

Entwicklung von Lebendzell-Microarrays und ihre Anwendung in der Detektion klinisch relevanter Biomarker

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Chem. Rebecca Bongartz
geboren am 19.10.1984 in Neuss

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: Prof. Dr. Detlef Bahnemann
Tag der Promotion: 20.02.2014

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die interessante und aktuelle Aufgabenstellung sowie seine Unterstützung während der letzten knapp 4 Jahre. Herrn Prof. Dr. Detlef Bahnemann danke ich für die Übernahme des Korreferats. Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves danke ich für die Bereitschaft, mein Nebenfachprüfer zu sein.

Ich danke Herrn Dr. Frank Stahl für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die Diskussionsbereitschaft, Betreuung und Unterstützung, die auch außerhalb Deutschlands während der Izmir-Aufenthalte nicht endete, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Johanna Walter für die hilfreichen Denkanstöße während der gesamten Arbeit, immer wiederkehrende Skepsis an vorhandenen und nicht-vorhandenen Kontrollen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Dissertation. Hierdurch erschien vieles in einem ganz anderen Licht.

Dr. Stefanie Wagner danke ich ebenfalls für die kompetente Einweisung in die Zellkultur und den Umgang mit ihren dem Tode geweihten Zelllinien, die bei mir hoffentlich etwas bessere Überlebenschancen fanden ;-). Nochmals vielen, vielen Dank Steffi, dass du meine Fragen auch nach eurem Weggang nach Wien so geduldig und ausführlich beantwortet hast. Ohne dich wäre der Übergang sehr viel schwieriger gewesen. Mein Dank gilt auch der gesamten Zellkulturmannschaft für die nette und leider nur sehr kurze Aufnahme in ihrem Labor, das ich dann sogar komplett übernehmen durfte.

Meinen zwei Quasi-Masterandinnen Mehriban Akin und Didem Ag, die in dem Projekt auf türkischer Seite gearbeitet haben, danke ich für die letzten 3 Jahre. Es war eine sehr schöne und besondere Erfahrung euch kennengelernt zu haben und mit euch zusammen arbeiten zu dürfen. Es hat mir viel Spaß gemacht, mein Wissen an euch weiterzugeben, ich kann mir keine besseren Masteranden vorstellen. Auch die Forschungsaufenthalte in Izmir werde ich nie vergessen, ihr habt mir gezeigt, was Gastfreundschaft wirklich bedeutet und ich hoffe, unser Kontakt wird nie abreißen. Meinem Bachelorstudenten Lukas Raddatz möchte ich für sein Interesse an dem Thema und die sehr gute Zusammenarbeit während seiner Bachelorarbeit danken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des TCI für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken. Dieses gilt insbesondere für Dr. Olga Kysil für die Einarbeitung in sterile Arbeitstechniken, Michael Meyer für die Einführung in die Durchflusszytometrie, Dr. Clarissa Baumanis und Janna Freitag für ihre Zeit am REM, Dr. Kai Mutz für die Beantwortung aller Fragen rund um die PCR und Dr. Guohong Zhu, die

immer eine motivierende Büronachbarin war. Außerdem gilt mein Dank Martin Pähler, der nicht aufgab, mir bei der schwierigsten PCR zu helfen. Unserem ehemaligen Bufdi Maik Schwalenberg und dem Praktikanten Kai Wenk danke ich für die Unterstützung während der Zellcharakterisierungsstudien, ohne euch hätte es sehr viel länger gedauert.

Ich bedanke mich vor allem bei Dr. Elias Tauchert, Olga Raisch, Anna Glyk und Dr. Estabraq Abdulkerim für das gute Arbeitsklima in der Bibliothek, die zahlreichen Gespräche, motivierenden Worte und Aktivitäten auch außerhalb des Labors. Estabraq, ich bin froh, mit dir die guten und schlechten Tage teilen zu können und vermisse schon jetzt unsere Gespräche bei einer Tasse Kaffee. Danke für die schöne Zeit am TCI, ich hoffe unsere Freundschaft wird weiterhin fortbestehen.

Zuletzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie für das Verständnis und die moralische Unterstützung danken. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt und während des gesamten Studiums nicht vergessen liest, wie viel eure Freundschaft insbesondere an schlechten Tagen wert ist. Bei meinem Freund Dr. Patrick Jonczyk möchte ich mich für die vielen schönen Stunden und die unglaubliche Unterstützung besonders in den letzten Monaten bedanken. Ohne dich, wäre ich in diesem sehr schwierigen Jahr nicht so weit gekommen. Du hast mir Halt und Zuversicht gegeben, wenn ich sie am meisten brauchte. Auch meinen Eltern Marianne und Theo Bongartz danke ich für die Unterstützung und Motivation zu jeder Zeit. Meiner Mutter habe ich mein Interesse an den Naturwissenschaften zu verdanken, vielen Dank hierfür. Meinem Vater danke ich für alles, was er mir beigebracht hat und das Halbwissen in vielen Bereichen, das uns nun stets bei der Problemlösung helfen kann. Ich liebe und vermisse dich für immer.

„Only the good die young“ B. May

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	I
Kurzzusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
2 Zielsetzung	4
3 Theoretischer Teil	5
3.1 Zellbasierte Microarrays.....	5
3.1.1 Allgemeine Grundlagen der Microarray-Technologie	5
3.1.2 Konventionelle zellbasierte Microarrays und deren Herstellungsmethoden	7
3.1.2.1 <i>Tissue-Microarrays</i>	7
3.1.2.2 <i>Zell-Microarrays</i>	9
3.1.3 Oberflächenbeschichtungen in der Zellkulturtechnik	12
3.2 Zelluläre Testsysteme.....	16
3.2.1 Detektionsmoleküle für zelluläre Systeme.....	17
3.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe als Markierung der Detektionsmoleküle.....	19
3.3 Spezifische Zellmembran-Biomarker.....	24
3.3.1 <i>Epidermal growth factor</i> Familie.....	24
3.3.2 FOLR1	26
3.3.3 EpCAM (CD326).....	26
4 Ergebnisse und Diskussion	28
4.1 Entwicklung von Lebendzell-Microarrays	29
4.1.1 Herstellung verschiedener Lebendzell-Microarrays.....	29
4.1.1.1 <i>Drucken von prokaryotischen Zellen</i>	29
4.1.1.2 <i>Drucken von eukaryotischen Zellen</i>	32
4.1.2 Optimierung der Immobilisierungsparameter, Spottereinstellungen und Oberflächen	34
4.1.3 Validierung von Oberflächenbeschichtungen mittels der Modellzelllinie A-549	38
4.1.4 Entwicklung eines <i>high-throughput</i> Analysesystems	40
4.1.5 Herstellung von Lebendzell-Microarrays mit weiteren Zelllinien und Primärzellen	43
4.1.6 Schlussfolgerungen	46

4.2	Charakterisierung der Zellen bezüglich der Biomarker HER-2/neu, FOLR1 und EpCAM.....	47
4.2.1	Molekularer Nachweis der Biomarker mittels PCR.....	47
4.2.1.1	<i>Housekeeping Gene</i>	48
4.2.1.2	<i>HER-2/neu</i>	49
4.2.1.3	<i>FOLR1</i>	50
4.2.1.4	<i>EpCAM</i>	51
4.2.2	Nachweis der Biomarker auf Protein-Ebene: Durchflusszytometrie.....	52
4.2.2.1	<i>Protolloptimierung der durchflusszytometrischen Färbung</i>	52
4.2.2.2	<i>Titration der optimalen Antikörperkonzentration für die Durchflusszytometrie</i>	54
4.2.2.3	<i>Expressionsnachweis der untersuchten Biomarker auf den verwendeten Zellen</i>	57
4.2.3	Schlussfolgerungen	58
4.3	Zelldiskriminierung mittels einer Oberflächenbeschichtung.....	60
4.3.1	Etablierung einer zelldiskriminierenden Oberfläche anhand eines Modellzelllinienpaares	60
4.3.2	Anwendung der Oberflächenbeschichtung auf ein weiteres Zelllinienpaar	64
4.3.3	Schlussfolgerungen	67
4.4	Entwicklung Quantum Dot-basierter Detektionsassays	68
4.4.1	Konjugate hydrophober Hexadecylamin-Quantum Dots _{560nm} (CdSe/ZnS) mit einem anti-HER-2/neu-Antikörper.....	68
4.4.1.1	<i>Protolloptimierung und Charakterisierung der Quantum Dot/Polymer/Antikörper-Biokonjugate</i>	69
4.4.1.2	<i>Zytotoxizitätsbestimmungen</i>	71
4.4.1.3	<i>Zellfärbungen und Mikroskopie</i>	74
4.4.2	Konjugate wasserdispergierbarer Thioglykolsäure-Quantum Dots _{560nm} (CdTe/CdS) mit einem anti-HER-2/neu-Antikörper	76
4.4.2.1	<i>Herstellung und Charakterisierung der TGA-Quantum Dot/Antikörper-Biokonjugate</i>	77
4.4.2.2	<i>Zytotoxizitätsbestimmungen</i>	79
4.4.2.3	<i>Durchflusszytometrie</i>	82
4.4.2.4	<i>Zellfärbungen und Mikroskopie</i>	83
4.4.2.5	<i>Stabilität der TGA-Quantum Dots und ihre Photobleaching-Eigenschaften</i>	87
4.4.3	Konjugate wasserdispergierbarer Quantum Dots _{655nm} (CdSe/ZnS) mit verschiedenen Antikörpern	90
4.4.3.1	<i>Protolloptimierung der Konjugation</i>	90

4.4.3.2	<i>Titration des optimalen Quantum Dot_{655nm}-Antikörper-Verhältnisses</i>	92
4.4.3.3	<i>Charakterisierung der Quantum Dot_{655nm}/IgG-Konjugate</i>	94
4.4.3.4	<i>Herstellung und Charakterisierung der Quantum Dot_{655nm}/Antikörper-Konjugate</i>	98
4.4.3.5	<i>Zytotoxizitätsbestimmungen</i>	100
4.4.3.6	<i>Zellfärbungen und Mikroskopie</i>	101
4.4.3.7	<i>Stabilität der Quantum Dots_{655nm} und Photobleaching-Eigenschaften</i>	105
4.4.3.8	<i>Schlussfolgerungen</i>	107
4.4.4	Konjugate wasserdispergierbarer Quantum Dots _{655nm} (CdSe/ZnS) mit einem Aptamer	107
4.4.4.1	<i>Herstellung und Charakterisierung der Quantum Dot_{655nm}/Aptamer-Konjugate</i>	107
4.4.4.2	<i>Zellfärbungen und Mikroskopie</i>	110
4.4.4.3	<i>Schlussfolgerungen</i>	111
4.5	Anwendung des neuen Detektionssystems auf den selbst-entwickelten Lebendzell- Microarrays	112
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	119
6	Anhang.....	123
6.1	Material	123
6.1.1	<i>E. coli</i> Stämme und eukaryotische Zellen	123
6.1.2	Medien	128
6.1.3	Puffer und Lösungen	129
6.1.4	Chemikalien	132
6.1.5	Microarrays und Zubehör.....	133
6.1.6	Plasmide und Restriktionsenzyme	133
6.1.7	Analyse-Kits	135
6.1.8	mRNA-/Protein-Sequenzen, Primer, Enzyme, Elektrophorese, Größenstandards	136
6.1.9	Antikörper, Aptamere und Quantum Dots	143
6.1.10	Verbrauchsmaterial	144
6.1.11	Geräte	145
6.1.12	Software	146
6.2	Methoden.....	147
6.2.1	Zellkulturtechniken	147
6.2.1.1	<i>Revitalisieren der Säugetierzellen</i>	147

6.2.1.2	<i>Kultivierung und Passage der Säugetierzellen</i>	147
6.2.1.3	<i>Kryokonservierung von Säugetierzellen</i>	149
6.2.2	Transformation von prokaryotischen und Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	150
6.2.2.1	<i>Herstellung kompetenter Zellen mittels TSS-Methode</i>	150
6.2.2.2	<i>Transformationen von E. coli</i>	150
6.2.2.3	<i>Herstellung einer Gefrierkultur von E. coli</i>	151
6.2.2.4	<i>Kultivierung von E. coli</i>	151
6.2.2.5	<i>Plasmid-Aufreinigung</i>	152
6.2.2.6	<i>Restriktion zur Plasmid-Identifizierung</i>	153
6.2.2.7	<i>Transfektionen von NIH-3T3 und HEK-293 Zellen</i>	153
6.2.3	Herstellung von Lebendzell-Microarrays.....	154
6.2.3.1	<i>Herstellung prokaryotischer Zell-Microarrays</i>	154
6.2.3.2	<i>Herstellung eukaryotischer Lebendzell-Microarrays</i>	155
6.2.3.3	<i>Validierung von Oberflächenbeschichtungen</i>	156
6.2.3.4	<i>Entwicklung eines high-throughput Analysesystems</i>	158
6.2.4	Analyse der Vitalität der kultivierten Zellen.....	158
6.2.4.1	<i>MTT-Test</i>	158
6.2.4.2	<i>CellTiter-Blue Assay</i>	160
6.2.4.3	<i>Nachweis von Nekrose (Laktatdehydrogenase)</i>	161
6.2.4.4	<i>Nachweis von Apoptose (Caspase-3 und -7)</i>	162
6.2.4.5	<i>Nachweis von Apoptose/Nekrose mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen</i>	162
6.2.4.6	<i>Zellfärbungen mittels Calcein-Acetoxyethyl und Propidiumiodid</i>	164
6.2.4.7	<i>Fixierung der Zellen</i>	165
6.2.4.8	<i>Zellfärbungen mittels DAPI</i>	165
6.2.4.9	<i>Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen</i>	166
6.2.5	Charakterisierung der Zellen bezüglich der Biomarker	167
6.2.5.1	<i>RNA-Isolierung und cDNA-Synthese</i>	167
6.2.5.2	<i>Primer-Design</i>	168
6.2.5.3	<i>Polymerasekettenreaktion</i>	169
6.2.5.4	<i>Analyse der PCR-Ergebnisse mittels Agarosegelelektrophorese</i>	171
6.2.5.5	<i>Analyse der PCR-Ergebnisse mittels Agilent Bioanalyzer 2100</i>	171

6.2.5.6	<i>Durchflusszytometrische Messungen</i>	173
6.2.6	Entwicklung Quantum Dot-basierter Detektionsassays	176
6.2.6.1	<i>Konjugate hydrophober Hexadecylamin-Quantum Dots_{560nm} (CdSe/ZnS) mit einem anti-HER-2/neu Antikörper</i>	176
6.2.6.2	<i>Konjugate wasserdispergierbarer Thioglykolsäure-Quantum Dots_{560nm} (CdTe/CdS) mit einem anti-HER-2/neu und einem anti-EpCAM Antikörper</i>	177
6.2.6.3	<i>Konjugate wasserdispergierbarer Quantum Dots_{655nm} (CdSe/ZnS) mit verschiedenen Antikörpern</i>	179
6.2.6.4	<i>Konjugate wasserdispergierbarer Quantum Dots_{655nm} (CdSe/ZnS) mit verschiedenen Aptameren</i>	182
6.2.6.5	<i>Charakterisierung der Konjugate mittels dynamic light scattering</i>	184
6.2.6.6	<i>Charakterisierung der Konjugate mittels Bradford-Test</i>	184
6.2.6.7	<i>Charakterisierung der Konjugate mittels BCA-Test</i>	185
6.2.6.8	<i>Charakterisierung der Konjugate mittels Agarosegelelektrophorese</i>	186
6.2.6.9	<i>Charakterisierung der Konjugate mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese</i> . 186	
6.2.6.10	<i>Zellfärbungen für die Mikroskopie</i>	187
6.3	Beteiligung an den Publikationen und betreute Arbeiten.....	187
	Abbildungsverzeichnis	IV
	Tabellenverzeichnis	XI
	Literaturverzeichnis	XII
	Lebenslauf	
	Publikationsliste	

Abkürzungsverzeichnis

α MEM	alpha Minimum Essential Medium
AU	<i>engl.: arbitrary units</i>
bp	Basenpaare
BP	Bindungspuffer
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethyl
CMA	Zell-Microarray
CTB	CellTiter-Blue Cell Viability Assay
Cy	Cyanin
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: desoxyribonucleic acid</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>engl.: enhanced green fluorescent protein</i>)
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EpCAM	Epithelzelladhäsions/aktivierungsmolekül
Em	Emission
Ex	Anregung (<i>engl.: excitation</i>)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

FOLR	Folatrezeptor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
h	Stunde
HDA	Hexadecylamin
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HER-2/neu	Heregulin Rezeptor 2
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
HS	Humanserum
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobasen
K _d	Bindungskonstante
kDa	Kilodalton
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>engl.: messenger ribonucleic acid</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
NBP	Natriumboratpuffer
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NKS	Neugeborenen Kälberserum
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl.: phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.: polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin

Abkürzungsverzeichnis

PEG	Polyethylenglykol
PerCP	Peridininchlorophyllprotein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PLL	Poly-L-Lysin
P/S	Penicillin/Streptomycin
QD	<i>Quantum Dot</i>
RFC	<i>engl.: reduced folate carrier</i>
RFU	<i>engl.: relativ fluorescence unit</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.: rounds per minute</i>)
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.: sodium dodecyl sulfate</i>)
TAE	Tris-Azetat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TGA	Thioglykolsäure
TMA	<i>Tissue-Microarray</i>
TOPO	Trioctylphosphinoxid
ucMSC	mesenchymale Stammzellen der Nabelschnur (<i>engl.: umbilical cord mesenchymal stem cells</i>)
UV	Ultraviolett
μL	Mikroliter
v	Volumen
w	Gewicht

Kurzzusammenfassung

Entwicklung von Lebendzell-Microarrays und ihre Anwendung in der Detektion klinisch relevanter Biomarker

Das Ziel dieser Arbeit war der Aufbau eines miniaturisierten zellulären Microarray-basierten Testsystems, das für den Nachweis von Krebszellen mittels zellspezifischer Fluoreszenzmarkierter Detektionsmoleküle verwendet werden sollte. Die DNA-Microarray-Technologie wurde vollständig auf lebende Zellen übertragen, indem die klassische Infrastruktur bestehend aus kontaktfreiem Nanoplotter, Microarray-Slides in Objektträgergröße und Microarray-Scanner genutzt wurde. Eine reproduzierbare und sterile Zellimmobilisierungsstrategie wurde mit Hilfe der A-549 Modellzelllinie erfolgreich entwickelt, optimiert und bis zum reproduzierbaren Einsatz validiert. Diese zeigte eine Zellvitalität von knapp 80% (bei einem Spotvolumen von nur 0,6 µL). Ein Inkubationskammersystem wurde für den *high-throughput* Einsatz der Microarrays entwickelt. Die optimierte Immobilisierungsstrategie konnte erfolgreich auf weitere humane Krebszelllinien und Primärzellen aus der Nabelschnur übertragen werden. Das Wachstum der auf diese Weise immobilisierten Zellen war mit dem Zellverhalten in Standard-96-Well Platten absolut vergleichbar.

Um eine reproduzierbare Unterscheidung der Zellen zu ermöglichen, wurde ein zellspezifisches Detektionssystem etabliert. Für die Detektion wurde zum einen ein Rezeptor-bindendes Zellkultursubstrat und zum anderen ein Antikörper- bzw. Aptamerbasierter Assay gewählt. Als Fluoreszenz-Markierung der zellspezifisch bindenden Detektionsmoleküle wurden halbleitende anorganische Nanopartikel, so genannte Quantum Dots verwendet. Es wurden drei verschiedene Kern/Hülle Quantum Dots erfolgreich mit den Biomolekülen funktionalisiert. Die resultierenden Konjugate waren aufgrund ihrer hohen Spezifität, geringen Toxizität und hohen Stabilität eine sehr gut geeignete Alternative zu herkömmlichen organischen Farbstoff-Konjugaten zur Zelldetektion. Um die Spezifität der späteren Fluoreszenz-Detektion nachzuweisen, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Zellen zunächst mittels PCR und Antikörper-basierter durchflusszytometrischer Detektion hinsichtlich ihrer Expression der Biomarker charakterisiert.

Insgesamt sind die hier etablierten Lebendzell-Microarrays eine äußerst vielversprechende Plattform für die Detektion oder Stimulierung von Zellen, wenn nur wenig Zellmaterial zur Verfügung steht.

Schlagnworte: Lebendzell-Microarrays, Quantum Dots, Antikörper, Aptamere, spezifische Zelldetektion/-diskriminierung

Abstract

Development of living cell microarrays and their application for the detection of clinically relevant biomarkers

The objective of this work was to develop a miniaturized cellular test system using microarray technology, which is applied for the specific detection of cancer cells by fluorescently labeled cell targeting molecules. Here, a technology conventionally used for DNA microarrays was transferred to living cells by utilizing the typical infrastructure consisting of contact free nanoplotter, microarray object slides and microarray scanner. The development of a reproducible, sterile strategy for cell immobilization was successful, and the optimized and validated process resulted in 80% cell viability for 0.6 μ L spotting volume. A special incubation chamber was built to implement *high-throughput* applications. Finally, the established immobilization process was successfully adapted to different human cancer cell lines and umbilical cord primary cells in the first part of this work. Their growth was comparable to the proliferation behavior in 96-well tissue plates.

To distinguish different kinds of cancerous cells from each other, cell specific targeting probes were synthesized. On the one hand a receptor-targeting cell culture substrate was applied to discriminate between more efficiently adhered receptor overexpressing cells and receptor poor cells. On the other hand antibody and aptamer-based fluorescence assays were established. The fluorescence label of these cell targeting molecules consists of semiconducting inorganic nanoparticles, so called *quantum dots*. Three different core/shell quantum dots were successfully labeled with the chosen biomolecules (resp. antibodies, aptamers). This labeling resulted in conjugates with high targeting specificity, low cytotoxicity and high stability. Consequently quantum dots are well-suited alternatives to the commonly used organic dyes for targeted cellular imaging studies. To verify the high specificity of cell detection, the expression of the biomarkers in the used cells was confirmed by PCR and flow cytometry.

The established living cell microarrays are a very promising tool for cell targeting or stimulation, especially if only a limited amount of cell material is available.

Keywords: Living cell microarrays, quantum dots, antibodies, aptamers, specific cell detection/discrimination

1 Einleitung

Krebserkrankungen sind, insbesondere in den modernen Industrieländern, eine der häufigsten Todesursachen. Die Heilungschancen sind dabei um ein Vielfaches größer, wenn die Erkrankung früh erkannt wird. Neben regelmäßigen Kontrollen spielt auch die eindeutige Identifizierung von erkrankten Zellen und Geweben eine große Rolle, um eine eindeutige und frühe Diagnose stellen zu können.

Auf der Oberfläche von Körperzellen befinden sich verschiedene Moleküle (insbesondere Eiweiße), die vom Zelltyp und dem Herkunftsgewebe bestimmt werden. Sie sind auch, je nachdem ob eine Zelle krank oder gesund ist, in unterschiedlicher Vielfalt und Anzahl ausgeprägt und werden als spezifische Biomarker bezeichnet. In der modernen Krebsdiagnostik wird es immer wichtiger, mit Hilfe definierter Biomarker Krebszellen eindeutig von gesunden Zellen zu unterscheiden, indem z.B. die Kultur primärer Krebszellen, gewonnen aus Gewebeproben, untersucht wird. Hierfür ist es besonders wichtig, dass zum einen nur sehr wenige patienteneigene Zellen zur Untersuchung benötigt werden und zum anderen trotzdem ein rasches und eindeutiges Ergebnis erzielt wird. Nur bei frühest möglicher Erkennung der Erkrankung kann diese erfolgreich behandelt werden. Daher ist die Diagnose auf Verfahren angewiesen, die hochspezifisch und hochsensitiv sind, wie z.B. fluoreszenzbasierte Untersuchungsverfahren. So können gezielt nur die erkrankten Zellen selektiv angefärbt werden. Doch nicht nur für die Diagnose der Erkrankung sondern auch für viele Therapieansätze werden zellspezifische Biomarker verwendet, da sich die Verteilung der Eiweiße auf der Zelle mit der Behandlung verändert.

Systeme, die die Untersuchung einer Vielzahl von Zellen und Geweben mit wenig Zeit- und Materialaufwand ermöglichen, sind unentbehrlich für die Diagnose von Erkrankungen und für die Untersuchung der Auswirkungen einer Therapie auf die Zellen. Sogenannte zellbasierte Microarrays können dies leisten, indem sie eine große Anzahl paralleler Untersuchungen mit nur wenigen patienteneigenen Zellen ermöglichen. Sie finden in der regenerativen Medizin und im *Tissue Engineering*, in der Medikamentenentwicklung und in Wirkstoffuntersuchungen, sowie in der Diagnostik Anwendung und werden als Alternative zu Tierversuchen eingesetzt. In Kombination mit Fluoreszenz-markierten Detektionsmolekülen können zellbasierte Microarrays dabei helfen, neue Methoden zur Früherkennung und Therapie von Tumoren zu finden, welches immer noch die größte Herausforderung in der Krebsforschung ist.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Herstellung von Lebendzell-Microarrays, die als miniaturisierte Testsysteme zum Nachweis von Krebszellen mittels zellspezifischer Quantum Dot-basierter Detektionen verwendet werden können. Die Zellimmobilisierungsstrategie, die in dieser Arbeit verwendet werden soll, beruht auf dem Prinzip des kontaktfreien Druckens. Dieses wird üblicherweise für die Herstellung von DNA- und Protein-Microarrays eingesetzt. Hier soll die Microarray-Technologie vollständig auf lebende Zellen übertragen werden, indem die klassische Infrastruktur bestehend aus kontaktfreiem Nanoplotter, Microarray-Slides in Objektträgergröße und Microarray-Scanner genutzt wird.

Es soll zunächst die Fähigkeit der Zellen, den Druckprozess zu überleben, untersucht werden. Basierend hierauf soll der Druckprozess von lebenden Zellen und ihre Kultivierung über mehrere Tage anhand einer Modellzelllinie (A-549, Lungenkrebszelllinie) optimiert werden. Neben verschiedenen Druckparametern sollen die Einflüsse der Nasschemie und der Microarray-Oberflächenmaterialien untersucht werden.

Nach erfolgter Lebendzell-Microarray Herstellung sollen verschiedene hierauf kultivierte Zellen spezifisch mit Hilfe von Fluoreszenznanopartikeln detektiert und voneinander unterschieden werden. Hierfür sollen halbleitende Nanopartikel, sogenannte *Quantum Dots*, mit einem zellspezifisch bindenden Biomolekül (Antikörper und Aptamer) versehen werden.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines durch das BMBF (Förderkennzeichen: TUR09/I25 und 01DL12013) und TÜBITAK geförderten Verbundprojektes des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover und dem Biochemischen Department der Ege Universität, Izmir, Türkei angefertigt.

3 Theoretischer Teil

In dieser Arbeit sollen Lebendzell-Microarrays entwickelt und produziert werden. Diese können in der Forschung sowie Diagnostik für zelluläre Analysen als miniaturisierte Assays sowohl für *in-situ* Hybridisierungen als auch für immunzytochemische Untersuchungen eingesetzt werden. Ein weiteres Anwendungsfeld sind automatisierte toxikologische Tests. Im Folgenden werden zunächst die Grundlagen der Hochdurchsatz-Technologie „Microarrays“ vorgestellt (Kapitel 3.1), wobei insbesondere auf Zell-Microarrays näher eingegangen wird. Die Detektionsmoleküle zellulärer Assays und deren Farbmarkierungen werden mit besonderem Augenmerk auf fluoreszierende Nanopartikel (Quantum Dots) vorgestellt (Kapitel 3.2). Schließlich wird ein kurzer Überblick über die in dieser Arbeit nachzuweisenden Biomarker gegeben (Kapitel 3.3).

3.1 Zellbasierte Microarrays

Standardisierte Analysen, die die Untersuchung einer Vielzahl von Zellen und Geweben mit wenig Zeit- und Materialaufwand ermöglichen, sind unentbehrlich, um Prozesse wie Expression, Differenzierung sowie toxische Wirkungen zu testen. Bioaktive Moleküle und Stimuli, z.B. Wirkstoffe, Signalmoleküle oder Chemikalien haben großen Einfluss auf das Überleben von Zellen und ihr Verhalten. Um zu untersuchen, wie Zellen auf diese äußeren Reize reagieren, ist es notwendig, ein System zu entwickeln, das einerseits sehr sensitiv ist, andererseits aber einen hohen Durchsatz ermöglicht. Die etablierten zellbasierten Microarray-Techniken werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

3.1.1 Allgemeine Grundlagen der Microarray-Technologie

Die Microarray-Technologie bietet die Möglichkeit für *high-throughput* Analysen, bei denen in einem einzigen Experiment Hunderte oder Tausende Proben gleichzeitig untersucht werden können. Die Auswertung erfolgt meist über ein Fluoreszenzsignal. Das Verfahren bietet mit seiner hohen Sensitivität und Durchsatzrate viele Vorteile und hatte seinen Durchbruch in den 1990er Jahren im Bereich der Genomanalytik. Es handelt sich bei Microarrays um eine feste Oberfläche (Slide), meist aus Glas oder Kunststoff, auf der Proben hochreproduzierbar systematisch in Reihen und Spalten angeordnet und dadurch eindeutig identifizierbar sind. Abb. 3.1-1 zeigt schematisch die gebräuchlichen Microarray-Typen, die im Folgenden detaillierter beschrieben werden.

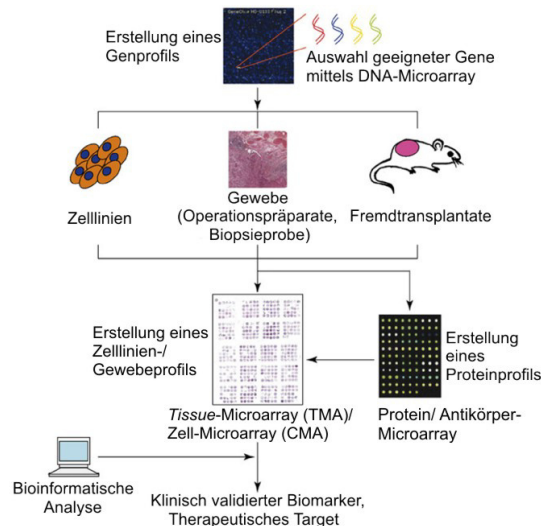


Abb. 3.1-1: Schematische Darstellung der verschiedenen Microarray-Typen und der Verknüpfung ihrer Einsatzgebiete (modifiziert nach [131]).

Ursprünglich wurde diese Analysemethode für den Nachweis einer Genregulation entwickelt, sogenannte DNA/RNA-MICROARRAYS werden in Mikroskopobjektträgergröße hergestellt. Hierfür werden kurze Oligonukleotide als Fängermoleküle auf der Slide-Oberfläche an einem Sondenort (Spot) immobilisiert. Zwei DNA- oder revers transkribierte mRNA-Proben werden mit verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen versehen und von den zugehörigen Fängermolekülen gebunden. Das Muster der Fluoreszenzsignale der gebundenen Proben wird mit einem Fluoreszenz-Scanner ausgelesen. Alle Proben eines Microarrays werden exakt gleich behandelt und sind denselben Bedingungen und Reagenzien ausgesetzt (z.B. Inkubationszeiten, Temperaturen, Waschbedingungen, Antikörper). Außerdem sind so nur geringe Mengen an Analysereagenzien notwendig. Die Informationsdichte des Microarrays hängt von der Anzahl der Spots ab, der Abstand der Spots zueinander ist für die Zuverlässigkeit der molekularen Erkennung ausschlaggebend [102].

Mittlerweile ist dieses Verfahren auch auf andere Ebenen übertragen worden. Da das Expressionsmuster auf RNA-Ebene nicht genau das Proteom der Zelle abbildet, wurden PROTEIN-MICROARRAYS entwickelt. Die Detektion der Proteine erfolgt mittels eines Antikörpers oder Aptamers (einzelsträngige DNA oder RNA-Sequenz), die als Fängermoleküle auf der Microarray-Oberfläche immobilisiert werden. Proteine können aber auch direkt auf die Microarrays gedruckt und erst im zweiten Schritt von frei beweglichen fluoreszenzmarkierten Fängermolekülen detektiert werden. Die auf die Microarrays aufzutragenden DNA/RNA-Moleküle, Aptamere/Antikörper oder Proteine werden mit Hilfe eines computergesteuerten Spotters auf die Oberflächen aufgebracht. Dort werden sie über kovalente oder nicht-kovalente Bindungen, hydrophobe oder hydrophile Wechselwirkungen

immobilisiert. Für die Anfertigung der Microarrays können zwei Verfahren verwendet werden, das Kontakt- und das kontaktfreie Verfahren. Für das Kontakt-Spotten werden längliche Nadeln (*Pins*) eingesetzt, die in die Lösung/Suspension getaucht werden, diese aufnehmen und in Folge eines direkten Kontaktes mit der Slide-Oberfläche wieder abgeben [111]. Die Flüssigkeitsabgabe im Piezo-Verfahren (kontaktfrei) erfolgt nicht durch einen direkten Kontakt mit der Microarray-Oberfläche. Bei diesem „*on the fly*“-Verfahren umspannt ein piezoelektrischer Keramikring einen flexiblen Schlauch, welcher nach Anlegen einer Spannung und der Verformung des Keramikringes einen Flüssigkeitstropfen auf den Microarray abgibt [93]. Diese Methode besitzt den Vorteil, die Microarray-Oberfläche nicht in Folge eines Kontaktes zu beschädigen.

3.1.2 Konventionelle zellbasierte Microarrays und deren Herstellungsmethoden

3.1.2.1 Tissue-Microarrays

In Anlehnung an die DNA/RNA-Microarrays wurde zusätzlich zu den Protein-Microarrays ein weiteres Format entwickelt: Microarrays aus Gewebeproben für die direkte Phänotypisierung auf Zellebene. Diese Art der Microarrays spielt in der Immunhistochemie eine entscheidende Rolle, in der Proteine in Geweben und Zellen angefärbt werden. Den anderen Formaten entsprechend stellen die TISSUE-MICROARRAYS (TMA) eine *high-throughput* Methode dar. Zuvor wurden meist Gewebesektionen verwendet, welche zeit- und kostenintensiv einzeln untersucht wurden und somit nicht nur große Mengen an Antikörpern und Reagenzien verbrauchten sondern auch große Mengen Gewebeproben voraussetzten, die der entscheidende limitierende Faktor waren. Mit Hilfe der TMAs konnte die Anzahl von 100 möglichen Untersuchungen auf bis zu 500.000 Tests mit einer einzigen Biopsieprobe gesteigert werden [108]. Häufig geht den TMA Experimenten eine Transkriptionsanalyse von Genen in Tumoren oder anderen klinisch relevanten Geweben voran. Die mittels cDNA-Microarrays erhaltenen Daten von potenziellen Biomarkern und therapeutischen Target-Proteinen werden dann auf Gewebe-Ebene validiert, indem TMAs mit ausgewählten Gewebeproben auf die entsprechenden Proteine oder RNA untersucht werden [11].

1986 wurde zum ersten Mal ein Multi-Gewebe-Block beschrieben [12]. Die Anzahl der Gewebeproben war jedoch begrenzt und die Identifizierung der Proben schwierig. Eine standardisierte und automatisierte Methode wurde von Kononen *et al.*, 1998 etabliert [74]. Aufgrund des hochpräzisen Prozesses, der sich bis heute nur geringfügig verändert hat, konnten bis zu 1.000 verschiedene Gewebeproben gleichzeitig und reproduzierbar in einem

einzelnen Experiment unter identischen Bedingungen untersucht werden und waren eindeutig identifizierbar. Die TMAs bestehen aus hunderten Gewebeproben, die meist einem in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeblock (Spender) entnommen werden. Bevor die TMAs hergestellt werden, wird eine Sektion des Spender-Gewebeblocks mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) angefärbt und so die Region gefunden, die für spätere Untersuchungen von Interesse ist (Abb. 3.1-2 Aa). Eine Hohlzylinder mit einem Innendurchmesser von 0,6 mm wird verwendet, um aus der identifizierten Region des Spenderblocks einen Zylinder auszustanzt. Dieser wird dann in einen leeren Empfängerblock an einer klar definierten Position eingesetzt (Ab), die dokumentiert wird. Ein Spenderblock kann so 200 - 300 Mal ausgestanzt werden [108]. Aus weiteren Spenderblöcken werden Proben ausgestanzt und in denselben Empfängerblock überführt. So entsteht eine Anordnung verschiedener Gewebeproben. Mit Hilfe eines Mikrotomes wird der fertige Empfängerblock in 3 µm dicke Sektionen geschnitten (Ac). Ein Transfertape wird verwendet, um die Sektionen auf Objektträger zu überführen (Ac,d). Jeder TMA kann mit den gleichen Analysemethoden untersucht werden, die auch auf den großen Gewebesektionen angewendet werden. Hierzu zählen Immunhistochemie (IHC, Detektion von Proteinen in Gewebe mittels Enzym-gekoppelter Antikörper, Abb. 3.1-2D), Immunfluoreszenzfärbung (Detektion von Proteinen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper, Abb. 3.1-2F) oder Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH, Bestimmung der Kopienzahl eines Gens durch Detektion der DNA-Sequenzen in Zellkernen von Gewebesektionen mittels fluoreszenzmarkierter, komplementärer DNA-Fragmente, Abb. 3.1-2E).

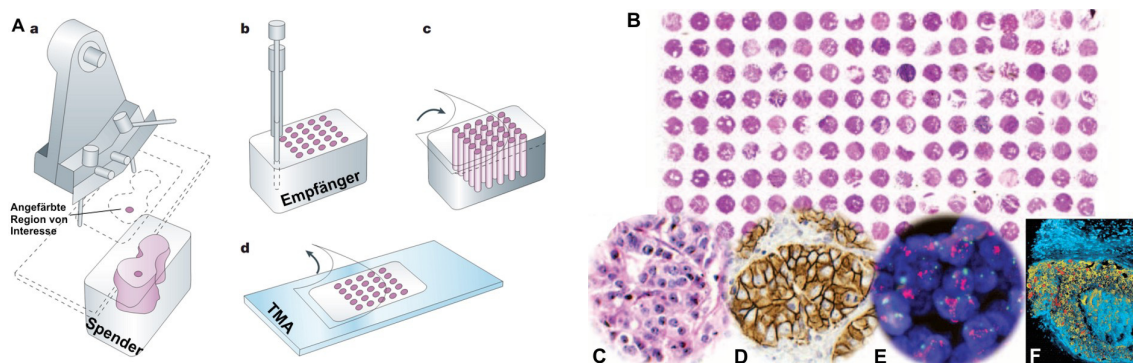


Abb. 3.1-2: Herstellung von TMAs (A) und ihre Anwendungsmöglichkeiten (B-F). A) zeigt die Herstellung der TMAs. B) zeigt eine Übersicht eines mittels Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbten TMAs. C) zeigt eine Vergrößerung dieser H&E Färbung, D) zeigt die Vergrößerung einer immunhistochemischen (IHC)-Färbung eines Gewebes mit starker Proteinexpression (braune Membranen) und E) zeigt eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs (FISH)-Analyse (modifiziert nach [115]). F) zeigt drei übereinandergelegte Immunfluoreszenzfärbungen [108].

Die Bedenken, dass die geringe Größe der Gewebeproben von $\sim 0,00000108 \text{ cm}^3$ ($\varnothing = 0,6 \text{ mm}$) für den vollständigen Tumor (Biopsieprobe durchschnittlich $0,52 \text{ cm}^3$ groß) nicht repräsentativ ist, wurden bis 2003 in mehr als 20 IHC-TMA-Färbungsstudien widerlegt

[115]. Alle Studien kamen zu dem gleichen Ergebnis. Eine gute Übereinstimmung (>95%) zwischen den großen Sektionen (0,0003 cm³) und den TMA-Ergebnissen ist schon bei zwei Proben desselben Spenderblocks [19; 113] gegeben. TMAs geben nicht nur über die Häufigkeit und Verbreitung eines Targets sowie dessen Expressionslevel Auskunft, sondern sind auch hilfreich, um die Rolle des Targets während der Tumorentwicklung zu analysieren. Multitumor-TMAs enthalten Proben einer Vielzahl von verschiedenen Tumortypen und Gewebearten. Auf sogenannten Entwicklungs-TMAs sind Tumore desselben Typs in verschiedenen Erkrankungsstadien aufgebracht. Prognose-TMAs wiederum bestehen aus Proben klinischer Nachuntersuchungen [115]. Jeder TMA kann individuell zusammengestellt werden.

Die Antigenstabilität in den Gewebeproben auf einem TMA kann durch Oxidationen des Gewebes stark beeinträchtigt werden. Falsche Temperaturen während der Lagerung und eine unkorrekte Vorgehensweise bei der Bearbeitung des Gewebes vor einer Analyse fördern den Antigenverlust [145].

Zusätzlich zu den Gewebeproben befinden sich auf den TMAs Kontrollen, bestehend aus Proben von gesundem Gewebe oder Zelllinien. Diese dienen als reproduzierbare Standardkontrolle, um die Sektionen eines Arrays oder TMA-Experimente verschiedener Laboratorien und Zeitpunkte auch quantitativ vergleichen zu können [108; 115]. Adhärente *in-vitro* Zelllinienkulturen wurden in der medizinischen Grundlagenforschung intensiv hinsichtlich ihrer malignen Transformation, Differenzierungen und anderer zellulärer Prozesse erforscht. Deshalb werden diese gut charakterisierten Modellsysteme auch auf TMAs eingesetzt. Die Zellen werden in Formalin fixiert, eingebettet in Paraffin oder Agarose und auf TMAs übertragen [6; 65]. So dienen sie nicht nur als Kontrolle, sondern können direkt mit den korrespondierenden Gewebeproben verglichen werden.

3.1.2.2 Zell-Microarrays

Zelllinien werden aber auch auf reine ZELL-MICROARRAYS (CMAS) übertragen, die mit den TMAs vergleichbar sind. CMAs werden als kostengünstige Plattform verwendet, um in einem *high-throughput* Verfahren molekulare Stimulationen an Zellen durchzuführen oder Proteinprofile zu erstellen. Immunhistochemische und andere Analyseprotokolle können so optimiert werden, ohne auf teure Gewebeproben zurückgreifen zu müssen. Auch geeignete zelluläre Positiv- bzw. Negativkontrollen lassen sich so sehr schnell finden. CMAs geben auch die Möglichkeit, die Proteinexpressionen nach einer Vielzahl verschiedener experimenteller Bedingungen zu untersuchen. So kann eine schnelle Auskunft über die

Auswirkungen von Wirkstoffen/Medikamenten oder anderen Stimuli sowie Gen-Ausschaltungen erhalten werden [14; 141]. Die Zellen werden hierfür nach der Stimulation fixiert, alle zellulären Prozesse somit angehalten und die Zellmembran permeabilisiert. Meist werden sie dann wie bei der TMA-Herstellung in Paraffin, Agar oder Agarose eingebettet [6; 40; 141]. Sie können jedoch auch direkt nach der Fixierung mit Hilfe eines Kontakt-Spotters auf die Microarrays gedruckt werden [118; 53]. Hart *et al.*, 2009 konnten so einen CMA mit 4.600 Spots aus fixierten Hefen herstellen. Sie übertrugen das Format auf verschiedene menschliche Zellen (Jurkat, HELA, A-549; Abb. 3.1-3A), indem sie für das Kontakt-Drucken einen Pin mit einem größeren Durchmesser wählten und die Viskosität der Zellsuspension erhöhten. Dadurch konnten sie ~50 Zellen pro Spot aus einer Zellsuspension mit 10^6 Zellen/20 μ L auf den Microarray drucken. Sie stimulierten die Zellen vor dem Fixieren und wiesen die dadurch hervorgerufenen veränderten Enzymaktivitäten mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper nach (B). Dieses erfolgte nach Befestigung einer Inkubationskammer auf dem Microarray [53].

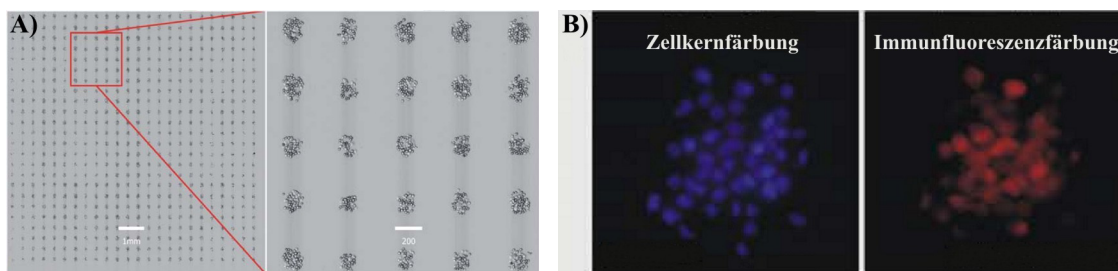


Abb. 3.1-3: High-Density Zell-Microarray von fixierten HELA-Zellen (A) sowie Fluoreszenzmikroskopaufnahmen (B) einer Immunfluoreszenzfärbung (rot) und Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 (blau) nach einer Zellstimulation und anschließender Microarray-Erstellung [53].

Die Fixierung sowie die Einbettung in Paraffin haben große Auswirkungen auf die Qualität der Zellen und des Gewebes. Die chemische Fixierung mittels Formalin führt zu Vernetzungen zwischen Proteinen und auch Nukleinsäuren, sodass sie die RNA beschädigen (Methylgruppen werden hinzugefügt) und Antigenstrukturen und somit die Antikörper-Bindungsstellen verändern können. *In-situ* Analysen von DNA, RNA und Proteinen können dadurch fehlerhaft sein und die Resultate je nach Fixierungsdauer in Qualität und Reproduzierbarkeit variieren [145; 79]. Um dieses zu umgehen, können die Zellen eines CMAs genauso wie das Spendergewebe eines TMAs auch gefroren sein. Diese Proben behalten ihre Integrität und können somit in RNA-Untersuchungen eingesetzt und auch von Antikörpern detektiert werden, die nicht für Formalin-fixierte Gewebe geeignet sind [117]. Die gefrorenen Arrays können hierbei aus den verschiedensten biologischen Proben bestehen, wie z.B. Zelllysaten, Geweben, Zellen sowie Proteinen. Dadurch sind die Anwendungsmöglichkeiten solcher Microarrays sehr vielfältig [85]. Stephan *et al.*, 2002

haben CMAs hergestellt, indem sie Zellsuspensionen in einen gefrorenen Block mit ausgestanzten Vertiefungen gegeben haben und darin bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren haben. Dann haben sie aus diesem Block Sektionen geschnitten und auf Slides aufgebracht [124]. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass frisch gefrorene Zellen und Gewebe ihre Architektur einbüßen und Deformationen der Zellmorphologie auftreten. Außerdem kann die Hohlzylinder beim Ausstanzen des hart gefrorenen Gewebes brechen [117].

Nicht nur die jeweiligen Nachteile der Fixierungsmethoden haben die Wissenschaftler seit einigen Jahren dazu veranlasst, das Microarray-Format auf lebende Zellen zu übertragen. LEBENDZELL-MICROARRAYS dienen auch dazu, Beziehungen zwischen den Zellen, ihrer Umgebung (z.B. lösliche Faktoren oder Wirkstoffe, Extrazelluläre Matrix, benachbarte Zellen) und den Zellantworten auf diese Stimuli zu charakterisieren. Zusätzlich können Einblicke in die molekularen Mechanismen einer Zelle gewonnen werden (Abb. 3.1-4 A, B) [151]. Toxische Eigenschaften von (Bio-)Molekülen auf Zellen können exakter untersucht und Wirkstoffe effizienter entwickelt werden. Auch die Auswirkungen dieser Stimuli auf Signalkaskaden und mögliche Abwehr-/Umgebungssysteme der Zellen lassen sich ermitteln. Des Weiteren können so Effekte einer Expression oder eines Ausschaltens von Genen auf das Zellverhalten und den Phänotyp einfach und schnell erforscht werden. Hierfür werden Gene (in Vektoren) oder doppelsträngige *interfering* RNA (siRNA) auf den Microarray gedruckt [157]. In jedem Spot auf dem Microarray können andere Gene oder siRNA-Moleküle vorliegen. Diese werden dann von Zellen mittels reverser Transduktion (Virale Vektoren) oder reverser Transfektion (Nicht-virale Vektoren) aufgenommen. Hierdurch kann es zu Änderungen des Phänotyps der Zelle kommen. Die erfolgreiche Gen-Aufnahme in die Zellen kann auf einfache Weise verfolgt werden. In die Vektoren kann zusätzlich das Gen für das *green fluorescent protein* (GFP) eingebaut werden, sodass die Zellen nach der Aufnahme des Vektors fluoreszieren (Abb. 3.1-4C) [34; 151; 81].

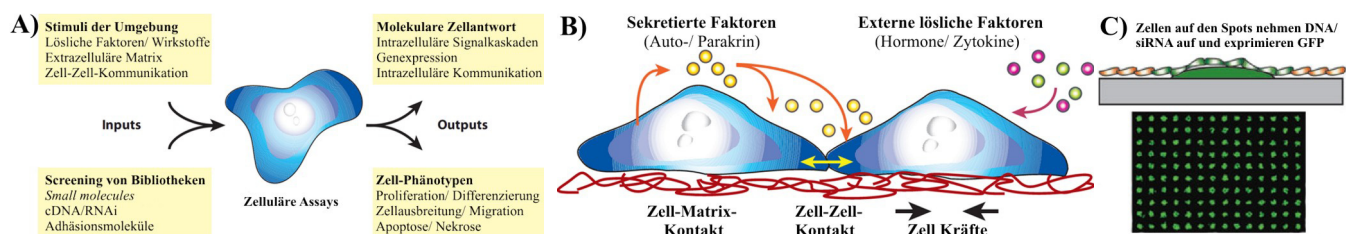


Abb. 3.1-4: Schematische Darstellung der Anwendungsmöglichkeiten von Zell-Microarrays (A) und der Einflüsse der Zellumgebung (B) sowie einer einfachen Zellüberwachung auf einem Microarray mittels Aufnahme eines GFP-Gens in die Zelle (C) (modifiziert nach [151]).

Um einen Lebendzell-Microarray herzustellen, werden zwei Methoden unterschieden. Zum einen können die Zellen auf die Microarray-Oberfläche gedruckt werden. Zum anderen kann der Microarray so gestaltet werden, dass die Zellen, die der gesamten Slide-Oberfläche

ausgesetzt werden, nur an definierten Position anhaften können. Für ersteres gibt es nur sehr wenige Beispiele. Zum einen wurden die Proben auf einen Microarray mit 96 Vertiefungen (1,5 μ L Volumen) gespottet und so zusätzlich voneinander getrennt [7]. Außerdem wurde ein modifizierter Computer-Drucker verwendet, um *chinese hamster ovary* Zellen (CHO) und embryonale Motoneuronen der Ratte mit nur geringem Viabilitätsverlust auf Agar und Kollagengel zu drucken [149].

Auf einem typischen Lebendzell-Microarray wird hingegen eine Oberfläche aus Glas oder Silikon mit Hilfe eines computergestützten Spotters (Kontakt oder kontaktfrei) bedruckt, indem zahlreiche Spots aus Proteinen oder anderen biologischen Molekülen (z.B. Polymere, Carbohydrate, Antikörper) auf der Oberfläche angeordnet werden. An diese Biomoleküle binden die Zellen, während die restliche Oberfläche passiviert wird und somit für die Zell-Anhaftung nicht zur Verfügung steht [8; 48; 106]. Eine stabile Immobilisierung der Zellen oder der Biomoleküle, an die die Zellen binden, auf der Oberfläche sowie gleichzeitig das Verhindern von Zelladhäsion zwischen den Spots ist von entscheidender Bedeutung, stellt aber auch die größte Herausforderung dar. Auf diesen Aspekt wird im Folgenden näher eingegangen.

3.1.3 Oberflächenbeschichtungen in der Zellkulturtechnik

Das Material, auf das die Zellen aufgebracht werden und das die Zellen voneinander trennt, muss hohe Standards erfüllen. Es muss ein Umfeld geschaffen werden, dass im Idealfall dem physiologischen weitestgehend entspricht und es ermöglicht, dass die Zellen sich vergleichbar dem natürlichen Zellverband in einem Gewebe verhalten können. Zudem müssen die Experimente reproduzierbar sein und die Oberfläche dementsprechend ohne Variationen herstellbar sein. Die Oberfläche soll dafür sorgen, dass die Zellen außerhalb ihrer natürlichen Umgebung überleben und darf daher keinerlei toxische Effekte ausüben [151]. Essenziell für aussagekräftige Ergebnisse einer Zellstimulation ist, dass die Oberfläche auf die Zellen nicht störend wirkt, da hierdurch die Zellantwort verfälscht werden könnte [32]. Entscheidend sind aber auch die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Oberfläche. So sollte sie nicht mit Inhaltsstoffen des Mediums reagieren und bei der Sterilisation nicht verändert werden, da das Material weiterhin seine Funktionen erfüllen muss [135].

Adhärenz Zellen haben die natürliche Eigenschaft an Oberflächen zu binden. Sie verwenden hierfür Adhäsionsmoleküle (z.B. Polysaccharide) und Glykoproteine, die sie auf ihrer

Membran tragen. Während der Microarray-Experimente sind sie verschiedenen Waschschrritten ausgesetzt, die die Zelladhäsion stark beeinflussen und zu einem Ablösen der Zellen führen können. Kreuzkontaminationen sind die Folge. Suspensionszellen müssen immer auf der Microarray-Oberfläche verankert werden. Daher wurden unterschiedliche Verfahren entwickelt, um Zellen auf einer Oberfläche zu immobilisieren: Immobilisierung mittels kovalent gebundener Liganden, Adsorption, Polymer/Gel-Verkapselung und das „Einschließen“ von Zellen in einer Matrix (Abb. 3.1-5). Die unter A) gezeigten Strategien dienen der festen Bindung der Zellen auf der Oberfläche, müssen aber mit einer anderen Methode kombiniert werden, um die Zellen erfolgreich voneinander isolieren zu können.

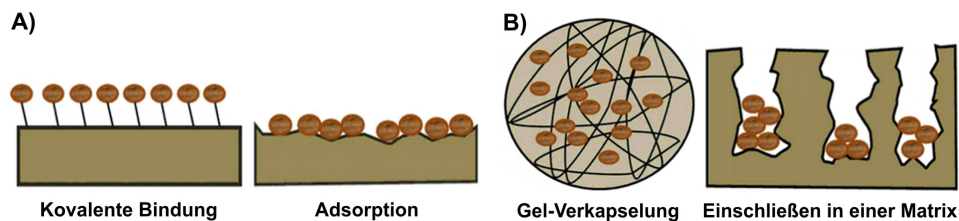


Abb. 3.1-5: Schematische Darstellung verschiedener Immobilisierungsmethoden für Zellen (nach [32]).

Immobilisierung mittels kovalent gebundener Liganden

Hart *et al.*, 2009 haben für ihre Microarrays die humanen adhärenen Zellen nach der Stimulierung und Fixierung mit biotinyliertem Weizenkeimagglutinin behandelt. Dieses ist ein Lektin, das an die Glykoproteine der Zellmembran bindet. Die Zellen wurden dann auf Slides gespottet, die mit Streptavidin beschichtet waren. Die sehr hohe Affinität von Biotin zu Streptavidin führte zu einer stabilen Bindung der Zellen auf den Microarrays [53]. Eine deutlich spezifischere Bindung von Zellen auf einer Oberfläche ist möglich, wenn nur ein bestimmter Zelltyp gebunden wird. Dieses kann mit Hilfe von Antikörper-Microarrays erfolgen. Da die Antikörper nur spezifisch an ein Protein binden, das nur auf einem Zelltyp exprimiert wird, können die Zellen so voneinander getrennt werden. Dieses wurde bereits 1983 angewendet [20], spielt aber auch noch heute bei der Evaluierung von Antikörpern oder Proteinmarkern eine Rolle [72].

Adsorption

Den Einfluss von Lektinen und Carbohydraten auf Zellen bei der Zell-Zell-Interaktion, Zellkommunikation und der Immunantwort veranschaulichten Nimrichter *et al.*, 2004 mit T-Zellen. Diese banden auf einem Microarray mit verschiedenen Zuckerresten selektiv nur an ihre komplementären Zucker [90]. Eine Zellantwort wird auch erhalten, wenn Peptide auf den Microarrays immobilisiert werden, die Zellen an diese binden und sie aufnehmen [39]. Auf Microarrays mit Spots aus verschiedenen Polymeren wurden verschiedene Zellen (embryonale Stammzellen und Zelllinien) kultiviert. Durch dieses Verfahren konnte eine

Vielzahl von Polymeren auf ihre Zelladhäsionseigenschaften getestet werden und innerhalb kurzer Zeit wurden neue für die Zellkultur geeignete Beschichtungen gefunden [5; 135]. Zusätzlich zu den zellbindenden Polymeren wurde eine Microarray-Beschichtung aus Agarose eingesetzt, um unspezifische Zellbindungen zu verhindern. Zellabstoßende Eigenschaften besitzt auch eine Slide-Oberfläche, die dicht mit Polyethylenglykol (PEG) beschichtet ist [57; 91]. Auf diese Beschichtung wurden dann Polyurethane oder Polymere gedruckt [135]. Die am häufigsten verwendeten Moleküle, die die Zelladhäsion fördern, sind Proteine. Insbesondere Proteine der Extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagen und Fibronectin, aber auch Polylysine oder integrinbindende Peptide wie RGD (Arg-Gly-Asp, Zelladhäsion vermittelnde Sequenz im Fibronectin) werden verwendet. Rasi Ghaemi *et al.*, 2013 untersuchten verschiedene Proteine der Extrazellulären Matrix hinsichtlich ihrer Zelladhäsionseigenschaften am Beispiel von mesenchymalen Stammzellen. Sie druckten die Proteine auf einen Epoxy-Silan-beschichteten Slide und passivierten die restliche Oberfläche mit ebenfalls kovalent-gebundenem Bisamin-PEG. Kollagen I stellte sich als am besten geeignet für die Zelladhäsion und das Zellwachstum heraus und wurde auch als Oberflächenprotein während einer Differenzierung unter osteogenen Bedingungen erfolgreich verwendet [106]. Neben einer besseren Zellanhaftung können Kombinationen dieser Proteine auch die Differenzierung oder die Proteinproduktion einleiten [106; 151; 43].

Ein Spezialfall dieser Methode ist die Verwendung von Elektroden auf einem Microfluid-Microarray, auf denen die Zellen binden, wenn ein Strom angelegt wird. So werden Zellen, die über die Microarray-Oberfläche strömen, aufgrund ihrer unterschiedlichen dielektrischen Eigenschaften voneinander getrennt [50].

Einschließen in einer Matrix

Wie bereits beschrieben, müssen die Spots mit Zellen räumlich so voneinander getrennt sein, dass eine Kreuzkontamination ausgeschlossen ist. Hierfür wurden verschiedene Methoden entwickelt. Die einfachste wurde von Rasi Ghaemi *et al.*, 2013 verwendet, da sie das zellabstoßende PEG als Oberflächenpassivierung verwendet haben (Abb. 3.1-6A) [106]. Aus PEG können zudem mittels Mikroabformungs-Soft-Lithografie auch Mikrowells geformt werden. Das bedeutet, es wird ein Stempel aus Silikon verwendet, der in eine PEG-Diakrylatlösung auf einem vorbehandelten Glas-Slide getaucht wurde. Die PEG-Diakrylatlösung wird mit Hilfe von UV-Strahlung auspolymerisiert und bildet nach Entfernen des Stempels einen Mikrowell-Microarray. In den Vertiefungen werden die Zellen dann kultiviert (B) [91; 86]. Ebenfalls auf Soft-Lithografie griffen Kim *et al.*, 2006 zurück, die Mikrowell-Microarrays aus Hydrogel anfertigten [70]. Das Hydrogelgitter, das Zawko *et al.*,

2010 mit Hilfe eines in Alginatlösung getauchten Nylon-Gewebes auf der Slide-Oberfläche durch Luft- und Gefriertrocknung erzeugten, war sogar zur Vereinzelung von Zellen geeignet (C). Es fanden sich jedoch auch Vertiefungen, in denen keine oder mehrere Zellen waren [154].

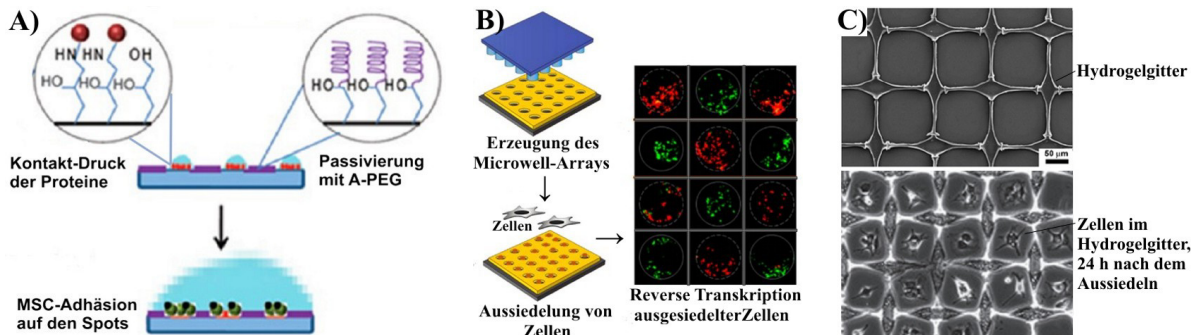


Abb. 3.1-6: Schematische Darstellungen der verschiedenen Methoden, um Zellen mit einer Matrix voneinander abzutrennen. A) zeigt eine Kombination aus Proteinen, die die Zelladhäsion fördern, und einer PEG-Passivierung (modifiziert nach [106]). B) zeigt ein Verfahren, dass einen Stempel verwendet, um Vertiefungen zu erzeugen, in denen die Zellen revers transkribiert wurden (rote und grüne Signale) (modifiziert nach [91; 86]) und C) zeigt ein Gitter aus Alginat-Hydrogel (oben), in dem die Zellen abgetrennt voneinander wachsen (unten) (modifiziert nach [154]).

Gel-Verkapselung

Eine Methode, Zellen effizient voneinander zu trennen und doch auf demselben Microarray zu testen, ist die Einkapselung der Zellen. Dieses Verfahren hat noch einen weiteren entscheidenden Vorteil. Wachstum, Stoffwechsel, die Morphologie und Organisation adhärenter Zellen sind in einer *in-vitro* Kultur grundlegend verschieden von den Prozessen *in-vivo*. Im Körper wachsen Zellen nicht als zweidimensionale Gebilde, sondern bilden dreidimensionale Strukturen. Dieses kann *in-vitro* nachgeahmt werden. Epithelzellen zeigen z.B. bei einem Vergleich nach der Kultivierung in einer 2D und 3D Umgebung große Unterschiede in der Gen- und Rezeptorexpression, Proliferation, Zellkommunikation und im Differenzierungsverhalten [116; 142; 125]. Daher haben Microarrays, die das Wachstum von Zellen in 3D-Verbänden erzeugen, stark an Bedeutung gewonnen. Verschiedene Verfahren sind mittlerweile etabliert. Insbesondere die Einkapselung in eine Alginatmatrix oder Hydrogel-Mikrostrukturen wurden beschrieben. Die Zellen werden hierbei in den Lösungen dieser Polymerbildner suspendiert, wobei häufig adhäsionsfördernde Zusätze wie z.B. RGD-Peptide hinzugesetzt werden [73]. Die Zell-Gel-Suspensionen werden dann mit Hilfe eines kontaktfreien Nanoplotters auf den Microarray gedruckt und anschließend polymerisiert. Im Falle der Alginatmatrix kann die Polymerisation dadurch erfolgen, dass der Microarray vor dem Spotten der Zellen mit einer Bariumchlorid/Poly-L-lysin (BaCl_2/PLL)-Lösung bedruckt wurde. PLL unterstützt die Anhaftung des Alginats, welches durch das BaCl_2 auspolymerisiert (Abb. 3.1-7A) [75; 83]. Hydrogel aus PEG wird mit UV-Strahlung auspolymerisiert. Wird die Zell-PEG-Suspension in ein Netzwerk aus Mikrokanälen gegeben, kann auch

ohne einen Spotter eine Mikrostruktur erzeugt werden, in der verschiedene Zellen auf einem Microarray räumlich getrennt werden (B) [73]. Auch die oben genannten PEG-Microwells können für die Erzeugung von 3D-Kulturen verwendet werden. Diese Microwells werden z.B. mit embryonalen Stammzellen besiedelt und so embryonale Körper (Zellaggregate) erzeugt (C) [66; 86].

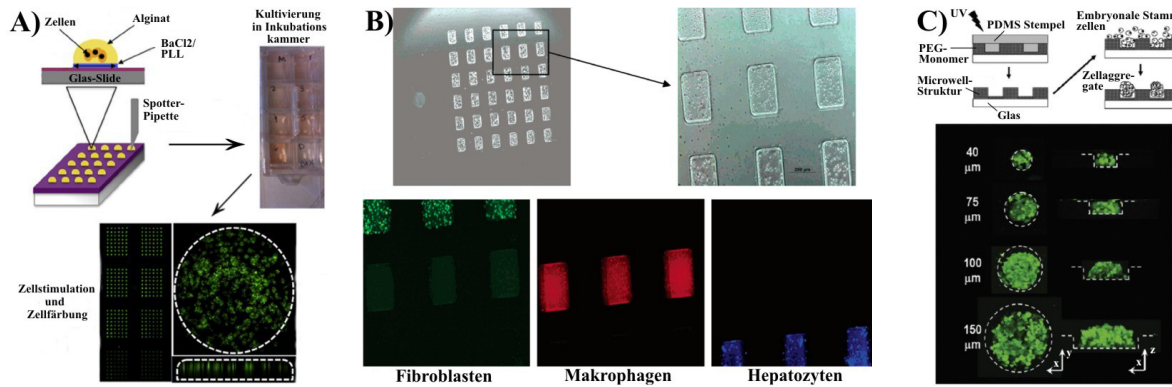


Abb. 3.1-7: Herstellung von 3D-Microarrays durch Einkapselung der Zellen in Alginate (A) und in PEG-Mikrostrukturen (B) sowie durch Aussiedelung von Stammzellen in PEG-Microwells (C). In A) wurde die Alginate-Zell-Suspension auf einen mit BaCl₂/PLL-besetzten Chamber-Slide gespotet und die Zellen angefärbt (grün) (modifiziert nach [83]). In B) wurde die Mikrostruktur aus einer Zell-PEG-Suspension mit Hilfe von Mikrokanälen erzeugt und die verschiedenen Zelltypen unterschiedlich angefärbt, grün: Fibroblasten, rot: Makrophagen, blau: Hepatozyten (nach [73]). In C) wurden Zellaggregate von embryonalen Stammzellen in PEG-Microwells erzeugt und diese angefärbt (grün) (nach [66]).

3.2 Zelluläre Testsysteme

Eine Vielzahl von Systemen, mit denen Zellen untersucht werden, ist auf dem Markt erhältlich. Die meisten Methoden, um Zellen zu untersuchen, basieren auf einer kolorimetrischen Detektion und Auswertung. Diese zellulären Testsysteme können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen werden Testsysteme, die alle Zelltypen gleich behandeln und nur zwischen Zuständen (wie lebend oder tot) unterscheiden können, für die Bestimmung der Proliferation und Anwesenheit einer Zelle oder zytotoxischer Effekte von Molekülen verwendet. Zum anderen werden Detektionssysteme, die auf Biomolekülen wie Antikörpern oder Aptameren basieren, verwendet, um spezifisch an bestimmte Zellen oder Organellen zu binden und diese so zu markieren. Mit Hilfe dieser immunzytochemischen Methode kann z.B. der Phänotyp und der Differenzierungsstatus einer Zelle bestimmt werden. Auf die Grundlagen dieses Verfahrens wird im Folgenden detaillierter eingegangen, wobei zum einen die Detektionsmoleküle vorgestellt werden und zum anderen alternative Farbstoffe genannt werden.

3.2.1 Detektionsmoleküle für zelluläre Systeme

Die Immunhistochemie (IHC) von Gewebe und die Immunzytochemie (ICC) von Zellen unterscheiden sich nur in dem Material, das mit diesen Verfahren untersucht wird. Die verwendeten Detektionsreagenzien sind gleich oder wurden etwas stärker für die jeweilige Anwendung optimiert. Als Detektionsmoleküle werden in diesen zellulären Testsystemen seit 1941 klassischerweise Antikörper verwendet, die mit einem Farbstoff markiert sind [29]. Auf diese Weise lassen sich gezielt ausgewählte Antigene einer Zelle untersuchen, da die Antigen-Antikörper Erkennung hochspezifisch ist. Es wurde eine Vielzahl von Antikörper-Markierungen etabliert, die von Fluoreszenz-Markierungen in verschiedenen Farben, über Enzyme, deren Reaktionsprodukte unter einem konventionellen Lichtmikroskop sichtbar sind, bis hin zu radioaktiven Isotopen reichen [103]. Polyklonale Antikörper werden hergestellt, indem ein Wirt (Maus, Kaninchen) mit dem Antigen immunisiert wird. Antikörper, die so hergestellt werden, sind gegen verschiedene Epitope des Antigens gerichtet. Mit Hilfe von Hybridomazelllinien werden hingegen Antikörper hergestellt, die nur gegen ein spezifisches Epitop des Antigens gerichtet sind. Diese werden daher monoklonal genannt und bevorzugt verwendet, um unspezifische Bindungen infolge von Kreuzreaktionen zu verhindern. In der Immunzytochemie werden Antikörper eingesetzt, die hochspezifisch und sehr stark an ihr Antigen binden. Die Detektion von Antigenen mittels Antikörpern kann entweder direkt oder indirekt erfolgen. In der direkten Methode wird das Antigen in einem Ein-Schritt-Prozess von einem farbstoffmarkierten Primärantikörper detektiert. Die indirekte Methode besteht aus zwei Schritten. Im ersten Schritt bindet ein primärer unmarkierter Antikörper spezifisch an das Antigen. Im zweiten Schritt wird dieser primäre Antikörper von einem zweiten farbstoffmarkierten Antikörper detektiert, der gegen die Immunglobulinspezies des ersten Antikörpers gerichtet ist. Da hierbei zwei Sekundärantikörper an den primären Antikörper binden können, wird die Sensitivität des Assays erhöht [30].

Eine Alternative zu den Antikörpern in der molekularen Erkennung stellen Aptamere dar. Dabei handelt es sich um kurze Oligonukleotide, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Faltung an ihr Zielmolekül hochspezifisch binden. Sie wurden 1990 von drei Forschergruppen unabhängig entdeckt und nach dem lateinischen „*aptus*“ für „passend, genau angepasst“ benannt [138; 37; 109]. Ihrer Herstellung in einer chemischen Synthese haben es diese Moleküle zu verdanken, dass sie mit einer minimalen Batch-to-batch Variation und frei von Toxinen oder immunogenen Substanzen hergestellt werden können. Dieses ist für Antikörper nicht garantiert. Die Aptamere werden in einem *in-vitro* Prozess, genannt SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), unter definierten

dabei aber frei wählbaren Bedingungen aus DNA- oder RNA-Bibliotheken selektiert [138]. Aptamere können gegen komplexe Strukturen wie Proteine/Enzyme [138; 132], Wachstumsfaktoren [62], Antikörper [52] oder Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle [63] auf der Zellmembran gerichtet sein. Sie werden aber auch für die Detektion von kleineren Molekülen, wie Peptiden [89], Vitaminen [129], pharmazeutischen Wirkstoffen [78], Toxinen [16] oder Nukleotiden [59] verwendet. Es wurden bereits Aptamere selektiert, die wie Antikörper in der Therapie von Krankheiten wie Krebs eingesetzt werden, indem sie an Zelloberflächenbiomarker binden [27]. Es können sogar Aptamere gegen lebende Zellen mittels Cell-SELEX selektiert werden (siehe Abb. 3.2-1A) [156]. Dies ist dann vorteilhaft, wenn für eine spezielle Untergruppe eines Zelltyps (z.B. Krebszellen) die spezifischen Biomarker nicht bekannt sind. Die Aptamere werden direkt gegen die Zellen selektiert, ohne den Biomarker identifizieren oder zur Verfügung stellen zu müssen. Sie bestehen aus einer Random-Region einer zufälligen z.B. 40 Nukleotide langen Basenabfolge, welche von definierten Primern aus 20-25 Basen eingeschlossen wird (B) [139]. Dadurch können sie mittels PCR amplifiziert werden. Einzelsträngige Oligonukleotide können eine Vielzahl von Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden [7]. Als Beispiel einer Sekundärstruktur ist in Abb. 3.2-1C) das in dieser Arbeit verwendete S15 Aptamer (vgl. Kapitel 4.4.4) gezeigt [156].

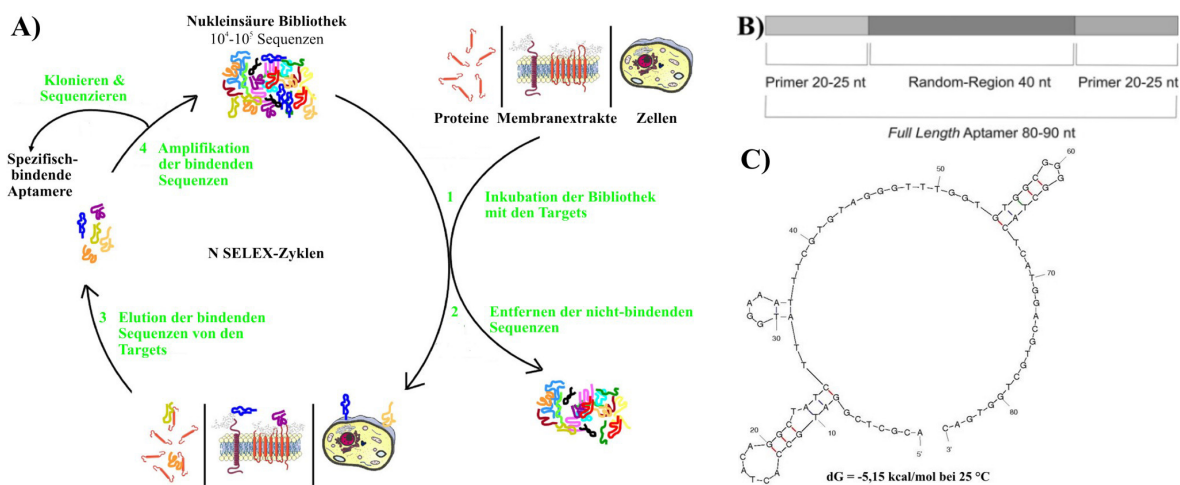


Abb. 3.2-1: Schematische Darstellung der Aptamer Selektion (A) (nach [26]) und des Aufbaus von Aptameren (B) [139] sowie der Sekundärstruktur (C) am Beispiel des S15 DNA-Aptamers gegen die A-549 Zelllinie (Aptamersequenz für die Berechnung der Sekundärstruktur mit dem [mfold-Web Server](http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold)¹ wurde [156] entnommen).

Die Bindung der Aptamere an ihre Targets kann dabei genauso affin und spezifisch sein wie die Antikörper-Antigen Bindung, oder kann diese sogar übertreffen [46]. Nanomolare bis hin zu picomolaren Bindungskonstanten sind veröffentlicht [105]. In Tab. 3.2-1 ist ein Vergleich von Antikörpern und Aptameren zusammengestellt, der die Vor- und Nachteile verdeutlicht.

¹<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>, RNA Institute, College of Arts and Sciences, University at Albany, New York

Tab. 3.2-1: Vergleich von Antikörpern und Aptameren.

Antikörper	Aptamer
Entwicklung <i>in-vivo</i> in Tieren oder Zellkulturen	Selektion in einem <i>in-vitro</i> Prozess
Antigenauswahl beschränkt	Auch toxische und nichtimmunogene Targets möglich
Chargenschwankungen	Hoch-reproduzierbar herstellbar
Herstellungsprozess sehr teuer	Kostengünstige Synthese
Nur unter physiologischen Bedingungen stabil	Selektionsbedingung an späteren Assay anpassbar und nahezu frei wählbar
Irreversible Denaturierung	Reversible Denaturierung
Begrenzte Haltbarkeit, Aktivitätseinbußen nach Regeneration	Lange Haltbarkeit, Regeneration möglich
Modifizierungen nur an undefinierten Positionen und mit möglichen Aktivitätseinbußen	Modifikationen an definierten Positionen möglich
IgG Antikörper sind bivalent (~150 kDa)	Meist monovalent (13-26 kDa)

Da der SELEX-Prozess relativ komplex ist, ist dieses der entscheidende Faktor bei der Auswahl des Detektionsmoleküls. Sind bereits Aptamere gegen ein Target selektiert und zeigen eine hohe Spezifität, finden sie zunehmend Anwendung. Targets, gegen die noch keine Aptamere selektiert wurden, werden weiterhin spezifisch mit markierten Antikörpern nachgewiesen.

3.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe als Markierung der Detektionsmoleküle

Fluoreszenz-Markierungen spielen bei der Untersuchung von zellulären Prozessen und komplexen biologischen Wechselwirkungen wegen ihrer hohen Sensitivität, geringen Kosten und im Vergleich zu radioaktiven Markierungen gut handhabbaren Sicherheitsregulierungen eine entscheidende Rolle. Somit ist die Entwicklung fluoreszierender, biokompatibler, nicht-toxischer sowie wasserlöslicher Materialien, die an Detektionsmoleküle (z.B. Antikörper) gebunden werden können, von großer Bedeutung. Antikörper und Aptamere können spezifisch an einen Zelltyp binden und werden mittels Farbstoffmarkierungen detektiert. Da Fluoreszenznachweise deutlich sensitiver sind als Absorptionsdetektionen, werden erstere meist bevorzugt. Jedoch können sie auf Formalin-fixierten Proben nur eingeschränkt angewendet werden, da diese aufgrund der Autofluoreszenz des Formalins grüne Hintergrundsignale zeigen [38; 56]. Am häufigsten werden die organischen Farbstoffe Fluorescein Isothiocyanat (FITC, EX_{494nm}/EM_{518nm} , grün), Rhodamin-Derivate (z.B. Texas Red, EX_{595nm}/EM_{615nm} , rot) und Phycoerythrin (PE, EX_{565nm}/EM_{575nm} , gelb-orange) verwendet. Nachteil dieser Farbstoffe ist, dass sie empfindlich gegen Dehydratation sind und ausbleichen. Farbstoffe der Alexa Fluorochromgruppe oder Cyanin-basierte Farbstoffe fluoreszieren stärker und sind zum Teil stabiler gegen Ausbleichen [103].

Als alternative Farbstoffe dienen anorganische Nanopartikel, wie die halbleitenden Quantum Dots (QDs). QDs bestehen meist aus einem CdSe oder CdTe Kern, der mit ZnS oder CdS

(Material mit einer breiteren Bandlücke) ummantelt ist, um die Photostabilität und die Quantenausbeute der Emission der Partikel zu erhöhen. Außerdem wird die Zytotoxizität nicht-ummantelter QDs, die durch die Freisetzung von Cadmiumkationen in oxidativer Umgebung entsteht, nach einer Ummantelung mit einer dünnen Schicht CdS (1-6 Lagen) deutlich reduziert [126; 35]. Je nach Anwendungsgebiet kann das Material und die Größe des Kerns gewählt werden (Abb. 3.2-2 A), die die optischen Eigenschaften bestimmen [82]. Für Gewebefärbungen werden z.B. QDs mit einer NIR-Emission bevorzugt, da so die Autofluoreszenz und Lichtstreuung des Gewebes unterdrückt wird und sehr tief in das Gewebe eingedrungen werden kann [71]. QDs zeigen im Gegensatz zu den gängigen organischen Fluorophoren eine intensive Photolumineszenz-Emission und hohe Photostabilität (B) sowie eine Quantenausbeute ihrer Emission mit großen Extinktionskoeffizienten [4; 128; 147].

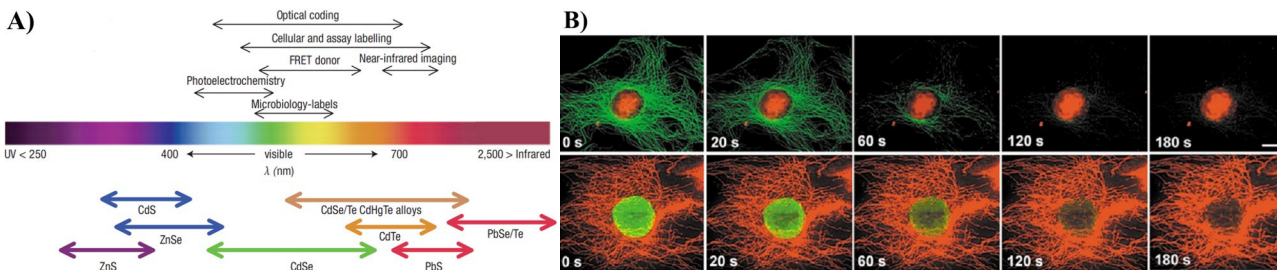


Abb. 3.2-2: Übersicht über Quantum Dot Kern-Materialien mit Angabe der verfügbaren Emissionswellenlängen und der Angabe der Anwendungsbereiche (A) [82], sowie eine Demonstration der Photostabilität (B) von Quantum Dots (rot) im direkten Vergleich mit einem AlexaFluor-Farbstoff (grün) [147].

Ihre Absorptionsspektren sind sehr breit, die Emissionsspektren hingegen sehr schmal und symmetrisch, sodass mehrere Strukturen gleichzeitig mit verschiedenfarbigen Nanopartikeln angefärbt werden können (Abb. 3.2-3 B, C) [31; 158]. Die Emissionswellenlänge der QDs hängt direkt von der Partikelgröße ab und kann bei der Synthese gesteuert werden (A). Ihre Größe entspricht mit 2-20 nm ungefähr der von mittelgroßen Proteinen [99]².

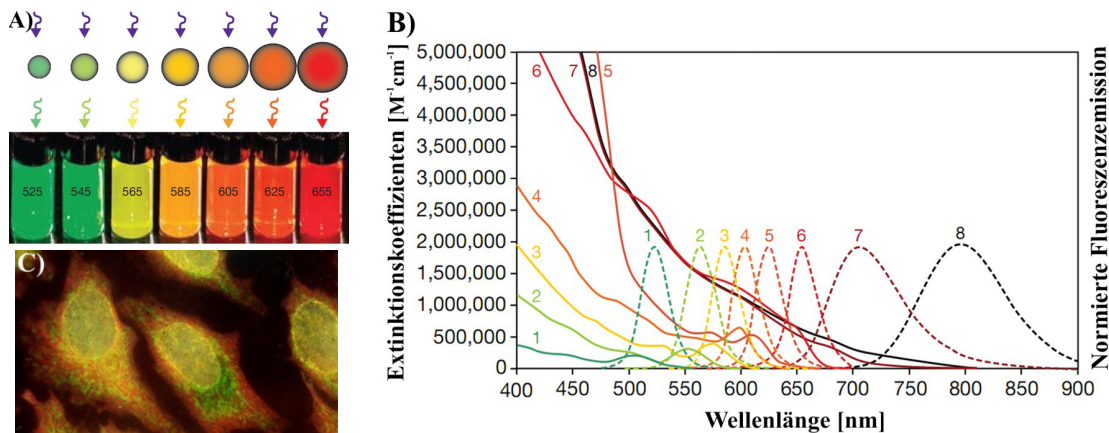


Abb. 3.2-3: Übersicht über die produzierbaren Größen und Emissionsmaxima (A) sowie der Absorptions- und Emissionsspektren (B) der Quantum Dots einer Synthese und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Multiplexingfärbung (C) [158]. (A) und B) sind modifiziert nach².

² The future of fluorescence – Qdot nanocrystal technology, www.lifetechnologies.com

Ein Vergleich der spektralen Eigenschaften von typischen organischen Farbstoffen (FITC, PE, PerCP-Cy5.5, A) und Quantum Dots ähnlicher Emissionswellenlängen (B) ist in Abb. 4.2-5 dargestellt. Das Beispiel zeigt die Verwendung der Farbstoffe in einer durchflusszytometrischen Messung unter Einsatz eines Zytometers, das beispielhaft über einen Anregungslaser mit einer Wellenlänge von 488 nm verfügt und mit je einem Filter (mit Bandbreite) im grünen (525/40), gelben (575/30) und roten (675/30) Fluoreszenzbereich ausgestattet ist.

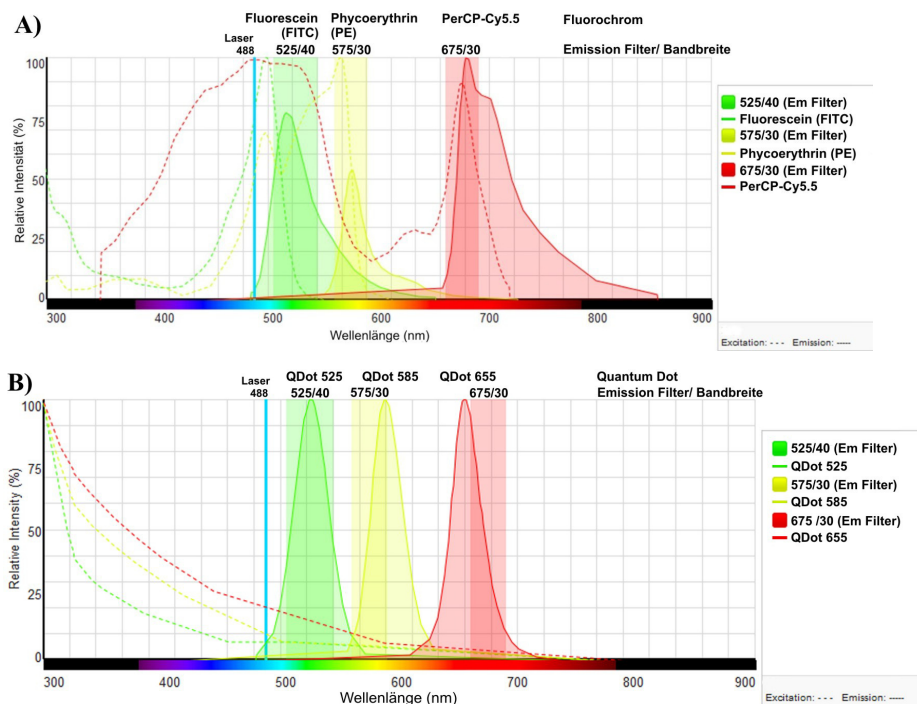


Abb. 3.2-4: Anregungsspektren (.....) und Emissionsspektren (—) der organischen Fluorochrome Fluorescein (FITC, grüne Linien), R-Phycocerythrin (R-PE, gelbe Linien) und PerCP-Cy5.5 (rote Linien) (A) sowie der Quantum Dots ähnlicher Emissionswellenlängen (B). Nach Fluorescence SpectraViewer, Life Technologies³.

In Abb. 4.2-5 wird sehr gut deutlich, dass bei der Durchflusszytometrie der *Spillover* beachtet werden muss. Dieser Effekt tritt immer dann auf, wenn die Emissionsspektren verschiedener Fluorophore überlappen, also dann wenn die Fluoreszenz eines Fluorophors auch in einem Detektor gemessen wird, der eigentlich für einen anderen Farbstoff bestimmt ist. Ein Multiplexing wird dadurch erschwert. Der Anteil der Emission, der in den einzelnen Filtern detektiert wird, ist in Tab. 3.2-2 zusammengestellt.

Tab. 3.2-2: Spillover der organischen Farbstoffe und Quantum Dots. Farbig hervorgehoben sind die Unterschiede im Spillover organischer Fluorophore und Quantum Dots. Nach Fluorescence SpectraViewer, Life Technologies³.

Fluorochrom/Filter	525/40	575/30	675/30	Fluorochrom/Filter	525/40	575/30	675/30
FITC	62,7 %	11,5 %	0,0 %	QD 525	81,0 %	1,9 %	0,0 %
PE	0,4 %	58,7 %	2,4 %	QD 585	0,1 %	48,3 %	0,0 %
PerCP-Cy5.5	0,0 %	0,0 %	32,2 %	QD 655	0,0 %	0,1 %	38,2 %

³<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>

Die QD-Synthese findet in organischer Phase, wie z.B. in Trioctylphosphinoxid (TOPO) oder Hexadecylamin (HDA), bei hohen Temperaturen statt. Dabei entstehen QDs, die mit diesen hydrophoben organischen Gruppen beschichtet sind. Die Kristalle (spärlich, kubisch oder stabförmig) bestehen aus hunderten Atomen und sind nur aufgrund der Oberflächengruppen kolloidal stabil. Diese Gruppen besitzen einen polaren Kopf, der mit der QD-Oberfläche interagiert und einen aliphatischen Teil, der die Kristalle in Dispersion hält. Störungen dieser Anordnung führen zu Instabilität und Agglomeratbildung [80; 137]. Um die QDs biokompatibler und wasserlöslich zu machen, müssen sie mit einer Polymer-Beschichtung versehen werden (Abb. 3.2-5 A). Mittels eines Ligandenaustausches können ebenfalls elektrostatische Ladungen oder hydrophile Gruppen erzeugt werden, indem die hydrophobe Schicht ersetzt wird (B) [133; 22]. Als hydrophiles Segment, dass zudem unspezifische Bindungen an Zellen unterdrückt, wird häufig PEG verwendet [76]. Erst nach dem Phasentransfer können die für eine Zelldetektion nötigen Biomoleküle (z.B. Antikörper, Aptamere, Folsäure) an die eingeführten funktionellen Gruppen der Nanopartikel konjugiert werden.

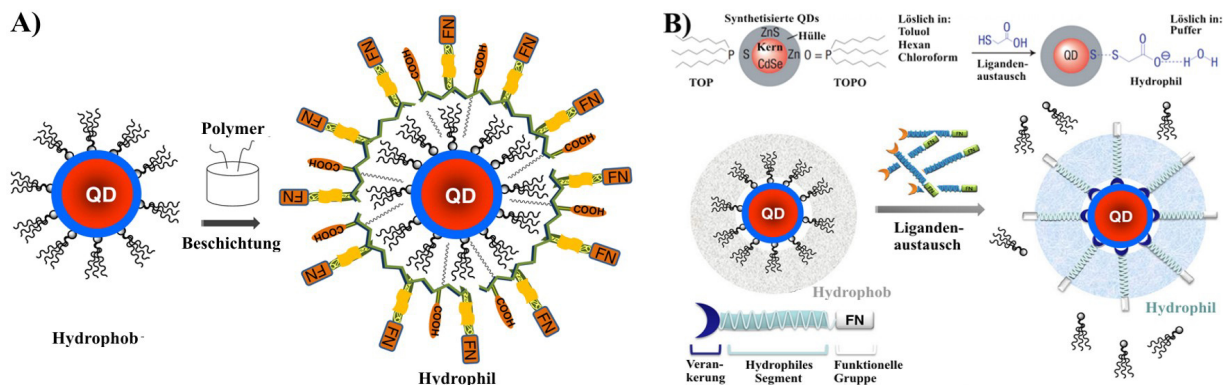


Abb. 3.2-5: Überführung der hydrophoben TOPO- oder HDA-beschichteten Quantum Dots in die wässrige Phase durch Beschichtung mit einem Polymer mit funktionellen Gruppen (A) oder Ligandenaustausch mit einem hydrophilen, bifunktionale Liganden bestehend aus einer Verankerung, einem hydrophilen Segment und einer funktionellen Gruppe (B). (Modifiziert nach [80; 82]).

Die Beschichtung mit Polymeren, die nötig ist, um diese hydrophoben Nanopartikel in die wässrige Phase zu überführen, bewirkt eine meist starke Abnahme der möglichen Quantenausbeute der QD Emissionen (40-45%). Daher werden Verfahren entwickelt, die QDs direkt in wässriger Phase bei niedrigeren Temperaturen zu synthetisieren [45]. Jedoch besitzen viele dieser wasserlöslichen CdTe-Kern-QDs (meist Thiol- beschichtet, z.B. mit Thioglykolsäure) nur sehr geringe Quantenausbeuten ihrer Emissionen (3-10%). Mit Hilfe einer CdS-Hülle und z.B. Thioacetamid als Ligand [100] oder ohne Hülle aber mit speziellen Liganden (z.B. Glutathion, Mercaptopropionsäure) und unter optimiertem pH-Wert konnte die Quantenausbeute der QD-Emission auf >40% gesteigert werden [77; 110]. Die Toxizität dieser wasserlöslichen QDs nimmt ebenso ab wie die der hydrophoben Nanopartikel, wenn

der Cadmium enthaltende Kern mit mehreren Hüllen z.B. aus CdS/ZnS versehen ist [126]. Wasserlösliche QDs sind für spätere Anwendungen besonders interessant, da sie aufgrund der Abwesenheit einer hydrophilen (Polymer-) Hülle deutlich kleiner als hydrophobe mit einem Polymer beschichtete QDs sind (Abb. 3.2-6) [127].

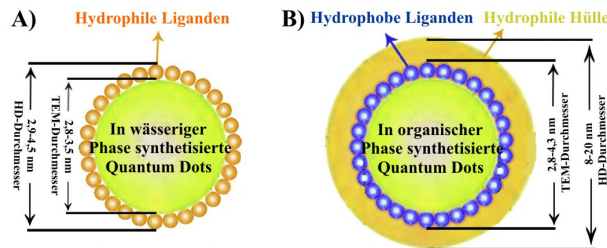


Abb. 3.2-6: Größenvergleich von in wässriger Lösung (A) und in organischer Phase (B) hergestellten QDs. (nach [127]).

