

DNA-Kohlenstoffnanorohr-Konjugate
Biokompatibilität - *ex vivo*-Verhalten - Funktionalisierung



Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kristin Kröker

aus Schweinfurt

Würzburg 2012

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

.....

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am

.....

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
2 Grundlagen und Kenntnisstand	5
2.1 Kohlenstoffnanoröhren	5
2.1.1 Herstellung und Klassifizierung	6
2.1.2 Photophysikalische Eigenschaften	8
2.2 Desoxyribonukleinsäure	12
2.2.1 Aufbau	12
2.2.2 Struktur	13
2.2.3 Stabilität	14
2.3 DNA-Kohlenstoffnanorohr-Konjugate	15
2.4 Kohlenstoffnanoröhren in Zellen	18
2.4.1 Mechanismen zur Zellinkorporation	19
2.4.2 Zelluläre Interaktionen mit Kohlenstoffnanoröhren	21
2.4.3 Zytotoxizität von Kohlenstoffnanoröhren	23
2.5 Zelllinien	25
2.5.1 Murine Makrophagen J774.1	26
2.5.2 Humane Epithelzellen HeLa	27
3 Methoden und Durchführung	29
3.1 Probenpräparation	29
3.1.1 Dispergierung	29
3.1.2 Dichtegradientenultrazentrifugation	31
3.1.3 Zentrifugenfiltration	33
3.1.4 Sterile Probenpräparation	35

3.2	Probencharakterisierung	36
3.2.1	Absorptionsspektroskopie	36
3.2.2	Emissionsspektroskopie	37
3.3	Zellkulturen	38
3.3.1	Mausmakrophagen	38
3.3.2	Sterilkontrolle	39
3.3.3	Umgang mit HeLa-Zellen	41
3.3.4	Zytotoxizitätsuntersuchungen	45
3.3.5	Konfokale Mikroskopie	50
3.3.6	Fluoreszenzmikrospektroskopie	52
3.4	DNA-Funktionalisierung	54
3.4.1	Materialien	54
3.4.2	Fluoreszenzspektroskopie	57
3.4.3	Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen	57
4	Biokompatibilität von DNA-Kohlenstoffnanorohr-Konjugaten	59
4.1	Motivation und Aufgabenstellung	59
4.2	Experimente	61
4.2.1	Enzym	61
4.2.2	Proteinmischung	63
4.2.3	pH-Reihen	65
4.2.4	Zytotoxizität gegenüber J774.1	66
4.2.5	Zytotoxizität gegenüber HeLa	67
4.3	Ergebnisse und Interpretation	70
4.3.1	Biostabilitätsstudien	70
4.3.2	Zytotoxizitätsstudien	82
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	89
5	DNA-Kohlenstoffnanorohr-Konjugate in HeLa-Zellen	91
5.1	Kenntnisstand und Aufgabenstellung	91
5.2	Experimente	93
5.2.1	Zellkulturen	94
5.2.2	Mikroskopie	96
5.2.3	Mikrospektroskopie	96

5.3	Ergebnisse und Interpretation	97
5.3.1	Mikroskopie in HeLa-Zellen	97
5.3.2	Spektroskopie in HeLa-Zellen	104
5.4	Zusammenfassung und Ausblick	112
6	Funktionalisierung von DNA-Kohlenstoffnanorohr-Konjugaten	115
6.1	Kenntnisstand und Aufgabenstellung	115
6.2	Experimente	117
6.2.1	Sulphydrylierung der DNA	119
6.2.2	Aktivierung des Fluorophors	120
6.2.3	Kupplung des aktivierten Fluorophors an freie DNA . . .	122
6.2.4	Funktionalisierung durch Rohdispergierung	123
6.2.5	Funktionalisierung durch Oberflächenabsättigung	124
6.2.6	Funktionalisierung durch direkte Reaktion	124
6.3	Ergebnisse und Interpretation	127
6.3.1	Voruntersuchungen	127
6.3.2	Nachweis der Funktionalisierung	131
6.3.3	Quantifizierung der Funktionalisierung	144
6.4	Zusammenfassung und Ausblick	150
7	Zusammenfassung	153
8	Summary	157
	Literaturverzeichnis	161
	Abbildungsverzeichnis	169
	Tabellenverzeichnis	173
	Danksagung	175

Abkürzungsverzeichnis

AMAC	2-Aminoakridon, <i>engl.</i> 2-aminoacridone
CoMoCAT	Cobalt-Molybdän-Katalysator, <i>engl.</i> cobalt molybdenum catalyst
CVD	chemische Gasphasenabscheidung, <i>engl.</i> chemical vapor deposition
Cy3	Cyanin 3
Dansyl	5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonyl
DGU	Dichtegradientenultrazentrifugation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>engl.</i> deoxyribonucleic acid
D-PBS	Phosphatpuffer nach Dulbecco, <i>engl.</i> Dulbecco's phosphate buffered saline
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure, <i>engl.</i> double-stranded deoxyribonucleic acid
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	fötales Rinderserum, <i>engl.</i> fetal bovine serum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FWHM	Halbwertsbreite, <i>engl.</i> full width half maximum
G	Pyrimidinbase Guanin bzw. Desoxyguanylat
HipCO	Hochdruck-Kohlenmonoxid-Prozess, <i>engl.</i> high pressure carbon monoxide
HeLa	Akronym der nach Henrietta Lacks benannten Zelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>engl.</i> high performance liquid chromatography

IC_{50}	Konzentration der halbmaximalen Inhibition
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie, <i>engl.</i> International Union of Pure and Applied Chemistry
LB	Agarplatten nach Luria-Bertani
MWNT	mehrwandige Kohlenstoffnanoröhre, <i>engl.</i> multi-wall carbon nanotube
NA	nicht angegeben
NIR	Nahinfrarot
NTB ⁻	2-Nitro-5-thiobenzoat
OD	optische Dichte, <i>engl.</i> optical density
PBS	Phosphatpuffer, <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	Wasserstoffionenaktivität, <i>lat.</i> potentia Hydrogenii
PMT	Photoelektronenvervielfacher, <i>engl.</i> photomultiplier tubes
PL	Photolumineszenz
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>engl.</i> rounds per minute
RPMI	Zellkultivierungsmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SMCC	Succinimidyl-4-(<i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
ssDNA	einsträngige Desoxyribonukleinsäure, <i>engl.</i> single-stranded deoxyribonucleic acid
SWNT	einwandige Kohlenstoffnanoröhre, <i>engl.</i> single-wall carbon nanotube
T	Purinbase Thymin bzw. Thymidylat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin
TCSPC	zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen, <i>engl.</i> time-correlated single photon counting
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität, <i>engl.</i> unit
RGD	Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure im Einbuchstabencode

WST	wasserlösliches Tetrazoliumsalz, <i>engl.</i> water soluble tetrazolium salt
WST-8	(2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium
w/V	Masse pro Volumen, <i>engl.</i> weight per volume

In der gesamten Arbeit wird die angelsächsische Notation mit Punkten als Dezimaltrennzeichen verwendet.

1 Einleitung

Die Vision von winzig kleinen Robotern zur Beseitigung von Fehlfunktionen im Körper nach Aufnahme in den Blutkreislauf wurde bereits 1959 vom Physiker und späterem Nobelpreisträger Richard Feynman in seiner berühmten Rede *"There's plenty of room at the bottom"* geschaffen.^[1,2] Auch wenn das Konzept und die Terminologie der Nanotechnologie erst über ein Jahrzehnt später durch Taniguchi eingeführt wurde, gilt Feynman aufgrund dieser Rede als deren Begründer.^[3]

Inzwischen ist die Verwendung nanoskaliger Materialien, welche definitionsgemäß in einem Größenbereich von 1 bis 100 nm liegen, für medizinische Zwecke Gegenstand aktueller Forschung und geht in einigen Fällen bereits über den Status reiner Grundlagenforschung hinaus. So werden beispielsweise durch den Einsatz superparamagnetischer Eisenoxidnanopartikel in einer Hyperthermie-Therapie erste Erfolge in der lokalen Bekämpfung von Prostata Tumoren sowie Glioblastomen, bösartigen Gehirntumoren, erzielt.^[4,5] Dabei stellt dieses Verfahren durchaus keinen Einzelfall dar, es werden derzeit mehr als 40 verschiedene Nanotherapeutika an Patienten eingesetzt, insbesondere im Bereich der Krebstherapie.^[6]

Die Forderung nach neuen Technologien für die Tumorforschung geht aus der unvorstellbaren Komplexität der im Körper ablaufenden Prozesse hervor. Wo herkömmlichen Methoden bereits Grenzen gesetzt sind, gibt die Nanotechnologie als ein vergleichsweise junges Gebiet auf einer neuen Ebene Anlass zur Hoffnung. Ein Grund für die Eignung von Nanopartikeln für medizinische Anwendungen liegt in der vergleichbaren Größenordnung zu Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Peptiden oder Lipiden, wodurch Beeinflussungen und Untersuchungen auf subzellulärer Ebene möglich sind. Durch die Vielfalt an geometrischer Gestalt und Materialbeschaffenheit steht eine Bandbreite sphärischer, stäbchen- oder röhrenförmiger Partikel organischen oder

anorganischen Ursprungs für unterschiedlichste Verwendungen zur Verfügung. Prominente Vertreter, deren Verwendbarkeit für biochemische Fragestellungen diskutiert wird, reichen unter anderem von Goldnanokugeln über Quantenpunkte bis hin zu den Kohlenstoffmaterialien Nanodiamanten und Kohlenstoffnanoröhren.

Letzteren wird als interessanter Vertreter nanoskaliger Materialien aufgrund ihres einzigartigen Aspektverhältnisses und ihrer optischen Eigenschaften eine Vielzahl an Einsatzmöglichkeiten zugeschrieben. Grundvoraussetzung dafür ist neben ihrer Biokompatibilität die Fähigkeit zur Zellpenetration. Auch wenn der exakte Aufnahmemechanismus von Kohlenstoffnanoröhren in Zellen in aktueller Literatur noch kontrovers diskutiert wird, besteht die Gewissheit, dass sich Nanoröhren bereitwillig intrazellulär anreichern.^[7]

Eine beliebte Verwendung findet sich daher in bildgebenden Verfahren (*engl.* imaging) durch den Einsatz als optische Marker und Sensoren, da sich mit Hilfe der photophysikalischen Charakteristika von speziellen Kohlenstoffnanoröhrtypen Umgebungseinflüsse und -veränderungen sensitiv detektieren lassen. Durch ihre hohe Photostabilität und die Minimierung von Gewebeatofluoreszenz aufgrund der Anregbarkeit im sogenannten biologisch transparentem Fenster heben sich Kohlenstoffnanoröhren gegenüber herkömmlichen zur Detektion eingesetzten organischen Farbstoffen hervor. In der Forschergruppe um H. Dai werden beispielsweise isotopisch veränderte einwandige Kohlenstoffnanoröhren (*engl.* single-wall nanotubes, SWNTs) zur Mehrfarbendetektion eingesetzt, um über die spezifische Raman-Streuung antikörpermarkierter Nanoröhren mehrere immobilisierte Proteine simultan nachzuweisen.^[8,9]

Ebenfalls als Raman-Marker werden Kohlenstoffnanoröhren von Heller *et al.* verwendet. Hier macht man sich darüber hinaus die Fähigkeit von SWNTs zur Lichtemission im Nahinfrarotbereich zu Nutze, welche spektral getrennt von der natürlichen Fluoreszenz der meisten biologischen Systeme liegt. Im Gegensatz zu Raman-Signalen zeigt die Photolumineszenz erhebliche Einflüsse durch die Umgebung, womit sich SWNTs sowohl als Langzeitmarker als auch als optischer Sensor zur Zellmarkierung eignen.^[10] In weiterführenden Arbeiten wird beschrieben, wie zahlreichen Analyte, darunter Genotoxine, Chemotherapeutika und reaktive Sauerstoffspezies, durch Verände-

rungen im Emissionsverhalten von Kohlenstoffnanoröhren sensitiv nachgewiesen werden können. Mit einer gesteigerten Empfindlichkeit bis hin zur Einzelmoleküldetektion lassen sich SWNT-basierte Sensoren sogar *in vivo* anwenden.^[11,12]

Ein weiteres Einsatzgebiet von Kohlenstoffnanoröhren in der „Nanomedizin“ liegt im gezielten Wirkstofftransport (*engl.* drug delivery). In vielen Therapieverfahren besteht die Problematik, dass Arzneistoffe ihren Wirkort nicht spezifisch erreichen oder intrinsisch nur ungenügend von Targetzellen aufgenommen werden. Für die Verwendung von SWNTs als Transporter müssen die Nanoröhren somit zusätzlich zum Wirkstoff mit spezifisch gegen bestimmte Zelloberflächenrezeptoren gerichteten Liganden, sogenannten Agonisten, ausgestattet sein. Hierfür kommt neben Antikörpern und bestimmten Wachstumsfaktoren insbesondere die Aminosäuresequenz RGD in Frage, welche sich spezifisch gegen die Rezeptorklasse der Integrine richtet. Die *ex vivo*-Funktionstüchtigkeit unterschiedlicher Arzneiträgersysteme auf SWNT-Basis wurde bereits in diversen Studien mit Antitumorwirkstoffen wie Paclitaxel oder Taxoid belegt.^[8,9,13,14] In Abbildung 1.1 werden die hier aufgeführten Anwendungsmöglichkeiten von Kohlenstoffnanoröhren für biomedizinische Zwecke schematisch veranschaulicht.

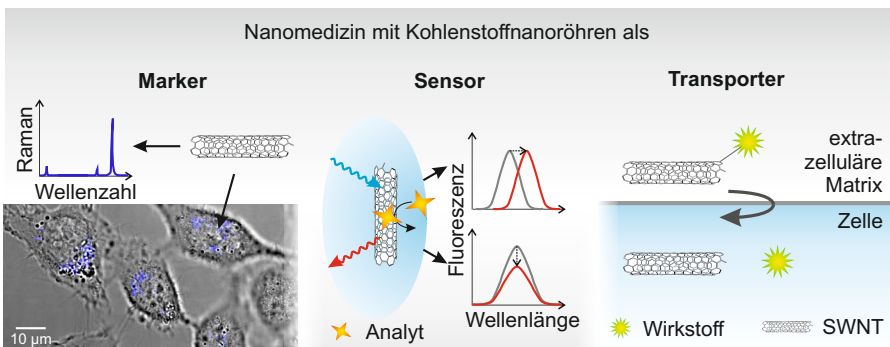


Abbildung 1.1: Einsatzgebiete von Kohlenstoffnanoröhren in der Nanomedizin.

Im Bereich der Tumorforschung decken Kohlenstoffnanoröhren damit sowohl die Felder Diagnostik als auch Therapie ab. Auch wenn Nanomedizin mit SWNTs allgemein betrachtet noch in der Anfangsphase steckt und Lang-

zeitstudien teilweise noch ausstehen, gilt deren Entwicklung als auf dem Sprung vom prinzipiellen Beweis (*engl.* proof-of-principle) zu präklinischen Untersuchungen.^[15,16]

Diese Dissertation widmet sich Untersuchungen zur Biokompatibilität und Verwendbarkeit von SWNTs in Zellen. Neben Zytotoxizität wird die Stabilität von SWNT-Konjugaten unter physiologischen Bedingungen sowie deren Funktionalisierbarkeit erprobt. Die Besonderheit in Abgrenzung zu vorherigen Publikationen liegt dabei in der sorgfältigen Aufreinigung und speziellen Präparation der Kohlenstoffnanorohrkongugate unter Ausschluss von SWNT-Bündeln. Auch die Wahl der Funktionalisierungsrouten über das nicht-kovalent gebundene Dispergieradditiv unterscheidet sich grundlegend von bisherigen Ansätzen direkter chemischer Funktionalisierung auf der Nanorohroberfläche.

2 Grundlagen und Kenntnisstand

Einzelstrang-DNA dispergierte SWNTs bilden die Basis dieser Arbeit. Die beiden Komponenten dieses Hybridmaterials, Kohlenstoffnanoröhren und Desoxyribonukleinsäure, werden im Folgenden zunächst einzeln vorgestellt und charakterisiert, bevor die Herstellung und Eigenschaften ihres Konjugates gezeigt werden. Deren Wechselwirkung mit zellulären Systemen und die hier verwendeten Zelllinien J774.1 und HeLa werden abschließend beschrieben.

2.1 Kohlenstoffnanoröhren

Das zentrale Element dieser Arbeit liegt im Kohlenstoff, welcher in den Modifikationen Diamant und Graphit kristallisiert. Neben diesen natürlich vorkommenden Formen, die aufgrund ihrer verschiedenen Hybridisierungszustände in ihren Eigenschaften kaum unterschiedlicher sein könnten, existiert unter Normalbedingungen eine Vielzahl allotroper Modifikationen, die sich jeweils auf die beiden Grundtypen zurückführen lassen.^[17,18]

Betrachtet man eine einzelne Schicht des sp^2 -hybridisierten Graphits, so handelt es sich um das in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnenen Graphen, für dessen Erforschung es 2010 den Nobelpreis für Physik gegeben hat.

Ebenfalls einer sp^2 -Hybridisierung unterliegen die 1985 entdeckten und bereits 19 Jahre zuvor theoretisch vorhergesagten Fullereene, die sich als Käfige aus Kohlenstoffatomen beschreiben lassen. Verlängert man diese sphärischen Kohlenstoffverbände um zylindrische Strukturen, gelangt man zu geschlossenen Kohlenstoffnanoröhren. Durch formales Aufrollen einer zwei-

dimensionalen Graphenschicht werden an den Enden offene Kohlenstoffnanoröhren unter Verminderung der Dimensionalität konstruiert. In Abbildung 2.1 reiht sich die Kohlenstoffnanoröhre zu Graphen und Fulleren in die strukturelle Verwandtschaft ein.

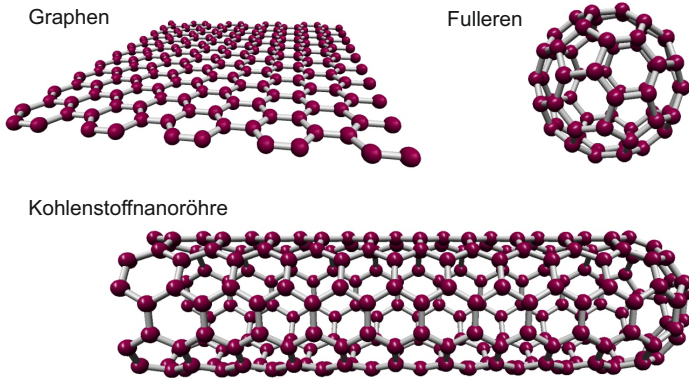


Abbildung 2.1: Kohlenstoffnanoröhren und die strukturellen Verwandten, Graphen und Fulleren.

Das rege Interesse an Kohlenstoffnanoröhren wurde entfacht, als Iijima *et al.* 1991 von röhrenartigen Konstrukten berichteten, die bei der Lichtbogenentladung zur Fulleren synthese zufällig entdeckt wurden und isoliert werden konnten.^[19,20] Seit der Erforschung thermischer, mechanischer, elektronischer und optischer Eigenschaften von Kohlenstoffnanoröhren erhofft man sich, neue Anwendungsgebiete unter anderen in den Sektoren Energiespeicherung, Sensorik, Verbundwerkstoff und Biomedizin zu erschließen.^[21]

2.1.1 Herstellung und Klassifizierung

Die Synthese von Kohlenstoffnanoröhren lässt sich im Allgemeinen aus den Herstellungsverfahren ihrer strukturellen Verwandten, den Fullerenen, herleiten. Dazu wurden neben dem Lichtbogenverfahren die Laserablation und die chemische Gasphasenabscheidung (*engl.* chemical vapor deposition, CVD) etabliert. Abhängig von der jeweiligen Methode werden außer SWNTs auch mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren (*engl.* multi-wall nanotubes,

MWNTs), konzentrisch ineinander gewachsene Röhren, mit unterschiedlicher Durchmesser-Verteilung erzeugt.

Gute Ausbeuten an einwandigen Nanoröhren liefern die beiden bekanntesten CVD-Verfahren HiPCO (*engl.* high pressure carbon monoxide) und CoMoCAT (*engl.* cobalt molybdenum catalyst), in welchen jeweils von Kohlenmonoxid als Kohlenstoffquelle unter Einsatz verschiedener Katalysatorzusammensetzungen ausgegangen wird. Für diese Arbeit wird ausschließlich Rohmaterial aus dem CoMoCAT-Prozess verwendet, welcher SWNTs mit einer geringen Durchmesser-Verteilung generiert.

Eine konkrete Benennung nach IUPAC-Nomenklatur ist für makromolekulare Strukturen wie SWNTs aufgrund der Vielzahl an Atomen nicht praktikabel. Daher wurde eigens für Nanoröhren ein System entwickelt, wodurch sie derart klassifiziert werden, dass dem Namen bereits grundlegende Eigenschaften zu entnehmen sind. Allgemein werden einwandige Kohlenstoffnanoröhren in drei Klassen unterteilt, welche durch das unterschiedliche Aufrollen der jeweiligen Graphenschicht voneinander abgegrenzt sind. Die eindeutige Benennung der SWNTs erfolgt durch das Deskriptoren-paar (n, m) mit $n \geq m \in \mathbb{N}_0$, das die exakte Ausrichtung der aufgewickelten Graphenschicht und den Umfang der Nanoröhre herleiten lässt. Aus strukturellen Überlegungen erfolgt somit die Einteilung in die Röhrentypen *armchair* ((n, m) mit $n = m$), *zigzag* ($(n, 0)$) und *chiral* ((n, m) mit $n > m$), welche in Abbildung 2.2 veranschaulicht wird.

Neben geometrischer Information kann den chiralen Indizes entnommen werden, ob es sich um halbleitende oder metallische SWNTs handelt. Ergibt die Differenz aus $(n - m)$ einen durch drei teilbaren Wert $\in \mathbb{N}$, so handelt es sich um metallische Nanoröhren, andernfalls besitzen sie einen halbleitenden Charakter.

Da jede Nanoröhrenchiralität unterschiedliche photophysikalische Eigenschaften besitzt, ist für spektroskopische Experimente die Selektion eines einzelnen SWNT-Typs hilfreich. Bei allen bekannten Herstellungsprozessen werden Gemische unterschiedlicher Kohlenstoffnanoröhren erzeugt. In dieser Arbeit wird CoMoCAT-Rohmaterial eingesetzt, welches eine Anreicherung der (6,5)-Chiralität besitzt.

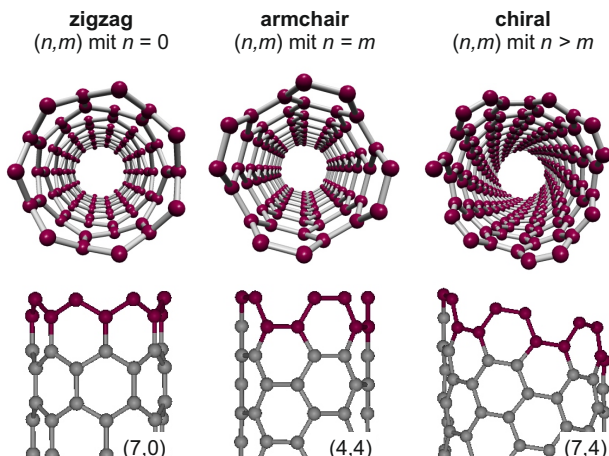


Abbildung 2.2: Strukturelle Einteilung von Kohlenstoffnanoröhren in die Klassen *zigzag*, *armchair* und *chiral* mit den jeweiligen charakteristischen Deskriptoren (n, m) . Die Namensgebung resultiert von der farblich hervorgehobenen Kantenform.

2.1.2 Photophysikalische Eigenschaften

Aufgrund der photophysikalischen Eigenschaften von Kohlenstoffnanoröhren können verschiedene optische Methoden zu deren Charakterisierung eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden Messungen zur Absorption und Photolumineszenz (PL) von halbleitenden (6,5)-SWNTs in wässriger Lösung durchgeführt und Fluoreszenzlebensdauern mittels zeitkorreliertem Einzelphotonenzählen (*engl.* time-correlated single photon counting, TCSPC) ermittelt.

Zum Verständnis der optischen Eigenschaften von Kohlenstoffnanoröhren ist eine Kenntnis der elektronischen Struktur von SWNTs notwendig, welche sich aus der Energiedispersion des Graphens herleiten lässt. Die Bandstruktur von SWNTs und die durch Quantisierung ausgebildeten Subbänder rühren dabei vom Übergang zur Eindimensionalität her. Abbildung 2.3 veranschaulicht die Auswirkung der Dimensionalität auf die Bandlücke von Halbleitern und halbleitenden SWNTs sowie ein sich daraus ableitendes vereinfachtes Energiediagramm. Für deren ausführliche Herleitung sei an dieser

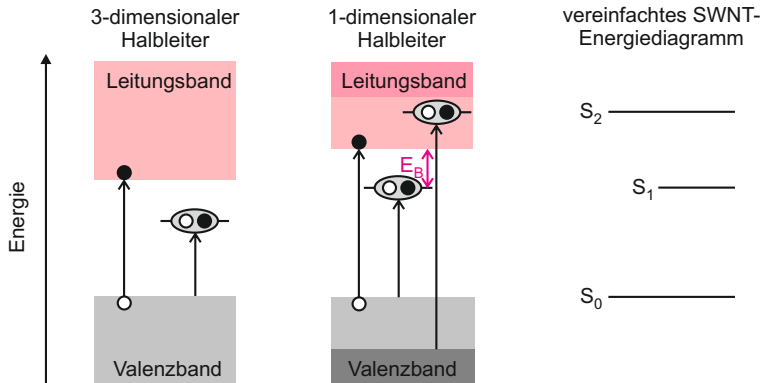


Abbildung 2.3: Vergleich der Bandlücke eines 3-dimensionalen Halbleiters mit der eines 1-dimensionalen sowie exzitonische Bindungsenergie E_B . Aus der Subbandstruktur der halbleitenden Kohlenstoffnanoröhre lässt sich ein stark vereinfachtes Energieschema erstellen.

Stelle auf weiterführende Arbeiten^[22,23] sowie Fachliteratur^[24–26] verwiesen.

Abbildung 2.4 zeigt exemplarisch ein Absorptions- sowie Photolumineszenzspektrum von einwandigen (6,5)-Kohlenstoffnanoröhren. Die beiden Absorptionsbanden können Gruppen von van Hove-Singularitäten, die lokalen Maxima in der Zustandsdichte (*engl.* density of states, DOS) entsprechen und zwischen denen elektronische Übergänge stattfinden, zugeordnet werden. Die für das Zustandekommen des Absorptionsspektrums entscheidenden Übergänge S_1 und S_2 sind in dem stark vereinfachten Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.4 markiert.

Genauer betrachtet konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um klassische elektronische Übergänge freier Ladungsträger, sondern vielmehr um exzitonische Zustände handelt, bei denen es aufgrund starker Coulomb-Wechselwirkungen zur Ausbildung eines gebundenen Elektron-Loch-Paares kommt.^[27–29] Die Korrelation zwischen Coulomb-Kräften und der dielektrischen Konstante verweist auf eine starke Abhängigkeit von der unmittelbaren Umgebung. Die Exzitonbindungsenergie E_B ist abhängig von der Permittivität und spiegelt somit direkte Einflüsse durch Lösungsmittel oder Dispergieradditiva wider. In Abbildung 2.5 wird die Abhängigkeit der

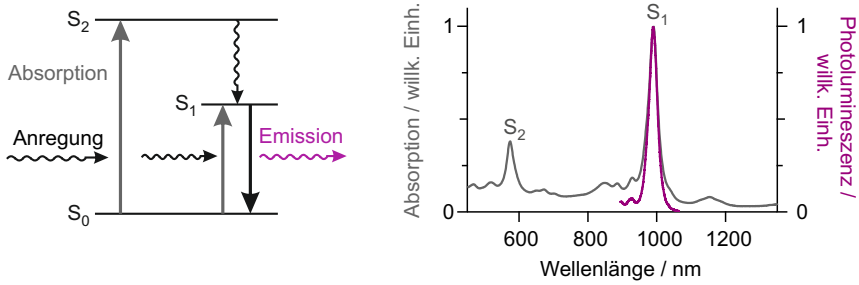


Abbildung 2.4: Optische Übergänge in Kohlenstoffnanoröhren sowie Absorptions- und Photolumineszenzverhalten.

exzitonischen Bindungsenergie von den Coulomb-Wechselwirkungen qualitativ dargestellt und die Auswirkung von Aggregation als Umgebungseinfluss auf die optischen Eigenschaften anhand zweier Absorptionsspektren für isolierte und gebündelte SWNTs demonstriert. Die halbleitende (6,5)-SWNT besitzt in Lösung je nach Umgebung eine Absorption im Nahinfrarotbereich um 990 nm sowie im Sichtbaren um 570 nm, welche die Nanorohrsuspension violett erscheinen lässt und eine resonante S_2 -Anregung ermöglicht. Eine Rotverschiebung der Absorptionsmaxima, Linienverbreiterung sowie ein Anstieg des Hintergrunds sind charakteristisch für aggregierte SWNT-Proben. Eine Quantifizierung der in einer Lösung vorhandenen Nanorohrkonzentration lässt sich nach Schöppler *et al.* anhand des Absorptionsquerschnittes für (6,5)-SWNTs erzielen.^[30] Hier lässt sich die aus dem Absorptionsspektrum gewonnene optische Dichte (OD) des S_1 -Übergangs gemäß

$$c_C = B \cdot \frac{\Delta_{\text{FWHM}} \cdot \text{OD}}{f \cdot d} \quad (2.1)$$

in eine molare Kohlenstoffatomkonzentration c_C umrechnen. Die Halbwertsbreite Δ_{FWHM} in nm ist ebenfalls dem S_1 -Maximum im Absorptionsspektrum zu entnehmen, B stellt mit $5.1 \times 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \frac{\text{cm}}{\text{nm}}$ eine Konstante und $f = 0.01$ die dimensionslose Oszillatorstärke dar. Die Weglänge d der verwendeten Küvette wird in cm angegeben. Die molare SWNT-Konzentration c_{SWNT} kann schließ-

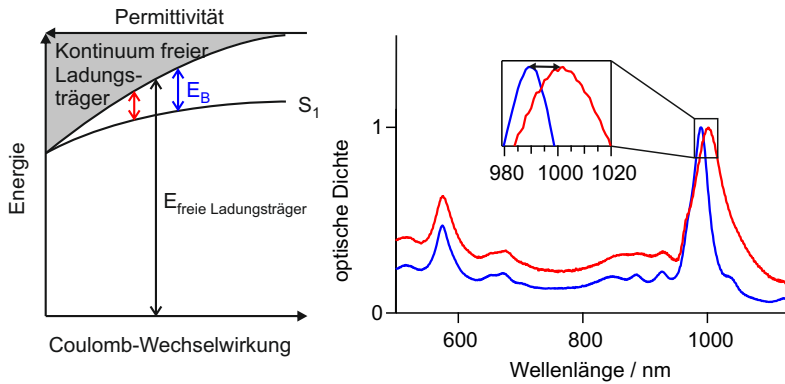


Abbildung 2.5: Abhängigkeit der exzitonischen Bindungsenergie von Coulomb-Wechselwirkungen und der Permittivität der Umgebung. Die Aggregation von SWNTs führt zu einer Absenkung der Exzitonbindungsenergie. Das Absorptionsmaximum ergibt sich aus der Differenz der Energie freier Ladungsträger und E_B . Damit resultiert eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von aggregierten (rot) im Vergleich zu isolierten (blau) SWNTs.

lich durch

$$c_{\text{SWNT}} = \frac{cC}{N_C \cdot l} \quad (2.2)$$

unter Kenntnis der durchschnittlichen Nanoröhrlänge l und einer Kohlenstoffatomanzahl N_C von 88.48 C-Atome pro nm Röhre ermittelt werden.

Nach optischer Anregung von exzitonischen Zuständen kann die Emission wie im Energiediagramm in Abbildung 2.4 markiert als strahlende Desaktivierung ebenfalls aus dem S_1 -Energieniveau erfolgen. Für die halbleitende (6,5)-Röhre wird typischerweise eine Emission im Nahinfrarotbereich mit einer leichten Stokes-Verschiebung im Vergleich zur Absorption gefunden. Die geringe PL-Quantenausbeute, das Verhältnis emittierter zu absorbierten Photonenanzahl, liegt je nach Probenqualität bei etwa 0.01 - 1 % und lässt sich durch das Vorhandensein einer Vielzahl konkurrierender Desaktivierungsprozesse erklären.^[26,31,32] Analog zur Absorption nimmt die Aggregation von SWNTs auch auf das Photolumineszenzverhalten einen starken Einfluss und

die PL-Intensität wird je nach Bündelgröße unterschiedlich stark gequenchet bis hin zur vollständigen Auslöschung. Fluoreszenzlebensdauern τ_{PL} , die in TCSPC-Messungen erfasst werden, liegen typischerweise im Bereich von 10 ps bis 60 ps für isolierte SWNTs und werden ebenfalls in Abhängigkeit von Art und Ausmaß der Aggregation entsprechend verringert.^[31,33]

2.2 Desoxyribonukleinsäure

Desoxyribonukleinsäure (*engl.* deoxyribonucleic acid, DNA) stellt neben Wasser, Proteinen, Lipiden und Polysacchariden einen der wichtigsten zellulären Bestandteile dar. Als Träger der genetischen Information in sämtlichen Lebewesen bildet DNA somit den Grundbaustein des Lebens.^[34] Bevor in Kapitel 2.3 auf die Verwendungsmöglichkeit als Dispergieradditiv für SWNTs eingegangen wird, sollen hier zunächst Aufbau, Struktur und Stabilität des Biomoleküls DNA vorgestellt werden.

2.2.1 Aufbau

Bei Nukleinsäuren im Allgemeinen handelt es sich um Makromoleküle, die aus einer linearen Sequenz von Nukleotiden bestehen. Diese wiederum sind aufgebaut aus einer Pyrimidin- oder Purinbase, welche kovalent an das Monosaccharid (Desoxy-)Ribose mit einer Phosphatgruppe gebunden sind. Als DNA-Basen kommen die in Abbildung 2.6 dargestellten Heterozyklen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) in Frage. Die jeweilige Base wird über eine *N*-glykosidische Bindung mit β -Konfiguration an der Monosaccharideinheit unter Ausbildung eines Nukleosids verknüpft. Die Bindungsstellen in diesem *N,O*-Acetal sind dabei die Atome *N1* für Purine bzw. *N9* für Pyrimidine und *C1'* der Desoxyribose. Durch Nukleosidbildung wird die Wasserlöslichkeit der hydrophoben Stickstoffbasen aufgrund der Hydrophilie der Zuckereinheiten erheblich erhöht. Nukleotide werden aus Nukleosiden durch Monophosphorylierung der Hydroxylgruppe des *C5'*-Atoms gebildet. Der Aufbau zu Polynukleotiden erfolgt schließlich durch Veresterung der *C3'*-Hydroxylgruppe mit der Phosphatgruppe des benachbarten

Nukleotids. Daraus resultiert für einen DNA-Einzelstrang jeweils ein 5'- und ein 3'-Ende, wodurch sich nach Konvention die Schreibweise einer 5' → 3'-Richtung ergibt.^[35] Abbildung 2.6 zeigt den Aufbau von monomeren DNA-Bausteinen.

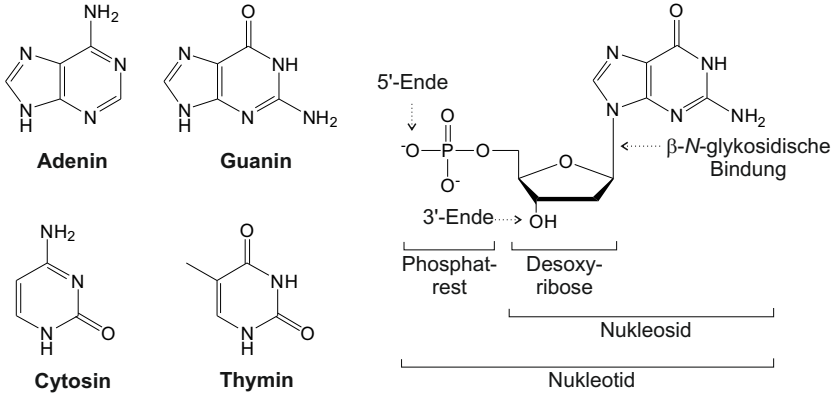


Abbildung 2.6: Chemische Struktur der vier DNA-Basen sowie Aufbau von Nucleosiden und Nucleotiden am Beispiel der Purinbase Guanin.

2.2.2 Struktur

Die durch Phosphodiesterbrücken untereinander verknüpften Zuckereinheiten bilden somit das Grundgerüst des DNA-Stranges. Während das Rückgrat des linearen Polymers strukturgebend dient, ist die genetische Information in der genauen Abfolge der Basen kodiert.^[36] In der Regel liegen DNA-Strukturen nicht einzeln vor, sondern stabilisieren sich durch Bildung helikaler Doppelstränge.^[37] Zwei Polynucleotidstränge winden sich mit antiparalleler Laufrichtung um eine gemeinsame Achse, wobei das negativ geladene Zucker-Phosphatrückgrat nach außen orientiert ist und sich die hydrophoben Purin- und Pyrimidinbasen nahezu senkrecht zur Achse im Inneren der Doppelhelix befinden. Eine Windung der Helixstruktur umfasst 3.4 nm mit zehn Basen. Es ergeben sich Basenpaarungen zwischen den in den beiden komplementären Strängen jeweils gegenüberliegenden Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin unter Ausbildung intermolekularer

Wasserstoffbrücken. Innerhalb der Helix stapeln sich die Basenpaare übereinander, wobei der Doppelstrang eine zusätzliche Stabilisierung durch π - π -Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte erfährt. Die Wechselwirkungen zwischen komplementären Strängen sowie die räumliche Struktur werden in Abbildung 2.7 dargestellt.

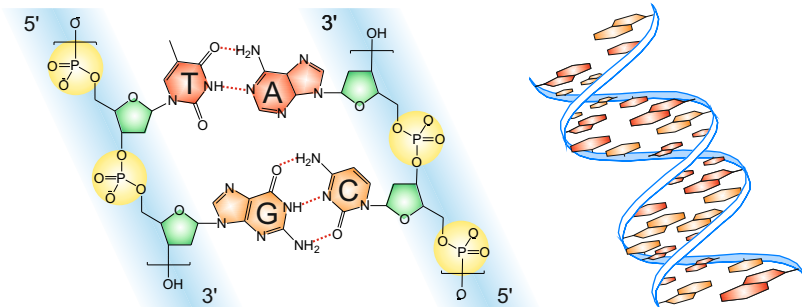


Abbildung 2.7: Intermolekulare Wechselwirkungen (rot gestrichelt) zwischen den komplementären Basenpaaren Thymin und Adenin (rot) sowie Guanin und Cytosin (orange) innerhalb zweier DNA-Stränge und räumliche Anordnung innerhalb einer DNA-Doppelhelix. Das hydrophile Rückgrat (blau) setzt sich aus Phosphatresten (gelb) und Desoxyriboseeinheiten (grün) zusammen.

2.2.3 Stabilität

Nukleoside gelten allgemein als stabil gegenüber alkalischen Medien. Beim Kontakt mit Säuren zeigen pyrimidinhaltige Nukleoside ebenfalls eine gute Beständigkeit, wohingegen es im Fall von Purinbasen leicht zur sauren Hydrolyse in die freie Base sowie Pentose kommt.^[38,39] Nukleinsäuren können durch Nukleasen enzymatisch gespalten werden. Je nach Angriffsort der Strangspaltung wird zwischen Exo- und Endonukleasen unterschieden. Während erstere die Basen jeweils vom 3'- und 5'-Ende her abtrennen, wird die DNA von Endonukleasen innerhalb der Nukleinsäurekette gespalten. Das Restriktionsenzym DNase I als Beispiel für eine Endonuklease spaltet sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA unspezifisch in Di-, Tri- und Oligonukleotide mit 5'-phosphoryliertem und 3'-hydroxyliertem Ende.^[40-42] In Ab-

Abbildung 2.8 wird ein Mechanismus für die saure Depurinierung innerhalb eines DNA-Stranges vorgeschlagen sowie die enzymatische Spaltung durch Nukleasen schematisch dargestellt.

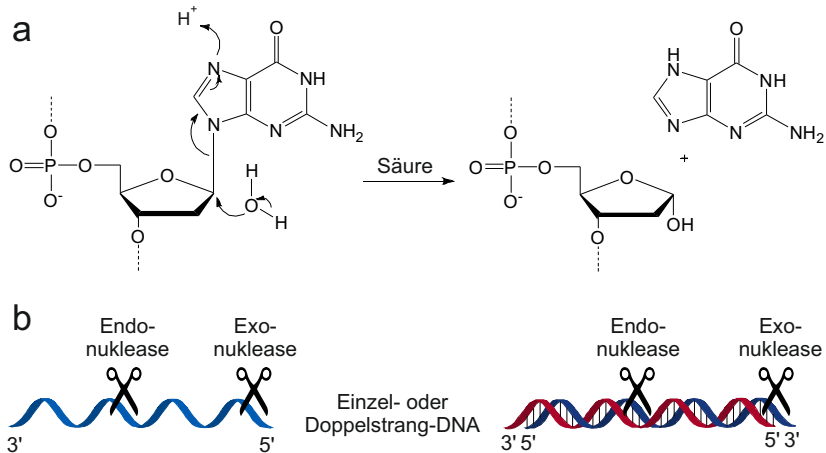


Abbildung 2.8: a) Vorschlag zum Mechanismus der sauren Depurinierung innerhalb eines DNA-Stranges und b) enzymatische Spaltung von Einzel- und Doppelstrang-DNA durch Endo- und Exonukleasen als Schema.

2.3 DNA-Kohlenstoffnanorohr-Konjugate

Kohlenstoffnanoröhren besitzen aufgrund ihres sp^2 -hybridisierten Grundgerüsts einen stark hydrophoben Charakter. Intermolekular stabilisieren sie sich demnach durch $\pi - \pi$ -Wechselwirkungen, welche sich in Form von Aggregatbildung mit benachbarten SWNTs äußern. Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1991 sind Forschergruppen danach bestrebt, Kohlenstoffnanoröhren in Lösung zu bringen und Aggregatgrößen zu minimieren. Eine kovalente Funktionalisierung durch Behandlung mit starken Säuren zur Carboxylierung von SWNT-Enden ist ein beliebter und auch erfolgreicher Ansatz zur Steigerung der Hydrophilie, allerdings ist die Integrität der optischen Eigenschaften aufgrund von Defektbildung in der Kohlenstoffnanorohrstruktur durch die extremen Reaktionsbedingungen nicht gewährleistet. Eine sanftere Mög-

lichkeit unter Erhalt der photophysikalischen Charakteristika wurde in der nicht-kovalenten Oberflächenbedeckung gefunden. Auf der Suche nach möglichen Dispergieradditiven für wasserlösliche SWNT-Suspensionen erfreuen sich (ionische) Tenside, verschiedene Polymere und auch Biomoleküle wie Peptide, Zucker, Lipide, Polyethylenglykole (PEG) sowie DNA-Stränge größter Beliebtheit. Die entscheidende Gemeinsamkeit aller Dispergierreagenzien liegt in ihrem amphiphilen Charakter, welcher sowohl Wechselwirkungen mit dem wässrigen Lösungsmittel als auch eine Vereinzelung der hydrophoben Kohlenstoffnanoröhren durch π - π -Wechselwirkungen erlaubt. Abbildung 2.9 gibt einen Einblick in solche chemisch modifizierten SWNTs und Hybridstrukturen anhand ausgewählter Beispiele.

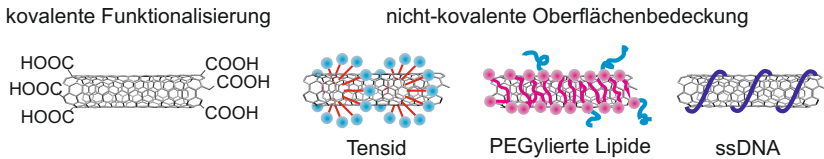


Abbildung 2.9: Kovalente Funktionalisierung und nicht-kovalente Oberflächenbedeckung zur Steigerung der Hydrophilie von SWNTs. In der nicht-kovalenten Modifikation kommen unter anderen Tenside, welche sich mizellenartig um Nanoröhren anordnen, PEGylierte Lipide zur großflächigen Abdeckung sowie DNA-Stränge zur Umwicklung von SWNTs zum Einsatz.

Die in Kapitel 2.2 vorgestellten Nukleinsäuren stellen aufgrund des polaren Zuckerrückgrates und der hydrophoben Baseneinheiten ein amphiphiles Polymer dar, wodurch DNA als biokompatibles Dispergieradditiv für SWNTs prädestiniert ist. Bereits 2003 publizierten Nakashima *et al.* den ersten Befund für die Solubilisierung von SWNTs durch Ultraschallbehandlung mit DNA.^[43] Die verwendete doppelsträngige DNA (*engl.* double-stranded deoxyribonucleic acid, dsDNA) natürlicher Herkunft bewirkte eine spontane Entbündelung der SWNTs. Aufgrund der Homogenität wurde von Cathcart *et al.* der Begriff der „Lösung“ anstelle „Dispersion“ vorgeschlagen.^[44]

Synthetisch erzeugte Einzelstrang-DNA (*engl.* single-stranded deoxyribonucleic acid, ssDNA) wurde ebenfalls 2003 erfolgreich zur Suspension von SWNTs eingesetzt. Pionierarbeiten auf dem Gebiet entstanden durch die

Gruppe um Zheng *et al.* Hier wurde erstmals ein Modell für die Interaktionen zwischen Nanoröhren und DNA-Strängen geliefert. Demnach kommt es durch π -Stapelung zu einer helikalen Umwicklung der SWNTs durch DNA-Einzelstränge. Die dabei entstehenden Wechselwirkungen zwischen ssDNA und Kohlenstoffnanorohroberfläche sollen die intermolekulare SWNT-Stabilisierung übertreffen, woraus eine hohe Effektivität der Solubilisierung und Entbündelung resultiert, die sogar zur Trennung von metallischen und halbleitenden Röhren eingesetzt werden kann. Die Stärke der Wechselwirkungen und die kinetische Stabilität der Hybridstruktur wurde als sequenzabhängig gefunden, wobei ssDNA mit alternierendem d-(GT) $_n$ -Gerüst einer Basenlänge von $n = 3$ als Minimum und $n = 10$ bis 45 als Optimum gilt.^[45-47] Abbildung 2.10 zeigt die Entbündelung von aggregierten SWNTs durch Behandlung mit Einzelstrang-DNA sowie die entsprechenden intermolekularen Wechselwirkungen, die zur Stabilisierung beitragen. Die Oligomere zeigen molekulardynamischen Rechnungen zufolge eine hohe Flexibilität in ihrer Konformation bei der Umwicklung von SWNTs, weshalb die Oberflächenbedeckung keinesfalls als starr, sondern vielmehr als dynamisch angesehen wird.^[48]

Einzelstrang-DNA kann in Analogie zur Doppelhelix in dsDNA ebenfalls komplexe Strukturen durch intramolekulare Basenpaarbildung annehmen. Enthält eine Oligonukleotidkette beispielsweise gegeneinander komplementäre Sequenzen am 5'- und 3'-Ende, kommt es zur Ausbildung sogenannter Hairpin-Motive. Hain *et al.* gelang es, DNA-SWNT-Konjugate mit solchen intramolekular hybridisierten Oligomerstrukturen herzustellen und zu erforschen.^[49]

Soll bei der Dispergierung von SWNTs mit DNA-Einzelsträngen ein Maximum an Basen $\pi - \pi$ -Wechselwirkungen mit der Nanorohroberfläche zur Verfügung stehen, so muss bei der Wahl des entsprechenden Oligonukleotids darauf geachtet werden, dass keine Komplementärbasen oder -fragmente im Strang enthalten sind. Den hier durchgeführten Experimenten sind demnach d-(GT) $_{16}$ -Oligomere zu Grunde gelegt, welche neben einer hervorragenden Solubilisierung auch eine Auftrennung nach Chiralität durch anschließende Dichtegradientenultrazentrifugation ermöglichen.

Die nicht-kovalente Biofunktionalisierung von SWNTs gilt darüber hinaus als

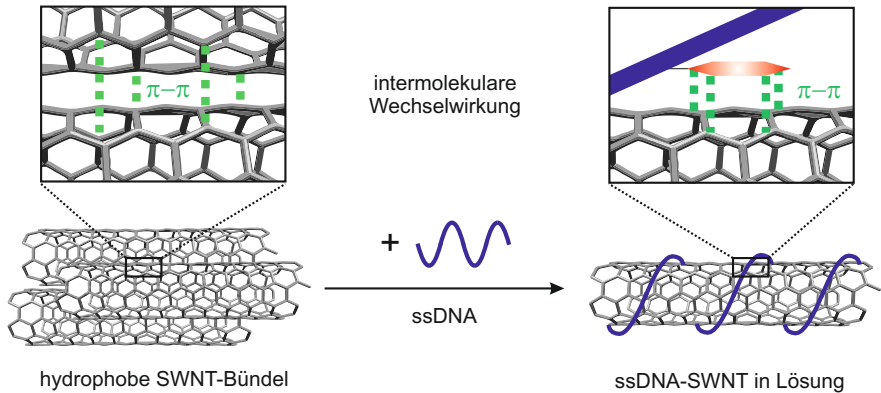


Abbildung 2.10: Entbündelung von SWNT-Aggregaten durch Einzelstrang-DNA. Die zwischen benachbarten Nanoröhren auftretenden π - π -Wechselwirkungen (grün) werden durch attraktive Kräfte zwischen den heteroaromatischen DNA-Basen (rot) und dem SWNT- π -System abgeschwächt und schließlich durch ausreichende räumliche Distanz zwischen den Nanoröhren in Lösung unterbunden.

Wegbereiter in die Biotechnologie, da DNA den SWNTs den Zugang zu Zellen erleichtern soll.

2.4 Kohlenstoffnanoröhren in Zellen

Für die Verwendung von Kohlenstoffnanoröhren in biomedizinischen Anwendungen ist deren Aufnahme in Zellen unabdingbar. Im Folgenden werden zunächst prinzipielle Mechanismen vorgestellt, nach denen sich Zellen Stoffe einverleiben können. Der exakte Aufnahmeweg von SWNTs in Zellen wird in aktueller Literatur noch diskutiert. Daher wird anschließend eine Übersicht der in Betracht gezogenen Aufnahmewege gegeben. Da die Wechselwirkungen zwischen Nanoröhren und Zellen auch toxische Effekte nach sich ziehen können, wird im Abschluss die Abhängigkeit der SWNT-Zytotoxizität von verschiedenen Parametern erläutert.

