of high-producing subclones during gene amplification of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnol. Bioeng.* 71, 266–73.
27. Kim, J. Y.; Kim, Y.-G.; Lee, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 93, 917–930.
28. Almo, S. C.; Love, J. D. Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2014, 26, 39–43.
29. Lai, T.; Yang, Y.; Ng, S. K. Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013, 6, 579–603.
30. Hong, K. L.; Sooter, L. J. Single-Stranded DNA Aptamers against Pathogens and Toxins: Identification and Biosensing Applications. *Biomed Res. Int.* 2015, 2015, 419318.

-
31. Kim, Y.-G.; Park, B.; Ahn, J. O.; Jung, J.-K.; Lee, H. W.; Lee, E. G. New cell line development for antibody-producing Chinese hamster ovary cells using split green fluorescent protein. *BMC Biotechnol.* 2012 121 2012, 12, 24.
32. DeMaria, C. T.; Cairns, V.; Schwarz, C.; Zhang, J.; Guerin, M.; Zuena, E.; Estes, S.; Karey, K. P. Accelerated clone selection for recombinant CHO CELLS using a FACS-based high-throughput screen. *Biotechnol. Prog.* 23, 465–72.
33. Moretti, P.; Behr, L.; Walter, J. G.; Kasper, C.; Stahl, F.; Scheper, T. Characterization and improvement of cell line performance via flow cytometry and cell sorting. *Eng. Life Sci.* 2010, 10, 130–138.
34. ATOCHINA, O.; Mylvaganam, R.; Akselband, Y.; McGrath, P. Comparison of results using the gel microdrop cytokine secretion assay with ELISPOT and intracellular cytokine staining assay. *Cytokine* 2004, 27, 120–128.
35. Gray, F.; Kenney, J. S.; Dunne, J. F. Secretion capture and report web: use of affinity derivatized agarose microdroplets for the selection of hybridoma cells. *J. Immunol. Methods* 1995, 182, 155–63.
36. Manz, R.; Assenmacher, M.; Pflüger, E.; Miltenyi, S.; Radbruch, A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995, 92, 1921–5.
37. Tuerk, C.; Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990, 249, 505–510.
38. Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990, 346, 818–822.
39. Applications of Cyanuric Chloride <http://cyanuric-chloride.evonik.com/product/cyanuric-chloride/en/applications/> (accessed Jul 10, 2018).

-
40. Meyer, M. Applications of Aptamers in Flow Cytometry Assays, Leibniz Universität Hannover, 2014.
41. Huthmacher, K.; Most, D.; Huthmacher, K.; Most, D. Cyanuric Acid and Cyanuric Chloride. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2000.
42. Ware, W. R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process. *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 455–458.
43. Nonaka, Y.; Sode, K.; Ikebukuro, K. Screening and Improvement of an Anti-VEGF DNA Aptamer. *Molecules* **2010**, *15*, 215–225.
44. Ferrara, N.; Houck, K.; Jakeman, L.; Leung, D. W. Molecular and Biological Properties of the Vascular Endothelial Growth Factor Family of Proteins. *Endocr. Rev.* **1992**, *13*, 18–32.
45. Teixeira, K. N.; Oliveira, J. S.; Souza, K. N.; de Moura, J.; Brito, C. A.; Vidigal, T. H. D. A.; Santos, A. M. C.; Santoro, M. M. Comparison of the biochemical and molecular properties of myoglobins from three *Biomphalaria* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **2011**, *39*, 581–586.
46. Ruidavets, J.-B.; Cournot, M.; Cassadou, S.; Giroux, M.; Meybeck, M.; Ferrières, J.; Holguin, F.; Hong, Y.; Luepker, R. V.; Mittleman, M. A.; Peters, A.; Siscovick, D.; Smith, S. C.; Whitsel, L.; Kaufman, J. D. Ozone air pollution is associated with acute myocardial infarction. *Circulation* **2005**, *111*, 563–9.
47. Fröhlich, E. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *Curr. Drug Metab.* **2013**, *14*, 976–88.
48. Halamoda-Kenzaoui, B.; Ceridono, M.; Colpo, P.; Valsesia, A.; Urbán, P.; Ojea-Jiménez, I.; Gioria, S.; Gilliland, D.; Rossi, F.; Kinsner-Ovaskainen, A. Dispersion Behaviour of Silica Nanoparticles in Biological Media and Its Influence on Cellular Uptake. *PLoS One* **2015**, *10*, e0141593.
49. Beer, C.; Foldbjerg, R.; Hayashi, Y.; Sutherland, D. S.; Autrup, H. Toxicity of silver nanoparticles—

