



FACULTEIT BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN

Academiejaar 2015–2016

GERICHTE PERTURBATIE VAN DE KERNMEMBRAAN
MET BEHULP VAN NANOBUBBLES

Yasmine BEULQUE

Promotoren: Prof. dr. ir. Winnok De Vos
Prof. dr. Kevin Braeckmans

Tutoren: Prof. dr. ir. Winnok De Vos
Ranhua Xiong

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
MASTER OF SCIENCE IN DE BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN:
CEL- EN GENBIOTECHNOLOGIE



FACULTEIT BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN

Academiejaar 2015–2016

GERICHTE PERTURBATIE VAN DE KERNMEMBRAAN
MET BEHULP VAN NANOBUBBLES

Yasmine BEULQUE

Promotoren: Prof. dr. ir. Winnok De Vos
Prof. dr. Kevin Braeckmans

Tutoren: Prof. dr. ir. Winnok De Vos
Ranhua Xiong

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
MASTER OF SCIENCE IN DE BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN:
CEL- EN GENBIOTECHNOLOGIE

Toelating tot bruikleen

De auteur en de promotoren geven de toelating om deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik.

Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.

januari 2016

Yasmine Beulque

Prof. dr. ir. Winnok De Vos

Prof. dr. Kevin Braeckmans

Woord vooraf

Mijn dank gaat uit naar prof. dr. ir. Winnok De Vos en prof. dr. Kevin Braeckmans. Het is uit hun wetenschappelijke samenwerking dat het idee voor dit thesisonderwerp ontsproten is. Ik dank hen voor het delen van hun inzichten en het aanreiken van ideeën. Beide professoren brachten mij bij, dat moeilijkheden en problemen eigenlijk uitdagingen en nieuwe mogelijkheden betekenen.

Ranhua Xiong dank ik voor de raadgevingen die ik kreeg bij het mij eigen maken van de techniek van fotoporatie.

Ook ir. Tom Sieprath en ir. Tobias Corne zijn bedankt voor het delen van hun vaardigheden, in het bijzonder in microscopie. Ik dank hen ook voor het vele overleg, hun relativeringsvermogen en humor.

Ik dank het Centrum voor Medische Genetica, verbonden aan het UZ Gent en de UGent, dat ik gebruik kon maken van het FACS-toestel. In het bijzonder bedank ik dr. Filip Matthijssens voor zijn assistentie bij het FACS'en.

Voor de morele steun en het nalezen van mijn thesis tenslotte, ben ik mijn vriend dankbaar.

Samenvatting

Een verstoorde kernmembraan is een verschijnsel dat kernmerkend is voor laminopathieën. Dit is een heterogene groep van aangeboren aandoeningen, die veroorzaakt worden door mutaties in het LMNA-gen. Dit gen codeert voor lamines; nucleaire proteïnen die onder meer structuur en rigiditeit aan de nucleus te verlenen. Ten gevolge van de verstoorde kernmembraan treden herhaaldelijk spontane, niet-letale rupturen op met acuut verlies van compartimentalisatie tot gevolg. Het niet-letale karakter van de rupturen in de kernmembraan doet vermoeden dat ze een belangrijke rol spelen in de pathogenese.

Om het stochastisch proces van rupturen in de kernmembraan beter te kunnen bestuderen, werd in deze thesis geprobeerd om op gerichte wijze rupturen te induceren. Hiervoor werd gebruik gemaakt van fotoporatie met gouden nanopartikels. Door deze te laseren, worden lokaal hele kleine dampbellen gevormd, de zogeheten nanobubbles, die op transiënte wijze de membraan kunnen permeabiliseren.

Om de geïnduceerde rupturen in de kernmembraan te kunnen detecteren, werd gebruik gemaakt van cellen met FITC-dextraan in het cytoplasma of met EYFP-NLS in de nucleus. Vervolgens werden voor fotoporatie de gouden nanopartikels via endocytose tot bij de kernmembraan gebracht. Translocaties van fluorescent signaal van zowel het cytoplasma naar de nucleus, als van de nucleus naar het cytoplasma, werden onderzocht.

Voor FITC-dextraan kon bij fotoporatie van de kernmembraan een kleine toename in het nucleair signaal ten opzichte van het cellulair signaal gevonden worden, voor EYFP-NLS vice versa. De vastgestelde relatieve toenames in nucleair of cellulair signaal waren beperkt. Er kon niet met zekerheid gesteld worden dat deze het gevolg waren van rupturen in de kernmembraan.

Vermoedelijk was perinucleaire lokalisatie van de gouden nanopartikels via endocytose onvoldoende om rupturen in de kernmembraan te induceren. Bovendien werd vastgesteld dat er naast endocytose, ook rekening gehouden moest worden met exocytose van de gouden nanopartikels.

Inhoudsopgave

Toelating tot bruikleen	II
Woord vooraf	III
Samenvatting	IV
Lijst met symbolen en afkortingen	IX
Lijst van tabellen	X
Lijst van figuren	XI
1 Inleiding	1
2 Literatuurstudie	2
2.1 De lamina	2
2.1.1 Het cytoskelet	2
2.1.2 De nucleus en het nucleoskelet	3
2.2 Lamines	4
2.2.1 Classificatie op genniveau	4
2.2.2 Maturatie en vorming van hogere-orde laminestructuren	5
2.2.3 Functies van lamines	5
2.2.4 Interacties van lamines met andere proteïnen en met DNA	6
2.2.5 Lamines en mitose	8
2.3 Laminopathieën	8
2.3.1 Mutaties van laminegenen	8
2.3.2 Onderliggende mechanismen achter laminopathieën	9
2.3.3 Rupturen in de kernmembraan	9
2.4 Gecontroleerde inductie van rupturen	12
2.4.1 Sonoporië	12
2.4.2 Elektroporië	13
2.4.3 Fotoporië	14
2.5 Scope van het onderzoek binnen deze thesis	17
3 Materiaal en methoden	19
3.1 Celcultuur	19
3.2 Modificaties	19
3.2.1 Plasmiden	19
3.2.2 Ontwikkeling van stabiele cellijnen	20
Antibioticum afdodingscurve	20
Transfectie	21
Selectie	22
Isolatie van stabiel getransfecteerde klonen en expansie	22