2.4.1 Mechanismen zur Zellinkorporation

Für die Aufnahme von Substanzen ins Zellinnere stehen verschiedene Wege zur Verfügung. Zellen besitzen eine Doppelschicht aus Phospholipiden als semipermeable Membran zur räumlichen Abtrennung des Zytoplasmas und der Zellorganellen von der Umgebung. Sie dient als Schutzbarriere zur Wahrung des inneren Milieus und ist intrinsisch nur für bestimmte Stoffe durchlässig. Der Transport unterschiedlicher Moleküle durch eine solche Biomembran kann dabei aktiv oder passiv erfolgen. In eukaryotischen Zellen, welche im Gegensatz zu Prokaryoten einen Zellkern besitzen, finden sich membranverlagernde Transportvorgänge. Wie in Abbildung 2.11 skizziert, bilden sich unter Einstülpung der Plasmamembran um die aufzunehmenden Substanzen sogenannte Vesikel, die in das Zytoplasma gelangen.

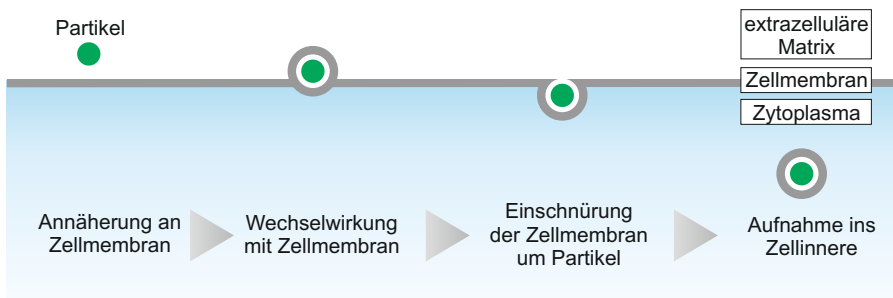


Abbildung 2.11: Allgemeine Aufnahme eines Partikels ins Zellinnere durch membranverlagernde Transportvorgänge. Das innere Milieu der Zellen ist hier und in darauffolgenden Abbildungen in blau dargestellt.

Je nach Art und Größe der inkorporierten Teilchen handelt es sich dabei um verschiedene Formen der Endozytose. Die unspezifische Aufnahme von Flüssigkeiten oder gelösten Substanzen aus der Umgebung wird mit dem Begriff der Pinozytose („Zelltrinken“) bezeichnet, welcher oftmals synonym zu Endozytose verwendet wird. Große Partikel wie Zellfragmente oder ganze Zellen dagegen werden phagozytiert („Zellfressen“). Der zur Endozytose umgekehrt verlaufende Vorgang wird Exozytose genannt, bei dem es zur Ausscheidung verschiedener Stoffe kommt und welcher häufig gekoppelt mit der endozyto-

tischen Aufnahme auftritt.

Endozytose kann über ihre allgemeine Form hinaus auch rezeptorvermittelt verlaufen. Dabei binden Makromoleküle mit spezifischen Liganden an Rezeptoren auf der äußeren Oberfläche der Plasmamembran. Das wichtigste und am besten verstandene Lehrbuchbeispiel liegt in der durch den Proteinkomplex Clathrin vermittelten Endozytose, welche durch die hohe Spezifität eine Konzentrierung der internalisierten Moleküle bis auf drei Größenordnungen erlaubt. Eine schematische Darstellung der ablaufenden Transportvorgänge in Abhängigkeit von den Partikeleigenschaften ist in Abbildung 2.12 gezeigt.

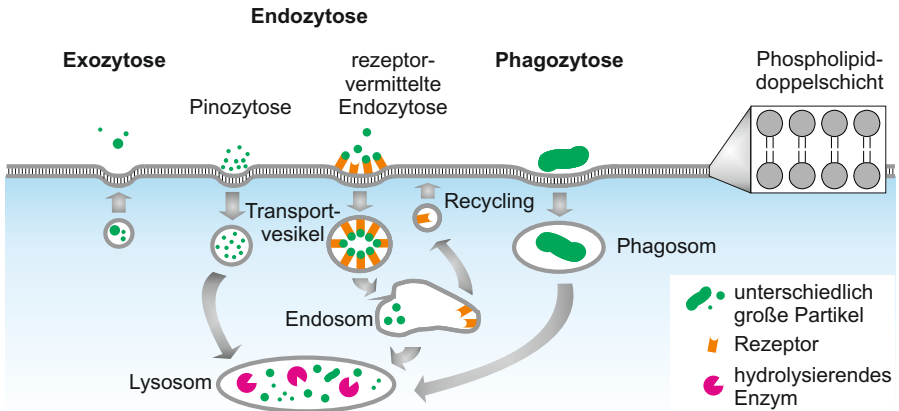


Abbildung 2.12: Exozytose und verschiedene Formen der endozytotischen Aufnahme, darunter Pinozytose für kleine Partikel, rezeptorvermittelte Endozytose und Phagozytose für größere Partikel.

Die in Vesikel aufgenommenen Teilchen gelangen zunächst in endosomale Kompartimente, komplexe Gebilde aus untereinander verbundenen Membranröhren und Vesikeln. Endosome können ähnlich dem *trans*-Golgi-Netzwerk allgemein als Sortierstation betrachtet werden, in denen über den weiteren Transportweg in der Zelle oder aus der Zelle hinaus entschieden wird. Rezeptoren rezyklisieren in der Regel und gelangen zurück an die Zellmembranoberfläche, wohingegen Vesikel je nach beeinhalteten Liganden meistens als späte Endosome im lysosomalen Apparat enden. Während frühe Endosome in der Zellperipherie zu finden sind und eine relativ glatte

Form besitzen, kennzeichnet sich das zum späten Endosom gereifte Kompartiment durch die Nähe zum Zellkern und eine große Membranoberfläche durch Einstülpung der Abgrenzungsmembran. Auch in Schwimmdichte und Proteinzusammensetzung unterscheiden sich die beiden Arten von Endosomen. Das typisch saure Milieu mit einem pH von 6.0 im frühen und pH von 4.5 im späten Stadium der Endosome wird durch die vom Energielieferanten Adenosintriphosphat (ATP) getriebenen Protonenpumpen in der Membran gewährleistet. Aus dem endosomalen Bereich wird dessen Inhalt zu den ebenfalls pH-sauren Lysosomen transportiert, welche zum Partikelverdau etwa 40 verschiedene Enzyme enthalten, darunter Nukleasen, Proteasen und Hydrolasen.

Bei bestimmten Zelltypen hat sich die Phagozytose als häufigste Form der Partikelaufnahme etabliert. Große Teilchen wie Zellreste und Bakterien, welche aus Sicht der Zellen überwiegend als Abfallstoffe bezeichnet werden können, werden dabei von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen aufgenommen. Die eigentliche Funktion der Nahrungsaufnahme hat sich somit in einen Reinigungsmechanismus zur Beseitigung beschädigter Zellen und zum Schutz vor Krankheitserregern gewandelt.^[34,50,51]

2.4.2 Zelluläre Interaktionen mit Kohlenstoffnanoröhren

Kohlenstoffnanoröhren stellen für Zellen in erster Linie Fremdstoffe dar. Die Ummantelung mit Biomolekülen wie einsträngiger DNA kann dabei unabhängig von der Zelllinie einen wichtigen Zugang zur Plasmamembran darstellen. Während in aktueller Forschung stets neue Erkenntnisse über die zelluläre Aufnahme von Kohlenstoffnanoröhren gewonnen werden, gibt es derzeit noch keine allgemeingültige Antwort auf die Frage nach dem exakten Prozess der SWNT-Inkorporation. Auch wenn Endozytose als vorherrschende Aufnahmeroute für Nanomaterialien im Allgemeinen gilt und ebenfalls für Kohlenstoffnanoröhren in verschiedenen Abwandlungen in Betracht gezogen wird, wird darüber hinaus auch von passiver Diffusion berichtet.^[52] Funktionalisierte Kohlenstoffnanoröhren können ebenso in nicht-endozytierenden Zellen nachgewiesen werden, weshalb unabhängig vom Zelltyp oftmals auch

von einer energieunabhängigen Aufnahme die Rede ist.^[7,53]

Demgegenüber stehen Untersuchungen, bei denen ausdrücklich eine Energieabhängigkeit der zellulären Inkorporation von SWNTs festgestellt wurde, indem die Endozytose-inhibierende Temperatur von 4 °C anstelle der typischen 37 °C gewählt wurde und ein drastischer Unterschied in der Menge an aufgenommenen SWNTs nachgewiesen werden konnte.^[54] Zudem wurde eine Clathrin-vermittelte Aufnahme durch den Vergleich mit derartigen Bedingungen, die die Ausbildung Clathrin-ummantelter Vesikel unterbindet, bestätigt.^[55] Ebenfalls als rezeptorinduziert gilt die Endozytose von SWNTs laut einem Modell zur längenabhängigen Aufnahme. Der entscheidende Parameter zur Bestimmung der Nanopartikel-Zell-Wechselwirkungen liegt dabei in der Adhäsion von Proteinen aus dem Zellkultivierungsmedium auf die Nanorohroberfläche, genauer gesagt an das negativ geladene DNA-Rückgrat. Die adsorbierten Proteine werden problemlos von Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt und eröffnen somit den Weg ins Zellinnere.^[56,57]

Bei den Makrophagen konnte eine aktive Aufnahme von SWNTs durch die für diese Zellart typische Phagozytose gefunden werden.^[58,59] Im Zusammenhang mit Untersuchungen von SWNTs in Lungengewebe konnte eine Aktivierung von makrophagischen Zellen beobachtet werden, welche eine stressbedingte Phagozytose auslösten.^[60]

In jüngsten Arbeiten konnte durch Einsatz spezifischer Inhibitoren der Mechanismus der durch bestimmte Gene vermittelten Makropinozytose in Endothelzellen, welche als Barriere für den Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut fungieren, nachgewiesen werden.^[61] Abbildung 2.13 zeigt schematisch die wichtigsten der vorgeschlagenen Aufnahmemechanismen für ssDNA-SWNT-Konjugate.

Interessant bei Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus sind die Interaktionen, die beim ersten Kontakt von Kohlenstoffnanoröhren mit Zellen entstehen. Die entscheidenden Wechselwirkungen zwischen Zellmembran und DNA oder SWNT-Oberfläche können durch Verwendung von synthetischen Lipidschichten *in vitro* nachgestellt und charakterisiert werden. Aktuelle Studien zu Folge nehmen SWNTs Einfluss auf die Oberflächenspannung der künstlichen Membran und können somit eine endozytotische Aufnahme ins Zellinnere stimulieren, da Ungleichgewichte zwischen Innen-

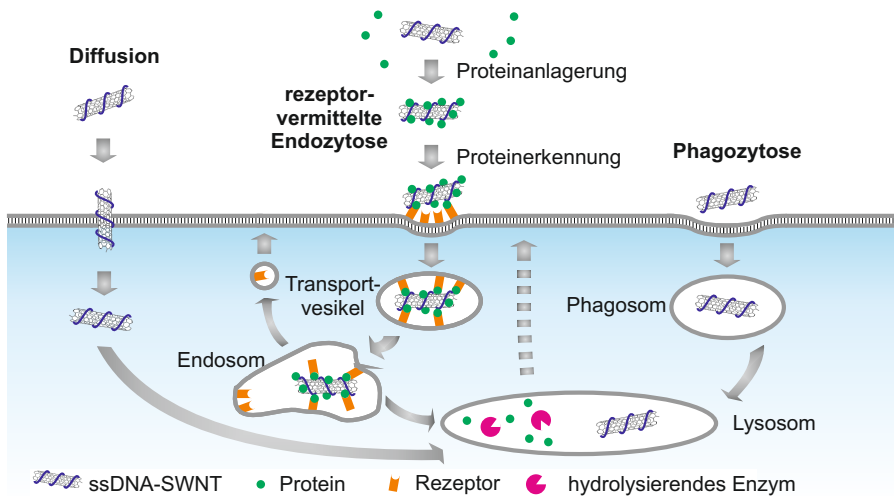


Abbildung 2.13: Aufnahmewege für DNA-ummantelte SWNTs ins Zellinnere: passive Diffusion, rezeptorvermittelte Endozytose und Phagozytose.

und Außenseite aktiv von der Membran reguliert werden.^[62]

Zahlreiche Forschergruppen haben sich im vergangenen Jahrzehnt den mechanistischen Untersuchungen zur SWNT-Aufnahme gewidmet und unterschiedlichste, teils widersprüchliche Erklärungsansätze geliefert. Tatsächlich scheint die Inkorporation von Kohlenstoffnanoröhren auf verschiedene Wege möglich zu sein, wobei ein gleichzeitiges Vorliegen aus allen Vorschlägen realistisch erscheint. Die Verteilung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche liegt nicht homogen vor, so dass die Art der Partikelaufnahme in jedem Einzelfall auch davon abhängig ist, an welcher Stelle der erste Kontakt zwischen Zelle und Nanoröhre entsteht.

2.4.3 Zytotoxizität von Kohlenstoffnanoröhren

Nachdem sich Kohlenstoffnanoröhren bereitwillig intrazellulär anreichern können, stellt sich die Frage nach möglichen toxischen Effekten. Bevor sich neuartige Systeme für medizinische Anwendungen etablieren können,

müssen ausführliche Studien unter anderem zur Zytotoxizität durchgeführt werden. Zu SWNTs gibt es diesbezüglich bereits zahlreiche Untersuchungen, wobei auch hier keine Einigkeit über resultierende Nebeneffekte herrscht. Unter Zytotoxizität im Allgemeinen wird die Giftigkeit einer Substanz gegenüber zellulären Einheiten verstanden. Für deren Untersuchung stehen verschiedene standardisierte Protokolle zur Verfügung, sogenannte Zytotoxizitätsassays. Dabei wird die metabolische Aktivität von behandelten Zellen nach Zugabe eines sensitiven Farbstoffes durch photometrische Analytik ermittelt. Bekannte Beispiele für solche Assays sind der MTT-, WST-8- und Alamar Blue-Test, welche jeweils nach dem eingesetzten Farbstoff benannt sind.

Die vorherrschende Problematik im Zusammenhang mit Kohlenstoffnanoröhren und letztlich auch der Grund, warum eine Pauschalantwort nach Zytotoxizität nicht möglich ist, liegt in der nicht-standardisierten Präparation der SWNT-Proben. Grundlegende Unterschiede in Qualität und Biokompatibilität der Proben rühren unter anderem von der Wahl des SWNT-Herstellungsverfahrens und verwendeten Dispergieradditivs, Art und Grad der Funktionalisierung sowie verschieden effektiven Reinigungsmethoden her. Dabei stellen Nanoröhrlänge, Größe der freien Oberfläche sowie deren chemische Natur ebenso wichtige Parameter zur Beeinflussung des Ergebnisses von Zytotoxizitätsstudien dar wie die Tendenz zur Aggregatbildung und Verunreinigungen durch Katalysatorrückstände und amorphe Kohlenstoffreste.^[52,63–65] Über die Unterschiede in der Materialqualität hinaus wurde eine Abhängigkeit der Resultate aus Zytotoxizitätsuntersuchungen von der Wahl des durchzuführenden Assays gefunden. So gibt es Assays, die eine starke Zytotoxizität indizieren, wohingegen mit identischen Proben in anderen Protokollen kein Effekt messbar ist.^[66]

Aufgrund ihrer nadelähnlichen Form und des analogen Aspektverhältnisses werden Kohlenstoffnanoröhren bezüglich ihres Gefährdungspotentials für Lungenzellen häufig einem Vergleich mit Asbestfasern unterzogen. Feinfasrige Asbeststrukturen mit einem Durchmesser von etwa 3 µm können Zellen regelrecht durchspießen und dadurch Entzündungen im Lungengewebe als Vorstufe von Krebs erzeugen. In Pilotstudien zeigten lange MWNTs tatsäch-

lich eine Asbest-Ähnlichkeit in ihrer Pathogenität gegenüber Lungenepithelzellen,^[67] wohingegen die um einige Größenordnungen kleineren SWNTs in einer nanoskaligen Dispersion als ungefährlich eingestuft wurden.^[60] Eine Gefährdung von Lungengewebe und -zellen durch Kohlenstoffnanoröhren ist in erster Linie auf Inhalation des rußartigen Rohmaterials zurückzuführen. Interessiert man sich dagegen für Effekte von SWNT-Suspensionen, die für biomedizinische Verwendungen realistisch sind, sollte die Wahl auf Targetzellen je nach Organspezifität des untersuchten Wirkorts fallen.

Als Mechanismus für die in vielen Studien beobachtete Zytotoxizität wird Nekrose als pathologisches Zellsterben in passiver Form in Erwägung gezogen. Seltener wird das Phänomen der Apoptose, der in jeder Zelle programmierte und somit aktive, physiologische Zelltod, gefunden.^[68]

Ein Blick auf die Entwicklung der bei SWNTs gefundenen zytotoxischen Effekte im Laufe der Jahre zeigt eine erhebliche Steigerung der Probenqualität und eine damit einhergehende Verringerung der Zytotoxizität. Während ersten Befunden zufolge Kohlenstoffnanoröhren Inhibitoren für die Überlebensfähigkeit von Zellen darstellen können,^[69–71] berichten aktuelle Studien, die ein besonderes Augenmerk auf die Präparation der Nanoröhren legen, überwiegend von nicht-zytotoxischen SWNTs sowohl in *in vitro*- als teils sogar in *in vivo*-Untersuchungen.^[60,72–74] Die inzwischen ermöglichte Minimierung der Aggregat- und Bündelgröße durch verfeinerte Solubilisierungs- und Reinigungsverfahren kann die Wechselwirkungen mit Zellen verbessern und darüber hinaus in einer verringerten Zytotoxizität resultieren. So lange jedoch keine einheitlichen Standards für die Präparation von SWNTs zur medizinischen Anwendung existieren, müssen individuelle Untersuchungen der jeweiligen Proben durchgeführt und optimalerweise unter Verwendung verschiedener Zytotoxizitätsprotokolle parallel evaluiert werden.

2.5 Zelllinien

Die Wahl der Zelllinie zur Untersuchung der Wechselwirkungen mit Kohlenstoffnanoröhren ist von erheblicher Bedeutung. Die in dieser Arbeit verwen-

deten Kulturen J774.1 und HeLa werden nachfolgend vorgestellt.

2.5.1 Murine Makrophagen J774.1

Erste zytotoxikologische Tests der dieser Arbeit zugrundeliegenden ssDNA-SWNTs werden mit den Mausmakrophagen J774.1 durchgeführt.

Bei dieser Linie handelt es sich um Makrophagen-ähnliche Zellen, welche ihre Analogie zu Fresszellen ihrer Neigung zur Phagozytose verdanken. 1985 wurden die aus bösartigen Tumoren im Knochenmark von weiblichen Albinomäusen stammenden Zellen erstmals in Kultur gebracht.^[75] Diese kontinuierliche Zelllinie gilt als unsterblich, ist überwiegend adhärent und wird als heterogenes Gemisch von Zellen beschrieben.^[76-78] Wie für Phagozyten üblich erzeugen sie Lysosyme, welche ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind, und Interleukin-1, einen entzündungsfördernden Signalstoff. J774.1-Zellen sind somit in der Lage, schädliche Fremdstoffe wie Bakterien zu erkennen und durch Phagozytose zu beseitigen. Phagozyten, wie Makrophagen, sind primäre Zellen des Immunsystems und daher die erste Kontaktstelle von Fremdkörpern mit dem Organismus.

Die in dieser Arbeit in Zytotoxizitätsuntersuchungen eingesetzten Mausmakrophagen werden in Abbildung 2.14 a) gezeigt.

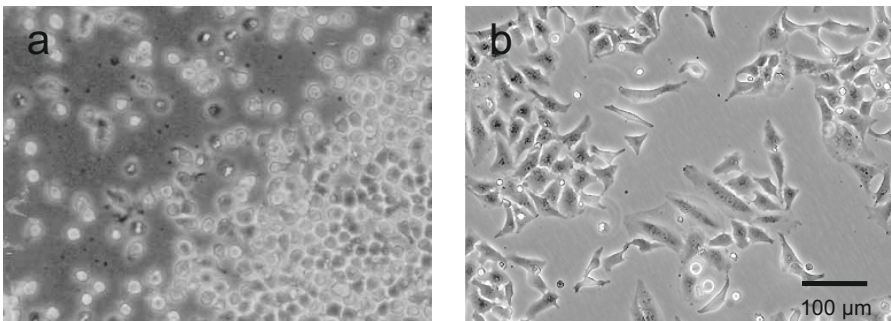


Abbildung 2.14: a) Mausmakrophagen J774.1^[75] und b) menschliche Epithelzellen HeLa.^[79]

2.5.2 Humane Epithelzellen HeLa

Auch wenn Tiermodelle oft in guter Näherung auf die Verhaltensweise bestimmter Pathogene auf Menschen übertragen werden können, so besteht dennoch die Notwendigkeit, Studien an menschlichen Zellen durchzuführen. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wird daher die etablierte humane Zelllinie HeLa gewählt.

Das Akronym ist auf die 31-jährige afroamerikanische Patientin Henrietta Lacks zurückzuführen, vor deren Tod im Jahr 1951 Zellen aus einem Zervixkarzinom, einem bösartigen Gebärmutterhalskrebs, entnommen wurden, die mit dem humanen Papillomvirus HPV-18 infiziert waren. Aus diesen humanen Epithelzellen konnte aufgrund ihrer ungewöhnlich hohen Wachstumsrate die erste permanente Zelllinie kultiviert werden, die bis heute als unsterblich gilt und die Mikrobiologie im klassischen Sinn revolutionierte. Sie sind prototypisch für das menschliche Epithelium und bieten einen ersten Kontakt des Organismus mit toxischen Verbindungen.^[80] Die etablierte Standardkultur ist die am besten erforschte Zelllinie und wird häufig in Zytotoxizitätsuntersuchungen eingesetzt.

Die HeLa-typische Zellstruktur ist Abbildung 2.14 b) zu entnehmen.

3 Methoden und Durchführung

Sämtliche experimentelle Untersuchungen dieser Disseration beruhen auf Systemen von ssDNA-SWNT-Konjugaten. Im Folgenden werden daher zunächst die allgemeinen Schritte der SWNT-Probenpräparation und deren Charakterisierung geschildert. Der Umgang mit den in Zellexperimenten benötigten Kulturen sowie die Vorgehensweise bei der DNA-Funktionalisierung von SWNT-Hybriden werden abschließend beschrieben.

3.1 Probenpräparation

Zur Herstellung individualisierter ssDNA-SWNT-Konjugate wurden im praktischen Verlauf dieser Arbeit unterschiedliche Methoden getestet, um eine (6,5)-Anreicherung von Kohlenstoffnanoröhren mit Einzelstrang-DNA in Analogie zur bereits etablierten Präparation mit Tensiden als Dispersionsmittel zu ermöglichen. Eine direkte Behandlung des Rohmaterials mit DNA und anschließender Dichtegradientenultrazentrifugation konnte sich dabei gegenüber Austauschreaktionen von Tensiden auf SWNT-Oberflächen durch Dialyse durchsetzen und wird hier als Standardmethode aufgeführt.

3.1.1 Dispergierung

Als Rohmaterial wird (6,5)-angereicherter SWNT-Ruß (SWeNT SG 65, SouthWest NanoTechnologies) aus dem CoMoCAT-Verfahren eingesetzt, welcher die gewünschte Chiralität zu etwa 50% enthält. Etwa 0.5 mg des Rohmaterials werden in 3.0 ml Phosphatpuffer (PBS, *engl.* phosphate buffered saline) mit den gewünschten Nukleinsäuren einer Nukleotidkonzentration

von 0.5 mM 1.5 h unter Kühlung auf 20 °C (Frya Kältetechnik) im Badgefäß beschallt (Branson Sonifier 450A, Stufe 3, kontinuierlicher Betrieb). Die eingesetzten DNA-Oligomere (biomers.net) besitzen jeweils eine Basenlänge von 32 Einheiten mit 16 alternierenden (GT)-Sequenzen. Je nach Experiment ist eine besondere Markierung der Nukleinsäuren durch Fluorophore oder Fluoreszenzlöcher erforderlich. Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Modifikationen, welche teilweise auch in der Probenpräparation zum Einsatz gekommen sind.

Modifikation	Oligomer
Thiol C ₆ -SH	5'-(HS-C ₆)-(GT) ₁₆ -3'
Fluorophor Cy3	5'-Cy3-(GT) ₁₆ -3'
Fluorophor 6-FAM + Quencher DDQI	5'-(6-FAM)-(GT) ₇ -GT(DDQI)-(GT) ₈ -3'

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten modifizierten DNA-Oligomere. Thiol- und Cy3-modifizierte DNA können in der Probenpräparation genutzt werden, um funktionelle Gruppen bzw. Farbstoffe zur SWNT-Markierung einzuführen. Doppelt-markierte DNA-Oligomere kommen in Kapitel 4 zum Einsatz.

Die Oligomere werden bei Vorliegen zusätzlicher Modifikationen am DNA-Strang als HPLC-, andernfalls als kartuschengereinigt geliefert. Die exakte DNA-Konzentration ist dem jeweils der Lieferung beigefügten Oligonukleotiddatenblatt zu entnehmen und schwankt je nach Syntheseausbeute durch den Hersteller zwischen 100 µM und 450 µM. Beim Einsatz modifizierter DNA-Einzelstränge wird die Oligonukleotidkonzentration beim Beschallungsvorgang aufgrund der durch sterische Hinderung verminderten Dispergierfähigkeit auf 0.7 mM statt 0.5 mM gesetzt. Der verwendete Puffer (10x PBS, Fisher Scientific) liegt in zehnfacher Konzentration vor und wird durch entsprechende Verdünnung mit HPLC-Wasser (Chromasolv Plus, Sigma Aldrich) auf 10 mM und einen physiologischen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Abbildung 3.1 zeigt, wie nach Ultraschallbehandlung des anfangs stark heterogenen Gemisches grober Rußflocken in wässriger Umgebung eine schwarze Dispersion erhalten wird.

Mögliche unlösliche Rückstände können durch Verwendung einer Tischzentrifuge (Mikroliter, Hettich) nach 5 min bei 10 krpm als Bodensatz verworfen

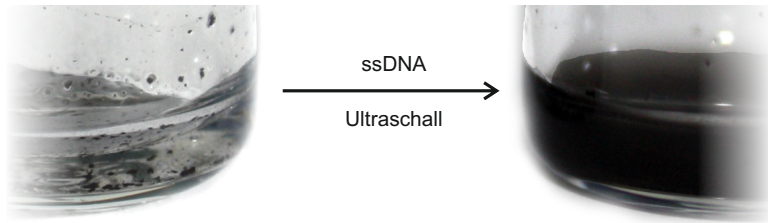


Abbildung 3.1: Entbündelung von SWNT-Rohmaterial durch Ultraschallbehandlung mit ssDNA.

werden. Der relativ homogene Überstand besteht aus einem Gemisch aus isolierten und unterschiedlich stark gebündelten SWNTs und wird zur weiteren Aufreinigung eingesetzt.

3.1.2 Dichtegradientenultrazentrifugation

Durch den Herstellungsprozess bedingt liegen trotz (6,5)-Anreicherung verschiedene SWNT-Chiralitäten und somit eine gewisse Durchmesserverteilung im Rohmaterial vor. Zur optischen Charakterisierung ist das Vorliegen eines einzelnen SWNT-Typs wünschenswert, was eine weitere durchmesserselektive Auftrennung erfordert. Für die Aufreinigung tensiddispersierter Kohlenstoffnanoröhren wurde die Methode der Dichtegradientenultrazentrifugation (DGU) etabliert, um nicht nur verschieden große Aggregate zu beseitigen, sondern darüber hinaus isolierte SWNTs einzelner Chiralitäten zu erhalten.^[81,82] Dabei macht man sich je nach Röhrentyp und Aggregatgröße unterschiedliche Schwimmdichten zu Nutze, welche aus der Anordnung der nicht-kovalenten Oberflächenbedeckung und der darauf aufbauenden Hydrathülle in Abhängigkeit des Durchmessers resultieren. Bei der isopyknischen Ultrazentrifugation ordnen sich Partikel in einer ihrer Dichte entsprechenden Position im Zentrifugenröhrchen (Ultra-Clear™, Beckman Coulter) an. Dazu wird das SWNT-Gemisch in einen Dichtegradienten eingebracht, der den Dichtebereich der enthaltenen Partikel umfasst. Hierbei kommt das Dichtegradientenmedium Iodixanol zum Einsatz, welches als 60 (w/V)%-ige wässrige Lösung unter dem Namen OptiPrep® (Sigma Aldrich) kommerziell

erhältlich ist. Für DNA-solubilierte SWNTs hat sich ein dreistufiger Dichtegradient bewährt, bei dem Mischungen von OptiPrep[®] und PBS mit einem Iodixanolgehalt von 40 (w/V)%, 30 (w/V)% und 20 (w/V)% übereinander geschichtet werden. Während für die unterste und oberste Phase jeweils 4 ml verwendet werden, besteht die mittlere Schicht aus einem Volumen von 3 ml und beinhaltet das dispergierte Nanorohrmaterial. Tabelle 3.2 fasst den stufenförmigen Dichtegradienten für ssDNA-SWNTs zusammen.

Schicht	Iodixanolgehalt	OptiPrep [®] :PBS	Volumen
III	20 (w/V)%	1:2	4 ml
II	30 (w/V)%	1:1 (+SWNTs)	3 ml
I	40 (w/V)%	2:1	4 ml

Tabelle 3.2: Stufendichtegradient zur (6,5)-Anreicherung von ssDNA-dispergiertem SWNT-Material mittels DGU. Die ultraschallbehandelte Rohdispersion ist in der mittleren Schicht II enthalten.

Aus dem Stufendichtegradient bildet sich ein linearer Gradient aus, nachdem das mit Parafilm[®] verschlossene Zentrifugenrohr zwei Stunden horizontal gelagert wird. Bei diesem Diffusionsschritt erfolgt eine erste grobe Sortierung der Partikel nach ihrer Dichte. Nach Austarieren unter Verwendung der 20 (w/V)%-igen Iodixanollösung werden die Proben einer 18-stündigen Ultrazentrifugation (Optima L-90 K mit SW 41 Ti-Rotor, Beckman Coulter) bei 41 krpm und 21 °C unterworfen. In Abbildung 3.2 findet sich eine Übersicht der einzelnen DGU-Präparationsschritte.

Die nach der Zentrifugation erhaltenen Banden entsprechen unterschiedlichen SWNT-Chiralitäten und Aggregaten verschiedener Größen. Um einzelne Fraktionen zu erhalten, kommt eine Spritzenpumpe (kd Scientific) zum Einsatz, die in definierten Schritten Fluorinert FC-40 (Sigma Aldrich), eine hydrophobe Hydraulikflüssigkeit hoher Dichte, unterschichtet. Die dabei nach oben transportierten SWNTs können am Auslass beliebig entnommen werden. Typischerweise werden Fraktionen mit einem Volumen von je 200 µl gesammelt. Die erhaltenen ssDNA-SWNT-Proben zeigen eine gute Stabilität über Monate hinweg.

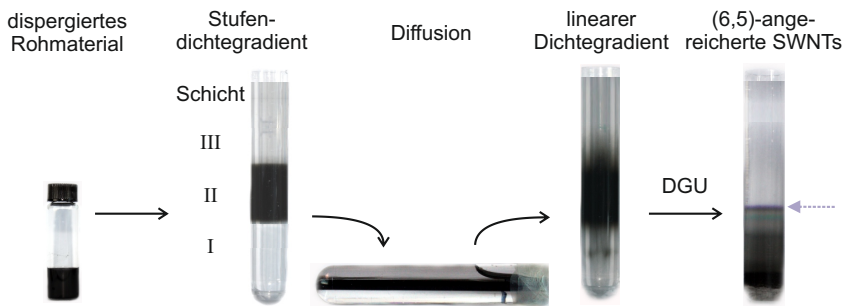


Abbildung 3.2: Präparationsschritte bei der Dichtegradientenultrazentrifugation: Einschichten des ssDNA-SWNT-Rohmaterials in einen Stufendichtegradienten, Ausbildung eines linearen Dichtegradienten durch Diffusion, Anreicherung von individualisierten (6,5)-chiralen ssDNA-SWNTs nach Ultrazentrifugation.

3.1.3 Zentrifugation

Nach erfolgter DGU können je nach Experiment verschiedene Methoden zur weiteren Behandlung der Nanorohroberfläche eingesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die SWNT-Oberflächenbedeckung mit DNA-Strängen nach der Ultrazentrifugation bei etwa 20 % liegt. Durch Zugabe von 5 μl Oligomerlösung, was im kommerziell erhältlichen Konzentrationsbereich zwischen 100 μM und 450 μM einen enormen DNA-Überschuss bedeutet, kann unter fünfminütiger Verwendung eines Ultraschallbades (Socorex Super 10 P, Bandelin) eine teilweise Absättigung der Oberfläche auf bis zu 80 % erzielt werden.^[30] Um wiederum den überschüssigen Anteil an DNA-Oligomer zu entfernen, können Filtersysteme (Microcon[®] Ultracel YM-100, Millipore) in mehreren Zentrifugationsschritten (Rotina 35 R, Hettich) eingesetzt werden. Die Filtermembran wird mit 100 kDa so gewählt, dass sie durchgängig für Nukleinsäuren ist, makromolekulare Systeme wie SWNTs jedoch als fester Rückstand gehalten werden. Das SWNT-Retentat kann je nach Experiment durch Resuspendieren in PBS und erneute Zentrifugation (20 min, 2500 rpm, RT) beliebig häufig gewaschen werden. Zum vollständigen Ausspülen des gereinigten Retentats wird das Filtersystems umgedreht und mit wenig Pufferlösung 2 min zentrifugiert. Die Vorgehensweise wird in Abbildung 3.3 sche-

matiiert.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, ssDNA-SWNT-Lösungen aufzukonzentrieren. Hierbei kommen ebenfalls Zentrifugeneinheiten (Amicon® Ultracel 100kDa, Millipore) zum Einsatz, in welchen jedoch im Unterschied zum vorangegangenen System die Filtermembran nicht im Boden, sondern in den Seitenflächen angeordnet ist. So wird aus dem anfänglichen Probenvolumen von 450 µl stets ein Flüssigkeitsvolumen von 40 µl zurückgehalten. Auch hier kann die aufkonzentrierte ssDNA-SWNT-Lösung durch wiederholten Wechsel von Resuspension in PBS und Zentrifugation (20 min, 2500 rpm, RT) beliebig gewaschen werden.

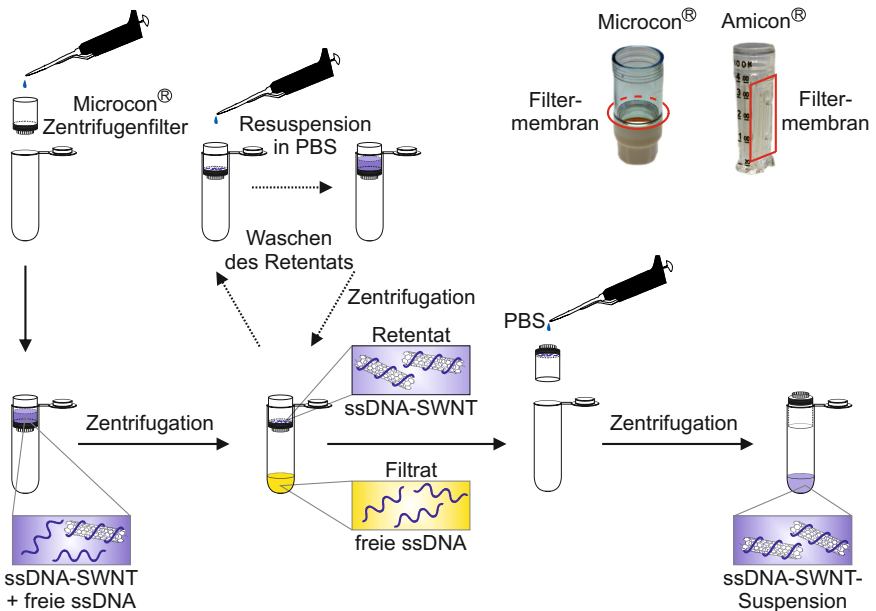


Abbildung 3.3: Reinigung von ssDNA-SWNTs durch Entfernen freier ssDNA mittels Zentrifugation. Dabei kommen je nach Experiment die Filtersysteme Microcon® und Amicon® zum Einsatz, die sich grundlegend in der Anordnung ihrer Filtermembran unterscheiden. Während Microcon®-Filter zur gründlicheren Reinigung verwendet werden, dienen Amicon®-Systeme einer Aufkonzentrierung von SWNT-Proben.

3.1.4 Sterile Probenpräparation

Der Einsatz von ssDNA-SWNT-Konjugaten in Experimenten mit Zellen bedarf steriler Proben. Im Gegensatz zu den gängigsten Nanomaterialien sind Kohlenstoffnanoröhren aufgrund ihres hohen Aspektverhältnisses zu groß, um durch gewöhnliche Sterilfiltration von möglichen Keimen befreit zu werden. Daher muss der Weg über eine Probenpräparation unter sterilen Bedingungen führen. Alle Arbeitsschritte werden, sofern möglich, unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (Gelaire[®] Flow Laboratories TC 60) durchgeführt. Glasbehälter, Pipettenspitzen, Eppendorf-Reaktionsgefäße und SWNT-Rohmaterial werden vor deren Verwendung 20 min bei 121 °C im Wasserdampf autoklaviert (Systec DE-45). Steril verpackte Falcon-Plastikaufbewahrungsgefäße (Cellstar[®] tubes, Greiner bio-one) und Einwegpipetten (Greiner bio-one) können direkt eingesetzt werden. Nicht-autoklavierbare Labormaterialien wie Zentrifugenröhrchen und -filter werden durch Behandlung mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert. Phosphatpuffer und HPLC-Wasser können nach Sterilfiltration (Nalgene) verwendet werden. Zur zweistündigen Beschallung des Rohmaterials mit steril gelöster DNA im Badgefäß wird das zuvor autoklavierte Schraubdeckelglas mit Parafilm[®] fest verschlossen, da sich der Deckel durch Ultraschallbehandlung leicht aufschrauben kann und damit die Sterilität nicht gewährleistet wäre. Um ein Überhitzen am Deckelrand zu verhindern, wird das Ultraschallgerät vom kontinuierlichen in den gepulsten Modus unter ansonsten gleichbleibenden Bedingungen gestellt. OptiPrep[®], welches sich weder autoklavieren noch sterilfiltrieren lässt, wird ausschließlich der Originalpackung entnommen. Auf die Verwendung des nach der DGU für die Fraktionierung eingesetzten Spritzenpumpensystems wird verzichtet. Stattdessen werden die Fraktionen von Hand mit Hilfe einer Eppendorfpipette in 200 µl-Schritten jeweils von oben entnommen.

Alle hier nicht explizit aufgeführten Arbeitsschritte können wie in den Kapiteln 3.1.1 bis 3.1.3 beschrieben unter Berücksichtigung der sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

3.2 Probencharakterisierung

Wie im Grundlagenkapitel 2.1.2 bereits angedeutet, können Kohlenstoffnanoröhren standardmäßig durch ihre charakteristischen Absorptions- und Emissionsbanden bezüglich ihrer Chiralität identifiziert werden.

3.2.1 Absorptionsspektroskopie

Im Anschluss an die Dichtegradientenultrazentrifugation werden die erhaltenen Fraktionen absorptionsspektrometrisch auf ihre Chiralität, das Vorliegen von Aggregaten und die in der Probe vorhandene SWNT-Menge hin untersucht. Das verwendete Absorptionsspektrometer (Cary 5000 UV-Vis-NIR, Varian) umfasst einen Messbereich von 200 nm bis zu 3300 nm unter Einsatz von zwei Detektoren, die bei 800 nm vollautomatisch gewechselt werden. Als Lichtquelle dienen eine Deuterium- und eine Halogenlampe, der Wechsel erfolgt bei 350 nm. Für SWNT-Proben wird hier standardmäßig ein Messbereich von 1350 nm bis 400 nm mit Intervallen von 1 nm und einer Integrationsdauer von 0.1 s/nm gewählt. Eine Anregung im UV-Bereich ist für Experimente notwendig, bei denen DNA-Oligomere bei Abwesenheit von SWNTs untersucht werden. Da sämtliche in dieser Arbeit untersuchten Proben in Phosphatpuffer gelöst sind, wird das Referenzspektrum von PBS zur Hintergrundkorrektur genutzt. Der Verlauf der Absorption innerhalb des Zentrifugenröhrchens kann wie in Abbildung 3.4 gezeigt den verschiedenen DGU-Fractionen entnommen werden. Das Probevolumen der verwendeten Küvette (Typ 105.250-QS, Hellma[®]) liegt bei einem Minimum von 140 µl.

Bei der sterilen Probenpräparation wird lediglich ein geringer Teil der Probe zur Absorptionsmessung eingesetzt und das Spektrum aufgrund der notwendigen Verdünnung entsprechend hochgerechnet. Anschließend wird die verdünnte Probe ausschließlich für Experimente unter nicht-sterilen Bedingungen eingesetzt.

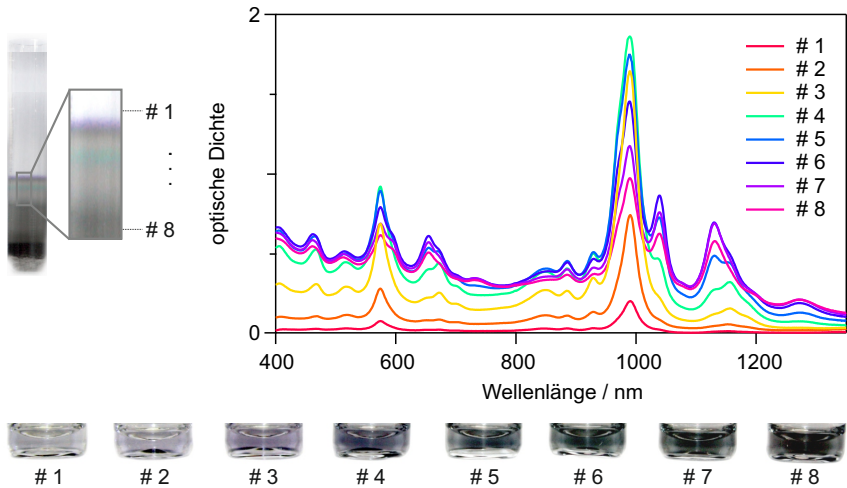


Abbildung 3.4: Absorptionsspektren und photographische Aufnahmen verschiedener Fraktionen nach der Dichtegradientenultrazentrifugation.

3.2.2 Emissionsspektroskopie

Das Emissionssignal von (6,5)-Kohlenstoffnanoröhren kann durch eine resonante Anregung des S_2 -Exzitons mit einer Wellenlänge von etwa 570 nm enorm verstärkt werden. Zur Anregung bieten sich demnach die 568.2 nm-Linie eines Kryptonionenlasers (2020, Spectra-Physics) sowie ein gelber Diodenlaser (Sapphire-568-50 CW, Coherent) mit 563.25 nm an. Da der Aufbau zu Photolumineszenzmessungen auch zur Raman-Spektroskopie verwendet werden kann, wird der Strahl vor dem Eintritt in den Spektrographen durch einen Kantenfilter (Razoredge 568.1 nm, Kaiser Optics) geleitet, um störendes Anregungslicht herauszufiltern. Das 500 mm-Spektrometer (Acton Advanced SP 2500 A, Princeton Instruments) ist mit drei Gittern (300 Linien/mm, 1200 Linien/mm, 1800 Linien/mm) ausgestattet, die wie auch die eingebauten Spiegel zur Optimierung der Reflexion im Nahinfrarotbereich silberbeschichtet sind. Für PL-Messungen wird das 300 Linien/mm-Gitter eingesetzt. Breite des Eingangspaltes sowie Integrationsdauer werden je nach Experiment variiert. Das spektral aufgetrennte Licht wird mit einer thermoelektrisch gekühlten CCD-Kamera (ladungsgespeckeltes Bauelement, *engl.*

charge-coupled device; back-illuminated deep depletion Pixis 256BR, Princeton Instruments) mit 1024 x 256 Pixeln detektiert. In Abbildung 3.5 ist der schematische Aufbau zu PL-Messungen skizziert.

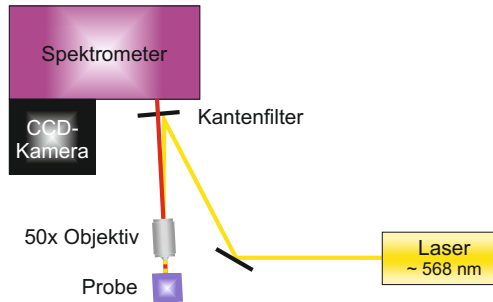


Abbildung 3.5: Schematischer PL-Aufbau, der auch für Raman-Messungen verwendet werden kann.

3.3 Zellkulturen

Für Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen ssDNA-SWNT-Konjugaten und Zellen werden die Makrophagen-ähnlichen J774.1- sowie die humanen HeLa-Kulturen verwendet. Da die Arbeiten mit den Mausmakrophagen ausschließlich vom Teilprojekt Z1 zum Qualitätsmanagement des Sonderforschungsbereichs SFB 630 für „Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“ im Institut für Infektionsbiologie durchgeführt wurden, werden die Protokolle an dieser Stelle nur knapp wiedergegeben. Der Umgang mit HeLa-Zellen soll dagegen in den Kapiteln 3.3.3 bis 3.3.6 ausführlich beschrieben werden.

3.3.1 Mausmakrophagen

J774.1-Zellen werden bei 37 °C unter 5%-iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Dem bereits Natriumhydrogencarbonat beinhaltendem RPMI-Medium (Gibco) sind 10 % hitzeinaktiviertes (30 min, 56 °C) fötales Kälberserum (FBS, *engl.*

fetal bovine serum; PAA), 2 mM Glutamin (Biochrom), 10 mM HEPES-Puffer (Gibco) mit einem pH-Wert von 7.2, 100 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Gentamycin (Sigma-Aldrich) und 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) beige-setzt. Für erste Zytotoxizitätsuntersuchungen wird die Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in eine 96-Loch-Zellkulturplatte (Greiner) transferiert. Die seriell fünffach verdünnte Testsubstanz wird im Verhältnis 1:90 mit Medium gemischt und 180 µl davon mit 20 µl Zellsuspension versetzt. Jede Verdünnung wird als Duplikat zur Doppelbestimmung angesetzt. Das Standardprotokoll sieht eine Wachstumskontrolle, die ausschließlich aus Zellen und Medium besteht, sowie Sterilkontrollen ohne Zellen vor. Nach Ablauf einer Inkubationsdauer von 24 h werden in jede Vertiefung 20 µl Alamar Blue®-Lösung (Biozol) zugegeben und die Mikrotiterplatte weitere 24 h unter Zellkulturbedingungen aufbewahrt. Zur Auswertung werden die optischen Dichten bei 550 nm und 630 nm in einem Elisa-Plattenleser (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation) bestimmt.^[83]

3.3.2 Sterilkontrolle

Bevor eigene Experimente mit Zellkulturen durchgeführt werden können, muss zunächst sichergestellt werden, dass die Möglichkeit zur sterilen Arbeitsweise gegeben ist. Zur Kontrolle der Sterilität einzelner Komponenten werden üblicherweise Agarplatten verwendet, auf denen die meisten Bakterienarten im Falle einer Kontamination sehr leicht nachgewiesen werden können.

Die Herstellung sogenannter LB-Agarplatten (Agarplatten nach Luria-Bertani) erfolgt durch Lösen von 5.0 g Trypton (Fluka), 2.5 g Hefe (Sigma-Aldrich) und 5.0 g Natriumchlorid in 250 ml HPLC-Wasser. Nach Zugabe von 7.5 g Agar (Sigma-Aldrich) wird die Lösung mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt und für 1 min zum Kochen gebracht. Die Mischung wird in eine 1 L-Schott-Flasche überführt und 20 min bei 121 °C im Dampf autoklaviert. Anschließend wird die sterile Lösung nach kurzem Abkühlen unter der Sicherheitswerkbank in 25 Plastikpetrischalen (Greiner bio-one) zu je 10 ml gegossen. Die ausgehärteten Agarplatten können bis zu ihrem Einsatz über Kopf gelagert im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Eine Sterilkontrolle kann an allen zur Probenpräparation und Zellkultivierung eingesetzten Flüssigkeiten durchgeführt werden. Dazu werden wenige Tropfen der zu untersuchenden Lösung mit einem sterilen Spatel auf der Agaroberfläche verstrichen und die Platten anschließend im Inkubator (C16, Labotect) bei 37°C aufbewahrt. Die Ausmaße einer bakteriellen Kontamination sind bereits nach 24 h augenscheinlich sichtbar. Abbildung 3.6 vergleicht hierzu das Ergebnis einer sterilen Testlösung mit dem einer absichtlich kontaminierten Probe. Alle hier durchgeführten Kontrollen deuteten darauf hin, dass nach einer sorgfältigen Reinigung des Laborbereiches steriles Arbeiten möglich ist.

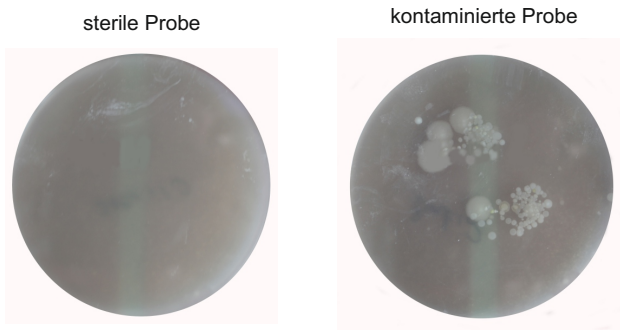


Abbildung 3.6: LB-Agarplatten zur Sterilkontrolle von Lösungen. Nach 24 Stunden ist der Bakterienbefall in einer kontaminierten Probe deutlich sichtbar gegenüber einer sterilen Lösung.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Sterilität insbesondere nach erfolgter Probenpräparation unter entsprechenden Bedingungen kann durch die Verwendung von Serum erfolgen. Dazu werden 0.5 ml FBS mit wenigen Tropfen ssDNA-SWNT versetzt und ebenfalls bei 37°C gelagert. Im Serum sind zahlreiche Proteine enthalten, die für Bakterien ein wichtiges Nährmedium darstellen und deren Wachstum bei Vorhandensein stark fördern. Somit können auch hier nach bereits 24 h Veränderungen im Erscheinungsbild wahrgenommen werden, da Lösungen, welche bakterienkontaminiert sind, eine starke Trübung aufweisen. Mit den gemäß Kapitel 3.1.4 hergestellten SWNT-Konjugaten kann auf diese Art ebenfalls die Sterilität der Proben nachgewiesen werden.