- Nanoparticle or silver ion? *Toxicol. Lett.* **2012**, *208*, 286–292.
50. Beddoes, C. M.; Case, C. P.; Briscoe, W. H. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *218*, 48–68.
51. Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **2003**, *422*, 37–44.
52. Zaki, N. M.; Tirelli, N. Gateways for the intracellular access of nanocarriers: a review of receptor-mediated endocytosis mechanisms and of strategies in receptor targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 895–913.
53. Feng, X.; Zhang, S.; Wu, H.; Lou, X. A novel folic acid-conjugated TiO₂-SiO₂ photosensitizer for cancer targeting in photodynamic therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, *125*, 197–205.
54. Yameen, B.; Choi, W. II; Vilos, C.; Swami, A.; Shi, J.; Farokhzad, O. C. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 485–499.
55. Qiu, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Xu, L.; Bai, R.; Ji, Y.; Wu, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Chen, C. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7606–7619.
56. Xia, T.; Kovichich, M.; Liong, M.; Meng, H.; Kabehie, S.; George, S.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3273–3286.
57. Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 897–900.
58. Clift, M. J. D.; Rothen-Rutishauser, B.; Brown, D. M.; Duffin, R.; Donaldson, K.; Proudfoot, L.; Guy, K.; Stone, V. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *232*, 418–427.
59. Zhang, L. W.; Monteiro-Riviere, N. A. Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake. *Toxicol. Sci.* **2009**, *110*, 138–155.

60. Ulusoy, M.; Jonczyk, R.; Walter, J.-G.; Springer, S.; Lavrentieva, A.; Stahl, F.; Green, M.; Scheper, T. Aqueous Synthesis of PEGylated Quantum Dots with Increased Colloidal Stability and Reduced Cytotoxicity. *Bioconjug. Chem.* 2016, 27, 414–426.
61. Suzuki, H.; Toyooka, T.; Ibuki, Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41, 3018–3024.
62. Akin, M.; Bongartz, R.; Walter, J. G.; Demirkol, D. O.; Stahl, F.; Timur, S.; Scheper, T. PAMAM-functionalized water soluble quantum dots for cancer cell targeting. *J. Mater. Chem.* 2012, 22, 11529.
63. And, B. D. C.; Chan, W. C. W. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. 2007.
64. Gratton, S. E. A.; Ropp, P. A.; Pohlhaus, P. D.; Luft, J. C.; Madden, V. J.; Napier, M. E.; DeSimone, J. M. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 105, 11613–8.
65. Zou, X.-Y.; Xu, B.; Yu, C.-P.; Zhang, H.-W. Imbalance between oxidative and antioxidative systems: Toward an understanding of visible light-induced titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Chemosphere* 2013, 93, 2451–2457.
66. Dalai, S.; Pakrashi, S.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A. Acute Toxicity of TiO₂ Nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under Visible Light and Dark Conditions in a Freshwater System. *PLoS One* 2013, 8, e62970.
67. Brayner, R.; Ferrari-Iliou, R.; Brivois, N.; Djediat, S.; Benedetti, M. F.; Fiévet, F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.* 2006, 6, 866–70.
68. Corbari, L.; Cambon-Bonavita, M.-A.; Long, G. J.; Grandjean, F.; Zbinden, M.; Gaill, F.; Compère,

- P. Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Biogeosciences* **2008**, *5*, 1295–1310.
69. Lindfors, K.; Kalkbrenner, T.; Stoller, P.; Sandoghdar, V. Detection and spectroscopy of gold nanoparticles using supercontinuum white light confocal microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 037401.
70. van Dijk, M. A.; Lippitz, M.; Orrit, M. Far-field optical microscopy of single metal nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 594–601.
71. van Dijk, M. A.; Tchebotareva, A. L.; Orrit, M.; Lippitz, M.; Berciaud, S.; Lasne, D.; Cognet, L.; Lounis, B. Absorption and scattering microscopy of single metal nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3486–95.
72. Schmelzeisen, M.; Austermann, J.; Kreiter, M. Plasmon mediated confocal dark-field microscopy. *Opt. Express* **2008**, *16*, 17826.
73. Simon, M.; Barberet, P.; Delville, M.-H.; Moretto, P.; Sez nec, H. Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an *in vitro* explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Nanotoxicology* **2011**, *5*, 125–139.
74. Faria, M.; Navas, J. M.; Soares, A. M. V. M.; Barata, C.; Barata, C. Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos. *Sci. Total Environ.* **2014**, *470–471*, 379–389.
75. Aslan, K.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 538–44.
76. Chen, Y.; Munechika, K.; Ginger, D. S. Dependence of fluorescence intensity on the spectral overlap between fluorophores and plasmon resonant single silver nanoparticles. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 690–6.

77. Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 7238–48.
78. Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2007, 2, 681–93.
79. Aaron, J.; Nitin, N.; Travis, K.; Kumar, S.; Collier, T.; Park, S. Y.; José-Yacamán, M.; Coghlan, L.; Follen, M.; Richards-Kortum, R.; Sokolov, K. Plasmon resonance coupling of metal nanoparticles for molecular imaging of carcinogenesis in vivo. *J. Biomed. Opt.* 2007, 12, 034007.
80. Stringer, B.; Imrich, A.; Kobzik, L. Flow cytometric assay of lung macrophage uptake of environmental particulates. *Cytometry* 1995, 20, 23–32.
81. Zucker, R. M.; Massaro, E. J.; Sanders, K. M.; Degn, L. L.; Boyes, W. K. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry. A* 2010, 77, 677–685.
82. Zucker, R. M.; Daniel, K. M.; Massaro, E. J.; Karafas, S. J.; Degn, L. L.; Boyes, W. K. Detection of silver nanoparticles in cells by flow cytometry using light scatter and far-red fluorescence. *Cytom. Part A* 2013, 83, 962–972.
83. Vranic, S.; Boggetto, N.; Contremoulins, V.; Mornet, S.; Reinhardt, N.; Marano, F.; Baeza-Squiban, A.; Boland, S. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part. Fibre Toxicol.* 2013, 10, 2.
84. Barteneva, N. S.; Fasler-Kan, E.; Vorobjev, I. A. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *J. Histochem. Cytochem.* 2012, 60, 723–33.
85. Gottstein, C.; Wu, G.; Wong, B. J.; Zasadzinski, J. A. Precise quantification of nanoparticle internalization. *ACS Nano* 2013, 7, 4933–45.

-
86. Huang, M.; Khor, E.; Lim, L.-Y. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharm. Res.* 2004, 21, 344–353.
87. Ma, Z.; Lim, L.-Y. Uptake of Chitosan and Associated Insulin in Caco-2 Cell Monolayers: A Comparison Between Chitosan Molecules and Chitosan Nanoparticles. *Pharm. Res.* 2003, 20, 1812–1819.
88. Neumeyer, A.; Bukowski, M.; Veith, M.; Lehr, C. M.; Daum, N. Propidium iodide labeling of nanoparticles as a novel tool for the quantification of cellular binding and uptake. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2011, 7, 410–419.
89. Behrens, I.; Pena, A. I. V.; Alonso, M. J.; Kissel, T. Comparative Uptake Studies of Bioadhesive and Non-Bioadhesive Nanoparticles in Human Intestinal Cell Lines and Rats: The Effect of Mucus on Particle Adsorption and Transport. *Pharm. Res.* 19, 1185–1193.
90. Rahman, M.; Laurent, S.; Tawil, N.; Yahia, L.; Mahmoudi, M. Nanoparticle and Protein Corona. In; 2013; pp. 21–44.
91. Fubini, B. Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ. Health Perspect.* 1997, 105 Suppl 5, 1013–20.
92. Seleci, D. A.; Seleci, M.; Jochums, A.; Walter, J.-G.; Stahl, F.; Scheper, T. Aptamer mediated niosomal drug delivery. *RSC Adv.* 2016, 6, 87910–87918.
93. Xiao, Y.; Forry, S. P.; Gao, X.; Holbrook, R. D.; Telford, W. G.; Tona, A. Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *J. Nanobiotechnology* 2010, 8, 13.
94. Zhu, M.; Nie, G.; Meng, H.; Xia, T.; Nel, A.; Zhao, Y. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Acc. Chem. Res.* 2013, 46, 622–631.
95. Borm, P.; Klaessig, F. C.; Landry, T. D.; Moudgil, B.; Pauluhn, J.; Thomas, K.; Trottier, R.; Wood, S. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part V: Role of Dissolution in Biological Fate and Effects of Nanoscale Particles. *Toxicol. Sci.* 2006, 90, 23–32.

