

Entwicklung nukleinsäurebasierter Diagnostika unter Berücksichtigung moderner Signalverstärkungs- und Rapid-Prototyping-Technologien

Von der Fakultät Umwelt und Naturwissenschaften
der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus-Senftenberg
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Master of Science (M.Sc.)

Christoph Jurischka

aus Lauchhammer

Gutachter:	Prof. Dr. med. vet. habil. Peter Schierack
Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Ilko Bald
Tag der mündlichen Prüfung:	28.01.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5
Abstract	6
Formelzeichen- und Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	10
1 Einleitung und theoretische Betrachtungen	11
1.1 Vorbemerkungen und Zielstellung	11
1.2 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	13
1.3 Das Genom humaner Papillomviren als Modell	16
1.4 Signalverstärkungsstrategien	18
1.4.1 DNA-Origamis	19
1.4.2 Tyramidsignalverstärkung	20
1.5 Erstellung bioanalytischer Funktionsmodelle mittels 3D-Druck	21
2 Material und Methoden	26
2.1 DNA-Konstrukte, Mikropartikel und Fluoreszenzcharakteristika	26
2.2 Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien	33
2.3 Geräte, Instrumente und Zusatzinformationen	39
2.3.1 3D-Drucksysteme und Polymere	40
2.3.2 Mikroskopische Bildgebungssysteme	41
2.3.3 Software	42
2.4 Zell- und Gewebekultur	42
2.4.1 Kultivierung und Charakterisierung von humanen Zellen	42
2.4.2 Probenpräparation	43
2.4.3 Umgang mit FFPE-Gewebe	46
2.5 Kultivierung von Mikroorganismen	48
2.5.1 Anreicherung, Aufreinigung und Überprüfung eines Plasmids	49
2.6 Polymerasekettenreaktion und Sondenpräparation	50
2.6.1 Amplifikationsreaktionen	50
2.6.2 DNA-Präzipitation und finale Sondenherstellung	52
2.7 <i>In-situ</i> -Hybridisierung	53
2.7.1 Allgemeine Betrachtung und Vorgehen	53
2.7.2 FISH-Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen in humanen Zelllinien	53
2.7.3 CISH als alternative Nachweismethode von DNA-Sequenzen	54
2.7.4 Anmerkungen zu <i>in-situ</i> -Hybridisierungsversuchen	55
2.8 Evaluierung von Sonden an Mikropartikeln	55
2.9 Sondennachweis mittels DNA-Origamis	57
2.10 Anwendung der TSA-Technologie auf Mikropartikel	58
2.11 Untersuchung kommerzieller 3D-Druck-Polymere für den Einsatz in der Bioanalytik	62
2.11.1 3D-gedruckte Modelle und Geräte	62

2.11.2	Analyse der Autofluoreszenz und spektralen Eigenschaften	64
2.11.3	Dynamische Differenzkalorimetrie.....	65
2.11.4	FISH zur Detektion bakterieller 16S rRNA auf 3D-Druckobjekten.....	65
2.11.5	Biofilmbildung auf 3D-gedruckten Polymermaterialien	66
2.11.6	Zelladhäsionsversuche	67
2.11.7	DNA-Capture-Assay.....	67
2.11.8	Analyse der Fluoreszenzaufnahmen	69
3	Ergebnisse und Diskussion	70
3.1	Evaluierung HPV-spezifischer FISH-Sonden.....	70
3.1.1	Sondendesign und Zielsequenzen	71
3.1.2	Sondenüberprüfung an Mikropartikeln.....	71
3.1.3	Sondenüberprüfung im Zellkultur- und Gewebemodell.....	74
3.1.4	Fazit zum Einsatz neuer, spezifischer FISH-Sonden.....	83
3.2	DNA-Origamis als Detektionsstrategie an Mikropartikeln	86
3.3	Evaluierung der Tyramidsignalamplifikation an Mikropartikeln.....	92
3.4	Einsatz 3D-druckbarer Polymere für bioanalytische Anwendungen.....	97
3.4.1	Geeignete Filamente für Fluoreszenzanwendungen	98
3.4.2	Filamente für Hochtemperaturanwendungen.....	102
3.4.3	FISH-Versuche mit bakterieller 16S rRNA auf 3D gedruckten Oberflächen	105
3.4.4	Biofilmbildung auf 3D-gedruckten Probenträgern	109
3.4.5	Analyse der Zelladhäsion	113
3.4.6	Einsatz des 3D-Drucks in Anwendungen zur Analyse eukaryotischer Zellen	120
3.4.7	Ergebnisse der DNA-Capture-Analyse im Chip-Format.....	123
3.4.8	Zusammenfassung der Filamenteigenschaften	124
3.4.9	Fazit zur Nutzung druckbarer Polymere in der Bioanalytik	126
3.5	Fazit im Kontext dieser Dissertation	128
4	Literaturverzeichnis	132
5	Anhang	142
5.1	Danksagung.....	142
5.2	Selbstständigkeitserklärung.....	143
5.3	Publikationen	144
5.3.1	Publikationen im Rahmen dieser Dissertation und eigener Beitrag zu den Veröffentlichungen	144
5.3.2	Gesamte Veröffentlichungsliste und sonstige Beiträge.....	145

Zusammenfassung

Die Entwicklung und Optimierung bioanalytischer Testsysteme erfordert zunehmend innovative und effiziente Strategien, um insbesondere den steigenden individuellen Anforderungen der personalisierten Medizin gerecht zu werden. Hierzu müssen stetig moderne Konzepte zur Charakterisierung potenzieller Biomarker untersucht und in schnell anpassbare diagnostische Anwendungen integriert werden. Gerade der sensitive und gleichzeitige Nachweis spezifischer Nukleinsäuren ist dabei von großem Interesse. Mit dieser Dissertation wurde die Entwicklung und Evaluierung spezifischer Hybridisierungssonden zum Nachweis viraler Nukleinsäuresequenzen in Zell- und Gewebemodellen mittels Fluoreszenzmikroskopie dargelegt. Hierbei zeigte sich, dass bei hinreichend großer Viruslast auch sehr kurze Sequenzbereiche effektiv detektiert werden können. Um zur Evaluierung von neuen Zielsubstanzen möglichst sensitive Aussagen treffen zu können, wurden weiterhin innovative Signalverstärkungstechnologien, insbesondere zur Analyse von Biomolekülen in mikropartikelbasierten Assays untersucht. Neben der erfolgreichen Übertragung der bereits für zellbasierte Anwendungen eingesetzten Tyramidsignalverstärkung auf Mikropartikel zeigten neuartige Nukleinsäurekonstrukte, sogenannte Origamis, großes Potential für zukünftige, sensitive Nachweisverfahren. Neben den einzelnen Assaykomponenten selbst sind zudem die Planung und der Aufbau von neuen Versuchssystemen entscheidend für einen erfolgreichen Einsatz in der Bioanalytik. Hier bieten moderne Fabrikationstechnologien, wie der 3D-Druck, enorme Vorteile für individuelle Untersuchungsmethoden. Diese Arbeit zeigte, dass entsprechend thermisch und fluoreszenzspektrometrisch charakterisierte Polymermaterialien gut für den funktionalen Einsatz in mikro-, zell- und molekularbiologischen Anwendungen geeignet sind und dadurch in Zukunft, bei kontinuierlicher Weiterentwicklung solcher maßgeschneiderten Systeme, rasch und wirksam auf neue diagnostische Fragestellungen und Bedürfnisse reagiert werden kann.

Abstract

The development and optimization of bioanalytical test systems requires increasingly innovative and efficient strategies, to meet the growing individual requirements of personalized medicine. For this purpose, modern concepts for the characterization of potential biomarkers must be continuously investigated and integrated into rapidly adaptable diagnostic applications. Especially the sensitive and simultaneous detection of specific nucleic acids is of great interest. This dissertation describes the development and evaluation of specific hybridization probes for the detection of viral nucleic acid sequences in cell and tissue models using fluorescence microscopy. It was shown that even very short sequence ranges can be detected effectively if the virus load is sufficiently high. In order to evaluate new target substances and to be able to make the most sensitive statements possible, innovative signal amplification technologies, especially for the analysis of biomolecules in microparticle-based assays, were also investigated. In addition to the successful transfer of the tyramid signal amplification, already used for cell-based applications, to microparticles, novel nucleic acid constructs, so-called origamis, showed great potential for future, sensitive detection methods. In addition to the individual assay components themselves, the planning and construction of new experimental systems are crucial for successful use in bioanalytics. Here, modern manufacturing technologies such as 3D printing offer enormous advantages for individual test methods. This work showed that appropriately thermally and fluorescence-spectrometrically characterized polymer materials are well suited for functional use in micro-, cell- and molecular biological applications. Thus, in the future, with continuous development of such tailor-made systems, it will be possible to react quickly and effectively to new diagnostic questions and needs.

Formelzeichen- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung/ Formelzeichen	Erklärung
(HI)PS	(High Impact) Polystyrol
(r)RNA	(Ribosomal) Ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
(d)NTPs	(Desoxy-) Nukleosidtriphosphate
3DP	3D-Printing (3D-Druck)
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol
AK	Antikörper
AM	Additive Manufacturing
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
AU	Arbitrary unit (freie, methodenabhängige Einheit)
BHQ1	Black Hole Quencher 1, 3'
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderalbumin)
Bsp.	Beispiel(e)
Bspw.	Beispielsweise
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
CAD	Computer-aided design (rechnerunterstütztes Konstruieren)
CARD	Catalyzed reporter deposition
CFU	Colony forming unit (Kolonie-bildende Einheit)
CISH	Chromogene- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
CLSM	Konfokales-Laser-Scanning-Mikroskop
Cps	Counts per second (Anzahl je Sekunde)
CTRL	Control (Kontrolle)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	Dulbecco's PBS
DSC	Differential scanning calorimetry (dynamische Differenzkalorimetrie)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS (= FKS)	Fetal bovine serum (fötales Kälberserum)
FDM	Fused Deposition Modeling
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded (Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fw	Forward (Vorwärts)
GUI	Graphical user interface
HEX	Hexachlorfluorescein
HP	Hybridisierungspuffer
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	Horse raddish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICC/IHC	Immuno cyto/histo chemistry (Immunzyto/-histochemie)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
MEK	Methylethylketon
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäurepuffer
MIP	Maximum-Intensitätsprojektion
<i>n</i>	Anzahl <i>n</i>

n_{index}	Brechungsindex
NB	Nichtspezifische Bindung
NC	Negative Control (Negativkontrolle)
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Polycarbonat
PCA	Principle Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PCA	Principal component analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDMS	Poly(dimethylsiloxan)
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PET(G)	Polyethylenterephthalat (Glykol)
PFA	Paraformaldehyd
PLA	Polymilchsäure
PMMA	Polymethylmethacrylat
POCT	Point-of-Care-Testing
PP	Polypropylen
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
ROI	Region of interest (Bereich von Interesse)
RP	Rapid Prototyping
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rv	Reverse (Rückwärts)
SA	Streptavidin
SB	Spezifische Bindung
SCN	Isothiocyanat
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SFF	Solid-Freeform-Technologie
SSC	Saline sodium citrate (Salzlösung Natriumcitrat)
STD	Standard
STED	Stimulated Emission Depletion (Mikroskopietechnik)
Supp.	Supplementary material (Zusatzmaterial)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS (T)	Tris-buffered saline (tris-gepufferte Salzlösung; ± Tween 20)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T_g	Glasübergangstemperatur
T_m	Schmelztemperatur
TPU	Thermoplastisches Polyurethan
T_r	Rekristallisationstemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Tyramide signal amplification (Tyramid-Signalverstärkung)
TWS	Tyramide Working Solution (Tyramid-Arbeitslösung)
U. a.	Unter anderem
WP	Waschpuffer
$\lambda (\lambda_{ex}, \lambda_{em})$	Wellenlänge (Anregung, Emission)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schema der FISH.....	14
Abb. 2 HPV-Genom mit (Onko-) Genen.....	17
Abb. 3 Herstellung von DNA-Origamis.....	19
Abb. 4 Tyramidsignalverstärkung in Zellen.....	20
Abb. 5 Experimenteller Aufbau der Polymerstudien.....	24
Abb. 6 Plasmidkarte pML2d.....	49
Abb. 7 Sondennachweis an Mikropartikeln.....	56
Abb. 8 DNA-Origami-Detektion an Mikropartikeln.....	58
Abb. 9 Tyramidsignalverstärkung auf Mikropartikeloberflächen.....	59
Abb. 10 Gelshift biotinylierter Oligonukleotide.....	60
Abb. 11 Mikroskopische Bilder eines mit Streptavidin beschichteten und mit TSA behandelten Mikropartikels.....	61
Abb. 12 Erstellte 3D-Konstruktionen in dieser Arbeit.....	63
Abb. 13 Vorbereitung eines 3D-gedruckten 2-Kammer-Chips.....	68
Abb. 14 Überprüfung der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese.....	70
Abb. 15 Korona als SONDENSIGNAL an Mikropartikeln.....	72
Abb. 16 Vergleich verschiedener Nachweiskombinationen von Sonden an Mikropartikeln.....	73
Abb. 17 FISH-Tests mit kommerziellen Sonden.....	75
Abb. 18 Vergleich der CISH und FISH (\pm TSA) in fixierten Zellen.....	77
Abb. 19 Vergleich von Nachweismethoden in der FISH.....	78
Abb. 20 Metaphasen-FISH mit HPV-Sonden.....	78
Abb. 21 Vergleich von Sondenmischungen gegen HPV-Sequenzen.....	80
Abb. 22 HE-Färbung von FFPE-Geweben.....	82
Abb. 23 FISH an FFPE-Material.....	83
Abb. 24 Untersuchung von DNA-Origamis unter verschiedenen Konditionen.....	87
Abb. 25 Bindung von DNA-Origamis in TAE- und TBS-T-Puffern.....	89
Abb. 26 Mikropartikelenaufnahmen nach DNA-Origami-Bindung.....	90
Abb. 27 Mikroskopischer Vergleich der DNA-Origami-Bindung.....	91
Abb. 28 Ergebnisse zur Tyramidsignalverstärkung an Mikropartikeln.....	95
Abb. 29 Fluoreszenzspektren der 3D-gedruckten Polymere.....	99
Abb. 30 Biplot der Hauptkomponentenanalyse (PCA) für die Anregungswellenlänge 350 nm.....	101
Abb. 31 Thermische Analysen von zwei 3D-Druckfilamenten.....	104
Abb. 32 Mittlere Fluoreszenzintensität der <i>S. aureus</i> Stämme 6095 und 6096.....	106
Abb. 33 Biofilmbildung auf gedruckten Probenträgeroberflächen.....	111
Abb. 34 Bestimmung der Zelldichte auf gedruckten Probenträgern.....	113
Abb. 35 Adhäsionsmuster der Zelllinien SiHa, HeLa und CaSki auf gedruckten Probenträgern.....	115
Abb. 36 Durchschnittliche DAPI-Fluoreszenzintensität von Zelllinien auf gedruckten Probenträgern.....	118
Abb. 37 Näherungswerte der Zellzahl der Zelllinien SiHa, HeLa und CaSki auf gedruckten Probenträgern.....	119
Abb. 38 FISH in eukaryotischen Zellen auf gedruckten Probenträgern.....	120
Abb. 39 Immunfluoreszenzfärbung auf einem 3DP-modifizierten Objektträger.....	122
Abb. 40 Normalisierte Fluoreszenzintensität auf Nitrozellulosemembranen in 3D-gedruckten Chips.....	124

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Kommerzielle Sonden und DNA-Konstrukte.....	26
Tab. 2 Mikropartikelpopulationen (Beads)	26
Tab. 3 Fluoreszenzfarbstoffe und deren spektrale Eigenschaften	26
Tab. 4 Oligonukleotide und einzelsträngige Sonden	27
Tab. 5 PCR-Produkte - doppelsträngige Amplikons und Sonden für Mikropartikelversuche	29
Tab. 6 Sonden (-kombinationen) für Hybridisierungsversuche	31
Tab. 7 Chemikalien und Reagenzien mit Zusatzinformationen	33
Tab. 8 Medien, Puffer und Lösungen - Zusammensetzung und Herstellung	36
Tab. 9 Kits und Komponenten	38
Tab. 10 Verbrauchsmaterialien.....	38
Tab. 11 Laborgeräte und Messinstrumente	39
Tab. 12 Polymere für den 3D-Druck.....	40
Tab. 13 Kultivierte Zelllinien.....	43
Tab. 14 HPV-positive und -negative FFPE-Gewebeproben	46
Tab. 15 Kultivierte Mikroorganismen	48
Tab. 16 Zusammensetzung der PCRs	51
Tab. 17 Einschätzung von Sondenmischungen gegen HPV-Sequenzen.....	79
Tab. 18 Erhöhte Autofluoreszenz der Filamente	102
Tab. 19 Ergebnisse zur Analyse der Zelladhäsion über Bildintensität und Zellzahlbestimmung	116
Tab. 20 Vergleich von Filamenteigenschaften für den 3D-Druck von bioanalytischen Untersuchungssystemen	125

1 Einleitung und theoretische Betrachtungen

1.1 Vorbemerkungen und Zielstellung

In der personalisierten Medizin und der Diagnostik verschiedener Krankheiten sind der präzise Nachweis und die Quantifizierung von Biomolekülen, wie Proteinen inklusive Antikörper oder Nukleinsäuren aus Patientenproben, von großem Interesse. Für die Entwicklung und Verbesserung neuer Assays ist es daher notwendig, über eine Reihe von hochspezifischen und sensitiven Nachweisverfahren zu verfügen.

Diese Dissertation beschäftigt sich im Folgenden mit verschiedenen Fragestellungen rund um den Nachweis von Biomarkern. Dabei soll unter anderem sowohl auf die Diagnostik mittels spezifischer Sonden, die sensitive, teils automatisierte Detektion auch geringer Analytmengen unter Zuhilfenahme innovativer Signalverstärkungsansätze, als auch die generelle Assayplanung und -optimierung eingegangen werden. Insbesondere werden hierzu unterschiedliche Aspekte moderner Fabrikationstechnologien untersucht und analysiert, wie das Rapid-Prototyping, das durch fortschreitende Entwicklungen auch im Life-Science-Bereich immer mehr interessante Möglichkeiten bietet. Diese neuen Techniken bergen ein großes Zukunftspotential, besonders bei der Entwicklung von bioanalytischen Testsystemen, beispielsweise im Point-of-Care-Testing (POCT), um schnell, individuell und effizient auf neue Fragestellungen und Bedürfnisse reagieren zu können.

Die Ziele dieser Arbeit gliederten sich dazu in folgende Themenkomplexe:

- Entwicklung und Evaluierung spezifischer Hybridisierungssonden zum Nachweis viraler DNA-Sequenzen in Zellen und Geweben mittels Fluoreszenzmikroskopie
- Untersuchung innovativer Signalverstärkungstechnologien, insbesondere zur Analyse von Biomolekülen in mikropartikelbasierten Assays
- Charakterisierung und Evaluierung der 3D-Drucktechnologie zur Entwicklung von bioanalytischen Testsystemen mit dem Fokus auf kommerzielle Polymermaterialien

Neben bisher unveröffentlichten Resultaten bezüglich neuer Sonden für den Nachweis von humanen Papillomviren, fließen zu einem Großteil folgende zwei, im Zusammenhang mit dieser Dissertation erstellte, Fachpublikationen zu den Themen Tyramidsignalverstärkung an Mikropartikeln und Polymere für den 3D-Druck von bioanalytischen Testsystemen ein:

- Jurischka C, Dinter F, Sowa M, Noack J, Schiebel J, Roggenbuck D, Schierack P, Rödiger S. Tyramide signal amplification as universal detection method on protein coated microbeads. *Journal of Cellular Biotechnology*. 2019;4:15–22. doi:10.3233/JCB-189003. [1]
- Jurischka C, Dinter F, Efimova A, Weiss R, Schiebel J, Schulz C, Fayziev B, Schierack P, Fischer T, Rödiger S. An explorative study of polymers for 3D printing of bioanalytical test systems. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2020. doi:10.3233/CH-190713. [2]

Weiterhin wird in dieser Arbeit zum Teil auf die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung im Kontext von Doppelstrangbrüchen eingegangen, was zudem als Beitrag in einem Review zur Thematik molekulare Biomarker im Kontext von DNA-Schäden erschienen ist:

- Ruhe M, Rabe D, Jurischka C, Schröder J, Schierack P, Deckert PM, Rödiger S. Molecular biomarkers of DNA damage in diffuse large-cell lymphoma – a review. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*. 2019;4:5. doi:10.21037/jlpm.2019.01.01. [3]

1.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Gerade fluoreszenzbasierte Untersuchungsmethoden bieten in vielen diagnostischen Fragestellungen wichtige Vorteile. Zum einen lassen sich mit Hilfe von optischen Instrumenten, teils sogar automatisierten Systemen, sehr sensitiv viele verschiedene Biomoleküle detektieren und zuordnen. Zum anderen ist es dadurch, im Vergleich zu anderen Standardmethoden wie PCR oder Lateral-Flow-Assays, relativ einfach möglich, sogar Aussagen auf Einzelzellebene zu treffen. So kann nicht nur eine genaue Aussage zur Lokalisation, zum Beispiel in krankhaften Tumorgeweben, gegeben werden, sondern auch zu spezifischen Aberrationen einzelner Zellen.

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) als hochsensitive Methode zur Färbung spezifischer Nukleinsäuresequenzen ist eine dieser Techniken, mit einem breiten Anwendungsfeld insbesondere in der molekularen Zytogenetik [4]. Von der Identifizierung ganzer Chromosomen, ihrer Regionen oder chromosomaler Veränderungen bis hin zum Screening auf einzelne Gene oder nur kurzer Sequenzabschnitte ermöglichen FISH-Sonden den präzisen Nachweis ihrer spezifischen Ziel-DNA- oder RNA-Sequenzen (sogenannte Targets). Mit FISH kann nicht nur das bloße Vorhandensein dieser Sequenzen gezeigt werden. Ebenso können zusätzliche Aussagen über Anzahl und Variationen getroffen werden, wodurch sich beispielsweise auch Chromosomenaberrationen wie Gentranslokationen oder Genamplifikationen untersuchen lassen. Die Grundlage für diese Technik bildet eine spezifische Hybridisierungsreaktion direkt am zu untersuchenden Ort (*in situ*), das heißt in einzelnen Zellen bis hin zu ganzen Geweben. Hierfür ist keine vorherige Extraktion von Molekülen notwendig und biologische Strukturen bleiben weitgehend erhalten. Dadurch macht es diese Methode möglich, die spezifischen Targets nicht nur quantitativ und qualitativ zu erfassen. Sie lassen sich zudem auch mikroskopisch genau lokalisieren und im Kontext von Geweben, zum Beispiel im Falle von soliden Tumoren, einordnen [5, 6].

Für die *in-situ*-Hybridisierungen werden spezifische Sonden konstruiert, die komplementär zu den Zielsequenzen sind. Je nach Untersuchungsprinzip können diese Sonden aus einzel- oder doppelsträngiger DNA oder RNA bestehen. Zum späteren Nachweis sind die Sonden entsprechend markiert. Dies kann im Falle von FISH durch das Einbringen fluoreszenzmarkierter Nukleotide geschehen oder auch durch andere Linker-Moleküle, wie Biotin oder Digoxigenin, die eine nachgeschaltete Detektion mit etwaiger Signalverstärkung möglich machen [7–9]. Bei der FISH erfolgt

der sehr sensitive Nachweis mit speziellen Fluoreszenzmikroskopen. Im Gegensatz dazu werden bei der Chromogen-*in-situ*-Hybridisierung (CISH) Substanzen verwendet, die eine Detektion mittels einfacher Lichtmikroskopie möglich machen [10]. Der entscheidende Prozess bei diesen Methoden ist die korrekte Hybridisierung der Sonde mit ihrer Zielregion. Dieser ist schematisch in Abb. 1 am Beispiel einer genomischen DNA-Sequenz als Target dargestellt. In diesem Fall ist weiterhin die doppelsträngige Form der Moleküle zu berücksichtigen. Um überhaupt eine Anlagerung der Sonden zu ermöglichen, müssen dieses zunächst durch Denaturierung mittels Hitze oder Chemikalien getrennt werden. Bei ausreichender Spezifität und passenden Bindungseigenschaften bildet sich im Anschluss über Wasserstoffbrückenbindungen der beteiligten Basen ein Sonden-Target-Hybrid aus, das im Anschluss detektiert werden kann.

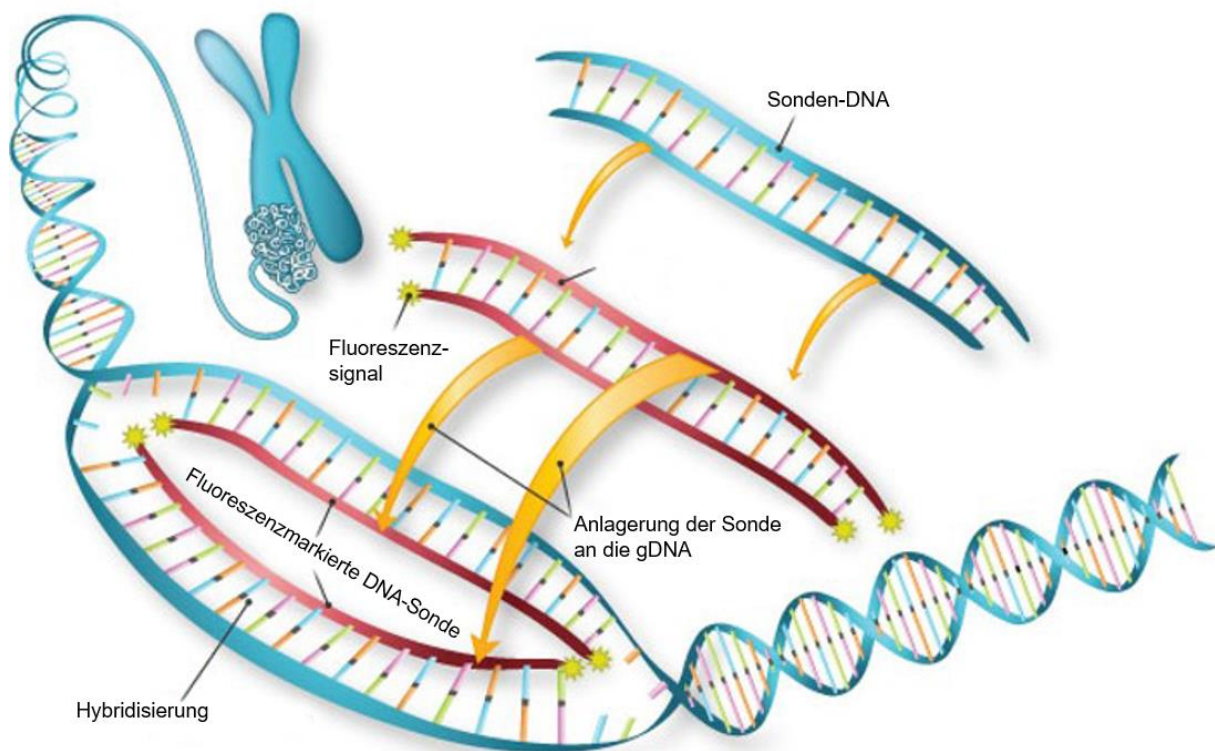


Abb. 1 Schema der FISH. Die Abbildung zeigt schematisch den Hybridisierungsprozess zwischen fluoreszenzmarkierter Sonden-DNA und einer Zielsequenz der genomischen DNA nach Dekondensierung (aus den Chromosomen) und Denaturierung (Doppel- → Einzelstränge). Das Schema ist angepasst von www.semrock.com/fish.aspx [11] entnommen.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Sonden mit verschiedenen Markierungen lassen sich sogar mehrere Zielsequenzen parallel in einem Multiplexansatz analysieren. Das bietet für die Diagnostik einen weiteren Vorteil, da insbesondere bei

begrenzten Patientenmaterial mehrere Parameter gleichzeitig untersucht werden können. Auch die Kombinationen mit antikörperbasierten Techniken wie der Immunzyto- oder Immunhistochemie (ICC, IHC) sind möglich und bringen einen zusätzlichen Mehrwert mit sich [12, 13].

Weitere Möglichkeiten zeigen sich beispielsweise in der Onkologie durch die parallele Untersuchung von DNA-Schäden und deren Verknüpfung mit spezifischen chromosomalen Regionen. Bei Untersuchungen von γ -H2AX-Foci, die durch Doppelstrangbrüche (DSB) in Zellkernen verursacht werden, bietet die Kombination mit FISH die Möglichkeit, zusätzliche Informationen zur Charakterisierung der detektierten Signale, insbesondere deren Verteilung und genomische Lokalisierung, zu gewinnen [3].

Untersuchungen von Nakamura *et al.* (2009) zu endogenen DNA-Schäden konnten beispielsweise einen hohen Beitrag von Telomerschäden an den gesamten DNA-Doppelstrangschäden in Tumorzellen zeigen [14]. Daher wurden telomerspezifische FISH-Sonden verwendet, um zwischen nicht-telomeren Schäden an Chromosomenarmen und Telomerschäden selbst zu unterscheiden. Die kombinierte Analyse von DSB-Foci und FISH-Signalen ermöglichte darüber hinaus die Unterscheidung dieser Schäden an DNA-Doppelstrangenden oder DSBs an Chromosomenenden, z. B. innerhalb von Telomeren. Schließlich zeigte diese Studie eine Korrelation zwischen der Anzahl der Foci und der geschädigten Telomere sowie eine inverse Beziehung zwischen der Anzahl der γ -H2AX-Foci und der Telomerase-Aktivität.

In einer weiteren Studie von Brugat *et al.* (2010) wurde FISH zum Nachweis komplexer Chromosomenaberrationen bei chronisch lymphatischen Leukämiezellen (CLL), die für Telomerdysfunktion bekannt sind, eingesetzt [15]. Dabei konnte gezeigt werden, dass kritisch kurze Telomere das DSB-Signal aktivieren können, dargestellt als erhöhte Foci-Anzahl, die neben TRF2 und γ -H2AX oder 53BP1 auch Proteine des nichthomologen Endjoining-Reparatursystems enthalten. Neben Co-Lokalisationen dieser verschiedenen DSB-Marker mit Telomersequenzen zeigte die FISH-Analyse von Metaphasen-CLL-Zellen eine Assoziation von kurzen Telomeren mit genomischer Instabilität. Beobachtet wurden Telomerdeletionen und andere häufige chromosomale Deletionen in den CLL-Zellen, wobei alle Aberrationen durch spezifische FISH-Sonden nachgewiesen wurden.

Neben Telomer-assoziierten Studien wurden FISH-Ansätze auch erfolgreich bei Untersuchungen zur H2AX-Funktion in der Immunglobulin-Schweren-Kette (IgH)-

Klasse-Schalter-Rekombination (CSR) in B-Lymphozyten eingesetzt [16, 17]. Unter Verwendung von FISH-Sonden, die auf verschiedene IgH-Regionen zielen, schlugen Franco *et al.* (2006) sowie Yin *et al.* (2009) eine allgemeine Rolle für DSB-Antwortfaktoren bei der Förderung der Endverknüpfung und der Unterdrückung von Chromosomenbrüchen und Translokationen durch Chromatinmodifikationen durch H2AX vor.

Im Allgemeinen ist FISH sehr vorteilhaft für die Untersuchung von DSB in bestimmten genetischen Regionen, bei der Untersuchung von Chromosomenteilen, der Lokalisierung von bestimmten Genen oder der Analyse möglicher Ergebnisse nach unzureichender Reparatur wie z. B. chromosomalen Rearrangements.

1.3 Das Genom humaner Papillomviren als Modell

Aufgrund der hohen Relevanz wurde zur Entwicklung und Überprüfung spezifischer DNA-Sonden und unterschiedlicher Detektionsstrategien das Genom humaner Papillomviren (HPV) als Modellsystem gewählt [18]. HPV sind doppelsträngige DNA-Viren mit einem zirkulären Genom von etwa 8 kb und infizieren Basalzellen der Epithelschichten (z. B. am Gebärmutterhals, der Haut). Bisher sind mehr als 150 verschiedene HPV-Genotypen bekannt (ca. 100 infizieren Menschen), die sich anhand ihrer klinischen Relevanz gruppieren lassen. Während Low-Risk-Typen (z. B. HPV 6, 11) zu gutartigen Hautwarzen führen können, sind anogenitale Karzinome, insbesondere Gebärmutterhalskrebs, stark mit persistierenden Infektionen durch humane Papillomviren der High-Risk-Gruppe (z. B. HPV 16, 18) assoziiert. Gebärmutterhalskrebs ist mit 4.000 Todesfällen pro Jahr in Deutschland der häufigste Tumor bei Frauen, wobei in fast allen Fällen mindestens eine HPV-Infektion nachgewiesen werden kann. Die persistierende HPV-Infektion spielt eine große Rolle beim Zervixkarzinom und der physische Zustand des Virus (integriert oder episomal) scheint ein wichtiger prognostischer Marker für das Zervixkarzinom zu sein [19, 20]. Das Genom von Hochrisikotypen von HPV enthält Onkogene (E6/ E7), deren Produkte mit Tumorsuppressor-Genen (p53, pRB) interagieren und diese inaktivieren und zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F führen. Im Ergebnis lösen die viralen E-Proteine die Zellproliferation aus und verhindern die Apoptose. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die Virus-DNA in das Wirtszellgenom integriert wird, wobei die Kontrolle durch ein virales Suppressor-Gen (E2) in der Regel verloren geht, was

wiederum zu einer Überproduktion der viralen Onkogene führt [21, 22]. Zur Übersicht ist das HPV-16-Genom inklusive der Genverteilung in Abb. 2 dargestellt.

Wichtige Techniken zur Risikoabschätzung sind zytologische Auswertungen von Zervikovaginalabstrichen nach dem Pap-Test und der Nachweis des HPV-Genoms mittels PCR [23, 24]. Da aber die Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom ein Schlüsselereignis im Verlauf der Entwicklung zum Gebärmutterhalskrebs zu sein scheint, ist es ratsam, für eine bessere Abschätzung des Tumorrisikos nach bereits integrierter viraler DNA mittels Techniken wie FISH zu suchen.

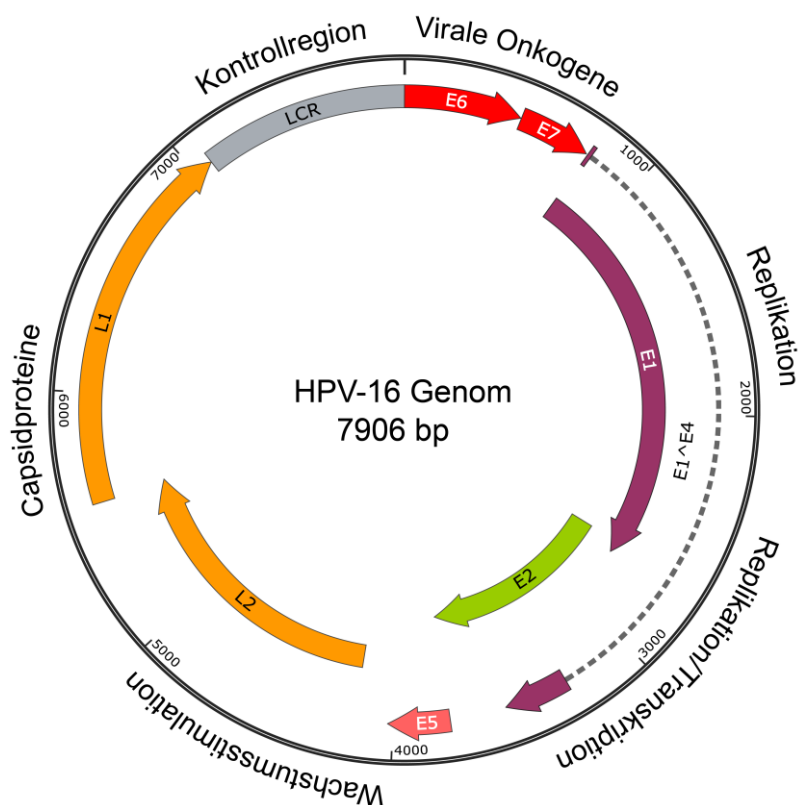


Abb. 2 HPV-Genom mit (Onko-) Genen. Die Abbildung zeigt das knapp 8.000 bp große, zirkuläre Genom des humanen Papillomvirus Typ 16. Zur Übersicht sind die wichtigsten Genregionen (inklusive der Onkogene E6 und E7) sowie regulatorische Bereiche eingezeichnet. Die Sequenzinformationen zur Erstellung dieser Grafik basierten auf der NCBI-Referenzsequenz NC_001526.4.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich zunächst mit dem Design und der Anwendung von FISH-Sonden für den Nachweis der HPV-Genotypen 16 und 18. Hierbei sollten insbesondere Sonden gegen die viralen Onkogene E6 und E7 eingesetzt werden, um gleichzeitig eine mögliche Schädigung bei Integrationsereignissen zu detektieren. Es wurde berichtet, dass die Loci der HPV-Integration über fast alle menschlichen Chromosomen verteilt sind. Trotz einer Präferenz für genomisch fragile Stellen, sind keine bevorzugten Stellen oder Integrationsmotive bekannt [25]. Da die HPV-

Integrationsstellen zufällig über das gesamte Genom verteilt sind, ist es ebenso möglich, dass HPV-Sequenzen in Krebs-assoziierte Gene integriert werden. Daher waren zusätzlich Sondenkombinationen geplant, um ebensolche Regionen zu untersuchen.

Als biologisches Modell zur Überprüfung und Auswertung der Qualität der Sonden wurden HPV-infizierte Zelllinien verwendet. Für diesen Ansatz wurden drei Zervixkarzinoma-Zelllinien kultiviert, deren Genome bereits integrierte DNA von HPV enthielten: HeLa (mit 10 bis 50 Kopien von HPV-18 L1 ORF), SiHa (HPV-16, 1 bis 2 Kopien pro Zelle) und CaSki (HPV-16, ca. 600 Kopien pro Zelle) [19, 26]. In diesen Zellen sollte das integrierte Genom von HPV über die entwickelten Sonden nachgewiesen werden.

Nach der Etablierung der FISH auf Zellkulturebene sollten in den nächsten Schritten künstliche Gewebe und Patientenproben untersucht werden. Geplante Arbeiten, waren die Analyse von Zervixabstrichen sowie die Anwendung der Methode an fixierten Gewebeproben (Mikrotomschnitte) aus Biopsien wie beispielsweise Konisationen.

Ein entscheidender Faktor beim FISH-Nachweis dieser Art von Zielmolekülen war neben deren Sequenzlänge vor allem die Anzahl der vorhandenen Kopien. Um auch Proben und Zellen mit nur geringen Mengen spezifischer DNA-Sequenzen als positiv detektieren zu können, sollten im weiteren Verlauf der Arbeit Testsysteme zur Beurteilung der Sonden sowie Signalverstärkungsstrategien untersucht werden.

1.4 Signalverstärkungsstrategien

In der medizinischen Diagnostik und der Life-Science-Forschung sind Anwendungen auf Mikropartikelbasis nützliche Werkzeuge, die gegenüber herkömmlichen Analysemethoden mehrere Vorteile bieten. Dabei spielen die Multiplexfähigkeit, Automatisierung, quantitative Analyse sowie schnelle und kostengünstige Hochdurchsatz-Screenings eine wichtige Rolle. Mittlerweile werden zunehmend mikropartikelbasierte Techniken wie der Hybridisierungstest, die Echtzeit-Hybridisierungskinetik, der Multiplexing-CytoBead-Assay, die Schmelzkurvenanalyse oder der digitale Mikropartikelassay entwickelt und für die klinische Diagnostik eingesetzt [27–29]. Eines der Ziele dieser Arbeit war, neue Methoden für den universellen Nachweis von Biomolekülen auf Mikropartikeloberflächen zu evaluieren und diese zusätzlich auf ihre Signalverstärkungsfähigkeit zu testen.

1.4.1 DNA-Origamis

Eine hier untersuchte Strategie beinhaltete die Nutzung innovativ gefalteter DNA-Konstrukte, die als DNA-Origamis bezeichnet werden [30, 31]. Diese Partikel wurden in einer mit mehreren Fluorophoren beladenen und mit Biotin-markierten Form der Firma GATTAquant (Deutschland) auf die direkte Bindung an Streptavidin auf Mikropartikeloberflächen sowie auf ihre Fähigkeit zum Nachweis von Streptavidin-gebundenen Oligonukleotidsonden getestet. Um Bindungseigenschaften dieser sehr kleinen, nur wenige Zehntel Nanometer fassenden Moleküle zu untersuchen, wurden entsprechende Aufnahmen insbesondere mittels STED-Mikroskopie (Abberior Instruments) angefertigt. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 3 der Faltungsvorgang von einem Grundgerüst hin zu funktionalisierten DNA-Origamis schematisch dargestellt.

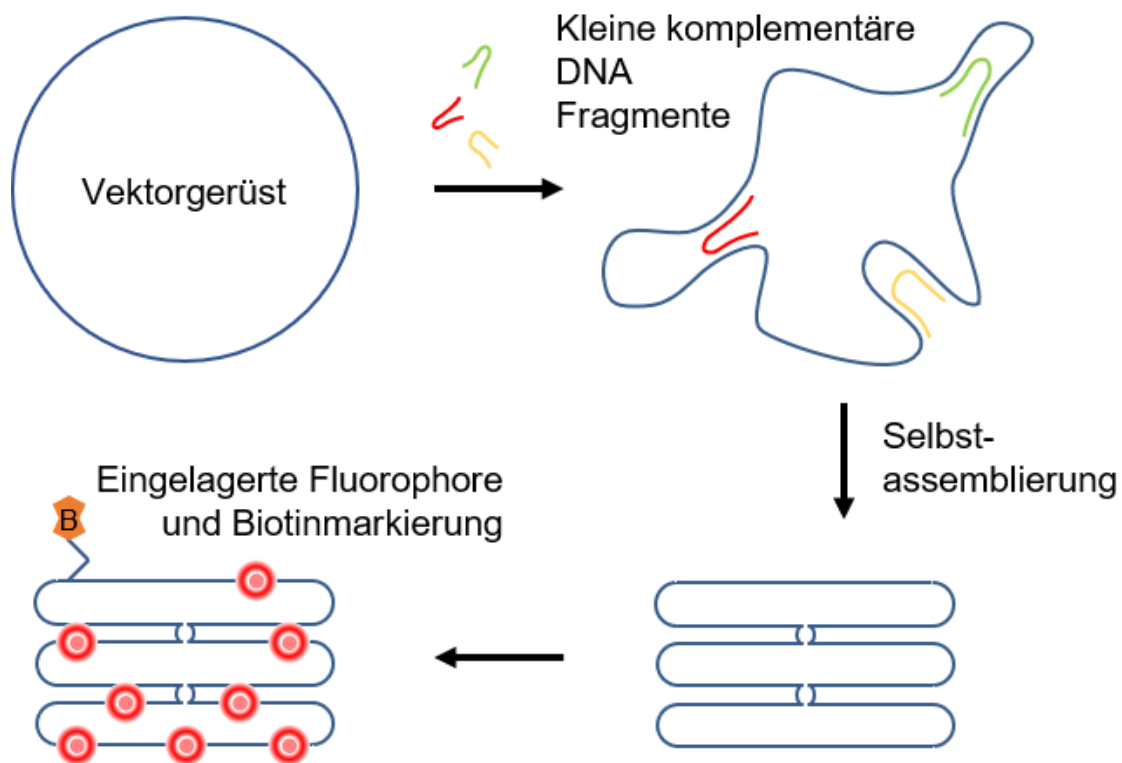


Abb. 3 Herstellung von DNA-Origamis. Die Abbildung zeigt den schematischen Vorgang bei der Konstruktion von DNA-Origamis. Ein zirkulärer DNA-Vektor bekannter Sequenz dient als Grundgerüst und wird durch die Zugabe kurzer, spezifischer DNA-Fragmente durch Selbstassemblierung in eine bestimmte Form gefaltet (im vorliegenden Fall würfelförmig). Durch das Einbringen fluoreszierender oder Biotin-markierter DNA-Fragmente lassen sich die Konstrukte funktionalisieren und entsprechend in Experimenten einsetzen.

1.4.2 Tyramidsignalverstärkung

Als weitere Strategie wurde mit dieser Arbeit die Anwendung einer universellen Fluoreszenzdetektionstechnologie namens Tyramidsignalverstärkung (TSA, von engl. *tyramide signal amplification*) auf Mikropartikeln für den Nachweis von oberflächen-gebundenen DNA-Sonden vorgestellt [1]. Das TSA-Verfahren wurde von Kersten *et al.* (1995) für eine *in-situ*-Hybridisierungsanwendung eingeführt [32] und hat sich als vielseitige und robuste Enzymamplifikationstechnik für den empfindlichen immunhistochemischen Nachweis erwiesen (Abb. 4).

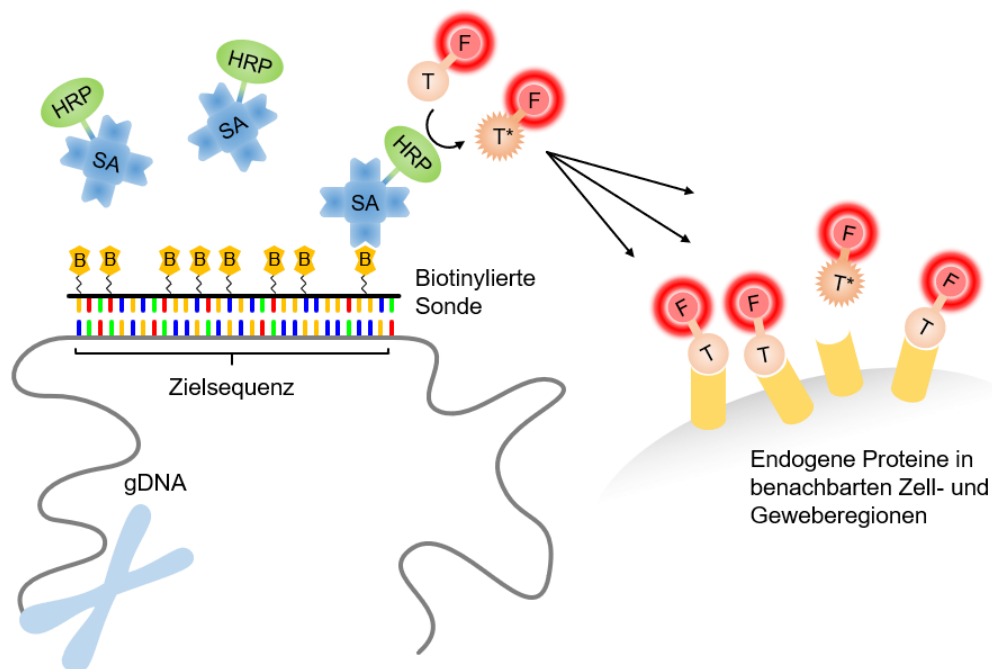


Abb. 4 Tyramidsignalverstärkung in Zellen. Die Grafik zeigt schematisch den Ablauf der TSA-Anwendung wie sie *in situ* in biologischen Proben wie Zellen abläuft. Nach einer Standard-FISH zum Nachweis einer spezifischen, genomischen DNA-Sequenz mittels Biotin-markierter Sonde (B) folgt der Nachweis der hybridisierten Sonde durch eine enzymatische Reaktion. Dazu bindet zunächst mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin (HRP-SA) an die Sonde. Nach Zugabe des spezifischen Substrates werden fluoreszenzmarkierte Tyramidmoleküle (T) in eine reaktive Zwischenform (T*) umgesetzt. Diese binden in unmittelbarer Umgebung zahlreich an endogene Proteinreste und ermöglichen dadurch eine hochsensitive Detektion.

Bei den üblichen visuellen Fluoreszenztechniken ist ein Signalverstärkungsverfahren erforderlich, um sehr geringe Mengen eines Moleküls nachzuweisen. Daher ist TSA eine effiziente Methode zur Signalamplifikation in Hybridisierungsexperimenten mit Low-Copy-Oligonukleotiden und zur weiteren Proteinanalyse mit niedrig exprimierten Genen [33]. Als eine Art der katalysierten Reporterdeposition (CARD, von engl. *catalyzed reporter deposition*) ist TSA eine sehr empfindliche Methode, insbesondere bei der Fluoreszenzdetektion verschiedener Zielmoleküle in der ICC/IHC oder bei *in-situ*-Hybridisierungsansätzen [34–37]. Der entscheidende Vorgang bei dieser

Technologie ist die Einführung eines Meerrettichperoxidase-konjugierten Streptavidins (HRP-SA) für den direkten Nachweis von biotinylierten Molekülen wie Antikörpern oder Oligonukleotiden, die spezifisch an das Zielmolekül gebunden sind. Im letzten und kritischen Schritt vermittelt die Peroxidase eine Umsetzung des fluoreszenzmarkierten Tyramid-Substrats, hin zu aktivierten, reaktiven Zwischenformen, die an elektronenreiche Aminosäurereste von nahen, endogenen Proteinen (z. B. Tyrosin, Tryptophan) binden [38]. Dies führt zur Anlagerung zahlreicher fluoreszierender Tyramidmoleküle in einem engen Bereich des Zielmoleküls und erzeugt eine hochdichte Markierung des gewünschten Proteins oder der gewünschten Nukleinsäuresequenz *in situ*. Neben der bekannten Anwendung dieser Technik bei der Untersuchung biologischer Proben wie Zellen oder Geweben wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem ein Assay zum empfindlichen Nachweis von DNA-Molekülen auf Mikropartikeln etabliert.

1.5 Erstellung bioanalytischer Funktionsmodelle mittels 3D-Druck

In der Forschung und Entwicklung besteht ein hoher Bedarf an innovativen Konzepten, mit denen komplexe bioanalytische Systeme entwickelt oder an experimentelle Bedingungen angepasst werden können. Für diese Aufgabe kann die 3D-Drucktechnologie eingesetzt werden. Die ersten Beiträge zu diesem Verfahren wurden Anfang der 80er Jahre von Charles Hull geleistet [39]. Seitdem gewinnt der 3D-Druck, auch Additive Manufacturing (AM), Rapid Prototyping (RP) oder Solid-Freeform-Technologie (SFF) genannt, in Industrie und Wissenschaft zunehmend an Bedeutung. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn viele Optimierungsschritte für die Entwicklung notwendig sind [40]. Mit dieser Technologie können dreidimensionale, funktionale Modelle unabhängig voneinander erstellt werden, indem ein Material Schicht für Schicht aufgetragen wird. Es gibt eine Vielzahl von Materialien, die für Diagnostikanwendungen und den 3D-Druck verwendet werden können, wobei Polymilchsäure (PLA) und Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) die am häufigsten verwendeten sind [27, 41]. Weitere Materialien sind unter anderem PET (Polyethylenterephthalat) und thermoplastisches Polyurethan (TPU).

Da der 3D-Druck die Herstellung von Objekten mit unterschiedlichen Geometrien ermöglicht, bietet er auch Vorteile gegenüber herkömmlichen Fertigungsverfahren. Neben der Arzneimittelproduktion und -anpassung (inkl. personalisierter Medikamente), ausgefeilter und komplexer Darreichungsformen und On-Demand-

Produktion [42–44] wird die Technologie auch in der pharmazeutischen Arzneimittelproduktion und der Entwicklung von Drug-Delivery-Systemen mit nicht-traditionellen Geometrien für pharmazeutische Anwendungen (z. B. arzneimittelfreie Implantate) eingesetzt [45–47]. Für biomedizinische Anwendungen wurden Geräte für die Synthese von Nanopartikeln, die Kalorimetrie, eine Zellwachstumsüberwachung, die Geweberegeneration, Blutuntersuchungen, den Nachweis von pathogenen Bakterien, den Nachweis von Dopamin, die Forensik oder den Nachweis von DNA- und Protein-Krebs-Biomarkern gedruckt [44, 48–52]. Häufig sind Geräte zur Probenvorbereitung und neuartige Reaktionsgefäße, Lateral-Flow- und mikrofluidische Testsysteme wichtig für (Smartphone-basierte) Point-of-Care-Tests, für die Verarbeitung von (Blut-) Proben, für die Analyse von Thrombozytenaggregation und Thrombosekinetik sowie DNA- und Proteinarrays, die durch 3D-Druck hergestellt werden [48, 52–57].

Die Entwicklung von PLA geht auf das Jahr 1932 zurück. Als Reinsubstanz hat PLA eine Glasübergangstemperatur (T_g) von ca. 55 °C und eine Schmelztemperatur (T_m) von ca. 180 °C [58]. PLA wird aus Lactid hergestellt und ist daher hydrophob. Es ist einer der Filamente, die für viele medizinische Anwendungen wie Tissue Engineering und orthopädische Implantate verwendet werden können, da es zu Milchsäure abgebaut werden kann [52, 59].

Da ABS in Aceton gelöst werden kann, wurde es beispielsweise als Vorlage für die Herstellung von 3D-Mikrokanalnetzwerken verwendet, die von Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) umgeben sind [60]. Das Material zeichnet sich durch eine hohe Kälte- und Hitzebeständigkeit aus und ist sehr beständig gegen verschiedene Chemikalien [61].

PET ist in vielen Bereichen das am häufigsten verwendete thermoplastische Polymer, das sich aufgrund seiner hohen mechanischen Beständigkeit, Lebensmittelsicherheit, hohen chemischen Beständigkeit und Biokompatibilität auch für biomedizinische Anwendungen bestens eignet [62–64]. In der Glykol-co-polymerisierten Version PETG weist dieses Material mit einer niedrigeren Schmelztemperatur und Viskosität gute Eigenschaften für die 3D-Druck-Fertigung im Schmelzschichtverfahren (FDM) auf und kombiniert die Vorteile der einfachen Handhabung von PLA mit der hohen Haltbarkeit und Temperaturbeständigkeit von ABS.

Neben relativ festen Kunststoffen, die nach dem Drucken formbeständig und mechanisch belastbar sein sollen, gibt es flexible Materialien wie urethanbasierte TPU. Flexible thermoplastische Elastomere bieten den Vorteil, dass sie auch bei

Raumtemperatur (RT) Druck- oder Zugkräften nachgeben. Sie eignen sich daher für Dämpfungs- und Dichtfunktionen oder als flexible Stützstruktur zur Herstellung von Kunsthaut oder Gefäßen [65, 66].

Durch technologischen Fortschritt und Wettbewerb ist das FDM-Verfahren relativ kostengünstig geworden. Moderne 3D-Druck-Systeme erreichen unter bestimmten Bedingungen auch eine hohe Druckqualität und Genauigkeit bis in den 25 µm-Bereich. Nach der Definition von Beauchamp *et al.* (2017) sind 3D-Druckstrukturen für Millifluidik (> 1 mm), Submillifluidik (0,5-1,0 mm), große Mikrofluidik (100-500 µm) oder wirklich mikrofluidische (< 100 µm) Anwendungen möglich [67]. Demnach können Projekte auch in sehr kleinen Dimensionen reproduzierbar durchgeführt werden. Während die Auflösung des 3D-Druckers in Bezug auf Oberflächenrauheit und -größe nur sehr begrenzt mit der High-End-Lithographie konkurrieren kann, nutzen die Forscher diese Werkzeuge, um Prototypen von Mikrofluidikgeräten zu konstruieren [40, 68].

Wichtige Faktoren bei der Herstellung von Polymerformen mit Kunststoffen sind ihr Schmelzverhalten, ihre Kristallinität und ihre Hitzebeständigkeit. Schmelzverhalten und Kristallinität sind wichtige Parameter für die Herstellung eines Produkts mit stabilen mechanischen Eigenschaften [69]. Die Hitzebeständigkeit ist wichtig, um das Material unter bestimmten Bedingungen (z. B. DNA-Hybridisierung bei hohen Temperaturen) nutzen zu können oder das Material zu autoklavieren. Auch die Auswirkungen von Additiven müssen berücksichtigt werden [70]. Für PLA ist bekannt, dass die Zugabe von Farbstoffen einen Einfluss auf die Kristallisationsrate und Zugfestigkeit hat [71].

