

Report



ForschungmachtSchule Innovationspraktika

NACHNAME, Vorname: LAIMER Tamina
Geburtsdatum: 03.02.1991
Schule: BG/BRG Biondegasse, Baden
Schulstufe: 10. Schulstufe

TITEL des Innovationspraktikums: Atomic Force Microscopy Of The Interaction Of Functionalized Nanoparticles With Living CaCo-2 Cancer Cells

Bei: Institut für Allgemeine Physik,
Technische Universität Wien

Zeitraum: 1.8.08-31.8.08

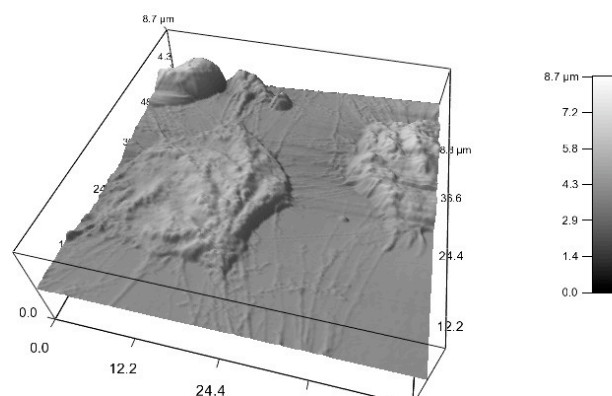
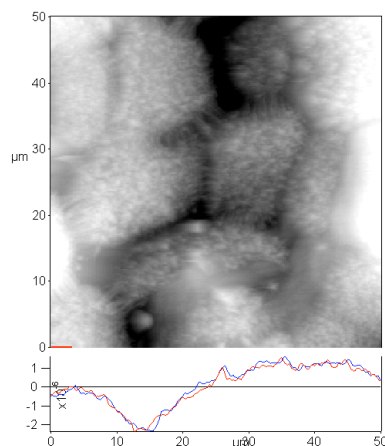
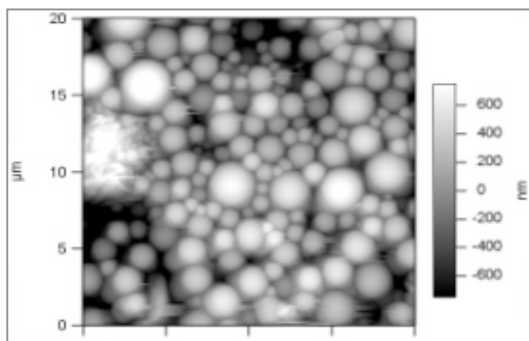
Betreut von: Univ. Ass. DI Dr. tech. Ille C. Gebeshuber

INHALT

MEIN INNOVATIONSPRAKTIKUM

1. Die Organisation bzw. die Abteilung

Das Institut für Allgemeine Physik der Technischen Universität Wien beschäftigt sich mit den Themengebieten Oberflächenphysik, Plasmaphysik, Sensorik und Ultraschall. Die Arbeitsgruppe Atom- und Plasmaphysik, geleitet von Prof. Aumayr, bereitet in Kooperation mit dem Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Wien ein Projekt zum Thema „Targeted Drug Delivery“ vor. In diesem Projekt sollen lebende Zellen während der Zuführung von Wirkstoffen unter dem Rasterkraftmikroskop (AFM) beobachtet werden.



Bilder:

- links oben: Nanopartikel
- rechts oben: Fluid Cell mit Zuleitung von Pufferlösung mit Wirkstoffen
- unten: Contact Mode Bilder von Zellen

2. Darstellung des Projekts

Im Projekt „Targeted Drug Delivery“ sollen Wirkstoffe gezielt zu einem bestimmten Zelltyp gebracht werden. Das ist deshalb besonders interessant, da bei konventionellen Medikamenten die Wirkstoffe im ganzen Körper unspezifisch verteilt werden und es so zu Nebenwirkungen kommen kann. Ein möglicher Lösungsansatz ist das Verpacken der Arzneistoffe in Nanopartikel aus einem wasserlöslichen Material. Dieses kann sich mit der Zeit auflösen und so den Wirkstoff freisetzen.

Damit die Medikamente ihren Weg in die Zelle finden sollen die Nanopartikel mit einer Beschichtung versehen werden, die es ihnen erlaubt sich nur an bestimmte Zellen zu binden.