3.2.3	Kernkleuring	24
	Invloed van permeabilisatie na fixatie op kleuring met DAPI of Hoechst 33342	24
	Optimalisatie van kleuring met Hoechst 33342 op levende cellen	25
3.3	Microscopie	25
3.4	Beeldanalyse	25
3.5	Fotoporatie-experimenten	26
3.5.1	Laser setup	26
3.5.2	AuNP's	27
3.5.3	Fotoporatie van de celmembraan	27
3.5.4	Optimale condities voor fotoporatie van de kernmembraan	29
3.5.5	Fotoporatie van de kernmembraan	29
4	Resultaten	31
4.1	Ontwikkeling van een methode om nucleaire en cellulaire fluorescentiesignalen te kwantificeren	31
4.1.1	Invloed van permeabilisatie na fixatie op kleuring met DAPI of Hoechst	32
4.1.2	Optimalisatie van Hoechst-kleuring op levende cellen	32
4.2	Monoklonale, stabiel getransfecteerde cellijnen met nucleaire fluorescentie	33
4.2.1	Antibioticum afdodingscurve	33
4.2.2	Isolatie van stabiel getransfecteerde klonen en expansie	34
4.2.3	Expressie-analyse van de stabiel getransfecteerde cellijnen	34
4.3	Fotoporatie van de celmembraan	37
4.3.1	Fotoporatie celmembraan van HeLa-cellen met FD40, FD70 of FD150	37
4.3.2	Fotoporatie celmembraan van ECV-304-cellen met FD70 of FD150	37
4.4	Endocytose van AuNP's tot bij de kernmembraan	40
4.4.1	Aantal geïnternaliseerde AuNP's na 24 uur endocytose	40
4.4.2	Afstand van AuNP's tot kernmembraan in functie van de tijd na toevoeging	41
4.5	Fotoporatie van de kernmembraan	43
4.5.1	Fotoporatie kernmembraan van ECV-304-cellen met FD70 of FD150	43
4.5.2	Fotoporatie kernmembraan van HeLa-cellen met FD70	43
4.5.3	Fotoporatie kernmembraan van HeLa-cellen met FD70 of EYFP-NLS	43
4.6	AuNP's na fotoporatie	47
5	Discussie	48
5.1	Monoklonale, stabiele cellijnen met nucleaire fluorescentie zijn tot stand gebracht	48
5.1.1	FACS is een efficiënte techniek om getransfecteerde klonen te isoleren	48
5.1.2	Klonale expansie eenvoudiger voor ECV-304-cellen dan HeLa-cellen	48
5.1.3	Monoklonaal, fluorescent karakter van de stabiele cellijnen	49
5.2	Methode voor kwantificatie van efficiëntie van nucleaire fotoporatie is ontwikkeld	49
5.2.1	Nucleaire exclusie is afhankelijk van de grootte van het FITC-dextraan	49

5.2.2	De spreiding van het signaal is afhankelijk van de grootte van het FITC-dextraan	50
5.2.3	AuNP's worden spontaan opgenomen en accumuleren perinucleair . . .	50
	Aantal geïnternaliseerde AuNP's varieert met de concentratie en de tijd	50
	Afstand van de AuNP's tot de kernmembraan is minimaal na 8 uur . . .	51
5.2.4	Fotoporatie kernmembraan na spontane internalisatie van AuNP's geeft	
	bescheiden verschuiving in ratio van cellulair op nucleair signaal	51
	AuNP's worden beïnvloed door fotoporatie	51
	Verschuiving in de ratio van cellulair op nucleair signaal	52
	Gerichte inductie van rupturen in de kernmembraan	53
6	Besluit	54
	Bibliografie	56
	Bijlage A - Datasheet AuNP	XIII

Lijst met symbolen en afkortingen

AuNP	gouden nanopartikel
BAF	'barrier to autointegration factor'
BSA	bovine serum albumine
CDC2	'cell division cycle protein 2 homolog'
Cdc25C	'cell division cycle protein 25C'
CMGG	centrum medische genetica Gent
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindool
DMEM	'Dulbecco's modified Eagle's medium'
ECV-304	'endothelial cells of vein 304'
EDTA	ethyleendiaminetetra-azijnzuur
EGFP	'enhanced green fluorescent protein'
EYFP	'enhanced yellow fluorescent protein'
FACS	'fluorescence-activated cell sorting/sorter'
FBS	foetaal bovine serum
FD40	FITC-dextraan met een moleculair gewicht van 40 kDa
FD70	FITC-dextraan met een moleculair gewicht van 70 kDa
FD150	FITC-dextraan met een moleculair gewicht van 150 kDa
FITC	fluoresceïne isothiocyanaat
GCL	'germ cell-less'
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethaansulfonzuur
HGPS	Hutchinson-Gilford progeria syndroom
HIV-1	'human immunodeficiency virus 1'
HP1	'heterochromatin protein 1'
KASH	'Klarsicht/ANC-1/Syne-1 homology'
LAD	'lamina associated domain'
LAP	lamine-geassocieerd proteïne
LB	'lysogeny broth'
LBR	lamine B receptor
LINC	'Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton'
NA	numerieke apertuur
Nd:YAG	neodymium-gedoteerd yttrium-aluminium-granaat kristal
NHDF	normale humane dermale fibroblasten
NLS	nucleaire lokalisatiesequentie
NP	nanopartikel
NPC	nucleaire porie complex
Oct1	'octamer-binding protein 1'
PBS	'phosphate buffered saline'
PML	'promyelocytic leukemia'
PP1	'protein phosphatase 1'
pRb	retinoblastoma proteïne

PS	penicilline-streptomycine
RFBP	‘RING (‘really interesting new gene’) finger-binding protein’
RNP	ribonucleoproteïne
siRNA	‘small interfering RNA’
snRNP	‘small nuclear ribonucleoprotein’
SOC	‘super optimal broth with catabolite repression’
SPR	‘surface plasmon resonance’
SUN	Sad1p/UNC-84
TRITC	tetramethylrhodamine
VNB	‘vapour nanobubble’
Vpr	‘viral protein R’
WD	‘working distance’
YA	‘young arrest’

Lijst van tabellen

3.1	Karakteristieken van de gebruikte 'filter cubes' van de Eclipse Ti microscoop	25
3.2	Karakteristieken van de gebruikte lasers en filters van de Eclipse C1si microscoop	25
4.1	Overzicht per celtype en per getransfecteerd plasmide van evolutie in aantal cellen na 'sorten' via FACS	34