Für einen optimalen Druckprozess sowie eine erfolgreiche Anwendbarkeit des Produktes sind Materialeigenschaften wie Autofluoreszenz, Schmelzverhalten und Stabilität (mechanisch, chemisch) entscheidend. Die Autofluoreszenz eines Materials liegt vor, wenn kurz nach der Beleuchtung mit Licht spezifischer Wellenlänge (Anregung des Materials selbst), eine spontane Emission von Licht auftritt. Die emittierten Photonen sind dabei in der Regel energieärmer als die absorbierten, d. h. sie besitzen eine größere Wellenlänge. Diese Fluoreszenz kann die Eignung eines Materials für qualitative und quantitative bioanalytische Anwendungen einschränken, wenn die Autofluoreszenz im Bereich oder höher als das zu messende Biomarkersignal liegt [52]. Das Verhalten von Biomaterialien muss in einem breiten Spektrum von *in-vitro*-Experimenten getestet werden [72].

Obwohl es in der wissenschaftlichen Literatur zahlreiche Veröffentlichungen zur Anwendung von 3D-Druck gibt, stellte sich die Frage, welche Einschränkungen bei der Verwendung kommerzieller Filamentmaterialien bestehen und ob es Materialien gibt, die bevorzugt werden sollten. Hier wird über Erfahrungen zur Anwendbarkeit von handelsüblichen Filamenten berichtet. Es wurden vierzehn farbige, transparente und schwarze Materialien erworben (Abb. 5, obere Reihe).

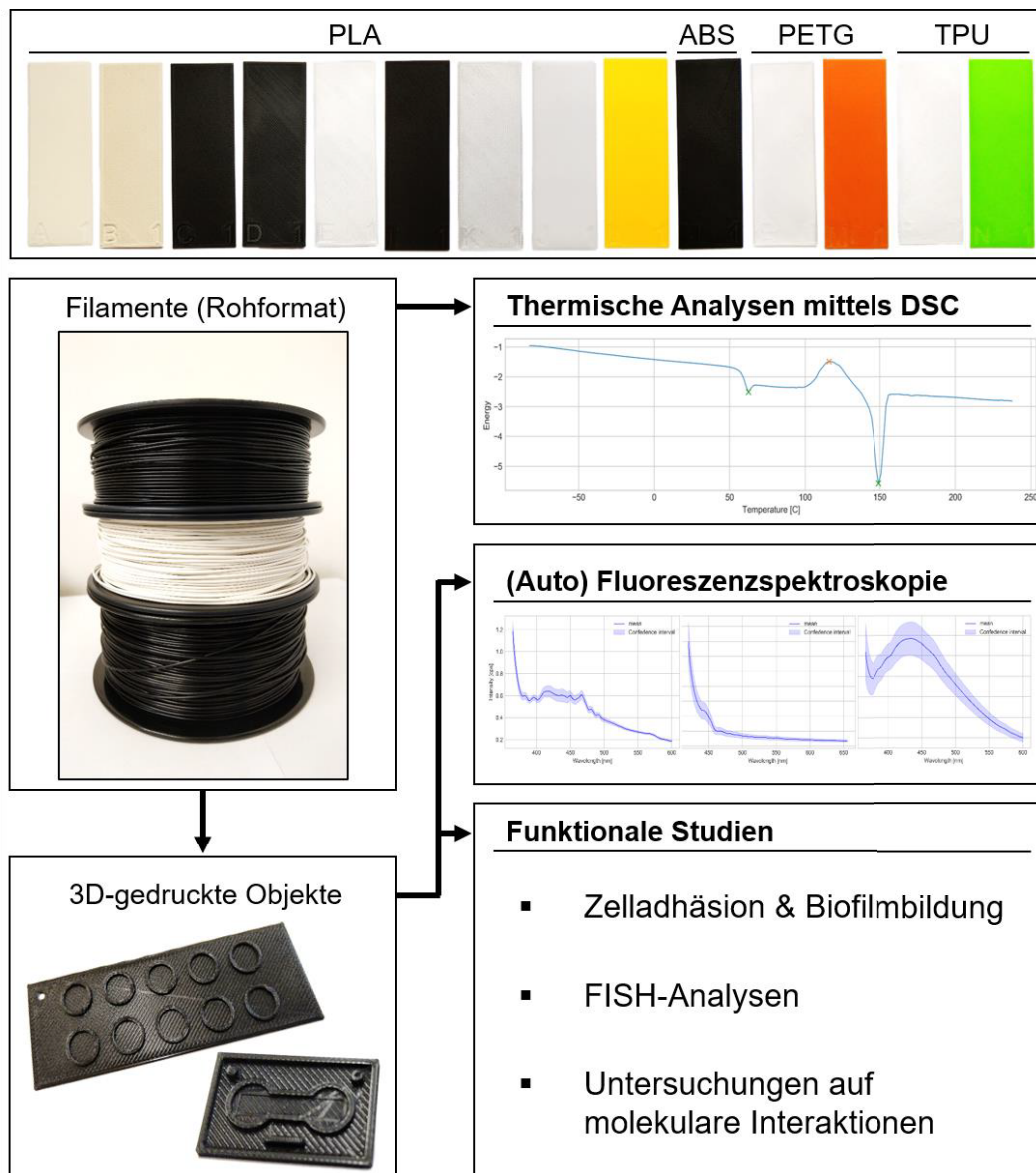


Abb. 5 Experimenteller Aufbau der Polymerstudien. In den Untersuchungen wurden verschiedene 3D-Druckfilamente (oben) auf ihre Eignung für die Herstellung von bioanalytischen Testsystemen analysiert. Mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) und der Fluoreszenzspektroskopie wurden thermische und spektrale Eigenschaften untersucht. In funktionellen Assays wurden weiterhin mögliche Anwendungen wie Zell- und Bakterienadhäsion, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und DNA-Detektion getestet.

Gefärbte Materialien wurden gewählt, weil die Verbindungen, welche die Farbe verursachen, einen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften des Materials haben [71]. Für bioanalytische Assays ist eine genaue Kenntnis der Materialeigenschaften unerlässlich. Obwohl gleichfarbige Filamente unter normaler Beleuchtung den Eindruck erwecken, dass sie gleiche Eigenschaften besitzen, lassen sich die unterschiedlichen Materialien bzw. deren Verhalten nur schwer auf Grundlage ihrer optischen Erscheinung einschätzen. Insbesondere unter speziellen Lichtquellen können problematische Effekte auftreten, wenn es um die Analyse von fluoreszenzmarkierten Proben geht. Da fluoreszenzbasierte Methoden aufgrund ihrer Empfindlichkeit und der einfachen Handhabung oft in der Bioanalytik eingesetzt werden, ist die richtige Materialauswahl für die beteiligten Komponenten von großer Bedeutung. Daher wurde untersucht, welche Filamente eine Autofluoreszenz aufweisen, um festzustellen, ob sie in einem bestimmten Spektralbereich eingesetzt werden können. Anschließend wurden aus ausgewählten Filamenten bioanalytische Geräte für den Nachweis von einzelsträngigen Nukleinsäuren in Form von DNA-Capture-Assays und für funktionelle Untersuchungen unter Einsatz von Adhäsionsassays mit Bakterien und humanen Zellen, der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung sowie der Biofilmbildung hergestellt.

2 Material und Methoden

2.1 DNA-Konstrukte, Mikropartikel und Fluoreszenzcharakteristika

Tab. 1 Kommerzielle Sonden und DNA-Konstrukte

Konstrukt	Beschreibung	Quelle	Artikelnummer
Custom-Beads ssDNA/ATTO647N	23 nm, 50 x ATTO 647N, 50 x ssDNA	GATTAquant	2110
GATTA-Beads R	23 nm, ATTO 647N	GATTAquant	2002
GATTA-Beads R - max. Biotin	23 nm, ATTO 647N	GATTAquant	2098
ssDNA - Biotin	5' Biotin, Scale: 1 μ M	GATTAquant	1511
ZytoFast HPV type 16,18	CISH-Sonde, biotinyliert	Zytovision	T-1056-400
ZytoLight SPEC ALKEML4 TriCheck Probe	FISH-Sonde, Fluoreszenz- markiert	Zytovision	Z-2117-200
ZytoLight SPEC TP53/17q22 Dual Color Probe	FISH-Sonde, Fluoreszenz- markiert	Zytovision	Z-2198-50
ZytoLight SPEC ALK/2q11 Dual Color Probe	FISH-Sonde, Fluoreszenz- markiert	Zytovision	Z-2124-200
p1203 PML2d HPV-16	Plasmid, HPV-16	Addgene	#10869

Tab. 2 Mikropartikelpopulationen (Beads)

Mikropartikelpopulation	Beschreibung	Quelle
C0424, C0425, C0426, C0427, C0428, C0429, C0430, C0431, C0432, C0433, C0434, C0435	Sphärische PMMA-Mikropartikel, größenkodiert (Durchmesser zwischen 9 und 15 μ m), fluoreszenzkodiert (spezifisches Verhältnis der Farbstoffe Rhodamine 6G und Coumarin), carboxylierte Oberfläche, 5000 μ l ⁻¹	PolyAn
C0427 (rote Fluoreszenz)	PMMA-(S15P+042*)-COOH, 15,4 μ m, 5000 μ l ⁻¹	PolyAn
C0428 (rote Fluoreszenz)	PMMA-(S15P+063*)-COOH, 14,7 μ m, 5000 μ l ⁻¹	PolyAn

Tab. 3 Fluoreszenzfarbstoffe und deren spektrale Eigenschaften

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungswellenlänge λ_{Ex} [nm]	Emissionswellenlänge λ_{Em} [nm]
7-Aminoactinomycin D (7AAD)	546 (488)	647
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	358	461
6-Carboxyfluorescein (FAM)	495	520
Alexa Fluor 488	490	525
Alexa Fluor 594	590	617
Alexa Fluor 647	650	665
ATTO 488	500	520
ATTO 647N	646	664
Coumarin	460	500
Cy3	550	570
Cy5	649	670
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	495	519
Hexachloro-Fluorescein (HEX)	535	556
Rhodamine 6G	520	560

Tab. 4 Oligonukleotide und einzelsträngige Sonden

Oligo-Nr.	Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	Länge	T_m [°C]	Markierung	Referenz
O2452	HPV-16_294_fw	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGT	23mer	58	·	[20]
O2453	HPV-16_294_rv	GACCCCTTATATTATGGAAT	20mer	42	·	[20]
O2461	16E2F	AACGAAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAG	29mer	55	·	[73]
O2462	16E2R	CCAAGGCGACGGCTTTG	17mer	55	·	[73]
O2464	16E6F	GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC	23mer	54	·	[73]
O2465	16E6R	TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC	25mer	55	·	[73]
O2466	HPV16-E6F	GGATCCACAGGAGCGACCCAGAAAG	25mer	65	·	·
O2467	HPV16-E6R	CTGCAGCTGGGTTTCTCTACGTGTT	25mer	60	·	·
O2468	HPV16-E7F	GGATCCTACATTGCATGAATATATG	25mer	52	·	·
O2469	HPV16-E7R	CTGCAGATGGGGCACACAATTCCTA	25mer	63	·	·
O2470	HPV16-E1F	ATCTACCATGGCTGATCCTG	20mer	49	·	·
O2471	HPV16-E1R	GGTCACGTAGGTCTGTACTA	20mer	41	·	·
O2472	HPV16-E2F	CGAGGACAAGGAAAACGATG	20mer	52	·	·
O2473	HPV16-E2R	TGTGGATGCAGTATCAAGAT	20mer	45	·	·
O2477	HPV-16_294_bio_fw	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGT	23mer	58	Dual-Biotin (5')	·
O2478	HPV-16_294_bio_rv	GACCCCTTATATTATGGAAT	20mer	42	Dual-Biotin (5')	·
O2521	HPV-16_294_fw_647	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGT	23mer	58	Atto 647N (5')	·
O2522	HPV-16_294_rv_647	GACCCCTTATATTATGGAAT	20mer	42	Atto 647N (5')	·
O2545	pYAM9-60F1	CTGCAGCGTTCTGAGAAACATC	22mer	54	·	[74]
O2546	pYAM9-60R2-r	GCGGGAATTCATACAAATTGCAG	23mer	57	·	[74]
O2547	HPV-16_294p_F01	GCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTAT	30mer	66	Atto 647N (5')	·
O2548	HPV-16_294p_F02	ATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAG	30mer	62	Atto 647N (5')	·
O2549	HPV-16_294p_F03	TATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTAT	30mer	55	Atto 647N (5')	·
O2550	HPV-16_294p_F04	GTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAA	30mer	50	Atto 647N (5')	·
O2551	HPV-16_294p_F05	TTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTT	30mer	47	Atto 647N (5')	·
O2552	HPV-16_294p_F06	TGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACA	30mer	58	Atto 647N (5')	·
O2553	HPV-16_294p_F07	ACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGT	30mer	59	Atto 647N (5')	·
O2554	HPV-16_294p_F08	GTATTAAGTGTCAAAGCCACTGTGTCTCTG	30mer	60	Atto 647N (5')	·
O2555	HPV-16_294p_F09	AAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGC	30mer	62	Atto 647N (5')	·
O2556	HPV-16_294p_F10	AAAGATTCCATAATATAAGGGGTC	24mer	75	Atto 647N (5')	·
O2626	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	20mer	(53) ¹	·	[75]
O2627	MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	20mer	(53) ¹	·	[75]

O2628	HPV-16_specific_E6:E7_253_Fw	CCCAGCTGTAATCATGCATGGAGA	24mer	60	.	[76]
O2629	HPV-16_specific_E6:E7_253_Rv	GTGTGCCCATTAACAGGTCTTCCA	24mer	59	.	[76]
O2630	HPV-18_specific_E6:E7_201_Fw	CGACAGGAACGACTCCAACGA	21mer	57	.	[76]
O2631	HPV-18_specific_E6:E7_201_Rv	GCTGGTAAATGTTGATGATTA	24mer	49	.	[76]
O2632	Beta-Globin_501_Fw	TCAACCCTACAGTCACCCAT	20mer	49	.	.
O2633	Beta-Globin_501_Rv	CTAACAATTACGAACAGCAATGAG	24mer	51	.	.
O2636	GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	23mer	41	.	[77]
O2637	GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	25mer	44	.	[77]
O2638	HPV-16_E7_Rv	ATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAAC	30mer	80	.	.
O2639	HPV-16_E7_Fw	GTCTACGTGTGTGCTTTGTACGCA C	26mer	76	.	.
O2640	HPV-18_E7_Rv	CCGAGCACGACAGGAGAGGCT	21mer	70	.	.
O2641	HPV-18_E7_Fw	TCGTTTTCTTCTCTGAGTCGCTT	24mer	70	.	.
O2763	HPV-16_L1_Fw	ATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTG	22mer	59	.	.
O2764	HPV-16_L1_Rv	TTACAGCTTACGTTTTTTGCGTTTAGC	27mer	58	.	.
O2765	HPV-16_L2_Fw	ATGCGACACAAACGTTCTGC	20mer	59	.	.
O2766	HPV-16_L2_Rv	CTAGGCAGCCAAAGAGACATCTG	23mer	59	.	.
O2767	pML2_flank_rv	GTAGGTTGAGGCCGTTGAGC	20mer	59	.	.
O2768	pML2_flank_fw	CTTTCACCAGCGTTTCTGGGTG	22mer	60	.	.
O2769	HPV-16_E1-end_Fw	AAGGACGTGGTCCAGATTAAGTTTG	25mer	59	.	.
O2770	HPV-16_L2-start_Rv	AGGGCCCACAGGATCTACTG	20mer	60	.	.
O2771	HPV-16_L1end-misc_Fw	ACATCCCAGGCAATTGCTTG	20mer	59	.	.
O2772	HPV-16_misc-E6-E7_Fw	TAAAACGACATGGGTGTGTGC	23mer	60	.	.
O2775	HPV16-E7F2	ATGCATGGAGATACACCTACATTGC	25mer	59	.	.
O583	EUB 338	GCWGCCWCCCGTAGGWGT	18mer	.	Atto 647N (5')	[78]
O2482	EUB 338 (A488)	GCWGCCWCCCGTAGGWGT	18mer	.	Atto 488 (5')	[78]
O2486	EUB 338 (komplementär)	ACWCCTACGGGWGGCWGC	18mer	.	Dual-Biotin (5')	[55]
O761	Vim	ACCTGCTCAATGTTAAGATGGCCC TTGACATTGAGATTGCC	41mer	76	Atto 647N (3'), Dual-Biotin (5')	

A – Adenin, G – Guanin, T – Thymin, C – Cytosin, M = A+C, R = A+G, W = A+T, Y = C+T;

¹ Anlagerungstemperatur der Primer während der PCR

Tab. 5 PCR-Produkte - doppelsträngige Amplikons und Sonden für Mikropartikelversuche

PCR-Nr.	Bezeichnung	Länge [bp]	Modifikation	Fw-Primer	Rv-Primer
P1	Biot.-HPV16 - 294 bp 647N-both primer	294	Biotin (intern), Atto 647N (5' Fw & Rv)	O2521	O2522
P2	Biot.-HPV16 - 294 bp 647N-Fw-only	294	Biotin (intern), Atto 647N (5' Fw)	O2521	O2453
P3	Biot.-HPV16 - 294 bp 647N-Rv-only	294	Biotin (intern), Atto 647N (5' Rv)	O2452	O2522
P4	Biot.-HPV16 - 294 bp	294	Biotin (intern)	O2452	O2453
P5	HPV16 - 294 bp 647N-both primer	294	Atto 647N (5' Fw & Rv)	O2521	O2522
P6	HPV16 - 294 bp 647N-Fw-only	294	Atto 647N (5' Fw)	O2521	O2453
P7	HPV16 - 294 bp 647N-Rv-only	294	Atto 647N (5' Rv)	O2452	O2522
P8	HPV16 - 294 bp	294	.	O2452	O2453
P9	dB(Fw)-HPV16 - 294 bp 647N-Rv-only	294	Biotin (dual, Fw), Atto 647N (5' Rv)	O2477	O2522
P10	dB(Rv)-HPV16 - 294 bp 647N-Fw-only	294	Biotin (dual, Rv), Atto 647N (5' Fw)	O2521	O2478
P11	dB(Fw)-HPV16 - 294 bp	294	Biotin (dual, Fw)	O2477	O2453
P12	dB(Rv)-HPV16 - 294 bp	294	Biotin (dual, Rv)	O2452	O2478
P13	HPV16 - E6	463	.	O2464	O2467
P14	HPV16 - E6 gene	441	.	O2466	O2467
P15	HPV16 - E7 gene	266	.	O2775	O2469
P16	HPV16 - 294-E6	356	.	O2452	O2467
P17	HPV16 - E6 fragment	81	.	O2464	O2465
P18	HPV16 - misc-E6	246	.	O2772	O2465
P19	HPV16 - L1-end	255	.	O2771	O2764
P20	HPV16 - L2-start	300	.	O2765	O2770
P21	HPV16 - E2 gene fragment	76	.	O2461	O2462
P22	HPV16 - E1-end	135	.	O2769	O2471
P23	HPV16 - E2-end	515	.	O2461	O2473
P24	HPV16 - E1 gene	1983	.	O2470	O2471
P25	HPV16 - E2 gene	1138	.	O2472	O2473
P26	HPV16 - L1 gene	1518	.	O2763	O2764
P27	HPV16 - L2 gene	1422	.	O2765	O2766
P28	Biot.-HPV16 - E6	463	Biotin (intern)	O2464	O2467
P29	Biot.-HPV16 - E6 gene	441	Biotin (intern)	O2466	O2467
P30	Biot.-HPV16 - E7 gene	266	Biotin (intern)	O2775	O2469
P31	Biot.-HPV16 - 294-E6	356	Biotin (intern)	O2452	O2467
P32	Biot.-HPV16 - E6 fragment	81	Biotin (intern)	O2464	O2465
P33	Biot.-HPV16 - misc-E6	246	Biotin (intern)	O2772	O2465

Material und Methoden

P34	Biot.-HPV16 - L1-end	255	Biotin (intern)	O2771	O2764
P35	Biot.-HPV16 - L2-start	300	Biotin (intern)	O2765	O2770
P36	Biot.-HPV16 - E2 gene fragment	76	Biotin (intern)	O2461	O2462
P37	Biot.-HPV16 - E1-end	135	Biotin (intern)	O2769	O2471
P38	Biot.-HPV16 - E2-end	515	Biotin (intern)	O2461	O2473
P39	Biot.-HPV16 - E1 gene	1983	Biotin (intern)	O2470	O2471
P40	Biot.-HPV16 - E2 gene	1138	Biotin (intern)	O2472	O2473
P41	Biot.-HPV16 - L1 gene	1518	Biotin (intern)	O2763	O2764
P42	Biot.-HPV16 - L2 gene	1422	Biotin (intern)	O2765	O2766
P43	HPV-16_specific_E6:E7_253	253	.	O2628	O2629
P44	Biot.-HPV-16_specific_E6:E7_253	253	Biotin (intern)	O2628	O2629
P45	HPV-18_specific_E6:E7_201	201	.	O2630	O2631
P46	Biot.-HPV-18_specific_E6:E7_201	201	Biotin (intern)	O2630	O2631
P47	β -Globin (501 bp fragment)	501	.	O2632	O2633
P48	Biot.- β -Globin (501 bp fragment)	501	Biotin (intern)	O2632	O2633
P49	HPV consensus MY09/11	\approx 450	.	O2626	O2627
P50	Biot.-HPV consensus MY09/11	\approx 450	Biotin (intern)	O2626	O2627
P51	GP5/GP6 consensus	\approx 140	.	O2636	O2637

Tab. 6 Sonden (-kombinationen) für Hybridisierungsversuche

Nr.	Sondenname	Komponentenbezeichnung + -nummer	Modifikation	Template	
S1	BE6p CaSki 1x	Biot.-HPV16 - E6 gene	P29	Multi-Biotin	gDNA (CaSki)
S2	BE6p CaSki 10x	Biot.-HPV16 - E6 gene	P29	Multi-Biotin	gDNA (CaSki)
S3	B294p CaSki 1x	Biot.-HPV16 - 294 bp	P4	Multi-Biotin	gDNA (CaSki)
S4	B294p CaSki 10x	Biot.-HPV16 - 294 bp	P4	Multi-Biotin	gDNA (CaSki)
S5	B294p SiHa	Biot.-HPV16 - 294 bp	P4	Multi-Biotin	gDNA (SiHa)
S6	B-HPV16-spec	Biot.-HPV-16_specific_E6:E7_253	P44	Multi-Biotin	gDNA (CaSki)
S7	B-HPV18-spec	Biot.-HPV-18_specific_E6:E7_201	P46	Multi-Biotin	gDNA (HeLa)
S8	BE6P1.1	Biot.-HPV16 - E6 gene	P29	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S9	BE7P1.1	Biot.-HPV16 - E7 gene	P30	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S10	B294P1.1	Biot.-HPV16 - 294 bp	P4	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S11	BE1P1.1	Biot.-HPV16 - E1 gene	P39	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S12	BE2P1.1	Biot.-HPV16 - E2 gene	P40	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S13	BL2P1.1	Biot.-HPV16 - L2 gene	P42	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S14	BMYP1.1	Biot.-HPV16 - MY	P37	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S15	BL1C1.1	Biot.-HPV16 - L1	P41	Multi-Biotin	gDNA (CaSki)
S16	B-E6.L-P	Biot.-HPV16 - E6 long	P28	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S17	B-E6-P	Biot.-HPV16 - E6 gene	P29	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S18	B-E7-P	Biot.-HPV16 - E7 gene	P30	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S19	B-294E6-P	Biot.-HPV16 - 294-E6	P31	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S20	B-E6.SF-P	Biot.-HPV16 - E6 fragment	P32	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S21	B-MiscE6-P	Biot.-HPV16 - misc-E6	P33	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S22	B-L1End-P	Biot.-HPV16 - L1-end	P34	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S23	B-L2Start-P	Biot.-HPV16 - L2-start	P35	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S24	B-E2.SF-P	Biot.-HPV16 - E2 gene fragment	P36	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S25	B-E1End-P	Biot.-HPV16 - E1-end	P37	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S26	B-E2End-P	Biot.-HPV16 - E2-end	P38	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S27	BC-E7/E6.L	Biot.-HPV16 - E7 gene	P30	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S28	BC-E7/294E6/E6.SF	Biot.-HPV16 - E6 long	P28	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - E7 gene	P30	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - 294-E6	P31	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - E6 fragment	P32	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S29	BC-E7/294E6/MiscE6	Biot.-HPV16 - E7 gene	P30	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - 294-E6	P31	Multi-Biotin	p1203 pML2d

Material und Methoden

S30	BC-7.1	Biot.-HPV16 - misc-E6	P33	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - E7 gene	P30	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - 294-E6	P31	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - misc-E6	P33	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - L1-end	P34	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - L2-start	P35	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - E1-end	P37	Multi-Biotin	p1203 pML2d
		Biot.-HPV16 - E2-end	P38	Multi-Biotin	p1203 pML2d
S31	B- β -Globin-501	Biot.- β -Globin (501 bp fragment)	P48	Multi-Biotin	gDNA (CaSki)
S32	B-HPV-MY09/11	Biot.-HPV consensus MY09/11	P50	Multi-Biotin	gDNA (CaSki)
S33	Fall (F01-10) 1x	294p F01-F10	O2547-O2556	Atto 647N	.
S34	Fall (F01-10) 10x	294p F01-F10	O2547-O2556	Atto 647N	.
S35	dBFw294	HPV-16_294_bio_fw	O2477	dual-Biotin	.
S36	Negativkontrolle (HP)	(-) HP	.	.	.
S37	Negativkontrolle (HP+)	(-) HP + Lachssperma DNA	.	.	.
S38	BN1	BioNick Control DNA	.	(Multi-Biotin)	.
S39	BN2	BioNick HPV16 294	P8-BN	(Multi-Biotin)	gDNA (CaSki)
S40	BN3	BioNick HPV16 E6 gene	P14-BN	(Multi-Biotin)	gDNA (CaSki)
S41	BN4	BioNick p1203 pML2d	.	(Multi-Biotin)	p1203 pML2d

2.2 Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien

Tab. 7 Chemikalien und Reagenzien mit Zusatzinformationen

Chemikalien & Reagenzien	Kommentar bzw. sonstige Informationen	Art.-Nr.	Quelle
7-Aminoactinomycin D	1 mg	A1310	Invitrogen
Aceton	C ₃ H ₆ O, ≥ 99,5 %	5025.5	Carl Roth
Agar-Agar	Kobe I, pulv., für die Mikrobiologie	5210.2	Carl Roth
Agarose	NEEO ultra-quality	2267.3	Carl Roth
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	A3485,1000	AppliChem
Ampicillin	Natriumsalz, ≥97 %; finale Konzentration 100 mg/ml	K029.1	Carl Roth
Borsäure	≥ 99,8 %	6943.1	Carl Roth
Bromphenolblau	Natriumsalz, für die Elektrophorese	A3640.0025	AppliChem
BSA	Bovines Serumalbumin, IgG-frei	3737.1	Carl Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ · 2 H ₂ O, ≥ 99 %	5239.2	Carl Roth
Chlorwasserstoffsäure	HCl, ≥ 32 %	P074.1	Carl Roth
Colcemid (Demecolcin)	10 µg/ml, in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	L6221	Biochrom
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol - Dihydrochlorid,	A1001.0100	AppliChem
Dextransulfat 500 (Natriumsalz)	M = 500 000 g/mol	5956	Carl Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄ , ≥ 99 %	P030.2	Carl Roth
DMEM (Dulbecco's MEM)	3,7 g/l NaHCO ₃ , 1,0 g/l D-Glukose, ohne Glutamin, wenig Endotoxin	F 0415	Biochrom
DMSO	Dimethylsulfoxid, C ₂ H ₆ OS	A994.2	Carl Roth
dNTP Mix	jeweils 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP	331520	Biozym
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid	E7750-5G	Sigma-Aldrich
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, ≥ 99 %	8040.3	Carl Roth
Eindeckmedium (wässrig)	Fertiglösung mit DAPI/Antifadingreagenz	4268 (Kit)	Medipan
Eosin G	C.I. 45380, für die Mikroskopie	7089.1	Carl Roth
Essigsäure (Eisessig)	CH ₃ COOH, 99-100 %	7332.2	Carl Roth
Ethanol (absolut)	C ₂ H ₅ OH, ≥ 99,8 %	20821.365	VWR
Ethanol (vergällt)	≥ 99,8 %, mit ca. 1 % MEK	K928.4	Carl Roth
Fixogum	elastischer Montagekleber, für Hybridisierungsversuche	-	Marabu
Formamid	CH ₃ NO, ≥ 99,5 %	6749.1	Carl Roth
Fötales Kälberserum	FBS Superior, stabil, wenig Endotoxin	FBS.S 0615	Bio-Sell

Material und Methoden

Glycerin	≥ 99 %	3783.1	Carl Roth
Hämalaunlösung	sauer nach Mayer, Fertiglösung	T865.1	Carl Roth
Hefeextrakt	pulv., für die Bakteriologie	2363.2	Carl Roth
Humane Cot-1 DNA	500 µg	15279011	Thermo Fisher
Immersionsöl (Immersion)	$n_{index} = 1,518$ (23 °C), fluoreszenzfrei	518 F	Zeiss
Immobilisierungslösung	.	.	Medipan
Immunglobulin G	Maus IgG Isotyp	02-6502	Invitrogen
Isopropanol (2-Propanol)	C ₃ H ₇ OH, ≥ 99,8 %	6752.4	Carl Roth
Kaliumchlorid	KCl	A2939,1000	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄ , ≥ 99,5 %	A1043.1000	AppliChem
Kanadabalsam	Eindeckmedium (wasserfrei) für FFPE-Gewebe	8016,1	Carl Roth
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung	0,10%	N069.1	Carl Roth
Lachssperma-DNA	geschert, 10 mg/ml	AM9680	Thermo Fisher
L-Glutamine	200 mM, wenig endotoxin	K 0283	Biochrom
Lysozym	aus Hühnereiweiß, dialysiert, lyophilisiert, 100.000 U/mg	62970	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	A4425,1000	AppliChem
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, ≥ 99 %, für die Biochemie	4259.1	Carl Roth
Methanol	CH ₃ OH, ≥ 99,9 %	4627.6	Carl Roth
Natriumacetat	CH ₃ COONa, wasserfrei für die Molekularbiologie	A4555,1000	AppliChem
Natriumazid	≥ 99,5%	S2002-5G	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	NaCl, > 99,8 %	9265.1	Carl Roth
Natriumcitrat	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O, tri-Natriumcitrat Dihydrat, ≥ 99 %	3580.3	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O, ≥ 98 %	K300.2	Carl Roth
Natriumthiocyanat	NaSCN, ≥ 98 %	2724,1	Carl Roth
Neutravidin	intern produziert, nach Gallizia <i>et al.</i> (1998) [79]	-	Forschungsgruppe
Paraffin	52-54 °C, für die Histologie	CN49.2	Carl Roth
Paraformaldehyd	granuliert	0335.2	Carl Roth
PBS (Dulbecco, 10×)	ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , wenig Endotoxin	L 1835	Biochrom
Penicillin-Streptomycin (100×)	10 000 Units Penicillin und 10 mg Streptomycin je ml in 0,9 % NaCl (Einsatz 1 ml in 100 ml Medium)	L0022	Biowest
Pepsin	≥ 2.000 FIP-U/g	KK38	Carl Roth
Protein G/A	Pierce, 5 mg	21181, 21193	Thermo Fisher
ROTIclear	Xylolersatz für die Histologie	A538.1	Carl Roth

Material und Methoden

ROTI-Mount	Eindeckmedium für FFPE-Gewebe, $n = 1,43-1,46$ (20 °C)	HP68.1	Carl Roth
RPMI 1640	2,0 g/l NaHCO ₃ , ohne Glutamin, wenig Endotoxin	F 1215	Biochrom
SDS (Natriumdodecylsulfat)	ultra pure, ≥ 99 %	2326.2	Carl Roth
Streptavidin	intern produziert, nach Gallizia <i>et al.</i> (1998) [79]	-	Forschungsgruppe
Streptavidin	lyophilisiert, in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.5), > 17 U/mg (1 Unit bindet 1 μ g D-Biotin)	2-0203-010	IBA Life Sciences
Streptavidin-Alexa Fluor 488	1 mg	016-540-084	Dianova
Streptavidin-Alexa Fluor 594	1 mg	016-580-084	Dianova
Streptavidin-Alexa Fluor 647	1 mg	016-600-084	Dianova
Streptavidin-Atto647N	1 mg	94149	Sigma-Aldrich
Streptavidin-Cy3	1 ml	434315	Thermo Fisher
Streptavidin-Peroxidase (HRP)	Konjugat mit Meerrettichperoxidase, 1 mg	S911	Thermo Fisher
TRIS Base	C ₄ H ₁₁ NO ₃ , Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, $\geq 99,9$ %	4855.5	Sigma-Aldrich
TRIS/HCl-Puffer	1 M TRIS Base, mit HCl auf pH 7,4/ 7,6/ 8,0	-	-
Triton X-100	0,3 mM (Aliquots als 10 % Lösung; 5 ml ad 50 ml H ₂ O)	A4975.0100	AppliChem
Trypanblau	0,5 % in 0,9 % NaCl Lösung	L 6323	Biochrom
Trypsin/EDTA (10 \times)	0,5 % Trypsin/ 0,2 % EDTA (w/v) in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	L 2153	Biochrom
Trypton/Pepton	aus Casein, pankreatisch verdaut, für die Mikrobiologie	8952.2	Carl Roth
Tween 20	Polysorbat 20, nichtionisches Detergens, Dichte = 1,095 g/cm ³	9127.1	Carl Roth
Wasser (für PCR)	Nuklease-frei, autoklaviert, DEPC-behandelt	T143.3	Carl Roth
Wasser, Reinstwasser	H ₂ O, durch Reinstwasseranlage	-	ELGA
Wasserstoffperoxid (30 %)	H ₂ O ₂ , 30 %, stabilisiert	8070.2	Carl Roth
Xylencyanol FF	für die Molekularbiologie	A4976.0005	AppliChem
Xylol (Isomere)	> 98 %, rein, für die Histologie	9713.1	Carl Roth

Tab. 8 Medien, Puffer und Lösungen - Zusammensetzung und Herstellung

Medien, Puffer und Lösungen	Zusammensetzung und zusätzliche Informationen
Einfriermedium	70 % Zellkulturmedium, 20 % FBS, 10 % DMSO
7-AAD-Färbelösung	941 µl PBS (1×) + 50 µl 7-AAD-Stocklösung (1 mg/ml in H ₂ O) + 9 µl Natriumazid-Lösung (10 %)
Alkoholreihen	100, 96, 90, 85, 70, 50 % (v/v) Ethanol in H ₂ O
BSA-Lösung	Zum Blocken, x % in PBS, sterilfiltriert (siehe Text)
DAPI-Lösung	10 mg/ml DAPI in PBS
DNA-Ladepuffer (6×)	10 mM TRIS-HCl (pH 7,6), 60 % Glycerin, 60 mM EDTA, 0,03 % Bromphenolblau (Natriumsalz), 0,03% Xylencyanol
Eosin-Gebrauchslösung	75 ml Eosin-Stammlsg. + 75 ml H ₂ O + 100 µl Eisessig
Eosin-Stammlösung (1 %)	Wässrige Lösung (2,5 g in 250 ml H ₂ O)
FISH-Fixierlösung	Methanol + Eisessig (3:1), frisch und vorgekühlt auf -20 °C
HCl-Lösung (0,2 M)	826 µl 37 % HCl ad 50 ml H ₂ O
HP (FISH, Eukaryoten)	2× SSC, 50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 0,05 M Natriumphosphat, pH 7,2
HP (FISH, Prokaryoten)	0,9 M NaCl, 20 mM TRIS/HCl, 0,01 % SDS, 15% Formamid
Kaliumchlorid-Lösung	0,075 M KCl (hypotonisch), autoklaviert
LB-Agar (± Ampicillin)	LB 1×, 1,5 % Agar (w/V), ± Ampicillin (100 µg/ml final)
LB-Kulturmedium	10 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l H ₂ O, autoklaviert
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat, pH 5,2 (→ Eisessig), autoklaviert, für DNA-Präparation
Natriumazid-Lösung (10 %)	in H ₂ O (117,5 mg in 1170 µl H ₂ O)
Natriumcitrat-Puffer	10 mM Natriumcitrat, 0,05 % Tween 20, pH 6,0 (→ HCl)
Natriumthiocyanat-Lösung	1 M (4,05 g NaSCN ad 50 ml H ₂ O)
PBS (10×)	137 mM NaCl, 12 mM Phosphat, 2,7 mM KCl, pH 7,4 (→ HCl), autoklaviert
PBS-Lösung (1×)	50 ml PBS (10×) ad 500 ml H ₂ O; autoklaviert
PBS-T	0,1 % (v/v) Tween 20 in 1× PBS
PCR-Puffer (5×)	335 mM TRIS/HCl, 80 mM Ammoniumsulfat, 0,05 % Tween 20, pH 8 (→ HCl)
Pepsinlösung (10 %)	Lagerung (-20°C) in Aliquots als 10 %ige Lösung. (1 g ad 10 ml H ₂ O)
PFA-Lösung	Paraformaldehyd als 4 %ige Lösung
SSC-Puffer (20×)	3,0 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 5 (→ HCl), autoklaviert
TAE-Puffer (50×)	242 g TRIS Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, ad 1.000 ml H ₂ O (1× TAE: 40 mM TRIS-Acetat, 1 mM EDTA)
TBE-Puffer (1×)	10,8 g (89 mM) TRIS Base, 5,5 g (89 mM) Borsäure, 0,7 g (2 mM) EDTA-Na ₂ , ad 1.000 ml H ₂ O (pH 8,0)
TBS (10×)	200 mM TRIS, 1,5 M NaCl, pH 7,5 (→ HCl)

Material und Methoden

TBS-T	0,1 % (v/v) Tween 20 in 1× TBS
Trypsin/EDTA-Lösung (1×)	1 ml Trypsin/EDTA (10×) + 9 ml PBS (sterile Herstellung)
Verdauungslösung (frisch)	59 ml H ₂ O + 596 µl 1 N HCl (vorgewärmt auf 37 °C), 29,8 µl Pepsinaliquot (10 %, Zugabe kurz vor Gebrauch)
WP (FISH, Prokaryoten)	0,9 M NaCl, 20 mM TRIS/HCl, 0,01 % SDS
WP 1-3 (FISH, Eukaryoten)	2× SSC, 50 % Formamid
WP 4 (FISH, Eukaryoten)	2× SSC
WP 5 (FISH, Eukaryoten)	2× SSC, 0,1 % Tween 20
Zellkulturmedien (final)	80 % Zellkulturmedium, 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U·ml ⁻¹ Penicillin, 0,1 mg·ml ⁻¹ Streptomycin

Tab. 9 Kits und Komponenten

Kits & Komponenten	Art.-Nr.	Quelle
AKLIDES® Nuk Human Lymphocyte Complete	4162	Medipan
Alexa Fluor 488 Tyramide Reagent	B40953	Thermo Fisher
Alexa Fluor 488 Tyramide SuperBoost Kit	B40932	Thermo Fisher
Alexa Fluor 594 Tyramide SuperBoost Kit	B40935	Thermo Fisher
Alexa Fluor 647 Tyramide Reagent	B40958	Thermo Fisher
BioNick DNA Labeling System	18247015	Thermo Fisher
BioTherm DNA Polymerase (5 U/ µl)	GC-002-0250	Rapidozym
BioTherm MgCl ₂ -Lösung für PCR (50 mM)	.	Rapidozym
BioTherm PCR-Reaktionspuffer (10×, ohne Mg ²⁺)	.	Rapidozym
Biotin PCR Labeling Core Kit	PP-303L-BIO	Jena Bioscience
Endogenous Biotin-Blocking Kit	E21390	Thermo Fisher
GeneJET Gel Extraction Kit	K0691	Thermo Fisher
GeneJET PCR Purification Kit	K0702	Thermo Fisher
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	K0503	Thermo Fisher
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	56404	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	51304	Qiagen
QIAGEN Plasmid Midi Kit	12145	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	27104	Qiagen
Shandon Cytoblock Präparationssystem (Reagenzien)	7401151	Thermo Fisher
ZytoFast CISH Implementation Kit AP-NBT BCIP	T-1070-40	Zytovision
ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit	Z-2099-20	Zytovision
ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit	Z-2028-20	Zytovision

Tab. 10 Verbrauchsmaterialien

Position	Zusatzinformation	Art.-Nr.	Quelle
Deckgläser	20×20 mm	No. 1	VWR
Deckgläser	18×18, 24×24, 24×32, 24×60 mm	No. 1	Carl Roth
Einbettformen	aus Metall, 23×36 mm	TT29.1	Carl Roth
Einbettkassetten	für FFPE-Präparate	PX06.1	Carl Roth
Mikroreaktionsgefäße	500, 1500, 2000 µl	ROTILABO	Carl Roth
Mikrotiterplatten	6-Well; 96-Well (Polystyrol, flach)	7696790; 10252711	Labsolute; Greiner bio-one
Nitrozellulosemembran	Amershan Protran, 0,1 µm; 0,2 µm	10600076; 10600044	GE Healthcare
Objektträger (Glas)	76×26×1 mm	Süssefrost	Süsse
Objektträger (Glas, adhäsiv)	76×26×1 mm	HistoBond	Marienfeld
Objektträger (PMMA)	75×25 mm		PolyAn
Pasteurpipetten	3 ml, 155 mm	7691062	LABSOLUTE
Reaktionsgefäße	für PCR	19143	Brand
Reaktionsgefäße	für Mikropartikel	781320, 781340	Brand
Serologische Pipetten	5, 10, 25 ml		Greiner bio-one
Sterilfilter	PVDF, 0,45 µm; 0,22 µm	P667.1; P666.1	Carl Roth
Zellkultur-/Petrischalen	Ø 100 mm	93040	TPP
Zellkulturflaschen	25 cm ² ; 75 cm ²	83.3910.002; 90076	Sarstedt; TPP
Zentrifugenröhrchen	15, 50 ml	62.547.254	Sarstedt

2.3 Geräte, Instrumente und Zusatzinformationen

Tab. 11 Laborgeräte und Messinstrumente

Gerät	Typ/ Bezeichnung	Hersteller
3D-Drucker	Pro 2; i3 Mega	Raise3D; Anycubic
Analysenwaagen	Ailon; LE5201	Acculab; Sartorius
Autoklav	V-Serie	Systec
Chemilumineszenz-Imager	Biostep Calvin S	Biostep
Digitale Mikroskopieplattform	VideoScan-System	BTU C-S ¹
DSC-Geräte	DSC 1/700; DSC 1/500	Mettler Toledo
Einfrigercontainer	Cryo 1 C	Nalgene
Elektrophoresestromversorgung	EV265, EV231	Consort
Färbetröge (Glas)	nach Coplin, Hellendahl	Carl Roth
Gel-Dokumentationssystem	BioDocAnalyze	Biometra
Gelelektrophoresekammern	.	Biostep
Heizrührgerät	RCT calssic	IKA
Inkubatoren	C 170; Minitron	Binder; Infors HT
Kippschüttler	Duomax 1030	Heidolph
Konfokalmikroskopiesystem	LSM 800	Zeiss
Mikropipetten (Ein-/Mehrkanal)	Research (plus)	Eppendorf
Mikroskop (+ Kameratasensor)	CKX41 (+ UC30)	Olympus
Mikrotom	HM 340E	Thermo Scientific
pH-Meter	seven easy	Mettler Toledo
Photometer	BioPhotometer plus	Eppendorf
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf
Reinstwasseranalge	.	ELGA
Sicherheitswerkbank	HERA safe	Thermo Electron Corp.
Spektralfluorimeter	FluoroMax-4	Horiba
Spektralphotometer (Mikrovolumen)	Colibri	Titertek Berthold
STED-Mikroskopiesystem	Expert Line	Aberrior Instruments
Thermocycler (PCR)	Mastercycler epgradient	Eppendorf
Thermoschüttler	Thermomixer comfort & C	Eppendorf
Tischzentrifuge	minispin plus	Eppendorf
Ultraschallgerät	sonorex digital 10P	Bandelin
UV-Tisch	Transilluminator TL-312A	Spectroline
Vakuumabsaugsystem	Vacusaft comfort	Integra Biosciences
Vortexmischer	Vortex Genius	IKA
Wasserbad	TW12	Julabo
Wasserbad	K20	Haake
Zählkammer	Neubauer improved	Marienfeld
Zentrifugen	Centrifuge 5810 & 5804 R	Eppendorf

¹ Rödiger *et al.* (2013) [80]

2.3.1 3D-Drucksysteme und Polymere

Merkmale der eingesetzten FDM-3D-Drucker

Zur Erstellung von 3D-Drucken wurden zwei handelsübliche FDM-3D-Drucker mit unterschiedlichen Designs aus verschiedenen Preissegmenten verwendet.

Das Hauptgerät war ein Raise3D Pro2 Doppeldüsendrucker mit 0,4-mm-Düse, einem Direktzuführsystem für 1,75-mm-Filamente und einem vollständig geschlossenen Bauraum ($305 \times 305 \times 300 \text{ mm}^3$) mit Heizbett. Dieser Drucker wurde wegen seiner Fähigkeit unterschiedliche Materialien bei hohen Temperaturen (bis $300 \text{ }^\circ\text{C}$) zu drucken und seiner hohen Genauigkeit ausgewählt (Positionierungsauflösung von $0,78125 \text{ }\mu\text{m}$ auf X/Y-Achse, minimale Schichtdicke von $10 \text{ }\mu\text{m}$).

Für den Vergleich von Drucken in niedrigerer Druckauflösung wurde der kostengünstige 3D-Drucker Anycubic i3 Mega verwendet (Positionierungsauflösung X/Y: $12,5 \text{ }\mu\text{m}$, minimale Schichtdicke: $50 \text{ }\mu\text{m}$). Dieser verfügte über eine offene und zugängliche Bauform ($210 \times 210 \times 205 \text{ mm}^3$), eine beheizbare, bewegliche Bauplatte und einen einfachen Bowdenextruder (0,4-mm-Düse, max. Temperatur: $260 \text{ }^\circ\text{C}$).

Kunststoffmaterialien für die Verwendung im 3D-Druck

Die in Tab. 12 aufgeführten kommerziellen Polymere wurden zum 3D-Druck unterschiedlicher CAD-Modelle eingesetzt und wurden durch Untersuchung spezifischer Materialeigenschaften näher charakterisiert (siehe dazu Abschnitt 2.11 und 3.4).

Tab. 12 Polymere für den 3D-Druck

#	Material	Farbe	Hersteller	Art.-Nr.
A	PLA	Weiß	Raise3D	.
B	PLA	Mattweiß	Das Filament	F10376
C	PLA	Mattschwarz	Das Filament	F10390
D	PLA	Schwarz	Das Filament	F10104
E	PLA	Farblos	Das Filament	S10108
F	TPU	Farblos	Das Filament	S10449
G	PETG	Farblos	Das Filament	S10160
H	ABS	Schwarz	Tronxy	.
I	PLA	Schwarz	Elegoo	.
J	PLA	Weiß	Janbex	.
K	PLA	Transparent	Sienoc	.
L	PLA	Fluo-orange	Surreal	.
M	PETG	Orange	Sunlu	.
N	TPU	Grün	Enotepad 3D	.
.	PMMA	Glasklar	Material4Print	SW10057.2

2.3.2 Mikroskopische Bildgebungssysteme

Zur Abbildung und Analyse mikroskopischer Strukturen wurden verschiedene Mikroskopie-Systeme eingesetzt:

Die digitale Fluoreszenz-Bildgebungsplattform VideoScan wurde zur automatischen Analyse großer Probenmengen, insbesondere von Mikropartikeln, im 96-Well-Format eingesetzt. Dieses System basiert auf der automatischen Erfassung und Analyse von zweidimensionalen Fluoreszenzbildern unter Verwendung von Algorithmen der digitalen Bildverarbeitung. Es ist in der Lage, das Fluoreszenzsignal einzelner Mikropartikel und gebundener Liganden quantitativ zu detektieren und kann in Kombination mit Standardtechnologien wie Multiplex-PCRs und direkten Hybridisierungsassays eingesetzt werden [80].

Hochauflösende konfokale Laserscanning-Aufnahmen wurden auf einem invertierten Zeiss LSM 800 System mit einem Axio Observer.Z1/7-Mikroskop durchgeführt.

In Kombination mit diesem Gerät kamen folgende Objektive (Zeiss) zum Einsatz:

- EC Plan-Apochromat 10×/0,30 M27
- Plan-Apochromat 20×/0,8 M27
- Plan-Apochromat 40×/0,95 Korr M27
- Plan-Apochromat 100×/1,4 Oil DIC M27

Die Bilder wurden unter Anregung von 4 Lasern der Wellenlängen 405, 488, 561 und 640 nm aufgenommen. Die Lochblende und Laserleistung wurden abhängig von Farbstoff, der Probe und der gewünschten optischen Schichtdicke variiert und sind, falls nötig, entsprechend gekennzeichnet. Die Detektorverstärkung wurde standardmäßig auf 650 V gesetzt.

Zusätzlich wurden super-hochauflösende Mikroskopieaufnahmen mit einem Abberior Instruments STED-Mikroskop (Expert Line) erstellt (STED = *stimulated emission depletion*). Um die normale lichtmikroskopische Auflösungsgrenze zu umgehen, nutzt dieses System neben der konfokalen Laserscanning-Technik zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen eine zusätzliche, nachträgliche Laserbeleuchtung zur Abregung der Fluoreszenz außerhalb des Fokuspunktes [81]. Das eingesetzte Mikroskop war dazu mit Anregungslasern der Wellenlängen 561 und 640 nm in Kombination mit einem darauf abgestimmten gepulsten 775-nm-STED-Laser ausgestattet und ermöglichte eine Auflösung von weniger als 30 nm.

Insbesondere das letzte System wurde für hochauflösende Aufnahmen und optische Schnitte für spätere 3D-Rekonstruktionen u. a. von beschichteten Mikropartikeln eingesetzt.

2.3.3 Software

Die folgenden Applikationen wurden zur Datenaufbereitung und Anfertigung dieser Arbeit eingesetzt:

- Bildaufnahme, -verarbeitung und -analyse:
VideoScan (CamMicControl v0.68.10.5), Zeiss ZEN blue 2.3, Abberior Inspector (v0.13.12637), ImageJ (1.52p)/ FIJI
- Statistische Analysen, Berechnungen und Datenvisualisierungen:
R (v3.5.1)/ R Studio (v1.1.456), Snappene
- Aufarbeitung der Ergebnisse, Erstellung von Abbildungen und schriftliches Verfassen:
Inkscape, GIMP, Microsoft Word, Excel und PowerPoint
- Verwendete Plugins für ImageJ:
Bio-Formate (Offene Mikroskopieumgebung, 2016), Z-Projekt (integriert in der verwendeten ImageJ-Version)

Die wichtigsten R- sowie ImageJ-Makro-Skripte, die für die verschiedenen Analysen verwendet wurden, sind in der digitalen Version dieser Arbeit als Anhang beigefügt.

2.4 Zell- und Gewebekultur

2.4.1 Kultivierung und Charakterisierung von humanen Zellen

Zur Evaluierung von FISH-Sonden in *in-vitro*-Versuchen wurden vier HPV-positive Zelllinien (HPV16⁺: CaSki, SiHa; HPV18⁺: HeLa, HEp-2) sowie zwei HPV-negative Zelllinien (HPV⁻: HEK293, H3122) als Kontrolle im Zelllabor etabliert und fortwährend kultiviert (Tab. 13). Alle genannten Zelllinien sind adhärent und wurden standardmäßig in serumhaltigem Medium (DMEM: CaSki, SiHa, HEp-2, HEK293; RPMI-1640: HeLa, H3122) in 25 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert (genaue Zusammensetzung siehe Tab. 8). Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchter Umgebung. Die Zellen wurden je nach Konfluenz (ca. 80-90 %) routinemäßig 1- bis 2-mal die Woche passagiert. Dazu wurde der Zellrasen einmal mit sterilem PBS (10 ml) gewaschen und im Anschluss durch Behandlung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (1 ml) enzymatisch abgelöst. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch

Zugabe von Medium (9 ml), wurde die Zellsuspension für 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in einem entsprechenden Volumen frischen, vorgewärmten Mediums aufgenommen. Die Zellen wurden regulär zur Weiterkultur im Verhältnis 1/5 bis 1/40 oder für spezifische Versuche nach Zählung in der Zählkammer verdünnt und mit einer bestimmten Zellzahl ausgesät.

Für eine Langzeitlagerung wurden die Zelllinien in Einfriermedium aufgenommen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml), als 1-ml-Aliquots in 2-ml-Kryoröhrchen überführt und in einen Flüssigstickstoff-Kryocontainer gegeben. Dort wurden sie, zur Vermeidung potenziellen Kreuzkontaminationen, in der Gasphase des Stickstoffs gelagert und bei Gebrauch frisch aufgetaut. Der Einfrier- sowie Auftauprozess wurde nach Standardmethoden durchgeführt (siehe [82]).

Die Morphologie und Wachstumsgeschwindigkeit (Wachstumskurve, Daten nicht dargestellt) der Zelllinien entsprach den in der Literatur aufgeführten Beschreibungen.

Tab. 13 Kultivierte Zelllinien

Zelllinie	Herkunft/Beschreibung	Referenz
CaSki	Humane Zervixkarzinomzelllinie, abgeleitet von einem metastatischen Bereich des Dünndarms; positiv für HPV-16, ca. 600 Kopien im Genom integriert	ATCC® CRL-1550
H3122	Adenokarzinom der Lunge (human), bekannte Variation: EML4-ALK-Genfusion, HPV-negativ	NCI-H3122 (CVCL_5160)
HEK293	Menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonal kidney), HPV-negativ	ATCC® CRL-1573
HeLa	Humane Zervixkarzinomzelllinie; positiv für HPV-18 (ca. 50 Kopien)	ATCC® CCL-2
HEp-2	Humane Karzinomzelllinie; HeLa-kontaminiert → HPV-18-spezifische Sequenzabschnitte nachweisbar	ATCC® CCL-23
SiHa	Humane Zervixkarzinomzelllinie; positiv für HPV-16, ca. 1-2 Kopien im Genom integriert	ATCC® HTB-35

2.4.2 Probenpräparation

Zellkulturpräparate für die FISH-Analyse

Zur Herstellung von Zellkulturpräparaten für die FISH-Analyse wurden sogenannte Zellausstriche angefertigt. Dafür wurden die entsprechenden Zelllinien routinemäßig kultiviert und bei einer Konfluenz von 80-90 % enzymatisch geerntet. Nach einmaligem Waschen in PBS-Lösung wurden die Zellen in Zentrifugenröhrchen 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank) wurden gereinigte Glasobjektträger positioniert. Das übriggebliebene Pellet wurde in 200 µl (abhängig von der Ausgangszellmenge) PBS

aufgenommen und nach gutem Durchmischen in Tropfen à 10 µl auf jeden Objektträger pipettiert. Mit einem sterilen Deckglas wurde der Tropfen in einem Zug über die ganze Fläche verteilt. Das Glas wurde dabei wie bei einem Blutausschlag angewinkelt gehalten, um die Zellen nicht zu schädigen. Die Objektträger wurden anschließend sofort in frische, vorgekühlte FISH-Fixierlösung gestellt (Methanol/Eisessig, 3:1) und bei -20 °C für ca. 20 min inkubiert (abhängig von der Zelllinie). Die Objektträger wurden zuletzt an der Luft (RT) getrocknet und für eine weitere Verwendung bei 4 °C gelagert.

