

Judith Krawinkel

Neuartige Ansätze für die laserbasierte Manipulation von Zellen mit Hilfe plasmonen- induzierter Effekte



Springer Spektrum

Neuartige Ansätze für die laserbasierte Manipulation von Zellen mit Hilfe plasmoneninduzierter Effekte

Judith Krawinkel

Neuartige Ansätze für die laserbasierte Manipulation von Zellen mit Hilfe plasmonen- induzierter Effekte

Mit einem Geleitwort von
Prof. Dr. Alexander Heisterkamp



Springer Spektrum

Judith Krawinkel
Jena, Deutschland

Zugl.: Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2016

ISBN 978-3-658-17706-5 ISBN 978-3-658-17707-2 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-658-17707-2

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

Springer Spektrum

© Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH 2017

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Springer Spektrum ist Teil von Springer Nature

Die eingetragene Gesellschaft ist Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Abraham-Lincoln-Str. 46, 65189 Wiesbaden, Germany

Geleitwort

Das vorliegende Buch von Frau Judith Krawinkel befasst sich mit der Manipulation von lebenden Zellen mittels laserbasierten Methoden in Wechselwirkung mit Goldnanostrukturen, insbesondere Goldnanopartikeln. Durch Bestrahlung von Goldnanopartikeln lassen sich bei geeigneter Wahl der Wellenlänge kollektive Schwingungen der Oberflächen-elektronen (engl. surface plasmon resonance) anregen, deren Ausprägung zusätzlich von der Größe und Geometrie der jeweiligen Partikel abhängt. Diese Plasmonenantwort der Partikel lässt sich einerseits durch die unter Umständen auftretende Absorption bei der Resonanzwellenlänge nutzen oder durch die am Partikel auftretende Nahfeldüberhöhung, um am Partikel liegende zelluläre Strukturen wie Zellmembranen oder Makromoleküle zu beeinflussen. Innerhalb der Zellbiologie stellt dieses Einschleusen von Fremdmolekülen, zum Beispiel zur gezielten Genexpression oder dem Ausschalten bestimmter Gene, eine zentrale Methode dar. Weitere Anwendungsfelder sind das gezielte Abtöten von Zellen oder Bakterien im Rahmen einer Tumor- oder Infektionstherapie. Die Vorteile gegenüber einer rein laserbasierten Methode sind dabei einerseits die deutlich höhere Geschwindigkeit, da eine Vielzahl von Zellen parallel bearbeitet werden kann, und andererseits, dass eine Konjugation der Partikel ein gezieltes Anheften der Partikel an bestimmte Zellen erlaubt und somit auch eine hochselektive Methode der Zellmanipulation ermöglicht wird.

Dieses Buch gliedert sich in drei wesentliche Teile, der erste Teil befasst sich mit der Zellmanipulation mittels sphärischer Goldnanopartikel, um humane Primärzellen mit Fremdmolekülen zu beladen. Dieser Ansatz wird derzeit in verschiedenen internationalen Forschungsgruppen entwickelt, wurde jedoch bislang nicht, wie hier geschildert, an Primärzellen – humanen Fibroblasten – eingesetzt. Im zweiten Teil stellt Frau Krawinkel einen neuartigen Ansatz zur intrazellulären Manipulationen von Zellen vor, indem peptidkonjugierte Nanopartikel zunächst von den Zielzellen aufgenommen werden und dann mittels Laser manipuliert werden. Im dritten Teil erweitert Frau Krawinkel das Spektrum der nutzbaren plasmonischen Nanostrukturen um strukturierte Goldoberflächen und demonstriert erstmalig eine Anwendung zur Manipulation von Biofilmen. Die dazu eingesetzten und hier behandelten Techniken umfassen dabei unter anderem verschiedene Mikroskopieverfahren, insbesondere Fluoreszenz- und Multiphotonen-basierte Techniken, um Perforationseffizienz und Zellvitalität zu erfassen, zellbiologische Verfahren und Essays, wie beispielsweise Gelelektrophorese und automatisierte Zellzähler. Im Hinblick auf hochauflösende Verfahren kommen auch elektronenmikroskopische Verfahren zum Einsatz und geben der Leserschaft Einsicht in die Mechanismen und Vorgänge auf intrazellulärer Ebene. Theoretische Simulationen der Prozesse können so direkt mit den experimentellen Ergebnissen abgeglichen werden.