Lijst van figuren

2.1	De verschillende componenten van het cytoskelet (De Schutter, 2014)	3
2.2	De nucleaire lamina als een complex netwerk aan de binnenzijde van de interfase celkern (de Roos, 2013)	4
2.3	De vorming van laminefilamenten uit afzonderlijke lamines (Dittmer & Misteli, 2011)	5
2.4	Schematisch overzicht van interacties ter hoogte van de lamina (Schirmer & de las Heras, 2014)	7
2.5	Transiënte opname van GFP-gelabelde proteïnen in het cytoplasma of de kern bij HeLa cellen met expressie van Vpr (de Noronha et al., 2001)	10
2.6	Herhaaldelijke nucleaire rupturen met efflux van EYFP-NLS uit de kern gevolgd door herstel van het nucleair signaal bij fibroblasten van een laminopathiepatiënt (De Vos et al., 2011)	11
2.7	Cavitatie en implosie onder invloed van ultrasoon geluid leiden tot sonoporatie waarbij moleculen zoals bijvoorbeeld nucleïnezuren in de cel kunnen worden opgenomen (De Cock, 2014)	13
2.8	De vorming van ‘surface plasmons’ met periode T bij sferische metalen NP’s onder invloed van licht (Link & El-Sayed, 2000)	15
2.9	Afhankelijk van de laserintensiteit worden bij fotoporatie met AuNP’s dampbellen gevormd of vindt opwarming van de AuNP’s plaats (Xiong et al., 2014)	16
2.10	Overzicht van de twee grote strategieën die gevolgd zullen worden om via fotoporatie de kernmembraan te perturberen	18
3.1	24-well plaat met Geneticine [®] concentratiebereik van 0 tot 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Mirus Bio LLC, 2015a)	21
3.2	Transfectieprocedure voor Lipofectamine [®] 2000 (Life Technologies, 2015a) .	22
3.3	Werking en componenten van een FACS (Lodish et al., 2008)	24
3.4	Optische setup voor fotoporatie-experimenten (Xiong et al., 2014)	27
3.5	Procedure voor fotoporatie van de celmembraan	28
3.6	Procedure voor fotoporatie van de kernmembraan voor cellen met cytoplasmatische of nucleaire fluorescentie	30
4.1	Schematisch overzicht van kwantificatie van nucleaire en cellulaire fluorescentiesignalen ter berekening van de ratio van het cellulair op het nucleair signaal	31
4.2	(a) Dichtheidscurven voor gemiddeld nucleair signaal van gefixeerde HeLa cellen na kernkleuring. (b-e) Beelden na kleuring met respectievelijk DAPI zonder Triton X-100, Hoechst zonder Triton X-100, Hoechst met Triton X-100 en DAPI met Triton X-100.	32
4.3	Intensiteit nucleaire fluorescentie na Hoechst 33342 kleuring bij verschillende concentraties en incubatietijden voor (a) ECV-304 en (b) HeLa	33
4.4	G418 afdodingscurven voor (a) ECV-304 en (b) HeLa	34
4.5	Dichtheidscurven van fluorescentie-intensiteit mCherry-NLS voor monoklonale, stabiel getransfecteerde cellijnen	35

4.6	Dichtheidscurven van fluorescentie-intensiteit EYFP-NLS voor monoklonale, stabiel getransfecteerde cellijnen	36
4.7	Dichtheidscurven voor cellulair en nucleair signaal en voor ratio cellulair op nucleair signaal voor HeLa-cellen in FITC-kanaal na fotoporatie van celmembraan met FD40, FD70 of FD150	38
4.8	Dichtheidscurven voor cellulair en nucleair signaal en voor ratio cellulair op nucleair signaal voor ECV-304-cellen in FITC-kanaal na fotoporatie van celmembraan met FD70 of FD150	39
4.9	(a) Staafdiagram voor ratio van aantal geïnternaliseerde AuNP's op aantal cellen (per beeld) na 24 uur. Beelden van z-projecties van HeLa-cellen in TRITC en Hoechst kanaal voor (b) 200x, (c) 100x, (d) 50x en (e) 10x verdunning van AuNP stockoplossing.	40
4.10	Dichtheidscurven en boxplots voor afstand van AuNP's tot kernmembraan op verschillende tijdstippen na toevoeging van AuNP's aan ECV-304-cellen . . .	42
4.11	Dichtheidscurven voor cellulair en nucleair signaal en ratio cellulair op nucleair signaal voor ECV-304-cellen in FITC-kanaal na fotoporatie van de celmembraan met (a-c) FD70 en (d-f) FD150, en fotoporatie van de kernmembraan met 120 μ J als gemiddelde pulsenergie. Fotoporatie van de kernmembraan vond plaats 8 uur na toevoeging van de AuNP's.	44
4.12	Dichtheidscurven voor cellulair en nucleair signaal en ratio cellulair op nucleair signaal voor HeLa-cellen in FITC-kanaal na fotoporatie van de celmembraan met FD70 en fotoporatie van de kernmembraan met (a-c) 120 μ J en (d-f) 240 μ J als gemiddelde pulsenergie. Fotoporatie van de kernmembraan vond plaats 4 uur na toevoeging van de AuNP's.	45
4.13	Dichtheidscurven voor cellulair en nucleair signaal en ratio cellulair op nucleair signaal in FITC-kanaal na fotoporatie van de kernmembraan met 120 μ J als gemiddelde pulsenergie (a-c) voor HeLa-cellen met FD70 en (d-f) voor HeLa-cellen met EYFP-NLS. Fotoporatie van de kernmembraan vond plaats 4 uur na toevoeging van de AuNP's.	46
4.14	Groottedistributie van AuNP's zonder fotoporatie, na één en na twee keer fotoporatie	47

1 Inleiding

Verschillende pathologieën, waaronder premature veroudering en kanker, worden gekenmerkt door cellen met een verzwakte kernmembraan. Dit is een gevolg van mutaties in of deregulatie van genen die coderen voor lamines, nucleaire proteïnen die mede instaan voor de structuur van de kern.

Door een verzwakking van de kernmembraan ontstaan transiënte rupturen in de kernmembraan die zorgen voor een acuut verlies van compartimentalisatie. Hierbij verplaatsen proteïnen en zelfs volledige organellen zich vanuit de nucleus naar het cytoplasma en omgekeerd.

Tegen de verwachtingen in, gaat het verschijnsel niet gepaard met celdood. In plaats daarvan herstelt de kernmembraan zich. Het mechanisme waarmee de nucleaire membraan zich herstelt, is nog niet gekend.