96. Auffan, M.; Rose, J.; Wiesner, M. R.; Bottero, J.-Y. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 1127–1133.
97. Franklin, N. M.; Rogers, N. J.; Apte, S. C.; Batley, G. E.; Gadd, G. E.; Casey, P. S. Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 8484–8490.
98. Austin M. Derfus; Chan, W. C. W.; Bhatia, S. N. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett.* **2003**.
99. Mehriban Ulusoy; Johanna-Gabriela Walter; Antonina Lavrentieva; Imme Kretschmer; Lydia Sandiford; Marois, A. L.; Rebecca Bongartz; Pooyan Aliuos; Klaus Suhling; Frank Stahl; Mark Green; Thomas Scheper One-pot aqueous synthesis of highly strained CdTe/CdS/ZnS nanocrystals and their interactions with cells. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 7485–7494.
100. Hoshino, A.; Fujioka, K.; Oku, T.; Suga, M.; Sasaki, Y. F.; Ohta, T.; Yasuhara, M.; Suzuki, K.; Kenji Yamamoto Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification. *Nano Lett.* **2004**.
101. Lynch, I.; Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **2008**, *3*, 40–47.
102. Ehrenberg, M.; McGrath, J. L. Binding between particles and proteins in extracts: implications for microrheology and toxicity. *Acta Biomater.* **2005**, *1*, 305–315.
103. Holt, B. D.; Short, P. A.; Rape, A. D.; Wang, Y.; Islam, M. F.; Dahl, K. N. Carbon Nanotubes Reorganize Actin Structures in Cells and *ex Vivo*. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4872–4878.
104. Linse, S.; Cabaleiro-Lago, C.; Xue, W.-F.; Lynch, I.; Lindman, S.; Thulin, E.; Radford, S. E.; Dawson, K. A. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 8691–6.

105. Makarova, E. G.; Gordon, R. Y.; Podolski, I. Y. Fullerene C60 prevents neurotoxicity induced by intrahippocampal microinjection of amyloid-beta peptide. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *12*, 119–26.
106. Cabaleiro-Lago, C.; Quinlan-Pluck, F.; Lynch, I.; Lindman, S.; Minogue, A. M.; Thulin, E.; Walsh, D. M.; Dawson, K. A.; Linse, S. Inhibition of Amyloid β Protein Fibrillation by Polymeric Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15437–15443.
107. Yoo, S. Il; Yang, M.; Brender, J. R.; Subramanian, V.; Sun, K.; Joo, N. E.; Jeong, S.-H.; Ramamoorthy, A.; Kotov, N. A. Inhibition of Amyloid Peptide Fibrillation by Inorganic Nanoparticles: Functional Similarities with Proteins. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 5110–5115.
108. Raghava, S.; Singh, P. K.; Ranga Rao, A.; Dutta, V.; Gupta, M. N. Nanoparticles of unmodified titanium dioxide facilitate protein refolding. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2830.
109. Gheshlaghi, Z. N.; Riazi, G. H.; Ahmadian, S.; Ghafari, M.; Mahinpour, R. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2008**, *40*, 777–82.
110. Liu, S.; Zeng, T. H.; Hofmann, M.; Burcombe, E.; Wei, J.; Jiang, R.; Kong, J.; Chen, Y. Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6971–6980.
111. Vecitis, C. D.; Zodrow, K. R.; Kang, S.; Elimelech, M. Electronic-Structure-Dependent Bacterial Cytotoxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes. *ACS Nano* **2010**, *4*, 5471–5479.
112. Yang, H.; Liu, C.; Yang, D.; Zhang, H.; Xi, Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.* **2009**, *29*, 69–78.
113. Dibrov, P.; Dzioba, J.; Gosink, K. K.; Häse, C. C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2668–70.