3.3.3 Umgang mit HeLa-Zellen

Zur Kultivierung von Zelllinien sind Zyklen aus Auftauen, Passagieren und Einfrieren je nach Bedarf möglich. Die Startkultur der HeLa-Zellen wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Rudel aus dem Institut für Mikrobiologie bereitgestellt.

Das verwendete Vollmedium basiert auf dem kommerziell erhältlichen RPMI 1640-Medium (Gibco) mit GlutaMax™ und 25 mM HEPES. Zusätzlich werden 10% hitzeinaktiviertes (10 min, 56 °C) FBS (PAA), 5 ml einer 10000 U/10 mg Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco) und 1 mM Natriumpyruvat (Gibco) beigelegt. Die genaue Zusammensetzung und die Anteile der einzelnen Komponenten werden in Tabelle 3.3 wiedergegeben. Der im Medium enthaltene Indikator Phenolrot zeigt bei rötlicher Färbung den optimalen pH-Wert von 7.2 an. Eine Orange- bzw. Violettfärbung des Mediums deutet auf ein zu saures bzw. zu basisches Milieu hin. Das hergestellte Komplettmedium kann bis zu zwei Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Bestandteil	Volumen	Konzentration / Menge im Voll- medium
RPMI 1640-Medium	500 ml	
HEPES	bereits enthalten	25 mM
GlutaMax™	bereits enthalten	2 mM
Phenolrot	bereits enthalten	13.3 µM
FBS, hitzeinaktiviert	50 ml	10 Vol.-%
Penicillin/ Streptomycin	1 ml	100 U/ 100 µg
Natriumpyruvat	5 ml	1 mM

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des RPMI 1640-Komplettmediums zur Kultivierung von HeLa-Zellen.

Die bei -196 °C in einem Flüssigstickstofftank gelagerten Zellen müssen zügig aufgetaut werden. Dazu wird das Kryogefäß mit den eingefrorenen Zellen zunächst für 5 min in einen Eisbehälter gestellt, anschließend wartet

man nach gründlicher Desinfektion der Außenflächen bis zum vollständigen Auftauen nach etwa 5 min bei Raumtemperatur. Die enthaltenen Zellen mit einem Volumen von ca. 1 ml werden mit 10 ml Vollmedium in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt. Beim Arbeiten mit Flüssigkeiten kommen sterile Einwegpipetten (Rotilabo[®], Greiner bio-one) und eine Pipetierhilfe (accu-jet[®] pro, Brand) mit Schutzfilter zum Einsatz. Nach 10 min Zentrifugation bei 1500 rpm kann der Überstand verworfen und der Rückstand sorgfältig in 5 ml frischem Komplettmedium resuspendiert werden. Die Zellsuspension wird in eine 75 cm²-Zellkulturflasche (Typ 658175, Cellstar[®] Greiner bio-one) überführt, in welche 20 ml des im Wasserbad (GFL[®]) auf 37 °C temperierten Mediums vorgelegt werden. Die Zellen adhären nach 2 bis 3 h im Inkubator bei 37 °C und einer CO₂-Atmosphäre von 5%. Eine Kontrolle der Adhäsion von intakten Zellen am Boden der Kulturflasche erfolgt mikroskopisch (Fisher Scientific). Der Flaschenboden wird durch zweimaliges Waschen mit je 10 ml Dulbecco's-PBS (D-PBS; Gibco) von abgestorbenen Zellen und Zellresten befreit. Nach erneuter Zugabe von 20 ml vorgewärmtem Medium können sich die am Boden haftenden Zellen im Inkubator fortpflanzen.

Die Verdopplungsrate von HeLa-Kulturen liegt bei etwa 48 h. Um den Zellen genügend Raum zur gesunden Fortpflanzung zu bieten, müssen die Kulturen regelmäßig passagiert werden. Die monolagige Bedeckung der Bodenfläche sollte dabei stets unter 85% gehalten werden, da bei vollständiger Konfluenz ein gesundes Wachstum nicht gewährleistet ist. Das Subkultivieren von Zellen erfolgt nach dreimaligem Waschen mit je 10 ml D-PBS. Zum Lösen des konfluenten Zellrasens wird 1 ml Trypsin (Gibco) dazu gegeben. Die Wirkung des Enzyms setzt bereits nach wenigen Minuten im Inkubator ein und die abgelösten Zellen schwimmen in Lösung. Die dabei auftretende Veränderung der HeLa-typischen Zellform von dreieckig in vollkommen abgerundet kann mikroskopisch verfolgt werden. Die enzymatische Aktivität von Trypsin wird durch Zugabe von 10 ml Medium aufgrund der Verdünnung abgeschwächt. Die trypsinisierte Zellsuspension kann zur Subkultivierung in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml vorgelegtem und erwärmtem Medium überführt werden. Es empfehlen sich je nach Bedarf Verdünnungen von 1:5 bis 1:20. Entsprechend der gewählten Verdünnung muss der Vorgang des

Passagierens alle drei bis fünf Tage wiederholt werden.

Eine langfristige Lagerung von Zellkulturen ist durch Einfrieren möglich. Das dafür benötigte Einfriermedium besteht zu 70 % aus RPMI-Komplettmedium, 20 % FBS sowie 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, steril; Roth). Nach Trypsinierung der Zellen wird die Suspension 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand sorgfältig in 5 ml Einfriermedium gelöst. Da DMSO bei Raumtemperatur eine toxische Wirkung auf Zellen besitzt, müssen die Arbeitsschritte sehr zügig erfolgen. Nach Resuspension werden Kryogefäße (Nalgene) mit je 1 ml Zellsuspension befüllt und in einer Einfrierhilfe (Mr. Frosty, Nalgene) für zwei Tage bei -80°C aufbewahrt. Im Gegensatz zum Auftauen muss die Kühlrate beim Einfriervorgang mit etwa $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sehr gering gehalten werden, um Schäden an den Zellen durch plötzliche Kristallisierungsprozesse zu vermeiden. Falls die Zellen länger als einen Monat gelagert werden sollen, empfiehlt sich die Verwendung eines Flüssigstickstofftanks.

Zur Vergleichbarkeit von Experimenten ist eine Kenntnis der Menge an eingesetzten Zellen hilfreich. Um die in einer Suspension enthaltenen Zellen quantifizieren zu können, werden Zellzählkammern, sogenannte Hämocytometer, eingesetzt. Der Aufbau und die Funktionsweise der Neubauer-Zählkammer (Neubauer-Improved T 729.1 Marienfeld, Roth) ist in Abbildung 3.7 demonstriert.

Die Kammer besteht aus einer Glasplatte, in die in Rasterform definierte Vertiefungen eingebracht sind. Durch Aufbringen eines Deckgläschens im korrekten Abstand, welcher durch die Sichtbarkeit von Newtonschen Ringen sichergestellt ist, besitzen die daraus erhaltenen Zählbereiche bekannte Volumina. $10\ \mu\text{l}$ der trypsinierten Zellsuspension werden in bekannter Verdünnung zwischen Glasplatte und Deckglas gegeben. Das Zählgitter enthält vier Großquadrate mit einer Fläche von jeweils $1\ \text{mm}^2$. Zur besseren Übersicht ist jedes dieser Quadrate in weitere 4×4 Quadrate eingeteilt, entlang derer die Zählung erfolgt. Nach Bestimmung der jeweils in einem Großquadrat vorhandenen Zellanzahl mit Hilfe eines Mikroskopes (Olympus BX41) wird der Mittelwert \bar{N} über die vier Großquadrate gebildet. Die Konzentration der Zellsuspension c_{Zellen} in Zellen/ μl wird gemäß

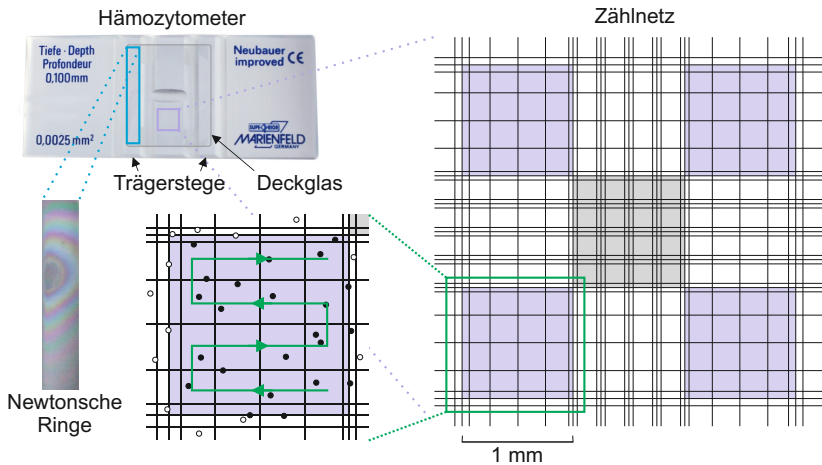


Abbildung 3.7: Prinzip und Aufbau eines Neubauer Improved-Hämozytometers. Die violett hinterlegten Bereiche entsprechen den vier Großquadranten, die zur Leukozytenzählung verwendet werden. Der grau hinterlegte Bereich dient der Erythrozytenzählung und kann hier vernachlässigt werden. Die Zellzählung entlang der grünen Markierung erfolgt unter Ausschluss von Doppelzählungen einzelner Zellen, die auf einer Trennlinie liegen (weiße Zellen). Das definierte Kammervolumen ergibt sich bei korrektem Abstand zwischen Deckglas und Trägerstege, welcher durch das Auftreten Newtonscher Ringe sichergestellt ist.

$$c_{\text{Zellen}} = \frac{\bar{N}}{a \cdot d \cdot f} \quad (3.1)$$

mit $a = 1 \text{ mm}^2$ als Fläche des Großquadrates, $d = 0.1 \text{ mm}$ als Kammertiefe und dem Verdünnungsfaktor f erhalten. Die kleineren Gruppenquadrate sind zur Zählung von Erythrozyten bestimmt und können hier unbeachtet bleiben.

Der Anteil lebendiger Zellen in einer Suspension kann in der Neubauer-Zählkammer durch eine Vitalfärbung mit Trypanblau ermittelt werden. Dazu werden $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension mit $100 \mu\text{l}$ einer 0.4% -igen Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich) gemischt und in die Zählkammer gebracht. Da der Farbstoff nur von toten Zellen aufgenommen wird, entsteht im Mikroskopbild ein Kontrastunterschied zwischen dunklen, toten Zellen und hellen, lebendigen Zellen.

3.3.4 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Untersuchungen zur Zytotoxizität von ssDNA-SWNT-Konjugaten gegenüber HeLa-Zellen werden mit dem CellTiter-Blue[®]- sowie dem WST-8-Assay durchgeführt. Beide Assays erlauben eine kolorimetrische Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen mit Hilfe eines Farbindikators.

Der CellTiter-Blue[®]-Assay beruht auf der Redoxsensitivität von Resazurin, auch bekannt unter dem kommerziellen Namen Alamar Blue[®]. Bei Anwesenheit aktiver Zellen kommt es zu dessen reduktiver Umwandlung in das fluoreszierende Resorufin. Der Farbumschlag von dunkelblau (Resazurin) nach pink (Resorufin) lässt sich absorptionsspektrometrisch verfolgen. Während Resazurin intrinsisch eine vernachlässigbare Fluoreszenz besitzt, zeigt die reduzierte Form eine starke Emission mit geringer Stokes-Verschiebung. Obwohl sowohl Absorptions- als auch Emissionsverhalten des Indikatorsystems die Kriterien zur Analysierbarkeit von Zytotoxizität erfüllen, wird die Verwendung des letzteren aufgrund einer höheren Sensitivität und einfacheren Datenauswertung empfohlen. In Abbildung 3.8 wird der Farbumschlag che-

misch als auch photophysikalisch charakterisiert.

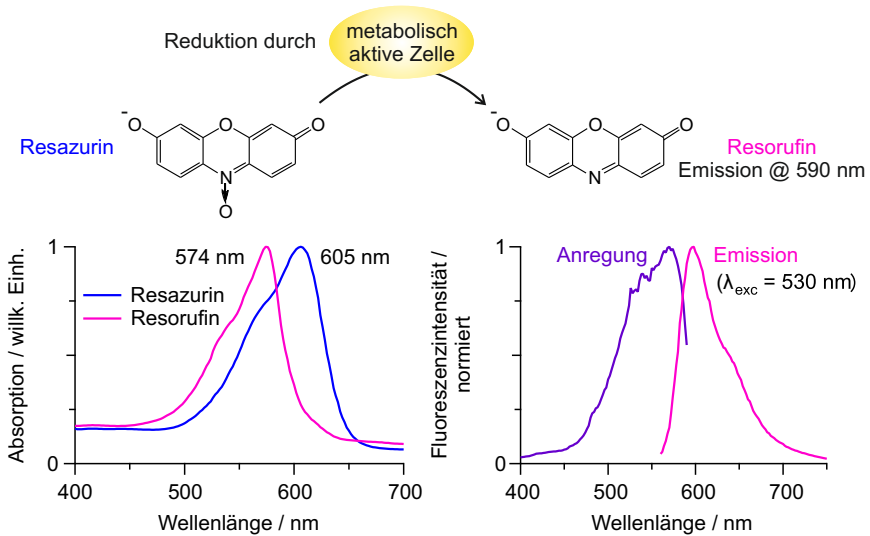


Abbildung 3.8: Bestimmung der Zytotoxizität nach dem CellTiter-Blue[®]-Assay. Bei aktivem Zellmetabolismus wird Resazurin zu Resorufin reduziert. Es findet ein Farbumschlag von blau nach pink statt, der sich zwar absorptionsspektrometrisch quantifizieren lässt, allerdings wird aufgrund der höheren Sensitivität eine Auswertung unter Ausnutzung der charakteristischen Resorufin-Fluoreszenz empfohlen. Anregungs- und Emissionsspektrum des fluoreszierenden Resazurins sind gegeneinander Stokes-verschoben.

WST-8 bezeichnet das wasserlösliche Tetrazoliumsalz (*engl.* water soluble tetrazolium salt) (2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium). Auch hier wird die mikrobielle Aktivität des Zellmetabolismus kolorimetrisch quantifiziert. Der Farbindikator WST-8 lässt sich reduktiv in das Formazan-Derivat umwandeln. Dazu benötigt es den Zusatz eines Elektronenüberträgers, welcher zwischen dem mitochondrialen Energiesystem NAD(P)H und dem Farbstoff WST-8 vermittelt. Das Absorptionsverhalten verändert sich wie in Abbildung 3.9 unterhalb des Redoxmechanismus gezeigt. Ein Farbumschlag des Indikators erfolgt bei einem aktiven Metabolismus der Zellen von gelb (WST-8) nach orange (WST-8 Formazan).

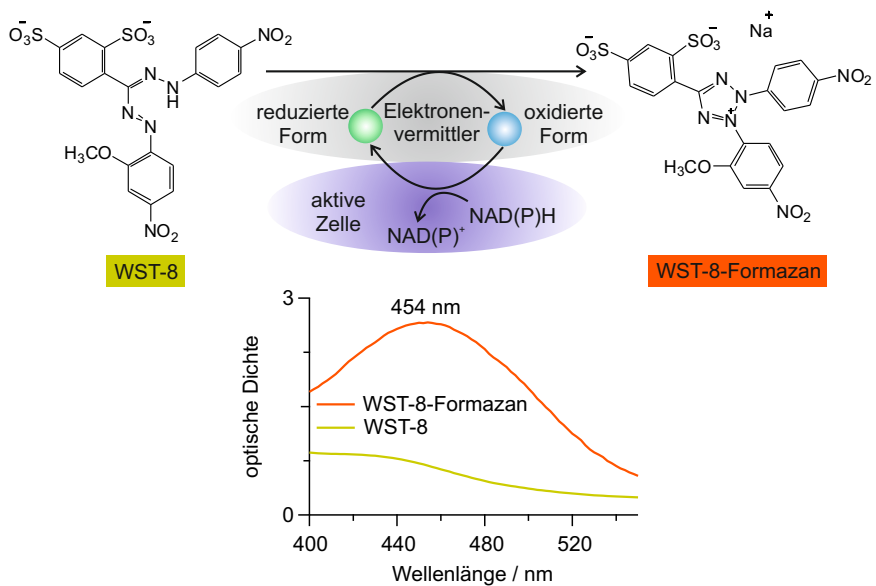


Abbildung 3.9: Bestimmung der Zytotoxizität nach dem WST-8-Assay. Die Oxidation des wasserlöslichen Tetrazoliumsalses zum entsprechenden Formazan und des Energiesystems NAD(P)H in aktiven Zellen wird über einen Elektronenvermittler gekuppelt. Der charakteristische Farbumschlag von gelb nach orange wird zur absorptionsspektrometrischen Quantifizierung des Anteils lebendiger Zellen genutzt.

Die Durchführung der Zytotoxizitätsassays erfolgt in transparenten 96-Loch-Mikrotiterplatten mit flachem Boden (Typ 655180 Cellstar[®], Greiner bio-one). Die Zellen werden dort zunächst in definierter Anzahl ausgesät. Pro Vertiefung werden typischerweise etwa 2×10^4 Zellen in 100 μl eingesetzt, die nach 8 h vollständig adhären sind. Zur Inkubation müssen jeweils identische Volumina der zu untersuchenden Lösungen durch sauberes Pipettieren zugegeben werden, um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen zu gewährleisten. Nach sanfter Durchmischung der Ansätze werden die Mikrotiterplatten 18 h unter Zellkulturbedingungen im Inkubator aufbewahrt. Nach Ablauf der gewählten Inkubationsdauer werden die Farbindikatoren gemäß Herstellerempfehlung zugegeben. Für den CellTiter-Blue[®]-Assay werden 20 μl Alamar Blue[®]-Lösung (Promega) verwendet. Beim WST-8-Zytotoxizitätsprotokoll wird das Indikatorpulver zunächst mit der im Set (Cayman Chemical) enthaltenen Elektronenmittler-Lösung gemischt und jeweils 10 μl davon in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. In beiden Assays ist ein vollständiger Farbumschlag nach zweistündiger Inkubation erreicht.

Die kolorimetrische Messung erfolgt am Elisa-Plattenleser (InfiniTe[®] 200, Tecan) der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Engstler im Institut für Zellbiologie. Je nach Betriebsmodus kann das Absorptions- oder Emissionsverhalten untersucht werden. Absorptionsmessungen werden für beide Zytotoxizitätsprotokolle durchgeführt. Für den WST-8-Assay wird die Absorbanz bei 450 nm gemessen. Der CellTiter-Blue[®]-Assay sieht den Vergleich der Absorption von oxidiert und reduzierter Form des Farbindikators vor. Daher werden Messungen bei 550 nm und 600 nm parallel durchgeführt. Eine typische Normierung der Absorptionsmessergebnisse auf die Wasserbande im Infrarotbereich zur Korrektur von Pipettierungenauigkeiten kann aufgrund des photophysikalischen Verhaltens von SWNTs im Nahinfrarotbereich nicht durchgeführt werden. Die Fluoreszenz nach CellTiter-Blue[®] erfolgt mit einer Anregung bei 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 600 nm und wird auf der Bodenseite der Mikrotiterplatte detektiert.

Damit eine Zytotoxizitätsuntersuchung eine Aussagekraft besitzt, ist die Durchführung diverser Kontrollexperimente unerlässlich. Dazu zählen neben Wachstums-, Verbindungs- und Positivkontrollen auch die Messung

des intrinsischen Hintergrundsignals. Die Anzahl an eingesetzten Zellen ist ebenso äquivalent zu den Ansätzen mit den Testsubstanzen wie das Gesamtvolumen. Die Wachstumskontrolle besteht aus Zellen und Medium. Bei exakter Durchführung resultiert hier eine maximale Anzahl lebendiger Zellen, welche zur Normierung bekannt sein muss. Falls die hier zu untersuchenden ssDNA-SWNTs dazu in der Lage sind, mit dem Farbindikator chemische Reaktionen einzugehen, ist der Assay für dieses Testsystem ungeeignet, da Ergebnisse falsch-negativ interpretiert werden. Um das auszuschließen, wird eine Verbindungskontrolle angesetzt, bei der lediglich die Testsubstanz in Medium bei Abwesenheit von Zellen untersucht wird. Die Positivkontrolle dient dem Beweis, dass der verwendete Assay sensitiv für eine Unterscheidung zwischen lebendigen und toten Zellen ist. Daher werden die Zellen in diesem Ansatz durch den Zusatz von 70%-igem Ethanol gezielt abgetötet. Für die Aussagekraft des Zytotoxizitätsassays muss sich diese Messung deutlich von der Wachstumskontrolle unterscheiden. Der Ansatz zur Korrektur des Hintergrundsignals wird analog zur Verbindungskontrolle ohne Zellen, dafür aber mit Medium durchgeführt. Der erhaltene Wert muss vor der Normierung auf das Zellwachstum von sämtlichen Messungen subtrahiert werden. Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die Kontrollexperimente und deren jeweiligen Zusammensetzung.

Kontroll- experiment	Zusammensetzung			Zweck des Kontrollexperimentes
	Zellen	Medium	Sonstiges	
Wachstums- kontrolle	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	theoretisch maximale Anzahl lebender Zellen
Verbindungs- kontrolle	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	SWNTs	Ausschließen einer Verfälschung des Ergebnisses durch die Verbindung
Positiv- kontrolle	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ethanol	Beweis für Unterscheidbarkeit tot - lebendig
Hintergrund	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	Korrektur des Hintergrundsignals

Tabelle 3.4: Übersicht der in einer Zytotoxizitätsuntersuchung notwendigen Kontrollexperimente.

Alle Ansätze werden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Zur Auswertung werden Mittelwerte der Triplikatmessungen gebildet und für die jeweilige Messreihe nach Hintergrundsubtraktion auf den mittleren Wert der Wachstumskontrolle normiert. Die Fehlerbalken werden aus der Abweichung innerhalb eines Triplikats gebildet.

3.3.5 Konfokale Mikroskopie

Im Institut für Mikrobiologie der Universität Würzburg können HeLa-Zellen sehr exakt mikroskopisch untersucht werden. Das verwendete Mikroskop (Leica) erlaubt simultane konfokale Aufnahmen verschiedener Emissionswellenlängen im sichtbaren Bereich durch den Einsatz mehrerer Detektoren und Filterkombinationen. Die Nahinfrarotphotolumineszenz von Nanoröhren kann mit den siliziumbasierten Detektoren jedoch nicht gemessen werden, weshalb die Sichtbarmachung von SWNTs eine besondere Markierung mit Fluorophoren erfordert. Ein geeignetes System findet sich in der Verwendung von Cy3-markierten DNA-Strängen.^[84] Der pinkfarbene Cyaninfarbstoff emittiert bei 570 nm und kann somit problemlos im Mikroskop detektiert werden.

Für einfache Aufnahmen können lebendige Zellkulturen verwendet werden. Dazu werden sie in Lebendzellkammern (*engl.* chamber slides; LabTek® II, Typ 155409, Thermo Scientific Fisher) gezüchtet und je nach Experiment inkubiert. Die Mikroskopaufnahmen erfolgen bei Raumtemperatur, weshalb eine zügige Arbeitsweise vorteilhaft ist, da die Zellen nur bedingt außerhalb ihrer Kultivierungsbedingungen überleben. Weißlichtbilder lebendiger Zellen und die Cy3-Emission markierter ssDNA-SWNTs können dabei jedoch nicht konfokal aus derselben Ebene aufgenommen werden.

Eine Möglichkeit für ein konfokales Bild von Cy3-ssDNA-SWNTs zusammen mit Zellen besteht darin, bestimmte Kompartimente der Zellen mit spezifischen Fluorophoren zu färben. Da die typischen Zellfärbereagenzien toxisch sind, können keine lebendigen Kulturen markiert und anschließend mikroskopiert werden. Daher wählt man hierfür den Weg über die Fixierung von

Zellen, womit deren Zustand unveränderlich gemacht wird.

Vor der Fixierung müssen die Zellen zunächst auf Mikroskopierplättchen gezüchtet werden. Nach Trypsinierung wird die Zellsuspension in eine 12-Loch-Multischale (Hartenstein) gegeben, in die zuvor in jede Vertiefung ein autoklaviertes Plättchen (\varnothing 18 mm; Roth) gelegt wurde. Pro Loch werden 0.5 ml warmes Medium vorgelegt und 1 ml Zellsuspension durch sanftes Andrücken der Pipettenspitze auf das Glasplättchen zugegeben, so dass die Flüssigkeit auf dessen Oberseite bleibt und sich die Zellen nicht beidseitig anheften können. Nach vollständiger Adhäsion und Inkubation der Zellen entsprechend der Experimentplanung wird der Überstand entfernt und dreimal mit je 2 ml D-PBS gewaschen. Anschließend werden jeweils 1.5 ml 4 %-ige PFA-Lösung (4 % Paraformaldehyd in PBS) mit einer Einwirkzeit von 30 min bei Raumtemperatur zugegeben. Formaldehyd sorgt für eine Kreuzvernetzung von Proteinen im Zytoskelett der Zellen. In diesem Zustand können die Multischalen mit den fixierten Zellen für eine beliebige Dauer im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Haftfähigkeit der Zellen am Plättchen wird durch das Waschen mit kalzium- und magnesiumchloridhaltigem PBS verbessert. Um die geringe Fluoreszenz von PFA zu bleichen, werden die Vertiefungen im nächsten Waschschrift für 5 min mit einer 50 mM Ammoniumchloridlösung in PBS versetzt.

Die gewaschenen Zellen können nun in einer feuchten Kammer mit den gewünschten Farbstoffen inkubiert werden. Dazu wird Parafilm[®] flach auf ein nasses Papiertuch gelegt und 50 μ l Fluorophorlösung pro Mikroskopierplättchen einzeln aufgetropft. Mit der zellbedeckten Seite nach unten werden die Plättchen auf den Tropfen gelegt und 30 min unter Lichtausschluss gelagert. In dieser Arbeit werden die Farbstoffe Hoechst (invitrogen) für die Färbung des Zellkerns und Phalloidin 647 (invitrogen) zur Sichtbarmachung von Aktinfilamenten im Zytoskelett eingesetzt. Nach gründlicher Reinigung durch dreimaliges Waschen mit PBS, Eintauchen in Wasser und abschließendem Trockentupfen können die Mikroskopierplättchen mit der Zellseite auf einen Objektträger gelegt werden, auf welchen zuvor ein Tropfen des Eindeckmediums Mowiol (Roth) gegeben wurde. Vollständig unter Lichtausschluss getrocknet können die Plättchen auf dem Objektträger mit handelsüblichem Nagellack versiegelt werden. Die auf diese Weise fixierten

Zellen können als Dauerpräparat mit uneingeschränkter Haltbarkeit im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Bei der Wahl der Farbstoffe muss darauf geachtet werden, dass sie sich in ihrer Absorption und Fluoreszenz spektral voneinander unterscheiden. Für jeden eingesetzten Marker werden entsprechende Einstellungen zur Anregung und Detektion gewählt. Dabei muss beachtet werden, dass sich die Emissionsbereiche nicht überschneiden. Tabelle 3.5 gibt eine Übersicht der für mikroskopische Aufnahmen verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen der jeweiligen Fluorophore.

Fluorophor	λ_{exc} / nm	λ_{em} / nm
Hoechst	404	440
Phalloidin 647	633	670
Cy3	514	525

Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten Anregungs- (λ_{exc}) und Emissionswellenlängen (λ_{em}) für die Fluorophore Hoechst, Phalloidin 647 und Cy3.

Die Bilder werden mit 512 x 512 Pixeln und 95 μm Lochblende aufgenommen.

3.3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die spezifische Photolumineszenz von (6,5)-SWNTs kann ebenfalls in zell-mikroskopischen Untersuchungen betrachtet werden. Hierzu benötigt es ein entsprechendes Fluoreszenzmikroskop, welches neben Weißlichtbildern die Aufnahme von Emissionsbildern ermöglicht sowie spektrale Informationen liefert. Die zu untersuchende Zellprobe wird in einem XYZ-Nanopositioniersystem (P563.3CD, PI) im Epifluoreszenzmikroskop (Nikon Ti-U) platziert. Je nach Experiment kann zwischen einem 20x Objektiv (Nikon CFI S Plan Fluor ELWD) für Bildgebung und einem 100x Öl-Immersionsobjektiv (Nikon CFI Apo TIRF) mit einer maximalen numerischen Apertur von 1.49 zur Spektroskopie gewechselt werden. Die Photolumineszenz wird mit einem Spektrographen (SR 303i-B, Andor) und ei-

ner 1024 x 256 Pixel-Kamera (Newton DU-920N-BRD, Andor) unter Verwendung eines 980 ± 25 nm-Bandpassfilters (AHF Analystechnik) aufgezeichnet. Weißlicht- und Fluoreszenzbilder können durch Wechsel der Lichtquelle generiert werden. Für PL-Bilder werden (6,5)-SWNTs resonant mit einem 568 nm-Diodenlaser (Sapphire 568 LP, Coherent) angeregt. Weißlichtbilder von Zellen werden durch den Gebrauch einer Halogenmikroskoplampe (GE) erzeugt. Für zeitaufgelöste PL-Messungen wird eine Anregungswellenlänge von 570 nm mit einer Bandbreite von 20 nm eingesetzt, welche durch eine photonische Faser (SCG-800, Newport) erzeugt wird. Diese wird von einem 80 MHz-Ti:Saphir-Oszillator (Vitesse, Coherent) gepumpt. Zeitaufgelöste TCSPC-Messungen werden mit einer Lawinenphotodiode (PDM series, MDP) und TCSPC-Elektronik (HydraHarp 400, Picoquant) mit einer Binweite von 1 ps aufgezeichnet. Die Geräteantwortfunktion (IRF, *engl.* instrument response function) wird mit 980 nm-Licht der photonischen Faser, welche an einer Lösung von Polystyrolkugeln gestreut wird, gemessen. Das Verhältnis der Photon-Detektionsrate zur Repetitionsrate des Laserimpulses wird unter 0.01 gehalten. Um PL-Lebensdauern zu erhalten, wird eine Fitfunktion mit einer Faltung eines biexponentiellen Abklingens und der zuvor aufgenommenen IRF an die Daten angepasst.

Der Aufbau des verwendeten Fluoreszenzmikroskops erfolgte im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation, an welcher Stelle die Vorgehensweise sehr ausführlich beschrieben wird.^[23]

Die Präparation der Zellproben kann nicht wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben durch Versiegelung von fixierten Zellen erfolgen, da in den Dauerpräparaten eine störende Autofluoreszenz auftritt, deren Intensität höher als das eigentliche Messsignal ist. Dennoch können die Zellen zum Erhalt ihres Zustandes mit PFA fixiert werden. Durch Zugabe von PBS werden sie in nicht-geschlossenen Systemen zudem vor dem Austrocknen geschützt. Beim Einsatz von Lebendzellkammern müssen LabTek® II-Systeme verwendet werden, da die in standardmäßigen Systemen integrierten Glasplättchen am Kammerboden ebenfalls autofluoreszieren. Die Verwendung des 100x Objektivs erfordert spezielle Mikroskopierplättchen der Stärke 0 (Roth). Dazu werden die HeLa-Zellen bereits auf autoklavierten Plättchen kultiviert. Um die Fläche

des Zellrasen zur einfacheren Handhabung einzuschränken, grenzen zuvor desinfizierte Abstandshalter den Bereich auf eine Größe von etwa 1 cm^2 ein. Auch hier schließt an die Inkubation mit SWNTs das dreimalige Waschen mit D-PBS sowie eine Fixierung der Zellen durch PFA an. PBS soll erneut die Zellproben während der Messungen vor dem Austrocknen schützen.

3.4 DNA-Funktionalisierung

Die Funktionalisierung von SWNTs erfolgt in dieser Dissertation über das Dispergieradditiv DNA. Während die gewählten Syntheserouten in Kapitel 4 detailliert vorgestellt werden, soll hier zunächst auf die allgemeinen Methoden zur Präparation und Charakterisierung eingegangen werden.

3.4.1 Materialien

Als SWNT-Ausgangsmaterial werden durch DGU gereinigte, (6,5)-angereicherte Proben gemäß Kapitel 3.1 verwendet. Zur Dispergierung werden dabei je nach Experiment d-(GT)₁₆-Oligomere ohne Modifikation oder mit externer Thiolgruppe in Form eines C₆-SH-Terminus eingesetzt.

Eine Sulphydrylierung primärer Aminogruppen in der Purinbase Guanin der unmodifizierten ssDNA wird durch Reaktion mit 2-Iminothiolan-Hydrochlorid, auch bekannt als Trauts-Reagenz (Pierce Biotechnology Inc.), unter Zusatz von EDTA (Ethylendiamintetraacetat) entsprechend Abbildung 3.10 erprobt.

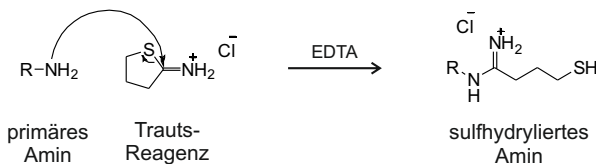


Abbildung 3.10: Sulphydrylierung von primären Aminogruppen mit dem Trauts-Reagenz.

Der Nachweis freier Thiolgruppen kann über den Ellman-Test erfolgen. Dazu

kommen eine Lösung mit 2 mM DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure); Sigma-Aldrich) und 50 mM Natriumacetat sowie ein 1 M TRIS-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), der mit 38 %-iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 8 eingestellt wird, zum Einsatz. Die Farbreaktion des bei Vorhandensein freier Thiolgruppen unter Aufbrechen der Disulfidbindung in DTNB entstehenden Anions NTB^- (2-Nitro-5-thiobenzoat) gemäß Abbildung 3.11 lässt sich absorptionspektrometrisch quantifizieren.

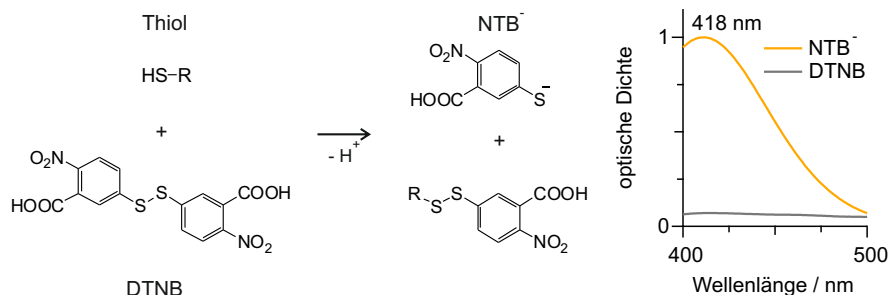


Abbildung 3.11: Ellman-Test zum Nachweis freier Thiole. Das entstehende Anion NTB^- weist im Gegensatz zum farblosen DTNB eine starke Gelbfärbung auf.

Modifizierte DNA-Oligomere mit einer Thiolgruppe am 5'-Terminus können direkt oder nach Dispergierung von SWNTs zur Kupplung mit einem Agens eingesetzt werden. Anstatt eines Wirkstoffs wird mit einem Fluorophor als Modellverbindung gearbeitet, da sich der Erfolg der Funktionalisierung sehr einfach fluoreszenzspektroskopisch nachweisen und quantifizieren lässt. Als Farbstoffe werden in dieser Arbeit zum einen *N*-(6-Aminoethyl)-5-(dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamid (*N*-Dansyl-1,6-hexandiamin), eine Dansylverbindung aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. h.c. G. Bringmann im Institut für Organische Chemie, zum anderen ein kommerzielles System, 2-Aminoakridon (*engl.* 2-aminoacridone, AMAC; Fluka), getestet. Die entscheidende funktionelle Gemeinsamkeit der beiden in Abbildung 3.12 gezeigten Agenzien liegt in der primären Aminogruppe.

Die Kupplungsreaktion zwischen Fluorophor und DNA-Strang erfolgt selektiv über den heterobifunktionellen Abstandshalter Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat; Fisher

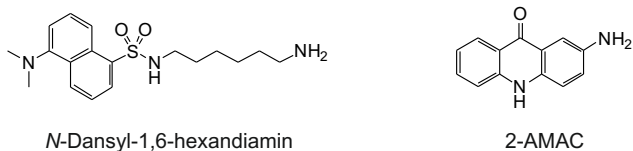


Abbildung 3.12: Fluorophorsysteme *N*-Dansyl-1,6-hexandiamin und 2-AMAC als Modellverbindung zur Kupplungsreaktion mit funktionalisierter DNA.

Scientific) aus Abbildung 3.13, der mit einem Sulfo-NHS-Ester für eine Reaktion mit primären Aminen im Fluorophor sowie einem Maleimidterminus zur Kupplung mit der Thiolgruppe der DNA ausgestattet ist. Zur Vermeidung von Disulfidbrücken zwischen funktionellen Thiolgruppen kommt das sanfte Reduktionsmittel TCEP · HCl (Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid; Thermo Scientific) zum Einsatz.

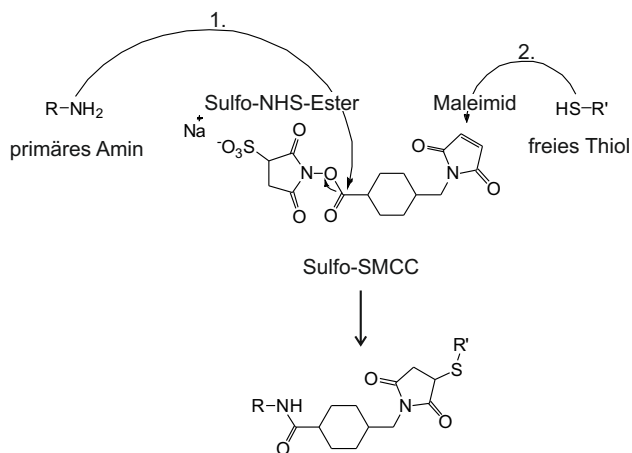


Abbildung 3.13: Kupplungsschema zur Funktionalisierung von DNA (\cong R') mit einem Agenz (\cong R).

Reagenzien, die in diesem Kapitel ohne Angabe eines Herstellers genannt sind, können direkt von der Chemikalienausgabe der Fakultät für Chemie und Pharmazie bezogen werden.

Sämtliche Reaktionsschritte werden bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Schüttlers (Thermomixer comfort 1.5 ml, Eppendorf) mit 400 rpm durchgeführt. Eine Reinigung der Reaktionsgemische lässt sich bei Anwesenheit von SWNTs durch Zentrifugenfiltration erzielen. Hier wird das Microcon[®]-Filtersystem gemäß Abbildung 3.3 eingesetzt. DNA-Stränge lassen sich nach Sulphydrylierung durch die Verwendung von Gelsäulen (NAP-5, GE Healthcare) größenausschlusschromatographisch aufreinigen.

3.4.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Charakterisierung einer erfolgreichen Funktionalisierung kann durch Messungen am Fluoreszenzspektrometer (FP-6300, Jasco) erfolgen. Anregungs- und Emissionwellenlängen lassen sich im Bereich zwischen 220 nm und 750 nm variieren. Beide Farbstoffsysteme können mit 400 nm angeregt werden. Das Wellenlängenintervall liegt bei 0.5 nm mit einer Integrationsdauer von 0.3 s/nm. Die Detektorempfindlichkeit wird je nach Intensität der Probenfluoreszenz über die Beschleunigungsspannung des Photoelektronenvervielfachers (PMT, *engl.* photomultiplier tube) geregelt. Für eine Quantifizierung müssen jeweils identische PMT-Einstellungen bei allen zugehörigen Messungen gewählt werden.

Das Fluoreszenzspektrometer lässt sich auch für die Detektion anderer in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore einsetzen. Dazu zählen Cy3-Marker aus Kapitel 3.3.5 und 6-FAM. Die Anregungswellenlänge liegt hier bei 450 nm für Cy3 bzw. 470 nm für 6-FAM.

3.4.3 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen

TCSPC-Messungen können anstelle von SWNTs auch an Fluorophoren durchgeführt werden. Der Messaufbau unterscheidet sich zu dem aus Kapitel 3.3.6 in der Verwendung eines Lasersystems mit einer Repetitionsrate von 250 kHz (Coherent).

Die Frequenz des Lichtimpulses der Wellenlänge 800 nm aus dem 80 MHz Ti:Saphir-Oszillator wird durch einen regenerativen Verstärker (RegA) auf

250 kHz herabgesetzt und durch einen β -Bariumborat-Kristall in einem optisch-parametrischen Verstärker (OPA 9450) frequenzverdoppelt. Die resultierenden 400 nm-Laserimpulse mit einer Frequenz von 250 kHz wird zur Anregung der Fluorophore genutzt. Die PL-Photonen werden bei einer Wellenlänge von 500 nm ebenfalls von der Lawinenphotodiode aufgezeichnet. Die Geräteantwortfunktion wird entsprechend bei dieser Wellenlänge aufgenommen.

4 Biokompatibilität von DNA-Kohlenstoffnanorohr- Konjugaten

Bevor Kohlenstoffnanoröhren für medizinische Fragestellungen in Betracht gezogen werden können, muss deren Beeinflussung durch biologische Systeme untersucht und die Verträglichkeit gegenüber Zellen sichergestellt sein. Ein Projekt dieser Dissertation umfasst die Validierung der Biokompatibilität von individualisierten ssDNA-SWNT-Konjugaten.

4.1 Motivation und Aufgabenstellung

Das Potenzial von SWNTs für biomedizinische Anwendungen wird seit Jahren diskutiert und rührt von den vielversprechenden Eigenschaften hinsichtlich der einmaligen Struktur und optischen Charakteristika.^[15,16] Ihre Fähigkeit zur Zellpenetration lässt Nanoröhren zu einem interessanten Werkzeug für den gezielten Wirkstofftransport oder zur Zellmarkierung werden. Zunächst muss jedoch das Augenmerk auf deren Bioverträglichkeit gerichtet werden, welche von medizinischen Transport- und Markierungssystemen kategorisch gefordert wird.

Kritische Stimmen befürchten zytotoxische Auswirkungen, welche in einigen Studien bereits an verschiedenen SWNT-Systemen belegt wurden.^[69-71] Uneinigkeit über das Vorliegen und Ausmaß möglicher schädlicher Effekte herrscht aufgrund der enormen Bandbreite an Präparationsmöglichkeiten, welche SWNT-Konjugate unterschiedlichster Qualität hinsichtlich Aggrega-

tion und Verunreinigungen liefern. Da weder zur Präparation von SWNT-Proben noch zu deren Zytotoxizitätsstudien Standardprotokolle existieren, ist eine individuelle Untersuchung der jeweiligen SWNT-Konjugate auf mögliche toxische Effekte unumgänglich.

Die vorherrschende Problematik, die im Umgang mit SWNT-Proben liegt, besteht in der Tendenz zur Aggregatbildung des hydrophoben Kohlenstoffmaterials.^[60] Es gilt zu untersuchen, welchen Einfluss biologische Umgebungen auf das Aggregationsverhalten von SWNTs nehmen. Interessant sind dabei Wechselwirkungen zwischen ssDNA-SWNT-Konjugaten und Biomolekülen wie Proteinen oder Enzymen. Eine mögliche Gefahr, die bei deren Kontakt mit den Konjugatproben entstehen kann, liegt in der Zerstörung der strukturellen Integrität von ssDNA-SWNTs. Werden DNA-Stränge beispielsweise durch Nukleasen enzymatisch gespalten, stehen sie einer Dispergierung der Nanoröhren nur noch unzureichend zur Verfügung. Als Folge können SWNTs nicht mehr durch π - π -Wechselwirkungen mit ssDNA stabilisiert werden und neigen zur Aggregation. Treten solche Effekte in Zellen auf, so können sich hydrophobe SWNTs in großen Bündeln anreichern und das biologische System stark gefährden. Ein grundlegendes Verständnis des Einflusses von Kohlenstoffnanoröhren auf zelluläre Einheiten kann daher bereits auf elementare Untersuchungen der SWNT-Wechselwirkungen mit Biomolekülen gestützt werden.

In der Literatur sind derartige Untersuchungen teilweise bereits für Systeme bekannt, bei denen jedoch keine spezielle Aufreinigung der SWNT-Proben durchgeführt wurde. In dieser Arbeit sollen somit bestehende Kenntnisse um Biokompatibilitätsstudien mit vereinzelt ssDNA-SWNTs erweitert werden. Die Besonderheit liegt dabei in der sorgfältigen Individualisierung der Konjugate durch die Methode der Dichtegradientenultrazentrifugation, welche eine Beurteilung der Stabilität aufgrund möglicher Aggregatbildung nach Veränderung der Umgebung erlaubt. Liegt die Probe hingegen wie in den Referenzstudien schon vor Beginn der Untersuchung in Bündelform vor, so ist das Ausmaß des Umgebungseinflusses auf das Aggregationsverhalten nur schwer auszumachen.

Die Stabilität der Konjugate wird hierbei unter physiologischen Bedingungen

auf die Probe gestellt. Dazu zählen neben enzymatischer und proteinreicher Umgebung auch die Variation des pH-Bereiches, welcher in verschiedenen Zellkompartimenten ebenfalls einer gewissen Bandbreite unterliegt.^[51] Als Indikator für die Konjugatstabilität von ssDNA-SWNTs können hierbei das Absorptionsverhalten und die charakteristische Photolumineszenz von Kohlenstoffnanoröhren herangezogen werden, die das Vorliegen oder Ausbleiben von Aggregation erkennen lassen.

Einfache Zytotoxizitätsuntersuchungen von ssDNA-SWNT-Konjugaten werden zunächst an Mausmakrophagen J774.1 durchgeführt. In weiteren ausführlichen Studien zur Zytotoxizität wird darüber hinaus ein direkter Vergleich von Konjugaten unterschiedlicher Qualität gegeben. Individualisierte Nanorohrkongjugate werden dabei ebenso wie ssDNA-SWNT-Material verschiedener Aggregationsgrade Zytotoxizitätsuntersuchungen unter Verwendung der menschlichen Epithelzelllinie HeLa unterworfen.

4.2 Experimente

Experimentelle Untersuchungen zur Biostabilität und Zytotoxizität von Nanoröhren beruhen auf individualisierten ssDNA-SWNT-Konjugaten, welche gemäß Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 mittels Dichtegradientenultrazentrifugation präpariert wurden. Sämtliche Experimente werden mit unmarkierten d-(GT)₁₆-Oligomersträngen als Dispergieradditiv durchgeführt. Die Reinheit der (6,5)-Chiralität und eine vollständige Individualisierung der ssDNA-SWNT-Strukturen wird absorptionspektrometrisch verifiziert. Bei Notwendigkeit steriler Proben nach Kapitel 3.1.4 wird deren Verwendung an gegebener Stelle explizit vermerkt.

4.2.1 Enzym

Erste Stabilitätsreihen umfassen ssDNA-SWNTs in enzymatischer sowie proteinreicher Umgebung. Als Enzym wird die Nuklease DNase I (Sigma Aldrich) verwendet, welche mit einer Menge von 18 U in einem enormen Überschuss zu den Konjugaten gegeben wird, wobei die Zugabe von 10 % eines

im DNase I-Set enthaltenen Reaktionspuffers (RB, *engl.* reaction buffer) benötigt wird. 1 U (*engl.* unit) beschreibt dabei definitionsgemäß die Menge an Enzym, die zum Umsatz von 10 µg Substanz in 1 min benötigt ist.^[85] 144 µl einer sterilen ssDNA-SWNT-Suspension werden für jedes Experiment benötigt. Die Inkubation erfolgt für 24 h im Thermomixer bei 37 °C und 400 rpm. Als Referenz dient ein Ansatz, bei dem anstelle der DNase I Phosphatpuffer in identischem Volumen zugegeben und analog inkubiert wird. Eine weitere Vergleichsprobe wird für das Startspektrum angesetzt, wobei hier auf eine Inkubation verzichtet wird. Tabelle 4.1 zeigt die Zusammensetzungen der einzelnen Ansätze, wobei das Gesamtvolumen zur Vergleichbarkeit der Proben immer 180 µl beträgt. Die Konzentration der reinen Enzymlösung liegt bei 1 U/µl.

Ansatz	Zusammensetzung				Inkubationsdauer
	SWNTs	DNase I	RB	PBS	
DNase I-Probe	144 µl	18 µl	18 µl	×	24 h
Referenz	144 µl	×	18 µl	18 µl	24 h
Startprobe	144 µl	×	18 µl	18 µl	0 h

Tabelle 4.1: Ansätze für die Untersuchung der ssDNA-SWNT-Stabilität gegenüber DNase I.

Um die Bedingungen während der Absorptions- und PL-Messungen für sämtliche Ansätze identisch zu halten, werden alle Proben nach Ablauf der Inkubationsdauer eingefroren und unmittelbar vor dem Vermessen zügig aufgetaut. Die Nuklease entfaltet ihre enzymatische Aktivität bei einer Temperatur von 37 °C und kann durch Einfrieren komplett gehemmt werden. Die Verwendung steriler Proben ist notwendig, um weder die Wirksamkeit des Enzyms zu beeinträchtigen, noch das Ergebnis durch Einführen weiterer in nicht-sterilen Proben enthaltenen Nukleasen zu verfälschen. Zur Korrektur des Hintergrunds kann das Spektrum von reinem PBS genutzt werden.