Een beter begrip van de oorzaken en gevolgen van deze rupturen wordt belemmerd door het feit dat ze stochastisch optreden. Het is met andere woorden moeilijk te voorspellen waar en wanneer ze zullen plaatsgrijpen. Daarom zijn technieken nodig die toelaten om rupturen op een gecontroleerde manier te bestuderen, bijvoorbeeld door ze gericht te induceren.

In het kader van deze thesis, wordt een piste verkend om rupturen op gerichte wijze uit te lokken. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een innovatieve techniek gebaseerd op fotoporatie. Kortweg worden hiervoor gouden nanopartikels naar de kernmembraan gericht en vervolgens met een laser bestraald. De zeer lokale opwarming genereert minuscule dampbelletjes, die dan door mechanische schade aan te richten de kernmembraan transiënt kunnen permeabiliseren. In dit werk wordt een eerste aanzet gegeven om nucleaire fotoporatie mogelijk te maken, na spontane internalisatie van goudpartikels. De efficiëntie van nucleaire fotoporatie wordt gekwantificeerd met behulp van fluorescente markers, microscopie en beeldanalyse.

2 Literatuurstudie

2.1 De lamina

2.1.1 Het cytoskelet

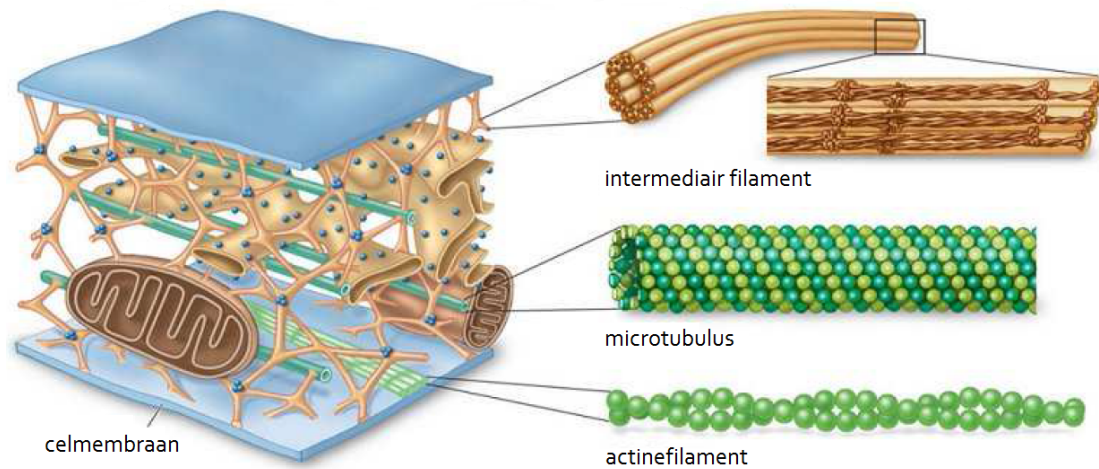
Beweging is één van de meest kenmerkende eigenschappen van leven. Binnenin de cel is beweging het resultaat van dynamische herschikkingen van het cytoskelet. Dit intern netwerk van proteïnen zorgt ook voor structuur en rigiditeit. Elektronenmicroscopische waarnemingen leren dat tot drie verschillende filamenteuze structuren samen het cytoskelet kunnen uitmaken (Figuur 2.1). Deze verschillen onder meer in diameter en mechanische eigenschappen (De Schutter, 2014).

De actinefilamenten (7-9 nm diameter) zijn polymeren van G-actine, hebben een grote trekweerstand en zijn betrokken in celmigratie, celdeling en het omgeven van partikels (De Schutter, 2014).

De microtubuli (24 nm diameter) zijn opgebouwd uit heterodimeren van α - en β -tubuline. Ze vangen hoofdzakelijk druk op en zijn betrokken in beweging van flagellen en cilia, celdeling, het intracellulair transport en de lokalisatie van vesikels en organellen (De Schutter, 2014).

De intermediaire filamenten (10-15 nm diameter) hebben een grote weerstand tegen mechanische kracht en stress. Ze vervullen geen rol in beweging of transport, maar leveren mechanische sterkte en vormen een ‘framework’ voor de lokalisatie van cellulaire processen. Ze werden tot nog toe enkel teruggevonden in multicellulaire dieren en niet in fungi en planten (Dittmer & Misteli, 2011; De Schutter, 2014).

Individuele moleculen van intermediaire filamenten bevatten een centraal α -helicaal domein van 310-350 aminozuren, met een C- en N-terminaal domein dat sterk kan variëren in grootte, sequentie en structuur. Twee van deze moleculen associëren tot een coiled-coil dimeer. In geval van cytoplasmatische intermediaire filamenten gaan twee anti-parallel georiënteerde dimeren een tetrameer vormen, waarbij de dimeren licht tegenover elkaar verschoven zijn. De gegeneerde overhangende carboxyuiteinden kunnen associëren met een volgend tetrameer en zo protofilamenten vormen. Acht protofilamenten winden uiteindelijk om elkaar heen ter vorming van een cytoplasmatisch intermediair filament. De intermediaire filamenten kunnen opgebouwd zijn uit proteïnen van verschillende families die weefsel specifiek kunnen zijn en worden op basis van sequentiehomologie ingedeeld in zes categorieën (type I tot VI) (Goldman et al., 2002; Dechat et al., 2008; Dittmer & Misteli, 2011).