Mit der vorliegenden Arbeit zeigt Frau Krawinkel neue, vielversprechende Perspektiven für die laserbasierte Manipulation von Zellen und Biofilmen auf, die ein berührungsloses, steriles und virenfrees Arbeiten an Zellen erlauben. Durch ihre ausführliche Analyse der Prozesse mittels fluoreszenzmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Verfahren kann sie so wichtige Beiträge für den Bereich der plasmonenbasierten Zellmanipulation darlegen und stellt diese der Leserschaft detailliert und doch gut verständlich dar. Die fachliche Breite als auch die Breite an Analysemethoden geben einen sehr guten Überblick über das Gebiet der optisch-induzierten Zellperforation mittels gepulster Laserstrahlung.

Ich wünsche dem Werk ein breites Publikum und die Aufmerksamkeit der Fachwelt, die es verdient.

Univ.-Prof. Dr. Alexander Heisterkamp

Danke

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich auf verschiedenste Weise bei der Fertigstellung meiner Dissertation unterstützt und dadurch zu ihrem Gelingen beigetragen haben. In meinen Dank schließe ich ausdrücklich auch all diejenigen ein, die zu nennen diese Danksagung sprengen würde. Den Mitgliedern der Prüfungskommission danke ich für die Durchführung des Promotionsverfahrens, insbesondere den Gutachtern dieser Arbeit Herrn Prof. Dr. Alexander Heisterkamp, Herrn PD Dr. Wolfgang Fritzsche und Herrn PD Dr. Ronald Sroka.

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut für Angewandte Optik (Physikalisch-Astronomische Fakultät) der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Für die dort erhaltene vielfältige Unterstützung bedanke ich mich bei allen Angehörigen des Instituts, allen voran dem langjährigen Institutsdirektor, Herrn Prof. Dr. Richard Kowarschik, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie meinem inzwischen an der Leibniz Universität Hannover lehrenden Betreuer, Prof. Dr. Alexander Heisterkamp. Für seine fachlichen Impulse, seine wissenschaftliche Begleitung, seinen stets kompetenten Rat sowie Motivierung und Ermutigung bin ich besonders dankbar. Dr. Maria-Leilani Torres-Mapa, Dieter Wostl und Undine Richter, nenne ich stellvertretend für alle wissenschaftlichen, technischen und studentischen KollegInnen, die mich unterstützt, immer wieder motiviert und engagiert begleitet haben. Marinus Huber danke ich für die Zuarbeit nach seinem Ausscheiden aus dem Institut.

Ganz besonders danke ich denen, mit denen ich auch außerhalb des Instituts fachlich inspirierende Diskussionen geführt habe. Dieser Dank geht unter anderem an Herrn Prof. Dr. Christoph Biskup, Frau Prof. Dr. Dagmar Fischer, Herrn Prof. Dr. Rainer Heintzmann, Herrn Dr. Ákos T. Kovács, Herrn Prof. Dr. Frank Schmidl und Herrn PD Dr. Martin Westermann. Für die tatkräftige Unterstützung in ihren Laboren danke ich Eisha Mhatre, Dr. Sarmiza Stanca, Maja Weber, Matthias Zink und David Zopf.

Sehr profitiert habe ich zudem von der Zusammenarbeit mit KollegInnen außerhalb Jenas. In Essen bedanke ich mich bei Lisa Gamrad und Herrn Prof. Dr. Stephan Barcikowski sowie bei Dr. Christoph Rehbock vom Universitätslehrstuhl für Technische Chemie für die kontinuierliche Versorgung mit ihren Partikeln und viele interessante Diskussionen. Meiner Frankfurter Projektpartnerin Frau Prof. Dr. Susanne Gerhardt-Szép vom zahnärztlichen Institut Carolinum der Johann Wolfgang Goethe Universität danke ich für die gute Zusammenarbeit sowie ihre engagierte und motivierende Unterstützung. Gut kooperiert habe ich mit der Abteilung Biomedizinische Optik im Laser Zentrum Hannover, hier sind vor allem Prof. Dr. Heisterkamp und Dr. Markus Schomaker zu nennen, sowie mit Herrn Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo vom Institut für Biophysik der Universität Hannover und mit Herrn PD Dr. Hugo Murua Escobar, seinerzeit

Tiermedizinische Hochschule Hannover, jetzt Universitätsmedizin Rostock. Bei allen bedanke ich mich herzlich.