Versuche zum enzymatischen Restriktionsverdau bedürfen generell einer Kontrolle der Nukleaseaktivität. Für den Fall, dass das Enzym unter den

gewählten Bedingungen nicht wirken kann, sind die Experimente unbrauchbar. Da die zum Testen von Enzymaktivitäten standardmäßig eingesetzte Methode der Gelelektrophorese mit anschließender Färbung für Einzelstrang-DNA nicht zur Verfügung steht, wird ein Ausweichexperiment gewählt, bei dem doppeltmarkierte ssDNA zum Einsatz kommt. Das Oligomer 5'-(6-FAM)-(GT)₇-GT(DDQI)-(GT)₈-3' ist mit dem Fluorophor 6-FAM sowie einem zugehörigen internen Fluoreszenzlöcher DDQI derivatisiert. Im Kontrollexperiment zur Überprüfung der DNase I-Aktivität werden 10 µl der 110.7 µM Oligomerlösung mit 10 µl DNase I der Konzentration 1 U/µl und 15 µl Reaktionspuffer mit 115 µl PBS steril gemischt. Als Referenz wird in einem zweiten Ansatz mit identischem Volumen das Enzym durch weitere 15 µl PBS ersetzt. In Tabelle 4.2 werden die Bestandteile der beiden Ansätze zusammengefasst.

Ansatz	Zusammensetzung				Inkubationsdauer
	DNA	DNase I	RB	PBS	
DNase I-Kontrolle	10 µl	10 µl	15 µl	115 µl	1 h bis 72 h
Referenz	10 µl	×	15 µl	125 µl	1 h bis 72 h

Tabelle 4.2: Ansätze zur Kontrolle der DNase I-Aktivität.

Die Proben werden bei 37 °C und 400 rpm im Thermomixer geschüttelt. Nach Ablauf unterschiedlicher Inkubationsdauern im zeitlichen Rahmen von 1 h bis 72 h wird die Fluoreszenz des 6-FAM-Farbstoffs gemessen und deren Intensität beim Ansatz mit DNase I im Vergleich zur jeweiligen Referenz betrachtet. Für jeden Zeitpunkt wird ein frischer Ansatz verwendet, da nach Fluoreszenzmessung die Sterilität der Probe nicht mehr gewährleistet ist.

4.2.2 Proteinmischung

Die Versuchsreihe zur Untersuchung der Konjugatstabilität gegenüber Proteinen wird in analoger Weise durchgeführt. Dazu wird das im Zellkulturmedium enthaltene fötale Kälberserum FBS eingesetzt, welches als Mischung verschiedener Proteine beschrieben wird und darüber hinaus Nukleasen beinhaltet.^[86] Auch hier werden jeweils 144 µl der sterilen ssDNA-SWNT-

Dispersion zur Inkubation mit 18 μl Puffer und 18 μl FBS versetzt, was im Gesamtvolumen eine Serumkonzentration von 10% bedeutet. Damit wird der Proteingehalt in etwa dem innerhalb eines Zellkulturmediums nachgestellt, wobei auch hier auf eine vorangegangene Hitzeinaktivierung von FBS gemäß Kapitel 3.3.3 nicht verzichtet wird. Es werden Inkubationsdauern von 24 h und 72 h gewählt sowie eine Startprobe angesetzt, die unmittelbar nach Mischung eingefroren wird. Als Referenz wird ein weiterer Ansatz ohne FBS für 72 h inkubiert. Da Proben mit FBS bei bereits geringfügiger Kontamination sehr stark zur Trübung neigen, werden zur Kontrolle des Hintergrundsignales 10%-ige FBS-Lösungen in PBS ohne SWNTs angesetzt und entsprechend inkubiert. Zur besseren Übersicht werden die durchgeführten Experimente in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Ansatz	Zusammensetzung			Inkubationsdauer
	SWNTs	FBS	PBS	
FBS-Probe nach 72 h	144 μl	18 μl	18 μl	72 h
FBS-Probe nach 24 h	144 μl	18 μl	18 μl	24 h
Startprobe	144 μl	18 μl	18 μl	0 h
Referenz	144 μl	×	36 μl	72 h
Hintergrund nach 72 h	×	18 μl	162 μl	72 h
Hintergrund nach 24 h	×	18 μl	162 μl	24 h
Hintergrund nach 0 h	×	18 μl	162 μl	0 h

Tabelle 4.3: Ansätze für die Untersuchung der ssDNA-SWNT-Stabilität gegenüber FBS.

Auch hier werden mögliche Reaktionen nach beendeter Inkubation durch Einfrieren aller Proben unterbunden. Die Sterilität der SWNT-Proben ist notwendig, um eine durch Bakterienbefall entstehende starke Trübung zu verhindern, welche eine Analyse der Daten unmöglich macht. Die Ansätze werden durch ihre Absorption und Photolumineszenz charakterisiert.

4.2.3 pH-Reihen

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität von ssDNA-SWNT-Konjugaten wird in mehreren Versuchsreihen erfasst. Ausgangspunkt sind auch hier jeweils individualisierte SWNT-Proben, welche zunächst am PBS-typischen pH-Wert von 7.4 vorliegen. Um die gesamte pH-Skala abzudecken, muss jeweils eine Titrationsserie sowohl für den sauren als auch für den basischen Bereich angefertigt werden. Zur Titration werden Salzsäure bzw. Natronlauge verwendet, die zunächst in einer Konzentration von 0.1 N für grobe pH-Sprünge zugegeben werden. Anschließend wird zu einer Konzentration von 1 N gewechselt, um in die Extrembereiche zu gelangen. Die zugegebenen Konzentrationen und Volumina wurden davor anhand einer Modelltitration mit reinem PBS optimiert und auf die ssDNA-SWNT-Testreihen heruntergerechnet. Das Startvolumen der beiden Versuchsansätze liegt bei jeweils 2.6 ml, so dass die pH-Elektrode (Hanna Instruments) komplett eintauchen kann. Die Elektrode wird durch Zwei-Punkt-Messung kalibriert. Das Titrationsprotokoll für die saure Testreihe wird in Tabelle 4.4 gezeigt.

pH	7.4	▶	6.8	▶	5.8	▶	3.2	▶	2.6	▶	2.0	▶	1.1	▶	0.5
0.1 N HCl	100 µl		100 µl		50 µl		50 µl		150 µl						
1 N HCl													100 µl	350 µl	

Tabelle 4.4: Titrationsprotokoll zur pH-Abhängigkeit im Sauren. Das Volumen der vorgelegten ssDNA-SWNT-Lösung mit pH 7.4 liegt bei 2.6 ml.

Nach jedem pH-Sprung wird ein Probenvolumen von 140 µl entnommen und zur Absorptionsmessung eingesetzt. Tabelle 4.5 steht analog für die Titrationsserie im Basischen.

pH	7.4	▶	8.6	▶	10.7	▶	11.3	▶	12.0	▶	12.5	▶	13.0
0.1 N NaOH	50 µl		50 µl		60 µl		270 µl						
1 N NaOH											60 µl	350 µl	

Tabelle 4.5: Titrationsprotokoll zur pH-Abhängigkeit im Basischen. Auch hier wird eine ssDNA-SWNT-Suspension mit pH 7.4 in einem Volumen von 2.6 ml vorgelegt.

Anhand der aufgezeichneten Absorptionsspektren können Einflüsse von Säuren und Laugen auf die Stabilität von ssDNA-SWNT-Konjugaten in pH-Abhängigkeit erkannt werden. Um darüber hinaus zu überprüfen, ob Vorgänge, die in den extremen pH-Regionen stattfinden, umkehrbar sind, wird eine mögliche Reversibilität in weiteren Ansätzen erprobt. Das Startvolumen der ssDNA-SWNT-Suspension beträgt jeweils 1.8 ml. Nachdem durch Zugabe von Salzsäure bzw. Natronlauge ein pH-Wert im stark Sauren bzw. stark Alkalischen eingestellt wird, wird die Probe neutralisiert und anschließend mit Ultraschall behandelt. Um eine starke Verdünnung durch Zugabe großer Volumina zu vermeiden, werden konzentrierte HCl- und NaOH-Lösungen in geringen Mengen eingesetzt. In den Tabellen 4.6 und 4.7 werden die Vorgehensweisen für die beiden Versuchsreihen zusammengefasst.

pH	7.4	➤	0.5	➤	6.5	➤	6.5
Behandlung	30 µl HCl		87.5 µl NaOH		Ultraschall		

Tabelle 4.6: Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Reversibilität von Effekten im Sauren. Das Startvolumen der ssDNA-SWNT-Lösung liegt bei 1.8 ml.

pH	7.4	➤	12.3	➤	6.5	➤	6.5
Behandlung	75 µl NaOH		21.5 µl HCl		Ultraschall		

Tabelle 4.7: Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Reversibilität von Vorgängen, die im Alkalischen stattfinden. Das Volumen der vorgelegten ssDNA-SWNT-Dispersion liegt bei 1.8 ml.

Auch hier werden jeweils 140 µl entnommen und einer Absorptions- sowie PL-Messung unterworfen.

4.2.4 Zytotoxizität gegenüber J774.1

Die Biokompatibilität der SWNT-Konjugate wird in Zytotoxizitätsuntersuchungen getestet. Erste Tests werden an der Makrophagen-ähnlichen Linie J774.1 mit dem Alamar Blue[®]-Assay durchgeführt. Der Umgang mit den Zellkulturen erfolgt wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben durch das Qualitätsma-

nagement des SFB 630 am Institut für Infektionsbiologie.

Die zu untersuchende ssDNA-SWNT-Suspension wird zunächst durch Zentrifugfiltration mit dem Microcon-System auf eine optische Dichte von 3.44 aufkonzentriert. Hierfür werden lediglich DGU-Fractionen mit individualisierten SWNTs eingesetzt. Die konzentrierte Dispersion wird seriell fünffach mit DMSO verdünnt. Jede Lösung der Verdünnungsreihe wird 1:90 mit Medium gemischt und als Duplikat gemäß dem Pipettierprotokoll aus Tabelle 4.8 in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Die Inkubation der Zellsuspension mit den Testlösungen liegt bei 18 h.

Ansatz	Zusammensetzung
Sterilkontrolle 1	180 µl 1. Verdünnung + 20 µl Medium
Sterilkontrolle 2	200 µl Medium mit 1 % DMSO
Leerprobe	180 µl Medium mit 1 % DMSO + 20 µl Zellsuspension
1. Verdünnung	180 µl 1. Verdünnung + 20 µl Zellsuspension
2. Verdünnung	180 µl 2. Verdünnung + 20 µl Zellsuspension
...	...
8. Verdünnung	180 µl 8. Verdünnung + 20 µl Zellsuspension

Tabelle 4.8: Pipettierprotokoll für den Alamar Blue®-Test mit den J774.1-Mausmakrophagen. Die Angabe der Verdünnung bezieht sich auf die Testsubstanz ssDNA-SWNT.

Bei dieser ersten Testreihe wurde die Sterilität in den SWNT-Probenpräparationsschritten im Gegensatz zu darauffolgenden Untersuchungen mit HeLa-Kulturen nicht beachtet.

4.2.5 Zytotoxizität gegenüber HeLa

Ausführliche Untersuchungen zur Zytotoxizität von SWNTs werden mit HeLa-Zellen durchgeführt. Hier wird auch der Einfluss der DGU-Probenpräparation auf mögliche toxische Effekte behandelt. Die Herstellung sämtlicher ssDNA-SWNT-Konjugate erfolgt unter strenger Sterilität. Indi-

vidualisierte Nanoröhren werden nach erfolgreicher Ultrazentrifugation im Dichtegradienten in den jeweiligen Fraktionen erhalten. Aggregierte ssDNA-SWNT-Bündel können ebenfalls nach DGU dem Zentrifugenröhrchen an entsprechender Position entnommen werden. Dazu werden Fraktionen aus der in Abbildung 4.1 gezeigten Lage im Zentrifugenrohr gesammelt. Als Vergleich dient dispergiertes ssDNA-SWNT-Rohmaterial, welches lediglich einer Ultraschallbehandlung unterzogen wird.

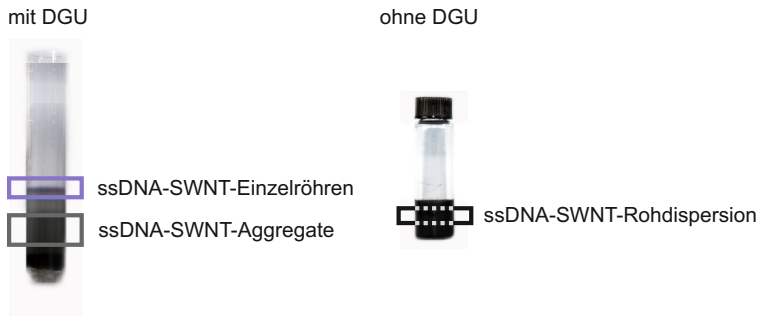


Abbildung 4.1: Unterschiedlich präparierte ssDNA-SWNT-Materialien für Zytotoxizitätsuntersuchungen mit HeLa-Zellen.

Der in Kapitel 2.1.2 vorgestellte Absorptionsquerschnitt kann genutzt werden, um Aussagen über den SWNT-Gehalt innerhalb einer Probe zu treffen.^[30] Allerdings bezieht sich der Wert auf individualisierte (6,5)-Einzelröhren und kann auf derart undefiniert aggregiertes Material nur bedingt angewendet werden. Die in einer Suspension vorhandene SWNT-Menge kann anhand der spektroskopischen Daten daher für Einzelröhren und Bündel bzw. Aggregate nicht exakt identisch eingestellt werden. Um dennoch vergleichbare SWNT-Mengen zu erhalten, werden Fraktionen mit individualisierten Konjugaten nach Bedarf mittels Amicon-Filtern aufkonzentriert.

Die Zytotoxizitätsassays werden in 96-Loch-Platten angesetzt. In Tabelle 4.9 wird eine solche Mikrotiterplatte schematisch gezeigt, wobei die hier angegebenen Positionen in Übereinstimmung mit darauffolgenden Tabellen stehen und damit einhergehend dem Verständnis von photographischen Aufnahmen in Kapitel 4.3 dienen.

Das Pipettierprotokoll zur Untersuchung der Zytotoxizität der unterschied-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
...												

Tabelle 4.9: Bezeichnungen der Lochpositionen einer Mikrotiterplatte.

lich präparierten ssDNA-SWNT-Dispersionen ist in Tabelle 4.10 gegeben, wobei sich eine genauere Beschreibung der Testsubstanzen in Tabelle 4.11 befindet.

Ansatz	Zusammensetzung	Loch
Wachstumskontrolle	100 µl Zellsuspension + 10 µl Medium	A1-C1
Verbindungskontrolle	100 µl Medium + 10 µl SWNTs	A2-C2
Positivkontrolle	100 µl Zellsuspension + 10 µl Ethanol	A3-C3
Hintergrund	110 µl Medium	A4-C4
Testsubstanz	100 µl Zellsuspension + 10 µl Testsubstanz	A5-C5 - A11-C11

Tabelle 4.10: Pipettierprotokoll für die Zytotoxizitätsuntersuchungen mit HeLa-Zellen. Die Lochpositionen beziehen sich auf die Angaben aus Tabelle 4.9. Triplikatmessungen einer Kontrolle bzw. Substanz werden somit jeweils in einer Spalte angeordnet. Die jeweiligen Testsubstanzen werden in Tabelle 4.11 näher erläutert.

Gemäß dem hier gezeigten Pipettierprotokoll werden sowohl der CellTiter-Blue[®]- als auch der WST-8-Assay durchgeführt. Die Inkubationszeiten der adhärennten Zellen mit den Testsubstanzen wird auf 18 h gesetzt.

ssDNA-SWNT-Probe	Loch
Einzelröhren mit Konzentration 1	A5-C5
Einzelröhren mit Konzentration 2	A6-C6
Aggregate mit Konzentration 1	A7-C7
Aggregate mit Konzentration 2	A8-C8
Rohdispersion mit Konzentration 1	A9-C9
Rohdispersion mit Konzentration 2	A10-C10
20 (w/V)%-ige Iodixanollösung	A11-C11

Tabelle 4.11: Beschreibung der Testsubstanzen in Ergänzung zu Tabelle 4.10. Auch hier ist die jeweilige Lochposition Tabelle 4.9 zu entnehmen.

4.3 Ergebnisse und Interpretation

4.3.1 Biostabilitätsstudien

Die Stabilität von ssDNA-SWNT-Konjugaten unter physiologischen Bedingungen ist eine unerlässliche Voraussetzung für deren Anwendbarkeit in biomedizinischen Aufgabenstellungen. Der Erhalt der ssDNA-SWNT-Integrität in unterschiedlichen Umgebungen wird hier gegenüber Enzymaktivität, Proteinen und verschiedenen pH-Werten auf die Probe gestellt. Als Indikator für die Konjugatstabilität dienen die optischen Eigenschaften von SWNTs, die eine mögliche Aggregation ebenso charakterisieren können wie das Vorliegen individualisierter Nanoröhren.

Eine erste Versuchsreihe innerhalb dieser Biostabilitätsstudie testet die Beständigkeit gegenüber DNase I, einer Endonuklease zum Verdau von Einzel- und Doppelstrang-DNA. Vor dem eigentlichen Experiment mit ssDNA-SWNTs bedarf es einer entsprechenden Kontrolle, die das tatsächliche Vorliegen eines aktiven Enzyms sicherstellt. Hierfür kommt das doppeltmarkierte Oligomer 5'-(6-FAM)-(GT)₇-GT-(DDQI)-(GT)₈-3' zum Einsatz. Das Prinzip der Nachweisreaktion ist in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt.

Demnach kann innerhalb des Fluorophor-Quencher-Paares 6-FAM und

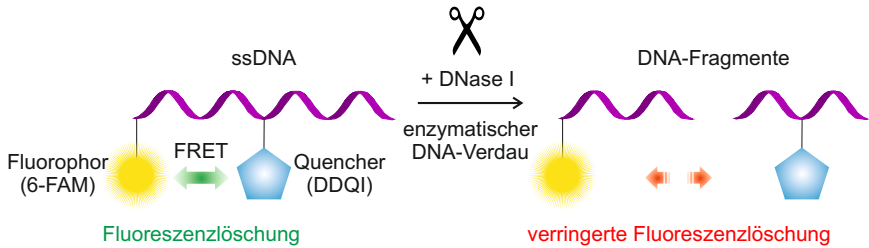


Abbildung 4.2: Nachweisreaktion der Enzymaktivität. Die doppelmarkierte ssDNA besitzt 6-FAM als Fluorophor und DDQI als zugehörigen internen Quencher. Bei entsprechender räumlicher Nähe kommt es im intakten DNA-Strang zu einer effizienten Fluoreszenzlöschung durch resonanten Energietransfer nach Förster. Nach erfolgreichem DNA-Verdau durch aktive Nuklease wird die 6-FAM-Fluoreszenz aufgrund der Distanz zum Quencher weniger effektiv gelöscht und es resultiert eine erhöhte PL-Intensität.

DDQI ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) stattfinden, der die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs zu einem gewissen Anteil verringert. Die starke Abstandsabhängigkeit solcher FRET-Prozesse kann genutzt werden, um die Beschaffenheit des DNA-Stranges zu qualifizieren.^[87] Während Fluorophor und korrespondierender Quencher in einem intakten Oligomer in relativer Nähe zueinander stehen, ist nach erfolgreichem enzymatischem DNA-Verdau im Mittel ein größerer Abstand zwischen den Fragmenten zu finden. Demzufolge wird die (6-FAM)-Fluoreszenz weniger effektiv gequencht und es kommt zu einem Anstieg der PL-Intensität. Das Ergebnis des hier durchgeführten Kontrollexperiments ist in Abbildung 4.3 zu sehen.

Verglichen mit der Referenz, bei der keine Nuklease vorhanden ist, zeigt die DNase I-Kontrolle über einen Zeitraum von drei Tagen eine signifikante Erhöhung der 6-FAM-Fluoreszenz. Der deutliche Unterschied nach 24 h ist dabei ein ausreichendes Kriterium für die Wahl der Inkubationsdauer im ssDNA-SWNT-Experiment.

Nachdem die Enzymaktivität bestätigt ist, wird DNase I zur Inkubation der SWNT-Konjugate unter optimierten Bedingungen eingesetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h wird die Nanorohrprobe wie in Abbildung 4.4 ge-

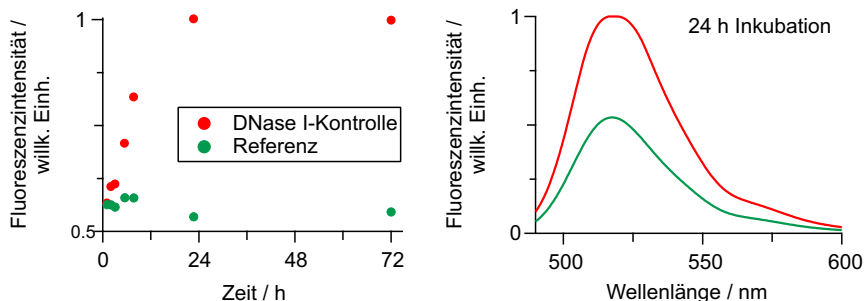


Abbildung 4.3: Nachweis der DNase I-Aktivität durch doppelmarkiertes Oligomer. Der Anstieg der 6-FAM-Fluoreszenzintensität für die DNase I-Kontrolle im Gegensatz zur Referenz resultiert vom erfolgreichen enzymatischen DNA-Verdau durch die Nuklease. Die Wahl der Inkubationsdauer im eigentlichen Experiment fällt auf 24 h, da sich hier ein signifikanter Fluoreszenzunterschied erkennen lässt, der wiederum auf eine ausreichende Reaktionsrate schließen lässt.

zeigt absorptions- und fluoreszenzspektrometrisch analysiert und einem Vergleich mit der Referenz ohne Enzym unterworfen.

Dabei werden lediglich geringfügige Unterschiede festgestellt, die im Rahmen der Messungenauigkeit vernachlässigt werden können. Das Maximum der S_1 -Absorptionsbande ist bei unveränderter Wellenlänge zu finden und auch die SWNT-Photolumineszenz zeigt keine Intensitätsverringering, welche im Fall einer Aggregation der Nanoröhren durch intramolekulare SWNT-Wechselwirkungen zu erwarten ist.^[32,88,89] Das Ausbleiben solcher Quencheffekte indiziert eine intakte ssDNA-SWNT-Integrität nach Behandlung mit aktivem Enzym. DNase I scheint gegenüber DNA-Strängen, welche auf der Nanoröhroberfläche adsorbiert sind, keine Wirkung zu besitzen. Andernfalls könnte eine ausreichende Solubilisierung der Kohlenstoffnanoröhren nicht gewährleistet sein, was sich durch Aggregation erkennbar machen würde. Eine Erklärung für das nicht-reaktive Verhalten des Enzyms gegenüber adsorbierter DNA wird in der sterischen Hinderung vermutet, wodurch die Restriktion durch die Nuklease derart stark gehemmt wird, dass sich keine Wirkung zeigt. SWNTs dienen somit dem Schutz vor enzymatischen DNA-Verdau und es kann auf eine ausreichende Konjugatstabilität in Anwesenheit der aktiven DNase I geschlossen werden.

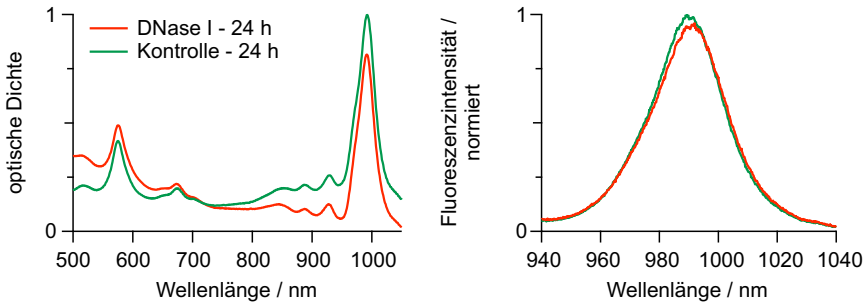


Abbildung 4.4: Stabilität von ssDNA-SWNT-Konjugaten gegenüber Enzym. Nach 24 h Inkubation der Nanoröhren mit aktiver DNase I werden Absorption und PL von SWNTs gemessen und die Ergebnisse mit der Kontrollprobe verglichen. Beide optischen Charakteristika deuten auf eine gute Konjugatstabilität in Anwesenheit des Enzyms hin.

Das hier erhaltene Resultat steht im Einklang mit den Befunden von Yi *et al.* und Wu *et al.*, bei deren Arbeiten allerdings nicht das Aggregationsverhalten von SWNTs als Indiz für den Schutz der Oligomer-Stränge vor enzymatischer Spaltung genutzt, sondern die Lösung auf Bildung von DNA-Fragmenten hin untersucht wird.^[90,91] Dabei handelt es sich um ssDNA-SWNT-Bündel, so dass die hier durchgeführten Experimente den Kenntnisstand um das Verhalten von Enzymen gegenüber auf individualisierten SWNTs adsorbierten DNA-Strängen durch spektroskopische Charakterisierung erweitern.

Ein weiterer Aspekt innerhalb dieser Stabilitätsstudie ist der Einfluss verschiedener Biomoleküle auf die Konjugatintegrität. Dazu wird durch Zusatz von FBS in Analogie zum Bestand im Zellkulturmedium eine physiologische Umgebung simuliert und das Verhalten der ssDNA-SWNTs beobachtet. Das hitzeinaktivierte Serum stellt unter anderem ein Gemisch verschiedener Proteine und Nukleasen dar und liefert wichtige Nährstoffe zur Kultivierung der meisten Zelllinien.

Nach Zugabe von 10% FBS zur ssDNA-SWNT-Lösung werden Reaktionszeiten von 24 h und 72 h bei 37°C getestet und mit einem Ansatz ohne Inkubation verglichen. Im Kontrollexperiment ist der Volumenanteil des Serums durch PBS ersetzt. In Abbildung 4.5 werden die spektroskopischen Re-

sultate zusammengefasst.

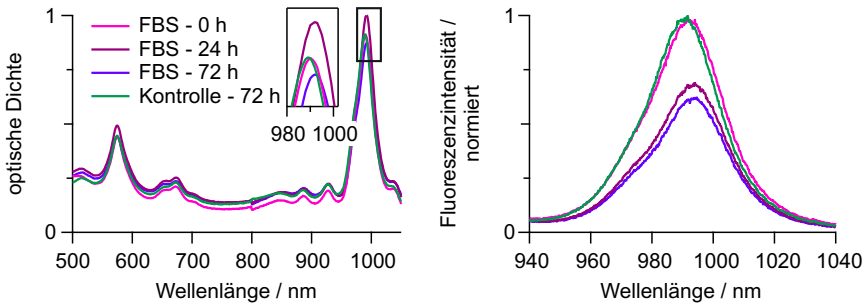


Abbildung 4.5: Stabilität von ssDNA-SWNT-Konjugaten gegenüber Proteinen. Nanoröhren werden bei verschiedenen Inkubationsdauern mit FBS versetzt und deren Absorptions- sowie PL-Spektren mit Kontrollen verglichen. Eine leichte Rotverschiebung des S_1 -Absorptionsmaximums sowie die Verringerung der PL-Intensität weisen eine Veränderung der Nanorohrumgebung nach.

Sowohl Absorptions- als auch PL-Verhalten der SWNTs zeigen eine spektrale Veränderung nach Behandlung mit FBS. Die Rotverschiebung der S_1 -Absorptionswellenlänge und des PL-Maximums um wenige Nanometer verglichen mit der Kontrolle wird in einer Übersicht in Tabelle 4.12 wiedergegeben.

Probe	$\lambda_{\max, \text{Absorption}} /$ nm	$\lambda_{\max, \text{PL}} /$ nm	$I_{\text{PL}} /$ willk. Einh.
FBS - 0 h	990	992	1.0
FBS - 24 h	992	994	0.7
FBS - 72 h	992	994	0.6
Kontrolle - 0 h	989	992	1.0

Tabelle 4.12: Spektrale Daten des FBS-Experiments aus Absorptions- und Photolumineszenzmessungen.

Es zeigt sich ein geringer Unterschied in den Wellenlängen, welche auf die Veränderung der unmittelbaren Umgebung hinweisen. Auch die Verringerung der PL-Intensität um 30% bzw. 40% durch Fluoreszenzquenchen legen einen direkten Umgebungseinfluss nahe. Eine Aggregation von SWNTs

kann allerdings nicht geschlussfolgert werden, da eine dafür typische Rotverschiebung um $> 10\text{ nm}$ ausbleibt. Als mögliche Ursache für die Veränderungen in den Spektren wird zuerst die Inkubationstemperatur von $37\text{ }^\circ\text{C}$ in Betracht gezogen. Daher werden ssDNA-SWNT-Konjugate in entsprechenden Referenzansätzen den jeweiligen Versuchsbedingungen unterworfen und nach 24 h bzw. 72 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ mit einer unbehandelten Startprobe verglichen. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 4.6.

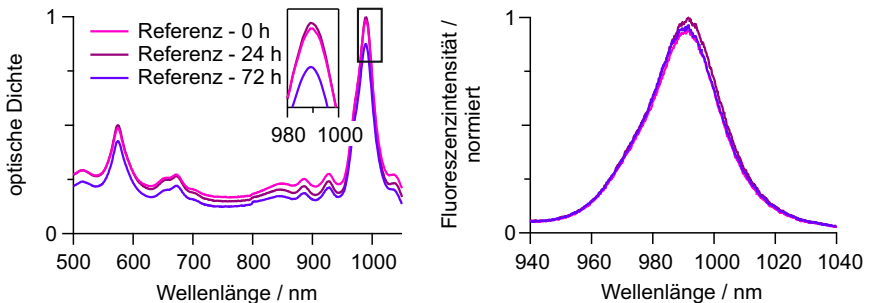


Abbildung 4.6: Kontrollexperiment zum Einfluss der Inkubationstemperatur. Absorption und PL der SWNTs zeigen keine Veränderung gegenüber den im DNase I- und FBS-Experiment gewählten Inkubationsbedingungen.

Es wird erkenntlich, dass keine Änderung in den Eigenschaften von ssDNA-SWNT-Konjugaten durch Temperatureinflüsse entstehen. Somit wirken sich die Inkubationsbedingungen im FBS-Experiment nicht auf Absorption und Photolumineszenz der Nanoröhren aus.

Vielmehr werden im eigentlichen Experiment Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nanorohroberflächen vermutet.^[92] Die negative Ladung im Phosphatrückgrat des Oligomers begünstigt eine Anlagerung partialpositiv geladener Proteine an die Konjugate. Durch Kontakt zum SWNT-Gerüst wird dessen elektronische Umgebung dahingehend verändert, dass die energetische Lage der Exzitonen herabgesetzt wird und Fluoreszenz zu einem gewissen Anteil gelöscht wird. Abbildung 4.7 gibt den Vorschlag solcher Wechselwirkungen schematisch wieder.

Als Ergebnis der Untersuchung lässt sich festhalten, dass es zu einer geringen spektralen Veränderung durch die Behandlung mit FBS kommt.

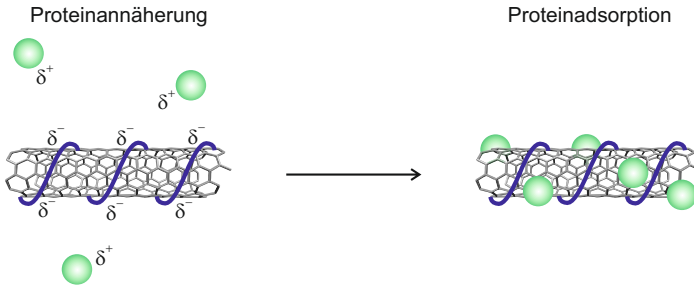


Abbildung 4.7: Anlagerung von Proteinen (grün) an ssDNA-SWNT-Konjugate. Die Wechselwirkung wird durch gegensätzliche Partialladungen in Proteinen und DNA-Strängen initiiert.

Ein Interpretationsansatz lässt Wechselwirkungen zwischen Proteinen und ssDNA-SWNT-Konjugaten als Ursache erscheinen. Aufgrund der lediglich sehr geringen Rotverschiebung wird eine Aggregation zwischen SWNTs als Folge von DNA-Abbau als unrealistisch gesehen, so dass von einer ausreichenden Konjugatstabilität unter Zellkulturbedingungen ausgegangen werden kann.

Gegensätzliches wird von Moon *et al.* berichtet, bei denen sich in Zellexperimenten mit markierten DNA-Strängen auf Nanoröhren Unterschiede bei Anwesenheit von FBS im Medium erkennen lassen.^[84] Allerdings werden nicht die im Serum enthaltenen Proteine, sondern Nukleasen dafür verantwortlich gemacht, dass sich freie Farbstoffmarker nach enzymatischer DNA-Spaltung finden lassen. Von einer verminderten Konjugatstabilität, insbesondere von individualisierten SWNTs, wird hingegen nicht berichtet.

Nachdem die Stabilität von ssDNA-SWNT-Konjugaten in Anwesenheit von Biomolekülen wie Enzymen und Proteinen sichergestellt ist, werden in weiteren Studien Umgebungseinflüsse durch pH-Variation in Betracht gezogen. Da sich unter physiologischen Bedingungen sehr unterschiedliche pH-Gebiete finden, wird hier der gesamte Bereich abgedeckt, um stabile Regionen auszumachen. Beispiele für Absorptionsspektren einer Titrationsserie werden in Abbildung 4.8 für den sauren und basischen pH-Zweig gezeigt.

Die Abnahme der optischen Dichte aufgrund des Verdünnungseffekts im

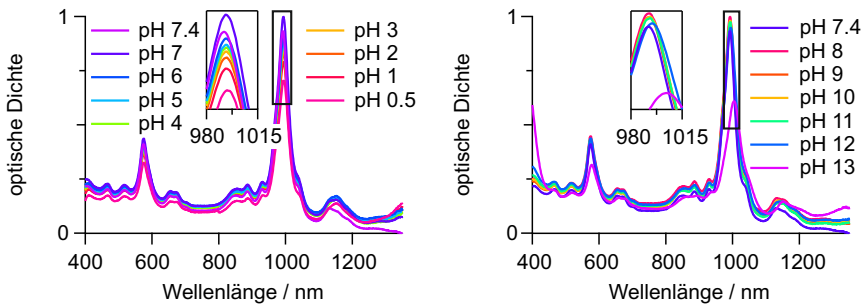


Abbildung 4.8: Abhängigkeit der SWNT-Absorption von der pH-Umgebung. Die Startprobe liegt jeweils bei einem pH-Wert von 7.4 vor. Durch Zugabe von Salzsäure werden in definierten Schritten verschiedene pH-Stufen erreicht (links). Analog wird mit der basischen Testreihe durch Zusatz von Natronlauge verfahren (rechts). Die im Laufe einer Titrationsreihe geringer werdende Absorption resultiert von der jeweiligen Verdünnung. Eine Verschiebung der Wellenlänge des Absorptionsmaximums in extremen pH-Regionen indiziert eine Aggregation der SWNTs.

Verlauf des Titrierexperiments kann zur Auswertung vernachlässigt werden. Entscheidend sind die Positionen der S_1 -Maxima. Während für den sauren pH-Bereich lediglich eine geringe Änderung festgestellt werden kann, findet bei Zugabe von Lauge eine deutliche Rotverschiebung um etwa 10 nm statt, welche die strukturelle Integrität der ssDNA-SWNTs stark in Frage stellt. Zur detaillierten Übersicht zeigt Abbildung 4.9 die Abhängigkeit der Absorptionswellenlänge vom pH-Wert.

Anhand der Auftragung der Absorptionsmaxima gegen den pH-Wert können die Bereiche, über die eine Stabilität der Konjugate erfüllt ist, eingegrenzt werden. Es ergeben sich Veränderungen in den stark sauren Regionen unterhalb eines pH-Wertes von 3, für den basischen Zweig wird der pH-Wert 11 als Grenze gesehen. Um über das Vorliegen einer SWNT-Aggregation urteilen zu können, werden in diesen Extrembereichen zusätzlich PL-Messungen durchgeführt und die Fluoreszenzintensitäten mit der Ausgangsprobe verglichen. Abbildung 4.10 zeigt PL-Spektren der ssDNA-SWNT-Proben mit pH-Werten von 0.5, 7.4 und 13.

Für beide pH-Zweige ist eine deutliche Verminderung bzw. Auslöschung der Photolumineszenz erkennbar. Während für den sauren Bereich ein Quen-

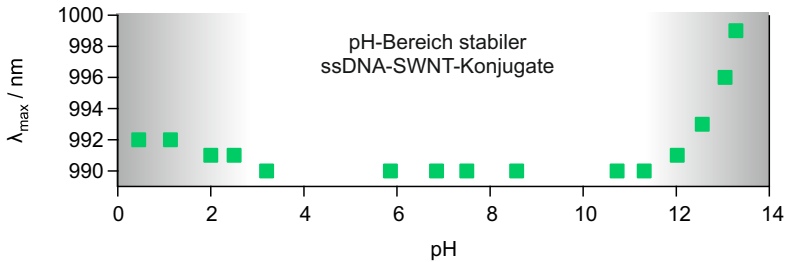


Abbildung 4.9: Abhängigkeit der ssDNA-SWNT-Konjugatstabilität vom pH-Wert. Während im Bereich von pH 3 bis 11 eine gute Stabilität der SWNT-Proben zu finden ist, zeigen die grau hinterlegten Regionen um die Extremwerte eine Rotverschiebung der energetischen Lage des S_1 -Exzitons und deuten somit auf eine Aggregation der SWNT-Proben hin. Der Einfluss des pH-Wertes durch stark basische Umgebung und somit die Verschiebung des Absorptionsmaximums ist stärker als die Beeinflussung durch Säuren.

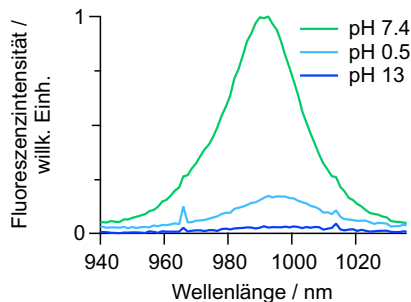


Abbildung 4.10: Abhängigkeit der SWNT-PL von der pH-Umgebung. Photolumineszenzmessungen werden für die extremen pH-Werte 0.5 und 13 mit dem Ergebnis des Start-pH-Wertes von 7.4 verglichen. Es werden unterschiedlich starke Auswirkungen durch Säuren und Laugen auf die Fluoreszenzlösung gefunden.

chen der Fluoreszenz um etwa 80% zu finden ist, zeigt die Probe mit pH 13 keine detektierbare SWNT-Photolumineszenz aufgrund starker Aggregation. Tabelle 4.13 fasst die spektralen Daten aus Absorptions- und Photolumineszenzmessungen für die Proben bei extremen pH-Werten in Gegenüberstellung zu denen der Startprobe bei pH 7.4 zusammen.

Probe	$\lambda_{\max, \text{Absorption}} /$ nm	$\lambda_{\max, \text{PL}} /$ nm	$I_{\text{PL}} /$ willk. Einh.
Start pH 7.4	989	991	1.0
sauer pH 0.5	992	996	0.2
basisch pH 13	999	≈ 997	≈ 0.03

Tabelle 4.13: Spektrale Daten des pH-Experiments aus Absorptions- und Photolumineszenzmessungen. Die Bestimmung des PL-Maximums der basischen Probe ist aufgrund der starken Fluoreszenzlöschung nur sehr ungenau möglich.

Basierend auf diesen Ergebnissen muss in beiden Extrembereichen der pH-Skala mit einer Aggregation der SWNT-Proben gerechnet werden. Im Umkehrschluss hingegen kann jedoch eine ausreichende Stabilität der ssDNA-SWNT-Konjugate in einem weiten pH-Rahmen zwischen 3 und 11 gefunden werden. Das Resultat steht in Einklang mit der materialwissenschaftlichen Studie von Karachevtsev *et al.*, wonach der Bereich zwischen pH 3 und 11 keine spektralen Veränderungen auf die optischen Eigenschaften DNA-dispergierter Kohlenstoffnanoröhren auftreten.^[93] Allerdings nutzen Karachevtsev *et al.* nicht-individualisierte SWNTs als Ausgangspunkt ihrer Untersuchungen, weshalb das Ausmaß von Aggregation nicht vollständig erfasst sein kann. Die Stabilität innerhalb dieses Bereichs ist zufriedenstellend für eine Anwendbarkeit von ssDNA-SWNT-Strukturen in Zellkulturexperimenten, bei denen lediglich mit einer pH-Variation von neutral zu schwach sauer mit einem Wert oberhalb 4.5 gerechnet werden muss.

Um abschließend zu klären, ob es sich bei den hier auftretenden Beobachtungen um Dotierungseffekte in den SWNTs handelt oder ob eine Zerstörung der DNA-Stränge stattfindet, wird die Aggregation und die daraus folgen-

de spektrale Veränderung auf eine mögliche Reversibilität hin getestet. Die SWNT-Proben werden zunächst in extreme pH-Umgebungen versetzt und anschließend durch Neutralisation wieder auf den Ausgangswert eingestellt. Auch die Verwendung eines Ultraschallbades wird in Betracht gezogen, um eine Entbündelung durch kurze Beschallungszeiten zu erproben. Abbildung 4.11 zeigt die Absorptionsspektren der Proben innerhalb der Reversibilitäts-experimente für saure und basische pH-Werte. Ausgangspunkt sind jeweils Konjugatproben in PBS mit pH 7.4, welche durch Zugabe kleiner Volumina an Salzsäure bzw. Natronlauge auf extreme pH-Werte gebracht und anschließend durch Neutralisation auf pH 6.5 eingestellt werden. Die Untersuchung des aggregierten SWNT-Materials wird mit einer kurzen Ultraschallbehandlung abgeschlossen.

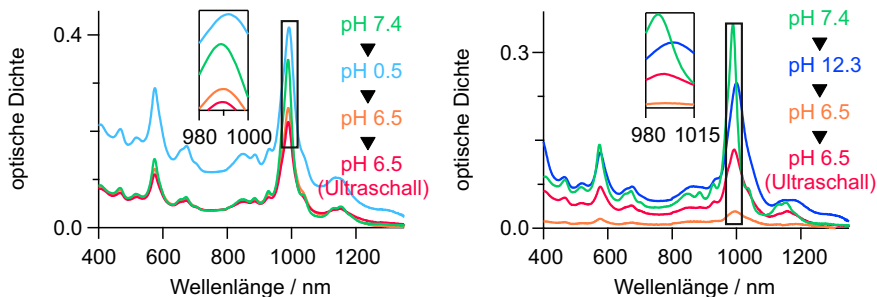


Abbildung 4.11: Untersuchung der Reversibilität der SWNT-Aggregation in extremen pH-Umgebungen. Stark saure bzw. basische Proben werden neutralisiert und deren S_1 -Absorption untersucht. Die anfängliche Rotverschiebung durch saure bzw. basische Umgebung ist nach Neutralisation und Ultraschallbehandlung nur zu einem geringen Anteil umkehrbar.

Das Verhalten gegenüber der pH-Variation wird in Abbildung 4.12 zusammengefasst. Zusätzlich zu den spektralen Charakteristika wird das augenscheinlich zu vernehmende Aggregationsverhalten photographisch festgehalten.

Durch Neutralisation und anschließende Ultraschallbehandlung kann das Absorptionsmaximum für beide pH-Extrema leicht blauverschoben werden. Auch hier sind die Effekte für den basischen Bereich stärker ausgeprägt.

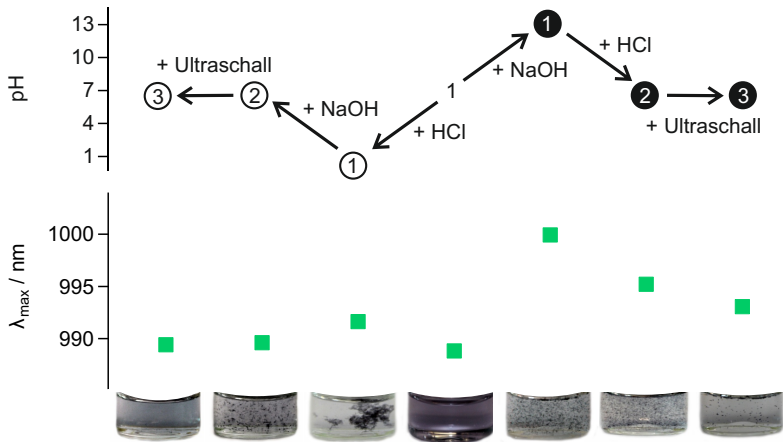


Abbildung 4.12: Ergebnisse des Versuches zur Reversibilität der Aggregation bei pH-Veränderung. Die Startprobe 1 wird durch Salzsäure bzw. Natronlauge in extreme pH-Bereiche (Probe ① bzw. ①) versetzt. Nach Neutralisation auf pH 6.5 (Probe ② bzw. ②) wird eine kurze Ultraschallbehandlung durchgeführt (Probe ③ bzw. ③). Photographische Aufnahmen halten das ausgeprägte Aggregationsverhalten der Konjugate zusätzlich fest.

Allerdings bleibt in jedem Fall eine vollständige Entbündelung aus, was sowohl spektroskopisch als auch durch Lichtbildaufnahmen belegbar ist. Daher kann auf eine Irreversibilität der SWNT-Aggregation durch den pH-Sprung zum extremen Milieu geschlossen werden. Dotierungseffekte können folglich als Hauptursache für die spektrale Veränderung der Probencharakteristika ausgeschlossen werden. Vielmehr deutet der Befund auf eine irreversible Beschädigung in den DNA-Strängen hin. Mechanistisch ist lediglich eine Depurinierung durch Säure bekannt, gegenüber Laugen gelten DNA-Oligomere als stabil. Allerdings werden in der Beurteilung der Stabilität von Nukleinsäuren ausschließlich Doppelstränge betrachtet, welche durch intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb der Doppelhelix eine grundlegend verschiedene Stabilisierung erfahren als einsträngige DNA. Auch werden in Fachbüchern für die Untersuchung der DNA-Säurestabilität und -Basenstabilität lediglich schwach saure und basische Bereiche betrachtet.

Abschließend gilt festzuhalten, dass die Beständigkeit von ssDNA-SWNT-Strukturen durch starke Säuren und Laugen limitiert ist. Die Beschädigung von DNA-Strängen resultiert in einer unzureichenden Dispergierung der Nanoröhren. Als Folge stabilisieren sich SWNTs untereinander in Form von Aggregatbildung. Für Experimente mit Zellkulturen zeigt sich dennoch eine gute Verwendbarkeit der ssDNA-SWNT-Konjugate, da deren Integrität im zelltypischen pH-Bereich gewährleistet ist.

Somit kann durch die Evaluierung der Biostabilität eine grundlegende Beständigkeit von ssDNA-SWNT-Strukturen unter physiologischen Bedingungen bescheinigt und deren *ex vivo*-Kompatibilität als nächster Schwerpunkt untersucht werden.

4.3.2 Zytotoxizitätsstudien

Das Projekt zur Biokompatibilität von ssDNA-SWNT-Konjugaten wird durch Zytotoxizitätsuntersuchungen vervollständigt. Dazu wird die Verträglichkeit der biostabilen Nanoröhren gegenüber J774.1-Mausmakrophagen und humanen Epithelzellen HeLa getestet. Während die Studie mit Mausmakropha-

gen lediglich einem ersten Einblick über eine mögliche zytotoxische Wirkung dient, widmen sich die Untersuchungen mit HeLa-Zellen einer differenzierteren Betrachtung des Einflusses der Probenqualität auf das Ergebnis mit menschlichen Zelllinien. Eine Beurteilung des Probenzustandes erfolgt wie in Abbildung 4.13 gezeigt absorptionspektroskopisch.

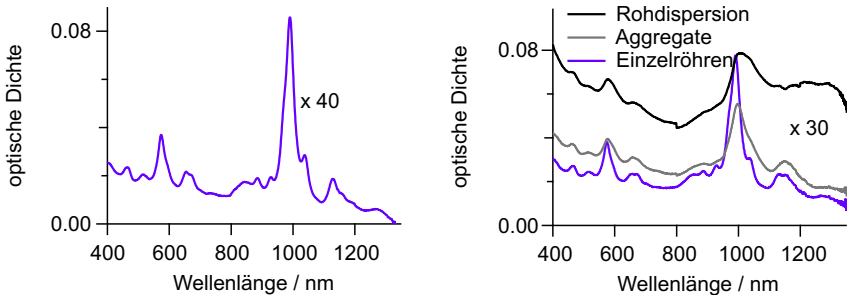


Abbildung 4.13: Optische Charakterisierung der ssDNA-SWNT-Proben zur Zytotoxizitätsuntersuchung. Eine Bewertung der Probenqualität bezüglich ihrer Reinheit in der (6,5)-Chiralität sowie dem Ausmaß ihrer Entbündelung kann aufgrund von Absorptionsspektren erfolgen. Erste Zytotoxizitätstests werden an Einzelröhren gegenüber Mausemakrophagen durchgeführt. Die Konzentration der Startprobe ist dem linken Spektrum zu entnehmen, der Verdünnungsfaktor in der Absorptionsmessung liegt bei 40. Die Absorptionsspektren rechts stammen von den ssDNA-SWNT-Proben verschiedener Aggregationsgrade für Zytotoxizitätsuntersuchungen gegenüber HeLa-Kulturen. Die optischen Dichte für Einzelröhren, Aggregate und Rohdispersion müssen aufgrund der Verdünnung mit dem Faktor 30 multipliziert werden.

Wie dem Pipettierprotokoll aus Tabelle 4.8 zu entnehmen ist, werden Substanzen durch das Qualitätsmanagement des SFB 630 auf ihre Zytotoxizität gegenüber J774.1-Zellen getestet, indem durch serielle fünffache Verdünnung Konzentrationsserien erstellt werden. Üblicherweise erhält man aus solchen Verdünnungsreihen sogenannte IC_{50} -Werte, die angeben, bei welcher Konzentration 50% der Zellen in ihrem Metabolismus inhibiert sind und somit ein Maß für zytotoxische Effekte darstellen. Die Konzentration der Startprobe liegt bei einer OD von 3.44. Nach einer 1:20-Mischung mit DMSO werden die seriellen Verdünnungen 1:90 mit Medium versetzt. Die daraus resultierenden Testkonzentrationen der ssDNA-SWNT-Lösungen werden in

Tabelle 4.14 zusammengefasst. Die Angabe erfolgt zum einen als optische Dichte, zum anderen als Kohlenstoffatomkonzentration, welche auf dem Absorptionsquerschnitt nach Schöppler *et al.* basiert.^[30]

ssDNA-SWNT-Probe	OD	c_C / nM
1. Verdünnung	1.72×10^{-3}	372
2. Verdünnung	0.38×10^{-3}	74.4
...
8. Verdünnung	2.4×10^{-6}	5×10^{-3}

Tabelle 4.14: Konzentrationen der ssDNA-SWNT-Dispersionen für Zytotoxizitätsuntersuchungen mit J774.1-Zellen. Die Angabe als optische Dichte ergibt sich aus dem Absorptionsspektrum unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung. Aus diesen Werten lassen sich molare Kohlenstoffatomkonzentration nähern.