QDs besitzen wie alle Nanopartikel eine große Oberfläche im Verhältnis zum Volumen, an die eine große Anzahl Moleküle gebunden werden kann [49; 44]. Es ist bereits eine Vielzahl von Antikörpern mit einer Quantum Dot-Farbmarkierung kommerziell verfügbar. Diese können nicht nur in der Zelldetektion verwendet werden, sondern z.B. auch für die Anfärbung von Western Blots (Abb. 3.2-7 A). Aufgrund ihrer schmalen Emissionsspektren werden QDs außerdem in Förster (*Fluorescence*) resonance energy transfer (FRET) Systemen verwendet [80; 82]. FRET ist ein photophysikalischer Prozess, in dem die Energie eines angeregten Chromophors (Donor) strahlungsfrei mittels Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf ein zweites Chromophor (Akzeptor) übertragen wird. Die FRET-Effizienz hängt hierbei von der Entfernung der zwei Farbstoffe ab, wobei das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen und die Dipolmomente parallel zueinander orientiert sein müssen. Der Akzeptor kann mit Hilfe eines Peptids an einem QD (Donor) gebunden sein. Da der QD zwar angeregt wird, diese Energie aber auf den Farbstoff überträgt, ist seine Emission mittels FRET gequencht. Wird die Peptidsequenz gespalten, erhöht sich der Abstand der Chromophore, die FRET Effizienz sinkt rapide und die Fluoreszenz des QDs wird wieder hergestellt. Dieses Prinzip wird auch für die Untersuchung von Proteaseaktivitäten in Zellen oder auf Biosensoren angewendet [28; 104; 69].

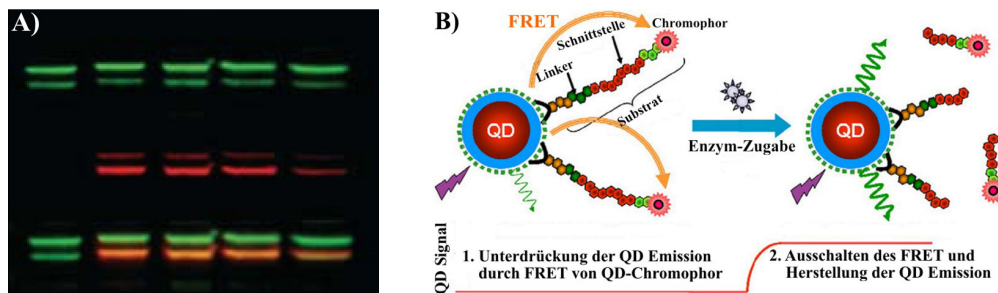


Abb. 3.2-7: Darstellung verschiedener Verwendungsmöglichkeiten von Quantum Dots. A) Mehrfarben-Western Blot durchgeführt mit QD-markierten Sekundäntikörpern (aus ², siehe S.20). B) Schematische Darstellung eines FRET-Systems, das für die Untersuchung der Proteaseaktivität in Zellen verwendet wird (nach [80]).

Eine andere Anwendung von Quantum Dots ist ihre Verwendung als Trägermaterial. Ihre Fähigkeit von lebenden Zellen aufgenommen zu werden, macht sie als Trägermaterialien für Gene, Wirkstoffe oder andere Moleküle interessant [82]. In Kombination mit einem zellspezifisch bindenden Liganden, sind so gezielte Stimulationen von Zellen möglich.

3.3 Spezifische Zellmembran-Biomarker

Auf der Zelloberfläche befinden sich verschiedene Moleküle (insbesondere Proteine), die von Zelltyp zu Zelltyp und Gewebeherkunft zu Gewebeherkunft variieren und somit als spezifische Marker verwendet werden können. Diese Biomarker spielen bei der eindeutigen Identifizierung von Zellen und Geweben eine große Rolle und können auch für die Detektion von Krebszellen dienen. Für eine erfolgreiche Therapie ist die frühest mögliche Erkennung der Erkrankung essenziell. Daher ist die Diagnose auf Verfahren angewiesen, die hochspezifisch und hochsensitiv sind. Aussagen über den Therapieverlauf können dabei nicht nur auf der Gen-Ebene erstellt werden, sondern müssen auch auf Protein-Ebene erfolgen. Doch nicht nur für die Diagnose der Erkrankung, sondern auch für viele Therapieansätze werden zellspezifische Biomarker verwendet. Drei dieser klinisch relevanten Marker, gegen die erfolgreich Detektionsmoleküle in der Therapie eingesetzt werden (bekanntestes Beispiel: der Trastuzumab Antikörper gegen HER2 in der Brustkrebsbehandlung), werden im Folgenden vorgestellt. Diese werden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

3.3.1 *Epidermal growth factor* Familie

Die transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase Familie des ErbB (*erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*) oder EGF (*epidermal growth factor*) spielt eine wichtige Rolle während des Wachstums und der Entwicklung vieler Organe (z.B. Herz, Brustdrüsen, Zentrales Nervensystem). Zu der Familie der *humanen* EGFRs gehören vier Mitglieder: EGFR (EGF Rezeptor, auch bekannt als ErbB1 oder HER1 [Heregulin-1]) und HER2 (HER-2/neu) bis HER4 (Hereguline, Gene: erbB2, erbB3, erbB4). Alle Familienmitglieder bestehen aus einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne, einer kurzen α -helikalen Transmembran-Domäne und einer extrazellulären Ligand-Bindungsdomäne (Abb. 3.3-1B) [112; 150].

Diese Rezeptorfamilie wird durch eine Ligand-induzierte Dimerisierung aktiviert, wobei sowohl Homo- als auch Heterodimere gebildet werden, sodass eine Vielzahl von

Kombinationen möglich ist. Ein Dimerisierungsarm unterstützt diesen Vorgang (Abb. 3.3-1A,B) [101; 150]. HER2 benötigt als einziger Rezeptor keinen Liganden und kann immer eine Dimerisierung eingehen. Unter normalen Umständen erfolgt die Aktivierung zeitlich begrenzt durch die 16 Derivate des EGF-Peptids (wie z.B. EGF, TGF-alpha). Die Ligand-Bindung induziert die Dimerbildung, welche wiederum die Tyrosinkinase-Domäne durch Phosphorylierung aktiviert und so Bindungen von verschiedenen Signalmolekülen ermöglicht. Die verschiedenen ErbB-Dimere aktivieren hierbei unterschiedliche Signalmoleküle [112; 150]. Eine Fehlfunktion der ErbB Signalkaskade des Rezeptors (meist unter Beteiligung von EGFR oder HER2) führt zur Tumorbildung und -streuung in Geweben der Brust, der Eierstöcke, des Gehirns, des Verdauungstraktes und der Prostata [130]. Diese sind zudem bei einer Überexpression von HER2 (185 kDa) mit einem schlechten Therapieausgang verknüpft, da ErbB2 als Schlüsselgen für das Zellüberleben und -wachstum gilt [88]. So werden die Signalkaskaden der Mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) und der PI3-Kinase (durch ErbB3) eingeleitet. Eine Aktivierung der PI3K-Kaskade verhindert die Apoptose und unterstützt somit das Überleben von Krebszellen, die MAPK-Kaskade (unter Beteiligung der Moleküle RAS, RAF und ERK) erhöht die Gen-Transkription und Zellteilung (Abb. 3.3-1A). Abhängig von den jeweiligen Zelltypen fördert eine Aktivierung der ErbB-Rezeptoren die Proliferation, Adhäsion, Differenzierung oder sogar Apoptose. Daher führt eine Rezeptor-Überexpression oder Fehlfunktion der Rezeptor-Aktivierung insbesondere im Brustgewebe und der Lunge zu einer verstärkten Krebszellbildung [150].

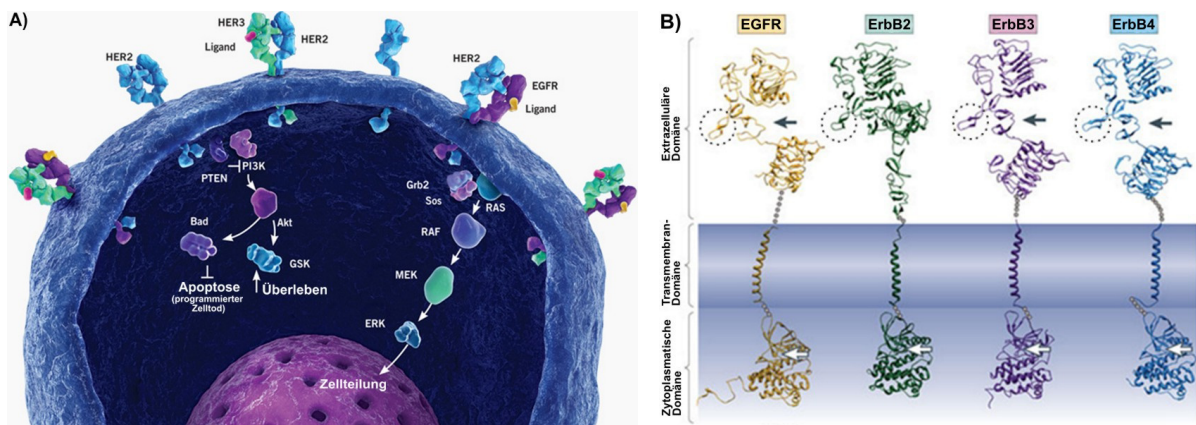


Abb. 3.3-1: Schematische Darstellung der PI3K- und MAPK-Kaskade (A) und der Sekundärstrukturen aller EGFR-Familienmitglieder (B). In A) sind die EGF-Rezeptoren lila, HER2-Rezeptoren hellblau und HER3-Rezeptoren grün dargestellt, die jeweiligen Liganden von HER3 und EGFR sind in pink oder gelb an den Rezeptoren gebunden (nach Genentech BioOncology, Roche⁴). In B) sind die Dimerisierungsarme mit einer gestrichelten Linie umkreist und die Bindungsstellen der Liganden sowie Signalmoleküle mit einem Pfeil markiert (nach [150]).

⁴ <http://www.biooncology.com/biological-pathways/her-signaling>

3.3.2 FOLR1

Der Folat-Rezeptor α (FOLR1) ist ein membrangebundenes Protein, das mit hoher Affinität Folat bindet und in die Zellen transportiert. Folat ist essenziell für den Zellmetabolismus. Es ist wichtig für die DNA-Synthese und Replikation, Zellteilung, Wachstum und das Überleben [25]. Daher wird es insbesondere von sich schnell teilenden Krebszellen aber auch von gesunden Zellen benötigt. Die Folat-bindenden Proteine werden in zwei Gruppen unterteilt: Niedrig-affine *reduced folate carrier* (RFC), die einen in beide Richtungen arbeitenden Anionenaustausch-Mechanismus für den Folat-Transport verwenden, und hoch-affine Folat-Rezeptoren, die Folat binden und mittels Endozytose aufnehmen [54; 107]. Es sind drei Isoformen des Folat-Rezeptors bekannt (α , β , γ), der über ein Glykosylphosphatidylinositol verankert ist und mit unterschiedlichen gewebespezifischen Verteilungen auftritt [9]. Folat-Rezeptor α wird in gesunden Zellen nur begrenzt exprimiert, wird aber von verschiedenen Epithel-Tumoren (z.B. Eierstock-, Gebärmutterhalskrebs) stark überexprimiert [96]. Die Expression nimmt zudem in Eierstockkrebszellen mit dem Grad der Tumorentwicklung zu und ist mit abnehmenden Überlebenschancen verbunden [134]. Die Bindungsaffinität des Folat-Rezeptors α für oxidiertes Folat (Folsäure) ist sehr hoch und liegt mit einer Bindungskonstanten von $K_d < 1$ nM bei physiologischen Konzentrationen. Für reduzierte Folate (z.B. 5-mTHF) ist sie ebenfalls hoch ($K_d = 1-10$ nM) [107]. Im Gegensatz dazu ist die Affinität des RFC, der von annähernd allen Zellen exprimiert wird, für Folsäure sehr gering (Michaelis-Konstante für die Bindung und den Transport $K_m = 200-400$ μ M). Reduzierte Folatvarianten werden hingegen mit hoher Affinität und bei hohen mikromolaren Konzentrationen gebunden ($K_m = 1-10$ μ M) [107; 67].

3.3.3 EpCAM (CD326)

Das Epithelzelladhäsions/-aktivierungsmolekül (EpCAM oder *Cluster of Differentiation* CD326 genannt) wurde bereits 1979 als eines der ersten tumorassoziierten Antigene (17-1A) beschrieben [55]. Gegen dieses Protein war auch der erste monoklonale Antikörper gerichtet, der in der Krebstherapie eingesetzt wurde [119]. Es erlangte jedoch nie die Aufmerksamkeit, die andere Biomarker (wie z.B. HER2) bei der Krebstherapie erhielten. Da EpCAM unabhängig voneinander mehrfach als hochimmunogenes tumorassoziiertes Antigen entdeckt wurde, sind zahlreiche Synonyme vorhanden, die einen Überblick über die Eigenschaften und das therapeutische Potenzial dieses Markers erschweren [10; 98]. Erst

2006 fand ein erstes internationales Symposium⁵ statt, auf dem die Bezeichnung vereinheitlicht wurde [10]. EpCAM ist ein potenzielles Target für die Behandlung der häufigsten humanen Krebsarten. Es wurde insbesondere als Marker für humane Darmkarzinome beschrieben [55], wird aber auch auf einer Vielzahl von humanen Epithelgeweben exprimiert und ist bei bösartigen Tumoren meist mit negativen Auswirkungen auf die durchschnittliche Überlebensrate verbunden [123; 143]. Insbesondere auf Epitheltumoren (z.B. Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen) [144] und bei der Entwicklung von Krebserkrankungen wird dieses Protein stabil überexprimiert. EpCAM ist ein Typ 1 transmembranes Glykoprotein (39 - 42 kDa), das als Tetramer mit vier identischen extrazellulär miteinander verbundenen Thyroglobulin- und EGF-ähnlichen Domänen vorliegt [10]. Es dient als epithelspezifisches interzelluläres Zelladhäsionsmolekül, ist jedoch nicht nur bei der Zelladhäsion sondern auch bei der Zellkommunikation, Migration, Proliferation und Differenzierung beteiligt [94; 136].

⁵ 1st International Symposium on EpCAM Function and Clinical Applications, 2006 in München

4 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Herstellung von Lebendzell-Microarrays, die als miniaturisierte Testsysteme zur spezifischen Detektion von Krebszellen mittels Quantum Dot-basierter Detektionsassays verwendet werden sollten. Hier sollte das Microarray-Verfahren vollständig auf lebende Zellen übertragen werden, indem die klassische Infrastruktur bestehend aus kontaktfreiem Nanoplotter, Microarray-Slides in Objektträgergröße und Microarray-Scanner genutzt wurde. Die Kombination aus automatisiertem Zellhandling, Bildauswertung und Miniaturisierung bietet die Möglichkeit Zell-Assays sowohl in das Multiplexing als auch in den Hochdurchsatz zu führen. Dabei konnte auf zusätzliche Geräte- und spezialisierte Zellchipinvestitionen (z.B. *Lab-on-a-chip*, Ibidi) verzichtet werden. Stattdessen wurde voll kompatibel zum DNA-Microarray-Equipment gearbeitet und ein allgemein anwendbares Herstellungsverfahren für Lebendzell-Microarrays entwickelt (siehe Kapitel 4.1). In Kapitel 4.2 ist die Charakterisierung mehrerer Zelllinien bezüglich ausgewählter Zellmembranproteine beschrieben. Die Ergebnisse wurden anschließend für eine Zelldiskriminierung mit Hilfe einer Oberflächenbeschichtung (siehe Kapitel 4.3) und für spezifische Zelldetektionen (siehe Kapitel 4.4) verwendet. Letzteres erfolgte durch verschiedene wasserlösliche Fluoreszenznanopartikel, die mit Antikörpern (siehe Kapitel 4.4.1 bis 4.4.3) und Aptameren (siehe Kapitel 4.4.4) versehen wurden. Schließlich wurden auf Lebendzell-Microarrays kultivierte Zellen mit den hergestellten fluoreszierenden Detektionsmolekülen angefärbt und so voneinander unterschieden (siehe Kapitel 4.5). Das Funktionsprinzip des kontaktfreien Spottens ist in Abb. 4-1 A dargestellt. Aus einer Vorlage wird die zu druckende Suspension in die Pipette aufgenommen und an einer definierten Position das gewünschte Volumen auf den Microarray gedruckt. Der Herstellungsprozess der Lebendzell-Microarrays und ihre Verwendung in dieser Arbeit ist schematisch in Abb. 4-1 B gezeigt.

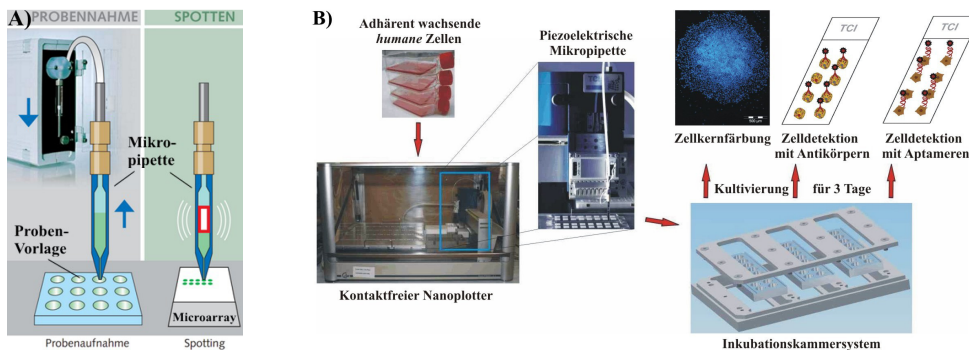


Abb. 4-1: Schematische Darstellung des Spotvorgangs (A)⁶ und Herstellungsprozesses von Lebendzell-Microarrays sowie ihre Anwendung in der Zelldetektion (B). Adhärenz Zellen werden geerntet und mittels der Mikropipette des kontaktfreien Nanoplotters auf Microarrays gespottet, die in Inkubationskammern fixiert sind. Nach einer Kultivierung über 3 Tage werden die Zellkerne mit DAPI und die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Aptameren gefärbt.

⁶ <http://www.gesim.de/upload/PDFs/NP-De-2011.pdf>

Die Ergebnisse der Experimente werden in den folgenden Kapiteln dargestellt und diskutiert. Methodisch beschrieben werden sie im Anhang in Kapitel 6.2.

4.1 Entwicklung von Lebendzell-Microarrays

Die Zellen wurden mit Hilfe eines piezoelektrisch betriebenen, kontaktfreien Nanoplotters (GeSim Nanoplotter NP2.1) auf die Microarray-Oberfläche gedruckt. Die abgegebene Flüssigkeitsmenge pro Tropfen während dieses Spotvorgangs betrug laut Herstellerangaben durchschnittlich 0,35 nL. Diese Flüssigkeitsmenge wird wie vom Hersteller vorgegeben in dieser Arbeit als „Tropfen“ bezeichnet. Die üblicherweise gedruckten Volumina lagen zwischen 0,02 µL und maximal 1,2 µL, was einer Tropfenanzahl von 50 bis 3200 Tropfen entsprach. Neben verschiedenen Spottereinstellungen wurden zweidimensionale Oberflächen mit unterschiedlichen Eigenschaften getestet. Alle folgenden Zellvitalitätsuntersuchungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

4.1.1 Herstellung verschiedener Lebendzell-Microarrays

4.1.1.1 Drucken von prokaryotischen Zellen

Während des piezoelektrischen Druckprozesses der Zellen auf die Microarray-Oberfläche mittels des kontaktfreien Verfahrens wirken starke Kräfte und hohe Geschwindigkeiten auf die Zellen in den Flüssigkeitstropfen. Daher sind die Zellen einem erhöhten Scherstress ausgesetzt, sodass das System zunächst auf seine generelle Eignung getestet wurde. Als erstes Testsystem wurde hierfür eine *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)-produzierende *E. coli* Kultur verwendet. Bakterien gelten als sehr robust und besitzen eine deutlich geringere Masse als Säugetierzellen, sodass die Auswirkungen des Druckprozesses auf diese Zellen geringer sein sollten als auf Säugetierzellen. Da nur die vitalen Bakterien das EGFP produzieren können, zeigt eine Zunahme des Fluoreszenzsignals die Vitalität der Kolonie an. Nahm die Fluoreszenzintensität und die Größe der auf einen Microarray gedruckten Bakterienkultur zu, konnte davon ausgegangen werden, dass die Bakterien das Spotten überlebt hatten. In dieser Arbeit sollte die Auswertung der Microarrays mit Hilfe eines DNA-Microarray-Scanners erfolgen. Da die Bakterien für die Scannerauflösung zu klein waren, unterstützte die EGFP-Expression zusätzlich die Detektion der Bakterienkolonien. Das Plasmid mit dem EGFP-Gen (pTriEx-EGFP), das in die Bakterien transformiert wurde, wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Bornscheuer der Universität Greifswald

zur Verfügung gestellt, die Plasmidkarte ist im Anhang in Kapitel 6.1.6 gezeigt. Dieses Plasmid wurde für eine Vervielfältigung in den Stamm *E. coli* XL1-Blue transformiert, kultiviert und mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit aufgereinigt. Von jedem Schritt der Plasmidisolierung (Lyse, Säulendurchfluss, Waschschrift und Elution) wurden Proben genommen und auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen. In Abb. 4.1-1A) kann die Qualität der Aufreinigung überprüft werden. Die zentrifugierten Lysate zeigen für alle vier Kultivierungen die charakteristischen Banden der *supercoiled* und offen-zirkulären Plasmid-DNA. Drei Säulen zeigen eine deutliche Überbeladung mit Plasmid, weshalb die Säulendurchflüsse und zum Teil die Waschfraktionen nicht völlig frei von DNA sind. Insgesamt wird die hohe Ausbeute an isoliertem Plasmid deutlich. Das EGFP-Gen wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI aus dem isolierten Plasmid ausgeschnitten, um zu bestätigen, dass es sich tatsächlich um das EGFP-Plasmid (6376 bp) handelte. Die Ergebnisse des Restriktionsverdaus sind in Abb. 4.1-1B) dargestellt und zeigen Fragmente der entsprechenden Größen (859 bp und 5517 bp). Die Schnittstellen können der Plasmidkarte im Anhang Kapitel 6.1.6 entnommen werden.

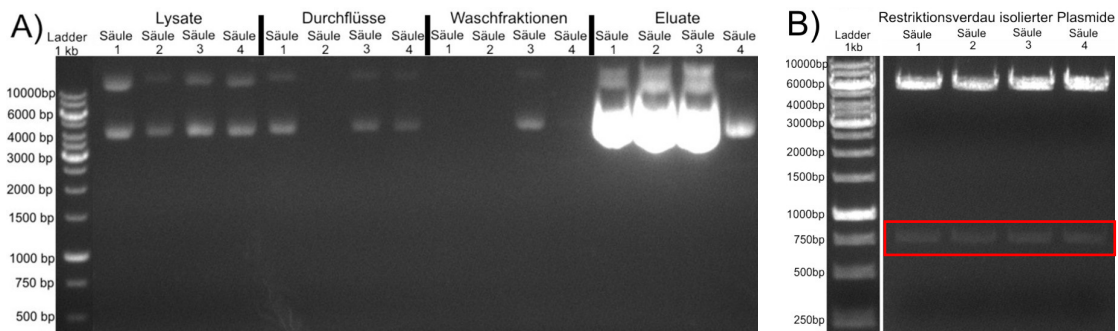


Abb. 4.1-1: Agarosegele der Plasmidaufreinigung (A) und des Restriktionsverdaus der isolierten Plasmide (B). In Spur 1 ist jeweils ein 1 kb DNA-Größenstandard gezeigt. Es wurden vier Kultivierungen transformierter *E. coli* XL1-Blue aufgereinigt und Proben der Lysate, Durchflüsse, Waschfraktionen und Eluate aufgetragen. Das isolierte Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI geschnitten (B Spur 2-5). In B) wurden der Übersichtlichkeit halber nur die relevanten Spuren gezeigt. Rot-markiert sind die Banden des ausgeschnittenen EGFP-Gens.

Das amplifizierte und aufgereinigte Plasmid wurde anschließend in *E. coli* BL21 (DE3) *single* transformiert, einem Stamm, der insbesondere für die Produktion rekombinanter Proteine geeignet ist. Die EGFP-Überexpression wurde bei einer Optischen Dichte (OD_{580}) von 0,8 rel. AU mit IPTG induziert. Nach 4,5 h wurde eine Probe unter dem Mikroskop nach einer UV-Anregung untersucht (siehe Abb. 4.1-2). Die Bakterien erscheinen aufgrund ihrer EGFP-Produktion grün.

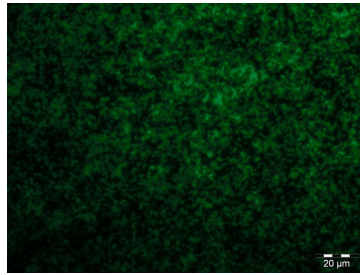


Abb. 4.1-2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der EGFP-produzierenden *E. coli* BL21 (DE3) single Kultur. Der Maßstab zeigt 20 µm.

Die Kulturbrühe wurde zentrifugiert und das Zellpellet für das Drucken der Bakterien auf einen Microarray in PBS-Puffer resuspendiert. Es zeigte ebenfalls eine grüne Fluoreszenz bei einer entsprechenden Bestrahlung mit UV-Strahlung. Es wurde ein abnehmendes Volumen (1600, 800, 400, 200, 100 und 50 Tropfen) dieser Suspension auf einen Glas-Objektträger gespottet. Der Microarray wurde bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm mit einem Microarray-Scanner ausgelesen. Hierbei wurden die Fluoreszenzsignale des GFPs detektiert, die mit dem gedruckten Volumen an Größe und Intensität zunahmten und eine runde Spotmorphologie aufwiesen (Abb. 4.1-3). Mit dieser Druckmethode können somit perfekte Spots erhalten werden und die Detektion mittels Microarray-Scanner ist sehr gut durchführbar.

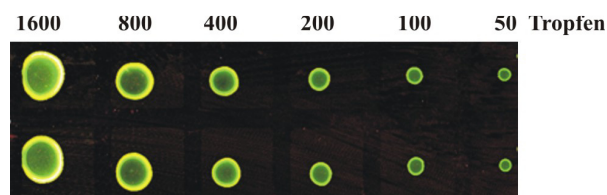


Abb. 4.1-3: Microarray, der mit einem abnehmenden Volumen einer EGFP-produzierenden *E. coli* BL21 (DE3) Suspension bedruckt wurde, deren EGFP-Signale bei einer Wellenlänge von 532 nm mittels Microarray-Scanner angeregt wurden.

Der Versuch wurde wiederholt, wobei die Volumina der *E. coli* Suspension auf einen Microarray gedruckt wurden, der dünn mit LB-Agar beschichtet wurde. Dieser Microarray wurde nach dem Spotten für 18 h bei 37 °C inkubiert und ebenfalls gescannt. Der LB-Agar wies eine starke Hintergrundfluoreszenz auf und konnte daher nicht ausgelesen werden. Unter einer manuellen UV-Bestrahlung waren auf dem Agar-beschichteten Microarray Spots erkennbar, die deutlich an Größe zu genommen hatten (Daten nicht gezeigt). Nach einer weiteren Kultivierung bei 37 °C für 24 h hatte sich die Spotgröße abermals verdoppelt. Die Bakterien haben den Druckprozess somit überlebt und wuchsen auf dem Microarray.

Die in PBS-Puffer suspendierten und auf eine Agaroberfläche gedruckten Prokaryoten konnten problemlos auf den Microarray gedruckt und kultiviert werden. Hierdurch zeigte sich die Anwendbarkeit des kontaktfreien Druckverfahrens, welches anschließend auf adhärent-wachsende Säugetierzellen (menschliche Zelllinien) übertragen werden sollte.

4.1.1.2 Drucken von eukaryotischen Zellen

Aufgrund der höheren Scherstresssensibilität vieler Säugetierzellen, wurde das kontaktfreie Verfahren zusätzlich für die Immobilisierung eukaryotischer Zelllinien getestet. Als Modellsystem wurde eine adhärente Zelllinie gewählt, die auch in den späteren Detektionsstudien in Kapitel 4.4 verwendet wurde. Hierbei handelte es sich um die *murine* Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3, welche mit einem EGFP-Plasmid (pEGFP-N1, Plasmidkarte siehe Anhang Kapitel 6.1.6) transient transfiziert wurde. Das Plasmid wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Schambach der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Eine klassische Transfektionsmethode eukaryotischer Zellen ist die Lipofektion mit Metafecten. Die negativ geladene DNA, die in eine Zelle eingeschleust werden soll, bildet mit den positiven Kopfgruppen des Liposoms spontan einen Komplex (Lipoplex), der mittels Endozytose von der Zelle aufgenommen wird. Die Membran des dabei entstandenen Endosoms löst sich auf und gibt die DNA frei, welche dann während der Mitose in den Zellkern diffundiert [153]. Die Lipofektion wurde dem während einer Masterarbeit⁷ optimierten Protokoll entsprechend durchgeführt und die Transfektionseffizienz nach 24 h mikroskopisch bestimmt. In Abb. 4.1-4 wird deutlich, dass NIH-3T3 Zellen für diese Transfektionsmethode ungeeignet sind, da auf dem abgebildeten dichtbesiedelten Bildausschnitt lediglich zwei Zellen erfolgreich transfiziert worden sind und grün fluoreszieren.

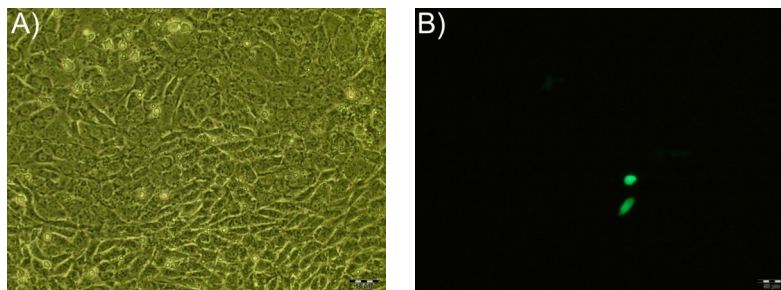


Abb. 4.1-4: Mikroskopaufnahme mittels Lipofektion mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfizierter NIH-3T3 Zellen. A) Hellfeldaufnahme, B) Fluoreszenzaufnahme. Die Aufnahmen wurden 24 h nach der Transfektion mit Metafecten erstellt. Der Maßstab zeigt 50 μm .

Da die Transfektion humaner embryonaler Nierenzellen (HEK-293) in einer vorherigen Arbeit erfolgreich durchgeführt wurde⁷, wurde diese Zelllinie für die weiteren Versuche verwendet. Für diese Zellen wurde die Polyfektion mittels Polyethylenimin (PEI, 25 kDa, linear) gewählt, die als ebenso effizient wie die Lipofektion beschrieben wurde. Die sehr starke Komplexbildung der DNA erfolgt hierbei mit den sekundären Aminen des PEI [3; 41]. Für die Polyfektion wurde das Protokoll des *GeneJuice Transfection Reagent* von Novagen verwendet und die Effizienz ebenfalls nach 24 h mikroskopisch bestimmt. Die

⁷ Masterarbeit, 'Expression des rekombinanten Wachstumsfaktors TGF- β in hochproduzierenden Säugetierzellen', M.Sc. Sabrina Baganz, 2013

Transfektion dieser Zelllinie war deutlich erfolgreicher (siehe Abb. 4.1-5), so dass sich diese Zellen für die Untersuchung des Druckens auf einem Microarray eignen. Die Transfektionseffizienz betrug ungefähr 50 %.

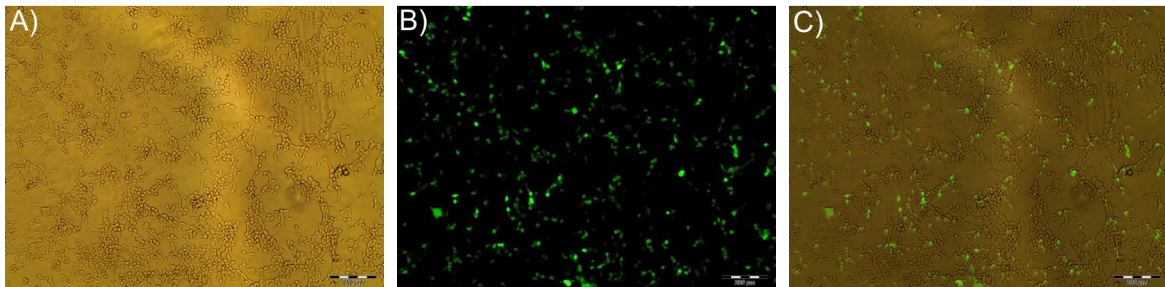


Abb. 4.1-5: Mikroskopaufnahme mittels Polyfektion mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfizierter HEK-293 Zellen. A) Hellfeldaufnahme, B) Fluoreszenzaufnahme. C) Überlagerung der Bilder A und B. Die Aufnahmen wurden 24 h nach der Transfektion mit PEI erstellt. Der Maßstab zeigt 200 μm .

Die Zellen wurden geerntet und auf einen Glas-Microarray in einem zunehmenden Suspensionsvolumen (50, 100, 200, 400, 800 und 1600 Tropfen) gedruckt und mit frischem Medium versehen. Sowohl direkt vor (Abb. 4.1-6 A) als auch nach der Immobilisierung (B) sowie nach einer Kultivierungsdauer von 2 Tagen (C) wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es ist erkennbar, dass der Anteil an grün fluoreszierenden Zellen auch nach einer Kultivierung für ein aussagekräftiges Auslesen mittels Microarray-Scanner zu gering war. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops konnten die Zellen dokumentiert werden. Zudem konnte auch die Betrachtung der Morphologie der nicht-transfizierten Zellen Auskunft über die Vitalität der Zellen geben. Insbesondere der Vergleich der Teilabbildungen von Abb. 4.1-6, auf denen die Zellen direkt nach dem Drucken (B, 1600 Tropfen) und nach einer Kultivierung von 2 Tagen (C, 1600 Tropfen) abgebildet werden, zeigt die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation auf, da sie sich deutlich vermehrt haben.

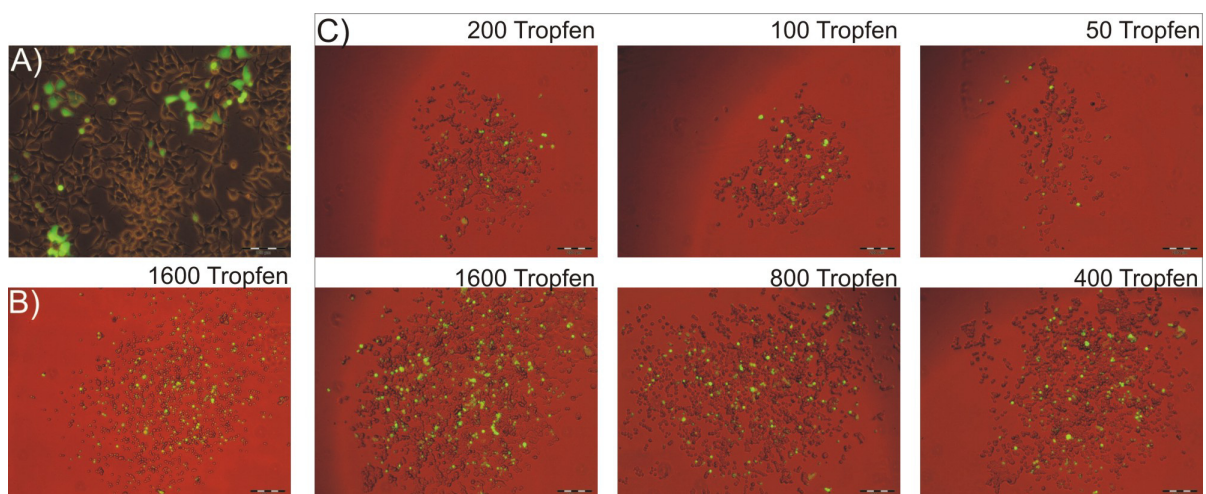


Abb. 4.1-6: Microarray, auf den ein zunehmendes Volumen einer EGFP-produzierenden HEK-293 Suspension gedruckt wurde, deren EGFP-Signale mittels Mikroskop detektiert wurden. A) Zellen der transfizierten HEK-293 Kultur vor dem Drucken, B) Zellen auf dem Microarray direkt nach dem Drucken (1600 Tropfen), C) Zellen der verschiedenen gedruckten Volumina nach einer Kultivierung von 2 Tagen. Der Maßstab zeigt 100 μm (A) und 200 μm (B, C).

In diesen ersten Versuchen konnten sowohl pro- als auch eukaryotische Zellen erfolgreich auf eine Microarray-Oberfläche gedruckt werden und auch eine Kultivierung über mehrere Tage konnte erfolgen. Die Anwendung der kontaktfreien Immobilisierungsstrategie auf *humane* Zellen und die Möglichkeit, kleine Suspensionsvolumina zu verwenden, waren daher gegeben. Im Folgenden wurde der Druckprozess optimiert und etabliert.

4.1.2 Optimierung der Immobilisierungsparameter, Spottereinstellungen und Oberflächen

Bevor mit einer Optimierung der Immobilisierungsstrategie begonnen wurde, wurde die am besten geeignete Mikropipette für den Nanoplotter ausgewählt. Es wurden drei Pipetten getestet, die sich in ihren Abmessungen und ihrer Fluidik unterschieden. Der Einfachheit halber erfolgte dieser Test mit Suspensionszellen. Diese müssen nicht von ihrer Kultivierungsoberfläche abgelöst werden und verbleiben länger in Suspension. Sollten sie sedimentieren, sind sie leicht wieder zu suspendieren. Adhärente Zellen müssten erneut enzymatisch vereinzelt werden, was den Stress für die Zellen erhöht. Mit Hilfe der in Tab. 4.1-1 genannten Mikropipetten des Spotters wurden jeweils 5 μL (12.500 Tropfen) einer *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Suspensionskultur in 15 μL Medium gespottet und die Zellvitalität mittels Trypanblau-Färbung ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass deutlich mehr ungefärbte (lebende) Zellen als Trypanblau-gefärbte (tote) Zellen vorlagen.

Tab. 4.1-1: Viabilität gespotteter Suspensionszellen unter Verwendung verschiedener Mikropipetten.

Mikropipette	Gespottete lebende Zellen	Gespottete tote Zellen	Vitalität [%]	Besonderheiten
Pipette (80x50 μm)	63	9	87,5	Probleme mit der Tropfenbildung
NanoTip Standard (55x55 μm)	743	11	98,5	
NanoTip HV (55x55 μm)	126	5	96,2	

Aufgrund der guten Zellvitalität wurde die Standardmikropipette NanoTip (55x55 μm) für die Anfertigung der Lebendzell-Microarrays ausgewählt.

Lebendzell-Microarrays haben den großen Vorteil, in der Analytik multiplexfähig zu sein. Hierdurch lassen sich Zellantworten auf spezielle Stimuli einfach und schnell beobachten. Es wurden bereits verschiedene Methoden entwickelt, in denen eine zellabstoßende Matrix für die räumliche Trennung der Zellen sorgt (siehe Kapitel 3.1.3). Eine Kultivierung oder Stimulation ist hier aber nur schwer möglich. Die meisten Zellen wachsen in einem speziellen Medium, was die gleichzeitige Untersuchung verschiedener Zellen und Testsubstanzen erschwert. Durch Inkubationskammern kann der Array in einzelne Felder

getrennt werden, von denen jedes für eine bestimmte Testsubstanz oder einen Zelltyp verwendet werden kann. In dieser Arbeit wurde eine Inkubationskammer mit 16 Vertiefungen (im Folgenden als „Well“ bezeichnet) auf dem Microarray-Slide befestigt, die zu untersuchenden Zellen wurden auf den Microarray gedruckt und anschließend kultiviert.

Der Druckprozess von lebenden Zellen und deren Weiterkultivierung über mehrere Tage wurde anhand der adhärennten Modellzelllinie (A-549, Lungenkarzinom Zelllinie) optimiert. Ziel dieser Optimierung war die Minimierung der zur Immobilisierung benötigten Volumina und Zellmengen bei gleichzeitiger Maximierung der Zellvitalität. Die gedruckten Zellen wurden über 3 Tage kultiviert. Dann wurden die Nuklei der mit Ethanol fixierten Zellen mittels des in die Nukleinsäuren interkalierenden Farbstoffes DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) gefärbt und die Fluoreszenzmikroskopaufnahmen qualitativ ausgewertet. Alle Bestandteile des Microarraysystems (Microarray-Oberfläche, Inkubationskammer) wurden vor den Versuchen sterilisiert. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgte diese Sterilisation mittels Autoklavieren. Sterilisierte Aldehyd-modifizierte Objektträger wurden unter sterilen Bedingungen in den Inkubationskammern befestigt, welche in sterilisierten Glas-Petrischalen mit Nocken gelagert und inkubiert wurden. Der Nanoplotter-Innenraum sowie die Mikropipette und alle weiteren Materialien wurden mit Isopropanol sterilisiert. Um die beste Immobilisierungsstrategie und das geringst mögliche einsetzbare Zellsuspensionsvolumen zu ermitteln, wurden verschiedene Volumen gespottet. Zum einen wurde direkt auf die Microarray-Oberfläche, zum anderen in 200 μL vorgelegtes Medium gespottet (siehe Abb. 4.1-7).

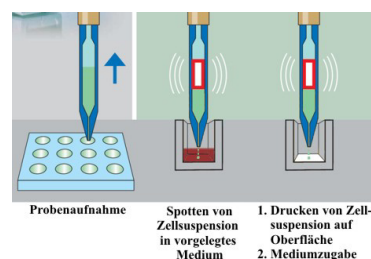


Abb. 4.1-7: Schematische Darstellung des Druckprozesses der Zellsuspension. Die Zellsuspension wurde entweder in ein Well mit Medium gespottet (Mitte) oder direkt auf die trockene Microarray-Oberfläche (rechts). Rechts wurde nach dem Spotten Medium hinzugegeben. (modifiziert nach⁸)

Während der direkten Immobilisierung der Zellen wurden die Dauer zwischen dem Spotten und dem Hinzufügen von 200 μL Medium (0 min; 1,5 min; 5 min) und die Luftfeuchtigkeit (keine Regulierung und 60 %) variiert. In Abb. 4.1-8 sind Aufnahmen von Zellen gezeigt, die durch Spotten eines steigenden Volumens immobilisiert wurden. Es ist gut zu sehen, dass auch beim Drucken von nur 200 Tropfen ($\sim 0,08 \mu\text{L}$) ein gut detektierbarer Spot entsteht.

⁸ <http://www.gesim.de/upload/PDFs/NP-De-2011.pdf>

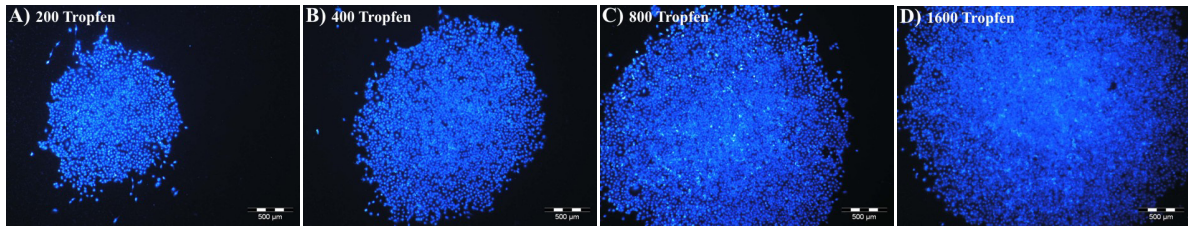


Abb. 4.1-8: Zunahme der Spotgröße und A-549 Zellzahl mit steigendem gespotteten Volumen. Der Maßstab zeigt 500 µm.

Wurde die Zellsuspension beim Drucken direkt auf eine Oberfläche gespottet und mit der Medium-Zugabe 1,5 min gewartet, entstanden annähernd runde Zellpopulationen (siehe Abb. 4.1-9 C). Zellen, die auf einen mit Medium überschichteten Microarray gespottet wurden, der direkt nach dem Drucken zurück in die Petrischale gelegt wurde, waren meist über das ganze Well verstreut (A). Wurde hingegen nach dem Spotten zu kurz mit der Medium-Zugabe gewartet (0 min), wurden die Zellen weggeschwemmt und es bildeten sich ebensolche Strukturen (B). Eine Verlängerung dieser „Trocknungszeit“ auf 5 min, führte zum vollständigen Austrocknen der kleineren Volumina (<800 Tropfen \equiv <0,3 µL), wodurch alle Zellen starben (D). Ebenfalls runde Populationen bildeten sich aus, wenn der Microarray nach dem Spotten von Zellen auf eine mit Medium überschichtete Oberfläche einige Zeit (~5 min) nicht bewegt wurde (E). Die Zellen konnten somit zu Boden absinken, bevor der Microarray in die Petrischale zurückgelegt wurde. Eine Erhöhung der Luftfeuchtigkeit während des Druckprozesses hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität (Daten nicht gezeigt). Eine „Trocknungszeit“ von 1,5 min eignete sich am besten, um eine gute Spotmorphologie und Zellvitalität zu erzeugen.

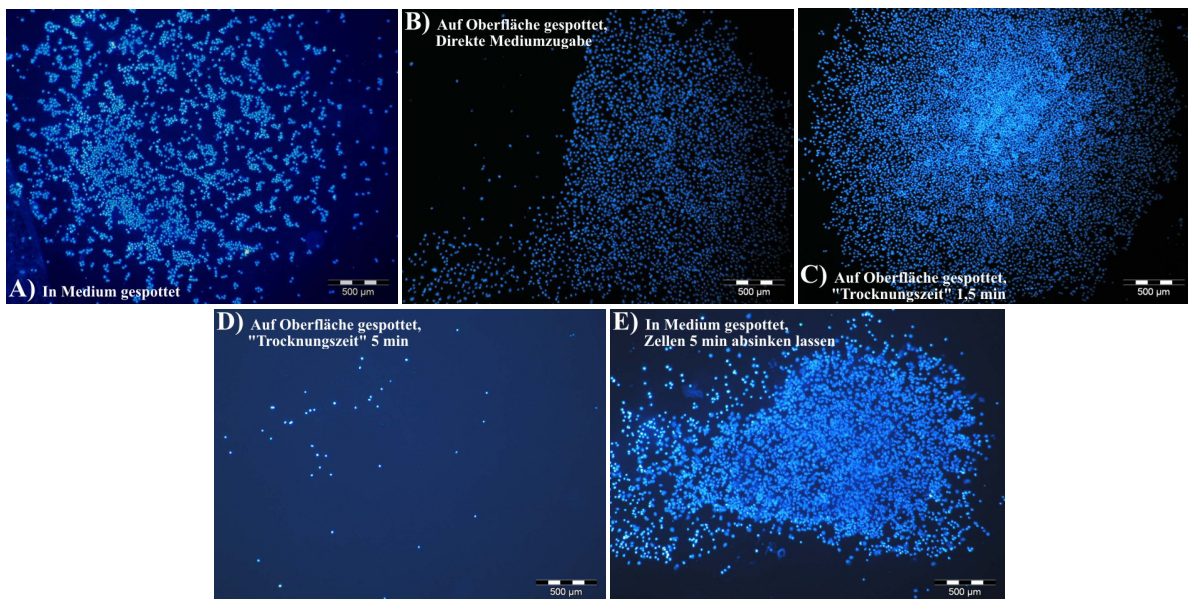


Abb. 4.1-9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von in Medium (A, E) und auf die Microarray-Oberfläche gespotteter Zellen (B-D) sowie die Einflüsse unterschiedlicher Wartezeiten zwischen Immobilisierung und Mediumzugabe. Der Maßstab zeigt 500 µm.

Nach der Optimierung der Immobilisierungsstrategie wurde die Zellvitalität mit Hilfe des CellTiter-Blue® (CTB) Cell Viability Tests (Promega) bestimmt. Das Reagenz enthält den blauen Farbstoff Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid), der von lebenden Zellen zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Resorufin (3-Oxo-3H-phenoxazin-10-ium-7-olat) reduziert wird. Eine direkte Quantifizierung der immobilisierten Zellen ist möglich, wenn simultan eine Konzentrationsreihe mit bekannten Zellzahlen betrachtet wird. Es wurden verschiedene Suspensions-Volumina (0, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 und 3200 Tropfen entsprechend einer ungefähren Zellzahl von 0, 57, 114, 228, 457, 915, 1830 und 3660 Zellen) in 96-Well-Platten gedruckt. Die Zellen wurden sowohl direkt auf die Oberfläche gespottet als auch in mit 100 µL Medium überschichtete Wells. 1,5 Minuten nach dem Spotten auf die trockene Oberfläche wurden 100 µL Medium zu den Zellen gegeben. 3 Stunden nach der Immobilisierung waren die Zellen adhärirt und wurden mit dem CTB-Reagenz versetzt. Aufgrund der für den Test relativ geringen Zellzahlen wurden die Fluoreszenzintensitäten erst nach einer Reaktionszeit von 23 h bestimmt. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte durch den Vergleich mit den Signalintensitäten der Zellkonzentrationsreihe. In Abb. 4.1-10 wird deutlich, dass die Vitalität der gespotteten Zellen nicht von der Methode abhängig ist. Zellen, die sowohl in mit Medium überschichtete Wells als auch direkt auf die Microarray-Oberfläche gespottet wurden, zeigen annähernd gleiche Vitalitäten. Diese nehmen jedoch mit abnehmendem Suspensionsvolumen von ungefähr 80 % auf knapp 50 % ab.

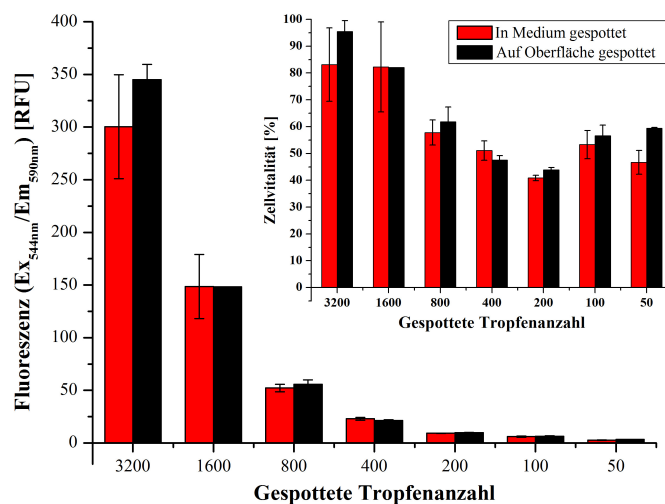


Abb. 4.1-10: Zellvitalität nach der Immobilisierung abnehmender Zellsuspensionsvolumina. Gemessene Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der gespotteten Tropfenanzahl. Insert: Berechnete Zellvitalität in Prozent in Abhängigkeit von der Tropfenanzahl. Jeweils rot: In mit Medium überschichtete Wells gespottete Zellen; schwarz: Direkt auf die Microarray-Oberfläche gespottete Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 4 Messungen.

Mit Hilfe der A-549 Modellzelllinie konnte somit eine reproduzierbare Druckmethode etabliert werden, die eine Zellvitalität von knapp 50 % bei sehr geringen Volumina (50 -

400 Tropfen \equiv 0,02 - 0,15 μL) bis hin zu ungefähr 80 % bei größeren Volumina (1.600 - 3.200 Tropfen \equiv 0,6 - 1,2 μL) zeigte. Mit Hilfe der Sterilisierung aller an dem Druckprozess beteiligten Komponenten (einschließlich Nanoplotter) konnten Kontaminationen erfolgreich verhindert werden. Hinsichtlich der Sterilität wurden die Microarrays direkt nach dem Drucken in die Petrischalen zurückgelegt. Für die weiteren Experimente wurde die hier optimierte Immobilisierungsprozedur verwendet: Direktes Spotten auf die Microarray-Oberflächen, keine Regulierung der Luftfeuchtigkeit und 1,5 min „Trocknungszeit“. Für sehr empfindliche Zellen ist aber auch das Spotten in vorgelegtes Medium gut geeignet, wenn den Zellen einige Minuten zum Absinken und Anhaften zur Verfügung gestellt werden.

4.1.3 Validierung von Oberflächenbeschichtungen mittels der Modellzelllinie A-549

Eine gute Zelladhäsion auf dem Substrat ist essenziell für biologische, medizinische oder pharmazeutische Anwendungen. Ist dieses Substrat zudem biokompatibel, nicht toxisch und liefert ein erhöhtes Potenzial zur Zelldifferenzierung oder Proliferation, findet es weite Anwendungen. Headicke *et al.*, 2003 haben gezeigt, dass Tissue-Microarrays, die mittels Immunfluoreszenzfärbung angefärbt wurden, mit Hilfe eines DNA-Microarray-Scanners quantitativ ausgewertet werden können. Daher sollte auch in dieser Arbeit die Detektion der spezifisch angefärbten Zellen mittels eines solchen Scanners erfolgen. Die Oberfläche der angestrebten Zell-Microarrays durfte somit nur eine geringe Autofluoreszenz aufweisen. Die in der Zellkultur üblicherweise für adhärente Zellen verwendeten Kulturflaschen und Gewebepplatten haben eine Polystyrol-Oberfläche. Polystyrol zeigt jedoch eine sehr hohe Autofluoreszenz. Daher musste eine andere Oberflächenbeschichtung gefunden werden. Autoklavierte Glasobjektträger dienten als eine Referenz mit geringen Hintergrundsignalen. Es wurden typische Zellkulturoberflächen aus Kollagen (selbthergestellte Kollagenbeschichtung und Kollagenfolie [Universität Tübingen]) und Poly-Lysin (selbthergestellte PLL-Beschichtung und Polysine[®]Slides [Thermo Scientific] sowie spezielle kommerzielle Adhäsions-Objektträger (Carl Roth GmbH) für erhöhte Zelladhäsion getestet und mit der Standardoberfläche Polystyrol verglichen. Der Vergleich der Oberflächen fand mit Hilfe des CellTiter-Blue Tests und durch Zellkernfärbungen mit DAPI statt. Die klassische Polystyrol-Oberfläche erzielte insgesamt die höchsten Fluoreszenzintensitäten und somit auch die höchsten Zellzahlen (zwischen 20 % und 35 % größer als auf Glas, siehe Abb. 4.1-11 A, Inlet). Die Polysine-Slides zeigten während einer Kultivierungsdauer von 4 Tagen annähernd die gleiche Zellzahl wie die Polystyrol-Platten (C) und waren damit besser als die

Glasobjektträger (B). Relativ schlecht schnitten die für erhöhte Zelladhäsion optimierten Adhäsionsslide ab (B). Nach einer Kultivierung von 72 h war die Zellzahl auf mit PLL-Lösung beschichteten Microarrays deutlich schlechter, als die auf den Polysine-Slides (C⁹). Im Vergleich mit den Glas-Slides befanden sich ebenfalls deutlich weniger Zellen auf der PLL-Oberfläche (A). Dieses könnte an einer ungenügenden Präparation der Oberfläche liegen, da die PLL-Lösung Hydrobromid enthält, welches von den Microarrays gewaschen werden muss, bevor die Zellen immobilisiert werden. Die Kollagenlösung erzeugte beim Trocknen eine sehr heterogene und unregelmäßige Oberfläche, was die große Standardabweichung erklärt (A). Die Ergebnisse wurden durch Zellkernfärbungen bestätigt (D-F). Auffällig war, dass sich auf den Polylysine-Slides die Zellkerne nicht wie auf Glas gleichmäßig verteilen sondern Zellgruppen und Lücken entstanden (F).

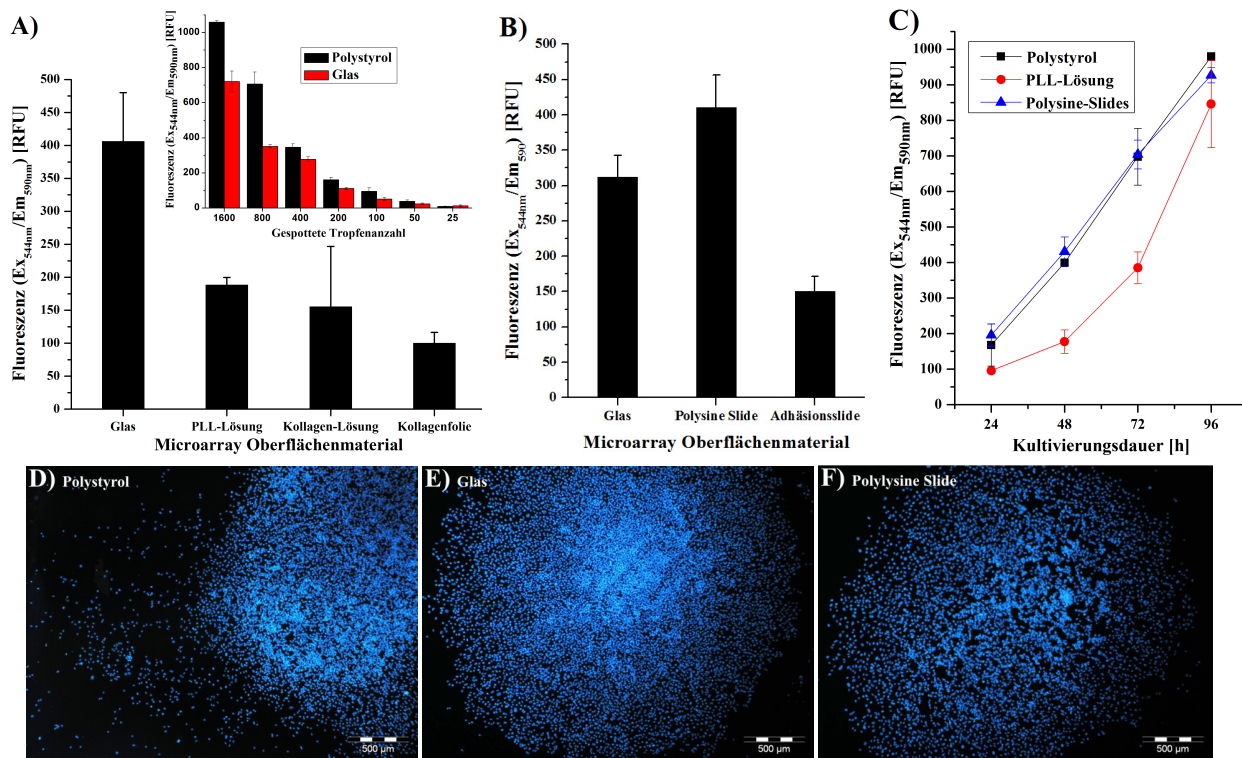


Abb. 4.1-11: Mittels CellTiter-Blue Test ermittelte Vitalitäten der A-549 Zellen auf verschiedenen Oberflächen (A-C⁹) sowie DAPI-Zellkernfärbungen (D-F), die Aufschluss über Zellverteilung und Spotmorphologie geben.

Die ermittelte Zellzahl auf der Kollagenfolie ist zwar verglichen mit Glas relativ niedrig. Die Folie stellt jedoch die Oberfläche dar, auf der die Zellen am besten adhärten und auch nach starkem Waschen nicht abgelöst wurden. Daher wurde die Immobilisierung von Zellen auf dieser Oberfläche im Folgenden näher betrachtet. Die Vitalität von Zellen, die auf dieser Oberfläche immobilisiert wurden, erhöhte sich beträchtlich, wenn die Kollagenfolie vor dem Spotten mit einem geringen Volumen Medium (20 μL) befeuchtet wurde (siehe Abb. 4.1-12

⁹ Bachelorarbeit, 'Physiologisches Potential von Zellen auf Zellchips', B.Sc. Lukas Raddatz, Leibniz Universität Hannover, 2012

B). Da dieses Material im feuchten Zustand etwas quillt und sehr elastisch wird, wird der Fall des Zellkulturtropfens hierdurch möglicherweise abgedeutert. Außerdem konnten die Zellen auf diese Weise nicht so schnell austrocknen. Die trockene Folie hingegen nahm die gesamte Feuchtigkeit aus dem Zellkulturtropfen auf, sodass die Zellen starben (A). Größere Zellkulturvolumina erhöhten die Zellzahl auf den Microarrays nochmals deutlich (C).

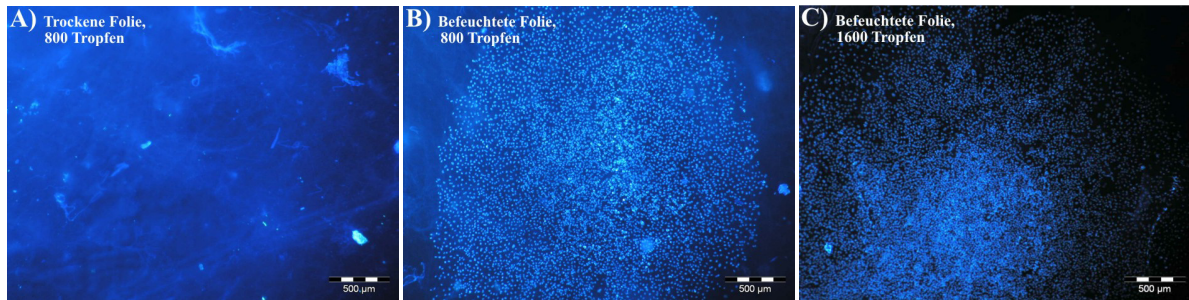


Abb. 4.1-12: Testung einer Kollagenfolie als Zellkulturoberfläche im trockenen (A) und befeuchteten Zustand (B) sowie eines größeren Tropfenvolumens mit höherer Zellzahl (C). Der Maßstab zeigt 500 µm.

Da sich die Kollagenfolie beim Trocknen wieder zusammenzog, konnte ein Objektträger mit diesem Material bespannt werden. Wenn ohne Inkubationskammer kultiviert wurde, löste sie sich wieder ab. Eine Ablösung erfolgte aber auch beim Entfernen der Kammern, sodass eine Auswertung der Microarrays nur mit Hilfe des Mikroskops möglich war, wobei die Inkubationskammer auf dem Slide verbleiben musste. Geringfügig von Nachteil war auch, dass die Zellen auf der Folie aufgrund der faserartigen Struktur nur sehr schlecht zu erkennen waren und erst nach der DAPI-Färbung eindeutig nachgewiesen werden konnten. Dennoch ist diese Oberfläche aufgrund der guten Zelladhäsion, eines guten Zellwachstums und der großen Elastizität für spätere Anwendungen sehr vielversprechend und sollte auch als Material im *Tissue Engineering* weiter untersucht werden.

4.1.4 Entwicklung eines *high-throughput* Analysesystems

Eine *high-throughput* Analyse auf einem Microarray ermöglicht die gleichzeitige Durchführung einer Vielzahl von Experimenten auf einem einzigen Slide. Nicht nur verschiedene Zelltypen können gleichzeitig stimuliert werden, sondern auch unterschiedliche Wirkstoffe, Oberflächenbeschichtungen oder Phänotypen können untersucht werden. Dieses Format reduziert somit den Arbeitsaufwand und die Kosten insbesondere für Reagenzien erheblich. Die am Institut für Technische Chemie (Leibniz Universität Hannover) üblicherweise für Protein-Microarrays verwendete Inkubationskammer ProPlate-16Pad von BioCat besitzt 16 quadratische Vertiefungen (Wells). Sie besteht aus Plastik und wird mit Plastikschiene an den Microarrays befestigt, wobei eine dünne Silikonmatte zwischen Slide und Kammer als

Dichtung dient (siehe Abb. 4.1-13 A). Dieses System zeigt zwei Probleme: 1. Die Glas-Slides zerbrechen gelegentlich beim Anbringen der Plastikklemmen und 2. Die Klemmen lassen bereits nach kurzer Zeit in ihrer Festigkeit nach, sodass die Kammern undicht werden. Daher wurde nach einer Alternative gesucht. Die von Peqlab angebotene, verschraubbare Aluminiumkammer Nexterion IC-16 (B) stellte sich als sehr gut geeignet heraus. Sie ist fest verschraubbar, relativ leicht und wegen eines Silikoneinsatzes dicht und zudem autoklavierbar. Diese Kammern wurden während der Optimierung der Immobilisierungsstrategie von Zellen in dieser Arbeit verwendet, wobei klassische Aldehyd-Microarray-Slides verwendet wurden (siehe Kapitel 4.1.2). Längerfristig sollte auf kostengünstigere Glasobjektträger zurückgegriffen werden, um diese zu beschichten. Diese passten jedoch nicht in die Aluminiumkammern, sie waren minimal zu breit. Das Kammersystem nahm zudem viel Raum im Inkubator ein, da jede Kammer in einer Glaspetrischale gelagert wurde, um Sterilität zu garantieren.

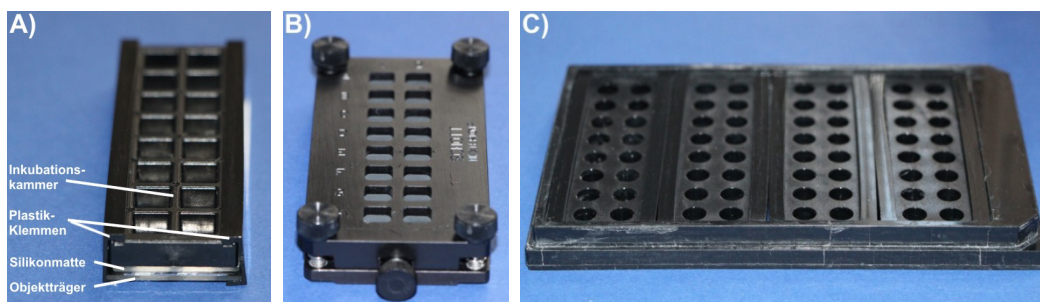


Abb. 4.1-13: Abbildungen der getesteten kommerziell erwerbbaaren Inkubationskammersysteme. A) zeigt die ProPlate-16Pad Kammer von BioCat, B) zeigt die Aluminiumkammer Nexterion IC-16 von peqlab und C) zeigt das ProPlate Tray-Kammersystem.

Die Lebendzell-Microarrays sowie ihre Inkubationskammern sollen später in zahlreichen Studien verwendet werden. So können verschiedenste Oberflächenbeschichtungen gleichzeitig getestet werden, oder verschiedene Zellproben simultan stimuliert und angefärbt werden. Eine parallele Analytik so vieler Proben ist sehr zeitaufwändig – jede Probe muss in eine 96-Well Platte umpipettiert werden – und ist zudem aufgrund von Pipettierfehlern sehr fehleranfällig. Besser geeignet wäre ein Kammersystem, das ein *high-throughput* Format mitbringt. Die bereits genannten ProPlate-Kammern von BioCat waren auch als so genannter Tray verfügbar (C). Hier befinden sich 3 oder 4 Inkubationskammern in einem Rahmen, der die Abmessungen einer Standard-96-Wellplatte besitzt und somit von herkömmlichen Plattenlesegeräten ausgelesen werden kann. Dieses System mit runden Wells sollte für alle folgenden Versuche verwendet werden. Die Zellen starben jedoch bei jeder Kultivierung in den Kammern. Dieses lag möglicherweise daran, dass die Wells einen geringeren Durchmesser als die einer 96-Wellplatte hatten, weshalb der Flüssigkeitsspiegel über den Zellen höher und der Diffusionsweg der Gase durch das Medium zu den Zellen länger war.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Zusätzlich wurden die Kammern in ihre Einzelteile zerlegt (Plastikkammer, Klemmen, Silikonmatte, Außen-Trayrahmen), in eine sterile für die Zellkultur geeignete Plastikkammer gelegt und mit 5 mL Medium überschichtet. Nach 3 Tagen bei 37 °C wurden die Medien auf konfluent gewachsene A-549 Zellen in einer 96-Well Platte gegeben und auf ihre Toxizität getestet. Die Höhe des Flüssigkeitsspiegels über den Zellen zeigte keine Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen (Abb. 4.1-14 A). Die einzelnen Kammerbestandteile zeigten jedoch einen signifikanten Einfluss. Wie in Teilabbildung B) zu sehen ist, waren die Plastikkammern und Silikonmatten, mit denen das Medium in Kontakt kam, stark toxisch. Als Ursache hierfür wurde ein dünner Klebefilm zwischen der Kammer und der Silikonmatte ausgemacht. Diese Toxizität konnte nicht beseitigt werden.

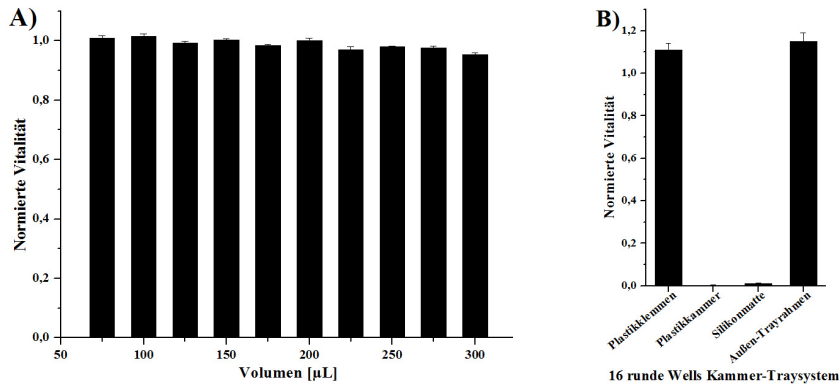


Abb. 4.1-14: Vitalitätsbestimmungen von A-549 Zellen, kultiviert mit verschiedenen Medienvolumina (A) und Extrakten der Bestandteile des Tray-Kammersystems (B). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 4 Messungen.

Die Außen-Trayrahmen zerfielen beim Sterilisieren in Isopropanol und wurden unbrauchbar. Infolge der gravierenden Nachteile der kommerziellen Kammern wurde ein optimiertes Kammersystem entwickelt und in der institutseigenen Werkstatt angefertigt. Um eine gute Dichtigkeit der Kammern zu gewährleisten, wurde ein in den Rahmen verschraubbarer „Deckel“ konstruiert (vergleichbar mit den Peqlab-Kammern). In dem Rahmen finden 3 Microarrays in voneinander abgeschlossenen, von unten und oben offenen Kammern Platz. Die Wells sind mit dem Mikroskop einsehbar. Der „Deckel“ drückt die Inkubationskammern auf die Microarrays, welche von einer Silikonmatte abgedichtet werden. Ein handelsüblicher 96-Well Plattendeckel verschließt die Kammern und sorgt für Sterilität. Die Metallteile wurden zum Schutz gegen Korrosion und die Salze der Medien und Nachweisflüssigkeiten eloxiert. Wie in Abb. 4.1-15 zu sehen ist, waren die Kammern dicht und für die Zellen nicht toxisch.

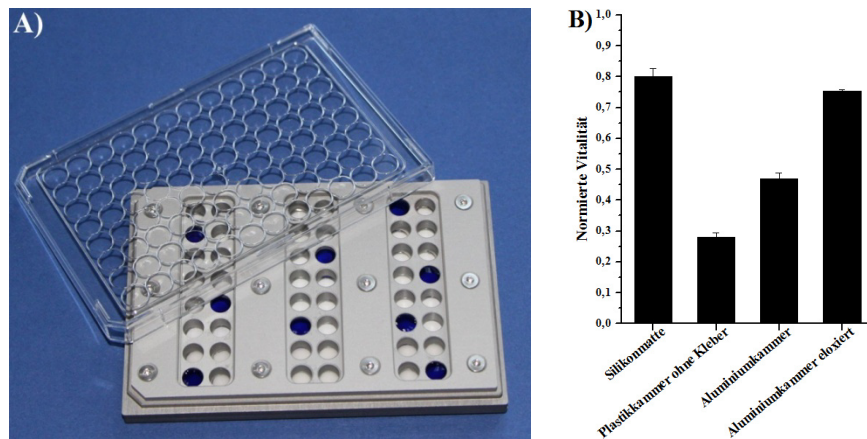


Abb. 4.1-15: Aufnahme des optimierten Inkubationskammersystems und Vitalitätsbestimmungen von A-549 Zellen, kultiviert in den neuen Kammern sowie der Vergleich mit der BioCat Plastikammer ohne Kleberschicht.

Die Oberflächenvalidierungen (Kapitel 4.1.3) und die Übertragung des Formates auf andere Zellen (Kapitel 4.1.5) wurden in ProPlate-16Pad Inkubationskammern mit quadratischen Wells durchgeführt. Das entwickelte Inkubationskammersystem fand in den die Arbeit abschließenden Detektionsstudien (Kapitel 4.5) Anwendung.

4.1.5 Herstellung von Lebendzell-Microarrays mit weiteren Zelllinien und Primärzellen

Die mit A-549 Zellen entwickelte Immobilisierungsstrategie wurde auf weitere *humane* Krebszelllinien [CACO-2 (Darmkarzinom), HELA (Gebärmutterhalskrebszellen), HEP-G2 (Leberkrebszellen), MCF-7 (Brustdrüsenkrebs)], Mäusefibroblasten (NIH-3T3) und Primärzellen [ucMSC (mesenchymale Stammzellen der Nabelschnur)] übertragen, um die generelle Anwendbarkeit des Systems zu demonstrieren. Zellen wachsen auf sehr vielen Oberflächen, bevorzugen aber solche mit erhöhter Adhäsion (Kapitel 3.1.3). Für diese Versuchsreihe wurden die beiden Oberflächenmodifikationen mit den höchsten Zellzahlen (Glas und Poly-L-Lysin) verwendet. Die Zellen wurden geerntet und von jeder Zellsuspension 1.200 Zellen auf den Microarrays immobilisiert. Nach einer Kultivierungsdauer von 3 Tagen wurden die Vitalitäten mittels CTB-Test bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.1-16 aufgetragen. Mit Ausnahme der ucMSC und NIH-3T3 waren die Fluoreszenzintensitäten der anderen Zellen auf der Glasoberfläche deutlich größer als die auf der Poly-L-Lysin-Beschichtung, was durch das bessere Wachstumsverhalten auf Glas begründet war. Im Gegensatz hierzu bevorzugten die ucMSC und NIH-3T3 Zellen eine Oberfläche mit besseren Adhäsionseigenschaften. Die höheren Fluoreszenz-Signale der NIH-3T3 auf der Glasoberfläche im Vergleich zu den anderen Zelllinien waren auf die kürzere Verdopplungszeit der Fibroblasten und ihren schnelleren Metabolismus des Resazurins zurückzuführen (siehe Anhang Kapitel 6.1.1).

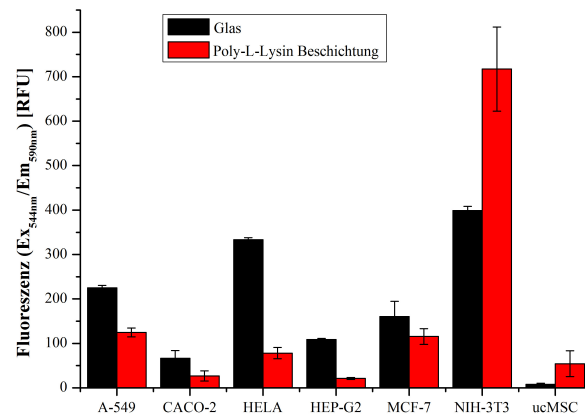


Abb. 4.1-16: Vitalitätsbestimmung verschiedener immobilisierter Zellen mittels CTB-Test nach einer Kultivierungsdauer von 3 Tagen. Die Zellen wurden auf unbeschichteten Glas- (schwarz) und Poly-L-Lysin-beschichteten Microarrays (rot) kultiviert.

Aufgrund der Ergebnisse des CTB-Tests wurden im Folgenden für alle menschlichen Zelllinien Glasoberflächen und für die Primärzellen sowie Fibroblasten Poly-L-Lysin-beschichtete Microarrays verwendet. Die Zellen wurden auch mit Calcein-Acetoxyethyl (AM) und Propidiumiodid gefärbt, um Auskunft über die Zellmorphologie und das Verhältnis von lebenden und toten Zellen zu erhalten. Der nicht fluoreszierende Ester Calcein-AM kann die Zellmembran überwinden und wird von metabolisch-aktiven Zellen gespalten, wodurch der Alkohol Calcein entsteht. Dieser bildet mit Eisenionen des Zytoplasmas grün fluoreszierende Chelat-komplexe, die nicht membrangängig sind und lebende Zellen vollständig anfärben. Propidiumiodid kann eine intakte Zellmembran nicht passieren und dringt dadurch nur in tote Zellen mit defekter Zellmembran (nekrotische Zellen) ein. In der Zelle bindet dieser Farbstoff an die Nukleinsäuren der Zellkerne und färbt diese rot. Die Spotmorphologie der Zellen war zum Teil sehr unterschiedlich (siehe Abb. 4.1-17). Die A-549, HELA und HEP-G2 Zellen wuchsen in runden Gruppen, ebenso wie die ucMSC, die zwar nicht in einem klar definierten Spot aber einer Spot-ähnlichen Weise wuchsen. Die CACO-2 und MCF-7 Zelllinien behielten ihr typisches Wachstum unter Ausbildung kleiner verstreuter Gruppen auch nach der dichten Immobilisation bei und waren über das gesamte Well verteilt. Die NIH-3T3 Zellen bildeten ursprünglich auch einen Spot, wuchsen aber deutlich schneller als die anderen Zellen und bedeckten nach 3 Tagen einen Großteil des Wells in unregelmäßiger Form. In keiner Teilabbildung waren rote Signale toter Zellen erkennbar, was eine hohe Zellvitalität anzeigte.

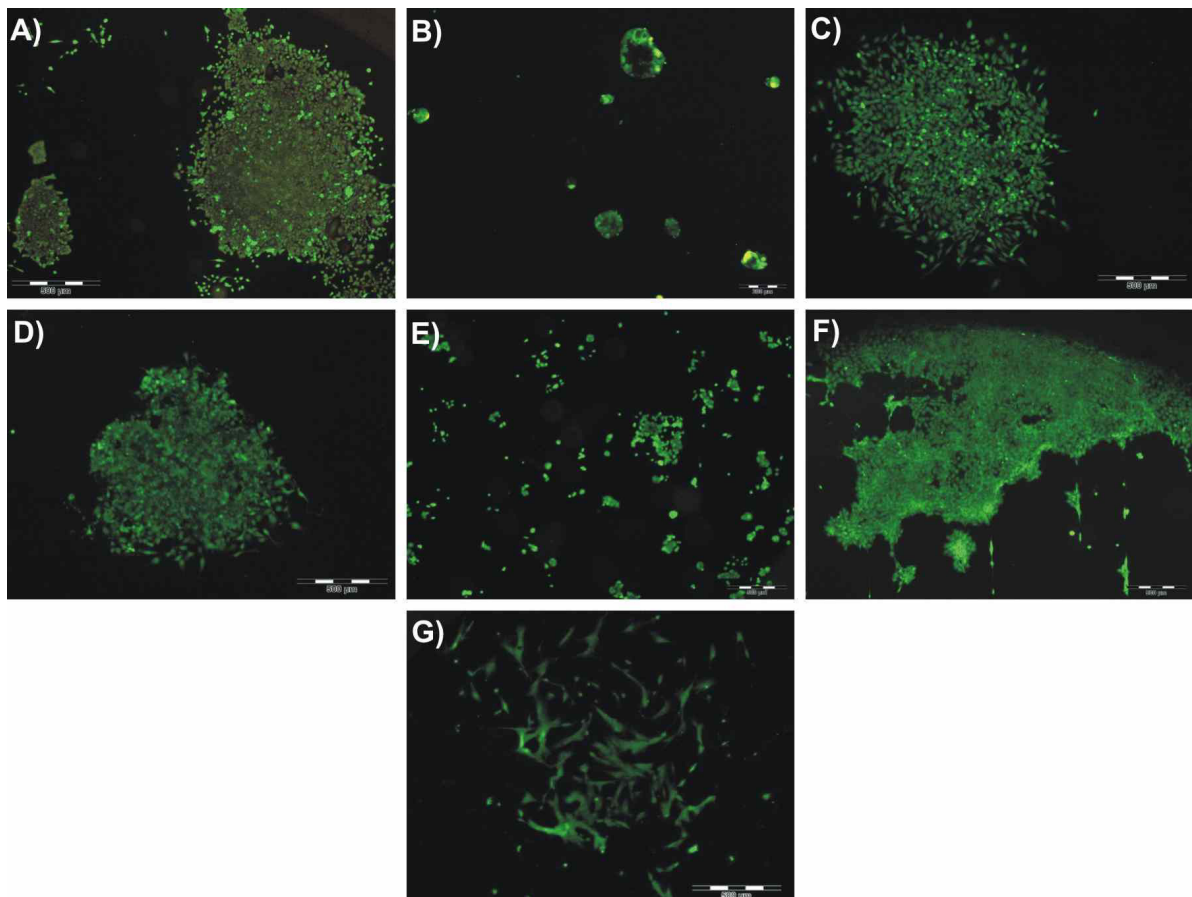


Abb. 4.1-17: Spotmorphologie verschiedener immobilisierter Zellen nach einer Kultivierungsdauer von 3 Tagen. Die Zellen wurden mit Calcein-AM (grün) und Propidiumiodid (rot) gefärbt. Die humanen Zelllinien A-549 (A), CACO-2 (B), HELA (C), HEP-G2 (D) und MCF-7 (E) wurden auf einer Glasoberfläche kultiviert, die Fibroblasten NIH-3T3 (F) und Primärzellen ucMSC (G) auf einer Poly-L-Lysin-Beschichtung. Der Maßstab zeigt 500 μm , Ausnahme ist B) mit 200 μm .

Neben der Vitalität gibt auch die Zellmorphologie Aufschluss über das physiologische Potenzial der Zellen auf verschiedenen Oberflächen und die Kultivierungsbedingungen. Die hier verwendeten Zellen sind von streng adhärenter Natur, sodass sie eine typische epithelartige oder Fibroblasten-ähnliche Morphologie aufweisen¹⁰. Zellen, die dieses eckig-längliche Aussehen besitzen, wachsen unter optimalen Bedingungen. Eine runde Morphologie bedeutet Ablösung in Folge von Zellteilung oder Zelltod. Die CACO-2 und HEP-G2 Zelllinien bilden hierbei mit ihrer eher runden Morphologie und der Vorliebe zur Kolonie- und Aggregatbildung eine Ausnahme. Auch MCF-7 Zellen zeigen bei geringer Zelldichte eine rundliche schwammige Morphologie, bilden hingegen bei hoher Zelldichte ebenfalls einen einschichtigen Zellrasen aus Epithel-ähnlichen Zellen¹¹. Mit Hilfe der Calcein-AM-Färbung kann sehr gut die Zellmorphologie betrachtet werden. In Abb. 4.1-18 sind Vergrößerungen der Aufnahmen aus Abb. 4.1-17 gezeigt. Es wird deutlich, dass auch nach dem Immobilisieren alle Zellen der Teilbilder ihre typische Morphologie aufwiesen.

¹⁰ <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animal-cell-lines.html>

¹¹ http://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx

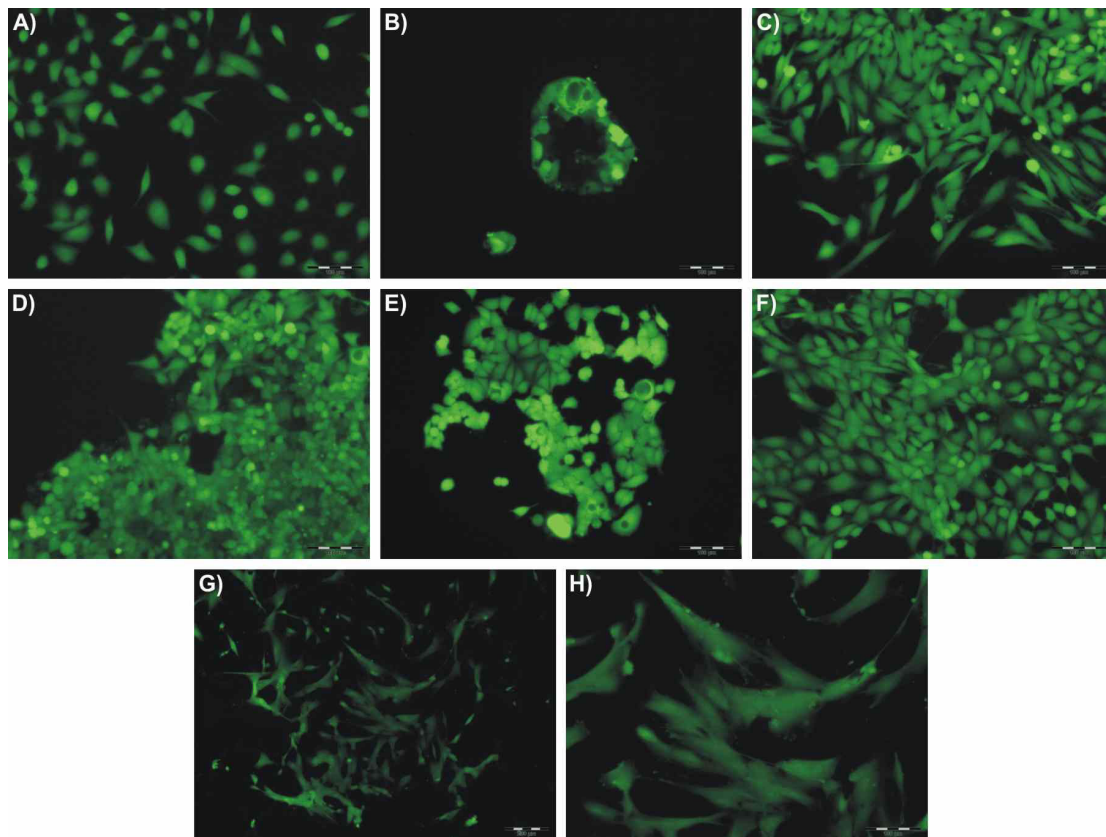


Abb. 4.1-18: Zellmorphologie verschiedener immobilisierter Zellen. Die Zellen wurden mit Calcein-AM (grün) und Propidiumiodid (rot) gefärbt. Die humanen Zelllinien A-549 (A), CACO-2 (B), HELA (C), HEP-G2 (D) und MCF-7 (E) wurden auf einer Glasoberfläche kultiviert, die Fibroblasten NIH-3T3 (F) und Primärzellen ucMSC (G, H) auf einer Poly-L-Lysin-Beschichtung. Der Maßstab zeigt 100 μm , Ausnahme ist G) mit 200 μm .

4.1.6 Schlussfolgerungen

Mit Hilfe der A-549 Modellzelllinie konnte erfolgreich eine reproduzierbare Druckmethode etabliert werden, die eine Zellvitalität von knapp 80 % (1.600 Tropfen, 0,6 μL) zeigte. In weiteren Experimenten wurde die Oberflächenbeschichtung optimiert und ein *high-throughput* Format entwickelt. Die generelle Übertragbarkeit auf andere Zellen wurde mit der Kultivierung von sieben weiteren Zelllinien untersucht. Das Wachstum und die Zellmorphologie der auf diese Weise immobilisierten Zellen war trotz der sehr geringen Zellzahl mit dem physiologischen Potenzial in 96-Well Kulturplatten vergleichbar. Das Spotten sorgt somit dafür, dass die Zellen zueinander in engem Zell-Zell-Kontakt stehen. Dieses wäre bei dem Aussiedeln einer so geringen Zellzahl (1.000 Zellen pro Well) in einer 96-Well Platte nicht gegeben und würde zu Einschränkungen z.B. im Proliferationsverhalten führen. Die generelle Anwendbarkeit der entwickelten Lebendzell-Microarrays konnte daher ebenso erfolgreich demonstriert werden.

4.2 Charakterisierung der Zellen bezüglich der Biomarker HER-2/neu, FOLR1 und EpCAM

In dem vorangegangenen Kapitel wurde beschrieben, wie ein Verfahren zum Drucken lebender Zellen auf Microarrays entwickelt wurde. Die entwickelten Lebendzell-Microarrays können vielfältig angewendet werden. So können Oberflächen und Wirkstoffe getestet und die Zellen mit Signalmolekülen stimuliert werden. Jede dieser Studien hat Einfluss auf die Zellantwort, Signalkaskaden der Zelle und Expression von Proteinen. In der Biotechnologie und personalisierten Medizin ist es zudem von entscheidender Bedeutung, dass nur ausgewählte Zellen spezifisch mit bioaktiven Molekülen stimuliert werden. Diese Spezifität wird z.B. von Antikörpern gewährleistet, die nur an jene Zellen binden, die ihr Antigen auf der Zellmembran exprimieren. In dieser Arbeit sollten Antikörper-gekoppelte fluoreszierende Nanopartikel einzelne Zelltypen spezifisch detektieren. Hierfür wurden Zelloberflächenbiomarker ausgewählt, die in der medizinischen Diagnostik und Therapie relevant sind und bei den jeweiligen Krebsnachweisen untersucht werden. Hierbei handelt es sich um einen Brust- und Lungenkrebsmarker (HER-2/neu), einen Epithelzell- und u.a. Gebärmutterhalskrebsmarker (Folsäure-Rezeptor 1 *adult*, FOLR1) sowie einen Marker für Karzinome des Gastrointestinaltraktes (Epithelzelladhäsionsmolekül, EpCAM oder CD326). Um die Spezifität der modifizierten Nanopartikel zu überprüfen, mussten die eingesetzten Zellen zunächst bezüglich ihrer Expressionslevel der Biomarker HER-2/neu, FOLR1 und EpCAM charakterisiert werden. Diese Charakterisierung erfolgte hier zum einen für die Gentranskription mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und zum anderen auf Protein-Ebene mittels Durchflusszytometrie. Die begrenzten Stabilitäten von mRNA und Proteinen bzw. den Extrazellulären Proteindomänen [51] machten die Nachweise beider Moleküle in den Assays notwendig.

4.2.1 Molekularer Nachweis der Biomarker mittels PCR

In der PCR-Analyse wurde der Transkriptionslevel der Gene *c-erbB2* (codiert das HER-2/neu Protein), FOLR1 und EpCAM in *humanen* Zelllinien A-549, CACO-2, HELA, HEP-G2 und MCF-7, in *murinen* NIH-3T3 Zellen und in *humanen* Primärzellen (ucMSC, Nabelschnurstammzellen) bestimmt. Zusätzlich wurde die Transkription des *humanen* *Housekeeping*-Gens Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HPRT) und des *murinen* Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) in allen verwendeten Zelllinien und Primärzellen untersucht. Eine Übersicht über die verwendeten Primerpaare mit Angabe ihrer

Sequenz, der optimierten Hybridisierungstemperatur und der zu erwartenden Produktlänge befindet sich in Tab. 4.2-1.

Tab. 4.2-1: Übersicht über die verwendeten *forward* (for) und *reverse* (rev) Primer für die Analyse der Gentranskription mittels PCR. Neben der Primersequenz und -länge sind auch der Organismus, die optimierte Hybridisierungstemperatur und die Länge des amplifizierten Produktes angegeben.

Gen	Ursprung	NCBI Referenznummer der mRNA Sequenz	Primersequenz (Sequenzlänge)	Hybridisierungstemperatur [°C]	Produktlänge
HPRT	<i>human</i>		for: 5'aag ctt gct ggt gaa aag ga3' (20)	60	263 bp
			rev: 5'aag cag atg gcc aca gaa ct3' (20)		
GAPDH	<i>murin</i>		for: 5'aac ttt ggc att gtg gaa gg3' (20)	58	224 bp
			rev: 5'aca cat tgg ggg tag gaa ca3' (20)		
c-erbB2 (HER-2/neu)	<i>human</i>	NM_001005862.1	for: 5'tgc ggc tcg tac aca ggg act t3' (22)	64	420 bp
			rev: 5'tgc ggg aga att cag aca cca act3' (24)		
c-erbB2 (HER-2/neu)	<i>murin</i>	NM_001003817.1	for: 5'cct caa aac agc tcg gag ac3' (20)	61	124 bp
			rev: 5'agg aga ggt ctg gct tca ca3' (20)		
FOLR1	<i>human</i>	NM_016724.2	for: 5'agt agg gga ggc tca gac aag gat3'(24)	63	497 bp
			rev: 5'tgg gga agt aga aat gga aag gtt3'(24)		
FOLR1	<i>murin</i>	NM_001252552.1	for: 5'atg caa acg gca ctt tat cc3' (20)	61	334 bp
			rev: 5'gct ccc tcg act gta gtt gc3' (20)		
EpCAM	<i>human</i>	NM_002354.2	for: 5'ctg cca aat gtt tgg tga tg3' (20)	60	332 bp
			rev: 5'acg cgt tgt gat ctc ctt ct3' (20)		

Um die PCR durchführen zu können, musste das cDNA-*Template* der einzelnen Zellen synthetisiert werden. Hierfür wurde zunächst die zelluläre Gesamt-RNA isoliert, diese dann zu cDNA umgeschrieben und in der PCR eingesetzt. In den folgenden Unterkapiteln sind die 1,5 %igen Agarosegele mit den Ergebnissen der PCR-Amplifikationen abgebildet.