Großen Dank richte ich an Markus, Martin, Timko und Undine, deren Geduld und Tipps nicht nur beim Korrekturlesen mir eine große Hilfe waren. All meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mir auch in Zeiten großen Stresses meine gute Laune erhalten haben. Mit Koch- und Spieleabenden, bei Squash und Lindy Hop, während gemeinsamer Unternehmungen und Mensagespräche habt ihr mir einen Ausgleich zu den oft langen Arbeitstagen geschaffen.

Von meinen Eltern habe ich jederzeit Rückhalt, Unterstützung und Motivation erfahren: Danke!

Judith Krawinkel

Inhaltsverzeichnis

Geleitwort	V
Danke	VII
Abbildungsverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Zusammenfassung	XV
1 Einleitung	1
2 Grundlagen laserbasierter Manipulation von Zellen mittels plasmoneninduzierter Effekte	3
2.1 Effekte an laserbestrahlten Goldpartikeln und -strukturen	3
2.1.1 Goldnanopartikel: Optische Eigenschaften und Plasmonenresonanzen	4
2.1.2 Plasmonische Interaktion von AuNP	8
2.1.3 Elektronendynamik und durch Wärmeeintrag induzierte Effekte . .	10
2.2 Zellen und ihre Manipulation mit Partikeln oder Laserstrahlung	14
2.2.1 Aufbau prokaryotischer und eukaryotischer Zellen	14
2.2.2 Nanopartikel als Wirkstofftransporter	16
2.2.3 Auswirkung der Bestrahlung von Zellen mit Lasern	19
2.2.4 Optische Verfahren zur Manipulation von Zellen	20
2.3 Goldnanopartikel und -strukturen für die laserbasierte Zellmanipulation .	21
2.3.1 Laser-Partikel-Wechselwirkungssysteme	22
2.3.2 Weitere auf plasmoneninduzierten Effekten basierende Ansätze . .	24
3 Zellmanipulation mit Hilfe sphärischer Partikel und Laserstrahlung	27
3.1 Aufbau, Materialien und Methoden zum Nachweis des Manipulationserfolgs	27
3.2 Etablierung der Methode an primären humanen Gingivafibroblasten . . .	33
3.2.1 Primärzellen: Perforation und Viabilität im Vergleich zu einer Zelllinie	34
3.2.2 Steigerung der Manipulationseffizienz primärer humaner Fibroblasten	37
3.3 Eignung membranadhärenter AuNP zur Manipulation von Primärzellen .	40
4 Intrazelluläre Manipulation mit peptidkonjugierten Goldnanopartikelagglomeraten	45
4.1 CPP-AuNP zur Manipulation von Zellen: Prinzip und Methoden	45
4.2 Aufnahme peptidkonjugierter Partikelagglomerate	53
4.3 Laserbasiertes, intrazelluläres Einbringen extrazellulärer Moleküle	55
4.4 Auswirkung der Laser-Partikel-Wechselwirkung auf die Zellviabilität . . .	58

4.5	Einfluss der Laserbestrahlung auf Partikelagglomerate	58
4.5.1	Simulierter Wärmeeintrag	58
4.5.2	Auswirkungen des Wärmeeintrags auf die CPP-AuNP	61
4.6	TEM-Untersuchungen der Effekte der Laser-Partikel-Wechselwirkung . .	63
4.7	Einbringen von Molekülen durch direkte Konjugation an die Partikel . . .	64
4.8	Anwendbarkeit der CPP-AuNP für die Zellmanipulation	66
5	Alternative zu Partikeln: Zellmanipulation mit goldbeschichteten Nanostrukturen	77
5.1	Anwendung der verwendeten Strukturen und Materialien	77
5.2	Manipulationseffizienz mittels Strukturen und Partikeln im Vergleich . . .	80
5.3	Nutzung des zugrunde liegenden Mechanismus zur Biofilmmannipulation .	82
5.4	Diskussion der Zellmanipulation mit goldbeschichteten Strukturen	84
6	Fazit und Ausblick	91
	Literaturverzeichnis	99
	Anhang	121