Nach Durchführung des Alamar Blue®-Assays werden mit einem Elisa-Plattenleser die Absorbanzen bei 570 nm und 630 nm aufgezeichnet. Aus deren Differenz resultiert nach Normierung auf die Wachstumskontrolle der Anteil an Zellen mit aktivem Metabolismus. Im Fall der ssDNA-SWNT-Konjugate kann kein IC_{50} -Wert ermittelt werden, da die Nanorohrproben in den Testkonzentrationen keine zytotoxische Wirkung auf die Mausemakrophagen zeigen.

Gegenüber menschlichen HeLa-Zellen werden ausführliche Zytotoxizitätsstudien in Hinblick auf eine Untersuchung von Einflüssen durch die Probenqualität durchgeführt. Die verwendeten SWNT-Proben sind in Abbildung 4.13 absorptionspektrometrisch charakterisiert. Die jeweiligen Testlösungen unterscheiden sich in ihrer Präparationsmethode und folglich in ihrer Bündelgröße. Während aus dem Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation je nach Fraktion individualisierte (6,5)-chirale Einzelröhren und mittelgroße Aggregate erhalten werden, liefert die einfache Ultraschallbehandlung eine SWNT-Rohdispersion undefinierter Bündel. Die Ansätze Einzelröhren, Aggregate und Rohdispersion lassen sich durch Lage und Breite ihres S_1 -Absorptionsmaximums sowie dem Hintergrund charakterisieren. Aus der op-

tischen Dichte und der Halbwertsbreite lassen sich gemäß Gleichung 2.1 aus Kapitel 2.1.2 Kohlenstoffatomkonzentrationen ermitteln. Tabelle 4.15 fasst die Werte für die drei unterschiedlich präparierten SWNT-Proben zusammen, sofern deren Bestimmung möglich ist.

ssDNA-SWNT-Probe	$\lambda_{\text{max, Absorption}}$ / nm	OD	Δ_{FWHM} / nm	c_C / μM
Einzelröhren 1	990	2.33	38	452
Einzelröhren 2	990	0.23	38	45.2
Aggregate 1	997	1.67	64	545
Aggregate 2	997	0.17	64	54.5
Rohdispersion 1	≈ 1009	≈ 2.36	NA	NA
Rohdispersion 2	≈ 1009	≈ 0.24	NA	NA

Tabelle 4.15: ssDNA-SWNT-Dispersionen als Testsubstanzen für Zytotoxizitätsuntersuchungen mit HeLa-Zellen. Die Bewertung der Probenqualität kann aufgrund des S_1 -Absorptionsmaximums und der Halbwertsbreite Δ_{FWHM} erfolgen. Die optische Dichte gilt als Maß für den SWNT-Gehalt und lässt sich in molare Kohlenstoffatomkonzentrationen überführen. Aufgrund der typischerweise mangelhaften Spektrenqualität im Fall der Rohdispersion können hierfür keine Halbwertsbreiten und Kohlenstoffatomkonzentrationen ermittelt werden (NA, nicht angegeben).

Nach entsprechender Behandlung der Zellen mit den verschiedenen ssDNA-SWNT-Dispersionen werden die Ansätze in den Mikroliterplatten mit dem jeweiligen Farbindikator gemäß den Protokollen nach CellTiter-Blue[®] und WST-8 inkubiert. Abbildung 4.14 zeigt photographische Aufnahmen der 96-Loch-Platten zu relevanten Zeitpunkten. Nach Inkubation mit den Farbstoffen werden metabolisch aktive Zellen durch einen Farbumschlag von blau nach violett im CellTiter-Blue[®]-Assay angezeigt. Gemäß dem WST-8-Protokoll zeigen lebendige Zellen eine ausgeprägte Orangefärbung.

Die Lochposition A3 im CellTiter-Blue[®]-Test zeigt fälschlicherweise eine Violettärfärbung, welche einen Pipettierfehler vermuten lässt. Da es sich hierbei um die Positivkontrolle mit gezielt abgetöteten Zellen handelt, wirkt sich die Ungenauigkeit nicht auf die weitere Auswertung aus. Im Histogramm aus Abbildung 4.15 bleibt der Wert für Loch A3 unberücksichtigt.

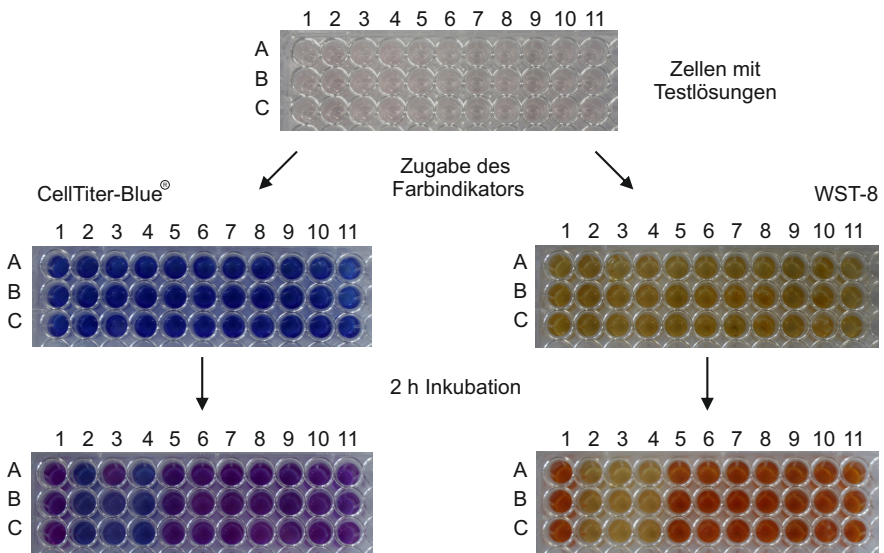


Abbildung 4.14: Durchführung der Zytotoxizitätsassays mit HeLa-Zellen. Die Zellsuspensionen mit den Testsubstanzen werden mit dem entsprechenden Farbindikator versetzt. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 2 h ist ein Farbumschlag von blau nach violett im CellTiter-Blue®-Assay (links) erkenntlich, bei WST-8 lässt sich der Anteil lebendiger Zellen durch die Orangefärbung gegenüber dem vorherigen Gelb quantifizieren (rechts).

Zur Quantifizierung der Farbreaktionen werden im Elisa-Plattenleser Absorbanzen bzw. Fluoreszenzintensitäten gemessen. Tabelle 4.16 fasst die spektroskopischen Kennzeichen der jeweiligen Messungen zusammen.

Assay	Messprinzip	λ_{exc} / nm	λ_{em} / nm
CellTiter-Blue®	Absorption	570 / 600	
	Fluoreszenz	550	600
WST-8	Absorption	450	

Tabelle 4.16: Messparameter zur Bestimmung des Anteils lebendiger Zellen im CellTiter-Blue®- und WST-8-Assay. Während WST-8 nur eine Quantifizierung mittels Absorptionsmessung erlaubt, bietet sich beim CellTiter-Blue®-Protokoll darüber hinaus auch eine sensitivere Auswertung über Fluoreszenzintensitäten an.

Die erhaltenen Absorbanzen und Fluoreszenzintensitäten werden zur Auswertung der Zytotoxizitätsuntersuchung herangezogen. Dazu werden zunächst Mittelwerte aus den Triplikatmessungen innerhalb einer Spalte der Mikrotiterplatten gebildet. Als Hintergrund wird der Mittelwert der Spalte A4 bis C4 abgezogen. Zur Normierung wird der Wert aus der Wachstumskontrolle in A1 bis C1 verwendet. Somit resultiert eine Zellviabilität von 100% in der Wachstumskontrolle und 0% im Ansatz der Hintergrundmessung. Die erhaltenen Ergebnisse für alle Testsubstanzen werden als Histogramm in Abbildung 4.15 für beide Assays im Vergleich dargestellt. Die Berechnung der Fehlerbalken erfolgt durch die jeweiligen Abweichungen vom Mittelwert in beide Richtungen innerhalb eines Triplikats.

Ein erster Vergleich zwischen den beiden Zytotoxizitätsprotokollen zeigt eine tendenzielle Übereinstimmung der Resultate, wobei die Ergebnisse gemäß dem WST-8-Assay durchgehend negativer bewertet werden. Als Ursache wird ein systematischer Unterschied in der Messmethode gesehen. Prinzipiell gilt eine Auswertung über Fluoreszenzintensitäten als sensitiver verglichen mit der Quantifizierung über Absorbanzen. Der CellTiter-Blue®-Assay, der generell beide Messprinzipien für Zytotoxizitätsstudien erlaubt, ist hier durch Fluoreszenzmessungen ausgewertet und sollte demgemäß eine höhere Genauigkeit zeigen.

Die Verbindungskontrolle ohne Zusatz von Zellen zeigt in beiden Fällen, dass

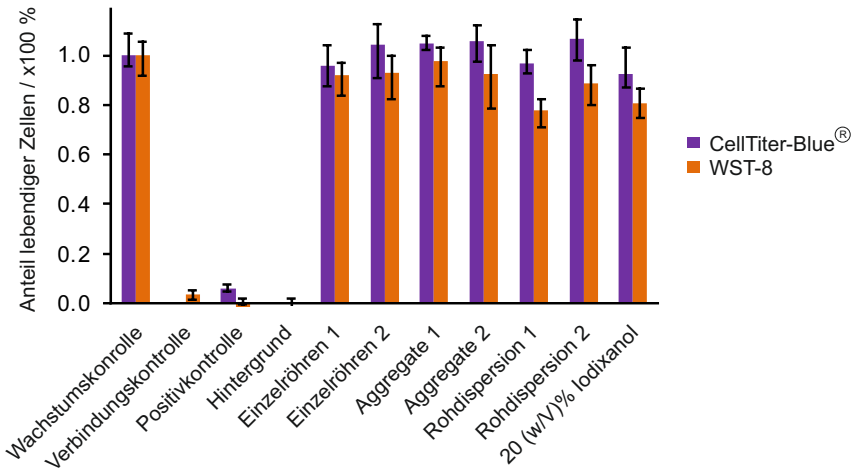


Abbildung 4.15: Ergebnis der Zytotoxizitätsuntersuchungen verschiedener ssDNA-SWNT-Konjugate gegenüber HeLa-Zellen nach dem CellTiter-Blue®- (violett) und WST-8-Protokoll (orange).

die Testsubstanz ssDNA-SWNT nicht intrinsisch mit dem Farbindikator reagieren kann und die ausgewählten Zytotoxizitätsprotokolle somit prinzipiell geeignet für das SWNT-System sind. Aus der Positivkontrolle mit gezielt getöteten Zellen ist die Sensitivität beider Assays hinsichtlich einer Unterscheidbarkeit von lebendigen und toten Zellen sichergestellt.

Die ssDNA-SWNT-Testsubstanzen zeigen auf den ersten Blick eine gute Verträglichkeit gegenüber HeLa-Zellen. Betrachtet man die Proben innerhalb einer Präparationsmethode, so lässt sich eine geringe Auswirkung der Konzentrationsunterschiede vermuten. Der Anteil vitaler Zellen ist für die niedrigere Konzentration „2“ in jedem Testsystem des CellTiter-Blue®-Assays geringfügig höher als die um den Faktor 10 konzentriertere Dispersion „1“. Im Mittel liefern individualisierte Einzelröhren ein ähnliches Ergebnis wie die ebenfalls einer Dichtegradientenultrazentrifugation entstammenden Aggregatproben. Einzig bei den nicht genauer definierten ssDNA-SWNT-Aggregaten aus der Rohdispersion kann eine leicht verringerte Überlebensfähigkeit der Zellen festgestellt werden. Das den DGU-Proben

beigesetzte Dichtegradientenmedium Iodixanol wird in einer Konzentration von 20 (w/V)% ebenfalls auf seine Zytotoxizität getestet. Hier kann eine geringe Herabsetzung des Anteils lebendiger Zellen herausgelesen werden. Der Gehalt von Iodixanol in DGU-präparierten ssDNA-SWNTs ist nicht näher bestimmt, wird aber aufgrund der resultierenden Probendichte auf unter 20 (w/V)% geschätzt.

Im Gegensatz zum Alamar Blue[®]-Test mit J774.1-Mausmakrophagen, bei dem kein IC_{50} -Wert ermittelt werden konnte, werden hier gezielt hohe SWNT-Konzentrationen dem Test unterworfen, um eventuelle zytotoxische Effekte durch größere Nanorohrmengen nicht zu unterschlagen. Zusammenfassend kann den ssDNA-SWNT-Konjugaten aus den Zytotoxizitätsuntersuchungen nach Alamar Blue[®], CellTiter-Blue[®] und WST-8 eine gute Verträglichkeit gegenüber HeLa-Kulturen zugeschrieben werden.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Projekt zur Biokompatibilität von ssDNA-SWNT-Strukturen standen Untersuchungen zur Konjugatstabilität unter physiologischen Bedingungen und Zytotoxizitätsstudien im Vordergrund, welche die Grundvoraussetzung für eine biomedizinische Verwendbarkeit von Nanoröhren darstellen.

Gegenüber der Endonuklease DNase I und der proteinreichen Umgebung im Serum FBS konnte eine ausreichende Integrität der ssDNA-SWNT-Proben erhalten bleiben, was eine Anwendung der Nanorohrkongjugate in Zellkulturen erlaubt. Auch wenn Wechselwirkungen mit Biomolekülen insbesondere im Kontakt mit Serum nicht ausgeschlossen werden können, wird der bestehende Zusammenschluss von ssDNA und SWNTs nicht gefährdet. Bei Kontakt mit Säuren und Laugen konnte eine pH-Sensitivität der Konjugate ausgemacht werden. Auch wenn unter extremen Bedingungen eine nicht-reversible Aggregation der SWNTs auftrat, wurde ein breiter pH-Bereich von 3 bis 11 gefunden, in welchem die Stabilität der ssDNA-SWNT-Strukturen gewährleistet ist. Für Experimente mit Zellkulturen gilt der schwach saure pH-Wert 4.5 als Untergrenze. Stark basische Bereiche treten nicht im

inneren Zellmilieu auf. Damit konnte eine in Hinblick auf bevorstehende Zellexperimente zufriedenstellende Konjugatstabilität evaluiert werden.

Die Resultate dieser Biostabilitätsstudien stehen in Einklang mit den Literaturdaten für aggregiertes SWNT-Material.^[91,93] Bestehende Kenntnisse können somit um die Sicherheit erweitert werden, dass auch individualisierte ssDNA-SWNT-Konjugate eine ausreichende physiologische Stabilität für zelluläre Anwendungen aufweisen.

Auch die Ergebnisse aus den Zytotoxizitätsstudien sind vielversprechend für die weitere Verwendung von Nanoröhren in HeLa-Kulturen. Für einen ersten Befund wurden J774.1-Zellen gewählt, da diese Linie durch ihr Makrophagen-ähnliches Verhalten zu einer effektiven Aufnahme von Fremdpartikel neigt und sich toxische Effekte somit schnell bemerkbar machen. Es konnte kein IC_{50} -Wert ermittelt werden, da bei den getesteten Konzentrationen keine Zytotoxizität detektierbar war. Im Kontakt mit menschlichen HeLa-Zellen konnte den individualisierten ssDNA-SWNT-Konjugaten ebenfalls eine gute Verträglichkeit bescheinigt werden. Innerhalb der DGU-präparierten Proben zeigte die Aggregatgröße keine negativen Einflüsse auf die Überlebensfähigkeit der Zellen. Die Methode der Dichtegradientenultrazentrifugation, deren Einflussnahme auf zytotoxische Effekte erstmals gegenüber standardisierten HeLa-Kulturen untersucht wurde, wirkt sich verglichen mit der Rohdispersion in geringem Maß positiv auf die Zellvitalität aus.

Mit diesen Resultaten stehen den biokompatiblen Kohlenstoffnanoröhren die Wege zu verschiedenen biomedizinischen Anwendungen offen. Aufgrund des effektiven Schutzes vor enzymatischer Aktivität durch Adsorption auf SWNT-Oberflächen können DNA-Oligomere problemlos in zelluläre Systeme eingebracht werden und dabei beispielsweise nach vorangegangener Funktionalisierung im gezielten Wirkstofftransport eingesetzt werden.

5 DNA-Kohlenstoffnanorohr-Konjugate in HeLa-Zellen

Die Fähigkeit zur Zellpenetration ist eine essentielle Voraussetzung für den Einsatz von Kohlenstoffnanoröhren als Transportsystem zum gezielten Einschleusen von Targetmolekülen ins Zellinnere. Bevor die Funktionalisierung mit speziellen Agenzien erprobt wird, soll die Aufnahme individualisierter ssDNA-SWNTs in Zellen studiert werden. Im Verlauf dieses Projekts wird daher das optische Verhalten biokompatibler ssDNA-SWNT-Konjugate vor und nach deren Inkorporation in die humane Epithelzelllinie HeLa mikrospektroskopisch untersucht.

5.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Kohlenstoffnanoröhren reichern sich bereitwillig in den meisten Zelltypen an.^[7] Dabei spielen Wechselwirkungen mit der Zellmembran eine wesentliche Rolle, da sie den ersten Berührungspunkt zwischen Nanoröhre und Zelle bilden.^[92] Die Ummantelung der hydrophoben Kohlenstoffoberfläche mit ssDNA fördert deren Kontaktaufnahme zur Zellmembran dabei zusätzlich, da aufgrund der Anlagerung von Biomolekülen aus der extrazellulären Matrix an Oligomere der Zugang der SWNTs ins Zellinnere durch Proteinerkennung begünstigt wird. Der Weg der Endozytose durch membranverlagernde Vorgänge gilt als wichtigster Aufnahmeweg der meisten Zellarten und wird auch für Nanomaterialien wie SWNTs als vorherrschend

der Mechanismus diskutiert.

Wie in Kapitel 2.4.3 bereits skizziert, besteht eine wesentliche Herausforderung bei Untersuchungen zur Partikelaufnahme in der mangelnden Vergleichbarkeit verschiedener Studien aufgrund uneinheitlicher SWNT-Präparationstechniken. So gibt es bislang kein allgemein akzeptiertes Standardverfahren, um vergleichbare SWNT-Proben zu erhalten. HeLa-Zellen gelten als die am besten erforschte Standardkultur und werden daher gerne für Pilotstudien herangezogen. An diesen prototypischen Epithelzellen findet ein erster Kontakt zwischen Fremdstoffen und dem menschlichen Drüsengewebe statt, was ihre Relevanz in der Forschung zur Partikelaufnahme unterstreicht. Die erfolgreiche Internalisierung von SWNTs in HeLa-Zellen wurde bereits in verschiedenen Studien bestätigt.^[54,84] Aufgrund der mangelnden Standardisierung in der SWNT-Probenpräparation empfiehlt sich die Verwendung von gut etablierten Zellkulturen, um einen Vergleichspunkt zwischen den jeweiligen Studien zu schaffen.

Eine Publikation von Yehia *et al.* befasst sich mit der Lokalisierung von SWNTs nach deren Aufnahme in HeLa-Zellen.^[54] Durch Transmissionselektronenmikroskopie konnten die mit Zellkulturmedium solubilisierten SWNTs in der Plasmamembran, im Zytoplasma, in Endo- und Lysosomen sowie im Golgi-Apparat gefunden und charakterisiert werden. Die endozytotische Aufnahme wird dabei als zeit- und temperaturabhängiger Vorgang beschrieben. Moon *et al.* beschäftigten sich mit dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von ssDNA-SWNTs in HeLa-Zellen.^[84] Dabei wird die Methode der Cy3-Fluoreszenzmarkierung an DNA-Strängen eingesetzt, wobei vor einer Quantifizierung anhand der Emissionsintensität gewarnt wird, da im Gegensatz zu den Resultaten aus Kapitel 4.3.1 eine Nukleaseaktivität in FBS gefunden wurde, welche zu Fehlinterpretation führen könnte.

Neben den Methoden der Transmissionselektronen-, Fluoreszenz- sowie Lichtmikroskopie besteht auch die Möglichkeit, die intrinsischen photo-physikalischen Eigenschaften von SWNTs zu deren Sichtbarmachung in Zellen zu nutzen. Heller *et al.* zeigten beispielsweise Raman-mikroskopische Aufnahmen von ssDNA-SWNT-Konjugaten, die sich als photostabile Langzeitmarker in Zellen erwiesen.^[10]

In dieser Dissertation werden ebenfalls verschiedene Mikroskopietechniken zum Nachweis von endozytiertem ssDNA-SWNT-Material in HeLa-Zellen eingesetzt. Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie erfordert die Verwendung eines externen Farbstoffmarkers, der in Form des Cyaninderivats Cy3 kovalent an die DNA-Stränge gebunden vorliegt. Fluoreszenzsignale der individualisierten Cy3-ssDNA-SWNT-Proben können simultan zu denen der spezifischen Zellfarbstoffe in derselben Objektebene detektiert werden und liefern somit bei gleichzeitigem Vorliegen den Nachweis einer erfolgreichen Aufnahme in die Zellen. Darüber hinaus kann analog zur Raman-Charakterisierung auch die intrinsische Photolumineszenz der (6,5)-SWNTs in Zellbildern aufgezeichnet werden. Die Methode der PL-Mikrospektroskopie bietet neben der Aufnahme einfacher Fluoreszenzspektren auch die Möglichkeit zu zeitaufgelösten Messungen. Die mikrospektroskopischen Ergebnisse sollen genutzt werden, um eine Aussage über den Zustand der ssDNA-SWNT-Konjugate in Zellen zu treffen. Die stark umgebungssensitive Photolumineszenz der (6,5)-SWNTs hilft bei der abschließenden Beurteilung, ob durch zelluläre Aufnahme eine Aggregation des Nanorohrmaterials zu befürchten ist oder ob auch *ex vivo* eine gute Konjugatstabilität gewährleistet bleibt, welche für die Anwendbarkeit von Kohlenstoffnanoröhren in biomedizinischen Aufgaben relevant ist.

5.2 Experimente

Für die Experimente mit Zellkulturen ist die Verwendung ausschließlich steriler individualisierter ssDNA-SWNT-Proben gemäß der Präparation in Kapitel 3.1.4 notwendig. Entsprechend der Mikroskopiemethode kommen unterschiedliche d-(GT)₁₆-Oligomere zum Einsatz. Im Fall der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie sind die DNA-Stränge am 5'-Ende mit Cy3 derivatisiert, wohingegen bei der PL-Mikrospektroskopie unmarkierte Oligomere Verwendung finden.

5.2.1 Zellkulturen

Die Kultivierung von HeLa-Zellen verläuft wie in Kapitel 3.3.3 ausführlich beschrieben. Je nach Experimentplanung werden unterschiedliche Präparationstechniken für die Zellproben eingesetzt. Einfache lichtmikroskopische Aufnahmen können in Lebendzellkammern durchgeführt werden. Hier ist der Einsatz von Zellmarkern aufgrund deren Zytotoxizität nicht möglich, so dass lediglich Weißlichtbilder und die den ssDNA-SWNTs zuzuordnende Cy3-Fluoreszenz gemessen werden können. Konfokale Mikroskopie erfolgt hingegen an fixierten Dauerpräparaten, die eine spezielle Färbung der Zellen erlauben. Für SWNT-Photolumineszenzmessungen in HeLa-Kulturen werden Zellen nach entsprechender Inkubation in Paraformaldehyd fixiert. Tabelle 5.1 gibt die verschiedenen Präparationsmethoden für die jeweilige Anwendung als Übersicht wieder. Eine ausführliche Beschreibung des Umgangs mit den Zellkulturen hinsichtlich ihrer für die entsprechende Mikroskopiemethode benötigten individuellen Präparationsgestalt findet sich in allgemeiner Form in den Kapiteln 3.3.5 und 3.3.6.

Präparat	Einsatz	Zellkultivierung
Lebendzellen	Lichtmikroskopie	in Lebendzellkammern
Dauerpräparate	konfokale Mikroskopie	auf Deckglas in 12-Loch-Platte, anschließend PFA-Fixierung, Färben der Zellen und Eindecken
Fixierte Zellen	PL-Mikroskopie	in Lebendzellkammern, anschließend PFA-Fixierung
	PL-Spektroskopie	auf Deckglas Stärke 0

Tabelle 5.1: Übersicht der verschiedenen Zellpräparationsmethoden je nach Art der Mikroskopie.

Die Zellsuspension wird in einer Konzentration von 250 Zellen/ μl in die dem jeweiligen Experiment entsprechende Vorrichtung gegeben und für 8 h unter Kultivierungsbedingungen bis zur Ausbildung eines adhärennten Zellrasens aufbewahrt. Die in den verschiedenen Präparationsmethoden eingesetzten Volumina und die Gesamtzahl an Zellen sowie die Menge an zusätzlichem Medium zur vollständigen Bedeckung der Bodenfläche sind Tabelle 5.2 zu

Präparat	Volumen der Zellsuspension	Volumen des Mediums	Gesamtanzahl an Zellen
Lebendzellen	100 μ l	0.2 ml	5×10^4
Dauerpräparate	500 μ l	1.0 ml	1.25×10^5
Fixierte Zellen (PL-Mikroskopie)	200 μ l	×	5×10^4
Fixierte Zellen (PL-Spektroskopie)	400 μ l	×	1×10^5

Tabelle 5.2: Zusammensetzung der Zellpräparate für die verschiedenen Mikroskopietechniken.

entnehmen.

Die adhärenenten HeLa-Zellen werden für 18 h mit ssDNA-SWNTs bzw. Cy3-ssDNA-SWNTs inkubiert. Die optischen Dichten der jeweiligen Nanorohrproben liegen dabei im Bereich zwischen 0.05 und 0.13, die Volumina richten sich nach Ansatzgröße und werden für alle Präparate in Tabelle 5.3 gezeigt.

Präparat	Volumen der ssDNA-SWNTs	optische Dichte
Lebendzellen	10 μ l	0.13
Dauerpräparate	20 μ l	0.13
Fixierte Zellen (PL-Mikroskopie)	20 μ l	0.07
Fixierte Zellen (PL-Spektroskopie)	10 μ l	0.05

Tabelle 5.3: Verwendete ssDNA-SWNT-Mengen und optische Dichten.

Zur Färbung der Dauerpräparate kommen neben Cy3 die spezifischen Zellmarker Hoechst und Phalloidin 647 zum Einsatz. Die Durchführung der Zellfärbung ist ebenfalls im Kapitel 3.3.5 methodisch und praktisch erklärt.

5.2.2 Mikroskopie

Die Mikroskopie der Lebendzellen sowie die konfokale Fluoreszenzmikroskopie gefärbter Dauerpräparate erfolgt im Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Rudel.

Um eine Aussage über die effektive Aufnahme von Kohlenstoffnanoröhren in HeLa-Zellen treffen zu können, benötigt es die Durchführung verschiedener Kontrollexperimente. In beiden Präparationsmethoden werden daher neben Cy3-ssDNA-SWNT-Konjugaten auch unmarkierte ssDNA-SWNT-Proben sowie Cy3-ssDNA ohne SWNTs zur Inkubation der HeLa-Kulturen herangezogen. Tabelle 5.4 zeigt die experimentellen Ansätze zur Weißlicht- und Konfokalmikroskopie in Übersicht.

Präparat	unbehandelt	Cy3-ssDNA	unmarkierte ssDNA-SWNT	Cy3-ssDNA-SWNT
Lebendzellen	×	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Dauerpräparat	×	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Tabelle 5.4: Ansatzgröße für die Weißlicht- und Konfokalmikroskopie.

Die erhaltenen Aufnahmen lassen sich mit der frei zugänglichen Software ImageJ bearbeiten und auswerten.

5.2.3 Mikrospektroskopie

Für den Aufbau zu mikrospektroskopischen Aufnahmen der SWNT-Photolumineszenz sei an dieser Stelle auf eine vorangegangene Dissertation verwiesen. Eine Zusammenfassung findet sich im Methodenkapitel 3.3.6.^[23] Für die Interpretation der Resultate sind Vergleichsexperimente mit Referenzproben notwendig. Dazu werden ssDNA-SWNT-Dispersionen durch Zentrifugenfiltration von PBS befreit und durch kurze Behandlung mit Ultraschall im gleichen Volumen an Vollmedium resuspendiert. Diese Probe dient als Referenz für die spektroskopische Charakterisierung von ssDNA-

SWNTs außerhalb von Zellen mit Medium als äußere Umgebung. In einer weiteren Kontrollprobe wird die pH-Umgebung im Medium mit verdünnter Salzsäure auf einen Wert von 4 eingestellt. Die verschiedenen ssDNA-SWNT-Dispersionen werden mit ihrer mikrospektroskopischen Verwendung in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

ssDNA-SWNTs	Anwendung
in PBS	PL-Mikroskopie und -Spektroskopie in HeLa
in Medium pH 7.4	Referenz für PL-Spektroskopie außerhalb HeLa
in Medium pH 4	Referenz für PL-Spektroskopie außerhalb HeLa

Tabelle 5.5: Experimente zur PL-Mikrospektroskopie.

5.3 Ergebnisse und Interpretation

5.3.1 Mikroskopie in HeLa-Zellen

Bevor mikroskopische Aufnahmen von SWNT-behandelten HeLa-Zellen gemacht werden, sollen zunächst einfache Weißlichtbilder mit unfixierten lebenden Zellen gezeigt werden. In Abbildung 5.1 finden sich dazu Mikroskopbilder zur Unterscheidung von lebendigen und abgestorbenen Zellen. Der Unterschied in der Zellvitalität ist deutlich durch deren Form erkennbar, da sich typische HeLa-Strukturen mit dem apoptotischen Zelltod von dreieckig nach abgerundet ändern. Das Sterben der Zellen unter Mikroskopierbedingungen ist auf die Arbeitstemperatur von etwa 20 °C anstelle der üblichen Kultivierungsbedingungen von 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre zurückzuführen. Durch zügiges Arbeiten ist es möglich, lebendige Zellen über einen Zeitraum von ca. 30 min bis 1 h zu mikroskopieren.

In sämtlichen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wird der einheitliche Farbcode blau und grün für die beiden Zellmarker Hoechst und Phalloidin sowie pink für Cy3 als ssDNA-SWNT-Marker verwendet. Die jeweiligen gefärbten Bereiche können entsprechend Tabelle 5.6 den Regionen Zellkern, Zytoskelett und SWNTs zugeordnet werden.

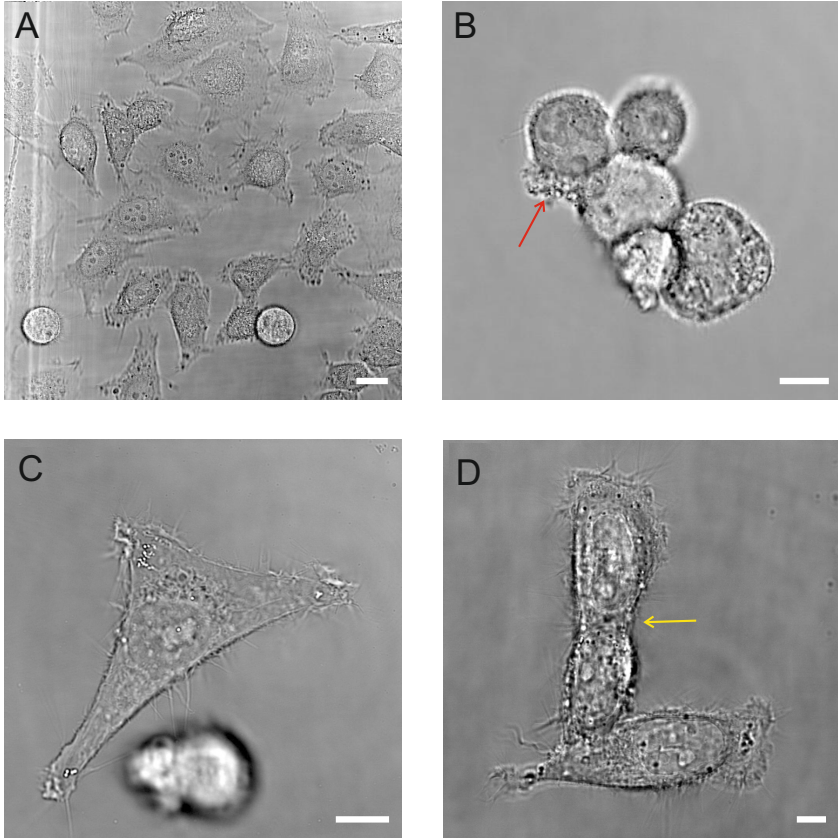


Abbildung 5.1: Weißlichtaufnahmen von HeLa-Zellen. A) Übersichtsbild mit lebendigen und toten Zellen. B) Mehrere tote Zellen. Markiert ist eine Stelle, an der das Zellinnere aufgrund von Apoptose ausläuft. C) Typische dreieckige Struktur einer lebendigen HeLa-Zelle. Im Vordergrund ist eine tote Zelle sichtbar. D) Lebendige HeLa-Zellen bei der Zellteilung. Markiert ist die Stelle, an der sich die Zellmembran unter Ausbildung zweier neuen Zellen zusammenschnürt. Der Maßstabsbalken stellt 10 μm dar.

Darstellung	Marker	Interpretation
blau	Hoechst	Zellnuklei
grün	Phalloidin 647	Aktinfilamente im Zytoskelett
pink	Cy3	ssDNA-SWNTs

Tabelle 5.6: Verwendeter Farbcode in sämtlichen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

In darauffolgenden PL-mikroskopischen Bilder, in denen ausschließlich die intrinsische SWNT-Fluoreszenz im Nahinfraroten anstelle von Zellmarkern detektiert werden kann, ist die Farbe pink ebenfalls für ssDNA-SWNT kodiert.

Die Abbildungen 5.2 und 5.3 liefern einen direkten Vergleich zwischen Weißlichtaufnahmen und Fluoreszenzmessungen der unterschiedlich behandelten HeLa-Zellen.

Die Kontrollexperimente umfassen zum einen unbehandelte Zellen, zum anderen sind HeLa-Kulturen mit Cy3-ssDNA bzw. mit unmarkierten ssDNA-SWNTs inkubiert. Die Ansätze ohne Cy3-Marker dienen dem Nachweis, dass die im entsprechenden Kanal detektierte Fluoreszenz tatsächlich auf den Farbstoff zurückzuführen ist und nicht eine unspezifische Autofluoreszenz der Zellen bzw. Effekte durch SWNTs widerspiegelt. Sowohl die unbehandelte Probe als auch die mit unmarkierten ssDNA-SWNTs inkubierten HeLa-Zellen zeigen weder in der Überlagerung von Weißlichtaufnahme und Cy3-Intensität noch im konfokalen Bild eine derartige Fluoreszenz. Mit markierten Oligomeren können im nicht-konfokalen Mikroskopiebetrieb in den Lebendzellen Cy3-Fluoreszenzen in Zellumgebung detektiert werden. Die negative Kontrolle mit dem gefärbten Dauerpräparat zeigt im Konfokalbild hingegen ein Ausbleiben solcher Intensitäten. Der direkte Vergleich zwischen den beiden Aufnahmemodi spricht dafür, dass sich Cy3-ssDNA-Oligomere zwar in Zellnähe anlagern, allerdings nicht in derselben Ebene mit den Zellen nachgewiesen werden können. Die mit Cy3-ssDNA-SWNTs inkubierten Zellen zeigen in beiden Mikroskopiearten deutliche Fluoreszenzintensitäten. Durch die konfokale Messweise kann bewiesen werden, dass sich Cy3 und somit auch die Kohlenstoffnanorohrderivate tatsächlich im Zellinneren befinden. Folglich muss

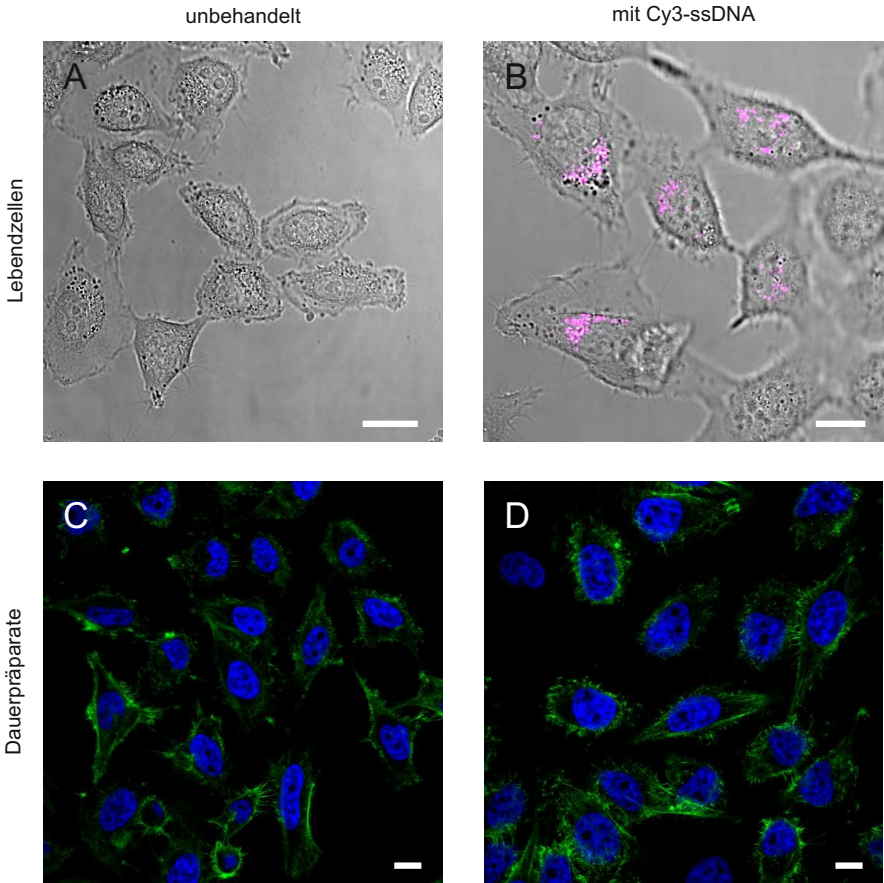


Abbildung 5.2: Weißlicht- und konfokale Aufnahmen in HeLa-Lebendzellen und gefärbten Dauerpräparaten. Bei den hier gezeigten Ansätzen handelt es sich um verschiedene Kontrollexperimente, die mit unbehandelten sowie mit Cy3-ssDNA inkubierten Zellen durchgeführt werden. Während im Fall der unbehandelten Probe in beiden Mikroskopiearten keine Intensität im Cy3-Kanal detektiert wird, zeigt die Cy3-ssDNA-Probe im Weißlichtbild die entsprechende Fluoreszenz. Aus dem Vergleich mit dem konfokalen Bild des Dauerpräparates wird jedoch ersichtlich, dass sich Cy3 nicht in den Zellen befindet, sondern lediglich in Zellnähe. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

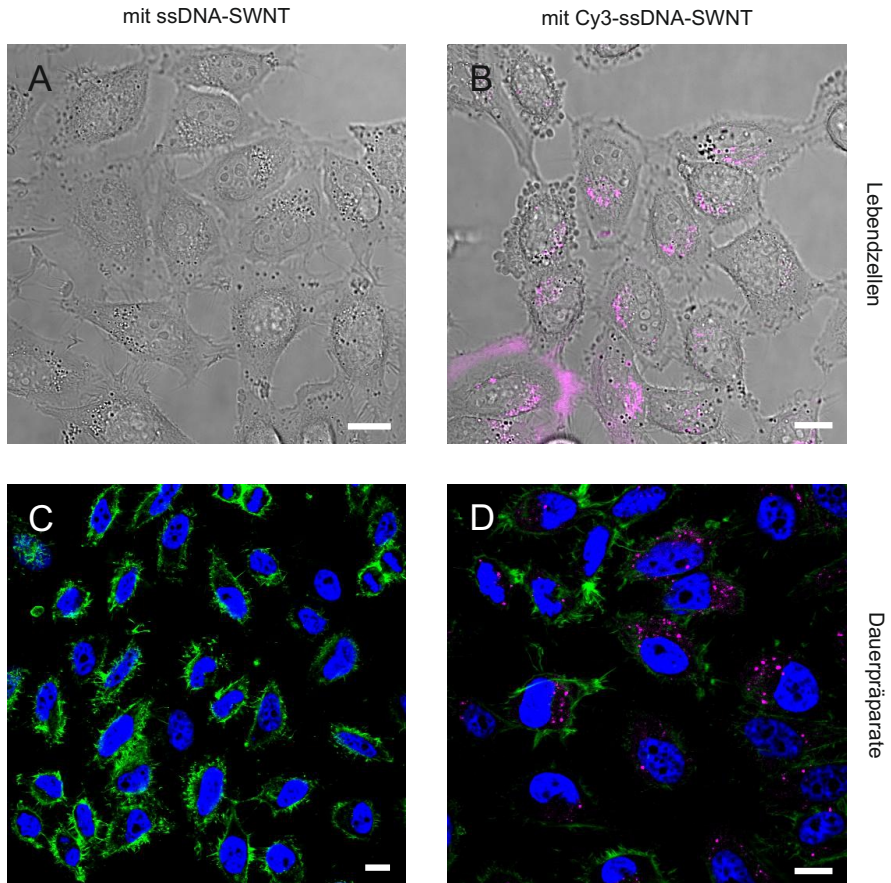


Abbildung 5.3: Weißlicht- und konfokale Aufnahmen in HeLa-Lebendzellen und gefärbten Dauerpräparaten. Diese beiden Ansätze zeigen zum einen ein weiteres Kontrollexperiment, in welchem die Zellen mit unmarkierten ssDNA-SWNTs inkubiert sind und welches erwartungsgemäß keine Cy3-Fluoreszenz aufweist. Zum anderen ist aus dem eigentlichen Experiment mit Cy3-ssDNA-SWNTs ersichtlich, dass die markierten Nanoröhren in die Zelle aufgenommen sein müssen, da sowohl im Weißlicht- als auch im konfokalen Fluoreszenzbild Cy3 detektiert wird. Ein Vergleich mit Abbildung 5.2 legt nahe, dass SWNTs erfolgreich aufgenommen werden. Der Maßstabsbalken steht für 10 μm .

eine Aufnahme der ssDNA-SWNTs durch Endozytose oder ähnliche Mechanismen stattgefunden haben.

Tabelle 5.7 fasst die Ergebnisse der Abbildungen 5.2 und 5.3 zusammen.

Zellprobe	Mikroskopie	
	Weißlicht	konfokal
unbehandelt	-	-
Cy3-ssDNA	+	-
ssDNA-SWNT	-	-
Cy3-ssDNA-SWNT	+	+

Tabelle 5.7: Ergebnisse aus Weißlicht- und Konfokalmikroskopie von HeLa-Zellen. Unbehandelte sowie mit Cy3-ssDNA bzw. ssDNA-SWNT inkubierte Zellen dienen als Kontrolle zum Experiment mit Cy3-ssDNA-SWNT behandelten HeLa-Zellen. Die Angaben „+“ und „-“ beziehen sich auf das Auftreten von Cy3-Fluoreszenz.

Weitere konfokale Bilder, die eine erfolgreiche Aufnahme von Cy3-ssDNA-SWNTs in die Zellen belegen, werden in Abbildung 5.4 gezeigt. Auffällig ist dabei eine verstärkte Lokalisierung der Nanoröhren in Zellkernnähe. Erklären lässt sich diese Beobachtung durch den räumlichen Aufbau der Zellen. Da es sich bei HeLa-Zellen nicht um flache Strukturen, sondern vielmehr um pyramidale Konstrukte mit dem Nukleus als Zentrum handelt, ist verständlich, dass sich vorzugsweise in Kernnähe ausreichend Platz für eine SWNT-Anreicherung findet. Dieser Effekt wird auch mit der konfokalen Messmethode, bei der die Cy3-Fluoreszenzintensität aus nur einer Objektebene detektiert wird, sichtbar. Abbildung 5.5 veranschaulicht diesen Erkläransatz für die verstärkte Lokalisierung markierter ssDNA-SWNT-Konjugate in Nähe des Zellkerns.

Nachdem der Nachweis für eine effektive Aufnahme individualisierter ssDNA-SWNT-Konjugate in HeLa-Zellen anhand der konfokalen Aufnahmen erbracht ist, können Mikroskopiemessungen der (6,5)-SWNT-Nahinfrarotfluoreszenz in Zellen durchgeführt werden. Hier ist wie auch in den Weißlichtaufnahmen mit Lebendzellen kein konfokaler Betrieb der NIR-Fluoreszenz und dem optischen Mikroskopiebild möglich. Erste Messungen im NIR-Fluoreszenzmikroskop werden mit einem 20x Objektiv

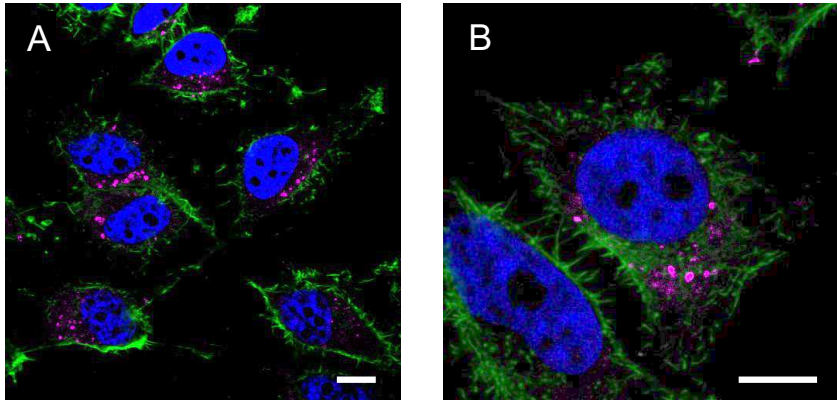


Abbildung 5.4: Weitere konfokale Aufnahmen von Cy3-ssDNA-SWNTs in HeLa-Zellen mit verschiedenen Vergrößerungen. Die Anreicherung von markierten ssDNA-SWNTs in den Zellen ist durch die Cy3-Fluoreszenz deutlich sichtbar. Der Maßstabsbalken zeigt jeweils 10 μm .

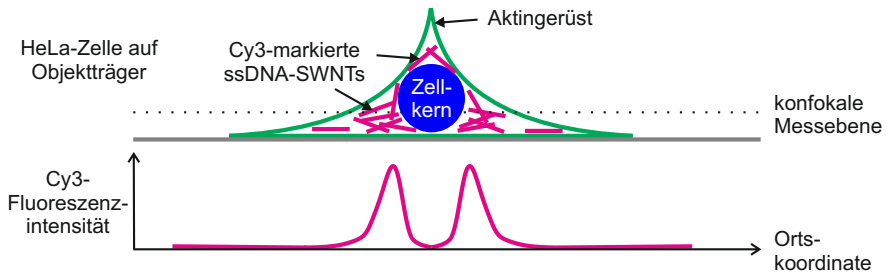


Abbildung 5.5: Verteilung der Cy3-Fluoreszenzintensität innerhalb einer Objektebene einer HeLa-Zelle. Aufgrund der räumlichen Struktur bietet sich in Zellkernnähe ausreichend Platz für eine vermehrte Anreicherung der Cy3-ssDNA-SWNTs, welche sich in der konfokalen Messmethode durch eine Erhöhung der Cy3-Fluoreszenzintensität um den Nukleus herum vergleichen mit der Zellperipherie auswirkt.

durchgeführt, welches eine gute Übersicht über die Zellprobe bietet und die PL-mikroskopische Nachweismöglichkeit von unmarkierten ssDNA-SWNTs in zellulären Strukturen demonstriert. Allerdings wird eine genauere spektroskopische Untersuchung erschwert, da mit der geringen numerischen Apertur des Objektivs nur ein geringer Anteil des emittierten Lichts zum Detektor geleitet wird. Abbildung 5.6 gibt eine Auswahl an NIR-Bildern in Überlagerung mit einfachen Weißlichtaufnahmen. Die Photolumineszenz der Nanoröhren im Nahinfrarotbereich lässt sich in guter Übereinstimmung mit den Zellstrukturen lokalisieren.

Anhand der Aufnahmen kann gezeigt werden, dass SWNTs mit der Methode der NIR-PL-Mikroskopie auch direkt nachgewiesen werden können.

5.3.2 Spektroskopie in HeLa-Zellen

Detaillierte spektroskopische Untersuchungen von SWNTs in HeLa-Zellen werden unter Verwendung eines 100x Objektivs mit einer hohen numerischen Apertur von 1.49 unter Verminderung der Integrationsdauer und Verbesserung der Fluoreszenzsensitivität im Vergleich zum zuvor eingesetzten Objektiv mit 20facher Vergrößerung ermöglicht. Die Auflösung der Bilder im sichtbaren Spektralbereich leidet zwar unter der Optimierung des PL-Mikroskops für den NIR-Bereich, dennoch sind zelluläre Strukturen eindeutig erkennbar und stehen in guter Übereinstimmung mit der lokalen Photolumineszenzverteilung der SWNTs. Eine Auswahl repräsentativer PL-Spektren und zeitaufgelöster Fluoreszenzabklingkurven wird in den Abbildungen 5.7 sowie 5.8 gegeben.