Es gibt mehrere Aufgaben innerhalb dieses Projekts:

- Abbilden und vermessen der Nanopartikel und ihrer Eigenschaften
- Abbilden von verschiedenen Zelltypen und Messung von Veränderungen unter Einfluss von Wirkstoffen
- Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Gel auf dem Zellen gezüchtet werden

Das Ziel ist es, all diese Punkte eines Tages zusammenzuführen und an der lebenden Zelle Veränderungen zu messen und so zu bestimmen, wie wirkungsvoll verschiedenen Versionen von beschichteten Nanopartikeln sind.

Das Hauptproblem dabei ist, dass all dies nur mit lebenden Zellen funktioniert, was bedeutet, dass man der Zelle ein natürliches Umfeld bieten muss. Dazu gehört das Halten einer zelltypischen Temperatur von 37,2°C, das Umgeben mit einer Pufferlösung (Salzgehalt wie im Körper, konstanter pH Wert etc.) und das Anwachsen von Zellen auf einem geeigneten Untergrund.

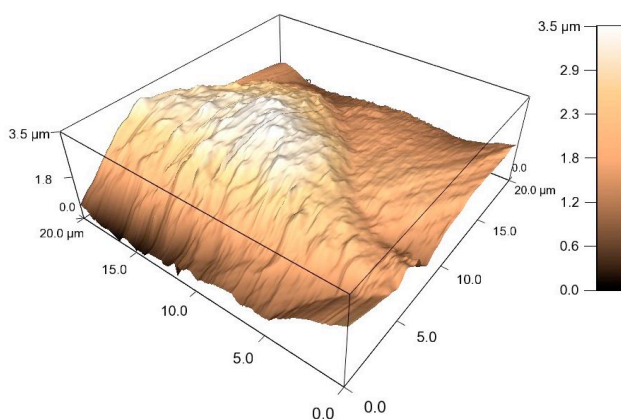
3. Aufgabenstellungen und Tätigkeiten im Praktikum

Das Gerät, das für unsere Messungen am besten geeignet ist, ist das AFM. AFM bedeutet "Atomic Force Microscope" oder auf deutsch Rasterkraftmikroskop. Das AFM stellt direkten Kontakt zur Probe her, indem es mit einer sehr feinen Spitze über die Probe fährt.

Angebracht ist die Spitze auf einem so genannten Cantilever, einer dünnen Blattfeder auf die ein Laserstrahl reflektiert wird. Wenn die Spitze sich nun über die Oberfläche bewegt verdreht bzw. verbiegt sich der Cantilever und der Laser wird abgelenkt. Aus dieser Ablenkung berechnet sich dann die abgetastete Oberfläche.

Es gibt 2 häufig verwendete Betriebsmodi: den Contact Mode und den Tapping Mode.

Beim Contact Mode wird die Spitze leicht gegen das Objekt gedrückt und dann zeilenweise über den zu messenden Bereich gezogen. Dabei sorgt ein Regler dafür, dass sie immer mit derselben Stärke auf die Oberfläche drückt. Die Spitze muss also gehoben oder gesenkt werden, um die Laserablenkung konstant zu halten und daraus ergibt sich dann die momentane Höhe der Spitze. Wenn man diese Information über viele (typischerweise 256*256) Punkte zusammensetzt ergibt sich ein Höhenprofil.



typisches Höhenprofil einer fixierten Zelle

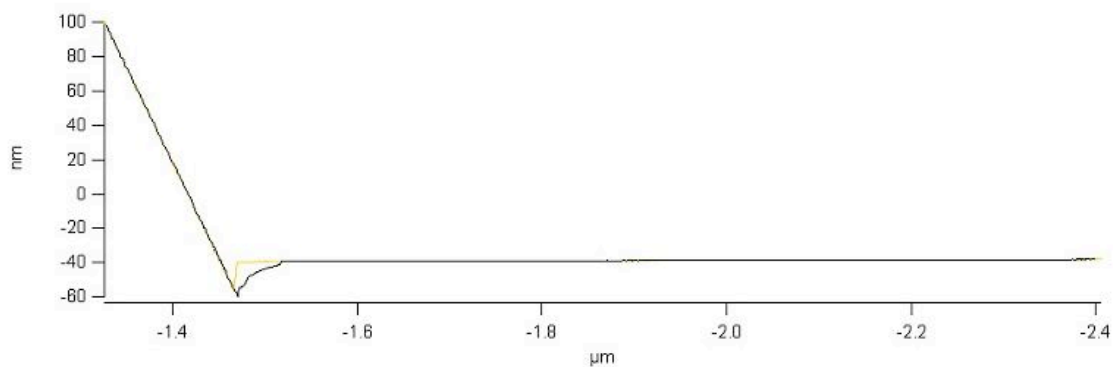
Beim Tapping Mode wird die Spitze in Schwingung versetzt und diese Schwingung an der Oberfläche gedämpft, der Cantilever tippt die Oberfläche also laufend an.