Abbildungsverzeichnis

3.1	Schematische Darstellung des Aufbaus zur Manipulation von Zellen . . .	29
3.2	Perforationseffizienz und Anteil nicht nekrotischer Zellen nach Laserbestrahlung	35
3.3	Räumlich selektive Manipulation von primäre humane Gingivafibroblasten	35
3.4	Einbringen von Dextranen in pHFIB-G	37
3.5	Polarisationsabhängigkeit des Perforationsmechanismus	38
3.6	Wachstum von pHFIB-G in Medium mit und ohne Ascorbinsäure	39
3.7	Perforationseffizienz und Anteil lebensfähiger pHFIB-G in Medium mit und ohne Ascorbinsäure	40
4.1	Schematische Darstellung der Zellmanipulation mit CPP-AuNP (peptid-konjugierte AuNP-Agglomerate) und Laserbestrahlung	46
4.2	Aufnahme der CPP-AuNP durch ZMTH3	54
4.3	Transmissionselektronenmikroskops (TEM)-Bilder intra- und extrazellulärer CPP-AuNP	55
4.4	Visualisierung der Aufnahme und des Freisetzens von Calcein	56
4.5	Effizienz des intrazellulären Freisetzens von Calcein in Abhängigkeit von der verwendeten Laserfluenz	57
4.6	Energieabsorption und die resultierende Wassertemperatur bei verschiedenen Fluenzen	59
4.7	Temperatur eines CPP-AuNP mit 350 Goldnanopartikel (AuNP)	61
4.8	Extinktionsspektren der CPP-AuNP vor und nach dem Bestrahlen	62
4.9	TEM-Bilder von mit intraendosomalen CPP-AuNP bestrahlten Zellen . .	64
4.10	Transfektion mit VPP	65
4.11	Intrazelluläre CPP-AuNP im Dunkelfeldmikroskop	73
5.1	Mit Gold beschichtete Struktur: Membran der Zellkultureinsätze	78
5.2	Anteil erfolgreich manipulierter Zellen und deren Fluoreszenzintensität nach dem Bestrahlen	81
5.3	ZMTH3 auf goldbeschichteter strukturierter Membran (bestrahlt)	82
5.4	Auf (goldbeschichtetem) Deckgläschen getrockneter und teilweise bestrahlter Biofilm	83
5.5	Polymerisieren des Biofilms durch Laserbestrahlung	83
5.6	Mögliches Design einer optimierten Nanostruktur	90

A.1	Unbearbeitetes Original von Abbildung 3.3c	126
A.2	Einfluss der Laserbestrahlung auf die Langzeitviabilität der Zellen	127
A.3	Transfektion von pHFIB-G mit siRNA	129
A.4	Charakterisierung von 200 nm AuNP konjugiert mit Ascorbinsäure	131
B.1	TEM-Aufnahmen peptidfreier AuNP	135
B.2	CPP-AuNP nach Laserbestrahlung	135
B.3	Aufnahme peptidfreier AuNP	137
B.4	Temperaturabhängige Aufnahme der CPP-AuNP	137
B.5	Intrazelluläres Calcein vor und nach dem Bestrahlen	138
B.6	Unbeabsichtigte Perforation der Plasmamembran während des Bestrahlen	138
B.7	Bestimmung objektiver Kriterien zum intrazellulären Freisetzen von Molekülen	139
B.8	Viabilität von Zellen mit CPP-AuNP nach Laserbestrahlung	141
B.9	Beispiel eines mit Matlab modellierten CPP-AuNP	142
B.10	In (zellpenetrierenden Peptiden (CPP, engl. cell penetrating peptides)-) AuNP verschiedener Radien induzierte Temperaturen	144
B.11	Wärmeintrag eines CPP-AuNP mit 350 AuNP, dargestellt in verschiedenen Schmittebenen	145
B.12	Schnitt durch die CPP-AuNP bei maximaler Wassertemperatur	145
B.13	Temperatur in Abhängigkeit von Fluenz und Abstand vom Partikelzentrum	146
B.14	Gelelektrophorese der Kernlokalisierungssequenzen (NLS, engl. nuclear localization sequences)-AuNP und PPP	146
B.15	Freisetzen von an CPP-AuNP konjugierten Molekülen	148
C.1	Bestrahlen von Zellen auf goldbeschichteten Zellkultureinsätzen	150
C.2	Ablationsschwelle (vorbehandelter) goldbeschichteter Membranen	151
C.3	Mikroskopische Betrachtung bestrahlter Biofilme	152
C.4	Aushärten des polymerisierten Biofilms	153
C.5	Unterschiedliche Schädigungen von Biofilmen durch Laserbestrahlung	153
C.6	3D-Zeichnungen möglicher Nanostrukturen für die Zellmanipulation	154

Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetoxymethylester
ANOVA	Varianzanalyse, engl. analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
Au	Gold
AuNP	Goldnanopartikel
BSA	Rinderalbumin, engl. bovine serum albumin
BSE	zurückgestreute Elektronen, engl. backscattered electrons
CCD	charge-coupled device
CFU	koloniebildende Einheit, engl. colony forming unit
CPP	zellpenetrierendes Peptid, engl. cell penetrating peptide
CPP-AuNP	peptidkonjugiertes AuNP-Agglomerat (mit CPP konjugierte AuNP)
CT	Computertomographie
CWG ₃ PK ₃ RKVED	Peptid mit NLS, kurz: NLS
CWR ₁₀	Dekaarginin (Peptid)
DCIP	2,6-Dichlorphenolindophenol Natriumsalz Hydrat
DLS	dynamische Lichtstreuung, engl. dynamic light scattering
DMEM	Dublecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
eDNA	extrazelluläre Desoxyribonukleinsäure (DNA)
EDX	Röntgenmikroanalyse, engl. energy dispersive X-ray analysis
EL	Endolysosom
EM	elektromagnetisch
EMCCD	electron multiplying charge-coupled device
EMZ	Elektronenmikroskopisches Zentrum
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
FCS	fetales Kälberserum, engl. fetal calve serum
FE	frühes Endosom
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPP	Fluorescein konjugierte NLS-AuNP
FWHM	Halbwertsbreite, engl. full width half maximum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HAL	Halogenlampe
HBO	Quecksilber-Kurzbogenlampe
L	Lysosom
LB	Lennox Broth

LIFT	laserinduzierter Materialtransfer, engl. laser induced forward transfer
LTP	Ladungstransferplasmon
NA	Numerische Apertur
NIR	nahinfrarot
NLS	Kernlokalisierungssequenz, engl. nuclear localization sequence
NP	Nanopartikel
NPC	Kernpore, engl. nuclear pore complex
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl. phosphate buffered saline
PDT	photodynamische Therapie
PET	Polyethylenterephthalat
pHFIB-G	primäre humane Gingivafibroblasten
PI	Propidium Iodid
PLAL	pulsed laser ablation in liquid
PMT	Photoelektronenvervielfacher, engl. photomultiplier tubes
PPP	Plasmid (pEGFP-C1) konjugierte NLS-AuNP
PST	Polarisationsstrahlteiler
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure, engl. ribonucleic acid
ROI	gewünschter Bereich, engl. region of interest
ROS	freie Sauerstoffradikale, engl. reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SE	spätes Endosom
SERS	oberflächenverstärkte Raman-Streuung, engl. surface-enhanced Raman scattering
siRNA	kleine, eingreifende RNA, engl. small interfering RNA
SPR	Plasmonenresonanz, engl. surface plasmon resonance
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-aminomethan
UK	Vereinigtes Königreich
UV	ultraviolett
Vis	sichtbar, engl. visible
VPP	Vektor konjugierte NLS-AuNP

Zusammenfassung

Um bisher nur unzureichend behandelbare Krankheiten therapieren zu können, wird an immer neuen Verfahren geforscht. Der Fokus zellbasierter Therapien liegt auf der Gentherapie, dem Einbringen von Wirkstoffen in oder dem gezielten Eliminieren von Zellen. Einzubringende Moleküle müssen effizient, zielgerichtet und im Hochdurchsatz in eine Vielzahl von Zellen gelangen ohne – außer beim Eliminieren – deren Lebensfähigkeit zu beeinträchtigen. Trotz der unterschiedlichen Anforderungen an die für die verschiedenen Ziele benötigten Methoden besitzt die Interaktion von Laserstrahlung mit Goldnanostrukturen wie Goldnanopartikeln (AuNP) das Potential, ein breites Spektrum dieser zu erfüllen. Durch die Wechselwirkung können chemische, thermische und mechanische Schäden an biologischen Materialien wie Zellen induziert werden, deren Ausmaß und somit deren Anwendung von den Parametern der Interaktionspartner abhängt. Allerdings sind diese vielfältig und die zugrunde liegenden Mechanismen nur für ausgewählte Systeme untersucht.