Metaphasenpräparationen

Das Verfahren zur Herstellung von Metaphasenpräparaten aus adhären Zellen basiert auf Ried (2006) [83] und wurde entsprechend der genutzten Zelllinien adaptiert.

Die Zellen wurden zunächst standardmäßig in 75 cm²-Zellkulturflaschen gehalten. Einen Tag vor Beginn der Präparation wurden sie passagiert und so ausgesät, dass sie am Folgetag zu 60-80 % konfluent waren. Um die Zellteilungen während der Metaphase zu stoppen, wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium mit einer Endkonzentration Colcemid von 0,1 g·ml⁻¹ (100 µl Colcemid in 10 ml Kulturmedium) ersetzt. Abhängig von der mitotischen Aktivität der zu analysierenden Zellen wurde die Kultur bei 37 °C für 12-24 h inkubiert. Zur Ernte der mitotischen Zellen wurde das Medium entnommen und in ein konisches Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Der Zellrasen wurde für 5 min mit 10 ml PBS gewaschen und die Lösung im Anschluss in dem Röhrchen mit dem zuvor entnommenen Medium gesammelt. Zum Ablösen der noch anhaftenden Zellen wurde eine standardmäßige Trypsin/EDTA-Behandlung (1 ml) durchgeführt und die Zellsuspension nach dem Abstoppen der Reaktion mit 5 ml Medium in das Sammelröhrchen überführt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 200 × g wurde der Überstand verworfen, dabei aber 0,5 ml Medium im Röhrchen belassen, das zum vorsichtigen Resuspendieren diente. Nachfolgend wurden ebenfalls vorsichtig 2 ml vorgewärmte KCl-Lösung (37 °C, 0,075 M) unter sanftem Schütteln tropfenweise hinzugefügt. Danach folgte die Zugabe von weiteren 40-45 ml der hypotonischen KCl-Lösung (abhängig von der Größe des Zellpellets). Nach gutem Mischen wurde die Zellsuspension für 17 min (für CaSki) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert (die genaue Zeit variiert je nach Zelllinie zwischen 15-25 min). Die Reaktion wurde darauf durch Zugabe von 4-5 Tropfen frisch zubereiteten Fixiermittels (Methanol/Eisessig, 3:1, v/v) gestoppt und die Suspension für 5 min bei

300 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 0,5 ml verworfen und das Pellet im verbliebenen Volumen resuspendiert. Tropfenweise wurden erneut 5 ml Fixierlösung langsam an der Innenwand des Röhrchens und unter leichtem Schütteln hinzugegeben. Durch vorsichtiges Anschnipsen des Röhrchens wurde das Pellet schließlich gelöst und die Suspension in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen. Die Lösung wurde erneut für 5 min bei 300 × g zentrifugiert und der gesamte letzte Schritt zwei weitere Male wiederholt. Vor der Herstellung der Präparate wurde das Fixiermittel ein weiteres Mal gewechselt und das Volumen entsprechend der Zellmenge gewählt. Zum Auftragen der Metaphasenzellkerne wurden gereinigte Glasobjektträger auf eine Heizplatte (ca. 50 °C) in feuchter Umgebung positioniert. Mittels Pasteurpipette wurde die Suspension schließlich tropfenweise, bei einer Entfernung von ca. 20 cm auf die Glasflächen getropft (4-8 Tropfen je Objektträger). Die fertigen Metaphasenpräparate wurden an der Luft getrocknet und für eine spätere Verwendung bei 4 °C gelagert.

Herstellung von Gewebemodellen

In der routinemäßigen pathologischen Praxis wird Biopsiematerial, beispielsweise aus soliden Tumoren, zu einem großen Teil als Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE) präpariert und charakterisiert. Dies führt insbesondere bei Untersuchungen mittels FISH zu einer starken Abweichung im Vorgehen und je nach Gewebetyp auch zu einigen Problemen. Um trotz der Unterschiede der biologischen Proben eine Art Standard zum Vergleich zur Verfügung zu haben, wurden ähnlich behandelte Gewebemodelle aus Zellkulturen präpariert. Dabei wurden dieselben Zelllinien verwendet, die auch in einzelnen Schichten (Monolayer) in Flaschen kultiviert wurden. Um eine dreidimensionale Anordnung der Zellen zu erreichen, ohne eine längerfristige 3D-Kultur, wurden die Zellen als Pellet in einem speziellen Zweikomponentenmedium eingebettet (Shandon Cytoblock Präparationssystem).

Zur Vorbereitung wurden die Zellen in mehreren Zellkulturflaschen (75 oder 150 cm²) unter Standardbedingungen kultiviert, bis eine Konfluenz von 80-90 % erreicht wurde. Die Zellen wurden regulär durch enzymatische Behandlung geerntet, mit PBS (4 °C) gewaschen, vereinzelt und quantifiziert. Ein entsprechendes Volumen (je nach Zelllinie mit 20-40 · 10⁶ Zellen) wurde in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 500 × g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 4 %iger, phosphatgepufferter Formalinlösung versetzt und für mindestens 12 h bei 4 °C inkubiert. Die fixierten Proben wurden dann 10 min bei

800 × g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit 10 ml Reinstwasser gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zwei weitere Male wiederholt und das Wasser schließlich entfernt. Das übriggebliebene Pellet wurde nun mit drei Tropfen des Cytoblock Reagenz #2 versetzt und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem Reagenz #1 (sechs Tropfen) überführt. Kurz darauf bildete sich um das Pellet herum eine feste Pseudomatrix und das gesamte Konstrukt konnte in eine Einbettkassette zur folgenden Paraffinierung überführt werden.

Die Paraffinierung von Formalin-fixierten (Pseudo-) Geweben wurde durch Inkubieren in folgenden Lösungen erreicht, wobei das enthaltene Gewebewasser sukzessive über eine aufsteigende Alkoholreihe sowie Xylol bzw. Xylol-Paraffin-Gemische, durch Paraffin ersetzt wurde:

- 24 h in 50 % Ethanol (4 °C) → 24 h in 70 % Ethanol (4 °C) →
- 12-16 h in 85 % Ethanol (4 °C) → 12-16 h in 96 % Ethanol (4 °C) →
- 12-16 h in 100 % Isopropanol (4 °C) → 12 h in Xylol (RT) →
- 24 h in Xylol-Paraffin (1:1; 60 °C) → 6 h + ca. 12 h in flüssigem Paraffin (60 °C)

Im Anschluss erfolgte das Einbetten der Proben in flüssiges Paraffin mit Hilfe von metallischen Einbettformen (23 × 36 mm).

2.4.3 Umgang mit FFPE-Geweben

Neben den selbst-präparierten Pseudo-FFPE-Geweben wurde mit dieser Arbeit auch anonymisiertes Patientenmaterial zu Testzwecken genutzt. Die Proben wurden als bereits diagnostizierte FFPE-Blöcke durch das Carl-Thiem-Klinikum Cottbus (CTK) zur Verfügung gestellt (Tab. 14).

Tab. 14 HPV-positive und -negative FFPE-Gewebeproben

Nummer	HPV-Vortest	Charge	Quelle
11	(-)		
12	HPV16 ⁺		
13	HPV16 ⁺ , 33 ⁺		
14	HPV33 ⁺		
15	(-)		
16	HPV16 ⁺		
17	HPV16 ⁺		
18	HPV16 ⁺ , 58 ⁺	HPV 02.2017	Carl-Thiem-Klinikum Cottbus (CTK)
19	HPV33 ⁺		
20	HPV33 ⁺		
21	HPV18 ⁺		
22	(-)		
23	HPV16 ⁺ , 58 ⁺		
24	HPV33 ⁺		

Mikrotomschnitte von FFPE-Geweben

Von den FFPE-Gewebeblöcken wurden mit einem elektronischen Rotationsmikrotom (Thermo Fisher) Gewebeschnitte angefertigt. Zu Testzwecken wurden verschiedene Schnittthicken untersucht, wobei sich 3 µm in den meisten Fällen als optimal erwiesen hatte. Die Schnitte wurden schließlich in einem Streckungsbad bei 38 °C auf adhäsive Objektträger für die Histologie (HistoBond) aufgebracht, getrocknet und für die weitere Verwendung bei RT gelagert.

Deparaffinierung und Vorbereitung von FFPE-Probenmaterial

Abhängig von den folgenden Untersuchungen wurden die FFPE-Proben unterschiedlich behandelt.

Für nachfolgende histologische Färbungen im wässrigen Milieu wurden die Proben in umgekehrter Weise zur Paraffinierung behandelt, also Austausch des Paraffins mit Wasser, durch Inkubationen in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (bei RT):

2× 10 min in Xylol → 2× 10 min in 100 % Ethanol → je 5 min in 90 %, 70 % und 50 % Ethanol → 10 min in H₂O → weiter mit Färbung (siehe unten)

Für die FISH-Analytik waren zusätzliche Aufarbeitungsschritte nötig, um die fixierten Strukturen und Zielmoleküle für eine qualitativ hochwertige Detektion freizulegen. Bei dickeren Schnitten (5 µm und mehr) hatte es sich bewährt, die Objektträger zunächst aufrecht ca. 30 min bei 60 °C zu inkubieren, um überschüssiges Paraffin ablaufen zu lassen. Als nächstes folgte, wie oben beschrieben, eine Inkubation in Xylol und Ethanol (2× 10 min Xylol → 2× 10 min 100 % Ethanol) und ein anschließendes Trocknen an der Luft. Als nächstes wurden die Proben unter Hitze in speziellen Puffern behandelt. Dabei waren nach Art und Zustand des Gewebes zwei unterschiedliche Ansätze möglich und auszutesten. Die Objektträger wurden dazu 30 min entweder in 1 molarer Natriumthiocyanat-Lösung bei 80 °C oder in Natriumcitrat-Puffer bei 100 °C inkubiert. Bei den Pseudo-Geweben (nicht physiologisch verbundene Zellen) zeigte sich der Natriumcitrat-Puffer als besser geeignet, da hier kaum Zellen bzw. Gewebestücke verloren gingen. Für die meisten echten Gewebeproben schien die Natriumthiocyanat-Lösung qualitativ ein leicht besseres Ergebnis zu erzielen, wobei dieses auch stark vom Zustand der Proben abhängig war. Zu Vergleichszwecken wurde daher die Durchführung mittels Natriumcitrat-Puffer gewählt.

Anschließend erfolgte eine fünfminütige Inkubation in Wasser, gefolgt von zwei Waschschritten in 2× SCC-Puffer (jeweils 10 min, RT). Ein weiterer wichtiger Schritt

war der folgende Aufschluss mittels Pepsin (nicht für Pseudo-Gewebe). Dazu wurden die Objektträger für 5-20 min in frischer, vorgewärmter Verdauungslösung (37 °C) inkubiert, abhängig von Gewebetyp und Schnittstärke. Die Reaktion wurde durch kurzes Eintauchen in Reinstwasser unterbrochen und die Proben zweimal in 2× SCC-Puffer gewaschen (jeweils 5 min, RT). Zuletzt konnte direkt mit der Dehydratisierung für die FISH-Analytik fortgesetzt werden (siehe unten Abschnitt 2.7.2).

Histologische Färbungen

Zur Übersichtsfärbung von Gewebeschnitten wurden standardmäßig Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) angefertigt. Die vorbereiteten und rehydratisierten Schnitte wurden dafür zunächst für 10 min in Hämalaulösung inkubiert und danach für ca. 8 min in warmem Wasser gewaschen (in Färbebehältern mit mehreren Wasserwechseln). Nach einer einminütigen Inkubation in Eosin (Gebrauchslösung) wurde für ca. 30 s vorsichtig unter Leitungswasser gespült und im Anschluss 5 min in 70 % Ethanol gewaschen. Zuletzt wurden die Proben wieder durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydratisiert:

Je 5 min in 70 %, 90 % und 100 % Ethanol → 5 min in Xylol → Lufttrocknen

Schließlich wurden die Proben mit entsprechenden Deckgläsern unter Verwendung von Kanadabalsam eingedeckt und über Nacht getrocknet.

2.5 Kultivierung von Mikroorganismen

In diesem Abschnitt ist zunächst nur die Kultivierung von Bakterien zur Plasmid-anreicherung aufgeführt. Zudem wurden im Zusammenhang mit dieser Arbeit Bakterien für FISH- und Biofilmuntersuchungen auf Polymeroberflächen kultiviert, deren Details in den Kapiteln 2.11.4 und 2.11.5 näher beschrieben sind. Tab. 15 listet im Folgenden die verwendeten Mikroorganismen und Stämme auf.

Tab. 15 Kultivierte Mikroorganismen

Mikroorganismus	Herkunft/Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i>	DH5alpha mit p1203 pML2d HPV-16	Addgene (Plasmid #10869)
<i>Escherichia coli</i>	MG1655 F ['] tet Stamm 6101	[46]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Stämme 6095, 6096	[46]

2.5.1 Anreicherung, Aufreinigung und Überprüfung eines Plasmids

Für die Entwicklung von HPV-spezifischen Sonden wurde das Plasmid p1203 pML2d HPV-16 (Addgene, #10869) erworben, das große Teile des Genoms des humanen Papillomvirus Typ 16 trägt. Abb. 6 zeigt eine Plasmidkarte mit den wichtigsten Genregionen sowie ausgewählten Primern.

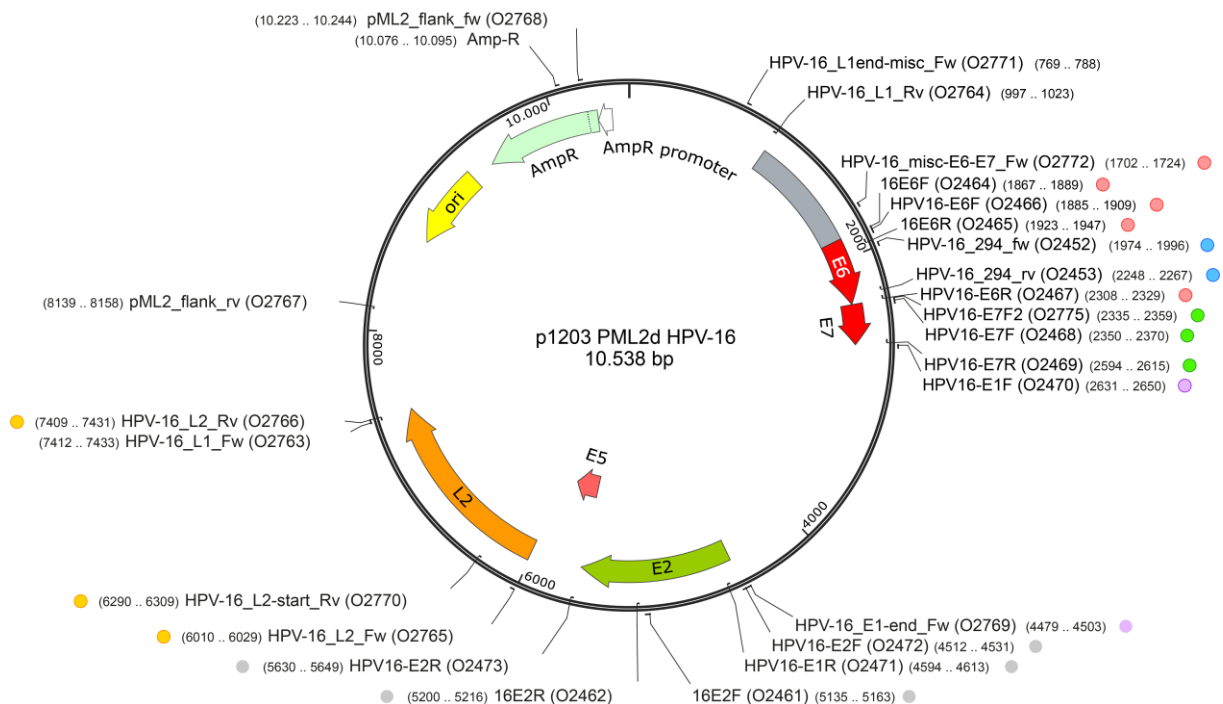


Abb. 6 Plasmidkarte pML2d. Gezeigt ist das zirkuläre Plasmid p1203 pML2d HPV-16. Es trägt Teile des HPV-16-Genoms (u. a. die Onkogene E6 und E7). Weiterhin eingezeichnet sind der Replikationsursprung (ori) sowie die Ampicillin-Resistenzkassette Amp^R. Zusätzlich sind einige der eingesetzten Primer und deren Lage, relativ zur Plasmidsequenz dargestellt.

Das Plasmid lag zunächst im Standardformat als high-copy-Plasmid mit Ampicillinresistenzgenen in *Escherichia coli* DH5alpha in Agar vor. Zur Anreicherung und Aufreinigung wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit verwendet. Dazu wurden Übernackturen in LB-Medium mit Ampicillin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bei 37°C unter Schütteln vorbereitet und anschließend nach Herstellervorgaben vorgegangen. In Kurzform wurden die Bakterien lysiert, überschüssige Zellbestandteile entfernt und die DNA über Säulen und verschiedene Puffer sukzessive aufgereinigt und schließlich in PCR-Wasser eluiert. Das Plasmid wurde anschließend durch Sequenzierung (extern durch LGC Ltd.) mittels spezifischer Primer sowie Restriktionsverdau überprüft und bestätigt (Daten sind nicht gezeigt). Die zur Sequenzüberprüfung genutzten Primer waren: O2467, O2470, O2471, O2473, O2764, O2765, O2767, O2768, O2769, O2770, O2771, O2772, O2775 (Tab. 4).

2.6 Polymerasekettenreaktion und Sondenpräparation

2.6.1 Amplifikationsreaktionen

In dieser Arbeit wurden zahlreiche Sonden zur Detektion von HPV-spezifischen DNA-Sequenzen entwickelt und evaluiert. Grundlage dafür bildete das HPV-Genom (Abb. 2), wobei vor allem auf die Detektionsmöglichkeit der Onkogenregionen E6 und E7 Wert gelegt wurde. Zur Herstellung der verschiedenen Sonden und Sondenfragmente wurde ausschließlich die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt.

Unter Verwendung neu designter, spezifischer Primer (neben bereits veröffentlichten Varianten in Tab. 4 aufgelistet) wurden damit verschieden lange Sequenzabschnitte aus unterschiedlichen Regionen des HPV-Genoms amplifiziert. Unter Verwendung verschiedener Primerkombinationen entstanden so verschiedene Amplikons, die mit ihren jeweiligen Primerpaaren und Modifikationen in Tab. 5 aufgelistet sind. Als Vorlage (Template) für diese Reaktionen dienten sowohl aufgereinigte genomische DNA (gDNA) aus HPV-positiven Zelllinien (CaSki, SiHa, HeLa), als auch ein HPV-Gene-tragendes Plasmid (0). Für die Gewinnung der gDNA wurden die Zelllinien routinemäßig kultiviert und bei Bedarf enzymatisch geerntet. Die Aufschließung der Zellen und die Aufreinigung der DNA erfolgten schließlich nach Herstelleranweisungen mittels QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen).

Die PCR-Produkte dienten ihrerseits als Template für die Herstellung Biotin-markierter Sondenäquivalente. Um dies zu erreichen, wurden zunächst zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde versucht, Sonden durch eine Nicktranslationsreaktion nach dem BioNick-DNA-Labeling-System (Thermo Fisher) mit Biotinmolekülen zu versehen. Zum anderen wurde eine direkte Inkorporation von Biotin-konjugierten Nukleotiden während der PCR angewendet, was im vorliegenden Fall die effektivere Variante war. Hierzu wurde ein Biotin-PCR-Labeling-Core-Kit (Jena Bioscience) genutzt, mit dem während der Amplifikation teilweise dTTP durch Biotin-markiertes dUTP ersetzt wurde. In der folgenden Tab. 16 sind die Zusammensetzungen der PCR-Mixe sowohl für die Standardamplifikationen mittels BioTherm-Polymerase (Rapidozym), als auch für die Biotinylierungsreaktionen mittels Kit-Komponenten (Jena Bioscience) dargelegt. Die Angaben beziehen sich dabei jeweils auf die Durchführung einer einzelnen 50 µl Reaktion.

Tab. 16 Zusammensetzung der PCRs

Standardamplifikation (Rapidozym)				Biotinylierungsreaktion (Jena Bioscience)			
Komponente	<i>C_{stock}</i>	<i>C_{final}</i>	V [μ l]	Komponente	<i>C_{stock}</i>	<i>C_{final}</i>	V [μ l]
H ₂ O			39,1	H ₂ O			32,75
Puffer	10×	1×	5	Puffer	10×	1×	5
MgCl ₂ -Lsg.	50 mM	1,5 mM	1,5	Label-Mix			5
dNTPs	10 mM	200 μ M	1	Fw primer	10 μ M	0,5 μ M	2,5
Fw primer	10 μ M	0,2 μ M	1	Rv primer	10 μ M	0,5 μ M	2,5
Rv primer	10 μ M	0,2 μ M	1	Polymerase		0,02 U/ μ l	1,25
Polymerase			0,4	Template			1
Template			1				

Bei der Herstellung größerer Sondenmengen wurden die Biotinylierungsreaktionen in bis zu acht parallelen Ansätzen durchgeführt. Dazu wurden vorher entsprechend große Mastermixe angesetzt und die Proben nach den Reaktionen zur weiteren Überprüfung und Aufarbeitung gepoolt.

Der PCR-Prozess lief dabei standardmäßig (mit oder ohne Biotinylierung) nach folgendem Schema in PCR-Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (Eppendorf) ab:

- | | | | |
|----|-------------------------|-------|----------|
| 1. | Initiale Denaturierung: | 95 °C | 2 min |
| 2. | Denaturierung: | 95 °C | 30 s |
| 3. | Primerhybridisierung: | 56 °C | 30 s |
| 4. | Elongation: | 56 °C | 30 s |
| 5. | Finale Extension: | 72 °C | 10 min |
| 6. | Stopp und Kühlung: | 4 °C | ∞ |

Die entscheidenden Amplifikationsschritte 2.-4. wurden routinemäßig in 30 Zyklen gefahren. Zusätzlich wurden primerspezifisch folgende Abwandlungen gewählt:

- Unterschiedliche Primer-Hybridisierungstemperaturen für PCRs mit folgenden Bezeichnungen (siehe Tab. 5): 294 (54 °C), E6 (60 °C), β -Globin & MY09/11 (45 °C)
- P46-50: 35 Zyklen
- P43-P46: 35 Zyklen ohne Schritt 3 und 5, Denaturierung für 15 s bei 92 °C und Elongation für 4 min bei 62 °C

Nach den PCRs wurden die Proben mit einem GeneJET-PCR-Purification-Kit (Thermo Fisher) nach Herstellervorgaben mit verschiedenen Puffern über Trennsäulen von den restlichen Reaktionskomponenten getrennt, gereinigt und in entsprechenden Volumina PCR-Wassers eluiert.

Eine Überprüfung der Sonden erfolgte in diesem Stadium zum einen rein größenspezifisch mittels Agarose-Gelelektrophorese (je nach Fragment in 0,5-3 % Agarose in TAE- oder TBE-Puffer) und weiterhin funktional durch mikropartikelbasierte Untersuchungen (siehe dazu Abschnitt 2.8).

2.6.2 DNA-Präzipitation und finale Sondenherstellung

Zur Herstellung der finalen, gebrauchsfertigen Sondenmischungen für *in-situ*-Hybridisierungsversuche wurden die aufgereinigten Oligonukleotide bzw. Amplifikationsprodukte entsprechend Tab. 6 zusammengestellt. Dazu wurde deren Konzentration photometrisch (Colibri, Titertek Berthold) bestimmt und 1 µg je Sondenkomponente in ein neues, steriles Mikroreaktionsgefäß gegeben. Die finale Konzentration jeder Sondenkomponente entsprach demnach 5 ng·µl⁻¹ (Ausnahme Sonde S2 und S4, hier wurde zu Vergleichszwecken die 10-fache Menge eingesetzt). Weiterhin wurden dem Sondengemisch jeweils 40 µg Lachssperma-DNA sowie 10 µg humane Cot-1 DNA als Zusatz beigefügt

Im Anschluss wurde eine zweimalige Präzipitation der enthaltenen DNA nach folgendem Prinzip durchgeführt:

Entsprechend dem Ausgangsvolumen wurden der Lösung 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat (NaAc) und das doppelte Volumen an eiskaltem, absolutem Ethanol (EtOH) hinzugefügt (Bsp.: bei $V = 100 \mu\text{l}$ → 10 µl NaAc, 200 µl EtOH). Die Lösung wurde danach sofort für mindestens 30 min bei -80 °C inkubiert und anschließend in einer vorgekühlten (4 °C) Zentrifuge 20 min bei 17.000 × *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, die Probe für eine weitere Präzipitation zunächst in 50 µl PCR-Wasser aufgenommen und erneut wie beschrieben vorgegangen.

Nach der zweiten Wiederholung dieses Prozesses wurde die präzipitierte DNA bei Bedarf unter sterilen Bedingungen kurz getrocknet, um möglichst keinen Ethanol in die Probe zu verschleppen. Das allerdings nicht völlig trockene Pellet wurde darauf in 200 µl Hybridisierungspuffer (HP: 2× SSC, 50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 0,05 M Natriumphosphat, pH 7,2) aufgenommen und als gebrauchsfertige Sondenmischung bei 4 °C gelagert.

2.7 *In-situ*-Hybridisierung

2.7.1 Allgemeine Betrachtung und Vorgehen

In dieser Arbeit wurden spezifische DNA-Sonden genutzt, um DNA- oder rRNA-Sequenzen in humanen Tumorzelllinien, Geweben und Bakterien nachzuweisen. Das entsprechende Vorgehen unterschied sich dabei erheblich zwischen den eu- und prokaryotischen Organismen sowie zwischen dem Nachweis doppelsträngiger DNA und einzelsträngiger aber strukturell komplexer vorliegender rRNA.

Der FISH-Nachweis bakterieller 16S rRNA wurde in dieser Arbeit ausschließlich im Zusammenhang mit der Untersuchung von Polymermaterialien eingesetzt. Das entsprechende methodische Vorgehen ist daher im Kapitel „FISH zur Detektion bakterieller 16S rRNA auf 3D-Druckobjekten“ (2.11.4) näher erläutert.

Im Folgenden liegt der Fokus auf der *in-situ*-Hybridisierung zur Detektion von DNA-Sequenzen in eukaryotischen Zellen.

2.7.2 FISH-Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen in humanen Zelllinien

Zur Untersuchung von eukaryotischen Zellen auf spezifische DNA-Sequenzen wurden verschiedene kommerzielle und selbst hergestellte DNA-Sonden eingesetzt. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene FISH-Protokolle getestet und optimiert. Folgendes Vorgehen wurde schließlich etabliert und standardmäßig für alle FISH-Analysen (eukaryotisch) angewandt.

Die zu untersuchenden Proben wurden dazu, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, fixiert und vorbehandelt, so dass sie als methodisch-zugängliche Zellen auf Objektträgern vorlagen. Im ersten Schritt wurden die Zellproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur dehydratisiert (70 %, 90 %, 100 % Ethanol, jeweils 5 min) und im Anschluss an der Luft komplett getrocknet. Als nächstes folgte die Applikation der Sonden, die bereits 5 min bei 37 °C vorgewärmt wurden. Je nach Deckglasgröße wurden je 5-10 µl der Sonde auf eine vorher festgelegte Stelle pipettiert und diese mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Zur Versiegelung der Ränder wurde eine Schicht flexibler Klebstoff (Marabu Fixogum) aufgetragen. Für alle eingesetzten Proben folgte anschließend auf gleiche Weise die Denaturierung der Proben- und Sonden-DNA für 5 min bei 76 °C (beheizbarer Hybridisierungsaufsatz im Thermomixer, Eppendorf). Daraufhin wurden die aufgeheizten Objektträger sofort in

eine vorgewärmte, feuchte Kammer überführt und zur Hybridisierung für mindestens 24 h bei 37 °C inkubiert.

Zur weiteren Bearbeitung und Entfernung ungebundenen Sondenmaterials wurden die Proben einzeln vorsichtig von Kleber und Deckglas befreit und nacheinander in fünf verschiedene, auf 46 °C vorgeheizte Waschpuffer gegeben (jeweils 10 min in Waschpuffer WP 1,2,3,4 und 5 min in WP 5).

Proben mit fluoreszierenden Sonden wurden nun an der Luft getrocknet. Anschließend wurden sie mit einem Tropfen Eindeckmittel inklusive des Gegenfärbereagenzes DAPI (Medipan) und einem Deckglas luftblasenfrei eingedeckt.

Proben mit Sonden ohne eigene Fluoreszenz, dafür aber mit dem Linker-Molekül Biotin, wurden weiter behandelt. Dazu wurden sie anschließend zweimal für 10 min in PBS gewaschen (RT) und nachfolgend durch unterschiedliche Streptavidin-Konjugate markiert.

Hierzu wurden entweder fluoreszierende Streptavidin-Konjugate (Verdünnung 1/200 in PBS) aufgebracht (je nach Bereichsgröße 100 – 400 µl) und für 1 h bei 37 °C inkubiert oder andererseits zusätzlich eine Signalverstärkungskaskade über Streptavidin-Peroxidase-Konjugate nachgeschaltet. Zur Signalverstärkung wurde in diesem Fall ein Tyramid-SuperBoost-Kit mit fluoreszenzmarkierten Tyramiden (Thermo Fisher) eingesetzt und nach Herstellervorgaben vorgegangen.

In beiden Fällen wurden die Proben anschließend zweimal in PBS sowie einmal in PBS-T (jeweils 10 min) gewaschen und an der Luft getrocknet. Zuletzt wurden auch diese Proben mit Eindeckmittel (inkl. DAPI) und Deckglas luftblasenfrei eingedeckt.

Um eine langfristige Mikroskopierbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden die Ränder der aufgelegten Deckgläser zusätzlich mit handelsüblichem Nagellack versiegelt und die Objektträger dunkel und kühl gelagert.

2.7.3 CISH als alternative Nachweismethode von DNA-Sequenzen

Neben der FISH wurden auch vergleichende Untersuchungen mittels CISH angestellt, welche zur Detektion, anstelle von Fluorochromen, die Umsetzung von chromogenen Substanzen ausnutzt. Zur Anwendung kam hierzu ein ZytoFast-CISH-Implementation-Kit (Zytovision), das ebenfalls Biotin-markierte Oligonukleotide als Sonden voraussetzt. Zunächst wurde dazu genauso verfahren wie bei der FISH, einschließlich der Nachhybridisierungswaschschritte. Anschließend wurden die Herstelleranweisungen befolgt, wonach als erstes eine mit Streptavidin-konjugierte alkaline Phosphatase an

die Sonden angelagert wurde, die im Nachgang eine enzymatische Umsetzung von Nitrotetrazoliumblausäurechlorid/5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (NBT/BCIP) katalysierte. Diese Form der CISH führte so zu lichtmikroskopisch sichtbaren blau-violetten Signalen, die nach dem Eindecken der Proben mit einem wässrigen Eindeckmittel analysiert werden konnten.

2.7.4 Anmerkungen zu *in-situ*-Hybridisierungsversuchen

Beim Umgang mit direkt fluoreszenzmarkierten Sonden musste schon zu Beginn, ab dem Zeitpunkt der Sondenapplikation, auf eine lichtgeschützte Arbeitsumgebung geachtet werden. Dies galt ebenso für alle weiteren Inkubationsschritte. Ein Austrocknen der Proben während der Hybridisierung und allen weiteren Arbeitsschritten war zudem strikt zu vermeiden. Bei Untersuchungen mittels Biotinmarkierten Sonden auf biologischen Gewebeproben wurde weiterhin ein zusätzlicher Blockierungsschritt mit Streptavidin-/ Biotin-Lösungen (Biotin-Blocking Kit, Thermo Fischer) nach Herstellervorgaben angewendet, um endogenes Biotin zu maskieren.

2.8 Evaluierung von Sonden an Mikropartikeln

Das Verfahren zur Bindung von biotinylierten Nukleinsäuren an Streptavidinbeschichtete Mikropartikeloberflächen wurde aus dem von Rödiger *et al.* (2011) [84] beschriebenen Protokoll übernommen. In dieser Arbeit wurden fluoreszierende und größenkodierte Mikropartikel aus Polymethylmethacrylat (PMMA) mit Carboxylfunktionalisierten Oberflächen von 9 und 15,4 µm Durchmesser (PolyAn) verwendet (Tab. 2). Alle Mikropartikelbehandlungen wurden in Suspension in 200-µl-Mikrozentrifugenröhrchen durchgeführt. Für die Streptavidinbeschichtung wurden $2 \cdot 10^5$ Mikropartikel in 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäurepuffer (MES) übertragen. Nach der Pelletierung durch Zentrifugation (1 min, $10.000 \times g$) und der Abnahme des Überstandes wurden die Carboxylgruppen durch den Vernetzer 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert. Die Aktivierung erfolgte in 100 µl EDC-MES-Puffer (5,2 mM EDC, 0,1 M MES, pH 4,5) für 20 min unter Schütteln in einem Thermomixer (28 °C, 1.200 rpm; Eppendorf). Nach einem einzelnen Waschschrift (200 µl $0,05 \times$ PBS) wurden die Mikropartikel wie oben beschrieben erneut pelletiert. Anschließend wurden die Oberflächen kovalent mit Streptavidin durch Zugabe von 50 µl PBS mit $150 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Streptavidin (IBA Lifesciences) und einer Inkubation für 3 h

bei 28 °C und 1.200 rpm gekoppelt. Danach wurden die Mikropartikel zentrifugiert (1 min, 10.000 × g) und dreimal mit 200 µl TBS-T-gepufferte Salzlösung mit 0,01 % Tween 20) gewaschen, ebenso nach jedem weiteren Protokollschritt. Am Ende des Proteinkopplungsprozesses wurden Streptavidin-beschichtete Mikropartikel in TBS-T bei 4 °C zur Lagerung aufbewahrt.

Die eigentlichen Hybridisierungsexperimente liefen im Anschluss wie in Abb. 7 schematisch dargestellt ab.

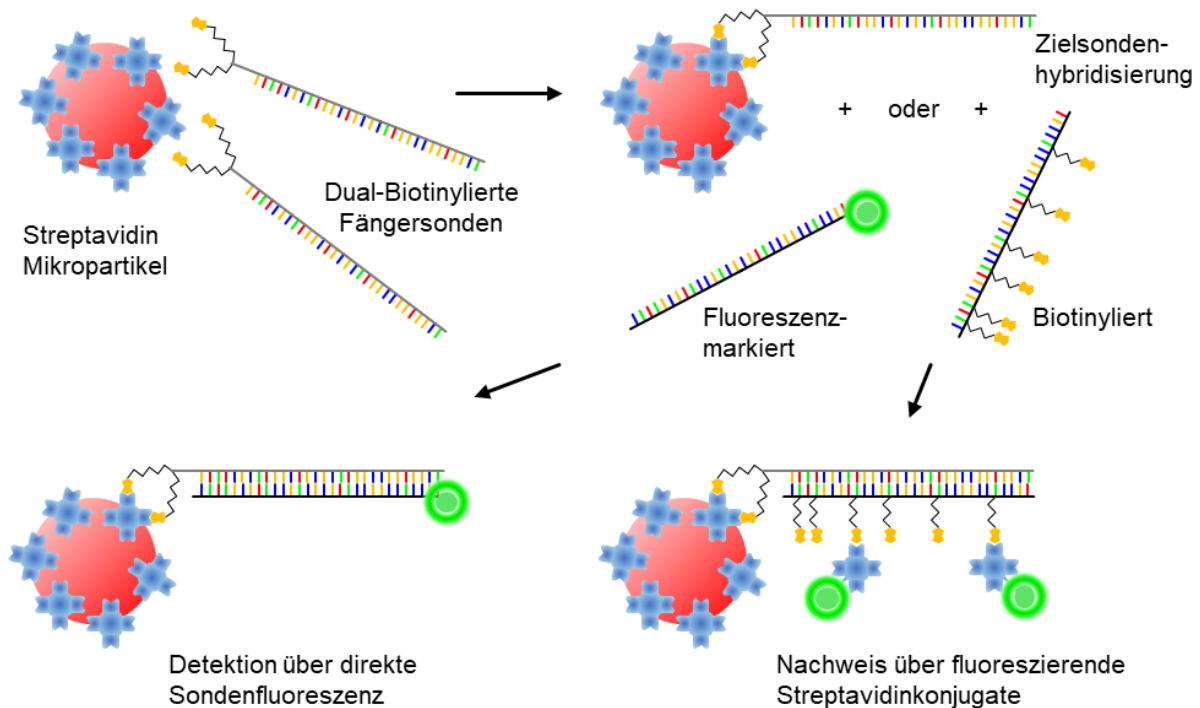


Abb. 7 Sondernachweis an Mikropartikeln. Die Grafik zeigt schematisch die grundlegenden Prozesse beim Nachweis von DNA-Sonden auf Mikropartikeloberflächen. Auf Streptavidin-modifizierte Mikropartikel werden zunächst 5'-dual-biotinylierte Fängersonden gebunden. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der entsprechenden Zielsonden, die je nach Vorgehen direkt fluoreszenzmarkiert (links) oder mehrfach mit Biotin-Molekülen (rechts) bestückt sein können. Im ersten Fall wird dabei die Sondenfluoreszenz direkt zur Detektion genutzt, wobei im zweiten Fall zusätzlich fluoreszenzkonjugiertes Streptavidin eingesetzt wird, das kovalent an die biotinylierten Sonden bindet. Der Nachweis der Bindung erfolgt in beiden Fällen fluoreszenzmikroskopisch durch Messung der Intensität eines koronaren Signals um die Partikel herum.

Zu Beginn der Hybridisierungsversuche wurden 5'-dual-Biotin-markierte Fängersonden an die Streptavidin-funktionalisierten Mikropartikeloberflächen gebunden (50 nM, 1 h, 28 °C, 1.200 rpm). Ein Überschuss an der ungebundenen Sonde wurde durch drei Waschschrte entfernt und der Überstand anschließend verworfen. Je nach Versuchsanordnung folgte im Nachgang die Hybridisierung der einzel- oder doppelsträngigen Sonden, die entweder direkt fluoreszenz- oder intern mit Biotinen markiert waren, an die komplementäre Fängersonde. Im Falle der einzelsträngigen Sonden

wurden 50 μl (50 nM) der entsprechenden Sonde hinzugegeben und 1 h inkubiert (28 °C, 1.200 rpm).

Beim Einsatz von doppelsträngigen Sonden (Zugabe von 50 μl , 50 nM) wurde die Partikel-Sonden-Suspension zunächst für 2 min bei 95 °C, gefolgt von 5 min bei 76 °C in einem PCR-Thermocycler (Eppendorf) denaturiert. Nach Beendigung wurden die Proben unverzüglich in einen vorgeheizten Thermomixer überführt und bei 37 °C und 1.200 rpm für 1 h inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen wurde der Überstand mit ungebundenen Sonden verworfen und das in 100 μl TBS aufgenommene Partikelpellet in eine Mikrotiterplatte (96 Wells) zur Analyse überführt.

Im Falle von Biotin-markierten Sonden erfolgte noch ein weiterer Schritt, bei dem Streptavidin-Konjugate zur Detektion eingesetzt wurden. Dazu wurden die Proben nach dem Waschen (hier PBS-T statt TBS-T) ein letztes Mal mit 50 μl der entsprechenden Streptavidin-Lösung (Verdünnung jeweils 1:200 in PBS-T) inkubiert (1 h, 28 °C, 1.200 rpm). Zur Analyse wurde die Mikropartikelsuspension nach letztmaligem Waschen (3 \times in PBS-T) in 100 μl PBS aufgenommen und ebenfalls im 96-Well-Format untersucht.

Die finale Messung des Ligandenwertes als relative Fluoreszenzintensität (RFI) jedes einzelnen Mikropartikels wurde dazu mit der vollautomatischen mehrfarbigen Fluoreszenz-Digitalbildgebungsplattform VideoScan durchgeführt [80].

2.9 Sondennachweis mittels DNA-Origamis

Zum hochsensitiven Nachweis von Oligonukleotiden an Mikropartikeln wurde als weitere Nachweismethode mit fluoreszierenden DNA-Origamis experimentiert.

Dabei wurde zunächst die direkte Bindung der sowohl fluoreszenz- als auch Biotin-markierten DNA-Origamis an Streptavidin-funktionalisierte Mikropartikeloberflächen untersucht. Zum Nachweis hybridisierter Sonden wurde dazu ein ähnlicher Versuchsaufbau genutzt wie zur Detektion von doppelsträngigen, biotinylierten Sonden mittels Streptavidin-Konjugaten. Statt der Konjugate wurde in gleichen Konzentrationen reines Streptavidin als Linker verwendet, das im Nachgang wiederum die markierten DNA-Origamis binden sollte. Beide Prinzipien sind in (Abb. 8) schematisch dargestellt. Zur Gewährleistung der Stabilität der Origamis war bei diesen Versuchen in allen Puffern ein Mindestgehalt an MgCl_2 nötig (≥ 5 mM). Um das optimale Verhältnis zu ermitteln, wurde der MgCl_2 -Anteil wie auch die allgemeinen

Pufferkonditionen in den verschiedenen Experimenten variiert. Aufgrund herstellungsbedingt schwankender Origamimengen (chargenweise nur ca. 100 μl bei 1 bis 10 nM) wurden gezielt Versuche mit Verdünnungen im Bereich von maximal 1:50 bis 1:1.000 durchgeführt. Neben der Auswertung mit dem bereits genannten VideoScan-System wurden vor allem hochauflösende Mikroskope (CSLM, STED) zum qualitativen Nachweis eingesetzt.

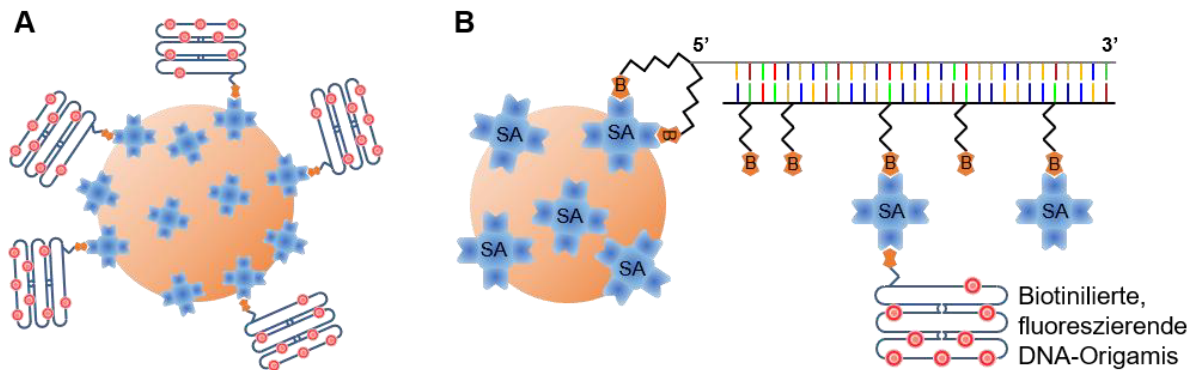


Abb. 8 DNA-Origami-Detektion an Mikropartikeln. Die Darstellungen zeigen schematisch den Nachweis von DNA-Origamis an Mikropartikeln (Größen sind nicht maßstabsgerecht). Dabei wurde zum einen die direkte Bindung der fluoreszenz- und Biotin-markierten DNA-Origamis an Streptavidin-funktionalisierte Mikropartikeloberflächen untersucht (**A**) und zum anderen der Nachweis hybridisierter Sonden (**B**), wobei das Prinzip zur Detektion von doppelsträngigen biotinylierten Sonden mittels Streptavidin-Konjugaten gewählt wurde.

2.10 Anwendung der TSA-Technologie auf Mikropartikel

Zur Evaluierung der TSA-Technologie auf Mikropartikeloberflächen wurden zunächst Streptavidin-beschichtete Mikropartikel, wie bereits im Abschnitt 2.8 beschrieben, vorbereitet. Das weitere Vorgehen wird auf Grundlage der zu dieser Thematik entstandenen Publikation ausführlicher beschrieben und ist schematisch in Abb. 9 dargestellt.

Für nachfolgende Hybridisierungsexperimente wurden eine doppelsträngige DNA-Fängersonde und eine doppelsträngige Zielsonde mit der gleichen Sequenz erzeugt und durch Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Für diese Experimente wurde eine genomische Region des humanen Papillomavirus Typ 16 als Modell gewählt.

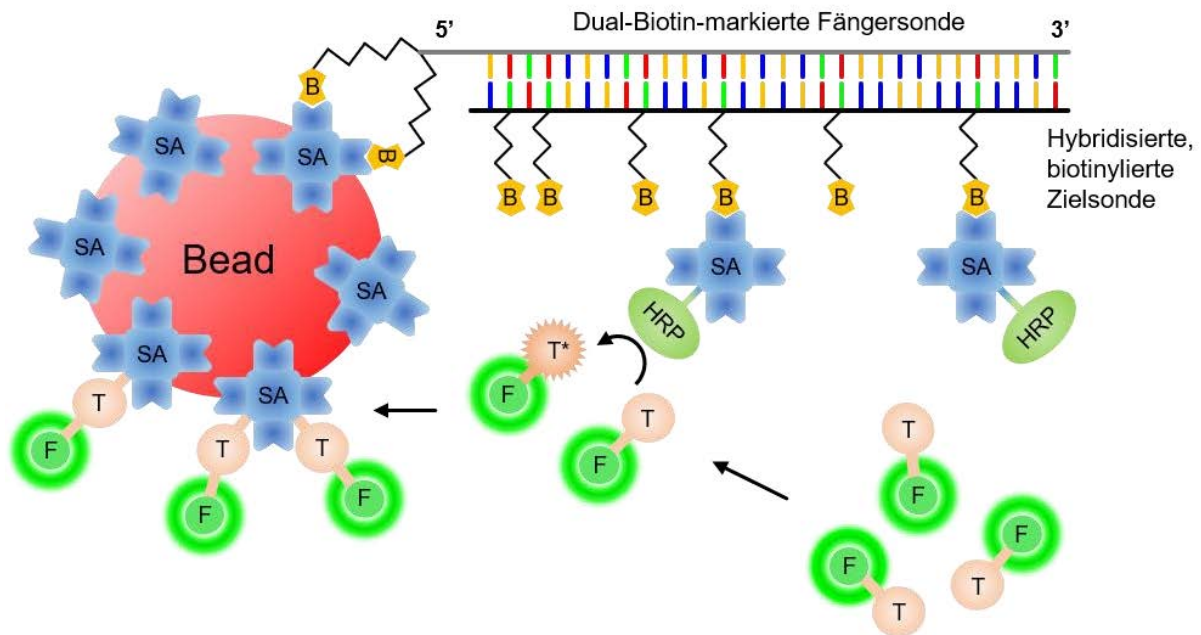


Abb. 9 Tyramidsignalverstärkung auf Mikropartikeloberflächen. 5'-dual-biotinylierte Fängersonden werden an Streptavidin (SA)-beschichtete Mikropartikel gebunden und anschließend mit Biotin (B)-markierten Zielsequenzen hybridisiert. Nach Bindung von Streptavidin-konjugierten Meerrettichperoxidasen (HRP) an die Zielsequenz werden fluoreszenz (F)-markierte Tyramide aktiviert. In diesem Zustand binden die Tyramide (T) kovalent an benachbarte Proteine (hier Streptavidin auf der Partikeloberfläche) und erlauben die Detektion starker Fluoreszenzsignale (links).

Die Amplifikationen wurden mit spezifischen Primern durchgeführt, die eine 294-bp-Region im Bereich der E6:E7-Gene des HPV-16-Genoms adressieren (HPV-16-294-fw Vorwärtsprimer: 5'-GCAAGCAACAGTTTACTGCGACGT-3'; HPV-16-294-rv Reverseprimer: 5'-GACCCCTTATTATTATGGAAT-3'; angepasst von Adler *et al.* (1997) [20]; erhalten von Biomers, Deutschland). Die PCRs wurden in 50 µl Reaktionen durchgeführt. Für die spätere Bindung an Streptavidin-beschichtete Mikropartikeloberflächen wurde die Fängersonde mit einer biotinylierten Version des Vorwärtsprimers mit 5'-dual-Biotin modifiziert. Die endgültige Zusammensetzung der Reaktionsmischung für die Fängersonde betrug 1,5 mM MgCl₂, 200 µM von jedem dNTP, 0,2 µM von jedem Primer und 0,02 U·µl⁻¹ BioTherm-Taq-DNA-Polymerase im BioTherm-Puffer (Rapidozym, Deutschland). Die Zielsequenz (Hybridisierung mit der Fängersonde) beinhaltete mehrere Biotine, die über die gesamte Sequenz verteilt waren. Die Biotin-Markierung dieser Sonde wurde durch den Einbau von biotinylierten Nukleotiden (im Markierungsgemisch enthalten) während der PCR (Biotin-PCR Labeling-Core-Kit, Jena Bioscience) erreicht. Für dieses Verfahren wurden 0,5 mM jedes Primers und 0,02 U·µl⁻¹ Taq DNA-Polymerase im Markierungspuffer verwendet. Für beide Sondenamplifikationen diente ein aufgereinigtes PCR-Produkt als Vorlage. Dieses wiederum wurde durch Amplifikation eines spezifischen Bereiches

genomischer DNA von CaSki-Zellen erhalten, welche wie schon erwähnt integrierte virale DNA-Sequenzen von HPV-16 enthielten (50 ng je Reaktion; gleicher HPV-16-spezifischer Primer). Folgende Reaktionsbedingungen wurden für beide Sonden mit einem Mastercycler ep gradient (Eppendorf) angewendet: anfängliche Denaturierung bei 94 °C für 2 min, gefolgt von 30 Zyklen von 94 °C für 30 s (Denaturierung), 54 °C für 30 s (Anlagerung) und 72 °C für 30 s (Verlängerung) und endete mit einem finalen Verlängerungsschritt bei 72 °C für 10 min. Die PCR-Produkte wurden schließlich mit dem GeneJET-PCR-Purification-Kit (Thermo Fisher) aufgereinigt und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Abb. 10).

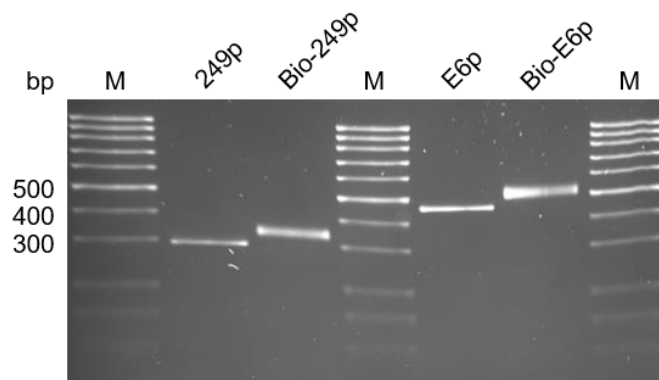


Abb. 10 Gelshift biotinylierter Oligonukleotide. Das Bild visualisiert die Bandenverschiebung biotinylierter Zielsekunden (Bio-294p, 3. Spur; Bio-E6p, 6. Spur) im Vergleich zu den Fängersonden (294p, 2. Spur; E6p, 5. Spur). Die Größe der Fragmente ist durch den Einbau mehrerer biotinylierter Nukleotide auf ca. 330 bp bzw. 500 bp verschoben; 3 % Agarose in TAE; M: 100 bp DNA-Leiter (Roth); angefärbt mit Ethidiumbromid.

Zu Beginn der eigentlichen Hybridisierungsexperimente wurden Fängersonden durch das 5'-verknüpfte Dual-Biotin an die Streptavidin-funktionalisierten Mikropartikeloberflächen gebunden. Um eine Sättigung zu erreichen, wurden $6,6 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ Sonde in TBS-T (in vorherige Experimente bestimmt) verwendet (1 h, 28 °C, 1.200 rpm). Ein Überschuss an ungebundener Sonde wurde durch drei Waschschriffe entfernt. Um die Empfindlichkeit der Methode zu überprüfen, wurde die Konzentration der Zielsekunde von $3,3 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ auf $3,3 \cdot 10^{-6} \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ titriert. Für die eigentliche Hybridisierung an die komplementäre Fängersonde wurden die DNA-Doppelstränge beider Sonden für 2 min bei 95 °C und 5 min bei 76 °C in einem PCR-Thermocycler (Eppendorf) denaturiert, gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C und 1.200 rpm für 1 h. Anschließend wurden drei Waschschriffe durchgeführt, um ungebundene Sonden zu entfernen. Die nächsten Schritte im Tyramide SuperBoost Kit (Thermo Fisher) waren die Bindung von HRP-SA an die biotinylierte und hybridisierte Zielsekunde. Dementsprechend wurden

50 µl einer HRP-SA-Lösung (gebrauchsfertige Mischung aus dem Kit) pro Probe zugegeben und für 1 h (28 °C, 1.200 rpm) inkubiert, gefolgt von weiteren Waschschritten. Anschließend wurden 50 µl Tyramid-Arbeitslösung (TWS), die das eigentliche Tyramidsubstrat enthält, gemäß den Kit-Anweisungen zugegeben. Damit katalysierte das Enzym die Reaktion der Tyamide hin zu aktivierten Zwischenprodukten, die infolgedessen kovalent an Streptavidin auf der Mikropartikeloberfläche gebunden wurden. Aufgrund der Konjugation mit Fluorophoren führte dies zu nachweisbaren Fluoreszenzsignalen auf den Mikropartikeloberflächen (Abb. 11).

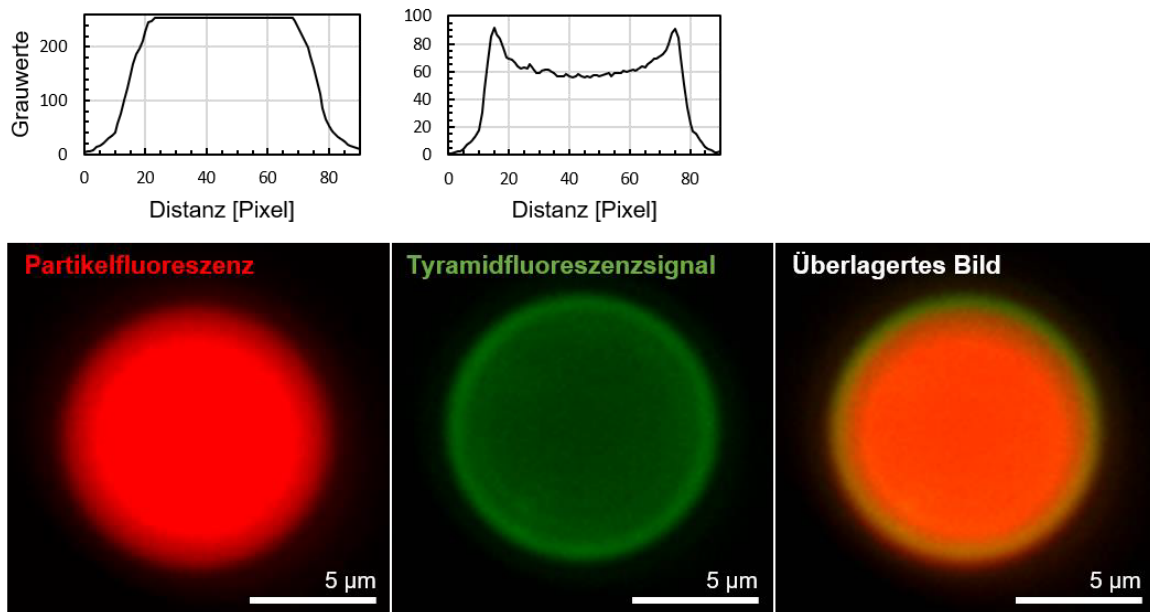


Abb. 11 Mikroskopische Bilder eines mit Streptavidin beschichteten und mit TSA behandelten Mikropartikels. Links: Basisfluoreszenz des Mikropartikels (PolyAn GmbH), Mitte: Ligandenfluoreszenz von Alexa Fluor 488 Tyramid, rechts: überlagertes Bild). Die Diagramme oben zeigen Intensitätsprofile der Pixel in der Mitte der Partikelbilder. Während A eine hohe Beadfluoreszenz über die gesamte Kugelgeometrie zeigt, reflektieren die beiden Peaks in B die gemessenen homogenen Ringsignale (Korona).