114. Schreurs, W. J.; Rosenberg, H. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1982**, *152*, 7–13.
115. Rauch, J.; Kolch, W.; Mahmoudi, M. Cell Type-Specific Activation of AKT and ERK Signaling Pathways by Small Negatively-Charged Magnetic Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 868.
116. Xu, L.; Li, X.; Takemura, T.; Hanagata, N.; Wu, G.; Chou, L. Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. *J. Nanobiotechnology* **2012**, *10*, 16.
117. Peuschel, H.; Sydlik, U.; Haendeler, J.; Büchner, N.; Stöckmann, D.; Kroker, M.; Wirth, R.; Brock, W.; Unfried, K. c-Src-mediated activation of Erk1/2 is a reaction of epithelial cells to carbon nanoparticle treatment and may be a target for a molecular preventive strategy. *Biol. Chem.* **2010**, *391*, 1327–32.
118. Guidetti, G. F.; Consonni, A.; Cipolla, L.; Mustarelli, P.; Balduini, C.; Torti, M. Nanoparticles induce platelet activation in vitro through stimulation of canonical signalling pathways. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2012**, *8*, 1329–1336.
119. Stone, V.; Tuinman, M.; Vamvakopoulos, J. E.; Shaw, J.; Brown, D.; Petterson, S.; Faux, S. P.; Borm, P.; MacNee, W.; Michaelangeli, F.; Donaldson, K. Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur. Respir. J.* **2000**, *15*, 297–303.
120. Decker, T.; Lohmann-Matthes, M. L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Methods* **1988**, *115*, 61–9.
121. Mu, Q.; Hondow, N. S.; Krzemiński, Ł.; Brown, A. P.; Jeuken, L. J.; Routledge, M. N. Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9*, 29.
122. Lin, J.; Zhang, H.; Chen, Z.; Zheng, Y. Penetration of Lipid Membranes by Gold Nanoparticles: Insights into Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Their Relationship. *ACS Nano* **2010**, *4*, 5421–5429.
123. Xia, T.; Kovochich, M.; Liong, M.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity

- Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways. *ACS Nano* 2008, 2, 85–96.
124. Durán, N.; Durán, M.; de Jesus, M. B.; Seabra, A. B.; Fávaro, W. J.; Nakazato, G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2016, 12, 789–799.
125. Tu, Y.; Lv, M.; Xiu, P.; Huynh, T.; Zhang, M.; Castelli, M.; Liu, Z.; Huang, Q.; Fan, C.; Fang, H.; Zhou, R. Destructive extraction of phospholipids from Escherichia coli membranes by graphene nanosheets. *Nat. Nanotechnol.* 2013, 8, 594–601.
126. Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K. T.; Schlager, J. J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. Vitro.* 2005, 19, 975–983.
127. Rozhkova, E. A.; Ulasov, I.; Lai, B.; Dimitrijevic, N. M.; Lesniak, M. S.; Rajh, T. A High-Performance Nanobio Photocatalyst for Targeted Brain Cancer Therapy. *Nano Lett.* 2009, 9, 3337–3342.
128. Zamzami, N.; Marchetti, P.; Castedo, M.; Zanin, C.; Vayssière, J. L.; Petit, P. X.; Kroemer, G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* 1995, 181, 1661–72.
129. Petit, P. X.; Susin, S.-A.; Zamzami, N.; Mignotte, B.; Kroemer, G. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett.* 1996, 396, 7–13.
130. Zamzami, N.; Susin, S. A.; Marchetti, P.; Hirsch, T.; Gómez-Monterrey, I.; Castedo, M.; Kroemer, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 1996, 183, 1533–44.
131. Lemasters, J. J.; Nieminen, A.-L.; Qian, T.; Trost, L. C.; Elmore, S. P.; Nishimura, Y.; Crowe, R. A.; Cascio, W. E.; Bradham, C. A.; Brenner, D. A.; Herman, B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1998, 1366, 177–196.
132. Yang, J. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science (80-)*. 1997, 275, 1129–1132.

133. Petit, P. X.; Lecoeur, H.; Zorn, E.; Dauguet, C.; Mignotte, B.; Gougeon, M. L. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J. Cell Biol.* 1995, 130, 157–67.
134. Reers, M.; Smiley, S. T.; Mottola-Hartshorn, C.; Chen, A.; Lin, M.; Chen, L. B. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* 1995, 260, 406–17.
135. Cossarizza, A.; Baccarani-Contri, M.; Kalashnikova, G.; Franceschi, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 197, 40–5.
136. Smiley, S. T.; Reers, M.; Mottola-Hartshorn, C.; Lin, M.; Chen, A.; Smith, T. W.; Steele, G. D.; Chen, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991, 88, 3671–5.
137. Reers, M.; Smith, T. W.; Chen, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 1991, 30, 4480–4486.
138. Kluck, R. M.; Bossy-Wetzell, E.; Green, D. R.; Newmeyer, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997, 275, 1132–6.
139. Temkin, V.; Huang, Q.; Liu, H.; Osada, H.; Pope, R. M. Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis. *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26, 2215–25.
140. Shapiro, H. M. Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods* 2000, 21, 271–9.
141. Natarajan, V.; Wilson, C. L.; Hayward, S. L.; Kidambi, S. Titanium Dioxide Nanoparticles Trigger Loss of Function and Perturbation of Mitochondrial Dynamics in Primary Hepatocytes. *PLoS One* 2015, 10, e0134541.
142. Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005, 113, 823–39.