Ziel dieser Arbeit war, drei neuartige Ansätze vorzustellen, die mit verschiedenen Goldnanostrukturen bei – mit Ausnahme der Fluenz – gleichbleibenden Laserparametern (532 nm, $\tau_{\text{Puls}} = 1$ ns, 22,5 kHz) Zellen mittels plasmoneninduzierter Effekte manipulieren, sowie die jeweils verwendeten Mechanismen aufzuzeigen. Durch die Laserpulsdauern von 1 ns dominierten bei allen Anwendungen thermisch induzierte Effekte. Zu ihnen zählen Kavitationsblasen, die durch ihr Auf- und Abschwingen sowie das Aussenden von Schockwellen das biologische Material zusätzlich mechanisch schädigen. Insbesondere bei sensibleren Zellen tragen z. B. radikale Sauerstoffspezies auch chemisch zur Manipulation bei. Entstehen dabei transiente Perforationen können extrazelluläre Moleküle ins Zytoplasma gelangen. Permanente Schädigungen führen zum Eliminieren der Zellen.

Mit membranadhärenten sphärischen AuNP wurden bereits Zellen erfolgreich transfiziert. Allerdings erfolgte die Untersuchung der optimalen Parameter vornehmlich an Zelllinien. Um diese durch Parameterstudien mit primären humanen Gingivafibroblasten (pHFIB-G) zu ergänzen, wurden für den ersten Ansatz AuNP mit 200 nm Durchmesser genutzt. Der Vergleich zur Tumorzelllinie ZMTH3 bestätigt die Zelltypunabhängigkeit des Perforationsmechanismus mit diesen AuNP. Trotz der gleichen optimalen Laserfluenz von 25 mJ/cm^2 reagierten pHFIB-G sensibler auf die induzierten Effekte. Die Zugabe von Ascorbinsäure als Radikalfänger maximierte ihre Lebensfähigkeit nach dem Bestrahlen (97,5%) und die Manipulationseffizienz (91,5%) auf mit den ZMTH3 vergleichbare Werte.

Der zweite Ansatz nutzt peptidkonjugierte AuNP-Agglomerate (CPP-AuNP), die zusammen mit den einzubringenden Molekülen mittels Endozytose von ZMTH3 aufgenommen wurden. Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) bestätigten, dass ein externer Trigger benötigt wird, damit der Endosomeninhalt ins

Zytoplasma gelangt. Durch Bestrahlen mit Fluenzen oberhalb der Schwellfluenz von 25 mJ/cm^2 wurden die Endosomen räumlich und zeitlich selektiv aufgebrochen und ihr Inhalt – die AuNP sowie die einzubringenden Moleküle – bei mindestens 58 % der Zellen ins Zytoplasma freigesetzt. Die Lebensfähigkeit der Zellen und andere intrazelluläre Kompartimente wurden dabei nicht signifikant beeinträchtigt, obwohl im Zentrum der CPP-AuNP mit $\sim 1037^\circ\text{C}$ Temperaturen um den Schmelzpunkt von Gold (1063°C) induziert wurden. Dadurch desagglomerierten die CPP-AuNP. Bei erneutem Bestrahlen können sie somit keine weiteren Schäden anrichten und einfacher aus der Zelle heraus gelangen. Durch direkte Konjugation von Molekülen an die CPP-AuNP kann die Selektivität dieser Methode erhöht werden. Geeignete Linker und Moleküle müssten in einem nächsten Schritt untersucht werden.

Im dritten Ansatz wurde beim Bestrahlen goldbeschichteter Oberflächen durch den Energieeintrag Gold abladiert. Dabei wurden AuNP und Kavitationsblasen generiert, die ZMTH3 irreversibel schädigten. Mit einer fast zehn Mal größeren Fluenz von 225 mJ/cm^2 wurde so die Permeabilität von *Bacillus subtilis*-Biofilmen erhöht bzw. wurden dehydrierte Biofilme durch polymerisieren zerstört.