Die Reaktion wurde schließlich durch die Zugabe von 50 µl Stoppreagenz und drei weiteren Waschschrritten gestoppt. Nach der Übertragung der Mikropartikelsuspension auf Mikrotiterplatten wurde die Messung des Ligandenwertes ebenfalls als relative Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Mikropartikels mit der Digitalbildgebungsplattform VideoScan durchgeführt. Im Vergleich dazu wurde die hybridisierte Biotinmarkierte Zielsonde auch mit direkt fluoreszenzmarkiertem (AlexaFluor 488) Streptavidin (SA-AF488) nachgewiesen. Um die endgültige Signalstärke pro Mikropartikel zu optimieren, wurden verschiedene Bedingungen auf ihre Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensität getestet. Daher wurden unterschiedliche Inkubationszeiten

mit TSA-Reagenz (enzymatische Reaktion), unterschiedliche Mengen an Zielsonden, HRP-SA sowie des TSA-Substrats untersucht. Darüber hinaus wurden verschiedene Proteinzusammensetzungen auf Mikropartikeloberflächen (50, 90 oder 100 % BSA, IgG, Protein A/G bzw. 50, 10 oder 0 % Streptavidin) verwendet, um eine Signalverstärkung zu überprüfen, die möglicherweise durch eine unterschiedliche Anzahl von Tyramidbindungsstellen durch verschiedene Aminosäurezusammensetzungen und räumlich unterschiedliche Proteinstrukturen verursacht wird. Als Kontrolle wurden Mikropartikel auf die gleiche Weise ohne Zusatz von Sonden behandelt.

2.11 Untersuchung kommerzieller 3D-Druck-Polymere für den Einsatz in der Bioanalytik

2.11.1 3D-gedruckte Modelle und Geräte

Vierzehn Polymerfilamente (PLA: $n = 9$, ABS: $n = 1$, PETG: $n = 2$, TPU: $n = 2$; 1,75 mm Durchmesser) von fünf Herstellern wurden zur Erstellung von Untersuchungsmaterialien und Vorrichtungen verwendet. Detaillierte Informationen über die Quelle und die Eigenschaften sind im Ergebnisteil der Tab. 20 zu entnehmen. Die Herstellung von 3D-Objekten aus einem digitalen Modell umfasst die Prozessschritte Planung, Zeichnen eines digitalen Designs, Übersetzung in Maschinenbefehle und Ausführung des Druckprozesses [39].

Die genutzten digitalen 3D-Modelle wurden mit der 3D-CAD/CAM-Software Fusion 360 (Autodesk) erstellt und als dreieckiges Oberflächennetz in eine *.STL-Datei (STereo-Lithographie) umgewandelt. Das Slicing zu ausführbaren Maschinenbewegungen erfolgte für den Raise3D-Pro2-Drucker mit der Software ideaMaker (Raise3D) und für die Maschine Anycubic I3 Mega mit der Open-Source-Software Cura (Ultimaker). Die endgültigen Druckinformationen wurden dann in *.GCODE-Dateien gespeichert. Sowohl die verwendeten *.STL- als auch die *.GCODE-Dateien können dem digitalen Zusatzmaterial des elektronischen Artikels entnommen werden (Supp. 3D [2]).

Für die Materialstudien wurden verschiedene 3D-Objekte erstellt und gedruckt, die in Abb. 12 dargestellt sind. Für die Funktionsstudien wurden nur vier Filamente (siehe Tab. 20: Materialien C, D, H, I) ausgewählt, die sich aufgrund der weiter unten beschriebenen Ergebnisse am besten eigneten.

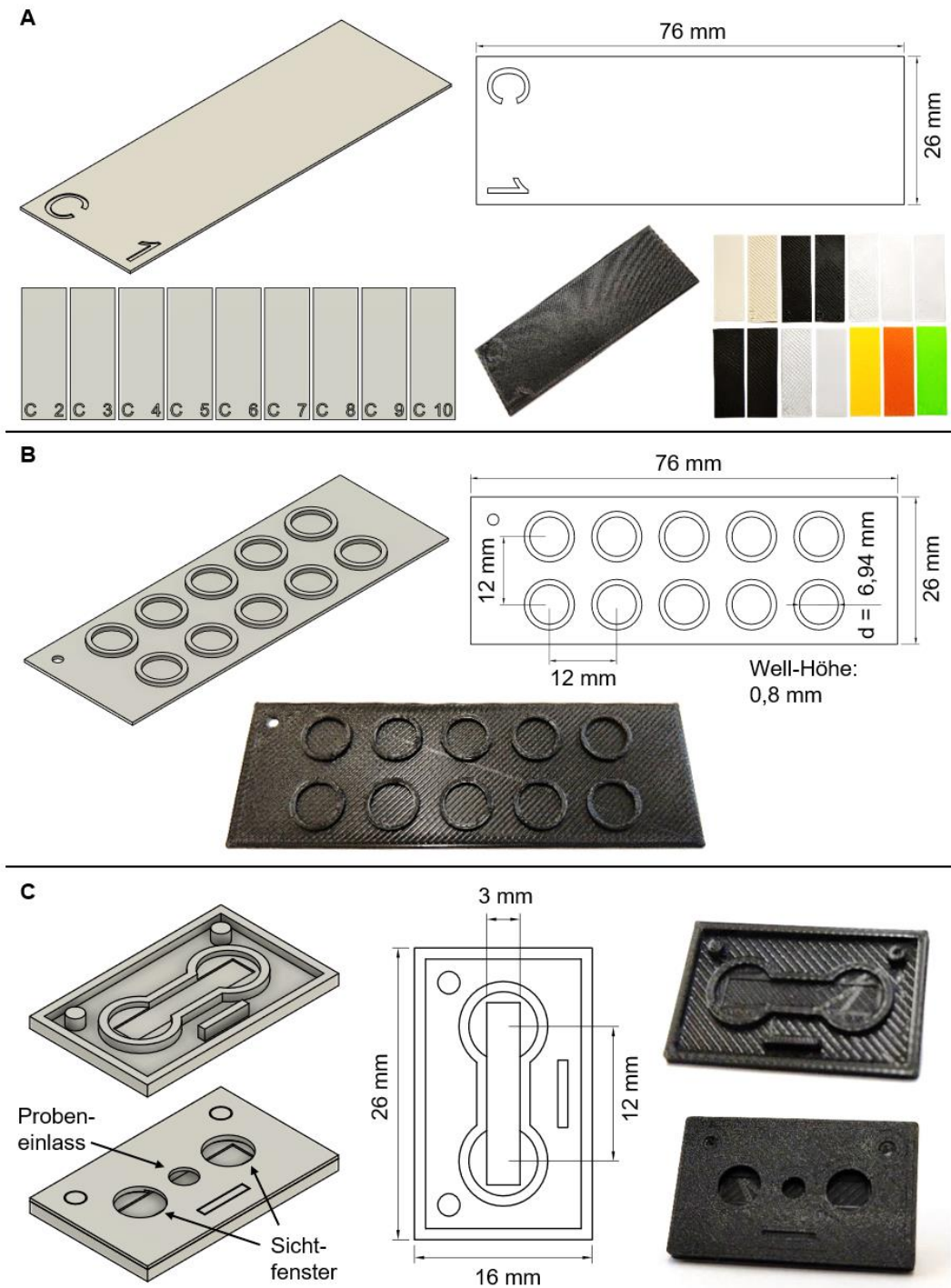


Abb. 12 Erstellte 3D-Konstruktionen in dieser Arbeit Diese Abbildung zeigt die drei im Rahmen dieser Arbeit erstellten 3D-Objekte (als digitales Modell, Schema und gedrucktes Modell). Sie wurden mit der CAD-Software Fusion 360 (Autodesk) erstellt und mit den untersuchten Polymeren im 3D-Druckverfahren hergestellt. Die Abmessungen der Konstruktionen sind entsprechend angegeben. **A:** repräsentativer Teststreifen für die Autofluoreszenzmessung, 10 Replikate für jedes Material ($n = 14$); **B:** 10-Well-Probenträger für Zelladhäsions-, FISH- und Biofilmtests; **C:** 2-Kammer-Chip für den DNA-Capture-Assay; **B/C** wurden aus 4 ausgewählten PLA- (mattschwarz und schwarz, Das Filament; schwarz, Elegoo) und ABS- (schwarz, Tronxy) Filamenten gedruckt (siehe Tab. 20: Materialien C, D, H, I).

Es wurden zehn Replikate von Teststreifen ($76 \times 26 \times 0,5 \text{ mm}^3$) gedruckt, um die Variation der Autofluoreszenz jedes Materials zu analysieren. Diese wurden entsprechend mit A bis N für den Materialtyp bzw. 1 bis 10 für das Replikat gekennzeichnet (Abb. 12 A). Da der Schmelzprozess die spektralen Eigenschaften der Polymere beeinflussen kann [85], wurden alle Materialien nach dem Drucken analysiert. Funktionelle Assays: Experimente zur Zelladhäsion, bakteriellen Biofilmbildung sowie FISH-Experimente wurden mit gedruckten 10-Well-Probenträgern mit einer Wachstumsfläche von ca. $37,8 \text{ mm}^2$ in jedem Well durchgeführt (Abb. 12 B). Zum Nachweis von kurzer, fluoreszenzmarkierter, einzelsträngiger DNA wurden Lateral-Flow-Experimente in einem speziell angefertigten Zweikammerchip durchgeführt (Abb. 12 C). Zwei ausgestanzte runde Filterpapiere und ein rechteckiger Filterstreifen förderten den Flüssigkeitsstrom in der Kammer.

2.11.2 Analyse der Autofluoreszenz und spektralen Eigenschaften

Die Autofluoreszenz wurde nach dem Drucken (Druckeinstellungen und 3D-Modelle siehe Supp. 3D des elektronischen Artikels [2]) von 3D-Objekten mit der Größe eines Standardobjektträgers untersucht (Abb. 12 A). Von jedem Polymer wurden zehn technische Replikate angefertigt, um die Varianz zu beurteilen. Die Fluoreszenzspektren wurden mit dem FluroMax-4 Spektrofluorimeter (Horiba) analysiert. Die Teststreifen wurden vertikal und zentral in einem festen Probenhalter platziert und ohne Deckgläser fixiert. Der Fokus wurde auf die Probe gelegt. Die Stirnfläche wurde 30° zum Anregungsstrahl ausgerichtet. Dadurch konnte das Eindringen von Anregungslicht in die Emissionsschlitze verhindert und eine zunehmende Interferenz durch Streulicht vermieden werden.

Die Messung wurde als Batch-Experiment in sechs Schritten automatisch durchgeführt. Nach sukzessiver Bestrahlung mit Anregungslicht verschiedener Wellenlängen (350, 405, 488, 561, 640, 750 nm) wurde Fluoreszenzlicht vom Emissionsmonochromator erfasst. Alle Anregungswellenlängen wurden so gewählt, dass sie den Laserlinien konfokaler Laserscanning-Mikroskope entsprachen, um die gängigsten Spektralbereiche zu untersuchen, die in fluoreszenzbasierten Experimenten eine Rolle spielen (z. B. DAPI, FITC, Cy3, Cy5). Die optimalen Parameter für Anregung, Verstärkung und Empfindlichkeit des Detektors sowie die Signalauflösung wurden nach einer groben Vorabmessung aller Materialien gewählt. Alle Proben wurden mit den gleichen Einstellungen analysiert, um trotz starker

Fluoreszenzunterschiede einen nachträglichen absoluten Vergleich der Intensitäten untereinander zu gewährleisten. Alle Messungen wurden mit Eingangss- und Ausgangsspaltbreiten von 5 nm und einer Schrittweite von 1 nm zur Emissionsdetektion durchgeführt.

Die Spektraldaten wurden wie zuvor beschrieben [86] mit der statistischen Programmiersprache R [87] unter Verwendung des R Commander Graphical User Interface (GUI) [88] und der RKWard GUI/DIE [89] analysiert. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) von normalisierten Fluoreszenzspektren wurde mit der Funktion *prcomp()* durchgeführt. Hierdurch sollten Fluoreszenzwellenlängen, bei denen die maximale Variation zwischen den Filamenten beobachtet wurde, sowie Ähnlichkeiten zwischen den Filamenten identifiziert werden. Dies wurde als Biplot [90] visualisiert. Die vollständige Analyse ist im Zusatzmaterial des elektronischen Artikels verfügbar (Supp. PCA [2]).

2.11.3 Dynamische Differenzkalorimetrie

Alle Proben wurden durch eine Analyse mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) charakterisiert. Die DSC-Experimente wurden mit einer DSC 1/700 und einer DSC 1/500 von Mettler Toledo in geschlossenen Aluminium-Pfännchen (40 µl) unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Das Kalorimeter wurde mit *n*-Oktan und Gallium als Referenzmaterialien bei Erwärmungsraten von 1, 2, 5, 10 und 20 K·min⁻¹ kalibriert. Nach der Kalibrierung wurden Temperatur und Wärmestrom mit *n*-Dekan, Gallium und Indium verifiziert. Für diese Materialien stimmten die Fusionseigenschaften perfekt mit den in NIST [91] aufgeführten Daten überein. Die aus den DSC-Kurven abgeleiteten charakteristischen Temperaturen wurden extrapoliert; das Schmelzen wurde als endotherm und das Gefrieren als exotherm bestimmt. Kaltkristallisationseffekte von glasartigen Substanzen zeigten während des Erwärmungsprozesses exotherme Signale. Zur Untersuchung des thermischen Verhaltens der Filamente wurden mehrere in Abschnitt 3.4.2 beschriebene Temperaturregime verwendet. Die Masse der Proben betrug etwa 6-16 mg.

2.11.4 FISH zur Detektion bakterieller 16S rRNA auf 3D-Druckobjekten

Die Adhäsion von Bakterien auf verschiedenen 3D-Druck-Polymeren wurde durch FISH-Untersuchungen ermittelt [92]. Vor der Verwendung wurden die gedruckten Probenträger 2 h in 70 %igem Ethanol bei RT inkubiert, um Verunreinigungen zu

entfernen und Kontaminationen zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben­träger in 50 ml sterilem Wasser gespült und bei RT getrocknet. Die Hälfte der Proben­träger wurde mit einer Immobilisierungslösung (Medipan GmbH, Deutschland) beschichtet, die andere Hälfte blieb unbeschichtet. Auf diesen wurden $5 \cdot 10^6$ Kolonie-bildende Einheiten (CFU·ml⁻¹) Bakterien (*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Stamm 6095 und Stamm 6096, Isolat von Mukoviszidosepatienten) pro Well gesät und bei RT für eine Stunde adhären gelassen. Ungebundene Bakterien wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Die Bakterien wurden für 1 h bei 4 °C mit 4 % PFA fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Um die Zugänglichkeit der FISH-Sonde zu gewährleisten, wurde *S. aureus* mit 1 mg·ml⁻¹ Lysozym in 10 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiolhydrochlorid (TRIS/HCl) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Alle Bakterien wurden dann für 10 Minuten bei -21 °C mit vorgekühltem Methanol inkubiert, um die Lysozymreaktion zu stoppen und die Bakterien zu permeabilisieren. Nach kurzer Trocknungszeit wurde eine fluoreszenzmarkierte (ATTO 647N) 16S rRNA-Sonde (EUB338 [78], 5'-GCWGCCWCCCGTAGGWGT-3'; 5 ng·µl⁻¹ in Hybridisierungspuffer (5 M NaCl, 1 M TRIS/HCL, 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 15 % Formamid) für 1 h bei 46 °C hybridisiert. Anschließend wurden die Proben mit vorgewärmtem Waschpuffer (5 M NaCl, 1 M TRIS/HCL, 10 % SDS) bei 48 °C für 10 min gewaschen. Abschließend wurden die Bakterien mit 50 µg·µl⁻¹ DAPI-Lösung gegengefärbt und dreimal mit PBS gewaschen. Die Bilder wurden mit einem CSLM aufgenommen und bioinformatisch analysiert (Abschnitt 2.11.8).

2.11.5 Biofilmbildung auf 3D-gedruckten Polymermaterialien

Gedruckte Proben­träger aus PLA (mattschwarz und schwarz, Das Filament; schwarz, Elegoo) und ABS (schwarz, Tronxy) wurden auf ihre Biofilmbesiedelungseigenschaften getestet. Vor der Verwendung wurden die Proben­träger 2 h in 70 %igem Ethanol bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben­träger in 50 ml Wasser gespült und bei RT getrocknet. Für die Biofilmbildung wurden der *S. aureus*-Stamm 6095 und der *Escherichia coli* MG1655 F'tet-Stamm 6101 [93] auf Proben­träger ($3 \cdot 10^6$ CFU·ml⁻¹) gesetzt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Der Biofilm wurde dann mit PBS gewaschen und mit DAPI gefärbt (50 µg·µl⁻¹). Die Proben­träger, auf denen der Biofilm gebildet wurde, wurden mit einem CLSM analysiert und wie in Abschnitt 2.11.8 beschrieben ausgewertet.

2.11.6 Zelladhäsionsversuche

Die Zelladhäsion wurde an 10-Well-Objektträgern aus PLA (mattschwarz und schwarz, Das Filament; schwarz, Elegoo) und ABS (schwarz, Tronxy) getestet. Vor der Verwendung wurden die gedruckten Probenräger bei RT 2 h in 70 %igem Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Probenräger in 50 ml Wasser gespült und bei RT getrocknet.

Die drei bekannten Zelllinien SiHa & CaSki [94], HeLa [95] wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle's Medium (DMEM; 10 % fetales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 U·ml⁻¹ Penicillin/ Streptomycin) inkubiert (5 Vol.-% CO₂, 37 °C). Die Zellen wurden mit 0 (Negativkontrolle mit Medium) 1,25·10³, 2,5·10³, 5,0·10³ und 1,0·10⁴ Zellen pro Well gesät (Abb. 12 B) und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch 15 min Inkubation mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei 4 °C fixiert. Die Kerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) in einer Konzentration von 50 µg·µl⁻¹ gefärbt und anschließend dreimal mit 50 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gespült und bis zur Analyse bei 4 °C in PBS gelagert. Ein Bereich von 2.363,9 µm² um das Zentrum jedes Wells wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie erfasst.

Die Zelladhäsion wurde weiterhin auf gedruckten, flachen TPU Objektträgern (ca. 1 cm² Stücke) getestet (Abb. 12 A). Die Objektträger wurden in eine 6-Well-Platte gelegt, um eine Verdunstung zu verhindern. Es wurden entweder keine (Negativkontrolle mit Medium), 2,5·10⁵ oder 5,0·10⁵ Zellen in 2 ml Medium pro Well gesät und 48 h inkubiert. Schließlich wurden die Proben fluoreszenzmikroskopisch mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) LSM800 (Zeiss, Deutschland) untersucht.

2.11.7 DNA-Capture-Assay

Drei PLA-Filamente (mattschwarz und schwarz, Das Filament; schwarz, Elegoo) und ABS (schwarz, Tronxy) wurden ausgewählt, um einen Zweikammerchip (Abb. 12 C) für den DNA-Capture-Assay herzustellen, da sie die niedrigste Autofluoreszenz aufwiesen. Abb. 13 veranschaulicht die Vorbereitung und Verwendung des Chips für DNA-Detektionsexperimente.

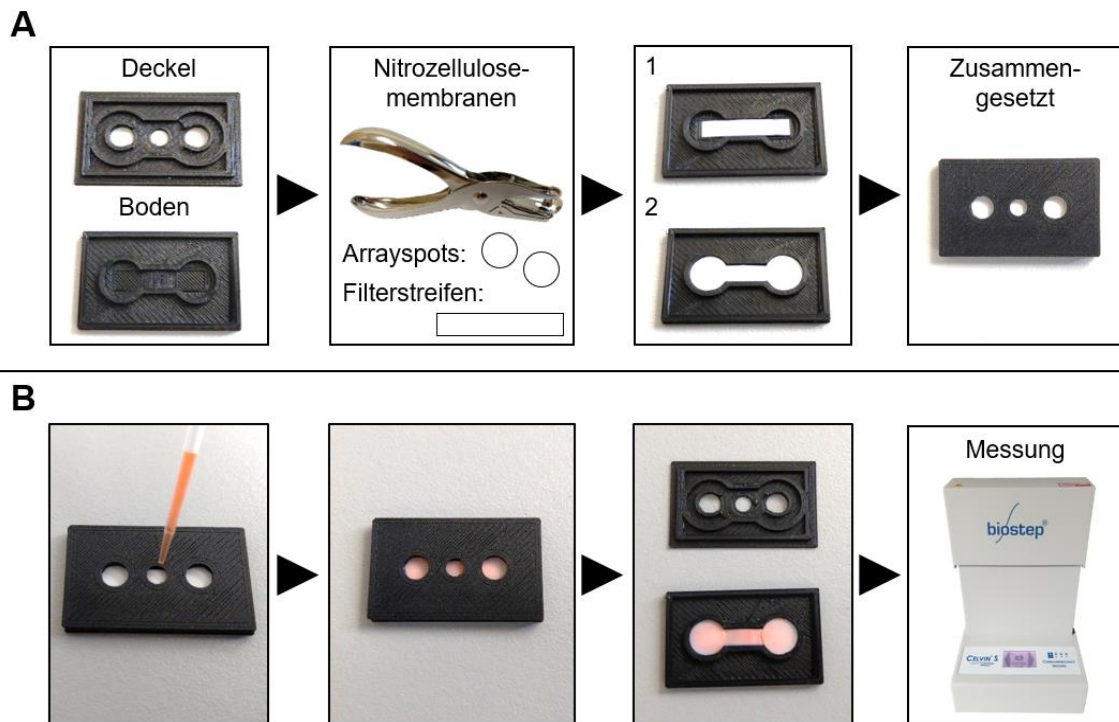


Abb. 13 Vorbereitung eines 3D-gedruckten 2-Kammer-Chips. **A:** Ein leerer Chip (2 Teile) wird zunächst mit einem rechteckigen Filterstreifen und anschließend mit kreisförmigen Nitrozellulosemembranen (Durchmesser: 6 mm, vorbereitet mit einer Lochzange) bestückt. Alle Membranen werden nach dem Verschließen mit dem Deckel in Position gehalten. **B:** Zur Veranschaulichung wurde eine Eosinlösung (orange) in den Probeneinlass pipettiert. Während der Inkubationszeit von fünf Minuten diffundiert die Lösung über den Filterstreifen in die Probenkammern. Bei den DNA-Detektionsexperimenten wurden fluoreszierende Sonden verwendet und mit einem Fluoreszenzbildungsgerät (Biostep Celvin S) ausgewertet.

Als Matrix im Chip wurde eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) mit einer Porengröße von 0,2 μm verwendet. Dieser klassische Ansatz wurde verwendet, um fluoreszenzmarkierte einzelsträngige DNA-Moleküle dosisabhängig in einer Suspension einzufangen [96, 97]. Zwei ausgestanzte runde Filterpapiere und ein rechteckiger Filterstreifen wurden in den Chip eingesetzt und mit einem Deckel verschlossen. Vier Konzentrationen (0,05, 0,1, 1, 10 μM) einer fluoreszenzmarkierten (ATTO 647N) 16S-rRNA:EUB338-Sondensuspension sowie eine Negativkontrolle (nur Puffer) wurden in den Speicher pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Der Überschuss der Sonde wurde durch dreimaliges Waschen mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween 20 (TBS-T; 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) entfernt. Die Signale wurden mit dem Fluoreszenzbildungsgerät Biostep Celvin S (Biostep) bei einer Exposition von 50 % der maximalen Anregungsintensität für 5 s erfasst.

2.11.8 Analyse der Fluoreszenzaufnahmen

Die aufgenommenen Bilddaten wurden mit Hilfe einer Biobildinformatik-Datenanalyse-Pipeline in der Programmiersprache Python (v. 3.7.3) analysiert [98, 99]. Kurz gesagt, die Daten wurden als TIFF-Bild importiert und mit Funktionen aus dem *scikit-image*-Paket analysiert (v. 0.14.2) [100]. Die statistische Analyse wurde mit dem Paket *statsmodels* (v. 0.9) durchgeführt [101].

Als Indikator für die Adhäsion der Zellen an der Probenoberfläche wurde die durchschnittliche Pixelintensität berechnet. Die statistische Signifikanz zwischen den verschiedenen Zellaussaat-Zahlen wurde durch Anpassung eines linearen Regressionsmodells und die Durchführung der ANOVA mit Hilfe des Signifikanztests nach Tukey (*Tukey's honest significance test*), wie er im Python-Modul *statsmodels* implementiert ist, bestimmt. Zusätzlich wurde die Zellzahl auf jedem Bild mit der *blog_log()*-Funktion von *scikit-image* geschätzt. Um den Nachweis falsch positiver Zellkerne zu unterdrücken, wurden die Bilder vor der Analyse mit einem Medianfilter ($r = 3,5$) in Graustufen umgewandelt und unscharf dargestellt. Zellklumpen wurden durch Berechnung des Interquartilsbereichs (IQR) für die Größen der detektierten Kerne erkannt. Alle Kerne größer als Radius ($r \geq 75\% \text{ Quartil} + 1,5 * \text{IQR} \mu\text{m}$) wurden von der Zählung ausgeschlossen. Zur Abschätzung der abgedeckten Fläche auf den Biofilmbildern wurde die otsu-Schwellenwertmethode verwendet [102]. Zur Analyse der Chip-Assays wurde zunächst die Well-Position auf den Bildern geschätzt, indem die Bilder mit einem Schwellenwert versehen wurden, um 98,7 % aller Pixel zu unterdrücken, gefolgt von der Berechnung einer euklidischen Entfernungskarte und der Bestimmung lokaler Maxima. Diese Maxima wurden zur Erstellung von binären Masken verwendet, um die durchschnittliche Pixelintensität für jede Testplatte zu berechnen. Um die Autofluoreszenz des verwendeten Materials zu berücksichtigen, wurde vom ermittelten Ergebnis ein Referenzpunkt subtrahiert. Die Position wurde als Mitte zwischen den beiden Wells jeder Platte ermittelt (um minus 30 Pixel auf der y-Achse versetzt). Die Auswertung ist im Zusatzmaterial des elektronischen Artikels als Jupyter-Notebook-Dokument verfügbar (Supp. IAP [2]).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Evaluierung HPV-spezifischer FISH-Sonden

Teilziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer, spezifischer FISH-Sonden zum Nachweis viraler DNA, die durch die Infektion mit humanen Papillomviren potenziell in eukaryotische Zellen eingebracht wird. Der Fokus lag dabei auf die für den Menschen besonders relevanten Hochrisiko-HPV-Typen 16 und 18. Als Untersuchungsgegenstand dienten vor allem Modellzelllinien, in deren Wirtszellgenom HPV-DNA-Sequenzen ganz oder teilweise integriert vorlagen. Die Untersuchungen sollten weiterhin zur Verifizierung auf FFPE-Patientenmaterial ausgedehnt werden.

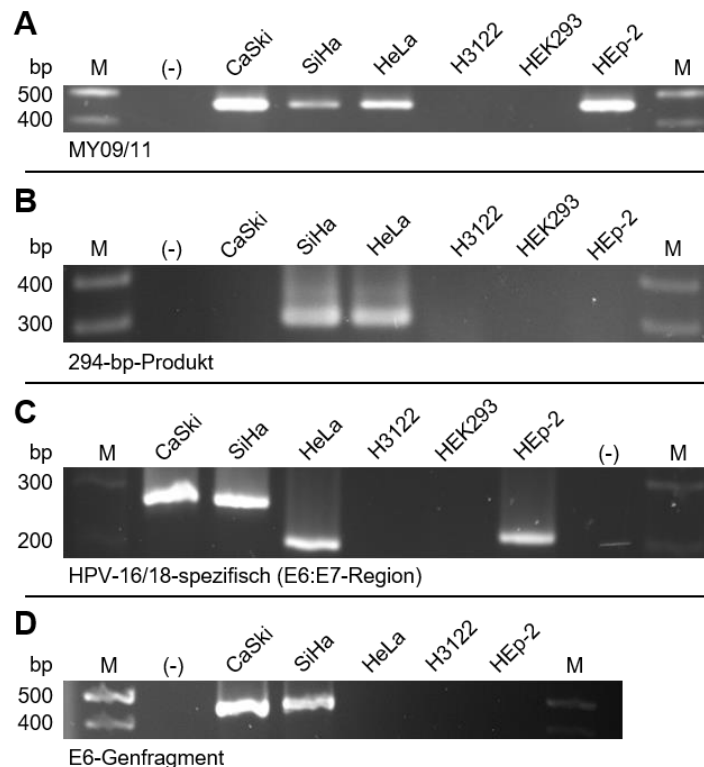


Abb. 14 Überprüfung der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese. Die Abbildung zeigt repräsentativ die Überprüfung auf HPV-spezifische DNA-Sequenzen in den sechs Zelllinien (HPV-16⁺: CaSki, SiHa; HPV-18⁺: HeLa, HEP-2; HPV⁻: H3122, HEK293). Spezifische DNA-Sequenzen in extrahierter gDNA wurden mit entsprechenden Primern durch PCR amplifiziert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Vorhandensein entsprechend großer Banden überprüft. Dargestellt sind vier Primersätze: **A**: MY09/11, HPV-Konsensus-Primer für hochkonservierten L1-ORF zum Nachweis verschiedener HPV-Typen (449–458 bp, abhängig vom HPV-Typ); **B/D**: HPV-16-spezifische Primer, die auf die 294 bp-Region der E6-E7-Gene bzw. ein E6-Gen-Fragment (441 bp) abzielt; **C**: spezifischer Primer für sowohl HPV-16 als auch -18, der in der 2-Plex-PCR (HPV-16: 253 bp Produkt; HPV-18: 201 bp Produkt) verwendet wird. Dieselben spezifischen Primer wurden auch zur Herstellung biotinylierter FISH-Sonden verwendet.

Die im Material- und Methodenteil genannten Modellzelllinien (Tab. 13) wurden fortwährend kultiviert und für die Experimente entsprechend präpariert. Zur Überprüfung auf das Vorhandensein der adressierten Sequenzen wurden diese nach Extraktion der jeweiligen genomischen DNA durch Standardamplifikationsreaktionen (PCR) mit den entsprechenden Primern vervielfältigt. Nach Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese konnten die unterschiedlichen Amplifikate anhand ihrer Fragmentgröße analysiert werden. (Abb. 14).

3.1.1 Sondendesign und Zielsequenzen

Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene Sequenzen des HPV-Genoms (Abb. 2), inklusive der Onkogene E6 und E7, analysiert und geeignete Regionen als Zielbereiche für die spezifische Sondenadressierung ausgewählt. Dafür wurden extern entsprechende Oligonukleotide synthetisiert (Tab. 4), die als Primer zur Herstellung der doppelsträngigen DNA-Sonden durch PCR eingesetzt wurden. Als Sequenzvorlage zur Amplifikation dienten einerseits aufgereinigte, genomische DNAs, die aus den HPV-Sequenz-tragenden Zelllinien extrahiert wurden. Andererseits wurde das Plasmid pML2D (Abb. 6) genutzt, das große Sequenzbereiche von HPV-16 trug und nach entsprechender Aufreinigung in großer Menge zur Verfügung stand. Die verschiedenen DNA-Amplikons wurden schließlich durch Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen bzw. durch Inkorporation von Biotin markiert und nach spezieller Präparation als gebrauchsfertige Sondenmischungen (siehe Tab. 6) in den verschiedenen Hybridisierungsversuchen eingesetzt.

3.1.2 Sondenüberprüfung an Mikropartikeln

Neben den gezielten *in-vitro*-Hybridisierungsexperimenten in Zellen und Geweben wurden einzelne Sonden außerdem auf deren Nachweispotential an artifiziellen Mikropartikeln überprüft. Hierdurch war es möglich die Sondenqualität ohne störende Randeffekte, beispielsweise durch eine ungünstige Fixierung oder behindernde Zellbestandteile, und bei bekannten Pufferbedingungen zu beurteilen. Das Vorgehen wurde im Methodenteil entsprechend beschrieben. Die Bindung der fluoreszenzmarkierten Sonden erzeugte ein mikroskopisch sichtbares Ringsignal (Korona) um die Mikropartikel, das zur Quantifizierung herangezogen wurde (Abb. 15). Dies geschah durch Messung eines Ligandenwertes als relative Fluoreszenzintensität (RFI) eines jeden Mikropartikels mit dem VideoScan-System.

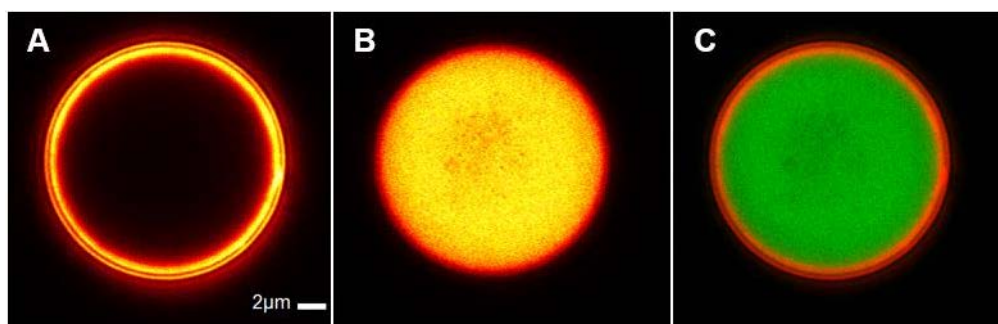


Abb. 15 Korona als Sondensignal an Mikropartikeln. Die Abbildung zeigt repräsentativ mikroskopische Aufnahmen eines einzelnen Mikropartikels nach einer Hybridisierungsreaktion mit fluoreszenzmarkierten Sonden. Gezeigt ist eine Falschfarbendarstellung von Signalen die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zuzuordnen sind (A: Ringsignal (Korona) einer Atto647N-markierten Sonde; B: Eigenfluoreszenz des Partikels (Heatmap-Darstellung: gelb = hohe Intensität, rot = geringe Intensität); C: überlagertes Bild, rot = Sonde, grün = Partikel). Die Aufnahmen erfolgten mit hochauflösender STED-Mikroskopie (Maßstab 2 µm).

Abb. 16 zeigt das repräsentative Resultat der Mikropartikelversuche, bei dem verschiedene Sondenkombinationen verglichen wurden. Die Untersuchung fand jeweils an den funktionalisierten und Streptavidin-modifizierten Oberflächen der Partikel statt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Atto 647N genutzt - in Form von konjugiertem Streptavidin (SA-647N) oder als Modifikation der Oligonukleotidsonden selbst. Zur besseren Erläuterung sind die unterschiedlichen Konditionen schematisch dargestellt. Im Vergleich zu den direkt und einfach fluoreszenzmarkierten Sondenvarianten (Abb. 16 D/F) zeigte sich ein signifikant erhöhtes Signal beim Nachweis der hybridisierten Sonde mittels fluoreszenzmarkiertem Streptavidin (Abb. 16 G). Die Signalintensität übertraf dabei die der Kontrollsonde (Abb. 16 B) um fast das Doppelte. Ohne Fängersonde waren die Signale erwartungsgemäß sehr gering. Dennoch war auch eine geringe Signalintensität für die fluoreszenzmarkierte und biotinylierte Sonde messbar (Abb. 16 F). Diese war jedoch vernachlässigbar, da sie nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze lag und im Vergleich zum Nachweis mittels Streptavidin-Konjugat gering ausfiel. Der Unterschied zur Kontrollsonde (O761) lag hingegen in der einzelsträngigen Form der Sonde begründet. Die weiterhin eingesetzten Sonden (P3, P4, P7, P11) wurden jeweils als aufgereinigte, doppelsträngige PCR-Produkte eingesetzt. Genaue Informationen zu den eingesetzten Oligonukleotiden können Tab. 4 und Tab. 5 entnommen werden. Im Fall der doppelsträngigen Sonden wurde durch die Denaturierungsschritte ein Großteil der fluoreszenztragenden Einzelstränge entfernt, was zu wesentlich geringeren Signalintensitäten führte.

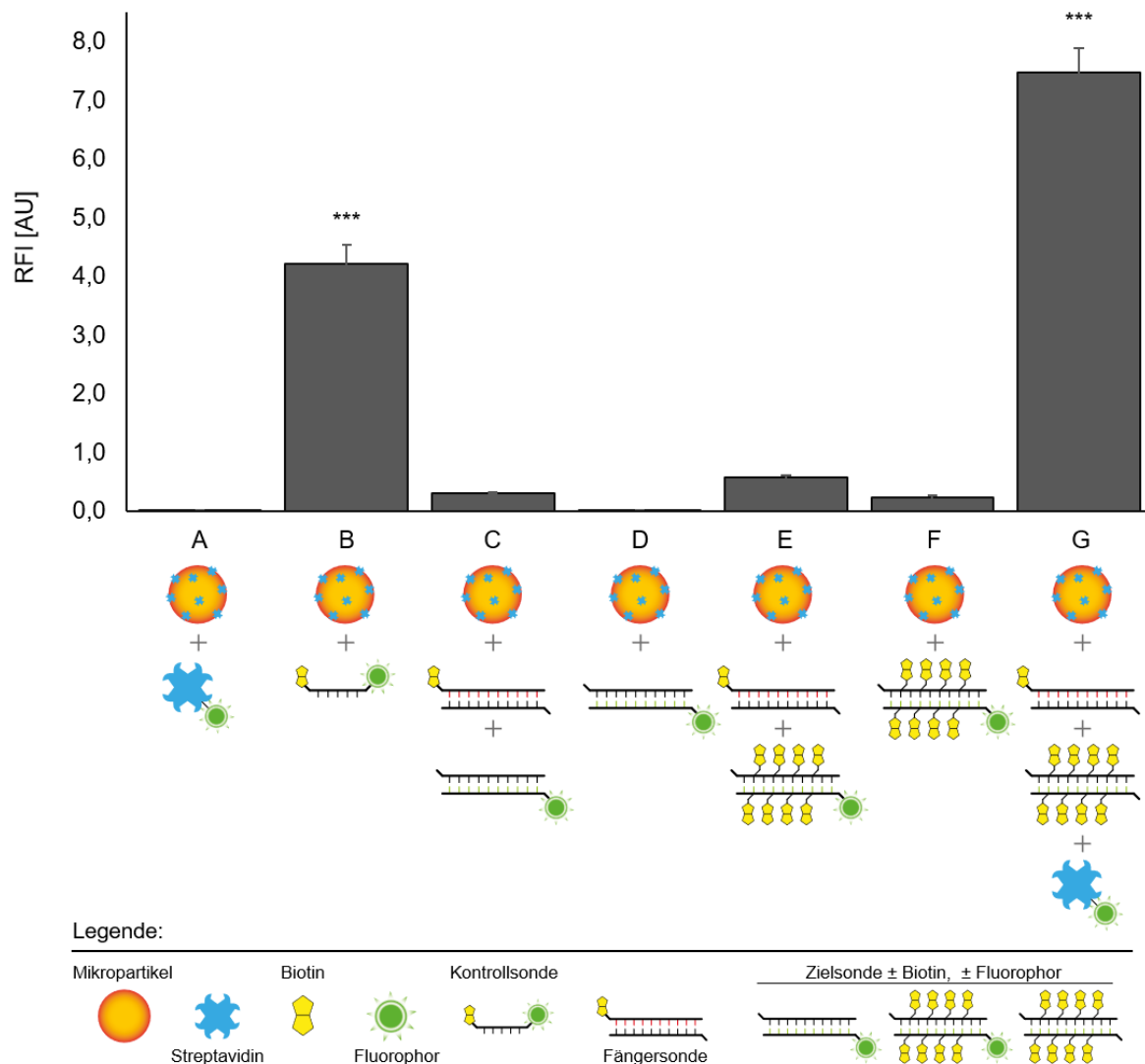


Abb. 16 Vergleich verschiedener Nachweiskombinationen von Sonden an Mikropartikeln. Das Diagramm zeigt das repräsentative Resultat von Sondenuntersuchungen an Mikropartikeln. Die entsprechenden Konditionen sind zur Veranschaulichung im unteren Bereich schematisch dargestellt. Die Fluoreszenzsignale der an den Partikeloberflächen gebundenen Moleküle wurden als relative Fluoreszenzintensitäten gemessen und ausgewertet (RFI, gemittelt; Standardabweichung auf den Balken eingezeichnet). Zur Untersuchung wurden Streptavidin-modifizierte Mikropartikel eingesetzt (12 Populationen parallel). Verglichen wurden folgende Sonden- bzw. Nachweiskombinationen: **A:** Mikropartikel ohne Sonde (Negativkontrolle); **B:** Kontrollsonde (O761: 5'-dual-Biotin, 3'-Atto 647N); **C:** Zielsonde (P7: 294p-647N, 5'-Atto 647N) hybridisiert mit Fängersonde (P11: 5'-dual-Biotin); **D:** Zielsonde (P7: 294p-647N, 5'-Atto 647N) ohne Fängersonde; **E:** biotinylierte Zielsonde (P3: B294p-647N, 5'-Atto 647N) hybridisiert mit Fängersonde (P11: 5'-dual-Biotin); **F:** biotinylierte Zielsonde (P3: B294p-647N, 5'-Atto 647N) ohne Fängersonde; **G:** Nachweis der biotinylierten Zielsonde (P4: B294p) hybridisiert mit Fängersonde (P11: 5'-dual-Biotin) mittels Streptavidin-Konjugat (SA-647N). Die Versuche wurden als Doppelbestimmungen realisiert. Statische Signifikanzbewertung mittels ANOVA und Tukey's HSD (Signifikanzcodes: *** $p < 0,001$); Vergleich zu C als Referenz.

Mit den hier dargestellten Versuchen konnte die grundlegende Hybridisierung doppelsträngiger (Ziel-) Sonden mit mikropartikelgebundenen, komplementären, ebenfalls doppelsträngigen Sequenzen (Fängersonden) gezeigt werden. Es zeigte sich dabei, dass ein signalstarker Nachweis der biotinylierten Sonden durch

Fluorophor-konjugiertes Streptavidin möglich ist, der von der Intensität her deutlich höher ausfiel als durch direkt markierte Sonden. Diese Tatsache qualifizierte die hergestellten Sonden für weitere Untersuchungen im Zellkulturmodell, bei dem das Zielmolekül, die DNA, ebenfalls in doppelsträngiger Form vorlag.

3.1.3 Sondenüberprüfung im Zellkultur- und Gewebemodell

Der finale Einsatzzweck der hergestellten Sonden waren Hybridisierungsversuche *in vitro* zur Detektion spezifischer DNA-Sequenzen in Zellen und Geweben. Nach erfolgreichen Voruntersuchungen durch PCR und Mikropartikelversuche wurden dazu FISH- und CISH-Experimente durchgeführt. Zunächst wurden unterschiedliche Protokolle getestet und etabliert sowie deren Anwendbarkeit auf die vorliegenden Präparateformen untersucht. Nach Optimierung des Vorgehens wurden, wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, entsprechende Untersuchungspräparate hergestellt und die folgenden Versuche nach Abschnitt 2.7 durchgeführt.

Zur grundlegenden Eignung der gewählten Zelllinien und deren Prozessierung wurden vergleichende FISH-Analysen mit kommerziell erhältlichen Sonden vorgenommen. Repräsentative Beispiele zeigen die Aufnahmen in Abb. 17, wobei Inter- und Metaphasezellkerne der Zelllinien CaSki und SiHa nach FISH mit einer kommerziellen Sonde dargestellt sind. Die eigentlich zum Nachweis von Amplifikationen des ALK-Gens entworfene Sonde wurde hier zur prinzipiellen Überprüfung der Methode eingesetzt. Durch die Kombination mit einem zweiten Nachweisbereich (2q11, Alpha-Satelliten in der Zentromerregion von Chromosom 2) konnten hierbei weitere Beobachtungen gemacht werden. Obwohl in normalen Interphasezellkernen jeweils zwei grüne oder orangene Signale erwartet wurden, zeigten CaSki und SiHa je nach beobachtetem Zellkern auch drei bis vier Signale je Farbe. Weiteren Aufschluss dazu gaben zudem Metaphasenpräparationen.

In Abb. 17 zeigen sich besonders in der unteren rechten Aufnahme (SiHa) drei deutlich abgegrenzte Chromosomen mit Signalen auf den jeweils zusammengehörenden Chromatiden. Dieses Ergebnis konnte mit einer Chromosomenaberration, genauer der Amplifikation des Chromosoms 2, assoziiert werden. Diese Tatsache war für den reinen Nachweis mittels HPV-Sonden nicht direkt relevant, musste aber für weitere Auswertungen berücksichtigt werden.

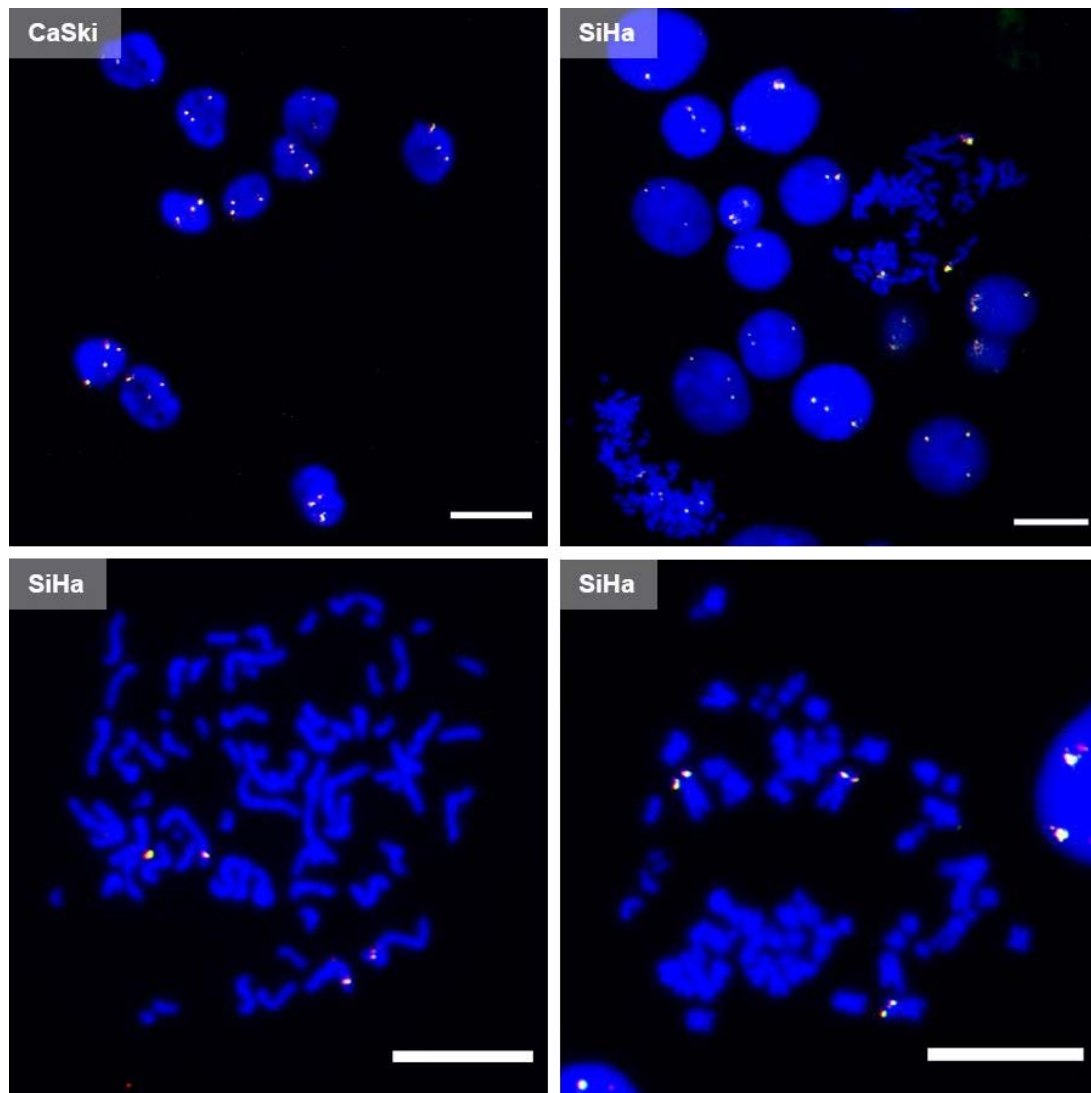


Abb. 17 FISH-Tests mit kommerziellen Sonden. Gezeigt sind repräsentative fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von initialen FISH-Tests an Inter- und Metaphasezellkernen von CaSki und SiHa nach FISH mit der kommerziellen Sonde ZytoLight-SPEC ALK/2q11-Dual-Color-Probe (Zytovision). DNA (Zellkerne, Chromosomen) in blau (DAPI); grün: ALK; orange: 2q11. Maßstab jeweils 20 µm.

Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mussten nicht nur allein Unterschiede zwischen den Zelllinien betrachtet werden, sondern auch Abweichungen der Zellen einer einzigen Linie, da hier eine Inhomogenität des Erbmaterials zwischen einzelnen Zellen bestand. Da in vielen naturwissenschaftlichen Untersuchungen Zelllinien als Modelle eingesetzt werden, können solche Fakten entscheidend sein und müssen gerade bei der Analyse von genetischen Informationen betrachtet werden. Insbesondere bei der Arbeit mit immortalen Tumorzelllinien ist zu berücksichtigen, dass sich Eigenschaften auch während der Kultivierung stetig ändern können – phänotypisch als auch genotypisch.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurden wie schon erwähnt verschiedene Sonden zur Detektion HPV-spezifischer Sequenzbereiche entwickelt, wobei diese durch PCR vervielfältigt wurden und durch das Einbringen von Biotinmolekülen durch unterschiedliche Streptavidin-Konjugate nachweisbar waren. Dazu wurden zunächst einzelne Sonden aufgereinigt und zum Einsatz in der FISH entsprechend vorbereitet (2.6.2). Die finalen Sonden wurden schließlich in mehreren Experimenten an unterschiedlichen Zelllinien getestet, wobei der Nachweis zum einen mit Streptavidin-Cy3 (SA-Cy3) sowie nach Signalverstärkung über TSA (siehe dazu 1.4.2) durch Tyramid-Alexa Fluor 488 (TSA-488) erfolgte. In der folgenden Abb. 18 sind exemplarisch die Testergebnisse verschiedener Sonden in fixierten Zellen anhand von mikroskopischen Aufnahmen vergleichend gegenübergestellt.

Neben der FISH wurde zudem die alternative, enzymbasierte Variante der CISH angewendet, die durch Lichtmikroskopie auswertbare Ergebnisse produziert. Für die CISH wurde ein kommerzielles Kit (Zytovision) genutzt, aus dem neben der (+)- und (-)-Kontrollsonde auch eine ähnliche Biotin-markierte HPV-16-Sonde (vierte Bildreihe) stammte. Diese sind den selbstproduzierten Sondenvarianten (294p, E6p) gegenübergestellt. Alle Aufnahmen links des grauen Streifens stammten dabei von CaSki-Zellpräparaten, rechts davon sind die Zelllinien entsprechend gekennzeichnet. Wie erwartet, zeigten die Kontrollsonden sowie die Negativkontrolle ohne Sonde die erwarteten Resultate. Beim Einsatz von HPV-spezifischen Sonden konnten deutliche Signale in CaSki-Zellen detektiert werden, wobei die kommerzielle Sonde den anderen intensitätsmäßig unterlag.

Der Einsatz der Signalverstärkung lieferte zudem noch stärkere Signale. Im Vergleich zu den Proben ohne Verstärkung wurden selbst bei einem Zehntel der Belichtungszeit noch deutlich auswertbare Intensitäten erreicht. Trotz des positiven und qualitativen Nachweises konnten keine Einzelsignale aufgelöst und quantifiziert werden. Die Signalformen und -bereiche waren wenig bis gar nicht distinkt und variierten zu stark zwischen einzelnen Zellkernen.

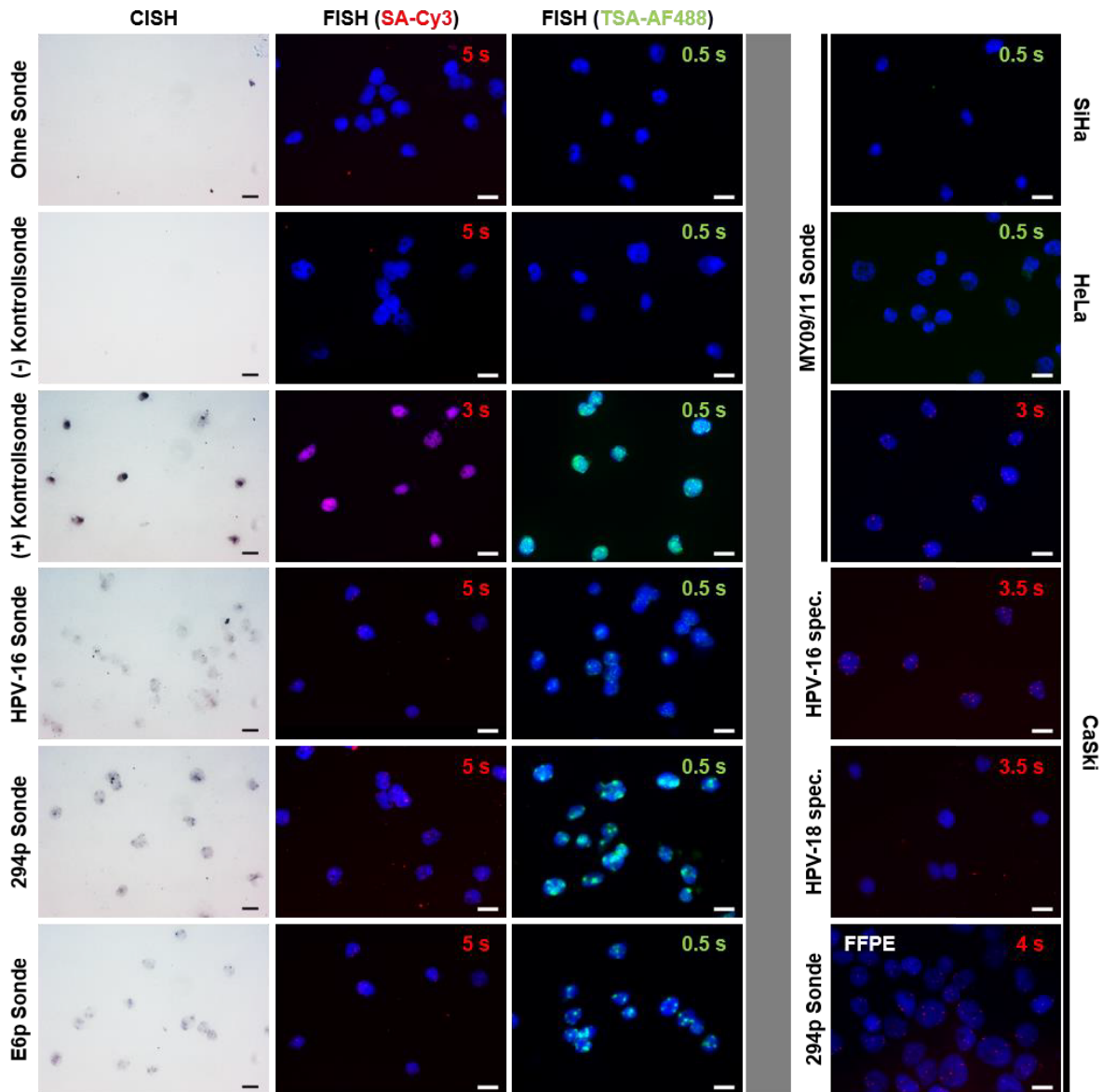


Abb. 18 Vergleich der CISH und FISH (\pm TSA) in fixierten Zellen. Gezeigt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen CISH- bzw. FISH-gefärbter Zellproben. Untersucht wurden Methanol/Eisessig-fixierte Zellen bzw. formalinfixiertes, paraffineingebettetes Modellgewebe (FFPE). Der linke Teil der Abbildung zeigt jeweils CaSki-Zellen. Die Zellen der letzten Spalte sind am rechten Bildrand gekennzeichnet. Nach der Denaturierung der gDNA wurden biotinylierte Sonden (Beschriftung links der Spalten) zur Hybridisierung verwendet. Der Nachweis erfolgte entweder nach Umwandlung eines chromogenen Substrates (NBT/BCIP: lila), der Bindung von Streptavidin-Cy3 (rot) oder nach einer TSA mit AlexaFluor-488-Tyamiden (grün). Belichtungszeiten der Fluoreszenzaufnahmen sind entsprechend angegeben. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Maßstabsbalken = 20 μ m.