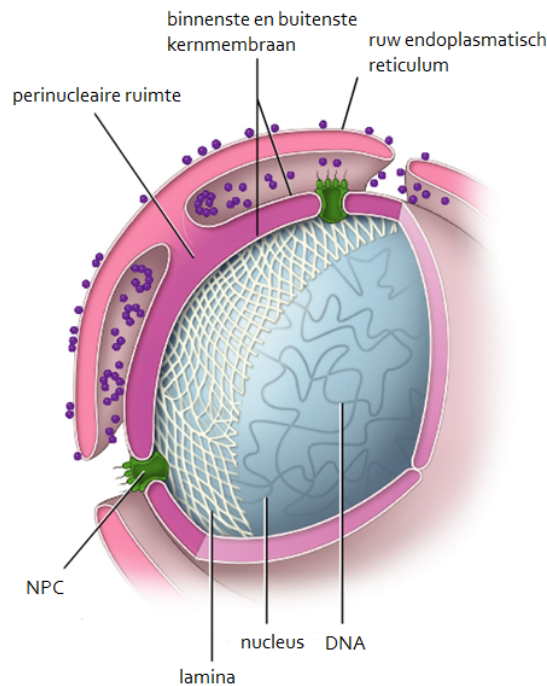


Figuur 2.1: De verschillende componenten van het cytoskelet (De Schutter, 2014)

2.1.2 De nucleus en het nucleoskelet

De celkern of nucleus is een sterk gecompartmenteerd organel, dat in hoofdzaak gedefinieerd wordt door de kernmembraan en het nucleoplasma. De kernmembraan bestaat net als de celmembraan uit een dubbele fosfolipidelaag. Echter, in het geval van de kern, betreft het een dubbele kernmembraan, met de perinucleaire ruimte of het nucleaire lumen tussen beide membranen in (Figuur 2.2) (Schirmer & de las Heras, 2014). Het nucleoplasma bevat het chromatine, maar ook kleinere structuren als de nucleolus, Cajal lichamen, nucleaire speckles en ‘promyelocytic leukemia’ (PML) nucleaire lichamen (Schirmer & de las Heras, 2014). Deze structuren worden nucleaire lichamen genoemd (Figuur 2.4) en zijn doorgaans niet via lichtmicroscopie waarneembaar. Ze zijn niet omgeven door een membraan. Toch vormen ze afzonderlijke, sferische structuren die bestaan uit hoge concentraties van specifieke proteïnen en RNA-moleculen (Lodish et al., 2008; Meldi & Brickner, 2011). Daarnaast bevat het nucleoplasma nog het nucleaire cytoskelet, ook wel het nucleoskelet genoemd (Schirmer & de las Heras, 2014).

De nucleaire lamina vormt het hoofdbestanddeel van het nucleoskelet. Ze bestaat uit een complex netwerk van proteïnen dat de nucleoplasmatische zijde van de binnenste kernmembraan bekleedt (Figuur 2.2). De lamina bevat vasthechtingsplaatsen voor het chromatine en voor de nucleaire porie complexen (NPC's). De NPC's vormen kanalen in de dubbele kernmembraan voor transport tussen cytoplasma en nucleus. Moleculen tot ongeveer 50 à 60 kDa kunnen vrij diffunderen doorheen de NPC's, terwijl transport van grotere moleculen sterk gereguleerd is (Lodish et al., 2008; Meyers, 2012; Schirmer & de las Heras, 2014).



Figuur 2.2: De nucleaire lamina als een complex netwerk aan de binnenzijde van de interfase celkern (de Roos, 2013)

2.2 Lamines

2.2.1 Classificatie op genniveau

De proteïnen waaruit de nucleaire lamina is opgebouwd, worden lamines genoemd. Het complexe netwerk van de lamina, is in feite opgebouwd uit twee afzonderlijke, maar onderling verbonden netwerken. Het ene bestaat uit B-type lamines, vormt een eerder geordende structuur en is geassocieerd met de binnenste kernmembraan en de NPC's. Het andere bestaat uit A-type lamines, vormt een meer ongeordende structuur en bevindt zich bovenop het vorige netwerk (Osmanagic-Myers et al., 2015).

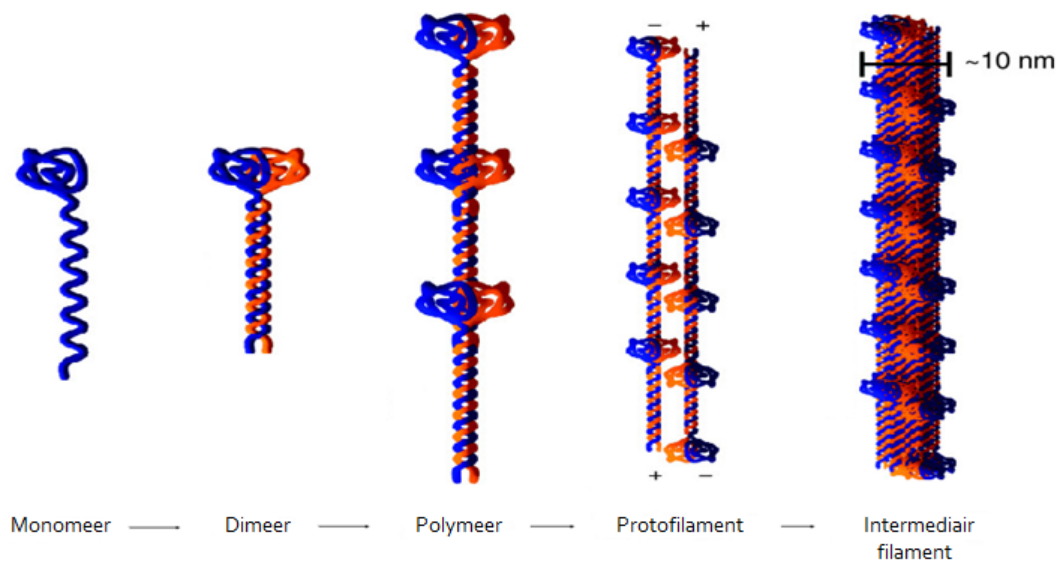
Nucleaire lamines (van het A-type) kunnen ook in lagere concentraties aangetroffen worden in het nucleoplasma (Goldman et al., 2002; Dechat et al., 2008; Meyers, 2012). Hier komen ze voor in een meer dynamische toestand dan in de lamina (Osmanagic-Myers et al., 2015). Het geheel aan nucleaire lamines die geen onderdeel uitmaken van de lamina, wordt de 'nucleoplasmic veil' genoemd.

In de genomen van de mens en andere zoogdieren zijn drie genen teruggevonden (LMNA, LMNB1 en LMNB2) die via alternatieve splicing coderen voor zeven proteïne isovormen. Tot de A-type lamines behoren lamine A, C, A Δ 10 en C2 en tot de B-type lamines behoren lamine B1, B2 en B3. De eerste groep wordt gecodeerd door het LMNA-gen, de tweede door de LMNB1- en LMNB2-genen (Dittmer & Misteli, 2011).