Zusätzlich werden bei beiden Modi noch andere Messwerte aufgezeichnet, z.B.: die seitlichen Ablenkungen der Spitze (Lateral Image).

Das AFM, das wir benutzten, war ein so genanntes "Ambient AFM", was bedeutet, dass es nicht in Vakuum betrieben wird. Dafür kann man jedoch in Flüssigkeiten messen.

Die höchste erreichbare Auflösung liegt dabei bei harten Objekten an Luft im Bereich von 10nm. Für elastische Proben erhöht sie sich allerdings mindestens auf das Zehnfache.

Neben Tapping und Contact Mode Messungen war für uns vor allem die Force-Curve (Kraftkurve) von besonderer Bedeutung. Für eine Force-Curve wird die Spitze auf bzw. in die Oberfläche gedrückt und wieder weggezogen. Wenn man die Ablenkung des Lasers oder auch die Kraft gegen die Entfernung von der Oberfläche aufträgt ergibt sich eine so genannte Force-Curve.



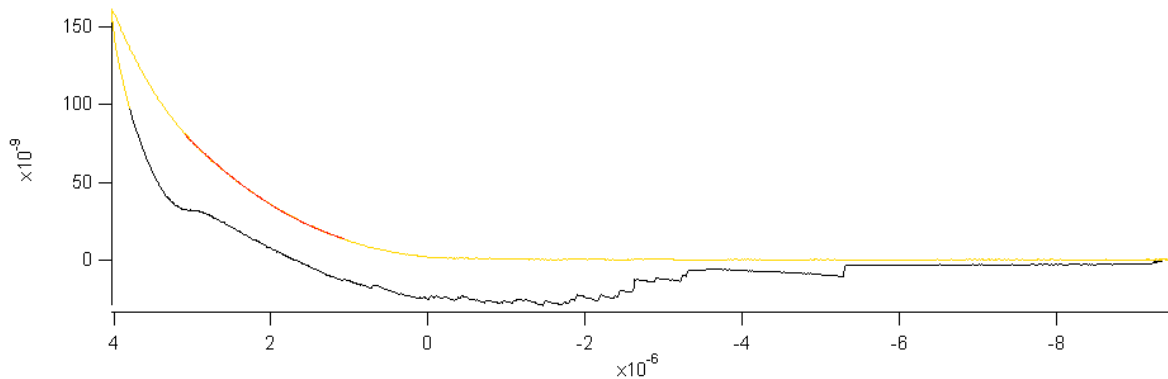
Typische Force-Curve auf Glas

Aus dieser kann man viele Eigenschaften des Materials ablesen, so kann man zum Beispiel die Festigkeit, Elastizität oder die Klebrigkeit messen.

Über einige Bereiche unserer Proben haben wir gezieltes Force Mapping gemacht. Dabei werden sehr viele Force-Curves aufgenommen. So kann man zum Beispiel ein Oberflächenbild der Elastizität machen.

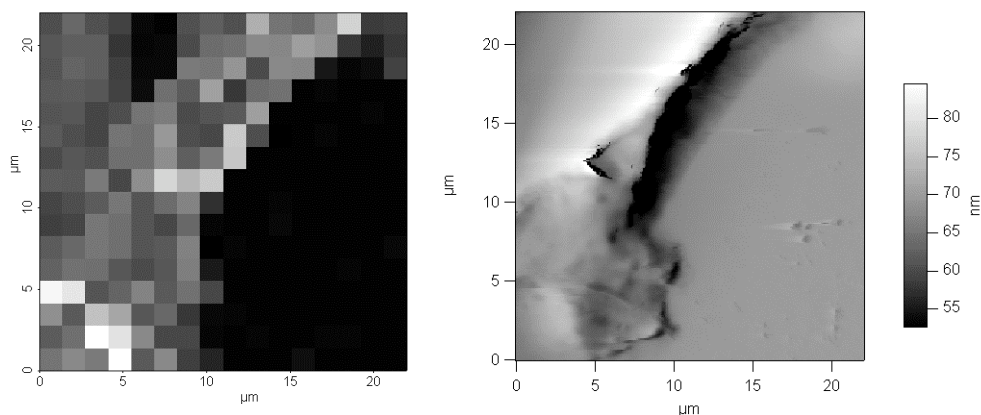
Da sich dieses Projekt als Gesamtes mitten in seiner Entwicklung befindet, ist es noch zu früh um konkrete Ergebnisse zu nennen. Was wir aber auf jeden Fall herausgefunden haben ist, was sich alles mit dem AFM bestimmen lässt und wie man größere Datenmengen aufnehmen kann.