Die Unterschiede im Nachweis mit und ohne Signalverstärkung sowie die diffuse Signalverteilung nach TSA ist zur Veranschaulichung an CaSki-Zellkernen in Abb. 19 mit einer stärkeren Vergrößerung dargestellt. Weiterhin war eine Detektion in SiHa- und HeLa-Zellen auch nach Anwendung einer Signalverstärkung nicht möglich. Auch weitere Sonden, deren Sequenzbereiche (MY09/11, HPV-16 und HPV-18 spec.) in den genannten Zellen mittels PCR gut nachweisbar waren, erbrachten kein positives

Ergebnis in FISH oder CISH. In CaSki-Zellkernen zeigten diese jedoch positive Signale. Auch im Gewebemodell (Abb. 18, rechts unten), worauf im Anschluss noch eingegangen wird, zeigte eine Sonde (294p) gut nachweisbare Signale.

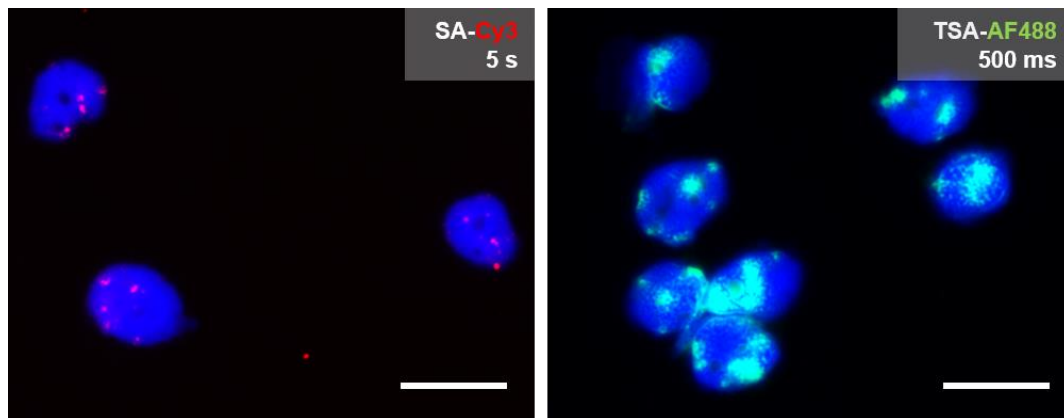


Abb. 19 Vergleich von Nachweismethoden in der FISH Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Methanol/Eisessig-fixierten CaSki-Zellen nach einer FISH (Sonde: E6p), nachgewiesen durch Streptavidin-Cy3 (rot) oder TSA mit Alexa Fluor-488-Tyramiden (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstabsbalken = 20 μ m.

Um die beobachtete Signalverteilung in CaSki-Zellen besser beurteilen zu können, wurden weitere FISH-Versuche an Metaphasenpräparaten durchgeführt (Abb. 20).

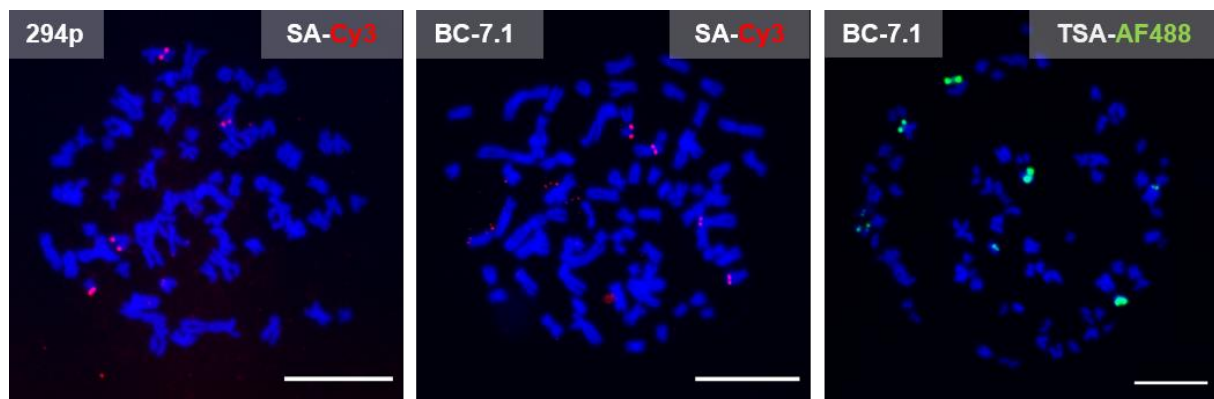


Abb. 20 Metaphasen-FISH mit HPV-Sonden. Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von repräsentativen Metaphasenpräparaten von CaSki-Zellen nach einer FISH (Sonden: 294p, BC-7.), nachgewiesen durch Streptavidin-Cy3 (rot) oder TSA mit Alexa Fluor-488-Tyramiden (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstabsbalken = 20 μ m.

Hierbei zeigte sich eine distinkte Signalverteilung auf bestimmte Chromosomen. Dies konnte sowohl mit einer einfachen, kurzen Sonde (294p) und Nachweis mit SA-Cy3, als auch verstärkt durch eine Sondenmischung (BC-7.1) und TSA gezeigt werden. Detektierbar waren bis zu acht Chromosomen mit jeweils einem separaten Signal auf jedem Chromatid, wobei die Signalstärke je Region variierte. Ob es sich dabei jedoch um völlig unterschiedliche Chromosomen bzw. -paare oder teilweise durch

Aberrationen (Amplifikationen) hervorgerufene, mehrfach auftretende Chromosomen handelte, wurde nicht näher untersucht. In den anderen zur Verfügung stehen Zelllinien konnten auch in Metaphasenzellkernen keine Signale detektiert werden. Unter Berücksichtigung der aus der Literatur bekannten HPV-Kopienzahlen der untersuchten Zelllinien muss angenommen werden, dass zur Detektion mindestens einige hundert Sequenzkopien als Cluster (Vgl. CaSki) vorliegen müssen, um eine Detektion mit den vorgestellten Methoden zu ermöglichen. Selbst mit Signalverstärkung ließ sich so bei geringer Kopienzahl (Vgl. SiHa, HeLa) kein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis bewerkstelligen.

Um die Sensitivität des HPV-Nachweises durch FISH zu erhöhen, wurden weitere Sonden erstellt, die verschiedene Bereiche des HPV-Genoms adressierten (siehe Tab. 6). Diese wurden sowohl einzeln als auch in Kombination in Form von Sondenmischungen getestet. In Abb. 21 sind dazu FISH-Resultate in CaSki-Zellen anhand von repräsentativen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in einer vergleichenden Übersicht dargestellt.

Die FISH-Resultate waren anhand der Signalverteilung (Anzahl und Intensität) und Unterschiede zwischen den Zellkernen nicht hinreichend automatisch quantifizierbar und wurden daher manuell beurteilt. Zur besseren Übersicht wurde die Einschätzung der Sondenqualität relativ zueinander in Tab. 17 dargelegt.

Tab. 17 Einschätzung von Sondenmischungen gegen HPV-Sequenzen

Sondenmix	Einschätzung
S19 B-294E6-P	++ gute Signale
S17 B-E6-P	+ schwache Signale
S16 B-E6.L-P	++ besser als B-E6-P allein
S18 B-E7-P	+ schwache Signale
S20 B-E6.SF-P	- keine Signale
S21 B-MiscE6-P	+ schwache, wenige Signale
S22 B-L1End-P	(+) schwache, teilweise Hintergrundsignale
S23 B-L2Start-P	+ schwach Signale
S24 B-E2.SF-P	- keine Signale, teilweise Hintergrundfärbung
S25 B-E1End-P	(+) schwache Signale
S26 B-E2End-P	+ gute Signale
S27 BC-E7/E6.L	+++ gute, helle Signale
S28 BC-E7/294E6/E6.SF	+++ gute, helle Signale
S29 BC-E7/294E6/MiscE6	++++ gute, helle Signale, zusätzlich kleinere Signale
S30 BC-7.1	+++++ sehr gute und viele helle Signale
S35 dBfw294	- keine Signale
S36 Negativkontrolle (HP)	(-) leichte Hintergrundfärbung
S37 Negativkontrolle (HP+)	- .

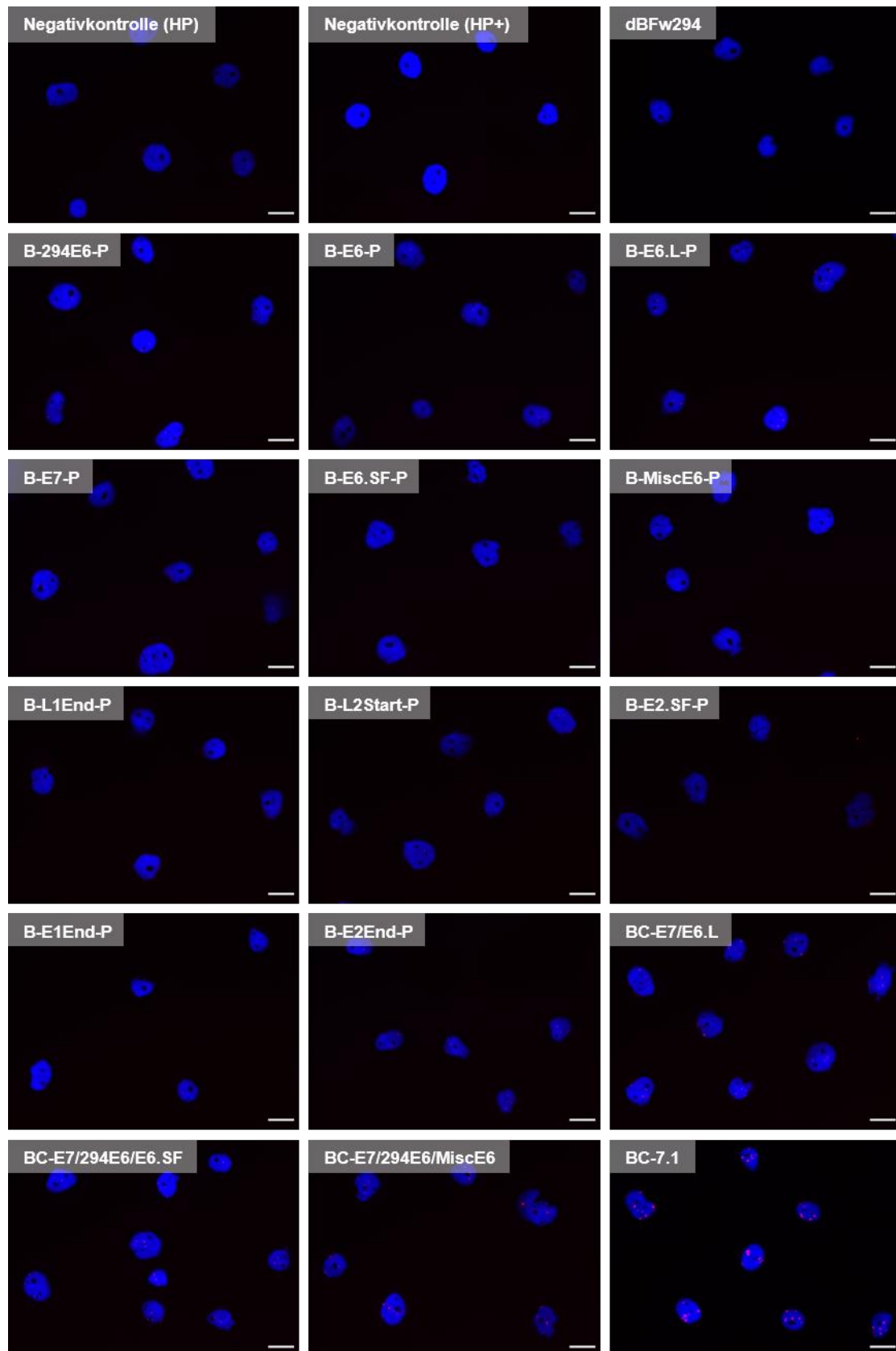


Abb. 21 Vergleich von Sondenmischungen gegen HPV-Sequenzen. Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CaSki-Zellen nach FISH mit unterschiedlichen Sondenmischungen. Alle Proben stammten aus einem einzelnen FISH-Ansatz und wurden identisch behandelt. Alle Aufnahmen wurden mit gleichen Einstellungen erstellt. Nachweis jeweils mit SA-Cy3 (rot). Gegenfärbung mit DAPI (blau). Maßstabsbalken = 20 µm.

Im Ergebnis zeigte sich, dass Sondenmischungen, die mehrere Sequenzbereiche abdecken, deutlich stärkere Signale erzeugen und zu bevorzugen sind. Besonders die Kombination aus sieben unterschiedlichen Einzelsonden (BC-7.1) zeigte im vorliegenden Fall (CaSki) Vorteile in Form von zahlreichen, hellen Einzelsignalen. Problematisch blieb jedoch der Fakt, dass auch mit dieser Art von Sonden kein effektiver Nachweis von HPV-Sequenzen in Zellen mit wenigen Kopien (SiHa, HeLa) erreicht werden konnte.

Neben der Analyse von Einzelzellen (bspw. aus Schleimhautabstrichen), ist die Untersuchung von Gewebeproben in der Onkologie ein entscheidendes Mittel für die Beurteilung des Krankheitszustandes. Insbesondere bei viralen Infektionen kann eine Untersuchung infizierter Gewebereiche wichtige Erkenntnisse zum weiteren Verlauf der Erkrankung liefern. Gerade FISH-Analysen können durch die Möglichkeit zur Lokalisation infizierter Regionen und Abschätzung der Viruslast bei der Risikobewertung helfen.

Daher sollten weitere Versuche zeigen, inwieweit die erstellten Sonden auch in FFPE-Gewebe eingesetzt werden können. Dazu wurden zum einen Pseudogewebe aus Zellkulturen präpariert, als auch vorher charakterisierte Patientenproben analysiert. Vor den eigentlichen FISH-Untersuchungen wurden die unterschiedlichen Proben (3- μ m-Schnitte) zunächst entparaffiniert und zur Beurteilung der Qualität und Lokalisation geeigneter Bereiche histologisch mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Abb. 22 zeigt dazu repräsentativ Bereiche aus Pseudogewebe und Patientenmaterial.

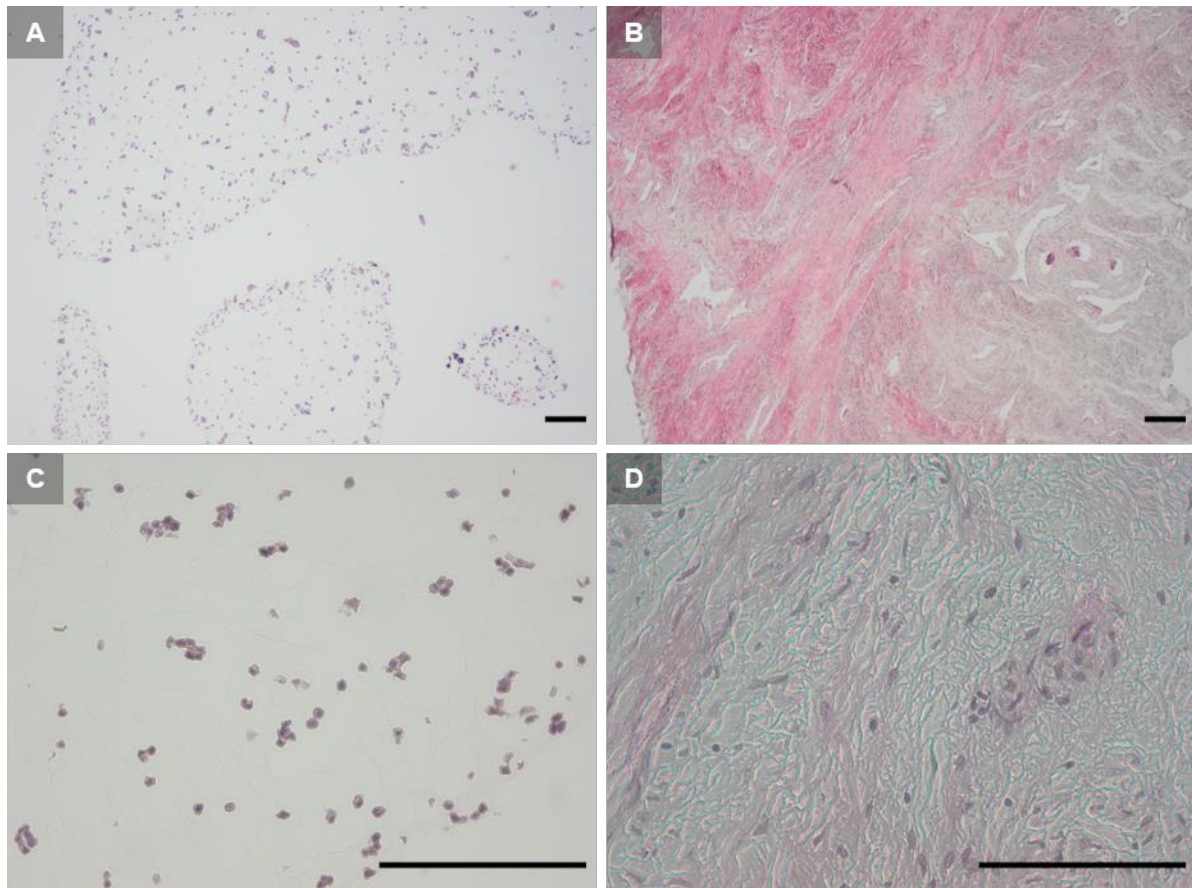


Abb. 22 HE-Färbung von FFPE-Geweben. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen nach einer Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE). Die Abbildung zeigt dabei repräsentativ Bereiche aus Pseudogewebe (**A/C**, CaSki) und Patientenmaterial (**B/D**, #12, HPV16⁺), aufgenommen mit einem 4×- (**A/B**) und 20×- (**C/D**)-Objektiv. Maßstab jeweils 200 µm.

Nach Auswahl geeigneter Bereiche wurden FISH-Untersuchungen an den entparaffinierten und entsprechend aufbereiteten Probenmaterialien durchgeführt. Dies wird, äquivalent zu Abb. 22, in Abb. 23 dargestellt. Trotz der erfolgreichen Detektion von HPV-spezifischen Sequenzen mittels 294p-Sonde und SA-Cy3 im Gewebemodell (CaSki-Zellen) konnte in den vorliegenden Patientenproben, auch nach Untersuchung unterschiedlicher Geweberegionen, kein FISH-Nachweis erreicht werden. Dabei lieferte auch die Nutzung anderer Sonden (u.a. BC-7.1-Sondenmix), zusätzlicher Signalverstärkung und unterschiedlicher Probenaufarbeitung stets negative Ergebnisse. Hinzu kamen zusätzliche Störeffekte durch unspezifische Färbungen, die die Analyse aufwendiger machten und im gleichen Maße auch in der Negativkontrolle auftraten (trotz zusätzlicher Blockierungsschritte).

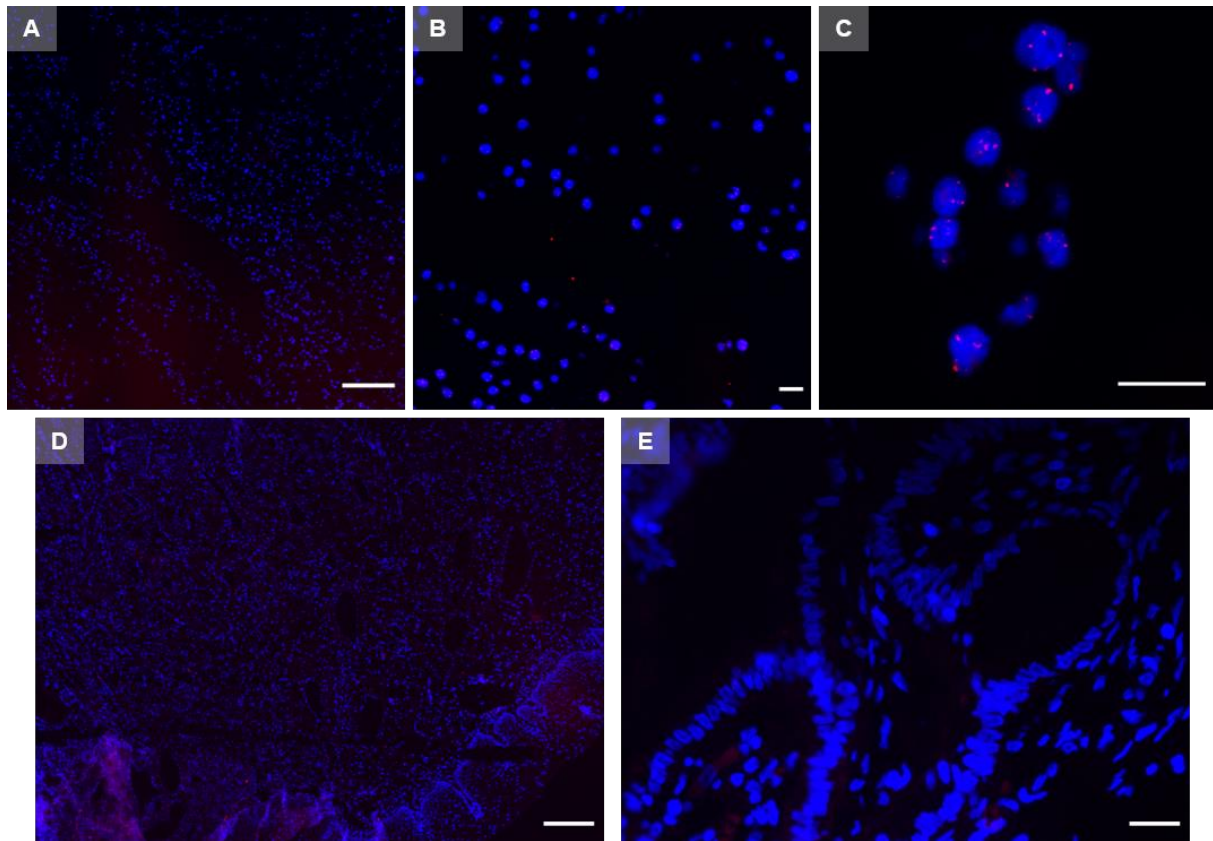


Abb. 23 FISH an FFPE-Material. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von FFPE-Gewebe nach einer FISH (Sonde 294p). Die Abbildung zeigt repräsentativ Bereiche aus Pseudogewebe (**A-C**, CaSki) und Patientenmaterial (**D/E**, #12, HPV16⁺). Die Detektion der biotinylierten Sonden erfolgte durch Streptavidin-Cy3 (rot) oder TSA mit Alexa Fluor-488-Tyramiden (grün). Zellkerne: DAPI (blau). Aufgenommen mit einem 4x-(**A/D**), 20x-(**B**) oder 40x-(**C/E**)-Objektiv. Maßstäbe: **A/D** = 200 μ m, **B/C/E** = 20 μ m. Fazit zum Einsatz neuer, spezifischer FISH-Sonden

Als Fazit zu den Untersuchungen von geeigneten FISH-Sonden zur HPV-Detektion lassen sich einige Punkte zusammenfassen. Das Vorhandensein von HPV-DNA-Sequenzen in Zelllinien konnte durch PCR bestätigt werden. Dabei konnte spezifisch zwischen Typ 16 und Typ 18 unterschieden werden. Weiterhin war das Protokoll zur Synthese von Biotin-markierten Sonden mit HPV-Sequenz-spezifischen Primern erfolgreich, wobei aufgereinigte gDNA und Plasmid-DNA als Vorlage gleichermaßen geeignet waren. Die Sonden konnten zudem für Multiplexprüfungen in Mikropartikelanwendungen verwendet werden. In CISH- und FISH-Experimenten war es möglich, mit den kreierte Sonden HPV-spezifische Sequenzen im Zellkulturmaßstab in hochbelasteten chromosomalen Bereichen (hunderte Kopien in CaSki-Zellen) nachzuweisen. Dies gelang ebenso im Gewebemodell aus Zellkulturen, wobei beachtet werden musste, dass die Zellen im Pseudogewebe nicht frei dreidimensional gewachsen sind und dadurch keine gewebespezifische extrazelluläre Matrix ausgebildet wurde. Obwohl dadurch in der Vergleichbarkeit zu echten Gewebeproben

Abstriche gemacht werden mussten, war dieses Zellmodell dennoch gut geeignet, um die Sonden annähernd FFPE-getreu testen zu können.

Insgesamt problematisch zu betrachten war hingegen der FISH-Nachweis von HPV-Sequenzen bei nur potenziell geringer Viruslast der Proben. Als Beispiel dafür dienten die Zelllinien SiHa und HeLa, bei denen die vorgestellten Methoden nicht sensitiv genug waren, um nur wenige Kopien je Zelle (unter 50) qualitativ nachzuweisen. Ebenso verhielt es sich mit dem Patientenmaterial, für welches mit FISH kein positiver Nachweis auf HPV möglich war. Da die Patientenproben allerdings mit sensitiveren Methoden (PCR, Hybridisierungsteststreifen) validiert worden waren, mussten verschiedene Ursachen bei der Problemanalyse berücksichtigt werden.

In diesen Fällen können zwei grundlegende Dinge den Nachweis negativ beeinflussen. Zum einen ist eine äußerst hohe Sensitivität notwendig, um auch einzelne gebundene Sonden zu detektieren. Dies kann auf unterschiedliche Weise verbessert werden. So liefert der Einsatz von Signalverstärkungsstrategien, beispielsweise enzymatisch durch TSA, oder das Einbringen stark fluoreszierender Konstrukte wie DNA-Origamis eine insgesamt höhere Signalintensität am Zielort. Weiterhin können Detektionssysteme mit weitaus höheren Sensitivitäten genutzt werden, wie beispielsweise lasergestützte Mikroskope, die in Kombination mit superaflösenden Techniken (z. B. STED) auch Partikel in Dimensionen weniger zehntel Nanometer abbilden können.

Auf der anderen Seite ist die initiale Bindung der Sonde entscheidend. Neben der Spezifität der Basenpaarung und Länge der Sonde, die vor allem deren Mobilität und Bindungseigenschaften beeinflussen, ist auch die vorliegende Form entscheidend, nämlich einzel- oder doppelsträngig. Neben der Sondenstabilität wird hierdurch auch die Geschwindigkeit und Effizienz der potenziellen Bindung bestimmt. Beides hat Vor- und Nachteile, sowohl in der Herstellung als auch in der Anwendung. Einzelsträngige DNA-Sonden werden vor allem bevorzugt, wenn sehr viele gleiche Zielmoleküle bzw. zahlreiche Kopien der entsprechenden Zielsequenzen vorhanden sind. Beispiele dafür sind die FISH-basierte Identifikation von Bakterien über rRNA-Moleküle oder die spezifische Chromosomenfärbung über repetitive DNA-Bereiche an Zentromeren oder Telomeren. In solchen Fällen werden meist kurze (ca. 30 bp) einzelsträngige Oligonukleotide eingesetzt, die sich chemisch in großer Menge synthetisieren lassen. Weitere Vorteile besonders kurzer Sonden sind die höhere Diffusionsrate sowie die bessere Membrangängigkeit, da diese mit der Sondenlänge abnehmen.

Dennoch macht der Einsatz doppelsträngiger Sonden Sinn, wenn es um die Abdeckung großer Genregionen- oder Chromosomenabschnitte im oberen Kilobasenbereich geht. Mittels PCR lassen sich auf diese Weise relativ einfach und kostengünstig auch längere Sonden herstellen und vervielfältigen, wobei große Template, beispielsweise ganze Vektoren bzw. Virusgenome genutzt werden können, ohne deren komplette Basenabfolge zu kennen. Auch durch die Vervielfältigung mit Hilfe von Plasmiden können nach optionalem Restriktionsverdau ebenfalls zahlreiche, doppelsträngige Sondenfragmente erhalten werden. Da bei der DNA-FISH ohnehin eine Denaturierung der gDNA notwendig ist, lassen sich unter Berücksichtigung entsprechender Hybridisierungsparameter auch mit längeren, doppelsträngigen Sonden (bis ca. 1.000 bp) gute Ergebnisse erzielen. Vorteilhaft sind hierbei eine schnellere Hybridisierung im Vergleich zu kurzen Sonden und eine doppelte Markierung durch Hybridisierung mit beiden DNA-Strängen.

Aber auch das Zielmolekül selbst ist von großer Bedeutung. Während einzelsträngige Moleküle, die meist in einer großen Anzahl vorliegen (z. B. mRNA), relativ einfach zugänglich und nachweisbar sind, muss bei der doppelsträngigen DNA zunächst eine Denaturierung durch Hitze und/oder Chemikalien erfolgen, um anschließend einzelne bis wenige Bereiche zugänglich zu machen. Danach muss schließlich gewährleistet sein, dass bevorzugt die Sonde und nicht die komplementären DNA-Stränge rehybridisieren. Dies kann durch entsprechend hohe Sondenkonzentrationen begünstigt und mit vielen Zielkopien gut funktionieren, bringt aber für Einzelsequenzen weniger 100 bp Schwierigkeiten mit sich.

Um eine FISH-Analyse in solchen Fällen dennoch zu ermöglichen, könnten andere, aufwendigere Methoden nützlicher sein. Beispiele dafür sind unter anderem die *in-situ*-PCR, bei der die Zielsequenz zunächst *in situ* amplifiziert wird, um im Anschluss eine markierte Sonde zum Nachweis einzusetzen [103, 104] oder weiterhin die CASFISH, bei der die initiale Sondenhybridisierung unter weniger harschen Bedingungen durch eine Variante des Enzyms Cas9 vermittelt wird [105].

Insgesamt bieten FISH-Untersuchungen, gerade durch die Auswertbarkeit mittels Fluoreszenzmikroskopie große Vorteile, sind aber nicht in jedem Fall gut geeignet. Für große DNA-Abschnitte, wie ganze Gen- oder Chromosomenbereiche von mehreren 100 kb, ist die FISH eine hervorragende Methode und liefert Aussagen, beispielsweise über chromosomale Aberrationen (Amplifikationen, Translokationen), die anders gar nicht oder nur schwierig feststellbar wären. Zum Nachweis weniger, kurzer DNA-

Sequenzen wie in dieser Arbeit ist die konventionelle FISH hingegen nicht optimal und funktioniert nur bedingt im Rahmen bestimmter Konditionen. In solchen Fällen sind fast immer Strategien zur Signalverstärkung notwendig, worauf in den nächsten Abschnitten näher eingegangen werden soll.

3.2 DNA-Origamis als Detektionsstrategie an Mikropartikeln

Da ein sensitiver Nachweis in der FISH-Analytik abhängig von Größe und Verfügbarkeit der Zielsequenzen schwierig sein kann, wurden innovative Detektions- bzw. Signalverstärkungsstrategien untersucht. Um deren Eignung zu testen, wurden sie im Rahmen von Mikropartikelexperimenten unter definierten Bedingungen analysiert. Ein neuer Ansatz in diesem Bereich ist der Einsatz von zahlreichen sehr dicht-gepackten Fluorophoren in Form von gefalteten DNA-Konstrukten, den sogenannten DNA-Origamis. Unter entsprechend angepassten Bedingungen liefern sie ein intensives, punktuell fluoreszenzsignales Signal, das den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis einzelner Moleküle ermöglicht.

Im Folgenden werden DNA-Origamis als Detektionsstrategie für Sonden an Mikropartikeln betrachtet und deren Einsetzbarkeit eingeschätzt. Für die Versuche wurde ähnlich vorgegangen wie bei der Evaluierung von Sonden an Mikropartikeln. Der Nachweis mittels DNA-Origamis wurde, wie in Abschnitt 2.9 beschrieben, durchgeführt. Als Untersuchungsobjekte wurden Mischungen aus verschiedenen Partikelpopulationen eingesetzt. Als Alternative zur Beschichtung mit Streptavidin (in diesem Abschnitt als core-Streptavidin bezeichnet), wurden zusätzlich Partikel mit einer Neutravidinbeschichtung vergleichend untersucht. Zum Einsatz kamen jeweils fluoreszierende DNA-Origamis (würfelförmig, Kantenlänge ca. 23 nm, Fluorophore: Atto 647N, Fa. GATTAquant), die zusätzlich mit wenigen Biotinmolekülen modifiziert waren. Neben diesen Standardkonstrukten (STD) wurden zusätzlich Origamis untersucht, die durch eine besonders starke Biotinylierung charakterisiert waren (highBio). Bei der Anwendung der gefalteten DNA-Konstrukte waren besondere Pufferbedingungen, insbesondere die $MgCl_2$ -Konzentration, zu beachten. Eine weitere Schwierigkeit bestand in der geringen Konzentration im μM -Bereich, die eine besonders genaue Handhabung unabdingbar machte.

Nachdem erste *proof-of-principle*-Tests zum Nachweis hybridisierter, biotinylierter Sonden an Mikropartikel nach dem Standardprotokoll nicht zielführend waren, wurden weitere Bindungsuntersuchungen direkt an den modifizierten Mikropartikeloberflächen

durchgeführt (Ergebnisse in Abb. 24, Abb. 25). Der Fokus lag hier vor allem auf der Untersuchung verschiedener Pufferbedingungen. Als Referenz wurde standardmäßig mit TBS-T begonnen. Zunächst wurde der Effekt unterschiedlicher $MgCl_2$ -Konzentrationen untersucht (Abb. 24 A/B). Nach Herstellerangaben waren mindestens 5 bis 20 mM nötig, um die Stabilität der Origamis zu gewährleisten. Nachdem die doppelte und zehnfache Menge (40 und 200 mM $MgCl_2$ in TBS-T) den Bindungsanteil steigern konnte, sollte überprüft werden, ob eine weitere Konzentrationserhöhung sinnvoll war.

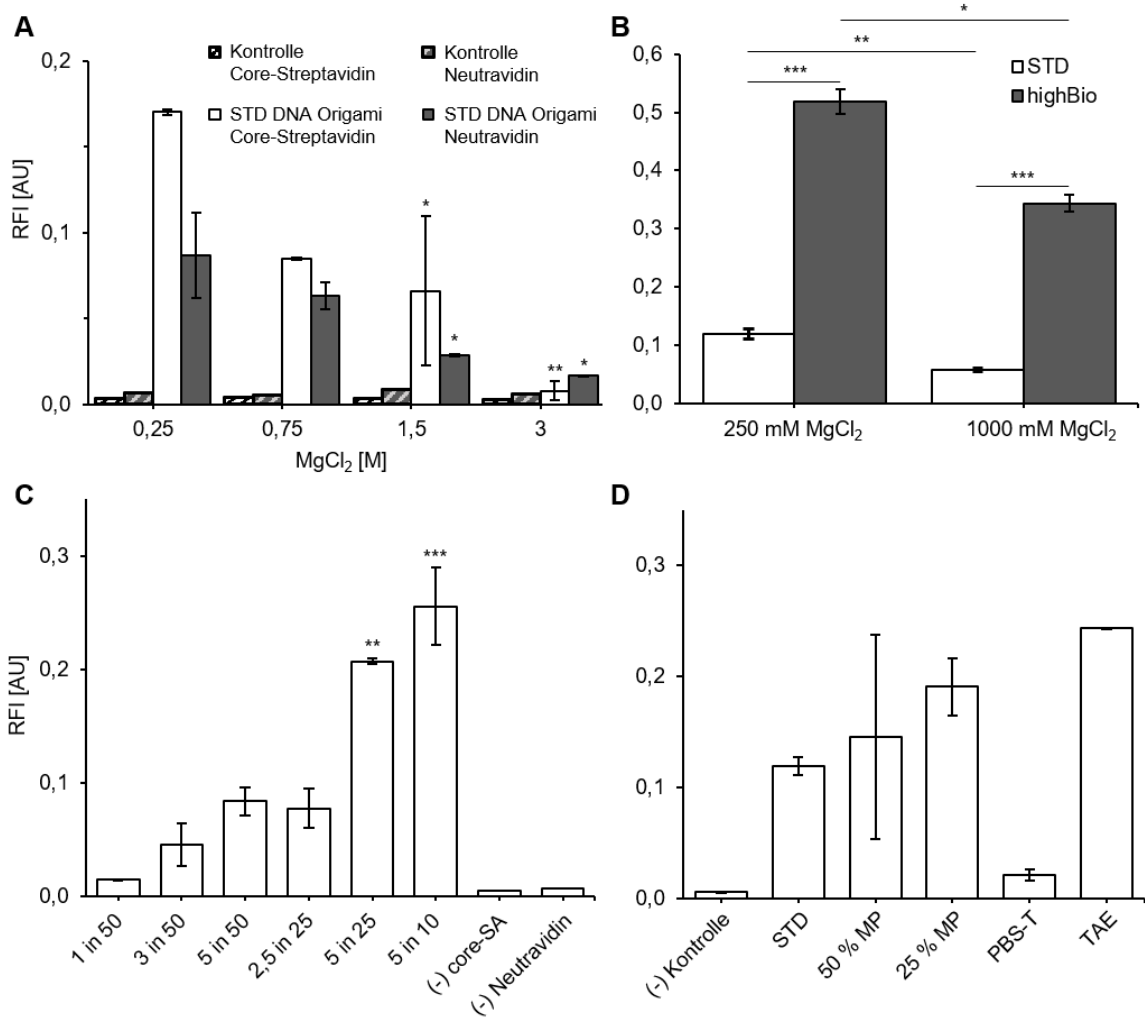


Abb. 24 Untersuchung von DNA-Origamis unter verschiedenen Konditionen. Gezeigt sind die Ergebnisse der Bindungsversuche von Fluorophor-tragenden DNA-Origamis (STD: Standard, highBio: stark biotinyliert) an Mikropartikeloberflächen (modifiziert mit core-Streptavidin oder Neutraavidin; je 12 Populationen parallel). Die Diagramme stellen die Bindungsmengen anhand der gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten dar (RFI). **A:** Vergleich der core-Streptavidin- und Neutraavidin-Beschichtung unter verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen. **B:** Vergleich von Standard- und stark biotinylierten Origamis bei 250 und 1.000 mM $MgCl_2$ (5 μ l Origamis in 25 μ l TBS-T). **C:** Vergleich unterschiedlich großer Versuchsansätze und Verdünnungen (STD Origami, core-SA, 250 mM $MgCl_2$ final in TBS-T; Angaben in μ l). **D:** Vergleich unterschiedlicher Partikelmengen und weiterer Puffer (STD, 250 mM $MgCl_2$). Alle Versuche wurden als Doppelbestimmungen realisiert. Statische Signifikanzbewertung mittels ANOVA und Tukey's HSD (Signifikanzcodes: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$); **A:** Vergleich zu 0,25 M je Avidinvariante, **B:** Vergleiche wie dargestellt, **C:** Vergleich mit „5 in 50“ als Referenz.

Wie Abb. 24 A allerdings zeigt, führte eine weitere schrittweise Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration im Puffer zu einer Abnahme der Signalintensität. Bei einer Stoffmengenkonzentration von 3 M $MgCl_2$ lagen die gemessenen Werte sogar nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze des genutzten Analysesystems. Bei Konzentrationen oberhalb von 1,5 M $MgCl_2$ traten neben den schwächer werdenden Fluoreszenzsignalen noch zusätzlich Messprobleme auf. Diese schlossen den Einsatz erhöhter Konzentrationen aus. Als problematisch erwies sich dabei, dass die Mikropartikel nicht mehr auf den Plattenboden absanken, sondern an der Flüssigkeitsoberfläche oder teilweise mitten im Puffer schwebten. Diese Tatsache erklärte sich mit einer Vergrößerung der Auftriebskraft, hervorgerufen durch eine Salz-bedingte Dichteerhöhung, und musste vermieden werden. Die konzentrationsabhängige Abnahme in der Signalintensität wurde für beide Origamivarianten (STD, highBio) äquivalent festgestellt. Eine signifikante Reduzierung der RFI wurde jeweils bereits bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 1 M bestimmt (Abb. 24 B). Eine Konzentration von 250 mM $MgCl_2$ wurde schließlich als optimal für die Folgeversuche definiert.

Weiterhin wurden signifikante Unterschiede zwischen den Beschichtungsvarianten (core-Streptavidin, Neutravidin) und den Origamitypen (STD, highBio) beobachtet. Dabei wurden an core-Streptavidin-modifizierten Mikropartikeln mehr als doppelt so hohe Bindungsmengen nachgewiesen wie an Neutravidin-Partikeln (Abb. 24 A). Die stark biotinylierte Origami-Variante (highBio) führte zu einer bis zu fünffachen Signalintensität verglichen mit dem Standardkonstrukt (STD, bei 250 mM; Abb. 24 B).

Da der Umgang mit diesen sensiblen Konstrukten eine Arbeit bei geringen Konzentrationen und Volumina erforderte, wurden unterschiedliche Verdünnungen der Origami-Stocklösung und Einsatzmengen getestet (Abb. 24 C). Erwartungsgemäß zeigte die höchste getestete Einsatzmenge (5 in 10 μ l entsprechend einer 1:2-Verdünnung) die besten Resultate. Eine 1:5-Verdünnung (5 in 25 μ l) zeigte ebenso eine signifikante Signalerhöhung (verglichen mit 5 in 50 μ l). Hinsichtlich des einzusetzenden Volumens war hiermit ein Kompromiss für weitere Versuche im kleinen Maßstab gefunden.

Neben der Reduzierung der eingesetzten Menge an Mikropartikeln (50 und 25 % der Standardmenge, Verbesserung des Origami-Oberflächen-Verhältnisses), zeigte insbesondere der Einsatz von TAE-Puffer einen Vorteil für die Bindung der DNA-Origamis (Abb. 24 C). Dieser Einfluss wurde weiter untersucht und die Ergebnisse verschiedener TAE- und TBS-T-Puffer wurden gegenübergestellt (Abb. 25). Insgesamt

erwies sich 1 %iger TAE-Puffer mit 250 mM MgCl₂ als beste Lösung für diese Art von Versuchen an Mikropartikeln. Dennoch mussten insgesamt Abstriche gemacht werden, da im Vergleich zu einer einfach fluoreszenzmarkierten Kontrollsonde (O761, bei 50 nm in 50 µl Reaktionsvolumen) in der VideoScan-Analyse nur weniger als ein Siebentel der Fluoreszenzintensität erreicht werden konnte.

Da diese im automatisierten Mikroskopiesystem (VideoScan) gemessenen Intensitäten teilweise nur knapp über der Nachweisgrenze lagen, wurde zur weiteren Beurteilung der Bindungsereignisse die hochauflösende STED-Mikroskopie eingesetzt. Hiermit waren bei entsprechend guten Probenpräparationen Auflösungen von 20-30 nm möglich. Auch in diesem konkreten Anwendungsfall zeigte diese Mikroskopieform einen großen Vorteil.

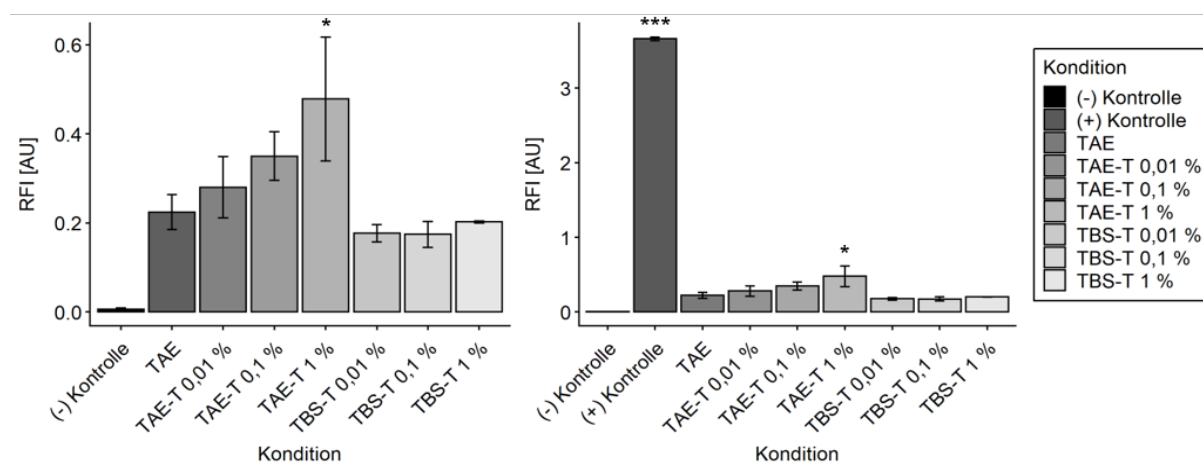


Abb. 25 Bindung von DNA-Origamis in TAE- und TBS-T-Puffern. Gezeigt sind Ergebnisse der Bindungsversuche von fluoreszierenden DNA-Origamis an Streptavidin-modifizierten Mikropartikeloberflächen (je 12 Populationen parallel). Die Diagramme stellen die Bindungsmengen anhand der gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten dar (RFI). Links ohne, rechts mit (+) Kontrolle (50 nM O761-Sonde). Versuche in Doppelbestimmungen. Statische Signifikanzbewertung mittels ANOVA und Tukey's HSD (Signifikanzcodes: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$); Vergleich zu TAE als Referenz.

Selbst im Falle nur schwacher Intensitätswerte beim automatisierten VideoScan-System konnten mittels STED-Mikroskopie noch zahlreiche Signale auf der Oberfläche einzelner Mikropartikel detektiert werden. Begründet durch die hohe Auflösung wurde auch keine typische Korona um die Partikel beobachtet, wie sie bei der Bindung von Oligonukleotiden auftrat (siehe Abb. 15). Eine erwartete dichte, homogene Verteilung auf der Oberfläche zeigte sich allerdings ebenso wenig. Vermutlich führten sterische Behinderungen zu den signalarmen Lücken auf der Oberfläche, wobei sich allerdings eine Varianz zwischen einzelnen Partikelpopulationen zeigte.

In den folgenden Abbildungen sind zur Veranschaulichung der Resultate mikroskopische Aufnahmen von Mikropartikeln mit oberflächengebundenen DNA-Origamis dargestellt. In Abb. 26 zeigte sich die nur sporadische Beschichtung der Partikel mit den fluoreszenzmarkierten Origamis zu Beginn der Versuche. Beim Größenvergleich fiel zudem auf, dass dabei nicht einzelne Origamistrukturen abgebildet wurden, sondern vielmehr größere Cluster. Diese wurden wahrscheinlich durch ungünstige Pufferbedingungen und/oder degenerierte Konstrukte hervorgerufen.

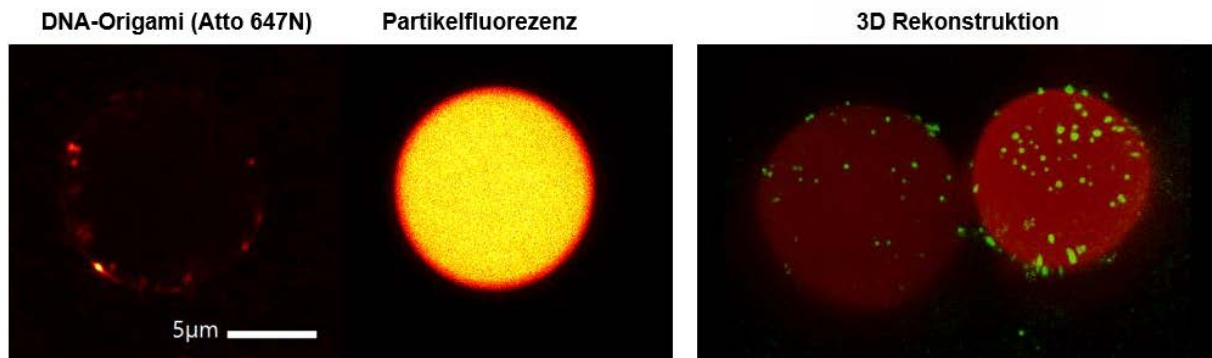


Abb. 26 Mikropartikelenaufnahmen nach DNA-Origami-Bindung. Dargestellt sind hochauflösende, mikroskopische Aufnahmen (STED) von DNA-Origamis auf Mikropartikeln. Gezeigt ist die anfängliche Situation in TBS-T Puffer bei 20 nM $MgCl_2$ als optischer Schnitt (links) und 3D-Rekonstruktion (rechts).

Im Vergleich hierzu stellt Abb. 27 gebundene DNA-Origamis nach angepassten Pufferbedingungen mit erhöhten $MgCl_2$ -Konzentrationen dar. Subjektiv waren vor allem bei der STD-Variante weniger Signale zu erkennen als beim highBio-Typ. Im Vergleich zu 0,5 M $MgCl_2$ schien die Erhöhung auf 1 M $MgCl_2$ die Bindungsmenge ebenso zu begünstigen.

Obwohl die prinzipielle Möglichkeit bestand, Einzelsignale optisch aufzulösen, wurde keine Quantifizierung basierend auf STED-Aufnahmen durchgeführt. Grund hierfür waren die besonderen Präparations- und Mikroskopiebedingungen. Trotz spezieller Eindeckmedien und weiterer Anpassungen wurden ein teilweises Abdriften und eine rasche Schädigung der Mikropartikel beobachtet. So konnten keine optimalen Bedingungen für eine (semi-) automatisierte Messung (z-Stapel) einer statistisch relevanten Anzahl an Objekten gewährleistet werden. Das STED-System wurde daher nur für qualitative Aussagen hinsichtlich der Oberflächenverteilung und Clusterbildung von Origamis eingesetzt. In zukünftigen Versuchen könnten immobilisierte Mikropartikel in Verbindung mit stabilisierenden Pufferbedingungen eine genauere Abschätzung der Origami-Anzahl begünstigen.

DNA-Origamis bieten prinzipiell den großen Vorteil, dass sie durch individuelle, spezifische Sequenzfragmente in jegliche gewünschte Form gefaltet werden können. Hinzu kommt die Möglichkeit, sie durch Inkorporation bestimmter Moleküle zu modifizieren und mit verschiedenen Eigenschaften auszustatten.

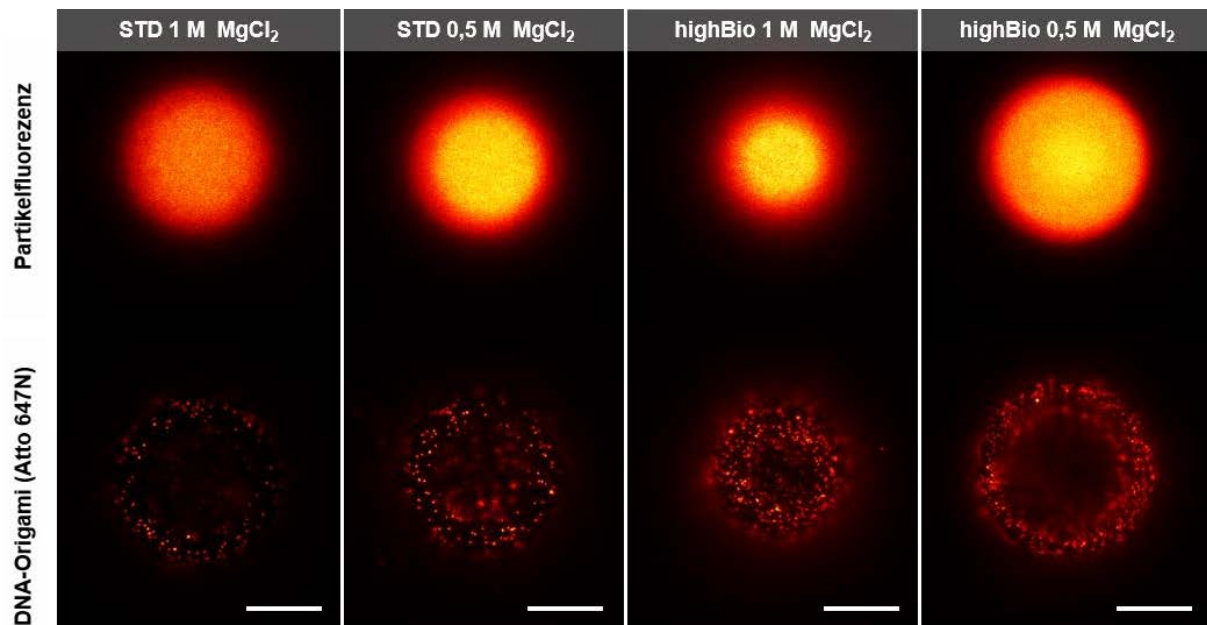


Abb. 27 Mikroskopischer Vergleich der DNA-Origami-Bindung. Dargestellt sind hochauflösende, mikroskopische Aufnahmen (STED) von DNA-Origamis auf Mikropartikeln. Gezeigt sind einzelne Standard- und stark biotinylierte Partikel (STD, highBio) in 1,0 bzw. 0,5 M $MgCl_2$. Maßstab 5 μm .

Neben bindungsaktiven Molekülen, wie beispielsweise Biotin, können auch in sehr kleinen räumlichen Dimensionen (20-30 nm) sehr viele Fluoreszenzmoleküle (ca. 100) vereint werden, was zu starken Fluoreszenzintensitäten führen kann.

Die Ergebnisse dieser Experimente haben gezeigt, dass fluoreszierende DNA-Origamis für bestimmte Anwendungen, unter Verwendung hochauflösender Mikroskope, eingesetzt werden können. Dennoch sind sie durch besondere Pufferbedingungen und eine eingeschränkte Stabilität nicht optimal für eine reine Signalverstärkung in Standardassays geeignet. Das macht sie für *in-vitro*-Versuche an Mikropartikeln momentan nur bei Nutzung von sehr sensitiven Geräten und mit großem Aufwand einsetzbar. Problematisch ist hier augenscheinlich die inhomogene Bindung dieser Konstrukte an die Partikeloberflächen. Diese Beobachtung sollte in Zukunft näher untersucht und durch andere Bindungsstrategien, wie beispielweise direkte Hybridisierungsprozesse, optimiert werden. Bei hinreichend stabilen Bindungen und nachweisbaren Intensitäten könnte in Zukunft auch eine Anwendung auf zellulärer Ebene denkbar sein, wobei hier weitere Fragestellungen, u. a. der stabile

Transport durch die Zelle hin zur Zielregion, zu beantworten sind. Aus den genannten Gründen wurden weitere Signalverstärkungsstrategien in Betracht gezogen, von denen eine im nachfolgenden Kapitel vorgestellt wird.