4.2.1.1 *Housekeeping* Gene

Die synthetisierte cDNA der *humanen* Zellproben wurde mit einem Primerpaar für *humanes* HPRT auf ihre Amplifikationsfähigkeit geprüft. Diese Qualitätskontrolle erfolgte für die *murine* Zelllinie mit einem Primerpaar für *murines* GAPDH. Für alle *humanen* Zellproben zeigte die Bande bei ungefähr 263 bp die Amplifikation des HPRT-Gens und die Amplifikationsfähigkeit der cDNA an (Abb. 4.2-1B). Auch die PCR für das *murine* GAPDH-Gen war erfolgreich, was die Bande bei ungefähr 224 bp anzeigt (A). Die synthetisierten cDNA-*Templates* aller Zellen können somit für die Charakterisierungen der Zellen bezüglich der drei Biomarker verwendet werden.

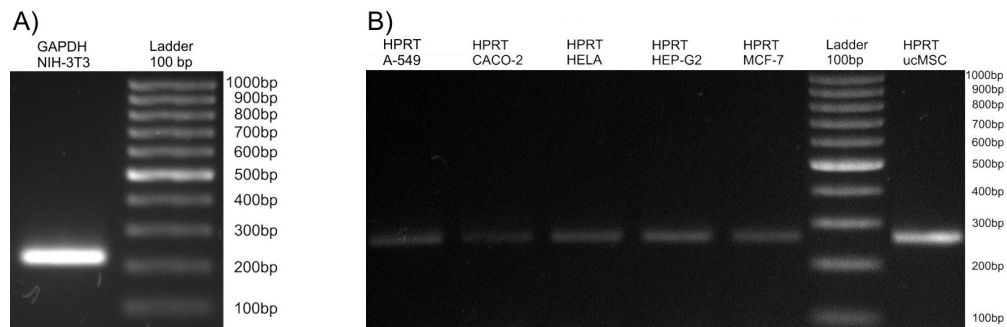


Abb. 4.2-1: Nachweis der erfolgreichen cDNA-Synthese anhand des Transkriptionsnachweises der *Housekeeping-Gene* Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH, A) und Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HPRT, B) mittels PCR. GAPDH wurde in der *murinen* Zelllinie, HPRT in allen humanen Zelllinien und Primärzellen nachgewiesen. Die Spuren 2 (A) und 6 (B) zeigen die 100 bp DNA-Größenstandards.

4.2.1.2 HER-2/neu

Viele Zellen sind HER-2/neu positiv (siehe Kapitel 3.3.1), in einigen Krebsarten (z.B. Brustkrebs) wird dieses Protein jedoch stark überexprimiert und für die Vorhersage des Krankheitsverlaufs untersucht. In Abb. 4.2-2 sind die Ergebnisse der Transkriptionsuntersuchung des *c-erbB2* Genes, das das HER-2/neu Protein kodiert, dargestellt. Es ist zu erkennen, dass keine der humanen Zellen negativ für die Transkription des HER-2/neu ist. Daher wurden zusätzlich *murine* Fibroblasten (NIH-3T3) getestet, die negativ für die Transkription des Gens waren. Die Ursache für dieses negative Resultat der NIH-3T3 Zellen (B, Spur 1) ist ihr *muriner* Ursprung, aufgrund dessen das Primerpaar gegen das *humane* Gen an der *murinen* cDNA nicht hybridisieren konnte. Eine Wiederholung der PCR mit einem Primerpaar gegen die *murine* cDNA zeigte, dass auch die NIH-3T3 Zellen positiv für die Transkription des *c-erbB2* sind (C, Spur 2). Der im Folgenden verwendete Antikörper musste somit sehr sorgfältig ausgewählt werden, da ein Proteinsequenz-Vergleich des *humanen* und *murinen* HER-2/neu eine 92 %ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zeigte (siehe Anhang Kapitel 6.1.8). HELA und ucMSC Zellen zeigen stärkere Banden bei ungefähr 420 bp, für alle anderen humanen Zellen sind nur schwache Banden erkennbar. Für diese PCR wurde von allen Zellen doppelt so viel cDNA verwendet wie in den anderen Versuchen, um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten. Wegen des schwachen und nicht ganz eindeutigen Ergebnisses, wurden die Amplifikate zusätzlich zu dem Agarosegel auch auf einen DNA-Chip des Agilent 2100 Bioanalyzers aufgetragen und analysiert. Das Resultat entsprach dem hier gezeigten Agarosegel (siehe Anhang Kapitel 6.2.5.5). Eine weitere Überprüfung dieser Ergebnisse erfolgte mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung einer Antikörper-basierten Zellfärbung (siehe Kapitel 4.2.2.3).

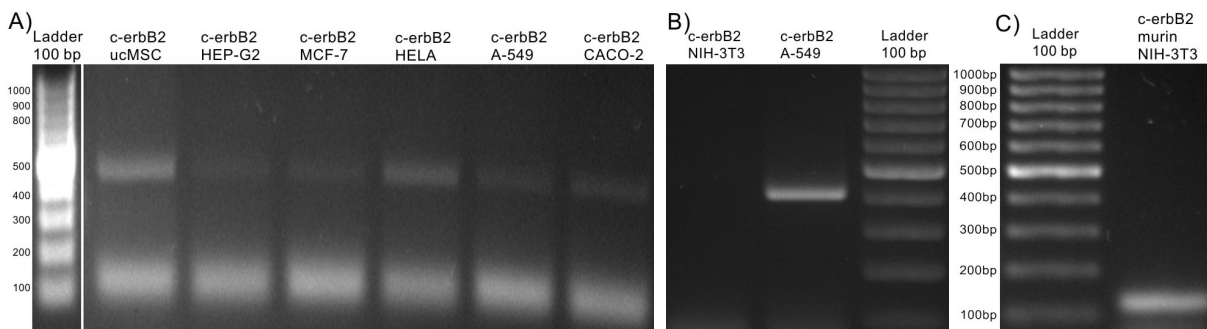


Abb. 4.2-2: Zellcharakterisierung bezüglich der Transkription des c-erbB2 Gens, das den Zellmembran-Biomarker HER-2/neu kodiert, mittels PCR. Der Übersichtlichkeit halber sind in A) nur die relevanten Spuren aller *humanen* Zellen gezeigt. Die Untersuchung der c-erbB2-Expression in NIH-3T3 erfolgte in B) mit einem Primerpaar gegen das *humane* Gen und in C) gegen das *murine* Gen. In A) und C) zeigt jeweils die erste Spur in B) die dritte Spur die 100 bp DNA-Größenstandards.

4.2.1.3 FOLR1

Trotz des positiven Nachweises des *Housekeeping* Gens HPRT zeigen A-549 Zellen und ucMSCs Zellen keine Bande für das Amplifikat des humanen FOLR1 bei 497 bp (Abb. 4.2-3 A, B jeweils Spur 2). Da die *Housekeeping* Gene nachgewiesen werden konnten, kann aufgrund der fehlenden Bande in B) Spur 2 angenommen werden, dass A-549 Zellen FOLR1-negativ sind und als Negativkontrolle in den folgenden Zelldiskriminierungsstudien verwendet werden können. In den Studien, in denen eine zelldiskriminierende Oberfläche etabliert werden soll, sollten zwei Zelllinienpaare (FOLR1-positiv gegen FOLR1-negativ) verwendet werden. Daher wurde nach einer weiteren FOLR1-negativen Zelllinie gesucht. Eine PCR von NIH-3T3 cDNA ergab ebenfalls ein negatives Resultat. Eine Wiederholung der PCR für die zuvor negativ-getestete NIH-3T3 Zelllinie mit einem Primerpaar gegen die *murine* cDNA zeigte, dass auch die NIH-3T3 Zellen positiv für FOLR1 sind. Ein Proteinsequenz-Vergleich des *humanen* und *murinen* FOLR1 ergab eine 88 %ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen (siehe Anhang Kapitel 6.1.8), welches bei der Antikörperauswahl für mögliche Zellfärbungen beachtet werden musste. HELA Zellen besitzen ebenso wie CACO-2 Zellen ein hohes Transkriptionslevel für FOLR1, was in einer starken Bande bei 497 bp in Spur 3 und 4 resultiert. Wegen ihrer starken FOLR1-Transkription kann die HELA Zelllinie in allen folgenden Adhäsions- und Detektionsstudien als Positivkontrolle verwendet werden. Für HEP-G2 und MCF-7 Zellen sind deutlich schwächere Banden erkennbar, sie sind somit nur schwach positiv für die Transkription dieses Gens.

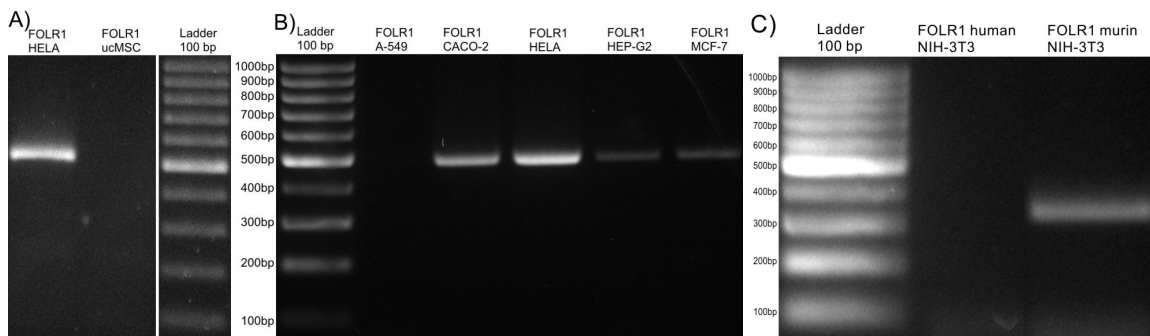


Abb. 4.2-3: Zellcharakterisierung bezüglich der Transkription des FOLR1-Gens mittels PCR. Der Übersichtlichkeit halber sind in A) nur die relevanten Spuren der Positivkontrolle (HELA, Spur 1) und der Primärzellen (Spur 2) gezeigt. Die Ergebnisse der weiteren *humanen* Zelllinien sind in B) dargestellt. Die Untersuchung der Transkription des FOLR1 in NIH-3T3 erfolgte in C) mit einem Primerpaar gegen das *humane* (Spur 2) sowie gegen das *murine* Gen (Spur 3). In B) und C) zeigt jeweils die erste Spur, in A) die dritte Spur die 100 bp DNA-Größenstandards.

4.2.1.4 EpCAM

Auch die Untersuchung der verschiedenen Zellen auf ihr Transkriptionslevel des Biomarkers EpCAM ergab, dass eine Zelllinie negativ für dieses Gen war (siehe Abb. 4.2-4). Für HELA Zellen ist bei 332 bp kein Amplifikat zu erkennen (B, Spur 4). A-549 Zellen zeigen zudem nur eine sehr schwache Transkription des Gens (B, Spur 2), ebenso wie die Primärzellen in A) Spur 2. Die weiteren *humanen* Zelllinien zeigen in B) starke Banden und somit eine gute Gen-Amplifikation. Wegen der starken Transkription von EpCAM kann die HEP-G2 Zelllinie in den folgenden Detektionsstudien als Positivkontrolle verwendet werden. Die HELA Zellen dienen in den nachfolgenden Zellfärbungsstudien als Negativkontrolle.

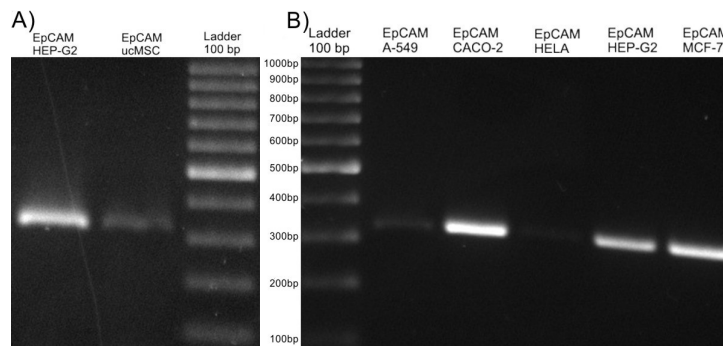


Abb. 4.2-4: Zellcharakterisierung bezüglich der Transkription des EpCAM-Gens mittels PCR. In A) ist das Ergebnis der Primärzellen (Spur 2) verglichen mit der Positivkontrolle (HEP-G2, Spur 1) gezeigt. Die Expressionen der übrigen *humanen* Zellen sind in B) dargestellt. In A) zeigt die dritte Spur, in B) die erste Spur die 100 bp DNA-Größenstandards.

Aufgrund der fehlenden Amplifikate für eine Transkription des humanen c-erbB2 Gens (HER-2/neu Protein) auf den NIH-3T3 Zellen, für FOLR1 auf der A-549 Zelllinie und für EpCAM auf den HELA Zellen wurde angenommen, dass diese drei Zelllinien somit auch negativ für die jeweiligen Proteine waren. Als positiv für eine Gentranskription wurden die A-549 (c-erbB-2 bzw. HER-2/neu), HELA (FOLR1) und HEP-G2 (EpCAM) ermittelt. Die Ergebnisse der PCRs wurden im folgenden Kapitel zusätzlich auf Protein-Ebene überprüft, indem fluorochrommarkierte Antikörper die Oberflächenproteine detektierten.

4.2.2 Nachweis der Biomarker auf Protein-Ebene: Durchflusszytometrie

4.2.2.1 Protolloptimierung der durchflusszytometrischen Färbung

Die mittels PCR nachgewiesene Gentranskription sollte auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden. Hierbei werden die gewünschten Oberflächenproteine von fluorochrommarkierten Antikörpern detektiert. Da in dieser Arbeit nicht nur eine Zelldetektion sondern auch eine spezifische Unterscheidung von Zellen erfolgen soll, wurden die Antikörper gegen die drei Zell-Biomarker (HER-2/neu, FOLR1 und EpCAM) so ausgewählt, dass drei verschieden farbige Fluorochrome die Antikörper markierten. Hierbei müssen die Fluorochrome kompatibel zu dem verwendeten Durchflusszytometer sein. Dieses verfügt über einen Anregungslaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und ist mit je einem Filter (mit Bandbreite) im grünen (525/40), gelben (575/30) und roten (675/30) Fluoreszenzbereich ausgestattet (siehe Abb. 4.2-5). Aufgrund dieser Vorgaben wurden die Fluorochrome Fluorescein Isothiocyanat (FITC, grün), R-Phycoerythrin (PE, gelb) und das Tandemfluorochrom Peridininchlorophyllprotein-Cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5, rot) ausgewählt.

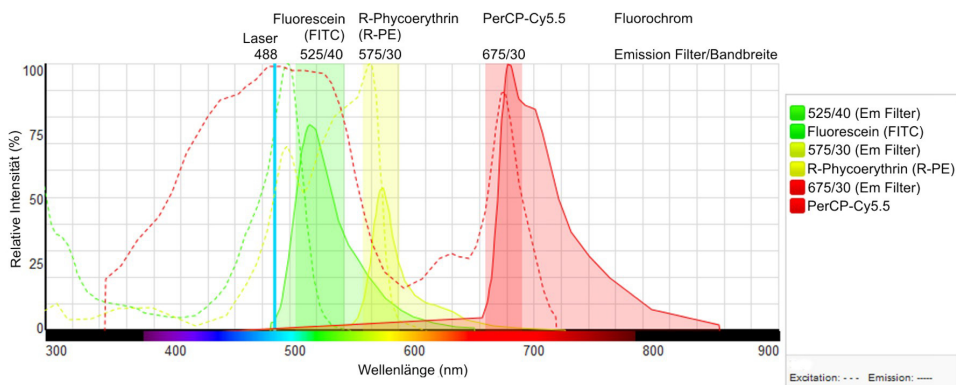


Abb. 4.2-5: Auswahl der Fluorochrome unter Berücksichtigung der Ausstattung des Durchflusszytometers. Dieses hat einen 488 nm Anregungslaser (blaue Linie), eine Emissionsfilter bei 525 nm mit einer Bandbreite von 40 nm (grüner Balken), einen Emissionsfilter bei 575/30 nm (gelber Balken) und einen Emissionsfilter bei 675/30 nm (roter Balken). Die Anregungsspektren (·····) und Emissionsspektren (—) der verwendeten Fluorochrome Fluorescein (FITC, grüne Linien), R-Phycoerythrin (R-PE, gelbe Linien) und PerCP-Cy5.5 (rote Linien) sind ebenfalls dargestellt. Nach Fluorescence SpectraViewer, Life Technologies¹².

Während der Optimierung der durchflusszytometrischen Messung wurden A-549 Zellen (HER-2/neu-positiv), HELA Zellen (FOLR1-positiv) und HEP-G2 Zellen (EpCAM-positiv) als Modellzelllinien eingesetzt. Diese Zelllinien werden als die ausgewählten Biomarker tragenden Zellen beschrieben, was auch in den PCR-Studien dieser Arbeit indirekt bestätigt wurde (siehe Kapitel 4.2.1). Nach der Zellfärbung wurde die Fluoreszenzintensität von jeder Zellprobe einzeln vermessen und ein *Dotplot* Diagramm sowie ein Histogramm von mindestens 10.000 lebenden Zellen erstellt. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Proteinmenge und der Signalintensität.

¹²<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>

In Färbungsstudien von Geweben und auch Zellen werden diese nach der Entnahme bzw. Kultivierung fixiert und erst dann gefärbt. Auch in dieser Arbeit sollten die Zellen zunächst fixiert werden, um ein Standardprotokoll zur Zellfärbung mit Fluoreszenznanopartikeln zu etablieren. Daher wurden auch in der Durchflusszytometrie fixierte Zellen eingesetzt. Mittels Durchflusszytometrie wurden zwei verschiedene Standardprotokolle miteinander verglichen: Das „*Flow Cytometry Protocol*“ von *Cell Signaling Technology*¹³ und das im Institut für Technische Chemie etablierte Protokoll¹⁴. Beide Protokolle unterschieden sich nur in einem Punkt voneinander. Während im institutsinternen Protokoll keine Fixierung der Zellen stattfand, wurden im Protokoll von *Cell Signaling Technology* die Zellen in Formaldehyd-lösung (finale Konzentration 4 %) fixiert. Für die Färbungen der Zellen wurden die von den Herstellern empfohlenen Antikörpermengen verwendet (Tab. 4.2-2). Als Negativkontrolle wurden die Zellen separat mit einer äquivalenten Menge *mouse* IgG Isotypkontrolle gefärbt, die mit den jeweiligen Fluorochromen markiert war.

Tab. 4.2-2: Herstellerangaben zur Konzentration der Antikörper und empfohlene Antikörpermenge pro Test.

Antikörper	Konzentration	Antikörper/Test
BD Human anti-HER-2/neu FITC	3 µg/mL	0,06 µg
BD Mouse IgG1,κ Isotypkontrolle FITC	50 µg/mL	
R&D anti-human FOLR1-PE	50 µg/mL	0,5 µg
BD Mouse IgG1, κ Isotypkontrolle PE	50 µg/mL	
BD Human anti-EpCAM PerCP-Cy5.5	2 µg/mL	0,04 µg
BD Mouse IgG1, κ Isotypkontrolle PerCP-Cy5.5	12,5 µg/mL	

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen sind in Abb. 4.2-6 dargestellt. Stellvertretend für alle während der Charakterisierung durchgeführten Färbungen ist in Abb. 4.2-6 A der Vergleich der Zellfärbung mit dem zellspezifischen Antikörper (hier anti-HER-2/neu) und der *mouse* IgG Isotypkontrolle gezeigt. Die Fluoreszenzintensität der Isotypkontrollen lag stets zwischen 1 AU und 2 AU und war somit deutlich geringer als die zellspezifischen Färbungen mit einem Antikörper. Der Unterschied von fixierten (*Cell Signaling Technology* Protokoll) zu unbehandelten Zellen (institutsinternes Protokoll) bei A-549 Zellen (Abb. 4.2-6 B) ist nur sehr gering. Die relative Fluoreszenzintensität (bezogen auf die Isotypkontrolle) der unbehandelten Zellen ist nur unwesentlich größer als die der fixierten Probe. Deutlich größer ist der Unterschied bei den HELA Zellen (Abb. 4.2-6 C), bei denen die relativen Intensitäten der unbehandelten Zellen fast 200 *arbitrary units* (AU) größer sind

¹³ <http://www.cellsignal.com/support/protocols/Flow.html>

¹⁴ Dissertation, 'Establishment of recombinant cell lines and characterization of primary cells for stem cell technology applications', Dr. Pierre Moretti, Leibniz Universität Hannover, 2010

als die der fixierten Zellen. Im Gegensatz hierzu weisen die fixierten HEP-G2 Zellen (Abb. 4.2-6 D, schwarze Linie) etwas höhere relative Fluoreszenzintensitäten auf als die unbehandelten.

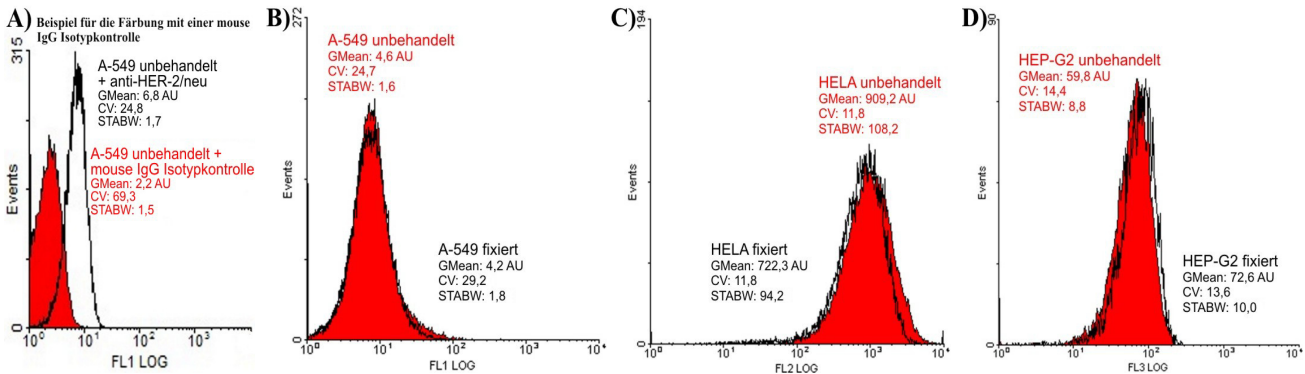


Abb. 4.2-6: Protokolloptimierung der durchflusszytometrischen Messung mit unbehandelten und fixierten Zellen. A) Für alle Färbungen stellvertretender Vergleich der Färbung von unbehandelten A-549 Zellen mit anti-HER-2/neu FITC-markiertem Antikörper und mit der FITC-markierten *mouse* IgG Isotypkontrolle (rot: Zellspezifischer Antikörper, schwarz: Mouse IgG Isotypkontrolle). B) Färbung von A-549 Zellen mit einem anti-HER-2/neu FITC-markierten Antikörper, C) Detektion von HELA Zellen mit einem anti-FOLR1 PE-markierten Antikörper, D) Fluoreszenzsignale von HEP-G2 Zellen angefärbt mit einem anti-EpCAM PerCP-Cy5.5-markierten Antikörper. Rot: Unbehandelte Zellen, schwarze Linie: mit Formaldehyd (finale Konzentration 4 %) für 10 min fixierte Zellen. Die berechneten relativen Fluoreszenzintensitäten (GMean, bezogen auf die *mouse* IgG Isotypkontrollfärbungen), die Variationskoeffizienten (CV) und die Standardabweichungen ($STABW = CV * GMean / 100$) sind unter den jeweiligen Zelllinien angegeben.

Die Experimente zeigten, dass die gewählten Antikörper gegen HER-2/neu und EpCAM für die Detektion von sowohl fixierten als auch nicht-fixierten Zellen geeignet sind. Auch die Fluoreszenzsignale des Antikörpers gegen FOLR1 sind für beide Zellzustände ausreichend. Die unbehandelten Zellen zeigen aber deutlich höhere Signale (909,2 AU im Vergleich zu 722,3 AU). Daher und auch wegen der relativ geringen Unterschiede der anderen Antikörper (13 AU bei EpCAM) wurden die Zellen in allen weiteren durchflusszytometrischen Messungen nicht fixiert und dem institutsinternen Protokoll gefolgt.

4.2.2.2 Titration der optimalen Antikörperkonzentration für die Durchflusszytometrie

Unspezifische Bindungen der Detektionsmoleküle an ihre Zielmoleküle werden mit zunehmender Konzentration begünstigt. Ist die eingesetzte Antikörpermengung zu gering, werden schwächere Fluoreszenzsignale erzeugt, die je nach Fluorochrom für eine sensitive Detektion zu schwach sein können. Daher sollte eine Antikörpermengung verwendet werden, die zu einer Signalsättigung aufgrund der vollständigen Besetzung aller Bindungsplätze führt und die gleichzeitig niedrig genug ist, um unspezifische Bindungen und zu hohe Kosten zu vermeiden. Die Titration der optimalen Antikörperkonzentration war auch in dieser Arbeit notwendig. Die eingesetzten Antikörpermengen können Tab. 4.2-3 entnommen werden. Die Färbungen von jeweils 500.000 Zellen fanden in einem Volumen von 120 μ L statt.

Tab. 4.2-3: Titration der Antikörpermengen für die Färbung von 500.000 Zellen. Angegeben sind die getesteten Antikörpermengen in µg, die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen sind grau hervorgehoben.

Antikörper	Antikörper/ 500.000 Zellen							
	0,2 µg	0,1 µg	0,08 µg	0,06 µg	0,04 µg	0,02 µg	0,01 µg	0,005 µg
BD Human anti-HER-2/neu FITC	0,2 µg	0,1 µg	0,08 µg	0,06 µg	0,04 µg	0,02 µg	0,01 µg	0,005 µg
R&D anti-human FOLR1 PE	1,0 µg	0,5 µg	0,25 µg	0,1 µg	0,05 µg	0,025 µg	0,01 µg	0,005 µg
BD Human anti-EpCAM PerCP-Cy5.5	0,1 µg	0,08 µg	0,06 µg	0,04 µg	0,02 µg	0,01 µg	0,005 µg	0,001 µg

In Abb. 4.2-7 und Abb. 4.2-8 sind die relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die eingesetzten Antikörpermengen in µg aufgetragen. Die Titrations der Antikörper gegen HER-2/neu und EpCAM ergaben typische Sättigungskurven, wie sie in Bindungsstudien üblich sind (siehe Abb. 4.2-7). Ab 0,04 µg Antikörper/500.000 Zellen für anti-HER-2/neu FITC (A) und 0,08 µg Antikörper/500.000 Zellen für anti-EpCAM PerCP-Cy5.5 (B) tritt eine Signalsättigung ein. Es sind alle Bindungsstellen (Epitope) auf der Zelloberfläche besetzt. Als Fit wurde das Box-Lucas-Model verwendet.

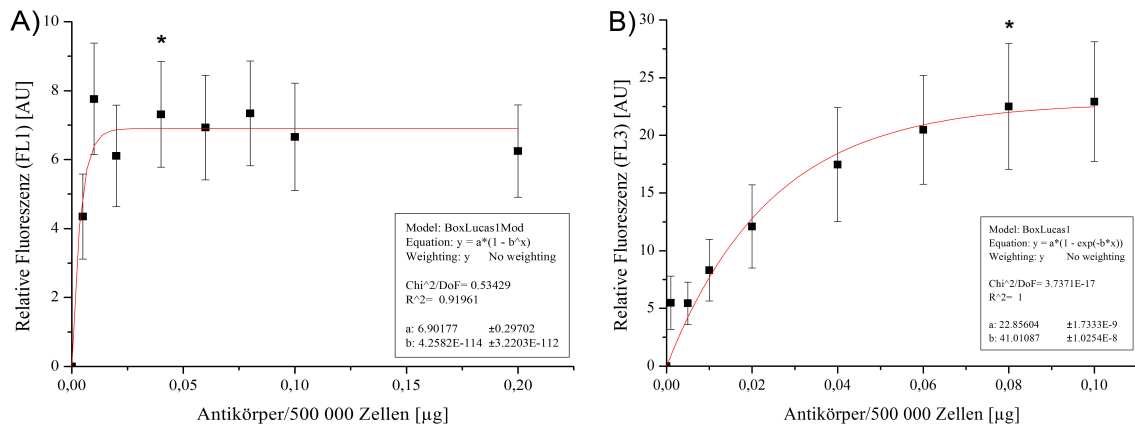


Abb. 4.2-7: Titrations der optimalen anti-HER-2/neu (A) und anti-EpCAM (B) Antikörpermenge für die Färbung von 500.000 Zellen/Test. Mit Stern* markiert sind die Antikörpermengen, die im Folgenden für die Zellcharakterisierungen verwendet wurden.

Die Titration des Antikörpers gegen den humanen Folsäure-Rezeptor 1 (FOLR1) resultierte jedoch nicht in einer Sättigungskurve, wie in Abb. 4.2-8 A deutlich wird. Nach einem Anstieg flacht die Kurve zunächst ab, steigt dann aber plötzlich linear weiter an. Dieser Kurvenverlauf deutet auf verstärkte unspezifische Bindungen oder die Detektionen eines Epitops durch mehrere Antikörper hin. In welchem Ausmaß dieser Antikörper unspezifisch bindet, wurde untersucht, indem der Titrationsversuch mit FOLR-1-negativen A-549 Zellen wiederholt wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 4.2-8 B dargestellt und zeigt lediglich sehr geringe Fluoreszenzintensitäten, die zwar leicht zunehmen aber in eine Sättigung übergehen. Die Fluoreszenzintensitäten der negativen Zellen sind so gering, dass sie vernachlässigt werden können und somit nicht für den fast linearen Signalanstieg bei hohen Konzentrationen verantwortlich sind. Der sehr starken Gentranskription entsprechend (siehe Nachweis mittels PCR in Kapitel 4.2.1.3) sind wahrscheinlich große Mengen dieses Proteins auf der

Zellmembran exprimiert, sodass es erst bei deutlich höheren Antikörperkonzentrationen zu einer Sättigung kommt. Der Vergleich der beiden Teilabbildungen zeigt zudem, dass der Antikörper sehr spezifisch nur an die Rezeptor-positiven Zellen bindet und sehr hohe Fluoreszenzintensitäten erzielt werden. Für die weiteren Zellcharakterisierungen wird eine Antikörpermenge von 0,1 µg/500.000 Zellen verwendet.

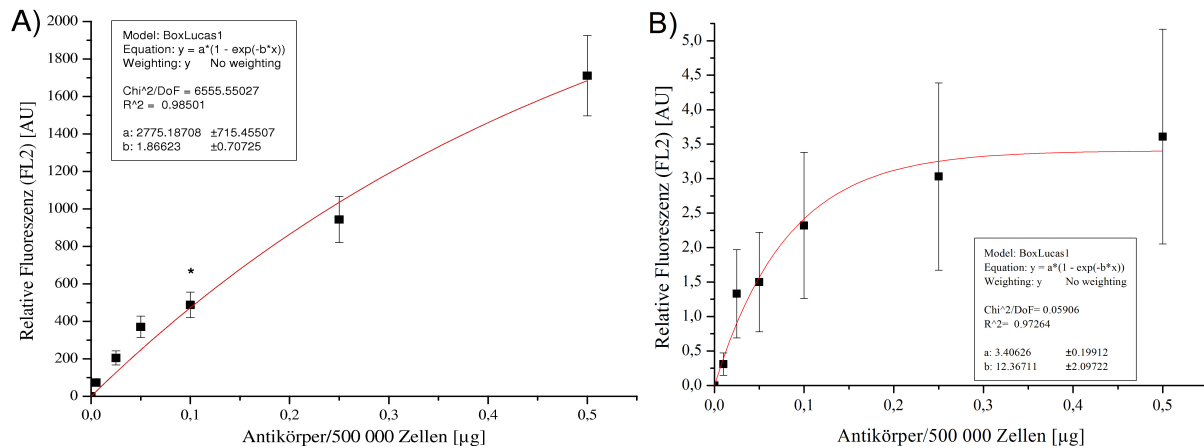


Abb. 4.2-8: Titrations der optimalen anti-FOLR1 Antikörpermenge für die Färbung von 500.000 Zellen/Test. A) zeigt die relativen Fluoreszenzintensitäten mit steigender Antikörpermenge gefärbter FOLR-1-positiver HELA Zellen, B) zeigt die entsprechenden Intensitäten gefärbter FOLR-1-negativer A-549 Zellen. Mit Stern* markiert ist die Antikörperkonzentration, im Folgenden für die Zellcharakterisierungen verwendet wurden.

Die maximal erreichbare Fluoreszenzintensität des anti-HER-2/neu-FITC Antikörpers ist verglichen mit den beiden anderen Antikörpern mit ~7 AU nur sehr gering (Abb. 4.2-7 A). Die Immunzytochemie mittels anti-EpCAM-PerCP-Cy5.5 Antikörper erzielt dreimal so starke Intensitäten (Abb. 4.2-7 B), die Färbung mit dem anti-FOLR1-PE Antikörper sogar fast 100mal stärkere (Abb. 4.2-8 A). Neben einer geringeren Anzahl an Bindungsstellen (Rezeptoren) auf der Zelloberfläche sind vor allem die Helligkeiten der verwendeten Fluorochrome hierfür ausschlaggebend. So ist laut BD Biosciences die relative Helligkeit von FITC-Konjugaten lediglich mittelmäßig, die von PerCP-Cy5.5-Verbindungen hell und die von PE-Markierung sogar am hellsten¹⁵. Diese Beschreibung spiegelt sich in den maximal erzielten Fluoreszenzintensitäten wieder. Die Expression des HER-2/neu Rezeptors ist laut PCR relativ schwach, die FOLR1 Expression stark (siehe Abb. 4.2-2 und Abb. 4.2-3). Eine Kombination aus schwach exprimiertem Protein und schwachem Fluorochrom (wie bei HER-2/neu-FITC) ist wegen der erzielbaren geringen Fluoreszenzintensität und geringeren Sensitivität eher schlecht geeignet. Bei der Antikörperauswahl wurde dieses zwar beachtet, aber eine andere Kombination der drei Fluorochrome war nicht verfügbar. Um sicher zu stellen, dass die Sensitivität für eine Zelldiskriminierung ausreichend war, wurden die HER-2/neu-positiven A-549 und human-HER-2/neu-negative NIH-3T3 Zellen mitein-

¹⁵ http://www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor_Fluorochrome_Guide.pdf

ander verglichen. Der Intensitätsunterschied beider Zelllinien ist noch groß genug, um zwischen Rezeptor-positiven und Rezeptor-negativen Zellen unterscheiden zu können (siehe Abb. 4.2-9).

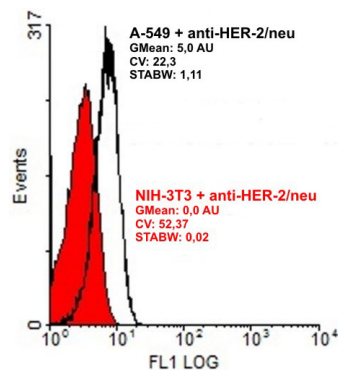


Abb. 4.2-9: Histogramme der NIH-3T3 (rot) und A-549 (schwarz) Zellcharakterisierung für den HER-2/neu Rezeptor mittels Durchflusszytometrie. Die berechneten relativen Fluoreszenzintensitäten (GMean, bezogen auf die *mouse* IgG Isotypkontrollfärbungen), die Variationskoeffizienten (CV) und die Standardabweichungen sind unter den jeweiligen Zelllinien angegeben.

4.2.2.3 Expressionsnachweis der untersuchten Biomarker auf den verwendeten Zellen

Die Charakterisierung der Zellen bezüglich der Oberflächen-Biomarker HER-2/neu, FOLR-1 und EpCAM mittels Durchflusszytometrie erfolgte mit Hilfe des optimierten Protokolls (siehe Kapitel 4.2.2.1) und der geringsten effektiven Antikörpermenge (siehe Kapitel 4.2.2.2). Die verwendeten Antikörper- und Puffervolumina sowie die optimierten Antikörpermengen pro Test sind in Tab. 4.2-4 aufgelistet. In jedem Test wurden von den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien und Primärzellen wie zuvor 500.000 Zellen eingesetzt.

Tab. 4.2-4: Auflistung der Antikörper und Isotypkontrollen, die für die Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie verwendet wurden. Die Vorverdünnungen der Antikörper in Inkubationspuffer und die optimierten, resultierenden Antikörpermengen pro Test in µg sind ebenfalls angegeben.

	Antikörper	Volumen Antikörper [µL]	Volumen Puffer [µL]	Antikörper/ Test [µg]
Antikörper	BD Human anti-HER-2/neu FITC	13,33	6,67	0,04
Isotypkontrolle	BD Mouse IgG ₁ , k FITC	0,8	19,2	
Antikörper	R&D anti-human FOLR1 PE	2	18	0,1
Isotypkontrolle	BD Mouse IgG ₁ , k PE	2	18	
Antikörper	BD Human anti-EpCAM PerCP-Cy5.5	40	-	0,08
Isotypkontrolle	BD Mouse IgG ₁ , k PerCP-Cy5.5	6,4	33,6	

Die Ergebnisse aller Messungen sind in Abb. 4.2-10 dargestellt. In Teilabbildung A) ist die Zellfärbung mit dem Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-markierten anti-HER-2/neu Antikörper gezeigt, in Teilabbildung B) die mit dem anti-*human* FOLR1-Phycoerythrin-(PE) Antikörper und in Teilabbildung C) die Zellfärbung mit dem PerCP-Cy5.5-markierten anti-EpCAM Antikörper. Der Übersichtlichkeit halber ist jede Zelllinie in einer anderen Farbe

dargestellt: A-549 (hellgrün), CACO-2 (türkis), HELA (schwarz), HEP-G2 (lila), MCF-7 (dunkelblau) und NIH-3T3 (hellblau), sowie die Primärzellen (ucMSCs) als rote Fläche. Zusätzlich ist in allen Teilabbildungen der Fluoreszenzbereich mit einem Marker (M1) gekennzeichnet, in dem 1 % der Zellen der Negativkontrolle das höchste Signal erzeugen. Beim Vergleich der Abbildungen wird sehr gut deutlich, dass die NIH-3T3 Zelllinie von allen Antikörpern nicht detektiert und angefärbt wird. Diese Zelllinie zeigt in allen drei Experimenten Fluoreszenzintensitäten von 0 AU. Negativ für zwei zu detektierende Proteine sind die Primärzellen, sie zeigen lediglich für das Protein HER-2/neu zu 44 % ein positives Ergebnis. Mit Ausnahme der NIH-3T3 Zellen sind alle anderen getesteten Zellen HER-2/neu-positiv, sodass eine Zelldiskriminierung auf Basis dieses Biomarkers alleine nicht sinnvoll ist. Weiterhin sind zwei Zelllinien negativ für jeweils ein Protein; HEP-G2 Zellen sind FOLR1-negativ und HELA Zellen sind EpCAM-negativ getestet worden. MCF-7 Zellen sind gleichfalls für zwei Biomarker positiv und für das FOLR1-Protein zudem mit 63% überwiegend negativ. FOLR1-negativ sind A-549 Zellen, welche auch zu 72% als EpCAM-negativ identifiziert worden sind. Die CACO-2 Zelllinie stellte sich in den durchflusszytometrischen Messungen als einzige Zelllinie heraus, die für alle drei Biomarker eindeutig positiv ist. Insgesamt ist festzustellen, dass eine Unterscheidung der Zellen insbesondere anhand des FOLR1 und EpCAM Biomarkers möglich ist.

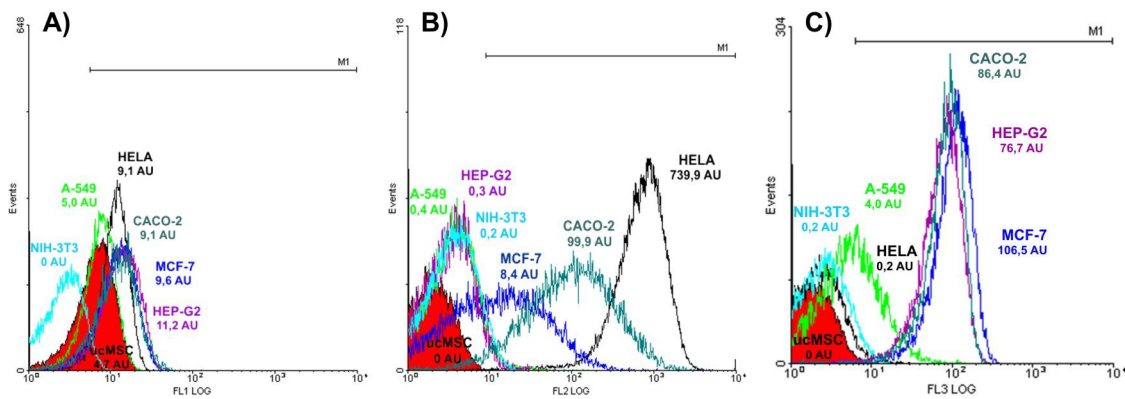


Abb. 4.2-10: Histogramme der durchflusszytometrischen Charakterisierung bezüglich der Expression der Zell-Biomarker HER2/neu (A), FOLR1 (B) und EpCAM (C). Die berechneten relativen Fluoreszenzintensitäten (bezogen auf die *mouse* IgG Isotypkontrollfärbungen) sind unter den jeweiligen Zelllinien angegeben. M1 markiert den Fluoreszenzintensitätsbereich, in dem die Zellen positiv sind.

4.2.3 Schlussfolgerungen

In Tab. 4.2-5 sind die Ergebnisse der Zellcharakterisierungen mittels PCR und Durchflusszytometrie der Übersichtlichkeit halber nochmals zusammengefasst. Zudem sind für jeden Rezeptor jeweils eine positive und eine negative Zelllinie mit einem Stern (*) markiert, die in den Zelldetektionsstudien verwendet wurden. Es wird deutlich, dass eine

Charakterisierung der Zellen ausschließlich auf mRNA-Ebene nur unzureichend ist. MCF-7 Zellen sind mittels PCR als HER-2/neu-negativ charakterisiert worden, sind aber in der Durchflusszytometrie positiv gewesen. Der umgekehrte Fall ist bei HEP-G2 (für FOLR1) und ucMSC Zellen (für EpCAM) jedoch auch aufgetreten. In der Literatur ist diese Problematik vielfach beschrieben und macht die unterschiedlichen mRNA- und Protein-Stabilitäten deutlich [51].

Tab. 4.2-5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellcharakterisierungen mittels PCR und Durchflusszytometrie. Positive Resultate sind grün, negative rot markiert. Ein qualitativer Vergleich der PCR-Bandenstärken und die relativen Fluoreszenzintensitäten (bezogen auf die *mouse* IgG Isotypkontrollen) der durchflusszytometrischen Messungen, sowie die Organismen sind in Klammern angegeben. Die Anzahl positiv-getesteter Zellen mittels Durchflusszytometrie sind in Prozent angegeben. Fett und mit Stern* markiert sind die Zelllinien, die im Folgenden für Zelldiskriminierungsstudien verwendet werden. N.u. = nicht untersucht.

Zelllinie	Ursprung	PCR für HER-2	PCR für FOLR1	PCR für EpCAM	Durchflusszytometrie HER-2	Durchflusszytometrie FOLR1	Durchflusszytometrie EpCAM
A-549	Lunge (<i>human</i>)	Positiv (mittel)	Negativ	Positiv (schwach)	* Positiv (5,0 AU) 55,0 %	* Negativ (0,4 AU) 1,0 %	Positiv/Negativ (4,0 AU) 28,3 %
HEP-G2	Leber (<i>human</i>)	Positiv (schwach)	Positiv (schwach)	Positiv (stark)	Positiv (11,2 AU) 79,9 %	Negativ (0,3 AU) 1,4 %	* Positiv (76,7 AU) 98,4 %
HELA	Eierstock (<i>human</i>)	Positiv (mittel)	Positiv (stark)	Negativ	Positiv (9,1 AU) 86,3 %	* Positiv (739,9 AU) 99,5 %	* Negativ (0,2 AU) 2,3 %
NIH-3T3	Fibroblast (<i>murin</i>)	Negativ (<i>human</i>) Positiv (<i>murin</i>)	Negativ (<i>human</i>) Positiv (<i>murin</i>)	n.u.	* Negativ <i>human</i> (0 AU) 1,0 %	Negativ <i>human</i> (0,2 AU) 0,8 %	Negativ <i>human</i> (0,2 AU) 1,0 %
CACO-2	Darm (<i>human</i>)	Positiv (mittel)	Positiv (mittel)	Positiv (stark)	Positiv (9,1 AU) 79,1 %	Positiv (99,9 AU) 93,4 %	Positiv (86,4 AU) 98,4 %
MCF-7	Brust (<i>human</i>)	Negativ	Positiv (schwach)	Positiv (stark)	Positiv (9,6 AU) 83,2 %	Positiv/Negativ (8,4 AU) 37,1 %	Positiv (106,5 AU) 99,1 %
ucMSC	Nabelschnur-Stammzellen (<i>human</i>)	Positiv (schwach)	Negativ	Positiv (mittel)	Positiv/Negativ (4,7 AU) 44,3 %	Negativ (0 AU) 0,0 %	Negativ (0 AU) 0,0 %

Die Unterschiede in der Expression des HER2/neu, FOLR1 und EpCAM-Proteins von den verschiedenen Zellen wurden mit Hilfe der beiden sehr spezifischen und sensitiven Analysemethoden aufgezeigt und gegenseitig bestätigt. Ein hohes Expressionslevel von HER2/neu in A-549 Zellen, von FOLR1 in HELA Zellen und von EpCAM in HEP-G2 Zellen konnte eindeutig nachgewiesen werden. Ebenso wurde gezeigt, dass NIH-3T3 Zellen aufgrund ihrer Herkunft für das humane HER2/neu negativ sind, diese Zellen jedoch *murines* HER2/neu exprimieren, was für die Antikörperauswahl entscheidend ist. A-549 Zellen sind für die FOLR1-Expression negativ, ebenso wie HELA Zellen für das EpCAM

Protein. Diese Zelllinien wurden somit in den weiteren Studien zur Zelldiskriminierung als Negativ- bzw. Positivkontrollen verwendet.

4.3 Zelldiskriminierung mittels einer Oberflächenbeschichtung

Üblicherweise werden Zellen in der Immunhistochemie voneinander unterschieden und gleichzeitig charakterisiert, indem sie mit Hilfe markierter Antikörper angefärbt werden, die an zellspezifische Proteine binden. Das Unterscheiden von Zellen könnte aber auch bereits bei der Bindung adhärenter Zellen auf einer Oberfläche stattfinden. Durch gezielte Modifikation dieser Oberfläche z.B. mit Biomolekülen könnten nur bestimmte Zellen an der Oberfläche binden oder besser auf dieser wachsen. In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob diese Möglichkeit der Zelldiskriminierung tatsächlich angewendet und einen Nutzen für die Microarray-Technologie haben kann. Dieses Kapitel wurde teilweise im Journal of Material Chemistry B., 2013, 1, 522-528 [13] veröffentlicht.

4.3.1 Etablierung einer zelldiskriminierenden Oberfläche anhand eines Modellzelllinienpaares

Mineralische Tonerde gehört zu den Substraten, die eine gute Zelladhäsion bewirken und außerdem mittels Ionenaustausch-Reaktionen auf einfache und effektive Weise mit funktionellen Gruppen versehen werden können [114]. Diese Silikate wurden bereits in mehreren biomedizinischen Studien als Substrate eingesetzt. So zeigten Poly(Milchsäure)-Montmorillonit Nanopartikel eine erhöhte Zelladhäsion und Zellausbreitung [95]. In einer anderen Studie wurde an Magnesiumsilikaten Folsäure adsorbiert [60]. Beide Studien zeigen, dass Tonerde als Zellkultursubstrat dienen und gezielt modifiziert werden kann. Folsäure (FS) bindet mit hoher Affinität an Folsäurerezeptoren (FOLR1), die u.a. auf der Zelloberfläche von Tumorzellen überexprimiert vorliegen. Mittels der Adsorption von Folsäure an Montmorillonit (Tonerde) könnte ein Zellkultursubstrat hergestellt werden, auf dem FOLR1-positive Zellen besser adhäreren und wachsen sollten als FOLR1-negative Zellen. Die Herstellung und Charakterisierung der Folsäure-Tonerde erfolgte in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Suna Timur an der Ege Universität in Izmir. Die Charakterisierungen mittels Fouriertransformations-Infrarot-Spektroskopie, Röntgenbeugungsspektrometrie, Thermo-

gravimetrie und Bestimmung der Zetapotenziale zeigten nach der Modifizierung eindeutig eine erfolgreiche Adsorption der Folsäure an die Tonerde [13].

Die FS-modifizierte Tonerde wurde als Rezeptor-bindende Oberfläche hinsichtlich einer verbesserten Zelladhäsion untersucht, indem eine FOLR1-positive und eine FOLR1-negative Zelllinie verwendet wurden. In Abb. 4.3-1 sind die Ergebnisse der entsprechenden Zellcharakterisierung (siehe Kapitel 4.2) für zwei Zelllinien (A-549 und HELA) zusammengefasst. In A) sind die Ergebnisse der PCR abgebildet. In B) und C) sind die der durchflusszytometrischen Messungen dargestellt. Sie zeigen die Kombination der Zellfärbungen mit einer Phycoerythrin-(PE)-markierten *mouse* IgG1 Isotypkontrolle als Negativkontrolle (schwarze Linie) einerseits und einem anti-*human* FOLR1-PE Antikörper (rote Fläche) andererseits. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die Zelladhäsionsstudien FOLR1-negative A-549 Zellen als Negativkontrolle und FOLR1-überexprimierende HELA Zellen als Modellzelllinie verwendet.

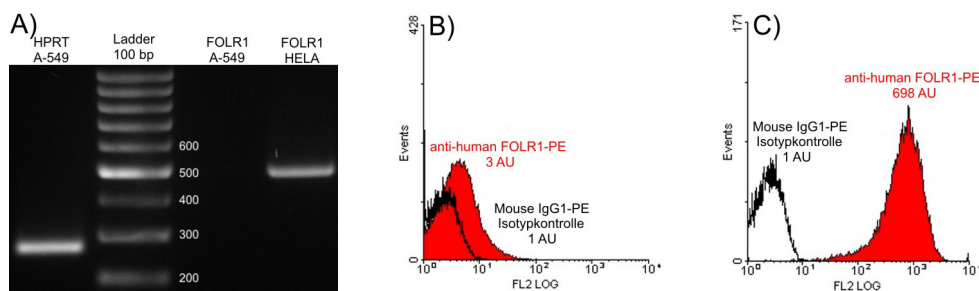


Abb. 4.3-1: Zellcharakterisierung bezüglich der Überexpression des Zellmembran-Biomarkers FOLR1 in A-549 und HELA Zellen mittels PCR (A) und Durchflusszytometrie (B, C). Das 1,5 % Agarosegel mit den Ergebnissen der PCR (A) zeigt auf Spur 2 den 100 bp DNA-Größenstandard, auf Spur 3 die Expression von FOLR1 in A-549 Zellen, auf Spur 4 die Expression von FOLR1 in HELA Zellen und auf Spur 1 die Expression des *Housekeeping* Gens HPRT in A-549 Zellen. Die Histogramme zeigen die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Färbung von A-549 (B) und HELA (C) Zellen mit einer *mouse* IgG1-Phycoerythrin (PE) Isotypkontrolle (schwarz) und einem anti-*human* FOLR1-PE (rot). Die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten sind als Nummern angegeben. Ergebnisse publiziert in [13].

Die Zelladhäsionseigenschaften der FS-Tonerde wurden fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopisch sowie mit Hilfe des CellTiter-Blue (CTB) *Cell Viability Assays* bestimmt. In jeder Studie wurde Folsäure-modifizierte Tonerde mit nicht modifizierter Tonerde verglichen, um die Eignung als Zellkulturmaterial zu untersuchen. Hierfür wurde eine FS-modifizierte Tonerde-Suspension (1 mg/mL PBS) in den Vertiefungen einer 96-Well Platte getrocknet. Anschließend wurden FOLR1-überexprimierende HELA und FOLR1-negative A-549 Zellen auf dem Substrat ausgesiedelt. Das Proliferationsverhalten der Zellen während einer Kultivierungsdauer von 96 h wurde mit Hilfe des CellTiter-Blue Tests quantitativ untersucht. Zusätzlich wurden für jede Oberfläche nach den jeweiligen Kultivierungszeiten die Zellkerne in einem Well mit DAPI gefärbt. Zum Vergleich wurden die Zellen auf einer unbeschichteten 96-Well Platten-Polystyroloberfläche kultiviert. Anhand von Abb. 4.3-2 lässt sich feststellen, dass die HELA Zellzahl auf der FS-modifizierten

Tonerde (B, rote Linie) vergleichbar mit der auf Polystyrol kultivierter Zellen (B, schwarze Linie) ansteigt. Die Zahl der A-549 Zellen (A) nimmt jedoch nur geringfügig zu. Beide Zelllinien wachsen auf der FS-modifizierten Tonerde (rote Linie) besser als auf der nicht modifizierten (blaue Linie), was an der extrem negativen Oberflächenladung der nicht modifizierten Tonerde liegt [17].

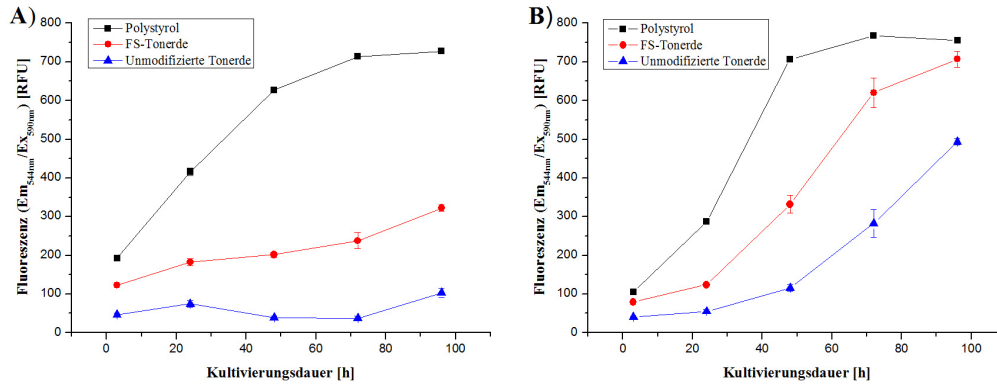


Abb. 4.3-2: Proliferationsverhalten von A-549 (A) und HELA (B) Zellen auf FS-Tonerde (rote Kurve), unmodifizierter Tonerde (blaue Kurve) und als Positivkontrolle Zellen kultiviert in einer 96-Well Polystyrol-Platte (schwarze Kurve) betrachtet über eine Kultivierungsdauer von 96 h. Ergebnis publiziert in [13].

Für den ersten Zell-Matrix-Kontakt spielen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ-geladenen Zelloberfläche und dem Matrixsubstrat eine entscheidende Rolle. Ohgaki *et al.*, 2001 beschrieben, dass negativ-geladene Matrices mit anorganischen divalenten Kationen sowie kationischen Aminosäuren und Proteinen (z.B. Fibronectin) aus dem Kulturmedium bedeckt sind. Diese Schicht aus Kationen und Proteinen vermittelt stärkere Zell-Matrix Wechselwirkungen [92]. Jedoch haben Cai *et al.*, 2006 bei der Charakterisierung funktionalisierter Titanschichten festgestellt, dass die Adsorption von Proteinen deutlich geringer ist, wenn das Zetapotenzial des Substrates niedriger ist. Zudem war neben einer geringeren Proteinadsorption auch die Zellproliferation geringer auf stärker negativ-geladenen Oberflächen [17]. Die hier verwendete Tonerde besitzt laut Messung des Zetapotenzials eine sehr negative Oberflächenladung (-42 mV). Nach der Modifizierung mit Folsäure ist das Zetapotenzial weniger negativ (-34 mV). Diese stark negativ-geladenen Oberflächenbeschichtungen könnten die Ursache für die schwächere Zellproliferation beider Zelllinien im Vergleich zu der Positivkontrolle sein. Der schwache Anstieg im Wachstum der A-549 auf der FS-modifizierten Tonerde ist begründet in der weniger negativen Oberflächenladung dieser. Verglichen mit den A-549 Zellen zeigen HELA Zellen auf FS-Tonerde ein deutlich besseres Wachstumsverhalten, was wahrscheinlich auf die Überexpression der Folsäurerezeptoren dieser Zelllinie zurückzuführen ist.

Das Proliferationsverhalten beider Zelllinien konnte zusätzlich mit Hilfe der DAPI-Zellkernfärbungen bestätigt werden. Zudem kann die DAPI-Färbung auch Auskunft über

den genauen Wachstumsort der Zellen geben, da die Tonerde schwach angefärbt und so gut sichtbar wird. Die Abb. 4.3-3 und Abb. 4.3-4 zeigen exemplarisch Aufnahmen der Zellkernfärbungen nach einer Kultivierungsdauer von 72 h. Es wird deutlich, dass beide Beschichtungen unregelmäßig sind und keine geschlossene Schicht bilden. Sie weisen stattdessen viele Zwischenräume auf. Die Zellzahl auf der FS-Tonerde (Abb. 4.3-3B, 4B) ist bei beiden Zelllinien größer als auf der nicht modifizierten Tonerde (Abb. 4.3-3A, 4A). Im Fall der nicht modifizierten Tonerde kann nicht genau gesagt werden, wo die Zellen wachsen. Die Abb. 4.3-3 C und 4C zeigen jeweils vergrößerte Ausschnitte der Teilabbildungen, auf denen ein sehr unterschiedliches Wachstumsverhalten der Zelllinien auf FS-Tonerde deutlich wird. Die HELA Zellen (Abb. 4.3-4C) wachsen hauptsächlich direkt auf der Beschichtung, wohingegen die A-549 Zellen die Zwischenräume der Beschichtung bevorzugen, beides wird in den Aufnahmen durch Pfeile angedeutet.

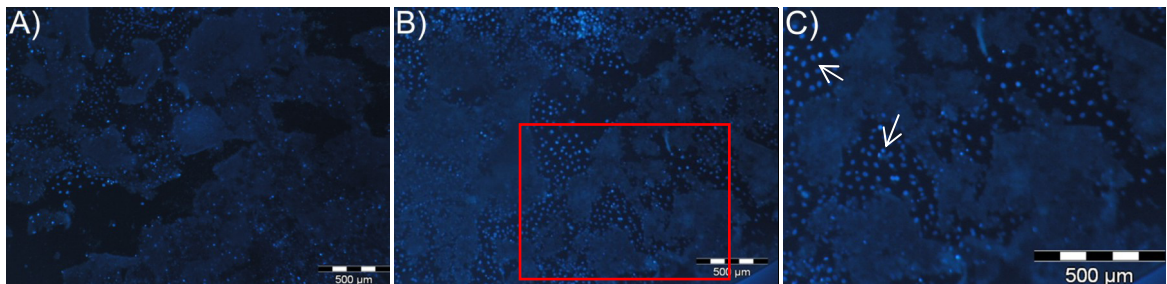


Abb. 4.3-3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der DAPI-Zellkernfärbung von A-549 Zellen, die auf unmodifizierter Tonerde (A) und FS-modifizierter Tonerde (B, C) für 72 h kultiviert wurden. C) ist ein vergrößerter Ausschnitt von B (rotes Rechteck), auf dem der Wachstumsort der Zellen exemplarisch mit Pfeilen verdeutlicht wird. Der Maßstab zeigt 500 µm. Ergebnis publiziert in [13].

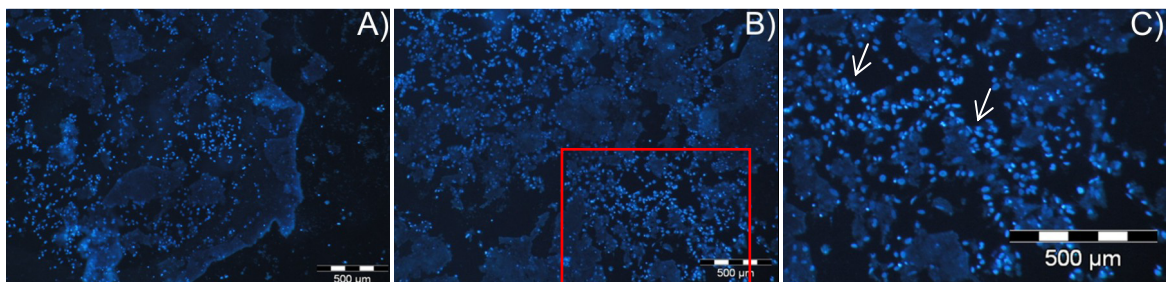


Abb. 4.3-4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der DAPI-Zellkernfärbung von HELA Zellen, die auf unmodifizierter Tonerde (A) und FS-modifizierter Tonerde (B, C) für 72 h kultiviert wurden. C) ist ein vergrößerter Ausschnitt von B (rotes Rechteck), auf dem der Wachstumsort der Zellen exemplarisch mit Pfeilen verdeutlicht wird. Der Maßstab zeigt 500 µm. Ergebnis publiziert in [13].

Die REM-Aufnahmen der Zellen, die auf unmodifizierter Tonerde und FS-Tonerde kultiviert wurden, geben zusätzlich zur Zellzahl und -morphologie auch Aufschluss über die Oberflächenbeschaffenheit der Beschichtungen. Ein Vergleich der Teilabbildungen A) und B) der Abb. 4.3-5 und Abb. 4.3-6 zeigt große strukturelle Unterschiede der beiden Tonerden auf. So ist unmodifizierte Tonerde sehr grob und unregelmäßig strukturiert, wohingegen die FS-modifizierte Tonerde eine relativ glatte Oberfläche bildet. Beide Zelllinien zeigen auch auf diesen Aufnahmen ein besseres Wachstumsverhalten auf FS-modifizierter Tonerde. Auf der

unmodifizierten Tonerde sind nur sehr wenige, im Fall von A-549 (Abb. 4.3-5 A) nur schwer von der Oberflächenstruktur unterscheidbare Zellen erkennbar (mit Pfeilen angedeutet). Auf FS-Tonerde kultivierte HELA Zellen zeigen eine Morphologie, die überwiegend auf vitale Zellen schließen lässt. Es sind lediglich vereinzelte runde und somit tote Zellen zu sehen. Dieses gilt nicht für die A-549 Zellen. Es sind insgesamt weniger und auch deutlich mehr tote Zellen vorhanden. Der Großteil der Zellen besitzt hier eine runde Morphologie.

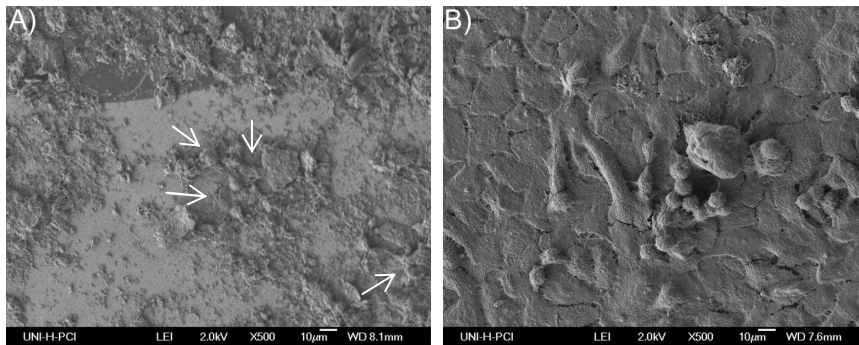


Abb. 4.3-5: REM Aufnahmen adhärierter A-549 Zellen kultiviert auf unmodifizierter Tonerde (A) und FS-modifizierter Tonerde (B). In A) werden einige Zellen von Pfeilen angezeigt. Der Maßstab zeigt 10 µm. Ergebnis publiziert in [13].

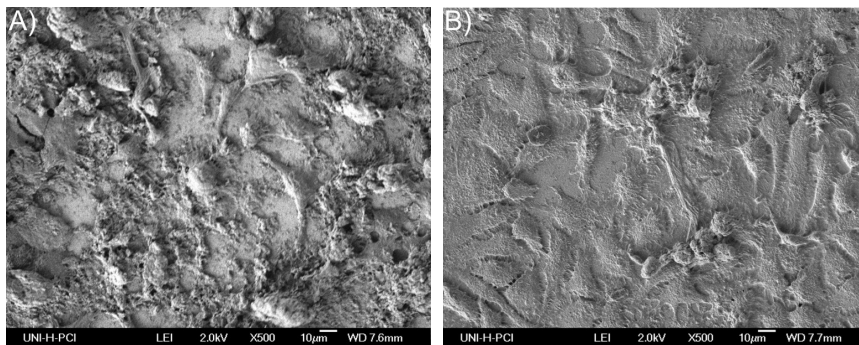


Abb. 4.3-6: REM Aufnahmen adhärierter HELA Zellen kultiviert auf unmodifizierter Tonerde (A) und FS-modifizierter Tonerde (B). Der Maßstab zeigt 10 µm. Ergebnis publiziert in [13].

Insgesamt zeigten die Zellen eine unterschiedlich hohe Affinität zu der Rezeptor-bindenden Oberfläche, die vom Rezeptor-Expressionslevel der Zellen abhing. Die FOLR1-positiven Zellen banden effektiver an das Folsäure-modifizierte Substrat als die FOLR1-negativen A-549 Zellen und zeigen eine deutlich bessere Proliferation.

4.3.2 Anwendung der Oberflächenbeschichtung auf ein weiteres Zelllinienpaar

Um zu untersuchen, ob dieses Verhalten generell auf andere Zellen übertragbar ist, wurde das Experiment von dem A-549/HELA-Modellsystem auf ein anderes Zelllinienpaar HEP-G2/NIH-3T3 übertragen. In Abb. 4.3-7 sind die Ergebnisse der Zellcharakterisierung mittels PCR (siehe Kapitel 4.2) gezeigt. Dementsprechend wurden HEP-G2 Zellen als FOLR1-negative Kontrolle und NIH-3T3 Zellen als FOLR1-positiv Zelllinie verwendet.

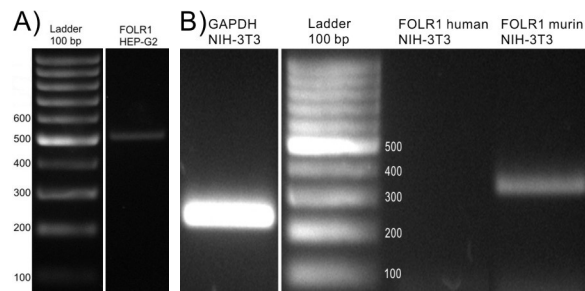


Abb. 4.3-7: Zellcharakterisierung bezüglich der Transkription des FOLR1-Gens in HEP-G2 und NIH-3T3 Zellen mittels PCR. Das 1,5 % Agarosegel mit den PCR-Ergebnissen für HEP-G2 Zellen (A) zeigt auf Spur 1 den 100 bp DNA-Größenstandard und auf Spur 2 die Transkription des FOLR1-Gens. Das 1,5 % Agarosegel für die NIH-3T3 Zellen zeigt auf Spur 2 den 100 bp DNA-Größenstandard, auf Spur 3 die Transkription des *humanen* FOLR1-Gens, auf Spur 4 die Transkription des *murinen* FOLR1-Gens und auf Spur 1 die Transkription des *Housekeeping* Gens GAPDH.

Die Zelladhäsionseigenschaften der FS-modifizierten Tonerde wurden auch für dieses Zelllinienpaar fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopisch sowie mittels CTB-Test bestimmt. Der CTB-Test zeigte ein mit dem A-549/HELA-System vergleichbares Ergebnis. Auch hier stieg die Anzahl der auf FS-Tonerde kultivierten FOLR1-negativen Zellen (HEP-G2, Abb. 4.3-8A) nur geringfügig an, die der FOLR1-positiven NIH-3T3 hingegen nahm deutlich zu (B). Wiederum war das Zellwachstum beider Zelllinien auf dem FS-modifizierten Substrat besser als auf der unmodifizierten Variante.

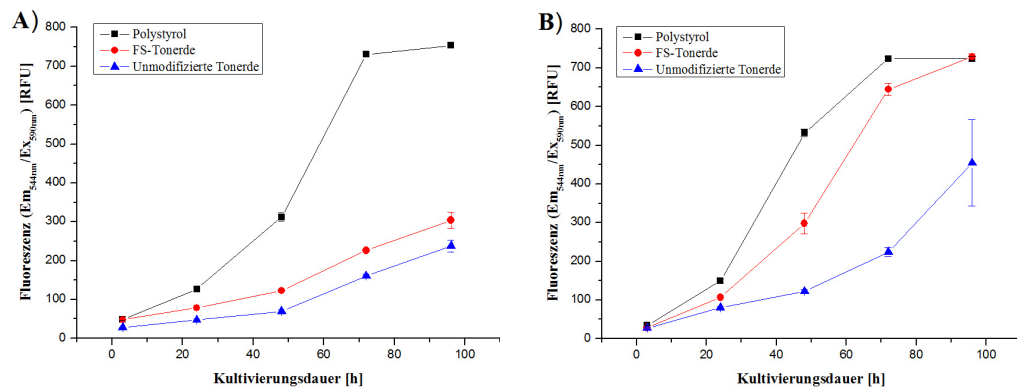


Abb. 4.3-8: Proliferationsverhalten von HEP-G2 (A) und NIH-3T3 (B) Zellen auf FS-Tonerde (rote Kurve), unmodifizierter Tonerde (blaue Kurve) und als Positivkontrolle Zellen kultiviert in einer 96-Well-Polystyrol-Platte (schwarze Kurve) betrachtet über eine Kultivierungsdauer von 96 h.

Das Proliferationsverhalten beider Zelllinien konnte erneut mittels DAPI-Zellkernfärbungen bestätigt werden. Um den Wachstumsort der Zellen vergleichen zu können, sind im Folgenden die DAPI-Färbungen nach einer Kultivierungsdauer von 48 h gezeigt (siehe Abb. 4.3-9). Im Gegensatz zum Modellsystem kann bei den HEP-G2 und NIH-3T3 Zellen jedoch diesbezüglich kein Unterschied festgestellt werden. Auf beiden Oberflächen befinden sich die Zellen direkt auf der Beschichtung und nicht in den Zwischenräumen. Die Zellzahl der HEP-G2 Zellen (A) ist auf der FS-modifizierten Tonerde deutlich niedriger als die der NIH-3T3 Zellen (B). Hier ist annähernd die gesamte Beschichtung mit Zellen bedeckt.

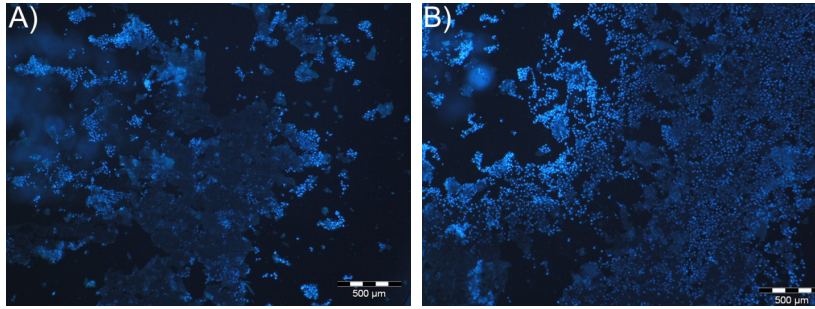


Abb. 4.3-9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DAPI-Zellkernfärbung von HEP-G2 (A) und NIH-3T3 Zellen (B), die auf FS-modifizierter Tonerde für 48 h kultiviert wurden. Der Maßstab zeigt 500 µm.

Die REM-Aufnahmen der Zellen, die auf unmodifizierter Tonerde und FS-modifizierter Tonerde kultiviert wurden, zeigten große Ähnlichkeit mit denen des Modellsystems. Die Zellzahl der FOLR1-positiven NIH-3T3 Zellen ist auf der FS-modifizierten Tonerde (Abb. 4.3-10 B) deutlich höher als die der FOLR1-negativen HEP-G2 Zellen (A), was die zuvor gezeigten Ergebnisse bestätigt.

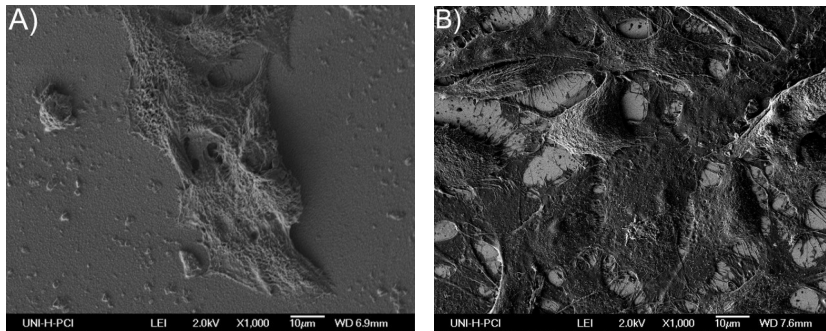


Abb. 4.3-10: REM Aufnahmen adhärirter HEP-G2 (A) und NIH-3T3 Zellen (B) kultiviert auf FS-modifizierter Tonerde. Der Maßstab zeigt 10 µm.

Bei eingehender Betrachtung einiger Aufnahmen der Kultivierung auf nicht modifizierter Tonerde war ein Nachteil der gewählten Beschichtungsmethode zu erkennen. In Abb. 4.3-11 sind verschiedene Bildausschnitte gezeigt, auf denen deutlich zu erkennen ist, dass die Beschichtung in einem Bereich sehr unregelmäßig ist und sich übereinander lagert. In A) ist dieses an der Unschärfe des rechten Bereiches erkennbar, der sich oberhalb des fokussierten linken Bereich befindet. Ähnliches gilt für B), wo in der rechten unteren Ecke ein Teil der Beschichtung übereinander gelagert ist. Beides wird durch Pfeile verdeutlicht. Auch auf der REM-Aufnahme der NIH-3T3 Zellen auf nicht modifizierter Tonerde sind drei Bereiche zu sehen, die eine sehr ebene Oberfläche besitzen und sich daher deutlich von der übrigen Oberfläche unterscheiden. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Beschichtungsstücke, die sich abgelöst haben und sich dann mit der Unterseite nach oben in dem gezeigten Bereich wieder abgelagert haben. Nicht nur die sehr grobe Tonerdebeschichtung zeigte diese Problematik. Auch von der FS-modifizierten Tonerde konnten sich Teile ablösen, wie es in D) anhand der aufgerollten Beschichtung zu erkennen ist. Diese Aufnahme ist jedoch das

einziges Beispiel für die Ablösung der FS-modifizierten Tonerde, wohingegen eine Ablösung der Beschichtung bei der nicht modifizierten Tonerde häufiger zu finden ist. Die Methode der Beschichtung könnte somit noch weiter verbessert werden, um eine ebenmäßigere Oberflächenstruktur zu erzielen.

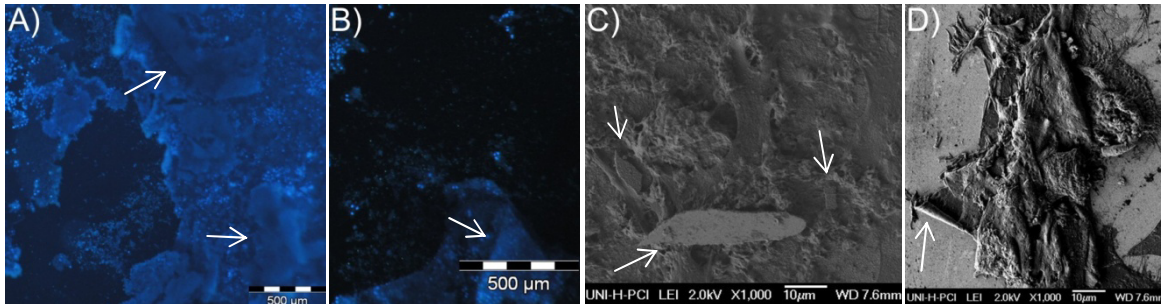


Abb. 4.3-11: Nachteil der Beschichtungsmethode, sich ablösende Bereiche der unmodifizierten Tonerde (A-C) und FS-modifizierten Tonerde (D). Der Maßstab zeigt in A) und B) 500 µm in C) und D) 10 µm.

4.3.3 Schlussfolgerungen

Eine Diskriminierung von Zellen mit Hilfe einer spezifischen Oberflächenmodifikation ist sehr gut möglich. Als Beispiel für diese Oberflächenstrukturen wurde eine Folsäure-modifizierte Tonerde als Substrat gewählt und mit nicht funktionalisierter Tonerde verglichen. Mit Hilfe eines Modell-Zelllinienpaares, das als Folsäure-Rezeptor-negativ (A-549) und Folsäure-Rezeptor-positiv (HELA) beschrieben ist, konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Oberflächenmodifikationen Zellen diskriminieren können. Um die allgemeine Anwendbarkeit dieses Systems zu demonstrieren, wurde es zudem erfolgreich auf ein anderes Zelllinienpaar (HEP-G2, NIH-3T3) übertragen. Rezeptor-exprimierende Zellen adhärten deutlich besser und zeigten ein gutes Proliferationsverhalten, wohingegen Rezeptor-negative Zellen nur eine schwache Bindung und Proliferation zeigten. Die Folsäure-modifizierte Tonerde war somit ein gutes Beispiel eines Rezeptor-bindenden Zellkultursubstrates. Nach einer weiteren Optimierung der Beschichtungsmethode, um noch gleichmäßigere Oberflächenschichten zu erzeugen und die Reproduzierbarkeit weiter zu verbessern, wäre eine Anwendung der Oberfläche zur Beschichtung von Lebendzell-Microarrays möglich.

4.4 Entwicklung Quantum Dot-basierter Detektionsassays

Zellen werden üblicherweise identifiziert und spezifisch voneinander unterschieden, indem sie mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden. Diese Antikörper binden an zellspezifische Proteine und sind fluoreszenzmarkiert. Verschiedene Zelllinien sollten im Folgenden spezifisch mit wasserlöslichen Fluoreszenznanopartikeln detektiert werden. Halbleitende Nanopartikel, so genannte Quantum Dots, zeigen eine intensive Photolumineszenzemission und eine hohe Photostabilität. Im Gegensatz zu den gängigen organischen Fluorochromen sind ihre Absorptionsspektren sehr breit, die Emissionsspektren jedoch sehr schmal, so dass ein Multiplexing verschiedener Targets möglich ist [31]. Alle Nanopartikel besitzen eine große Oberfläche, an die Moleküle gebunden werden können [49; 44], sodass nicht nur ein Antikörper pro Partikel gebunden ist, sondern mehrere. Daraus kann eine stärkere Bindung mit dem Target resultieren.

Es wurden drei verschiedene Kern/Hülle Quantum Dots getestet: 1. Kommerziell erwerbbarer Nanopartikel mit hydrophoben Oberflächengruppen (Kapitel 4.4.1), 2. Nano-partikel mit einer Polymerbeschichtung mit hydrophilen Endgruppen (Kapitel 4.4.3 und 4.4.4), 3. Nanopartikel mit hydrophilen Oberflächengruppen (Kapitel 4.4.2). Diese wurden entweder mit Antikörpern (Kapitel 4.4.1 - 4.4.3) oder mit Aptameren (siehe Kapitel 4.4.4) versehen. Die Inhalte der Kapitel 4.4.1 und 4.4.2 wurden während der Forschungsaufenthalte von Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Suna Timur von der Ege Universität in Hannover in enger Kooperation erarbeitet und in den Journalen *Journal of Material Chemistry B.*, 2012, 22, 11529-11536 [2] und *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 114, 96-103 [1] veröffentlicht.

4.4.1 Konjugate hydrophober Hexadecylamin-Quantum Dots_{560nm} (CdSe/ZnS) mit einem anti-HER-2/neu-Antikörper

Kommerziell erhältliche Quantum Dots (QDs), die als eine Alternative zu den organischen Fluorochromen angeboten werden, sind entweder als hydrophobe Nanopartikel oder als hydrophile, meist Polymer-beschichtete, Nanopartikel verfügbar. Sollen QDs für die Zelldetektion verwendet werden, müssen sie mit Biomolekülen (z.B. Antikörper, Aptamere, Folsäure) funktionalisiert werden. Hierfür müssen die hydrophoben Nanopartikel in die wässrige Phase überführt werden, was durch einen Ligandenaustausch erfolgt. Auf diese Weise werden hydrophile Gruppen oder elektrostatische Ladungen auf die QD-Oberflächen aufgebracht und die QDs dadurch wasserlöslich. Erst nach dem Phasentransfer können die

eigentlichen Biomoleküle mit den Nanopartikel konjugiert werden. Wasserlösliche Nanopartikel sind preislich deutlich teurer als ihre hydrophoben Vorstufen, weshalb in diesem Kapitel hydrophobe Hexadecylamin (HDA)-Quantum Dots (Sigma Aldrich) bestehend aus einem CdSe-Kern und einer ZnS-Hülle eingesetzt wurden. Laut Herstellerangaben besitzen sie einen Durchmesser von 3,4 nm. Deren hydrophobe Oberflächengruppen wurden zunächst durch ein Dendrimer (Polyamidoamin) mit terminalen Amingruppen ausgetauscht, um die Nanopartikel in die wässrige Phase zu überführen. Für Zellfärbungsstudien wurden sie dann mit einem Antikörper gegen das Rezeptorprotein HER-2/neu versehen.

4.4.1.1 Protokolloptimierung und Charakterisierung der Quantum Dot/Polymer/Antikörper-Biokonjugate

Polyamidoamin Generation 5 (PAMAM, P-G5) ist ein stark verzweigtes Makromolekül. Die große Anzahl an Konjugationsstellen führt zu sehr dicht funktionalisierten und stabilen Strukturen [84]. Zudem stabilisieren Dendrimere mit Amin-Endungen die QDs elektrostatisch und sie verbessern die zellmembranpassierenden Eigenschaften [21; 68]. Die große Pufferkapazität der primären und tertiären Amine von PAMAM unterstützt das Austreten der Partikel aus den Endosomen. Diese werden beim Eindringen in die Zelle um die Quantum Dots gebildet. Ohne die Freisetzung aus den Vesikeln kommt es zum Photobleaching der QDs aufgrund der Azidität der Endosomen [122]. In Abb. 4.4-1 sind der Ligandenaustausch, die Biokonjugation und Anwendung schematisch dargestellt. Während der Inkubation interagieren die multiplen Amingruppen der PAMAM (P) Moleküle wegen ihrer großen Bindungsaffinität mit den Zinkatomen der Oberfläche der HDA-QDs (CdSe/ZnS), sodass die entstandenen P/QDs wasserdispergierbar werden. Die kovalente Bindung eines Antikörpers gegen den HER-2/neu Rezeptor an die P/QDs erfolgte mittels einer EDC/NHS-Crosslinking-Reaktion. Dieses Linkerpaar initiiert die Kondensation eines primärenamins (hier PAMAM) mit einer Carboxylgruppe (hier Antikörper) unter Bildung einer Amidbindung.

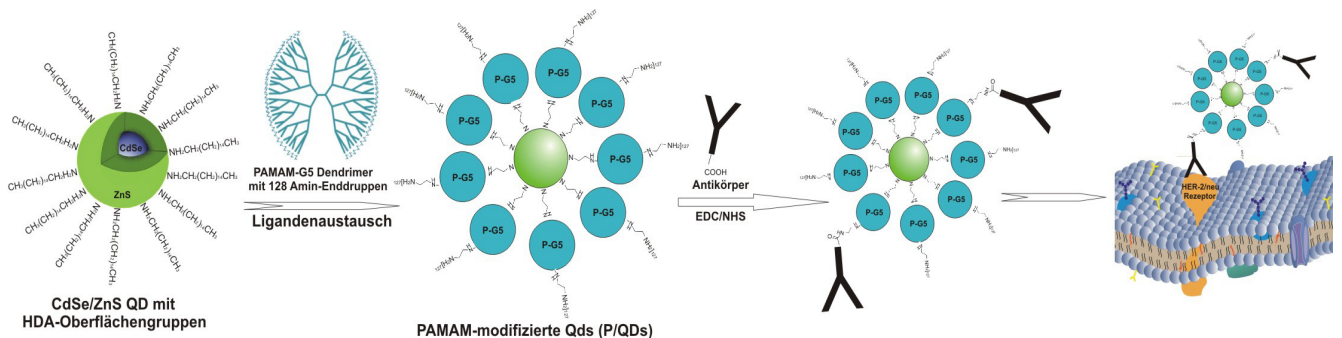


Abb. 4.4-1: Schematische Darstellung des Ligandenaustausches zwischen HDA-stabilisierten QDs und PAMAM-G5 Dendrimern, der Biokonjugation der hergestellten hydrophilen PAMAM-modifizierten QDs (P/QDs) mit einem Antikörper gegen den HER-2/neu Rezeptor und der Anwendung der P/QD/anti-HER2-Konjugate in der Zelldetektion.

Die Nanopartikel gingen bei der Modifikation mit PAMAM vollständig in die wässrige Phase über, sodass von einem erfolgreichen Ligandenaustausch ausgegangen werden konnte. Um diesen Austausch zu bestätigen und mögliche Effekte der Oberflächenbeschichtung auf die Fluoreszenzeigenschaften der QDs zu ermitteln, wurden die Absorptions- und Emissionsspektren der Edukte (HDA-QDs, P-G5), der PAMAM-modifizierten QDs (P/QDs) und der finalen Biokonjugate (P/QD/anti-HER2) aufgenommen. Wie in Abb. 4.4-2 A) zu erkennen ist, änderten sich die Fluoreszenzeigenschaften der QDs durch diese Reaktion nicht; das Maximum der Emission verblieb bei 563 nm. Da PAMAM im Gegensatz zu den HDA-QDs einen Absorptionspeak bei 280 nm zeigte und die Konjugate diesen Peak ebenfalls zeigten (siehe Abb. 4.4-2 B Insert), konnte auf einen erfolgreichen Ligandenaustausch geschlossen werden. Eine weitere Funktionalisierung der P/QDs mit dem Antikörper führte zu keinen Veränderungen der optischen Eigenschaften.

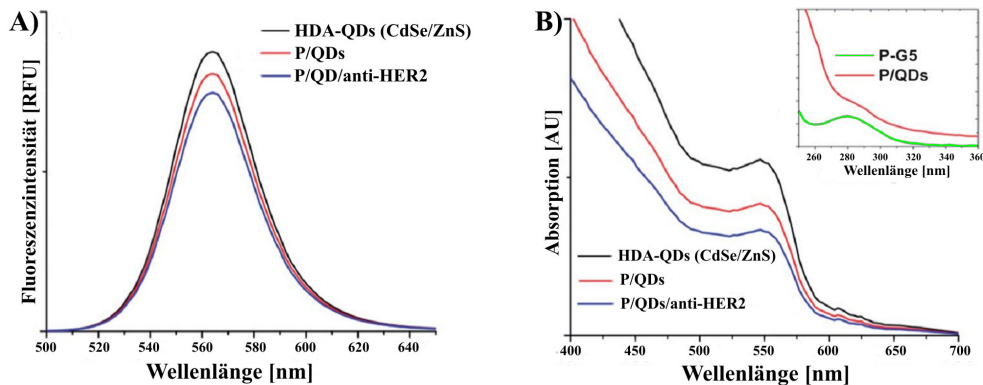


Abb. 4.4-2: Fluoreszenz- (A) und UV-Vis-Spektren (B) von nicht funktionalisierten HDA-QDs (CdSe/ZnS, schwarze Kurven), PAMAM (P-G5)-modifizierten QDs (P-QDs, rote Kurven) und anti-HER2-funktionalisierten P/QDs (blaue Kurven), sowie von PAMAM (grüne Kurve im Insert). Ergebnis publiziert in [2].

Die HDA-QDs wurden mit verschiedenen Mengen PAMAM modifiziert und die Anzahl der PAMAM-Moleküle pro QD wurde über einen Bradford-Test bestimmt. Die positiv-geladenen primären und tertiären Amine des PAMAM bilden unter aziden Bedingungen mit den negativen Gruppen des Coomassie Brilliant Blue G-250 einen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm. Mit Hilfe einer Kalibrationskurve von PAMAM ($y = 0,994x - 0,005$; $R^2 = 0,999$) wurde berechnet, dass maximal 28 PAMAM-Moleküle an einen QD gekoppelt werden konnten.

Der hydrodynamische Durchmesser der P/QDs wurde unter Verwendung des *dynamic light scattering* (DLS) ermittelt. Die Partikelgrößen von PAMAM (P-G5) und QDs mit 14 (P14/QD) und 28 (P28/QD) PAMAM-Molekülen sind in Abb. 4.4-3 gezeigt. Die mittels DLS gemessene Größe von 5,6 nm für P-G5 stimmt gut mit der in der Literatur beschriebenen Größe für Amin-funktionalisierte PAMAM-G5 Dendrimere des Tomalia-Typs mit 5,7 nm Durchmesser überein [84]. Eine Zunahme gebundener PAMAM-Moleküle

führt nicht nur zu einer Vergrößerung des Durchmessers von 32,9 nm bei P14/QD auf 58,8 nm bei P28/QD, sondern auch zu einer deutlich breiteren Größenverteilung und somit Heterogenität der Partikel. Nachteil der DLS-Methode ist, dass der hydrodynamische Durchmesser bestimmt wird, welcher nicht zuletzt auch von der Partikelladung abhängig ist und je nach Puffer und Pufferzusätzen stark aufgrund einer ausgebildeten Doppelschicht der Salze und Wassermoleküle variieren kann. Daher wurden von einer Probe lyophilisierter P14/QDs auch Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen angefertigt und die Partikel vermessen. Ihr Durchmesser betrug im Mittel 31,8 nm, welches gut mit der Größe der DLS-Bestimmung übereinstimmt.

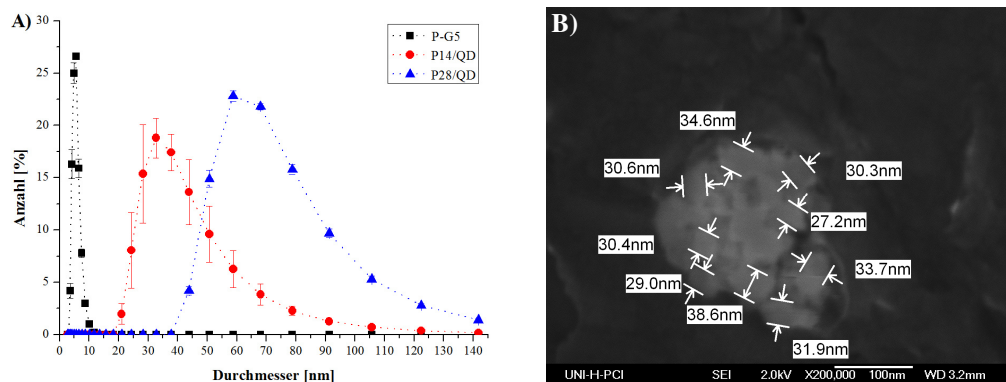


Abb. 4.4-3: Bestimmung der Partikelgrößen mittels DLS-Messungen (A) und REM (B). A) Größenverteilung von PAMAM (P-G5, schwarze Quadrate, 5,61 nm \pm 0,3), von QDs mit 14 PAMAM-Molekülen (P14/QD, rote Kreise, 32,91 nm \pm 1,9) und mit 28 PAMAM-Molekülen (P28/QD, blaue Dreiecke, 58,78 nm \pm 0,5). Die Fehlerbalken entsprechen den Werten der Standardabweichungen von N = 3 Messungen. Ergebnis publiziert in [2]. B) Bestimmung von Partikelgrößen einer lyophilisierten Probe P14/QDs mittels REM, die durchschnittliche Größe beträgt 31,81 nm \pm 3,40.

Eine geringe Größe der Quantum Dot-basierten Fluoreszenzproben ist für eine gute Zellaufnahme und Tumordetektion essenziell [18; 23]. Daher wurden für die weiteren Anwendungen die kleineren P14/QDs verwendet, die zudem eine homogenere Größenverteilung besaßen.

4.4.1.2 Zytotoxizitätsbestimmungen

Sollen Nanopartikel für die Zelldetektion *in-vivo* verwendet werden, ist es zwingend notwendig, dass die Partikel biokompatibel sind. Auch wenn sie als Trägermaterialien für bioaktive Moleküle dienen sollen, um eine Zelle spezifisch zu stimulieren, dürfen sie keine toxischen Eigenschaften aufweisen. Die Zytotoxizität von Cadmium-basierten Quantum Dots wird auf die Freisetzung von Cd²⁺-Kationen in oxidativer Umgebung in der Zelle zurückgeführt [35]. Die toxischen Effekte von QDs basieren jedoch nicht nur auf den Nanokristallen selbst, sondern auch auf den beschichtenden Molekülen [35; 58]. Kationische Nanopartikel sind zudem oft toxisch, weil sie elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ-geladenen Glykokalyx der Zellmembran eingehen [42]. Daher ist es für spätere

Anwendungen der Nanopartikel in Zellstudien essenziell, die toxischen Effekte der QDs und ihrer PAMAM-Modifikation (P14/QD) zu ermitteln, was hier an drei Modellzelllinien erfolgte. Hier wird die Zellvitalität mit dem Tetrazolium-Reagenz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) kolorimetrisch bestimmt. Das gelbe, wasserlösliche MTT wird in den Mitochondrien lebender Zellen mit Hilfe von NADH zum violetten, wasserunlöslichen Formazansalz reduziert. Der entstandene Komplex wird aus den Zellen erst freigesetzt, nachdem ein Detergenz (hier Natriumdodecylsulfat in 0,01 M HCl gelöst) hinzugegeben wurde. Die Absorption der Probe wird bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Als Referenz dient die Messung der Absorption bei 630 nm.