Demnach kann die Verteilung der ssDNA-SWNT-Konjugate in HeLa-Zellen anhand der Nanorohrfluoreszenz gemessen werden. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der PL-spektroskopischen Charakterisierung der (6,5)-Kohlenstoffnanoröhren. Photolumineszenzmessungen an verschiedenen Stellen werden mit dem Ergebnis einer Referenzprobe individualisierter ssDNA-SWNT-Konjugate in Kultivierungsmedium außerhalb von Zellen verglichen. Auffällig ist die unterschiedlich stark ausgeprägte Verbreiterung des PL-Maximums in HeLa-Zellen gegenüber der Referenz. Im Mittelwert liegt die Halbwertsbreite der PL-Bande bei 43.1 nm und ist somit nach Aufnahme

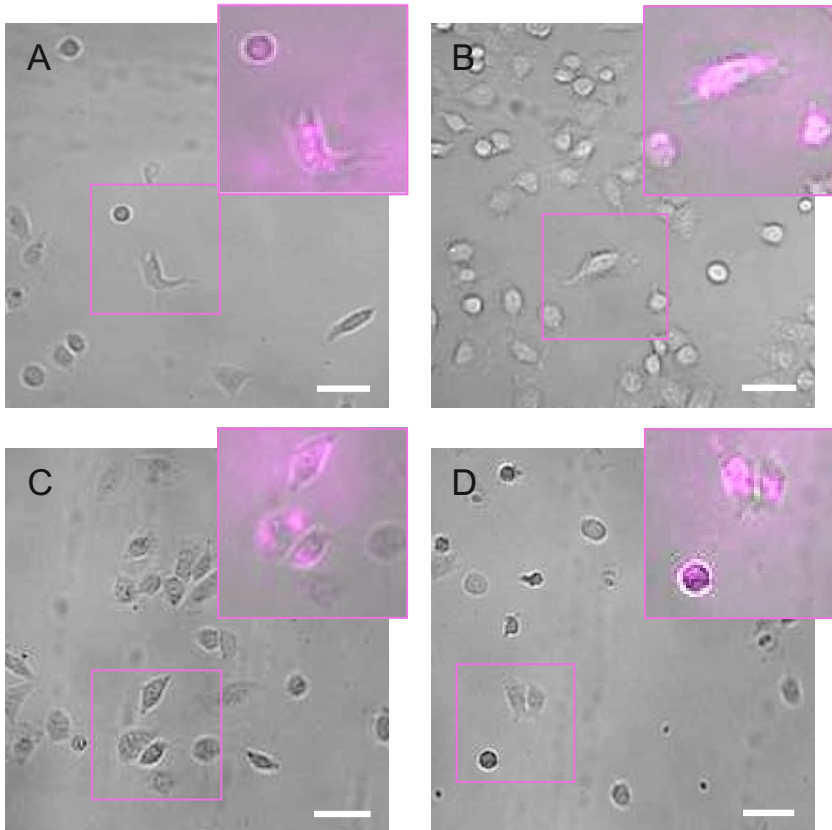


Abbildung 5.6: Überlagerung von Weißlichtbildern und Nahinfrarotaufnahmen von unmarkierten ssDNA-SWNTs in HeLa-Zellen. Nanoröhren lassen sich sowohl in lebendigen als auch in toten Zellen nachweisen, wobei der Zelltod auch hier auf die Mikroskopierbedingungen zurückzuführen ist. Die NIR-Bilder sind mit einem 20x Objektiv aufgenommen. Die Maßstäbchen zeigen jeweils 50 µm.

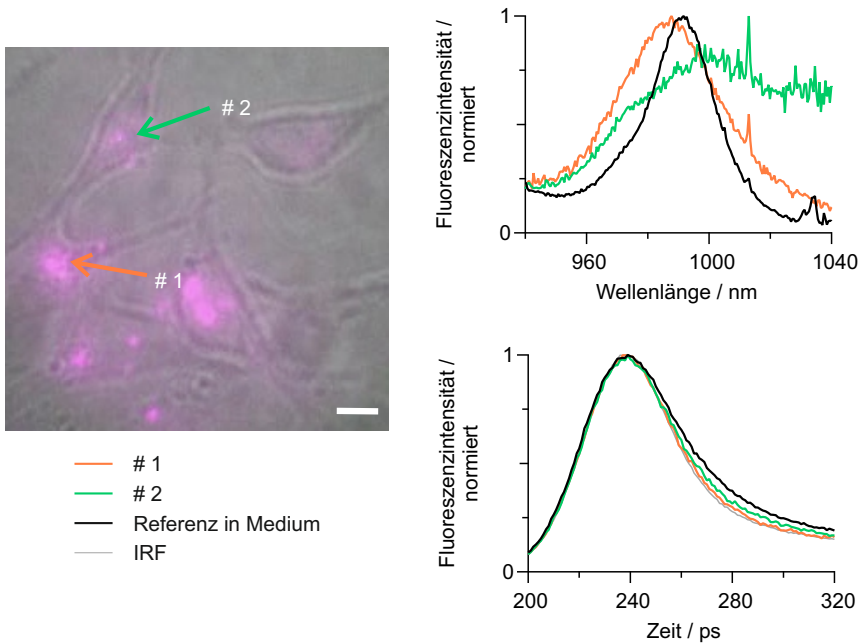


Abbildung 5.7: Spektroskopische Untersuchung von SWNTs in HeLa-Zellen. Die Verteilung der ssDNA-SWNT-Konjugate kann durch deren Photolumineszenz sichtbar gemacht werden und stimmt gut mit den Zellstrukturen überein. Repräsentative PL-Spektren und die zugehörigen TCSPC-Daten sind für zwei ausgewählte Punkte gezeigt. Das PL-Maximum kann demnach sowohl rot- als blauverschoben bezüglich der Referenz außerhalb von Zellen vorliegen. Die Fluoreszenzabklingkurven von SWNTs in Zellen weisen auf die Tendenz zu verkürzten PL-Lebensdauern hin. Der Maßstabsbalken steht für 10 μm .

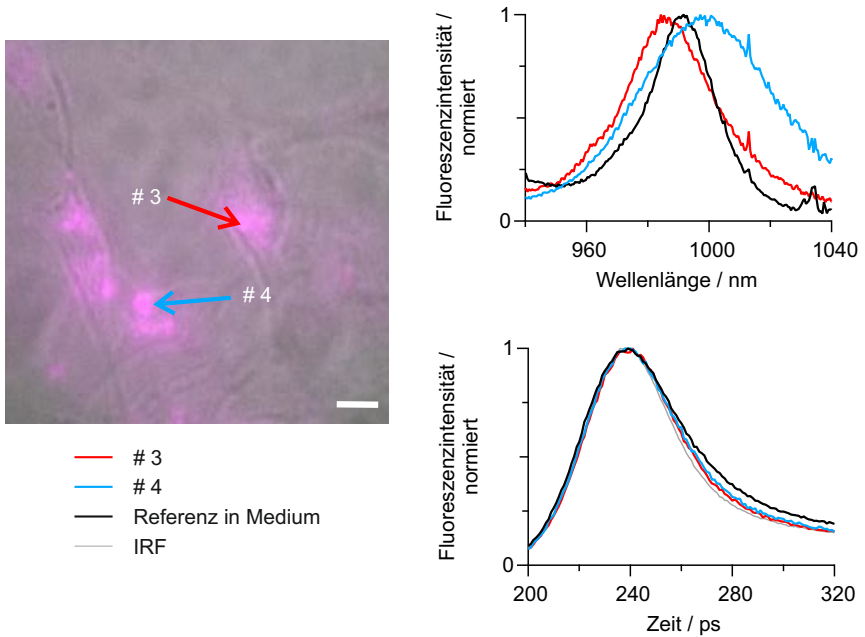


Abbildung 5.8: Weitere spektroskopische Untersuchungen von SWNTs in HeLa-Zellen, die ssDNA-SWNTs anhand ihrer Photolumineszenz im Zellinneren lokalisieren. Auch hier werden zwei Messpunkte mit repräsentativen PL- und TCSPC-Daten herausgegriffen. Der Trend aus Abbildung 5.7 lässt sich demnach bestätigen. Der Maßstabsbalken zeigt 10 μm an.

in Zellen um knapp 20 nm verbreitert. Bezüglich der energetischen Lage der maximalen Photolumineszenz kann kein einheitliches Verhalten festgestellt werden. Es werden sowohl blau- als auch rotverschobene Banden beobachtet. Das Referenzspektrum in Medium zeigt ein PL-Maximum um 993 nm, die durchschnittliche Verschiebung der SWNT-Photolumineszenz in HeLa-Zellen um etwa 1.5 nm in den langwelligeren Bereich ist im Vergleich dazu nur sehr gering. Die Auswertung der TCSPC-Daten zeigt dagegen eine klare Tendenz zu verkürzten SWNT-Fluoreszenzlebensdauern in HeLa verglichen mit den Referenzdaten außerhalb von Zellen. Die mittleren PL-Lebensdauern liegen bei 5.9 ps für internalisierte SWNTs. Demgegenüber steht der Wert von 13.2 ps für die Referenzprobe. Die Abbildungen 5.7 und 5.8 zeigen nur eine Auswahl von vier repräsentativen Spektren. Die Ergebnisse aus der Gesamtheit von zehn Messungen werden in Abbildung 5.9 zusammengefasst.

Die Verbreiterung der PL-Bande um etwa 20 nm und die Verkürzung der SWNT-Fluoreszenzlebensdauern von 13.2 ps außerhalb auf durchschnittliche 5.9 ps in HeLa-Zellen lassen auf den ersten Blick eine Aggregation der Nanoröhren vermuten. Allerdings lässt sich die nur geringfügige Verschiebung der energetischen Lage des PL-Maximums unter Berücksichtigung von Aggregation allein nicht erklären. Somit müssen weitere Umgebungseinflüsse für das Verständnis der spektralen Veränderungen in Betracht gezogen werden. Da Partikel im Verlauf einer endozytotischen Aufnahme in Endosome transportiert werden, liegt die Vermutung auf eine Beeinflussung durch den pH-Wert nahe. Je nach Stadium der endosomalen Kompartimente werden schwach saure Bereiche bis etwa pH 4.5 erreicht. Um den pH-Effekt zu überprüfen, wird eine Referenzprobe mit ssDNA-SWNTs in Medium auf eine leicht saure Umgebung eingestellt. Abbildung 5.10 vergleicht die spektroskopischen Resultate der beiden Referenzproben unterschiedlicher pH-Werte.

Aus dem Vergleich zwischen den beiden Messungen der Referenzproben von ssDNA-SWNT-Konjugaten in Kultivierungsmedium mit einem pH-Wert von 4 bzw. 7 folgen eine geringe Rotverschiebung und Bandenverbreiterung beim Übergang von neutraler zu schwach saurer Umgebung. Die PL-Lebensdauer verkürzt sich in pH 4 deutlich im Vergleich zur Referenz bei pH 7, wie sich aus den Fluoreszenzabklingkurven erkennen lässt. Die erhaltenen Werte für

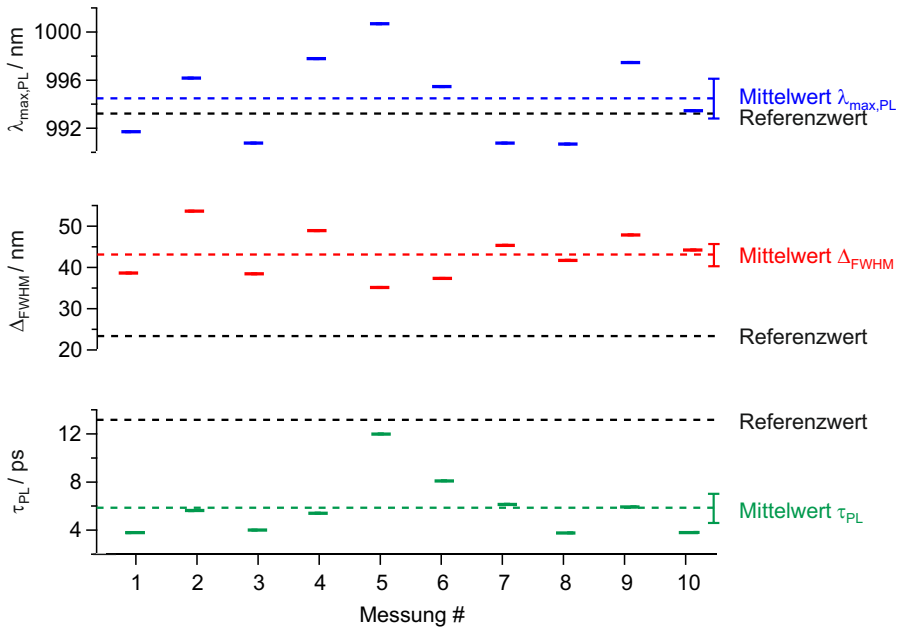


Abbildung 5.9: Zusammenfassung der spektroskopischen Ergebnisse von ssDNA-SWNT-Konjugaten in HeLa-Zellen aller Messung. Die Mittelwerte für $\lambda_{\text{max,PL}}$ (blau gestrichelt), Δ_{FWHM} (rot gestrichelt) und τ_{PL} (grün gestrichelt) werden aus zehn Einzelmessungen gebildet und mit Referenzwerten (schwarz gestrichelt) von ssDNA-SWNT in Medium verglichen. Die Standardabweichungen werden als vertikale Fehlerbalken angegeben. Nur im Fall der energetischen Lage des PL-Maximums liegt der Referenzwert im Rahmen der Standardabweichung. Halbwertsbreite und Fluoreszenzlebensdauer zeigen hingegen eine deutliche Abweichung des Mittelwerts von SWNTs in HeLa von der Referenz mit Nanoröhren außerhalb von Zellen.

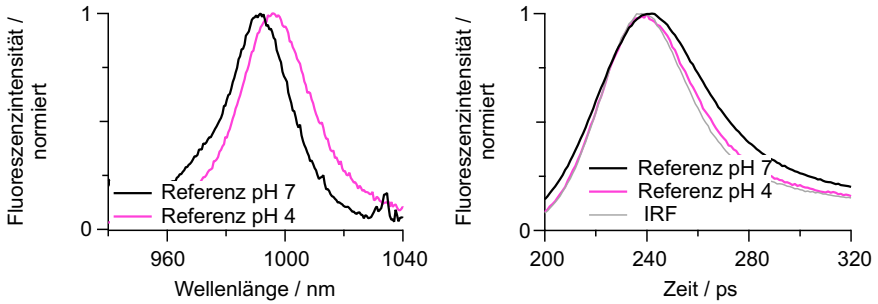


Abbildung 5.10: Spektroskopischer Vergleich der Referenzproben in Medium mit pH 7 und pH 4. Es zeigen sich eine leichte Rotverschiebung des PL-Maximums mit einer geringfügigen Bandenverbreiterung im Medium mit schwach saurem pH-Wert. Die Fluoreszenzablinkkurven zeigen einen deutlichen Unterschied, woraus sich verkürzte PL-Lebensdauern bei der Referenz mit pH 4 verglichen mit pH 7 ergeben.

die Wellenlänge der maximalen Photolumineszenz, die Halbwertbreite und die Fluoreszenzlebensdauern werden in Tabelle 5.8 für die unterschiedlichen pH-Werte zusammengefasst und den Mittelwerten endozytierter ssDNA-SWNTs gegenübergestellt.

ssDNA-SWNT-Probe	$\lambda_{\text{max,PL}} / \text{nm}$	$\Delta_{\text{FWHM}} / \text{nm}$	$\tau_{\text{PL}} / \text{ps}$
Ø in HeLa	994.4	43.1	5.9
in Medium pH 7.4	993.2	23.4	13.2
in Medium pH 4	995.7	31.1	5.9

Tabelle 5.8: Spektrale Daten von endozytierten ssDNA-SWNT-Konjugaten gegenüber Referenzmaterialien in Medium bei pH 7.4 und pH 4.

Während bei der Referenz in Medium mit einem sauren pH-Wert von 4 eine stärkere Rotverschiebung des PL-Maximums auszumachen ist als bei den Nanorohr-Konjugaten in HeLa-Zellen, wird auch hier eine deutliche, obgleich schwächere Zunahme der Halbwertbreite sichtbar. Die Fluoreszenzlebensdauer ist hingegen identisch mit dem Mittelwert des endozytierten SWNT-Materials. Aus den Daten wird deutlich, dass eine Berücksichtigung der pH-Umgebung zum Verständnis der spektralen Veränderungen zwar ge-

rechtfertigt, allerdings nicht zu deren vollständigen Erklärung ausreichend ist.

Als Ergebnis lässt sich damit festhalten, dass weder eine Aggregation von ssDNA-SWNT-Konjugaten noch eine Beeinflussung durch den zelltypischen pH-Wert eine hinlängliche Erklärung der spektralen Veränderungen liefert. Gegenüber einer möglichen Aggregation unter Zellkulturbedingungen zeigen individualisierte ssDNA-SWNT-Strukturen gemäß Kapitel 4 eine zufriedenstellende Stabilität in physiologischer Umgebung. Dies steht in Übereinstimmung mit dem hier gefundenem Resultat, dass die spektralen Unterschiede nicht allein durch das Auftreten von SWNT-Aggregation unter Verminderung der ssDNA-SWNT-Konjugatintegrität durch Umgebungseinflüsse verantwortet werden. Vielmehr muss der Interpretationsansatz um die Berücksichtigung der räumlichen Nähe mehrerer SWNTs untereinander erweitert werden. Um eine quantitative Vorstellung über die pro Zelle aufgenommenen ssDNA-SWNTs zu gewinnen, benötigt es die in Tabelle 5.9 zusammengestellten Daten.

Größe	Wert
optische Dichte	0.05
Halbwertsbreite	38 nm
Volumen an ssDNA-SWNT	10 μ l
Länge der SWNTs	250 nm
Anzahl an C-Atomen in (6,5)-SWNTs	88.48 Atome / nm
Anzahl an Zellen	1 x 10 ⁵

Tabelle 5.9: Verwendete Daten zur Abschätzung der SWNT-Menge in HeLa-Zellen.

Aus optischer Dichte, Halbwertsbreite und dem Volumen an eingesetzter ssDNA-SWNT-Lösung erhält man gemäß Formel 2.1 eine Stoffmenge an Kohlenstoffatomen von etwa 10^{-10} mol. Mit einer durchschnittlichen SWNT-Länge von 250 nm und einem für (6,5)-Röhren typischen Wert von 88.48 C-Atomen / nm ergeben sich 2.7×10^9 SWNTs im verwendeten Inkubations-

volumen. Daraus resultiert eine durchschnittliche maximale Anzahl an Kohlenstoffnanoröhren pro Zelle von 3×10^4 . Auch wenn davon ausgegangen werden kann, dass nicht das gesamte SWNT-Material endozytiert wird, so ist ersichtlich, dass sich in einem Endosom nicht nur vereinzelte, sondern eine Vielzahl an ssDNA-SWNTs befindet. Die Größe von Endosomen wird mit einer breiten Verteilung von 100 nm bis 1 μ m angegeben, welche ausreichend Platz für die Ansammlung mehrerer Partikel bietet.^[94,95] Die den unter Zellbedingungen stabilen ssDNA-SWNTs dadurch aufgezwungene räumliche Nähe innerhalb eines Endosoms birgt die Gefahr, eine Aggregation vorzutauschen, da sich die unmittelbare SWNT-Umgebung durch Wechselwirkungen untereinander verändern kann.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Das zweite Projekt dieser Dissertation befasste sich mit dem Verhalten individualisierter ssDNA-SWNT-Konjugate nach deren Internalisierung in HeLa-Zellen. Dabei galt es, die umgebungssensitiven photophysikalischen Eigenschaften der Nanoröhren *ex vivo* zu untersuchen und auf das Vorliegen möglicher SWNT-Aggregation hin zu prüfen.

Verschiedene Mikroskopietechniken dienten einem ersten Nachweis und der Charakterisierung von ssDNA-SWNT-Strukturen in Zellen. Dabei kamen verschiedene Präparationstechniken zum Einsatz, um Kohlenstoffnanoröhren in Lebendzellen, gefärbten Dauerpräparaten sowie fixierten HeLa-Zellen mittels Weißlicht-, konfokaler Fluoreszenz- und NIR-PL-Mikroskopie sichtbar zu machen. Durch einen direkten Vergleich von Weißlichtmikroskopie und konfokalen Aufnahmen mit speziellen Zellmarkern konnte gegenüber entsprechenden Kontrollexperimenten nachgewiesen werden, dass sich Cy3-markierte ssDNA-SWNTs in HeLa-Zellen anreichern. Auch die spezifische Nahinfrarotfluoreszenz von (6,5)-chiralen SWNTs eignete sich zu deren mikroskopischen Lokalisierung.

Eine genauere Charakterisierung der Nanoröhren erfolgte durch die Methode der PL-Mikrospektroskopie. Das Fluoreszenzverhalten der ssDNA-SWNT-

Konjugate nach Aufnahme in Zellen wurde hinsichtlich der energetischen Lage des PL-Maximums, dessen Halbwertsbreite und PL-Lebensdauer untersucht. Die dabei auftretenden spektralen Veränderungen konnten weder eindeutig auf das Vorliegen von SWNT-Aggregaten noch auf eine pH-Beeinflussung gemäß der in Endosomen vorhandenen Umgebung allein zurückgeführt werden. Eine einfache Berechnung der für eine endozytotische Aufnahme in Frage kommenden SWNT-Menge legt den Schluss nahe, dass in einem Endosom eine große Anzahl an ssDNA-SWNTs transportiert wird und durch deren gegenseitige Nähe eine Änderung der elektronischen Umgebung stattfindet, die sich wiederum auf die optischen Eigenschaften auswirkt. Auch wenn eine Bündelung von ssDNA-SWNTs in geringem Maß anzunehmen ist, so kann in Einklang mit dem Befund aus Kapitel 4 zur physiologischen Konjugatstabilität eine vollständige SWNT-Aggregation als Grund für spektrale Veränderungen ausgeschlossen werden.

Mit diesen Ergebnissen kann individualisierten ssDNA-SWNT-Konjugaten erstmals auch *ex vivo* eine gute Verträglichkeit im Kontakt mit zellulären Strukturen attestiert werden, was neben ihrer Biokompatibilität einen weiteren wichtigen Schritt zum Einsatz von Nanoröhren als Wirkstofftransporter darstellt.

6 Funktionalisierung von DNA-Kohlenstoffnanorohr-Konjugaten

Ein häufig genutztes Anwendungsgebiet für biokompatible Kohlenstoffnanoröhren, denen der Zugang zu Zellen gewährt ist, findet sich im Einsatz als Transportsystem zur Vermittlung einer zellulären Aufnahme spezieller Moleküle. Im Rahmen des Projekts zur Funktionalisierung von ssDNA-SWNT-Konjugaten werden neuartige Routen zur Kupplung von Fluorophoren an DNA-Stränge untersucht. Die Entwicklung eines Transportsystems auf Basis der untersuchten Konjugate stellt nach den zuvor gewonnenen Kenntnissen zur Biokompatibilität und zum *ex vivo*-Verhalten einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur biomedizinischen Verwendung von SWNTs dar.

6.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Aufgrund ihres außergewöhnlichen Aspektverhältnisses werden Kohlenstoffnanoröhren als Vektor zum Transport bestimmter Moleküle in Zellen in Betracht gezogen. Die Möglichkeit einer hohen Oberflächenbeladung soll dabei genutzt werden, um Wirkstoffe in hohen Konzentrationen spezifisch ins Innere von Targetzellen einzuschleusen. Eine der am meisten umforschten Varianten zur Beladung von SWNTs mit Agenzien besteht in der kovalenten Modifikation der Nanorohroberfläche.

In Studien von Kam *et al.* konnte gezeigt werden, dass SWNTs zum Transport von sehr großen Molekülen geeignet sind.^[14] Dabei wurden Proteine mit

einem Molekulargewicht von 60 kDa durch kovalente Verknüpfung an Nanoröhren erfolgreich in Zellen transportiert. Um eine Selektivität gegen bestimmte Zelltypen, in der Regel Krebszellen, zu erhalten, bedarf es den Einsatz spezieller Moleküle, die gegen zelltypische Rezeptoren gerichtet sind. Diese Agonisten können ebenso kovalent an die SWNTs gekuppelt werden wie der eigentliche Wirkstoff. Sogenannte Wirkstofftransportsysteme (*engl.* drug delivery systems) bestehen typischerweise aus einem solchen tumorgerichteten Zielmolekül auf der SWNT-Oberfläche unter gleichzeitigem Vorhandensein von Wirkstoffmolekülen, welche über einen spaltbaren Crosslinker an die Nanoröhre gebunden sind.^[96] Im Zellinneren kann der Wirkstoff durch Bindungsbruch im Verknüpfungsganz freigesetzt werden. Eine gängige Variante liegt dabei in der Verwendung von Disulfidbrücken im Crosslinker, die durch im Zellmilieu anwesende endogene Thiole wie Glutathion gespalten werden. Chen *et al.* entwickelten zur Tumorthherapie ein solches System mit Taxoid als freizusetzenden Antitumorwirkstoff unter Ausnutzung der spezifischen Bindung zwischen Biotin-modifizierten SWNTs und Zellen mit Streptavidin-Rezeptoren.^[96] Einer Kombination aus dem Zytostatikum Cisplatin und dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF als Agonist konnte bereits eine *in vivo*-Wirksamkeit der gegen Krebszellen gerichteten SWNT-Biokonjugate nachgewiesen werden.^[13]

Neben einer chemischen Modifikation der SWNT-Oberfläche gelingt die Biofunktionalisierung von Nanoröhren auch über eine nicht-kovalente Beladung. Dazu kommen unter anderem Polyethylenglykolderivate oder Phospholipide zum Einsatz, die durch ihre Amphiphilie zu einer Dispergierung der Kohlenstoffpartikel fähig sind. Eine ausreichende Selektivität gegenüber bestimmten Rezeptoren konnte durch parallele Verwendung mehrerer Wachstumsfaktoren an verschiedenen SWNTs auf Mehrfarbendetektion erweitert werden. Liu *et al.* konnten dabei bis zu drei isotopisch markierte SWNT-Arten mit jeweils einem Agonisten in entsprechenden Zelltypen hochspezifisch und simultan Raman-mikroskopisch nachweisen.^[8] Die Modifikation gelang über eine Kupplung der Wachstumsfaktoren an freie Aminogruppen der PEGylierten SWNTs. In Arbeiten mit Phospholipid-dispergierten SWNTs konnte von einem erfolgreichen Transport mit anschließender Freisetzung und nuklearer Translokation von Oligomeren

berichtet werden.^[97] Damit konnte die Eignung von Kohlenstoffnanoröhren für die Übertragung von Transfektionsagenzien wie siRNA nachgewiesen werden.

Die Kupplung von Wirkstoffmolekülen wird in der Literatur auf unterschiedliche Weise vollzogen. Von einer Funktionalisierung der zur Dispergierung eingesetzten DNA-Oligomere wird bisher nicht berichtet. Eine generelle Funktionalisierbarkeit wird durch den Einsatz Thiol-modifizierter ssDNA demonstriert, die zur Reaktion mit Quantenpunkten fähig ist.^[98] Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich im dritten Projekt mit verschiedenen Ansätzen zur Modifikation von biokompatiblen ssDNA-SWNTs über das nicht-kovalent gebundene Dispergieradditiv als neuartige Funktionalisierungsstrategie. Die jeweiligen Funktionalisierungsschemata werden zur einfacheren Interpretation und Quantifizierbarkeit mit Fluorophoren als Modellverbindung anstelle von Wirkstoffen erprobt. Dabei stehen prinzipiell drei Funktionalisierungsrouten zur Verfügung, die auf ihre Effektivität hin untersucht werden sollen. Abbildung 6.1 gibt eine schematische Übersicht der drei unterschiedlichen Möglichkeiten, auf die im Verlauf dieses Kapitels näher eingegangen wird.

6.2 Experimente

Die Experimente zur Funktionalisierung individualisierter ssDNA-SWNT-Konjugate sehen je nach Reaktionsroute unterschiedliche Startmaterialien vor. Dabei kommen in der Dichtegradientenultrazentrifugation neben unmodifizierten d-(GT)₁₆-Oligomeren auch ssDNA-Stränge mit Thiol-C₆-Gruppe am 5'-Ende zum Einsatz. Diese 5'-(HS-C₆)-(GT)₁₆-3'-Stränge werden zur Vereinfachung im Folgenden als „DNA-SH“ bezeichnet, wohingegen die unmodifizierten Oligomere lediglich als „DNA“ beschrieben werden. Sämtliche Experimente laufen ohne Berücksichtigung einer Probensterilität ab.

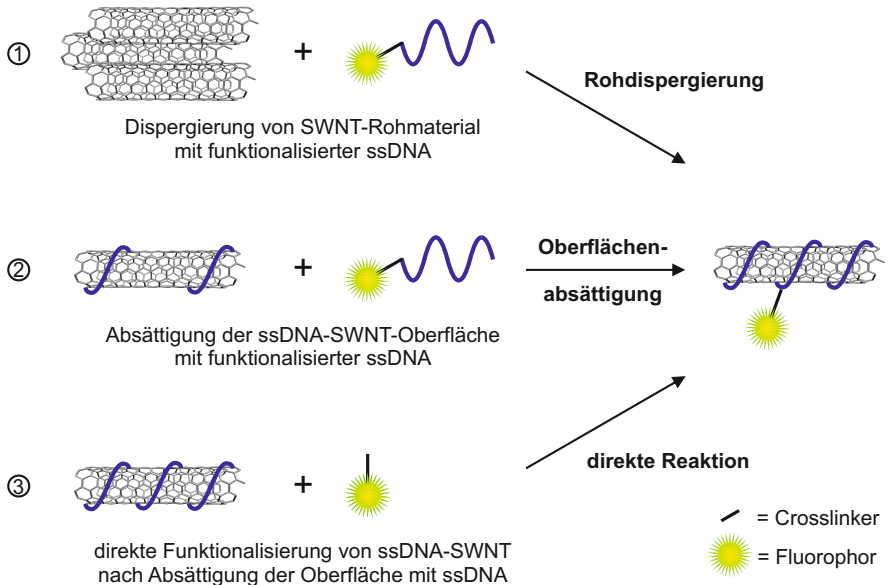


Abbildung 6.1: Prinzipielle Funktionalisierungsmöglichkeiten für die Kupplung eines Fluorophors an ssDNA-SWNTs. Demnach können Fluorophor-ssDNA-SWNT-Strukturen durch Rohdispersion ① bzw. Oberflächenabsättigung ② mit funktionalisierter ssDNA oder durch eine direkte Reaktion ③ des Fluorophors mit ssDNA-SWNT-Konjugaten erhalten werden. Die einzelnen Strategien werden im Folgenden näher vorgestellt und diskutiert.

6.2.1 Sulphydrylierung der DNA

Durch Sulphydrylierung von primären Aminogruppen der DNA-Base Guanin sollen gemäß Abbildung 6.2 zunächst freie Thiolgruppen in den Oligomeren eingeführt werden.

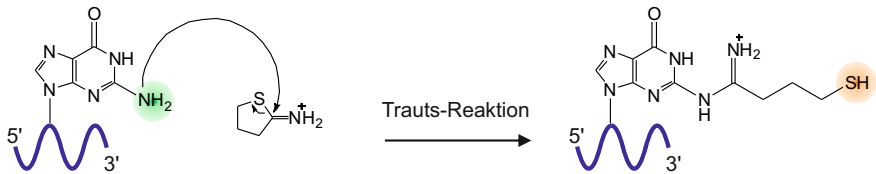


Abbildung 6.2: Reaktionsschema zur Sulphydrylierung freier ssDNA. Durch Reaktion der primären Aminogruppe (grün) der DNA-Base Guanin mit dem Trauts-Reagenz 2-Iminothiolan werden in den Oligomeren freie Thiole (orange) generiert.

Dazu werden 1.6 mg Trauts-Reagenz 2-Iminothiolan in 1 ml PBS gelöst und 19.7 μl der resultierenden 11.6 mM Lösung zu 190 μl d-(GT)₁₆-Oligomerlösung mit einer Konzentration von 151 μM gegeben. Nach einer Reaktionsdauer von 1 h unter Schütteln bei 400 rpm und Raumtemperatur wird das erhaltene Gemisch durch NAP-5-Gelsäulen gröößenausschlusschromatographisch aufgereinigt. Es werden Fraktionen zu je 200 μl gesammelt und absorptionsspektrometrisch auf das Vorliegen von DNA durch deren charakteristische Absorptionsbande um 260 nm hin untersucht.

Alternativ wird die Sulphydrylierung auch an Oligomeren getestet, welche bereits auf der SWNT-Oberfläche adsorbiert sind. Hierbei werden 200 μl individualisierte ssDNA-SWNT-Konjugate mit 200 μl Trauts-Lösung zur Reaktion gebracht. Eine Aufreinigung erfolgt durch Zentrifugenfiltration unter Verwendung von Microcon[®]-Einheiten. Das Reaktionsschema wird in Abbildung 6.3 veranschaulicht.

Die jeweiligen gereinigten Lösungen werden dem Ellman-Test zum quantitativen Nachweis freier Thiole unterworfen. Für diese Farbreaktion werden 100 μl Ellman-Reagenz bestehend aus 2 mM (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) und 50 mM Natriumacetat mit 200 μl 1 M TRIS-Puffer bei pH 8, 2.4 ml HPLC-Wasser sowie 5 μl der zu untersuchenden Testlösung versetzt und nach Ablauf von 5 min die Absorption um 418 nm gemessen.

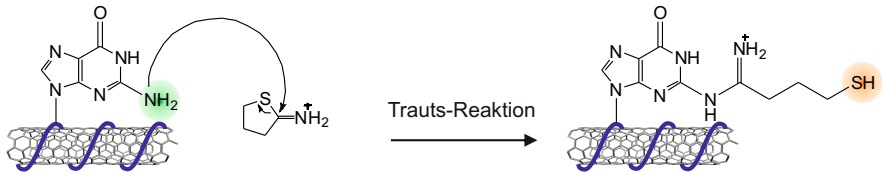


Abbildung 6.3: Reaktionsschema zur Sulfhidrylierung individualisierter ssDNA-SWNTs. Primäre Aminogruppen (grün) der DNA-Base Guanin reagieren mit dem Trauts-Reagenz unter Ausbildung freier Thiole (orange).

Die dabei auftretende Farbreaktion verläuft mechanistisch wie im Methodenkapitel 3.4 in Abbildung 3.11 vorgestellt.

6.2.2 Aktivierung des Fluorophors

In ersten Experimenten wird lediglich die Dansylverbindung *N*-(6-Aminohexyl)-5-(dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamid, kurz *N*-Dansyl-1,6-hexandiamin, zur Kupplung eingesetzt. Dabei reagiert zunächst der Sulfo-NHS-Ester des heterobifunktionellen Crosslinkers mit der freien Aminogruppe des Fluorophors, bevor abschließend der Maleimidterminus nach den unterschiedlichen Reaktionsrouten ① bis ③ an das Thiol im DNA-Strang gekuppelt wird. Die Aktivierung des Fluorophors mit dem Crosslinker erfolgt wie in Abbildung 6.4 schematisch gezeigt.

Hierfür werden 2 mg des Crosslinkers Sulfo-SMCC unter Verwendung eines Ultraschallbads in 200 μ l HPLC-Wasser gelöst. 50 μ l des Dansyl-Fluorophors mit einer Konzentration von 40 mM in DMSO werden mit 450 μ l PBS gemischt. 200 μ l davon werden mit dem gleichen Volumen an Sulfo-SMCC-Lösung versetzt und durch 30-minütige Ultraschallbehandlung zur Reaktion gebracht. Um eine Hydrolyse des aktivierten Fluorophors am Maleimidterminus des Crosslinkers zu vermeiden, wird das Gemisch direkt ohne weitere Aufreinigung zur Kupplung im zweiten Schritt wie in den Kapiteln 6.2.4 bis 6.2.6 beschrieben eingesetzt.

In Experimenten zur Funktionalisierungsrouten ③ kommt das in Abbildung

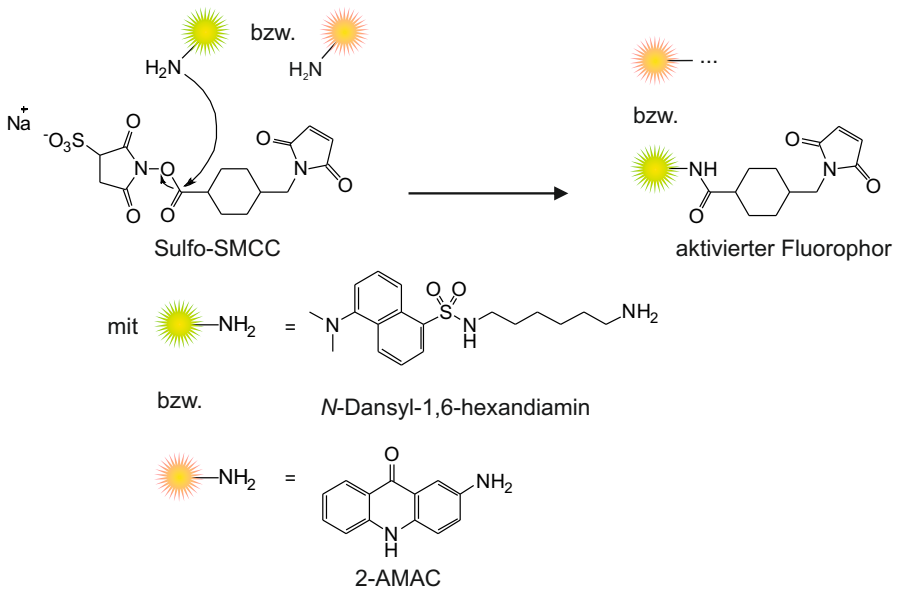


Abbildung 6.4: Reaktionsschema zur Aktivierung des Fluorophors mit dem Crosslinker Sulfo-SMCC. Dieser kann am Sulfo-NHS-Ester spezifisch mit primären Aminogruppen unter Ausbildung einer stabilen Amidbrücke reagieren. Die Kupplung erfolgt je nach Experiment mit den beiden gezeigten Fluorophoren, die jeweils eine primäre Aminogruppe besitzen.

6.4 ebenfalls gezeigte 2-Aminoakridon, kurz 2-AMAC, als weiterer Fluorophor zum Einsatz. Die Aktivierung verläuft analog zur Dansylverbindung. Zunächst werden 0.5 mg AMAC in 1 ml DMSO gelöst und 20 µl des Ansatzes mit 100 µl PBS gemischt. 60 µl Fluorophorlösung werden anschließend mit 80 µl Sulfo-SMCC-Lösung für 30 min zur Reaktion gebracht. Auch hier wird auf eine Reinigung in Anbetracht der Reaktivität gegenüber nukleophilen Verbindungen verzichtet und das Gemisch zügig direkt im finalen Kupplungsschritt eingesetzt.

6.2.3 Kupplung des aktivierten Fluorophors an freie DNA

Für die Dispergierung von SWNT-Rohmaterial nach Funktionalisierungsrouten ① aus Abbildung 6.1 bzw. zur Oberflächenabsättigung individualisierter Nanoröhren mit Fluorophor-funktionalisierter ssDNA gemäß Schema ② muss zunächst der zweite Kupplungsschritt durchgeführt werden. Die Reaktion zwischen dem Maleimidterminus des Crosslinkers und den freien Thiolgruppen der DNA-Stränge soll wie in Abbildung 6.5 dargestellt verlaufen.

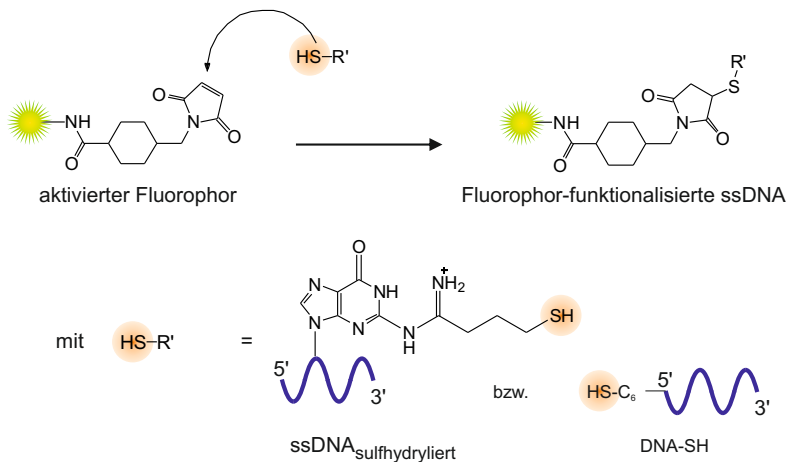


Abbildung 6.5: Reaktionsschema zur Kupplung des Sulfo-SMCC-aktivierten Fluorophors an ssDNA. Für die Reaktion mit dem Maleimidterminus des Crosslinkers kommen sowohl sulfhydrylierte als auch kommerziell erhältliche DNA-Stränge mit freier Thiolgruppe (orange) zum Einsatz.

Für die Kupplung werden 30 μl des Sulfo-SMCC-Fluorophor-Ansatzes mit 400 μl ssDNA versetzt und für 1 h bei 400 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Es werden Ansätze für sulfhydrylierte ssDNA-Proben und kommerziell erhältliche DNA-SH-Oligomere mit aktiviertem Dansyl-Fluorophor durchgeführt. Als Referenz für Kontrollexperimente wird unbehandelte ssDNA ohne Thiolgruppen mit dem Sulfo-SMCC-Fluorophor-Gemisch versetzt. Tabelle 6.1 fasst die vereinfachten Schemata der in den jeweiligen Experimenten eingesetzten Oligomere zusammen.

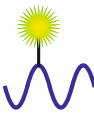

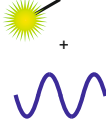
	Fluorophor-funktionalisierte ssDNA		nicht-funktionalisierte ssDNA
Schema			
Oligomer	DNA _{sulfhydryliert}	DNA-SH	DNA
Sulfhydrylierung	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kupplung mit Fluorophor	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Tabelle 6.1: Übersicht der verschiedenen ssDNA-Oligomere für Experimente zu den Funktionalisierungsrouten ① und ② aus Abbildung 6.1.

Mit dem Fluorophor-gekoppelten DNA-SH-Oligomer werden Versuche zur Reinigung durch gröÙenausschlusschromatographische Auftrennung durchgeführt. Absorptions- und Fluoreszenzmessungen dienen einer Charakterisierung hinsichtlich des DNA- und Fluorophorgehalts in den jeweiligen Fraktionen.

6.2.4 Funktionalisierung durch Rohdispergierung

Fluorophor-funktionalisierte DNA gemäß Tabelle 6.1 kann nun zur Dispersion von SWNT-Rohmaterial gemäß der Funktionalisierungsstrategie ① erprobt werden. Dazu wird die DNA in einem Volumen von 400 μl zu 0.5 mg

Nanorohrruß gegeben und im Badgefäß für 2 h mit Ultraschall behandelt. Als Vergleichsprobe wird in einem weiteren Ansatz SWNT-Ruß mit der Referenz-DNA unter identischen Bedingungen beschallt. Nach erfolgreicher Dispersion werden die jeweiligen Suspensionen in den standardmäßigen Dichtegradienten aus Kapitel 3.1.2 eingeschichtet und einer Ultrazentrifugation unterzogen. Die erhaltenen Fraktionen können hinsichtlich einer Individualisierung von Fluorophor-ssDNA-SWNT-Konjugaten absorptionsspektrometrisch charakterisiert werden. Zusätzlich werden die Proben durch Fluoreszenzmes-sungen auf den Gehalt des Farbstoffs untersucht.

6.2.5 Funktionalisierung durch Oberflächenabsättigung

Für Versuche zur Absättigung der Nanorohroberfläche mit funktionalisier-ten Oligomeren nach Funktionalisierungsrouten ② kommen individualisier-te ssDNA-SWNT-Konjugate nach DGU-Präparation zum Einsatz. Zu 200 µl SWNT-Suspension werden 50 µl Fluorophor-funktionalisierter ssDNA gege-ben und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Hier werden ebenfalls die in Abbildung 6.5 gezeigten Oligomere mit dem Dansyl-Farbstoff verwendet. Im Kontrollexperiment wird ebenfalls ssDNA, jedoch ohne Kupplungsmöglich-keit des aktivierten Fluorophors genutzt. Die Analyse verläuft erneut anhand der SWNT-Absorption und Fluorophor-Emission.

6.2.6 Funktionalisierung durch direkte Reaktion

Die direkte Reaktion des aktivierten Fluorophors mit ssDNA-SWNT-Konjugaten entsprechend der Funktionalisierungsrouten ③ aus Abbildung 6.1 wird durch verschiedene Strategien erprobt.

Zunächst werden Einzelröhren aus der Dichtegradientenultrazentrifuga-tion mit DNA-SH-Oligomeren als Dispergieradditiv erhalten, welche einer Kupplungsreaktion unterworfen werden. 150 µl DNA-SH-SWNTs werden mit 30 µl Sulfo-SMCC-Dansylverbindung 1 h bei 400 rpm und Raumtempera-tur geschüttelt. Alternativ werden die entsprechend Abbildung 6.3 direkt sulphydrylierten ssDNA-SWNT-Einzelröhren in einem weiteren Ansatz in der

Kupplungsreaktion mit aktiviertem Dansyl-Farbstoff eingesetzt. Es folgt eine mehrmalige Zentrifugenfiltration mit Microcon[®]-Einheiten zur Reinigung des Reaktionsgemisches. Absorptions-, Emissions- sowie TCSPC-Messungen des Retentats und des Filtrats im Vergleich dienen einer Charakterisierung des Funktionalisierungsversuchs. Die zugehörige Kontrolle sieht den Einsatz von 150 µl unmodifizierter ssDNA-SWNT-Konjugate und 30 µl Fluorophorlösung vor.

In einer zweiten Versuchsreihe wird die Nanorohroberfläche der DNA-SH-SWNT-Konjugate durch Behandlung mit zusätzlicher DNA abgesättigt. Anschließend kommt das sanfte Reduktionsmittel TCEP zur Spaltung möglicher, zwischen zwei Thiolen geknüpften Disulfidbrücken unmittelbar vor der Kupplungsreaktion zum Einsatz.

Die verwendete SWNT-Dispersion liegt als individualisiertes Material mit DNA-SH- bzw. DNA-Oligomeren als Kontrolle dispergiert vor. 200 µl der jeweiligen Suspension werden mit 30 µl unmodifizierter DNA der Konzentration 200 µM 5 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Lösen von 1 mg TCEP · HCl in 1 ml HPLC-Wasser werden 5 µl dieser 3.5 mM Lösung zu beiden ssDNA-SWNT-Ansätzen gegeben und für 1 h bei 400 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Nach Ablauf der Einwirkzeit des Reduktionsmittels wird für den Kupplungsschritt 30 µl aktivierte Dansyl-Fluorophor-Lösung zugesetzt und eine weitere Stunde geschüttelt. Nach einer Aufreinigung durch Zentrifugenfiltration werden Retentate und Filtrate absorptions- und fluoreszenzspektroskopisch charakterisiert.

Alternativ zur zweiten Versuchsreihe wird im dritten Ansatz die Reihenfolge variiert, in der Thiol-haltige bzw. unmodifizierte ssDNA auf die Röhrenoberfläche gebracht wird. Somit wird die Dispergierung und Dichtegradientenultrazentrifugation regulär mit d-(GT)₁₆ durchgeführt und die freie Oberfläche durch Zugabe von 5 µl des analogen DNA-SH-Oligomers gesättigt. Die dadurch eingeführten freien Thiole werden exakt wie in der vorherigen Versuchsreihe beschrieben nach TCEP-Behandlung mit dem aktivierten Dansyl-Fluorophor zur Reaktion gebracht. Im Kontrollexperiment wird ebenfalls unmodifizierte DNA zur Oberflächenabsättigung eingesetzt,

so dass hier keine Thiole für eine Reaktion vorhanden sind.

Im letzten Ansatz wird der Dansyl-Fluorophor durch 2-Aminoakridon ersetzt. Sämtliche Reaktionsschritte verlaufen in Analogie zur dritten Versuchsreihe mit der Einführung freier SH-Gruppen durch Oberflächenabsättigung individualisierter ssDNA-SWNT-Konjugate. Es werden 0.5 mg AMAC in 1 ml DMSO gelöst und 20 µl davon mit 100 µl PBS versetzt. 60 µl der Fluorophorlösung werden durch Zugabe von 80 µl Sulfo-SMCC-Lösung in 30 min aktiviert. Nach TCEP-Behandlung der ssDNA-SWNT-Konjugate mit Thiol-haltigen Oligomeren erfolgt der Kupplungsschritt zwischen 150 µl Nanorohrlösung und 30 µl aktiviertem AMAC. Durch Zentrifugenfiltration und spektroskopische Charakterisierung wird die Versuchsreihe abgeschlossen.

Die verschiedenen Ansätze zur direkten Funktionalisierung der Thiol-haltigen Oligomere in Anwesenheit von SWNTs werden in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

Versuchsreihe	DGU		Absättigung		TCEP	Fluorophor	
	DNA	DNA-SH	DNA	DNA-SH		Dansyl	AMAC
1	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontrolle	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontrolle	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontrolle	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Kontrolle	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Tabelle 6.2: Übersicht der verschiedenen Versuchsreihen zur direkten Reaktion des aktivierten Fluorophors mit DNA-Oligomeren in Anwesenheit von SWNTs.

6.3 Ergebnisse und Interpretation

6.3.1 Voruntersuchungen

Als erster Schritt zur Präparation von Fluorophor-ssDNA-SWNT-Konjugaten wird der Versuch zur Einführung funktioneller SH-Gruppen in DNA-Stränge untersucht. Die Sulphydrylierung nach Trauts wird an freien Oligomeren sowie an individualisierten Konjugaten erprobt.

Freie Oligomere in Abwesenheit von SWNTs werden nach dem Sulphydrylierungsversuch größenausschlusschromatographisch aufgereinigt und absorptionsspektrometrisch auf den DNA-Gehalt hin untersucht. Mit der entsprechenden Fraktion wird der Ellman-Test zum kolorimetrischen Nachweis freier Thiole durchgeführt. Abbildung 6.6 fasst die spektroskopischen Resultate zusammen.

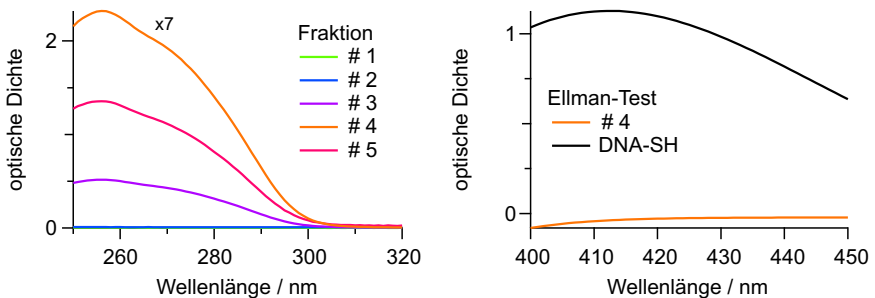


Abbildung 6.6: Absorptionsspektren der DNA-Fractionen nach Sulphydrylierung und größenausschlusschromatographischer Aufreinigung des Reaktionsgemisches sowie Ellman-Test mit Fraktion # 4 und DNA-SH als Referenz. Fraktion # 4 enthält den Hauptanteil an DNA-Oligomeren, zeigt jedoch im Ellman-Test im Vergleich mit der Referenzprobe ein negatives Resultat durch Ausbleiben der charakteristischen Absorbanz bei 418 nm.