3.3 Evaluierung der Tyramidsignalamplifikation an Mikropartikeln

Neben leuchtstarken Einzelspezies, wie die vorgestellten DNA-Origamis, spielen in bioanalytischen Anwendungen enzymatische Reaktionen eine besondere Rolle. Überall dort, wo wenige Analyten nachgewiesen werden müssen, nutzt man daher unterschiedliche Methoden zur Signalamplifikation. Durch die Anhäufung einer Vielzahl an Signalmolekülen um das eigentliche Zielmolekül lassen sich so äußerst sensitive Nachweise bewerkstelligen. Eine dieser Möglichkeiten ist die bereits im Methodenteil vorgestellte TSA. Durch ihre Einfachheit, erhöhte Empfindlichkeit und hohe Spezifität wird sie vielfach in histologischen Untersuchungen wie IHC oder FISH als effektive Nachweisverfahren eingesetzt [36, 106].

Als Teil dieser Arbeit wurde die TSA-Reaktion nun zur Sondendetektion auf Mikropartikeloberflächen übertragen und mit der Videoscan-Plattform untersucht. Aufgrund der hohen Bindungseffizienz des aktivierten Tyramids an die proteinbeschichteten Oberflächen der Mikropartikel war eine hochintensive Fluoreszenzkorona nachweisbar. Dabei wurde eine quantitative Bestimmung des Ligandenwertes als relative Fluoreszenzintensität (RFI) durchgeführt. Die in diesen Experimenten verwendeten aufgereinigten Sonden wurden zuvor mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Abb. 10 zeigt eine deutliche Bandenverschiebung der biotinylierten Zielsonde gegenüber der Fängersonde in einem 3 %igen Agarosegel in TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE). Die Größe des Bio-294p-Fragments wurde durch die Integration mehrerer biotinylierter Nukleotide auf ca. 330 bp verschoben.

Wie zuvor erwähnt, binden aktivierte Tyramidmoleküle kovalent an spezifische Proteinreste. Eine Änderung der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen auf den Mikropartikeloberflächen könnte daher die Anzahl der final gebundenen Tyramidmoleküle beeinflussen. Um zu klären, ob unterschiedliche Proteinzusammensetzungen einen Effekt auf die resultierenden Fluoreszenzsignale haben, wurden Mikropartikel mit Streptavidin in Kombination mit unterschiedlichen Mengen verschiedener Proteine (BSA, IgG, Protein A/G) beschichtet. Um in diesem Fall die endgültige Beschichtungseffizienz zu überprüfen, wurde eine Kontrollsonde (5'-Dualbiotin, 3'-Alexa-Fluor-488) in gleicher Weise wie die anderen Sonden auf die

Mikropartikel angewendet. Abb. 28 A zeigt die Ergebnisse dieser Kontrollsondenbindung an Partikel, die mit unterschiedlichen Proteinmengen beschichtet wurden. Wie für die direkt markierte Kontrollsonde erwartet, nahmen die Fluoreszenzintensitäten mit sinkenden Streptavidinmengen ab, da hierdurch ebenfalls die Anzahl der entsprechenden Bindungsstellen für Biotin reduziert wurde. Das Fluoreszenzsignal korrelierte in diesem Fall mit der Zahl gebundener Einzelsonden. Das Vorhandensein anderer Proteine hatte auf die Kontrollsonde daher keinen Einfluss.

Beim Nachweis mittels TSA entscheidet hingegen, neben der Sondenmenge, vor allem die Anzahl gebundener, fluoreszierender Tyramidmoleküle über die messbare Signalstärke. Dieser sekundäre Tyramidbindungsschritt könnte daher über weitere elektronenreiche Reste durch Oberflächenmodifikationen bzw. Funktionalisierungen verbessert werden. Ein Effekt unterschiedlicher Proteinzusammensetzungen auf den Mikropartikeloberflächen war allerdings nicht feststellbar. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Streptavidinbeschichtung bereits ohne weitere Anpassungen für den Nachweis von Oligonukleotiden mit TSA ausreichend war und für diese Anwendung empfohlen werden kann (Abb. 28 B-D). Damit erfüllte Streptavidin zwei Aufgaben in der TSA an Mikropartikeln. Zum einen stellte es die Bindung der Fängersonde mittels Biotin an die Mikropartikeloberfläche sicher. Zum anderen diente es selbst als Ligand für die aktivierten Tyramide.

Bei ICC/IHC/FISH-Ansätzen liegen die normalen Inkubationszeiten mit dem TSA-Substratreagenz zwischen zwei und zwanzig Minuten [7]. Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurde die Enzymreaktion zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. Die Experimente zeigten, dass das maximale Signal nach 2 bis 5 Minuten Inkubation erreicht wurde. Aufgrund einer möglichen Instabilität des Tyramid-Arbeitsreagenzes (TWS) wurden auch längere Inkubationszeiten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die gemessenen Signalintensitäten auch nach 2 h Inkubation mit diesem Reagenz stabil waren (Abb. 28 B), was eine bessere Planung paralleler Experimente ermöglichte.

Um die Wirkung einer übermäßigen Verwendung der Markierungsreagenzien zu überprüfen, wurden außerdem verschiedene Mengen des Tyramidsubstrates getestet (bis zu 4-fach höher als vom Hersteller empfohlen bzw. die doppelte Menge HRP-Streptavidinkonjugat). Dies zeigte aber keine positiven oder negativen Auswirkungen auf die Signalintensitäten im Vergleich zu Standardbedingungen (Abb. 28 C). Aus

diesem Grund ist die Standardkomposition der vom Hersteller angepassten Reagenzien für diese Art von Assay an Mikropartikeln ausreichend.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich potenzieller Multiplexansätze haben gezeigt, dass der Assay in der aktuellen Form als Suspensionsversuch nicht optimal für den Nachweis unterschiedlicher Analyten in einer Probenmischung geeignet ist. So verursachten die TSA-spezifischen Reaktionen eine vergleichbare Färbung verschiedener Partikelpopulationen in einem einzigen Ansatz, egal ob daran Sonden gebunden waren oder nicht. Das heißt, Partikel mit möglicherweise anderen, nicht nachzuweisenden Analyten würden unspezifisch gefärbt werden und ein falsch-positives Resultat anzeigen. Diese Ergebnisse wurden für alle getesteten Bedingungen beobachtet, entscheidend war nur, dass in der Probe entsprechend ein nachweisbarer Analyt vorhanden war. Dies trat in gleicher Weise bei niedrigen Sondenkonzentrationen und kurzen Inkubationszeiten auf. Diese Tatsache bestätigte die sehr schnelle und effiziente enzymatische Umsetzung in TSA-Anwendungen, was in großen Ansätzen zu einer Tyramidbindung an alle proteinbeschichteten Mikropartikel in der Probensuspension führte.

Neben der Spezifität ist oftmals besonders die Sensitivität ein begrenzender Faktor solcher bioanalytischer Assays. Ob die vorgestellte TSA-Methode auch an Mikropartikeln einen signalverstärkenden Vorteil bietet, wurde im Vergleich zum Nachweis mit einem Fluorophor-konjugiertem Streptavidin überprüft. Im Versuch erfolgte der Nachweis jeweils von biotinylierten DNA-Sonden im Standardansatz, auf der einen Seite mittels TSA, auf der anderen durch markiertes Streptavidin (Abb. 28 C). Im zweiten Fall wurde die hybridisierte Zielsonde direkt über das Signal eines Streptavidin-Alexa-Fluor-488-Konjugates (SA-AF488) analysiert. Bei diesem Verfahren war die Anzahl der Biotine für die Signalstärke begrenzend. Unter Standardbedingungen (STD, Zielsondenkonzentration von $3,3 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) ergab der SA-AF488-Nachweis 4-fach höhere Fluoreszenzintensitäten als durch die TSA-Reaktion. In Verdünnungsversuchen waren SA-AF488-Konjugatsignale allerdings nur bis zu einer Verdünnung der Zielsonde von 1:1.000 messbar ($3,3 \cdot 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Da TSA durch den nachfolgenden enzymatischen Prozess nicht durch die Biotin-Streptavidin-Bindungsstellen begrenzt ist, war TSA in der Tat empfindlicher. Hierbei waren nachweisbare Signale bis hinunter zu einer Verdünnung von 1:10.000 ($3,3 \cdot 10^{-4} \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) messbar. Damit zeigte die TSA ihren Vorteil vor allem bei der Detektion geringer Mengen von Zielmolekülen aufgrund einer niedrigeren Nachweisgrenze.

Es lässt sich noch einmal zusammenfassen, dass die TSA eine effektive Methode zum Nachweis von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen molekularen Spezies ist, bisher aber vor allem im zyto- bzw. histologischen Kontext. Als Teil dieser Arbeit wurde diese Technik auf ihre Leistungsfähigkeit überprüft, biotinylierte DNA-Sonden zu erkennen, die an Fängersonden auf Mikropartikeloberflächen hybridisiert sind. Mit den hier gemachten Untersuchungen konnte diese äußerst sensitive, Enzym-vermittelte Detektionsmethode erfolgreich auf mikropartikelbasierte Assays übertragen werden.

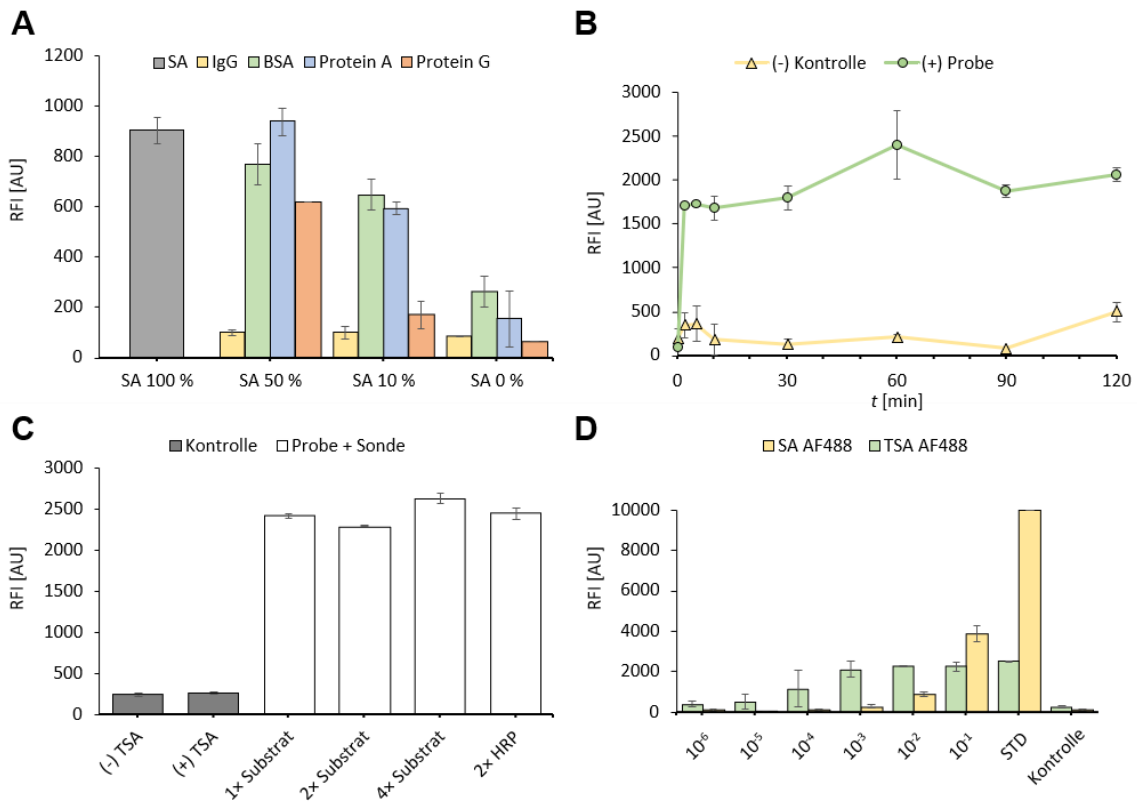


Abb. 28 Ergebnisse zur Tyramidsignalverstärkung an Mikropartikeln. Gemessen wurden die mikropartikelassoziierten relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) für unterschiedliche Konditionen. Als Kontrollen dienten Mikropartikel ohne Sondenzugabe und \pm TSA-Inkubation. Die Experimente wurden im Doppelansatz durchgeführt. **A:** Bindung einer Kontrollsonde (5'-Dualbiotin, 3'-Alexa-Fluor-488) an beschichtete Mikropartikel (Streptavidin (SA) in Kombination mit IgG, BSA oder Protein A/G; je 50, 90 oder 100 % bezogen auf SA). **B-D:** TSA an SA-beschichteten Mikropartikeln nach Bindung biotinylierter Sonden. **B:** Vergleich unterschiedlicher Inkubationszeiten mit der Tyramid-Arbeitslösung (0 bis 120 min). **C:** Einfluss unterschiedlicher Mengen des Tyramid-Substrats (Standard, 2 \times , 4 \times) und des HRP-SA. **D:** Effekt titrierter Zielsondenkonzentrationen (3,3 bis $3,3 \cdot 10^{-6}$ ng/ μ l) bei Vergleich des Nachweises mit Streptavidin (SA AF488) und TSA (TSA AF488); STD: Standardkonzentration von 3,3 ng/ μ l.

Das zusätzlich auf die Mikropartikeloberflächen aufgebrauchte Streptavidin, zur Bindung der Fängersonde, bot dabei gleichzeitig zahlreiche Angriffspunkte für die fluoreszierenden Tyramid-Reportermoleküle. Im Ergebnis konnten intensitätsstarke Fluoreszenzsignale an den Partikeln gemessen werden.

Die TSA kann daher insbesondere für den empfindlichen Nachweis geringer Analytmengen an Mikropartikeln empfohlen werden, die in Standardansätzen mit Antikörpern oder einfachen Sonden nur unzureichend detektierbar wären. Diese Tatsache deckt sich mit Ergebnissen konventioneller FISH-Versuche, in denen diese Amplifikationstechnik durch den Nachweis von stark verdünnten, kleinen Sonden und Targets einen entscheidenden Mehrwert brachte [106].

Ein weiterer Vorteil ist, dass keine direkt markierten Moleküle, wie fluoreszente Nukleinsäuresonden benötigt werden. Durch den Austausch der Tyramid-Konjugate kann relativ einfach zwischen verschiedenen Fluoreszenzbedingungen gewechselt werden. Dies ermöglicht eine flexible Assaygestaltung in Kombinationen mit weiteren Nachweisen durch Sonden, Antikörper oder Proteinkonjugate. Auch die DNA-Sonden selbst können natürlich zum Nachweis anderer Biomarker durch Proteine und Antikörper ersetzt werden.

Nur der Einsatz der TSA zur gleichzeitigen Detektion mehrfacher Analyten bereitet durch unspezifische Färbungen in Suspension Schwierigkeiten. Im Gegensatz zu dem vorgestellten Versuchsaufbau könnte ein zukünftiger Ansatz mit gespotteten oder anderweitig immobilisierten Mikropartikeln arbeiten (vgl. Rödiger *et al.* (2012) [80]), wodurch mit ausreichenden Abständen ein Multianalytnachweis gewährleistet werden könnte. Im Vergleich zu anderen Enzym-basierten Methoden, bei denen die Reaktionsprodukte von den Stellen der Enzymaktivität diffundieren, weist die TSA eine bessere räumliche Auflösung auf, weshalb sie sogar bei hochauflösenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt wurde [107]. In diesem Fall fänden die spezifischen Reaktionen nur lokal begrenzt statt und eine Färbung entfernter Partikel würde verhindert werden. In diesem Fall könnten sequentielle TSA-Runden nacheinander durchgeführt werden, um verschiedene Analyten unterschiedlich zu färben [108]. Hierdurch könnten sensitive und differenzierbare Ergebnisse für einzelne Mikropartikelpopulationen erwartet und Multiplexing ermöglicht werden. Solche statischen Bedingungen wären darüber hinaus eher vergleichbar mit normalen Gewebeproteinen wie bei IHC- oder FISH-Ansätzen, bei denen Signale auch nur wenige Mikrometer voneinander entfernt aufgelöst werden können [109].

Die sensitive mikropartikelassoziierte TSA bietet auf jeden Fall genügend Potential für den Aufbau komplexerer Assays. Neben den vorgestellten Suspensionsversuchen in konventionellen Mikroreaktionsgefäßen ist weiterhin auch eine Integration in automatisierte, mikrofluidische Plattformen denkbar (vgl. Dinter *et al.* (2019) [55]). Da

die Planung und Konstruktion solcher Produkte jedoch teuer und zeitaufwendig sind, bieten sich hierfür moderne Entwicklungstechnologien wie der 3D-Druck an. Noch entscheidender als der Herstellungsprozess selbst sind für bioanalytische Anwendungen vor allem die eingesetzten Materialien. Die Untersuchungen zu entsprechenden Polymeren werden im nächsten Abschnitt ausführlich behandelt.

3.4 Einsatz 3D-druckbarer Polymere für bioanalytische Anwendungen

Die Herstellung polymerer Materialien unterliegt zahlreichen Prozessen, die je nach Hersteller variieren, um am Ende Produkte hervorzubringen, die je nach Anwendungsfall ganz variable und einzigartige Eigenschaften aufweisen. Sowohl Effekte kontinuierlicher Optimierungen als auch Schwankungen von Zusammensetzungen und Zusatzstoffen können zu erheblichen Veränderungen der Gesamteigenschaften führen [110]. Schon kleine Unterschiede können bestimmte Materialien für sensible Anwendungen wie in der Bioanalytik unbrauchbar machen.

Viele Kunststoffe weisen häufig eine Autofluoreszenz auf, wenn sie durch Licht bestrahlt werden (z. B. nahes UV-Licht). Sie können auch eine starke lichtabsorbierende Eigenschaft haben. Dies ist unter anderem auf Additive zurückzuführen, die fluoreszierende und stark absorbierende Spezies in das Material einbringen. Aber auch die Wärmebehandlung scheint die Eigenschaften zu verändern. Dies führt daher bei optischen Messungen oft zu suboptimalen Nachweisgrenzen [85, 111].

Es ist wichtig zu beachten, dass die Filamenthersteller oft nicht die genaue chemische Zusammensetzung ihrer Polymere angeben und bestimmte Eigenschaften bei der Produktion nicht berücksichtigt bzw. überprüft werden. So standen auch für keines der untersuchten Materialien genaue spektrale Daten zur Verfügung. Daher war es nicht möglich zu beurteilen, ob eines dieser Materialien in bestimmten Bereichen keine oder nur eine geringe Autofluoreszenz aufweist. Aus Mangel an Informationen wurden 14 handelsübliche Filamente der Materialklassen PLA, ABS, PETG und TPU unterschiedlicher Farbe untersucht. Von besonderem Interesse dabei waren das Schmelzverhalten und die spektralen Eigenschaften der 3DP-Filamente für den Einsatz in fluoreszenzbasierten bioanalytischen Tests. Die Filamente wurden dafür ohne weitere Vorverarbeitungsschritte verwendet. Die Temperaturuntersuchungen wurden mit Proben des Rohmaterials durchgeführt. Die Fluoreszenzuntersuchungen fanden an gedruckten Objekten statt. Die in der Studie eingesetzten 3D-Modelle

wurden jeweils aus einer einzigen Charge eines jeden Materials in mehreren technischen Replikaten erstellt und nach dem Druck untersucht.

3.4.1 Geeignete Filamente für Fluoreszenzanwendungen

Im Hinblick darauf, ob die Materialien für optische bioanalytische Anwendungen eingesetzt werden können, wurde zunächst untersucht, inwieweit die Materialien nach dem Druck eine Autofluoreszenz aufweisen. Wie für die Analyse der Autofluoreszenz und der spektralen Eigenschaften beschrieben, wurden Emissionsmessungen nach der Anregung mit sechs verschiedenen Wellenlängen durchgeführt (Abb. 29 A zeigt einen Vergleich der mittleren Emissionsdaten aller Materialien bei den gewählten Wellenlängen $\lambda_{ex} = 350, 488, 640 \text{ nm}$). Um eine Signalsättigung des Detektors bei starker Fluoreszenz zu vermeiden, wurden zunächst grobe Messungen aller Materialien durchgeführt, um die maximalen Intensitätswerte und entsprechende Parameter am Messgerät zu ermitteln. Die gemessene Fluoreszenzintensität in *counts per second* (cps) ist daher sowohl geräte- als auch messspezifisch und ein relativer Wert. Ein absoluter Vergleich der Intensitäten in anderen Systemen ist daher nicht ohne Weiteres möglich. Bei späteren Anwendungen, bei denen Messsystem, Filter und Fluorophore das Signal-Rausch-Verhältnis beeinflussen, ist nicht unbedingt ein absoluter Fluoreszenzwert entscheidend, sondern vor allem das Spektralprofil und die Bereiche, in denen die meisten Spitzenwerte (Peaks) auftreten. Zum Vergleich der Materialien wurden die verschiedenen Niveaus der Autofluoreszenz definiert: keine oder sehr niedrige (unter $1 \cdot 10^6 \text{ cps}$), mittlere (bis $5 \cdot 10^6 \text{ cps}$) und hohe Autofluoreszenz (über $5 \cdot 10^6 \text{ cps}$).

Die fluoreszenzspektrometrische Analyse zeigte, dass alle Materialien Substanzen enthalten, die in einem weiten Bereich fluoreszieren. Allerdings variierte die Fluoreszenzintensität bei den nicht schwarzen Materialien. Die Fluoreszenz war bei niedrigeren Wellenlängen (350-561 nm) besonders ausgeprägt, so dass einige Materialien für sehr sensitive fluoreszenzbasierte Assays, bei denen schon ein geringer Hintergrund zu Störungen führt, nicht geeignet sind. Die Materialien PLA (Surreal), PETG (Sunlu) und TPU (Enotepad) hatten über einen weiten Bereich eine besonders hohe Autofluoreszenz. Einige Materialien zeigten teilweise eine sehr unterschiedliche Verteilung der Autofluoreszenz über das gemessene Spektrum (z. B. weißes PLA, Janbex oder grünes TPU, Enotepad). Beim Einsatz solcher Filamente muss genau überprüft werden, ob bestimmte Autofluoreszenz-Peaks mit der

gewünschten Fluoreszenz der Assaykomponenten konkurrieren. Andererseits wurden Materialien überprüft, die keine (schwarzes und mattschwarzes PLA, Das Filament) oder sehr geringe (schwarzes PLA, Elegoo oder schwarzes ABS, Tronxy) Autofluoreszenz aufwiesen, auch bei Anregungen mit Strahlung höherer Energie zwischen 300-400 nm.

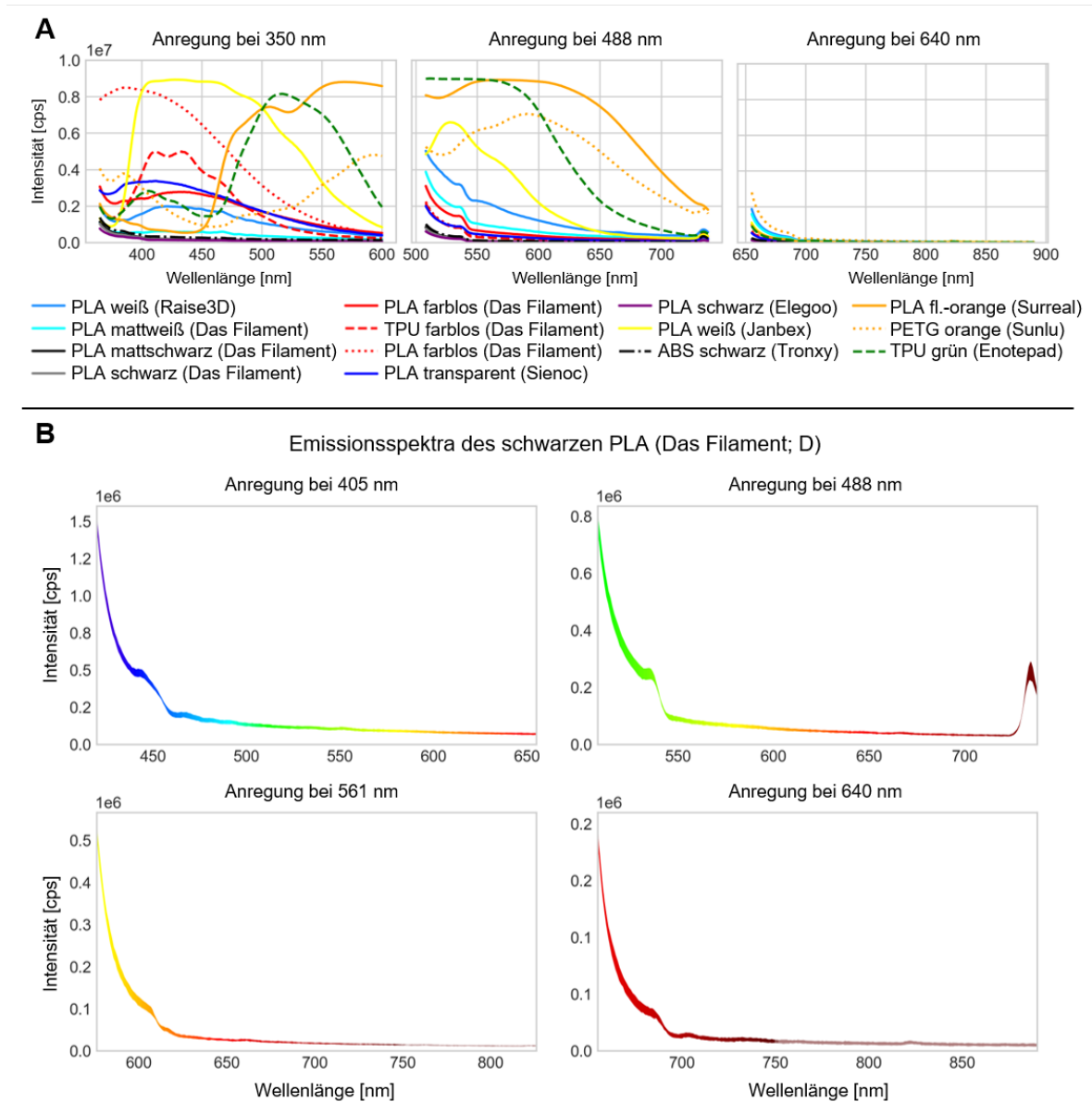


Abb. 29 Fluoreszenzspektren der 3D-gedruckten Polymere. Von jedem 3D-Druckfilament (jeweils aus 1 Charge) wurden Teststreifen in Form von Objektträgern (10 technische Replikate) gedruckt und deren spektrale Eigenschaften fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die Emissionsspektren wurden nach Anregung mit 6 verschiedenen Wellenlängen aufgenommen. **A** zeigt die mittleren Fluoreszenzspektren der Materialien für drei verschiedene Anregungswellenlängen (350, 488, 640 nm). **B** zeigt repräsentative Spektren des schwarzen PLA-Filaments (Das Filament), aus vier Wellenlängenbereichen, die typischerweise in biologischen Assays verwendet werden. Dieses Material ist in fluoreszenzbasierten Assays mit roten und Nahinfrarotfarbstoffen verwendbar. Die Farben entsprechen dem emittierten Licht bei der jeweiligen Wellenlänge. Dargestellt sind der Mittelwert und das Konfidenzintervall aus 10 Messungen.

Auch transparente bzw. farblose Filamente zeigten eine starke Autofluoreszenz. Wie aus der Literatur bekannt, ist dieser Effekt insbesondere bei augenscheinlich farblosen Materialien auf spezielle Additive zurückzuführen [112]. Substanzen, die dazu bestimmt sind die optischen Eigenschaften wie Farbklarheit oder Transparenz der Materialien zu verbessern, können eine starke Autofluoreszenz verursachen. Pigmente, die für das bloße Auge farbig erscheinen, haben einen Einfluss auf diese Eigenschaft. So kann beispielsweise die Autofluoreszenz insgesamt verbessert werden, nur in bestimmten Wellenlängenbereichen auftreten oder entsprechend gelöscht werden [113].

Unter den ausgewählten Filamenten hatten die vier schwarzen PLA- und ABS-Filamente (Das Filament, Elegoo, Tronxy) eine geringe Autofluoreszenz über alle Spektren, die als relevant definiert wurden. Ihre Eigenschaften und Anwendungen werden im Folgenden näher erläutert. Alle anderen Filamente wurden von weiteren funktionellen fluoreszenzbasierten Assays ausgeschlossen.

Bei den meisten biologischen Proben nimmt die Autofluoreszenz mit zunehmender Anregungswellenlänge ab, wodurch die Nachweisbarkeit durch höhere Signal-Rausch-Abstände erhöht wird [114]. Dies wurde auch für die Filamente (> 550 nm) beobachtet, was bedeutet, dass die meisten Filamente mit roten und nahinfraroten (NIR) Farbstoffen verwendbar sind.

Abb. 29 B zeigt die Emissionsdaten eines Materials (schwarzes PLA, Das Filament) in den wichtigsten Fluoreszenzbereichen (siehe 405 nm: DAPI, 488 nm: FITC, 561 nm: Cy3, 640 nm: Cy5). Wie aus den Diagrammen ersichtlich ist, weist dieses Filamentmaterial über den gesamten betrachteten Wellenlängenbereich wenig oder gar keine Autofluoreszenz auf und ist daher für die gewünschten Anwendungen interessant. Basierend auf den analytischen Daten scheint dieses PLA das am besten geeignete für Fluoreszenzexperimente zu sein.

Die Analysen und Darstellungen wurden für alle Materialien für alle sechs Wellenlängen erstellt und sind im Zusatzmaterial des elektronischen Artikels einsehbar (Supp. FS [2]).

Die ersten beiden Hauptkomponenten erklärten > 90 % der Gesamtvarianz für die normierten Fluoreszenzspektren bei allen Anregungswellenlängen. Die Unterscheidung zwischen den Filamenten nahm im Allgemeinen mit zunehmender Anregungswellenlänge ab (Abb. 30).

Bei einer Anregung mit 350 nm zeigten die Filamente PLA (Surreal) und TPU (Enotepad) eine erhöhte Autofluoreszenz bei 550 nm. Die Filamente PETG (Das Filament) und PLA (Janbex) zeigten hier hingegen eine gesteigerte Autofluoreszenz bei den Wellenlängen 400, 470 und 550 nm (Abb. 30). Die erhöhte Autofluoreszenz mildert den Bildkontrast zu fluoreszierenden Objekten und senkt damit die Nachweisgrenzen. Die Materialien PETG (Das Filament), PLA (Janbex), PLA (Surreal), PETG (Sunlu) und TPU (Enotepad) bildeten separate Cluster.

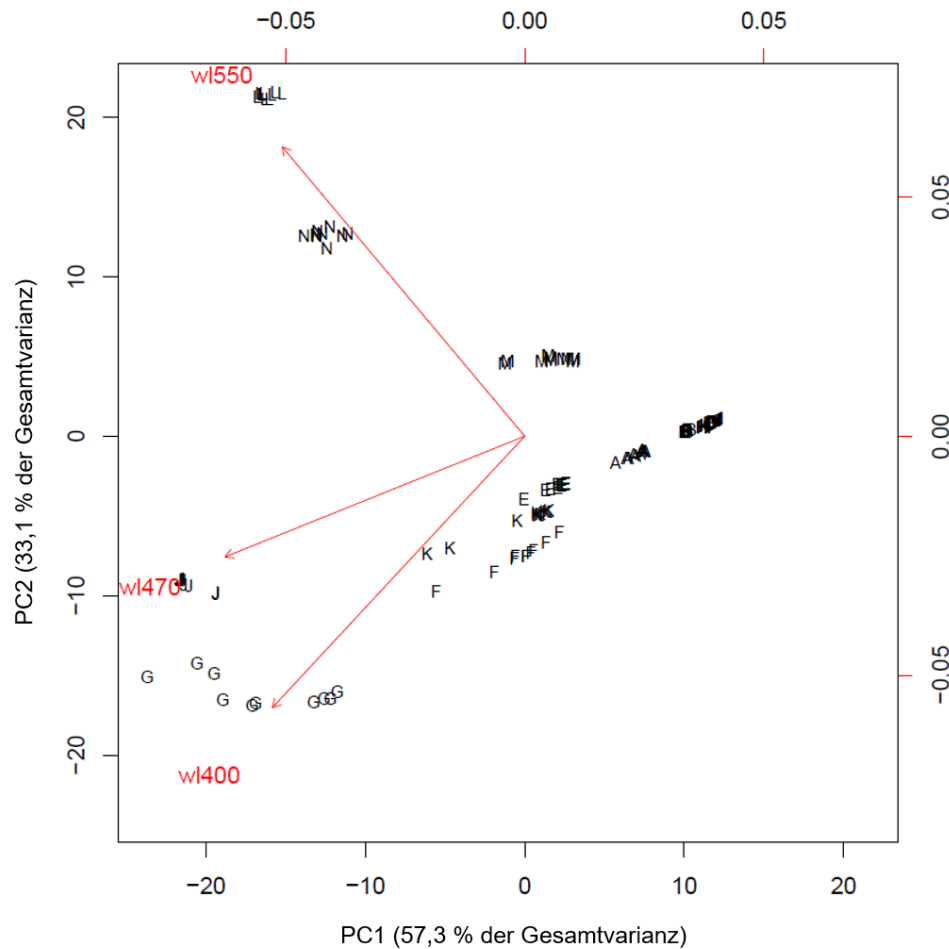


Abb. 30 Biplot der Hauptkomponentenanalyse (PCA) für die Anregungswellenlänge 350 nm. Rote Pfeile zeigen die PCA bei den annotierten Wellenlängen (wl) (obere Abszisse und rechte Ordinatenachse), Buchstaben zeigen die Werte des Filaments PC1 vs. PC2 (untere Abszisse und linke Ordinatenachse). Ein Pfeil, der auf eine Reihe von Filament-Scores gerichtet ist, zeigt eine positive Korrelation an. Diese Filamentautofluoreszenz war bei der gegebenen Wellenlänge stärker ausgeprägt. Die entgegengesetzte Richtung zeigt eine negative Korrelation an. Der Winkel zwischen den Pfeilen zeigt die Korrelation zwischen den Autofluoreszenzintensitäten an. Die gleiche Richtung kennzeichnet positive Korrelation, die entgegengesetzte Richtung negative Korrelation und ein rechter Winkel (90°) keine Korrelation. A: weißes PLA (Raise3D); B: mattweißes PLA (Das Filament); C: mattschwarzes PLA (Das Filament); D: schwarzes PLA (Das Filament); E: farbloses PLA (Das Filament); F: farbloses TPU (Das Filament); G: farbloses PETG (Das Filament); H: schwarzes ABS (Tronxy); I: schwarzes PLA (Elegoo); J: weißes PLA (Janbex); K: transparentes PLA (Sienoc); L: fluo-oranges PLA (Surreal); M: oranges PETG (Sunlu); N: grünes TPU (Enotepad).

Die Analyse der Emissionsdaten für die anderen Anregungswellenlängen ergab ebenfalls eine gesteigerte Autofluoreszenz, die für die Differenzierung nach Tab. 18 verwendet werden kann. Dies war jedoch nicht so klar wie bei $\lambda_{ex} = 350$ nm (für weitere Details siehe Supp. PCA Abb. 5 B-F im Zusatzmaterial des elektronischen Artikels [2]). Insgesamt war die Autofluoreszenz bei Anregungswellenlängen < 500 nm stärker ausgeprägt, wobei die Filamenttypen PLA (Janbex), PLA (Surreal), PETG (Sunlu) und TPU (Enotepad) am stärksten betroffen waren.

Tab. 18 Erhöhte Autofluoreszenz der Filamente

Filament		Anregungswellenlänge λ_{Ex} [nm]					
#	Typ	350	405	488	561	640	750
G	PETG Farblos (Das Filament)	400	795
J	PLA Weiß (Janbex)	470	465	550	.	660	830
L	PLA Fluo-orange (Surreal)	550	560	625	700	.	.
M	PETG Orange (Sunlu)	.	620	625	740	.	.
N	TPU Grün (Enotepad)	550	560	550	.	.	.

Wellenlängen, bei denen eine erhöhte Autofluoreszenz beobachtet wurde, sind für die untersuchten Anregungswellenlängen angegeben.

3.4.2 Filamente für Hochtemperaturanwendungen

Die Hersteller von handelsüblichen 3DP-Filamenten geben nur unvollständige Auskünfte über die jeweiligen Verarbeitungstemperaturen der Materialien, die nicht ausreichen, um die sinnvolle Integration in bioanalytische Anwendungen abschätzen zu können. Abgesehen von groben Richtwerten für den Druck, gibt keine Dokumentation genaue thermische Eigenschaften oder gar bestimmte Temperaturbereiche an, in denen diese Materialien eingesetzt werden können. Darüber hinaus ist wenig über genaue Materialzusammensetzungen und Produktionsbedingungen bekannt, was zu Schwierigkeiten bei der Materialauswahl für bioanalytische Systeme führt. Insgesamt wurden vierzehn 3D-druckbare Polymere analysiert. Nach der Spektralanalyse blieben das schwarze und mattschwarze PLA (Das Filament), farbloses PETG und TPU (Das Filament), schwarzes ABS (Tronxy) sowie schwarzes PLA (Elegoo) für die DSC-Analysen übrig (Tab. 20). Diese werden im Folgenden näher beschrieben. Die anderen Materialien zeigten eine starke Autofluoreszenz über das gesamte Spektrum und wurden daher nicht weiter berücksichtigt (siehe dazu Abb. 29 und Supp. FS im Zusatzmaterial des elektronischen Artikels [2]).

Zwei der schwarzen PLA-Proben (Das Filament) zeigten eine hohe Homogenität in der DSC-Auswertung, sowohl innerhalb der Replikate als auch zwischen den Filamenten. Glasübergangs-, Rekristallisations- und Schmelzbereich ließen sich sehr gut charakterisieren und entsprachen den bisherigen Annahmen basierend auf der Materialklasse. Obwohl für die mattschwarze Variante im Durchschnitt etwas niedrigere Glasübergangstemperaturen ($62,5 \pm 0,6 \text{ °C}$) und Rekristallisationstemperaturen ($118,5 \pm 0,9 \text{ °C}$) ermittelt wurden, sind beide Materialien für den Einsatz bis mindestens 50 °C gut geeignet und können problemlos auch bei einer vergleichsweise niedrigen Schmelztemperatur von 150 °C verarbeitet werden. Die nur geringen Temperaturabweichungen zwischen den beiden Stoffen sind vermutlich auf die Mattierungsmittel zurückzuführen. Solche Effekte sind beispielsweise für Polymere wie Nylon beschrieben, bei denen Mattierungsmittel physikalische und mechanische Eigenschaften beeinflussen [115]. Abb. 31 zeigt die DSC-Graphen für schwarze PLA- und mattschwarze PLA-Filamente (Das Filament). Die DSC-Kurven für schwarzes PLA (Elegoo), farbloses TPU und PETG (Das Filament) sowie schwarzes ABS (Tronxy) sind im Zusatzmaterial des elektronischen Artikels einsehbar (Supp. DSC [2]).

Schwarzes PLA (Elegoo) zeigte zwar eine ähnliche Glasübergangstemperatur ($62,4 \pm 0,9 \text{ °C}$) wie die anderen PLA-Proben, doch die Rekristallisationstemperatur lag etwa 20 °C niedriger und die Schmelztemperatur lag ca. 20 °C höher im Vergleich zu den anderen schwarzen PLA-Varianten ($T_r, \text{ Elegoo} = 100,6 \pm 6,8 \text{ °C}$, $T_m, \text{ Elegoo} = 168,6 \pm 2,3 \text{ °C}$).

Unabhängig von der Aufheizrate traten zusätzliche Effekte auf, die vermutlich durch Verunreinigungen oder Zusatzstoffe verursacht wurden. Diese Einflussfaktoren können auch unregelmäßig im Material verteilt sein und ein homogenes Schmelzverhalten beeinträchtigen. Dies ist jedoch entscheidend für den Druckprozess und damit für ein qualitativ hochwertiges Ergebnis.

Attribute wie Glasübergang und Fluoreszenz sind auch für die spätere Anwendung wichtig, weshalb Materialien verwendet werden sollten, deren Eigenschaften leicht charakterisierbar sind und innerhalb einer Charge keine Abweichungen aufweisen. Das untersuchte PETG-Filament zeigte innerhalb der Wiederholungen ein einheitliches Verhalten und eine Glasübergangstemperatur von fast 80 °C ($78,1 \pm 2,1 \text{ °C}$). Mit der verwendeten DSC-Methode konnten jedoch keine genauen Messwerte bezüglich Rekristallisation oder Schmelztemperatur ermittelt werden. Erst oberhalb von 400 °C wurde kurz vor der thermischen Zersetzung ein Schmelzeffekt beobachtet.

Für ABS konnte nur aus den Kühlkurven eine durchschnittliche Glasübergangstemperatur von $104,2 \pm 0,1 \text{ °C}$ bestimmt werden. Diese war die höchste unter den sechs DSC-untersuchten Materialien und impliziert damit eine besonders ausgeprägte Formstabilität bei höheren Temperaturen bis 100 °C . Allerdings konnten die Rekristallisations- und Schmelztemperaturen für ABS durch die DSC-Analysen nicht eindeutig bestimmt werden. Es ist davon auszugehen, dass dies auf die Zusatzstoffe zurückzuführen war.

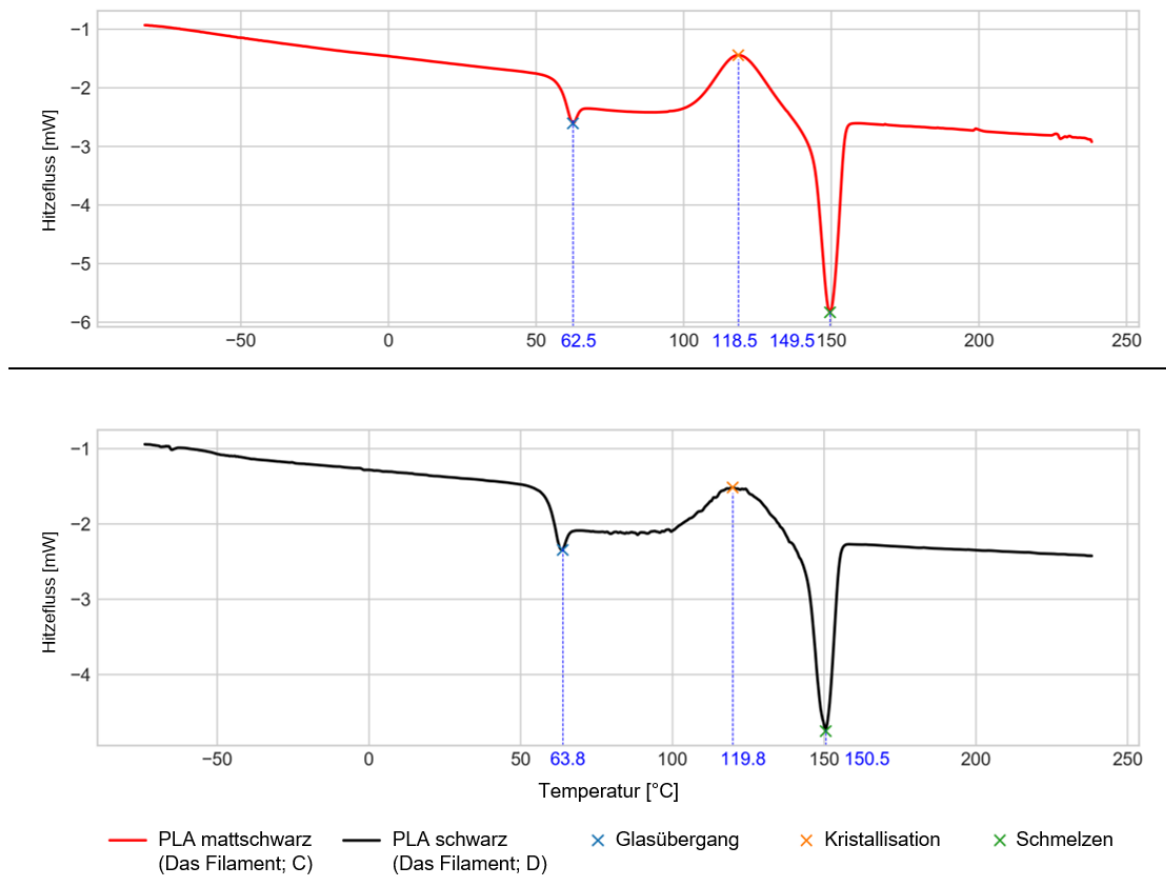


Abb. 31 Thermische Analysen von zwei 3D-Druckfilamenten. Die Diagramme zeigen die DSC-Kurven für mattschwarzes PLA (A, rote Linie, Das Filament) und schwarzes PLA (B, schwarze Linie, Das Filament). Die Kurven stellen den Mittelwert der während drei Heizzyklen gemessenen Daten dar. Die Peak-Analyse wurde durchgeführt, um Glasübergangs-, Rekristallisations- und Schmelztemperaturen zu ermitteln.

TPU stellte einen Sonderfall dar, da es bereits bei Raumtemperatur sehr flexibel ist. Diese Eigenschaft macht das Material besonders interessant für Anwendungen, bei denen eine elastische Verformung oder Abdichtung erforderlich ist. Diese materialtypische Besonderheit führte allerdings zu komplexen Messergebnissen in den DSC-Analysen, die nur schwer einzuordnen waren. Daher konnten neben einer durchschnittlichen Glasübergangstemperatur von $-16,1 \pm 3,0 \text{ °C}$ keine kritischen

Temperaturbereiche oder genaue Verarbeitungsbedingungen spezifiziert werden. Dennoch dienen die erhaltenen Ergebnisse als Anhaltspunkt für die thermalen Einsatzbereiche und für weitere Messungen bei veränderten Bedingungen, um die zugrundeliegenden temperaturspezifischen Effekte besser charakterisieren zu können.

Nach der allgemeinen Analyse auf spezifische Materialeigenschaften, wie Auto-fluoreszenz und Temperaturstabilität, wurden die geeignetsten Varianten für bioanalytische Untersuchungen selektiert. In den nachfolgenden Abschnitten werden spezifischere Möglichkeiten zum Einsatz in funktionalen Assays beschrieben, bei denen vor allem schwarze PLA- und ABS-Polymere verwendet wurden.

3.4.3 FISH-Versuche mit bakterieller 16S rRNA auf 3D gedruckten Oberflächen

Ein wichtiger Einsatzbereich von bioanalytischen Systemen ist die Charakterisierung von Krankheitserregern. Insbesondere bei der mikrobiologischen Diagnostik von Infektionen müssen Bakterien für eine effektive Behandlung schnellstmöglich identifiziert werden. Neben der teils langwierigen Anzucht von Erregern, die nicht immer möglich ist, bietet sich die FISH als geeignetes Mittel zur Analyse an.

In funktionalen Versuchen wurde dazu überprüft, wie Bakterien auf 3D-gedruckten Oberflächen adhären und ob FISH-Untersuchungen ebenfalls auf solchen gedruckten Materialien durchführbar sind. Nach Beurteilung der bisherigen Analysen wurden nur die schwarzen PLA- und ABS-Materialien (siehe Tab. 20: C, D, H und I) für diese Versuche eingesetzt. Bakterien adhärten auf den gedruckten Materialien und wurden mit dem universellen Nukleinsäurefarbstoff DAPI angefärbt. Je mehr Bakterien adhärten, desto stärker war das DAPI-Fluoreszenzsummensignal, das mikroskopisch erfasst wurde. Zur Einschätzung der Adhärenz wurden darüber die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten pro Fläche bestimmt. Neben dieser universellen Färbung wurde die FISH angewendet, mit der Bakterien gruppen- (alle Bakterien, Familie, Gattung etc.) oder speziesspezifisch identifiziert werden können. Zur Überprüfung der FISH-Methode wurde die Hybridisierung mit einer Sonde durchgeführt, die Bakterien allgemein über die Bindung an eine domänenspezifische, konservierte Region der bakteriellen 16S rRNA nachweist (Sonde EUB338 mit dem Farbstoff ATTO 647N) [116]. Die Hybridisierungseffizienz wurde weiterhin als Maß für den physiologischen Zustand der Bakterien herangezogen. So weisen schneller wachsende bzw. hochaktive Bakterien tendenziell mehr Ribosomen auf und bieten

daher mehr Zielmoleküle (rRNA) für die FISH-Sonden, was wiederum zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal eines Einzelbakteriums führt [117].

Die Abb. 32 stellt Ergebnisse der FISH-Untersuchungen von adhärenierten Bakterien (*S. aureus*) auf den gedruckten Materialien vor.

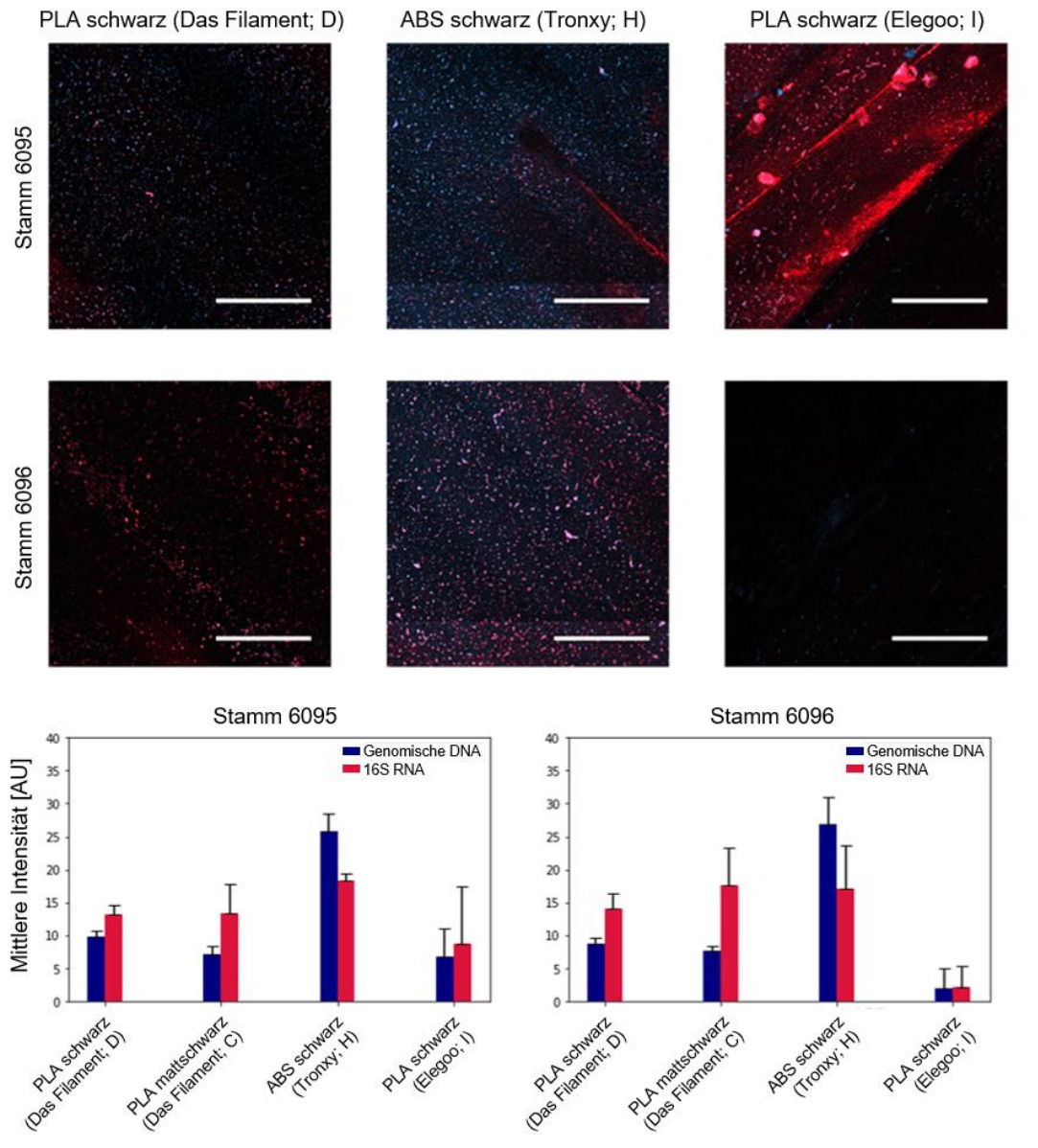


Abb. 32 Mittlere Fluoreszenzintensität der *S. aureus* Stämme 6095 und 6096. Dargestellt sind die Resultate der Nukleinsäurefärbung (DAPI) und der 16S-rRNA-FISH (ATTO 647N). Unbeschichtete Probenträger aus PLA (schwarz/mattschwarz, Das Filament; schwarz, Elegoo) und ABS (schwarz, Tronxy) wurden verglichen. **Oben:** Die Stämme 6095 und 6096 hafteten auf allen Materialien, außer auf schwarzem PLA (Elegoo). Schwarzes und mattschwarzes PLA (Das Filament) zeigte eine lockere Verteilung anhaftender Bakterien. ABS zeigte ein wesentlich dichteres Verteilungsmuster anhaftender Bakterien. **Unten:** Gezeigt sind die relevantesten Ergebnisse zur Signalverteilung von genomischer DNA zu 16S rRNA. $n = 4$, die Standardabweichung zwischen den beiden getesteten Stämmen ist oberhalb der Balken dargestellt. Maßstabsbalken = 200 μm .

Die beiden Teststämme zeigten ein ähnliches Anhaftungsmuster in Bezug auf Menge und Verteilung der Bakterien. Es gab keinen Unterschied in der bakteriellen Adhäsion zwischen reinen und mit Immobilisierungslösung beschichteten Materialien. Im Vergleich der gedruckten Kunststoffe zeigte ABS die besten Adhäsionseigenschaften für Bakterien. Für dieses Material wurden signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten des DAPI-Farbstoffes gemessen ($p = 0,001$). Durch Analyse der FISH-Signale wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den Materialien festgestellt. Aufgrund der ausgewählten Vergrößerung im Mikroskopie-Setup ($10\times$ Objektiv) wurden keine einzelnen Bakterien gezählt. Deren Anzahl wurde stattdessen als $\text{Events}\cdot\text{mm}^{-2}$ für den Vergleich der Filamente geschätzt (siehe Abschnitt 2.11.8). Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen ABS (Tronxy, $n_{\text{events}} = 4405,2 \pm 660$) und PLA (black, Elegoo, $n_{\text{events}} = 1236,2 \pm 114$) durch die DAPI-Färbung ($p = 0,008$) beobachtet. Die FISH-Ergebnisse zeigten jedoch kein einheitliches Bild und waren nicht optimal vergleichbar. Im Vergleich zur DAPI-gefärbten Gesamt-DNA erreichten die Fluoreszenzsignale, beim Nachweis der 16S-rRNA-Sequenzen mittels FISH, in der Regel höhere Intensitäten. Neben Ursachen, wie einer unterschiedlichen Permeabilität der fixierten Zellen für die Oligonukleotidsonden, kann auch ein veränderter Ribosomengehalt zu den Abweichungen geführt haben. Da die unregelmäßige Verteilung von signalstarken und signalschwachen Bakterien auch in unabhängigen Wiederholungen zu beobachten war, ist diese Erklärung naheliegender. Der DNA-Gehalt eines Bakteriums und das resultierende Fluoreszenzsignal nach einer entsprechenden Färbung sind relativ konstant und homogen verteilt. Wie bereits weiter oben erwähnt, schwankt der Anteil an ribosomaler RNA hingegen und ist über einen weiten Bereich proportional zur Wachstumsrate der Bakterien [118]. Aus dieser Tatsache lässt sich schlussfolgern, dass zum Versuchszeitpunkt (FISH-Färbung) noch nicht alle Bakterien optimal an die neuen Bedingungen auf allen Kunststoffoberflächen angepasst waren (Latenzphase). Trotz zusätzlicher Aussagemöglichkeiten zum physiologischen Zustand der Bakterien muss bei der Identifikation mittels FISH-Sonden berücksichtigt werden, dass nicht in jedem Fall jedes Bakterium ausreichend gefärbt ist, um es als positiv bewerten zu können. Aus diesem Grund ist es auch wichtig, in FISH-Versuchen nicht nur Sonden allein einzusetzen, sondern in Kombination mit universellen Farbstoffen wie DAPI zur Gegenfärbung zu arbeiten.