2.2.2 Maturatie en vorming van hogere-orde laminestructuren

Alle laminegenen bevatten een nucleaire lokalisatiesequentie (NLS) voor hun posttranslatieel transport naar de nucleus. Daarbovenop bevatten lamines B1, B2 en A een C-terminale –CAAX sequentie (Goldman et al., 2002; Dechat et al., 2008; Osmanagic-Myers et al., 2015). Deze bestaat uit een cysteïne residu, twee alifatische residu's en een C-terminaal residu. De aanwezigheid van de sequentie leidt tot farnesylering (3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrieen, C15:3) van het cysteïne residu, verwijdering van de drie laatste residu's en carboxymethylering van het cysteïne residu (Van Damme, 2014). Lamine A wordt hierna nog verder geprocessed, zodat uiteindelijk enkel lamines B1 en B2 nog over de farnesylfunctie beschikken. De modificaties ter hoogte van de –CAAX sequentie zouden van belang zijn voor proteïne-interacties met de lamines, alsook voor de sortering van de lamines naar de binnenste nucleaire membraan (Goldman et al., 2002; Mounkes et al., 2003; Dechat et al., 2008; Dittmer & Misteli, 2011; Meyers, 2012).

De nucleaire lamines worden geclassificeerd als type V intermediaire filamenten. Anders dan bij de cytoplasmatische intermediaire filamenten, associëren coiled-coil dimeren via een kopstaartbinding tot lamine polymeren. Twee dergelijke polymeren in anti-parallelle oriëntatie vormen een protofilament. Een nucleair intermediair filament bestaat uiteindelijk uit drie tot vier dergelijke protofilamenten (Figuur 2.3)(Dittmer & Misteli, 2011).



Figuur 2.3: De vorming van laminefilamenten uit afzonderlijke lamines (Dittmer & Misteli, 2011)

2.2.3 Functies van lamines

Als onderdeel van het nucleoskelet, zijn de lamines in de eerste plaats belangrijk als structurele componenten van de celkern. De B-type lamines verlenen de kern elasticiteit, terwijl de A-type lamines zorgen voor de mechanische stijfheid en viscositeit van de kern (Osmanagic-Myers et al., 2015).

Daarnaast komt uit de genetische analyse van lamines naar voor dat zij vele kritieke cellulaire processen ondersteunen door interacties aan te gaan met proteïnen. Tot deze processen behoren onder andere de regulatie van genexpressie, celproliferatie en -differentiatie, DNA-replicatie, transcriptie en apoptose (Osmanagic-Myers et al., 2015).

Door het bestuderen van de veranderingen die optreden in cellen met bijvoorbeeld expressie van mutante laminegenen, zijn al veel processen gekend waarin lamines een rol spelen. Echter, de precieze rol die normale lamines in deze processen vervullen, blijft in grote mate onbekend (Dechat et al., 2010; Dittmer & Misteli, 2011; Burke & Stewart, 2013).

2.2.4 Interacties van lamines met andere proteïnen en met DNA

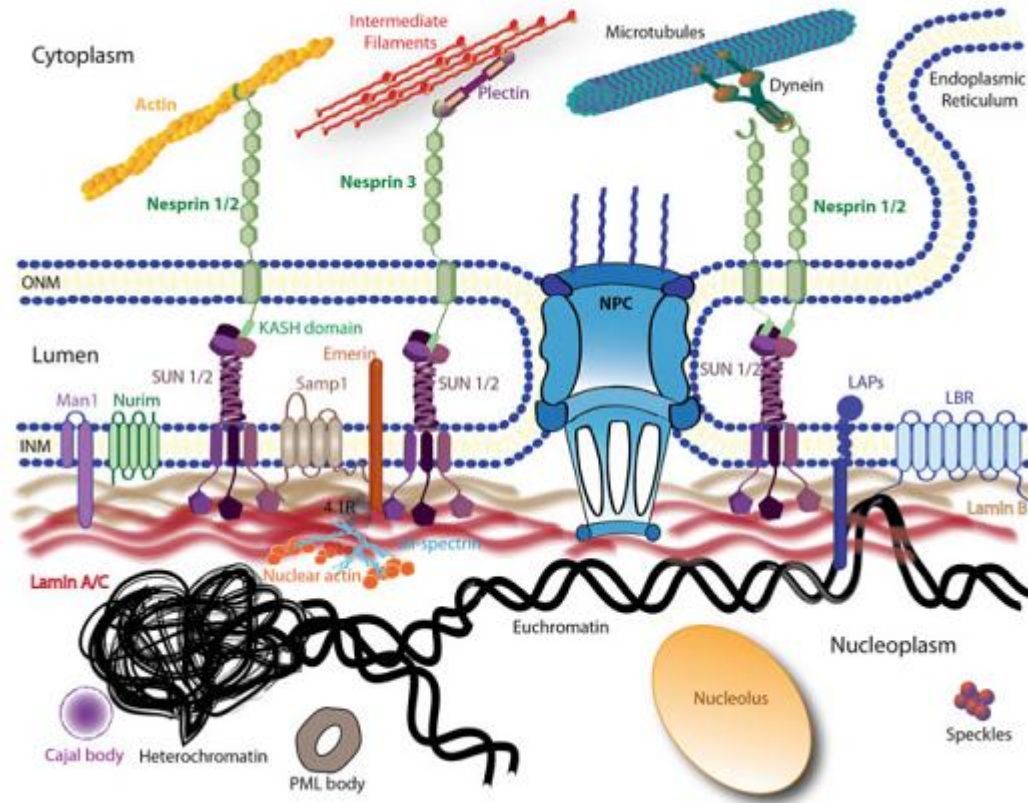
De proteïnen die interacties met de lamina aangaan, worden lamina-geassocieerde proteïnen (LAPs) genoemd en behoren tot één van twee groepen. Enerzijds zijn er de integrale membraanproteïnen die zich in de binnenste nucleaire membraan bevinden, anderzijds zijn er de proteïnen die, zonder vervat te zitten in de binnenste nucleaire membraan, geconcentreerd zijn rond de lamina (Goldman et al., 2002). Naast de LAPs zijn er ook nog de proteïnen die interacties aangaan met de lamines van de ‘nucleoplasmic veil’.