Zunächst sollte die optimale Inkubationsdauer der Zellen mit den HDA-QDs und den PAMAM-modifizierten QDs (P14/QD) ermittelt werden. Hierfür wurden konfluent gewachsene A-549 (Lungenkrebszellen), HEP-G2 (Leberkrebszellen) und MCF-7 (Brustkrebszellen) Zellen für 1 h, 2 h, 4 h und 24 h den QD-Proben einer Konzentration von 0,05 μ M ausgesetzt und anschließend der MTT-Test durchgeführt. Um mögliche Effekte der Mediumzusätze auszuschließen bzw. zu bestätigen, wurde zum Vergleich das für die Verdünnung verwendete Volumen PBS-Puffer ebenso getestet wie das in der HDA-QD-Probe vorhandene Volumen Toluol. In Abb. 4.4-4 A) sind die Ergebnisse dieses zeitabhängigen Tests dargestellt. Es ist sehr gut erkennbar, dass die in Toluol gelösten HDA-QDs extrem toxisch für alle Zellen sind. Mit Ausnahme der HEP-G2 Zellen liegt die Vitalität der Zellen bereits nach 1 h (bei den HEP-G2 nach 2 h) unter 20 %. Ein Vergleich mit den Proben, die neben Medium Toluol enthielten, zeigt nach 2 h, dass für diese hohe Toxizität nicht allein das Toluol verantwortlich ist. Die HDA-QD-Ergebnisse liegen z.T. noch unterhalb der Werte für die Proben, die Toluol enthielten. Die PAMAM-modifizierten QDs sind hingegen deutlich weniger toxisch. Insgesamt sinkt die Vitalität mit zunehmender Inkubationszeit langsam auf 70 – 80 %. Der Unterschied einer 4 h und 24 h Inkubation ist für die A-549 und HEP-G2 Zellen nur sehr gering. Auf die MCF-7 Zellen scheinen die P14/QDs erst nach mehr als 4 h einen toxischen Effekt auszuüben.

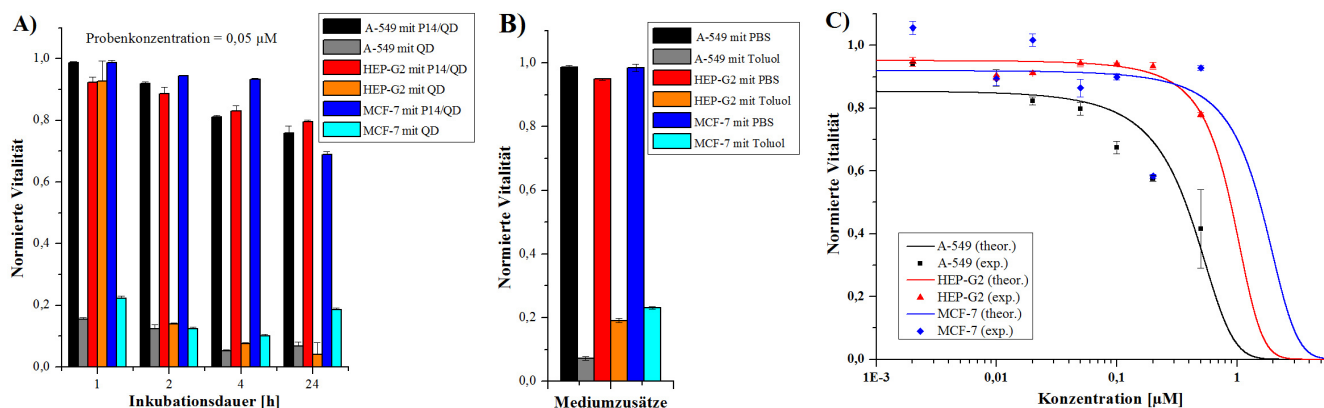


Abb. 4.4-4: Zeitabhängige (A, B) und konzentrationsabhängige Effekte (C) von P14/QDs und nicht funktionalisierten HDA-QDs auf die Vitalität von A-549, HEP-G2 und MCF-7 Zellen unter Verwendung des MTT-Assays. Die experimentell bestimmte Zellvitalität wurde jeweils auf die unbehandelten Kontrollzellen normiert (Vitalität = 1). A) Ermittlung der geeigneten Inkubationsdauer der Zellen mit den Proben (0,05 μM) durch Probeneinwirkung für 1, 2, 4 und 24 h, B) Effekte von Lösungsmitteln der P14/QDs (PBS) und HDA-QDs (Toluol) als Mediumzusätze nach 2 h Inkubation. C) Dosis-Wirkungskurve berechnet aus den Daten des MTT-Assays nach 4 h Inkubation mit P14/QDs verschiedener Konzentrationen (0,002; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 und 0,5 μM). Die Fehlerbalken entsprechen den Werten der Standardabweichungen von $N = 4$ Messungen. Ergebnis publiziert in [2].

Der konzentrationsabhängige MTT-Test erfolgte wegen der großen Toxizität der HDA-QDs nur mit den weniger toxischen P14/QDs. Da die Zellvitalität nach 4 h zwar vermindert aber insgesamt noch gut war und die Unterschiede zwischen 4 h und 24 h nicht sehr groß waren, wurden die Zellen im Folgenden für 4 h inkubiert. Abb. 4.4-4 B) zeigt die Zellvitalität von A-549, HEP-G2 und MCF-7 Zellen nach einer Behandlung mit verschiedenen P14/QD-Konzentrationen. PAMAM zeigt in Konzentration $>5 \mu\text{M}$ toxisches Potenzial [64]. Die hier verwendete höchste P14/QD-Konzentration beträgt $0,5 \mu\text{M}$, und beinhaltet somit $7 \mu\text{M}$ PAMAM. Bei der Betrachtung der Messdaten wird deutlich, dass P14/QDs nicht toxisch für HEP-G2 und MCF-7 Zellen sind. Somit kann die PAMAM-Beschichtung als Ursache für toxische Effekte ausgeschlossen werden. Auf die Vitalität der A-549 Zelllinie haben die P14/QDs jedoch schon bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ einen großen Einfluss.

Die Dosis-Wirkungskurven wurden aus den experimentellen Zytotoxizitätsdaten und mit Hilfe der exponentiellen Gleichung (1) extrapoliert.

$$(1) y = 1 - \frac{1}{1 + e^{a(b-x)}}$$

mit $a =$ Steigung, $b = \text{IC}_{50}$ (50 % inhibitory concentration), $x =$ Probenkonzentration

Der IC_{50} -Wert wurde mit dieser Gleichung berechnet. Die NOAEC (no observable adverse effect concentration) und die TLC (total lethal concentration) sind weitere Toxizitätskenndaten, die ebenfalls bestimmt wurden. Diese Kenndaten sind in Tab. 4.4-1 zusammengestellt. Hierbei wird ebenfalls deutlich, dass die P14/QDs für die A-549 Zelllinie ($\text{IC}_{50} 0,373 \mu\text{M}$) sehr viel toxischer sind als für die MCF-7 Zellen ($\text{IC}_{50} 1,549 \mu\text{M}$) und die HEP-G2 Zellen ($\text{IC}_{50} 0,885 \mu\text{M}$).

Tab. 4.4-1: Mittels konzentrationsabhängigem MTT-Test berechnete Zytotoxizitätskennndaten für P14/QDs. Die Toxizität ist ausgedrückt als IC₅₀ (50 % inhibitory concentration), NOAEC (no observable adverse effect concentration) und TLC (total lethal concentration) in µM.

Zelllinie	IC ₅₀ (µM)	NOAEC (µM)	TLC (µM)
MCF-7	1,549	0,320	3,427
A-549	0,373	0,065	0,996
HEP-G2	0,885	0,218	1,762

Die Sensitivität einer Zelle gegenüber einem Nanopartikel kann von der Zelloberflächenmorphologie, den zellspezifischen Oberflächenrezeptoren und deren charakteristischen Verteilung auf der Zelle abhängen. Daher ist es möglich, dass die Zellmorphologie der A-549 Zellen diese für toxische Effekte der P14/QDs anfälliger macht als die MCF-7 Zellen. Diese Vermutung wird von einer Studie von Patra *et al.* 2007 unterstützt, die berichtet, dass Goldnanopartikel den Zelltod von A-549 Zellen induzieren. Zwei andere getestete Zelllinien (BHK21 und HEP-G2) zeigten keine Reaktion auf die Goldnanopartikel [97]. Choi *et al.* demonstrierten mit PEG-modifizierten Phospholipid-beschichteten Fe₃O₄ und MnO Nanopartikeln ebenfalls größere toxische Effekte an A-549 Zellen als an MCF-7 Zellen [24]. Insgesamt zeigen die P14/QDs eine geringe Zytotoxizität, sodass sie im Folgenden in den Zellfärbungsstudien eingesetzt wurden.

4.4.1.3 Zellfärbungen und Mikroskopie

Werden Nanopartikel mit Biomolekülen wie Rezeptorliganden gekoppelt, erfolgt die Partikelaufnahme häufig spezifisch über Rezeptor-vermittelte Endozytose [140; 121; 33]. Neben dem spezifischen Transport durch die Zellmembran kann die Bindung kationischer Liganden auch unspezifisch erfolgen. Dendrimere mit Amin-Endungen binden aufgrund ihrer positiven Ladung unspezifisch an die Zellen [120]. Hier wurde möglichen unspezifischen Wechselwirkungen entgegengewirkt, indem die Ligandendichte und Oberflächenladung optimiert wurden. Als Modell dienten MCF-7 Zellen, die mit PAMAM-modifizierten QDs mit 14 und 28 PAMAM-Molekülen pro QD inkubiert und anschließend am Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden. Die Aufnahmen in Abb. 4.4-5 zeigen, dass P28/QDs (A) in größerem Maße unspezifisch an die Zelloberfläche binden als P14/QDs (B). Die mit P28/QDs behandelten Zellen waren voneinander klar unterscheidbar. Diese Nanopartikel besitzen eine höhere Dichte an PAMAM-Molekülen auf ihrer Oberfläche und damit auch eine größere Anzahl positiver Ladungen. Die elektrostatischen Wechselwirkungen der P14/QDs mit den Zellen waren hingegen nicht stark und zahlreich genug, um die Zellen eindeutig zu visualisieren.

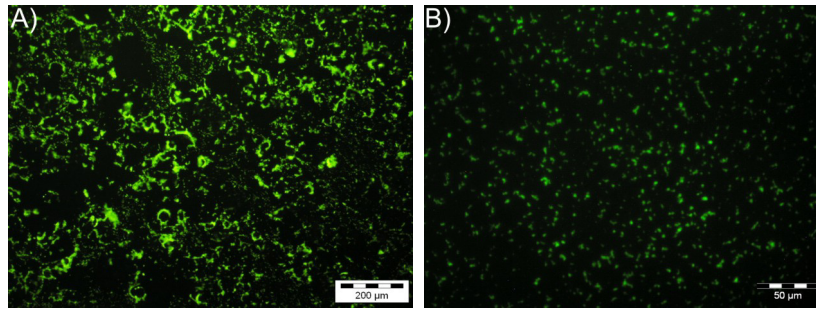


Abb. 4.4-5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MCF-7 Zellen, behandelt mit P28/QDs (A) und P14/QDs (B) für 4 h. Der Maßstab zeigt 200 µm in A) und 50 µm in B). Ergebnis publiziert in [2].

Ihrer geringeren Größe und reduzierten unspezifischen Wechselwirkungen wegen wurden für die Zellfärbungsstudien die P14/QDs verwendet, um eine spezifische Detektion zu unterstützen. Sie wurden mit einem HER-2/neu-spezifischen Antikörper konjugiert, um an die HER-2/neu-positiven MCF-7 Zellen (siehe Kapitel 4.2.3) zu binden. Die Zellen wurden für 4 h mit P14/QD/anti-HER2 Konjugaten verschiedener Konzentration (0,5 und 0,9 µM) inkubiert. In Abb. 4.4-6 ist zu sehen, dass die Zellen spezifisch angefärbt wurden. Hierbei drangen die Antikörper-Konjugate bei einer Konzentration von 0,9 µM in die Zelle ein und verteilten sich gleichmäßig im Zytosol (Abb. 4.4-6 A). Die PAMAM-Konzentration in Konjugaten einer niedrigeren Konzentration (0,5 µM) reichte für eine Freisetzung der Konjugate nicht aus. Die Konjugate sind größtenteils in den beim Eindringen gebildeten Endosomen (Abb. 4.4-6 B, kleine grüne Punkte) oder auf der Zellmembran verblieben. Ursache hierfür ist, dass kationische Polymere wie PAMAM die Freisetzung der Konjugate in das Zytosol bewirken, da sie in aziden Organellen die Protonenadsorption erhöhen und so einen erhöhten osmotischen Druck aufbauen, der wiederum die Freisetzung einleitet [36].

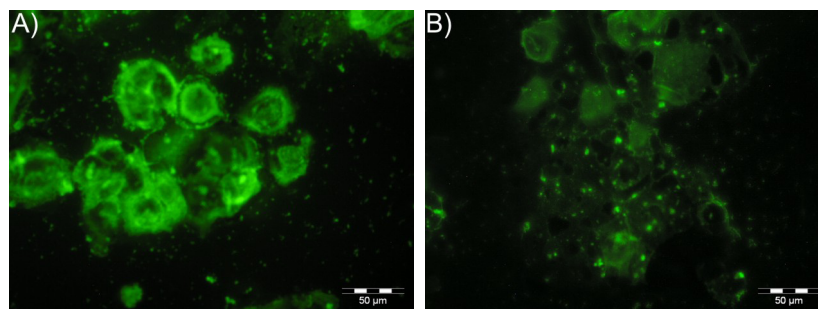


Abb. 4.4-6: Zelluläre Aufnahme von P14/QD/anti-HER2-Konjugaten in einer Konzentration von 0,9 µM (A) und 0,5 µM (B) in MCF-7 Zellen nach einer Inkubation bei 37 °C für 4 h. Jeweils rechts sind die Hellfeldaufnahmen, links die Fluoreszenzaufnahmen gezeigt. Der Maßstab zeigt 50 µm. Ergebnis publiziert in [2].

Um zu überprüfen, ob dieser Transport tatsächlich über Endozytose erfolgte, wurde die Färbung bei 4 °C mit den P14/QD/anti-HER2 Konjugaten und zur Kontrolle mit P14/QDs wiederholt. Da unter diesen Umständen der Zellmetabolismus eingestellt ist [61], konnten keine Konjugate in die Zellen eindringen (siehe Abb. 4.4-7).

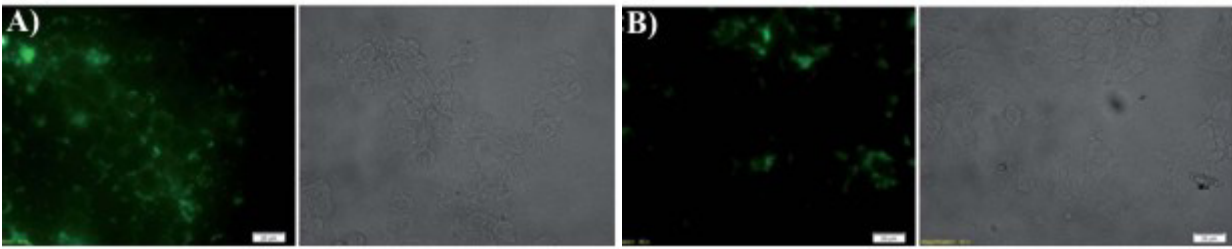


Abb. 4.4-7: Evaluierung des Mechanismus der zellulären Aufnahme von P14/QD/anti-HER2-Konjugaten einer Konzentration von $0,9 \mu\text{M}$ (A) und P14/QDs einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ in MCF-7 Zellen nach einer Inkubation bei 4°C für 4 h. Jeweils rechts sind die Hellfeldaufnahmen, links die Fluoreszenzaufnahmen gezeigt. Der Maßstab zeigt $20 \mu\text{m}$. Ergebnis publiziert in [2].

Hydrophobe Quantum Dots konnten mit Hilfe von Polyamidoamin (PAMAM) erfolgreich in wasserlösliche Nanopartikel überführt werden. Die Ligandendichte auf der Quantum Dot Oberfläche spielte beim Ausmaß unspezifischer Wechselwirkungen mit Zellen eine entscheidende Rolle. Diese unspezifische Bindung konnte stark reduziert werden und nach Konjugation eines Antikörpers erfolgreich in eine spezifische Affinität umgewandelt werden.

4.4.2 Konjugate wasserdispergierbarer Thioglykolsäure-Quantum Dots_{560nm} (CdTe/CdS) mit einem anti-HER-2/neu-Antikörper

Im Folgenden sollten Quantum Dot/Antikörper-Konjugate für die Zelldetektion verwendet werden, die auf wasserdispergierbaren Quantum Dots basierten. Hierdurch konnte auf eine weitere Beschichtung der Quantum Dots bzw. einen Ligandenaustausch verzichtet werden. Die in diesem Kapitel verwendeten CdTe/CdS Kern/Hülle Quantum Dots besitzen keine zusätzliche Polymerschicht, sondern wurden direkt in thioglykolsäurehaltiger Lösung hergestellt. Somit sind sie aufgrund dieser ionischen TGA-Oberflächengruppen wasserdispergierbar. Da diese QDs keine Polymerschicht aufweisen und auch keine weitere Beschichtung benötigen, um in Wasser dispergierbar zu sein, sind sie nach der Konjugation mit einem Biomolekül deutlich kleiner als hydrophobe QDs, die zuvor noch modifiziert werden müssen. Dieses ist für spätere Anwendungen in der Zelldetektion erheblich von Vorteil [23; 127]. Sie wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Suna Timur von der Ege Universität in Izmir zur Verfügung gestellt. In Izmir wurden die wasserdispergierbaren Quantum Dots hergestellt und bzgl. ihrer Kristallstruktur, spektralen Eigenschaften und Größe charakterisiert, sowie ein Protokoll zur erfolgreichen Konjugation eines anti-HER-2/neu Antikörpers an die Nanopartikel entwickelt. Details hierzu können in dem Artikel Ag *et al.*, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 114, 96-103 nachgelesen werden [1], in dem Teile dieses Kapitels veröffentlicht wurden.

4.4.2.1 Herstellung und Charakterisierung der TGA-Quantum Dot/Antikörper-Biokonjugate

Die hier verwendeten Quantum Dots weisen als Oberflächengruppen Thioglykolsäure (TGA) auf und besitzen nach der Anregung mit UV-Strahlung ein Emissionsmaximum von 560 nm. Als Modellsystem erfolgte die kovalente Bindung eines Antikörpers gegen den HER-2/neu Rezeptor direkt an den TGA-Gruppen auf der Oberfläche des Nanokristalls mittels einer EDC/sulfo-NHS-Crosslinking-Reaktion. Als *zero-length crosslinker* reagiert EDC hierbei mit den Carboxylgruppen der TGA-QD₅₆₀ und bildet eine aktive Estergruppe, die von dem sulfo-NHS angegriffen wird und zu einem Ester-Intermediat reagiert. Dieser Angriff erfolgt sehr schnell, sodass der aktive Ester nicht hydrolysiert wird, sondern in eine stabilere und langlebigere Form überführt wird. Bei Anwesenheit eines Amin-Nukleophils (Antikörper) wird die NHS-Gruppe sehr schnell abgespalten und ein stabiles Amid erhalten. Eine schematische Darstellung der Konjugation und Anwendung der Partikel ist in Abb. 4.4-8 gezeigt.

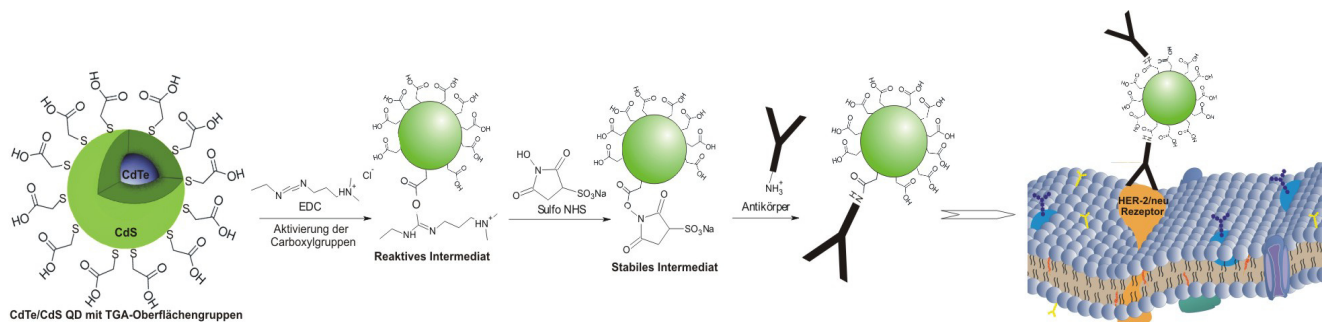


Abb. 4.4-8: Schema des Reaktionsmechanismus‘ der Konjugation von TGA-QD₅₆₀ und einem Antikörper gegen HER-2/neu, sowie der Anwendung der Konjugate in der Zellfärbung.

Die erfolgreiche Herstellung der TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Biokonjugate wurde qualitativ mit Hilfe einer Agarose- (15 min bei 98 V) und nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit anschließender Silberfärbung bestätigt. Hierbei wurden zum einen ein 2 % Agarosegel und zum anderen für die PAGE ein 6 % Sammelgel sowie 15 % Trenngel verwendet. Die native PAGE zeigte den Effekt der erfolgreichen Konjugation auf Antikörperebene. Im Agarosegel fand eine Diskriminierung von TGA-QD₅₆₀ und Antikörper-gekoppelten Nanopartikeln statt. In beiden Gelen sind die Biokonjugate deutlich langsamer in ihrer Mobilität im elektrischen Feld als die unmodifizierten Edukte (siehe Abb. 4.4-9 A, B). Dieses ist in der Größenzunahme und der geringeren negativen Oberflächenladung der Konjugate begründet.

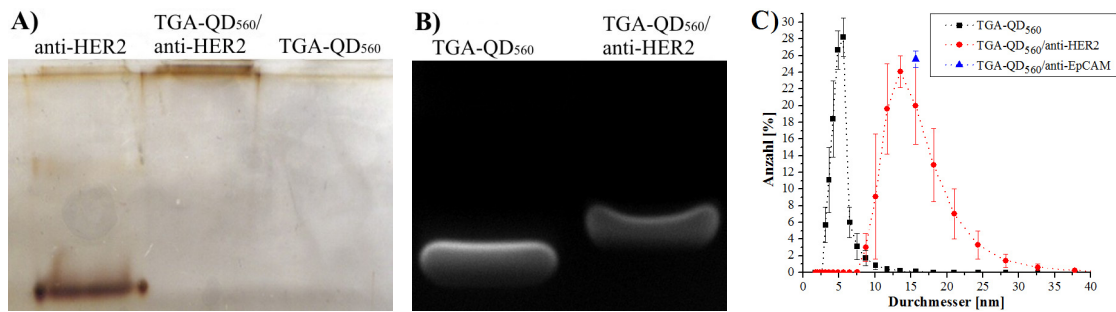


Abb. 4.4-9: Qualitative Nachweise der erfolgreichen Konjugationen von TGA-QD₅₆₀ (CdTe/CdS) mit einem Antikörper gegen HER-2/neu mit Hilfe einer nativen PAGE (A), eines 2,0 % Agarosegels (B) und DLS-Messungen (C). Spur 2 zeigt in A) und B) das TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugat. In A) ist in Spur 1 der Antikörper und in Spur 3 die QD-Stocklösung aufgetragen. In B) zeigt Spur 1 ebenfalls die QD-Stocklösung. C) stellt die hydrodynamischen Durchmesser der TGA-QD₅₆₀ (schwarze Quadrate, 5,4 nm ± 1,8, inkl. Größenverteilungen) und der TGA-QD₅₆₀/Antikörper Konjugate mit anti-HER2 (rote Punkte, 14,3 nm ± 2,0, inkl. Größenverteilung) und anti-EpCAM (blaues Dreieck, 17,1 nm ± 3,2) dar. Die Fehlerbalken entsprechen den Werten der Standardabweichungen von N = 3 Messungen. Ergebnisse publiziert in [1].

Auskunft über den Größenunterschied der TGA-QD₅₆₀ und Konjugate gaben die hydrodynamischen Durchmesser (Teilabbildung C). Neben den TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Nanopartikeln wurden auch Konjugate mit einem Antikörper gegen das Zelloberflächenprotein EpCAM mittels DLS vermessen. Die TGA-QD₅₆₀/anti-EpCAM Konjugate wurden später in Multiplexingfärbungen verwendet (Kapitel 4.5). Der hydrodynamische Durchmesser unmodifizierter TGA-QD₅₆₀ lag mit 5,4 ± 1,8 nm deutlich niedriger als der nach der Biokonjugation mit anti-HER2/neu 14,3 nm ± 2,0 und mit EpCAM 17,1 nm ± 3,2.

Um die Antikörpermenge zu ermitteln, die an die TGA-QD₅₆₀ gekoppelt war, wurde ein Bradford-Test mit den Waschfraktionen durchgeführt, die bei der Abtrennung nicht umgesetzter Edukte gesammelt wurden. Mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden aus BSA-Verdünnungen ($y = 1,2214x + 0,0028$; $R^2=0,9943$) wurde berechnet, dass pro Milligramm QD eine anti-HER-2/neu Antikörpermenge von 10,67 µg gebunden hatte. Nach Berücksichtigung der eingesetzten Antikörpermenge von 19,625 µg pro Milligramm QD lag die Bindungseffizienz bei ~55 %.

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie (NanoDrop 3300) konnten nach der Biokonjugation keine Veränderungen in den Fluoreszenzeigenschaften der TGA-QD₅₆₀ festgestellt werden. Die Wellenlänge der maximalen Emission verblieb bei 560 nm. Die in Abb. 4.4-10 dargestellte verringerte Fluoreszenzintensität ist auf die Verdünnung der Nanopartikel nach der Konjugation zurückzuführen. Nach Beachtung der Verdünnungsfaktoren sind die Intensitäten annähernd gleich groß, sodass eine Quantifizierung der Konjugate mit einer Kalibrationsgeraden der TGA-QD₅₆₀ erfolgen kann (siehe Anhang, Kapitel 6.2.6.2).

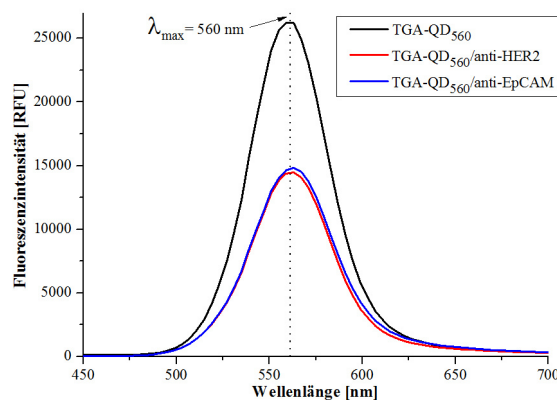


Abb. 4.4-10: Fluoreszenzspektren der TGA-QD₅₆₀/Antikörper-Konjugate. Schwarz: unbehandelte TGA-QDs₅₆₀, rot: TGA-QD₅₆₀/anti-HER2, blau: TGA-QD₅₆₀/anti-EpCAM. Die gepunktete Linie zeigt das Emissionsmaximum der QDs bei 560 nm an.

4.4.2.2 Zytotoxizitätsbestimmungen

Werden wasserdispergierbare Kern/Hülle Quantum Dots oder solche mit einer Beschichtung aus Biomolekülen für die Zellerkennung eingesetzt, ist die Freisetzung von Cd²⁺-Kationen reduziert [35]. Dieses zeigten auch Su *et al.*, 2009 und 2011 die durch eine zusätzliche zweite ZnS-Ummantelung von CdTe/CdS-QDs die Toxizität nochmals reduzierten [126; 127]. Die konzentrationsabhängige Zytotoxizität der Kern/Hülle TGA-QDs₅₆₀ und ihrer mit Biomolekülen ummantelten TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugate wurde daher anhand zweier Zelllinien ermittelt, die für spätere Anwendungen als Modelle dienen. Da diese Studie die Diskriminierung von HER-2/neu-produzierenden und nicht-produzierenden Zellen zum Ziel hatte, wurden HER-2-positive Zellen (Lungenkrebszellen, A-549) und HER-2-negative Zellen (Mäusefibroblasten, NIH-3T3) verwendet. Diese waren zuvor mittels PCR und Durchflusszytometrie als solche identifiziert worden (siehe Kapitel 4.2.3). Die Zytotoxizität wurde unter Verwendung des MTT-Tests untersucht. Die TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugate stellten sich hierbei als deutlich toxischer dar als reine TGA-QDs, was auf stärkere Wechselwirkungen der Konjugate mit den Zellen und einen besseren Transport in die Zellen schließen lässt [47]. Die insgesamt relativ hohe Toxizität im Vergleich zu den in Kapitel 4.4.1 verwendeten HDA-QDs kann in einer fehlerhaften Ummantelung der QDs begründet sein. Hierdurch könnten in den Zellen schnell Cd²⁺-Kationen freigesetzt werden. Die QDs könnten dadurch ähnlich toxisch wie nicht ummantelte Kern QDs sein [126]. In Abb. 4.4-11 sind die aus den experimentellen Daten berechneten Dosis-Wirkungskurven dargestellt und in Tab. 4.4-2 sind die charakteristischen zytotoxischen Kenndaten zusammengefasst, die mit Gleichung (1) berechnet wurden.

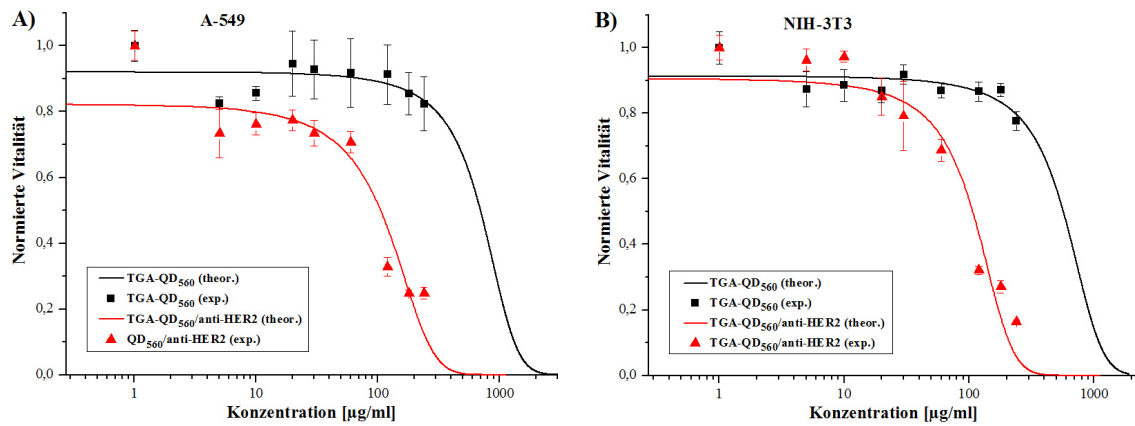


Abb. 4.4-11: Konzentrationsabhängige Effekte von TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugaten und nicht funktionalisierten TGA-QDs₅₆₀ auf die Vitalität von A-549 (A) und NIH-3T3 (B) Zellen unter Verwendung des MTT-Assays. Die experimentell bestimmte Zellvitalität wurde jeweils auf die unbehandelten Kontrollzellen normiert (Vitalität = 1). Dosis-Wirkungskurve berechnet aus den Daten des MTT-Assays nach 2 h Inkubation mit Konjugaten und QDs verschiedener Konzentrationen (5; 10; 20; 30; 60; 120; 180 und 240 µg/mL). Die Fehlerbalken entsprechen den Werten der Standardabweichungen von N = 4 Messungen. Ergebnis publiziert in [1].

Die Zytotoxizität der Biokonjugate ist für beide Zelllinien sehr ähnlich, wobei sie für die HER-2/neu-positiven A-549 Zellen (IC₅₀ 105,4 µg/mL) etwas größer ist als für die HER-2/neu-negativen NIH-3T3 (IC₅₀ 107,1 µg/mL). Die Toxizität der TGA-QDs ist um ein Vielfaches geringer. Die IC₅₀ Werte der nicht funktionalisierten TGA-QDs₅₆₀ liegen für A-549 Zellen bei 696,7 µg/mL und für NIH-3T3 Zellen bei 569,4 µg/mL.

Tab. 4.4-2: Berechnete Zytotoxizitätskennzahlen für die TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugate und TGA-QDs₅₆₀ eines konzentrationsabhängigen MTT-Tests. Die Toxizität ist ausgedrückt als IC₅₀ (50% inhibitory concentration), NOAEC (no observable adverse effect concentration) und TLC (total lethal concentration) in µg/mL.

Zelllinie	Partikel	IC ₅₀ (µg/mL)	NOAEC (µg/mL)	TLC (µg/mL)
A-549	TGA-QD ₅₆₀	696,7	145,3	1533,3
	TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2	105,4	18,7	308,5
NIH-3T3	TGA-QD ₅₆₀	569,4	115,3	1282,0
	TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2	107,1	21,6	246,7

Der Mechanismus des Zelltodes, den die Nanopartikel verursachten, wurde anhand von Nanopartikelkonzentrationen untersucht, die eindeutig toxische Effekte hervorriefen (TGA-QD₅₆₀: 800 µg/mL; TGA-QD₅₆₀/anti-HER2: 200 µg/mL). Dieses sollte mit Hilfe des Nachweises aktiver Caspasen und freigesetzter Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt werden. Die Proteasen Caspase-3 und -7 spielen bei der Apoptose von Säugetierzellen eine entscheidende Rolle und dienen somit als Indikatoren für diese Art des Zelltodes. Da die Zellmembranen hierbei intakt bleiben, werden die Zellen zunächst lysiert. Die freigesetzten Caspasen spalten anschließend das im Assay (Apo-ONE[®] Homogeneous Assay, Promega) vorhandene Substrat zu einem fluoreszierenden Produkt, welches bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und bei 538 nm detektiert wird. Diese Wellenlängen stellten sich als problematisch heraus, da auch die Nanopartikel unter diesen Bedingungen angeregt werden

und grün fluoreszieren. Es konnten keine Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten unbehandelter und behandelter Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der Nekrose wird die Zellmembran permeabel, sodass LDH aus dem Zytoplasma in den Zellkulturüberstand diffundiert und dort nachgewiesen werden kann. Bei diesem Test (CytoTox-ONE Homogeneous Membran Integrity Assay, Promega) erfolgt die Umsetzung von Resazurin zu fluoreszierendem Resorufin, welches bei 544 nm angeregt und bei 590 nm detektiert wird, wenn im Zellkulturüberstand LDH anwesend ist. Wie in Abb. 4.4-12 A) dargestellt, wird durch die TGA-QD₅₆₀ eine deutlich höhere LDH-Freisetzung verursacht als durch die Biokonjugate. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die TGA-QD₅₆₀ die Nekrose der Zellen einleiten.

Diese Ergebnisse wurden mit einer anderen Nachweismethode (Annexin V/PI Dead Cell Apoptosis Kit) überprüft. Mit diesem Assay lassen sich apoptotische und nekrotische Zellen mittels Durchflusszytometrie qualitativ und quantitativ nachweisen. In vitalen Zellen befindet sich Phosphatidylserin auf der inneren Seite der Zellmembran. Während der Apoptose wird es auf die extrazelluläre Seite verschoben, sodass Annexin-V FITC hoch affin hieran binden und die Zellen grün markieren kann. In nekrotische Zellen kann Propidiumiodid ungehindert eindringen, an die Nukleinsäuren innerhalb der Zellen binden und diese rot markieren. Vitale Zellen sind hingegen für Propidiumiodid nicht permeabel und auch Annexin V kann nicht an sie binden. Je mehr Zellen apoptotisch oder nekrotisch sind, desto höher sind die jeweiligen Fluoreszenzsignale. Die *Density-Plots* unbehandelter Zellen und mit TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugat (200 µg/mL) inkubierter Zellen zeigten nur geringe Unterschiede. In beiden Fällen waren keine apoptotischen und eine ähnliche Anzahl nekrotischer Zellen feststellbar (siehe Abb. 4.4-12 B, C). Der Versuch konnte für die TGA-QD₅₆₀ nicht wiederholt werden, da die Zellen aufgrund der sehr hohen QD-Konzentration (800 µg/mL) nicht von der Flaschenoberfläche abzulösen waren. Sie waren vollständig von den Nanopartikeln bedeckt, weshalb das für die Ablösung verwendete Trypsin nicht zu den Zellen gelangte.

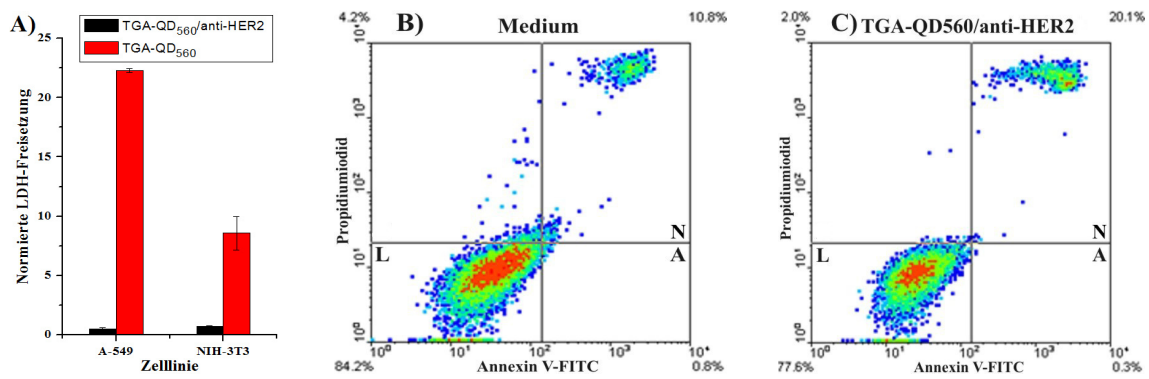


Abb. 4.4-12: Bestimmung des Zelltodmechanismus mittels LDH-Messung (A) und Durchflusszytometrie (B, C). A zeigt die auf unbehandelte Zellen normierte freigesetzte LDH-Menge nach einer 2 h Behandlung von A-549 und NIH-3T3 Zellen mit TGA-QD₅₆₀ (rot) und den Biokonjugaten (schwarz). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 Messungen. B) zeigt durchflusszytometrische Messungen lebender (L, unten links), apoptotischer (A, unten rechts), nekrotischer (N, oben rechts) A-549 Zellen ohne Behandlung (B) und nach einer 2 h Behandlung mit Konjugaten (C), mit blau = wenige Zellen bis rot = viele Zellen.

Insgesamt wurden verglichen mit dem MTT-Test (Abb. 4.4-11) zu viele metabolisch aktive Zellen beobachtet (in Abb. 4.4-12 B, C Quadrant L, 78 %). Eine Ursache könnte in dem MTT-Test liegen. Von Carbonnanotubes ist bekannt, dass sie im Zellinneren mit dem MTT wechselwirken und so zu falsch-positiven Ergebnissen führen [146]. Daher sollte für die Toxizitätsbestimmung der CellTiter-Blue Test als Alternative verwendet werden. Dieser konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Die Konjugat-Konzentration, die in den Zellfärbungsstudien eingesetzt werden sollte, musste dem MTT-Test entsprechend kleiner als 100 µg/mL sein, um die Zellen auch nach der Färbung vital zu erhalten. Eine Anwendung der TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugate in der Zelldetektion wurde unter diesen Voraussetzungen durchgeführt.

4.4.2.3 Durchflusszytometrie

Eine spezifische Zelldetektion sollte in dieser Arbeit nicht nur anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden. Die hergestellten fluoreszierenden Biokonjugate sollten viel mehr auch für durchflusszytometrische Anwendungen genutzt werden, um die universelle Verwendbarkeit der Biokonjugate zu demonstrieren. Darüber hinaus ist die Durchflusszytometrie eine sehr sensitive Methode, um die erfolgreiche und spezifische Bindung der TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugate zu quantifizieren. Zunächst wurde die optimale Konjugat-Konzentration ermittelt, indem die HER-2/neu-positiven A-549 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 10, 20, 30, 40, 60 µg/mL) nach dem in Kapitel 4.2.2.1 optimierten Protokoll für die Durchflusszytometrie gefärbt wurden. Die Ergebnisse dieser Titration sind in Abb. 4.4-13 A) dargestellt. Die Fluoreszenzintensität nahm hierbei in Abhängigkeit von der Konzentration zu. Bei einer Konzentration zwischen 40 und 60 µg/mL trat eine Signalsättigung ein. Die zellspezifische Bindung sollte daher mit einer

Konzentration von 40 µg/mL an den Rezeptor-positiven A-549 und HER-2/neu-negativen NIH-3T3 Modellzelllinien nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.4-13 B). Die Fluoreszenzintensität der gefärbten A-549 Zellen war doppelt so groß wie die der NIH-3T3 Zelllinie.

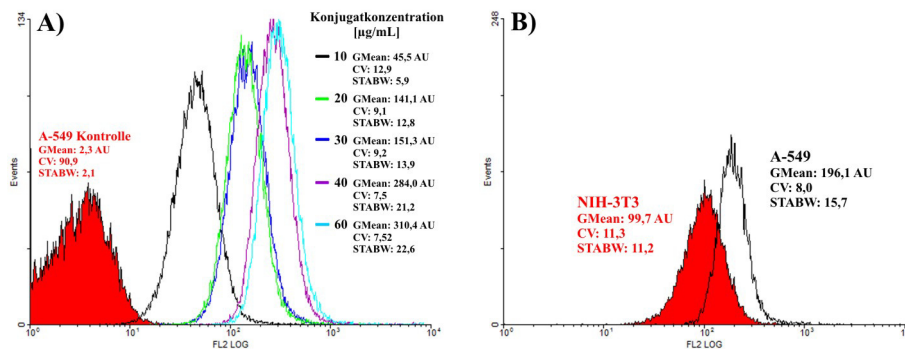


Abb. 4.4-13: Histogramme der konzentrationsabhängigen Bindung von TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 an HER-2/neu-positive A-549 (A) sowie der spezifischen Bindung der Konjugate an A-549 (B, schwarze Kurve) und HER-2/neu-negative NIH-3T3 Zellen (B, rote Kurve). Ergebnis publiziert in [1].

Die durchflusszytometrische Messung von gefärbten A-549 und NIH-3T3 Zellen lässt eine stärkere Bindung der TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugate an den Rezeptor-exprimierenden A-549 Zellen erkennen. Zudem scheint eine relativ starke unspezifische Bindung an die Rezeptor-negativen NIH-3T3 Zellen zu existieren, die jedoch deutlich schwächer als die spezifische Bindung ist. Diese wäre durch eine möglicherweise ungenügende Spezifität der Zielstruktur des Antikörpers erklärbar, da NIH-3T3 Zellen für *mouse* HER-2/neu positiv sind. Die Fluoreszenzintensität der QDs ist verglichen mit FITC, das für die Charakterisierung der Zellen verwendet wurde (siehe Kapitel 4.2.2.3), deutlich größer. Dieses könnte eine generelle Zunahme des Fluoreszenzsignals bewirken, auch bei einer nur geringen unspezifischen Bindung. Um zu ermitteln, ob die hohen Fluoreszenzsignale in der Signalintensität der QDs oder einer großen unspezifischen Bindung begründet sind, werden die Zellen im Folgenden angefärbt und mikroskopisch betrachtet. Für diesen mikroskopischen Nachweis wurde wegen der geringeren Sensitivität eine Konjugatkonzentration von 60 µg/mL gewählt.

4.4.2.4 Zellfärbungen und Mikroskopie

Die Standardprotokolle einer typischen immunzytochemischen Zellfärbung beginnen mit der Probenvorbereitung, in welcher die Zellen bzw. Gewebe fixiert werden. Hierdurch werden die Antigene unlöslich und besser zugänglich für den Antikörper und die Zelle sowie Organellen verbleiben in dem zu untersuchenden Kontext. Alle Stoffwechsel- und anderen Pfade werden ausgeschaltet und konserviert. Die Zellen werden zudem vor einer osmotischen Beschädigung durch Anschwellen oder Schrumpfen geschützt. Zwei Hauptgruppen von Fixativen werden am häufigsten eingesetzt, quervernetzende Fixative und

Fällungsfixative. Zu der ersten Gruppe gehören Formalin (wässrige Lösungen von (Para-) Formaldehyd) und Glutaraldehyd, die Hydroxid-Methylen-Brücken zwischen benachbarten Proteinketten bilden. Es entsteht ein Netzwerk aus miteinander verbundenen Proteinen. Diese Methode wird hauptsächlich für kleine Zielmoleküle (wie z.B. bioaktive Neuropeptide) verwendet, da bei dieser Fixierung die bindungsspezifischen Epitope von Proteinen verändert werden können [145; 103]. Die zweite Gruppe besteht aus Alkoholen und Aceton. Sie zerstören die hydrophoben Bindungen, die die tertiäre Proteinstruktur aufrecht erhalten. Die Primär- und Sekundärstruktur bleibt unberührt, so dass diese Methode bevorzugt bei großen Proteinen angewendet wird [103].

Zunächst wurden daher HER-2/neu-exprimierende A-549 und HER-2/neu-negative NIH-3T3 Zellen auf einem Deckgläschen kultiviert, zum einen mit Paraformaldehyd (4 % in PBS) zum anderen mit eiskaltem Ethanol für je 30 min bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert und dann mit TGA-QDs₅₆₀ und TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugaten für 2 h bei Raumtemperatur gefärbt. Die Zellen wurden hierbei von allen Proben angefärbt. Es konnten weder Unterschiede zwischen den Ethanol-fixierten Rezeptor-positiven (Abb. 4.4-14 A) und -negativen Zellen (D) noch zwischen den TGA-QDs₅₆₀ (B, E) und den spezifisch-bindenden Konjugaten (A, D) beobachtet werden. Auch die Paraformaldehyd-fixierten A-549 Zellen (C) zeigten eine vergleichbare Färbung.

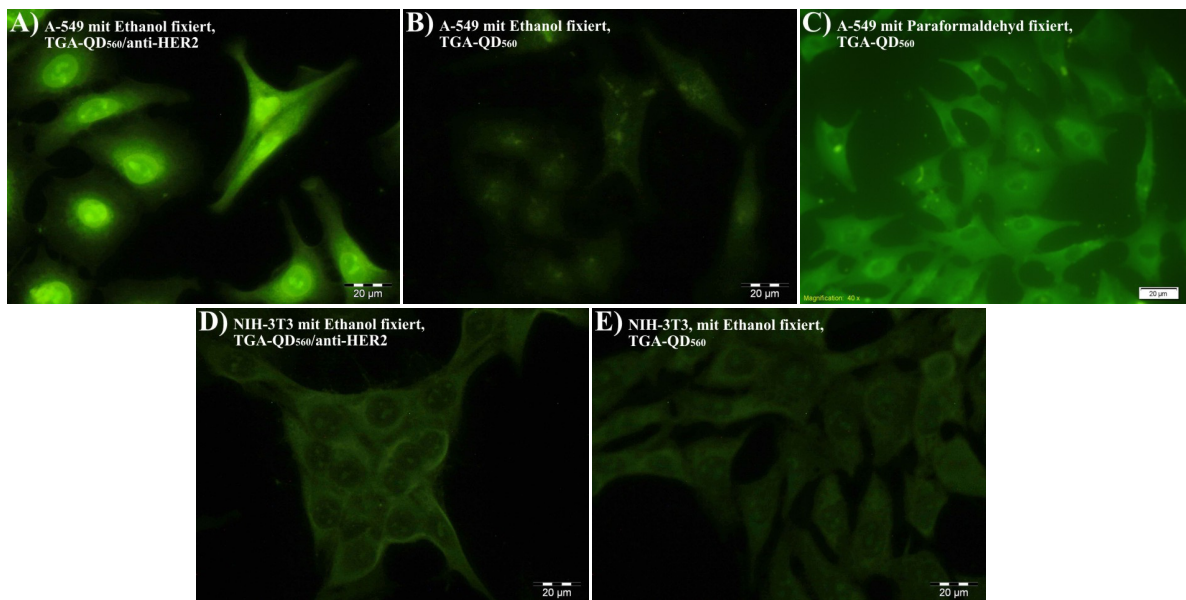


Abb. 4.4-14: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen fixierter A-549 (A-C) und fixierter NIH-3T3 (D, E) Zellen, angefärbt für 2 h mit jeweils 120 µg/mL TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Biokonjugat (A, D) und TGA-QD₅₆₀ (B, C, E). Fixierung erfolgte mit eiskaltem Ethanol für 30 min bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$, Ausnahme ist C, hier wurde mit Paraformaldehyd (4 % in PBS) für 30 min bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert und anschließend für 30 min durch TritonX100 (0,1 % in PBS) permeabilisiert. Der Maßstab zeigt 20 µm.

Für eine erfolgreiche Unterscheidung von Rezeptor-positiven und -negativen Zellen mit den Quantum Dot/Antikörper Konjugaten ist somit eine Fixierung der zu analysierenden Zellen

unabhängig von der Fixierungsart ungeeignet. Daher wurden im Folgenden alle Immunfärbungen an lebenden Zellen durchgeführt. Diese wurden dem durchflusszytometrischen Protokoll angelehnt mit einem Blockpuffer (enthält FKS) behandelt, um unspezifische Bindungen zu verhindern und anschließend ebenfalls für 2 h mit den Konjugaten gefärbt.

In Kapitel 4.4.2.3 wurde eine Sättigung des Fluoreszenzsignals bei 60 $\mu\text{g/mL}$ beobachtet. Da das Durchflusszytometer sensitiver als das anschließend verwendete Fluoreszenzmikroskop war, wurde zunächst die TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konzentration für die mikroskopische Anwendung angepasst. Ausgehend von 60 $\mu\text{g/mL}$ wurde die Konzentration bis auf 180 $\mu\text{g/mL}$ gesteigert. Eine weitere Erhöhung der Konzentration würde eine Zytotoxizität >70 % bewirken und ein Vergleich mit den nicht-funktionalisierten TGA-QDs₅₆₀ unmöglich machen, da diese bei höheren Konzentrationen die gesamte Microarray-Oberfläche bedeckten (Daten nicht gezeigt). Die höchste verwendete Konzentration wurde außerdem für die Anfärbung von NIH-3T3 Zellen verwendet, um mögliche unspezifische Bindungen aufzuzeigen. Die Ergebnisse der Färbungen sind in Abb. 4.4-15 aufgezeigt. Eine Konzentration von 60 $\mu\text{g/mL}$ ist für das verwendete Mikroskop zu gering, die Zellen sind nur schemenhaft zu erkennen. Eine Konzentration von 120 $\mu\text{g/mL}$ färbt die Zellen deutlich stärker an und wird im Folgenden verwendet, obwohl die höchste getestete Konzentration (180 $\mu\text{g/mL}$) nochmals bessere Färbungen liefert, im Hinblick auf die Toxizität aber kritisch betrachtet wird.

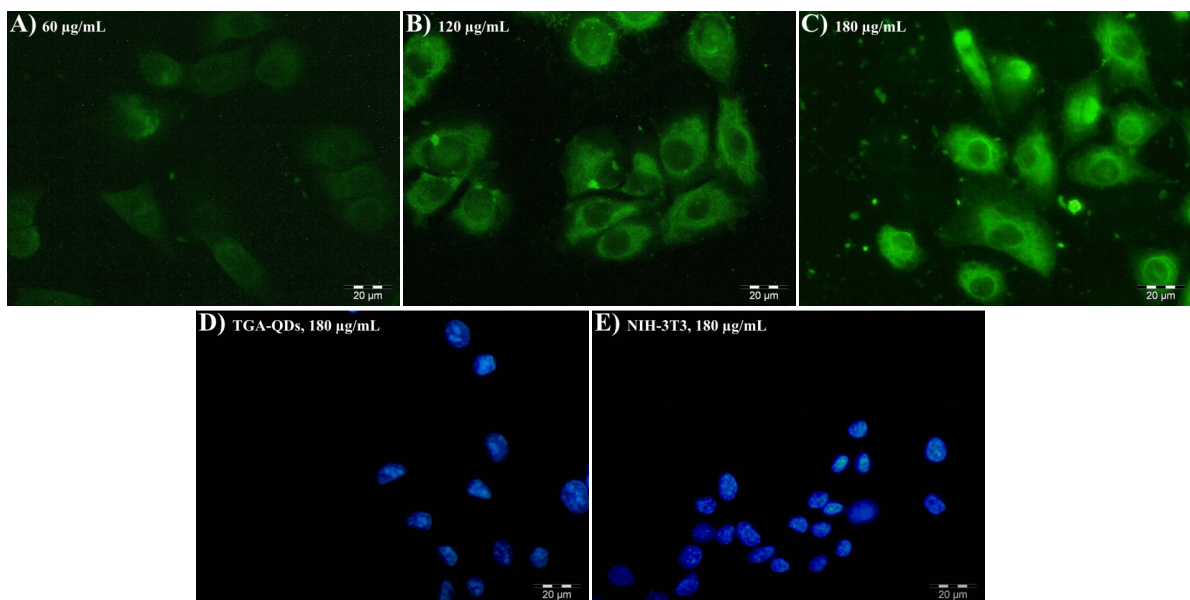


Abb. 4.4-15: Bestimmung der optimalen Konzentration (60 - 180 $\mu\text{g/mL}$) von TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugaten für die Zelldetektion mittels Fluoreszenzmikroskop am Beispiel der A-549 Zelllinie (A-C) nach 2 h Inkubation. In D) ist die Kontrollfärbung mit nicht-funktionalisierten TGA-QDs₅₆₀ bei 180 $\mu\text{g/mL}$ dargestellt und E) zeigt die Zellnegativkontrolle NIH-3T3 gefärbt mit 180 $\mu\text{g/mL}$ Konjugat. Grün: Konjugat, blau: DAPI-Zellkernfärbung. Der Maßstab zeigt 20 μm .

Die Beobachtung der zeitlichen Abfolge der Internalisierung in Abb. 4.4-16 zeigt gut den Mechanismus, mit dem die Konjugate in die Zelle gelangen [155; 148]. Um die Vorgänge

besser sichtbar zu machen, wurden für diese Studie Konzentrationen von 200 µg/mL eingesetzt. Zunächst binden die Konjugate spezifisch an die Antigene auf der Zellmembran (A, nach 15 min), anschließend werden sie in Endosomen in das Zytoplasma eingeschleust (B, nach 1 h). Hier ist noch teilweise eine punktartige Verteilung von nicht aufgelösten Endosomen erkennbar. Nach 2 h sind die Konjugate im Zytoplasma gleichmäßig verteilt (C), die Zellen sind größtenteils schon deutlich stärker angefärbt. Nach 6 h sind alle Zellen sehr stark angefärbt (D), wobei die Anzahl lebender Zellen sehr stark abgenommen hat. In Abb. 4.4-15 war die genaue Lokalisierung der nicht-funktionalisierten QDs schwer zu erkennen, daher wurden zusätzlich A-549 Zellen 6 h mit den TGA-QDs₅₆₀ inkubiert. In Teilabbildung E) wird deutlich, dass die TGA-QDs₅₆₀ auch in die Zelle eindringen und um den Nukleus agglomeriert sind. Dieses haben auch Nabiev *et al.*, 2007 und Zhang *et al.*, 2009 beobachtet [87; 155]. Sie haben gezeigt, dass negativ-geladene (CdTe) QDs mit Carboxylgruppen von den Zellen passiv aufgenommen werden, aus den Endosomen austreten und nahe der Nukleusporenkomplexe akkumulieren. Zum Vergleich ist in Teilabbildung F) die unspezifische Bindung der Konjugate an NIH-3T3 Zellen nach 6 h Inkubation gezeigt. Die Fluoreszenzintensität ist deutlich geringer als die der spezifischen Färbung.

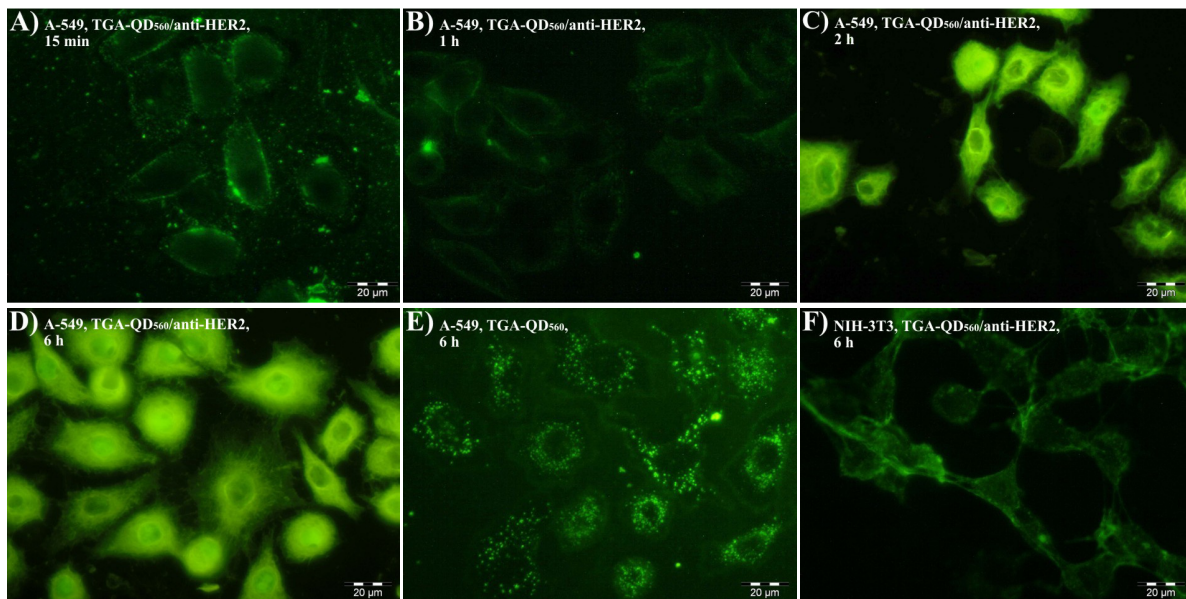


Abb. 4.4-16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Internalisierung von TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Biokonjugaten (200 µg/mL) in das Zytoplasma von HER2-positiven A-549 Zellen nach 15 min (A), 1 h (B), 2 h (C) und 6 h (D), sowie der Akkumulation von TGA-QDs nahe der Nuklei von A-549 Zellen nach 6 h (E) und der schwachen unspezifischen Bindungen der Biokonjugate an die HER2-negative Kontrolle NIH-3T3 nach 6 h Inkubation (F). Der Maßstab zeigt 20 µm.

Der Aufnahmeprozess der TGA-QDs₅₆₀ und ihrer Biokonjugate in die Zellen wurde bei einer 2 h Färbung bei 4 °C identifiziert. Werden die Konjugate mittels Endozytose in die Zellen geschleust, ist der Vorgang unter diesen Bedingungen unterbrochen [61]. Auf den Aufnahmen in Abb. 4.4-17 ist dies sehr gut aufgezeigt. Sowohl die Konjugate (A) als auch die

TGA-QDs₅₆₀ (B) binden an die Zellmembran, können diese aber nicht überwinden. Dadurch sind keine Unterschiede in der Färbung der Zellen erkennbar. Es wird jedoch insbesondere in Teilabbildung A) sehr gut die dreidimensionale Zellmorphologie verdeutlicht.

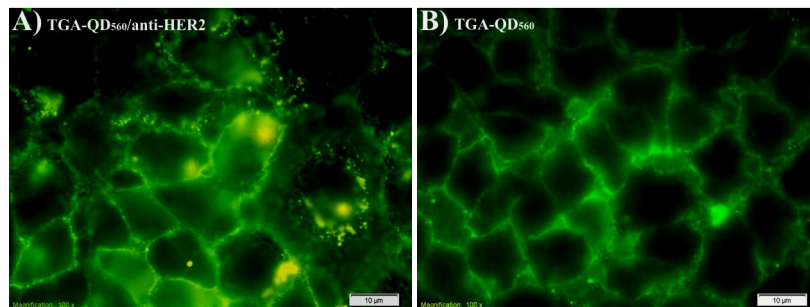


Abb. 4.4-17: Identifizierung des Internalisierungsprozesses von TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugaten (A) und nicht-funktionalisierten TGA-QD₅₆₀ (B) nach einer Inkubation von A-549 Zellen für 2 h bei 4 °C mit einer Probenkonzentration von jeweils 60 µg/mL. Der Maßstab zeigt 10 µm.

Die hergestellten Quantum Dot/Antikörper Konjugate konnten erfolgreich für die spezifische Detektion von Rezeptor-exprimierenden Zellen sowohl in der Durchflusszytometrie als auch Mikroskopie eingesetzt werden. Die Lokalisierung der Nanopartikel in der Zelle sowie deren Internalisierungsprozess konnte aufgezeigt werden.

4.4.2.5 Stabilität der TGA-Quantum Dots und ihre Photobleaching-Eigenschaften

Die Langzeitstabilität der TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugate wurde durch Messung der Fluoreszenzintensität mittels NanoDrop 3300 über einen Zeitraum von 30 Tagen ermittelt. Während dieser Zeit wurden die Konjugate bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Wie in Abb. 4.4-18 dargestellt ist, konnte keine signifikante Abnahme der normierten Intensitäten festgestellt werden. Die Fluoreszenzintensitäten wurden hierfür auf die Anfangsintensität direkt nach der Konjugation bezogen.

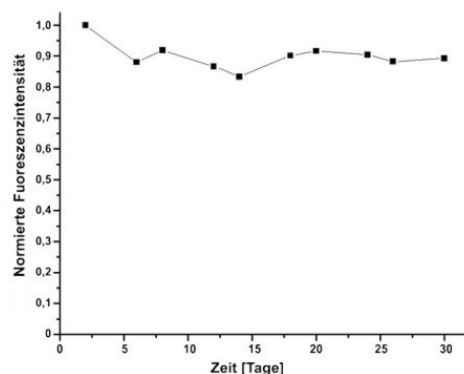


Abb. 4.4-18: Normierte Fluoreszenzintensitäten der TGA-QD₅₆₀/anti-HER2-Konjugate betrachtet über einen Zeitraum von 30 Tagen zur Bestimmung der Langzeitstabilität.

Die Dokumentation des Agarosegels (siehe Abb. 4.4-9) mit dem Nachweis der erfolgreichen Konjugation war schwierig, da die Banden nach 10 min noch nicht weit genug voneinander getrennt, nach 30 min jedoch verschwunden waren. Eine Elektrophoresedauer von 15 min

stellte sich als optimal heraus, aber auch die anschließende Aufnahme eines Fotos war problematisch, da die Banden lokalisiert und dann von der Kamera fokussiert werden mussten. Der komplette Vorgang musste unter UV-Bestrahlung erfolgen und bewirkte ein schnelles Ausbleichen der Banden, bis diese ebenfalls nicht mehr zu sehen waren. Die Konjugate blichen hierbei deutlich schneller aus als die verdünnten unbehandelten TGA-QD₅₆₀ gleicher Konzentration (600 µg/mL), wie in Abb. 4.4-19 gezeigt ist. Das Gel wurde 15 min unter Spannung gesetzt, fotografiert und erneut für 13 min in die Elektrophoresekammer gelegt und wieder fotografiert. Die Dokumentation des Gels wurde zweimal wiederholt, jeweils nach einer Aufbewahrungszeit von 1 min im Dunkeln. In den Teilabbildungen ist deutlich die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten der rechten Bande (TGA-QD₅₆₀/anti-HER2) zu sehen, bis diese in D) trotz hoher Belichtungszeit gar nicht mehr sichtbar ist.

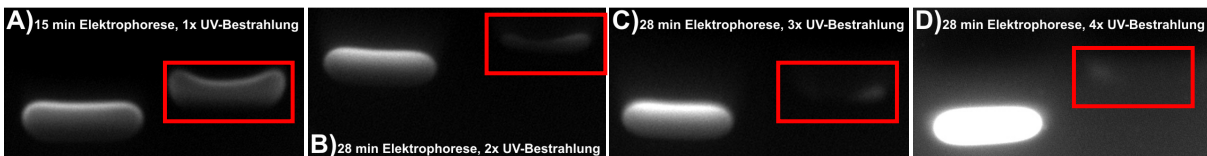


Abb. 4.4-19: Abnahme der Fluoreszenzintensität der TGA-QD₅₆₀/anti-HER2-Konjugate (jeweils rechts) während der Agarosegelelektrophorese und mehrmaliger UV-Bestrahlungen. Jeweils links: TGA-QD₅₆₀.

Diese für Quantum Dots eher schlechten *Photobleaching*-Eigenschaften wurden auch mit der mehrmaligen Aufnahme von Fluoreszenzbildern gefärbter Zellen bestätigt. Nach zweimaliger Bestrahlung mit UV-Strahlung von der Dauer der Fokussierung der Zellen (ca. 1 min) wurden Aufnahmen der gefärbten Zellen gemacht. Wie der Vergleich der Teilabbildungen in Abb. 4.4-20 zeigt, nahm die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen sehr schnell ab und war bei der zweiten Aufnahme fast nicht mehr zu sehen.

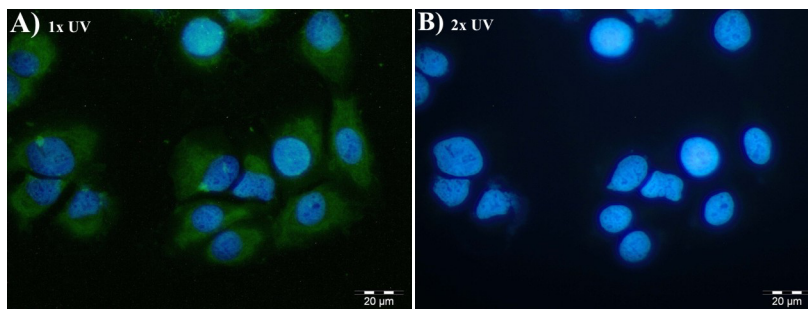


Abb. 4.4-20: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen gefärbter A-549 Zellen nach UV-Bestrahlung von wenigen Sekunden während der 1. Aufnahme (A) und der 2. Aufnahme (B). Grün: Konjugat, blau: DAPI-Zellkernfärbung. Der Maßstab zeigt 20 µm.

Eine so schnelle und signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität wurde bei TGA-Quantum Dots₅₆₀ einer früheren Herstellungscharge (im Folgenden als TGA-QD₅₆₀* bezeichnet) nicht beobachtet. Die maximale Fluoreszenzintensität dieser QDs war um ein vielfaches höher (schwarze Kurve Abb. 4.4-21 A, siehe Anhang Kapitel 6.2.6.2). Zum

Vergleich, die Konzentration, die mittels Verdünnungsreihe der TGA-QD₅₆₀* bestimmt wurde, hätte lediglich 200 µg/mL anstelle der für die TGA-QD₅₆₀-Stocklösung üblichen 909 µg/mL betragen. Auch die Photostabilität der TGA-QD₅₆₀*-Charge war größer. Der Einfluss einer mehrmaligen UV-Bestrahlung auf die Fluoreszenzintensität der TGA-QD₅₆₀ ist in Teilabbildung B) gezeigt. Es fand ebenfalls ein Vergleich der zwei verschiedenen Chargen statt, wobei die frühere Charge TGA-QD₅₆₀* im Insert dargestellt ist. Die Fluoreszenzintensität nimmt bei beiden QDs mit der Anzahl der UV-Bestrahlungen ab, jedoch stagniert das Signal bei der TGA-QD₅₆₀*-Charge ab der fünften Bestrahlung auf einem Level. Das Signal der TGA-QDs₅₆₀ von 2012 nimmt mit jeder Bestrahlung weiterhin ab.

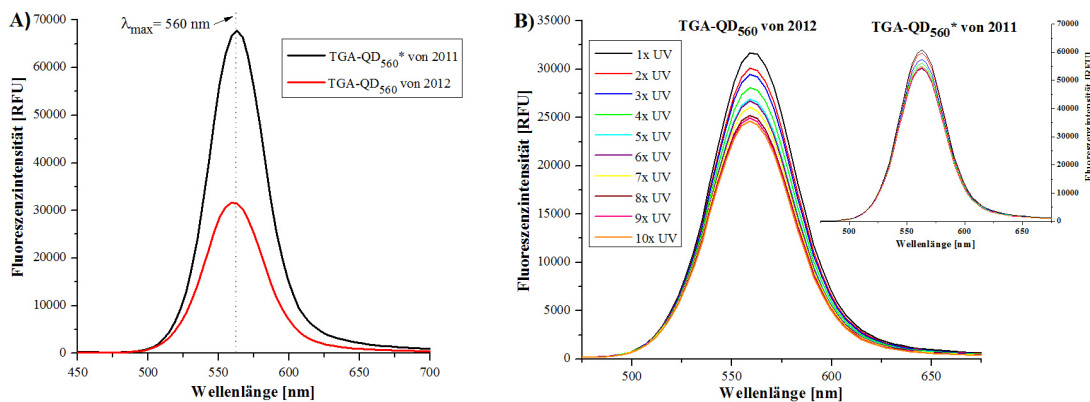


Abb. 4.4-21: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten (A) und Effekte einer mehrmaligen UV-Bestrahlung auf die Fluoreszenzintensitäten (B) zweier verschiedener TGA-QD₅₆₀-Chargen von 2011 (*) und 2012. Die gepunktete Linie zeigt das Emissionsmaximum der QDs bei 560 nm an.

Die unterschiedlichen Photostabilitäten der zwei Chargen lassen sich auch beim Vergleich von Abb. 4.4-20 mit Abb. 4.4-22 erkennen. In Letzterer sind Zellfärbungen mit Konjugaten der früheren TGA-QD₅₆₀*-Charge abgebildet, die nach einander von demselben Bildausschnitt mit steigender Vergrößerung gemacht wurden. Im Gegensatz zu Abb. 4.4-20 waren in der untenstehenden Zellfärbungsstudie zunächst keine Unterschiede (A, B), dann lediglich eine geringfügige Abnahme in den Fluoreszenzintensitäten (B, C) zu beobachten.

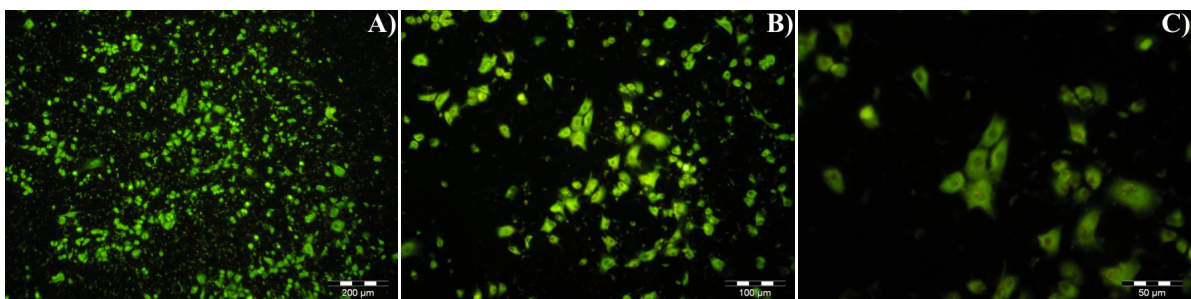


Abb. 4.4-22: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen der Färbung von A-549 Zellen mit TGA-QD₅₆₀*-anti-HER2-Konjugaten mit zunehmender Vergrößerung. Der Maßstab zeigt 200 µm (A), 100 µm (B) und 50 µm (C).

Bei Betrachtung von Abb. 4.4-23 wird eine Verschiebung des Emissionsmaximums von 7 nm für TGA-QD₅₆₀ deutlich, wenn die QDs nicht unter vollständiger N₂-Atmosphäre (schwarze Kurve) sondern unter einer Atmosphäre mit erhöhtem Luftanteil gelagert wurden.

Diese Verschiebung könnte auf eine minimale Größenveränderung durch Partikelalterung zurückzuführen sein, da sich die Emissionsmaxima von QDs mit steigender Partikelgröße zu längeren Wellenlängen verschieben. Für eine Veränderung der Partikel sprach auch, dass nach einer mehrmonatigen Lagerung (≥ 6 Monate) eine erfolgreiche Konjugation von QDs und Antikörpern nicht mehr möglich war, da die Konjugate ausfielen. Die Menge der ausgefallenen Konjugate nahm dabei mit der Zeit zu (Daten nicht gezeigt). Dieses bestätigt die Hypothese einer ungenügenden Ummantelung des (CdTe)-QD-Kerns. Die CdS-Hülle ist instabil, wodurch sich die optischen Eigenschaften verändern und die Toxizität steigt.

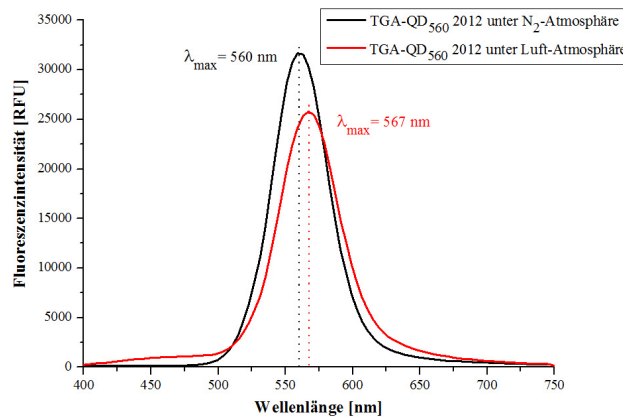


Abb. 4.4-23: Verschiebung des Maximums des Emissionspeaks bei der Lagerung von TGA-QD₅₆₀ unter einer Atmosphäre mit erhöhtem Luftanteil (rot) im Vergleich zu einer Lagerung unter N₂-Atmosphäre (schwarz). Die gepunktete Linie zeigt das Emissionsmaximum der QDs bei 560 nm (schwarz) und 567 nm (rot) an.

Aufgrund der spezifischen Färbungen in den durchflusszytometrischen Messungen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen waren die TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugate sehr gut für Zelldiskriminierungen in Färbungsstudien und bei der Detektion von HER-2/neu-exprimierenden Zellen geeignet. Sie sollten daher in dieser Arbeit auch für die Zelldetektion auf Lebendzell-Microarrays eingesetzt werden. Eine weitere Optimierung des Herstellungsverfahrens könnte zu deutlich stabileren, sehr fluoreszenzintensiven Nanopartikeln mit geringeren Chargenunterschieden und geringerer Toxizität führen.

4.4.3 Konjugate wasserdispergierbarer Quantum Dots_{655nm} (CdSe/ZnS) mit verschiedenen Antikörpern

4.4.3.1 Protokolloptimierung der Konjugation

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, waren die TGA-QD₅₆₀ nur begrenzt lagerfähig, da sie nach wenigen Monaten instabil wurden und für Antikörper-Kopplungen nicht mehr verwendet werden konnten. Um dieses Problem zu umgehen, wurde auf kommerziell erwerbbar Quantum Dots (Life Technologies) zurückgegriffen. Da die

Zellfärbungsstudien mit mehr als einem Antikörper erfolgen sollten, wurden als zweite Farbe rot fluoreszierende Quantum Dots verwendet. Die Konjugation sollte mittels EDC/NHS-Initiierung erfolgen, wie es bei den TGA-QDs₅₆₀ der Fall war. Es wurden daher wasserlösliche QDot[®] ITK Quantum Dots 655 nm verwendet, die mit einem amphiphilen Carboxyl-funktionalisierten Polymer beschichtet waren.¹⁶ Der CdSe-Kern dieser Nanopartikel ist mit einer ZnS-Hülle ummantelt, weitere Auskünfte über die Oberflächenbeschaffenheit standen nicht zur Verfügung. Zunächst sollte das Protokoll, das für die TGA-Quantum Dots₅₆₀ verwendet wurde, auf die QDot ITK 655nm übertragen werden. Die Konzentration der TGA-QDs₅₆₀ war mit 0,909 mg/mL, die der QDs₆₅₅ mit 8 µM angegeben. Somit war ein direkter Vergleich der Konzentrationen der beiden QDs nicht möglich und es wurde nach einer Möglichkeit des Vergleichs gesucht. Die TGA-QDs bestanden aus einem CdTe-Kern mit einer CdS-Hülle. Yu *et al.*, 2003 beschrieben u.a. eine Methode zur Berechnung der Größe eines Nanokristalls anhand der Wellenlänge seines Absorptionspeaks [152]. Hiernach beträgt der Durchmesser des CdTe-Kerns der TGA-QDs (Absorptionspeak bei ~480 nm) 1,68 nm, die mittels DLS und TEM in Kapitel 4.4.2.1 ermittelte Gesamtgröße der TGA-CdTe/CdS Quantum Dots beträgt 5 nm. Nach Berechnung des Kern- und Hülle-Volumens und unter Verwendung der Materialdichten [$\rho(\text{CdTe}) = 5,86 \text{ g/cm}^3$, $\rho(\text{CdS}) = 4,87 \text{ g/cm}^3$]¹⁷ sowie der Avogadro-Konstanten wurde die ungefähre molare Masse der TGA-QDs₅₆₀ mit 190.000 g/mol bestimmt (Details siehe Anhang, Kapitel 6.2.6.3). Laut Herstellerangaben haben die QD₆₅₅ eine ungefähre molare Masse von 150.000 bis 200.000 g/mol. Daraus ergab sich, dass die beiden Quantum Dot Sorten (TGA-QD₅₆₀ und QD₆₅₅) in annähernd gleichen Volumina in den Kopplungsreaktionen eingesetzt werden können. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine einfache Übertragung der Konjugationsbedingungen nicht realisierbar war. Die QDs₆₅₅ waren nach der Konjugation vollständig ausgefallen (Abb. 4.4-24), wobei wenige Partikel bereits nach der Aktivierung mittels EDC/NHS aber vor der Antikörperzugabe zu erkennen waren. Eine falsche Dosierung der Aktivierungsreagenzien konnte ausgeschlossen werden, da die Konjugation von TGA-QDs₅₆₀ problemlos erfolgte.

¹⁶ <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp19020.pdf>

¹⁷ <http://www.semiconductors.co.uk/propivi5410.htm#CdS,CdSe,CdTe>

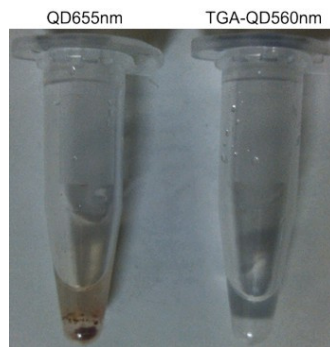


Abb. 4.4-24: Aufnahmen frischhergestellter QD/anti-HER-2/neu Biokonjugate nach dem Standardprotokoll für TGA-QDs₅₆₀. Die QD₆₅₅/AK-Biokonjugate (links) sind vollständig ausgefallen, im Reaktionsansatz der TGA-QD₅₆₀ (rechts) sind hingegen keinerlei Partikel erkennbar.

Die Stabilität von QDs ist oft vom Puffersystem abhängig, sodass getestet wurde, ob der MES-Puffer für die Agglomeratbildung der QD₆₅₅ verantwortlich war. Dieses konnte jedoch nicht beobachtet werden. Der Puffer hatte keinerlei Auswirkungen auf die Stabilität. Da leider keine weiteren Informationen über die Beschaffenheit der QD₆₅₅ zur Verfügung standen, konnte nur vermutet werden, dass es aufgrund der deutlich größeren Anzahl von Carboxylgruppen bedingt durch die größere Oberfläche (~2,5fach) und der zusätzlichen Unterstützung der EDC-Aktivierung durch NHS zu Verzweigungsreaktionen gekommen ist. Die verzweigten Agglomerate waren so groß, dass sie in der Suspension nicht mehr stabilisiert wurden (vgl. Abb. 4.4-28).

Im Folgenden wurde daraufhin von dem beschriebenen Standardprotokoll abgewichen und das Herstellerprotokoll der QD₆₅₅ (Life Technologies) für eine Konjugation der QDs mit Streptavidin verwendet. Ein Protokoll für die Kopplung von Antikörpern wurde vom Hersteller nicht angegeben.

4.4.3.2 Titration des optimalen Quantum Dot_{655nm}:Antikörper-Verhältnisses

Um eine spezifische Detektion durch Antikörper-modifizierte Nanopartikel zu erreichen, muss mindestens ein Antikörper pro Quantum Dot (QD) gebunden sein. Werden zu wenige Antikörper eingesetzt, können sich Konjugate aus einem Antikörper und mehreren QDs bilden. Die Stabilität Antikörper-gekoppelter QDs ist somit abhängig von der Anzahl gebundener Antikörper (AK). Ist das Verhältnis von Quantum Dots und Antikörpern ideal aufeinander abgestimmt, liegen die Konjugate ebenso wie unkonjugierte QDs als einzelne Nanopartikel vor. Wenn zu viele Antikörper gebunden sind, stehen dem QD nicht mehr genügend geladene Oberflächengruppen (z.B. Carboxylgruppen) zur Verfügung, um eine ausreichende elektrostatische Stabilisierung in der Lösung aufrecht zu erhalten. Sind die Konjugate nicht stabil, bilden sich Agglomerate aus, sodass die Konjugate im schlechtesten

Fall aus der Suspension ausfallen und für eine Detektion nicht mehr verwendet werden können. Daher ist es für die spätere Zelldetektion in dieser Arbeit sehr wichtig das QD:AK-Verhältnis zu ermitteln, das die größte Stabilität der Konjugate bewirkt. Aus Kostengründen erfolgte die Titration der optimalen Antikörpermenge anhand des Modellsystems *mouse* IgG, wobei verschiedene QD:IgG-Verhältnisse getestet wurden (1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40). Um auszuschließen, dass eine Agglomeratbildung von mehreren QDs untereinander erfolgt, wurde ein Kontrollansatz ohne IgG verwendet. Für die Konjugation wurde das Herstellerprotokoll (Life Technologies) der QDs für eine Kopplung von Streptavidin an QDs befolgt (siehe Anhang, Kapitel 6.2.6.3).

In Abb. 4.4-25 ist die Agarosegel-Analyse gezeigt, auf der die Konjugate aufgetragen sind, die mittels Ultrazentrifugation (10 min bei 12 °C und 65.000 rpm) im Institut für Biophysik bei PD C. Zeilinger von den nicht umgesetzten Edukten abgetrennt wurden. Von links nach rechts steigt das QD:IgG-Verhältnis von 1:1 auf 1:40. Spur 6 zeigt in Boratpuffer verdünnte QDs als Negativkontrolle und Spur 7 zeigt den Kontrollansatz ohne IgG. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Konjugate mit steigendem IgG-Überschuss langsamer in dem elektrischen Feld durch das Gel bewegen (Spur 1 bis 5). Dieses lässt auf eine Massenzunahme infolge zunehmender Antikörperbindungen schließen.

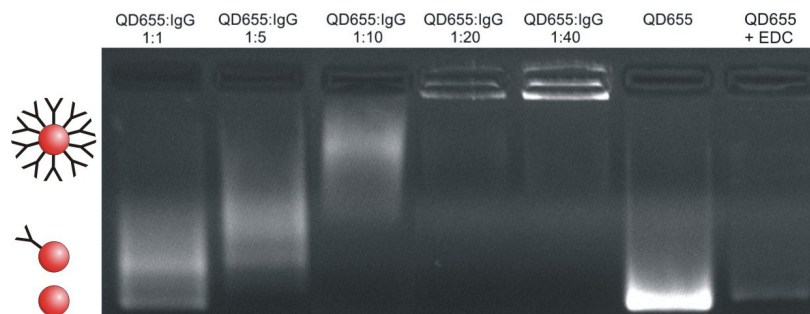


Abb. 4.4-25: Qualitativer Nachweis der erfolgreichen Konjugationen von QD₆₅₅ mit *mouse* IgG zunehmender QD:IgG-Verhältnisse. Spur 1 bis 5 zeigt die Konjugate, die mittels Ultrazentrifugation (10 min bei 12 °C und 65.000 rpm) aufgereinigt wurden. Spur 6 zeigt die verdünnte QD₆₅₅-Stocklösung. Spur 7 den Kontrollansatz ohne IgG. Aufgetragen wurden 80 nM der QDs und Konjugate, jeweils versetzt mit 10 µL 2x Ladepuffer. Die Auftrennung erfolgte für 1 h bei 98 V mittels eines 1,5 %igen Agarosegels. Am linken Rand sind Schemata der jeweiligen Konjugate dargestellt.

Die unbehandelten QDs können sich aufgrund ihrer geringen Größe und Verzweigung sehr schnell durch das Gel bewegen (vgl. Abb. 4.4-28). Die hohe Beweglichkeit wird zusätzlich durch die große Anzahl negativ-geladener Carboxylgruppen auf der Nanopartikeloberfläche verstärkt. Je mehr Antikörper an die QDs gebunden sind, desto mehr werden die Konjugate retardiert und ihre Migrationsfähigkeit eingeschränkt; das Konjugat mit dem höchsten QD:IgG-Verhältnis (1:40) hat nicht einmal die Geltasche verlassen (siehe Spur 5). Da die Bande in Spur 7 auf gleicher Höhe mit der unbehandelten QDs liegt, hat keine Reaktion zwischen den QDs untereinander stattgefunden. Die Antikörpermenge des Verhältnisses 1:1

ist für eine vollständige Konjugation aller QDs nicht ausreichend, da in den Spuren 1 und 8 jeweils zwei deutliche Banden zu sehen sind. Die untere entspricht der Bande unbehandelter QDs. Es ist somit nur gut die Hälfte der QDs mit einem Antikörper versehen worden.

Die hergestellten QD₆₅₅/IgG-Konjugate wurden ausführlicher charakterisiert, um das QD:AK-Verhältnis auswählen zu können, das die beste Stabilität besaß und im Folgenden für alle Reaktionen der QD₆₅₅ mit Antikörpern verwendet werden sollte.

4.4.3.3 Charakterisierung der Quantum Dot_{655nm}/IgG-Konjugate

Mit Hilfe des in Kapitel 4.4.3.2 gezeigten Agarosegels (Abb. 4.4-25) konnten erste Unterschiede der Konjugate verschiedener gebundener Antikörpermengen aufgezeigt werden. Eine genauere Charakterisierung der Konjugate bzgl. ihrer Größe, ihrer Fluoreszenzeigenschaften und der gebundenen Antikörperkonzentrationen wird im Folgenden beschrieben.

Eine genauere Auskunft über die Größe von Nanopartikeln und ihren Konjugaten gibt die DLS-Messung (siehe Kapitel 4.4.1.1). Diese Methode ist jedoch nur für die Vermessung monodispers verteilter sphärischer Partikel geeignet. Diese Einschränkung wurde insbesondere bei der Größenbestimmung der QD/IgG-Konjugate mit großem Antikörperüberschuss (1:20 und 1:40) deutlich. Diese polydispersen Proben konnten aufgrund zu unterschiedlich großer Partikel nur stark verdünnt vermessen werden. In Abb. 4.4-26 sind die Ergebnisse der DLS-Messungen gezeigt. In Teilabbildung A) ist eine gute Korrelation zwischen der Zunahme gebundener Antikörper und steigenden Durchmessern erkennbar. QD₆₅₅ weisen einen Durchmesser von $12,3 \text{ nm} \pm 0,6 \text{ nm}$ auf, wohingegen die Reaktion mit einer äquimolaren Antikörpermenge zu einer annähernden Verdopplung der Größe führt ($22,1 \text{ nm} \pm 1,1 \text{ nm}$). Bei einem 5- bis 20-fachen Antikörperüberschuss (QD:IgG-Verhältnisse 1:5 bis 1:20) nimmt der Durchmesser nur noch wenig zu und bleibt dann bei ungefähr 33 nm konstant. In Teilabbildung B sind neben den unbehandelten QD₆₅₅ (schwarze Quadrate) die Größenverteilungen der am geeignetsten erscheinenden Konjugate (1:5 rote Punkte, 1:10 blaue Dreiecke) dargestellt. Die QD₆₅₅ zeigen eine sehr schmale Größenverteilung, die bei deutlich geringeren Durchmessern liegt, als die der Konjugate. Die Größenunterschiede der Konjugate untereinander sind nur sehr gering, wobei die Konjugate des 1:5-Verhältnisses eine etwas weitere Größenverteilung zeigen.

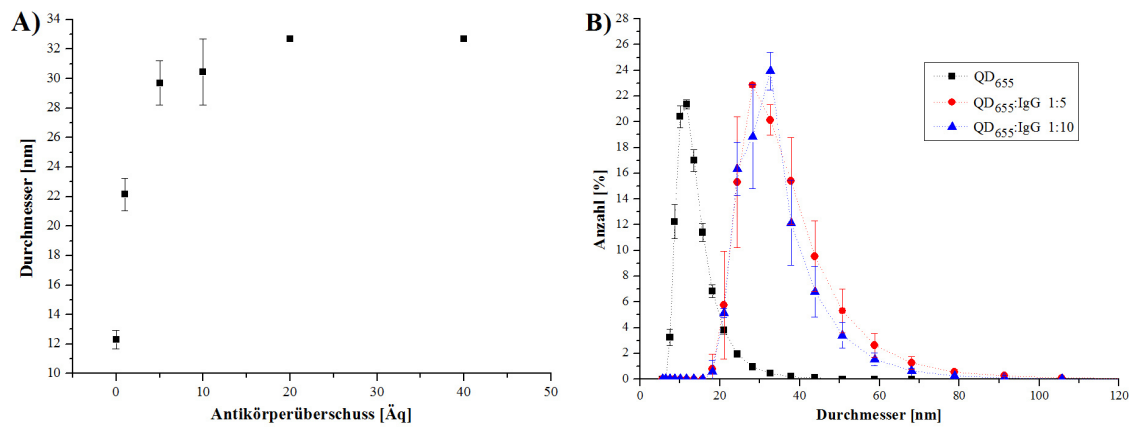


Abb. 4.4-26: Hydrodynamische Durchmesser (A) und Größenverteilungen (B) unfunktionalisierter QD₆₅₅ und der QD/IgG-Konjugate mit steigendem Antikörperüberschuss im Reaktionsansatz. B) Schwarze Quadrate: QD₆₅₅, rote Kreise: QD₆₅₅:IgG 1:5, blaue Dreiecke: QD₆₅₅:IgG 1:10. Die Fehlerbalken entsprechen den Werten der Standardabweichungen von N = 3 Messungen.

Die DLS-Messungen deuten auf die vollständige Belegung der verfügbaren Antikörper-Bindungsplätze auf der QD-Oberfläche bei einem 20-fachen Antikörperüberschuss hin. Aufgrund der geringen Größe der Quantum Dots (~Größenordnung eines Antikörpers), sind jedoch nicht die angebotenen Bindungsplätze der limitierende Faktor sondern der verfügbare die QDs umgebende Raum. Je mehr Antikörper an die QD-Kugeln binden, desto größer werden die sterischen Hinderungen zwischen den gebundenen Antikörpern. Um die Antikörpermenge zu bestimmen, die an einen QD bindet, wurde ein Bicinchoninsäure (BCA)-Test durchgeführt. Zwei BCA-Moleküle bilden mit einem einwertigen Kupferkation einen violetten wasserlöslichen Chelat-Komplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm sein Absorptionsmaximum hat. Das einwertige Kupferkation entsteht zuvor durch die Reaktion von zweiwertigen Kupferkationen mit Proteinen in alkalischem Milieu. Mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden (*mouse* IgG, $y = 179x^2 + 361,7x + 10,95$; $R^2 = 0,999$) konnte die Antikörpermenge in den Fraktionen der Aufreinigung bestimmt und mit der eingesetzten Antikörperkonzentration verrechnet werden. Daraus ergaben sich die in Abb. 4.4-27 gezeigten Verhältnisse von gebundenem Antikörper pro Quantum Dot, welche linear mit der eingesetzten Antikörperkonzentration ansteigen.

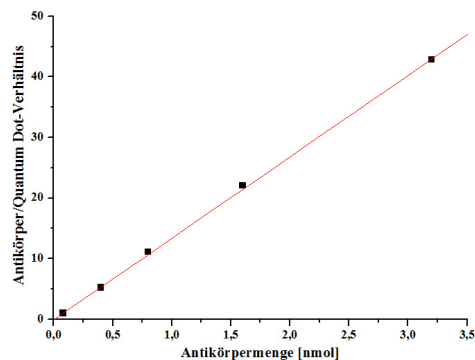


Abb. 4.4-27: Linearer Anstieg des Antikörper/QD-Verhältnisses mit zunehmender Antikörperkonzentration.

Der hydrodynamische Durchmesser stagniert ab einem QD:IgG-Verhältnis von 10, es wird aber immer noch mehr IgG an die QDs gebunden. Dieser vermeintliche Widerspruch hängt mit der Hydrathülle zusammen, die sich um die Konjugate bildet und die sich ab einer bestimmten gebundenen IgG-Menge nicht mehr vergrößert. Ursache für die Agglomeratbildung bei großem Antikörperüberschuss ist die Aktivierung der QD₆₅₅ Oberflächengruppen (hier Carboxylgruppen), um eine kovalente Bindung mit dem Antikörper zu initialisieren. Befinden sich nur sehr wenige Antikörper in der Reaktionslösung (z.B. äquimolare Verhältnisse), bindet statistisch gesehen ein Antikörper an jeden Quantum Dot, wenn das Reaktionsgemisch gut durchmischt ist. Sind mehr Antikörper als Quantum Dots vorhanden, können zunächst mehr Antikörper an die Nanopartikel binden. Wird der Antikörperüberschuss jedoch noch weiter gesteigert, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein EDC-aktivierter Antikörper an einen anderen Antikörper bindet. Dadurch bilden sich stark verzweigte Konjugate, die aus mehreren Antikörper-verknüpften Quantum Dots bestehen. Diese Konjugate sind so groß, dass sie aus der Lösung ausfallen. Eine schematische Darstellung dieser Vorgänge ist in Abb. 4.4-28 gezeigt.