Die Ursachen für die Unterschiede in den FISH-Resultaten zwischen den einzelnen Materialien konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Möglicherweise liegen diese

aber in unterschiedlichen Wachstumsstadien der Bakterien begründet. Im Fall von ABS könnte die deutlich höhere initiale Anzahl an Bakterien zu einem zeitigeren Erreichen der stationären Wachstumsphase geführt haben. Da kein Mediumaustausch durchgeführt wurde, könnte das verringerte Nährstoffangebot bereits früher ein optimales Wachstum begrenzt haben. Hierdurch wäre eine Verlangsamung der Proteinbiosynthese sowie eine Reduktion der Ribosomen zu erwarten gewesen. Durch entsprechend weniger rRNA-Zielmoleküle könnten demnach die niedrigeren FISH-Signale, im Vergleich zu DAPI, erklärt werden. Im Umkehrschluss läge der Grund für die höheren FISH-Signalintensitäten bei den PLA-Materialien wiederum im exponentiellen Wachstum, mit erhöhter ribosomaler Aktivität, begründet. Neben Platz- und Nährstoffangebot, könnte auch die hydrolytische Spaltung des biologisch abbaubaren PLA eine Rolle spielen und sollte für mögliche Langzeitversuche berücksichtigt werden [119].

Zukünftig könnte eine Verlängerung der Adhäsionszeiten mit optionalem Mediumwechsel die Bedingungen verbessern, was durch metabolisch aktivere Bakterien zu intensiveren, homogeneren Signalen im FISH-Versuch führen könnte. Allerdings ist das Zeitfenster bis zur eindeutigen Diagnostik begrenzt und Schwankungen zwischen den Arten müssen ebenfalls berücksichtigt werden. Daher muss, je nach Anwendungsfall, ein Kompromiss zwischen qualitativer Identifikation der Bakterien und quantitativen Abschätzungen der Bakterienanzahl gefunden werden. Gegebenenfalls müssen weitere Zusatzuntersuchungen angeschlossen werden.

Beim Vergleich der gemessenen Fluoreszenzsignale der DAPI-Färbungen zeigte ABS die besten Ergebnisse, hervorgerufen durch eine bessere Adhäsion der Bakterien. Um möglichst viele Bakterien einer Probe analysieren zu können, sollte sich bei einer weiteren Erkennung mit FISH auf das Material ABS beschränkt und Optimierungen im Druckprozess in Betracht gezogen werden. Im Vergleich zu den anderen Materialien zeigte ABS zudem Vorteile in der Handhabung, was sich in einer homogeneren Flüssigkeitsbenetzung der Oberflächen und damit einer gleichmäßigeren Verteilung der enthaltenen Bakterien zeigte.

Zusammenfassend zeigte ABS ein Adhäsionsmuster von dicht adhärennten Bakterien und erzielte bei diesem Assaytyp die besten Ergebnisse. PLA (Elegoo) war wiederum das Material ohne eine deutliche Adhäsion von Bakterien und schien im Vergleich zu den anderen Materialien nicht für Adhäsions- oder Wachstumsversuche geeignet zu

sein. Die statistischen Testergebnisse der anderen Materialien sind als Zusatzmaterial des elektronischen Artikels verfügbar (Supp. IA [2]).

3.4.4 Biofilmbildung auf 3D-gedruckten Probenträgern

Neben der spezifischen Möglichkeit zur Identifikation durch FISH, sollte nun mehr das Wachstumsverhalten von Mikroorganismen auf den Materialoberflächen untersucht werden. Hierzu wurde die Biofilmbildung von Bakterien (*E. coli*, *S. aureus*) auf gedruckten Probenträgern beobachtet.

Unter den vier ausgewählten Materialien adhärten die Bakterien besonders gut auf dem ABS-Polymer (Tronxy) und besiedelten größere und dichtere Oberflächenbereiche (Abb. 33). Auch bei den drei PLAs (schwarz/mattschwarz, Das Filament; schwarz, Elegoo) wurde eine Biofilmbildung beobachtet, wenn auch in geringerem Maße.

Neben materialtypspezifischen Eigenschaften, beeinflusst durch die chemische Zusammensetzung des Polymers (unbekannte Additive wie Pigmente usw.), mussten auch druckprozessspezifische Parameter im Detail betrachtet werden. Bei der Bewertung des Kolonisationsbereichs durch Bakterien waren nicht nur molekulare Wechselwirkungen (abhängig von der Materialzusammensetzung), sondern auch die Beschaffenheit der Mikro- und Makrooberflächen von Bedeutung [120]. So wurden Unregelmäßigkeiten auf der Oberfläche durch Verschmutzung oder Beschädigung der Druckerdüse beobachtet. Dadurch konnten Mikroorganismen eine größere Angriffsfläche für Adhäsion und Kolonisation erhalten. Die typische Rillenstruktur, die durch die linearen Bewegungen des Druckkopfes verursacht wurde, kann problematisch sein. In den oberflächlichen „Tälern“ schien so eine stärkere Besiedlung mit Bakterien aufgetreten zu sein als in den höheren abgerundeten „Berggebieten“ der Materialoberfläche. Bei einem ausreichend großen Höhenunterschied kann von einem quantitativen Unterschied bei den Bakterien sowie einem Berg-Tal-Gradienten der verfügbaren Nährstoffe ausgegangen werden. Beispielsweise müssen, bei der Evaluierung antibiotisch wirksamer Substanzen und Oberflächenparameter auf die Bildung von Biofilmen, auch morphologische Materialeigenschaften berücksichtigt werden, da diese zu unspezifischen Ergebnissen führen können [121].

Für besonders glatte und homogene Oberflächen ist daher beim Druck auf eine dichte Überlappung und Verschmelzung der Druckerzeugnisse zu achten. Diese können

durch entsprechende Nachbehandlungen (z. B. Aceton-Dampfbehandlung bei ABS) weiter verbessert werden.

Der Einfluss der mikro- und nanoskaligen Topografie, auf die Adhäsion von Bakterien, könnte hingegen auch effektiv ausgenutzt werden. Eine gezielte Mikrostrukturierung der Oberflächen könnte einerseits Kontaktflächen maximieren und andererseits einzelne Bakterien zu einer orientierten Ausrichtung bewegen [122]. Im Gegensatz zu industriellen Einrichtungen und Krankenhäusern, in denen eine solche spezifische Adhäsion vermieden werden soll, könnte diese, in optimierten Assays, enorme Vorteile für automatisierte Messungen bieten.

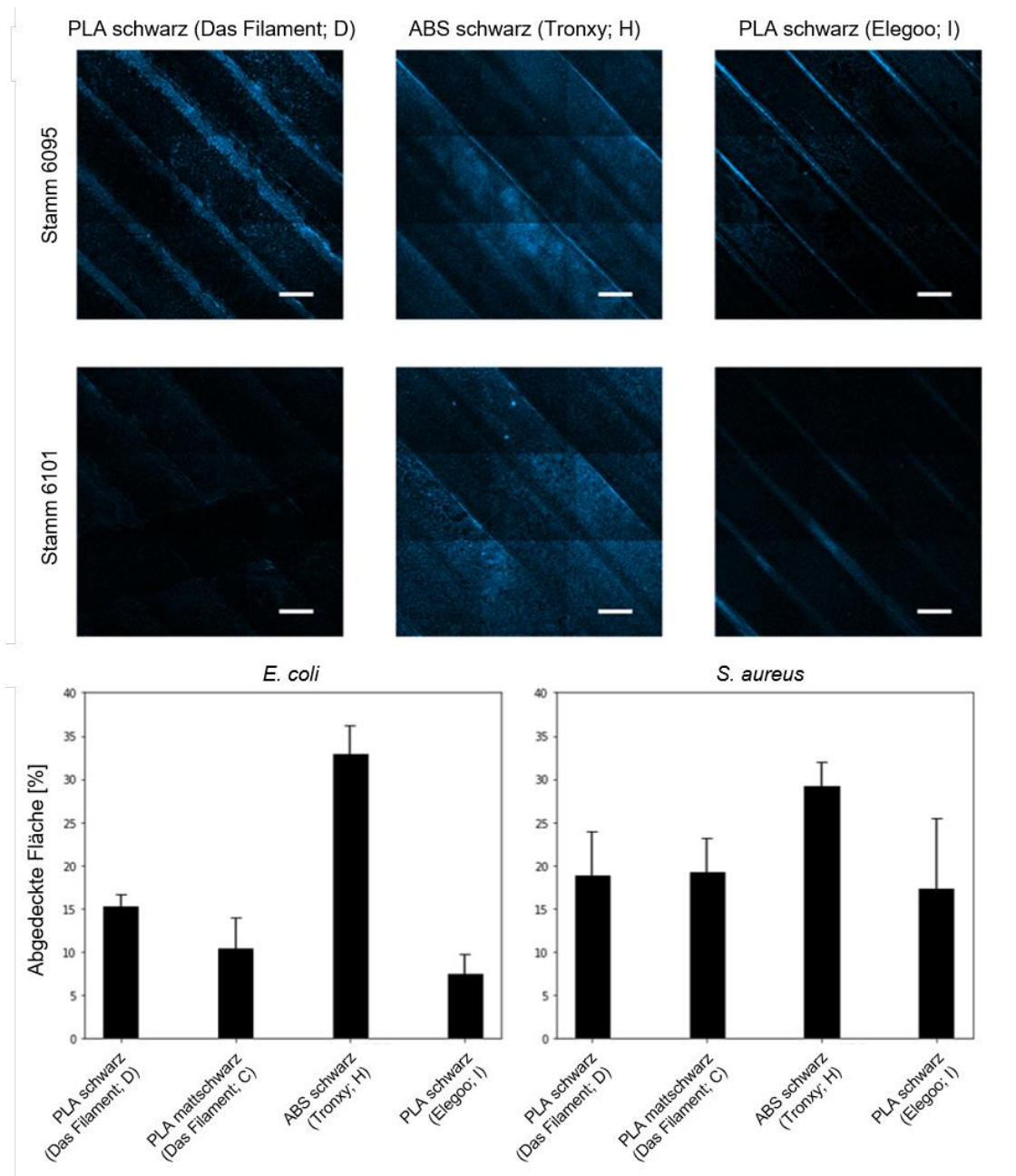


Abb. 33 Biofilmbildung auf gedruckten Probenträgeroberflächen. Gezeigt sind die Ergebnisse für Biofilme (*E. coli*, *S. aureus*) auf Probenträgern aus PLA (schwarz/mattschwarz, Das Filament; schwarz, Elegoo) und ABS (schwarz, Tronxy). Die Bakterien *E. coli* und *S. aureus* haften und bildeten einen Biofilm auf allen Materialien. ABS ist das Material mit der dichtesten Bakterienbesiedelung. **Oben:** Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen die mit Biofilm bedeckten Oberflächen. 3DP-typische Rillenstrukturen sind erkennbar. **Unten:** Bildanalyse auf Basis genomischer DNA-Signale (DAPI). $n = 4$, die Standardabweichung ist auf den Balken dargestellt, $* = p < 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

Zusätzliche Beschichtungen mit einer Gelmatrix und Biomolekülen, beispielsweise Collagen, Polylysin oder Fibronectin, wie sie für Zell- und Gewebekultivierungen üblich sind, könnten weitere Vorteile bieten [123, 124]. Zum einen würden dadurch auch geringe Unebenheiten reduziert und zum anderen die Haftung von Mikroorganismen weiter erhöht werden.

Noch entscheidender sind solche Beschichtungen für komplexere Untersuchungen eukaryotischer Zellen. Hier beeinflussen Oberflächenmodifikationen durch extrazelluläre-Matrix-assoziierte Substanzen nicht nur die Adhäsion, sondern auch andere Aspekte der Zellbiologie, wie Proliferation, Mobilität und Morphologie [125].

Mit entsprechendem Equipment sind zudem Plasmabehandlungen der Materialien vorstellbar. Durch oberflächliche Ladungsveränderungen könnte so ebenfalls die Adhäsion von Bakterien oder Zellen für verschiedene Assays gesteigert werden. Gleichzeitig wäre dadurch eine effektive Sterilisation der Produkte schon während der Herstellung realisierbar [126].

Neben den chemischen und physikalischen Bedingungen müssen auch bei der Messmethode Kompromisse eingegangen werden. Eine besondere Rolle spielt die ermittelte Schichtdicke. Insbesondere bei Biofilmen auf unebenen Oberflächen sollten daher Stapelaufnahmen aus verschiedenen Fokusebenen verwendet werden. Da die Frage nach einer grundlegenden Kolonisationsfähigkeit und Biofilmbildung auf 3D-gedruckten Objekten geklärt werden sollte, wurden hingegen nur größere, einschichtige Übersichtsbilder aufgenommen. Die Daten sind eine Annäherung auf Grundlage der Analyse der kolonisierten Oberflächenbereiche und damit ein Anhaltspunkt für erweiterte Studien. Unter Berücksichtigung und Optimierung der oben beschriebenen Parameter könnten genauere Untersuchungen hinsichtlich der individuellen Zellquantifizierung durchgeführt werden. Zur Beurteilung setzt dies allerdings, selbst unter Standardbedingungen, spezifische Erfahrungen voraus [127].

Auch in Bezug auf die Fluoreszenzeigenschaften hat sich gezeigt, dass sich diese Materialien zur Analyse solcher Kolonisations- und Biofilmexperimente eignen. Nach der Färbung mit DAPI wurde mit den gewählten Belichtungseinstellungen keine auffällige Hintergrundfluoreszenz beobachtet. Die getesteten Materialien können daher für unterschiedliche Fluoreszenzdetektionsanwendungen eingesetzt werden. Obwohl Durchlichtaufnahmen nicht ausgewertet werden konnten, bietet dieses Format die Möglichkeit, die Haftung und Kolonisation an Polymeren zu untersuchen. Als ein Anwendungsfeld unter vielen bietet sich beispielsweise die Untersuchung und Evaluierung von Materialien für den Einsatz in Implantatanwendungen an. Neben stabilen Kunststoffen für Langzeitimplantate, spielt hierbei auch das 3D-druckbare PLA eine Rolle, aus dem beispielsweise abbaubare chirurgische Nähte oder sogenannte *drug delivery devices* gefertigt werden [59, 128]. Langzeitversuche mit bioanalytischen Testgeräten sind allerdings begrenzt möglich, da die Degradierung von biologisch

abbaubaren Polymeren je nach Versuchsbedingungen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit erfolgt [129]. So wurde bereits in diesen Biofilmexperimenten ein starker, kulturuntypischer Geruch festgestellt, der wahrscheinlich auf einen beginnenden biologischen Abbau zurückzuführen war.

3.4.5 Analyse der Zelladhäsion

Neben mikrobiologischen Anwendungen zur Identifizierung und Charakterisierung von Bakterien sind, in unterschiedlichen diagnostischen wie auch therapeutischen Bereichen, eukaryotische Zellen von besonderem Interesse. Neben grundlegenden Untersuchungen zur Zell- und Gewebekultivierung ist, beispielsweise in der Onkologie, die Analyse von entarteten Zellen sehr bedeutend. Um zu klären, ob sich die gedruckten Materialien überhaupt zur Untersuchung der vergleichsweise sensiblen Zellen eignen, wurden Zelladhäsionsversuche unternommen.

Die Zelladhäsion konnte auf den 3D-gedruckten Probenträgern aus schwarzem sowie mattschwarzem PLA (Das Filament) und schwarzem ABS (Tronxy) für alle Zelllinien beobachtet werden (Abb. 34, Abb. 35).

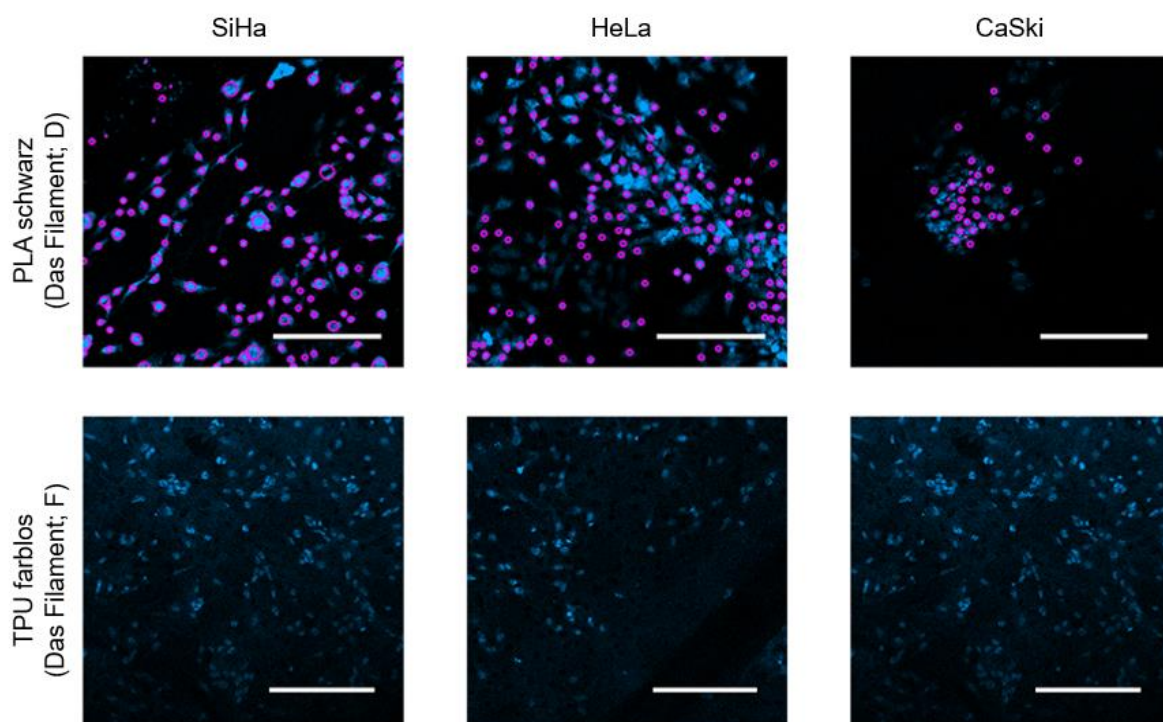


Abb. 34 Bestimmung der Zelldichte auf gedruckten Probenträgern. Die Zellkerne von SiHa-, HeLa- und CaSki-Zellen wurden automatisch gezählt. Obere Reihe: Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C nach der Aussaat (rund 4000 Zellen·mm⁻²) inkubiert, PFA-fixiert und mit DAPI gefärbt. Magentafarbene Kreise geben die detektierten Kerne sowie deren ungefähren Durchmesser an. Untere Reihe: Adhäsionsmuster der Zelllinien auf TPU (rund 500 Zellen·mm⁻², ausgesät in einer 6-Well-Platte mit einem ca. 1 cm² großen TPU-Teststück). Die Zellen wurden 48 h bei 37 °C nach der Aussaat inkubiert, mit 4 % PFA fixiert und mit DAPI gefärbt. Maßstabsbalken: 200 µm.

Der verwendete Analyse-Algorithmus wurde im Allgemeinen bei Bildern mit getrennt liegenden Kernen mit ausreichend hohem Kontrast zum Hintergrund (hohes Signal-Rausch-Verhältnis) durchgeführt. Er scheiterte aber bei Bildern, bei denen die Zellen zu dicht und überlagert vorlagen.

Bei der Analyse musste auch die durch den Druckprozess verursachte Oberflächentopografie berücksichtigt werden, die zu einer teilweise gerichteten Verteilung sowie zu einer leicht veränderten Position der Zellen in der z-Achse führte. Möglichkeiten zur Optimierung dieser Effekte wurden bereits im vorherigen Abschnitt zur Biofilmbildung beschrieben. Dennoch wurde bei der Untersuchung ganzer Wells ein unterschiedliches Haftverhalten beobachtet. Während SiHa- und HeLa-Zellen eine insgesamt gleichmäßige Verteilung über die Oberfläche zeigten, die für alle Materialien vergleichbar war, wurde bei CaSki-Zellen keine uniforme Adhäsion beobachtet. CaSki-Zellen neigten hier eher zur Bildung von Zellklumpen (Cluster). Bei CaSki-Zellen wurde ebenso eine teilweise Ablösung der Zellschicht vom Material beobachtet. Dies deutete darauf hin, dass CaSki-Zellen im Gegensatz zu SiHa- und HeLa-Zellen nicht optimal auf den Materialoberflächen haften können.

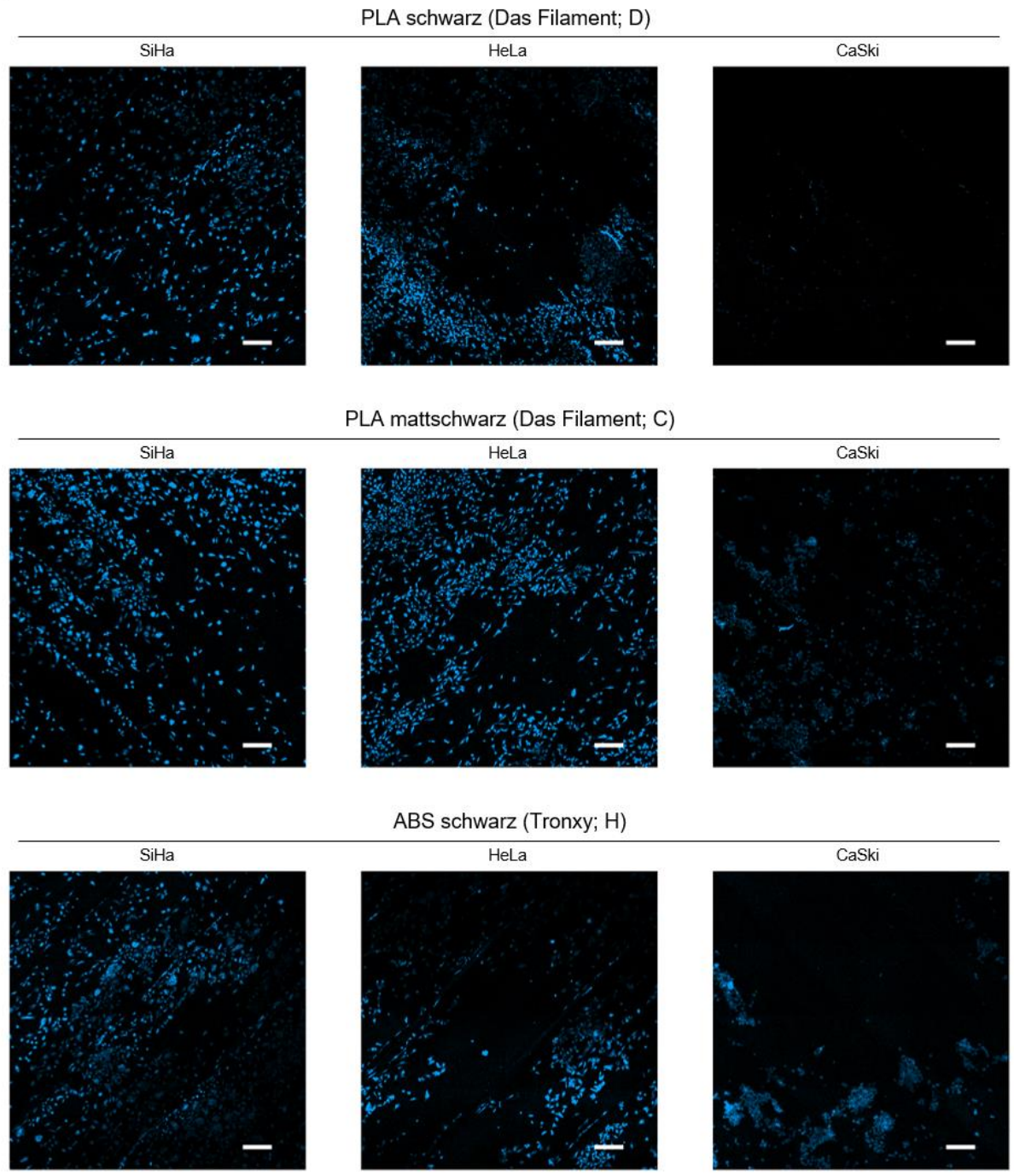


Abb. 35 Adhäsionsmuster der Zelllinien SiHa, HeLa und CaSki auf gedruckten Probensträgern. Auf gedruckten Well-Probensträgern aus PLA (schwarz/mattschwarz, Das Filament und ABS (schwarz, Tronxy)) wurden rund 2000 Zellen·mm⁻² ausgesät, 24 h inkubiert, mit 4 % PFA fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Zelllinien SiHa und HeLa zeigten ein Muster von dicht adhärenenden Zellen mit einer gleichmäßigen Zellverteilung auf den Materialien. CaSki-Zellen lagen nur ungleichmäßig verteilt vor und waren durch die Bildung von Zellklumpen gekennzeichnet. Maßstabsbalken: 200 µm.

Weiterhin zeigten die Analysen, dass alle Zelllinien ebenfalls auf TPU adhärten. Im Gegensatz zu den anderen Materialien konnte kein qualitativer Unterschied im Adhäsionsmuster der Zelllinien festgestellt werden.

Zur objektiven Beurteilung wurde die Zelladhäsion durch digitale Bildanalyse evaluiert (siehe Abschnitt 2.11.8). Die geringere Adhäsion von CaSki-Zellen sowohl auf PLA als auch auf ABS wurde durch die Analyse der mittleren Bildintensität und der Bestimmung der mittleren Zellzahl ebenfalls bestätigt (Tab. 19, Abb. 36, Abb. 37). Im Vergleich zu SiHa und HeLa wurden in beiden Fällen für CaSki deutlich geringere Werte ermittelt. Dies wurde in gleicher Weise bei allen getesteten Materialien und Verdünnungen beobachtet.

Tab. 19 Ergebnisse zur Analyse der Zelladhäsion über Bildintensität und Zellzahlbestimmung

Zellen	Material	Mittlere Bildintensität i	Mittlere Zellzahl n
CaSki	ABS	10,09 ± 3,14 ($p = 0,2638$)	125,96 ± 99,33 ($p = 0,076$)
	PLA (schwarz)	5,02 ± 4,82 ($p = 0,2104$)	84,29 ± 78,98 ($p = 0,111$)
SiHa	ABS	23,26 ± 2,07 ($p = 0,001$)	495,89 ± 45,67 ($p = 0,001$)
	PLA (schwarz)	22,13 ± 3,62 ($p = 0,001$)	574,16 ± 99,58 ($p = 0,001$)
	PLA (mattschwarz)	·	605,46 ± 170,08 ($p = 0,001$)
HeLa	ABS	25,96 ± 6,93 ($p = 0,001$)	586,85 ± 122,83 ($p = 0,001$)
	PLA (schwarz)	31,47 ± 9,88 ($p = 0,001$)	771,39 ± 234,84 ($p = 0,001$)
	PLA (mattschwarz)	·	1344,18 ± 185,76 ($p = 0,001$)

Es wurde kein Gradient zwischen den verschiedenen Zahlen der gesäten Zellen beobachtet. Für alle getesteten Zellzahlen war kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle sowohl für die durchschnittliche Bildintensität als auch für die geschätzte Zellzahl zu beobachten. Dies deutete zudem auf eine schwache Zelladhäsion der Zellen auf den getesteten Materialien hin. Aufgrund der dichten Ballung von CaSki-Zellen bei höheren Zellzahlen (2115,15 Zellen·mm⁻² und mehr) konnte die eingesetzte digitale Zählmethode zur Unterscheidung von Zellen nicht optimal ausgeführt werden. Somit wurde die durchschnittliche Bildintensität als zuverlässigerer Indikator für ein solches Wachstumsmuster angesehen.

Die ungefähren Zellzahlen für SiHa- und HeLa-Zellen zeigten ähnliche Ergebnisse wie die beobachtete durchschnittliche Intensität. Die höchste Anzahl von Zellen wurde auf mattschwarzem PLA für HeLa-Zellen (ca. 1344) und SiHa-Zellen (ca. 605) ermittelt, mit einer allgemein höheren Zellzahl bei der Linie HeLa. Die niedrigsten Zellzahlen für HeLa und SiHa wurden für schwarzes ABS bestimmt. Beide Zelllinien zeigten einen Gradienten für alle getesteten Verdünnungen. Ein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zur Negativkontrolle war für alle gesäten Zellzahlen, mit Ausnahme von schwarzem PLA (Das Filament) für SiHa-Zellen (signifikanter Unterschied nur bei 2115,15 und 4230,3 Zellen·mm⁻²) und mattschwarzem PLA (Das Filament) für HeLa-

Zellen (signifikanter Unterschied nur bei 4230,3 Zellen·mm⁻²), zu beobachten. Die ermittelte durchschnittliche Bildintensität zeigte einen ähnlichen Trend.

Die vorliegenden Adhäsionsversuche haben gezeigt, dass humane Zellen prinzipiell auf 3D-gedruckten Materialien haften und mittels einfachen zellbiologischen Färbemethoden analysiert werden können. Dieses Ergebnis ebnet den Weg für weitere spezifische Assayentwicklungen, bei denen individuell gedruckte Reaktionskammern zum Einsatz kommen könnten. Vorstellbar wären beispielsweise onkologische Untersuchungen von Krebszellen aus dem Blut oder aus Biopsien von soliden Tumoren. So könnten, unter Berücksichtigung entsprechender Materialeigenschaften, zytologische Standardmethoden wie Antikörperfärbungen und FISH-Versuche auch auf diesen individuellen Objekten durchgeführt werden. Zur Demonstration dieser Möglichkeiten wurden *proof-of-principle*-Experimente zur Analyse humaner Krebszellen durchgeführt, welche im nächsten Abschnitt beschrieben werden.

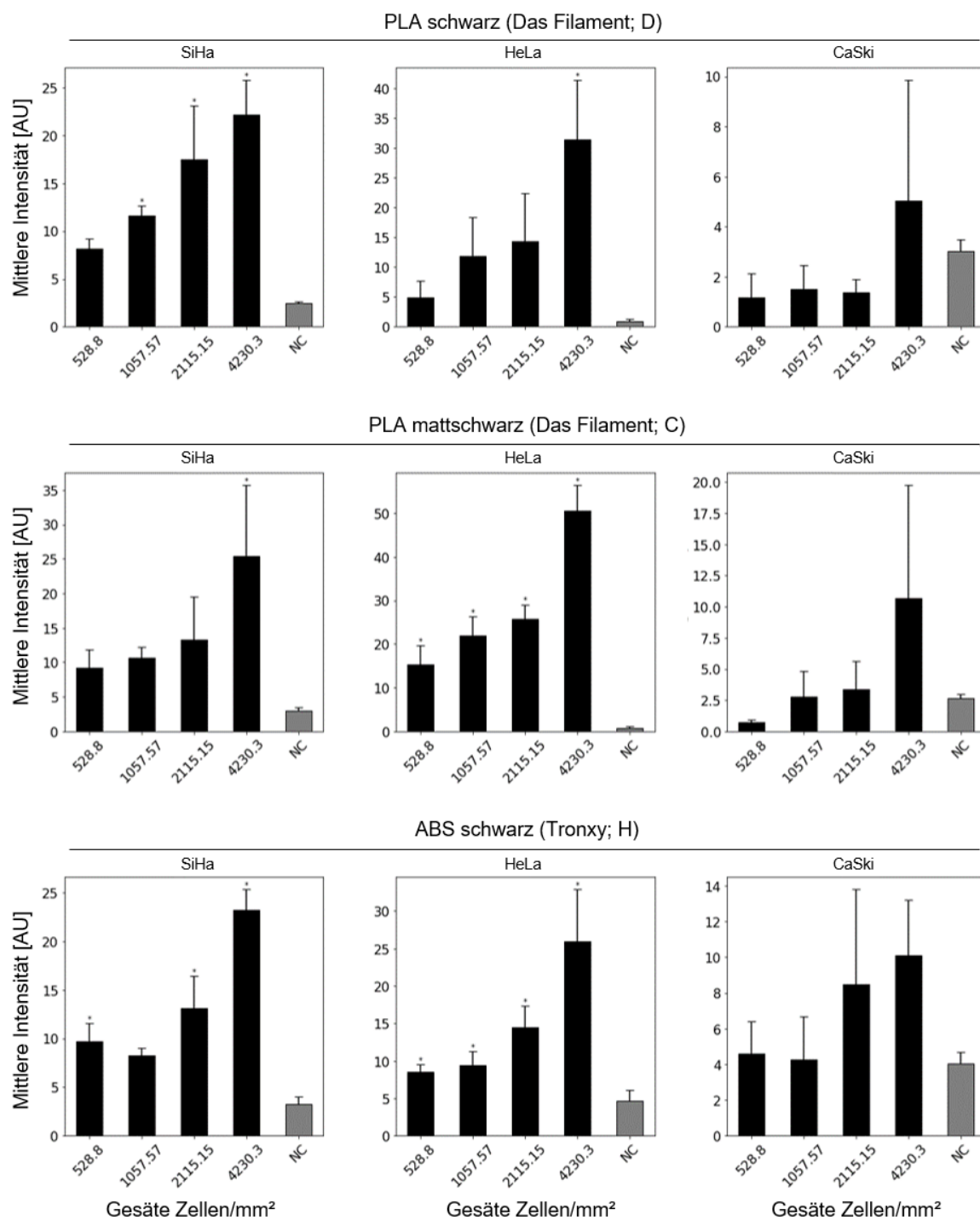


Abb. 36 Durchschnittliche DAPI-Fluoreszenzintensität von Zelllinien auf gedruckten Probenträgern. Dargestellt sind die Ergebnisse für PLA (schwarz/mattschwarz, Das Filament) und ABS (schwarz, Tronxy). Die Zellen wurden 24 h inkubiert, PFA-fixiert und DAPI-gefärbt. Als Indikator für die Adhäsion wurden die durchschnittlichen Pixelintensitäten der fluoreszenzmikroskopischen Digitalbilder analysiert. Für mattschwarzes und schwarzes PLA wurden die höchsten Pixelintensitäten für HeLa-Zellen beobachtet. SiHa-Zellen zeigten für beide PLA-Filamente geringere Intensitäten als HeLa. Die Ergebnisse für HeLa- und SiHa-Zellen waren für ABS vergleichbar. CaSki zeigte im Vergleich die geringsten Intensitäten für alle drei Materialien bei allen Zellaussaatzahlen und dadurch eine geringere Zelladhäsion. NC = Negativkontrolle, $n = 4$, Standardabweichung als Fehlerbalken, $* = p < 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

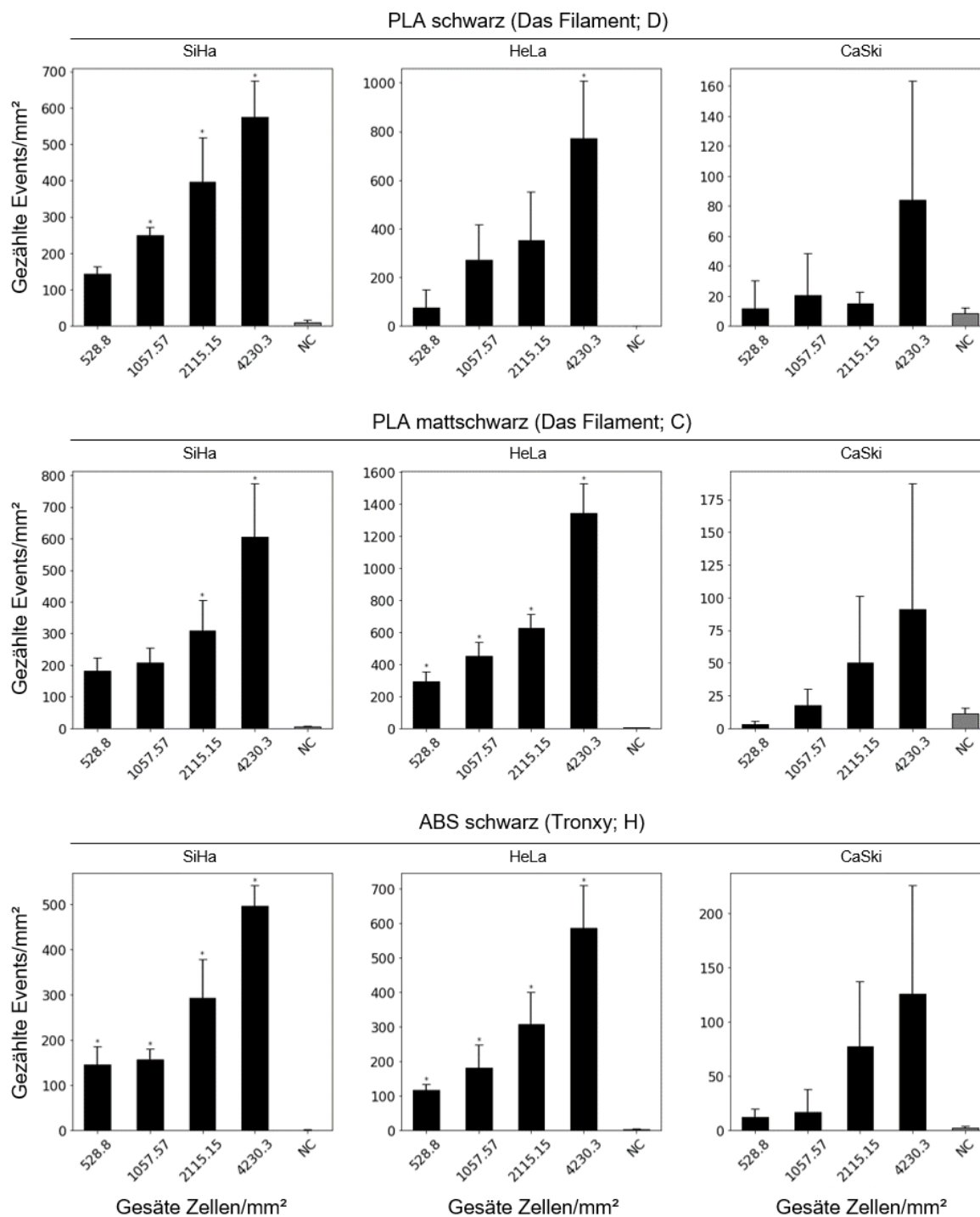


Abb. 37 Näherungswerte der Zellzahl der Zelllinien SiHa, HeLa und CaSki auf gedruckten Probensträgern. Dargestellt sind die Ergebnisse für PLA (schwarz/mattschwarz, Das Filament) und ABS (schwarz, Tronxy) für alle getesteten Zellzahlen. Die Zellen wurden 24 h inkubiert, PFA-fixiert und DAPI-gefärbt. Die Ermittlung der Zellzahlen erfolgte durch digitale Bildanalyse fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen. Für beide getesteten PLA-Typen wurden die höchsten Zellzahlen für HeLa-Zellen beobachtet. SiHa-Zellen zeigten bei beiden PLA-Typen generell niedrigere Zellzahlen als HeLa-Zellen. Die für HeLa- und SiHa-Zellen bestimmten Zellzahlen waren für ABS vergleichbar. NC = Negativkontrolle, $n = 4$, Standardabweichung als Fehlerbalken, * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

3.4.6 Einsatz des 3D-Drucks in Anwendungen zur Analyse eukaryotischer Zellen

HPV-FISH in eukaryotischen Zellen auf gedruckten Probenträgern

Neben des FISH-Nachweises von Bakterien auf gedruckten Probenträgern, konnte die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ebenso für eukaryotische Zellen angewendet werden. Trotz der harschen Bedingungen, wie hohen Temperaturen (76 °C zur Hybridisierung) und verschiedenen Lösungsmitteln (Methanol, Ethanol, Essigsäure, Formamid), denen die Materialien ausgesetzt waren, konnte das stabile ABS (Tronxy) ohne Probleme eingesetzt werden. Abb. 38 zeigt einen repräsentativen Versuch bei dem eine biotinylierte, HPV-spezifische FISH-Sonde (BC-7.1) zum Nachweis von CaSki-Zellen auf einem 3D-gedruckten ABS-Probenträger eingesetzt wurde (Vorgehen äquivalent zu Abschnitt 2.7.2). Einzig die druckbedingte Oberflächenbeschaffenheit machte die Analyse durch die unterschiedliche Lage der Zellen in der z-Ebene etwas schwieriger und musste daher manuell ausgeführt werden. Für zukünftige Untersuchungen kann die oberflächliche Struktur durch optimierte Druckparameter und Modifikationen, wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, verbessert werden und so auch automatisierte Analysen ermöglichen.

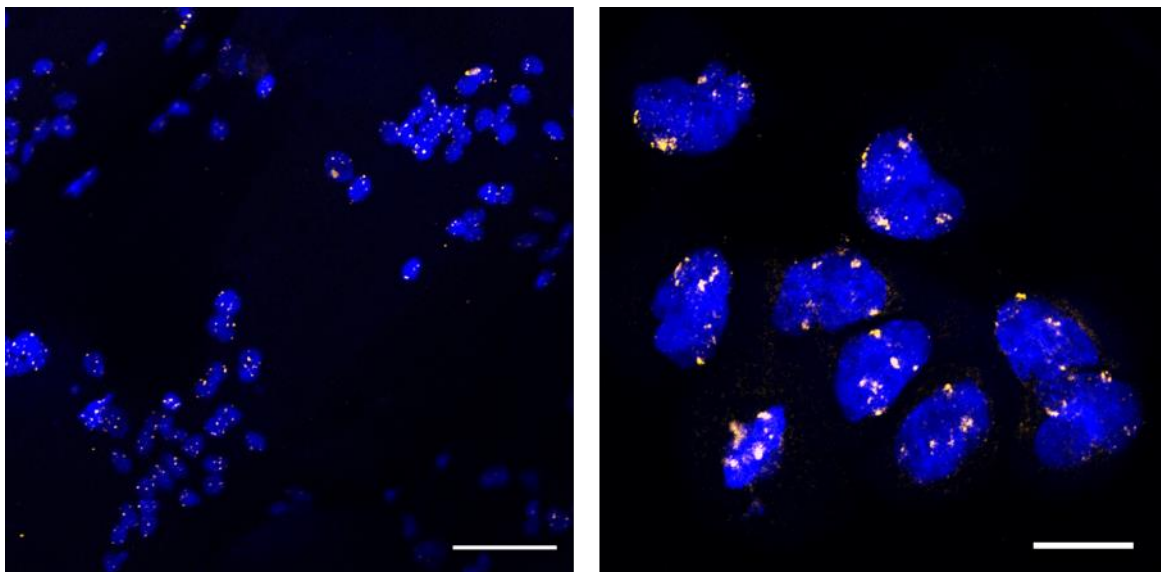


Abb. 38 FISH in eukaryotischen Zellen auf gedruckten Probenträgern. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen (CSLM, links: 20×, rechts: 40× Objektiv) von Methanol/Eisessig fixierten CaSki-Zellen. Die Zellen wurden auf 3D-gedruckten, schwarzen ABS-Probenträger aufgebracht. Als Sonde wurde BC-7.1 eingesetzt. Der Nachweis erfolgte durch Streptavidin-Cy3 (in Falschfarbendarstellung als gelbe Signale). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Maßstabsbalken: 100 µm (links) und 20 µm (rechts).

Analyse von Doppelstrangbrüchen auf modifizierten Objektträgern

Neben dem 3D-Druck ganzer Analysematerialien aus 3DP-Filamenten, sind auch Modifikationen bereits verfügbarer Assaykomponenten möglich. Beispielsweise

können mit optimierten 3DP-Prozessen einfache Kunststoffobjektträger nachträglich mit individuellen Strukturen versehen werden. So ließen sich zwei Vorteile miteinander verbinden. Zum einen bieten transparente Materialien bessere optische Eigenschaften für die Mikroskopie. Zum anderen können spezifische Kavitäten und Kanäle aufgedruckt werden, wodurch auch komplexere Assays mit einer solchen Vorrichtung durchgeführt werden können.

Abb. 39 zeigt exemplarisch, wie eine solche Modifikation umgesetzt werden kann (siehe auch Dinter *et al.* (2020) [130]). Ein Objektträger mit Standardmaßen (75 × 25 mm, Material: PMMA, PolyAn) wurde direkt mit transparentem PMMA-Filament (Material4Print) bedruckt. Als *proof-of-principle* dienten dazu einfache Strukturen zur Erzeugung von Probenreservoirs, die über angebundene Kanäle befüllt werden konnten. Die hier dargestellte Anwendung demonstriert die Nutzung in Kombination mit Standardmethoden, wie der Immunzytochemie. In diesem Versuch wurden DNA-Doppelstrangbrüche (Biomarker für den Effekt einer Krebstherapie) in adhärenz Tumorzellen (SiHa) mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Zellen wurden in den Kammern kultiviert und nach Versiegelung mit Deckgläsern über fluidische Kanäle (400 µm) befüllt und gewaschen. Die DSB-assoziierten Biomarker γH2AX und 53BP1 wurden nach einer Standardimmunfluoreszenzfärbung (AKLIDES® Nuk Testkit, Medipan, Protokoll nach Herstellervorgaben) mit einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen und analysiert. Die digitale Bildanalyse zeigte, dass eine automatische Quantifizierung auf den modifizierten Polymermaterialien ebenso möglich war, wie sie normalerweise auf Standardobjektträgern aus Glas ohne zusätzliche Strukturen stattfindet [131].

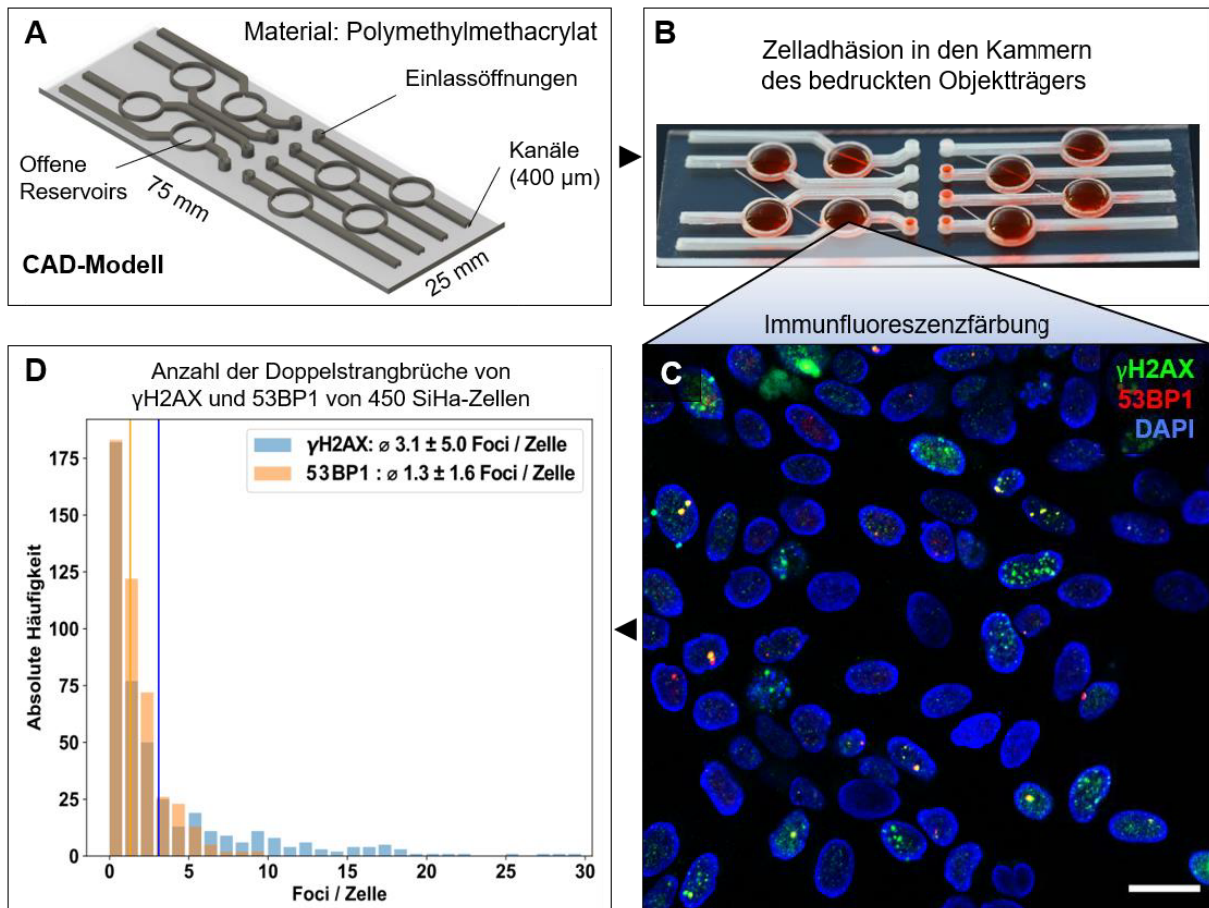


Abb. 39 Immunfluoreszenzfärbung auf einem 3DP-modifizierten Objektträger. Kunststoffobjektträger können durch 3D-Druck mit individuellen Komponenten ausgestattet werden [130]. So lassen sich mit geringem Aufwand vielseitige bioanalytische Anwendungen realisieren. Das Beispiel demonstriert den Einsatz beim Nachweis von Doppelstrangbrüchen. Zur Veranschaulichung wurden einfache Reservoirs und Kanäle zu deren Befüllung gewählt. Die entsprechenden Strukturen wurden digital geplant (A) und direkt auf Kunststoffobjektträger gedruckt (Material: jeweils PMMA). Eine Zellkultursuspension (SiHa) wurde in die Kammern pipettiert und über Nacht (37 °C) inkubiert (B: befüllte Kammern). Die auf der Objektträgeroberfläche adhärenierten Zellen wurden gewaschen und fixiert (2 % PFA). Die DSB-assoziierten Biomarker γ H2AX (grün, FITC) und 53BP1 (rot, Cy5) wurden durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert (C: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Maßstab = 20 μ m). Gegenfärbung der DNA mit DAPI (blau). Die Punktsignale (Foci) wurden mittels *Bioimage informatics* [98] quantifiziert. Die Häufigkeiten der Biomarker γ H2AX und 53BP1 unterschieden sich. Die meisten Zellen in diesem Versuch zeigten nur wenige Doppelstrangbrüche (durchschnittlich $3,1 \pm 5,0$ γ H2AX-Foci pro Zelle).

Die Analyseexperimente haben gezeigt, dass 3D-gedruckte Objekte gut zur Kultivierung verschiedener zellulärer Organismen sowie zu deren fluoreszenzbasierten Analyse einsetzbar sind. Hierbei lassen sich sowohl prokaryotische Bakterien als auch eukaryotische humane Zellen verwenden und untersuchen. Die Möglichkeit zur Anpassung von Standardmaterialien macht das Rapid-Prototyping darüber hinaus zu einer idealen Hilfstechologie in der Entwicklung und Erweiterung von komplexen bioanalytischen Untersuchungsmethoden.

3.4.7 Ergebnisse der DNA-Capture-Analyse im Chip-Format

Neben der Analyse ganzer Zellen oder intrazellulärer Komponenten, geht es in der Bioanalytik oft um den Nachweis spezifischer Analyten aus flüssigen, teilweise auch vorab aufgereinigten Proben. Diese Materialien können aus Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin, Liquid-Biopsy-Entnahmen oder von einfachen Abstrichen stammen. Je nach Fragestellung gibt es dafür verschiedene Aufarbeitungs- und Analyseverfahren. Im Bereich der Schnell Diagnostik sind beispielsweise Lateral-Flow-Immunoassays (LFIAs) eine feste Größe. Solche kleinen Testgeräte benötigen keine spezielle Ausbildung oder Ausrüstung für die Bedienung und liefern innerhalb von Minuten ein Ergebnis. Daher werden sie schon lange auf eine breite Palette an Zielmolekülen in analytischen *in-vitro*-Assays eingesetzt. Dazu zählen die Identifizierung von Markern für Infektionskrankheiten, der Nachweis toxischer Verbindungen oder die Überprüfung von Medikamentengebrauch oder das Vorhandensein von Krankheiten anzuzeigen [132].

Zur Untersuchung von, in bioanalytischen *in-vitro*-Tests einsetzbaren, 3D-gedruckten Formaten, wurde ein einfacher Zweikammerchip entworfen, welcher nach dem Lateral-Flow-Verfahren funktionierte. Nach der Befüllung wurde die flüssige Probe (hier DNA) über einen Filterstreifen in Probenkammern transportiert und dort über ein Reportermolekül (in diesem Fall fluoreszenzmarkiert) nachgewiesen.

Die Versuche zeigten einen erfolgreichen Einsatz von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden in 3D-gedruckten Chips aus den vier PLA- (schwarz / mattschwarz, Das Filament; schwarz, Elegoo) und ABS- (schwarz, Tronxy) Filamenten (Abb. 40).

Dabei zeigte keines der PLA-Materialien einen Vorteil gegenüber den anderen. ABS erbrachte die beste Reproduzierbarkeit bei der DNA-Detektion mit den geringsten Standardabweichungen. Die Werte für die beiden niedrigsten Konzentrationen (50 nM und 100 nM) lagen an der Nachweisgrenze und variierten daher. Im Hinblick auf die Handhabung des Detektionsverfahrens müssen in Zukunft einige Schritte, wie das Waschen und gleichmäßige Befüllen, durch Änderungen am 3D-Druck oder die Verwendung anderer Materialien und Puffersysteme, optimiert werden.

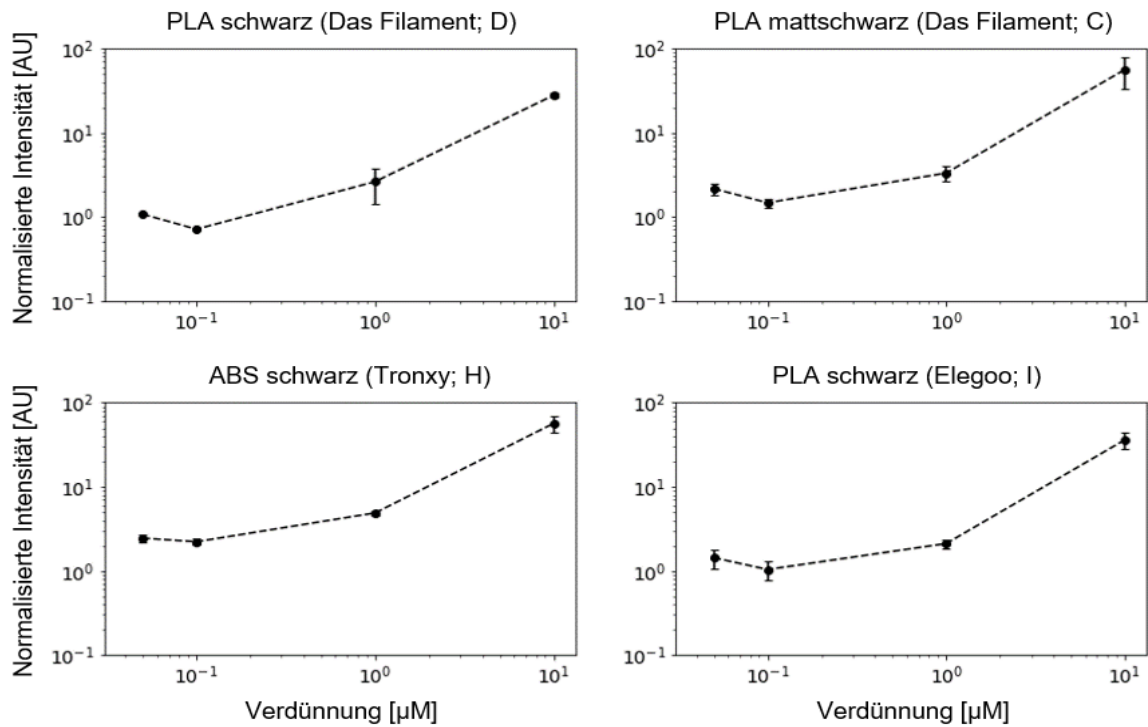


Abb. 40 Normalisierte Fluoreszenzintensität auf Nitrozellulosemembranen in 3D-gedruckten Chips. Zum Einsatz kamen ATTO 647N-markierte DNA-Sonden. Die 2-Kammer-Chips wurden aus den Materialien PLA (schwarz / mattschwarz, Das Filament; schwarz, Elegoo) und ABS (schwarz, Tronxy) hergestellt. Bei allen Materialien konnte eine fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde in den Chips nachgewiesen werden. Die Signale der beiden niedrigsten Konzentrationen 50 nM und 100 nM lagen an der Nachweisgrenze und variierten daher. ABS stellte die Werte mit der geringsten Standardabweichung dar und ist daher für die Detektion mit fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden am besten geeignet. $n = 2$, * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle.