Interacties van de lamina met LAPs in de binnenste kernmembraan

De proteïnen die behoren tot de eerste groep, hebben naast hun membraan domein vaak een groot nucleoplasmatisch domein. Dit laatste kan binden aan lamines en aan chromatine. Meestal gebeurt de binding met chromatine indirect, dat wil zeggen door binding van een intermediair proteïne. De lamine B receptor (LBR) bijvoorbeeld, is enerzijds gebonden aan de lamina en anderzijds aan HP1 (‘heterochromatin protein 1’), een proteïne dat bindt met histonen en zo invloed uitoefent op de genexpressie. Bij de proteïnen emerine en MAN1 en bij de lamina-geassocieerde proteïne LAP2, vindt binding plaats met het chromatine-geassocieerde proteïne BAF (‘barrier to autointegration factor’). Andere voorbeelden van goed gekarakteriseerde proteïnen in de binnenste nucleaire membraan, zijn otfine, nurime en ‘RING (‘really interesting new gene’) finger-binding protein’ (RFBP) (Figuur 2.4)(Goldman et al., 2002; Mounkes et al., 2003; Schirmer & de las Heras, 2014).

Ook het LINC (‘Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton’)-complex bestaat uit proteïnen die tot deze groep van LAPs behoren. Het LINC-complex is een proteïnecomplex waarlangs de lamina in verbinding staat met het cytoskelet. Het is aan de ene zijde geassocieerd met de binnenste kernmembraan en aan de andere zijde met een deel van de cytoplasmatische actinefilamenten, microtubuli en intermediaire filamenten. Het LINC-complex bestaat uit proteïnen met SUN (Sad1p/UNC-84)-domeinen en proteïnen met KASH (‘Klarsicht/ANC-1/Syne-1 homology’)-domeinen. De proteïnen met SUN-domeinen komen voor als dimeren van SUN1 en SUN2. Ze bevinden zich in de binnenste nucleaire membraan en zijn geassocieerd met de lamina en met chromatine. In de perinucleaire ruimte interageren ze met de proteïnen met KASH-domeinen, die zich in de buitenste nucleaire membraan bevinden. Deze laatste proteïnen zijn nesprine/syne proteïnen en binden het cytoskelet aan zich. De actinefilamenten binden direct aan de nesprine/syne proteïnen, terwijl bij de microtubuli binding

via dyneïne en kinesine motoren plaatsvindt, en bij de intermediaire filamenten via plectine (Figuur 2.4) (Crisp et al., 2005; Dahl & Kalinowski, 2011; Schirmer & de las Heras, 2014).



Figuur 2.4: Schematisch overzicht van interacties ter hoogte van de lamina (Schirmer & de las Heras, 2014)

Interacties van de lamina met niet-membraangebonden LAPs

Tot de tweede groep behoren onder meer de proteïnen ‘germ cell-less’ (GCL), ‘young arrest’ (YA), PP1 (‘protein phosphatase 1’) en Oct1 (‘octamer-binding transcription factor 1’) (Goldman et al., 2002).

Oct1 is een LAP die interacties aangaat met B-type lamines. In de lamina binden de lamines met bepaalde regio’s binnen het chromatine, de zogenaamde LADs (‘lamina associated domains’). LADs bevatten bindingsplaatsen voor Oct1. Op die manier vormt Oct1 een vasthechtingsplaats voor het chromatine aan de lamina. In de meeste gevallen gaat het om transcriptieel inactief chromatine (Meldi & Brickner, 2011).

Interacties van lamines buiten de lamina

In het nucleoplasma zijn de lamines eveneens betrokken in de regulatie van genexpressie. Lamine A/C, geassocieerd met LAP2 α , kan pRb-E2F-complexen beïnvloeden. Het retinoblastoma proteïne (pRb) is een tumor suppressor proteïne dat in hypogefosforyleerde toestand kan

binden aan de transcriptiefactor E2F. Het pRb-E2F-complex zorgt dan voor transcriptionele repressie van bepaalde genen. Fosforylering van pRb maakt de binding met E2F ongedaan en zorgt voor activatie van transcriptie. De rol van het lamine A/C-LAP2 α complex ligt erin om, door interactie met pRb-E2F, de cellen te laten prolifereren dan wel differentiëren (Dorner et al., 2007; Osmanagic-Myers et al., 2015).

2.2.5 Lamines en mitose

De lamines vervullen een centrale rol in de afbraak, maar ook in de heropbouw van de nucleus na celdeling. Gedurende de promotafase van de mitose wordt de kernmembraan afgebroken en desintegreert de lamina (Osmanagic-Myers et al., 2015). De nucleaire lamines worden gefosforyleerd door CDC2 ('cell division cycle protein 2 homolog'), waarna ze depolymeriseren. Tijdens dit proces blijven de B-type lamines geassocieerd met fragmenten van de nucleaire membraan omwille van hun farnesylfunctie, terwijl de A-type lamines zich verspreiden doorheen het cytoplasma. Op het einde van de mitose, gedurende de telofase, vormen er zich twee kernmembranen. De lamines worden geïmporteerd in de nieuw gevormde nuclei ter vorming van de lamina van beide dochtercellen en gedefosforyleerd (Dittmer & Misteli, 2011). De vorming van de kernmembranen en de defosforylering van de lamines vinden quasi tegelijkertijd plaats (Goldman et al., 2002; Lodish et al., 2008).

Overigens worden niet alleen de lamines gefosforyleerd bij het begin van de mitotische deling. Ook componenten van de NPC's worden gefosforyleerd, waardoor de NPC's dissociëren. Fosforylatie van de proteïnen in de binnenste nucleaire membraan zorgt ervoor dat deze een verminderde affiniteit vertonen voor de lamina en het chromatine en draagt zo bij tot fragmentatie van de kernmembraan. Fosforylatie van het chromatine tenslotte, geeft aanleiding tot condensatie van het chromatine en verhindert interacties met de kernmembraan (Lodish et al., 2008).

2.3 Laminopathieën

2.3.1 Mutaties van laminegenen

Mutaties in de genen coderend voor de lamines geven aanleiding tot een veelheid aan zeldzame genetische aandoeningen. Veruit de meeste aandoeningen zijn gecorreleerd aan mutaties in het LMNA-gen, waarvan de meeste heterozygoot zijn. Afhankelijk van de mutatie kunnen zowel weefselspecifieke als systemische verschijnselen optreden. Weefselspecifieke aandoeningen kunnen het spierweefsel, het vetweefsel of het zenuwweefsel aantasten. Tot de systemische aandoeningen behoren de progeroïde syndromen restrictieve dermatopathie en Hutchinson-Gilford progeria syndroom (HGPS). Aandoeningen veroorzaakt door een mutatie in het LMNA-gen, worden laminopathieën genoemd (Dittmer & Misteli, 2011; Dechat et al., 2008).