-
143. Li, N.; Sioutas, C.; Cho, A.; Schmitz, D.; Misra, C.; Sempf, J.; Wang, M.; Oberley, T.; Froines, J.; Nel, A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* 2003, *111*, 455–60.
144. Trotter, P. J.; Orchard, M. A.; Walker, J. H. Ca²⁺ concentration during binding determines the manner in which annexin V binds to membranes. *Biochem. J.* 1995, *308* (Pt 2), 591–8.
145. Koopman, G.; Reutelingsperger, C. P.; Kuijten, G. A.; Keehnen, R. M.; Pals, S. T.; van Oers, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994, *84*, 1415–20.
146. van Engeland, M.; Nieland, L. J.; Ramaekers, F. C.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C. P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998, *31*, 1–9.
147. Shukla, S.; Priscilla, A.; Banerjee, M.; Bhonde, R. R.; Ghatak, J.; Satyam, P. V.; Sastry, M. Porous Gold Nanospheres by Controlled Transmetalation Reaction: A Novel Material for Application in Cell Imaging. *Chem. Mater.* 2005.
148. Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J. Biol. Chem.* 1997, *272*, 25719–23.
149. Patel, T.; Gores, G. J.; Kaufmann, S. H. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.* 1996, *10*, 587–97.
150. Nicholson, D. W.; Ali, A.; Thornberry, N. A.; Vaillancourt, J. P.; Ding, C. K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P. R.; Labelle, M.; Lazebnik, Y. A.; Munday, N. A.; Raju, S. M.; Smulson, M. E.; Yamin, T.-T.; Yu, V. L.; Miller, D. K. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995, *376*, 37–43.
151. Thornberry, N. A. The caspase family of cysteine proteases. *Br. Med. Bull.* 1997, *53*, 478–90.
152. McDonnell, M. A.; Wang, D.; Khan, S. M.; Vander Heiden, M. G.; Kelekar, A. Caspase-9 is

activated in a cytochrome c-independent manner early during TNF α -induced apoptosis in murine cells. *Cell Death Differ.* 2003, 10, 1005–1015.

153. Würstle, M. L.; Laussmann, M. A.; Rehm, M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp. Cell Res.* 2012, 318, 1213–1220.

154. Baharara, J.; Namvar, F.; Ramezani, T.; Mousavi, M.; Mohamad, R. Silver Nanoparticles Biosynthesized Using *Achillea biebersteinii* Flower Extract: Apoptosis Induction in MCF-7 Cells via Caspase Activation and Regulation of Bax and Bcl-2 Gene Expression. *Molecules* 2015, 20, 2693–2706.

155. Selim, M. E.; Hendi, A. A. Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012, 13, 1617–20.

156. Siddiqui, M. A.; Alhadlaq, H. A.; Ahmad, J.; Al-Khedhairi, A. A.; Musarrat, J.; Ahamed, M. Copper Oxide Nanoparticles Induced Mitochondria Mediated Apoptosis in Human Hepatocarcinoma Cells. *PLoS One* 2013, 8, e69534.

157. Singh, N.; Manshian, B.; Jenkins, G. J. S.; Griffiths, S. M.; Williams, P. M.; Maffei, T. G. G.; Wright, C. J.; Doak, S. H. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 2009, 30, 3891–3914.

158. Waisberg, M.; Joseph, P.; Hale, B.; Beyersmann, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003, 192, 95–117.

159. Li, N.; Ma, L.; Wang, J.; Zheng, L.; Liu, J.; Duan, Y.; Liu, H.; Zhao, X.; Wang, S.; Wang, H.; Hong, F.; Xie, Y. Interaction Between Nano-Anatase TiO₂ and Liver DNA from Mice In Vivo. *Nanoscale Res. Lett.* 2009, 5, 108–115.

160. Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J. M.; Paknikar, K. M. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol. Lett.* 2008, 179, 93–100.