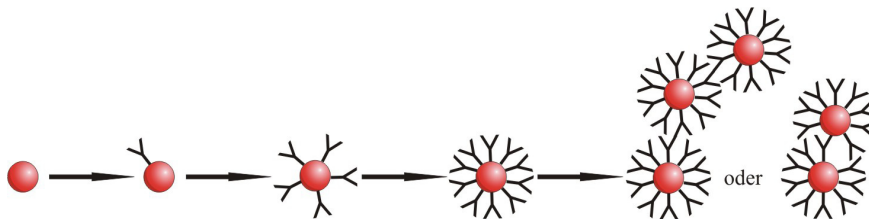


Abb. 4.4-28: Schematische Darstellung der Auswirkungen eines zunehmenden Antikörperüberschusses (Y) während der Konjugation von QD₆₅₅ (●).

Mögliche Effekte, die die Konjugation von Antikörpern an Quantum Dots auf die Fluoreszenzeigenschaften der Nanopartikel haben könnten, wurden mit dem NanoDrop 3300 untersucht. Da alle Proben auch bei der Ultrazentrifugation gleich behandelt wurden, sind die Messergebnisse gut miteinander vergleichbar und sollten nur geringfügige Abweichungen aufweisen. In Abb. 4.4-29 wird deutlich, dass es durch die Konjugation zu keinen Änderungen in den Fluoreszenzeigenschaften der QDs kommt. Das Maximum des Emissionspeaks entspricht in allen Fällen dem unbehandelter QDs bei 655 nm. Lediglich eine schwache Intensitätsabnahme bei gleichzeitiger Zunahme gebundener Antikörper ist erkennbar. Schwache Abschirmungseffekte der Antikörper könnten zusätzlich verstärkt worden sein durch geringfügige Produktverluste infolge der Oberflächenhaftung der QDs und einer schlechten Kühlung während der Aufreinigung und dem Transport. Die vergleichsweise schwachen Intensitäten der Konjugate mit großem Antikörperüberschuss (20-fach und 40-fach) sind wahrscheinlich in der größeren Instabilität und Inhomogenität der

Konjugate mit vielen Agglomeraten begründet, die relativ schnell ausfielen und dadurch bei der Fluoreszenzmessung nicht beachtet werden konnten.

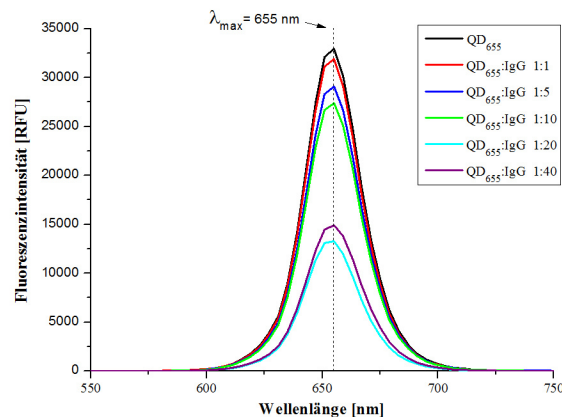


Abb. 4.4-29: Fluoreszenzspektren der QD_{655}/IgG -Konjugate mit zunehmender gebundener Antikörpermenge. Von oben nach unten steigt der eingesetzte Antikörperüberschuss (schwarz: unbehandelte QDs, rot: 1-fach, blau: 5-fach, grün: 10-fach, türkis: 20-fach, lila: 40-fache). Die gepunktete Linie zeigt das Emissionsmaximum der QDs bei 655 nm an.

Die Stabilität der einzelnen Konjugate ist jedoch nicht nur direkt nach der Konjugatbildung wichtig, Zellfärbungen sollten vielmehr auch noch nach mehreren Wochen mit den Konjugaten möglich sein. Daher wurden die aufgereinigten Konjugate der oben beschriebenen Titration im Dunkeln bei 4 °C für einen Monat gelagert und anschließend erneut betrachtet (Daten nicht gezeigt). Die Konjugate der geringen Antikörpermengen zeigten keinerlei Veränderungen. Die Konjugatsuspension der 10-fachen Antikörpermenge wies wenige vereinzelte Partikel auf, wohingegen im Fall des 20- und 40-fachen Antikörperüberschusses alle Konjugate ausgefallen waren. Lediglich der Bodensatz fluoreszierte, der Überstand war klar, farblos und nicht-fluoreszierend.

Eine äquimolare Menge Antikörper war nicht ausreichend, um die Quantum Dots_{655nm} vollständig zu funktionalisieren. Ein 20-facher und 40-facher Überschuss an Antikörper hingegen ließ zum Teil verzweigte Produkte entstehen, die leicht agglomerierten und als Feststoff ausfielen. Der Unterschied zwischen Konjugaten, die mit 5-fachem und 10-fachem Antikörperüberschuss hergestellt wurden, war nur gering. Die Fluoreszenzintensität des 5-fachen Überschusses war geringfügig höher, jedoch war auch ihre Größenverteilung geringfügig breiter. Da die Bande der Konjugate des 5-fachen Überschuss im Agarosegel (siehe Abb. 4.4-25) schwächer und deutlich unschärfer war und eine zweite Bande erkennen ließ, wurde in den folgenden Experimenten der 10-fache Antikörperüberschuss auf alle anderen Antikörper-Konjugationen übertragen.

4.4.3.4 Herstellung und Charakterisierung der Quantum Dot_{655nm}/Antikörper-Konjugate

Dem in den vorangegangenen Kapiteln für die Quantum Dot_{655nm} optimierten Protokoll entsprechend wurden nun auch verschiedene Antikörper (alle *mouse* IgG₁ Isotyp) an die Nanopartikel konjugiert. Es wurde ein Antikörper gegen den Folsäure-Rezeptor 1 (anti-FOLR1) verwendet, der dem der Zellcharakterisierungen in Kapitel 4.2.2 entsprach, jedoch unmarkiert war. Weiterhin wurde ein Antikörper gegen das Epithelzelladhäsionsmolekül (anti-EpCAM) benutzt. Außerdem wurden zwei verschiedene Antikörper gegen HER-2/neu (anti-HER2, anti-HER2*) eingesetzt, die miteinander verglichen wurden. HER-2* entspricht hierbei dem in Kapitel 4.4.2 mit den TGA-QDs₅₆₀ konjugierten Antikörper, der weitere Zusätze enthält. Für alle Färbungsstudien wurden die Zellen zur Negativkontrolle mit QD₆₅₅/*mouse* IgG Konjugaten gefärbt, um mögliche unspezifische Bindungen aufzuzeigen. Zudem wurden als Antikörpermodellsystem für die Zytotoxizitätsbestimmungen und durchflusszytometrischen Messungen sowie einiger mikroskopischer Studien Konjugate eingesetzt, die Antikörper gegen den *Epidermal growth factor* Rezeptor (EGFR) enthielten, der mit HER-2/neu nahverwandten Rezeptor-Tyrosinkinase.

In Abb. 4.4-30 ist die Agarosegelanalyse gezeigt, auf der die verschiedenen Konjugate und als Kontrolle unbehandelte QD₆₅₅ aufgetragen wurden. Es ist deutlich zu sehen, dass alle Konjugate unterschiedlich weit gewandert sind; lediglich das QD₆₅₅/*mouse* IgG und QD₆₅₅/anti-EpCAM Konjugat sind ähnlich weit gelaufen. Es ist sogar ein sehr deutlicher Unterschied zwischen den beiden verschiedenen anti-HER2 Antikörpern zu sehen. Dieses zeigt, dass bereits geringfügige Variationen der Antikörperkonzentration, Pufferzusammensetzung und -zusatzstoffe Auswirkungen auf die Konjugation und die Gelelektrophorese haben. Das Agarosegel kann somit nur für die Bestätigung der Konjugation herangezogen werden, aber nicht zur Bestimmung der Konjugatgröße oder der gebundenen Antikörpermenge eingesetzt werden. Außerdem wird deutlich, dass die Konjugation von QD_{655nm} und anti-EGFR nicht vollständig erfolgte, da auf Höhe der unbehandelten QDs ebenfalls eine Bande zu erkennen ist. Somit ist eine Abschätzung der einzusetzenden Antikörpermenge anhand des Modellsystems *mouse* IgG sehr gut möglich, im Zweifelsfall muss aber die Menge des eigentlichen Antikörpers weiter optimiert werden.

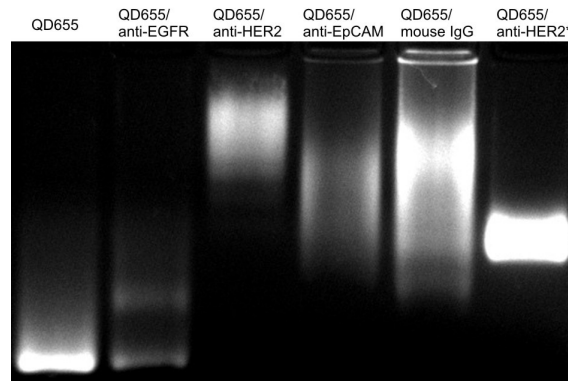


Abb. 4.4-30: Qualitativer Nachweis der erfolgreichen Konjugationen von QD₆₅₅ mit verschiedenen Antikörpern. Spur 1 zeigt die verdünnte QD-Stocklösung. Aufgetragen wurden 80 nM der QDs und Konjugate, jeweils versetzt mit 10 µL 2x Ladebuffer. Die Auftrennung in dem 1,5 %igen Agarosegel erfolgte für 1 h bei 98 V.

Die hydrodynamischen Größen der hergestellten Konjugate wurden mittels DLS-Messungen bestimmt. In Abb. 4.4-31 wird deutlich, dass sich das Bandenmuster des Agarosegels auch in den DLS-Ergebnissen widerspiegelt. Die unkonjugierten QD₆₅₅ sind am kleinsten und die unvollständig abreagierten QD₆₅₅/anti-EGFR-Konjugate sind ein wenig kleiner (21,0 nm ± 2 nm) als die übrigen Konjugate. Dennoch besitzen die im Agarosegel als geringfügig größer erscheinenden QD₆₅₅/anti-HER2 Konjugate von allen Konjugaten mit 18,2 nm ± 1,6 nm den kleinsten Durchmesser. Die anderen Konjugate zeigen im Mittel einen hydrodynamischen Durchmesser von 26,3 nm ± 1,9 nm. Mit Ausnahme des QD₆₅₅/anti-HER2 Konjugates entsprechen die Durchmesser jedoch insgesamt den nach Kapitel 4.4.3.3 zu erwartenden Größen.

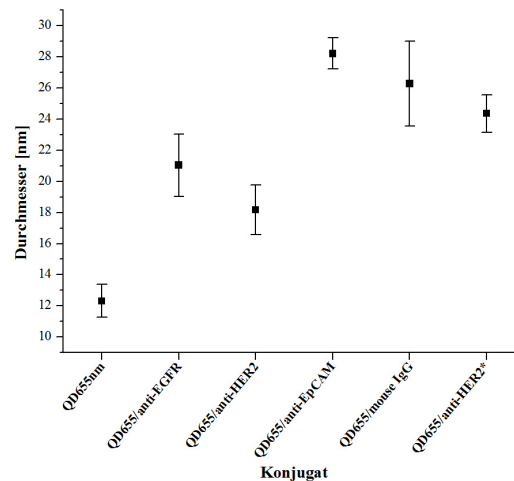


Abb. 4.4-31: Hydrodynamische Durchmesser nicht funktionalisierter QD₆₅₅ und der QD₆₅₅/Antikörper-Konjugate. Die Fehlerbalken entsprechen den Werten der Standardabweichungen von N = 3 Messungen.

Die kleineren Größen der QD₆₅₅/anti-EGFR und anti-HER2 Konjugate könnten auf eine geringere gebundene Antikörperanzahl zurückzuführen sein. Daher wurden die Konjugate auf ihr Antikörper/QD-Verhältnis hin untersucht, indem ein BCA-Test der Aufreinigungs-/Waschfraktionen durchgeführt wurde. Es gab nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Konjugaten (QD₆₅₅/anti-EGFR: 9,81 nmol pro 1 nmol QD, QD₆₅₅/anti-HER2: 9,53 nmol pro

1 nmol QD, QD₆₅₅/mouse IgG: 9,45 nmol pro 1 nmol QD). Somit wurde im Durchschnitt ein Verhältnis von 9,6 Antikörpern pro QD erzielt.

In Abb. 4.4-32 sind die Fluoreszenzspektren aller Konjugate gezeigt. Die Intensitäten sind hierbei nicht direkt vergleichbar, da zum einen verschiedene große Reaktionsansätze vorlagen und zum anderen die Konjugate nach der Reinigung in unterschiedlich großen Puffervolumen suspendiert wurden. Es wird aber deutlich, dass es trotz Konjugation und den aufgezeigten Unterschieden der Konjugate zu keiner Verschiebung des Maximums des Emissionspeaks (655 nm) kam.

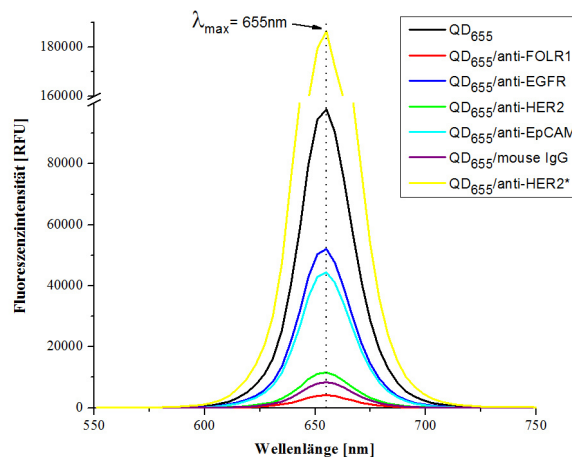


Abb. 4.4-32: Fluoreszenzspektren der Quantum Dot₆₅₅/Antikörper-Konjugate. Schwarz: unbehandelte QDs, rot: QD₆₅₅/anti-FOLR1, blau: QD₆₅₅/anti-EGFR, grün: QD₆₅₅/anti-HER2, türkis: QD₆₅₅/anti-EpCAM, lila: QD₆₅₅/mouse IgG, gelb: QD₆₅₅/anti-HER2*. Die gepunktete Linie zeigt das Emissionsmaximum der QDs bei 655 nm an.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass das Konjugationsprotokoll des Modellsystems Quantum Dot₆₅₅/mouse IgG erfolgreich auf verschiedene weitere Antikörper übertragen werden konnte. Alle hergestellten Konjugate zeigen sowohl im Agarosegel als auch bei DLS-Messungen eine deutlich veränderte Größe im Vergleich zu der QD_{655nm} Stocklösung. Die funktionalisierten Partikel sollten die Zellen somit spezifisch anfärben können.

4.4.3.5 Zytotoxizitätsbestimmungen

Die Kern/Hülle Quantum Dots QDot[®]ITK 655 nm bestehen aus einem CdSe-Kern, der von ZnS ummantelt ist. Der Hersteller gibt an, dass keine ausgeweiteten Untersuchungen des zytotoxischen Potenzials erfolgten. Somit war es besonders wichtig, vor einer Anwendung in durchflusszytometrischen Messungen und der Mikroskopie die Zytotoxizität dieser Nanopartikel und ihrer Biokonjugate zu untersuchen. Dieses erfolgte zunächst mit Hilfe eines konzentrationsabhängigen MTT-Tests anhand des Modellkonjugates QD₆₅₅/mouse IgG. Die in Kapitel 4.2.3 als Positiv- und Negativkontrollen identifizierten Zelllinien (A-549, HELA, HEP-G2, NIH-3T3) wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0,05; 0,1; 1; 5; 10; 100 nM) des Konjugates für 4 h (maximale Zellfärbungsdauer) behandelt. Im Vergleich mit

der Kontrolle unbehandelter Zellen zeigte sich für keine der Zelllinien ein toxischer Effekt (siehe Abb. 4.4-33 A).

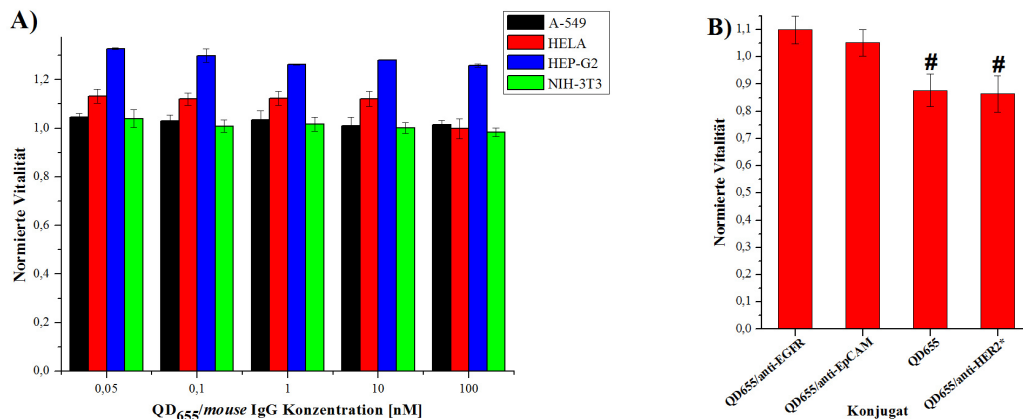


Abb. 4.4-33: Konzentrationsabhängige Effekte (A) von QD₆₅₅/mouse IgG auf die Vitalität von A-549, HELA, HEP-G2 und NIH-3T3 Zellen sowie Effekte der Antikörper-funktionalisierten QDs₆₅₅ (B) auf A-549 Zellen unter Verwendung des MTT-Assays. Die experimentell bestimmte Zellvitalität wurde jeweils auf unbehandelte Kontrollzellen normiert (Vitalität = 1). A) zeigt die Zellvitalität nach der Inkubation mit einer steigenden Konzentration QD₆₅₅/mouse IgG, mit schwarz: A-549 Zellen, rot: HELA Zellen, blau: HEP-G2 Zellen, grün: NIH-3T3 Zellen. B) zeigt Effekte der spezifisch-bindenden anti-EGFR- und anti-EpCAM-funktionalisierten QDs (20 nM), sowie nicht-funktionalisierter QDs₆₅₅ und anti-HER2*-konjugierter QDs (100 nM, mit # markiert). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 Messungen.

Um auszuschließen, dass die geringe Toxizität der QD₆₅₅/mouse IgG Konjugate nur eine Folge der ungenügenden Bindung und Internalisierung dieser unspezifischen Nanopartikel war, wurde der MTT-Test mit spezifisch-bindenden Konjugaten wiederholt. Hierbei wurden zwei verschiedene Konzentrationen verwendet (20 und 100 nM). Die hohe Konzentration (100 nM, mit # markiert) zeigte eine geringfügige Abnahme der Vitalität (Abb. 4.4-33 B). Insgesamt sind die funktionalisierten Nanopartikel in der relevanten Inkubationsdauer nicht-toxisch und somit für Zelldetektionen gut geeignet.

4.4.3.6 Zellfärbungen und Mikroskopie

Auch für diese Quantum Dots wurde zunächst versucht, eine Zellfärbung und Diskriminierung von fixierten Zellen durchzuführen, da die Polymerbeschichtung möglicherweise unspezifische Bindungen unterdrücken könnte. Wie in Abb. 4.4-34 zu erkennen ist, sind die Zellen klar erkennbar und gleichmäßig sowie kräftig von den QD₆₅₅ und den QD₆₅₅/anti-EGFR Konjugaten angefärbt. Leider war auch in diesem Fall weder eine Diskriminierung Rezeptor-exprimierender A-549 (A) und Rezeptor-negativer NIH-3T3 Zellen (C) möglich, noch konnte die unspezifische Färbung durch die QD₆₅₅ (B, D) unterdrückt werden, sodass im Folgenden auf eine Fixierung verzichtet wurde.

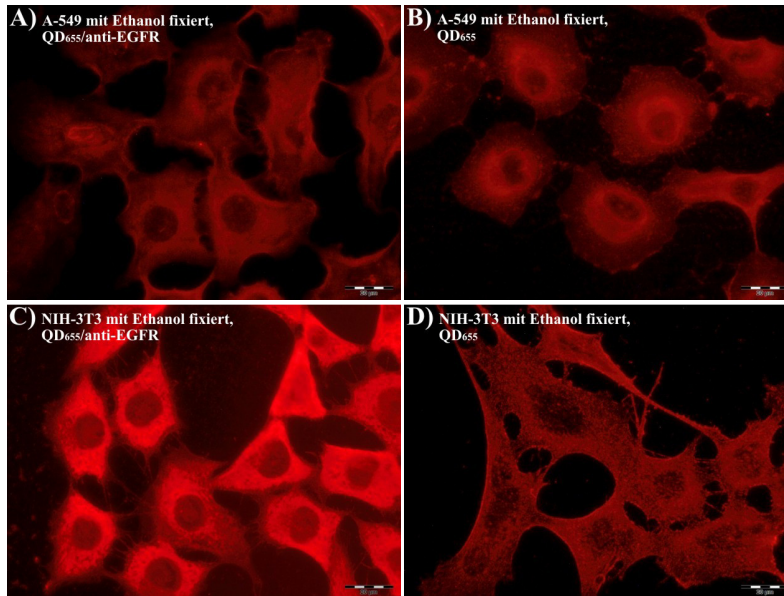


Abb. 4.4-34: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen mit eiskaltem Ethanol fixierter A-549 (A, B) und fixierter NIH-3T3 (C, D) Zellen, angefärbt für 2h mit jeweils 2 nM QD₆₅₅/anti-EGFR Biokonjugat (A, C) und QD₆₅₅ (B, D). Der Maßstab zeigt 20 µm.

Die Konjugate des HER2*-Antikörpers dienten im Folgenden zunächst als Modellsystem, um ein geeignetes Protokoll für die Zellfärbung zu etablieren und die einzusetzenden Konzentrationen abzuschätzen. In Abb. 4.4-35 wird gezeigt, wie die hohe Hintergrundfärbung (A, oberer Rand) durch Agglomerate nach der Filterung der hergestellten funktionalisierten Nanopartikel durch eine 0,2 µm Membran und Verdünnung auf 3 nM beseitigt werden konnte (B). Bereits bei der höheren Konzentration wurde festgestellt, dass die nicht-funktionalisierten QD₆₅₅ nur geringfügig an die Zellen banden (C).

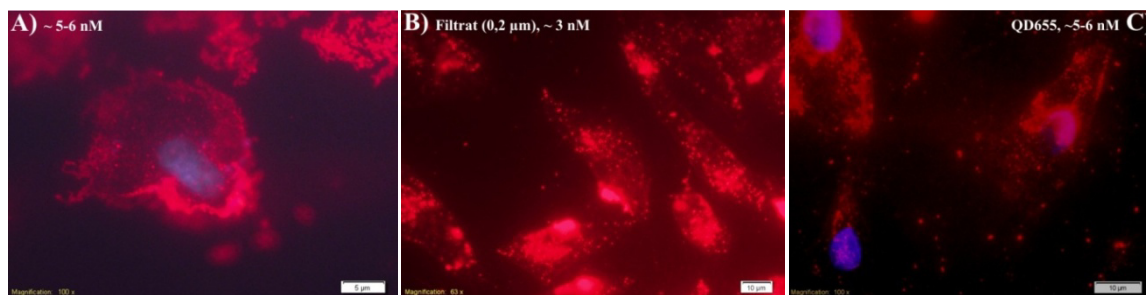


Abb. 4.4-35: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen erster Färbungsversuche von A-549 Zellen mit QD₆₅₅/anti-HER2* Konjugaten mit einer Konzentration von ~5-6 nM (A) und mit ~ 3 nM sowie Filterung der Konjugate mit einer 0,2 µm Membran (B), sowie Kontrollfärbungen mit QD₆₅₅ einer Konzentration von ~5-6 nM (C). Rot: QDs und Konjugate, blau: DAPI-Zellkernfärbung. Der Maßstab zeigt in A) 5 µm und in B), C) 10 µm.

Die verschiedenen Konjugate der Antikörper gegen EGFR, FOLR1 und EpCAM sowie des *mouse* IgGs als Negativkontrolle wurden anschließend auf ihre Spezifität untersucht, indem die in Kapitel 4.2.3 als zelluläre Positiv- und Negativkontrollen identifizierten Zelllinien für jeweils 2 h gefärbt wurden. Das hohe Expressionslevel von HER2/neu und EGFR in A-549 Zellen, von FOLR1 in HELA Zellen und von EpCAM in HEP-G2 Zellen wurde hierfür ausgenutzt. Ebenso wurden Rezeptor-negative NIH-3T3 Zellen für das humane HER2/neu,

A-549 Zellen für FOLR1 und HELA Zellen für das EpCAM Protein verwendet. Als Konzentrationen wurden hierbei für die anti-EGFR, anti-FOLR1 und *mouse* IgG Konjugate 2 nM und für die anti-EpCAM Konjugate 1 nM verwendet. Diese Konzentrationen verursachten die geringsten unspezifischen Bindungen. Die Ergebnisse der Zellfärbungen sind in Abb. 4.4-36 gezeigt. In der linken Spalte sind die Rezeptor-positiven und in der mittleren Spalte die Rezeptor-negativen Zellen abgebildet. Die unspezifischen Bindungen der QD₆₅₅/*mouse* IgG Konjugate sind für die Rezeptor-positiven Zellen in der rechten Spalte dargestellt. Alle Quantum Dot/Antikörper Konjugate binden sehr spezifisch an die Rezeptor-positiven Zellen und zeigen nur sehr schwache unspezifische Bindungen zu den Rezeptor-negativen Zellen. Auch die *mouse* IgG Konjugate sind als Negativkontrolle gut geeignet und zeigen nur relativ geringe unspezifische Bindungen.

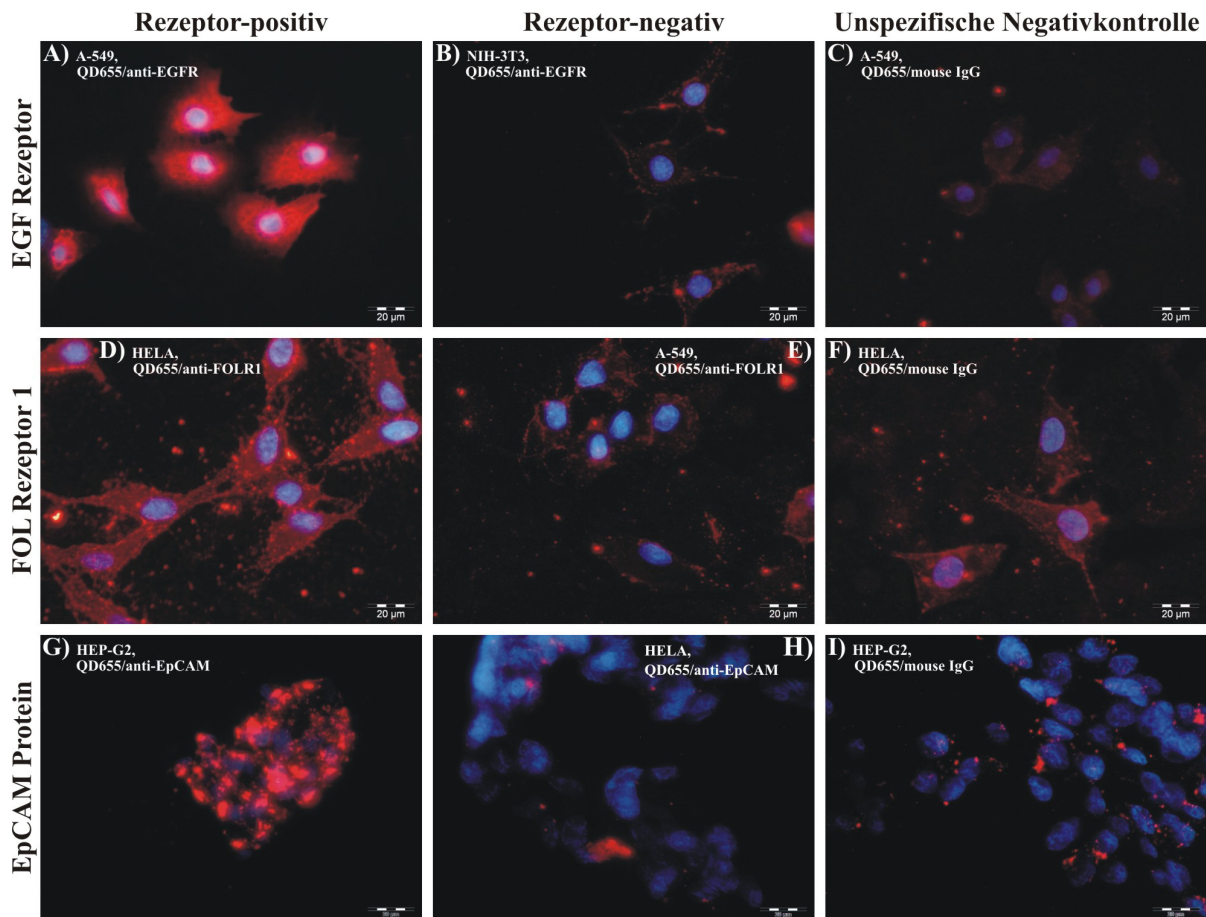


Abb. 4.4-36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der spezifischen Färbung Rezeptor-exprimierender Zellen (links Spalte, A, D, G), Rezeptor-negativer Zellen (mittlere Spalte, B, E, H) und der Negativkontrolle QD₆₅₅/*mouse* IgG (rechte Spalte, C, F, I) anhand der A-549, HELA, HEP-G2 und NIH-3T3 Zelllinie. Die Zellen wurden jeweils für 2 h inkubiert mit den QD₆₅₅/anti-EGFR, QD₆₅₅/anti-FOLR1 und QD₆₅₅/*mouse* IgG Konjugaten in einer Konzentration von 2 nM und mit den QD₆₅₅/anti-EpCAM Konjugaten in einer Konzentration von 1 nM. Rot: Quantum Dot/Antikörper Konjugate, blau: DAPI-Zellkernfärbung. Der Maßstab zeigt 20 µm.

Die Spezifität der Konjugat-Zell-Bindung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie genauer quantifiziert. Hierfür wurden die EGFR-positiven A-549 und EGFR-negativen NIH-3T3 Zellen mit einer QD₆₅₅/anti-EGFR Konzentration von 2 nM angefärbt und die Fluoreszenz-

intensität der Zellen im dritten Detektor (675 nm/30) gemessen (siehe Abb. 4.4-13). Als negative Kontrollfärbung wurden die Zellen mit der gleichen Konzentration QD₆₅₅/mouse IgG Konjugat behandelt und deren Fluoreszenzintensitäten auf 1 AU eingestellt. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten A-549 Zellen war viermal so groß wie die der NIH-3T3 Zelllinie, womit die Färbung sehr spezifisch war.

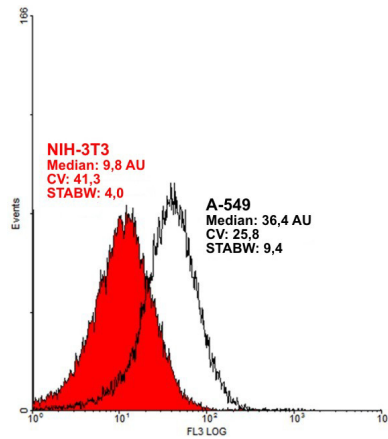


Abb. 4.4-37: Histogramm der spezifischen Bindung der QD₆₅₅/anti-EGFR Konjugate an A-549 (schwarze Kurve) und EGFR-negative NIH-3T3 Zellen (rote Kurve). Die berechneten relativen Fluoreszenzintensitäten (bezogen auf die QD₆₅₅/mouse IgG Kontrollfärbungen) sind unter den jeweiligen Zelllinien angegeben.

Der Aufnahmeprozess der QD₆₅₅ und ihrer Konjugate in die Zellen wurde am Modellsystem QD₆₅₅/anti-EGFR im zeitlichen Verlauf (15 min, 2 h, 6 h) betrachtet. Der Mechanismus wurde durch Färbung der A-549 Zellen für 2 h bei 4 °C identifiziert. In Abb. 4.4-38 ist sehr gut zu erkennen, dass die Konjugate nach 15 min an die Zellmembranen gebunden hatten (A) und nach 2 h in das Zytoplasma eingedrungen waren (B). Die Zellen wurden von den QD₆₅₅/anti-EGFR Konjugaten deutlich stärker gefärbt, als dieses mit den TGA-QD₅₆₀ Konjugaten möglich war. Sie wurden jedoch nicht so gleichmäßig gefärbt (vgl. Abb. 4.4-17). Eine Verlängerung der Inkubationszeit brachte keine Veränderungen. Die QDs₆₅₅ hatten auch nach 6 h Inkubation nur relativ schwach an die Zellmembranen gebunden (C). Sowohl die Konjugate (D) als auch die QDs (E) banden bei 4 °C ebenfalls an die Zellmembran, konnten diese aber nicht überwinden. Dadurch sind bei 4 °C keine Unterschiede zwischen den Partikeln erkennbar. Die Zellmorphologie zeigt den schlechten Zustand der Zellen aufgrund der niedrigen Temperaturen. So sind die Zellen nicht mehr langgestreckt, sondern haben sich deutlich zusammengezogen.

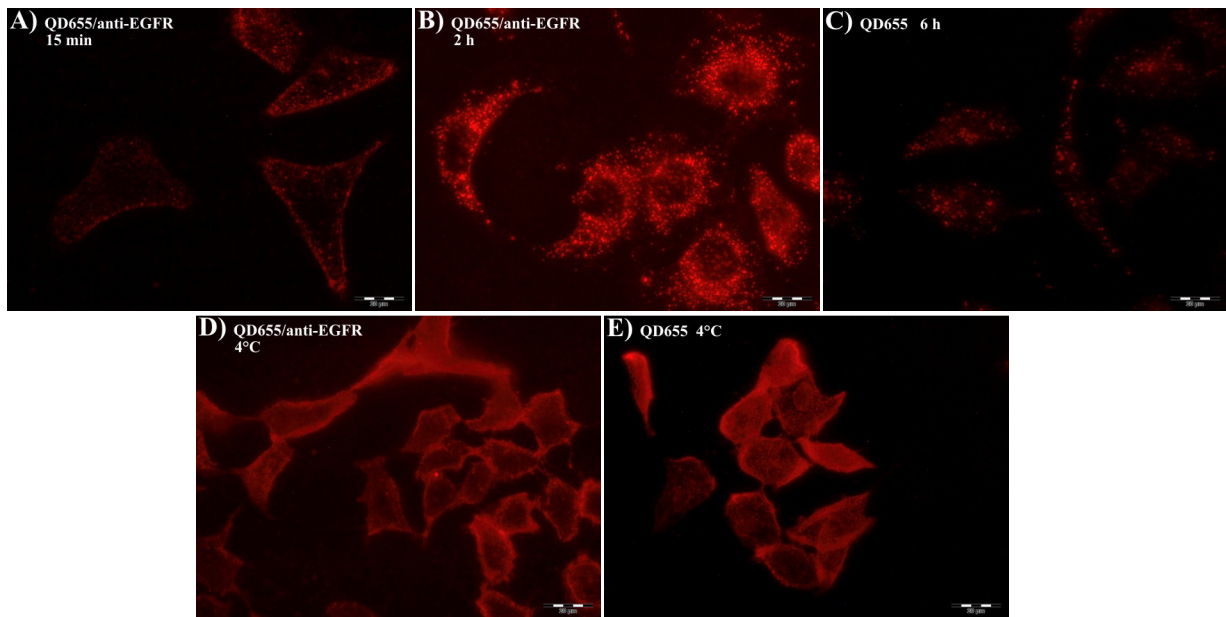


Abb. 4.4-38: Zeitliche Beobachtung und Identifizierung des Internalisierungsprozesses von $QD_{655}/anti-EGFR$ Konjugaten (A, B, D) und nicht-funktionalisierter QD_{655} (B, E) nach einer Inkubation von A-549 Zellen mit einer Probenkonzentration von jeweils 2 nM. Obere Reihe: Steigende Inkubationsdauern von 15 min (A), 2 h (B) und 6 h (C) bei 37 °C. Untere Reihe: Inkubation für 2 h bei 4 °C. Der Maßstab zeigt 20 µm.

4.4.3.7 Stabilität der Quantum Dots_{655nm} und Photobleaching-Eigenschaften

Die Langzeitstabilität der Quantum Dot_{655nm}/Antikörper-Konjugaten wurde bestimmt, indem die Konjugate im Dunkeln bei 4 °C gelagert und die Fluoreszenzintensitäten mittels NanoDrop3300 gemessen wurden. Für alle Konjugate nahm die Fluoreszenz nur sehr geringfügig ab, wie in Abb. 4.4-39 dargestellt ist. Von den Konjugaten von QD_{655} mit anti-HER2, anti-EpCAM und anti-EGFR konnten die Fluoreszenzintensitäten nicht über den gesamten Zeitraum gemessen werden, da diese frühzeitig aufgebraucht waren.

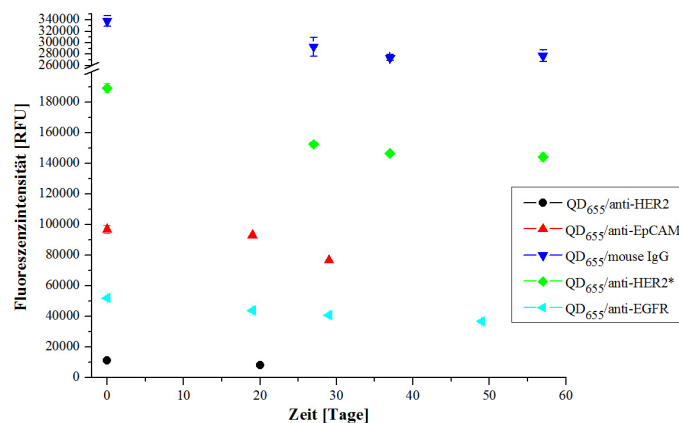


Abb. 4.4-39: Bestimmung der Langzeitstabilität anhand gemessener Fluoreszenzintensitäten der QD_{655}/AK -Konjugate betrachtet über einen Zeitraum von mindestens 20 bis maximal 57 Tagen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 Messungen.

Auch bei den kommerziell erworbenen Quantum Dots ließen sich Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten von verschiedenen Chargen beobachten, die jedoch geringer waren als die der TGA- QD_{560nm} . Eine verdünnte QD_{655} Lösung wurde mittels NanoDrop3300 mit

drei verschiedenen Standardreihen verglichen. Bei zwei Messungen, denen die Standardreihen des gleichen Jahres zugrunde lagen, wurden QD₆₅₅-Konzentrationen von 91 nM und 87 nM ermittelt. Eine dritte Messung, die sich auf eine deutlich ältere Standardreihe stützte, ergab hingegen eine Konzentration von 175 nM. Somit ist es auch bei den kommerziell erwerbbaaren Quantum Dots nötig, auf die maximale Fluoreszenzintensität zu achten und Konjugatkonzentrationen ggf. anzupassen. Der Vergleich dreier verschiedener QD-Stocklösungen eines Jahres in Abb. 4.4-40 A) zeigt jedoch generell nur geringe Intensitätsunterschiede. Die Photostabilitäten dieser Chargen waren ebenfalls annähernd gleich gut. Der Einfluss einer mehrmaligen UV-Bestrahlung auf die Fluoreszenzintensität der QD_{655nm} ist in Teilabbildung B) gezeigt. Zwei verschiedene Chargen wurden hierbei verglichen. Es wurde bei beiden Nanopartikelproben insgesamt nur eine minimale Abnahme der Fluoreszenzintensitäten festgestellt. Verglichen mit den TGA-QDs₅₆₀ (vgl. Kapitel 4.4.2.5) ist hier die für QDs typische hohe Stabilität und Vergleichbarkeit hervorzuheben.

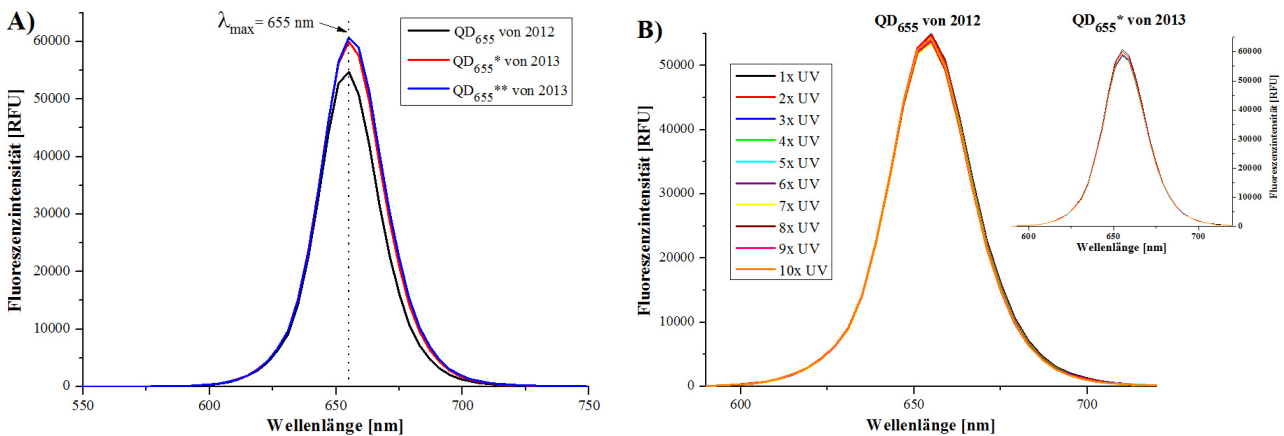


Abb. 4.4-40: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten (A) und Effekte einer mehrmaligen UV-Bestrahlung auf die Fluoreszenzintensitäten (B) verschiedener QD₆₅₅-Chargen von 2012 und 2013 (*, **). Die gepunktete Linie zeigt das Emissionsmaximum der QDs bei 655 nm an.

Außerdem wurden die Photostabilität und mögliche *Photobleaching*-Eigenschaften beispielhaft für das QD₆₅₅/anti-EGFR Konjugat mikroskopisch ermittelt. Bereits bei der Dokumentation des Agarosegels in Kapitel 4.4.3.4 (siehe Abb. 4.4-25) wurde deutlich, dass die Konjugate der QDs₆₅₅ im Gegensatz zu den TGA-QDs₅₆₀ Konjugaten sehr photostabil sind. Trotz mehrmaliger, wiederholter UV-Bestrahlung blichen die Banden nicht aus. Um dieses nochmals zu bestätigen, wurden nach definierten Bestrahlungszeiten mit UV-Strahlung (wenige sec, 1 min, 2 min, 4 min) Aufnahmen der gefärbten Zellen gemacht. Wie ein Vergleich der Teilabbildungen in Abb. 4.4-41 zeigt, nahm die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen nicht ab.

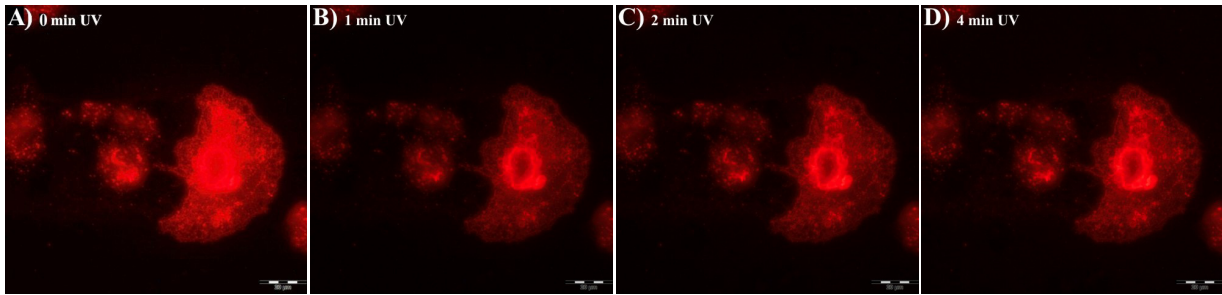


Abb. 4.4-41: *Photobleaching*-Eigenschaften der QD₆₅₅/anti-EGFR Konjugate nach definierten Bestrahlungszeiten mit UV-Strahlung von wenigen Sekunden während der 1. Aufnahme (A) bis hin zu 4 min Dauerbestrahlung (D). Der Maßstab zeigt 20 μm .

Die hergestellten Quantum Dot₆₅₅/Antikörper Konjugate zeigten auch nach der Internalisierung in die Zellen starke Fluoreszenzsignale und zudem eine hohe Photostabilität und geringe Toxizitäten, sodass auch Langzeitbeobachtungen möglich wären. Es konnte gezeigt werden, dass das optimierte Protokoll auf verschiedene Antikörper übertragbar ist. Dadurch konnten die verschiedenen Konjugate erfolgreich für die spezifische Diskriminierung Rezeptor-exprimierender und Rezeptor-negativer Zellen sowohl in der Durchflusszytometrie als auch Mikroskopie eingesetzt werden und sollten somit auch für die Anwendung auf Lebendzell-Microarrays gut geeignet sein.

4.4.3.8 Schlussfolgerungen

Es wurden drei sehr verschiedene Quantum Dots für die Funktionalisierung mit Biomolekülen (hier Antikörpern) verwendet und auf ihre Eignung als Detektionsmoleküle sowie ihrer Spezifität getestet. Die Funktionalisierung aller Quantum Dots mit den Antikörpern war erfolgreich, im Falle der hydrophoben HDA-QD₅₆₀ nach einem erfolgten Ligandenaustausch. Die resultierenden Konjugate wurden ausführlich charakterisiert und aufgrund ihrer hohen Spezifität, geringen Toxizität und hohen Stabilität als sehr gut geeignete Alternative zu herkömmlichen organischen Farbstoff-Konjugaten für Zelldetektionen befunden. Die toxischeren und etwas instabileren TGA-QD₅₆₀/Antikörper Konjugate sollen ebenso wie die nicht-toxischen QD₆₅₅/Antikörper Konjugate auf den selbst entwickelten Lebendzell-Microarrays angewendet werden.

4.4.4 Konjugate wasserdispergierbarer Quantum Dots_{655nm} (CdSe/ZnS) mit einem Aptamer

4.4.4.1 Herstellung und Charakterisierung der Quantum Dot_{655nm}/Aptamer-Konjugate

Neben Antikörpern sind Aptamere sehr spezifische Detektionsmoleküle. Sie werden in einem synthetischen Prozess hergestellt und können auch gegen ganze Zellen selektiert

werden (Cell-SELEX), wenn einzelne Zellmembranproteine nicht bekannt sind. Da die Quantum Dot_{655nm} (QDot_{655nm}ITK), wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, sehr photostabil und stark fluoreszierend waren, sollten diese Nanopartikel auch in ersten Zeldetektionsstudien verwendet werden, in denen Aptamere als Detektionsmoleküle eingesetzt wurden. Die Identifikation einer Zelllinie war in dieser Arbeit bisher nur durch die Kombination von mindestens zwei Antikörpern gegen unterschiedliche Antigene möglich. In den folgenden Kapiteln sollten daher zwei Aptamere verwendet werden, die von Zhao *et al.* 2009 gegen einen bestimmten Typ von *non-small cell lung cancer* (NSCLC) selektiert waren und auch die Zelllinie A-549 detektieren sollten [156]. Die ausgewählten Aptamere waren zum einen Cyanin 5 (Cy5)-markiert, zum anderen trugen sie eine Amino-Endgruppe, an die die QD₆₅₅ gebunden werden sollten. In der Literatur war als Zellnegativkontrolle für das Aptamer u.a. die HELA-Zelllinie genannt, die auch im Folgenden als solche verwendet wurde. Zusätzlich zu den A-549-spezifischen Aptameren wurden zwei Aptamere annähernd gleicher Sequenzlänge verwendet (S6 Kontrolle1 Cy5-markiert und Mal1-Kontrolle [15] mit Amino-Endgruppe), die aufgrund ihrer Sequenz nicht an die Zellen binden sollten. Die Mal1-Kontrolle wurde am Institut für Technische Chemie für die Aufreinigung kleiner Moleküle verwendet und wegen seiner annähernd gleichen Sequenzlänge ausgewählt. Die Aptamer-spezifischen Daten sind in Tab. 4.4-3 zusammengefasst.

Tab. 4.4-3: Der Literatur entnommene spezifische Kenndaten der verwendeten spezifisch-bindenden Aptamere (S6 und S15) sowie der Negativkontrollen (S6 und Mal1). Angegeben sind die Aptamerlänge (in Nukleotiden), die am Aptamer vorhandene Markierung, die Aptamersequenz inkl. der Primersequenz (schwarz), Zell-spezifische Targets und mögliche Zell-Negativkontrollen, sowie Bindungskonstanten(K_d)-Werte. Die Bindungsstärke der Aptamere zu den Targets ist ebenfalls angegeben mit sehr stark (++++), schwach (++) , keine Bindung (0).

Aptamer	Markierung	Sequenz	Target	Negativkontrolle	K_d /nM
S6 (85 nt)	Amino-C6	5' ACGCTCGGATGCCACTACAGG TGGCCAGTCACTCAATTGGGTG TAGGGGTGGGATTGTGGGTTG CTCATGGACGTGCTGGTGAC3'	A-549 (NSCLC) +++++	MCF-7,HELA 0	28,2 ± 5,5
	Cy5		Tissue Arrays 0	HEP-G2 ++	
S15 (85 nt)	Amino-C6	5' ACGCTCGGATGCCACTACAGG CTATCTTATGGAAATTCGTGTA GGGTTTGGTGTGGCGGGGTAC TCATGGACGTGCTGGTGAC3'	A-549 (NSCLC) +++++	MCF-7,HELA 0	56,8 ± 3,2
	Cy5		Tissue Arrays +++++	HEP-G2 ++	
S6 Kontrolle1 (85 nt)	Cy5	5' ACGCTCGGATGCCACTACAGA CCGCGTCTCTACGACCGGTGCT CGATTTAATTCGCTGACGTGAC TCATGGACGTGCTGGTGAC3'	Aptamer- Negativkontrolle		
Mal1 Kontrolle (72 nt)	Amino-C6	5' ATACGGGAGCCAACACCAGC AGTCAAGAAGTTAAGAGAAAA ACAATTGTGTATAAGAGCAGGT GTGACGGAT3'	Aptamer- Negativkontrolle		

Die Aptamere S6 und S15 wurden in dem Bindungspuffer (BP) selektiert: 2,67 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 137,93 mM NaCl, 8,06 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 5 mM MgCl₂, 4,5 g/L Glukose, 1 mg/mL BSA, welcher in dieser Arbeit für die richtige Faltung der Aptamere

sorgte. Die Zelldetektion erfolgte in Bindungspuffer mit 20 % Fötalem Kälberserum. Dieses Protokoll wurde der Literatur entnommen [156].

Die Konjugation der Aptamere S6, S15 und Mall1 erfolgte nach dem Standardprotokoll des Instituts für Technische Chemie in Natriumboratpuffer (NBP) unter EDC-Initiierung. Nicht umgesetzte Edukte wurden mit Hilfe von 100 kDa Zentrifugaleinheiten abgetrennt und die QD₆₅₅/Aptamer Konjugate in Bindungspuffer (BP) umgepuffert. Welch großen Einfluss der Puffer für die richtige Faltung des Aptamers spielt, veranschaulicht Abb. 4.4-42. Sie zeigt aber auch die unterschiedliche Wirkung verschiedener Puffer auf die QDs.

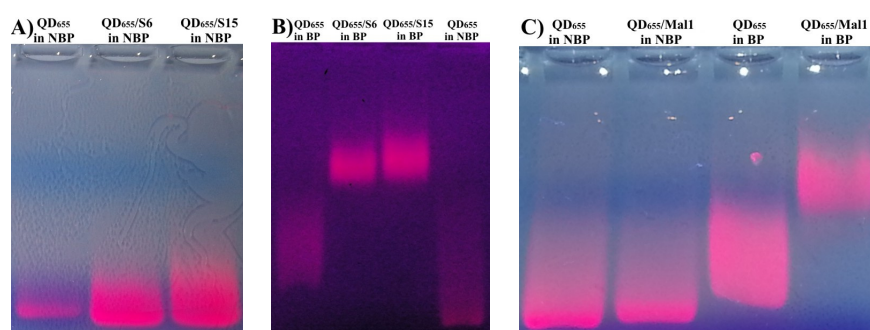


Abb. 4.4-42: Qualitativer Nachweis der erfolgreichen Konjugationen von QD₆₅₅ mit den Aptameren S6 und S15 (A, B) sowie Mall1 (C) und Darstellung des Puffereinflusses auf die QDs und Aptamerfaltung. A) zeigt QD₆₅₅ (Spur 1), QD₆₅₅/S6 (Spur 2) und QD₆₅₅/S15 (Spur 3) in Natriumboratpuffer (NBP) gelöst. In B) wurden in Bindungspuffer (BP) gelöste QD₆₅₅ (Spur 1), QD₆₅₅/S6 (Spur 2) und QD₆₅₅/S15 (Spur 3), sowie in NBP gelöste QD₆₅₅ (Spur 4) aufgetragen. C) zeigt QD₆₅₅ in NBP gelöst (Spur 1) und in BP gelöst (Spur 3) sowie Mall1-funktionalisierte QD₆₅₅ in NBP gelöst (Spur 2) und in BP gelöst (Spur 4). Aufgetragen wurden 80 nM der Nanopartikel, jeweils versetzt mit 10 µL 2x Ladepuffer. Die Auftrennung erfolgte für 1 h bei 98 V.

Werden die QDs in dem Bindungspuffer gelöst, bildet sich aufgrund der negativen Ladung der QDs eine elektrostatisch stabilisierte Schicht bestehend aus den Salzionen, Glukose und BSA des Puffers auf der QD-Oberfläche. Diese beeinflusst maßgeblich die Wanderungsgeschwindigkeit der Nanopartikel im elektrischen Feld der Gelelektrophorese. Zudem sind divalente Mg²⁺-Kationen in dem Bindungspuffer enthalten, die einen Teil der negativen QD-Ladung abschirmen. Dreidimensional gefaltete Aptamere nehmen deutlich mehr Raum ein und behindern die Nanopartikel während ihrer Wanderung durch das Gel. Da die Schicht sehr ungleichmäßig ist, haben die QDs nicht alle die gleiche Geschwindigkeit und es entsteht eine sehr langer verschmierter Streifen anstelle einer klar definierten Bande im Gel. In einem Puffer ohne diese Zusätze können sich die Konjugate deutlich schnell im Gel bewegen.

Die Aptamer-funktionalisierten QD₆₅₅ wurden hinsichtlich ihrer hydrodynamischen Größe und Fluoreszenzeigenschaften charakterisiert. Wie bei allen QD-Konjugaten beobachtet, hatte die Konjugation mit einem Biomolekül keinen Einfluss auf die Floreszenzeigenschaften der QDs, das Emissionsmaximum blieb bei einer Wellenlänge von 655 nm (siehe Abb. 4.4-43 A). Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers mittels DLS-Messung stellte sich im Gegensatz zu allen bisher durchgeführten Messungen als ungeeignet

heraus. Der besseren Vergleichbarkeit wegen wurden alle Proben in dem Bindungspuffer gelöst. Dadurch lagerten sich BSA und Ionen an die hochgeladenen QDs an, was sich in einer sehr heterogenen Größenverteilung mit großen Standardabweichungen widerspiegelt. Die beiden Aptamer-Konjugate zeigen hingegen sehr schmale und reproduzierbare Größenverteilungen, die zudem einen annähernd gleichen Durchmesser von 5 - 6 nm aufweisen.

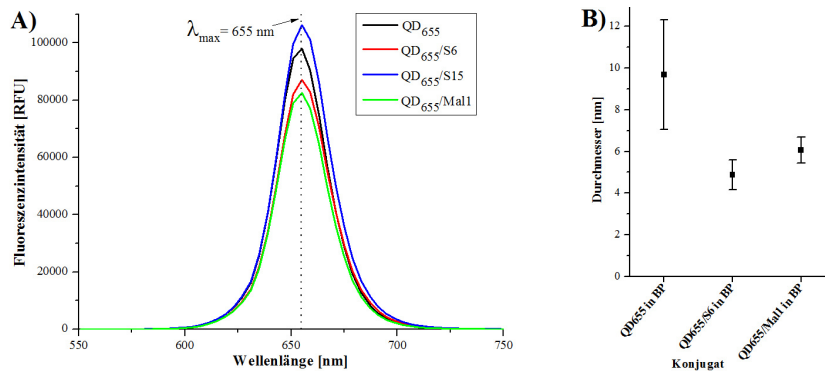


Abb. 4.4-43: Charakterisierung der QD₆₅₅/Aptamer Konjugate bzgl. ihrer Fluoreszenzeigenschaften (A) und hydrodynamischen Größe (B). A) Schwarze Kurve: nicht-funktionalisierte QDs₆₅₅, rote Kurve: QD₆₅₅/S6, blaue Kurve: QD₆₅₅/S15, grüne Kurve: QD₆₅₅/Mal1. Die gepunktete Linie zeigt das Emissionsmaximum der QDs bei 655 nm an. B) Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 Messungen.

4.4.4.2 Zellfärbungen und Mikroskopie

In der Literatur, die die Aptamere S6 und S15 behandelt, ist das genaue Target dieser Biomoleküle nicht beschrieben [156]. Es ist nur angegeben, dass die Aptamere die A-549 Zellen detektieren, aber nicht ob es sich bei dem eigentlichen Target um einen Rezeptor oder ein anderes Oberflächenmolekül handelt. Zudem haben die Autoren anhand von Tissue-Microarrays gezeigt, dass Carboxytetramethylrhodamin-(TAMRA)-markierte Aptamere spezifisch an die Zellmembran binden und nicht unspezifisch in die Zelle eindringen. Daher wurden erste Zellfärbungen an Ethanol-fixierten A-549 und HELA Zellen mit S6 und Mal1-funktionalisierten QD₆₅₅ durchgeführt. Wie bereits für die Antikörper-funktionalisierten Quantum Dots beschrieben (siehe Kapitel 4.4.3.6), führte die Fixierung der Zellen auch hier zu zahlreichen unspezifischen Bindungen, die eine Unterscheidung der Positiv- (A-549) und Negativkontrolle (HELA) unmöglich machten. In Abb. 4.4-44 sind sowohl fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der gefärbten Zellen (A) als auch ein Scan des selben besiedelten und gefärbten Objektträgers (B) unter Einsatz des GenePix 4000B Microarray Scanners (Axon Instruments) gezeigt. Der Scan wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine Detektion der mit QD₆₅₅-Konjugaten gefärbten Zellen auch mit einem Microarray Scanner möglich war. Dieses wäre eine sensitive und sehr exakte Methode zur Quantifizierung der Fluoreszenzsignale gefärbter Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten der fixierten und gefärbten Zellen waren trotz einer nicht-optimalen Anregungswellenlänge sehr

stark und verursachten bereits bei einer Signalverstärkung (gain) von 500 starke und klare Signale. Bei genauer Betrachtung waren sogar einzelne Zellen zu erkennen (C).

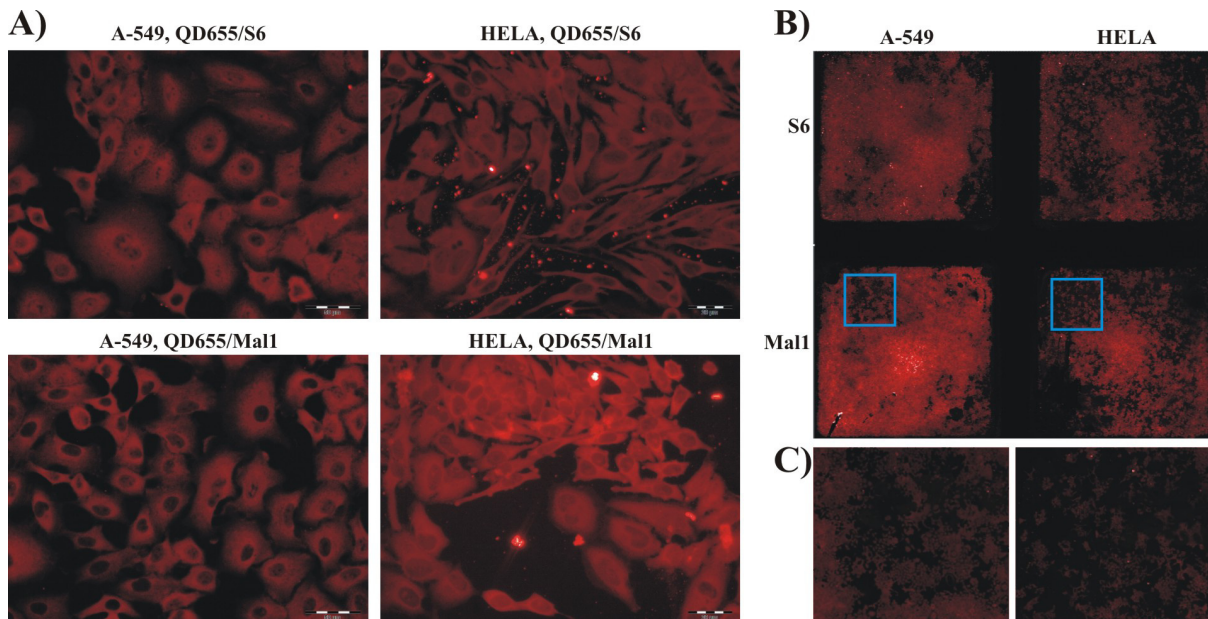


Abb. 4.4-44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (A) und Scans (B, C) von Ethanol-fixierten A-549 (jeweils linke Spalte) und HELA Zellen (jeweils rechte Spalte) gefärbt mit QD₆₅₅/S6 Konjugaten (jeweils obere Zeile) und QD₆₅₅/Mal1 Nanopartikeln (jeweils untere Zeile) für 1 h bei Raumtemperatur. C) zeigt vergrößerten Ausschnitt von B) Mal1 (blaues Rechteck). Der Maßstab zeigt 50 µm.

Da die Färbung fixierter Zellen mit den QD₆₅₅/Aptamer Nanopartikeln zu keiner spezifischen Detektion führte, wurde diese mit nicht-fixierten Zellen auf selbst-hergestellten Lebendzell-Microarrays (siehe Kapitel 4.5) wiederholt.

4.4.4.3 Schlussfolgerungen

Die Identifikation einer Zelllinie erfolgte in dem vorangegangenen Kapitel mit Hilfe zweier Farbstoff-markierter Aptamere, die gegen einen bestimmten Typ von *non-small cell lung cancer* (NSCLC) selektiert waren und auch die Zelllinie A-549 detektieren sollten. Die ausgewählten Aptamere waren zum einen Cyanin 5 (Cy5)-markiert, zum anderen trugen sie eine Amino-Endgruppe, an die erfolgreich die QDs₆₅₅ gebunden wurden. In der Literatur war als Zellnegativkontrolle für das Aptamer u.a. die HELA-Zelllinie genannt. Zusätzlich zu den A-549-spezifischen Aptameren wurden zwei Aptamer-Kontrollen verwendet (S6 Kontrolle Cy5-markiert und Mal1-Kontrolle mit Amino-Endgruppe), die nicht an die Zellen binden sollten. Erste Färbungen von fixierten Zellen waren entgegen den Beschreibungen in der Literatur nicht spezifisch. Daher sollte eine spezifische Zellfärbung mit unfixierten Zellen auf den selbst entwickelten Lebendzell-Microarrays durchgeführt werden.

4.5 Anwendung des neuen Detektionssystems auf den selbst-entwickelten Lebendzell-Microarrays

Zum Abschluss dieser Arbeit wurden entweder die optimierten und auf ihre Spezifität getesteten Antikörper- oder Aptamer-basierten Quantum Dot Nanopartikel auf den selbst-entwickelten Lebendzell-Microarrays angewendet. Hierfür wurden zunächst mit den charakterisierten Zellen (siehe Kapitel 4.2.3) Lebendzell-Microarrays unter Verwendung des optimierten Protokolls angefertigt (siehe Kapitel 4.1.6). Als Oberflächenmaterial wurden hier unbeschichtete Glasobjektträger eingesetzt, die wegen ihrer besseren optischen Eigenschaften eine geringe Autofluoreszenz und geringe Lichtstreuung hervorrufen. Als Folge dessen können klare und scharfe Bilder angefertigt werden können. Die immobilisierte Zellzahl betrug, wenn nicht anders beschrieben, 600 Zellen. Diese wurden für drei Tage kultiviert, bevor sie mit den Konjugaten angefärbt wurden. In Kapitel 4.4.4.2 wurden die gefärbten Zellen zum ersten Mal nicht nur mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert, sondern auch mit Hilfe eines Microarray-Scanners abgebildet. Wäre dieses auch auf die Färbung nicht fixierter Zellen übertragbar, könnte eine sehr spezifische und sensitive Quantifizierungsmethode positiv-getesteter Zellen zur Verfügung stehen.

Der besseren Vergleichbarkeit wegen, wurden zunächst A-549 Zellen spezifisch unter Verwendung des Cyanin 5 (Cy5)-markierten Aptamers S15 detektiert. Als Negativkontrolle dienten das Cy5-markierte Random Aptamer S6 Kontrolle1 und die HELA-Zelllinie. Da die Zellen bei der Herstellung der Lebendzell-Microarrays einem erhöhten Stress ausgesetzt waren, wurde ihre Vitalität anhand einer Calcein-AM Kontrollfärbung auf dem gleichen Microarray nachgewiesen. Die Microarrays wurden nach der Färbung getrocknet und bei einer Signalverstärkung von gain 300 (im roten Kanal, $\lambda_{\text{EX}}=635\text{nm}$) sowie gain 400 (im grünen Kanal, $\lambda_{\text{EX}}=532\text{nm}$) gescannt. Das Ergebnis ist in Abb. 4.5-1 gezeigt. Es wird sehr gut die schöne Spotmorphologie und hohe Vitalität beider Zelllinien durch die starke grüne Fluoreszenz angezeigt (linke Spalte) und es sind deutliche Unterschiede zwischen den Positiv- und Negativkontrollen erkennbar (mittlere und rechte Spalte). Die HELA Zellen wurden hierbei von beiden Aptameren gleich schwach angefärbt (untere Zeile), wohingegen die A-549 Zellen von dem S15 Aptamer weitaus stärker gefärbt wurden (obere Zeile Mitte).

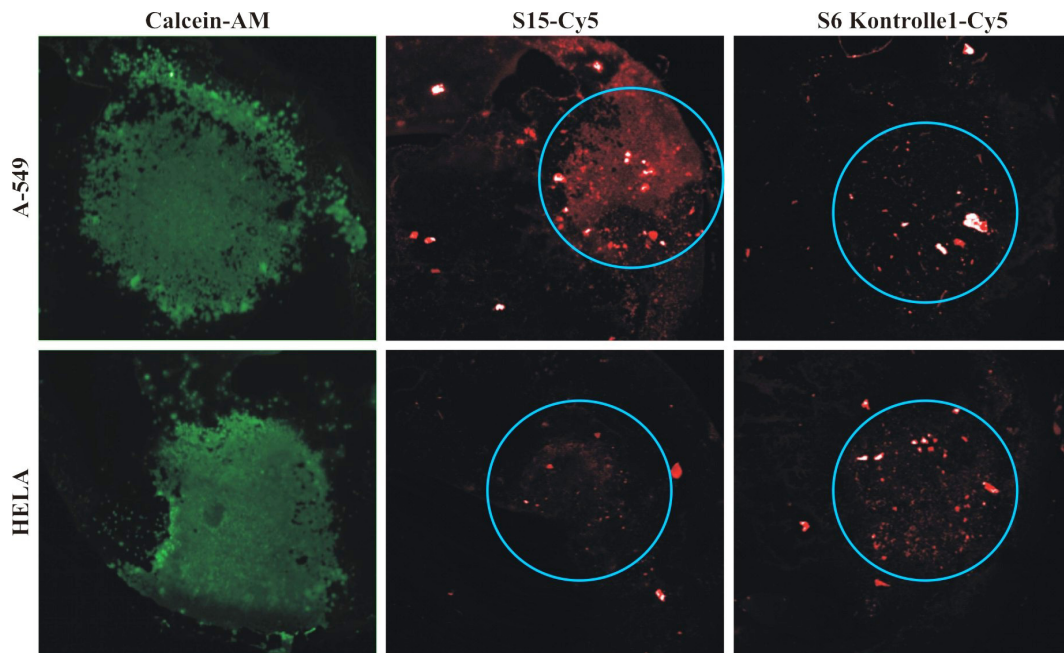


Abb. 4.5-1: Scans der angefertigten Lebendzell-Microarrays von A-549 (obere Zeile) und HELA Zellen (untere Zeile) angefärbt mit Calcein-AM (linke Spalte), um die Vitalität der Zellen anzuzeigen, S15-Cy5 (mittlere Spalte) für die spezifische Detektion von A-549 Zellen und S6 Kontrolle1-Cy5 als Negativkontrolle (rechte Spalte) für 1 h. Die Bereiche der Zellsots sind mit blauen Kreisen markiert.

Die erfolgreiche spezifische Detektion der A-549 Zellen mit Hilfe von Aptameren wurde auf die QD₆₅₅/Aptamer Konjugate übertragen. Hierbei wurden Fluoreszenzmikroskopaufnahmen angefertigt. Diese zeigen in Abb. 4.5-2 bei gleicher Konzentration (100 nM) eine mit den Cy5-markierten Aptameren vergleichbare spezifische Detektion von A-549 Zellen (A) und keine unspezifischen Bindungen der Aptamer-Negativkontrolle (QD₆₅₅/Mal1, B und D) sowie der Zell-Negativkontrolle (HELA, C).

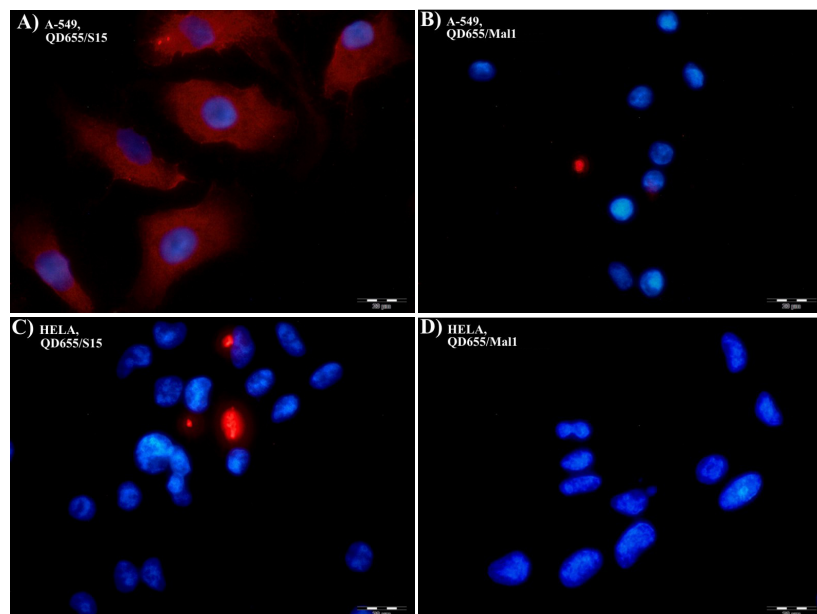


Abb. 4.5-2: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen der angefertigten Lebendzell-Microarrays von A-549 (A, B) und HELA Zellen (C, D) gefärbt mit QD₆₅₅/S15 Konjugaten (A, C) und QD₆₅₅/Mal1 Nanopartikeln (B, D) für 1 h. Rot: QD₆₅₅/Aptamer Konjugate, blau: DAPI-Zellkernfärbung. Der Maßstab zeigt 20 µm.

In Kapitel 4.4.4.2 konnten fixierte und mit QD₆₅₅/Aptamer Nanopartikeln gefärbte Zellen mittels Microarray-Scanner abgebildet werden. Um zu überprüfen, ob dieses auch mit nicht fixierten Zellen möglich war, wurden A-549 und NIH-3T3 Zellen (jeweils 1.200 Zellen) auf einem Lebendzell-Microarray kultiviert, jeweils ein Well mit Ethanol fixiert und alle Zellproben mit QD₆₅₅/anti-EGFR angefärbt. Trotz der hohen Fluoreszenzintensität der QD₆₅₅/Antikörper Konjugate war die Signalstärke für den Microarray-Scanner zu schwach. Die fixierten Zellen wurden wie oben bereits erwähnt problemlos dargestellt (Abb. 4.5-3 A, C), die nicht-fixierten EGFR-positiven A-549 Zellen waren jedoch nicht zu erkennen (B). Somit konnte eine Quantifizierung der Signalstärken einer Zellfärbung nicht mittels Microarray-Scanner erfolgen. Dieses galt auch für die um ein vielfaches schwächeren Fluoreszenzsignale der TGA-QD₅₆₀/Antikörper Konjugate aus Kapitel 4.4.2.4 (Daten nicht gezeigt).

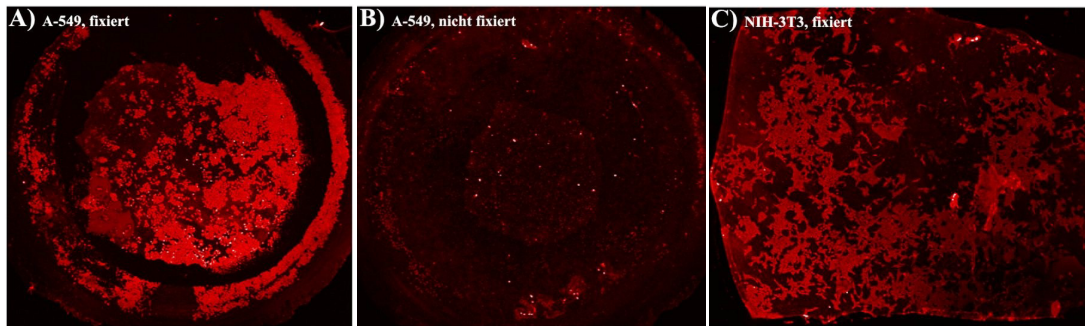


Abb. 4.5-3: Scans der angefertigten fixierten (A, C) und nicht fixierten (B) Lebendzell-Microarrays von A-549 (A, B) und NIH-3T3 Zellen (C) angefärbt mit QD₆₅₅/anti-EGFR.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die gefärbten Lebendzell-Microarrays nur anhand von Fluoreszenzmikroskopaufnahmen ausgewertet. Die Spezifität der QD₆₅₅/Antikörper Konjugate wurde bereits in Kapitel 4.4.3.6 veranschaulicht, gleiches gilt für die TGA-QD₅₆₀/anti-HER2* Nanopartikel in Kapitel 4.4.2.4. Daher wird an dieser Stelle nur die Anwendung der Konjugate auf den hergestellten Lebendzell-Microarrays gezeigt.

HER-2/neu: In Abb. 4.5-4 zeigen die Fluoreszenzmikroskopaufnahmen, dass die anti-HER2*-funktionalisierten Nanopartikel (TGA-QD₅₆₀ und QD₆₅₅) spezifisch an die Zellmembran der Rezeptor-positiven Zellen [A-549 (A), CACO-2 (B), HELA (C), HEP-G2 (D) und ucMSC (E)] banden und über Rezeptor-initiierte Endozytose in die Zellen gelangten. HER-2-negative Zellen (NIH-3T3, F) wurden nicht angefärbt.

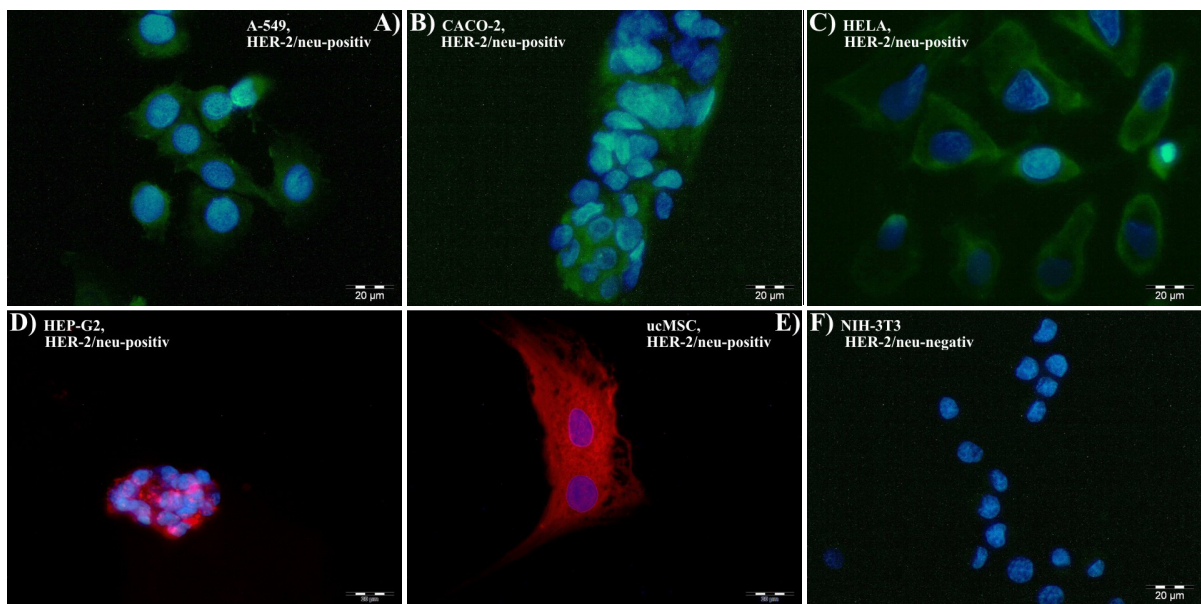


Abb. 4.5-4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HER-2/neu-positiven Zellen (A-E) und Rezeptor-negativen NIH-3T3 Zellen (F) angefärbt mit anti-HER2* Konjugaten der TGA-QD₅₆₀ und QD₆₅₅ Nanopartikel für 2 h. Bei den Rezeptor-exprimierenden Zellen handelt es sich um die Modellzelllinie A-549 (A), drei weitere Krebszelllinien CACO-2 (B), HELA (C) und HEP-G2 (D) und Primärzellen aus der Nabelschnur (E). Grün: TGA-QD₅₆₀/anti-HER2*, rot: QD₆₅₅/anti-HER2*, blau: DAPI-Zellkernfärbung. Der Maßstab zeigt 20 µm.

FOLR1: Die meisten Zellen wurden als negativ für den Folsäure-Rezeptor 1 getestet (siehe Kapitel 4.2.3), dieses spiegelte sich auch in Abb. 4.5-5 wieder. Mit Ausnahme der FOLR1-positiven HELA Zellen (A) wurden neben den Rezeptor-negativen A-549 Zellen (Abb. 4.4-36) auch die immobilisierten HEP-G2 (B) und Primärzellen aus der Nabelschnur (ucMSC, C) von den anti-FOLR1-funktionalisierten Nanopartikeln nicht angefärbt. Dieser Zellmembranmarker ist für erfolgreiche Zelldiskriminierungen somit gut geeignet, da er nur von wenigen Zellen exprimiert wird und somit zellspezifisch ist.

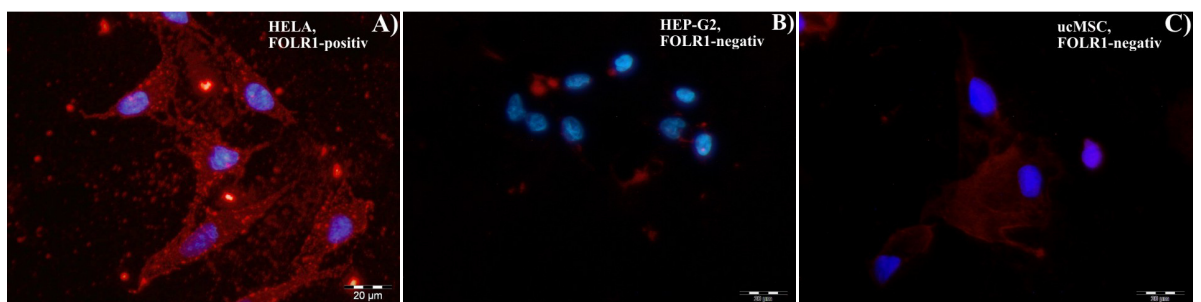


Abb. 4.5-5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von FOLR1-positiven HELA Zellen (A) und Rezeptor-negativen HEP-G2 (B) und Primärzellen aus der Nabelschnur (C) angefärbt mit QD₆₅₅/anti-FOLR1 Konjugaten für 2 h. Rot: QD₆₅₅/anti-FOLR1, blau: DAPI-Zellkernfärbung. Der Maßstab zeigt 20 µm.

EpCAM: Der dritte untersuchte Proteinmarker ist das Epithelzelladhäsionsmolekül, auf das die Hälfte der ausgewählten Zellen negativ getestet wurde und das somit auch für eine erste Zelldiskriminierung verwendet werden konnte. Auch die QD₆₅₅-Konjugate dieses Antikörpers zeigten eine entsprechende Spezifität, wie in Abb. 4.5-6 aufgezeigt wird.

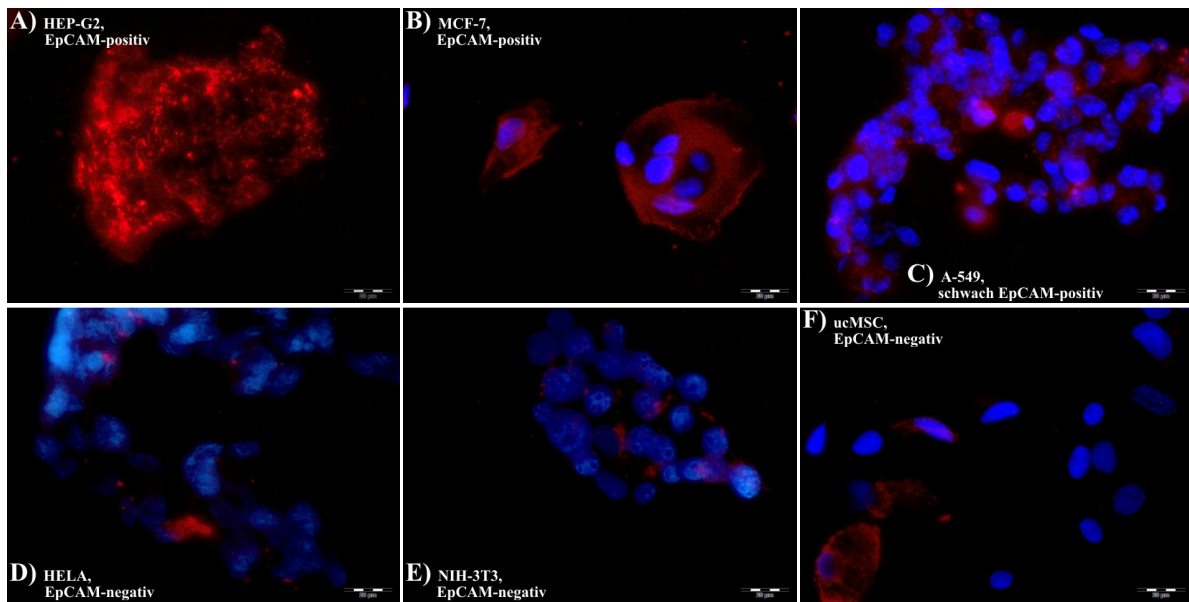


Abb. 4.5-6: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von EpCAM-positiven HEP-G2 (A) und MCF-7 Zellen (B), sowie schwach positiven A-549 Zellen (C) und Rezeptor-negativen HELA (D), NIH-3T3 (E) und Primärzellen aus der Nabelschnur (F) angefärbt mit QD₆₅₅/anti-EpCAM Konjugaten für 2 h. Rot: QD₆₅₅/anti-EpCAM, blau: DAPI-Zellkernfärbung. Der Maßstab zeigt 20 µm.

Zu den Vorteilen der Microarray-Technologie zählt u.a. die Analyse verschiedener Komponenten einer Probe, wie es z.B. bei der Fluoreszenz-basierten Detektion verschiedener Proteine einer Tissue-Microarray Gewebeprobe der Fall ist. Ein erster Versuch einer solchen Multiplex-Färbung wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die Zellen der Lebendzell-Microarrays wurden hierbei zum einen mit QD₆₅₅/anti-EGFR und zum anderen mit TGA-QD₅₆₀/anti-EpCAM gefärbt. Auch hier zeigte sich die Spezifität der Nanopartikel (siehe Abb. 4.5-7). Zudem war erkennbar, dass sich die verschiedenen Nanopartikel nicht in ihrer Spezifität beeinflussten oder behinderten, da nur die jeweiligen Rezeptor-positiven Zellen angefärbt wurden. Es wurde eine Zelllinie verwendet, die beide Rezeptoren exprimiert (HEP-G2, 1. Reihe) und eine, die beide Rezeptoren nicht exprimiert (NIH-3T3, 2. Reihe). Weiterhin exprimierte eine Zelllinie den einen Rezeptor stark und den anderen nur schwach (A-549, 3. Reihe). Diese drei konnten anhand der Fluoreszenzaufnahmen unterschieden werden. Eine Diskriminierung von HELA (4. Reihe) und den Primärzellen (5. Reihe) war hingegen nicht möglich, da beide EGFR exprimieren, EpCAM jedoch nicht.

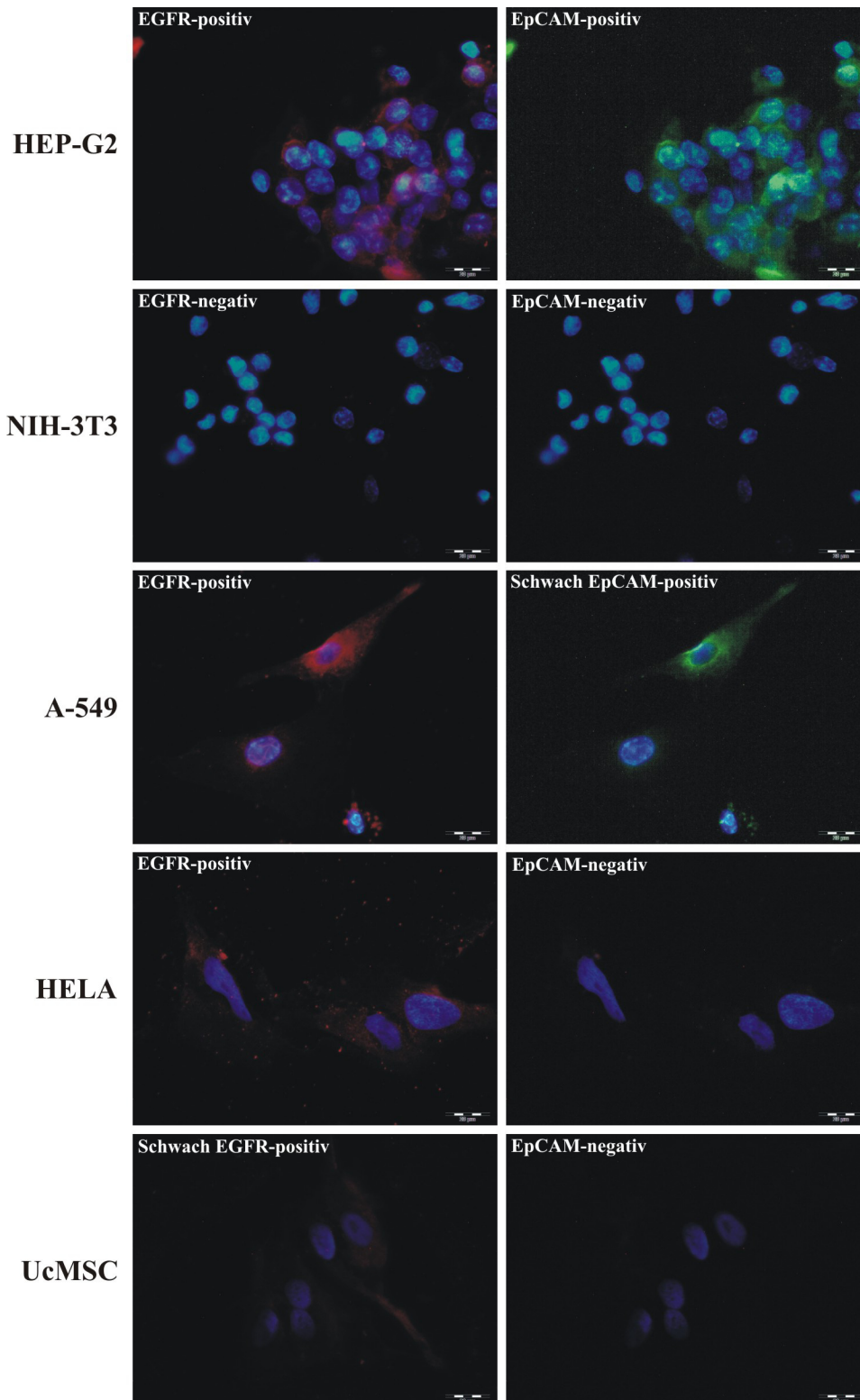


Abb. 4.5-7: Zelldiskriminierung anhand von zwei Zellmembran-Biomarkern: EGFR (linke Spalte) und EpCAM (rechte Spalte). 3 (HEP-G2, NIH-3T3, A-549) von 5 Zelllinien/Primärzellen sind so unterscheidbar. Rot: QD₆₅₅/anti-EGFR, grün: TGA-QD₅₆₀/anti-EpCAM, blau: DAPI-Zellkernfärbung. Der Maßstab zeigt 20 µm.

Eine solche Multiplex-Färbung könnte mit anderen Detektionsmolekülen wiederholt werden, um eine klare Diskriminierung der Zellen zu erzielen. Hierfür könnte u.a. auch ein Antikörper gegen den Folsäure Rezeptor 1 oder ein gegen einen Zelltyp gerichtetes Aptamer, wie z.B. S6 oder S15 (gegen A-549) dienen. Insgesamt sind die in dieser Arbeit etablierten

Lebendzell-Microarrays eine vielversprechende Plattform für die Detektion oder Stimulierung von Zellen, wenn wenig Zellmaterial zur Verfügung steht. Weiterhin sind die mit einem Zelldetektionsmolekül modifizierten Quantum Dots auch auf dieser Plattform spezifisch anwendbar, wobei nur geringe Volumina für die Detektionen benötigt werden. Sowohl Antikörper als auch Aptamere sind sehr gut geeignet, die Zellen auf einem Lebendzell-Microarray zu unterscheiden. Die verwendeten Quantum Dots wurden mit Hilfe dieser Detektionsmoleküle ganz gezielt in ausgewählte Zellen eingeschleust und können somit auch als Trägermaterialien für Wirkstofftransporte eingesetzt werden. Der große Vorteil der Lebendzell-Microarrays ist ihre Einsatzmöglichkeit in Zellstimulationsstudien und bei der Untersuchung und Aufklärung von Zellantworten und Signalkaskaden. Beide in dieser Arbeit etablierten Systeme haben somit ein breites Anwendungsgebiet und besitzen ein großes Potenzial, in der Diagnostik sowie Zellstimulation angewendet zu werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines durch das BMBF (Förderkennzeichen: TUR 09/I25 und 01DL12013) und TÜBITAK geförderten Verbundprojektes des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover und dem Biochemischen Department der Ege Universität, Izmir, Türkei angefertigt. Das Ziel dieser Arbeit war der Aufbau eines miniaturisierten zellulären Microarray-basierten Testsystems, das für den Nachweis von Krebszellen mittels zellspezifischer fluoreszenzmarkierter Detektionsmoleküle verwendet werden sollte.

Dazu wurde eine Zellimmobilisierungsstrategie für die Anfertigung von Lebendzell-Microarrays entwickelt, optimiert und bis zum reproduzierbaren Einsatz validiert, die auf dem Prinzip des kontaktfreien Spottens basierte (Kapitel 4.1). Das Druckverfahren wurde zunächst mit Hilfe EGFP-produzierender Bakterien und Säugetierzellen auf seine Eignung für die Herstellung von Lebendzell-Microarrays getestet. Basierend hierauf wurde der Druckprozess von lebenden Zellkulturen und ihre Kultivierung über mehrere Tage an einer Modellzelllinie (A-549, Lungenkrebszelllinie) optimiert. Neben verschiedenen Druckparametern wurden Oberflächen mit unterschiedlichen Eigenschaften getestet. Mit Hilfe der A-549 Modellzelllinie konnte erfolgreich eine reproduzierbare und sterile Druckmethode etabliert werden, die eine Zellvitalität von knapp 80 % (bei einem Spotvolumen von 0,6 μL \equiv 1600 Tropfen) zeigte. Ein Inkubationskammersystem wurde für den *high-throughput* Einsatz der Microarrays entwickelt. Die optimierte Immobilisierungsstrategie konnte zudem auf andere humane Krebszelllinien und Primärzellen aus der Nabelschnur übertragen werden. Das Wachstum der auf diese Weise immobilisierten Zellen war mit dem Zellverhalten in Standard-96-Well Platten absolut vergleichbar, sodass die generelle Anwendbarkeit dieser Methode erfolgreich demonstriert werden konnte.