Aus der für Nukleinsäuren charakteristischen Absorbanz bei 260 nm ist ersichtlich, dass Fraktion # 4 den Hauptanteil an Oligomeren enthält. Das Testergebnis auf die Anwesenheit freier Thiole fällt jedoch nach Ellman mit dieser Probe negativ aus, wie sich im direkten Vergleich mit einer Referenzprobe der kommerziellen DNA-SH zeigt. Die Absorption des in der

Ellman-Reaktion entstehenden Anions bei 418 nm bleibt für die untersuchte Lösung des Sulphydrylierungsversuchs im Gegensatz zur Thiol-haltigen Kontrolle aus. Somit können mit dem Ellman-Test keine freien Thiole in der aufgereinigten DNA-Lösung nach dem Sulphydrylierungsversuch festgestellt werden, was auf ein Scheitern der Reaktion schließen lässt.

Um zu überprüfen, ob die Sulphydrylierungsreaktion in Anlehnung an einen literaturbeschriebenen Ansatz mit ssDNA-SWNT-Konjugaten möglich ist, wird hier analog verfahren.^[9] Die sulphydrylierten Konjugate werden nach Aufreinigung durch Zentrifugenfiltration ebenfalls dem Ellman-Test unterworfen. Abbildung 6.7 zeigt die Absorptionsspektren des Ellman-Tests für den Sulphydrylierungsversuch im Vergleich zu einer SWNT-Probe, bei der DNA-SH bereits in der Präparation zur Individualisierung eingesetzt wurde. Abbildung 6.7 zeigt die Absorptionsspektren des Ellman-Tests für den Sulphydrylierungsversuch im Vergleich zu einer SWNT-Probe, bei der DNA-SH bereits in der Präparation zur Individualisierung eingesetzt wurde.

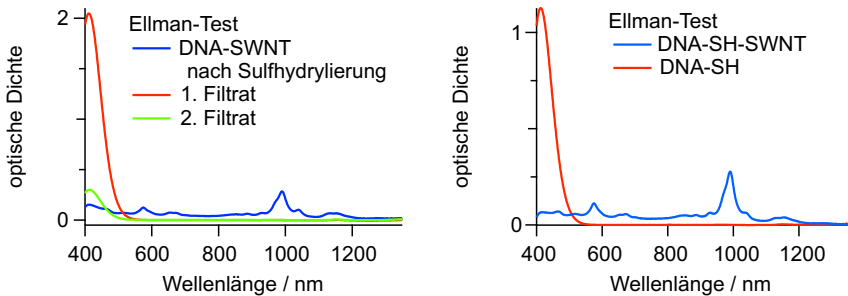


Abbildung 6.7: Absorptionsspektren des Ellman-Tests an ssDNA-SWNT-Konjugaten. Links sind die Spektren des Ansatzes des direkten Sulphydrylierungsversuchs an SWNT-adsorbierten Oligomeren nach Aufreinigung durch Zentrifugenfiltration gezeigt. Die Filtrate zeigen eine höhere Intensität der charakteristischen Ellman-Bande als das Retentat. Demgegenüber stehen rechts die Ergebnisse aus einer Probe, bei denen Thiol-haltige DNA bereits in der Präparation individualisierter Konjugate eingesetzt wurde. Auch hier zeigt der Ellman-Test ein negatives Ergebnis, wie aus dem direkten Vergleich mit freier DNA-SH ersichtlich ist.

Der Sulphydrylierungsansatz zeigt für das SWNT-haltige Retentat eine erheblich geringere Absorption bei 418 nm verglichen mit den bei der Reinigung anfallenden Filtraten. Folglich können auch in der direkten Reaktion des Trauts-Reagenz mit ssDNA-SWNT-Konjugaten keine freien Thiole nachgewie-

sen werden. Als Kontrolle wird eine SWNT-Probe gemäß Ellman getestet, bei welcher bereits in der Rohdispersion Thiol-haltige ssDNA eingesetzt wurde und die Anwesenheit von SH-Gruppen somit sichergestellt ist. Auch hier resultiert jedoch ein Ausbleiben der Absorptionsbande bei 418 nm, wie sich im Vergleich mit der Referenz aus freier DNA-SH erkennen lässt. Das negative Testergebnis nach Ellman weist darauf hin, dass die in den Konjugatproben enthaltenen Thiole trotz ausreichender Konzentration nicht nachweisbar sind und folglich vermutlich nicht in freier Form vorliegen.

Unter oxidativen Bedingungen neigen SH-Gruppen zur Dimerisierung. Durch Ausbildung von Disulfidbrücken stehen die Thiolgruppen einer hier angestrebten Reaktion nicht mehr zur Verfügung. Durch Zugabe eines sanften Reduktionsmittels zum Aufbrechen möglicher Disulfide soll dieses Problem umgangen werden und freie Thiole generiert werden. TCEP ist ein geeignetes Agens zur reduktiven Spaltung von Disulfiden und wird daher in verschiedenen Ansätzen der Kupplungsreaktionen eingesetzt.

Als Ergebnis der Untersuchung lässt sich abschließend festhalten, dass sich eine Sulphydrylierung an ssDNA-SWNTs entsprechend der Literaturangabe nicht durch den Ellman-Test bestätigen lässt.

In folgenden Experimenten wird daher ausschließlich kommerziell erhältliche DNA-SH verwendet und auf eine Einführung funktioneller SH-Gruppen nach Trauts verzichtet.

Bevor die Kupplung des Fluorophors an Nanorohrkongjugate erprobt wird, soll zunächst die erfolgreiche Aktivierung des Farbstoffs durch den heterobifunktionellen Crosslinker sichergestellt werden. Dazu wird die Sulfo-SMCC-aktivierte Dansylverbindung mit DNA-SH versetzt und das Gemisch nach Ablauf der Reaktionsdauer größenausschlusschromatographisch gereinigt. Eine Charakterisierung der gesammelten Fraktionen nach der Auftrennung erfolgt wie in Abbildung 6.8 zusammengefasst absorptions- und fluoreszenzspektrometrisch.

Die absorptionsspektroskopische Untersuchung deutet auf Oligomere in den beiden gezeigten Fraktionen # 5 und # 6 hin. Das Auftreten von Fluoreszenzbanden in beiden DNA-Lösungen impliziert eine Anwesenheit des Dansyl-Fluorophors, wobei sich wie in Tabelle 6.3 aufgeführt spektrale Unterschiede

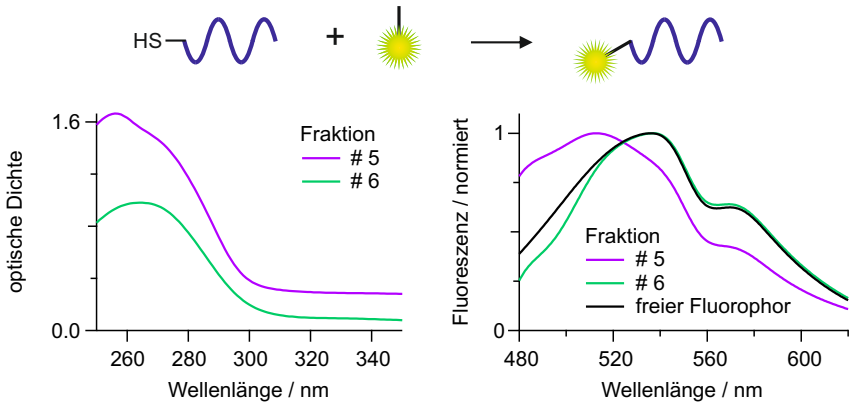


Abbildung 6.8: Nachweis der erfolgreichen Kupplung des Sulfo-SMCC-aktivierten Dansyl-Fluorophors mit DNA-SH. Nach größenausschlusschromatographischer Auftrennung werden die Fraktionen absorptionsspektrometrisch auf ihren DNA-Gehalt hin untersucht (links) und anschließend anhand der Fluoreszenz des Farbstoffs (rechts) auf dessen Anwesenheit überprüft. Fraktion # 5 zeigt ein gleichzeitiges Vorliegen von DNA-Oligomeren und Fluorophor, wobei dessen Emissionsmaximum im Vergleich zum freien Farbstoff und Fraktion # 6 blauverschoben ist.

Probe	$\lambda_{\text{PL, max}} / \text{nm}$
Fraktion # 5	513
Fraktion # 6	537
freier Fluorophor	536

Tabelle 6.3: Übersicht der Emissionsmaxima des Dansyl-Fluorophors in den DNA-Fraktionen # 5 und # 6 verglichen mit dessen freier Form.

hervorheben.

Während die Emission in Fraktion # 6 stark der des freien Farbstoffs ähnelt, zeigt das Fluoreszenzmaximum von Fraktion # 5 eine deutliche Blauverschiebung um 24 nm. Es ist daher anzunehmen, dass der Farbstoff in Fraktion # 6 in seiner freien Form neben den Oligomeren vorliegt, wohingegen aufgrund der spektralen Verschiebung des Emissionsmaximums auf eine erfolgreiche Kupplung zwischen DNA-SH und Sulfo-SMCC-Dansyl-Fluorophor in Fraktion # 5 geschlossen werden kann.

Die Fluorophor-gekoppelten DNA-Oligomere können in weiteren Experimenten zur Funktionalisierung von SWNT-Proben eingesetzt werden.

6.3.2 Nachweis der Funktionalisierung

6.3.2.1 Funktionalisierung durch Rohdispersion

Wie eingangs in Abbildung 6.1 bereits dargestellt werden verschiedene Funktionalisierungsschemata erprobt. Als erstes soll gemäß Route ① die Behandlung von SWNT-Rohmaterial mit Fluorophor-funktionalisierten Oligomeren und anschließender (6,5)-Anreicherung im Dichtegradienten getestet werden, ob individualisierte Fluorophor-ssDNA-SWNT-Konjugate erhalten werden können. Abbildung 6.9 stellt diese Funktionalisierungsmöglichkeit als Ausschnitt aus Abbildung 6.1 nochmals schematisch dar.

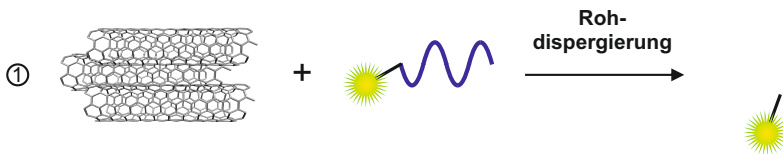


Abbildung 6.9: Funktionalisierungsschema nach Route ① als Ausschnitt aus Abbildung 6.1. SWNT-Rohmaterial wird mit Fluorophor-funktionalisierter ssDNA dispergiert und mittels DGU präpariert, um individualisierte Fluorophor-ssDNA-SWNT-Konjugate zu erhalten.

Nanorohrruß wird zur Dispergierung mit funktionalisierter ssDNA beschallt. Als Kontrolle wird die gleiche Oligomermenge und freier Dansyl-Fluorophor in einem weiteren Ansatz zum Rohmaterial gegeben und analog behan-

132 6 Funktionalisierung von DNA-Kohlenstoffnanorohr-Konjugaten

delt. Nach anschließender Einschichtung in den Dichtegradienten und Ultrazentrifugation werden in beiden Experimenten individualisierte ssDNA-SWNT-Konjugate erhalten. In Abbildung 6.10 sind die jeweiligen Schritte sowohl schematisch als auch photographisch für SWNTs mit Fluorophor-funktionalisiertem Oligomer festgehalten.

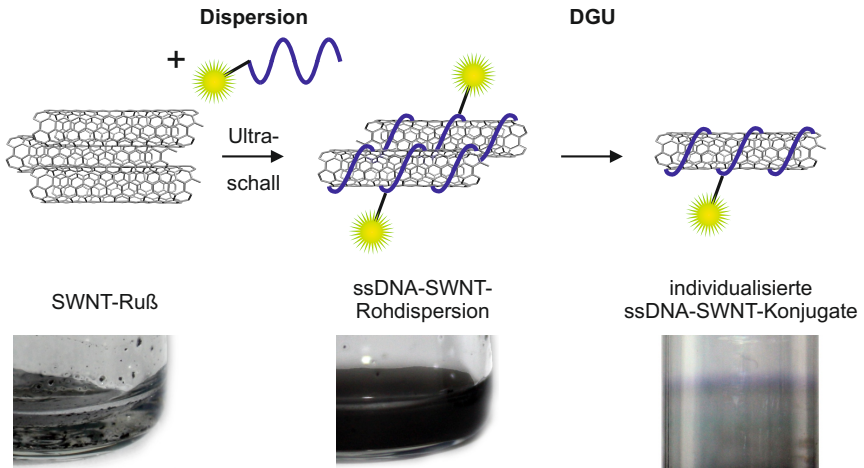


Abbildung 6.10: Funktionalisierungsrouten ①. Die schematischen und photographischen Darstellungen zeigen die jeweiligen Schritte von Nanorohrruß in DNA-Lösung vor dem Beschallen über die Rohdispersion nach der Ultraschallbehandlung bis hin zu individualisierten SWNTs, wie sie nach der DGU erhalten werden. Es resultiert eine gute Dispergierfähigkeit der mit Fluorophor funktionalisierten DNA-Oligomere sowie eine erfolgreiche (6,5)-Anreicherung mittels DGU.

Bereits nach Ultraschallbehandlung ist aus den photographischen Aufnahmen ersichtlich, dass Fluorophor-funktionalisierte DNA-Oligomere zur Dispersion des Rohmaterials in der Lage sind.

Es folgt eine erste fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der SWNT-Rohdispersion mit funktionalisierter ssDNA sowie dem Referenzansatz mit unmodifiziertem Oligomer und freiem Fluorophor. Dazu werden geringe Volumina der jeweiligen klaren schwarzen Dispersionen filtriert und Fluoreszenzspektren vom resuspendiertem SWNT-Retentat sowie den Filtraten aufgezeichnet. Abbildung 6.11 stellt die spektroskopischen Resultate zusammen.

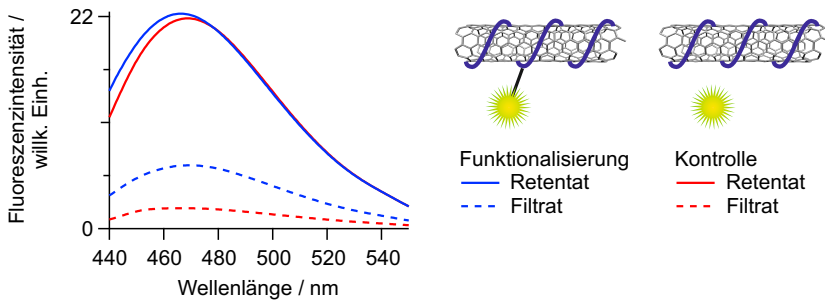


Abbildung 6.11: Filtrierversuch der SWNT-Rohdispersion mit Fluorophorfunktionalisierter gegenüber unmodifizierter ssDNA bei Anwesenheit einer äquivalenten Farbstoffmenge. In den Retentaten zeigt sich jeweils ein höheres Emissionssignal als in den zugehörigen Filtraten. Die Fluoreszenzintensitäten beider Retentate sind nicht auf deren Absorption normiert, so dass keine qualitative Aussage über einen möglichen Erfolg der Funktionalisierung getroffen werden kann.

Entscheidend für die Beurteilung eines möglichen Erfolgs der Funktionalisierung ist zunächst das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Retentat und Filtrat. Die Menge an Farbstoff, die an Kohlenstoffnanoröhren gebunden ist, muss nach Aufreinigung des Gemisches durch Filtration größer sein als die des freien Fluorophors in Lösung. Andernfalls kann eine erfolgreiche Funktionalisierung ausgeschlossen werden, da die Fluoreszenz im Retentat überwiegend auf nicht-gebundenen Farbstoff zurückzuführen wäre, der bei Zentrifugfiltration nur zu einem gewissen Anteil entfernt werden kann. Es gilt somit als erste Bedingung:

$$I_{PL, \max}(\text{Retentat}) \gg I_{PL, \max}(\text{Filtrat}) \quad (6.1)$$

Die in Abbildung 6.11 dargestellten Fluoreszenzspektren erfüllen diese Bedingung für beide experimentellen Ansätze. Die Emissionen der Retentate sind sowohl bei Fluorophor-funktionalisierter DNA als auch in der entsprechenden Kontrolle mit freiem Farbstoff höher als die der zugehörigen Filtrate. Somit sind mehr Fluorophormoleküle an die ssDNA-SWNT-Konjugate gebunden als in Lösung.

Ein direkter Vergleich des Emissionssignals der beiden Retentate erlaubt

erst nach deren Normierung auf die S_1 -Absorption eine qualitative Aussage über den Erfolg der kovalenten Funktionalisierung. Da es sich bei den hier untersuchten Lösungen um Rohdispersionen mit einer breiten Verteilung verschiedener SWNT-Aggregatgrößen bis hin zu vereinzelt Nanorohr-Konjugaten handelt, soll vor einer Beurteilung die Dichtegradientenultrazentrifugation zur Separation individualisierter ssDNA-SWNTs durchgeführt werden.

Durch DGU der klaren schwarzen Suspension kann eine erfolgreiche (6,5)-Anreicherung erzielt werden, was sich in Abbildung 6.10 durch Auftreten der charakterischen violetten Bande im Zentrifugenrohr äußert. Nach Entnahme der entsprechenden Fraktionen folgt eine absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchung gemäß Abbildung 6.12.

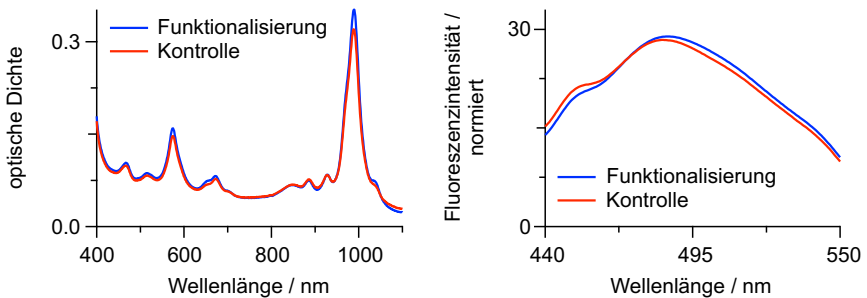


Abbildung 6.12: Absorptions- und Fluoreszenzspektren der ssDNA-SWNT-Konjugate nach DGU. Für die Funktionalisierung kommt das Fluorophorfunktionalisierte Oligomer zum Einsatz, wohingegen im Kontrollexperiment unmodifizierte DNA unter Zusatz von nicht-aktiviertem Fluorophor verwendet wird. Nach Normierung auf die S_1 -Absorption zeigen beide Ansätze ähnliche Fluoreszenzintensitäten.

Aus den Absorptionsspektren geht ebenfalls hervor, dass eine erfolgreiche Anreicherung des (6,5)-chiralen SWNT-Röhrentyps mit Fluorophorfunktionalisierter ssDNA sowie in der zugehörigen Kontrolle mit unmodifiziertem Oligomer bei Zusatz des Farbstoffsystems stattgefunden hat. Nach Normierung des Emissionssignals auf die S_1 -Absorptionsbande kann jedoch lediglich ein vernachlässigbarer Unterschied zwischen den beiden

Experimenten festgestellt werden. Aus der bestehenden Fluoreszenz im Kontrollexperiment muss darauf geschlossen werden, dass auch in diesem Fall eine Möglichkeit zur Anlagerung des Farbstoffs an die Nanorohroberfläche gegeben ist. Eine kovalente Bindung kann hier ausgeschlossen werden, da die entsprechenden Kupplungsmöglichkeiten weder im ssDNA-SWNT-System noch im Fluorophor vorhanden sind. Stattdessen können π - π -Wechselwirkungen zwischen dem delokalisierten sp^2 -Kohlenstoffgerüst der Nanoröhre und dem Fluorophor, der ebenfalls ein aromatisches System enthält, vermutet werden, welche eine Adsorption des Farbstoffs an ssDNA-SWNT-Konjugate zur Folge haben.

Für weitere Experimente bedeutet das die Notwendigkeit zur Durchführung analoger Referenzansätze, die einen direkten Vergleich von Fluoreszenzintensitäten erlauben. Als zweites Kriterium für eine erfolgreiche Funktionalisierung durch die gezielte Kupplungsreaktion gilt somit eine Erhöhung des Emissionssignals des Retentats im Fall des Kupplungsexperiments verglichen mit der entsprechenden Kontrolle:

$$I_{\text{PL, max}}(\text{Funktionalisierung}) > I_{\text{PL, max}}(\text{Adsorption}) \quad (6.2)$$

Im Folgenden werden die Ansätze mit „Funktionalisierung“ beim Einsatz Fluorophor-funktionalisierter DNA und „Adsorption“ in der Kontrolle mit unmodifizierten Oligomeren bei Anwesenheit des Farbstoffs bezeichnet.

Die Fluoreszenzintensitäten der Ansätze Funktionalisierung und Adsorption zur Kontrolle weisen nach Normierung auf die S_1 -Absorption keinen Unterschied auf. Zwar kann die Dansylverbindung im Ansatz mit Fluorophor-funktionalisierter DNA auf der SWNT-Oberfläche nachgewiesen werden, allerdings lässt das Kontrollexperiment mit unmodifiziertem Oligomer auf eine starke Unspezifität in der Art der Anbindung schließen. Auch wenn Fluorophor-ssDNA-SWNT-Konjugate aus dem Versuch resultieren, kann keine weitere Aussage über das exakte Vorliegen im System getroffen werden.

6.3.2.2 Funktionalisierung durch Oberflächenabsättigung

Als nächstes soll die Funktionalisierung von ssDNA-SWNT-Konjugaten mit dem Dansyl-Derivat entsprechend dem Reaktionsschema ② aus Abbildung 6.1 getestet werden. Abbildung 6.13 gibt den entsprechenden Ausschnitt als Zusammenfassung wieder.

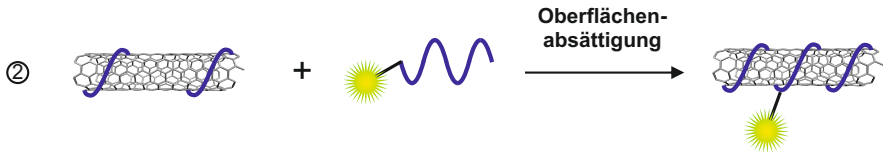


Abbildung 6.13: Funktionalisierungsschema nach Route ② als Ausschnitt aus Abbildung 6.1. Die Nanorohroberfläche von individualisierten ssDNA-SWNT-Konjugaten wird mit Fluorophor-funktionalisierter DNA gesättigt.

Demnach werden hier bereits DGU-gereinigte individualisierte ssDNA-SWNT-Proben eingesetzt, deren freie Nanorohroberfläche durch Zugabe zusätzlicher Oligomere DNA-gesättigt werden soll. Nach Zugabe Fluorophor-funktionalisierter bzw. unmodifizierter DNA mit äquivalentem Farbstoffgehalt zu ssDNA-SWNT-Proben muss der Überschuss an Oligomer durch Filtration entfernt werden. Auch durch wiederholte Zentrifugenfiltration kann jedoch keine eindeutige Aussage aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Filtraten und Retentaten in den jeweiligen Experimenten getroffen werden, der die Annahme einer erfolgreichen Funktionalisierung rechtfertigen würde. Da die Problematik der Aufreinigung mit den beiden anderen Funktionalisierungsrouten ① und ③ besser umgangen werden kann, wird der gescheiterte Versuch entsprechend Schema ② durch Absättigung der Nanorohroberfläche mit zusätzlicher, Fluorophor-funktionalisierter ssDNA nicht weiterverfolgt.

6.3.2.3 Funktionalisierung durch direkte Reaktion

Aufgrund der vergleichsweise einfachsten Handhabung hinsichtlich der Reinigungsschritte wird der Schwerpunkt auf die Funktionalisierungsrouten

③ gelegt, die eine direkte Reaktion des Fluorophors mit ssDNA-SWNT-Konjugaten vorsieht. Das Schema wird als Ausschnitt aus Abbildung 6.1 in Abbildung 6.14 wiedergegeben.



Abbildung 6.14: Funktionalisierungsschema nach Route ③ als Ausschnitt aus Abbildung 6.1. Hier erfolgt eine direkte Kupplung des Fluorophors an individualisierte ssDNA-SWNT-Konjugate. Die dazu notwendigen reaktiven Gruppen werden durch spezielle Vorbehandlung eingeführt.

Im Verlauf der Untersuchungen zu Funktionalisierungsschema ③ werden vier verschiedene Versuchsreihen verfolgt. Das erste Experiment verläuft durch eine direkte Zugabe der Sulfo-SMCC-aktivierten Dansylverbindung zu individualisierten ssDNA-SWNT-Konjugaten, deren Oligomere bereits Thiole für eine Kupplungsreaktion enthalten. Im Kontrollexperiment sind die SWNTs dagegen mit unmodifizierter ssDNA solubilisiert. Nach mehrmaliger Zentrifugenfiltration werden Fluoreszenzspektren der Retentate sowie Filtrate aufgenommen und wie in Abbildung 6.15 gezeigt verglichen.

In beiden experimentellen Ansätzen der ersten Versuchsreihe kann eine stärkere Emission im SWNT-Retentat als im entsprechenden Filtrat gefunden werden, womit die erste Voraussetzung für eine erfolgreiche Funktionalisierung erfüllt ist. Beim Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Retentate kann hingegen kein signifikanter Unterschied als Hinweis auf ein positives Ergebnis festgestellt werden. Stattdessen ist festzuhalten, dass im Kontrollexperiment eine vergleichsweise starke Emission auftritt, die für eine entsprechend große Menge adsorbierter Farbstoffmoleküle spricht. Zwischen dem Funktionalisierungsansatz und der Kontrolle kann keine spektrale Verschiebung beobachtet werden, was wiederum gegen eine erfolgreiche Kupplung spricht.

Um die Möglichkeit zur Adsorption des Fluorophors auf die freie SWNT-Oberfläche zu minimieren, geht dem Kupplungsschritt in allen folgenden

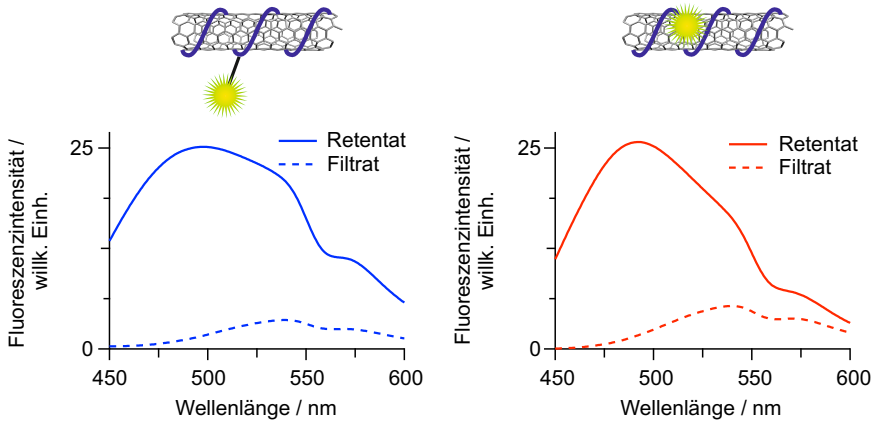


Abbildung 6.15: Erste Versuchsreihe zur Funktionalisierung durch eine direkte Kupplungsreaktion zwischen Fluorophor und ssDNA-SWNT-Konjugaten. Während die Filtrate im Experiment und in der Kontrolle eine deutlich geringere Emission zeigen als die entsprechenden Retentate, lässt sich die Funktionalisierung aufgrund der ähnlichen Fluoreszenz zum Kontrollexperiment nicht als erfolgreich einschätzen.

Ansätzen eine Absättigung durch zusätzliche Oligomere voran. Als weitere Verbesserung der Reaktionsbedingungen erfolgt darüber hinaus die Zugabe des Reduktionsmittels TCEP, um einer möglichen Disulfidbrückenbildung zwischen zwei benachbarten DNA-Einzelsträngen entgegenzuwirken und freie Thiole einer Reaktion zugänglich zu machen.

Die zweite Versuchsreihe geht ebenfalls von Konjugaten aus, bei deren Dispersion Thiol-haltige ssDNA zum Einsatz kommt. Für die Absättigung der SWNT-Oberfläche zur Minimierung der Anzahl freier Adsorptionsstellen für die Dansylverbindung reicht die Zugabe eines geringen Anteils unmodifizierter Oligomere, welche im Fall des Kontrollexperimentes auch vor der DGU bereits eingesetzt werden. Nach TCEP-Behandlung erfolgt der Kupplungsschritt mit dem Sulfo-SMCC-aktiviertem Dansyl-Fluorophor. Durch Zentrifugenfiltration werden auch hier SWNT-Retentate und Filtrate mit ungebundenem Fluorophor erhalten, welche spektroskopisch charakterisiert werden. Die Resultate sind in Abbildung 6.16 gemeinsam mit einem zusammenfas-

senden Schema zur Versuchsreihenfolge dargestellt.

Nach Bedeckung der freien Röhrenoberfläche durch zusätzliche unmodifizierte ssDNA zeigt sich eine deutliche Änderung des Resultats verglichen mit der ersten Versuchsreihe. Auch hier zeigen die Filtrate eine geringere Fluoreszenzintensität als die zugehörigen Retentate, wodurch der Anteil an gebundenen Farbstoffmolekülen größer ist als der Anteil an freien Fluorophoren. Nach Normierung des Emissionssignals auf die S_1 -Absorptionsbande ist ein signifikanter Unterschied zwischen dem Kupplungsexperiment verglichen mit der Kontrolle zu erkennen. Die Differenz aus den beiden Ansätzen zur Funktionalisierung und Adsorption kann den kovalent gebundenen Fluorophoren zugeschrieben werden. Nachdem beide Kriterien für eine erfolgreiche Funktionalisierung gemäß den Gleichungen 6.1 und 6.2 erfüllt sind, kann die hier aufgezeigte Kupplungsstrategie als zielführend bewertet werden.

Im nächsten Schritt wird eine umgekehrte Reihenfolge bezüglich der Zugabe von DNA-Oligomeren erprobt. Durch den Einsatz unmodifizierter ssDNA in der Rohdispersion und Dichtegradientenultrazentrifugation mit anschließender Sättigung der freien Oberfläche in ssDNA-SWNT-Konjugaten durch Thiol-haltige Nukleinsäuren soll eine kostengünstigere Alternative angestrebt werden, da eine erheblich geringere Menge an DNA-SH benötigt wird. In der dritten Versuchsreihe wird daher diese im Vergleich mit vorangegangenen Experimenten abgeänderte Reihenfolge gewählt. Das Präparationsschema sowie die spektralen Resultate dieses Ansatzes sind in Abbildung 6.17 zusammengefasst.

Wie sich aus den Daten erkennen lässt, wirkt sich eine Variation in der Reihenfolge des DNA-Einsatzes nicht negativ auf das Resultat aus, wie sich aus den Daten erkennen lässt. Auch hier kann anhand eines Vergleichs der Fluoreszenzintensitäten eine Erfüllung beider Kriterien beobachtet werden und folglich auf eine erfolgreiche Kupplungsreaktion geschlossen werden.

Im letzten Ansatz innerhalb der Funktionalisierungsrouten ③ soll der Ein-

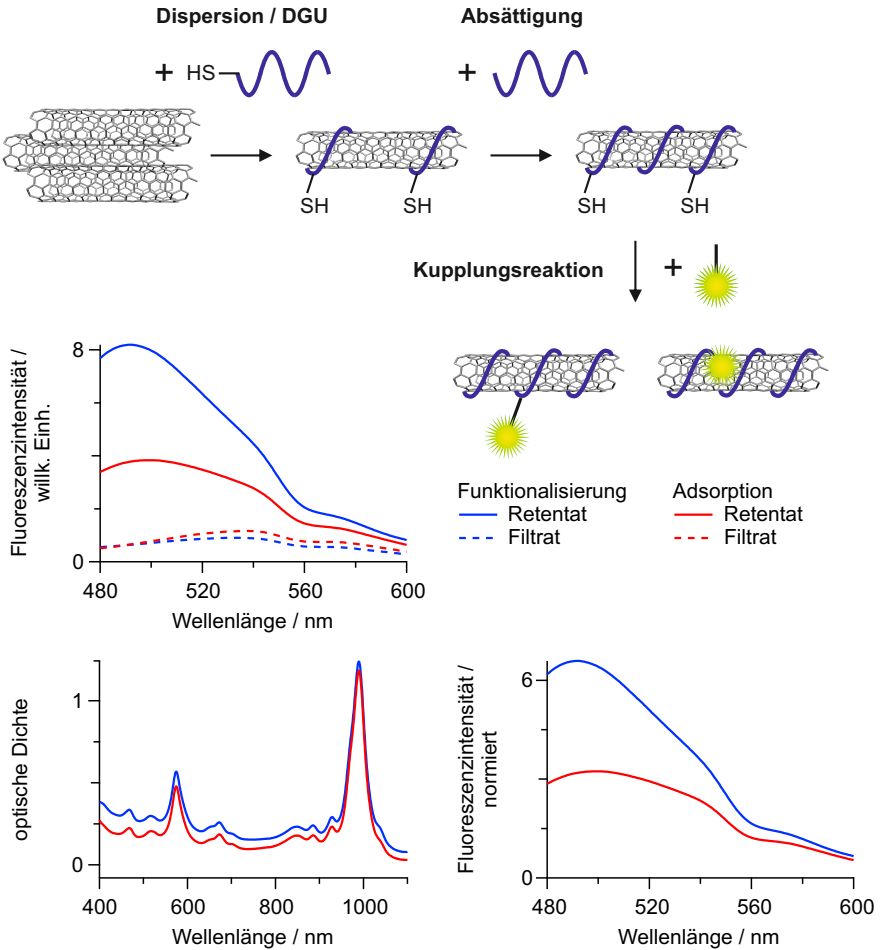


Abbildung 6.16: Zweite Versuchsreihe zur Funktionalisierung durch eine direkte Kupplungsreaktion zwischen Fluorophor und ssDNA-SWNT-Konjugaten. Wie schematisch gezeigt wird die Rohdispersion mit DNA-SH durchgeführt und die freie SWNT-Oberfläche nach DGU mit unmodifizierter DNA gesättigt. Vor der Kupplung mit dem aktiviertem Dansyl-Fluorophor erfolgt eine reduktive Vorbehandlung. Aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Filtrat und Retentat sowie von Funktionalisierung und Adsorption nach Normierung kann auf eine erfolgreiche Funktionalisierung geschlossen werden.

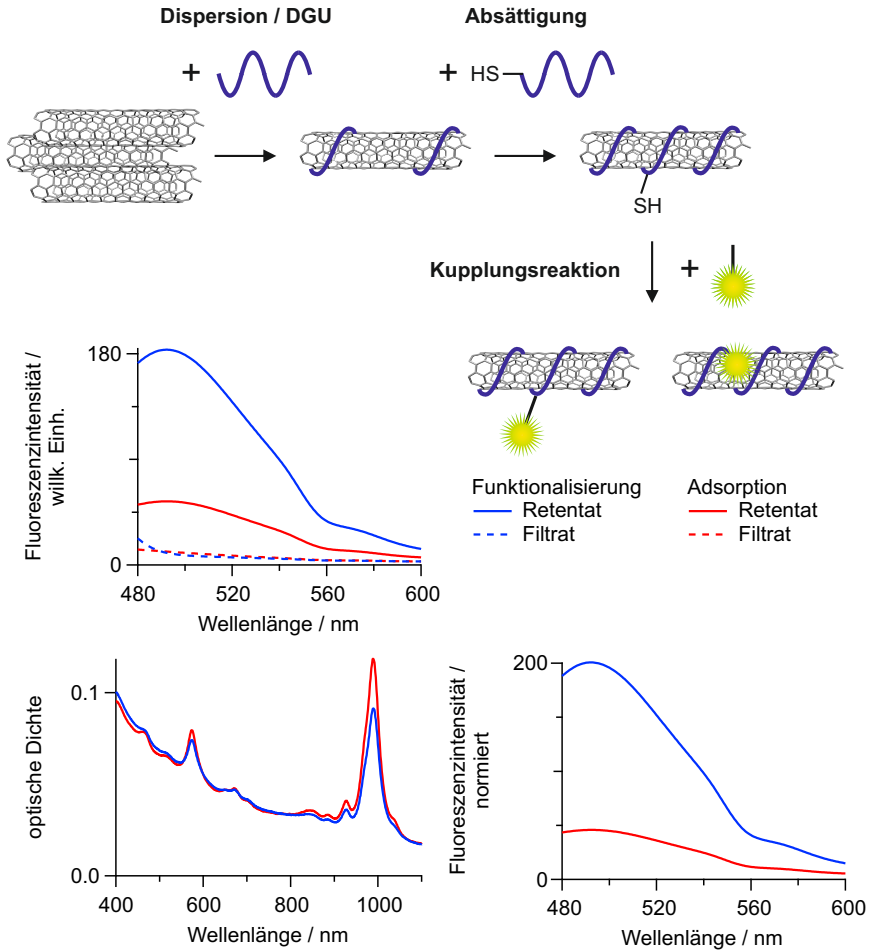


Abbildung 6.17: Dritte Versuchsreihe zur Funktionalisierung durch eine direkte Kupplungsreaktion zwischen Fluorophor und ssDNA-SWNT-Konjugaten. Dem Schema ist die abgeänderte Reihenfolge der DNA-Zugabe zu entnehmen, wonach unmodifizierte Oligomere zur Dispersion und Individualisierung der Konjugate eingesetzt und deren freie Oberfläche mit DNA-SH gesättigt wird. Auch hier schließt der Kupplungsschritt mit aktiviertem Dansyl-Fluorophor direkt an die Behandlung mit TCEP an. Der Erfolg der Funktionalisierung lässt sich durch den Vergleich der entsprechenden Fluoreszenzintensitäten feststellen.

satz eines kommerziell erhältlichen Fluorophorsystems getestet werden. 2-Aminoakridon erfüllt durch die primäre Aminogruppe die Voraussetzung für die Kupplungsstrategie und wird analog zur Dansylverbindung mit dem heterobifunktionellem Crosslinker Sulfo-SMCC aktiviert. Die Kupplungsreaktion erfolgt wie in der vorangegangenen Versuchsreihe im Anschluss an eine TCEP-Behandlung der mit DNA-SH abgesättigten ssDNA-SWNT-Konjugate. Das Schema mit den einzelnen Präparationsschritten sowie die aus dem Experiment resultierenden Absorptions- und Fluoreszenzspektren sind Abbildung 6.18 zu entnehmen.

Wie schon in den Versuchsreihen zuvor werden auch hier die Fluoreszenzintensitäten für eine Beurteilung des Erfolgs der durchgeführten Kupplungsreaktion herangezogen. Die Filtrate aus dem Reinigungsschritt des Reaktionsgemisches weisen eine deutlich schwächere Emission des AMAC-Farbstoffs auf als die zugehörigen SWNT-Proben im Retentat. Allerdings kann im Gegensatz zu den Experimenten mit dem Dansyl-Fluorophor keine spektrale Verschiebung zwischen freiem AMAC im Filtrat und den adsorbierten bzw. gekuppelten Farbstoffmolekülen des SWNT-Retentats festgestellt werden. Der Vergleich der auf die S_1 -Absorptionsbande normierten Fluoreszenzintensitäten liefert auch im Fall der AMAC-Funktionalisierung ein signifikant stärkeres Signal für die Kupplungsreaktion als für das Kontrollexperiment mit einer Adsorption des Farbstoffs. Da in der vierten Versuchsreihe ebenfalls beide Kriterien für eine erfolgreiche Funktionalisierung erfüllt werden, kann abschließend auch die Kupplung des kommerziell erhältlichen Fluorophors AMAC als erfolgreich betrachtet werden.

Mit Funktionalisierungsrouten ③ durch eine direkte Reaktion des aktivierten Fluorophors mit individualisierten und vorbehandelten ssDNA-SWNT-Konjugaten besteht eine zielführende Strategie zur Kupplung von Farbstoffen an nicht-kovalent gebundene DNA auf Nanoröhren. Tabelle 6.4 fasst die in diesem Zusammenhang durchgeführten Versuchsreihen zusammen.

Es zeigt sich, dass eine Kombination aus DNA-Absättigung der Nanorohroberfläche und reduktiver TCEP-Behandlung eine Funktionalisierung von ssDNA-SWNT-Konjugaten mit einem Fluorophorsystem ermöglicht. Die Reihenfolge, in welcher unmodifizierte Oligomere und Thiol-haltige Analoga in

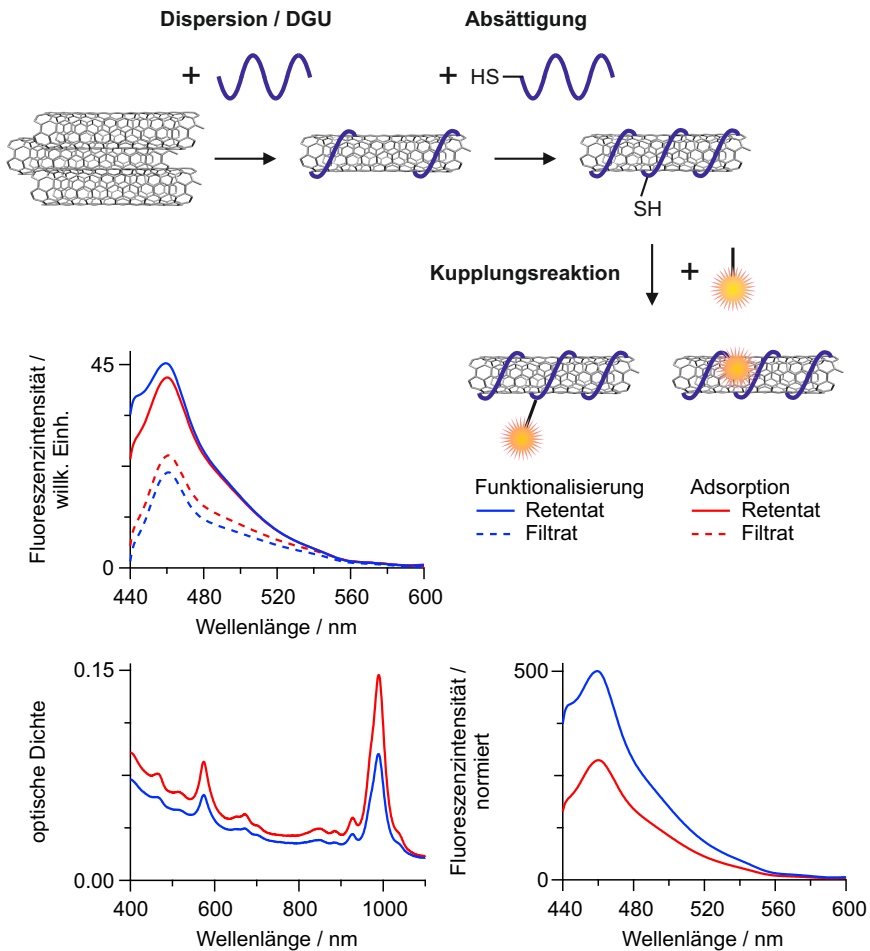


Abbildung 6.18: Vierte Versuchsreihe zur Funktionalisierung durch eine direkte Kupplungsreaktion zwischen Fluorophor und ssDNA-SWNT-Konjugaten. Die Reihenfolge der DNA-Zugabe ist analog zur dritten Versuchsreihe gewählt. Nach TCEP-Behandlung folgt hier die Kupplung mit aktiviertem AMAC-Fluorophor. Als Resultat lässt sich aus dem Vergleich der Emissionssignale ein Erfolg der Funktionalisierungsstrategie folgern.

Versuch	Variation	Ergebnis
1	ohne Absättigung, ohne TCEP-Behandlung	-
2	Absättigung mit DNA, TCEP-Behandlung	+
3	DGU mit DNA, Absättigung mit DNA-SH	+
4	AMAC als Fluorophor	+

Tabelle 6.4: Übersicht der Versuchsreihen nach Funktionalisierungsrouten ③ und deren Bewertung hinsichtlich einer gescheiterten oder erfolgreichen Funktionalisierung als Resultat.

der Rohdispersion und Oberflächenabsättigung eingesetzt werden, wirkt sich nicht negativ auf den Erfolg der Kupplungsreaktion aus. Somit kann der kostengünstigere Weg durch Einsatz sehr geringer Volumina an DNA-SH zur Nanorohroberflächenbedeckung anstatt der SWNT-Rohdispersion mit diesem modifiziertem Oligomer gewählt werden. Mit einem kommerziell erhältlichen Farbstoffsystem kann der gleiche Erfolg erzielt werden wie mit dem zunächst getesteten Dansyl-Fluorophor als Modellverbindung.

6.3.3 Quantifizierung der Funktionalisierung

Nach der erfolgreichen Kupplungsreaktion zwischen ssDNA-SWNT-Konjugaten und Fluorophoren mit Strategie ③ soll ein Maß für die Effektivität der Funktionalisierung gegeben werden. Dazu muss eine Abschätzung für die Menge an kovalent gebundenem Fluorophor unter Berücksichtigung des Anteils adsorbierter Farbstoffmoleküle erfolgen. Eine einfache Quantifizierung durch Ablesen der Fluoreszenzintensität und Vergleich mit einer Eichkurve der reinen Fluorophorlösung kann in diesem Fall jedoch nicht durchgeführt werden, da es durch Fluoreszenzlöschung zu einer Verringerung der Emission im gebundenen Zustand an Nanoröhren verglichen mit der Referenzlösung ohne SWNTs kommt. Da auch für kovalent an DNA-Stränge gebundene Fluorophore eine Wahrscheinlichkeit für eine gleichzeitig vorliegende adsorptive Wechselwirkung zwischen dem ausgeprägten π -System der Kohlenstoffnanoröhre und dem aromatischen Anteil des Farbstoffs besteht, muss nach der Funktionalisierung ein resonanter

Energietransfer nach Förster als Ursache für Fluoreszenzquenchen berücksichtigt werden. Zwischen den Konzentrationen des freien Fluorophors c_{frei} und dem an SWNTs gebundenen Farbstoff c_{gebunden} besteht folgender Zusammenhang:

$$c_{\text{gebunden}} = \frac{\tau_{\text{frei}}}{\tau_{\text{gebunden}}} \cdot \frac{I_{\text{gebunden}}}{I_{\text{frei}}} \cdot c_{\text{frei}} \quad (6.3)$$

Um die Menge gebundener Fluorophore zu erhalten, benötigt es somit die Kenntnis der Fluoreszenzlebensdauern τ_{frei} bzw. τ_{gebunden} für den Farbstoff in Lösung bzw. an SWNTs gebunden sowie die jeweils zugehörigen Intensitäten I_{frei} bzw. I_{gebunden} aus den Emissionsspektren. Unter Berücksichtigung der spektralen Verschiebung beim Übergang vom freien zum gebundenen Zustand des Fluorophors wird anstelle der Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum das Integral unterhalb der Bande in einem definierten Bereich genutzt.

Zur Ermittlung der Emissionslebensdauern werden durch zeitaufgelöstes Einzelphotonenzählen Fluoreszenzabklingkurven der Farbstoffe aufgenommen. In den Abbildungen 6.19 und 6.20 sind die Resultate der TCSPC-Messungen an den beiden Fluorophorsystemen Dansyl und AMAC sowohl für den jeweils freien Farbstoff als auch für die Proben aus den Funktionalisierungsexperimenten nach Route ③ gezeigt.

Die Werte der Lebensdauern τ werden durch eine Fitroutine unter Annahme einer biexponentiellen Fluoreszenzabnahme berechnet. Die resultierenden Werte werden für die freie Form sowie nach Kupplung an ssDNA-SWNT-Konjugate in Tabelle 6.5 zusammengestellt.

Größe	Dansyl	AMAC
$\tau_{\text{frei}} / \text{ns}$	4.6	10.6
$\tau_{\text{gebunden}} / \text{ns}$	2.6	9.4

Tabelle 6.5: Übersicht der Fluoreszenzlebensdauern des Dansyl- und AMAC-Fluorophors. Verglichen werden jeweils die freie sowie die an ssDNA-SWNT gebundene Form des Farbstoffs.

Zur Ermittlung der Konzentration der an ssDNA-SWNT gebundenen Farb-

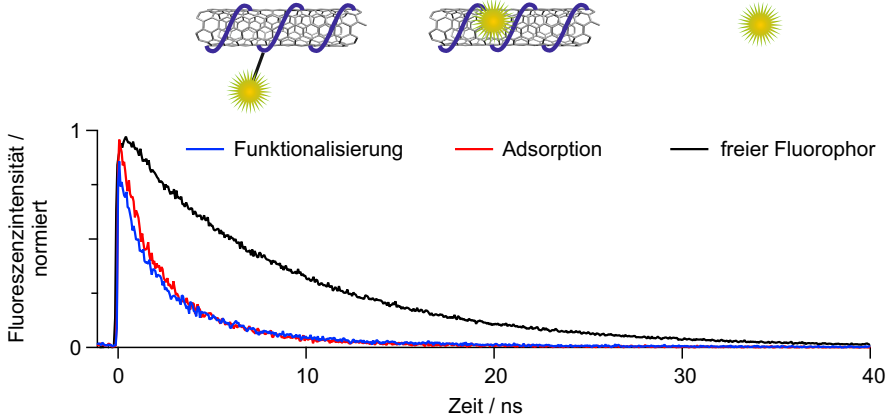


Abbildung 6.19: Fluoreszenzabklingkurven des Dansyl-Farbstoffs. Der Vergleich zwischen der reinen Fluorophorlösung und den durch Reaktion mit ssDNA-SWNT-Konjugaten kovalent bzw. adsorptiv gebundenen Molekülen zeigt eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer nach der Funktionalisierung.