161. Hsin, Y.-H.; Chen, C.-F.; Huang, S.; Shih, T.-S.; Lai, P.-S.; Chueh, P. J. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* **2008**, *179*, 130–139.
162. AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 279–290.
163. Choi, A. O.; Brown, S. E.; Szyf, M.; Maysinger, D. Quantum dot-induced epigenetic and genotoxic changes in human breast cancer cells. *J. Mol. Med.* **2008**, *86*, 291–302.
164. Bhabra, G.; Sood, A.; Fisher, B.; Cartwright, L.; Saunders, M.; Evans, W. H.; Surprenant, A.; Lopez-Castejon, G.; Mann, S.; Davis, S. A.; Hails, L. A.; Ingham, E.; Verkade, P.; Lane, J.; Heesom, K.; Newson, R.; Case, C. P. Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 876–883.
165. Toyokuni, S. Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation. *Biotherapy* **1998**, *11*, 147–54.
166. Jaiswal, M.; LaRusso, N. F.; Burgart, L. J.; Gores, G. J. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 184–90.
167. Valinluck, V.; Sowers, L. C. Inflammation-Mediated Cytosine Damage: A Mechanistic Link between Inflammation and the Epigenetic Alterations in Human Cancers. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 5583–5586.
168. Li, X. Y.; Gilmour, P. S.; Donaldson, K.; MacNee, W. Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax* **1996**, *51*, 1216–22.
169. Park, E.-J.; Yi, J.; Chung, K.-H.; Ryu, D.-Y.; Choi, J.; Park, K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol. Lett.* **2008**, *180*, 222–229.

-
170. Peters, K.; Unger, R. E.; Kirkpatrick, C. J.; Gatti, A. M.; Monari, E. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2004, 15, 321–5.
171. Gojova, A.; Guo, B.; Kota, R. S.; Rutledge, J. C.; Kennedy, I. M.; Barakat, A. I. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ. Health Perspect.* 2007, 115, 403–9.
172. Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988, 175, 184–91.
173. Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998, 391, 43–50.
174. Sakahira, H.; Enari, M.; Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998, 391, 96–99.
175. Walker, P. R.; Kokileva, L.; LeBlanc, J.; Sikorska, M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques* 1993, 15, 1032–40.
176. Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 1992, 119, 493–501.
177. Darzynkiewicz, Z.; Juan, G.; Li, X.; Gorczyca, W.; Murakami, T.; Traganos, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997, 27, 1–20.
178. Campbell, I. G.; Jones, T. A.; Foulkes, W. D.; Trowsdale, J. Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res.* 1991, 51, 5329–38.
179. Ali, D.; Alarifi, D.; Al-Doaiss, A.; Ali, B. A.; Ahamed, M.; Al-Khedhairi, A. A. Histologic and apoptotic changes induced by titanium dioxide nanoparticles in the livers of rats. *Int. J. Nanomedicine* 2013, 8, 3937.

180. Bagheri-Abassi, F.; Alavi, H.; Mohammadipour, A.; Motejaded, F.; Ebrahimzadeh-Bideskan, A. The effect of silver nanoparticles on apoptosis and dark neuron production in rat hippocampus. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2015, 18, 644–8.
181. Wilhelmi, V.; Fischer, U.; Weighardt, H.; Schulze-Osthoff, K.; Nickel, C.; Stahlmecke, B.; Kuhlbusch, T. A. J.; Scherbart, A. M.; Esser, C.; Schins, R. P. F.; Albrecht, C. Zinc Oxide Nanoparticles Induce Necrosis and Apoptosis in Macrophages in a p47phox- and Nrf2-Independent Manner. *PLoS One* 2013, 8.
182. Xia, T.; Kovochich, M.; Brant, J.; Hotze, M.; Sempf, J.; Oberley, T.; Sioutas, C.; Yeh, J. I.; Wiesner, M. R.; Nel, A. E. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. *Nano Lett.* 2006, 6, 1794–1807.
183. Friehs, E.; AlSalka, Y.; Jonczyk, R.; Lavrentieva, A.; Jochums, A.; Walter, J.-G.; Stahl, F.; Scheper, T.; Bahnemann, D.; Bahnemann, D. Toxicity, phototoxicity and biocidal activity of nanoparticles employed in photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 2016, 29.
184. Hussain, S.; Thomassen, L. C. J.; Ferecatu, I.; Borot, M.-C.; Andreau, K.; Martens, J. A.; Fleury, J.; Baeza-Squiban, A.; Marano, F.; Boland, S. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 2010, 7, 10.
185. Bass, D. A.; Parce, J. W.; Dechatelet, L. R.; Szejda, P.; Seeds, M. C.; Thomas, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 1983, 130, 1910–7.
186. Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V.; Davies, K. J. A.; Dennery, P. A.; Forman, H. J.; Grisham, M. B.; Mann, G. E.; Moore, K.; Roberts, L. J.; Ischiropoulos, H.; Ischiropoulos, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 2012, 52, 1–6.
187. Jochums, A.; Friehs, E.; Sambale, F.; Lavrentieva, A.; Bahnemann, D.; Scheper, T. Revelation of

different nanoparticle-uptake behavior in two standard cell lines NIH/3T3 and A549 by flow cytometry and time-lapse imaging. *Toxics* 2017, 5.