Die auf den Lebendzell-Microarrays gedruckten und kultivierten Zellen sollten im Verlauf der Arbeit zuverlässig voneinander unterschieden werden. Um dieses zu ermöglichen, musste ein zellspezifisches Detektionssystem etabliert werden. Für die Detektion wurde ein Antikörper-basierter Assay gewählt, der auf dem Nachweis dreier Biomarker (HER-2/neu, FOLR1 und EpCAM) beruhte, welche auf der Oberfläche von Krebszellen überexprimiert vorliegen. Als sensitive Detektionsmethode wurde eine Fluoreszenz-Markierung der zellspezifisch bindenden Antikörper verwendet. Aufgrund ihrer optimalen optischen Eigenschaften wurden halbleitende anorganische Nanopartikel, so genannte Quantum Dots (QDs) eingesetzt, um die Liganden mit einer Farbmarkierung zu versehen. Um die Spezifität

der späteren Fluoreszenz-Detektion nachzuweisen, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Zellen zunächst hinsichtlich ihrer Expression der drei Biomarker charakterisiert (Kapitel 4.2). Die Charakterisierung erfolgte zum einen mittels PCR, in der die Transkription der entsprechenden Gene nachgewiesen wurde. Zum anderen wurde die Proteinexpression mit Hilfe einer Antikörper-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Detektion untersucht. Bei einem Vergleich dieser beiden sehr sensitiven und spezifischen Nachweismethoden wurde deutlich, dass eine Charakterisierung der Zellen ausschließlich auf mRNA-Ebene oder Protein-Ebene nur unzureichend war. In der Literatur ist diese Problematik vielfach beschrieben und macht die unterschiedlichen mRNA- und Protein-Stabilitäten deutlich. Ein hohes Expressionslevel von HER2/neu in A-549 Zellen, von FOLR1 in HELA Zellen und von EpCAM in HEP-G2 Zellen konnte eindeutig nachgewiesen werden.

Da alle *humanen* Zelllinien für den HER2/neu-Rezeptor positiv getestet wurden, wurde als zelluläre Negativkontrolle auf die *murine* Zelllinie NIH-3T3 zurückgegriffen. Diese war aufgrund ihrer Herkunft für das humane HER2/neu eindeutig negativ. Da sie jedoch das *murine* HER2/neu exprimierte, erfolgte die Antikörperauswahl sehr sorgfältig. Auch für die zwei anderen Biomarker wurden so geeignete zelluläre Negativkontrollen gefunden (A-549 Zellen als FOLR1-negativ, HELA Zellen als EpCAM-negativ). Diese Zelllinien wurden somit in den weiteren Studien zur Zelldiskriminierung als Positiv- bzw. Negativkontrollen verwendet.

Das Unterscheiden von Zellen kann aber nicht nur mit Hilfe einer Antikörper-basierten Färbung erfolgen. Auch schon bei der Bindung adhärenter Zellen auf einer Oberfläche ist eine Diskriminierung der Zellen möglich. Durch gezielte Modifikation dieser Oberfläche, z.B. mit Biomolekülen, können nur bestimmte Zellen an der Oberfläche binden oder besser auf dieser wachsen. Als Beispiel für diese Oberflächenstrukturen wurde eine Folsäure-modifizierte Tonerde als Substrat gewählt und mit nicht funktionalisierter Tonerde verglichen (Kapitel 4.3). Mit Hilfe eines Modell-Zelllinienpaares, das als FOLR1-negativ (A-549) und FOLR1-positiv (HELA) charakterisiert wurde, konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Oberflächenmodifikationen Zellen selektiv diskriminieren können. Um die allgemeine Anwendbarkeit dieses Systems zu demonstrieren, wurde es zusätzlich erfolgreich auf ein anderes Zelllinienpaar (HEP-G2, NIH-3T3) übertragen. Rezeptor-exprimierende Zellen adhärten deutlich besser und zeigten ein gutes Proliferationsverhalten auf Folsäure-modifizierter Tonerde, wohingegen Rezeptor-negative Zellen nur eine schwache Bindung und Proliferation zeigten. Die Folsäure-modifizierte Tonerde stellte somit ein gutes Beispiel

eines Rezeptor-bindenden Zellkultursubstrates dar. Nach einer weiteren Optimierung der Beschichtungsmethode, um noch gleichmäßigere Oberflächenschichten zu erzeugen und die Reproduzierbarkeit weiter zu verbessern, wäre eine Anwendung der Oberfläche zur Beschichtung von Lebendzell-Microarrays möglich.

Als Fluoreszenz-Markierung der zellspezifisch bindenden Detektionsmoleküle wurden Quantum Dots verwendet. Diese werden in organischer Phase mit großer Stabilität und hohen Photolumineszenzen hergestellt, müssen dann aber noch mit hydrophilen Oberflächengruppen versehen werden, damit Zellen gefärbt werden können. Sie können prinzipiell auch in wässriger Phase synthetisiert werden, zeigen hierbei aber häufiger Instabilitäten und niedrigere Fluoreszenzintensitäten. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Kern/Hülle Quantum Dots für die Funktionalisierung mit Biomolekülen (hier Antikörpern) verwendet: 1. Nanopartikel mit hydrophoben Oberflächengruppen (HDA-QD₅₆₀), 2. Nanopartikel mit einer zusätzlichen Polymerbeschichtung mit hydrophilen Endgruppen (QD₆₅₅), 3. in wässriger Phase synthetisierte Nanopartikel (TGA-QD₅₆₀). Die Funktionalisierung aller Quantum Dots mit den Antikörpern war erfolgreich (Kapitel 4.4). Im Fall der hydrophoben HDA-QD₅₆₀ erfolgte diese erst nach einem Ligandenaustausch der hydrophoben Oberflächengruppen mit einem hydrophilen Dendrimer. Die resultierenden Konjugate wurden ausführlich charakterisiert und waren aufgrund ihrer hohen Spezifität, geringen Toxizität und hohen Stabilität eine sehr gut geeignete Alternative zu herkömmlichen organischen Farbstoff-Konjugaten in der Zelldetektion.

Obwohl die in wässriger Phase synthetisierten TGA-QD₅₆₀/Antikörper Konjugate eine höhere Toxizität und Instabilität zeigten, konnten sie ebenso wie die nicht-toxischen Polymerbeschichteten QD₆₅₅/Antikörper Konjugate erfolgreich auf den selbst entwickelten Lebendzell-Microarrays eingesetzt werden (Kapitel 4.5).

Zusätzlich wurden Zellfärbungsstudien durchgeführt, die auf farbstoffmarkierten Aptameren basierten (Kapitel 4.4.4). Diese waren gegen einen bestimmten Typ von *non-small cell lung cancer* (NSCLC) selektiert worden und sollten auch die Zelllinie A-549 detektieren. Die ausgewählten Aptamere (S6 und S15) waren zum einen Cyanin 5 (Cy5)-markiert, zum anderen trugen sie eine Amino-Endgruppe, an die erfolgreich die zuvor verwendeten Polymerbeschichteten QD₆₅₅ gebunden wurden. Als zelluläre Negativkontrolle für das Aptamer wurde die in der Literatur genannte HELA-Zelllinie bestätigt. Aptamere, die mit einem organischen Cy5-Farbstoff markiert oder an die QD₆₅₅ gekoppelt waren, banden nicht an diese Zellen. Zusätzlich wurden zwei Aptamer-Kontrollen gefunden (S6 Kontrolle1 Cy5-

markiert und Mal1-Kontrolle mit Amino-Endgruppe), die an beide Zelllinien nicht banden. Auf den Lebendzell-Microarrays konnte dadurch die Spezifität der Aptamere durch den Einsatz einer positiven und negativen Zelllinie demonstriert werden (Kapitel 4.5). Die Spezifität wurde ebenfalls unter Verwendung von Aptamer-Negativkontrollen erfolgreich aufgezeigt.

Der Vorteil der Microarray-Technologie ist unabhängig von ihrem Einsatzgebiet die enorme Probenanzahl, die gleichzeitig unter identischen Bedingungen untersucht werden kann. Hierzu zählt auch die Analyse verschiedener Komponenten einer Probe, wie es z.B. bei der fluoreszenzbasierten Detektion verschiedener Proteine einer Tissue-Microarray Gewebeprobe der Fall ist. Ein erstes solches Multiplexing wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt (Kapitel 4.5). Um eine noch deutlichere Diskriminierung der Zellen zu erzielen, könnte der Multiplexing-Grad noch weiter gesteigert werden, indem eine größere Anzahl Proteine detektiert werden. Ebenso könnte eine Kombination anderer Detektionsmoleküle verwendet werden. Hierfür könnte u.a. auch ein Antikörper gegen den Folsäure Rezeptor 1 oder ein gegen einen Zelltyp gerichtetes Aptamer, wie z.B. S6 oder S15 (gegen A-549) dienen.

Insgesamt sind die in dieser Arbeit etablierten Lebendzell-Microarrays eine äußerst vielversprechende Plattform für die Detektion oder Stimulierung von Zellen, wenn nur wenig Zellmaterial zur Verfügung steht. Weiterhin sind die mit einem Zelldetektionsmolekül modifizierten Quantum Dots auch auf den Zellarrays spezifisch anwendbar, wobei nur geringe Volumina für die Detektionen benötigt werden. Eine weitere Erhöhung der Zellprobenanzahl wäre durch eine Verkleinerung der Vertiefungen in der Inkubationskammer problemlos möglich. Ein Drucken verschiedener Zelllinien in eine Vertiefung wurde bereits durchgeführt, wobei die Zellen jedoch nur sehr kurz weiterkultiviert werden können, bevor sie ineinander wachsen. Wird der Microarray nur für eine kurzweilige Detektion oder Stimulation verwendet, ist das etablierte System sehr gut geeignet. Für eine längere Stimulation wäre z.B. eine Gel-Verkapselung denkbar, wie sie in Kapitel 3.1.3 vorgestellt wurde, welche bereits im Institut für Technische Chemie etabliert ist und auf die Lebendzell-Microarrays übertragen werden könnte. Das in dieser Arbeit etablierte zelluläre Testsystem sowie der Quantum Dot-basierte Detektionsassay besitzen ein großes Potenzial, in der Diagnostik sowie Zellstimulation angewendet zu werden.

6 Anhang

6.1 Material

6.1.1 *E. coli* Stämme und eukaryotische Zellen

Es werden die *E. coli* Stämme XL1-Blue und BL21 (DE3) verwendet. Die Genotypen und Erklärung der genetischen Marker von *E. coli* Stämmen wurden der Promega Website entnommen¹⁸. Der XL1-Blue Stamm verfügt über eine Mutation, die die Rekombination eingefügender DNA in die Wirts-DNA minimiert und die Stabilität des Inserts erhöht (*recA1*), weshalb er für die Plasmidamplifikation verwendet wird. Zudem ist bei diesem Stamm die Isolation einer hoch-qualitativen Plasmid-DNA möglich (*endA1*) und die Spaltung transformierter DNA durch endogene Restriktionsendonukleasen ist ausgeschaltet (*hsdR17* (*r_K-*, *m_K+*)). Genetische Marker: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(*r_K-*, *m_K+*), *supE44*, *relA1*, *lac*, [F', *proAB*, *lacI^qΔM15::Tn10(tet^r)*].

Der BL21 (DE3) Stamm wird hier zur Expression des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) eingesetzt, da er eine reduzierte Proteolyse rekombinant gebildeter Proteine zeigt (*ompT*) und für eine high-level Proteinexpression mit einfacher Induzierung des T7 RNA Polymerase Expressionssystems (DE3) geeignet ist. Genetische Marker: F⁻, *ompT*, *hsdS_B*(*r_B-*, *m_B-*), *dcm*, *gal*, λ (DE3).

Alle während der Erstellung dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben. Die folgenden allgemeinen Beschreibungen der Zelllinien stammen von der Website der DSMZ¹⁹.

A-549 (humane Lungenkarzinomzelllinie, DSMZ-Nr. ACC-107):

Es handelt sich bei dieser Zelllinie um immortale Zellen eines Lungenkarzinoms, das 1972 einem 58-jährigen hellhäutigen Mann entnommen wurde. Diese humanen epithelialen Zellen (siehe Abb. 6.1-1) wachsen adhärent als einfache Schicht und besitzen eine Verdopplungszeit von ca. 40 h. Sie werden alle 3 - 4 Tage mit Trypsin/EDTA abgelöst, vereinzelt und im Verhältnis 1:10 geteilt. Laut DSMZ sind sie immunologisch folgendermaßen charakterisiert: cytokeratin +, cytokeratin-7 +, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 +, cytokeratin-19 +, desmin -, endothel -, EpCAM -, GFAP -, neurofilament -, vimentin +.

Kulturmedium: DMEM-Flüssigmedium, 10 % FKS (v/v), 1 % P/S (v/v).

¹⁸ <https://www.promega.de/Resources/technical-reference>

¹⁹ <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animal-cell-lines.html>

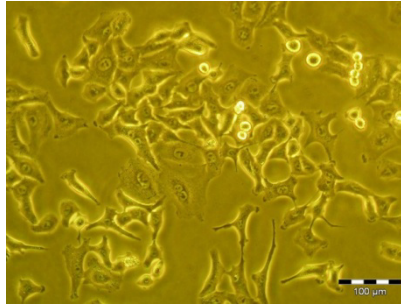


Abb. 6.1-1: Mikroskopaufnahme einer A-549 Kultur.

CACO-2 (humane Darmkrebszelllinie, DSMZ-Nr. ACC-169):

Diese epithelialen immortalen Zellen wurden aus einem primären Darmtumor (Adenokarzinom) etabliert, der 1974 einem 72-jährigen hellhäutigen Mann entnommen wurde. Sie wachsen adhärent, bilden aber Kolonien. Aufgrund ihrer Verdopplungszeit von ca. 80 h wachsen sie sehr langsam und werden im Verhältnis 1:5 geteilt. Um eine zu lange Trypsinierung und somit abnehmende Vitalität zu vermeiden, muss die Kultur geteilt werden, bevor sie Konfluenz erreicht. Zudem wird für die Ablösung und Vereinzelung der Zellen Accutase verwendet, das die Zellmembran nicht so stark angreift und schädigt wie Trypsin, da es eine Mischung verschiedener proteolytischer und kollagenolytischer Enzyme ist. Diese Zelllinie wurde immunologisch als cytokeratin +, cyto-keratin-7 -, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 +, cytokeratin-19 +, desmin -, endothel -, EpCAM +, GFAP -, neurofilament -, vimentin - charakterisiert.

Kulturmedium: MEM-Flüssigmedium, 20 % FKS (v/v), 1 % P/S (v/v).

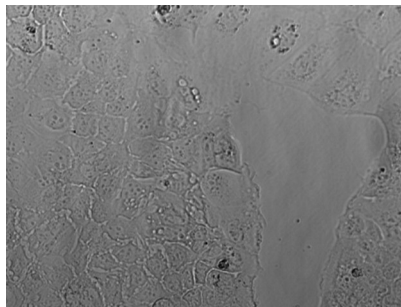


Abb. 6.1-2: Mikroskopaufnahme einer CACO-2 Kultur²⁰.

CHO-Suspensionszellen (Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters):

Die in dieser Arbeit verwendeten CHO-Suspensionszellen sind an das serumfreie Wachstum in Suspension adaptierte Subklone der adhärennten *chinese hamster ovary* Zelllinie, die aus der Biopsie eines erwachsenen Chinesischen Hamsters von 1957 etabliert wurde. Diese

²⁰ http://www.dsmz.de/fileadmin/downloads/ACC/cells_in_culture/CACO-2_Bild_1.jpg

Zellen werden am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover als Produktionszellen für Wachstumsfaktoren und andere Proteine kultiviert.

Kulturmedium: 138,15 g ProCHO5-Pulver, 10 mL Insulin, 3,5 mL Lipidos, 10,5 g Natriumhydrogencarbonat, 100 mL L-Glutamin (100x), 50 mL Glycin, 50 mL P/S auf 5 L dH₂O.

HEK-293 (humane embryonale Nierenzellen, DSMZ-Nr. ACC 305):

Bei der HEK-293 Zelllinie handelt es sich um Zellen einer humanen embryonalen Niere, die mit einem Adenovirus Typ 5 transfeziert wurden, aber keine aktiven Viren produzieren. Die adhärennten fibroblastoiden Zellen wachsen in einfachen Schichten und besitzen eine Verdopplungszeit von 24 - 30 h, weshalb sie bereits nach 2 Tagen in einem Verhältnis von 1:10 geteilt werden müssen. Das Passagieren erfolgt in diesem Fall nicht enzymatisch. Die Zellen können durch kräftiges Klopfen von der Kulturflaschenoberfläche abgelöst werden.

Kulturmedium: DMEM-Flüssigmedium, 10 % FKS (v/v), 1 % P/S (v/v).

HELA (humane Gebärmutterhalskrebszelllinie, DSMZ-Nr. ACC-57):

Diese Zelllinie eines Gebärmutterhalskarzinoms war die erste kontinuierlich kultivierte immortale Zelllinie. Das epitheloide Karzinom wurde 1951 einer 31-jährigen dunkelhäutigen Frau entnommen, die spätere Diagnose lautete Adenokarzinom. Diese Zelllinie ist mit Papillomaviren Typ 18 (HPV-18) infiziert, wobei eine Aktivierung und Übertragung der Viren während der Arbeit mit den Zellen als unwahrscheinlich gilt. Diese epithel-ähnlichen Zellen wachsen in einfachen Schichten, Verdopplungszeit ca. 48 h. Alle 3 - 4 Tage werden sie mit Trypsin/EDTA abgelöst, vereinzelt und im Verhältnis 1:10 geteilt. Sie sind immunologisch beschrieben als: cytokeratin +, cytokeratin-7 +, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 +, cytokeratin-18 +, cytokeratin-19 +, desmin -, endothel -, EpCAM -, GFAP -, HMB-45 -, neurofilament -, vimentin +.

Kulturmedium: DMEM-Flüssigmedium, 10 % FKS (v/v), 1 % P/S (v/v).

HEP-G2 (humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie, DSMZ-Nr. ACC-180):

Die Zellen wurden aus dem 1975 entnommenen Tumorgewebe (hepatozelluläres Karzinom) eines 15-jährigen argentinischen Jungen etabliert. Diese Zelllinie ist patentiert und produziert eine Vielzahl von Proteinen. Es handelt sich um adhärennt und epithel-ähnlich wachsende Zellen, die Aggregate bilden und eine Verdopplungszeit von 50 - 60 h zeigen. Sie werden alle 3 - 6 Tage mit Trypsin/EDTA abgelöst und in einem Verhältnis von 1:5 geteilt.

Sie sind beschrieben als cytokeratin +, cytokeratin-7 -, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 +, cytokeratin-19 +, desmin -, endothel -, EpCAM +, GFAP -, neurofilament-, vimentin -. Da sie EpCAM-positiv sind, werden sie in dieser Arbeit als Positivkontrolle für dieses Zellmembranprotein verwendet.

Kulturmedium: DMEM-Flüssigmedium, 10 % FKS (v/v), 1 % P/S (v/v).

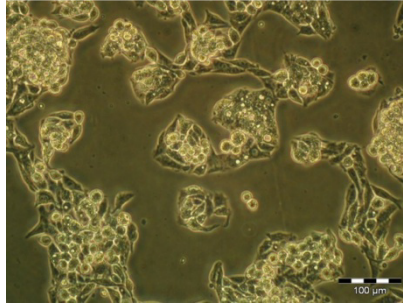


Abb. 6.1-3: Mikroskopaufnahme einer HEP-G2 Kultur.

MCF-7 (humane Brustadenokarzinomzelllinie, DSMZ-Nr. ACC 115):

Diese Zellen stammen von einer 69-jährigen hellhäutigen Frau aus dem Jahr 1970, die ein metastasierendes Mammakarzinom hatte. Die epithel-ähnlichen Zellen wachsen in einfachen Schichten, können aber auch kuppelartig wachsen. Sie werden alle 3 - 6 Tage mit Trypsin/EDTA vereinzelt und in einem Verhältnis von 1:5 geteilt. Ihre Verdopplungszeit beträgt im Durchschnitt 50 h, kann aber von 30 - 72 h variieren. Sie sind folgendermaßen charakterisiert: cytokeratin +, cytokeratin-7 -, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 +, cytokeratin-19 +, desmin -, endothel -, EpCAM +, GFAP -, neurofilament -, vimentin-. Kulturmedium: MEM-Flüssigmedium, 10 % FKS (v/v), 1 % Natriumpyruvat (v/v), 1 % L-Glutamin (v/v), 1 % Nicht-essenzielle Aminosäuren (v/v), 10 µg/mL Insulin, 1 % P/S (v/v).

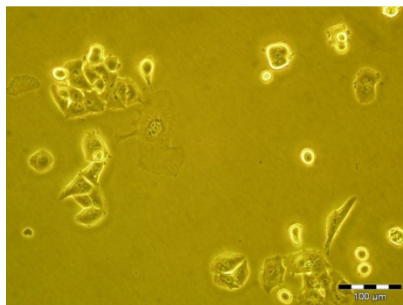


Abb. 6.1-4: Mikroskopaufnahme einer MCF-7 Kultur.

NIH-3T3 (Mäusefibroblastenzelllinie, DSMZ-Nr. ACC-59):

Diese Zelllinie hat ihren Ursprung in einem kontakt-inhibierten NIH *Swiss mouse* Embryo und wird häufig in DNA-Transfektionsassays verwendet. Die Fibroblasten wachsen adhärent in einfachen Schichten. Sie besitzen eine nur kurze Verdopplungszeit von ca. 20 h und sind

daher sehr schnell wachsende Zellen. Die Kultur sollte nicht vollständig konfluent werden; die Zellen werden alle 2 - 3 Tage mit Trypsin/EDTA vereinzelt und 1:20 geteilt.

Kulturmedium: DMEM-Flüssigmedium, 10 % NKS, 1 % P/S

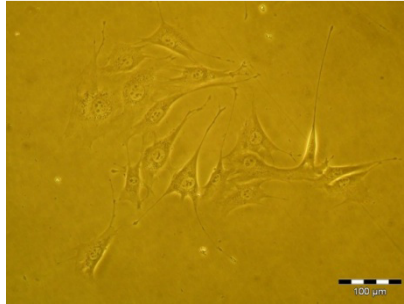


Abb. 6.1-5: Mikroskopaufnahme einer NIH-3T3 Kultur.

ucMSC (Stammzellen, isoliert aus der Nabelschnur):

Die in dieser Arbeit verwendeten mesenchymalen Stammzellen (MSC) wurden während einer vorangegangenen Arbeit aus der Nabelschnur isoliert, charakterisiert und beschrieben²¹. MSCs sind multipotente Stromazellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung besitzen. Sie sind in fast allen postnatalen Geweben zu finden und werden u.a. für eine Gewebegeneration eingesetzt. Die International Society for Cellular Therapy (ISCT) hat drei Kriterien aufgestellt, die die isolierten Zellen erfüllen müssen, um als MSCs zu gelten: 1. Adhärenz auf Plastik unter Standardkultivierungsbedingungen; 2. Differenzierungsfähigkeit in die osteogene, chondrogene und adipogene Richtung; 3. Positive Expression spezifischer Zelloberflächenantigene (CD73, CD90, CD105) sowie negativ für CD45, CD34, HLA-DR.

Kulturmedium: α -MEM-Flüssigmedium, 10 % HS, 50 µg/mL Gentamycin

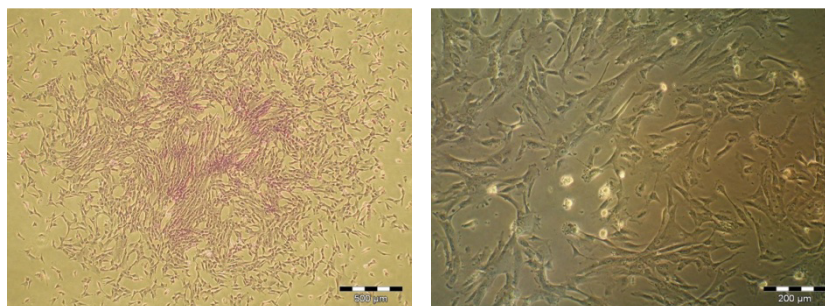


Abb. 6.1-6: Mikroskopaufnahme einer mit Toluidinblau gefärbten Kultur von Stammzellen aus der Nabelschnur

²¹ Dissertation, 'Strategies in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells expansion', Dr. Antonina Lavrentieva, Leibniz Universität Hannover, 2012

6.1.2 Medien

Medienzusammensetzungen

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)	Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco®)
0,2 g/L Calciumchlorid	117,24138 mM Natriumchlorid
0,0001 g/L Eisennitrat · 9H ₂ O	1,8018018 mM Calciumchlorid
0,09767 g/L Magnesiumsulfat	0,8139166 mM Magnesiumsulfat
0,4 g/L Kaliumchlorid	5,3333335 mM Kaliumchlorid
6,4 g/L Natriumchlorid	1,0144928 mM Natriumdihydrogenphosphat · H ₂ O
0,109 g/L Natriumhydrogenphosphat	5,5555553 mM D-Glukose
4,5 g/L Glukose	0,01 mM Glycin
0,084 g/L L-Arginin · HCl	0,099999994 mM L-Alanin
0,0626 g/L L-Cystin · 2HCl	0,5971564 mM L-Argininhydrochlorid
0,584 g/L L-Glutamin	0,11363637 mM L-Asparagin · H ₂ O
0,03 g/L Glycin	0,1 mM L-Asparaginsäure
0,042 g/L L-Histidin · HCl · H ₂ O	0,099936105 mM L-Cystin · 2HCl
0,105 g/L L-Isoleucin	0,1 mM L-Glutaminsäure
0,105 g/L L-Leucin	2,0 mM L-Glutamin
0,146 g/L L-Lysin · HCl	0,2 mM L-Histidinhydrochloride · H ₂ O
0,03 g/L L-Methionin	0,39694658 mM L-Isoleucin
0,066 g/L L-Phenylalanin	0,39694658 mM L-Leucin
0,042 g/L L-Serin	0,39617488 mM L-Lysinhydrochlorid
0,095 g/L L-Threonin	0,10067114 mM L-Methionin
0,016 g/L L-Tryptophan	0,19393939 mM L-Phenylalanin
0,10379 g/L L-Tryosin 2Na · 2H ₂ O	0,1 mM L-Prolin
0,094 g/L L-Valin	0,1 mM L-Serin
0,004 g/L Cholinchlorid	0,40336135 mM L-Threonin
0,004 g/L Folsäure	0,04901961 mM L-Thryptophan
0,0072 g/L Myoinositol	0,19885059 mM L-Tryosin Dinatriumsalz Dihydrat
0,004 g/L Nicotinamid	0,3931624 mM L-Valin
0,004 g/L D-Pantothensäure	0,007142857 mM Cholinchlorid
0,004 g/L Pyridoxal · HCl	0,002096436 mM D-Calciumpantothenat
0,0004 g/L Riboflavin	0,0022675737 mM Folsäure
0,004 g/L Thiamin · HCl	0,008196721 mM Nicotinamid
0,0159 g/L Phenolrot · Na	0,004901961 mM Pyridoxalhydrochlorid
0,11 g/L Brenztraubensäure · Na	2,6595744*10 ⁻⁴ mM Riboflavin
	0,002967359 mM Thiaminhydrochlorid
	0,011111111 mM i-Inositol
	0,026567481 mM Phenolrot

Minimum Essential Medium (α-MEM), keine Nukleoside (Gibco®)

0,28089887 mM L-Alanin	1,8018018 mM Calciumchlorid
0,49763033 mM L-Arginin	0,8139166 mM Magnesiumsulfat
0,37878788 mM L-Asparagin · H ₂ O	5,3333335 mM Kaliumchlorid
0,22556391 mM L-Asparaginsäure	117,24138 mM Natriumchlorid
0,5681818 mM L-Cystinhydrochlorid · H ₂ O	1,0144928 mM Natriumdihydrogenphosphat · H ₂ O
0,1 mM L-Cystin · 2HCl	5,5555553 mM D-Glukose
0,5102041 mM L-Glutaminsäure	9,708738*10 ⁻⁴ mM Liponsäure
2,0 mM L-Glutamin	1,0 mM Natriumpyruvat
0,2 mM L-Histidin	0,6666667 mM Glycin
0,4 mM L-Isoleucin	0,2840909 mM Ascorbinsäure
0,4 mM L-Leucin	4,0983607*10 ⁻⁴ mM Biotin
0,39726028 mM L-Lysin	0,007142857 mM Cholinchlorid
0,10067114 mM L-Methionin	0,002096436 mM D-Calciumpantothenat
0,19393939 mM L-Phenylalanin	0,0022675737 mM Folsäure
0,3478261 mM L-Prolin	0,008196721 mM Nicotinamid
0,23809524 mM L-Serin	0,004901961 mM Pyridoxalhydrochlorid
0,40336135 mM L-Threonin	2,6595744*10 ⁻⁴ mM Riboflavin

Anhang

0,04901961 mM L-Thryptophan	0,002967359 mM Thiaminhydrochlorid
0,23111111 mM L-Tryosin Dinatriumsalz	0,0010036901 mM Vitamin B12
0,3931624 mM L-Valin	0,011111111 mM i-Inositol
	0,026567481 mM Phenolrot

Medien-/ Kultursubstratpräparation für prokaryotische Zellen

Lysogeny broth (LB)-Medium	1 % Trypton 1 % Natriumchlorid 0,5 % Hefeextrakt 20 min bei 121 °C autoklavieren
TSS-Lösung (Herstellung kompetenter Zellen)	LB-Medium 10 % PEG (8000) 5 % DMSO 30 mM Magnesiumchlorid
LB-Agar-Platten	LB-Medium 1,5 % Agar autoklavieren

Medienpräparation für eukaryotische Zellen

DMEM-Flüssigmedium	1,35 % DMEM-Pulver 0,37 % Natriumhydrogencarbonat pH = 7,2 steril filtriert
MEM-Flüssigmedium	0,961 % MEM-Pulver 0,22 % Natriumhydrogencarbonat pH = 7,2 steril filtriert
α -MEM-Flüssigmedium	1,008 % α -MEM-Pulver 0,22 % Natriumhydrogencarbonat pH = 7,2 steril filtriert

6.1.3 Puffer und Lösungen

Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Puffer, Lösungen und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit destilliertem Wasser (dH₂O) angesetzt. Die pH-Werte dieser Flüssigkeiten wurden mit 1 M Salzsäure oder 5 M Natronlauge eingestellt.

Zellkulturrpuffer

1x PBS	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4 autoklavieren
Trypsin/EDTA-Puffer-Lösung	1x Trypsin in PBS 0,02 % EDTA

Anhang

Kollagen-Lösung	0,1 M Essigsäure 0,1 % Kollagen Typ I Bei Raumtemperatur rühren bis Kollagen gelöst, ca. 3 h 1:10 mit PBS verdünnen
Paraformaldehyd-PBS-Puffer (4 % PFA)	200 mL dH ₂ O auf 60 °C erhitzen 10 g Paraformaldehyd unter Rühren hinzufügen Direkt im Anschluss ca. 50 µL Natronlauge (10 N) unter Rühren hinzugeben Rühren bis Paraformaldehyd vollständig gelöst 25 mL 10x PBS hinzugeben Mit dH ₂ O auf 250 mL auffüllen, mischen Mit einem 0,45 µm Filter filtrieren Langzeitlagerung bei -20 °C
DAPI-Färbepuffer	100 mM Tris, pH = 7 150 mM Natriumchlorid 1 mM Calciumchlorid 0,5 mM Magnesiumchlorid 0,1 % Nonidet-P40 steril filtriert
DAPI-Stammlösung	500 µg/ mL DAPI in dH ₂ O
DAPI-Färbelösung	2 µL DAPI-Stammlösung/ mL DAPI-Färbepuffer
Cacodylatpuffer	200 mM Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat pH = 7,3
Karnovskypuffer	5 mg Calciumchlorid 10 mL Cacodylatpuffer 20 µL Glutaraldehyd (50 %) 2,48 mL dH ₂ O
Plasmid-/ DNA-Puffer	
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH = 8,0 steril filtriert
Quantum Dot/Antikörper Konjugations- und Zellfärbungspuffer	
Natriumboratpuffer (NBP) Konjugation	10 mM Borsäure pH = 7,4 (mit Natronlauge einstellen) steril filtriert
Natriumboratpuffer (NBP) Reaktionsstopp	50 mM Borsäure pH = 8,3 (mit Natronlauge einstellen) steril filtriert
MES-Puffer	25 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure pH = 6,0 steril filtriert

6.1.4 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid Gemisch (37,5:1) 40 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
4,6-Diamino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -Ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Eisessig	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Gentamycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Humanserum (HS)	Medizinische Hochschule Hannover, Abt. Transfusionsmedizin
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
2-(<i>N</i> -morpholino)ethansulfonsäure Hydrat (MES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
<i>N</i> -hydroxysuccinimid (NHS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Anhang

Nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Neugeborenen Kälberserum (NKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Nonidet-P40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RNAtidy G	Appllichem GmbH, Darmstadt
RNase Zap	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris-Base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Serva Electrophoresis
Trypton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

6.1.5 Microarrays und Zubehör

Oberflächenbeschichtungen

Standard Glasobjektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Deckgläschen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aldehyd (Vantage Silylated Slides 25)	CEL Associates Inc., TX, USA
Kollagen Typ I aus Kalbshaut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kollagenfolie	Universität Tübingen, Anatomisches Institut, Abteilung Experimentelle Embryologie
Polysine [®] Slides	Thermo Fischer Scientific Inc., MA, USA
Poly-L-lysine Hydrobromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Roti-Bond Adhäsionsobjektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Inkubationskammersysteme

Nexterion 16-well superstructures	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
16 well ProPlate Slide Slide Module	BioCat GmbH, Heidelberg
16 round well ProPlate Tray Set	BioCat GmbH, Heidelberg

6.1.6 Plasmide und Restriktionsenzyme

Als erstes Testsystem wurde eine *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)-produzierende Bakterien-Kultur verwendet. Das Plasmid mit dem EGFP-Gen (pTriEx-EGFP) wurde freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe Prof. Bornscheuer der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt. Dieses 6376 bp große Plasmid (Abb. 6.1-7) verfügt neben dem GOI

(*gene of interest*, EGFP) über eine Ampicillin-Resistenz und einen T7 *lac* Promoter, der eine IPTG-basierte Induktion ermöglicht. Das exprimierte EGFP ist mit einem His-tag versehen und könnte somit bei einer Aufreinigung abgetrennt werden. Nach der Amplifikation wird aus dem isolierten Plasmid das EGFP-Gen ausgeschnitten, indem dieses wie in Abb. 6.1-7 markiert von den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI geschnitten wird. Hiermit soll überprüft werden, ob es sich um das korrekte Plasmid handelt. In Tab. 6.1-1 sind die Enzyme, ihre Schnittstellen und Puffer zusammengefasst. Infolge des Plasmidkontrollverbaus entstehen zwei Fragmente der Größe 5517 bp und 859 bp (EGFP-Gen).

Tab. 6.1-1: Restriktionsenzyme und Puffer, ihre Hersteller, Enzymschnittstellen sowie deren Position im Plasmid.

	Enzym 1	Hersteller	Enzym 2	Hersteller	Puffer	Hersteller
	NcoI	Fermentas	XhoI	Fermentas	2x Tango	Fermentas
Schnittstelle	5'...C↓C A T G G...3' 3'...G G T A C↑C...5'		5'...C↓T C G A G...3' 3'...G A G C T↑C...5'			
Position im Plasmid	1		859			

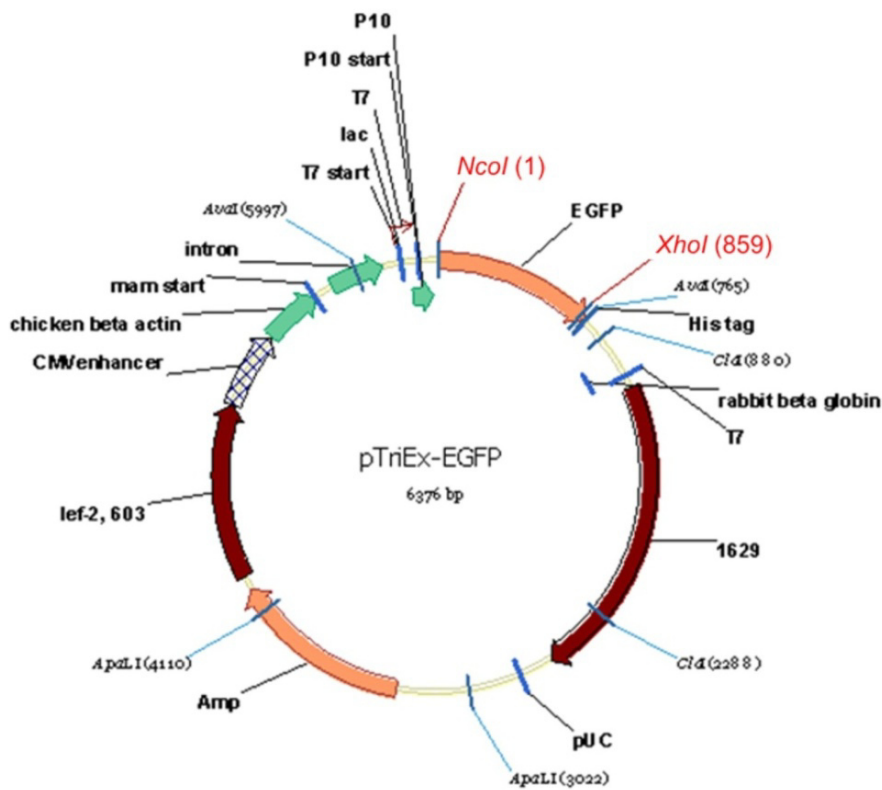


Abb. 6.1-7: Karte des Plasmids pTriEx-EGFP von der Arbeitsgruppe Prof. Bornscheuer der Universität Greifswald mit einer Gesamtgröße von 6376 bp. Das Plasmid enthält das EGFP-Gen, eine Ampicillin-Resistenz (Amp) und einen T7 *lac* Promoter. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind rot markiert, die Position der Schnittstellen ist in Klammern angegeben.

Als zweites Testsystem wurden EGFP-produzierende eukaryotische Zellen (NIH-3T3 und HEK-293 Zellen) verwendet. Das hierfür verwendete Plasmid mit dem EGFP-Gen (pEGFP-N1) wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Schambach der Medizinischen Hochschule

Hannover zur Verfügung gestellt und während einer vorangegangenen Masterarbeit²² amplifiziert und isoliert.

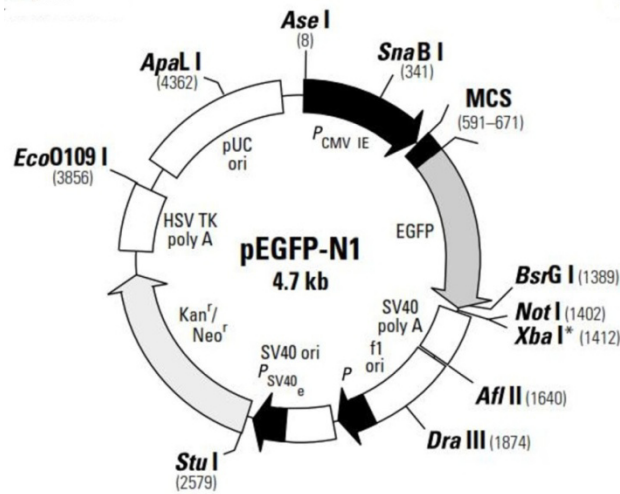


Abb. 6.1-8: Karte des Plasmids pEGFP-N1 zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Schambach der Medizinischen Hochschule Hannover.

6.1.7 Analyse-Kits

Zellvitalitäts-/ Zellproliferationstests

MTT-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
CytoTox-ONE Homogeneous Membran Integrity Assay (LDH)	Promega GmbH, Mannheim
Apo-ONE Homogeneous Assay (Caspase-3/-7)	Promega GmbH, Mannheim
Annexin V-FITC/PI Dead Cell Apoptosis Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Calcein-AM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Propidiumiodid-Lösung (1,0 mg/mL in Wasser)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Proteinquantifizierung

Bradford Reagenz	0,1 g Coomassie-Brilliant Blue 50 mL Ethanol (95 %) 100 mL Phosphorsäure (85 %) 1000 mL dH ₂ O filtriert
BCA	Thermo Fischer Scientific Inc., MA, USA

Plasmidaufreinigung

Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
------------------	---------------------

²² Masterarbeit, 'Expression des rekombinanten Wachstumsfaktors TGF- β in hochproduzierenden Säugetierzellen', M.Sc. Sabrina Baganz, 2013

6.1.8 mRNA-/Protein-Sequenzen, Primer, Enzyme, Elektrophorese, Größenstandards

Die mRNA-Sequenzen der Gene wurden der NCBI Nukleotid-Datenbank ²³ entnommen. Entscheidend für die Auswahl ist die größtmögliche Vollständigkeit der Transkriptionsvariante und eine hohe Anzahl von Referenzen.

c-erbB2 (human):

NCBI Reference Sequence: NM_001005862.1 GI:54792097

LOCUS: NM_001005862 4816 bp mRNA linear PRI 26-FEB-2012

DEFINITION: Homo sapiens v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)(ERBB2), transcript variant 2, mRNA.

```

ORIGIN: 1 gttcccgat ttttgtgggc gcctgccccc cccctcgtec ccctgctgtg tccatatatc
61 gaggcgatag ggtaagga aggcggacgc ctgatgggtt aatgagcaa ctgaagtgtt
121 ttccatgatc ttttttgagt cgcaattgaa gtaccacctc ccgaggggtg ttgcttcccc
181 atgcggggta gaacctttgc tgtcctgttc accactctac ctccagcaca gaatttggct
241 tatgcctact caatgtgaag atgatgagga tgaaaacctt tgtgatgatc cacttccact
301 taatgaatgg tggcaaagca aagctatatt caagaccaca tgcaaagcta ctccctgagc
361 aaagagtcac agataaaacg ggggcaccag tagaatggcc aggacaaaac cagtgcagca
421 cagagactca gacctggca gccatgcctg cgcaggcagt gatgagagtg acatgtactg
481 ttgtggacat gcacaaaagt gagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc
541 cagtcccagag acccacctgg acatgctccg ccacctctac cagggctgcc aggtgggtga
601 gggaaacctg gaactcacct acctgccacc caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat
661 ccaggagggtg cagggtctac tgtcctcgcg tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca
721 gaggtcgcg attgtgagag gcaaccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct
781 agacaatgga gaccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct
841 gcgggagctg cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg
901 gaacccccag ctctgctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa
961 ccagctggct ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc
1021 gatgtgtaag ggctcccget gctggggaga gagtctctgag gattgtcaga gcctgacgcg
1081 cactgctctgt gccggtggct gtgcccgctg caaggggcca ctgccactgc actgctgcc
1141 tgagcagtg tctgccgct gcaocggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca
1201 cttcaaccac agtggcatct gtgagctgca ctgccagcc ctggtcacct acaacacaga
1261 cacgtttgag tccatgcccc atcccagagg ccggtataca ttccggcgca gctgtgtgac
1321 tgctgtccc tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcaccctcg tctgccccct
1381 gcacaaccaa gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc
1441 ctgtgcccga gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac
1501 cagtgccaat atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct
1561 gccggagagc tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct
1621 ccaagtgttt gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga
1681 cagcctgcct gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca
1741 caatggcgcc tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc
1801 actgagggaa ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacacccacc tctgcttctg
1861 gcacacggtg ccctgggacc agctctttcg gaaccgcac caagctctgc tccacactgc
1921 caaccggcca gaggacgagt gtgtggcgga gggcctggcc tggccaccag tgtgcgccc
1981 agggcactgc tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tcttccgggg
2041 ccaggagtgc gtggaggaat gccgagtagt gcaggggctc ccaggaggat atgtgaatgc
2101 caggcactgt ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt
2161 tggaccggag gctgaccagt gtgtggcctg tggccactat aaggaccctc ccttctgcgt
2221 ggcccgtctc cccagcgggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccactt ggaagtctcc
2281 agatgaggag ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct
2341 ggatgacaag ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc
2401 ggtggttggc attctgctgg tctgtggtct gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg
2461 acggcagcag aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt
2521 ggagccgctg acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tctgaaaga
2581 gacggagctg aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgtc tttggcacag tctacaaggg
2641 catctggatc cctgatggg agaatgtgaa aattccagtg gccatcaaag tgttgaggga
2701 aaacacatcc cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggctggtg
2761 gggctcccca tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt
2821 gacacagctt atgcctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct
2881 gggctcccag gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga
2941 ggatgtgctg ctcgtaacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca agagtcccaa

```

²³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

Anhang

```
3001 ccatgtcaaa attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta
3061 ccatgcagat gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccc
3121 gcggttacc caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac
3181 ttttggggcc aaaccttacg atgggatccc agcccgggag atccctgacc tgctggaaaa
3241 gggggagcgg ctgccccagc cccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtcaa
3301 atgttgatg attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc
3361 ccgcatggcc agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccagc
3421 cagtcccttg gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct
3481 ggtggatgct gaggagtatc tggtagccca gcagggcttc ttctgtccag acctgcccc
3541 gggcgctggg ggcattggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg
3601 ggacctgaca ctagggtctg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc cactggcacc
3661 ctccgaaggg gctggctccg atgtatttga tggtagacct ggaatggggg cagccaaggg
3721 gctgcaaagc ctccccacac atgaccccag ccctctacag cggtagatg aggaccccac
3781 agtacccttg ccctctgaga ctgatggcta cgttgcccc ctgacctgca gccccagcc
3841 tgaatatgtg aaccagccag atgttcggcc ccagccccct tcgccccgag agggccctct
3901 gcctgctgcc cgacctgtcg gtgccactct ggaaaggccc aagactctct cccagggaa
3961 gaatggggtc gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt
4021 gacaccccag ggaggagtct cccctcagcc ccaccctcct cctgccttca gcccagcctt
4081 cgacaacctc tattactggg accaggacct accagagcgg ggggctccac ccagcacctt
4141 caaagggaca cctacggcag agaaccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtgaa
4201 cagaaggcca agtccgcaga agccctgatg tgtcctcagg gagcagggaa ggctgactt
4261 ctgctggcat caagaggtgg gagggccctc cgaccacttc caggggaacc tgccatgcca
4321 ggaacctgtc ctaaggaacc ttcctcctg cttgagttcc cagatggtcc gaagggtcc
4381 agcctcgttg gaagaggaac agcactgggg agtctttgtg gattctgagg ccctgccaa
4441 tgagactcta ggggtccagt gatgccacag cccagcttgg ccctttcctt ccagatcctg
4501 ggtactgaaa gccttaggga agctggcctg agaggggaag cggccctaag ggagtgtcta
4561 agaacaaaag cgacccattc agagactgtc cctgaaacct agtactgcc cccatgagga
4621 aggaacagca atgggtgtcag tatccaggct ttgtacagag tgcttttctg tttagttttt
4681 actttttttg ttttgttttt ttaaagatga aataaagacc cagggggaga atgggtgtg
4741 tatggggagg caagtgtggg gggctcctct ccacaccac tttgtccatt tgcaaatata
4801 ttttgaaaa cagcta
```

c-erbB2 (*murin*):

NCBI Reference Sequence: NM_001003817.1

GI:54873609

LOCUS: NM_001003817

4998 bp

mRNA

linear

ROD 17-JUN-2012

DEFINITION Mus musculus v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian) (*ErbB2*), mRNA.

```
ORIGIN: 1 cgaggaagtg cggcgtagaag ttgtgtagct gagattgccg gccgctgggg acccggagcc
61 caggagcgcg ccttcccagg cggcccttc cggcgccgcg cctgtgctg ccctcgccgc
121 gccccgcgcc cgcagcctgg tccagcctga gccatggggc cggagccgca gtgatcatca
181 tggagctggc ggctggtgct cgttgggggt tccctcctgc cctcctgtcc cccggagccg
241 cgggtaccca agtgtgtacc ggtaccgaca tgaagttgcg actccctgcc agtcctgaga
301 cccacctgga catgcttcgc cacctctacc agggctgtca ggtggtgacg ggcaatttgg
361 agcttaccta cctgcccgc aatgccagcc tctcattcct gcaggacatc caggaagtcc
421 agggatacat gctcatcgct cacaaccgag tgaaacacgt cccactgcag aggttgcgca
481 tcgtgagagg gactcagctc tttgaggaca agtatgccct ggctgtgcta gacaaccgag
541 accctttgga caacgtcacc accgccgcc caggcagaac ccagaaggg ctgcgggagc
601 tgcagcttgc aagtctcaca gagatcttga agggaggagt tttgatccgt gggaaccctc
661 agctctgcta ccaggacatg gttttgtgga aggatgtcct ccgtaagaat aaccagctgg
721 ctctgtcga catggacacc aatcgttccc gggcctgtcc acctgtgccc ccaacctgca
781 aagacaatca ctggtggggg gagagtctcg aagactgtca gatcttgact ggcacctct
841 gtactagtgg ctgtgcccgg tgcaagggcc ggctgccac tgactgttgc catgagcagt
901 gtgctgcagg ctgcacgggt cccaagcatt ctgactgcct ggctgcctc cacttcaatc
961 atagtggat ctgtgagctg cactgcccgg ccctcatcac ctacaacaca gacacctcgc
1021 agtccatgct caaccctgag ggtcgctaca cctttggtgc cagctgtgtg accacctgcc
1081 cctacaacta cctctccagc gaagtgggat cctgcactct ggtctgtccc ccgaacaacc
1141 aagaggtcac agctgaggac ggaacacagc ggtgtgagaa atgcagcaag cctgtgtctg
1201 gagtatgcta tggctcgggc atggagcacc tccaggggc gagggccatc accagtgaca
1261 atatccagga gtttgcggc tgcaagaaga tctttgggag cctggcattt ttgcccggaga
1321 gctttgatgg gaaccctcc tccggcgttg cccactgaa gccagagcat ctccaagtgt
1381 tcgaaacctt ggaggagatc acaggttacc tatacatttc agcatggcca gagagcttcc
1441 aagacctcag tgtcttccag aaccttcggg tcattcgggg acggattctc catgatggtg
1501 cttactcatt gacgttgcaa ggcctgggga ttcactcact ggggctacgc tcactcggg
1561 agctggcgag tggattggct ctcttcacc gcaacacca tctctgctt gtaaacactg
1621 taccttggga ccagctcttc cggaaaccgc accaggccct actccacagt gggaaccgpc
1681 cagaagaggc atgtggtctt gagggtcttg tctgtaactc actgtgtgcc cgtgggact
1741 gctgggggccc agggcccacc cagtgtgtca actgcagtca gttcctccgc ggccaggagt
```

Anhang

```
1801 gtgtggagga gtgccgagta tggaaagggc tccccagga gtatgtgagg ggcaagcact
1861 gtctgccatg ccacccccgag tgtcagcctc aaaacagctc ggagacctgc tatggatcgg
1921 aggtcgacca gtgtgaggct tgtgccactc acaaggactc atcttcctgt gtggctcgg
1981 gccccagtggt tgtgaagcca gacctctcct acatgcctat ctggaagtac ccggatgagg
2041 agggcatatg tcagccatgc cccatcaact gcaccactc atgtgtggac ctggacgaac
2101 gaggctgccc agcagagcag agagccagcc cagtgcatt catcattgca actgtggtgg
2161 gcgtcctggt gtctctgatc atagtgggtg tcattggaat cctaatacaa cgaaggcgac
2221 agaagatccg gaagtatacc atgcgtaggc tgctgcagga gaccgagctg gtggagccgc
2281 tgacgcccag tggagctgtg cccaaccagg ctccagatgc gatcctaaag gagacagagc
2341 taaggaagct gaagtgctt gggtcaggag ccttcggcac tgtctacaag ggcattctga
2401 tcccagatgg ggagaacgtg aaaatccccg tggccatcaa ggtgttgagg gaaaacacat
2461 ctctaaagc taacaaagaa atcctagatg aagcgtacgt catggctggt gtgggttctc
2521 catatgtgtc ccgctcctg ggcattctgc tgacatccac agtgcagctg gtgacacagc
2581 ttatgcccta tggctgcctt ctggaccatg tccgagaaca ccgaggtcgc ttaggctccc
2641 aggacctgct caactggtgt gtccagattg ccaaggggat gagctacctg gaggaagtct
2701 ggcttgttca caggaccta gctgcccga acgtgctagt caagagtccc taccacgtca
2761 agattaccga ctctgggctg gcaaggctgc tggacattga tgagactgaa taccatcgag
2821 atgggggcaa ggtgcccatc aagtggatgg cattggaatc tattctcaga cgccggttca
2881 cccatcagag tgatgtgtgg agctatgggtg tgactgtgtg ggagctgatg accttggggg
2941 ccaaacctta cgatgggatc ccagctcggg agatccctga tttgctggag aagggagaac
3001 gcctacctca gcctccaatc tgcaccatcg acgtctacat gatcatggtc aaatgttgga
3061 tgattgactc cgaatgtcgc ccgagattcc gggagttggt atcagaattc tcccgatgg
3121 caagggacc cccagcgttt gtggtcatcc agaacgagga cttaggcccc tccagccccca
3181 tggacagcac ctctaccgt tcaactgctg aggatgatga catgggggag ctggtcgatg
3241 ctgaagagta cctggtacc cagcagggat tcttctcccc agaccctgcc ctaggtaactg
3301 ggagcacagc ccaccgcaga caccgcagct cgtcggccag gagtggcggg ggtgagctga
3361 cactgggcct ggagccctcg gaagaagagc ccccagatc tccactggct ccctccgaag
3421 gggctggctc cgatgtgttt gatggtgacc tggcagtggt ggtaaccaa ggactgcaga
3481 gcctctctcc acatgacctc agcctctac agcggtagag tgaggatccc acattacctc
3541 tgcccccca gactgatgac tacgttgctc ccctggcctg cagccccag cccgagtatg
3601 tgaaccagcc agaggttcgg cctcagctc ccttgacccc agagggctct ccgctccca
3661 tccgacctgc tgggtgctact ctagaaagac ccaagactct ctctcctggg aaaatggggg
3721 ttgtcaaaga cgtttttgcc tttgggggtg ctgtggagaa ccctgaatac ttagcaccca
3781 gagcaggcac tgcctctcag cccaccctt ctctgcctt cagcccagcc tttgacaacc
3841 tctattactg ggaccagaac tcatcggagc agggctctcc accaagtacc tttgaaggga
3901 ccccactagc agagaaccct gactacctag gcctggatgt gccagtatga ggtcacatgt
3961 gcagacatcc tctgtcttca gagtgggaa ggaaggccta acttgtggtc tccatcgccc
4021 gccacaaagc agggagaagg tctctggcc acatgacatc cagggcagcc ggctatgcca
4081 ggaacgtgcc ctgaggaacc tcgctcgatg cttcaatcct gagtggtaa gagggccccg
4141 cctggccgga agagacagca cactgttcag ccccagagga ttacagacct tgactgccct
4201 gacagactgt agggctccag tgggtattcct tacctggcct ggctctcttg gttctgaaga
4261 ctgaggaag ctcagcctgc aagggaggag gccccaggtg aatatcctgg gagcaggaca
4321 ccccactagc actgagcac gtgcattcca agagggggac agcacttgca cccagctgg
4381 tctttgtaca gaggttatgt tgttctgttt ttacttttgt tttttgttt ttttttaag
4441 atgaaataag gatacagtgg gagagtgggt gttatatgaa agtcgggggg tgctgtcccc
4501 tttctccatt tgcaatgaga tttgtaaaat aactggacct cagcctatgt ctgagagtgg
4561 tcccgggccc ggtcaaaccg tattgctcat ctgacacaca gctcctcctg gagtgagtgt
4621 gtagagatct tccaaaagtt tgagacaatt tggctttggg cttgagggac tggggagtta
4681 ggattccttc tgaaggccct ttggcaacag ggtcattctc cgttgacac actcatacca
4741 aggetacccc cagaatactc cgttgacac actcattcca aggetacccc cagaatgaag
4801 tctgtcctc ccagtgaggag aggggagctt gtggagagca ttgccatgtg acttgttttc
4861 cttgccttag aaagaagtat ccatccagga aaaccccacc cactaggtgt tagtcccacc
4921 cactaggtgt tagcagggcc agactgacct gtgtgcccc cgcacaggct ggacataaac
4981 acagccagct tgacacaa
```

Proteinvergleich HER-2/neu human (NCBI Reference Sequence: NP_001005862.1) und murin (NCBI Reference Sequence: NP_001003817.1) mit dem Programm BLASTP2.2.28²⁴:

Length = 1256, Score = 2165 bits (5609), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 1075/1226 (88%), Positives = 1130/1226 (92%), Gaps = 1/1226 (0%)

```
human 1 MKLRLPASPETHLDMRLRHLHYQCQVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNR 60
      MKLRLPASPETHLDMRLRHLHYQCQVQGNLELTYLP NASLSFLQDIQEVQGY+LIHNR+
murin 31 MKLRLPASPETHLDMRLRHLHYQCQVQGNLELTYLPANASLSFLQDIQEVQGYMLIHNRR 90
```

²⁴ http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Anhang

human	61	VRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNN-TTPVT-GASPGGLRELQLRSLTEIL	119
		V+ VPLQRLRIVRGTQLFED YALAVLDN DPL+N TT G +P GLRELQLRSLTEIL	
murin	91	VKHVPLQRLRIVRGTQLFEDKYALAVLDNRDPLDNVTTAAP-GRTPEGLRELQLRSLTEIL	150
human	120	KGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWCWESS	179
		KGGVLI+ NPQLCYQD +LWKD+ KNNQLA +DTNRSRAC PC+P CK + CWGES	
murin	151	KGGVLIIRGNPQLCYQDMVLWKDVLKRNQLAPVDMDTNRSRACPPCAPTCKDNHCWGES	210
human	180	EDCQSLTRTVACAGGCARCKGRLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCP	239
		EDCQ LT T+C GCARCKG LPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCP	
murin	211	EDCQILTGTICTSGCARCKGRLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCP	270
human	240	ALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPHNLQEVTAEDGTQ	299
		AL+TYNTDTFESM NPEGRYTFGASCVT CPYNYLST+VGSCTLVCP +NQEVTAEEDGTQ	
murin	271	ALITYNTDTFESMLNPEGRYTFGASCVTTCPYNYLSTEVGSCTLVCPNNQEVTAEDGTQ	330
human	300	RCEKSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNT	359
		RCEKSKPCA VCYGLGMEHLR RA+TS NIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDG+P+S	
murin	331	RCEKSKPCAGVCYGLGMEHLRGARAITSDNIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGNPSSGV	390
human	360	APLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLG	419
		APL+PE LQVFETLEEITGYLYISAW+S DLSVFQNL+VIRGRILH+GAYSLTLQGLG	
murin	391	APLKPEHLQVFETLEEITGYLYISAWPESFQDLSVFQNLRVIRGRILHNGAYSLTLQGLG	450
human	420	ISWLGRLSRLRELGSGLALIHHTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGL	479
		I LGLRSLRELGSGLALIH NTHLCFV+TVPWDQLFRNPHQALLH+ NRPE+ C EGL	
murin	451	IHSLGRLSRLRELGSGLALIHRTHLCFVNTVPWDQLFRNPHQALLHSGNRPEEACGLEGL	510
human	480	ACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQP	539
		C+ LCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRV +GLPREYV +HCLPCHPECQP	
murin	511	VCNSLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVWGLPREYVRGKHCLPCHPECQP	570
human	540	QNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFVCVARCPSGVKPDLSEMPYIWKFPDEEGACQPCPIN	599
		QN S TC+G EADQC ACAHYKD CVARCPSGVKPDLSEMPYIWK+PDEEG CQPCPIN	
murin	571	QNSSETCYGSEADQCEACAHYKDSSSCVARCPSGVKPDLSEMPYIWKYPDEEGICQPCPIN	630
human	600	CTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIIISAVVGGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTMRR	659
		CTHSCVDLD++GCPAEQRASP+T II+ VVG+LL +++ VV GILIKRR+QKIRKYTMRR	
murin	631	CTHSCVDLDERGCPAEQRASPVTFFIATVVGVLFLIIVVIGILIKRRRQKIRKYTMRR	690
human	660	LLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIP	719
		LLQETELVEPLTPSGA+PNQAQMRILKETELRK+KVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIP	
murin	691	LLQETELVEPLTPSGAVPNQAQMRILKETELRKLKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIP	750
human	720	VAIKVIRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSYPVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDH	779
		VAIKVIRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSYPVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDH	
murin	751	VAIKVIRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSYPVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDH	810
human	780	VRENRLGSLQDLLNWCQIAKMSYLEVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARL	839
		VRE+RGLGSLQDLLNWC+QIAKMSYLE+VRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARL	
murin	811	VREHRRLGSLQDLLNWCQIAKMSYLEEVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARL	870
human	840	LDIDETEHADGGKVP IKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTWELMTFGAKPYDGIIPAR	899
		LDIDETEHADGGKVP IKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTWELMTFGAKPYDGIIPAR	
murin	871	LDIDETEHADGGKVP IKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTWELMTFGAKPYDGIIPAR	930
human	900	EIPDLLEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVI	959
		EIPDLLEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVI	
murin	931	EIPDLLEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVI	990
human	960	QNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDDMGDLVDAEYLVLPQQGFFCPDPAPGAGGMVHRRHS	1019
		QNEDLGP+SP+DSTFYRSLLEDDDDMG+LVDAEYLVLPQQGFF PDPA G G H RRS	
murin	991	QNEDLGPPSPMDSTFYRSLLEDDDDMGELVDAEYLVLPQQGFFSPDPALGTGSTAHRHS	1050
human	1020	SSTRSGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPHTDPSPL	1079
		SS RSGG+LTLGLEPSEEE PRSPLAPSEGAGSDVFDGDL +G KGLQSL HD SPL	
murin	1051	SSARSGGELTLGLEPSEEEPPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLAVGVTKGLQSLSPHDLSPL	1110
human	1080	QRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLER	1139
		QRYSEDPT+PLP ETDGYVAPL CSPQPEYVNQPD+VRPQ P EGP P RPAGATLER	
murin	1111	QRYSEDPTLPLPPETDGYVAPLACSPQPEYVNQPEVVRPQSPPLTPEGPPPIRPAGATLER	1170

Anhang

human	1140	PKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPE	1199
		PKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYL P+ G A QPHP PAFSPAFDNLYYWDQ+ E	
murin	1171	PKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLAPRAGTASQPHPSPAFSPAFDNLYYWDQNSSE	1230
human	1200	RGAPPSTFKGTPAENPEYLGLDVPV	1225
		+G PPSTF+GTPAENPEYLGLDVPV	
murin	1231	QGPPPSTFEGTPTAENPEYLGLDVPV	1256

FOLR1 (human):

NCBI Reference Sequence: NM_016724.2 GI:262331573
LOCUS: NM_016724 1213 bp mRNA linear PRI 23-APR-2012
DEFINITION: Homo sapiens folate receptor 1 (adult) (FOLR1), transcript variant 7, mRNA.

ORIGIN: 1 tggaggcctg gctgggtgctc acatacaata attaactgct gagtggcctt cgcccaatcc
61 caggctccac tcctgggctc cattcccact ccctgcctgt ctctaggcc actaaaccac
121 agctgtcccc tggataaagg caagggggag tgtagagcag agcagaagcc tgagccagac
181 ggagagccac ctctctctcc aggaactgaa cccaaaggat cacctgggat tccttgagag
241 tacagatttc tccggcgtgg ccctcaaggg acagacatgg ctccagcggat gacaacacag
301 ctgctgctcc ttctagtgtg ggtggctgta gttagggagg ctccagacaag gattgcatgg
361 gccaggactg agcttctcaa tgtctgcatg aacgccaagc accacaagga aaagccaggc
421 cccgaggaca agttgcatga gcagtgtcga ccctggagga agaatgcctg ctgttctacc
481 aacaccagcc aggaagccca taaggatggt tcctacctat atagattcaa ctggaaccac
541 tgtggagaga tggcacctgc ctgcaaaccg catttcatcc aggacacctg cctctacgag
601 tgctccccca acttggggcc ctggatccag cagggtggatc agagctggcg caaagagcgg
661 gtactgaacg tgcccctgtg caaagaggac tgtgagcaat ggtgggaaga ttgtcgcacc
721 tcctacacct gcaagagcaa ctggcacaag ggctggaact ggacttcagg gtttaacaag
781 tgcgcagtgg gagctgcctg ccaacctttc catttctact tccccacacc cactgttctg
841 tgcaatgaaa tctggactca ctctacaag gtcagcaact acagccgagg gactgtccgc
901 tgcattccaga tgtggttcga cccagcccag ggcaacccca atgaggagggt ggcgagggtc
961 tatgctgcag caatgagtgg ggctgggccc tgggcagcct ggcccttctc gcttagcctg
1021 gccctaatac tgctgtggct gctcagctga cctcctttta ccttctgata cctggaaatc
1081 cctgccctgt tcagccccac agctcccacac tatttgggtc ctgctccatg gtcgggcctc
1141 tgacagccac tttgaataaa ccagacaccg cacatgtgtc ttgagaatta tttggaaaaa
1201 aaaaaaaaaa aaa

FOLR1 (murin):

NCBI Reference Sequence: NM_001252552.1 GI:357527370
LOCUS: NM_001252552 1411 bp mRNA linear ROD 10-JUN-2012
DEFINITION: Mus musculus folate receptor 1 (adult) (Folr1), transcript variant 1, mRNA.

ORIGIN: 1 ggggcagaga cagcttagaa gggcctccag cttaggctt tatagatacc tggcccacc
61 ttcccagtc agcaggctga tctggaagta taacaagaa aggaggctga cggctctaga
121 agtcccacac ctggtgtgat ctccagtaga caaacactcc tgggtgtgca caggattcag
181 gccactaac ctcgccggc tgtctcctgg aatgaagaa gcaaggaag cctagagtgg
241 agacaaagaa gcccgaggca ctctgagagc tgccatcttt tccttgtttg ccgctgaca
301 ctctctagca ggatccacat accctaagca gggagtggag agaggcctgg gctgggcccag
361 gttttctggg ctttttcctg tgctccgagt aggtgggttg tattttacc agtaggagtg
421 gaagactcct tggcgcttgg tgcctcaacc ggactgactt cctgggcctg gacttggcga
481 tttagaggtc gacatggctc acctgatgac tgtgcagttg ttgctcctgg tgatgtggat
541 ggccgaatgt gctcagtcca gagctactcg ggccaggact gaacttctca atgtctgcat
601 ggatgcaaaa caccacaaag aaaaaccggg ccctgaggac aatttacacg accagtgcag
661 cccctggaag acgaattcct gctgttccac gaacacaagc caggaagcac ataaggacat
721 ttccctacct taccggttca actggaacca ctgcgggaact atgacatcgg aatgcaaacg
781 gcactttatc caagacacct gcctctatga gtgttccccg aacttgggac cctggatcca
841 gcaggtggac cagagctggc gcaaagagcg gatccttgat gttcccctgt gcaaagagga
901 ctgtcagcag tgggtgggagg actgccagag ctcttttacc tgcaagagca attggcacia
961 gggatggaac tggctcctcg ggccataacga gtgtcctgtg ggagcctcct gccatccctt
1021 caccttctac ttcccacat ctgctgctct gtgtgaggaa atctggagtc actcctacia
1081 gctcagcaac tacagtgcag ggagcggccg ctgcattcag atgtgggtcg acccagccca
1141 gggcaacccc aacgaggaag tggcgagggt ctatgccgag gccatgagtg gagctgggtt
1201 tcatgggacc tggccactct tgtgcagcct gtccttagtg ctgctctggg tgatcagctg
1261 agctcctggt ttaccttcag ttgtctggag cgccaccctg cttggctcag cctcccagct
1321 cccagcctcc tttgtggtgg ggctctgaca gcctctttaa taaaccagac attccacatg
1381 tgcttatgaa attaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

Anhang

Proteinvergleich FOLR1 human (EAW74851.1) und murin (EDL16538.1) Programm BLASTP2.2.28²⁴:

Length=255, Score = 421 bits (1082), Expect = 7e-154, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 201/257 (78%), Positives = 225/257 (88%), Gaps = 2/257 (1%)

```
human 1   MAQRMTTQLLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPW 60
        MA MT QLLLL+W+A   AQ+R   ARTELLNVCM+AKHHKEKPGPED LH+QC PW
murin 1   MAHLMTVQLLLLLVMWMAEC--AQSRA TRARTELLNVCM DAKHHKEKPGPEDNLHDQCSPW 58

human 61  RKNACCSTNTS QEAHKDVS YLYRFNWNHCGEMAPACKRHF IQDTCLYECS PNLGPWIIQQV 120
        + N+CCSTNTS QEAHKD+SYLYRFNWNHCG M   CKRHF IQDTCLYECS PNLGPWIIQQV
murin 59  KTNSSCSTNTS QEAHKDIS YLYRFNWNHCGTMTSECKRHF IQDTCLYECS PNLGPWIIQQV 118

human 121  DQSWRKERV LNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHK GWNWTS GFNKCAVGAACQPFHF 180
        DQSWRKER+L+VPLCKEDC+QWWEDC++S+TCKSNWHK GWNW+SG N+C VGA+C PF F
murin 119  DQSWRKERIL DVPLCKEDCQWWEDCQS SFTCKSNWHK GWNWSSGHN ECPVGASCHPFTF 178

human 181  YFPTPTVLC NEIWTSHSYKVS NYSRSGSGRCIQMWFDP AQGNPNEEVARFYAA AMSGAGPWA 240
        YFPT LC EIW+HSYK+SNYSRSGSGRCIQMWFDP AQGNPNEEVARFYA AMSGAG
murin 179  YFPTSAALCE EIWSHSYKLS NYSRSGSGRCIQMWFDP AQGNPNEEVARFYAE AMSGAGFHG 238

human 241  AWPFLLSLALMLLWLLS 257
        WP L SL+L+LLW++S
murin 239  TWPLLC SLSLVLLWVIS 255
```

EpCAM:

NCBI Reference Sequence: NM_002354.2

GI:218505669

LOCUS: NM_002354 1731 bp

mRNA

linear

PRI 23-APR-2012

DEFINITION: Homo sapiens epithelial cell adhesion molecule (EPCAM), mRNA.

```
ORIGIN: 1 aactgcagcg cgggggctgg gggaggggag cctactcact cccccaactc cggggcggtg
        61 actcatcaac gagcaccagc ggccagaggt gagcagtccc gggaaagggc cgagaggcgg
        121 ggccgccagc tggggcaggt gtgcgctccg ccccgcccg cgcacagagc gctagtcctt
        181 cggcgagcga gcaccttcga cgcggctccg ggacccccctc gtcgctgtcc tcccgacgcg
        241 gaccgcgctg ccccaggcct cgcgctgcc ggccggctcc tcgtgtccca ctcccggcgc
        301 acgcccctcc gcgagtccc ggccccctcc gcgcccctct tctcggcgcg cgcgcagcat
        361 ggcgcccccg caggtcctcg cgttcgggct tctgcttgc gggcgacgg cgacttttgc
        421 cgcagctcag gaagaatgtg tctgtgaaa ctacaagctg gccgtaact gctttgtgaa
        481 taataatcgt caatgccagt gtacttcagt tggtgacaaa aatactgtca tttgctcaa
        541 gctggctgcc aaatgtttgg tgatgaagc agaaatgaat ggctcaaac ttgggagaag
        601 agcaaacct gaaggggcc tccagaacaa tgatgggctt tatgatcctg actgcatga
        661 gagcgggctc ttaaggcca agcagtgcaa cggcacctcc atgtgctggt gtgtgaacac
        721 tgctggggtc agaagaacag acaaggacac tgaaataacc tgctctgagc gagtgagaac
        781 ctactggatc atcattgaac taaaacacaa agcaagagaa aaaccttatg atagtaaaag
        841 tttgcggact gcacttcaga aggagatcac aacgcggtat caactggatc caaaatztat
        901 cagcagatatt ttgtatgaga ataatgttat cactattgat ctggttcaaa attccttca
        961 aaaaactcag aatgatgtgg acatagctga tgtggcttat tattttgaaa aagatgttaa
        1021 aggtgaatcc ttgtttcatt ctaagaaaat ggacctgaca gtaaatggg aacaactgga
        1081 tctggatcct ggtcaaacct taatattatta tggttgatgaa aaagcacctg aattctcaat
        1141 gcagggctca aaagctggtg ttattgctgt tattgtggtt gtggtgatag cagttgttgc
        1201 tggaaattgt gtgctggtta tttccagaaa gaagagaatg gcaaagtatg agaaggctga
        1261 gataaaggag atgggtgaga tgcataggga actcaatgca taactatata atttgaagat
        1321 tatagaagaa gggaaatagc aaatggacac aaattacaaa tgtgtgtgctg tgggacgaag
        1381 acatctttga aggtcatgag tttgtagt taacatcata tatttgtaat agtgaaacct
        1441 gtactcaaaa tataagcagc ttgaaactgg ctttaccat cttgaaatgt gaccacaagt
        1501 gtcttatata tgcagatcta atgtaaaatc cagaacttgg actccatcgt taaaattatt
        1561 tatgtgtaac attcaaatgt gtgcattaaa tatgcttcca cagtaaaatc tgaaaaactg
        1621 atttgtgatt gaaagctgcc tttctattta cttgagctct gtacatacat acttttttat
        1681 gagctatgaa ataaaacatt ttaaaactgaa tttcttaaaa aaaaaaaaaa a
```

Tab. 6.1-2: Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten *forward* (for) und *reverse* (rev) Primer für die Analyse der Gentranskription mittels PCR.

Gen	Ursprung	Primersequenz (Sequenzlänge)	Molare Masse [g/mol]	Schmelztemperatur [°C]	GC-Gehalt	Produktlänge
HPRT	<i>human</i>	for: 5'aag ctt gct ggt gaa aag ga3' (20)				263 bp
		rev: 5'aag cag atg gcc aca gaa ct3' (20)				
GAPDH	<i>murin</i>	for: 5'aac ttt ggc att gtg gaa gg3' (20)				224 bp
		rev: 5'aca cat tgg ggg tag gaa ca3' (20)				
c-erbB2 (HER-2/neu)	<i>human</i>	for: 5'tgc ggc tcg tac aca ggg act t3' (22)	6751	64,0	59,1%	420 bp
		rev: 5'tgc ggg aga att cag aca cca act3' (24)	7370	62,7	50%	
c-erbB2 (HER-2/neu)	<i>murin</i>	for: 5'cct caa aac agc tcg gag ac3' (20)	6079	59,4	55%	124 bp
		rev: 5'agg aga ggt ctg gct tca ca3' (20)	6182	59,4	55%	
FOLR1	<i>human</i>	for: 5'agt agg gga ggc tca gac aag gat3'(24)	7515	64,4	54,2%	497 bp
		rev: 5'tgg gga agt aga aat gga aag gtt3'(24)	7569	59,3	41,7%	
FOLR1	<i>murin</i>	for: 5'atg caa acg gca ctt tat cc3' (20)	6060	55,3	45%	334 bp
		rev: 5'gct ccc tcg act gta gtt gc3' (20)	6059	61,4	60%	
EpCAM	<i>human</i>	for: 5'ctg cca aat gtt tgg tga tg3' (20)	6163	55,3	45%	332 bp
		rev: 5'acg cgt tgt gat ctc ctt ct3' (20)	6049	57,3	50%	

Enzyme und ihre zugehörigen Puffer

M-MLV Reverse Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim
5x M-MLV Reverse Transkriptase Puffer	Promega GmbH, Mannheim
GoTaq Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
5x Green GoTaq Reaktionspuffer	Promega GmbH, Mannheim

Weitere Chemikalien für die Analyse der Gentranskription

Oligo(dt) ₁₂₋₁₈ Primer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
dNTP Mix (100 mM)	Fermentas
RNase freies Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Gelelektrophorese

Agilent DNA 7500 kit	Agilent Technologies, Inc., Waldbronn
Roti-Safe GelStain	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarosegel	TAE-Puffer 1 - 2% Agarose 5 min bei 800 Watt in der Mikrowelle aufkochen Leicht abkühlen 5 µL/100 mL Roti-Safe GelStain oder 10 µL/100 mL Ethidiumbromid

Native Polyacrylamidgelelektrophorese

15 % Trenngel	1875 µL 40% Acrylamid/Bisacrylamid Gemisch (37,5:1) 500 µL dH ₂ O 1400 µL Tris-HCl (1,5 M, pH = 8.8) 1225 µL dH ₂ O 10 µL Tetramethyldiamin 10 µL Ammoniumpersulfat
---------------	--

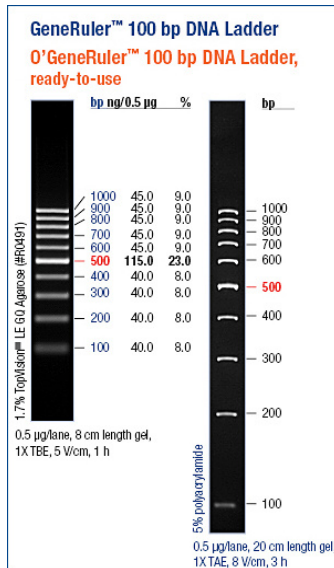
Anhang

6 % Sammelgel

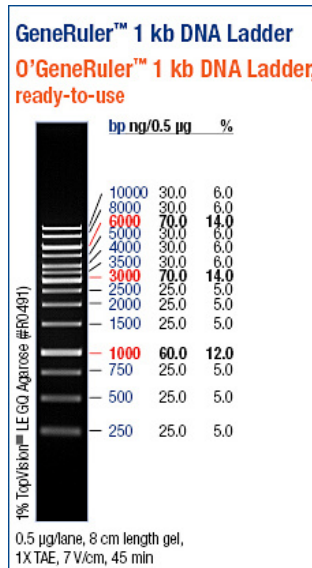
750 µL 40 % Acrylamid/Bisacrylamid Gemisch (37,5:1)
 300 µL dH₂O
 630 µL Tris-HCl (0,5 M, pH = 6.8)
 3770 µL dH₂O
 10 µL Tetramethylendiamin
 10 µL Ammoniumpersulfat

Größenstandards²⁵

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder
 (Thermo Scientific)



GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
 (Thermo Scientific)



6.1.9 Antikörper, Aptamere und Quantum Dots

Antikörper für die Charakterisierung der Zellen

<i>Human</i> anti-HER-2/neu FITC, IgG1	Klon: Neu 24.7	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Mouse</i> IgG1, κ Isotypkontrolle FITC		BD Biosciences, Heidelberg
anti- <i>human</i> FOLR1 PE, IgG1	Klon 548908, Lot: ABIN02	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
<i>Mouse</i> IgG1, κ Isotypkontrolle PE		BD Biosciences, Heidelberg
anti-EpCAM PerCP-Cy5.5, IgG1	Klon: EBA-1	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Mouse</i> IgG1, κ Isotypkontrolle PerCP-Cy5.5		BD Biosciences, Heidelberg

Antikörper für die Konjugation mit Nanopartikeln

anti-HER2	E2777, Lot: 110M4772	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
anti-HER2* (IgG)	Klon: SP3 enthält Proclin300	Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA
anti-EGFR	Klon: 225, Lot: 089K4825	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

²⁵ <http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-purification-and-electrophoresis/nucleic-acid-electrophoresis/dna-electrophoresis/generuler-dna-ladders>

Anhang

anti-FOLR1 (IgG1)	Klon 548908 Lot:CCQX0411051	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt
anti-EpCAM (IgG1)	SAB4700423, Lot: 515645	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Mouse IgG1	02-6502	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Aptamere

S6-Cy5	Extinktionskoeff: $838 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH, Frankfurt/Main
S6-Amino (C6)	Extinktionskoeff: $828 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH, Frankfurt/Main
S15-Cy5	Extinktionskoeff: $835 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH, Frankfurt/Main
S15-Amino (C6)	Extinktionskoeff: $825 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH, Frankfurt/Main
S6 Kontrolle1-Cy5	Extinktionskoeff: $815 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH, Frankfurt/Main
Mal1 Kontrolle-Amino (C6)		BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH, Frankfurt/Main

Nanopartikel

Hexadecylamin-Quantum Dots (CdSe/ZnS)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Polyamidoamin Generation 5		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
QDotITK™ Carboxyl-Quantum Dots 655 nm (CdSe/ZnS)		Life Technologies GmbH, Darmstadt

6.1.10 Verbrauchsmaterial

Gewebekulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² Wachstumsfläche)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Sterile Gewebekulturplatten aus Polystyrol (6-Well, 24-Well, 96-Well)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Corning Inc., NY, USA
Reaktionsgefäße (1 mL, 2 mL)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Stripette Pipetten (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL)	Corning Inc., NY, USA
Stripette Pipette (50 mL)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pasteurpipette (150 mm)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Zellsieb (70 µm Nylon)	BD Biosciences, Heidelberg
CryoPure-Gefäße 2 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Multipette-Aufsätze: Combitips Biopur (5 mL, 10 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilfilter für Medium: Filtropur L 0,2 S	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Sterilfilter für Spritzen: Minisart High-flow, single use syringe filter (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen

Anhang

Spritzen (2 mL, 5 mL, 10 mL, 50 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pipettenspitzen (10µL, 20-200 µL, 1000 µL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
quadiPERM	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt
Glas Petrischale	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Braunglas Fläschchen 4 mL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Braunglas Fläschchen 1,5 mL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
8 Chamber Glass Slides	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Vivaspin 0,5 mL Zentrifugaleinheiten 50 kDa MWCO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Vivaspin 0,5 mL Zentrifugaleinheiten 100 kDa MWCO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Vivaspin 0,5 mL Zentrifugaleinheiten 300 kDa MWCO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Vivaspin 0,5 mL Zentrifugaleinheiten 0,2 µm PES	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Omnifix-F 1 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Unsterile 96-Wellplatten	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
ITO Glas	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

6.1.11 Geräte

Nano Plotter NP 2.1 (kontaktfrei)	Gesim, Großkrummannsdorf
Reinstwasseranlage: Arium 611 uf uv	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
pH-Meter: HI 221 Calibration Check Microprocessor pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Scanner: GenePix 4000B	Axon Instruments, Foster City, CA, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifuge: Optima 100, Rotor: 100.4 TLA	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Lyophile: Alpha 1-4 LSC	Martin Christ GmbH, Osterode
Zentrifuge für Reaktionsgefäße 1-2 mL: minispin plus	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge für Reaktionsgefäße 15-50 mL: Centrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg
Inkubator: Heracell 240	Thermo Electron Corporation, Karlsruhe
Sterilbank: Herasafe	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Vakuumpumpe an der Sterilbank: Laboport	KnFLab Trenton, USA
Pumpe für die Sterilfiltration von Medium: Tandem Modell 1081	SciLog. Inc, Madison, USA
Fluoreszenzmikroskop: Olympus IX50	Olympus Corporation, Tokio
Kamera am Fluoreszenzmikroskop alt: C3040-ADU	Olympus Corporation, Tokio
Kamera am Fluoreszenzmikroskop neu: Olympus SC 30	Olympus Corporation, Tokio
Absorption-Plattenleser: Microplate Reader Benchmark Model 680	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluoroskan Ascent	Thermo Electron Corporation, Karlsruhe

Anhang

Multipette Stream	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDrop Fluorospectrometer 3300	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Homogenisator: Ultra Turrax, IKA T10 basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Inc., Waldbronn
PCR-Thermocycler	VWR International GmbH, Darmstadt
Agarosegel-Elektrophorese Einheit	Thermo Electron Corporation,
INTAS UV Dokumentationssystem	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
PAGE: Protean III Elektrophorese Einheit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Durchflusszytometer: Coulter EPICS XL-MCL	Becton Coulter Corporation, Miami, Florida
Dynamic Light Scattering: Nanoseries-Nano-ZS	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg
Rasterelektronenmikroskop: JSM 6700F NT	
Mehrkanalpipette: Transferpette 30-300 µL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipetten: 1-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettierhilfe: Accujet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortexer: IKA MS3 basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad	VWR International GmbH, Darmstadt

6.1.12 Software

Nano Plotter NP 2.1: NPC16 V2.15.46	Gesim, Großkramsdorf
Scanner: GenePix Pro	Axon Instruments, Foster City, CA, USA
Primer-Design: OligoPerfect™ Designer	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Standard Nucleotide BLAST, Standard Protein BLAST	National Center for Biotechnology Information (NCBI)
Kammerprogramm Mikroskop alt: Cell^B	Olympus Corporation, Tokio
Kammerprogramm Mikroskop neu: cellSens Standard	Olympus Corporation, Tokio
Absorption-Plattenleser: Micrplate Manager 5.2.1	BioRad Laboratories GmbH
Fluoroskan Ascent: Ascent Software Version 2.6	Thermo Fisher Scientific Inc.,
Auswertung Durchflusszytometer: WinMDI 2.9	
OriginPro 8G	
CorelDraw 12	
Corel Photo-Paint 12	
GNU Image Manipulation Program (GIMP 2.8)	
EndNote X2	

6.2 Methoden

6.2.1 Zellkulturtechniken

6.2.1.1 Revitalisieren der Säugetierzellen

Das Kryoröhrchen mit den tiefgefrorenen Zellen wird dem Kryotank entnommen und durch Schwenken im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. In das Kryoröhrchen wird langsam 1 mL kaltes Kulturmedium hineingetropt und 1 min gewartet. Diese Zellsuspension wird dann in ein Reaktionsgefäß mit 6 mL kaltem Kulturmedium überführt und die Zellen werden bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Um das Dimethylsulfoxid zu entfernen, das ein Bestandteil des Kryomediums war (siehe Kapitel 6.2.1.3), wird der Überstand vorsichtig entfernt. Das Zellpellet wird in 5 mL frischem, warmem Kulturmedium suspendiert und die Zellsuspension in eine Kulturflasche (75 cm² Wachstumsfläche) überführt. Weitere 10 mL Kulturmedium werden in die Kulturflasche gegeben und auf der Wachstumsoberfläche durch Schwenken verteilt. Die Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am folgenden Tag wird die Adhäsion der Zellen kontrolliert. Ist der Großteil der Zellen adhäriert, wird das Medium gewechselt. Hierfür wird das Medium aus der Flasche entfernt. Die Zellen werden einmal mit 8 mL warmem 1x PBS gewaschen, indem der Puffer so in die Kulturflasche gegeben wird, dass er nicht die Zellen von der Wachstumsoberfläche abwaschen kann. Die Kulturflasche wird verschlossen und vorsichtig so geschwenkt, dass der Puffer die alten Medium- und Dimethylsulfoxidreste von den Zellen abwäscht. Schließlich werden 10 mL frisches, warmes Kulturmedium in die Kulturflasche gegeben und die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchte kultiviert.

6.2.1.2 Kultivierung und Passage der Säugetierzellen

Als Zellpassage oder Splitten bzw. Subkultivierung wird das Aufteilen von Zellen in mehrere Kulturgefäße bezeichnet. Bei Suspensionszellen wird hierfür ein Teil der Zellkultur entnommen und mit frischem Medium in einem anderen Kulturgefäß (Reaktor, Spinnerflasche etc.) versetzt. Um adhärente Zellen auf mehrere Kulturgefäße aufteilen zu können, müssen sie von ihrer Kulturoberfläche abgelöst werden. Die Zellpassage erfolgt, wenn die Kulturoberfläche zu 80 % konfluent bewachsen ist, was bei sich schnell teilenden Zellen nach 2 - 3 Tagen erreicht ist. Werden die Zellen nicht passagiert, wird bei vollständiger Konfluenz die Proliferation gehemmt (Kontaktinhibierung), da kein Platz mehr für eine ausreichende Adhäsion gegeben ist und die Nährstoffe knapp werden. Zusätzlich werden die Zellen durch ihre eigenen Stoffwechselprodukte vergiftet. Die Zellen sterben.

Sind die Zellen zu konfluent gewachsen, sind sie nur schwer abzulösen und zu vereinzeln, welches die Bestimmung der Zellzahl erschwert und zu einer ungleichmäßigen Aussiedelung der Zellen führt.

Bei manchen Zellen, wie den HEK-293, reicht ein kräftiges Klopfen an der Kulturflasche aus, um die Adhäsion der Zellen zu stören und sie abzulösen. Die meisten Zellen müssen jedoch abgelöst werden, indem Enzymlösungen, wie z.B. eine Mischung von Trypsin und EDTA (2 mL), auf die Zellen gegeben wird²⁶. Zuvor werden die Zellen mit warmem 1x PBS (8 mL) gewaschen, da ohne diesen Waschschrift das Enzym die Zellen nur unzureichend erreichen kann und die Zellen nicht abgelöst werden. Die Protease Trypsin greift die Zellmembran an und hydrolysiert Peptidbindungen, sodass sich die Zellen bei 37 °C von der Kulturoberfläche ablösen. Da Moleküle wie z.B. Integrine, die an der Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Interaktion beteiligt sind, von Calcium- und Magnesiumionen stabilisiert werden, wird die Ablösung der Zellen beschleunigt, wenn die Kationen durch EDTA gebunden werden. Bei zu langem Kontakt mit Trypsin sterben die Zellen, sodass eine Inaktivierung des Trypsins nach 5 min erfolgt. Die Ablösung der Zellen kann zusätzlich durch Klopfen an der Kulturflasche unterstützt werden. Die Wirkung des Trypsins wird durch Zugabe von frischem Kulturmedium (8 mL) aufgehoben. Das Trypsin reagiert nur noch mit dem Serum in dem Medium, die Zellen werden nicht mehr angegriffen. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Medium-Trypsin-Gemisches werden die Zellen suspendiert. Eine geringe Menge abgelöster Zellen wird dann in ein neues Kulturgefäß mit frischem Medium gegeben und weiterkultiviert, während der Rest entweder verworfen oder für Versuche verwendet wird.

Die Zelldichte (Zellen/mL) wird mit Hilfe einer Neubauer Improved Zählkammer (Brand GmbH, Wertheim) ermittelt. Hierfür wird zunächst ein Deckgläschen auf die geringfügig befeuchteten Seitenstege der Zählkammer geschoben, sodass das Deckgläschen an der Kammer haftet und ein definierter Raum zwischen Deckgläschen und Kammer gebildet wird. Wenige Mikroliter Zellsuspension (~ 8µL) werden an die Deckgläschenkante auf den Mittelsteg pipettiert. Durch Kapillarkräfte wird die Suspension in den Zählraum befördert. Es werden alle vier Großquadrate jeweils bestehend aus 16 Kleinquadraten ausgezählt und der Mittelwert der gezählten Zellen berechnet. Dieser Mittelwert wird mit 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu ermitteln. Mögliche Verdünnungen müssen beachtet werden.

²⁶ http://www.carlroth.de/website/de-de/pdf/Zellpassage_Trypsin.pdf

Eine Masterzellbank kann angelegt werden, indem bei der 1. Passage die Zellen auf mehrere Kulturgefäße aufgeteilt werden. Somit wird eine große Zellzahl bei der 2. Passage erhalten, die eingefroren werden kann. Die Menge abgelöster Zellen, die in ein neues Kulturgefäß gegeben wird, richtet sich nach den in Kapitel 6.1.1 angegebenen Splitverhältnissen. Bei einer zu dichten Aussaat müssen die Zellen sehr bald erneut geteilt werden, bei einer zu dünnen Aussaat können sie aufgrund von Vernachlässigung infolge mangelnder Zell-Zell-Kontakte nur schlecht wachsen und sogar apoptotisch werden. Die Passagennummer erhöht sich bei jeder Teilung der Kultur um 1, welches bei der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse beachtet werden muss, da sich die Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer verändern können. So zeigen Primärzellen z.B. ab der 20. Passage eine verlangsamte Proliferation. Empfindlichere Zellen, wie die Primärzellen und die MCF-7 Zellen werden nach dem Ablösen für 5 min bei 300 g zentrifugiert und in frischem Kulturmedium suspendiert. Auf diese Weise werden das Trypsin und EDTA entfernt. Insbesondere MCF-7 Zellen zeigen ohne diesen Schritt eine deutlich verlangsamte Proliferation nach wenigen Passagen.

6.2.1.3 Kryokonservierung von Säugetierzellen

Die Kryoröhrchen werden mit dem Zellnamen, der Passagenzahl, dem Datum und dem Kürzel des Einfrierenden beschriftet und in einem Ständer in den Kühlschrank gestellt. Ein Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container wird mit 250 mL 70 %igem Isopropanol befüllt und ebenfalls gekühlt. Das Kryomedium setzt sich zusammen aus 10 % Dimethylsulfoxid, 70 % Kulturmedium und 20 % Serum. Die Zellen werden mit Trypsin oder Accutase abgelöst, bei 400 g für 3 min zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird in kaltem Kryomedium aufgenommen und die Zellen vorsichtig suspendiert. In jedes Kryoröhrchen wird 1 mL Suspension mit $1-2 \cdot 10^6$ Zellen gegeben, 40 µL der Suspension wird in einem Reaktionsgefäß aufgehoben und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer ermittelt. Die Kryoröhrchen werden gut verschlossen in den Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container gestellt und für 24 h bei -80 °C eingefroren. Da Dimethylsulfoxid toxisch auf die Zellen wirkt, müssen die Schritte nach der Zugabe des Kryomediums zu den Zellen schnell erfolgen, um zu verhindern, dass es zu einer toxischen Wirkung dieses Mediumzusatzes kommt. Dimethylsulfoxid verhindert die Bildung von Eiskristallen innerhalb der Zelle, welches zu einer Zerstörung der Zellstruktur führen würde. Für eine Langzeitlagerung werden die tiefgefrorenen Kryoröhrchen in einen mit flüssigem Stickstoff befüllten Kryotank mit -196 °C überführt. Die Daten der Kryoröhrchen werden dokumentiert.