So hat sich zum Beispiel gezeigt, dass das AFM eine gute Möglichkeit bietet genau zu messen, wie elastisch verschiedene Varianten des Gels sind, auf dem Zellen gezüchtet werden. Ein Beispiel:



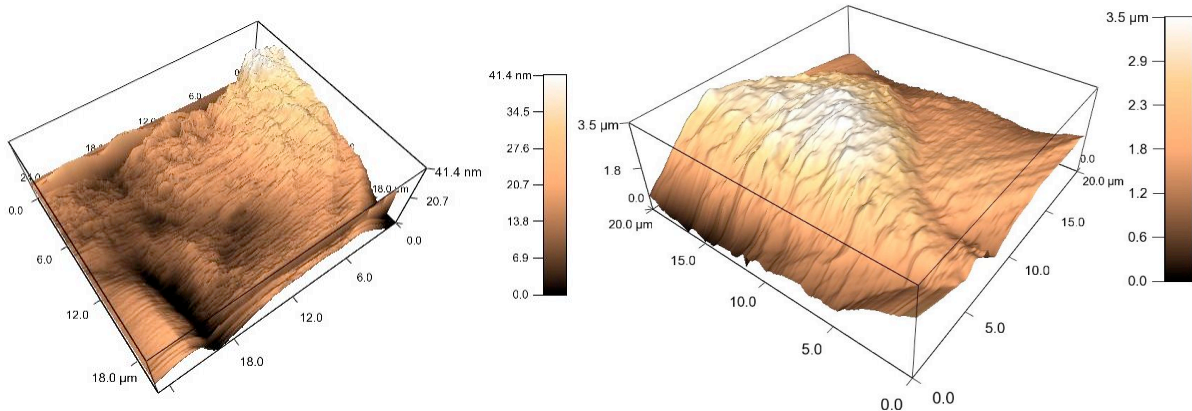
Hierbei handelt es sich um eine Force-Curve auf so einem Gel. Wie man sieht unterscheidet sie sich stark von einer auf Glas gemachten. Die gelbe Linie ist hier die Annäherung an die Oberfläche. An ihrer Krümmung kann man die Elastizität erkennen. Diese lässt sich leider nicht ohne weiteres ablesen, weshalb wir innerhalb unserer Messsoftware ein Programm erstellt haben, welches eine Kurve (nach dem theoretischen Modell) erstellt und an unsere Messdaten anpasst. Diese Kurve ist rot zu sehen und aus ihren Parametern berechnet das Programm die Elastizität.

Hier ein Beispiel einer Elastizitätsmessung mittels Force Mapping auf Zellen. (Leider mit geringer Auflösung beim linken Bild (Force Mapping), da sehr zeitaufwändig)



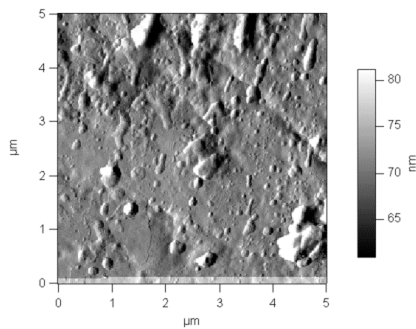
Auf dem linken Bild sieht man eine Karte der Elastizität, auf dem rechten ein Contact Mode Bild von der Zelle. Wie man sieht grenzt sich die Zelle, was Elastizität angeht, sehr klar von ihrer Umgebung ab. Das soll in Zukunft dazu dienen Elastizitätsunterschiede nach Zugabe von Wirkstoffen festzustellen.

Weiters haben wir festgestellt, dass um Zellen messen zu können, man auf sehr viele Parameter Rücksicht nehmen muss.