188. Kessler, R. Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient. *Environ. Health Perspect.* 2011, 119, a120-5.

189. Zarytova, V. F.; Zinov'ev, V. V.; Ismagilov, Z. R.; Levina, A. S.; Repkova, M. N.; Shikina, N. V.; Evdokimov, A. A.; Belanov, E. F.; Balakhnin, S. M.; Serova, O. A.; Baiborodin, S. I.; Malygin, E. G.; Zagrebel'nyi, S. N. An examination of the ability of titanium dioxide nanoparticles and its conjugates with oligonucleotides to penetrate into eucariotis cells. *Nanotechnologies Russ.* 2009, 4, 732-735.

190. Walter, J.-G.; Kökpınar, O.; Friehs, K.; Stahl, F.; Scheper, T. Systematic Investigation of Optimal Aptamer Immobilization for Protein-Microarray Applications. *Anal. Chem.* 2008, 80, 7372-7378.

Mitarbeit an Experimenten

Kapitel 2.2.1	Gemeinsame experimentell Durchführung	B. Sc. Merle Weitzenberg
Kapitel 2.2.2	Gemeinsame experimentell Durchführung	B. Sc. Julia Drömer
Kapitel 2.2.3	Gemeinsame experimentell Durchführung	B. Sc. Julia Drömer
Kapitel 3.2	Gemeinsame Durchführung	M. Sc. Elsa Friehs
Abbildung 43	REM-Bild aufgenommen	M. Sc. Stephanie Melchers

Betreute Abschlussarbeiten im Rahmen der Promotion

Bachelorarbeit von Merle Weitzenberg mit dem Titel: „*Immobilisierung von Aptameren auf Zelloberflächen*“. (Mitarbeit oben angegeben)

Bachelorarbeit von Julia Drömer mit dem Titel: „*Funktionalitätsüberprüfung von Zelloberflächen-immobilisierten Aptameren*“. (Mitarbeit oben angegeben)

Lebenslauf

Name	André Jochums
Geburtsdatum	09. April 1989
Geburtsort	Moers
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

Seit 10/2013	Promotion Chemie im Bereich <i>Durchflusszytometrie in der Biotechnologie</i> an der Leibniz Universität Hannover am Institut für Technische Chemie
10/2011 – 10/2013	Studium mit Abschluss: M.Sc. Life Science Thema der Arbeit: Aptamer-basierte Detektion von Ethanolamin
10/2008 – 09/2011	Studium an der Leibniz Universität Hannover mit Abschluss: B.Sc. Life Science Thema der Arbeit: Bestimmung der Gelöstsauerstoffkonzentration unter verschiedenen Zellkulturbedingungen
08/2001 – 07/2008	Hermann-Runge-Gesamtschule, Moers mit Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Publikationen

1. Jochums, A. (60 %); Friehs, E.; Sambale, F.; Lavrentieva, A.; Bahnemann, D.; Scheper, T. Revelation of different nanoparticle-uptake behavior in two standard cell lines NIH/3T3 and A549 by flow cytometry and time-lapse imaging. *Toxics* 2017, 5.
2. Friehs, E.; AlSalka, Y.; Jonczyk, R.; Lavrentieva, A.; Jochums, A. (15 %); Walter, J.-G.; Stahl, F.; Scheper, T.; Bahnemann, D.; Bahnemann, D. Toxicity, phototoxicity and biocidal activity of nanoparticles employed in photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 2016, 29.
3. Seleci, D. A.; Seleci, M.; Jochums, A. (20 %); Walter, J.-G.; Stahl, F.; Scheper, T. Aptamer mediated niosomal drug delivery. *RSC Adv.* 2016, 6, 87910–87918.
4. Ude, C.; Ben-Dov, N.; Jochums, A. (30 %); Li, Z.; Segal, E.; Scheper, T.; Beutel, S. Online analysis of protein inclusion bodies produced in *E. coli* by monitoring alterations in scattered and reflected light. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100.
5. Heilkenbrinker, A.; Reinemann, C.; Stoltenburg, R.; Walter, J.-G.; Jochums, A. (20 %); Stahl, F.; Zimmermann, S.; Strehlitz, B.; Scheper, T. Identification of the target binding site of ethanolamine-binding aptamers and its exploitation for ethanolamine detection. *Anal. Chem.* 2015, 87.