3.4.8 Zusammenfassung der Filamenteigenschaften

Vierzehn gebrauchsfertige Polymerfilamente von fünf Herstellern wurden auf ihre thermischen und spektralen Eigenschaften sowie die Herstellung bioanalytischer Testsysteme getestet. Zusammenfassend gibt diese Arbeit, auf Grundlage der durchgeführten Untersuchungen in Tab. 20., detailliertere Informationen über ihre Eigenschaften und Empfehlungen für ihre Anwendbarkeit

Abgesehen von komplexeren Verarbeitungsbedingungen im Druckprozess, erwies sich ABS bei den verschiedenen Untersuchungen und funktionellen Assays als Favorit. Neben der hohen Temperaturbeständigkeit wurde festgestellt, dass es sowohl in Fluoreszenzanwendungen als auch in Experimenten mit Mikroorganismen oder Zellen universell einsetzbar ist.

Tab. 20 Vergleich von Filamenteigenschaften für den 3D-Druck von bioanalytischen Untersuchungssystemen

#	Typ	Farbe	Hersteller	Geeignete Fluoreszenzkombinationen				Thermische Eigenschaften			Funktionale Assays			
				DAPI	FITC, Cy2	TRITC, Cy3	Cy5	T_g [°C]	T_r [°C]	T_m [°C]	Zell- adhäsion	Biofilm- bildung	FISH	DNA Capture
A	PLA	Weiß	Raise3D	×	×	✓	✓	·	·	·	·	·	·	·
B	PLA	Mattweiß	Das Filament	✓	(✓)	✓	✓	·	·	·	·	·	·	·
C	PLA	Mattschwarz	Das Filament	✓	✓	✓	✓	62.5	118.5	149.5	✓	✓	✓	✓
D	PLA	Schwarz	Das Filament	✓	✓	✓	✓	63.8	119.8	150.5	✓	✓	✓	✓
E	PLA	Farblos	Das Filament	×	(✓)	✓	✓	·	·	·	·	·	·	·
F	TPU	Farblos	Das Filament	×	(✓)	✓	✓	-16.1 ¹	/	/	·	·	·	·
G	PETG	Farblos	Das Filament	×	(✓)	✓	✓	78.1	/	/	·	·	·	·
H	ABS	Schwarz	Tronxy	✓	✓	✓	✓	104.2 ²	/	/	✓	✓	✓	✓
I	PLA	Schwarz	Elegoo	✓	✓	✓	✓	62.4	100.6	168.6	(✓)	(✓)	(✓)	✓
J	PLA	Weiß	Janbex	×	×	✓	✓	·	·	·	·	·	·	·
K	PLA	Transparent	Sienoc	×	(✓)	✓	✓	·	·	·	·	·	·	·
L	PLA	Fluo-orange	Surreal	×	×	×	✓	·	·	·	·	·	·	·
M	PETG	Orange	Sunlu	×	×	×	(✓)	·	·	·	·	·	·	·
N	TPU	Grün	Enotepad	×	×	✓	(✓)	·	·	·	·	·	·	·

Symbolerklärungen: ✓ - gut geeignet, (✓) - begrenzt anwendbar, × - nicht geeignet, · - nicht weiter untersucht, / - keine Daten;

T_g - Glasübergangstemperatur, T_r - Rekristallisationstemperatur, T_m - Schmelztemperatur;

¹ basierend auf den gebräuchlichsten Fluorophoren und Filtersets,

² nach Kurvenanpassung ermittelte Werte (Mittelpunkte),

³ Werte sind den Abkühlungskurven entnommen.

3.4.9 Fazit zur Nutzung druckbarer Polymere in der Bioanalytik

Die 3D-Druck-Technologie wird bereits eingesetzt, um kostengünstig Prototypen von Geräten für bioanalytische und pharmazeutische Anwendungen (u. a. Implantate, Mikronadeln, *Drug-Delivery-Systeme*) herzustellen. Aus der Anzahl der Veröffentlichungen und Patente in den letzten Jahren lässt sich schließen, dass es eine große aktive Wissenschafts- und Verbrauchergemeinschaft gibt [58]. 3D-Druck ist eine Technologie, die in der Wissenschaft sicherlich breiter eingesetzt werden könnte. Der zunehmende Einsatz von 3D-Druck ist wahrscheinlich und in den nächsten 30 Jahren werden mit hoher Sicherheit weitere Innovationen und Anwendungen folgen. Aber neben erschwinglichen 3D-Druckern sind für Wissenschaftler auch andere Aspekte wichtig.

Als Engpass können derzeit fehlende chemisch und physikalisch genau spezifizierte Filamente gesehen werden. Filamenthersteller liefern nützliche Informationen über Druckbedingungen und einige Materialeigenschaften. Aber auch Anwender von funktionellen bioanalytischen Testsystemen interessieren sich zum Beispiel dafür, ob die Materialien toxische Substanzen enthalten oder wie die Materialien die Genexpression modulieren. Zelladhäsionsassays sind ein prominentes Beispiel dafür, dass die Material/Organismus-Grenzfläche eine wichtige Rolle spielt [68, 133]. Zytotoxische Effekte lassen sich häufig durch den Einsatz einer Parylenbeschichtung von 3D-Strukturen vermeiden [68]. Mitglieder der Parylenfamilie können jedoch unter UV-Anregung ein stark abnehmendes Autofluoreszenzprofil aufweisen und haben daher einen niedrigen Fluoreszenzhintergrund in der Mikroskopie, was zu einem niedrigen Signal-Rausch-Verhältnis für eine geeignete optische Erkennung führt [112]. Ein besonderes Interesse gilt der Autofluoreszenz, die sich negativ auf die Entwicklung neuer Systeme auswirken könnte. Daher wurden einige dieser Probleme angesprochen und Daten für die weitere Verwendung durch Dritte gesammelt. Das Ziel war auch, Fragen zu beantworten, wie die offensichtlichen Nachteile genutzt werden können. So ist die Autofluoreszenz beispielsweise eine Möglichkeit, Signale reproduzierbar zu referenzieren. In der wissenschaftlichen Literatur sind dahingehend bisher nur wenige Informationen zu finden. Ein schwieriger Umgang mit der Autofluoreszenz zeigte sich in dieser Arbeit beim Nachweis von kurzen, einzelsträngigen DNA-Sonden mit Fluoreszenzmarkern auf Nitrozellulosemembranen. Die relative starke Autofluoreszenz des Materials führte dabei zu einer Verminderung des Signalunterschieds der Sonden zum Hintergrund. Allerdings gibt es auch

Nachweisverfahren mit denen höhere Signale der Proben erzeugt werden könnten. Die bereits vorgestellte Tyramidsignalverstärkung (TSA) ist beispielsweise ein universell einsetzbares immunhistochemisches Nachweisverfahren, das aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit in verschiedenen Anwendungen zur Quantifizierung von Biomolekülen eingesetzt wird.

Zukünftige Arbeiten sollten sich mit quantitativen Variationen der Fluoreszenzintensität der Materialien unter kontinuierlicher Langzeit-UV-Beleuchtung befassen. Detailliertere Informationen dazu wären auch für andere Disziplinen, wie z. B. der Forensik, wertvoll. Da das 3DP so leicht zugänglich ist, kann es grundsätzlich auch für kriminelle Zwecke, wie z. B. den Druck einer Waffe, verwendet werden [134]. Die Bestimmung von Materialart und -eigenschaften, durch die inhärente Verzerrung eines 3D-gedruckten Objekts, ist dabei hilfreich für die Identifizierung seiner Herkunft [135, 136]. Obwohl eine Klassifizierung der Materialien auf der Grundlage von Spektren und PCA erreicht werden konnte, reichte dies nicht für die Individualisierung aus, die für eine gerichts feste forensische Analyse erforderlich wäre.

Es wurde auch untersucht, ob die Materialien wie vom Hersteller geliefert, in funktionellen zellbasierten Tests verwendet werden können. Der Einsatz von Polymermaterialien in bioanalytischen Testsystemen ist besonders kritisch, wenn die Materialien oder deren Additive eine zytotoxische Wirkung haben. Zu beachten ist auch, dass ebenso die Oberflächeneigenschaften einen Einfluss auf die Zellen haben. Dies wurde anhand dreier menschlicher Tumorzelllinien (SiHa, CaSki, HeLa; Gebärmutterhalskrebs) untersucht. Hierbei wurde beobachtet, dass sich die Zelllinien unterschiedlich auf den Materialien verhielten und ausbreiteten. Die CaSki-Zellen zeigten eine geringere Zelldichte auf schwarzem und mattschwarzem PLA sowie auf ABS als HeLa- und SiHa-Zellen (Abb. 34-Abb. 37). HeLa-Zellen schienen am wenigsten vom Material beeinflusst zu werden.

Es sollte betont werden, dass der Einfluss unbekannter Additive nicht beurteilt werden kann. Für Anwendungen in Pharmazie, Medizin und Bioanalytik sind jedoch genaue Kenntnisse erforderlich, um hemmende toxische Einflüsse auszuschließen und (zell-)modulatorische Effekte beurteilen zu können. Diese zelltypspezifischen Verhaltensweisen stimmen mit Studien anderer Autoren überein. So wurde bereits durch *in-vitro*-Versuche gezeigt, dass ABS zytotoxische Effekte auf menschliche Neuroblastomzellen zeigen und die Funktionalität kortikaler Neuronen verändern kann [61,

137]. In verwandten Studien wurde jedoch kein Effekt bei HUVEC (humane Nabelvenenendothelzellen) oder PCLS (Precision Cut Liver Slices) beobachtet. Für PLA, das für seine Biokompatibilität bekannt ist, wurde dennoch auch beobachtet, dass dieses Material Zellen des zentralen Nervensystems und der Haut beeinflussen kann [61, 138, 139]. Basierend auf primären humanen adulten epidermalen Hautkeratinozyten und mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks wurde beschrieben, dass auch ohne direkten Materialkontakt Stoffwechselaktivität, Genexpression und andere biologische Prozesse signifikant beeinflusst werden können [140].

Aus diesen Gründen müssen Studien mit beliebigen Polymermaterialien kritisch betrachtet werden. Studienergebnisse können nur verallgemeinert werden, wenn in den Methoden und Materialien klar angegeben ist, welche Bedingungen vorlagen (z. B. Zusatzstoffe), so dass diese von Dritten reproduzierbar wiederholt werden können.

3.5 Fazit im Kontext dieser Dissertation

Mit dieser Dissertation wurden unterschiedliche Prozessschritte in dem breiten Gebiet der Assayentwicklung und -optimierung zum Nachweis von Biomarkern untersucht und durch neue Erkenntnisse und Strategien zum kontinuierlichen Fortschritt in der bioanalytischen Diagnostik beigetragen. Die zu Beginn dieser Arbeit aufgeführten Zielstellungen wurden dazu umfassend bearbeitet und im Großteil erfolgreich abgeschlossen.

Besonders der Nachweis bakterieller oder viraler Infektionen erfordert zunehmend effizientere Techniken, um in kürzester Zeit viele Patientenproben screenen und entscheidende Behandlungsstrategien einleiten zu können. Aufgrund größer werdender Probenaufkommen werden dabei aufwendige Analyseschritte immer öfter durch moderne digitale und automatisierte Systeme übernommen. Allerdings erfordern diese wiederum spezifisch auswertbare Assays mit sensitiven Detektionselementen wie Sonden. Insbesondere fluoreszenzbasierte Anwendungen bieten hierbei durch ihre hohe Sensitivität und Spezifität Vorteile und können im Kontext morphologisch intakter Patientenproben, wie beispielweise in der Onkologie, zusätzliche Aussagen zum Krankheitszustand liefern.

Neben der raschen Identifizierung akuter Infektionen spielt, im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen und der Früherkennung, in zunehmenden Maßen die

sensitive Detektion persistierender Infektionen oder verschiedener Aberrationen eine besondere Rolle. Integrationen viraler DNA in das Genom von Wirtszellen bergen beispielsweise das Risiko von Degenerationen, bei denen betroffene Zellen Auslöser für Tumore werden könnten. Insbesondere anogenitale Krebsarten sind stark mit persistenten Infektionen durch humane Papillomviren verbunden. Neben zytologischen Bewertungen von zervikovaginalen Abstrichen nach dem Pap-Test und der Polymerasekettenreaktion, ist die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung eine geeignete Technik zur Bestimmung einer HPV-Infektion. In dieser Arbeit wurden für entsprechende FISH-Analysen neue HPV-Hybridisierungssonden zum standardisierten, typspezifischen und quantitativen Nachweis von viralen DNA-Sequenzen in Wirtszellen entwickelt. Aufgrund der kurzen HPV-Sequenzen, die teils in nur wenigen Kopien vorliegen können, haben herkömmliche FISH-Sonden allerdings eine geringe Empfindlichkeit. Deshalb wurden spezifische FISH-Sonden für verschiedene Regionen des HPV-Genoms entwickelt und in Kombination mit Signalamplifikations-schritten getestet. Die folgende Evaluierung in Hybridisierungsversuchen zeigte, dass im Zellkulturmaßstab, in hochbelasteten chromosomalen Bereichen, durchaus kurze Sequenzabschnitte effektiv mittels FISH nachweisbar waren. Dennoch war mit den genutzten Methoden keine ausreichend hohe Sensitivität zu erreichen, um auch wenige Sequenzkopien detektieren und im Anschluss quantifizieren zu können. Diese Tatsache zeigte, dass in diesen Fällen mit standardmäßigen Hybridisierungsexperimenten allein, keine ausreichend hohe diagnostische Genauigkeit gegeben war, um infizierte Zellen mit hoher Sensitivität als positiv zu charakterisieren. Unabhängig davon können die entworfenen Sonden in anderen Assayformen, beispielsweise bei der Untersuchung von extrahierter DNA an Mikropartikeln, zum spezifischen und sensitiven Nachweis eingesetzt werden. Aber auch im Falle von stark virusbelasteten Zellen bzw. Geweben können mit FISH dennoch zusätzliche Informationen, durch Auswertung der lokalisierten Signale, generiert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Analyse von Biomarkern ist die grundlegende Sensitivität von entsprechenden Testsystemen. Diese sollte im Idealfall groß genug sein, um auch einige wenige Moleküle in einer Probe effizient zu detektieren. Um dieses Ziel zu erreichen, können unterschiedliche Signalverstärkungsmethoden in Assays integriert werden. In Fluoreszenztests, sowohl in Zell- und Gewebeproben als auch in mikropartikelbasierten Versuchen, erfordert die quantitative Analyse eines Zielmoleküls ein spezifisches Markierungsverfahren. Für die Nukleinsäureanalyse ist

die Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden die häufigste Methode. Nachteile sind jedoch die Notwendigkeit der direkten Markierung von Sonden und die Empfindlichkeit zum Nachweis geringer Mengen an Zielmolekülen. In dieser Arbeit wurde die Tyramidsignalverstärkung als alternative Nachweismethode für Biomoleküle an Mikropartikeln etabliert. Diese Methode war bereits als vielseitige und robuste enzymatische Amplifikationstechnik für den empfindlichen immunhistochemischen Nachweis bekannt. Hiermit wurde nun die Anwendbarkeit des TSA-Verfahrens zum Nachweis von hybridisierten, biotinylierten Oligonukleotidsonden, die an proteinbeschichtete Mikropartikeloberflächen gebunden sind, präsentiert. Mit dieser neuen Untersuchungsstrategie wurden die Vorteile mikropartikelbasierter Assays mit der sehr hohen Sensitivität der Tyramidsignalverstärkung kombiniert, wodurch sie, auch unter Berücksichtigung der potenziellen Multiplexfähigkeiten, in zukünftigen Markernachweisverfahren als äußerst effizientes Detektionssystem eingesetzt werden kann.

Als letzten Themenkomplex dieser Arbeit wurden moderne Methoden zur Generierung bioanalytischer Testsysteme untersucht. Hierbei ist der 3D-Druck zu nennen, der als Herstellungstechnologie von Funktionsmodellen für bioanalytische Anwendungen immer wichtiger wird. Moderne 3D-Drucksysteme erreichen eine hohe Druckqualität und -genauigkeit und werden zur Herstellung von Geräten für die Probenvorbereitung und für *Point-of-Care*-Tests eingesetzt. Neben den Druckparametern sind vor allem Materialeigenschaften, wie Schmelzverhalten und Autofluoreszenz, entscheidend für den optimalen Druckprozess und die Anwendbarkeit des Produktes. Diese werden durch Additive beeinflusst und variieren je nach Hersteller erheblich. Wie sich dies auf die Entwicklung von bioanalytischen Geräten auswirkt, war in der Literatur nur wenig bekannt. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche kommerzielle Polymermaterialien nach verschiedenen Gesichtspunkten charakterisiert und für den Einsatz in bioanalytischen Untersuchungssystemen evaluiert. Zusammenfassend konnte diese Arbeit am Beispiel unterschiedlicher Testobjekte für fluoreszenzbasierte Experimente verdeutlichen, dass durch den 3D-Druck einfach und schnell individuelle Vorrichtungen erstellbar sind. Unter Berücksichtigung entsprechender Materialeigenschaften, können diese erfolgreich in funktionale Assays integriert werden. Trotz der momentanen Beschränkung auf Kunststoffe, birgt diese Herstellungsform dennoch enorme Vorteile, wie die flexible und kostengünstige Entwicklung und Produktion von Prototypen für Untersuchungen. Bei fortwährender Verbesserung der 3D-Druck-

Systeme werden daher in Zukunft immer mehr individualisierte und miniaturisierte Systeme umsetzbar sein, besonders in den Bereichen Mikrofluidik und *Lab-on-a-Chip*.

4 Literaturverzeichnis

1. Jurischka C, Dinter F, Sowa M, Noack J, Schiebel J, Roggenbuck D, Schierack P, Rödiger S (2019) Tyramide signal amplification as universal detection method on protein coated microbeads. *JCB* 4(1-2):15–22. doi:10.3233/JCB-189003
2. Jurischka C, Dinter F, Efimova A, Weiss R, Schiebel J, Schulz C, Fayziev B, Schierack P, Fischer T, Rödiger S (2020) An explorative study of polymers for 3D printing of bioanalytical test systems. *CH*. doi:10.3233/CH-190713
3. Ruhe M, Rabe D, Jurischka C, Schröder J, Schierack P, Deckert PM, Rödiger S (2019) Molecular biomarkers of DNA damage in diffuse large-cell lymphoma—a review. *J. Lab. Precis. Med* 4:5. doi:10.21037/jlpm.2019.01.01
4. Arnemann J (2019) Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FiSH). In: Gressner (Hrsg) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 884
5. Weier H-UG, Greulich-Bode KM, Ito Y, Lersch RA, Fung J (2002) FISH in cancer diagnosis and prognostication: from cause to course of disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2(2):109–119. doi:10.1586/14737159.2.2.109
6. Garimberti E, Tosi S (2010) Fluorescence in situ hybridization (FISH), basic principles and methodology. *Methods Mol Biol* 659:3–20. doi:10.1007/978-1-60761-789-1_1
7. Schriml LM, Padilla-Nash HM, Coleman A, Moen P, Nash WG, Menninger J, Jones G, Ried T, Dean M (1999) Tyramide signal amplification (TSA)-FISH applied to mapping PCR-labeled probes less than 1 kb in size. *BioTechniques* 27(3):608–613
8. Arnold N, Seibl R, Kessler C, Wienberg J (1992) Nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin labeled DNA probes. *Biotech Histochem* 67(2):59–67. doi:10.3109/10520299209110009
9. McKay JA, Murray GI, Keith WN, McLeod HL (1997) Amplification of fluorescent in situ hybridisation signals in formalin fixed paraffin wax embedded sections of colon tumour using biotinylated tyramide. *MP, Mol Pathol* 50(6):322–325. doi:10.1136/mp.50.6.322
10. Zappacosta R, Colasante A, Viola P, D'Antuono T, Lattanzio G, Capanna S, Gatta DMP, Rosini S (2013) Chromogenic in situ hybridization and p16/Ki67 dual staining on formalin-fixed paraffin-embedded cervical specimens: correlation with HPV-DNA test, E6/E7 mRNA test, and potential clinical applications. *Biomed Res Int* 2013:453606. doi:10.1155/2013/453606
11. Semrock FISH (Fluorescence in Situ Hybridization). <https://www.semrock.com/fish.aspx>. Zugegriffen: 04. Dezember 2019
12. Savic S, Bode B, Diebold J, Tosoni I, Barascud A, Baschiera B, Grilli B, Herzog M, Obermann E, Bubendorf L (2013) Detection of ALK-positive non-small-cell lung cancers on cytological specimens: high accuracy of immunocytochemistry with the 5A4 clone. *J Thorac Oncol* 8(8):1004–1011. doi:10.1097/JTO.0b013e3182936ca9
13. Shin SJ, Chen B, Hyjek E, Vazquez M (2007) Immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization in HER-2/neu status in cell block preparations. *Acta Cytol* 51(4):552–557. doi:10.1159/000325793

14. Nakamura AJ, Redon CE, Bonner WM, Sedelnikova OA (2009) Telomere-dependent and telomere-independent origins of endogenous DNA damage in tumor cells. *Aging (Albany NY)* 1(2):212–218. doi:10.18632/aging.100019
15. Brugat T, Nguyen-Khac F, Grelier A, Merle-Béral H, Delic J (2010) Telomere dysfunction-induced foci arise with the onset of telomeric deletions and complex chromosomal aberrations in resistant chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 116(2):239–249. doi:10.1182/blood-2009-12-257618
16. Franco S, Gostissa M, Zha S, Lombard DB, Murphy MM, Zarrin AA, Yan C, Tepsuporn S, Morales JC, Adams MM, Lou Z, Bassing CH, Manis JP, Chen J, Carpenter PB, Alt FW (2006) H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations. *Mol Cell* 21(2):201–214. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.005
17. Yin B, Savic V, Juntilla MM, Bredemeyer AL, Yang-lott KS, Helmink BA, Koretzky GA, Sleckman BP, Bassing CH (2009) Histone H2AX stabilizes broken DNA strands to suppress chromosome breaks and translocations during V(D)J recombination. *J Exp Med* 206(12):2625–2639. doi:10.1084/jem.20091320
18. Jentschke M, Soergel P, Hillemanns P (2012) Importance of HPV Genotyping for the Screening, Therapy and Management of Cervical Neoplasias. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 72(6):507–512. doi:10.1055/s-0032-1314959
19. Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, Rocco JW, Teknos TN, Kumar B, Wangsa D, He D, Ried T, Symer DE, Gillison ML (2014) Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Res.* 24(2):185–199. doi:10.1101/gr.164806.113
20. Adler K, Erickson T, Bobrow M (1997) High sensitivity detection of HPV-16 in SiHa and CaSki cells utilizing FISH enhanced by TSA. *Histochem Cell Biol* 108(4-5):321–324
21. Nair S, Pillai MR (2005) Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis* 11(6):350–359. doi:10.1111/j.1601-0825.2005.01127.x
22. Wang C-CJ, Palefsky JM (2015) Human Papillomavirus (HPV) Infections and the Importance of HPV Vaccination. *Curr Epidemiol Rep* 2(2):101–109. doi:10.1007/s40471-015-0039-3
23. Raybould R, Fiander A, Wilkinson GWG, Hibbitts S (2014) HPV integration detection in CaSki and SiHa using detection of integrated papillomavirus sequences and restriction-site PCR. *Journal of Virological Methods* 206:51–54. doi:10.1016/j.jviromet.2014.05.017
24. Altobelli E, Scarselli G, Lattanzi A, Fortunato C, Profeta VF (2016) A comparison between Pap and HPV screening tests and screening methods. *Mol Clin Oncol* 5(2):348–354. doi:10.3892/mco.2016.909
25. Bodelon C, Untereiner ME, Machiela MJ, Vinokurova S, Wentzensen N (2016) Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers. *Int J Cancer* 139(9):2001–2011. doi:10.1002/ijc.30243
26. Diao M-K, Liu C-Y, Liu H-W, Li J-T, Li F, Mehryar MM, Wang Y-J, Zhan S-B, Zhou Y-B, Zhong R-G, Zeng Y (2015) Integrated HPV genomes tend to integrate in gene desert areas in the CaSki, HeLa, and SiHa cervical cancer cell lines. *Life Sci* 127:46–52. doi:10.1016/j.lfs.2015.01.039

27. Rödiger S, Liebsch C, Schmidt C, Lehmann W, Resch-Genger U, Schedler U, Schierack P (2014) Nucleic acid detection based on the use of microbeads: a review. *Microchim Acta* 181(11-12):1151–1168. doi:10.1007/s00604-014-1243-4
28. Grossmann K, Röber N, Hiemann R, Rödiger S, Schierack P, Reinhold D, Laass MW, Conrad K, Roggenbuck D (2016) Simultaneous detection of celiac disease-specific IgA antibodies and total IgA. *Auto Immun Highlights* 7(1):2. doi:10.1007/s13317-016-0073-2
29. Sowa M, Großmann K, Scholz J, Röber N, Rödiger S, Schierack P, Conrad K, Roggenbuck D, Hiemann R (2015) The CytoBead assay – a novel approach of multiparametric autoantibody analysis in the diagnostics of systemic autoimmune diseases. *LaboratoriumsMedizin* 38(6):1. doi:10.1515/labmed-2015-0036
30. Rothemund PWK (2006) Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 440(7082):297–302. doi:10.1038/nature04586
31. Schmied JJ, Gietl A, Holzmeister P, Forthmann C, Steinhauer C, Dammeyer T, Tinnefeld P (2012) Fluorescence and super-resolution standards based on DNA origami. *Nat Methods* 9(12):1133–1134. doi:10.1038/nmeth.2254
32. Kerstens HM, Poddighe PJ, Hanselaar AG (1995) A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J Histochem Cytochem* 43(4):347–352
33. Zolotukhin S (2014) Identification of low-expressing transcripts of the NPY receptors' family in the murine lingual epithelia. *Methods Mol Biol* 1211:213–228. doi:10.1007/978-1-4939-1459-3_17
34. Raap AK, van de Corput MP, Vervenne RA, van Gijlswijk RP, Tanke HJ, Wiegant J (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum Mol Genet* 4(4):529–534
35. van Gijlswijk RP, Zijlmans HJ, Wiegant J, Bobrow MN, Erickson TJ, Adler KE, Tanke HJ, Raap AK (1997) Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 45(3):375–382. doi:10.1177/002215549704500305
36. Bobrow MN, Moen PT (2001) Tyramide signal amplification (TSA) systems for the enhancement of ISH signals in cytogenetics. *Curr Protoc Cytom Chapter 8:Unit 8.9*. doi:10.1002/0471142956.cy0809s11
37. Speel EJ, Hopman AH, Komminoth P (1999) Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization. Play card(s). *J Histochem Cytochem* 47(3):281–288. doi:10.1177/002215549904700302
38. Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods* 125(1-2):279–285
39. Gross BC, Erkal JL, Lockwood SY, Chen C, Spence DM (2014) Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. *Anal. Chem.* 86(7):3240–3253. doi:10.1021/ac403397r
40. Tang CK, Vaze A, Rusling JF (2017) Automated 3D-printed unibody immunoarray for chemiluminescence detection of cancer biomarker proteins. *Lab Chip* 17(3):484–489. doi:10.1039/C6LC01238H

41. González-Henríquez CM, Sarabia-Vallejos MA, Rodríguez-Hernández J (2019) Polymers for additive manufacturing and 4D-printing: Materials, methodologies, and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 94:57–116. doi:10.1016/j.progpolymsci.2019.03.001
42. Norman J, Madurawe RD, Moore CM, Khan MA, Khairuzzaman A (2017) A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews* 108:39–50. doi:10.1016/j.addr.2016.03.001
43. Trenfield SJ, Awad A, Goyanes A, Gaisford S, Basit AW (2018) 3D Printing Pharmaceuticals: Drug Development to Frontline Care. *Trends in Pharmacological Sciences* 39(5):440–451. doi:10.1016/j.tips.2018.02.006
44. Liaw C-Y, Guvendiren M (2017) Current and emerging applications of 3D printing in medicine. *Biofabrication* 9(2):24102. doi:10.1088/1758-5090/aa7279
45. Park BJ, Choi HJ, Moon SJ, Kim SJ, Bajracharya R, Min JY, Han H-K (2018) Pharmaceutical applications of 3D printing technology: current understanding and future perspectives. *J. Pharm. Investig.* 45:224. doi:10.1007/s40005-018-00414-y
46. Capel AJ, Rimington RP, Lewis MP, Christie SDR (2018) 3D printing for chemical, pharmaceutical and biological applications. *Nat Rev Chem* 2(12):422–436. doi:10.1038/s41570-018-0058-y
47. Palo M, Holländer J, Suominen J, Yliruusi J, Sandler N (2017) 3D printed drug delivery devices: perspectives and technical challenges. *Expert Rev Med Devices* 14(9):685–696. doi:10.1080/17434440.2017.1363647
48. Kadimisetty K, Mosa IM, Malla S, Satterwhite-Warden JE, Kuhns TM, Faria RC, Lee NH, Rusling JF (2016) 3D-printed supercapacitor-powered electrochemiluminescent protein immunoarray. *Biosensors and Bioelectronics* 77:188–193. doi:10.1016/j.bios.2015.09.017
49. Hossain MA, Canning J, Ast S, Rutledge PJ, Jamalipour A (2015) Early warning smartphone diagnostics for water security and analysis using real-time pH mapping. *Photonic Sens* 5(4):289–297. doi:10.1007/s13320-015-0256-x
50. Ebert LC, Thali MJ, Ross S (2011) Getting in touch—3D printing in Forensic Imaging. *Forensic Sci Int* 211(1-3):e1-e6. doi:10.1016/j.forsciint.2011.04.022
51. Pfeil J, Dangelat LN, Frohme M, Schulze K (2019) Smartphone based mobile microscopy for diagnostics. *JCB* 4(1-2):57–65. doi:10.3233/JCB-180010
52. Song Y, Feijen J, Grijpma DW, Poot AA (2011) Tissue engineering of small-diameter vascular grafts: A literature review. *Clin Hemorheol Microcirc* 49(1-4):357–374. doi:10.3233/CH-2011-1486
53. Chan K, Coen M, Hardick J, Gaydos CA, Wong K-Y, Smith C, Wilson SA, Vayugundla SP, Wong S (2016) Low-Cost 3D Printers Enable High-Quality and Automated Sample Preparation and Molecular Detection. *PLoS ONE* 11(6):e0158502. doi:10.1371/journal.pone.0158502
54. Klicks J, Molitor E von, Ertongur-Fauth T, Rudolf R, Hafner M (2017) In vitro skin three-dimensional models and their applications. *JCB* 3(1):21–39. doi:10.3233/JCB-179004
55. Dinter F, Burdukiewicz M, Schierack P, Lehmann W, Nestler J, Dame G, Rödiger S (2019) Simultaneous detection and quantification of DNA and protein biomarkers in spectrum of cardiovascular diseases in a microfluidic microbead chip. *Anal Bioanal Chem* 411(29):7725–7735. doi:10.1007/s00216-019-02199-x

56. Chen Y, Fu Q, Li D, Xie J, Ke D, Song Q, Tang Y, Wang H (2017) A smartphone colorimetric reader integrated with an ambient light sensor and a 3D printed attachment for on-site detection of zearalenone. *Anal Bioanal Chem* 409(28):6567–6574. doi:10.1007/s00216-017-0605-2
57. Chen C, Townsend AD, Hayter EA, Birk HM, Sell SA, Martin RS (2018) Insert-based microfluidics for 3D cell culture with analysis. *Anal Bioanal Chem* 410(12):3025–3035. doi:10.1007/s00216-018-0985-y
58. Hamad K, Kaseem M, Yang HW, Deri F, Ko YG (2015) Properties and medical applications of polylactic acid: A review. *Express Polym. Lett.* 9(5):435–455. doi:10.3144/expresspolymlett.2015.42
59. Barton AJ, Sagers RD, Pitt WG (1996) Bacterial adhesion to orthopedic implant polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 30(3):403–410. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199603)30:3<403::AID-JBM15>3.0.CO;2-K
60. Bhattacharjee N, Urrios A, Kang S, Folch A (2016) The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics. *Lab Chip* 16(10):1720–1742. doi:10.1039/C6LC00163G
61. Duong LH, Chen P-C (2019) Simple and low-cost production of hybrid 3D-printed microfluidic devices. *Biomicrofluidics* 13(2):24108. doi:10.1063/1.5092529
62. Smith TP, Alexander MJ, Enterline DS (2003) Delayed stenosis following placement of a polyethylene terephthalate endograft in the cervical carotid artery. *Journal of Neurosurgery* 98(2):421–425. doi:10.3171/jns.2003.98.2.0421
63. Wang J, Huang N, Yang P, Leng YX, Sun H, Liu ZY, Chu PK (2004) The effects of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion. *Biomaterials* 25(16):3163–3170. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.010
64. Reinthaler M, Johansson JB, Braune S, Al-Hindwan HSA, Lendlein A, Jung F (2019) Shear-induced platelet adherence and activation in an in-vitro dynamic multiwell-plate system. *CH* 71(2):183–191. doi:10.3233/CH-189410
65. Lind JU, Busbee TA, Valentine AD, Pasqualini FS, Yuan H, Yadid M, Park S-J, Kotikian A, Nesmith AP, Campbell PH, Vlassak JJ, Lewis JA, Parker KK (2017) Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing. *Nature Mater* 16(3):303–308. doi:10.1038/nmat4782
66. Feng F, Ye L (2011) Morphologies and mechanical properties of polylactide/thermoplastic polyurethane elastomer blends. *J. Appl. Polym. Sci.* 119(5):2778–2783. doi:10.1002/app.32863
67. Beauchamp MJ, Nordin GP, Woolley AT (2017) Moving from millifluidic to truly microfluidic sub-100- μm cross-section 3D printed devices. *Anal Bioanal Chem* 409(18):4311–4319. doi:10.1007/s00216-017-0398-3
68. van den Driesche S, Lucklum F, Bunge F, Vellekoop M (2018) 3D Printing Solutions for Microfluidic Chip-To-World Connections. *Micromachines (Basel)* 9(2):71. doi:10.3390/mi9020071
69. Boyd RH (1985) Relaxation processes in crystalline polymers: experimental behaviour — a review. *Polymer* 26(3):323–347. doi:10.1016/0032-3861(85)90192-2
70. Brzozowska-Stanuch A, Rabiej S, Fabia J, Nowak J (2014) Changes in thermal properties of isotactic polypropylene with different additives during aging process. *Polimery* 59(04):302–307. doi:10.14314/polimery.2014.302

71. Wittbrodt B, Pearce JM (2015) The effects of PLA color on material properties of 3-D printed components. *Additive Manufacturing* 8:110–116. doi:10.1016/j.addma.2015.09.006
72. Roch T, Ma N, Kratz K, Lendlein A (2015) Cell-based detection of microbial biomaterial contaminations. *CH* 60(1):51–63. doi:10.3233/CH-151939
73. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S (2002) Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. *Journal of Clinical Microbiology* 40(3):886–891. doi:10.1128/JCM.40.3.886-891.2002
74. Baumgartner A, Weier JF, Weier H-UG (2006) Chromosome-specific DNA repeat probes. *J Histochem Cytochem* 54(12):1363–1370. doi:10.1369/jhc.6A6974.2006
75. MM Manos, Y Ting Shin, DK Wright, Al Lewis, TR Broker, SM Wolinsky, M. Manos, YC Ting (1989) The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* (7):209–214
76. Soler C, Allibert P, Chardonnet Y, Cros P, Mandrand B, Thivolet J (1991) Detection of human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18 in mucosal and cutaneous lesions by the multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 35(2):143–157. doi:10.1016/0166-0934(91)90130-r
77. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM (1990) The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 71 (Pt 1):173–181. doi:10.1099/0022-1317-71-1-173
78. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6):1919–1925
79. Gallizia A, Lalla C de, Nardone E, Santambrogio P, Brandazza A, Sidoli A, Arosio P (1998) Production of a soluble and functional recombinant streptavidin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 14(2):192–196. doi:10.1006/prev.1998.0930
80. Rödiger S, Schierack P, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Frömmel U, Schmidt C, Ruhland M, Schimke I, Roggenbuck D, Lehmann W, Schröder C (2012) A highly versatile microscope imaging technology platform for the multiplex real-time detection of biomolecules and autoimmune antibodies. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 133:35–74. doi:10.1007/10_2011_132
81. Klar TA, Hell SW (1999) Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt Lett* 24(14):954–956. doi:10.1364/OL.24.000954
82. Schmitz S (2011) *Der Experimentator: Zellkultur*, 3. Aufl. Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
83. Ried T (2006) Preparation of Metaphase Chromosomes from Adherent Cells. Section of Cancer Genomics, Genetics Branch, NCI National Institutes of Health. https://ccr.cancer.gov/sites/default/files/metaphase_preparation_from_adherent_cells.pdf. Zugegriffen: 10. Juli 2017
84. Rödiger S, Ruhland M, Schmidt C, Schröder C, Grossmann K, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Schimke I, Schierack P (2011) Fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on

- the surface of poly(methyl methacrylate) microbeads. *Anal Chem* 83(9):3379–3385. doi:10.1021/ac103277s
85. Piruska A, Nikcevic I, Lee SH, Ahn C, Heineman WR, Limbach PA, Seliskar CJ (2005) The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation. *Lab Chip* 5(12):1348. doi:10.1039/b508288a
86. Fischer T (2019) PCA-based supervised identification of biological soil crusts in multispectral images. *MethodsX* 6:764–772. doi:10.1016/j.mex.2019.03.013
87. R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing [homepage on the Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing
88. Fox J (2005) The R Commander: A Basic-Statistics Graphical User Interface to R. *J. Stat. Soft.* 14(9). doi:10.18637/jss.v014.i09
89. Rödiger S, Friedrichsmeier T, Kapat P, Michalke M (2012) Rkward : A Comprehensive Graphical User Interface and Integrated Development Environment for Statistical Analysis with R. *J. Stat. Soft.* 49(9). doi:10.18637/jss.v049.i09
90. GABRIEL KR (1971) The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika* 58(3):453–467. doi:10.1093/biomet/58.3.453
91. NIST Office of Data and Informatics. (2018) NIST Chemistry WebBook [homepage on the Internet]. NIST Standard Reference Database Number 69. doi:10.18434/T4D303
92. Kolenda R, Burdukiewicz M, Schiebel J, Rödiger S, Sauer L, Szabo I, Orłowska A, Weinreich J, Nitschke J, Böhm A, Gerber U, Roggenbuck D, Schierack P (2018) Adhesion of Salmonella to Pancreatic Secretory Granule Membrane Major Glycoprotein GP2 of Human and Porcine Origin Depends on FimH Sequence Variation. *Front. Microbiol.* 9:279. doi:10.3389/fmicb.2018.01905
93. Schiebel J, Böhm A, Nitschke J, Burdukiewicz M, Weinreich J, Ali A, Roggenbuck D, Rödiger S, Schierack P (2017) Genotypic and Phenotypic Characteristics Associated with Biofilm Formation by Human Clinical Escherichia coli Isolates of Different Pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 83(24):01660-17. doi:10.1128/AEM.01660-17
94. Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM (1987) Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 61(4):962–971
95. Masters JR (2002) HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2(4):315–319. doi:10.1038/nrc775
96. Tonkinson JL (2002) Nitrocellulose a tried and true polymer finds utility as a post-genomic substrate. *Front Biosci* 7(3):c1-12. doi:10.2741/A755
97. van Hal NL, Vorst O, van Houwelingen AM, Kok EJ, Peijnenburg A, Aharoni A, van Tunen AJ, Keijzer J (2000) The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *Journal of Biotechnology* 78(3):271–280. doi:10.1016/S0168-1656(00)00204-2
98. Schneider J, Weiss R, Ruhe M, Jung T, Roggenbuck D, Stohwasser R, Schierack P, Rödiger S (2019) Open source bioimage informatics tools for the analysis of DNA damage and associated biomarkers. *J. Lab. Precis. Med* (4):21. doi:10.21037/jlpm.2019.04.05
99. Millman KJ, Aivazis M (2011) Python for Scientists and Engineers. *Comput. Sci. Eng.* 13(2):9–12. doi:10.1109/MCSE.2011.36

100. van der Walt S, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, Boulogne F, Warner JD, Yager N, Goullart E, Yu T (2014) scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* 2(2):e453. doi:10.7717/peerj.453
101. Seabold S, Perktold J (2010) *Statsmodels: Econometric and Statistical Modeling with Python*:92–96. doi:10.25080/Majora-92bf1922-011
102. Sezgin M, Sankur B (2004) Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *J. Electron. Imaging* 13(1):146. doi:10.1117/1.1631315
103. Wiedorn KH, Kuhl H, Galle J, Caselitz J, Vollmer E (1999) Comparison of in-situ hybridization, direct and indirect in-situ PCR as well as tyramide signal amplification for the detection of HPV. *Histochem Cell Biol* 111(2):89–95
104. Bagasra O (2007) Protocols for the in situ PCR-amplification and detection of mRNA and DNA sequences. *Nat Protoc* 2(11):2782–2795. doi:10.1038/nprot.2007.395
105. Deng W, Shi X, Tjian R, Lionnet T, Singer RH (2015) CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(38):11870–11875. doi:10.1073/pnas.1515692112
106. Macechko PT, Krueger L, Hirsch B, Erlandsen SL (1997) Comparison of immunologic amplification vs enzymatic deposition of fluorochrome-conjugated tyramide as detection systems for FISH. *J Histochem Cytochem* 45(3):359–363. doi:10.1177/002215549704500303
107. Mayer G, Bendayan M (1997) Biotinyl-tyramide: a novel approach for electron microscopic immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 45(11):1449–1454. doi:10.1177/002215549704501101
108. Zaidi AU, Enomoto H, Milbrandt J, Roth KA (2000) Dual fluorescent in situ hybridization and immunohistochemical detection with tyramide signal amplification. *J Histochem Cytochem* 48(10):1369–1375. doi:10.1177/002215540004801007
109. van Gijlswijk RP, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ (1996) Improved localization of fluorescent tyramides for fluorescence in situ hybridization using dextran sulfate and polyvinyl alcohol. *J Histochem Cytochem* 44(4):389–392. doi:10.1177/44.4.8601698
110. Salentijn GI, Oomen PE, Grajewski M, Verpoorte E (2017) Fused Deposition Modeling 3D Printing for (Bio)analytical Device Fabrication: Procedures, Materials, and Applications. *Anal. Chem.* 89(13):7053–7061. doi:10.1021/acs.analchem.7b00828
111. Young EWK, Berthier E, Beebe DJ (2013) Assessment of Enhanced Autofluorescence and Impact on Cell Microscopy for Microfabricated Thermoplastic Devices. *Anal. Chem.* 85(1):44–49. doi:10.1021/ac3034773
112. Jervis DA (2003) Optical brighteners: Improving the colour of plastics. *Plastics, Additives and Compounding* 5(6):42–46. doi:10.1016/S1464-391X(03)00049-7
113. Choochottiros C, Chin I-J (2013) Potential transparent PLA impact modifiers based on PMMA copolymers. *European Polymer Journal* 49(4):957–966. doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.12.008
114. Lakowicz JR (Hrsg) (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US, Boston, MA
115. Tayebi HA, Yazdanshenas ME, Rashidi AS, Khajavi R, Montazer M (2011) Effect of Delustering Agent on Physical and Mechanical Properties of Nylon 6. *Asian Journal of Chemistry* 23(1):398–402

116. AMANN R (2000) Methodological Aspects of Fluorescence In Situ Hybridization. *Bioscience Microflora* 19(2):85–91. doi:10.12938/bifidus1996.19.85
117. Bouvier T, Del Giorgio PA (2003) Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiology Ecology* 44(1):3–15. doi:10.1016/S0168-6496(02)00461-0
118. DeLong EF, Wickham GS, Pace NR (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243(4896):1360–1363. doi:10.1126/science.2466341
119. Weng Y-X, Jin Y-J, Meng Q-Y, Wang L, Zhang M, Wang Y-Z (2013) Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polymer Testing* 32(5):918–926. doi:10.1016/j.polymertesting.2013.05.001
120. Yoda I, Koseki H, Tomita M, Shida T, Horiuchi H, Sakoda H, Osaki M (2014) Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiol* 14(1):97. doi:10.1186/s12866-014-0234-2
121. Cattò C, Cappitelli F (2019) Testing Anti-Biofilm Polymeric Surfaces: Where to Start? *Int J Mol Sci* 20(15). doi:10.3390/ijms20153794
122. Hsu LC, Fang J, Borca-Tasciuc DA, Worobo RW, Moraru CI (2013) Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 79(8):2703–2712. doi:10.1128/AEM.03436-12
123. Ragetly G, Griffon DJ, Chung YS (2010) The effect of type II collagen coating of chitosan fibrous scaffolds on mesenchymal stem cell adhesion and chondrogenesis. *Acta Biomater* 6(10):3988–3997. doi:10.1016/j.actbio.2010.05.016
124. Sottile J, Hocking DC, Swiatek PJ (1998) Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth. *J Cell Sci* 111 (Pt 19):2933–2943
125. Liberio MS, Sadowski MC, Soekmadji C, Davis RA, Nelson CC (2014) Differential effects of tissue culture coating substrates on prostate cancer cell adherence, morphology and behavior. *PLoS One* 9(11):e112122. doi:10.1371/journal.pone.0112122
126. Ramsey WS, Hertl W, Nowlan ED, Binkowski NJ (1984) Surface treatments and cell attachment. *In vitro* 20(10):802–808. doi:10.1007/BF02618296
127. Wilson C, Lukowicz R, Merchant S, Valquier-Flynn H, Caballero J, Sandoval J, Okuom M, Huber C, Brooks TD, Wilson E, Clement B, Wentworth CD, Holmes AE (2017) Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Res Rev J Eng Technol* 6(4)
128. Feijen J (1986) Biodegradable Polymers for Medical Purposes. In: Piskin E, Hoffman AS (Hrsg) *Polymeric Biomaterials*. Springer Netherlands, Dordrecht, S 62–78
129. Kucharczyk P, Pavelková A, Stloukal P, Sedlarík V (2016) Degradation behaviour of PLA-based polyesterurethanes under abiotic and biotic environments. *Polymer Degradation and Stability* 129:222–230. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2016.04.019
130. Dinter F, Jurischka C, Weiss R, Rödiger S (2020) Multiparametrische Antikörperdetektion für die Diagnostik. *Biospektrum* 26(3):265–267. doi:10.1007/s12268-020-1375-5
131. Runge R, Hiemann R, Wendisch M, Kasten-Pisula U, Storch K, Zöphel K, Fritz C, Roggenbuck D, Wunderlich G, Conrad K, Kotzerke J (2012) Fully automated interpretation of ionizing radiation-

- induced γ H2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES®. *Int J Radiat Biol* 88(5):439–447. doi:10.3109/09553002.2012.658468
132. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A (2009) Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 393(2):569–582. doi:10.1007/s00216-008-2287-2
133. Vitte J, Benoliel A-M, Pierres A, Bongrand P (2005) Regulation of cell adhesion. *Clin Hemorheol Microcirc* 33(3):167–188
134. Chase R, LaPorte G The next generation of crime tools and challenges. 3D printing
135. Eden A. (2014) Print Technology and Forensics. *Stevenson University Forensics Journal*.:8–13
136. Peng F, Yang J, Lin Z-X, Long M (2019) Source identification of 3D printed objects based on inherent equipment distortion. *Computers & Security* 82:173–183. doi:10.1016/j.cose.2018.12.015
137. Hyde J, MacNicol M, Odle A, Garcia-Rill E (2014) The use of three-dimensional printing to produce in vitro slice chambers. *J Neurosci Methods* 238:82–87. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.09.012
138. Rosenzweig D, Carelli E, Steffen T, Jarzem P, Haglund L (2015) 3D-Printed ABS and PLA Scaffolds for Cartilage and Nucleus Pulposus Tissue Regeneration. *IJMS* 16(12):15118–15135. doi:10.3390/ijms160715118
139. Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A (2016) Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 107:153–162. doi:10.1016/j.addr.2016.03.012
140. Schmelzer E, Over P, Gridelli B, Gerlach JC (2016) Response of Primary Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells and Dermal Keratinocytes to Thermal Printer Materials In Vitro. *J. Med. Biol. Eng.* 36(2):153–167. doi:10.1007/s40846-016-0118-z

5 Anhang

5.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Zuallererst bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Schierack und die Möglichkeit meine Arbeiten in dieser hervorragend ausgestatteten Umgebung durchführen zu können.

Besonders danken möchte ich dabei meinen Betreuern Prof. Dr. Schierack und Dr. Stefan Rödiger für die ausgezeichnete, geduldige Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit sowie für zahlreiche, produktive Diskussionen, die stets neue Ideen und Lösungsansätze hervorbrachten.

Außerdem möchte ich genauso allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe Multiparameterdiagnostik danken, die mir sowohl im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen als auch im Büro oder in der Freizeit mit vielen anregenden Gesprächen zur ständigen Motivation und zu neuen Gedanken beitrugen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich mit Zusprüchen und lieben Worten auf meinem Weg begleitet und stets ermutigt haben, auch wenn die Situationen mal nicht so positiv aussahen.

5.2 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie alle wörtlich und sinngemäß übernommenen Stellen gekennzeichnet habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Sedlitz, 20.06.2021

Christoph Jurischka

5.3 Publikationen

5.3.1 Publikationen im Rahmen dieser Dissertation und eigener Beitrag zu den Veröffentlichungen

Bestandteil der vorliegenden Dissertation sind zwei wissenschaftliche Forschungsartikel und ein Review-Artikel, die in einem Peer-Review-Prozess überprüft und in Fachzeitschriften veröffentlicht wurden.

Da die Beiträge mit Co-Autoren geschrieben wurden, wird der eigene Anteil nach einem definierten Schema dargestellt. Es werden drei Kategorien pro Beitrag unterschieden:

1. Position	2. Position	3. Position
Konzeptionelle Idee der Studie	Durchführung von Laborexperimenten und Probenanalysen, Datenanalysen, grafische Darstellungen, Programmieren von Software und statistischen Tests	Schreiben des Manuskripts

Die Zahlen in der Spalte „Beitrag“ zeigen jeweils den eigenen Anteil zu jeder Veröffentlichung an:

< 30 % Eigenbeitrag = 1 30 % - 70 % Beitrag = 2 >70 % - 100 % Beitrag = 3.

Der Beitrag zu jeder Publikation ist in Klammern aufgeführt.

Beitrag	Veröffentlichung
2,2,2 (70 %)	<u>Jurischka C</u> , Dinter F, Efimova A, Weiss R, Schiebel J, Schulz C, Fayziev B, Schierack P, Fischer T, Rödiger S. An explorative study of polymers for 3D printing of bioanalytical test systems. <i>Clinical Hemorheology and Microcirculation</i> . 2020. doi:10.3233/CH-190713.
1,3,2 (65 %)	<u>Jurischka C</u> , Dinter F, Sowa M, Noack J, Schiebel J, Roggenbuck D, Schierack P, Rödiger S. Tyramide signal amplification as universal detection method on protein coated microbeads. <i>Journal of Cellular Biotechnology</i> . 2019;4:15–22. doi:10.3233/JCB-189003.
1,1,1 (15 %)	Ruhe M, Rabe D, <u>Jurischka C</u> , Schröder J, Schierack P, Deckert PM, Rödiger S. Molecular biomarkers of DNA damage in diffuse large-cell lymphoma – a review. <i>Journal of Laboratory and Precision Medicine</i> . 2019;4:5. doi:10.21037/jlpm.2019.01.01.

5.3.2 Gesamte Veröffentlichungsliste und sonstige Beiträge

Gesamtliste der Publikationen (peer-reviewed)

Jurischka C, Dinter F, Efimova A, Weiss R, Schiebel J, Schulz C, Fayziev B, Schierack P, Fischer T, Rödiger S. An explorative study of polymers for 3D printing of bioanalytical test systems. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2020. doi:10.3233/CH-190713.

Jurischka C, Dinter F, Sowa M, Noack J, Schiebel J, Roggenbuck D, Schierack P, Rödiger S. Tyramide signal amplification as universal detection method on protein coated microbeads. *Journal of Cellular Biotechnology*. 2019;4:15–22. doi:10.3233/JCB-189003.

Ruhe M, Rabe D, Jurischka C, Schröder J, Schierack P, Deckert PM, Rödiger S. Molecular biomarkers of DNA damage in diffuse large-cell lymphoma – a review. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*. 2019;4:5. doi:10.21037/jlpm.2019.01.01.

Gao F, Sihver W, Jurischka C, Bergmann R, Haase-Kohn C, Mosch B et al. (2016): Radiopharmacological characterization of ⁶⁴Cu-labeled α-MSH analogs for potential use in imaging of malignant melanoma. In: *Amino acids* 48 (3), S. 833–847. DOI: 10.1007/s00726-015-2131-x.

Sihver W, Gao F, Jurischka C, Haase-Kohn C, Steinbach J, Carta D et al. (2014): Pharmacological characterization of α-MSH-derivatives. In: *Nuclear Medicine and Biology* 41 (7), S. 637–638. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2014.05.038.

Buch-/ Zeitschriftenbeiträge

Dinter F, Jurischka C, Weiss R, Rödiger S. (2020): Multiparametrische Antikörperdetektion für die Diagnostik. In: *Biospektrum* 26 (3), S. 265–267. DOI: 10.1007/s12268-020-1375-5.

Konferenzteilnahmen und -beiträge

- International Biotech Innovation Days - IBID 2020 (28.10.2020 – 29.10.2020, online)
 - Pitch Presentation:
„Characterization of polymers for 3D printing of bioanalytical test systems“
- 38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie – DGKMH (22.11.2019 – 23.11.2019, Braunschweig)
 - 3. Preis in der Kategorie „Speed“ Lecture:
„Charakterisierung von Polymeren für den 3D-Druck von bioanalytischen Testsystemen“
- Analysieren, Kultivieren, Desinfizieren - Ein Anwenderblick auf neue Polymere und Oberflächen in der Biotechnologie (11.09.2019, Potsdam)
 - Poster:
„An Explorative Study of Polymers for 3D Printing of Bioanalytical Test Systems.“

- PhD Workshop on Bioanalysis
(22.11.2018 - 23.11.2018, Luckenwalde)
 - Session-Chair
 - Speed Lecture:
„Fish Probes for the Detection of High-risk HPV Nucleic Acid in Infected Host Cells.”
- 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research - EACR25 Congress
(30.06.2018 – 03.07.2018, Amsterdam)
 - Poster:
„FISH Probes for the Detection of High-risk HPV Nucleic Acid in Infected Host Cells.“
- International Biotech Innovation Days - IBID 2018
(23.05.2018 – 25.05.2018, Senftenberg)
 - Short Lecture & Poster:
„Evaluation of signal amplification strategies on microbeads.“
- 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie – DGHM
(19.02.2018 - 21.02.2018, Bochum)
 - Poster:
„Molecular diagnostic of integrated virus DNA in host cell genomes.“
- Potsdam Days on Bioanalysis 2017
(23.11.2017 - 24.11.2017, Potsdam)
 - Poster:
„Screening of FISH probes for the detection of mutations and integrated viral DNA.“