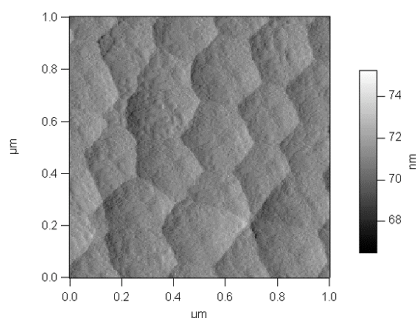
Das rechte Bild konnte zum Beispiel nur aufgenommen werden, weil die Zelle vorher mit einem Mittel behandelt wurde, dass sie stark versteift. Leider ist die Zelle danach praktisch tot und auch Elastizitätsmessungen machen hier keinen Sinn mehr.

Auf dem linken Bild lebt die Zelle noch, allerdings war hierfür auch ein sehr sensibler und weicher Cantilever nötig, sowie Pufferlösung und eine Temperatur von 37,2 Grad.



Auf den Bildern links kann man die gemessenen Nanopartikel sehen.

Die oberen wurden auf der Universität Wien hergestellt, die unteren sind industriell gefertigt. Man sieht ziemlich deutlich, dass bei den selbst hergestellten Nanopartikeln noch viele Verunreinigungen dabei sind, die sie verkleben und überdecken.



Im Moment wird daran gearbeitet, sie nach der Herstellung komplett zu säubern. Auch hier kann das AFM helfen festzustellen, inwiefern das funktioniert hat.

Tagesablauf:

Sobald ich am Institut ankam, fingen wir mit den Vorbereitungen am AFM an. Der jeweilige Cantilever musste eingebaut und kalibriert werden.

Genauer gesagt musste die Federkonstante des Cantilevers bestimmt werden, also wie sehr sich der Cantilever unter Anwendung einer bestimmten Kraft biegt. Dafür wird zuerst die Biegung bei Kontakt mit einer recht harten Oberfläche (meistens Glas) gemessen. Danach misst man, bei welcher Frequenz der Cantilever am stärksten schwingt. Aus diesen beiden Parametern ergibt sich dann die Federkonstante.

Zwischen 10 und 11 Uhr Vormittag wurden unsere Zellen geliefert und gleich darauf entweder in die Closed (Messungen in einer geschlossenen Flüssigkeitszelle) oder Open Fluid Cell (offene Zelle) eingebaut. Danach konnten wir mit unseren Messungen beginnen. Wir nahmen Bilder im Tapping und im Contact Mode auf und machten Force Mapping um die Elastizität zu bestimmen. Dabei war es immer wieder nötig unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops und sehr feinen Schrauben den Cantilever geschickt zu platzieren. Wenn man ihn zum Beispiel zu tief setzt, kann es vorkommen, dass man den gesamten Zellrasen verschiebt oder aber, wenn er zu hoch ist, kann man später nichts messen.

Für eine Zellprobe hatten wir nur 2-3 Stunden Zeit, da sie danach anfangen sich abzulösen und somit unbrauchbar wurden. Aus diesem Grund nahmen wir die lebenden Zellen immer zuerst und später fixierte, da diese länger halten.

Nachdem wir mit unseren Arbeiten fertig waren bauten wir unsere biologische Probe und den Cantilever wieder aus dem AFM aus und reinigten alles gründlich. Nach Abschluss der Aufräumarbeit analysierten wir unsere aufgenommenen Bilder und dokumentierten unsere Ergebnisse.

Eines der Highlights in meinem Innovationspraktikum war, dass wir eine Führung durch die Pharmazie bekommen haben. Dort haben wir gesehen wo und wie die Zellen, die wir gemessen haben, angebaut werden und welche Schritte dafür notwendig sind.

4. Nach meinem Innovationspraktikum

Besonders gut gefallen hat mir, dass ich die Möglichkeit hatte, mit lebenden Zellen zu arbeiten. Ich habe innerhalb kurzer Zeit sehr viel gelernt, indem ich in diesem Projekt mitarbeiten durfte und viele Dinge gesehen, zu denen man normalerweise keinen Zugang hat. Was mich jedoch überrascht hat war, dass sehr viel auf Englisch abläuft. Außerdem herrscht eine wirklich gute Arbeitsatmosphäre. Weniger gut gefallen hat mir allerdings, dass dadurch, dass wir mit biologischen Zellen gearbeitet haben, es eine relativ lange Anlaufzeit gegeben hat, bis die Zellen angebaut waren und alles funktioniert hat.

Ich habe insofern von dem Innovationspraktikum profitiert, dass ich einen Einblick in die Wissenschaft bekommen habe, was bestimmt meine spätere Berufswahl beeinflussen wird.