6.2.2 Transformation von prokaryotischen und Transfektion von eukaryotischen Zellen

Mit Hilfe der Transformation wird Fremd-DNA (hier Plasmid mit einem EGFP-Gen) in prokaryotische Zellen eingeschleust. Unter Normalbedingungen nehmen Bakterienzellen jedoch nur sehr schlecht DNA auf, weshalb die Zellen vor der Durchführung einer Transformation kompetent gemacht werden müssen. Eingeschleuste Vektoren werden mit jeder Zellteilung vermehrt, sodass aufgrund der kurzen Verdopplungszeiten der Bakterien sehr schnell große Mengen Plasmid erhalten werden. Die Transfektion von eukaryotischen Zellen dient ebenfalls dem Einschleusen von Fremd-DNA in eine Zielzelle. Beide Methoden werden verwendet, um rekombinante Proteine in großen Mengen herzustellen. Die in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsmethoden sind nicht viral und werden somit als transient bezeichnet. Das bedeutet, dass die Fremd-DNA nicht in das Genom der eukaryotischen Zielzelle integriert wird. Infolge dessen sinkt bereits nach wenigen Tagen die Proteinproduktion ab, da die Fremd-DNA degradiert oder die transfizierten Zellen altersbedingt sterben. Eine Auswahl der produzierten Zellen findet nicht statt.

6.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen mittels TSS-Methode

20 mL LB-Medium werden mit 100 µL kompetenter *E. coli* Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 130 rpm kultiviert. Mit 1 mL dieser Übernacht-Vorkultur werden 100 mL LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer OD₅₈₀ von 0,5 AU kultiviert. Die Zellen werden geerntet, indem die Zellsuspension für 10 min bei 4 °C und 1000 g zentrifugiert wird. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet bei 4 °C zwischengelagert. Das Pellet wird in 10 mL eiskaltem TSS suspendiert und aliquotiert. Die Aliquots á 100 µL werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

6.2.2.2 Transformationen von *E. coli*

In dieser Arbeit wird zunächst das in geringer Menge zur Verfügung stehende pTriEx-EGFP Plasmid mit Hilfe des *E. coli* XL1-Blue Stammes amplifiziert, um ausreichende Plasmidmengen für die spätere Proteinproduktion in *E. coli* BL21 (DE3) herzustellen. 100 µL kompetente Zellen werden langsam bei 4 °C aufgetaut. 20 ng Plasmid (in TE-Puffer) werden hinzugegeben und das Gemisch für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen als Hitzeschock für 2 min bei 42 °C inkubiert und dann für 5 min bei 4 °C abgekühlt, bevor 800 µL LB-Medium hinzugegeben werden. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C werden die Zellen bei 10.000 rpm für 1 min zentrifugiert und ein Teil des Überstandes abgenommen. In

den verbliebenen 100 μ L Flüssigkeit wird das Zellpellet suspendiert. Die Zellsuspension wird gleichmäßig auf einer LB-Agar-Platte (mit 100 μ g/mL Ampicillin) ausgestrichen und die Zellen im Inkubator bei 37 °C über Nacht kultiviert. Aus den einzelnen transformierten Zellen bilden sich Kolonien, deren Zellen identische Kopien der ersten transformierten Zelle sind.

6.2.2.3 Herstellung einer Gefrierkultur von *E. coli*

20 mL LB-Medium (mit 75 μ g/mL Ampicillin) wird in einem Schüttelkolben mit Schikanen mit einer einzelnen Kolonie der LB-Agar-Platte angeimpft. Die Zellen werden über Nacht bei 37 °C und 130 rpm kultiviert. Die Zellsuspension (Vorkultur) wird mit dem gleichen Volumen Glycerin vermischt, aliquotiert und 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Gefrierkulturen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

6.2.2.4 Kultivierung von *E. coli*

Für die Vorkultur kann nicht nur eine Kolonie auf der LB-Agar-Platte verwendet werden sondern auch ein Aliquot (500 μ L) einer Gefrierkultur. 20 mL LB-Medium (mit 75 μ g/mL Ampicillin) werden in einem Schüttelkolben mit Schikanen mit der Gefrierkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Für die Plasmidamplifikation wird jeweils 1 mL der *E. coli* XL1-Blue Vorkultur zum Animpfen von vier Hauptkulturen mit 100 mL LB-Medium (mit 75 μ g/mL Ampicillin) in Schüttelkolben mit Schikanen verwendet. Die Hauptkultur wird bei 37 °C und 130 rpm für 18 h kultiviert. Anschließend wird jede Hauptkultur auf zwei 50 mL-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei 4000 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Bis zur Plasmidaufreinigung mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits werden die Zellpellets bei -20 °C gelagert.

Für die GFP-Expression in den mit dem pTriEx-EGFP-Plasmid transformierten *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurden zwei Hauptkulturen mit 150 mL LB-Medium (mit 75 μ g/mL Ampicillin) mit jeweils 3 mL der entsprechenden Vorkultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C und 130 rpm in Schüttelkolben mit Schikanen kultiviert. Bei einer OD₅₈₀ von 0,8 AU wurde die Überexpression des EGFPs durch Zugabe von 1 mL IPTG (200 mM) induziert. Nach 4,5 h Proteinexpression wurde eine Zellkulturprobe mit dem Fluoreszenzmikroskop unter UV-Bestrahlung und Verwendung des U-MNB Filters, BP470-490 (Anregungsfilter), BA515 (Barrierefilter) betrachtet. Die übrige Kulturbrühe wurde in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4000 rpm für 20 min bei 4 °C

zentrifugiert. Unter UV-Strahlung betrachtet, leuchtete das Zellpellet ebenfalls grün. Das Zellpellet wird für weitere Versuche bei -20 °C gelagert (siehe Kapitel 6.2.3.1).

6.2.2.5 Plasmid-Aufreinigung

Die bei -20 °C gelagerten Zellpellets der *E. coli* XL1-Blue Hauptkultur (Kapitel 6.2.2.4), deren Zellen mit dem Plasmid pTriEx-EGFP transformiert worden sind, werden aufgetaut. Die Plasmid-Aufreinigung erfolgt mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit unter Befolgung des Herstellerprotokolls²⁷. Die Zellpellets werden in 4 mL Puffer P1 (mit zugesetzter RNase A und LyseBlue Reagenz) durch auf- und abpipettieren suspendiert, bis keine Klumpen übrig sind. Die Zellsuspension des ersten Pellets wird auf das zweite Pellet derselben Hauptkultur gegeben und die Suspendierung wiederholt. Um die vollständig suspendierten Bakterien zu lysieren, werden 4 mL des Puffers P2 hinzugegeben und die Flüssigkeiten durch sechsmaliges Invertieren der Zentrifugenröhrchen gut vermischt. Hierbei entsteht eine homogen blau gefärbte Suspension. Die Lyse findet für 5 min bei Raumtemperatur statt. 4 mL von Puffer P3 werden hinzugegeben und das Gemisch sofort durch sechsmaliges Invertieren des Zentrifugenröhrchens vermischt. Das Gemisch wird für 15 min bei 4 °C inkubiert, wodurch das unlösliche Material als weiße Flocken ausfällt und die Suspension wieder farblos wird. Die Probe wird erneut vermischt und bei 4000 g für 1,5 h bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand enthält die Plasmide und wird in ein neues 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und erneut bei 4000 g für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wird auf die zuvor mit 4 mL Puffer QBT equilibrierte Qiagen Tip 100 Säule aufgetragen. 240 µL des Lysats werden für die spätere Analyse mittels Agarosegelelektrophorese aufbewahrt. Das auf die Säule aufgetragene Lysat fließt mittels Schwerkraft durch die Säule. Von der Durchflussfraktion wird ebenfalls eine 240 µL Probe entnommen, um Auskunft über die Bindungseffizienz der Säule zu erhalten. Die gebundene DNA wird zweimal mit jeweils 10 mL Puffer QC gewaschen. Von der Gesamtwaschfraktion wird ebenfalls eine Probe entnommen. Die DNA wird mit 5 mL von Puffer QF in ein neues 15 mL-Zentrifugenröhrchen eluiert. Auch von dem Eluat wird eine Probe entnommen, die später analysiert wird. Die DNA wird gefällt, indem 3,5 mL Isopropanol (Raumtemperatur) zu dem Eluat gegeben werden, die Flüssigkeiten gemischt und sofort bei 4000 g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert werden. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert, sodass das lose durchsichtige Gel-ähnliche DNA-Pellet in dem Zentrifugenröhrchen verbleibt. Das DNA-

²⁷ <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/plasmid-dna/qiagen-plasmid-midi-kit#resources>

Pellet wird mit 2 mL 70 %igem Ethanol (Raumtemperatur) gewaschen und bei 4000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig verworfen ohne das DNA-Pellet zu zerstören. Das Pellet wird für 10 min luftgetrocknet und die DNA in 50 µL TE-Puffer durch schwenken suspendiert. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wird mittels NanoDrop 1000 Spektrophotometer bestimmt. Zudem werden die verschiedenen Fraktionen zusammen mit einem GeneRuler™ 1 kb DNA Größenstandard auf ein 1 %iges Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen (vgl. Kapitel 6.2.5.4).

6.2.2.6 Restriktion zur Plasmid-Identifizierung

Wird aus einem Plasmid ein DNA-Fragment mit Hilfe von Restriktionsenzymen ausgeschnitten, entstehen meist zwei Fragmente definierter Länge. Stimmen die Fragmentlängen des Verdauens mit den theoretischen Größen laut der Plasmidkarte überein, ist davon auszugehen, dass es sich um das gewünschte Plasmid handelt. Daher erfolgt in dieser Arbeit die Restriktion des mittels Plasmid Midi Kit isolierten pTriEx-EGFP Plasmids durch die zwei Enzyme NcoI und XhoI, um das EGFP-Gen auszuschneiden und das Plasmid zu identifizieren. Laut Plasmidkarte (siehe Kapitel 6.1.6) schneiden die ausgewählten Enzyme an den Positionen 1 und 859 des 6376 bp großen Plasmids, sodass ein 859 bp großes Fragment und ein 5517 bp großes Fragment entstehen. Für die Restriktion werden 700 ng Plasmid-DNA mit 2 µL 2x Tango-Puffer und jeweils 1 µL der Enzyme NcoI und XhoI vermischt und mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µL aufgefüllt. Die Restriktion findet für 1 h bei 37 °C statt. Anschließend werden die Proben (20 µL) mit 10 µL 2x Ladepuffer (mit Ethidiumbromid) gemischt und zusammen mit einem GeneRuler™ 1 kb DNA Größenstandard auf ein 1 %iges Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen.

6.2.2.7 Transfektionen von NIH-3T3 und HEK-293 Zellen

Die Lipofektion von NIH-3T3 Zellen mit Metafecten erfolgt dem optimierten Protokoll einer vorangegangenen Masterarbeit²⁸ entsprechend. Es werden 300.000 Zellen in einem Well einer 6-Well Platte in 3 mL Medium ausplattiert und 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Für die Lipofektion werden 1,5 µL MetafectenePro in 50 µL PBS verdünnt. Ebenfalls in 50 µL PBS wird 0,5 µg Plasmid pEGFP-N1 gelöst. Die Plasmidlösung wird vorsichtig zu der Lipidlösung gegeben und dieses Gemisch 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wird es zu den vorbereiteten Zellen gegeben, welche weitere 24 h mit

²⁸ Masterarbeit, 'Expression des rekombinanten Wachstumsfaktors TGF-β in hochproduzierenden Säugetierzellen', M.Sc. Sabrina Baganz, 2013

der DNA-Lipid-Lösung inkubiert werden. Die Transfektionseffizienz wird mittels Fluoreszenz-mikroskop und dem U-MNB Filter, BP470-490 (Anregungsfilter), BA515 (Barrierefiter) bestimmt.

Die Lipofektion und NIH-3T3 Zellen haben sich als ungeeignetes Transfektionssystem herausgestellt. Da HEK-293 Zellen zuvor erfolgreich mittels Polyfektion transfiziert worden sind²⁸, wird anschließend dieses System verwendet. Für die Polyfektion wird das Protokoll des *GeneJuice Transfection Reagent* von Novagen befolgt. Hierfür werden 300.000 HEK-293 Zellen einen Tag vor der Transfektion in Zellkulturflaschen (25 cm²) ausgesät. In 300 µL serumfreies DMEM werden tropfenweise 15 µg Polyethylenimin (PEI) gegeben, das Gemisch gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 5 µg Plasmid werden hinzugefügt und vorsichtig mittels Pipettieren untergemischt. Diese Mischung wird bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Das gesamte Volumen wird dann tropfenweise über die von Zellen besiedelte Fläche in der mit 5 mL Medium versehenen Kulturflasche gegeben. Eine bessere Verteilung der Reagenzien wird durch vorsichtiges Schwenken erzielt. Die Zellen werden für 48 h mit der DNA-PEI-Lösung inkubiert. Nach 24 h wird ebenfalls die Transfektionseffizienz bestimmt. Auch nach dem Drucken der Zellsuspension auf die Lebendzell-Microarrays werden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich ihrer EGFP-Produktion untersucht.

6.2.3 Herstellung von Lebendzell-Microarrays

6.2.3.1 Herstellung prokaryotischer Zell-Microarrays

Zunächst wird ein *E. coli* BL21 (DE3) Zellpellet (Zellen mit dem pTriEx-EGFP Plasmid transformiert siehe Kapitel 6.2.2.2 und kultiviert siehe Kapitel 6.2.2.4) aufgetaut und in 5 mL PBS suspendiert. Ein autoklavierter Objektträger wird anschließend mit einem abnehmenden Volumen (1600, 800, 400, 200, 100 und 50 Tropfen) dieser Suspension jeweils mit einem Replikat bedruckt. Hierfür werden folgende Spottereinstellungen gewählt:

Workplate: Rebecca_16Pad_a
Edit Spot Layout: Left = 5.000, Top = 3.000, Right = 5.000, Bottom = 3.000
„Top“-Einstellung ändert sich von Reihe zu Reihe jeweils um 9.000, wenn nur eine Reihe (2 Wells) gespottet wird
„Left“-Einstellung ändert sich von Spalte 1 zu Spalte 2 um 9.000, wenn die Reihe gewechselt wird
Rows per Spot: 16
Columns per Spot: 16
Spot Row Distance: 0.400
Spot Column Distance: 0.400
Rows of Blocks: 1
Columns of Blocks: 2
Block Row Distance: 9.000
Block Column Distance: 9.000

y-Dimension Block: 6.000
x-Dimension Block: 6.000

y-Dimension All Blocks: 6.000
x-Dimension All Blocks: 15.000

Transfer List: Rebecca_A549_16pad-test.TXT

Mtp = MTP_Sys

Reset wells

Group = Miri28okt09

Reset spots t A1 9,9

Target distance move: 15 mm

Target distance spot: 10 mm

Der Microarray wird luftgetrocknet und im grünen Kanal ($\lambda_{\text{EX}}=532$ nm) mit dem Microarray-Scanner gescannt. Das Spotten wird mit einer frisch kultivierten *E. coli* BL21 (DE3) Kultur (Zellen mit dem pTriEx-EGFP Plasmid transformiert siehe Kapitel 6.2.2.2) mit lebenden Zellen wiederholt, wobei der Glasobjektträger zuvor mit einer dünnen Schicht LB-Agar beschichtet worden ist. Hierfür wird mit einem Fettstift ein Rahmen auf dem Objektträger gezogen, in welchen 1 mL des noch flüssigen LB-Agars pipettiert und gleichmäßig verteilt wird. Der mit transformierten prokaryotischen Zellen bedruckte Microarray wird für zunächst 18 h dann nochmals für 24 h bei 37 °C inkubiert. Der Microarray wird sowohl mit dem Microarray-Scanner gescannt als auch unter UV-Strahlung betrachtet.

6.2.3.2 Herstellung eukaryotischer Lebendzell-Microarrays

Alle Bestandteile des Microarraysystems (Microarray-Oberflächen, Inkubationskammern) werden vor den Versuchen sterilisiert (1 h Isopropanol oder autoklavieren). Autoklavierte Aldehyd-modifizierte Objektträger werden unter sterilen Bedingungen in Nexterion IC-16 Inkubationskammern befestigt, welche in autoklavierten Glas-Petrischalen mit Nocken gelagert und inkubiert werden. Der Nanoplotter-Innenraum sowie die Mikropipette und alle weiteren Materialien werden mit Isopropanol sterilisiert.

In die so präparierten Wells des Microarrays wird mit den Spottereinstellungen, die in Kapitel 6.2.3.1 beschrieben sind, die Zellsuspension mit dem gewünschten Volumen (in der Regel 50, 100, 200, 400, 800, 1600 Tropfen) gespottet. Zum Spotten werden die Microarrays aus den Glas-Petrischalen genommen und in den Nanoplotter gelegt. Direkt nach dem Spotten werden sie wieder in die Petrischalen gelegt, um eine möglichst hohe Sterilität zu gewährleisten. Die Lebendzell-Microarrays werden für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, die Zellen dann in Ethanol fixiert (siehe Kapitel 6.2.4.7), die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) gefärbt (siehe Kapitel 6.2.4.8) und die Fluoreszenzmikroskopaufnahmen qualitativ ausgewertet.

Zunächst werden während der direkten Immobilisierung der Zellen die Dauer zwischen dem Spotten und dem Hinzufügen von 200 µL Kulturmedium (0 min, 1,5 min und 5 min) sowie

die Luftfeuchtigkeit (keine Regulierung und 60 %) variiert. Für die weiteren Experimente wird die optimierte Immobilisierungsprozedur verwendet: Direktes Spotten auf die Microarray-Oberfläche, keine Regulierung der Luftfeuchtigkeit und 1,5 min „Trocknungszeit“ vor der Zugabe von 200 µL Kulturmedium.

Die Zellvitalität der mit der optimierten Prozedur gedruckten Zellen wird mit dem CellTiter-Blue Cell Viability Test ermittelt (siehe Kapitel 6.2.4.2). Hierfür werden abweichend vom oben genannten Protokoll die Zellen in eine 96-Well Kulturplatte gedruckt, nach dem Spotten nur 100 µL Medium hinzugefügt und der Test nach einer Inkubationszeit der 96-Well Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ von 3 h durchgeführt.

Für die Oberflächenvalidierungen (Beschichtungen siehe Kapitel 6.2.3.3) werden die genannten Zellsuspensionsvolumen auf den in einer ProPlate-16Pad Inkubationskammer fixierten Microarray gedruckt. Die Zellen werden für 3 Tage kultiviert und anschließend sowohl fixiert und mit DAPI angefärbt als auch mittels CellTiter-Blue Test auf ihre Vitalität getestet (siehe Kapitel 6.2.4.2 und 6.2.4.8). Verschiedene Zelllinien und Primärzellen (jeweils 1600 Tropfen \equiv 1.200 Zellen) werden auf einen in einer ProPlate-16Pad Inkubationskammer fixierten Glasobjektträger und einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Microarray (siehe Kapitel 6.2.3.3) gedruckt. Hierfür wird die optimierte Immobilisierungsprozedur verwendet. Nach 3 Tagen Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ wird die Zellvitalität mittels CellTiter-Blue Test (siehe Kapitel 6.2.4.2) sowie einer Calcein-Acetoxymethyl- und Propidiumiodid-Färbung bestimmt (siehe Kapitel 6.2.4.6).

6.2.3.3 Validierung von Oberflächenbeschichtungen

Es werden typische Zellkulturoberflächen aus Kollagen (selbthergestellte Kollagenbeschichtung und Kollagenfolie) und Poly-Lysin (selbthergestellte PLL-Beschichtung und Polysine[®]Slides) sowie spezielle kommerzielle Adhäsions-Objektträger für erhöhte Zelladhäsion getestet und mit der Standardoberfläche Polystyrol verglichen. In allen Studien dienen autoklavierte Glasobjektträger als Referenz mit geringen Hintergrundsignalen.

Eine dünne Kollagenfolie wird auf die Größe eines Objektträgers zugeschnitten, wobei die Folie etwas breiter sein muss, als der Objektträger. Beide Seiten der Folie werden für jeweils 30 min unter UV-Strahlung sterilisiert. Bevor die Folie auf einen autoklavierten Glasobjektträger gelegt wird, wird sie für 5 min in autoklaviertem PBS eingelegt, wodurch sie elastisch wird und ein wenig quillt. Die überstehenden Seiten der Folie werden auf die Rückseite des Objektträgers gelegt. Während die Folie trocknet, zieht sie sich zusammen und

bleibt durch das Umschlagen auf die Glasrückseite an dem Objektträger haften. Der so präparierte Microarray wird erneut für 30 min unter UV-Strahlung sterilisiert und schließlich in einer ProPlate-16Pad Inkubationskammer mit 16 quadratischen Vertiefungen (autoklaviert oder für 1 h in 70 % Isopropanol sterilisiert) fixiert. Für das Bedrucken mit Zellen wird die Folie entweder direkt eingesetzt oder zuvor für 5 min mit 20 µL Medium befeuchtet.

Die Kollagenfolie wird mit einer weiteren Oberflächenbeschichtung aus Kollagen verglichen. Hierfür wird ein autoklavierter Glasobjektträger in einer ProPlate-16Pad Inkubationskammer fixiert und mit einer selbsthergestellten Kollagen-Lösung beschichtet. In jede Vertiefung wird eine unsterile Kollagen-Lösung Typ 1 (10 µg/cm² in 0,01 M Essigsäure) gegeben. Das Protein bindet während der folgenden 4 h bei 37 °C an die Microarray-Oberfläche. Danach wird die Flüssigkeit entfernt und die beschichtete Oberfläche über Nacht getrocknet. Der getrocknete Microarray wird für 30 min unter UV-Strahlung sterilisiert.

Eine ähnliche Prozedur wird für die Beschichtung der Microarrays mit einer Poly-L-Lysin-Lösung verwendet. Hierfür werden in die Vertiefungen einer ProPlate-16Pad Inkubationskammer, in der ein autoklavierter Glasobjektträger fixiert ist, 50 µL einer sterilfiltrierten Poly-L-Lysin-Lösung (0,05 % in PBS) gegeben. Das Poly-L-Lysin bindet während der folgenden 4 h bei 37 °C an die Microarray-Oberfläche. Die Flüssigkeit wird anschließend entfernt. Da das Poly-L-Lysin zelltoxisches Hydrobromid enthält, wird die beschichtete Oberfläche dreimal mit PBS gewaschen.

Zusätzlich wurden kommerzielle Polysine[®] Glasslides und Adhäsionsslides verwendet, die vom Hersteller so hergestellt wurden, dass sie die Adhäsion von Gewebe und Zellen fördern. Diese Microarray-Oberflächen wurden autoklaviert und mit einer ProPlate-16Pad Inkubationskammer versehen.

Als weiteres Zellkultursubstrat wird Folsäure-modifizierte Tonerde verwendet. Diese Oberfläche wird nicht für die Microarrays verwendet, dient aber der direkten Zelldiskriminierung von Folsäurerezeptor-exprimierenden und Rezeptor-negativen Zellen. Die Folsäure(FS)-modifizierte Tonerde wird hierbei mit unmodifizierter Tonerde verglichen. Das Proliferationsverhalten der auf diesen Oberflächen kultivierten Zellen soll bestimmt werden. Von jeder Tonerde wird 1 mg in 1 mL PBS mittels 5 min Ultraschall suspendiert. Jeweils werden 50 µL Suspension in ein Well einer 96-Well Kulturplatte gegeben, gleichmäßig verteilt und für 48 h bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird die beschichtete Kulturplatte für 3 h mit UV-Strahlung sterilisiert und mit 25.000 Zellen pro 1 cm² besiedelt. Als Negativkontrolle dienen unbehandelte Zellen, die auf der Polystyrol-Oberfläche der

Kulturplatte wachsen. Ein Blindwert mit der Beschichtung aber ohne Zellen wird ebenfalls berücksichtigt. Für jede Probe erfolgt eine Vierfach-Bestimmung. Weiterhin wird von jeder Probe ein beschichtetes und besiedeltes Well mit DAPI angefärbt. Die Zellen werden für 3 h (Adhäsionszeit), 24 h, 48 h, 72 h und 96 h auf den Oberflächen kultiviert. Dann wird der CellTiter-Blue Test durchgeführt (siehe Kapitel 6.2.4.2) oder die Zellen werden fixiert und mit DAPI gefärbt (siehe Kapitel 6.2.4.8). Zusätzlich wird die Zelladhäsion und Besiedelung des Substrates mit Zellen mittels REM-Aufnahmen untersucht (siehe Kapitel 6.2.4.9).

6.2.3.4 Entwicklung eines *high-throughput* Analysesystems

Zellen, die in dem kommerziell erwerbbaaren ProPlate-Inkubationskammer Traysystem kultiviert werden, sterben bereits nach 24 h Kultivierung. Dieses liegt möglicherweise daran, dass die Wells einen geringeren Durchmesser als die einer 96-Well Platte haben, weshalb der Flüssigkeitsspiegel über den Zellen höher und der Diffusionsweg der Gase durch das Medium zu den Zellen länger ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wird ein CellTiter-Blue-Test durchgeführt (siehe Kapitel 6.2.4.1), für den ausgesiedelte A-549 Zellen über 3 Tage mit einem zunehmenden Volumen Kulturmedium (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 und 325 µL) kultiviert werden. Zusätzlich werden die Kammern in ihre Einzelteile zerlegt (Plastikkammer, Plastikklappen, Silikonmatte, Außen-Trayrahmen) in eine sterile für die Zellkultur geeignete Plastikkammer (quadriPerm) bzw. in eine große Glaspetrischale gelegt und mit 5 mL Medium überschichtet. Als Negativkontrolle wird in eine Kammer Kulturmedium ohne Probe gegeben. Nach 3 Tagen bei 37 °C wurden diese Medien in 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und auf konfluent gewachsene A-549 Zellen in einer 96-Well Platte gegeben. Die Zellen werden für 24 h mit diesen Extrakten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und ein MTT-Test (siehe Kapitel 6.2.4.1) wird durchgeführt. Dieser Test wird mit den neu entwickelten von der institutsinternen Werkstatt gebauten Inkubationskammern wiederholt.

6.2.4 **Analyse der Vitalität der kultivierten Zellen**

6.2.4.1 MTT-Test

Die Anzahl und Vitalität von Zellen kann mit einer Reihe photometrischer Verfahren ermittelt werden. Während dieser Tests erfolgt die Umsetzung eines Reagenzes zu einem spezifischen (häufig fluoreszierenden) Farbstoff, dessen Signale mittels Absorption oder Fluoreszenz gemessen werden. Der MTT (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-

zoliumbromid)-Test gehört zu den Standardtests in einem Zellkulturlabor. Mit ihm wird meistens die Toxizität eines Stoffes bestimmt, indem die Stoffwechselaktivität der Zellen gemessen wird. Das gelbe wasserlösliche MTT wird hierbei in den Mitochondrien lebender Zellen mit Hilfe von NADH zu einem blauen wasserunlöslichen Formazansalz (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylformazan) reduziert, das in den Zellen verbleibt. Dieses Salz hat sein Absorptionsmaximum bei 570 nm. Das Signal wird mit einem Absorptions-Plattenleser quantifiziert, nachdem die Salzkristalle mit einem Detergenz aus den Zellen gelöst worden sind. Als Detergenz wird eine SDS-Lösung verwendet. Als Referenz wird die Absorption bei 630 nm gemessen, die von dem Wert der Messung bei 570 nm subtrahiert wird. Die Umsetzung des MTT zeigt den Redox-Status der Zellpopulation und somit die metabolische Aktivität der Zellen an.

Tab. 6.2-1: Anzahl der ausgesiedelten Zellen pro Well einer 96-Well Platte

Zelllinie	A-549	HELA	HEP-G2	MCF-7	NIH-3T3
Zellzahl pro Well	8.000	8.000	10.000	10.000	6.000

Für den MTT-Test werden 100 µL pro Well einer Zellsuspension (Zellzahl siehe Tab. 6.2-1) in eine 96-Well Platte gegeben und die Zellen über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Am folgenden Tag werden 100 µL frisches Kulturmedium in jedes Well gegeben und die Zellen weitere 2 Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wird aus den Wells entfernt, die Zellen werden einmal mit warmem PBS gewaschen und 200 µL der Proben (Nanopartikel-Suspensionen verschiedener Konzentrationen, oder Extraktlösungen) in jedes Well hinzugefügt. Für jede Probe und Konzentration wird eine Vierfach-Bestimmung durchgeführt und ein Blindwert (Probe ohne Zellen) berücksichtigt. Als Standardkontrolle, um verschiedene Tests miteinander vergleichen zu können, befinden sich auf jeder 96-Well Platte auch Zellen, die unter Standardbedingungen nur in Medium ohne Proben kultiviert werden. Nach 24 h werden die Proben vollständig aus den Wells entfernt und 110 µL einer 10 % MTT-Lösung (5 mg/mL in PBS) in Medium in jedes Well gegeben und für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit den Zellen inkubiert. Für die Untersuchung der Toxizität der Quantum Dot/Antikörper Konjugate wurden die Zellen mit Ausnahme des zeitabhängigen Tests 4 h mit den Proben inkubiert, bevor der MTT-Test erfolgte. Mit den TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugaten wurden die Zellen nur 2 h inkubiert. Die Zellen sollen später während einer 2 – 4 h Inkubation angefärbt werden, sodass auf eine längere Inkubationszeit während des MTT-Tests verzichtet wurde. Die gebildeten Formazan-Kristalle werden dann für 24 h aus den Zellen gelöst, indem jeweils 100 µL einer Solubilisierungslösung (1 g SDS in 10 mL 0,01 M HCl) zu der MTT-Lösung gegeben werden. Schließlich wird die Absorption des gelösten Formazans bei 570 nm gegen das Referenzsignal bei 630 nm in einem Absorptions-

Plattenleser gemessen. Das gemessene Signal dient als relatives Maß für die Vitalität von Zellen.

Mit Hilfe der Ergebnisse des MTT-Tests werden Dosis-Wirkungskurven sowie die Zytotoxizitätskenndaten NOAEC (*No Observed Adverse Effect Concentration*), IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*) und TLC (*Total Lethal Concentration*) berechnet. Hierfür wird die Zellvitalität auf 1 normiert (entspricht der Vitalität der unter Standardbedingungen in Kulturmedium kultivierten Zellen). Diese wird als Funktion gegen die logarithmisch aufgetragene Probenkonzentration dargestellt. Die berechneten Dosis-Wirkungskurven werden mit Hilfe von Gleichung (1) erhalten, die während einer vorangegangenen Arbeit etabliert worden ist²⁹.

$$(1) y = 1 - \frac{1}{1 + e^{a(b-x)}}$$

mit a = Steigung, b = IC₅₀ (50 % *inhibitory concentration*), x = Probenkonzentration

6.2.4.2 CellTiter-Blue Assay

Die Zellvitalität und Proliferation können mit Hilfe der Stoffwechsellleistungen der Zellen bestimmt werden, indem der CellTiter-Blue® (CTB) Cell Viability Test verwendet wird³⁰. Das hierbei verwendete Reagenz enthält den blauen, nicht fluoreszierenden Farbstoff Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid), der von lebenden Zellen zum pinkfarbenen fluoreszierenden Resorufin (3-Oxo-3H-phenoxazin-10-ium-7-olate) reduziert wird. Die Produktbildung kann nach Ablauf der Reaktion (4 - 23 h) photometrisch entweder durch dessen Absorption oder Fluoreszenz ermittelt werden. Da die Fluoreszenz eine sensitivere Detektion zulässt, wird meist diese Detektionsmethode verwendet. Eine direkte Quantifizierung der immobilisierten Zellen ist möglich, wenn simultan eine Konzentrationsreihe mit bekannten Zellzahlen betrachtet wird. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zu der Zellzahl. Neben den Zellen, die mit den Testsubstanzen/-oberflächen behandelt werden, werden auch Zellen untersucht, die unter Standardbedingungen nur in Kulturmedium kultiviert wurden. Außerdem wird ein Well getestet, in dem nur die Testsubstanzen/-oberflächen mit Medium aber ohne Zellen vorliegen (Blindwert), um Auskunft über mögliche Hintergrundsignale zu erhalten. Für jede Probe wird eine Vierfach-Bestimmung durchgeführt. Da das Reagenz keine toxischen Chemikalien enthält, sind lange Reaktionszeiten und eine hohe Sensitivität des Tests möglich. Da jede Zelllinie das

²⁹ Dissertation 'Untersuchungen zur Toxizität unterschiedlicher Nanomaterialien auf verschiedene Zelllinien, mesenchymale Stammzellen und 3D-Gewebestrukturen', Dr. Stefanie Wagner, Leibniz Universität Hannover, 2012

³⁰ <https://www.promege.de/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol/>

Resazurin unterschiedlich schnell umgesetzt, muss die optimale Reaktionszeit empirisch bestimmt werden.

Wenn nicht anders beschrieben, wird das Medium aus den zu untersuchenden Wells entfernt und jedes Well mit 100 μ L Flüssigmedium ohne Zusätze und 20 μ L CellTiter-Blue Reagenz versehen. Nach einer Reaktionszeit von 4 – 23 h wird die Fluoreszenz (Ex_{544nm}/Em_{590nm}) der Proben einer 96-Well Gewebekulturplatte mit einem Fluoreszenzplattenleser bestimmt. Von den Proben der Microarrays werden vor der Messung 100 μ L in eine unsterile 96-Well Platte überführt. Wird das Proliferationsverhalten untersucht, werden die Proben jeweils 4 h nach der CellTiter-Blue Reagenzzugabe gemessen.

6.2.4.3 Nachweis von Nekrose (Laktatdehydrogenase)

Der Nachweis von Nekrose erfolgt in dieser Arbeit unter Verwendung des CytoTox-One™ Assays, mit dem die Aktivität der zytoplasmatischen Laktatdehydrogenase (LDH, Oxidoreduktase) bestimmt wird³¹. Der Nachweis der LDH erfolgt extrazellulär im Überstand der Zellkultur, sodass nur die Aktivität der LDH aus nekrotischen Zellen gemessen wird. Die Zellmembran nekrotischer Zellen ist beschädigt und dadurch für die LDH permeabel. Die Bestimmung der LDH-Aktivität findet in zwei Teilreaktionen statt. Zunächst wird Laktat durch die LDH zu Pyruvat unter Verbrauch von NAD^+ oxidiert. In der zweiten Teilreaktion reduziert die Diaphorase mit Hilfe des gebildeten NADH das ebenfalls im Reagenz enthaltene Resazurin zu Resorufin. Die Fluoreszenz (Ex_{544nm}/Em_{590nm}) des Resorufins wird mit einem Fluoreszenz-Plattenleser gemessen. Das gemessene Signal ist hierbei proportional zur Menge an freigesetzter LDH und der Anzahl beschädigter Zellen.

Der Test wird nach Herstellerangaben in einer 96-Well Platte durchgeführt. A-549 und NIH-3T3 Zellen werden ausgesiedelt (Zellzahl siehe Tab. 6.2-1) und für 3 Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Dann werden Nanopartikelkonzentrationen (TGA-QD₅₆₀ und TGA-QD₅₆₀/anti-HER2) untersucht, die eindeutig toxische Effekte hervorrufen (TGA-QD₅₆₀: 800 μ g/mL; TGA-QD₅₆₀/anti-HER2: 200 μ g/mL). 200 μ L dieser Nanopartikel werden auf die Zellen gegeben und für 4 h mit ihnen inkubiert. Für jede Probe erfolgt eine Dreifach-Bestimmung und ein Blindwert (Probe ohne Zellen) wird berücksichtigt. Auch intakte Zellen geben in sehr geringen Mengen LDH ab, weshalb diese als Negativkontrolle ebenfalls untersucht werden. Anschließend werden jeweils 100 μ L der Überstände in eine neue 96-

³¹ <https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/101/cytotox-one-homogeneous-membrane-integrity-assay-protocol/>

Well Platte überführt und für den Nachweis der LDH mit jeweils 100 µL CytoTox-One Substratmix versetzt. Bei jedem folgenden Schritt wird die Platte vor Licht geschützt. Sie wird für 30 sec bei 300 rpm geschüttelt und dann bei 22 °C für 10 min inkubiert. Die Reaktion wird jeweils durch Hinzufügen von 50 µL Stopp-Lösung abgebrochen, die Platte erneut für 10 sec bei 300 rpm geschüttelt und die Fluoreszenz gemessen. Die Ermittlung der auf die Negativkontrolle (Zellen unter Standardbedingung in Kulturmedium kultiviert) normierten LDH-Freisetzung erfolgt nach Gleichung (2):

$$(2) \text{ Normierte LDH Freisetzung} = \frac{(\text{Probensignal} - \text{Hintergrund})}{(\text{LDH Abgabe Normalmedium} - \text{Hintergrund})}$$

6.2.4.4 Nachweis von Apoptose (Caspase-3 und -7)

Die Proteasen Caspase-3 und -7 spielen bei der Apoptose von Säugetierzellen eine entscheidende Rolle und dienen somit als Indikatoren für diese Art des Zelltodes. Apoptose ist ein von der Zelle selbst regulierter Prozess, der am Ende der Zellentwicklung erfolgt. Da die Zellmembranen hierbei intakt bleiben, werden die Zellen zunächst lysiert. Der Nachweis der freigesetzten Caspasen erfolgt mit dem Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay³². Das nicht fluoreszierende Substrat des Tests wird von den Proteasen Caspase-3 und Caspase-7 zu einem grün fluoreszierenden Produkt umgesetzt, welches bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und bei 538 nm detektiert wird.

Für den Nachweis der Enzymaktivitäten werden die Zellen entsprechend Tab. 6.2-1 in einer schwarzen 96-Wellplatte ausgesiedelt und über 3 Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend werden 100 µL Nanopartikelsuspension (TGA-QD₅₆₀: 800 µg/mL; TGA-QD₅₆₀/anti-HER2: 200 µg/mL) hinzugegeben und die Zellen für 4 h inkubiert. Nachdem die Überstände (Proben) von den Zellen entfernt worden sind, werden in jedes Well 100 µL Caspase Substrate Z-DEVD-R110 gegeben. Die Platte wird für 1 min bei 300 rpm geschüttelt und anschließend bei 22 °C im Fluoreszenzplattenleser gelagert und in 10 min Abständen über einen Zeitraum von 4 h vermessen.

6.2.4.5 Nachweis von Apoptose/Nekrose mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen

Mit Hilfe eines kombinierten Nachweises von Apoptose und Nekrose unter Verwendung eines Durchflusszytometers sollen die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel 6.2.4.3 und 6.2.4.4 bestätigt und näher untersucht werden. Hierfür wird das ApoTarget Annexin-V FITC

³² <https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/0/apoone-homogeneous-caspase-3-7-assay-protocol/>

Apoptosis Kit verwendet³³. In vitalen Zellen befindet sich Phosphatidylserin auf der inneren Seite der Zellmembran. Während der Apoptose wird es auf die extrazelluläre Seite verschoben, wo es von Annexin-V hoch affin gebunden wird. Die Zelle ist nach der Bindung von Annexin-V FITC somit grün markiert. In nekrotische Zellen kann Propidiumiodid ungehindert eindringen, an die Nukleinsäuren innerhalb der Zellen binden und diese rot markieren. Vitale Zellen sind hingegen für Propidiumiodid nicht permeabel und auch Annexin V kann nicht an sie binden, da sich kein Phosphatidylserin auf ihrer Zellmembran befindet. Je mehr Zellen apoptotisch oder nekrotisch sind, desto höher sind die jeweiligen Fluoreszenzsignale nach einer Färbung der Zellen mit Annexin-V FITC und Propidiumiodid. Apoptotische Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz (siehe Abb. 6.2-1 Region A) und lebende Zellen zeigen keine Fluoreszenz (Region L). Da bei nekrotischen Zellen die Zellmembran teilweise zerstört wird kann Annexin-V an die Phosphatidylserine auf der Membrannenseite binden, sodass tote, nekrotische Zellen eine rote und grüne Fluoreszenz zeigen (Region D).

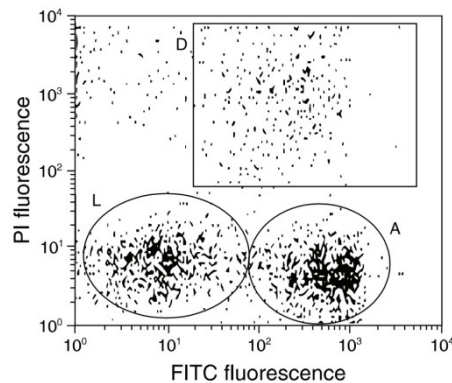


Abb. 6.2-1: Schematische Darstellung von mit Annexin-V FITC und Propidiumiodid gefärbten Zellen³³. L: Lebende Zellen, A: Apoptotische Zellen, D: Tote, nekrotische Zellen

A-549 und NIH-3T3 Zellen werden mittels Trypsin passagiert. Jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen werden in 5 mL Kulturmedium in Kulturflaschen (25 cm^2) ausgesiedelt und adhären über Nacht auf der Flaschenoberfläche. Das Medium wird entfernt und die Zellen werden jeweils für 4 h zum einen mit 1 mL TGA-QD₅₆₀ (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und zum anderen mit 1 mL TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugat (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inkubiert. Als Negativkontrolle werden Zellen auch mit 1 mL Medium inkubiert. Der Überstand wird jeweils in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen mit 0,5 mL Accutase abgelöst. Da sich die Zellen der TGA-QD₅₆₀ Proben auch nach 2 h Inkubation mit Accutase nicht abgelöst haben, wird nur mit den Medium und Konjugat-Proben weitergearbeitet. Die abgelösten Zellen werden in 1,5 mL Kulturmedium suspendiert und in die zugehörigen Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer

³³ <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp13242.pdf>

Zentrifugation bei 200 g für 5 min wird der Überstand verworfen und die Zellen einmal mit 500 µL 1x APO-Puffer (im Kit enthalten) gewaschen. Die Zellen werden mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL in 1 x APO-Puffer suspendiert. 100 µL der Zellsuspension werden in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß pipettiert. Zu jeder Probe werden 5 µL Annexin-V FITC und 10 µL Propidiumiodid-Puffer gegeben und die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Weitere 400 µL 1x APO-Puffer werden hinzugefügt, die Proben in ein Probengläschen des Zytometers überführt und mit dem Programm Apo unter Einsatz der Detektoren 1 (Emissionsfilter/Bandbreite: 525/40) und 3 (675/30) vermessen.

6.2.4.6 Zellfärbungen mittels Calcein-AM und Propidiumiodid

Der nicht fluoreszierende Ester Calcein-Acetoxyethyl (Calcein-AM) kann die Zellmembran leicht überwinden. Im Zytosol wird die Acetoxyethyl-Gruppe abgespalten und der dabei entstandene Alkohol (Calcein) bildet mit den Eisenionen des Zytosols einen fluoreszierenden nicht membrangängigen Komplex. Da nur lebende Zellen über aktive Esterasen verfügen, werden auch nur diese angefärbt. Unter Verwendung des U-MNB Filters, BP470-490 (Anregungsfilter), BA515 (Barrierefilter) des Fluoreszenzmikroskops können die grün fluoreszierenden Zellen betrachtet werden. Eine quantitative Analyse erlaubt das Auslesen mit Hilfe eines Fluoreszenzlesegerätes (Ex_{495nm}/Em_{515nm}). Da Propidiumiodid intakte Zellmembranen nicht passieren kann, werden von diesem Farbstoff nur nekrotische Zellen angefärbt. Der in die Zelle gelangte Farbstoff bindet an die Nucleinsäuren und färbt diese rot-orange (Ex_{535nm}/Em_{617nm}). Am Fluoreszenzmikroskop wird der interkalierte Farbstoff mit dem U-MNG Filter, BP530-550 (Anregungsfilter), BA590 (Barrierefilter) sichtbar.

Aus der Calcein-AM Stocklösung (1 mg/mL in DMSO) wird eine Arbeitslösung hergestellt, indem die Stocklösung 1:30 mit sterilem PBS verdünnt wird. Aus der Propidiumiodid-Stocklösung (1 mg/mL) wird ebenfalls eine Arbeitslösung (50 µg/mL in 0.9 % NaCl) hergestellt. Die Calcein-AM Arbeitslösung wird zusätzlich 1:10 mit Flüssigmedium (ohne Zusätze) verdünnt und mit Propidiumiodid-Arbeitslösung (1 µL pro 100 µL Färbelösung) versetzt. Die auf den Microarrays kultivierten Zellen werden einmal mit warmem PBS gewaschen. In jedes Well werden 100 µL der präparierten Calcein-AM/PI-Färbelösung gegeben und die Zellen für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

6.2.4.7 Fixierung der Zellen

Infolge der Fixierung der Zellen werden alle Stoffwechselwege und Signalkaskaden einer Zelle und ihrer Organellen angehalten und konserviert. Zudem werden die Antigene unlöslich und für eine immunzytochemische Färbung besser zugänglich. Die Zellproben können unter leicht feuchten Bedingungen bei 4 °C über mehrere Wochen bis hin zu Monaten gelagert werden, ohne dass ihre Struktur durch Anschwellen oder Schrumpfen der Zellen beschädigt wird. Es wird zwischen quervernetzenden Fixativen und Fällungsfixativen unterschieden.

Zu der ersten Gruppe gehört das in dieser Arbeit verwendete Paraformaldehyd (PFA), das Hydroxid-Methylen-Brücken zwischen benachbarten Proteingruppen bildet. Hierdurch entsteht ein Netzwerk aus Proteinen. Die Zellen werden für 30 min mit einer PFA-Lösung (4 % in PBS) bei 4 °C inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 10 min mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren, werden sie für 30 min mit einer Triton X-100-Lösung (0,1 % in PBS) bei Raumtemperatur solubilisiert. Bevor die Zellen mit DAPI oder den Antikörper-funktionalisierten Quantum Dots gefärbt werden, werden sie zweimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen.

Zu der Gruppe der Fällungsfixative gehören Alkohole wie z.B. Ethanol. Sie zerstören die hydrophoben Bindungen der Proteintertiärstruktur. Wenn nicht anders erwähnt, wird diese Fixiermethode in dieser Arbeit verwendet. Während dieser Fixierungsmethode werden die Zellen für 30 min mit eiskaltem Ethanol bei -20 °C inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Zellfärbung.

6.2.4.8 Zellfärbungen mittels DAPI

Die Färbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) ermöglicht die Visualisierung der Zellkerne, gibt jedoch keine Auskunft über die Vitalität der Zellen. DAPI interkaliert in die DNA, wodurch ein Komplex entsteht, der am Fluoreszenzmikroskop mit dem U-MWU Filter, BP330-385 (Anregungsfilter), BA420 (Barrierefiter) sichtbar wird. Die Fluoreszenzintensität dieses Komplexes kann auch mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders bei E_{X360nm}/E_{M460nm} quantifiziert werden. In dieser Arbeit wird DAPI auch als Gegenfärbung zu der Antikörperfärbung verwendet. Hierbei werden die Zellen zuerst mit den Antikörpern gefärbt (siehe Kapitel 6.2.6.10), dann zweimal mit PBS gewaschen und mit DAPI gefärbt. Die fixierten oder unfixierten Zellen, die bereits mit PBS gewaschen worden sind, werden für 15 min bei 37 °C mit der DAPI-Färbelösung (1 µg/mL in DAPI-Färbepuffer) inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal kurz mit PBS gewaschen. Um die Photostabilität

des Farbstoffes zu erhöhen wird in jedes Well bzw. auf jede Probe ein Tropfen Fluoroshield gegeben. Fixierte Zellen werden mit einem Deckgläschen bedeckt. Zellen, die auf einem Deckgläschen kultiviert und gefärbt wurden, werden mit der besiedelten Fläche nach unten auf einen Objektträger gelegt, auf dem sich ein Tropfen Fluoroshield befindet. Das Deckgläschen wird auf dem Objektträger befestigt, in dem es mit Nagellack umrandet wird.

6.2.4.9 Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird die Oberfläche einer Probe stark vergrößert abgebildet, indem sie mit einem gebündelten, hochenergetischen Elektronenstrahl rasterförmig bestrahlt wird. Der Prozess findet im Hochvakuum statt, damit der erzeugte Elektronenstrahl nicht mit den Molekülen der Luft wechselwirken kann. Partikel in Lösung (z.B. Nanopartikel) müssen daher vollständig lyophilisiert werden, bevor sie auf einen Graphitprobenträger aufgebracht und mit dem REM betrachtet werden können.

Auch die Zellen, die auf einer Oberfläche kultiviert wurden, müssen getrocknet werden, bevor sie betrachtet werden können. Da die Zellen und Oberflächen nicht auf einen Graphitprobenträger aufgebracht werden können, werden Indium-Zinn-Oxid (ITO) beschichtete Gläser verwendet. Diese besitzen eine leitende Oberfläche und ermöglichen so einen guten Elektronenfluss und scharfe REM-Aufnahmen. Die ITO-Gläser werden in 1 cm² große Quadrate geschnitten und von jeder Seite zunächst für 30 min unter UV-Bestrahlung sterilisiert. Dann werden sie in 24-Well Kulturplatten mit der leitenden Seite nach oben gelegt und mit 100 µL pro 1 cm² einer Tonerde-Suspension (1 mg/mL in PBS) versehen. Unter sterilen Bedingungen wird die Suspension für 48 h getrocknet. Die beschichteten Gläser werden für 3 h unter UV-Bestrahlung sterilisiert und mit 25.000 Zellen in 500 µL besiedelt. Nach einer Kultivierungsdauer von 72 h (bei HELA und A-549 Zellen) oder 48 h (bei NIH-3T3 und HEP-G2 Zellen) werden die Proben zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und für die REM-Aufnahmen vorbereitet. Hierfür werden die Proben zunächst für 24 h bei 4 °C in 500 µL pro Well Karnovsky-Puffer inkubiert. Anschließend werden sie dreimal für jeweils 5 min mit Cacodylatpuffer gewaschen und vollständig für 16 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die beschichteten ITO-Gläser werden mit einem Silberleitlack umrandet und auf einen Probenhalter geklebt. Die Aufnahmen werden mit einem Rasterelektronenmikroskop (Joel JSM-6700F NT) bei einer Beschleunigungsspannung von 2.0 kV erstellt. Für die REM Aufnahmen der mit Zellen besiedelten Folsäure-modifizierten Tonerdeproben ist eine 500 bis 1.000-fache Vergrößerung ausreichend. Die REM Aufnahmen der Nanopartikel erfolgen bei einer 200.000-fachen Vergrößerung.

6.2.5 Charakterisierung der Zellen bezüglich der Biomarker

Die Charakterisierung der Zellen erfolgt sowohl durch den Nachweis der Gentranskription mittels PCR als auch auf Protein-Ebene mit Hilfe der Immunzytochemie unter Einsatz eines Durchflusszytometers. Das Gentranskriptionslevel gibt Auskunft über die Häufigkeit mit der ein Gen als *messenger* RNA (mRNA) abgeschrieben wird und deutet auf die Proteinexpression hin. Da die in der PCR verwendete Polymerase jedoch eine DNA-Vorlage für die Amplifikation benötigt, ist es notwendig die mRNA aus den Zellen zu extrahieren und in cDNA zurückzutranskribieren. Erst nach der reversen Transkription kann die PCR durchgeführt werden. Im Gegensatz hierzu kann die Proteinexpression direkt auf den Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern erfolgen.

6.2.5.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die zu charakterisierenden Zelllinien werden in Kulturflaschen (75 cm² Kultivierungsoberfläche) bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert und anschließend passagiert. In 2 mL-Reaktionsgefäße werden jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen gegeben. Diese Zellen werden für 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellpellets werden in 1 mL RNAtidy G suspendiert. Die auf diese Weise lysierten Zellen werden entweder bei -20 °C gelagert, um die RNA zu einem späteren Zeitpunkt zu isolieren, oder bei 4 °C kurz abgekühlt. Um die vollständige Zerstörung der Zellen und ihrer Organellen sicherzustellen, werden die Zellen zusätzlich für 20 sec mit einem Homogenisator homogenisiert. Dieser wurde unmittelbar zuvor mit RNaseZap und dH₂O behandelt. Die homogenisierten Proben werden erneut auf 4 °C abgekühlt.

Im Folgenden wird das Protokoll von Life Technologies für die RNA Extraktion unter Einsatz von TRIzol befolgt³⁴. Die Volumenangaben der hinzuzufügenden Chemikalien beziehen sich jeweils auf das zu Beginn hinzugegebene Volumen von 1 mL Lyselösung (RNAtidy G). Das unlösliche Material wird durch Zentrifugation bei 12.000 g für 10 min bei 4 °C abgetrennt. Die RNA verbleibt hierbei im Überstand, wohingegen sich die Extrazelluläre Matrix, Polysaccharide und hochmolekulare DNA im Pellet wiederfinden. Die klare homogenisierte Lösung des Überstandes wird in ein neues autoklaviertes 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µL Chloroform versetzt. Die Lösungen werden durchmisch, indem das Reaktionsgefäß 15 sec kräftig geschüttelt wird, und bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert. Nach der folgenden Zentrifugation bei 12.000 g für 15 min

³⁴ http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf

bei 4 °C befindet sich die RNA in der farblosen wässrigen oberen Phase, welche in ein neues autoklaviertes 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt wird. Durch Zugabe von 500 µL Isopropanol und Vermischen wird die RNA gefällt. Die Proben werden hierfür für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 12.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, an Boden und Seite des Reaktionsgefäßes ist bei großen RNA-Mengen ein Gel-ähnliches Pellet erkennbar. Dieses RNA-Pellet wird mit 1 mL 75 % Ethanol gewaschen und gevortext. Nach der Zentrifugation bei 7.500 g für 5 min bei 4 °C wird der Überstand verworfen und das RNA-Pellet unter Verwendung von Druckluft vorsichtig luftgetrocknet. Die Trocknung erfolgt nicht vollständig, da die RNA ansonsten unlöslich würde. Das Pellet wird in 20 - 50 µL RNase-freiem Wasser (Menge ist abhängig von Pelletgröße) durch auf- und abpipettieren suspendiert und für eine vollständige Lösung für 10 min bei 55 °C inkubiert. Die Konzentration und Reinheit wird mittels NanoDrop 1000 durch Messung der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Hierfür wird die Funktion „Nucleic acid“ und die Messung „RNA“ verwendet. Die gelöste RNA wird bei -80 °C gelagert.

Die extrahierte RNA der Zellen muss für die PCR revers transkribiert werden. Hierfür werden 2 µg RNA (zu verwendendes Volumen berechnet sich aus der mittels NanoDrop 1000 bestimmten Konzentration) in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben und mit 3 µL oligo(dt)₁₂₋₁₈Primer versetzt. Diese Mischung wird mit dH₂O auf 27 µL (abhängig vom RNA-Lösungsvolumen) aufgefüllt und bei 65 °C für 5 min denaturiert. Hierdurch werden mögliche vorhandene Loops in der Struktur gelöst, sodass die RNA linear vorliegt. Die Proben werden für 1 min bei 4 °C abgekühlt, bevor 8 µL 5x M-MLV Reverse Transkriptase Puffer, 4 µL dNTP-Mix und 1 µL M-MLV Reverse Transkriptase hinzugegeben werden. Dieses Gemisch wird für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wird schließlich bei -20 °C gelagert.

6.2.5.2 Primer-Design

Die *forward* und *reverse* Primer, die eine für das jeweilige Gen charakteristische Sequenz flankieren sollen, werden mit dem OligoPerfect™ Designer von Life Technologies³⁵ so designt, dass bestimmte Vorgaben erfüllt sind. Die Primer besitzen eine Länge von 18-27 bp, ihre Schmelztemperatur liegt bei 57-65 °C und die resultierende Amplifikatgröße beträgt 100 - 300 bp. Die ausgewählten Primer sollten gleich groß sein, die gleiche Schmelztemperatur

³⁵ <http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>

aufweisen und dürfen nicht komplementär zueinander sein. Außerdem sollte die Produktregion bei der Auswahl beachtet werden. Das Amplifikat muss mindestens zwei Exons enthalten, sodass z.B. der forward Primer im 1. Exon bindet und der reverse Primer im 2. Exon. In der DNA befindet sich zwischen den beiden Exons ein Intron, welches aber nach der Transkription nicht in die mRNA-Sequenz übertragen wird. Binden die beiden Primer in verschiedenen Exon, kann anhand der Analyse der PCR-Ergebnisse nochmals überprüft werden, ob die extrahierte RNA rein oder mit DNA verunreinigt ist. Bei einer Verunreinigung mit DNA ergäbe sich in dem Elektrophoresegel eine zusätzliche Amplifikatbande mit einer sehr großen Größe (1. Exon, Intron und 2. Exon). Die Primerpaare werden schließlich noch hinsichtlich möglicher unspezifischer Bindungen überprüft, indem ihre Sequenzen mit dem Genom und den Transkripten des Organismus‘ verglichen werden. Hierfür wird die „Standard Nucleotide Blast“ Funktion³⁶ von NCBI verwendet, in die die Primersequenzen eingegeben und überprüft werden. Die in der PCR zu verwendenden Primer müssen sehr spezifisch nur an das ausgewählte Gen binden, da es sonst zu weiteren Amplifikaten unterschiedlicher Größen kommen kann. Die ausgewählten Primer sind Kapitel 6.1.8 zu entnehmen.

6.2.5.3 Polymerasekettenreaktion

Die lyophilisierten Primer werden nach Herstellerangaben in RNase-freiem Wasser gelöst, die Konzentration der Stocklösung beträgt somit 100 pmol/μL. Aus den Stocklösungen der *forward* und *reverse* Primer wird ein Verdünnungsmix hergestellt, in welchem die Primer zusätzlich 1:10 verdünnt vorliegen. Für jede PCR werden die folgenden Reaktanden in einem PCR-Reaktionsgefäß miteinander vermischt: 10 μL 5x Green GoTaq Reaktionspuffer, 4 μL dNTPs, 2 μL Primer-Verdünnungsmix (1 μL forward Primer, 1 μL reverse Primer), 1 μL cDNA, 0,25 μL GoTaq Polymerase, 32,75 μL dH₂O. Dem Reaktionspuffer sind bereits zwei Farbstoffe (gelb und blau) sowie eine Substanz, die die Probendichte erhöht, enthalten. Nach der PCR können die Proben somit direkt auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert werden, ohne nochmals mit Ladepuffer verdünnt zu werden. In einem Thermocycler werden die Proben dann für definierte Zeiten bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Zunächst wird die DNA bei 95 °C für 5 min denaturiert. Dann werden 37 Zyklen bestehend aus drei Inkubationsschritten von jeweils 30 sec durchlaufen. Zunächst wird die DNA bei 95 °C denaturiert, die Primer lagern sich bei der optimalen Hybridisierungstemperatur an die DNA

³⁶ http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

an und die GoTaq Polymerase erstellt aus den dNTPs des Reaktionsmixes bei ihrem Temperaturoptimum von 72 °C einen komplementären Strang zu dem cDNA-*Template*. Im Anschluss an die 37 Zyklen findet eine abschließende Vervollständigung der DNA-Stränge bei 72 °C für 10 min statt und die Proben werden auf 4 °C gekühlt. Die optimale Hybridisierungstemperatur, bei der beide Primer am besten binden, wird mittels einer Gradienten-PCR ermittelt. Diese PCR wird mit der cDNA von Zellen durchgeführt, die als Positivkontrolle dienen, von denen somit die positive Gentranskription bekannt ist (A-549 Zelllinie für das c-erbB2 Gen, HELA Zelllinie für das FOLR1 Gen, MCF-7 Zelllinie für das EpCAM Gen). Es werden mehrere PCR-Reaktionsgefäße mit denselben Reaktanden versehen, aber bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen inkubiert. Der Temperaturgradient wird so programmiert, dass eine Varianz von 5 bis 10 °C zwischen der ersten und der letzten Probe vorliegt (z.B. 50 – 60 °C) und die Schmelztemperaturen der Primer in diesem Gradienten liegen. Die PCR-Produkte werden schließlich mittels Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt, wodurch im Optimalfall nur eine Bande pro Probe in dem Agarosegel zu erkennen ist. Diese Bande ist bei der optimalen Hybridisierungstemperatur am stärksten ausgeprägt. Sind zusätzlich schwache Banden von Amplifikaten resultierend aus einer unspezifischen Primeranlagerung vorhanden, kann oft eine unspezifische Hybridisierung durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur unterdrückt werden. In Tab. 6.2-2 sind die auf diese Weise bestimmten optimalen Hybridisierungstemperaturen der Primer für die Amplifikation der *humanen* Gene c-erbB2, FOLR1 und EpCAM aufgelistet. Die Hybridisierungstemperatur der Primer für die Gene HPRT und GAPDH wurden bereits institutsintern optimiert. Die Hybridisierungstemperaturen für die *murinen* Gene c-erbB2 und FOLR1 wurden nicht optimiert. In diesen Fällen wurde die von Life Technologies während des Primer-Designs genannte Schmelztemperatur der Primer verwendet.

Tab. 6.2-2: Optimierte in den Zell-Charakterisierungsstudien verwendete Primer-Hybridisierungstemperaturen.

Primerpaar für das Gen	HPRT <i>human</i>	GAPDH <i>murin</i>	c-erbB2 (HER-2/neu) <i>human</i>	c-erbB2 (HER-2/neu) <i>murin</i>	FOLR1 <i>human</i>	FOLR1 <i>murin</i>	EpCAM
Optimale Hybridisierungstemperatur [°C]	60	58	64	61	63	61	60

Die Amplifikation des c-erbB2 Gens ist weiter optimiert worden, da die Ergebnisse schlecht reproduzierbar waren. Die während der PCR eingesetzte cDNA-Menge wurde auf 2 µL erhöht, das Volumen an dH₂O auf 31,75 µL gesenkt. Zusätzlich zu der Standardanalyse der PCR-Ergebnisse mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 6.2.5.4) wurden die PCR-

Ergebnisse der c-erbB2 Genamplifikation auch mit dem Agilent Bioanalyzer (siehe Kapitel 6.2.5.5) analysiert.

6.2.5.4 Analyse der PCR-Ergebnisse mittels Agarosegelelektrophorese

Ein 1,5 %ige Agarosegel wird hergestellt, indem 1,5 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer in der Mikrowelle bei 800 Watt für 2 min erhitzt werden, bis sich die Agarose vollständig auflöst. Nach dem Aufkochen kühlt die Lösung unter Rühren auf ca. 45 °C ab und 5 µL Roti-Safe GelStain wird hinzugegeben. Dieser Farbstoff interkaliert in die Proben-DNA und wird unter UV-Bestrahlung sichtbar. Er ist ein nicht-toxischer Ersatz für Ethidiumbromid. Die Agarose-Lösung wird blasenfrei in eine horizontale Gelkammer gegossen und ein Kamm mit 12 Taschen (mit einem Volumen für 40 µL) eingesetzt. Nach Verfestigung des Gels wird die Gelkammer in die Elektrophoresekammer gelegt, das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. 20 µL der PCR-Proben werden vorsichtig in die Taschen pipettiert, ohne das Gel zu beschädigen. Zusätzlich werden 3 µL DNA-Größenstandard GeneRuler 100 bp DNA Ladder mit 3 µL Green GoTaq Reaktionspuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wird geschlossen und die Elektrophorese erfolgt für 60 min bei 98 V. Die DNA-Banden werden unter UV-Strahlung sichtbar und mit einem INTAS UV Dokumentationssystem dokumentiert.

6.2.5.5 Analyse der PCR-Ergebnisse mittels Agilent Bioanalyzer 2100

Das Agilent DNA 7500 Kit enthält DNA-Chips und die Reagenzien, um DNA-Fragmente zu analysieren. Die DNA-Chips bestehen aus Mikrokanälen, in denen die Nukleinsäuren ihrer Größe entsprechend getrennt und quantifiziert werden. Für die Analyse der PCR-Ergebnisse des c-erbB2 Gens wird das Herstellerprotokoll befolgt³⁷. Die Trennung erfolgt auch mit diesem System elektrophoretisch in einer Gelmatrix, welche mit 25 µL eines DNA-Dye-Konzentrates mittels Vortexen vermischt wird. Alle Komponenten des Kits werden vor ihrem Einsatz für 30 min auf die Raumtemperatur angeglichen. Der Mix wird kurz zentrifugiert und auf einen Zentrifugalfilter übertragen. Dieser wird bei 1.500 g für 10 min zentrifugiert. Ein neuer DNA-Chip wird auf die Chip-Vorbereitungsstation gelegt. In die Vertiefung, die mit einem „G“ markiert ist, werden 9 µL des Gel-Dye-Gemisches pipettiert. Der Kolben der Spritze befindet sich bei der 1 mL-Markierung. Die Chip-Vorbereitungsstation wird geschlossen und der Kolben solange gedrückt bis er von dem Chip gehalten

³⁷ http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2938-90025_DNA7500-12000_QSG.pdf

wird. Nach dem genau 30 sec gewartet worden ist, wird der Chip gelöst, für 5 sec gewartet und dann der Kolben langsam wieder auf die 1 mL-Markierung gezogen. Die Chip-Vorbereitungsstation wird geöffnet und 9 µL des Gel-Dye-Gemisches werden in die Vertiefung pipettiert, die mit einem G markiert ist. In alle Vertiefungen der 12 Proben und Ladder werden 5 µL des Markers gegeben. In die Vertiefung, die mit einer Leiter markiert ist, wird dann 1 µL des DNA-Markers gegeben. In die 12 Proben-Vertiefungen wird 1 µL der PCR-Proben oder dH₂O pipettiert. Der befüllte Chip wird horizontal in den Vortex-Adapter gelegt und für 1 min bei 2.400 rpm geschüttelt. Die Elektrophorese und Analyse der Proben erfolgt schließlich in dem Agilent 2100 Bioanalyzer. In den Abb. 6.2-2 und Abb. 6.2-3 sind die Gelbilder gezeigt, die der Bioanalyzer von zwei verschiedenen PCR-Ergebnissen aller auf das c-erbB2 untersuchten *humanen* Zellen erzeugt hat. Jeweils die Spuren 1 bis 6 zeigen den Transkriptionsnachweis des *Housekeeping*-Gens HPRT. Ein Vergleich der beiden Abbildungen zeigt deutliche Unterschiede bei der Amplifikation des c-erbB2 Gens und somit auch die relativ schlechte Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses. Das in Abb. 6.2-3 gezeigte Ergebnis der PCR konnte unabhängig von dieser Analyse mit einer zweiten PCR bestätigt werden.

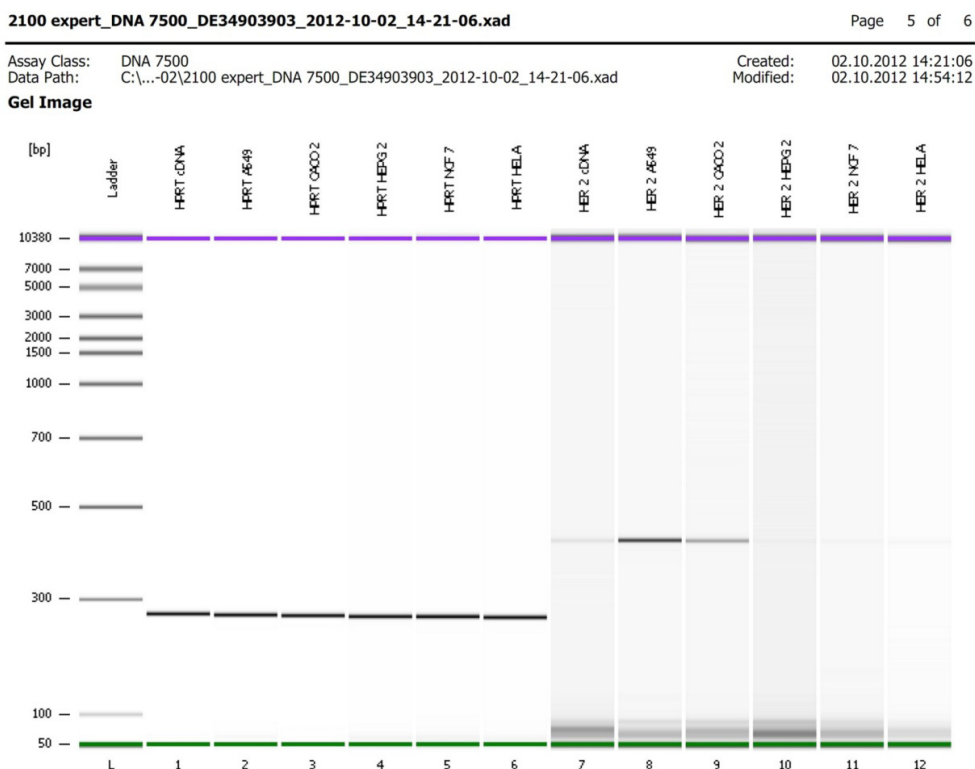


Abb. 6.2-2: Analyse einer PCR bezüglich der Transkription des c-erbB2-Gens unter Verwendung der einfachen cDNA-Menge. cDNA entspricht der cDNA der Primärzellen (ucMSC). Grün: unterer Laufmarker, in der Größe von Primerdimeren, lila: oberer Laufmarker.

Assay Class: DNA 7500
 Data Path: C:\...-31\2100 expert_DNA 7500_DE34903903_2012-10-31_14-25-59.xad
 Created: 31.10.2012 14:25:58
 Modified: 31.10.2012 14:59:58

Gel Image

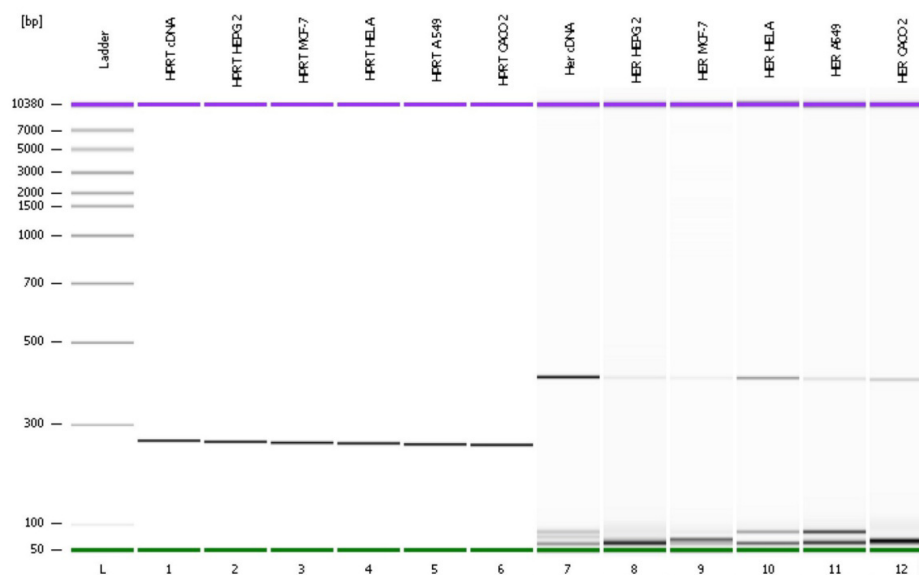


Abb. 6.2-3: Analyse einer zweiten PCR bezüglich der Transkription des c-erbB2-Gens unter Verwendung der doppelten cDNA-Menge. cDNA entspricht der cDNA der Primärzellen (ucMSC). Grün: unterer Laufmarker, in der Größe von Primerdimeren, lila: oberer Laufmarker.

6.2.5.6 Durchflusszytometrische Messungen

Zu Beginn der durchflusszytometrischen Messungen wurden zwei verschiedene Protokolle miteinander verglichen: Das „*Flow Cytometry Protocol*“ der Firma *Cell Signaling Technology*³⁸ und das institutsinterne Protokoll³⁹. In der vorangegangenen am Institut für Technische Chemie erstellten Arbeit wurde festgestellt, dass infolge der Trypsinierung manche Oberflächenproteine zerstört werden und nicht mehr detektiert werden können. Daher wurden die Zellen für alle durchflusszytometrischen Messungen mit Accutase abgelöst, welches die Zellmembran intakt lässt. Die abgelösten Zellen werden für 5 min bei 200 g zentrifugiert, einmal mit kaltem PBS gewaschen und erneut bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 1 mL Formaldehyd-Lösung (4 % in PBS) suspendiert. Die Fixierung findet für 10 min bei 37 °C statt, bevor die Zellen bei 4 °C für 5 min gekühlt werden. Auf diesen Fixierungsschritt wird bei Befolgung des institutsinternen Protokolls verzichtet. Die Zellen werden zweimal in kaltem Inkubationspuffer (2 % FKS in PBS) gewaschen. 500.000 Zellen werden in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben, zentrifugiert und in 100 µL kaltem Inkubationspuffer suspendiert. Die Zelloberfläche wird für 10 min bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifischen Antikörperbindungen vorzubeugen. Die

³⁸ <http://www.cellsignal.com/support/protocols/Flow.html>

³⁹ Dissertation, 'Establishment of recombinant cell lines and characterization of primary cells for stem cell technology applications', Dr. Pierre Moretti, Leibniz Universität Hannover, 2010

Zellsuspension wird mit in Inkubationspuffer verdünntem Antikörper auf ein Gesamtvolumen von 120 µL aufgefüllt und die Zellen und Antikörper gut durchmischt. Zusätzlich zu den spezifisch-bindenden Antikörpern werden *mouse* IgG Isotypkontrollen als Negativkontrollen verwendet. Die eingesetzte Menge der Isotypkontrolle entspricht der des entsprechenden Antikörpers. Zunächst werden die von den Herstellern empfohlenen Antikörpermengen verwendet, dann erfolgt die Titration der optimalen Antikörpermenge durch Inkubation unfixierter Zellen mit einer zunehmenden Antikörpermenge. In den folgenden Charakterisierungsstudien werden die optimierten Antikörpermengen und unfixierte Zellen verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Inkubationspuffer- und Antikörpervolumen sind in Tab. 6.2-3 nochmals zusammengefasst.

Tab. 6.2-3: Titration der Antikörpermengen für die Färbung von 500.000 Zellen. Angegeben sind die für die getesteten Antikörpermengen benötigten Volumina und die entsprechenden Volumina der Isotypkontrolle. Die vom Hersteller empfohlenen Mengen sind blau, die für die Charakterisierungen verwendeten Mengen sind rot hervorgehoben.

Antikörper	Antikörper/ 500.000 Zellen [µg]												
	0,5	0,25	0,2	0,1	0,08	0,06	0,05	0,04	0,025	0,02	0,01	0,005	0,001
Volumen [µL] anti-HER-2/neu FITC			66,7	33,3	26,7	20,0		13,3		6,7	3,3	1,7	
Volumen [µL] nkubationspuffer			53,3	86,7	93,3	-		6,7		13,3	16,7	18,3	
Volumen [µL] Isotypkontrolle FITC			4,0	2,0	1,6	1,2		0,8		0,4	0,2	0,1	
Volumen [µL] nkubationspuffer			16,0	18,0	18,4	18,8		19,2		19,6	19,8	19,9	
Volumen [µL] anti-FOLR1 PE	10,0	5,0		2,0			1,0		0,5		0,2	0,1	
Volumen [µL] nkubationspuffer	10,0	15,0		18,0			19,0		19,5		19,8	19,9	
Volumen [µL] Isotypkontrolle PE	10,0	5,0		2,0			1,0		0,5		0,2	0,1	
Volumen [µL] nkubationspuffer	10,0	15,0		18,0			19,0		19,5		19,8	19,9	
Volumen [µL] anti-EpCAM PerCP-Cy5.5				50,0	40,0	30,0		20,0		10,0	5,0	2,5	0,5
Volumen [µL] nkubationspuffer				70,0	80,0	90,0		-		10,0	15,0	17,5	19,5
Volumen [µL] Isotypkontrolle PerCP-Cy5.5				8,0	6,4	4,8		3,2		1,6	0,8	0,4	0,1
Volumen [µL] nkubationspuffer				112,0	113,6	115,2		16,8		18,4	19,2	19,6	19,9

Die Zellen werden für 1 h bei Raumtemperatur und 400 rpm mit dem Fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert, zweimal mit jeweils 500 µL Inkubationspuffer gewaschen und in 500 µL Inkubationspuffer suspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension auf ein Zellsieb gegeben und die gefärbten Zellen mit einem Coulter EPICS XL-MCL Durchflusszytometer vermessen. Die Signale des *forward scatters* (Zellgröße) werden gegen die

Signale des *side scatters* (Strukturkomplexität innerhalb der Zellen) in einem Dotplot-Diagramm aufgetragen, sodass die Mehrheit der Zellen im rechten oberen Bereich dargestellt wird. Hierfür werden ungefärbte Zellen verwendet. Gleichzeitig wird die Zellzahl gegen die logarithmische Fluoreszenzintensität in einem Histogramm dargestellt, wobei die Signalintensität (in *arbitrary units*, AU) mit zunehmender gebundener Antikörpermenge ansteigt. Bevor die mit spezifischem Antikörper gefärbten Zellen vermessen werden, werden die mit der Isotypkontrolle inkubierten Zellen vermessen. Die Verstärkung der Fluoreszenzsignale der Isotypkontrolle wird so eingestellt, dass die Signalintensität innerhalb der ersten Dekade (ungefähr bei 1 AU) liegt. Diese Einstellung wird auch für die Vermessung der Antikörpergefärbten Zellen verwendet. Da die organischen Fluorochrome nicht nur von einem Detektor gemessen werden, sondern auch von anderen Detektoren detektiert werden (*spillover*), wird die Verstärkung dieser „falschen“ Signale so verringert (kompensiert), dass die Signalintensität bei ungefähr 0 AU liegt. Die Flussrate wird so eingestellt, dass mindestens 15.000 Zellen detektiert werden, meist genügt eine mittlere Rate.

Die gemessenen Daten werden mit dem Programm WinMDI ausgewertet. Zunächst werden die Signale des *forward scatters* gegen die Signale des *side scatters* in einem Dotplot-Diagramm dargestellt. Jede Zelle wird durch einen Punkt in dem Diagramm dargestellt. Die Mehrzahl der Zellen befindet sich im rechten oberen Bereich (lebende Zellen) und bildet meist eine dichte „Wolke“. Um diesen dichten Bereich wird eine „Region“ markiert. In dieser Region befinden sich mindestens 10.000 Zellen. Durch die Markierung gelten diese Zellen als *gated*. Alle Messungen werden auf die Übereinstimmung der Lage der *gated* Region überprüft. Von den Messungen der mit der Isotypkontrolle inkubierten und mit dem Antikörper angefärbten Zellen werden Histogramme erzeugt (Zellzahl gegen die jeweiligen logarithmischen Fluoreszenzintensitäten). Die Messsignale, die in dem Histogramm dargestellt sind, werden ebenfalls *gated*. Für jedes Histogramm wird eine Statistik erhoben, in der die Gesamtzellzahl, Anzahl der *gated* Zellen, der Mittelwert der Signalintensitäten (GMean) und der Variationskoeffizient (CV) aufgeführt sind. Zudem kann ein Bereich des Histogramms mit einem Marker versehen werden, welcher die positiven (gefärbten) Zellen markiert. Die Lage dieses Markers und die Anzahl der Zellen in dem markierten Bereich werden ebenfalls in der Statistik wiedergegeben. Zum Vergleich verschiedener Messungen werden die entsprechenden Histogramme übereinander gelegt und farbig markiert. In den Histogrammen werden die Signalintensitäten (GMean) und der Variationskoeffizient (CV) der Messungen aufgeführt. Zusätzlich wird die Standardabweichung der Intensitäten berechnet: $STABW = CV * GMean / 100$. Um die optimale Antikörperkonzentration zu

ermitteln, werden die GMean-Daten der Färbungen steigender Antikörperkonzentrationen gegen die eingesetzten Antikörpermengen aufgetragen.

6.2.6 Entwicklung Quantum Dot-basierter Detektionsassays

6.2.6.1 Konjugate hydrophober Hexadecylamin-Quantum Dots_{560nm} (CdSe/ZnS) mit einem anti-HER-2/neu Antikörper

Für den Phasentransfer der hydrophoben HDA-CdSe/ZnS Kern-Hülle Quantum Dots (QD) werden 0,5 mL der QD-Stocklösung (5 μ M in Toluol) mit 0,5 mL PAMAM G5 Dendrimer-Lösung (150 μ M in Methanol) und 50 μ L Tetramethylammoniumhydroxid in einem 4 mL-Braunglas Fläschchen vermischt. Die PAMAM-Menge wird hierbei variiert, um die maximal gebundene Anzahl von PAMAM-Molekülen zu bestimmen. Das Gemisch wird für 15 h bei 30 °C in einem Rotator gemischt. Dann werden 2 mL Essigsäureethylester hinzugefügt, um die Nanopartikel-Komplexe zu fällen. Die Lösung wird zentrifugiert und die PAMAM-modifizierten QDs in PBS gelöst. Unkonjugiertes PAMAM Dendrimer wird mit Hilfe von 50 kDa MWCO Zentrifugaleinheiten abgetrennt.

Die Anzahl gebundener PAMAM Moleküle wird mit einem Bradford-Test (siehe Kapitel 6.2.6.6) ermittelt. Die Größe der PAMAM-modifizierten QDs wird mittels *dynamic light scattering* (DLS, siehe Kapitel 6.2.6.5) und Rasterelektronenmikroskopie (REM, siehe Kapitel 6.2.4.9) untersucht. Um die PAMAM-modifizierten QDs mit Hilfe des REM abbilden zu können, wird eine Probe der mit 14 PAMAM-Molekülen modifizierten QDs (P14/QDs) lyophilisiert.

Die Zytotoxizität der PAMAM-modifizierten QDs wird unter Verwendung des MTT-Tests (siehe Kapitel 6.2.4.1) ermittelt. Hierbei werden die Zellen (A-549, HEP-G2 und MCF-7) zunächst in einem zeitabhängigen MTT-Test für einen Zeitraum von 1 h, 2 h, 4 h und 24 h sowohl mit den unmodifizierten HDA-QDs als auch den P14/QDs einer Konzentration von 0,05 μ M inkubiert, um die optimale Inkubationsdauer zu bestimmen. Um mögliche Effekte der Mediumzusätze auszuschließen bzw. zu bestätigen, wird zum Vergleich das für die Verdünnung verwendete Volumen PBS-Puffer ebenso getestet wie das in der HDA-QD-Probe vorhandene Volumen Toluol. Außerdem erfolgt ein konzentrationsabhängiger MTT-Test für eine Inkubationsdauer von 4 h mit den P14/QDs zunehmender Konzentrationen (0,002; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 und 0,5 μ M).

Mögliche unspezifische Bindungen der PAMAM-modifizierten QDs werden validiert, indem MCF-7 Zellen in einer 96-Well Platte ausgesiedelt und bis zu 80 %iger Konfluenz kultiviert werden. Anschließend werden sie zweimal mit warmem PBS gewaschen und für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 100 µL P14/QDs und P28/QDs einer Konzentration von 0,9 µM inkubiert. Die Proben werden entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskop, U-MNB Filter, BP470-490 (Anregungsfilter), BA515 (Barrierefilter) betrachtet.

Um die Carboxylgruppe des Antikörpers zu aktivieren, wird der Antikörper (0,01 mg/mL) zu einem Gemisch aus 0,1 M EDC und 0,25 M NHS in 25 mM MES-Puffer (pH = 6,0) gegeben. Nach 15 min Schütteln bei Raumtemperatur werden 5 µM P14/QD-Lösung (in PBS) hinzugegeben. Das Gemisch wird für 2 h bei Raumtemperatur vermischt. Ungebundene Edukte werden mittels 300 kDa MWCO Zentrifugaleinheiten und mehrmaligem Waschen mit PBS entfernt.

Die Fluoreszenzspektren der QD- und Konjugat-Proben (2 µL) werden unter Einsatz des NanoDrop 3300 Fluorospektrometers als *relative fluorescence units* (RFU) ermittelt. Die Absorptionsspektren werden mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer als *arbitrary units* (AU) gemessen. MCF-7 Zellen werden wie oben beschrieben mit 100 µL P14/QD/anti-HER2 Konjugat (0,5 µM und 0,9 µM) für 4 h bei 37 °C angefärbt. Zudem werden MCF-7 Zellen mit 0,9 µM P14/QD/anti-HER2 Konjugat und 0,5 µM P14/QDs für 4 h bei 4 °C inkubiert, um Auskunft über den zellulären Aufnahmemechanismus zu erhalten.

6.2.6.2 Konjugate wasserdispergierbarer Thioglykolsäure-Quantum Dots_{560nm} (CdTe/CdS) mit einem anti-HER-2/neu und einem anti-EpCAM Antikörper

2 M EDC-Lösung und 0,5 M NHS-Lösung werden in 25 mM MES-Puffer (pH = 6,0) vorbereitet. 200 µL der TGA-QD₅₆₀ Stocklösung (0,909 mg/mL) werden mit 25 µL EDC-Lösung und 25 µL NHS-Lösung bei Raumtemperatur für 15 min bei 1.000 rpm im Thermomixer inkubiert, um die Carboxylgruppen der TGA-QD₅₆₀ zu aktivieren. Dann werden 3,75 µg Antikörper hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 4 h bei Raumtemperatur und 1000 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Konjugate werden von den nicht gekoppelten Edukten mit Hilfe von 300 kDa MWCO Zentrifugaleinheiten (4.000 rpm, 24 °C, 1 min) und dreimaligem Waschen mit jeweils 500 µL PBS befreit.

Die erfolgreiche Konjugation von TGA-QD₅₆₀ und anti-HER2 Antikörpern wird zum einen mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 6.2.6.8) zum anderen mittels nativer

Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe Kapitel 6.2.6.9) untersucht. Die Anzahl gebundener Antikörper-Moleküle wird mit einem Bradford-Test (siehe Kapitel 6.2.6.6) ermittelt. Die Größe der TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugate wird mittels *dynamic light scattering* (DLS, siehe Kapitel 6.2.6.5) untersucht. Die Fluoreszenzspektren und Photostabilitäten der TGA-QD₅₆₀ und Konjugate (2 µL) werden unter Einsatz des NanoDrop 3300 Fluorospektrometers als *relative fluorescence units* (RFU) ermittelt. Die Konjugate werden mit einer Kalibrationsgeraden der TGA-QD₅₆₀ am NanoDrop 3300 Fluorospektrometer quantifiziert (siehe Abb. 6.2-4 B).

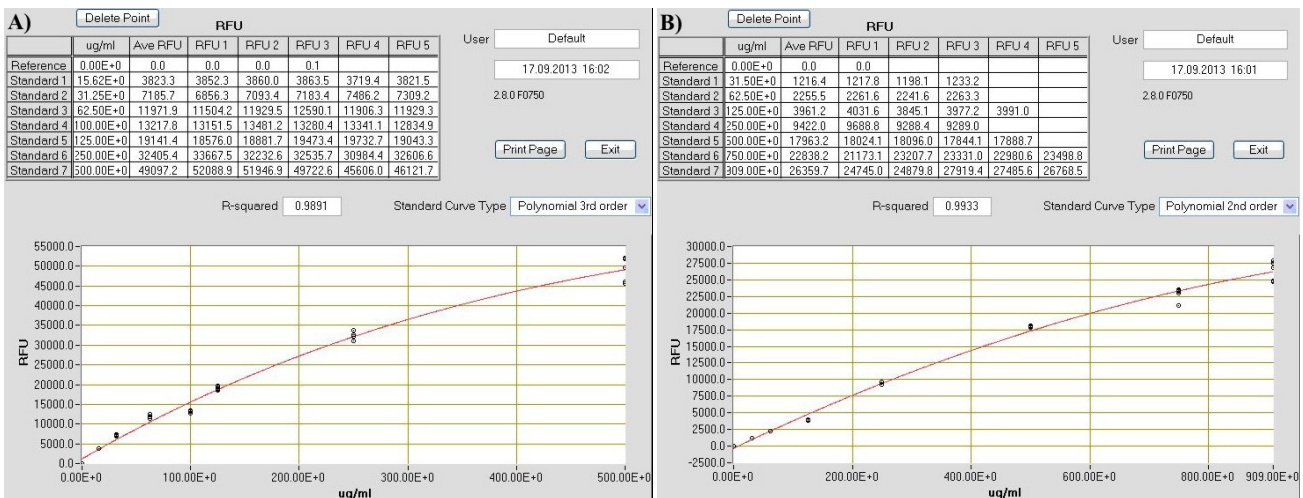


Abb. 6.2-4: Kalibrationsgeraden einer früheren TGA-QD₅₆₀*-Charge (A) und der in dieser Arbeit verwendeten TGA-QD₅₆₀ (B).

Die Zytotoxizität der anti-HER2-konjugierten QDs wird unter Verwendung des MTT-Tests (siehe Kapitel 6.2.4.1) ermittelt. Hierbei werden die Zellen (A-549 und NIH-3T3) in einem konzentrationsabhängigen MTT-Test für eine Inkubationsdauer von 2 h sowohl mit den unmodifizierten TGA-QDs als auch den TGA-QD/anti-HER2 Konjugaten zunehmender Konzentrationen (5; 10; 20; 30; 60; 120; 180 und 240 µg/mL) behandelt. Da diese Proben für beide Zelllinien toxisch sind, wird der Zelltodmechanismus näher untersucht. Eine Nekrose wird über den Nachweis von Laktatdehydrogenase im Zellkulturüberstand (siehe Kapitel 6.2.4.3) und eine Apoptose wird über den Nachweis aktiver Caspasen (siehe Kapitel 6.2.4.4) bestimmt. Diese Ergebnisse werden mit Hilfe des ApoTarget Annexin-V FITC Apoptosis Kits durchflusszytometrisch überprüft (siehe Kapitel 6.2.4.5).

Die hergestellten fluoreszierenden Biokonjugate sollen in der Mikroskopie und für durchflusszytometrische Anwendungen genutzt werden, um die universelle Verwendbarkeit der Biokonjugate zu demonstrieren. Zunächst wird hierfür die optimale Konjugat-Konzentration ermittelt, indem die HER-2/neu-positiven A-549 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 10, 20, 30, 40, 60 µg/mL) nach dem in Kapitel 4.2.2.1 und 6.2.5.6

optimierten Protokoll für die Durchflusszytometrie gefärbt werden. Es wird der 2. Detektor (Emissionsfilter/Bandbreite: 575 nm/30) verwendet. Die zellspezifische Bindung wird anschließend mit einer Konzentration von 40 µg/mL an den Rezeptor-positiven A-549 und HER-2/neu-negativen NIH-3T3 Modellzelllinien nachgewiesen.

Die Anwendung der TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugate in der Mikroskopie erfolgt zunächst mit auf Deckgläschen kultivierten A-549 und NIH-3T3 Zellen. Hierfür werden die Deckgläschen in 70 %igem Isopropanol sterilisiert, in 6-Well Platten gelegt und mit 50.000 Zellen in 3 mL über 3 Tage besiedelt. Anschließend werden die Zellen fixiert (siehe Kapitel 6.2.4.7) und mit je 1 mL TGA-QDs₅₆₀ und TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugaten (jeweils 120 µg/mL) für 2 h bei Raumtemperatur gefärbt. Die Zellkernfärbung erfolgt mit DAPI (siehe Kapitel 6.2.4.8). Die gefärbten Zellen werden mittels Fluoreszenzmikroskop, U-MNB Filter, BP470-490 (Anregungsfilter), BA515 (Barrierefilter) betrachtet. Die anschließenden Färbungen erfolgen mit nicht fixierten A-549 und NIH-3T3 Zellen nach dem in Kapitel 6.2.6.10 beschriebenen Protokoll. Die Zellen werden jeweils für 2 h mit 100 µL TGA-QDs₅₆₀ und TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugaten verschiedener Konzentrationen (60, 120 und 180 µg/mL) bei 37 °C inkubiert. Dieser Versuch wird bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C und einer Probenkonzentration von 60 µg/mL wiederholt. Für die Untersuchung des Internalisierungsmechanismus werden die kultivierten Zellen mit 100 µL TGA-QDs₅₆₀ und TGA-QD₅₆₀/anti-HER2 Konjugaten (jeweils 200 µg/mL) für 15 min, 1 h, 2 h und 6 h inkubiert.

6.2.6.3 Konjugate wasserdispergierbarer Quantum Dots_{655nm} (CdSe/ZnS) mit verschiedenen Antikörpern

Zunächst sollen die QD₆₅₅ dem Protokoll in Kapitel 6.2.6.2 entsprechend mit dem anti-HER2 Antikörper konjugiert werden. Die Größenberechnung des Nanopartikelkerns der TGA-QD₅₆₀ (CdTe/CdS) erfolgt nach [152] mit Gleichung (3):

$$(3) D [nm] = (9,8127 \cdot 10^{-7}) \cdot \lambda^3 - (1,7147 \cdot 10^{-3}) \cdot \lambda^2 - (1,0064) \cdot \lambda - (194,84)$$

mit λ = Wellenlänge des ersten Absorptionspeaks (hier $\lambda = 480$ nm [1])

Damit ergibt sich ein QD-Kerndurchmesser von 1,68 nm. Mittels DLS und TEM wurde der QD-Gesamtdurchmesser als 5 nm bestimmt [1]. Mit diesen Werten werden die Kugelvolumen ($V_{\text{Kugel}} = \pi \cdot d^3/6$) einer Kugel mit 5 nm Durchmesser und einer Kugel mit 1,68 nm Durchmesser berechnet. Das Volumen des Mantels wird durch Subtraktion des kleineren vom größeren Volumen berechnet. Mit Hilfe der Materialdichten für CdTe ($\rho =$

5,86 g/cm³)⁴⁰ und CdS ($\rho = 4,87 \text{ g/cm}^3$)⁴⁰ wird die Masse des Kerns und Mantels berechnet ($m = \rho \cdot V$), mit der die molare Masse berechnet wird ($M = m \cdot N_A$, $N_A = 6,0221 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$). Dadurch ergibt sich für die TGA-QD₅₆₀ eine molare Masse von ungefähr 190.000 g/mol, die ungefähr mit der der QD₆₅₅ übereinstimmt. Zum Vergleich wurden daher dem Protokoll in Kapitel 6.2.6.2 entsprechend 10 μL QD₆₅₅ mit 1,375 μL EDC-Lösung und 1,375 μL NHS-Lösung vermischt und mit 0,75 μg anti-HER2 versetzt.