Während die ersten beiden partikelbasierten Ansätze es ermöglichen, exogene Moleküle auf unterschiedlichen Wirkebenen effizient in eukaryotische Zellen einzubringen, erwiesen sich goldbeschichtete Oberflächen zum Eliminieren dieser oder zum Manipulieren bzw. Ausmerzen von robusteren Zellen wie Bakterien in Biofilmen als geeigneter.

Die erzielten Ergebnisse zeigen die unterschiedlichen Anwendungsgebiete plasmonen-basierter Zellmanipulation und tragen zum Verständnis der jeweils zugrunde liegenden Mechanismen bei.

1 Einleitung

Trotz der rasanten Entwicklung der modernen Medizin fehlen für viele Krankheiten wirksame Therapien. Untersuchungen zu Krankheitsursachen, -prozessen und Therapien sowie die Suche nach wirksamen Therapeutika müssen daher ergänzt werden durch eine Technologiebasis u. a. für prototypische Verfahren zum Verabreichen von Wirkstoffen („Drug delivery“), zu Diagnose und Therapie [1]. Bei diesen Verfahren spielen zellbasierte Ansätze eine große Rolle. In der Zellmanipulation geht es sowohl um die genetische Modifikation von Zellen als auch um das Einbringen von Wirkstoffen mit therapeutischem Nutzen und um das gezielte Eliminieren von Zellen.

Die Zellmembran bildet eine natürliche Barriere der Zellen gegen exogene Moleküle. Um diese dennoch gezielt einzubringen, gibt es verschiedene biologische, chemische und physikalische Verfahren mit individuellen Vor- und Nachteilen. 1984 nutzten Tsukakoshi et al. erstmals einen Laser (355 nm, $\tau_{\text{Puls}} = 5$ ns), um Zellen zu transfizieren, d. h. genetisches Material in sie einzubringen. Sie generierten mit Hilfe eines fokussierten Lasers kleine, reversible Löcher in der Zellmembran, durch die Desoxyribonukleinsäure (DNA) in die Zellen diffundierte [2]. Seit dieser sogenannten Optoinjektion zur Manipulation einzelner Zellen wurden Manipulationsverfahren mit unterschiedlichen Parametern stetig weiterentwickelt.

Ziel der Entwicklung neuer Verfahren, insbesondere für klinische Anwendungen, sind ein hoher Durchsatz erfolgreich manipulierter Zellen und – mit Ausnahme des gezielten Eliminierens von Zellen – eine hohe Lebensfähigkeit der behandelten Zellen. Letzteres gilt vor allem für klinisch relevante Primär- und Stammzellen, die empfindlicher sind als die zumeist für grundlegende Parameterstudien verwendeten Tumorzellen.

Bei der Optoporation werden im Zellkulturmedium mit dem Laser Schockwellen induziert. Ihre Ausdehnung übersteigt die Größe des Laserfokus, so dass mehrere Zellen gleichzeitig behandelt werden können. Je nach Druck der generierten Schockwellen können Zellmembranen perforiert (5,6 J/cm², 193 nm, $\tau_{\text{Puls}} = 14$ ns, 1 Hz) [3], Photosensibilisatoren in Biofilme zu deren Bekämpfung eingebracht (12,7 J/cm², 532 nm, $\tau_{\text{Puls}} = 3$ ns, 5 Hz) [4] oder Zellen transfiziert (1,3 J/cm², 532 nm, $\tau_{\text{Puls}} =$ ns, 10 Hz) [5] werden. Im Gegensatz zur Optoinjektion muss nicht jede Zelle einzeln anvisiert werden. Zudem kann ein lokaler Temperaturanstieg transiente Schäden der Zellmembran bewirken. Absorber wie Phenolrot verringern die für einen bestimmten Temperaturanstieg benötigte Laserfluenz [6].

Goldnanostrukturen wie Goldnanopartikel (AuNP) wirken ebenfalls als Absorber. Pitsillides et al. schädigten mittels Interaktion von AuNP mit Laserstrahlung (0,5 J/cm², 532 nm, $\tau_{\text{Puls}} = 20$ ns) Zellen lokal, um 10 kDa Dextrane in sie einzubringen [7]. Yao et al. untersuchten systematisch das vorübergehende Perforieren von Zellmembranen ohne die Zellen zu töten (30 mJ/cm², 532 nm, $\tau_{\text{Puls}} = 6$ ns, 20 Hz) [8]. Einen schwach