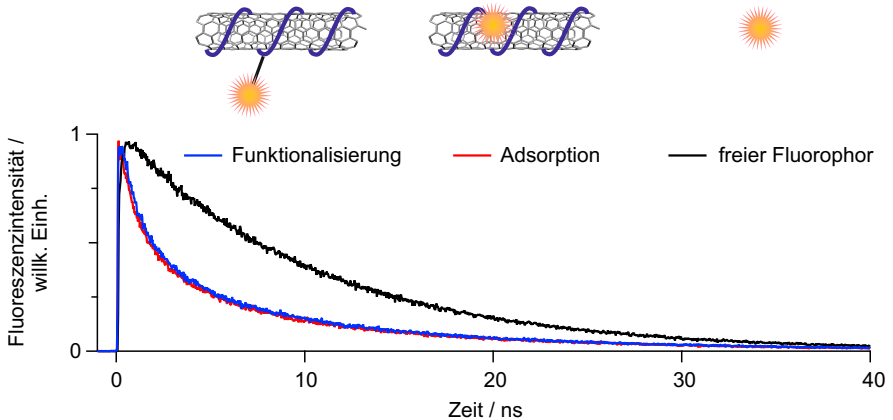


Abbildung 6.20: Fluoreszenzabklingkurven von AMAC. Der freie Fluorophor zeigt eine deutliche höhere Emissionslebensdauer als die nach Funktionalisierung bzw. Adsorption an SWNTs gebundenen Farbstoffmoleküle.

stoffmoleküle c_{gebunden} werden die Flächen unter den jeweiligen Fluoreszenzbanden durch Integration über einen definierten Wellenlängenbereich berechnet. Um eine möglichst genaue Abschätzung über die Anzahl gekuppelter Fluorophore zu erhalten, müssen zum einen die trotz Filtration in geringen Mengen frei in der Retentatlösung befindlichen Farbstoffmoleküle subtrahiert werden unter der Annahme, dass deren Konzentration im Retentat ähnlich zu der im Filtrat sei. Hierzu werden die Integrale der Emissionsspektren vom Retentat und vom Filtrat voneinander abgezogen. Zum anderen muss der Anteil an nicht kovalent, sondern adsorptiv gebundenen Fluorophore berücksichtigt werden. Dafür muss zunächst eine Normierung der Emission auf die S_1 -Absorption erfolgen, um von einer äquivalenten SWNT-Menge auszugehen. Nach Differenzbildung der Flächen unterhalb der normierten Fluoreszenzbanden für den Funktionalisierungsansatz und der Adsorption muss der erhaltene Wert zurück auf das Absorptionsspektrum hochgerechnet werden, so dass eine Anpassung an die tatsächliche Kohlenstoffnanorohrmenge erfolgt. Sämtliche für diese Vorgehensweise benötigten Daten werden in Tabelle 6.6 wiedergegeben. Die Integration verläuft für den Dansyl-Fluorophor über den gesamten Wellenlängenbereich des Emissionsspektrums von 480 nm bis 600 nm und im Fall von AMAC von 440 nm bis 600 nm.

Größe	Dansyl		AMAC	
	Funktionalisierung	Adsorption	Funktionalisierung	Adsorption
$I_{\text{Retentat}} / \text{willk. Einh.}$	534.7	296.0	2684	2429
$I_{\text{Filtrat}} / \text{willk. Einh.}$	79.6	98.4	1026	1315
Normierungsfaktor aus S_1 -Absorption	0.96	0.99	0.09	0.15
$I_{\text{gebunden}} / \text{willk. Einh.}$	262		971	

Tabelle 6.6: Zusammenstellung der benötigten Daten zur Ermittlung von I_{gebunden} aus Gleichung 6.3 sowie die dafür erhaltene Werte.

Aus den Daten lässt sich der in Gleichung 6.3 benötigte Wert I_{gebunden} für die Dansylverbindung und AMAC in gekuppelter Form ermitteln. I_{frei} wird für

beide Fälle aus der Emission der reinen Fluorophorlösung bekannter Konzentration c_{frei} erhalten. Tabelle 6.7 fasst die benötigten Daten zur Quantifizierung sowie deren Resultate zusammen.

Größe	Dansyl	AMAC
$\tau_{\text{frei}} / \text{ns}$	4.6	10.6
$\tau_{\text{gebunden}} / \text{ns}$	2.6	9.4
$I_{\text{frei}} / \text{willk. Einh.}$	1917	45410
$I_{\text{gebunden}} / \text{willk. Einh.}$	262	971
$c_{\text{frei}} / \mu\text{M}$	41.2	9.9
$c_{\text{gebunden}} / \mu\text{M}$	9.3	0.24

Tabelle 6.7: Zusammenstellung der benötigten Daten zur Quantifizierung der Funktionalisierung nach Gleichung 6.3 sowie die daraus resultierende Werte für c_{gebunden} .

Nach Gleichung 6.3 können aus den Daten die Konzentrationen der gekuppelten Fluorophore im Fall der Dansylverbindung und AMAC berechnet werden, die sich wie in Tabelle 6.7 gezeigt ergeben.

Um eine Vorstellung über die Größenordnung der ermittelten Konzentrationen der gebundenen Farbstoffmoleküle hinsichtlich der daraus resultierenden Anzahl an Fluorophoren pro Nanoröhre zu gewinnen, soll abschließend das Verhältnis dieser Fluorophormenge zum vorliegenden SWNT-Gehalt bestimmt werden. Die Nanorohrmenge einer Probe kann wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben aus dem Absorptionsspektrum als molare Kohlenstoffatomkonzentration c_C gemäß der Gleichung 2.1 genähert werden. Die Anzahl an gebundenen Fluorophoren $N_{\text{Fluorophor}}$ kann unabhängig von der Nanorohrlänge berechnet werden, indem die für die (6,5)-Chiralität charakteristische Kohlenstoffatomanzahl $N_C = 88.48$ pro Nanometer Röhrenlänge berücksichtigt wird. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang gemäß:

$$N_{\text{Fluorophor}} / \text{nm}^{-1} = \frac{c_{\text{gebunden}}}{c_C} \cdot N_C / \text{nm}^{-1} \tag{6.4}$$

In Tabelle 6.8 werden die aus den jeweiligen Absorptionsspektren ermittelten Werte für c_C und das Gesamtergebnis der Quantifizierung angegeben.

Größe	Dansyl	AMAC
$c_C / \mu\text{M}$	167	17.5
$N_{\text{Fluorophor}} / \text{nm}^{-1}$	4.9	1.2

Tabelle 6.8: Daten und Ergebnis zur Quantifizierung der Funktionalisierung nach Gleichung 6.4.

Aus der sehr hohen Fluorophoranzahl $N_{\text{Fluorophor}} / \text{nm}^{-1}$ zeigt sich in beiden Fällen, dass sich mit dieser Methode zur Quantifizierung nur schwer ein realistischer Wert für die Funktionalisierung abschätzen lässt. Trotz Berücksichtigung der nach Filtration verbliebenen freien Fluorophore in Lösung und Abzug des Anteils adsorbierter Farbstoffmoleküle kann lediglich eine obere Grenze für die Menge an erfolgreich kovalent an ssDNA-SWNT-Konjugate geknüpften Fluorophoren angegeben werden.

Eine mögliche Ursache für das Zustandekommen unverhältnismäßig hoher Fluorophoranzahlen pro Nanometer Röhrenoberfläche kann in einer nur näherungsweise Vergleichbarkeit zwischen dem jeweiligen Versuch und der zugehörigen Kontrolle durch Adsorption vermutet werden. Da sich unmodifizierte DNA und das korrespondierende DNA-SH-Oligomer in ihrer Art der SWNT-Bedeckung unterscheiden, sind die der Adsorption von Farbstoffmolekülen zur Verfügung stehenden Besetzungsstellen in den beiden Ansätzen nicht identisch. Abbildung 6.21 soll die vorliegende Problematik schematisch aufzeigen.

Unmodifizierte DNA-Stränge lagern sich bereitwilliger auf der hydrophoben Kohlenstoffoberfläche an als DNA-SH. Dies macht sich bereits bei der Solubilisierung des Rohmaterials bemerkbar, bei der im Falle der DNA-SH eine höhere Oligonukleotidkonzentration zur erfolgreichen Dispergierung benötigt wird. Somit ist anzunehmen, dass bei der SWNT-Oberflächenabsättigung durch einen DNA-Überschuss die Nanoröhre wesentlich stärker von Oligomeren bedeckt wird, wenn es sich um unmodifizierte Einzelstränge handelt. Demnach liegt eine niedrigere Anzahl an Adsorptionsstellen für freie Fluorophore im Kontrollexperiment verglichen zum Kupplungsansatz unter Verwendung von DNA-SH zur Oberflächensättigung vor. Relativ betrachtet

resultiert daher eine größere Menge adsorbierter Farbstoffmoleküle im eigentlichen Funktionalisierungsexperiment als in der Kontrolle zur Adsorption. Mit diesem Ansatz lassen sich die unverhältnismäßig hohen Werte für $N_{\text{Fluorophor}} / \text{nm}^{-1}$ zwar verstehen, jedoch nicht korrigieren.

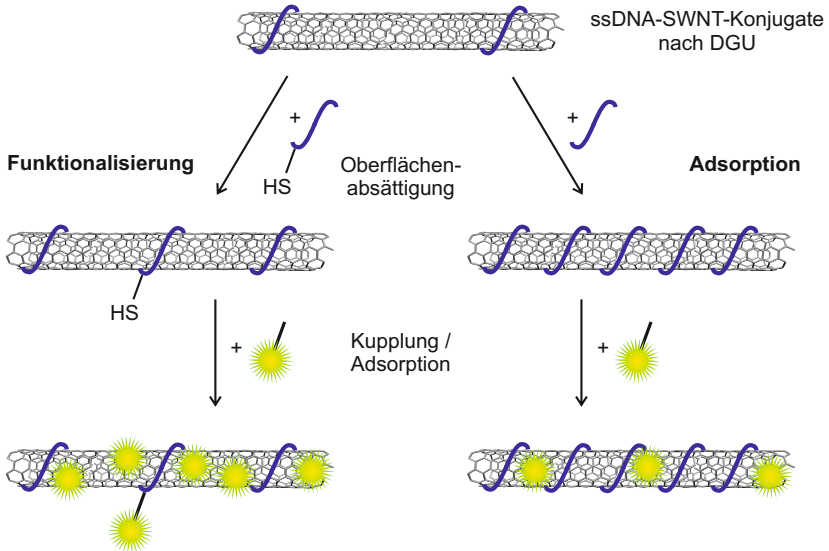


Abbildung 6.21: Veranschaulichung der unterschiedlichen Adsorptionseigenschaften von funktionalisierten und nicht-funktionalisierten ssDNA-Oligomeren. Durch die geringere Oberflächenbedeckung durch DNA-SH (links) steht mehr freie Nanorohroberfläche zur Adsorption freier Fluorophore zur Verfügung.

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Ihre Biokompatibilität, eine ausgeprägte Fähigkeit zur Zellpenetration und die hohe Beladbarkeit mit speziellen Molekülen machen ssDNA-SWNT-Derivate zu geeigneten zellulären Transportsystemen. In diesem Projekt wurde die Funktionalisierung mit zwei verschiedenen Fluorophoren als Modellverbindungen für Wirkstoffe untersucht, um neue Kupplungsmöglichkeiten für DNA-dispergierte SWNTs zu etablieren. Während in der Literatur

häufig eine kovalente Anbindung von Agenzien an die Nanorohroberfläche angestrebt wird, sollte in dieser Arbeit das nicht-kovalent gebundene Dispergieradditiv DNA für eine Kupplungsreaktion genutzt werden, um die optischen Eigenschaften der sorgfältig individualisierten (6,5)-SWNTs zu erhalten.

Dazu wurden drei unterschiedliche Funktionalisierungsrouten zur Präparation von Fluorophor-ssDNA-SWNT-Konjugaten erprobt. Zum einen besteht die Möglichkeit, Oligomere mit Fluorophoren zu funktionalisieren und diese anschließend auf die Nanorohroberfläche zu bringen. Auf diese Weise wurde in Route ① SWNT-Ruß mit Fluorophor-funktionalisierter DNA dispergiert und die (6,5)-chiralen Nanoröhren anschließend durch DGU angereichert. Im Rahmen des Funktionalisierungsschemas ② wurde versucht, die Fluorophor-modifizierten Oligomere auf bereits individualisierte ssDNA-SWNT-Konjugate durch Adsorption auf die noch freie Nanorohroberfläche aufzubringen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, den reinen Fluorophor zu aktivieren und sodann der direkten Reaktion mit ssDNA-SWNT-Konjugaten zu unterziehen, wie in der abschließend untersuchten Funktionalisierungsrouten ③ verfahren wurde. Verglichen mit den Experimenten aus den Funktionalisierungsmethoden ① und ②, die konzeptionell das Aufbringen von Fluorophor-funktionalisierter ssDNA auf Kohlenstoffnanoröhren verfolgten, kann die zuletzt getestete Strategie ③ als zielführend erachtet werden. Während bei den Funktionalisierungsrouten ① und ② nur sehr geringe Fluoreszenzunterschiede zwischen Funktionalisierung und Kontrollexperiment ohne Aussagekraft messbar sind, kann nach zuletzt untersuchter Strategie ③ eine erfolgreiche Kupplung gefunden werden. Die Quantifizierung erschwert sich allerdings durch eine fehlerbehaftete Vergleichbarkeit von Funktionalisierungs- und Kontrollexperiment, welche sich durch die unterschiedliche Effektivität der nicht-kovalenten Bedeckung der SWNT-Oberfläche mit den in den beiden Versuchen eingesetzten DNA-Oligomeren begründen lässt.

Nachdem in dieser Arbeit eine prinzipielle Funktionalisierbarkeit von DNA-dispergierten (6,5)-SWNTs demonstriert werden konnte, kann diese Methode

152 6 Funktionalisierung von DNA-Kohlenstoffnanorohr-Konjugaten

in weiterführenden Experimenten genutzt werden, um Wirkstoffe mit ähnlicher struktureller Beschaffenheit verglichen mit den Fluorophormodellen an die biokompatiblen ssDNA-SWNT-Konjugate zu binden und dem Transport in Zellen zu unterwerfen.

7 Zusammenfassung

Einzelstrang-DNA-dispergierte und individualisierte (6,5)-chirale Kohlenstoffnanoröhren bilden als Konjugatsystem den Ausgangspunkt dieser Dissertation. Im Vordergrund stehen dabei Untersuchungen zur Biokompatibilität dieser ssDNA-SWNT-Konjugate sowie deren Verhalten nach Zellpenetration und eine Funktionalisierbarkeit zum Wirkstofftransportsystem.

Das erste Projekt widmet sich in Kapitel 4 dem Studium der Konjugatstabilität unter physiologischen Bedingungen und einer Verträglichkeit gegenüber zellulären Systemen. Experimente zur Biokompatibilität werden erstmals an Nanorohrkonjugaten durchgeführt, welche nach Ultrazentrifugation im Dichtegradienten sorgfältig individualisiert vorliegen. Die umgebungs-sensitiven photophysikalischen Charakteristika vereinzelter (6,5)-SWNTs können zu einer Beurteilung der Konjugatintegrität in physiologischem Milieu genutzt werden. Die Stabilität von ssDNA-SWNT-Strukturen wird in Anwesenheit des Restriktionsenzym DNase I und dem in Zellnährmedien enthaltenen protein- und nukleasereichem Serum FBS auf die Probe gestellt. In beiden Fällen kann eine ausreichende ssDNA-SWNT-Integrität attestiert werden, die eine Verwendung unter Zellkultivierungsbedingungen erlaubt. Unter Berücksichtigung verschiedener in Zellen vorliegender pH-Umgebungen werden die Konjugate ebenfalls dieser Variation ausgesetzt. Bei Vorliegen stark saurer und basischer pH-Werte kann die Integrität von ssDNA-SWNT-Konjugaten nicht gewährleistet werden, was sich durch Aggregation bemerkbar macht. Innerhalb des breiten pH-Bereichs zwischen den Werten 3 und 11 hingegen kann eine gute Stabilität bestätigt werden. Für zelluläre Anwendungen bedeutet dieser Befund keine Einschränkung,

da in Kulturen lediglich neutrale bis schwach saure pH-Werte oberhalb von 4.5 zu finden sind.

Nachdem die Biostabilität der ssDNA-SWNT-Konjugate gewährleistet ist, kann in Zytotoxizitätsstudien eine *ex vivo*-Verträglichkeit des Nanomaterials getestet werden. Erste Untersuchungen mit der Mausmakrophagenlinie J774.1 weisen wie auch ausführliche Studien gegenüber menschlichen Epithelzellen HeLa auf eine uneingeschränkte Kompatibilität in den eingesetzten Konzentrationen hin. HeLa-Zellen, die mit DGU-gereinigten Nanorohrproben behandelt werden, zeigen eine geringfügig höhere Vitalität als nach Inkubation mit einer Rohdispersion undefinierter SWNT-Bündel.

Im Gesamtbild ergibt sich somit eine zufriedenstellende Biokompatibilität individualisierter ssDNA-SWNT-Konjugate, womit das in dieser Arbeit zentrale Kohlenstoffnanorohrsystem den Anforderungen für dessen biomedizinische Verwendbarkeit gerecht wird.

Der Schwerpunkt weiterer Untersuchungen liegt im zweiten Projekt aus Kapitel 5 auf dem Verhalten von ssDNA-SWNT-Konjugaten nach deren Aufnahme in HeLa-Zellen. Auch hier kann die starke Sensitivität der optischen Eigenschaften individualisierter (6,5)-Kohlenstoffnanoröhren gegenüber Umgebungseinflüssen genutzt werden, um Veränderungen im Emissionsverhalten von SWNTs nach deren zellulärer Aufnahme gegenüber dem Ausgangszustand zu beobachten. Nach ausführlicher Weißlicht-, Fluoreszenz- und SWNT-Photolumineszenzmikroskopie, aus deren Resultaten eine erfolgreiche Internalisierung von ssDNA-SWNTs in HeLa-Zellen eindeutig hervorgeht, stehen PL-spektroskopische Untersuchungen der Kohlenstoffnanoröhren im Vordergrund. Durch einen Vergleich des Emissionsverhaltens der ssDNA-SWNT-Konjugate in und außerhalb von Zellen können spektrale Verschiebungen, Linienverbreiterungen und verkürzte Fluoreszenzlebensdauern nach zellulärer Aufnahme festgestellt werden. Sowohl eine Aggregation von SWNTs als auch eine Beeinflussung durch die pH-Umgebung reichen nicht für eine vollständige Erklärung des Befunds aus. Vielmehr kann die in endosomalen Kompartimenten durch das Größenverhältnis von Endosomen zu SWNTs entstehende räumliche Nähe einer großen Nanorohrmenge untereinander als Ursache für eine Veränderung der

dielektrischen Umgebung und folglich des Emissionsverhaltens betrachtet werden.

Durch Verwendung der Kohlenstoffnanoröhren als Marker und Sensor können ssDNA-SWNT-Konjugate in Zellen somit nicht nur lokalisiert, sondern darüber hinaus hinsichtlich einer möglichen Aggregation untersucht werden. Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Daten kann zwar eine vollständige Aggregation der SWNTs durch deren Aufnahme in Zellen ausgeschlossen werden, sie muss jedoch in geringfügigem Ausmaß neben einer Beeinflussung durch die pH-Umgebung und die große räumliche Nähe durchaus in Betracht gezogen werden. Individualisierte ssDNA-SWNT-Konjugate können damit erstmals zeitaufgelöst PL-mikrospektroskopisch in HeLa-Zellen charakterisiert werden.

Für das letzte Projekt werden in Kapitel 6 neuartige Funktionalisierungsmöglichkeiten von ssDNA-SWNT-Konjugaten zu zellulären Transportsystemen unter Erhalt der photophysikalischen Eigenschaften erforscht. Dazu soll das Dispergiermittel DNA als Kupplungsstelle für eine kovalente Anbindung eines Agens genutzt werden. Anstelle eines Wirkstoffes werden die Untersuchungen mit einem Fluorophor als Modellverbindung durchgeführt, welcher den Vorteil einer einfachen Detektierbarkeit liefert. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, das Oligomer mit dem Fluorophor vorzufunktionalisieren und anschließend auf die Oberfläche der SWNTs zu bringen. Als effektiver erweist sich die Methode der direkten Kupplung des Farbstoffs an bereits DNA-dispergierte SWNTs. Der Erfolg in der Präparation von Fluorophor-ssDNA-SWNT-Konjugaten wird über die Emission des Fluorophors mit entsprechenden Referenzexperimenten gemessen. Der Versuch einer Quantifizierung liefert jedoch sehr hohe Werte, die lediglich als eine obere Grenze für die gefundene Anzahl gebundener Fluorophore pro Nanoröhre angesehen werden können.

Im Verlauf des Projekts kann eine Funktionalisierbarkeit der Nanoröhren über das Dispergieradditiv DNA als neue Strategie aufgezeigt werden. Im Gegensatz zu bekannten Wirkstofftransportsystemen bietet dieser Funktionalisierungsansatz den Vorteil, dass die optischen Eigenschaften der individualisierten ssDNA-SWNT-Konjugate erhalten bleiben, welche wieder-

um einen gleichzeitigen Einsatz der Nanoröhren als Transporter und Marker bzw. Sensor erlauben.

Die vorliegende Dissertation liefert neben dieser bisher unbekanntem Funktionalisierungsstrategie neue Erkenntnisse über die Biokompatibilität speziell von individualisierten ssDNA-SWNT-Konjugaten und deren Verhalten in HeLa-Zellen. Mit diesem Wissen kann der gezielte Wirkstofftransport durch Kohlenstoffnanoröhren als biokompatibles und zellgängiges Trägersystem anvisiert werden.

8 Summary

The key element of this thesis is a conjugate system of single-stranded DNA and individualized (6,5) single-wall carbon nanotubes. The investigations are mainly focused on the biocompatibility of ssDNA-SWNT conjugates, as well as their behavior after cell penetration and general ability to be functionalized for drug delivery.

Within the first project, chapter 4 contributes to the study the conjugate stability under physiological conditions and compatibility towards cellular structures. For the first time, such biocompatibility experiments are carried out with nanotube conjugates, which are thoroughly individualized by ultracentrifugation assisted density gradient. The photophysical characteristics of isolated (6,5) SWNTs are highly sensitive towards their environment and can thus be used to evaluate the state of conjugate integrity in a physiological milieu. The stability of ssDNA-SWNT structures is tested in the presence of restriction enzyme DNase I and FBS serum, an important nutrient medium ingredient rich in proteins and nucleases. In either case, the integrity of ssDNA-SWNT conjugates is not affected. With respect to the pH variety occurring in cell structures, the conjugate stability is also investigated in acid and base milieu. Both strong acid and alkaline pH environments influence the integrity of ssDNA-SWNT, leading to aggregation of nanotubes. Conversely, good conjugate stability can be evaluated in a wide pH range between 3 and 11, revealing unlimited applicability towards cells, where the pH environment is known to vary between neutral and weakly acid pH values above 4.5.

After evaluation of the biostability of ssDNA-SWNT conjugates, they have to be tested in *ex vivo* cytotoxicity assays. Studies are primarily carried

out with murine macrophage-like cells J774.1 and in more detail with the human cervix carcinoma cell line HeLa. Both indicate no cytotoxic effects with applied SWNT concentrations. Within the HeLa cell studies, the impact of DGU preparation on SWNT cytotoxicity is a further point of interest. As a result, slightly enhanced cell viability can be observed with DGU purified samples as compared to raw dispersion consisting of non-defined SWNT bundles.

Overall, ssDNA-SWNT conjugates can be assumed to be sufficiently biostable and thus suitable for biomedical applications.

Further investigations in the second part of this work in chapter 5 are focused on the behavior of ssDNA-SWNT conjugates after cellular uptake. Again, the strong environmental sensitivity of optical properties of individualized (6,5) carbon nanotubes can be used to detect changes of the SWNT emission after internalization. Different techniques have been employed to visualize ssDNA-SWNT structures in HeLa cells using white light, fluorescence, and SWNT photoluminescence microscopy. By PL spectroscopy of ssDNA-SWNTs in cells spectral shifts, line-broadening and shortened lifetimes are observed when comparing SWNT emission inside and outside of cell culture. Neither nanotube aggregation nor the influence of the cell-specific pH environment are sufficient explanations for such spectral behavior. Indeed, the spatial proximity of SWNTs with each other in small sized endosomal cell compartments is supposed to cause nanotube-nanotube interactions that change the dielectric environment and thus the emission behavior of SWNTs.

Within the use of carbon nanotubes as marker and sensor, ssDNA-SWNT conjugates cannot only be localized, but also characterized, with regard to possible nanotube aggregation. The data presented in this work can, on the one hand, exclude a total aggregation of SWNTs within their cellular uptake. But, on the other hand, a small extent of aggregation, pH environmental effects, and the spatial proximity of a high amount of SWNTs in comparatively small endosomes have to be considered as factors that influence SWNT emission properties. In this study, individualized ssDNA-SWNT conjugates can be characterized via time-resolved PL microspectroscopy for the first time.

The last project in chapter 6 addresses to new functionalization routes of ssDNA-SWNT conjugate with respect to drug delivery applications while retaining the photophysical characteristics. The SWNT dispersion additive DNA serves as binding site for covalent attachment of agents. For a convenient sample characterization, a fluorophor is used as model compound instead of a specific drug. In general, fluorophor-ssDNA-SWNT systems can be obtained by pre-functionalization of oligomers with dye, followed by attachment of the modified DNA on the nanotube surface. More promising, however, is the route via a direct coupling reaction of activated fluorophor molecules with specific ssDNA-SWNT conjugates. The successful sample functionalization can be evaluated from the fluorescence of the dye in comparison with corresponding control experiments. An attempt for quantification of functionalization is found to be problematic as the revealed values are too high and can thus only be regarded as upper limits for the number of fluorophors per nanotube.

A new functionalization method for SWNTs can be established using non-covalently bound DNA as the coupling point. Compared to well-known drug delivery systems, the optical properties of SWNTs can be retained with this procedure, allowing the simultaneous use of nanotubes as cellular transporter and marker or sensor.

In addition to the new functionalization strategy, further knowledge about biocompatibility of well-isolated ssDNA-SWNT conjugates and their behavior after cellular uptake can be obtained through this thesis. Thus, a targeted drug delivery with isolated carbon nanotubes as biocompatible and a cell penetrating carrier system could be aimed for future work.

Literaturverzeichnis

- [1] R. Feynman, *Engineering and Science* **1960**, (23), 22–36.
- [2] A. A. Shvedova, V. E. Kagan, B. Fadeel, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2010**, 50(1), 63–88.
- [3] L. Zhang, T. J. Webster, *Nano Today* **2009**, 4(1), 66–80.
- [4] K. Maier-Hauff, F. Ulrich, D. Nestler, H. Niehoff, P. Wust, B. Thiesen, H. Orawa, V. Budach, A. Jordan, *Journal of Neuro-Oncology* **2011**, 103(2), 317–324.
- [5] <http://magforce.de/home.html> (aufgerufen am 27.02.2012).
- [6] A. Schroeder, D. A. Heller, M. M. Winslow, J. E. Dahlman, G. W. Pratt, R. Langer, T. Jacks, D. G. Anderson, *Nature Reviews Cancer* **2011**, 12(1), 39–50.
- [7] K. Kostarelos, L. Lacerda, G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J. Luangsivilay, S. Godefroy, D. Pantarotto, J.-P. Briand, S. Muller, M. Prato, A. Bianco, *Nature Nanotechnology* **2007**, 2(2), 108–113.
- [8] Z. Liu, X. Li, S. M. Tabakman, K. Jiang, S. Fan, H. Dai, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130(41), 13540–13541.
- [9] Z. Chen, S. M. Tabakman, A. P. Goodwin, M. G. Kattah, D. Daranciang, X. Wang, G. Zhang, X. Li, Z. Liu, P. J. Utz, K. Jiang, S. Fan, H. Dai, *Nature Biotechnology* **2008**, 26(11), 1285–1292.
- [10] D. A. Heller, S. Baik, T. E. Eurell, M. S. Strano, *Advanced Materials* **2005**, 17(23), 2793–2799.

- [11] D. A. Heller, H. Jin, B. M. Martinez, D. Patel, B. M. Miller, T.-K. Yeung, P. V. Jena, C. Hobartner, T. Ha, S. K. Silverman, M. S. Strano, *Nature Nanotechnology* **2009**, 4(2), 114–120.
- [12] A. A. Boghossian, J. Zhang, P. W. Barone, N. F. Reuel, J.-H. Kim, D. A. Heller, J.-H. Ahn, A. J. Hilmer, A. Rwei, J. R. Arkalgud, C. T. Zhang, M. S. Strano, *ChemSusChem* **2011**, 4(7), 848–863.
- [13] A. A. Bhirde, V. Patel, J. Gavard, G. Zhang, A. A. Sousa, A. Masedunskas, R. D. Leapman, R. Weigert, J. S. Gutkind, J. F. Rusling, *ACS Nano* **2009**, 3(2), 307–316.
- [14] N. W. S. Kam, T. C. Jessop, P. A. Wender, H. Dai, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126(22), 6850–6851.
- [15] S. I. Pascu, R. L. Arrowsmith, S. R. Bayly, S. Brayshaw, Z. Hu, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2010**, 368(1924), 3683–3712.
- [16] K. Kostarelos, A. Bianco, M. Prato, *Nature Nanotechnology* **2009**, 4(10), 627–633.
- [17] E. Riedel, C. Janiak, *Anorganische Chemie*, 7. Aufl., de Gruyter, Berlin [u.a.], **2007**.
- [18] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien: Eine Einführung*, Teubner, Wiesbaden, **2007**.
- [19] S. Iijima, *Nature* **1991**, 354(6348), 56–58.
- [20] S. Iijima, T. Ichihashi, *Nature* **1993**, 363(6430), 603–605.
- [21] A. Jorio, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Carbon nanotubes: Advanced topics in the synthesis, structure, properties, and applications*, Springer, Berlin and New York, **2008**.
- [22] D. Stich, *Zur Exziton- und Ladungsträgerdynamik in einwandigen Kohlenstoffnanoröhren*, Dissertation, Universität Würzburg, **2012**.

- [23] F. Schöppler, *Photolumineszenzmikroskopie und -spektroskopie halbleitender Kohlenstoffnanoröhren*, Dissertation, Universität Würzburg, **2012**.
- [24] R. Saito, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Physical properties of carbon nanotubes*, Imperial College Press, London, **1998**.
- [25] D. M. Guldi, N. Martin, *Carbon nanotubes and related structures: Synthesis, characterization, functionalization, and applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.
- [26] M. J. O'Connell, *Science* **2002**, 297(5581), 593–596.
- [27] T. Ando, *Journal of the Physics Society Japan* **1997**, 66(4), 1066–1073.
- [28] V. Perebeinos, J. Tersoff, P. Avouris, *Physical Review Letters* **2004**, 92(25).
- [29] F. Wang, *Science* **2005**, 308(5723), 838–841.
- [30] F. Schöppler, C. Mann, T. C. Hain, F. M. Neubauer, G. Privitera, F. Bonaccorso, D. Chu, A. C. Ferrari, T. Hertel, *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, 115(30), 14682–14686.
- [31] F. Wang, G. Dukovic, L. Brus, T. Heinz, *Physical Review Letters* **2004**, 92(17).
- [32] J. Crochet, M. Clemens, T. Hertel, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129(26), 8058–8059.
- [33] T. Hertel, S. Himmelein, T. Ackermann, D. Stich, J. Crochet, *ACS Nano* **2010**, 4(12), 7161–7168.
- [34] H. Plattner, J. Hentschel, *Zellbiologie: 23 Tabellen*, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart and New York, **2002**.
- [35] G. Löffler, *Basiswissen Biochemie*, 7. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2008**.

- [36] J. M. Berg, B. Häcker, L. Stryer, J. L. Tymoczko, *Biochemie*, 6. Aufl., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **2010**.
- [37] Watson J., Crick F., *Nature* **1953**, (4356).
- [38] R. T. Wyatt, *Biochemical Journal* **1951**, (48), 584–590.
- [39] R. Garrett, C. Grisham, *Biochemistry*, 3. Aufl., Thomson Brooks/Cole, Belmont / CA (USA), **2005**.
- [40] <http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0303.asp> (aufgerufen am 21.03.2012).
- [41] S. Vanecko, M. S. Laskowski, *The Journal of Biological Chemistry* **1961**, 236(12), 3312–3316.
- [42] C. Mülhardt, *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*, 6. Aufl., Spektrum Akad.-Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [43] N. Nakashima, S. Okuzono, H. Murakami, T. Nakai, K. Yoshikawa, *Chemistry Letters* **2003**, 32(5), 456–457.
- [44] H. Cathcart, S. Quinn, V. Nicolosi, J. M. Kelly, W. J. Blau, J. N. Coleman, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111(1), 66–74.
- [45] M. Zheng, A. Jagota, E. D. Semke, B. A. Diner, R. S. Mclean, S. R. Lustig, R. E. Richardson, N. G. Tassi, *Nature Materials* **2003**, 2(5), 338–342.
- [46] S. R. Vogel, M. M. Kappes, F. Hennrich, C. Richert, *Chemistry - A European Journal* **2007**, 13(6), 1815–1820.
- [47] M. Zheng, *Science* **2003**, 302(5650), 1545–1548.
- [48] R. R. Johnson, A. T. C. Johnson, M. L. Klein, *Nano Letters* **2008**, 8(1), 69–75.
- [49] T. C. Hain, K. Kröker, D. G. Stich, T. Hertel, *Soft Matter* **2012**, 8(10), 2820.
- [50] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie: Mit 36 Tabellen*, 1. Aufl., Springer, Berlin [u.a.], **2005**.

- [51] K. Munk, *Biochemie - Zellbiologie*, 1. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, **2008**.
- [52] Y. Lee, K. E. Geckeler, *Advanced Materials* **2010**, 22(36), 4076–4083.
- [53] D. Pantarotto, J.-P. Briand, M. Prato, A. Bianco, *Chemical Communications* **2004**, 1, 16–17.
- [54] H. N. Yehia, R. K. Draper, C. Mikoryak, E. Walker, P. Bajaj, I. H. Musselman, M. C. Daigrepoint, G. R. Dieckmann, P. Pantano, *Journal of Nanobiotechnology* **2007**, 5:8.
- [55] N. W. S. Kam, Z. Liu, H. Dai, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45(4), 577–581.
- [56] H. Jin, D. A. Heller, M. S. Strano, *Nano Letters* **2008**, 8(6), 1577–1585.
- [57] H. Jin, D. A. Heller, R. Sharma, M. S. Strano, *ACS Nano* **2009**, 3(1), 149–158.
- [58] P. Cherukuri, S. M. Bachilo, S. H. Litovsky, R. B. Weisman, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126(48), 15638–15639.
- [59] M. L. Di Giorgio, S. Di Bucchianico, A. M. Ragnelli, P. Aimola, S. Santucci, A. Poma, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2011**, 722(1), 20–31.
- [60] G. M. Mutlu, G. R. S. Budinger, A. A. Green, D. Urich, S. Soberanes, S. E. Chiarella, G. F. Alheid, D. R. McCrimmon, I. Szleifer, M. C. Hersam, *Nano Letters* **2010**, 10(5), 1664–1670.
- [61] S. Bhattacharya, D. Roxbury, X. Gong, D. Mukhopadhyay, A. Jagota, *Nano Letters* **2012**, 12(4), 1826–1830.
- [62] P. N. Yaron, B. D. Holt, P. A. Short, M. Lösche, M. F. Islam, K. Dahl, *Journal of Nanobiotechnology* **2011**, 9:45.
- [63] C. M. Sayes, F. Liang, J. L. Hudson, J. Mendez, W. Guo, J. M. Beach, V. C. Moore, C. D. Doyle, J. L. West, W. E. Billups, K. D. Ausman, V. L. Colvin, *Toxicology Letters* **2006**, 161(2), 135–142.

- [64] F. Tian, D. Cui, H. Schwarz, G. G. Estrada, H. Kobayashi, *Toxicology in Vitro* **2006**, 20(7), 1202–1212.
- [65] P. Wick, P. Manser, L. K. Limbach, U. Dettlaff-Weglikowska, F. Krumreich, S. Roth, W. J. Stark, A. Bruinink, *Toxicology Letters* **2007**, 168(2), 121–131.
- [66] J. M. Wörle-Knirsch, K. Pulskamp, H. F. Krug, *Nano Letters* **2006**, 6(6), 1261–1268.
- [67] C. A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W. A. H. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. MacNee, K. Donaldson, *Nature Nanotechnology* **2008**, 3(7), 423–428.
- [68] M. De Nicola, S. Bellucci, E. Traversa, G. D. Bellis, F. Micciulla, L. Ghibelli, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2008**, 20(47), 474204.
- [69] G. Jia, H. Wang, L. Yan, X. Wang, R. Pei, T. Yan, Y. Zhao, X. Guo, *Environmental Science & Technology* **2005**, 39(5), 1378–1383.
- [70] S. K. Smart, A. I. Cassady, G. Q. Lu, D. J. Martin, *Carbon* **2006**, 44(6), 1034–1047.
- [71] E. Mooney, P. Dockery, U. Greiser, M. Murphy, V. Barron, *Nano Letters* **2008**, 8(8), 2137–2143.
- [72] X. Shi, B. Sitharaman, Q. P. Pham, P. P. Spicer, J. L. Hudson, L. J. Wilson, J. M. Tour, R. M. Raphael, A. G. Mikos, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008**, 86(3), 813–823.
- [73] B. Sitharaman, X. Shi, X. F. Walboomers, H. Liao, V. Cuijpers, L. J. Wilson, A. G. Mikos, J. A. Jansen, *Bone* **2008**, 43(2), 362–370.
- [74] G. Ciofani, Y. Obata, I. Sato, Y. Okamura, V. Raffa, A. Menciassi, P. Dario, N. Takeda, S. Takeoka, *Journal of Nanoparticle Research* **2009**, 11, 477–484.
- [75] <http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb0018.htm> (aufgerufen am 05.04.2012).

- [76] R. Snyderman, M. C. Pike, D. G. Fischer, H. S. Koren, *The Journal of Immunology* **1977**, 119(6), 2060–2066.
- [77] F. Amano, Y. Akamatsu, *Infection and Immunity* **1991**, 59(6), 2166–2174.
- [78] S. Inoue, S. Itagaki, F. Amano, *Infection and Immunity* **1995**, 63(5), 1876–1886.
- [79] <http://www.lgcstandards.atcc.org/Attachments/1765.jpg> (aufgerufen am 05.04.2012).
- [80] P. Stepnowski, A. C. Składanowski, A. Ludwiczak, E. Łaczyńska, *Human & Experimental Toxicology* **2004**, 23(11), 513–517.
- [81] M. S. Arnold, S. I. Stupp, M. C. Hersam, *Nano Letters* **2005**, 5(4), 713–718.
- [82] A. A. Green, M. C. Hersam, *Materials Today* **2007**, 10(12), 59–60.
- [83] Katzowitsch, Sologub, SOP M-z1-003-02 Bestimmung der Zytotoxizität, **2010**.
- [84] H. K. Moon, C. I. Chang, D.-K. Lee, H. C. Choi, *Nano Research* **2008**, 1(4), 351–360.
- [85] Sigma-Aldrich Co, DNase I (AMPD1) - Technical Bulletin.
- [86] A. Schrödel, *Biologie in unserer Zeit* **2007**, 37(5), 289.
- [87] S. A. E. Marras, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Nucleic Acids Research* **2002**, 30(21), 122e–122.
- [88] F. Wang, M. Sfeir, L. Huang, X. Huang, Y. Wu, J. Kim, J. Hone, S. O'Brien, L. Brus, T. Heinz, *Physical Review Letters* **2006**, 96(16).
- [89] J. Lefebvre, P. Finnie, *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, 113(18), 7536–7540.
- [90] C. Yi, C.-C. Fong, W. Chen, S. Qi, C.-H. Tzang, S.-T. Lee, M. Yang, *Nanotechnology* **2007**, 18(2), 025102.

- [91] Y. Wu, J. A. Phillips, H. Liu, R. Yang, W. Tan, *ACS Nano* **2008**, 2(10), 2023–2028.
- [92] H. Jin, D. A. Heller, R. Sharma, M. S. Strano, *ACS Nano* **2009**, 3(1), 149–158.
- [93] V. Karachevtsev, A. Glamazda, A. Plokhotnichenko, V. Leontiev, A. Linnik, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **2011**, 42(1), 41–46.
- [94] T. Ohya, M. Miaczynska, Ü. Coskun, B. Lommer, A. Runge, D. Drechsel, Y. Kalaidzidis, M. Zerial, *Nature* **2009**, 459(7250), 1091–1097.
- [95] M. Zerial, Y. Kalaidzidis, *systembiologie.de* **2011**, (3), 8–11.
- [96] J. Chen, S. Chen, X. Zhao, L. V. Kuznetsova, S. S. Wong, I. Ojima, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130(49), 16778–16785.
- [97] N. W. S. Kam, Z. Liu, H. Dai, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127(36), 12492–12493.
- [98] J. F. Campbell, I. Tessmer, H. H. Thorp, D. A. Erie, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130(32), 10648–10655.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Einsatzgebiete von SWNTs in der Nanomedizin	3
2.1	SWNTs, Graphen und Fulleren	6
2.2	Strukturelle Unterscheidung von SWNTs	8
2.3	Bandlücke und exzitonische Bindungsenergie	9
2.4	Absorption und PL von (6,5)-SWNTs	10
2.5	Rotverschiebung der S_1 -Aggregation	11
2.6	DNA-Basen, Nukleoside und Nukleotide	13
2.7	Aufbau und Wechselwirkungen innerhalb eines DNA-Stranges	14
2.8	Spaltung von DNA-Strängen	15
2.9	Kovalente und nicht-kovalente Funktionalisierung von SWNTs	16
2.10	Entbündelung von SWNT-Aggregaten	18
2.11	Membranverlagernde Transportvorgänge	19
2.12	Exozytose und Endozytose	20
2.13	Aufnahme von SWNTs ins Zellinnere	23
2.14	J774.1- und HeLa-Zellen	26
3.1	Entbündelung von SWNTs	31
3.2	Präparative Schritte bei der DGU	33
3.3	Zentrifugenfiltration	34
3.4	DGU-Fraktionen	37
3.5	PL-Aufbau	38
3.6	Sterilkontrolle durch LB-Agarplatten	40
3.7	Neubauer Improved-Zellzählkammer	44
3.8	CellTiter-Blue [®] -Zytotoxizitätsassay	46
3.9	WST-8-Zytotoxizitätsassay	47
3.10	Sulphydrylierung nach Trauts	54

3.11 Ellman-Reaktion	55
3.12 Fluorophore für Kupplungsreaktion mit DNA	56
3.13 Kupplungsreaktion zur DNA-Funktionalisierung	56
4.1 SWNT-Materialien für Zytotoxizitätsuntersuchungen	68
4.2 Nachweisreaktion der Enzymaktivität	71
4.3 Nachweis der Enzymaktivität	72
4.4 Konjugatstabilität gegenüber Enzym	73
4.5 Konjugatstabilität gegenüber Proteinmischung	74
4.6 Kontrollexperiment zum Temperatureinfluss	75
4.7 Wechselwirkung zwischen ssDNA-SWNT und Proteinen	76
4.8 pH-Abhängigkeit der Absorptionsspektren	77
4.9 Übersicht der pH-Abhängigkeit des Absorptionsmaximums	78
4.10 pH-Abhängigkeit der PL	78
4.11 Reversibilitätsversuch der Aggregation bei extremen pH-Werten	80
4.12 Zusammenfassung des Reversibilitätsversuchs der Aggregation	81
4.13 SWNT-Proben für Zytotoxizitätsuntersuchungen	83
4.14 Durchführung der Zytotoxizitätsassays	86
4.15 Ergebnis der Zytotoxizitätstests gegenüber HeLa-Zellen	88
5.1 Weißlichtbilder von HeLa-Zellen	98
5.2 Weißlicht- und konfokale Aufnahmen in HeLa	100
5.3 Weißlicht- und konfokale Aufnahmen in HeLa (Fortsetzung)	101
5.4 Konfokale Aufnahmen von Cy3-ssDNA-SWNTs in HeLa	103
5.5 Cy3-Verteilung in HeLa-Zellen	103
5.6 Nahinfrarotbild mit 20x Objektiv	105
5.7 Spektroskopie in HeLa-Zellen	106
5.8 Spektroskopie in HeLa-Zellen (Fortsetzung)	107
5.9 Spektroskopische Ergebnisse von SWNTs in HeLa-Zellen	109
5.10 Vergleich der Referenzen bei pH 7 und pH 4	110
6.1 Funktionalisierungsrouten	118
6.2 Sulfhydrylierung von ssDNA	119
6.3 Sulfhydrylierung von ssDNA-SWNT	120
6.4 Aktivierung des Fluorophors	121

6.5	Kupplung des Fluorophors an ssDNA	122
6.6	Ellman-Test an freier ssDNA	127
6.7	Ellman-Test an ssDNA-SWNT-Konjugaten	128
6.8	Kupplungsreaktion zwischen Fluorophor und ssDNA	130
6.9	Funktionalisierungsrouten ①	131
6.10	Ergebnis aus Route ①	132
6.11	Filtration der Rohdispersion nach Route ①	133
6.12	Spektrale Ergebnisse aus Route ①	134
6.13	Funktionalisierungsrouten ②	136
6.14	Funktionalisierungsrouten ③	137
6.15	Erste Versuchsreihe zu Route ③	138
6.16	Zweite Versuchsreihe zu Route ③	140
6.17	Dritte Versuchsreihe zu Route ③	141
6.18	Vierte Versuchsreihe zu Route ③	143
6.19	TCSPC-Messung mit Dansyl-Fluorophor	146
6.20	TCSPC-Messung mit AMAC	146
6.21	Problematik bei Quantifizierung	150

Tabellenverzeichnis

3.1	Modifizierte DNA-Oligomere	30
3.2	Stufendichtegradient	32
3.3	Komplettmedium für HeLa-Zellen	41
3.4	Kontrollexperimente in Zytotoxizitätsuntersuchungen	49
3.5	Anregung und Emission von Hoechst, Phalloidin 647 und Cy3	52
4.1	DNase I-Experiment	62
4.2	Kontrollexperiment zur DNase I-Aktivität	63
4.3	FBS-Experiment	64
4.4	pH-Titrationsreihe (sauer)	65
4.5	pH-Titrationsreihe (basisch)	65
4.6	Reversibilität der pH-Reihe (sauer)	66
4.7	Reversibilität der pH-Reihe (basisch)	66
4.8	Pipettierprotokoll J774.1	67
4.9	96-Loch-Mikrotiterplatte	69
4.10	Pipettierprotokoll HeLa	69
4.11	Ergänzung zu Pipettierprotokoll HeLa	70
4.12	Ergebnis des FBS-Experiments	74
4.13	Ergebnis des pH-Experiments	79
4.14	SWNT-Proben für Zytotoxizitätstest gegenüber J774.1	84
4.15	SWNT-Proben für Zytotoxizitätstest gegenüber HeLa	85
4.16	Messparameter der Zytotoxizitätsauswertung	87
5.1	Präparationsmethoden für Mikroskopie in Zellen	94
5.2	Präparation der Zellen für Mikroskopie	95
5.3	Inkubation der Zellpräparate mit ssDNA-SWNTs	95
5.4	Experimente für Weißlicht- und Konfokalmikroskopie	96

5.5	Kontrollexperimente für PL-Mikrospektroskopie	97
5.6	Farbcode in Mikroskopiebildern	99
5.7	Ergebnisse aus Weißlicht- und Konfokalmikroskopie	102
5.8	Spektrale Daten zur Spektroskopie von SWNTs	110
5.9	Daten zur Abschätzung der aufgenommenen SWNT-Menge . .	111
6.1	Oligomere für Funktionalisierungsexperimente	123
6.2	Funktionalisierung durch direkte Reaktion	126
6.3	Emission des Dansyl-Fluorophors	130
6.4	Zusammenfassung Route ③	144
6.5	Lebensdauern des Dansyl- und AMAC-Fluorophors	145
6.6	Daten zur Quantifizierung der Funktionalisierung	147
6.7	Daten zur Quantifizierung der Funktionalisierung	148
6.8	Daten zur Quantifizierung der Funktionalisierung	149

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all denen, die mich während der Promotion unterstützt und auf dem Weg meines Studiums begleitet haben.

Allen voran danke ich Prof. Dr. Tobias Hertel für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit zur Bearbeitung einer sehr vielseitigen und interdisziplinären Thematik in Form dieser Dissertation. Durch aufschlussreiche Diskussionen, die Teilnahme an wissenschaftlichen Fachtagungen und Weiterbildungsmöglichkeiten konnte ich mich in den letzten drei Jahren sowohl fachlich als auch persönlich weiterentwickeln und bin sehr dankbar für die wertvollen Erfahrungen.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die angenehme Atmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft, die ein harmonisches Zusammenarbeiten zu jeder Zeit ermöglichten. Ich freue mich über die guten Freundschaften, die im Verlauf meiner Promotion zwischen uns entstanden sind und die zu einem außergewöhnlichen Arbeitsklima beigetragen haben, bei dem man sich nur wohlfühlen kann. Besonders möchte ich mich bei Nicolas Rühl bedanken, der mich zu jedem Zeitpunkt unterstützt und motiviert hat. Tilman Hain und Holger Hartleb danke ich für die überaus angenehme Zeit im gemeinsamen Büro. Auf fachliche Unterstützung konnte ich mich immer auf Friedrich Schöppler verlassen, der mir stets mit hilfreichen Ratschlägen und ansteckend guter Laune beiseite stand. Den Korrekturlesern dieser Arbeit, insbesondere Frank Brunecker und Florian Späth, danke ich für ihren tatkräftigen und zuverlässigen Einsatz.

Den gesamten Mitarbeitern des Lehrstuhls und der Werkstätten bin ich dankbar für jede Hilfestellung hinsichtlich verwaltungs-, computer- und labortechnischen Angelegenheiten. Durch ihre unkomplizierte Art konnten viele stressige Tage erleichtert werden.

Martin Mikyna aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. h.c. Gerhard Bringmann sei gedankt für die Bereitstellung der Dansyl-Fluoreszenzverbindung als experimentelle Grundlage eines Projektkapitels.

Sehr dankbar bin ich Kerstin Paprotka und Dr. Martin Fraunholz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Rudel, die mir einen angenehmen Einstieg in den Umgang mit Zellkulturen ermöglichten und durch ausführliche Beratung in mikrobiologischen Fragestellungen jederzeit zur Seite standen.

Mein tiefster Dank gilt schließlich meinen Freunden und meiner Familie, die mir in meiner gesamten Studienzeit den Rücken gestärkt und freigehalten haben. Ohne das Verständnis und die volle Unterstützung auf jede denkbare Art und Weise wäre mein Studium in dieser Form nicht möglich gewesen. Danke an meine Eltern und Jasmin, die mich stets motivieren und immer für mich da sind!