Da alle QD₆₅₅ bei der vorangegangenen Reaktion ausgefallen sind, wird im Folgenden das Herstellerprotokoll der QD₆₅₅ (Konjugation der QDs mit Streptavidin)⁴¹ verwendet und optimiert, wobei verschiedene QD:IgG-Verhältnisse (1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40) getestet wurden. Für die Konjugation der QD₆₅₅ mit anderen Antikörpern wurde ein QD:Antikörper-Verhältnis von 1:10 verwendet. Eine Übersicht über die eingesetzten Konzentrationen und Volumina befindet sich in Tab. 6.2-4.

Tab. 6.2-4: In dieser Arbeit verwendete Quantum Dot- und Antikörper-Mengen.

Equivalent	Reagenz	Stockkonzentration	Stoffmenge	Volumen	Volumen Puffer
1	QD ₆₅₅	8 μM	0,08 nmol	10 μL	70,7 μL
1	Mouse IgG	2,5 mg/mL	0,08 nmol	4,8 μL	187,2 μL
5	Mouse IgG		0,4 nmol	24 μL	168 μL
10	Mouse IgG		0,8 nmol	48 μL	144 μL
20	Mouse IgG		1,6 nmol	96 μL	96 μL
40	Mouse IgG		3,2 nmol	192 μL	0 μL
10	anti-EGFR		1,93 mg/mL	0,8 nmol	62,2 μL
10	anti-HER2	2,4 mg/mL	50 μL		142 μL
10	anti-EpCAM	1 mg/mL	120 μL		72 μL
10	anti-FOLR1	1 mg/mL	120 μL		72 μL
10	anti-HER2*	1,5 mg/mL	80 μL		112 μL
1500	EDC		120 nmol		2,3 μL

10 μL der QD₆₅₅-Stocklösung werden mit 70,7 μL Natriumboratpuffer (10 mM, pH = 7,4) in einem 1,5 mL-Braunglas Fläschchen für 10 min auf dem Thermomixer bei 500 rpm vermischt. Dann werden insgesamt 192 μL verdünnter Antikörper hinzugegeben und ebenfalls für 10 min bei 500 rpm mit der QD-Lösung vermischt. EDC wird direkt vor der Verwendung als 10 mg/mL Stocklösung angesetzt und 2,3 μL dieser EDC-Lösung zu der QD-Lösung gegeben. Das Gemisch wird gevortext und die Konjugation erfolgt bei Raumtemperatur für 2 h und 700 rpm. Zum Abreagieren der EDC-aktivierten QDs werden 1.225 μL Natriumboratpuffer (50 mM, pH = 8,3) hinzugegeben und das Gemisch über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Proben werden bei 65.000 rpm für 10 min und bei 12 °C in einer Ultrazentrifuge (500 μL je Glaszentrifugenröhrchen) solange zentrifugiert, bis sich eine Probe vollständig in einem Zentrifugenröhrchen befindet. Der Überstand wird jeweils sehr

⁴⁰ <http://www.semiconductors.co.uk/propivi5410.htm#CdS,CdSe,CdTe>

⁴¹ <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp19020.pdf>

vorsichtig abgenommen, ohne das sehr lose „Pellet“ aufzuwirbeln. Die Konjugate werden dreimal mit Natriumboratpuffer (50 mM, pH = 8,3) gewaschen und in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Die Probe, die Waschfraktionen und Zentrifugenröhrchen werden unter UV-Strahlung betrachtet, um sicherzustellen, dass sich keine QDs an der Zentrifugenröhrchenwandung oder in den abgetrennten Fraktionen befinden.

Die erfolgreiche Konjugation von QD₆₅₅ mit den Antikörpern wird mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 6.2.6.8) untersucht. Die Anzahl gebundener Antikörpermoleküle wird mit einem BCA-Test (siehe Kapitel 6.2.6.7) ermittelt. Die Größe der QD₆₅₅/Antikörper Konjugate wird mittels *dynamic light scattering* (DLS, siehe Kapitel 6.2.6.5) untersucht. Die Fluoreszenzspektren und Photostabilitäten der QD₆₅₅ und Konjugate (2 µL) werden unter Einsatz des NanoDrop 3300 Fluorospektrometers als *relative fluorescence units* (RFU) ermittelt. Die Konzentration der Konjugate wird mit einer Kalibrationsgeraden der QD₆₅₅ am NanoDrop 3300 Fluorospektrometer bestimmt (siehe Abb. 6.2-5).

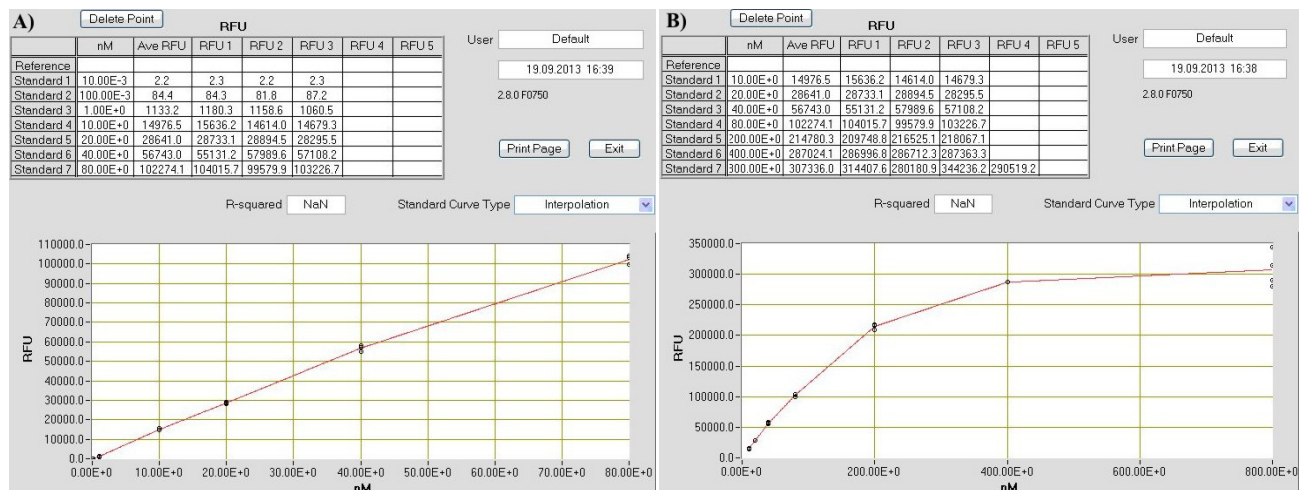


Abb. 6.2-5: Kalibrationsgeraden einer niedrigen QD₆₅₅- (A) und hohen QD₆₅₅-Konzentration (B).

Die Zytotoxizität der QD₆₅₅/Antikörper Konjugate wird unter Verwendung des MTT-Tests (siehe Kapitel 6.2.4.1) ermittelt. Hierbei werden die Zellen (A-549, HELA, HEP-G2 und NIH-3T3) in einem konzentrationsabhängigen MTT-Test für eine Inkubationsdauer von 4 h mit den QD₆₅₅/mouse IgG Konjugaten zunehmender Konzentrationen (0,05; 0,1; 1; 5; 10 und 100 nM) behandelt. Um auszuschließen, dass die geringe Toxizität der QD₆₅₅/mouse IgG Konjugate nur eine Folge der ungenügenden Bindung und Internalisierung dieser unspezifischen Nanopartikel ist, wird der MTT-Test mit spezifisch-bindenden Konjugaten und A-549 Zellen wiederholt. Hierbei werden zwei verschiedene Konzentrationen verwendet: QD₆₅₅/anti-EGFR und QD₆₅₅/anti-EpCAM (je 20 nM) und QD₆₅₅/anti-HER2* und nicht-funktionalisierte QD₆₅₅ (jeweils 100 nM).

Beispielhaft für die anderen Konjugate erfolgt die Anwendung der QD₆₅₅/anti-EGFR Konjugate in der Mikroskopie zunächst mit auf Deckgläschen kultivierten A-549 und NIH-3T3 Zellen. Hierfür werden die Deckgläschen in 70 %igem Isopropanol sterilisiert, in 6-Well Platten gelegt und mit 50.000 Zellen in 3 mL über 3 Tage besiedelt. Anschließend werden die Zellen fixiert (siehe Kapitel 6.2.4.7) und mit je 1 mL QDs₆₅₅ und QD₆₅₅/anti-EGFR Konjugaten (jeweils 2 nM) für 2 h bei Raumtemperatur gefärbt. Die gefärbten Zellen werden mittels Fluoreszenzmikroskop, U-MNG Filter, BP530-550 (Anregungsfilter), BA590 (Barrierefiter) betrachtet. Die anschließenden Färbungen erfolgen mit nicht fixierten Zellen nach dem in Kapitel 6.2.6.10 beschriebenen Protokoll. Zunächst werden A-549 Zellen mit verschiedenen anti-HER2*-Konjugat-Konzentrationen (5 - 6 nM, 3 nM) inkubiert, die mit und ohne vorherige Filterung (0,2 µm Zentrifugaleinheiten) auf die kultivierten Zellen gegeben werden. Im Folgenden werden die hergestellten Konjugate vor der Inkubation mit Zellen mit einer 0,2 µm Zentrifugaleinheit von möglichen Agglomeraten befreit. Als Konzentrationen in den folgenden Färbungen werden für die anti-EGFR, anti-FOLR1 und *mouse* IgG Konjugate 2 nM und für die anti-EpCAM Konjugate 1 nM verwendet. Für die Untersuchung des Internalisierungsmechanismus werden die kultivierten A-549 Zellen mit 100 µL QDs₆₅₅ und QD₆₅₅/anti-EGFR Konjugaten (jeweils 2 nM) für 15 min, 2 h und 6 h bei 37 °C und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Zusätzlich werden mit QD₆₅₅/anti-EGFR Konjugaten angefärbte A-549 Zellen für definierte Bestrahlungsdauern (wenige sec, 1 min, 2 min, 4 min) mit UV-Strahlung behandelt und die Fluoreszenz am Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die auf Lebendzell-Microarrays kultivierten Zellen (je 600 Zellen) werden jeweils für 2 h mit den oben angegebenen Konjugat-Konzentrationen gefärbt. Ein Lebendzell-Microarray mit jeweils 1.200 A-549 und NIH-3T3 Zellen wird fixiert, mit QD₆₅₅/anti-EGFR angefärbt und mit dem Microarray-Scanner gescannt.

Die Spezifität der Konjugat-Zell-Bindung wird mittels Durchflusszytometer genauer quantifiziert. Hierfür werden die EGFR-positiven A-549 und EGFR-negativen NIH-3T3 Zellen mit einer QD₆₅₅/anti-EGFR Konzentration von 2 nM angefärbt (siehe Kapitel 6.2.5.6) und die Fluoreszenzintensität der Zellen im 3. Detektor (Emissionsfilter/Bandbreite: 675 nm/30) gemessen.

6.2.6.4 Konjugate wasserdispergierbarer Quantum Dots_{655nm} (CdSe/ZnS) mit verschiedenen Aptameren

Für die Konjugation der QD₆₅₅ mit einem Aptamer wird das institutsintern etablierte Protokoll verwendet. Die Aptamere werden nach Herstellerangaben mit RNase-freiem

dH₂O in einer Konzentration von 200 µM gelöst. Die genaue Konzentration wird durch Messung der Absorption bei 260 nm mittels NanoDrop 1000 Spektrophotometer und dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Die eingesetzten Stoffmengen und Volumina der Aptamere und QD₆₅₅ sind in Tab. 6.2-5 aufgeführt. Die Durchführung entspricht dem Protokoll aus Kapitel 6.2.6.3, wobei abweichend hierzu die Reaktion 3 h erfolgt und nicht gekoppelte Edukte mit Hilfe von 100 kDa MWCO Zentrifugaleinheiten (4000 rpm, 2 min) und achtmaligem Waschen mit jeweils 200 µL Natriumboratpuffer (50 mM, pH = 8,3) entfernt werden. Die Konjugate der S6 und S15-Aptamere werden jeweils in 30 µL Natriumboratpuffer (50 mM, pH = 8,3), die Konjugate des Mal1-Aptamers werden in 65 µL Natriumboratpuffer (50 mM, pH = 8,3) gelöst.

Tab. 6.2-5: In dieser Arbeit verwendete Quantum Dot- und Aptamer-Mengen.

Equivalent	Reagenz	Stoffmenge	Volumen	Volumen Puffer
1	QDots	0,05 nmol	6,25 µL	50 µL
27	S6 Amino	1,3 nmol	6,19 µL	5,81 µL
28	S15 Amino	1,4 nmol	4,30 µL	7,70 µL
40	Mal1	2,0 nmol	10 µL	2 µL
1500	EDC	75 nmol	1,438 µL	

Die Konjugate werden in Bindungspuffer (BP, Aptamere) umgepuffert. Die erfolgreiche Konjugation von QD₆₅₅ und Aptameren (gelöst in Natriumboratpuffer oder Bindungspuffer) wird mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 6.2.6.8) untersucht. Die Größe der QD₆₅₅/Aptamer Konjugate wird mittels *dynamic light scattering* (DLS, siehe Kapitel 6.2.6.5) untersucht. Die Fluoreszenzspektren der QD₆₅₅ und Konjugate (2 µL) werden unter Einsatz des NanoDrop 3300 Fluorospektrometers als *relative fluorescence units* (RFU) ermittelt. Die Konzentration der Konjugate wird mit einer Kalibrationsgeraden der QD₆₅₅ am NanoDrop 3300 Fluorospektrometer ermittelt (siehe Abb. 6.2-5).

Die Anwendung der QD₆₅₅/Aptamer Konjugate in der spezifischen Zelldetektion erfolgt zunächst mit A-549 und HELA Zellen, die nach dem in Kapitel 6.2.6.10 beschriebenen Protokoll kultiviert worden sind. Die Zellen werden vor dem Blocken der Zelloberfläche fixiert (siehe Kapitel 6.2.4.7) und nach dem Blocken mit je 100 µL QD₆₅₅/S6 und QD₆₅₅/Mal1 Konjugaten (jeweils 100 nM) für 1 h bei Raumtemperatur gefärbt. Die gefärbten Zellen werden mittels Fluoreszenzmikroskop, U-MNG Filter, BP530-550 (Anregungsfilter), BA590 (Barrierefilter) betrachtet und unter Verwendung eines Microarray-Scanners bei einer Signalverstärkung (gain) von 500 gescannt. Anschließend werden 6.000 A-549 und HELA Zellen auf einen Microarray gespottet (siehe Kapitel 6.2.3.2), für 3 Tage kultiviert und dann nach dem Zellfärbungsprotokoll in Kapitel 6.2.6.10 behandelt. Von dem Protokoll abweichend werden die Zellen mit Cy-5-markierten S6 Kontrolle1 und S15 Aptameren (je

100 nM) nur für 1 h bei Raumtemperatur und 70 rpm inkubiert. Außerdem werden zwei mit Zellen bedruckte Wells mit Calcein-AM (siehe Kapitel 6.2.4.6) gefärbt, um die Zellvitalität aufzuzeigen. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 3 min werden die Microarrays getrocknet und mit dem Microarray-Scanner gescannt. Die Zellfärbungen werden mit QD₆₅₅/S15 und QD₆₅₅/Mall Konjugaten (jeweils 100 nM) auf Lebendzell-Microarrays wiederholt, wobei die Zellkerne nach der Aptamer-basierten Färbung mit DAPI angefärbt wurden (siehe Kapitel 6.2.4.8). Die gefärbten Zellen werden mittels Fluoreszenzmikroskop, U-MNG Filter, BP530-550 (Anregungsfilter), BA590 (Barrierefilter) betrachtet.

6.2.6.5 Charakterisierung der Konjugate mittels *dynamic light scattering*

Die Partikelgröße kolloidaler Nanopartikel kann mit Hilfe des *dynamic light scattering* (DLS) ermittelt werden. Die Methode dient der Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers monodispers verteilter spärlicher Partikel. Hierbei trifft ein Laserstrahl auf einen Partikel und wird in alle Richtungen gestreut. Da sich die Partikel in Suspension permanent bewegen (Brownsche Molekularbewegung) kommt es zu konstruktiven und destruktiven Interferenzen des Streulichts und zu Änderungen der Streuintensität. Eine Autokorrelationsfunktion macht die Berechnung der Diffusionsgeschwindigkeit möglich, indem der Zusammenhang zwischen der Zeit und Streuintensität berücksichtigt wird. Nachteil der DLS-Methode ist, dass der hydrodynamische Durchmesser bestimmt wird, welcher nicht zuletzt auch von der Partikelladung abhängig ist und je nach Puffer und Pufferzusätzen stark aufgrund einer ausgebildeten Doppelschicht der Salze und Wassermoleküle auf der Partikeloberfläche variieren kann. Der hydrodynamische Durchmesser wird von dem Nano-Zetasizer als Größenverteilung berechnet. Hierfür müssen der Brechungsindex des Lösungsmittels und des Materials, sowie der Diffusionskoeffizient und die Temperatur bekannt sein. Das Probenvolumen beträgt mindestens 1 mL, als Konzentration der Nanopartikelsuspension ist 1 nM ausreichend.

6.2.6.6 Charakterisierung der Konjugate mittels Bradford-Test

Die HDA-QDs wurden mit verschiedenen Mengen PAMAM modifiziert und die Anzahl der PAMAM-Moleküle pro QD wurde in einem Bradford-Test bestimmt. Die positiv-geladenen primären und tertiären Amine des PAMAM bilden unter aziden Bedingungen mit den negativen Gruppen des Coomassie Brilliant Blue G-250 Reagenzes einen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm. Mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden von PAMAM kann die Anzahl gebundener Moleküle pro QD berechnet werden. Auch für die Bestimmung

der an die TGA-QD₅₆₀ gebundenen Antikörpermenge wird der Bradford-Test verwendet. Die Kalibrationsgerade ergibt sich aus den Messungen von verschiedenen BSA-Konzentrationen. In beiden Fällen werden die Dendrimer- bzw. Antikörper-Konzentrationen in den Durchfluss- und Waschfraktionen ermittelt, die bei der Abtrennung nicht gekoppelter Edukte mittels Zentrifugaleinheiten erhalten worden sind. Zusätzlich wird eine Probe so präpariert, dass sie die gleiche Dendrimer- bzw. Antikörpermenge enthält, die für die Reaktion verwendet worden ist, aber frei von QDs ist. 10 µL der Standardkonzentrationen und Proben werden in eine unsterile 96-Well Platte pipettiert, jeweils mit 300 µL Bradford-Reagenz versetzt und für 30 sec bei 300 rpm geschüttelt. Von den Standardkonzentrationen erfolgt eine Zweifach- von den Proben eine Dreifach-Bestimmung. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wird die Absorption in einem Absorptions-Plattenleser ermittelt.

6.2.6.7 Charakterisierung der Konjugate mittels BCA-Test

Für die Bestimmung der Antikörpermenge, die an die QD₆₅₅ gebunden hat, wird das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet⁴². Zwei Bicinchoninsäure (BCA)-Moleküle bilden mit einem einwertigen Kupferkation einen violetten wasserlöslichen Chelat-Komplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm sein Absorptionsmaximum hat. Das einwertige Kupferkation entsteht zuvor durch die Reaktion von zweiwertigen Kupferkationen mit Proteinen in alkalischem Milieu. Mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden von *mouse* IgG verschiedener Konzentrationen, kann die Antikörpermenge bestimmt werden, die ungebunden in den Durchfluss- und Waschfraktionen vorliegt. Diese wird mit der eingesetzten Menge verrechnet. 25 µL jeder Standardkonzentration und Probe werden in eine unsterile 96-Well Platte pipettiert. Von den Standardkonzentrationen (0 – 1000 µg/mL) erfolgt eine Zweifach- von den Proben eine Dreifach-Bestimmung. Zusätzlich wird eine Probe so präpariert, dass sie die gleiche Antikörpermenge enthält, die für die Kopplungsreaktion verwendet worden ist, aber frei von QDs ist. Für eine 96-Well Platte werden 200 µL Arbeitsreagenz pro Well benötigt, sodass 20 ml BCA Reagenz A mit 0,4 mL BCA Reagenz B vermischt werden. Nach der Zugabe von 200 µL Arbeitsreagenz pro Well wird die Platte für 30 sec geschüttelt, mit einem Deckel versehen und für 2 h bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Die Platte wird auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption der Proben bei 570 nm in einem Absorptions-Plattenleser gemessen.

⁴² <http://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf>

6.2.6.8 Charakterisierung der Konjugate mittels Agarosegelelektrophorese

Die erfolgreiche Konjugation von Quantum Dots und Antikörpern sowie von Quantum Dots und Aptameren wird mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese untersucht. Hierfür werden sowohl die Konjugate als auch die nicht modifizierten QDs auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. Dieses Gel wird mit TAE-Puffer aber ohne Zugabe eines DNA-interkalierenden Farbstoffes (Ethidiumbromid, Roti-Safe GelStain) vorbereitet. 30 µL der TGA-QD₅₆₀ und ihrer Konjugate (jeweils 600 µg/mL) werden mit 10 µL 2x Ladefarbe vermischt und aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte 15 min bei einer angelegten Spannung von 98 V. 80 nM der QD₆₅₅ und ihrer Konjugate werden ebenfalls mit 10 µL 2x Ladefarbe vermischt und auf ein 1,5 %iges Agarosegel (ohne DNA-interkalierenden Farbstoff) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt für 1 h bei 98 V.

6.2.6.9 Charakterisierung der Konjugate mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit Hilfe einer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) werden Proteine nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. In dieser Arbeit wird eine native PAGE verwendet, um auf der Proteinebene die erfolgreiche Konjugation von Antikörpern an einen TGA-QD₅₆₀ aufzuzeigen. Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid werden mittels radikalischer Reaktion miteinander zu einem Polyacrylamidgel verknüpft. Als Radikalstarter dient hierbei Ammoniumpersulfat, das organische Amin Tetramethyldiamin initiiert die Radikalbildung. Es wird ein 15 %iges Trenngel und ein 6 %iges Sammelgel verwendet. Das Trenngel wird in einer vertikalen Gelkammer zuerst präpariert und während der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Dieses wird anschließend entfernt, sodass das Sammelgel auf das Trenngel gegossen werden kann. Die Proben werden in 20 µL Probenpuffer gegeben. Die Elektrophorese erfolgt bei 30 mA/100 V. Anschließend wird das Gel bis zur vollständigen Entfärbung in Silberentfärber/Fixierer geschwenkt. Durch das darin enthaltene Eisessig und Ethanol fallen die Proteine aus. Das Gel wird anschließend kurz mit dH₂O gewaschen und für 2,5 min in Farmers Reducer geschwenkt. Es wird in dH₂O bis zur vollständigen Entfärbung gewaschen und dann für 25 min in Silbernitrat-Lösung inkubiert. An die Proteine binden hierbei die Silberkationen der Lösung. Das Gel wird kurz in 2,5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und durch Zugabe alkalischer Formaldehyd-Lösung angefärbt. Die Silberkationen werden zu elementarem Silber reduziert, sodass die Proteine als braune Banden sichtbar werden. Die Reaktion wird gestoppt, indem das Gel in 5 %ige Essigsäure überführt wird.

6.2.6.10 Zellfärbungen für die Mikroskopie

Die Zellen werden in 8-Well Glas Chamber Slides in 200 µL Kulturmedium ausgesiedelt für 3 Tage bis zu einer 80 %igen Konfluenz kultiviert. Die ausgesiedelte Zellzahl pro Well ist Tab. 6.2-1 zu entnehmen. Das folgende Protokoll gilt auch für die Zellfärbung auf den Lebendzell-Microarrays. Das Medium wird entfernt und die Zellen werden einmal mit kaltem sterilem PBS gewaschen. Anschließend werden sie für 15 min bei Raumtemperatur in kaltem Inkubationspuffer (für Antikörper bzw. Aptamerfärbung) inkubiert, um unspezifische Bindungen durch Blocken der Zelloberfläche zu verhindern. Die Konjugate werden in den entsprechenden Inkubationspuffern verdünnt. 100 µL der Konjugat-Verdünnungen werden in jedes Well gegeben. Die Zellen werden dann für 2 h mit den Konjugaten bei Raumtemperatur oder 37 °C inkubiert. Schließlich werden die Zellen zweimal mit je 200 µL PBS gewaschen und mit DAPI gefärbt. Für die Multiplex-Färbung werden die Zellen gleichzeitig mit den entsprechenden Quantum Dot/Antikörper Konjugaten inkubiert.

6.3 Beteiligungen an Publikationen und betreute Arbeiten

Während der Promotion wurden einige Forschungsergebnisse (Teile von Kapitel 4.3, 4.4.1 und 4.4.2) bereits veröffentlicht (siehe Publikationsliste), andere Publikationen sind in Vorbereitung. Die veröffentlichten Ergebnisse, die am Institut für Technische Chemie von der Autorin dieser Arbeit erhalten wurden, sind teilweise auch in dieser Arbeit dargestellt. An dieser Stelle wird ein Überblick über die Beteiligung der Autorin an den Publikationen gegeben. Außerdem wird die von der Autorin betreute Bachelorarbeit genannt, die für Abb. 4.1-11 (Kapitel 4.1.3) als Quelle diente.

Folic acid-modified clay: targeted surface design for cell culture applications, **R. Bongartz**, D. Ag, M. Seleci, J.-G. Walter, E. E. Yalcinkaya, D. O. Demirkol, F. Stahl, S. Timur, T. Scheper.

Die Tonerde wurde an der Ege Universität, Izmir modifiziert und charakterisiert. Anschließend wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Expression des Folsäure Rezeptor 1 von R. Bongartz am Institut für Technische Chemie, Hannover charakterisiert. Das Proliferationsverhalten der Zellen sowie die Zelladhäsion wurden ebenfalls von R. Bongartz in Hannover untersucht.

Biofunctional Quantum dots as Fluorescence Probe for Cell Specific Targeting, D. Ag, **R. Bongartz**, L. E. Dogan, M. Seleci, J.-G. Walter, D. O. Demirkol, F. Stahl, S. Ozcelik, S. Timur, T. Scheper.

Die Quantum Dots wurden an der Ege Universität, Izmir hergestellt und charakterisiert. Die Herstellung und Charakterisierung der Quantum Dot/anti-HER2 Biokonjugate bezüglich ihrer Größe, optischen Eigenschaften und Zytotoxizität erfolgte in direkter Zusammenarbeit während der Forschungsaufenthalte zu gleichen Teilen von R. Bongartz und D. Ag von der Ege Universität sowohl in Izmir als auch am Institut für Technische Chemie in Hannover. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression des Biomarkers HER-2/neu von R. Bongartz am Institut für Technische Chemie charakterisiert. Basierend hierauf wurden die durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Studien in enger Zusammenarbeit durchgeführt.

From Invisible Structures of SWCNT towards Fluorescent and Targeting Architectures for Cell Imaging, D. Ag, M. Seleci, **R. Bongartz**, M. Can, S. Yurteri, I. Cianga, F. Stahl, S. Timur, T. Scheper, Y. Yagci.

Die Herstellung, Funktionalisierung und Charakterisierung der SWCNT erfolgte an der Ege Universität, Izmir. Die Zytotoxizität der verschiedenen funktionalisierten SWCNTs wurde von R. Bongartz am Institut für Technische Chemie untersucht und die Ergebnisse mit weiteren Tests überprüft. Die fluoreszenzmikroskopischen und durchflusszytometrischen Studien wurden in direkter Zusammenarbeit zu gleichen Teilen von R. Bongartz und D. Ag durchgeführt.

PAMAM-functionalized water soluble quantum dots for cancer cell targeting, M. Akin, **R. Bongartz**, J.-G. Walter, D. O. Demirkol, F. Stahl, S. Timur, T. Scheper.

Alle Arbeiten erfolgten in direkter enger Zusammenarbeit zu gleichen Teilen bearbeitet von M. Akin von der Ege Universität und R. Bongartz am Institut für Technische Chemie während eines Forschungsaufenthaltes.

Sach- und Schlussbericht für das BMBF/ TÜBITAK-Verbundprojekt (Projekt-Nr. BMBF: TUR09/I25, 01DL12013, TÜBITAK: 109T573).

Bachelorarbeit, 'Physiologisches Potential von Zellen auf Zellchips', Lukas Raddatz, 2012

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1-1: Schematische Darstellung der verschiedenen Microarray-Typen und der Verknüpfung ihrer Einsatzgebiete.	6
Abb. 3.1-2: Herstellung von TMAs (A) und ihre Anwendungsmöglichkeiten (B-F)..	8
Abb. 3.1-3: High-Density Zell-Microarray von fixierten HELA-Zellen sowie Fluoreszenzmikroskopaufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung und Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 nach einer Zellstimulation und anschließenden Microarray-Erstellung	10
Abb. 3.1-4: Schematische Darstellung der Anwendungsmöglichkeiten von Zell-Microarrays und der Einflüsse der Zellumgebung sowie einer einfachen Zellüberwachung auf einem Microarray mittels Aufnahme eines GFP-Gens in die Zelle.....	11
Abb. 3.1-5: Schematische Darstellung verschiedener Immobilisierungsmethoden für Zellen.....	13
Abb. 3.1-6: Schematische Darstellungen der verschiedenen Methoden, um Zellen mit einer Matrix voneinander abzutrennen.	15
Abb. 3.1-7: Herstellung von 3D-Microarrays durch Einkapselung der Zellen in Alginate und in PEG-Mikrostrukturen sowie durch Aussiedelung von Stammzellen in PEG-Microwells.....	16
Abb. 3.2-1: Schematische Darstellung der Aptamer Selektion und des Aufbaus von Aptameren sowie der Sekundärstruktur am Beispiel des S15 DNA-Aptamers gegen die A-549 Zelllinie.	18
Abb. 3.2-2: Übersicht über Quantum Dot Kern-Materialien mit Angabe der verfügbaren Emissionswellenlängen und der Angabe der Anwendungsbereiche, sowie eine Demonstration der Photostabilität von Quantum Dots im direkten Vergleich mit einem AlexaFluor-Farbstoff	20
Abb. 3.2-3: Übersicht über die produzierbaren Größen und Emissionsmaxima sowie der Absorptions- und Emissionsspektren der Quantum Dots einer Synthese und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Multiplexingfärbung	20
Abb. 3.2-4: Anregungsspektren und Emissionsspektren der organischen Fluorochrome Fluorescein, R-Phycoerythrin und PerCP-Cy5.5 sowie der Quantum Dots ähnlicher Emissionswellenlängen.	21
Abb. 3.2-5: Überführung der hydrophoben TOPO- oder HDA-beschichteten Quantum Dots in die wässrige Phase durch Beschichtung mit einem Polymer mit funktionellen Gruppen oder Ligandenaustausch mit einem hydrophilen, bifunktionalen Liganden bestehend aus einer Verankerung, einem hydrophilen Segment und einer funktionellen Gruppe.	22
Abb. 3.2-6: Größenvergleich von in wässriger Lösung und in organischer Phase hergestellten QDs..	23
Abb. 3.2-7: Darstellung verschiedener Verwendungsmöglichkeiten von Quantum Dots.....	23
Abb. 3.3-1: Schematische Darstellung der PI3K- und MAPK-Kaskade und der Sekundärstrukturen aller EGFR-Familienmitglieder..	25
Abb. 4-1: Schematische Darstellung des Spotvorgangs und Herstellungsprozesses von Lebendzell-Microarrays sowie ihre Anwendung in der Zelldetektion.....	28

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1-1:	Agarosegele der Plasmidaufreinigung und des Restriktionsverdaus der isolierten Plasmide.	30
Abb. 4.1-2:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der EGFP-produzierenden <i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>single</i> Kultur.....	31
Abb. 4.1-3:	Microarray, der mit einem abnehmenden Volumen einer EGFP-produzierenden <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Suspension bedruckt wurde, deren EGFP-Signale bei einer Wellenlänge von 532 nm mittels Microarray-Scanner detektiert wurden.....	31
Abb. 4.1-4:	Mikroskopaufnahme mittels Lipofektion mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfizierter NIH-3T3 Zellen.....	32
Abb. 4.1-5:	Mikroskopaufnahme mittels Polyfektion mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfizierter HEK-293 Zellen.....	33
Abb. 4.1-6:	Microarray, auf den ein zunehmendes Volumen einer EGFP-produzierenden HEK-293 Suspension gedruckt wurde, deren EGFP-Signale mittels Mikroskop detektiert wurden.....	33
Abb. 4.1-7:	Schematische Darstellung des Druckprozesses der Zellsuspension.....	35
Abb. 4.1-8:	Zunahme der Spotgröße und A-549 Zellzahl mit steigendem gespotteten Volumen.....	36
Abb. 4.1-9:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von in Medium und auf die Microarray-Oberfläche gespotteter Zellen sowie die Einflüsse unterschiedlicher Wartezeiten zwischen Immobilisierung und Mediumzugabe.....	36
Abb. 4.1-10:	Zellvitalität nach der Immobilisierung abnehmender Zellsuspensionsvolumina.....	37
Abb. 4.1-11:	Mittels CellTiter-Blue Test ermittelte Vitalitäten der A-549 Zellen auf verschiedenen Oberflächen sowie DAPI-Zellkernfärbungen.....	39
Abb. 4.1-12:	Testung einer Kollagenfolie als Zellkulturoberfläche im trockenen und befeuchteten Zustand sowie eines größeren Tropfenvolumens mit höherer Zellzahl.....	40
Abb. 4.1-13:	Abbildungen der getesteten kommerziell erwerbbaeren Inkubationskammersysteme.....	41
Abb. 4.1-14:	Vitalitätsbestimmungen von A-549 Zellen, kultiviert mit verschiedenen Medienvolumina und Extrakten der Bestandteile des Tray-Kammersystems.....	42
Abb. 4.1-15:	Aufnahme des optimierten Inkubationskammersystems und Vitalitätsbestimmungen von A-549 Zellen, kultiviert in den neuen Kammern sowie der Vergleich mit der BioCat Plastikammer ohne Kleberschicht.....	43
Abb. 4.1-16:	Vitalitätsbestimmung verschiedener immobilisierter Zellen mittels CTB-Test.....	44
Abb. 4.1-17:	Spotmorphologie verschiedener immobilisierter Zellen.....	45
Abb. 4.1-18:	Zellmorphologie verschiedener immobilisierter Zellen.....	46
Abb. 4.2-1:	Nachweis der erfolgreichen cDNA-Synthese anhand des Transkriptionsnachweises der <i>Housekeeping</i> -Gene GAPDH und HPRT mittels PCR.....	49

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.2-2: Zellcharakterisierung bezüglich der Transkription des c-erbB2 Gens, das den Zellmembran-Biomarker HER-2/neu kodiert, mittels PCR.....	50
Abb. 4.2-3: Zellcharakterisierung bezüglich der Transkription des FOLR1-Gens mittels PCR..	51
Abb. 4.2-4: Zellcharakterisierung bezüglich der Transkription des EpCAM-Gens mittels PCR.....	51
Abb. 4.2-5: Auswahl der Fluorochrome mit Berücksichtigung der Ausstattung des Durchflusszytometers..	52
Abb. 4.2-6: Protokolloptimierung der durchflusszytometrischen Messung mit unbehandelten und fixierten Zellen..	54
Abb. 4.2-7: Titrationen der optimalen anti-HER-2/neu und anti-EpCAM Antikörpermenge für die Färbung von 500.000 Zellen/Test.	55
Abb. 4.2-8: Titrationen der optimalen anti-FOLR1 Antikörpermenge für die Färbung von 500.000 Zellen/Test.	56
Abb. 4.2-9: Histogramme der NIH-3T3 und A-549 Zellcharakterisierung für den HER-2/neu Rezeptor mittels Durchflusszytometrie.....	57
Abb. 4.2-10: Histogramme der durchflusszytometrischen Charakterisierung bezüglich der Expression der Zell-Biomarker HER2/neu, FOLR1 und EpCAM.....	58
Abb. 4.3-1: Zellcharakterisierung bezüglich der Überexpression des Zellmembran-Biomarkers FOLR1 in A-549 und HELA Zellen mittels PCR und Durchflusszytometrie..	61
Abb. 4.3-2: Proliferationsverhalten von A-549 und HELA Zellen auf FS-Tonerde, unmodifizierter Tonerde und als Positivkontrolle Zellen kultiviert in einer 96-Well Polystyrol-Platte.	62
Abb. 4.3-3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der DAPI-Zellkernfärbung von A-549 Zellen, die auf unmodifizierter Tonerde und FS-modifizierter Tonerde für 72 h kultiviert wurden.....	63
Abb. 4.3-4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der DAPI-Zellkernfärbung von HELA Zellen, die auf unmodifizierter Tonerde und FS-modifizierter Tonerde für 72 h kultiviert wurden.....	63
Abb. 4.3-5: REM Aufnahmen adhärierter A-549 Zellen kultiviert auf unmodifizierter Tonerde und FS-modifizierter Tonerde..	64
Abb. 4.3-6: REM Aufnahmen adhärierter HELA Zellen kultiviert auf unmodifizierter Tonerde und FS-modifizierter Tonerde.	64
Abb. 4.3-7: Zellcharakterisierung bezüglich der Transkription des FOLR1-Gens in HEP-G2 und NIH-3T3 Zellen mittels PCR.....	65
Abb. 4.3-8: Proliferationsverhalten von HEP-G2 und NIH-3T3 Zellen auf FS-Tonerde, unmodifizierter Tonerde und als Positivkontrolle Zellen kultiviert in einer 96-Well-Polystyrol-Platte.....	65
Abb. 4.3-9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DAPI-Zellkernfärbung von HEP-G2 und NIH-3T3 Zellen, die auf FS-modifizierter Tonerde für 48 h kultiviert wurden.....	66
Abb. 4.3-10: REM Aufnahmen adhärierter HEP-G2 und NIH-3T3 Zellen kultiviert auf FS-modifizierter Tonerde.....	66

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.3-11: Nachteil der Beschichtungsmethode, sich ablösende Bereiche der unmodifizierten Tonerde und FS-modifizierten Tonerde.....	67
Abb. 4.4-1: Schematische Darstellung des Ligandenaustausches zwischen HDA-stabilisierten QDs und PAMAM-G5 Dendrimern, der Biokonjugation der hergestellten hydrophilen PAMAM-modifizierten QDs (P/QDs) mit einem Antikörper gegen den HER-2/neu Rezeptor und der Anwendung der P/QD/anti-HER2-Konjugate in der Zelldetektion.	69
Abb. 4.4-2: Fluoreszenz- und UV-Vis-Spektren von nicht funktionalisierten HDA-QDs, PAMAM-modifizierten QDs und anti-HER2-funktionalisierten P/QDs, sowie von PAMAM.	70
Abb. 4.4-3: Bestimmung der Partikelgrößen mittels DLS-Messungen und REM.	71
Abb. 4.4-4: Zeitabhängige und konzentrationsabhängige Effekte von P14/QDs und nicht funktionalisierter HDA-QDs auf die Vitalität von A-549, HEP-G2 und MCF-7 Zellen unter Verwendung des MTT-Assays.....	73
Abb. 4.4-5: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von MCF-7 Zellen, behandelt mit P28/QDs und P14/QDs für 4 h.....	75
Abb. 4.4-6: Zelluläre Aufnahme von P14/QD/anti-HER2-Konjugaten in einer Konzentration von 0,9 μM und 0,5 μM in MCF-7 Zellen nach einer Inkubation bei 37 °C für 4 h.....	75
Abb. 4.4-7: Evaluierung des Mechanismus der zellulären Aufnahme von P14/QD/anti-HER2-Konjugaten einer Konzentration von 0,9 μM und P14/QDs einer Konzentration von 0,5 μM in MCF-7 Zellen nach einer Inkubation bei 4 °C für 4 h.....	76
Abb. 4.4-8: Schema des Reaktionsmechanismus der Konjugation von TGA-QD ₅₆₀ und einem Antikörper gegen HER-2/neu, sowie der Anwendung der Konjugate in der Zellfärbung.....	77
Abb. 4.4-9: Qualitative Nachweise der erfolgreichen Konjugationen von TGA-QD ₅₆₀ mit einem Antikörper gegen HER-2/neu mit Hilfe einer nativen PAGE, eines 2,0% Agarosegels, DLS-Messungen.....	78
Abb. 4.4-10: Fluoreszenzspektren der TGA-QD ₅₆₀ /Antikörper-Konjugate.	79
Abb. 4.4-11: Konzentrationsabhängige Effekte von TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2 Konjugaten und nicht funktionalisierten TGA-QDs ₅₆₀ auf die Vitalität von A-549 und NIH-3T3 Zellen unter Verwendung des MTT-Assays.....	80
Abb. 4.4-12: Bestimmung des Zelltodmechanismus mittels LDH-Messung und Durchflusszytometrie.....	82
Abb. 4.4-13: Histogramme der konzentrationsabhängigen Bindung von TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2 an HER-2/neu-positive A-549 sowie der spezifischen Bindung der Konjugate an A-549 und HER-2/neu-negative NIH-3T3 Zellen.	83
Abb. 4.4-14: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen fixierter A-549 und fixierter NIH-3T3 Zellen, angefärbt für 2 h mit jeweils 120 $\mu\text{g/mL}$ TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2 Biokonjugat und TGA-QD ₅₆₀	84
Abb. 4.4-15: Bestimmung der optimalen Konzentration von TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2 Konjugaten für die Zelldetektion mittels Fluoreszenzmikroskop am Beispiel der A-549 Zelllinie.....	85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.4-16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Internalisierung von TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2 Biokonjugaten in das Zytosol von HER2-positiven A-549 Zellen, sowie der Akkumulation von TGA-QDs nahe der Nuklei von A-549 Zellen nach 6 h und der schwachen unspezifischen Bindungen der Biokonjugate an die HER2-negative Kontrolle NIH-3T3 nach 6 h Inkubation....	86
Abb. 4.4-17: Identifizierung des Internalisierungsprozesses von TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2 Konjugaten und nicht-funktionalisierten TGA-QD ₅₆₀ nach einer Inkubation von A-549 Zellen für 2 h bei 4 °C.....	87
Abb. 4.4-18: Normalisierte Fluoreszenzintensitäten der TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2-Konjugate betrachtet über einen Zeitraum von 30 Tagen zur Bestimmung der Langzeitstabilität.	87
Abb. 4.4-19: Abnahme der Fluoreszenzintensität der TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2-Konjugate während der Agarosegelelektrophorese und mehrmaliger UV-Bestrahlungen.....	88
Abb. 4.4-20: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen gefärbter A-549 Zellen nach UV-Bestrahlung von wenigen Sekunden während der 1. Aufnahme und der 2. Aufnahme.....	88
Abb. 4.4-21: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten und Effekte einer mehrmaligen UV-Bestrahlung auf die Fluoreszenzintensitäten zweier verschiedener TGA-QD ₅₆₀ -Chargen von 2011 und 2012.....	89
Abb. 4.4-22: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen der Färbung von A-549 Zellen mit TGA-QD ₅₆₀ */anti-HER2-Konjugaten mit zunehmender Vergrößerung.	89
Abb. 4.4-23: Verschiebung des Maximums des Emissionspeaks bei der Lagerung von TGA-QD ₅₆₀ unter einer Atmosphäre mit erhöhtem Luftanteil im Vergleich zu einer Lagerung unter N ₂ -Atmosphäre.	90
Abb. 4.4-24: Aufnahmen frischhergestellter QD/anti-HER-2/neu Biokonjugate nach dem Standardprotokoll für TGA-QD ₅₆₀	92
Abb. 4.4-25: Qualitativer Nachweis der erfolgreichen Konjugationen von QD ₆₅₅ mit <i>mouse</i> IgG zunehmender QD:IgG-Verhältnisse..	93
Abb. 4.4-26: Hydrodynamische Durchmesser und Größenverteilung unfunktionalisierter QD ₆₅₅ und der QD/IgG-Konjugate mit steigendem Antikörperüberschuss im Reaktionsansatz..	95
Abb. 4.4-27: Linearer Anstieg des Antikörper/QD-Verhältnisses mit zunehmender Antikörperkonzentration.	95
Abb. 4.4-28: Schematische Darstellung der Auswirkungen eines zunehmenden Antikörperüberschusses (Y) während der Konjugation von QD ₆₅₅	96
Abb. 4.4-29: Fluoreszenzspektren der QD ₆₅₅ /IgG-Konjugate zunehmender gebundener Antikörpermenge....	97
Abb. 4.4-30: Qualitativer Nachweis der erfolgreichen Konjugationen von QD ₆₅₅ mit verschiedenen Antikörpern.....	99
Abb. 4.4-31: Hydrodynamische Durchmesser nicht funktionalisierter QD ₆₅₅ und der QD ₆₅₅ /Antikörper-Konjugate.....	99
Abb. 4.4-32: Fluoreszenzspektren der Quantum Dot ₆₅₅ /Antikörper-Konjugate.....	100

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.4-33: Konzentrationsabhängige Effekte von QD ₆₅₅ /mouse IgG auf die Vitalität von A-549, HELA, HEP-G2 und NIH-3T3 Zellen sowie Effekte der Antikörper-funktionalisierten QD ₆₅₅ auf A-549 Zellen unter Verwendung des MTT-Assays..	101
Abb. 4.4-34: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen mit eiskaltem Ethanol fixierter A-549 und fixierter NIH-3T3 Zellen, angefärbt für 2h mit jeweils 2 nM QD ₆₅₅ /anti-EGFR Biokonjugat und QD ₆₅₅ .	102
Abb. 4.4-35: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen erster Färbungsversuche von A-549 Zellen mit QD ₆₅₅ /anti-HER2* Konjugaten mit einer Konzentration von ~5-6 nM und mit ~ 3 nM sowie Filterung der Konjugate mit einer 0,2 µm Membran, sowie Kontrollfärbungen mit QD ₆₅₅ einer Konzentration von ~5-6 nM.	102
Abb. 4.4-36: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen der spezifischen Färbung Rezeptor-exprimierender Zellen, Rezeptor-negativer Zellen und der Negativkontrolle QD ₆₅₅ /mouse IgG anhand der A-549, HELA, HEP-G2 und NIH-3T3 Zelllinie.	103
Abb. 4.4-37: Histogramm der spezifischen Bindung der QD ₆₅₅ /anti-EGFR Konjugate an A-549 und EGFR-negative NIH-3T3 Zellen	104
Abb. 4.4-38: Zeitliche Beobachtung und Identifizierung des Internalisierungsprozesses von QD ₆₅₅ /anti-EGFR Konjugaten und nicht-funktionalisierter QD ₆₅₅ nach einer Inkubation von A-549 Zellen.	105
Abb. 4.4-39: Bestimmung der Langzeitstabilität anhand gemessener Fluoreszenzintensitäten der QD ₆₅₅ /AK-Konjugate betrachtet über einen Zeitraum von mind. 20 bis maximal 57 Tagen.	105
Abb. 4.4-40: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten und Effekte einer mehrmaligen UV-Bestrahlung auf die Fluoreszenzintensitäten verschiedener QD ₆₅₅ -Chargen von 2012 und 2013.	106
Abb. 4.4-41: Photobleaching-Eigenschaften der QD ₆₅₅ /anti-EGFR Konjugate nach definierten Bestrahlungszeiten mit UV-Strahlung von wenigen Sekunden während der 1. Aufnahme bis hin zu 4 min Dauerbestrahlung.	107
Abb. 4.4-42: Qualitativer Nachweis der erfolgreichen Konjugationen von QD ₆₅₅ mit den Aptameren S6 und S15 sowie Mal1 und Darstellung des Puffereinflusses auf die QDs und Aptamerfaltung.	109
Abb. 4.4-43: Charakterisierung der QD ₆₅₅ /Aptamer Konjugate bzgl. ihrer Fluoreszenzeigenschaften und hydrodynamischen Größe.	110
Abb. 4.4-44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Scans von Ethanol-fixierten A-549 und HELA Zellen gefärbt mit QD ₆₅₅ /S6 Konjugaten und QD ₆₅₅ /Mal1 Nanopartikeln für 1 h	111
Abb. 4.5-1: Scans der angefertigten Lebendzell-Microarrays von A-549 und HELA Zellen angefärbt mit Calcein-AM, S15-Cy5 und S6 Kontrolle1-Cy5 für 1 h.	113
Abb. 4.5-2: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen der angefertigten Lebendzell-Microarrays von A-549 und HELA Zellen gefärbt mit QD ₆₅₅ /S15 Konjugaten und QD ₆₅₅ /Mal1 Nanopartikeln für 1 h.	113
Abb. 4.5-3: Scans der angefertigten fixierten und nicht fixierten Lebendzell-Microarrays von A-549 und NIH-3T3 Zellen angefärbt mit QD ₆₅₅ /anti-EGFR.	114

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.5-4:	Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von HER-2/neu-positiven Zellen und Rezeptor-negativen NIH-3T3 Zellen angefärbt mit anti-HER2* Konjugaten der TGA-QD ₅₆₀ und QD ₆₅₅ Nanopartikel ...	115
Abb. 4.5-5:	Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von FOLR1-positiven HELA Zellen und Rezeptor-negativen HEP-G2 und Primärzellen aus der Nabelschnur angefärbt mit QD ₆₅₅ /anti-FOLR1 Konjugaten	115
Abb. 4.5-6:	Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von EpCAM-positiven HEP-G2 und MCF-7 Zellen, schwach positiven A-549 Zellen und Rezeptor-negativen HELA, NIH-3T3 und Primärzellen aus der Nabelschnur angefärbt mit QD ₆₅₅ /anti-EpCAM Konjugaten für 2 h.	116
Abb. 4.5-7:	Zelldiskriminierung anhand von zwei Zellmembran-Biomarkern: EGFR und EpCAM.	117
Abb. 6.1-1:	Mikroskopaufnahme einer A-549 Kultur.....	124
Abb. 6.1-2:	Mikroskopaufnahme einer CACO-2 Kultur.....	124
Abb. 6.1-3:	Mikroskopaufnahme einer HEP-G2 Kultur.	126
Abb. 6.1-4:	Mikroskopaufnahme einer MCF-7 Kultur.	126
Abb. 6.1-5:	Mikroskopaufnahme einer NIH-3T3 Kultur.	127
Abb. 6.1-6:	Mikroskopaufnahme einer mit Toluidinblau gefärbten Kultur von Stammzellen aus der Nabelschnur	127
Abb. 6.1-7:	Karte des Plasmids pTriEx-EGFP mit einer Gesamtgröße von 6376 bp.	134
Abb. 6.1-8:	Karte des Plasmids pEGFP-N1.....	135
Abb. 6.2-1:	Schematische Darstellung von mit Annexin-V FITC und Propidiumiodid gefärbten Zellen	163
Abb. 6.2-2:	Analyse einer PCR bezüglich der Transkription des c-erbB2-Gens unter Verwendung der einfachen cDNA-Menge.	172
Abb. 6.2-3:	Analyse einer zweiten PCR bezüglich der Transkription des c-erbB2-Gens unter Verwendung der doppelten cDNA-Menge.....	173
Abb. 6.2-4:	Kalibrationsgeraden einer früheren TGA-QD ₅₆₀ *-Charge und der in dieser Arbeit verwendeten TGA-QD ₅₆₀	178
Abb. 6.2-5:	Kalibrationsgeraden einer niedrigen QD ₆₅₅ - und hohen QD ₆₅₅ -Konzentration.	181

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.2-1:	Vergleich von Antikörpern und Aptameren.....	19
Tab. 3.2-2:	Spillover der organischen Farbstoffe und Quantum Dots.....	21
Tab. 4.1-1:	Viabilität gespotteter Suspensionszellen unter Verwendung verschiedener Mikropipetten.	34
Tab. 4.2-1:	Übersicht über die verwendeten <i>forward</i> (for) und <i>reverse</i> (rev) Primer für die Analyse der Gentranskription mittels PCR.	48
Tab. 4.2-2:	Herstellerangaben zur Konzentration der Antikörper, empfohlene Antikörpermenge pro Test. ...	53
Tab. 4.2-3:	Titration der Antikörpermengen für die Färbung von 500.000 Zellen.....	55
Tab. 4.2-4:	Auflistung der Antikörper und Isotypkontrollen, die für die Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie verwendet wurden.....	57
Tab. 4.2-5:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellcharakterisierungen mittels PCR und Durchflusszytometrie.	59
Tab. 4.4-1:	Mittels konzentrationsabhängigem MTT-Test berechnete Zytotoxizitätskenndaten für P14/QDs.. ..	74
Tab. 4.4-2:	Berechnete Zytotoxizitätskenndaten für die TGA-QD ₅₆₀ /anti-HER2 Konjugate und TGA-QDs ₅₆₀ eines konzentrationsabhängigen MTT-Tests.	80
Tab. 4.4-3:	Der Literatur entnommene spezifische Kenndaten der verwendeten spezifisch-bindenden Aptamere (S6 und S15) sowie der Negativkontrollen (S6 und Mal1).. ..	108
Tab. 6.1-1:	Restriktionsenzyme und Puffer, ihre Hersteller, Enzymschnittstellen sowie deren Position im Plasmid.....	134
Tab. 6.1-2:	Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten <i>forward</i> (for) und <i>reverse</i> (rev) Primer für die Analyse der Gentranskription mittels PCR.	142
Tab. 6.2-1:	Anzahl der ausgesiedelten Zellen pro Well einer 96-Well Platte.....	159
Tab. 6.2-2:	Optimierte in den Zell-Charakterisierungsstudien verwendete Primer-Hybridisierungstemperaturen.	170
Tab. 6.2-3:	Titration der Antikörpermengen für die Färbung von 500.000 Zellen.....	174
Tab. 6.2-4:	In dieser Arbeit verwendete Quantum Dot- und Antikörper-Mengen.	180
Tab. 6.2-5:	In dieser Arbeit verwendete Quantum Dot- und Aptamer-Mengen.	183

Literaturverzeichnis

- [1] D. AG, R. BONGARTZ, L. E. DOGAN, M. SELECI, J. G. WALTER, D. O. DEMIRKOL, F. STAHL, S. OZCELIK, S. TIMUR and T. SCHEPER, 'Biofunctional quantum dots as fluorescence probe for cell-specific targeting', *Colloids Surf B Biointerfaces* 114C (2014) 96-103.
- [2] M. AKIN, R. BONGARTZ, J. G. WALTER, D. O. DEMIRKOL, F. STAHL, S. TIMUR and T. SCHEPER, 'PAMAM-functionalized water soluble quantum dots for cancer cell targeting', *Journal of Materials Chemistry* 22 (2012) 11529-11536.
- [3] A. AKINC, M. THOMAS, A. M. KLIBANOV and R. LANGER, 'Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis', *J Gene Med* 7 (2005) 657-663.
- [4] P. ALIVISATOS, 'The use of nanocrystals in biological detection', *Nat Biotechnol* 22 (2004) 47-52.
- [5] D. G. ANDERSON, S. LEVENBERG and R. LANGER, 'Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells', *Nat Biotechnol* 22 (2004) 863-866.
- [6] A. C. ANDERSSON, S. STROMBERG, H. BACKVALL, C. KAMPF, M. UHLEN, K. WESTER and F. PONTEN, 'Analysis of protein expression in cell microarrays: a tool for antibody-based proteomics', *J Histochem Cytochem* 54 (2006) 1413-1423.
- [7] P. ANGENENDT, L. NYARSIK, W. SZAFLARSKI, J. GLOKLER, K. H. NIERHAUS, H. LEHRACH, D. J. CAHILL and A. LUEKING, 'Cell-free protein expression and functional assay in nanowell chip format', *Anal Chem* 76 (2004) 1844-1849.
- [8] E. J. ANGLIN, C. SALISBURY, S. BAILEY, M. HOR, P. MACARDLE, M. FENECH, H. THISSEN and N. H. VOELCKER, 'Sorted cell microarrays as platforms for high-content informational bioassays', *Lab Chip* 10 (2010) 3413-3421.
- [9] A. C. ANTONY, 'Folate receptors', *Annu Rev Nutr* 16 (1996) 501-521.
- [10] P. A. BAEUERLE and O. GIRES, 'EpCAM (CD326) finding its role in cancer', *Br J Cancer* 96 (2007) 417-423.
- [11] M. BARLUND, F. FOROZAN, J. KONONEN, L. BUBENDORF, Y. CHEN, M. L. BITTNER, J. TORHORST, P. HAAS, C. BUCHER, G. SAUTER, O. P. KALLIONIEMI and A. KALLIONIEMI, 'Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis', *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 1252-1259.
- [12] H. BATTIFORA, 'The Multitumor (Sausage) Tissue Block - Novel Method for Immunohistochemical Antibody Testing', *Laboratory Investigation* 55 (1986) 244-248.
- [13] R. BONGARTZ, D. AG, M. SELECI, J.-G. WALTER, E. E. YALCINKAYA, D. O. DEMIRKOL, F. STAHL, S. TIMUR and T. SCHEPER, 'Folic acid-modified clay: targeted surface design for cell culture applications', *Journal of Materials Chemistry B* 1 (2013) 522-528.
- [14] T. BRAUNSCHWEIG, J. Y. CHUNG and S. M. HEWITT, 'Tissue microarrays: bridging the gap between research and the clinic', *Expert Rev Proteomics* 2 (2005) 325-336.
- [15] J. G. BRUNO and J. C. MINER, 'Therapeutic Nucleic acid-3'-conjugates', *US 2008/0161236 A1* (United States, 2008).
- [16] J. G. BRUNO, A. M. RICHARTE, M. P. CARRILLO and A. EDGE, 'An aptamer beacon responsive to botulinum toxins', *Biosens Bioelectron* 31 (2012) 240-243.
- [17] K. CAI, M. FRANT, J. BOSSERT, G. HILDEBRAND, K. LIEFEITH and K. D. JANDT, 'Surface functionalized titanium thin films: zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation', *Colloids Surf B Biointerfaces* 50 (2006) 1-8.
- [18] W. CAI, D.-W. SHIN, K. CHEN, O. GHEYSSENS, Q. CAO, S. X. WANG, S. S. GAMBHIR and X. CHEN, 'Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects', *Nano letters* 6 (2006) 669-676.
- [19] R. L. CAMP, L. A. CHARETTE and D. L. RIMM, 'Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma', *Lab Invest* 80 (2000) 1943-1949.
- [20] T. W. CHANG, 'Binding of cells to matrixes of distinct antibodies coated on solid surface', *J Immunol Methods* 65 (1983) 217-223.

- [21] A. S. CHAUHAN, N. K. JAIN, P. V. DIWAN and A. J. KHOPADE, 'Solubility enhancement of indomethacin with poly(amidoamine) dendrimers and targeting to inflammatory regions of arthritic rats', *J Drug Target* 12 (2004) 575-583.
- [22] N. CHEN, Y. HE, Y. SU, X. LI, Q. HUANG, H. WANG, X. ZHANG, R. TAI and C. FAN, 'The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots', *Biomaterials* 33 (2012) 1238-1244.
- [23] H. S. CHOI, W. LIU, P. MISRA, E. TANAKA, J. P. ZIMMER, B. ITTY IPE, M. G. BAWENDI and J. V. FRANGIONI, 'Renal clearance of quantum dots', *Nat Biotechnol* 25 (2007) 1165-1170.
- [24] J. Y. CHOI, S. H. LEE, H. B. NA, K. AN, T. HYEON and T. S. SEO, 'In vitro cytotoxicity screening of water-dispersible metal oxide nanoparticles in human cell lines', *Bioprocess and biosystems engineering* 33 (2010) 21-30.
- [25] S. W. CHOI and J. B. MASON, 'Folate and carcinogenesis: an integrated scheme', *J Nutr* 130 (2000) 129-132.
- [26] A. CIBIEL, DUPONT, D. M., DUCONGÉ, F., 'Methods To Identify Aptamers against Cell Surface Biomarkers ', *Pharmaceuticals* 4 (2011) 1216-1235.
- [27] A. CIBIEL, C. PESTOURIE and F. DUCONGE, 'In vivo uses of aptamers selected against cell surface biomarkers for therapy and molecular imaging', *Biochimie* 94 (2012) 1595-1606.
- [28] A. R. CLAPP, I. L. MEDINTZ, J. M. MAURO, B. R. FISHER, M. G. BAWENDI and H. MATTOUSSI, 'Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors', *J Am Chem Soc* 126 (2004) 301-310.
- [29] A. H. COONS, H. J. CREECH and R. N. JONES, 'Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group', *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47 (1941) 200-202.
- [30] A. H. COONS, E. H. LEDUC and J. M. CONNOLLY, 'Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit', *J Exp Med* 102 (1955) 49-60.
- [31] M. DAHAN, T. LAURENCE, F. PINAUD, D. S. CHEMLA, A. P. ALIVISATOS, M. SAUER and S. WEISS, 'Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots', *Optics Letters* 26 (2001) 825-827.
- [32] A. DATE, P. PASINI and S. DAUNERT, 'Fluorescent and bioluminescent cell-based sensors: strategies for their preservation', *Adv Biochem Eng Biotechnol* 117 (2010) 57-75.
- [33] J. B. DELEHANTY, H. MATTOUSSI and I. L. MEDINTZ, 'Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues', *Anal Bioanal Chem* 393 (2009) 1091-1105.
- [34] J. B. DELEHANTY, K. M. SHAFFER and B. LIN, 'A comparison of microscope slide substrates for use in transfected cell microarrays', *Biosens Bioelectron* 20 (2004) 773-779.
- [35] A. M. DERFUS, W. C. W. CHAN and S. N. BHATIA, 'Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots', *Nano Lett* 4 (2004) 11-18.
- [36] H. DUAN and S. NIE, 'Cell-penetrating quantum dots based on multivalent and endosome-disrupting surface coatings', *J Am Chem Soc* 129 (2007) 3333-3338.
- [37] A. D. ELLINGTON and J. W. SZOSTAK, 'In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands', *Nature* 346 (1990) 818-822.
- [38] B. FALCK, N. A. HILLARP, G. THIEME and A. TORP, 'Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde', *J Histochem Cytochem* 10 (1962) 348-354.
- [39] J. R. FALSEY, M. RENIL, S. PARK, S. LI and K. S. LAM, 'Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays', *Bioconjug Chem* 12 (2001) 346-353.
- [40] B. FERRER, R. BERMUDO, T. THOMSON, I. NAYACH, M. SOLER, M. SANCHEZ, M. CASTILLO, J. CALVO, E. CAMPO and P. L. FERNANDEZ, 'Paraffin-embedded cell line microarray (PECLIMA): development and validation of a high-throughput method for antigen profiling of cell lines', *Pathobiology* 72 (2005) 225-232.
- [41] D. FISCHER, T. BIEBER, Y. LI, H. P. ELSASSER and T. KISSEL, 'A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity', *Pharm Res* 16 (1999) 1273-1279.

- [42] D. FISCHER, Y. LI, B. AHLEMEYER, J. KRIEGLSTEIN and T. KISSEL, 'In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis', *Biomaterials* 24 (2003) 1121-1131.
- [43] C. J. FLAIM, S. CHIEN and S. N. BHATIA, 'An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation', *Nat Methods* 2 (2005) 119-125.
- [44] X. GAO, Y. CUI, R. M. LEVENSON, L. W. CHUNG and S. NIE, 'In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots', *Nat Biotechnol* 22 (2004) 969-976.
- [45] N. GAPONIK, D. V. TALAPIN, A. L. ROGACH, K. HOPPE, E. V. SHEVCHENKO, A. KORNOWSKI, A. EYCHMULLER and H. WELLER, 'Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes', *J Phys Chem B* 106 (2002) 7177-7185.
- [46] K. GEBHARDT, A. SHOKRAEI, E. BABAIE and B. H. LINDQVIST, 'RNA aptamers to S-adenosylhomocysteine: kinetic properties, divalent cation dependency, and comparison with anti-S-adenosylhomocysteine antibody', *Biochemistry* 39 (2000) 7255-7265.
- [47] M. GESZKE, M. MURIAS, L. BALAN, G. MEDJANDI, J. KORCZYNSKI, M. MORITZ, J. LULEK and R. SCHNEIDER, 'Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells', *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 1327-1338.
- [48] M. GHAEDI, N. TULEUOVA, M. A. ZERN, J. WU and A. REVZIN, 'Bottom-up signaling from HGF-containing surfaces promotes hepatic differentiation of mesenchymal stem cells', *Biochem Biophys Res Commun* 407 (2011) 295-300.
- [49] E. R. GOLDMAN, H. MATTOUSSI, G. P. ANDERSON, I. L. MEDINTZ and J. M. MAURO, 'Fluoroimmunoassays using antibody-conjugated quantum dots', *Methods Mol Biol* 303 (2005) 19-34.
- [50] D. S. GRAY, J. L. TAN, J. VOLDMAN and C. S. CHEN, 'Dielectrophoretic registration of living cells to a microelectrode array', *Biosens Bioelectron* 19 (2004) 1765-1774.
- [51] S. P. GYGI, Y. ROCHON, B. R. FRANZA and R. AEBERSOLD, 'Correlation between protein and mRNA abundance in yeast', *Mol Cell Biol* 19 (1999) 1720-1730.
- [52] J. HAMM, 'Characterisation of antibody-binding RNAs selected from structurally constrained libraries', *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 2220-2227.
- [53] T. HART, A. ZHAO, A. GARG, S. BOLUSANI and E. M. MARCOTTE, 'Human cell chips: adapting DNA microarray spotting technology to cell-based imaging assays', *PLoS One* 4 (2009) e7088.
- [54] G. B. HENDERSON, 'Folate-binding proteins', *Annu Rev Nutr* 10 (1990) 319-335.
- [55] M. HERLYN, Z. STEPLEWSKI, D. HERLYN and H. KOPROWSKI, 'Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies', *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 1438-1442.
- [56] T. HOKFELT and A. LJUNGDAHL, 'Modification of the Falck-Hillarp formaldehyde fluorescence method using the Vibratome: simple, rapid and sensitive localization of catecholamines in sections of unfixed or formalin fixed brain tissue', *Histochemie* 29 (1972) 325-339.
- [57] A. L. HOOK, H. THISSEN and N. H. VOELCKER, 'Advanced substrate fabrication for cell microarrays', *Biomacromolecules* 10 (2009) 573-579.
- [58] A. HOSHINO, K. FUJIOKA, T. OKU, M. SUGA, Y. F. SASAKI, T. OHTA, M. YASUHARA, K. SUZUKI and K. YAMAMOTO, 'Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification', *Nano letters* 4 (2004) 2163-2169.
- [59] D. E. HUIZENGA and J. W. SZOSTAK, 'A DNA aptamer that binds adenosine and ATP', *Biochemistry* 34 (1995) 656-665.
- [60] M. A. IWUAGWU and A. JIDEONWO, 'Preliminary investigations into the in-vitro interaction of folic acid with magnesium trisilicate and edible clay', *International Journal of Pharmaceutics* 65 (1990) 63-67.
- [61] J. K. JAISWAL, H. MATTOUSSI, J. M. MAURO and S. M. SIMON, 'Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates', *Nat Biotechnol* 21 (2003) 47-51.
- [62] D. JELLINEK, L. S. GREEN, C. BELL, C. K. LYNOTT, N. GILL, C. VARGESE, G. KIRSCHENHEUTER, D. P. MCGEE, P. ABESINGHE, W. A. PIEKEN and ET AL., 'Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor', *Biochemistry* 34 (1995) 11363-11372.

- [63] R. D. JENISON, S. D. JENNINGS, D. W. WALKER, R. F. BARGATZE and D. PARMA, 'Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion', *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8 (1998) 265-279.
- [64] R. JEVPRASEPHANT, J. PENNY, R. JALAL, D. ATTWOOD, N. B. MCKEOWN and A. D'EMANUELE, 'The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers', *Int J Pharm* 252 (2003) 263-266.
- [65] C. KAMPF, A.-C. ANDERSSON, K. WESTER, E. BJÖRLING, M. UHLEN and F. PONTEN, 'Antibody-Based Tissue Profiling As a Tool for Clinical Proteomics', *Clinical Proteomics* 1 (2004) 285-299.
- [66] J. M. KARP, J. YEH, G. ENG, J. FUKUDA, J. BLUMLING, K. Y. SUH, J. CHENG, A. MAHDAVI, J. BORENSTEIN, R. LANGER and A. KHADEMHOSEINI, 'Controlling size, shape and homogeneity of embryoid bodies using poly(ethylene glycol) microwells', *Lab Chip* 7 (2007) 786-794.
- [67] L. E. KELEMEN, 'The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander?', *Int J Cancer* 119 (2006) 243-250.
- [68] J. KHANDARE, P. KOLHE, O. PILLAI, S. KANNAN, M. LIEH-LAI and R. M. KANNAN, 'Synthesis, cellular transport, and activity of polyamidoamine dendrimer-methylprednisolone conjugates', *Bioconjug Chem* 16 (2005) 330-337.
- [69] G. B. KIM and Y. P. KIM, 'Analysis of protease activity using quantum dots and resonance energy transfer', *Theranostics* 2 (2012) 127-138.
- [70] H. KIM, R. E. COHEN, P. T. HAMMOND and D. J. IRVINE, 'Live Lymphocyte Arrays for Biosensing', *Advanced Functional Materials* 16 (2006) 1313-1323.
- [71] S. KIM, Y. T. LIM, E. G. SOLTESZ, A. M. DE GRAND, J. LEE, A. NAKAYAMA, J. A. PARKER, T. MIHALJEVIC, R. G. LAURENCE, D. M. DOR, L. H. COHN, M. G. BAWENDI and J. V. FRANGIONI, 'Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping', *Nat Biotechnol* 22 (2004) 93-97.
- [72] I. K. KO, K. KATO and H. IWATA, 'Parallel analysis of multiple surface markers expressed on rat neural stem cells using antibody microarrays', *Biomaterials* 26 (2005) 4882-4891.
- [73] W. G. KOH, L. J. ITLE and M. V. PISHKO, 'Molding of hydrogel microstructures to create multiphenotype cell microarrays', *Anal Chem* 75 (2003) 5783-5789.
- [74] J. KONONEN, L. BUBENDORF, A. KALLIONIEMI, M. BARLUND, P. SCHRAML, S. LEIGHTON, J. TORHORST, M. J. MIHATSCH, G. SAUTER and O. P. KALLIONIEMI, 'Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens', *Nat Med* 4 (1998) 844-847.
- [75] M.-Y. LEE, R. ANAND KUMAR, S. M. SUKUMARAN, M. G. HOGG, D. S. CLARK and J. S. DORDICK, 'Three-dimensional cellular microarray for high-throughput toxicology assays', *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 59-63.
- [76] E. E. LEES, T. L. NGUYEN, A. H. CLAYTON, B. W. MUIR and P. MULVANEY, 'The preparation of colloidally stable, water-soluble, biocompatible, semiconductor nanocrystals with a small hydrodynamic diameter', *ACS Nano* 3 (2009) 1121-1128.
- [77] Y. F. LIU and J. S. YU, 'Selective synthesis of CdTe and high luminescence CdTe/CdS quantum dots: the effect of ligands', *J Colloid Interface Sci* 333 (2009) 690-698.
- [78] C. MANNIRONI, A. DI NARDO, P. FRUSCOLONI and G. P. TOCCHINI-VALENTINI, 'In vitro selection of dopamine RNA ligands', *Biochemistry* 36 (1997) 9726-9734.
- [79] N. MASUDA, T. OHNISHI, S. KAWAMOTO, M. MONDEN and K. OKUBO, 'Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples', *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 4436-4443.
- [80] H. MATTOUSSI, G. PALUI and H. B. NA, 'Luminescent quantum dots as platforms for probing in vitro and in vivo biological processes', *Adv Drug Deliv Rev* 64 (2012) 138-166.
- [81] K. I. MCCONNELL, R. M. SCHWELLER, M. R. DIEHL and J. SUH, 'Live-cell microarray surface coatings supporting reverse transduction by adeno-associated viruses', *Biotechniques* 51 (2011) 255-258.
- [82] I. L. MEDINTZ, H. T. UYEDA, E. R. GOLDMAN and H. MATTOUSSI, 'Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing', *Nat Mater* 4 (2005) 435-446.

- [83] L. MELI, E. T. JORDAN, D. S. CLARK, R. J. LINHARDT and J. S. DORDICK, 'Influence of a three-dimensional, microarray environment on human cell culture in drug screening systems', *Biomaterials* 33 (2012) 9087-9096.
- [84] A. R. MENJOGE, R. M. KANNAN and D. A. TOMALIA, 'Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications', *Drug Discov Today* 15 (2010) 171-185.
- [85] T. MIYAJI, S. M. HEWITT, L. A. LIOTTA and R. A. STAR, 'Frozen protein arrays: a new method for arraying and detecting recombinant and native tissue proteins', *Proteomics* 2 (2002) 1489-1493.
- [86] H. C. MOELLER, M. K. MIAN, S. SHRIVASTAVA, B. G. CHUNG and A. KHADEMOSSEINI, 'A microwell array system for stem cell culture', *Biomaterials* 29 (2008) 752-763.
- [87] I. NABIEV, S. MITCHELL, A. DAVIES, Y. WILLIAMS, D. KELLEHER, R. MOORE, Y. K. GUN'KO, S. BYRNE, Y. P. RAKOVICH, J. F. DONEGAN, A. SUKHANOVA, J. CONROY, D. COTTELL, N. GAPONIK, A. ROGACH and Y. VOLKOV, 'Nonfunctionalized nanocrystals can exploit a cell's active transport machinery delivering them to specific nuclear and cytoplasmic compartments', *Nano Lett* 7 (2007) 3452-3461.
- [88] R. M. NEVE, H. A. LANE and N. E. HYNES, 'The role of overexpressed HER2 in transformation', *Ann Oncol* 12 Suppl 1 (2001) S9-13.
- [89] D. NIEUWLANDT, M. WECKER and L. GOLD, 'In vitro selection of RNA ligands to substance P', *Biochemistry* 34 (1995) 5651-5659.
- [90] L. NIMRICHTER, A. GARGIR, M. GORTLER, R. T. ALTSTOCK, A. SHTEVI, O. WEISSHAUS, E. FIRE, N. DOTAN and R. L. SCHNAAR, 'Intact cell adhesion to glycan microarrays', *Glycobiology* 14 (2004) 197-203.
- [91] E. H. OH, S. H. LEE, S. H. LEE, H. J. KO and T. H. PARK, 'Cell-based high-throughput odorant screening system through visualization on a microwell array', *Biosensors and Bioelectronics* 53 (2014) 18-25.
- [92] M. OHGAKI, T. KIZUKI, M. KATSURA and K. YAMASHITA, 'Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite', *J Biomed Mater Res* 57 (2001) 366-373.
- [93] T. OKAMOTO, T. SUZUKI and N. YAMAMOTO, 'Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology', *Nat Biotechnol* 18 (2000) 438-441.
- [94] W. A. OSTA, Y. CHEN, K. MIKHITARIAN, M. MITAS, M. SALEM, Y. A. HANNUN, D. J. COLE and W. E. GILLANDERS, 'EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy', *Cancer Res* 64 (2004) 5818-5824.
- [95] G. OZKOC, S. KEMALOGLU and M. QUAEDFLIEG, 'Production of poly(lactic acid)/organoclay nanocomposite scaffolds by microcompounding and polymer/particle leaching', *Polymer Composites* 31 (2010) 674-683.
- [96] N. PARKER, M. J. TURK, E. WESTRICK, J. D. LEWIS, P. S. LOW and C. P. LEAMON, 'Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay', *Anal Biochem* 338 (2005) 284-293.
- [97] H. K. PATRA, S. BANERJEE, U. CHAUDHURI, P. LAHIRI and A. K. DASGUPTA, 'Cell selective response to gold nanoparticles', *Nanomedicine* 3 (2007) 111-119.
- [98] C. PATRIARCA, R. M. MACCHI, A. K. MARSCHNER and H. MELLSTEDT, 'Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review', *Cancer Treat Rev* 38 (2012) 68-75.
- [99] C.-W. PENG and Y. LI, 'Application of Quantum Dots-based Biotechnology in Cancer Diagnosis: Current Status and Future Perspectives', *Journal of Nanomaterials* vol. 2010 (2010) 11 pages.
- [100] H. PENG, L. ZHANG, C. SOELLER and J. TRAVAS-SEJDIC, 'Preparation of water-soluble CdTe/CdS core/shell quantum dots with enhanced photostability', *J Lumin* 127 (2007) 721-726.
- [101] R. J. PIETRAS, J. ARBOLEDA, D. M. REESE, N. WONGVIPAT, M. D. PEGRAM, L. RAMOS, C. M. GORMAN, M. G. PARKER, M. X. SLIWKOWSKI and D. J. SLAMON, 'HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells', *Oncogene* 10 (1995) 2435-2446.
- [102] M. C. PIRRUNG, 'Die Herstellung von DNA-Chips', *Angew Chem* 114 (2002) 1326-1341.

- [103] J. M. POLAK and S. VAN NOORDEN, *Introduction to Immunocytochemistry* (BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, (2003).
- [104] D. E. PRASUHN, A. FELTZ, J. B. BLANCO-CANOSA, K. SUSUMU, M. H. STEWART, B. C. MEI, A. V. YAKOVLEV, C. LOUKOV, J. M. MALLET, M. OHEIM, P. E. DAWSON and I. L. MEDINTZ, 'Quantum dot peptide biosensors for monitoring caspase 3 proteolysis and calcium ions', *ACS Nano* 4 (2010) 5487-5497.
- [105] D. PROSKE, M. BLANK, R. BUHMANN and A. RESCH, 'Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications', *Appl Microbiol Biotechnol* 69 (2005) 367-374.
- [106] S. RASI GHAEMI, F. HARDING, B. DELALAT, R. VASANI and N. H. VOELCKER, 'Surface engineering for long-term culturing of mesenchymal stem cell microarrays', *Biomacromolecules* 14 (2013) 2675-2683.
- [107] S. RIJNBOUTT, G. JANSEN, G. POSTHUMA, J. B. HYNES, J. H. SCHORNAGEL and G. J. STROUS, 'Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor-alpha', *J Cell Biol* 132 (1996) 35-47.
- [108] D. L. RIMM, R. L. CAMP, L. A. CHARETTE, D. A. OLSEN and E. PROVOST, 'Amplification of tissue by construction of tissue microarrays', *Exp Mol Pathol* 70 (2001) 255-264.
- [109] D. L. ROBERTSON and G. F. JOYCE, 'Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA', *Nature* 344 (1990) 467-468.
- [110] A. L. ROGACH, T. FRANZL, T. A. KLAR, J. FELDMANN, N. GAPONIK, V. LESNYAK, A. SHAVEL, A. EYCHMULLER, Y. P. RAKOVICH and J. F. DONEGAN, 'Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals: State-of-the-Art', *J Phys Chem C* 111 (2007) 14628-14637.
- [111] S. D. ROSE, 'Application of a novel microarraying system in genomics research and drug discovery', *J Ass Lab Autom* 3 (1998) 53-56.
- [112] I. RUBIN and Y. YARDEN, 'The basic biology of HER2', *Ann Oncol* 12 Suppl 1 (2001) S3-8.
- [113] M. A. RUBIN, R. DUNN, M. STRAWDERMAN and K. J. PIENTA, 'Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis', *Am J Surg Pathol* 26 (2002) 312-319.
- [114] E. RUIZ-HITZKY, P. ARANDA, M. DARDER and G. RYTWO, 'Hybrid materials based on clays for environmental and biomedical applications', *Journal of Materials Chemistry* 20 (2010) 9306-9321.
- [115] G. SAUTER, R. SIMON and K. HILLAN, 'Tissue microarrays in drug discovery', *Nat Rev Drug Discov* 2 (2003) 962-972.
- [116] K. L. SCHMEICHEL and M. J. BISSELL, 'Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions', *J Cell Sci* 116 (2003) 2377-2388.
- [117] M. SCHOENBERG FEJZO and D. J. SLAMON, 'Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA, and proteins', *Am J Pathol* 159 (2001) 1645-1650.
- [118] J. M. SCHWENK, D. STOLL, M. F. TEMPLIN and T. O. JOOS, 'Cell microarrays: an emerging technology for the characterization of antibodies', *Biotechniques* Suppl (2002) 54-61.
- [119] H. F. SEARS, B. ATKINSON, J. MATTIS, C. ERNST, D. HERLYN, Z. STEPLEWSKI, P. HAYRY and H. KOPROWSKI, 'Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours', *Lancet* 1 (1982) 762-765.
- [120] R. SHUKLA, T. P. THOMAS, J. PETERS, A. KOTLYAR, A. MYC and J. R. BAKER, 'Tumor angiogenic vasculature targeting with PAMAM dendrimer-RGD conjugates', *Chemical Communications* (2005) 5739-5741.
- [121] R. SHUKLA, T. P. THOMAS, J. L. PETERS, A. M. DESAI, J. KUKOWSKA-LATALLO, A. K. PATRI, A. KOTLYAR and J. R. BAKER, JR., 'HER2 specific tumor targeting with dendrimer conjugated anti-HER2 mAb', *Bioconjug Chem* 17 (2006) 1109-1115.
- [122] J. SILVER and W. OU, 'Photoactivation of quantum dot fluorescence following endocytosis', *Nano Lett* 5 (2005) 1445-1449.
- [123] G. SPIZZO, P. WENT, S. DIRNHOFER, P. OBRIST, H. MOCH, P. A. BAEUERLE, E. MUELLER-HOLZNER, C. MARTH, G. GASTL and A. G. ZEIMET, 'Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer', *Gynecol Oncol* 103 (2006) 483-488.

- [124] J. P. STEPHAN, S. SCHANZ, A. WONG, P. SCHOW and W. L. WONG, 'Development of a frozen cell array as a high-throughput approach for cell-based analysis', *Am J Pathol* 161 (2002) 787-797.
- [125] C. STREULI, 'Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation', *Curr Opin Cell Biol* 11 (1999) 634-640.
- [126] Y. SU, Y. HE, H. LU, L. SAI, Q. LI, W. LI, L. WANG, P. SHEN, Q. HUANG and C. FAN, 'The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase - synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating', *Biomaterials* 30 (2009) 19-25.
- [127] Y. SU, F. PENG, Z. JIANG, Y. ZHONG, Y. LU, X. JIANG, Q. HUANG, C. FAN, S. T. LEE and Y. HE, 'In vivo distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots', *Biomaterials* 32 (2011) 5855-5862.
- [128] A. SUKHANOVA, J. DEVY, L. VENTEO, H. KAPLAN, M. ARTEMYEV, V. OLEINIKOV, D. KLINOV, M. PLUOT, J. H. COHEN and I. NABIEV, 'Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells', *Anal Biochem* 324 (2004) 60-67.
- [129] D. SUSSMAN, J. C. NIX and C. WILSON, 'The structural basis for molecular recognition by the vitamin B 12 RNA aptamer', *Nat Struct Biol* 7 (2000) 53-57.
- [130] W. TAI, R. MAHATO and K. CHENG, 'The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery', *J Control Release* 146 (2010) 264-275.
- [131] M. TAKIKITA, J. Y. CHUNG and S. M. HEWITT, 'Tissue microarrays enabling high-throughput molecular pathology', *Curr Opin Biotechnol* 18 (2007) 318-325.
- [132] D. M. TASSET, M. F. KUBIK and W. STEINER, 'Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes', *J Mol Biol* 272 (1997) 688-698.
- [133] D. K. TIWARI, S. TANAKA, Y. INOUE, K. YOSHIZAWA, T. M. WATANABE and T. JIN, 'Synthesis and Characterization of Anti-HER2 Antibody Conjugated CdSe/CdZnS Quantum Dots for Fluorescence Imaging of Breast Cancer Cells', *Sensors (Basel)* 9 (2009) 9332-9364.
- [134] G. TOFFOLI, A. RUSSO, A. GALLO, C. CERNIGOI, S. MIOTTI, R. SORIO, S. TUMOLO and M. BOIOCCHI, 'Expression of folate binding protein as a prognostic factor for response to platinum-containing chemotherapy and survival in human ovarian cancer', *Int J Cancer* 79 (1998) 121-126.
- [135] G. TOURNAIRE, J. COLLINS, S. CAMPBELL, H. MIZOMOTO, S. OGAWA, J. F. THABURET and M. BRADLEY, 'Polymer microarrays for cellular adhesion', *Chem Commun (Camb)* (2006) 2118-2120.
- [136] M. TRZPIS, P. M. MCLAUGHLIN, L. M. DE LEIJ and M. C. HARMSSEN, 'Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule', *Am J Pathol* 171 (2007) 386-395.
- [137] K. M. TSOI, Q. DAI, B. A. ALMAN and W. C. CHAN, 'Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies', *Acc Chem Res* 46 (2012) 662-671.
- [138] C. TUERK and L. GOLD, 'Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase', *Science* 249 (1990) 505-510.
- [139] J.-G. WALTER, 'Neue Materialien und Methoden in der Protein-Microarray-Technologie', Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, (2008).
- [140] H. WARTLICK, K. MICHAELIS, S. BALTHASAR, K. STREBHARDT, J. KREUTER and K. LANGER, 'Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells', *J Drug Target* 12 (2004) 461-471.
- [141] A. WATERWORTH, A. HANBY and V. SPEIRS, 'A novel cell array technique for high-throughput, cell-based analysis', *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 41 (2005) 185-187.
- [142] B. WEIGELT, A. T. LO, C. C. PARK, J. W. GRAY and M. J. BISSELL, 'HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment', *Breast Cancer Res Treat* 122 (2010) 35-43.
- [143] P. WENT, M. VASEI, L. BUBENDORF, L. TERRACCIANO, L. TORNILLO, U. RIEDE, J. KONONEN, R. SIMON, G. SAUTER and P. A. BAEUERLE, 'Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers', *Br J Cancer* 94 (2006) 128-135.
- [144] P. T. WENT, A. LUGLI, S. MEIER, M. BUNDI, M. MIRLACHER, G. SAUTER and S. DIRNHOFER, 'Frequent EpCam protein expression in human carcinomas', *Hum Pathol* 35 (2004) 122-128.

- [145] M. WERNER, A. CHOTT, A. FABIANO and H. BATTIFORA, 'Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry', *Am J Surg Pathol* 24 (2000) 1016-1019.
- [146] J. M. WORLE-KNIRSCH, K. PULSKAMP and H. F. KRUG, 'Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays', *Nano Lett* 6 (2006) 1261-1268.
- [147] X. WU, H. LIU, J. LIU, K. N. HALEY, J. A. TREADWAY, J. P. LARSON, N. GE, F. PEALE and M. P. BRUCHEZ, 'Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots', *Nat Biotechnol* 21 (2003) 41-46.
- [148] Y. XIAO, S. P. FORRY, X. GAO, R. D. HOLBROOK, W. G. TELFORD and A. TONA, 'Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake', *J Nanobiotechnology* 8 (2010) 13.
- [149] T. XU, J. JIN, C. GREGORY, J. J. HICKMAN and T. BOLAND, 'Inkjet printing of viable mammalian cells', *Biomaterials* 26 (2005) 93-99.
- [150] Y. YARDEN and G. PINES, 'The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology', *Nat Rev Cancer* 12 (2012) 553-563.
- [151] M. L. YARMUSH and K. R. KING, 'Living-cell microarrays', *Annu Rev Biomed Eng* 11 (2009) 235-257.
- [152] W. W. YU, L. QU, W. GUO and X. PENG, 'Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals', *Chemistry of Materials* 15 (2003) 2854-2860.
- [153] J. ZABNER, A. J. FASBENDER, T. MONINGER, K. A. POELLINGER and M. J. WELSH, 'Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid', *J Biol Chem* 270 (1995) 18997-19007.
- [154] S. A. ZAWKO and C. E. SCHMIDT, 'Simple benchtop patterning of hydrogel grids for living cell microarrays', *Lab Chip* 10 (2010) 379-383.
- [155] L. W. ZHANG and N. A. MONTEIRO-RIVIERE, 'Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake', *Toxicological Sciences* 110 (2009) 138-155.
- [156] Z. L. ZHAO, L. XU, X. L. SHI, W. H. TAN, X. H. FANG and D. H. SHANGGUAN, 'Recognition of subtype non-small cell lung cancer by DNA aptamers selected from living cells', *Analyst* 134 (2009) 1808-1814.
- [157] J. ZIAUDDIN and D. M. SABATINI, 'Microarrays of cells expressing defined cDNAs', *Nature* 411 (2001) 107-110.
- [158] P. ZRAZHEVSKIY and X. GAO, 'Quantum dot imaging platform for single-cell molecular profiling', *Nat Commun* 4 (2013) 1619.

Lebenslauf

Rebecca Bongartz
Diplom-Chemikerin

*19.10.1984, Neuss
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

BERUFLICHE PRAXIS

Mai 2010 – Juli 2013 Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
01.2012 – 07.2013: Wissenschaftliche Mitarbeiterin
05.2010 – 12.2011: Wissenschaftliche Hilfskraft

AUSBILDUNG

Mai 2010 – heute Promotionsstudium, Leibniz Universität Hannover
Hauptfach: Technische Chemie, Nebenfach: Biochemie,
Tag der Promotion: 20.02.2014, Note: Sehr gut

Dissertation „Entwicklung von Lebendzell-Microarrays und ihre
Anwendung in der Detektion klinisch relevanter Biomarker“ unter
der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper, Institut für Technische
Chemie, Leibniz Universität Hannover

Okt. 2004 – März 2010 Studiengang Chemie Diplom, Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Diplom-Chemikerin (Anorganische/Organische/
Physikalische/Technische Chemie), Note: gut

Diplomarbeit: „Entwicklung organspezifischer Protein-Microarrays
zur Detektion knochenspezifischer Differenzierungsmarker“ unter
der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper, Institut für Technische
Chemie, Leibniz Universität Hannover, Note: sehr gut

1997 – 2004 Albert Schweitzer Schule (Gymnasium) in Nienburg/Weser
Abschluss: Abitur, Note: gut

ZUSÄTZLICH ABSOLVIERTE PRAKTIKA UND TÄTIGKEITEN

Okt. 2008 – Nov. 2008 Laborpraktikum unter der Leitung von Dr. Thomas Binz, Zentrum
Biochemie, Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen
Hochschule Hannover

Publikationsliste

AKZEPTIERTE WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 2014 *Biofunctional quantum dots as fluorescence probe for cell-specific targeting*, Didem Ag, **Rebecca Bongartz**, Leyla Eral Dogan, Muharrem Seleci, Johanna-G. Walter, Dilek Odaci Demirkol, Frank Stahl, Serdar Ozelcik, Suna Timur, Thomas Scheper, *Colloid Surface B*, 114C, 96-103
- 2013 *From invisible structures of SWCNT towards fluorescent and targeting architectures for cell imaging*, Didem Ag, Muharrem Seleci, **Rebecca Bongartz**, Mustafa Can, Seda Yurteri, Ioan Cianga, Frank Stahl, Suna Timur, Thomas Scheper, Yusuf Yagci, *Biomacromolecules*, 14, 3532-3541
- 2013 Sach- und Schlussbericht für das BMBF/TÜBITAK-Verbundprojekt (Projekt-Nr. BMBF: TUR09/I25, 01DL12013, TÜBITAK: 109T573)
- 2013 *Folic acid-modified clay: targeted surface design for cell culture applications*, **Rebecca Bongartz**, Didem Ag, Muharrem Seleci, Johanna-G. Walter, Esra E. Yalcinkaya, Dilek Odaci Demirkol, Frank Stahl, Suna Timur, Thomas Scheper, *J. Mater. Chem. B*, 1, 522-528
- 2012 *PAMAM-functionalized water soluble quantum dots for cancer cell targeting*, Mehriban Akin, **Rebecca Bongartz**, Johanna-G. Walter, Dilek Odaci Demirkol, Frank Stahl, Suna Timur, Thomas Scheper, *J. Mater. Chem.*, 22, 11529-11536

WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN IN ARBEIT

Development and optimization of living cell microarrays as a miniaturized test system, Rebecca Bongartz, Peter D. Ringel, Michael T. Ringel, Frank Stahl, Thomas Scheper.

Application of living cell microarrays for the detection of specific cancer biomarkers in diagnostics, Rebecca Bongartz, Didem Ag, Johanna-G. Walter, Frank Stahl, Suna Timur, Thomas Scheper.

TEILNAHMEN AN KONGRESSEN

- März 2013 Dechema Frühjahrstagung der Biotechnologen, Frankfurt/Main
Posterpräsentation: *Development of living cell microarrays as miniaturized test systems*
- Jan. 2013 Dechema Congress Functional Genomics and Proteomics, Frankfurt/Main
Posterpräsentation: *Development of living cell microarrays as analytical test systems for biomarker detection*

- Jan. 2012 Dechema Congress Functional Genomics and Proteomics, Frankfurt/Main
Posterpräsentation: *Development of living cell microarrays as analytical test systems for bio-sensing applications*
- Juni 2011 10th International Workshop on biosensors and bioanalytical micro-techniques in environmental and clinical analysis (bbmec), Weimar