Hiernaast zijn enkele aandoeningen gekend die gecorreleerd zijn aan mutaties in het LMNB1- of LMNB2-gen of die gecorreleerd zijn aan mutaties in lamina-geassocieerde proteïnen (Dechat et al., 2008).

Overigens kunnen niet alleen mutaties, maar ook op- en neerregulaties van laminegenen optreden. Deze fenomenen zijn gecorreleerd aan verschillende types kanker (Dittmer & Misteli, 2011).

2.3.2 Onderliggende mechanismen achter laminopathieën

De pathologie achter de aandoeningen geassocieerd met mutaties in de laminegenen, is nog niet geheel duidelijk. Wel zijn er een aantal hypothesen opgesteld die verband houden met belangrijke functies van lamines. De twee meest genoemde worden hier besproken.

De structurele hypothese

Het is mogelijk dat mutanten van het LMNA-gen een minder sterke kern tot gevolg hebben. De kern is dan gevoeliger voor fysische stress. Verwacht wordt dat deze stress vooral optreedt in weefsels onderworpen aan mechanische krachten zoals bijvoorbeeld het spierweefsel (Dahl et al., 2008; Ho & Lammerding, 2012; Ho et al., 2013).

De functionele hypothese

Een andere mogelijkheid is dat genregulatie verstoord wordt door veranderde interacties van mutante A-type lamines met chromatine of met nucleaire transcriptiefactoren (Dahl et al., 2008; Ho & Lammerding, 2012; Ho et al., 2013). Immers, over het algemeen komt heterochromatine geassocieerd met de lamina voor. Gedacht wordt dat de lokalisatie van dit transcriptioneel inactieve chromatine rechtstreeks verband houdt met diens regulatie van genexpressie, doordat de A-type lamines verschillende transcriptionele repressors aan zich binden (Zastrow et al., 2004; De Vos et al., 2011).

2.3.3 Rupturen in de kernmembraan

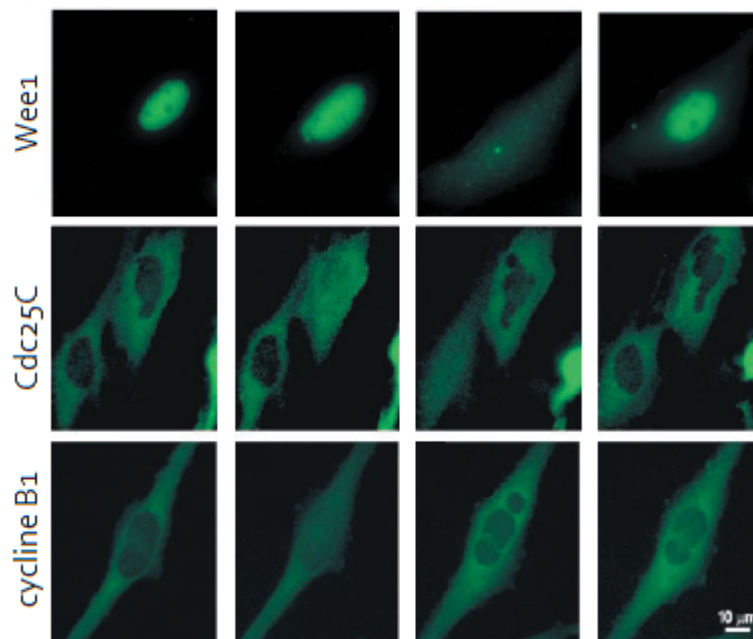
Hoewel de structurele en functionele hypothese elk andere aspecten van laminopathieën belichten, sluiten de hypothesen elkaar niet uit (Broers et al., 2006). Een fenomeen dat bij veel gevallen van laminopathie kon worden vastgesteld en waarbij beide hypothesen van toepassing zijn, is het optreden van rupturen in de kernmembraan (Hatch & Hetzer, 2014).

Het gaat bij deze aandoeningen meer bepaald om het herhaaldelijk optreden van transiënte rupturen in de kernmembraan gedurende de interfase. In cellen die mutante lamines tot expressie brengen, werd een onderbroken lamina vastgesteld, waarbij B-type lamines, NPC's en verschillende eiwitten van de binnenste kernmembraan op sommige plaatsen ontbraken. Ook werden uitstulpingen in de membraan vastgesteld, die chromatine bevatten. Als gevolg van de discontinuïteiten in de lamina, vinden op deze plaatsen rupturen in de kernmembraan plaats. Hierbij moet worden opgemerkt dat mutatie van de laminegenen in se geen rupturen in de kernmembraan veroorzaakt. Wel worden rupturen geïnduceerd bij een verkeerde verhouding tussen A- en B-type lamines, die zorgen voor respectievelijk viscositeit en elasticiteit van de kern. Op die manier kan het zijn dat mutatie van meerdere lamines geen rupturen veroorzaakt, maar mutatie van een enkel lamine wel. In het laatste geval wordt immers een

grotere spanning op de membraan uitgeoefend, die dan leidt tot rupturen in de membraan (Hatch & Hetzer, 2014).

De rupturen worden gekenmerkt door een acuut verlies aan compartimentalisatie. Hierbij vinden translocaties plaats van proteïnen en organellen vanuit de nucleus naar het cytoplasma en omgekeerd. Het verschijnsel gaat niet gepaard met celdood. In plaats daarvan herstelt de kernmembraan zich. Het mechanisme waarmee de nucleaire membraan zich herstelt, is nog niet gekend (Hatch & Hetzer, 2014).

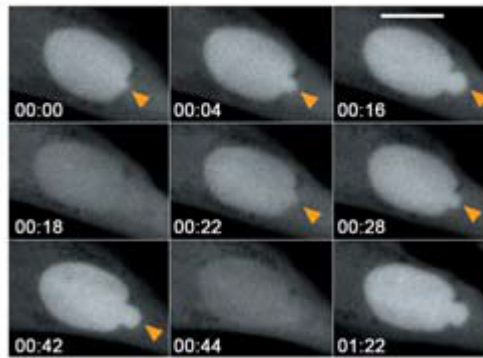
De rupturen zijn voor het eerst beschreven door de Noronha et al. (2001). Ze vonden dat Vpr ('viral protein R'), een proteïne die tot expressie wordt gebracht bij infectie met HIV-1 ('human immunodeficiency virus 1'), op transiënte en lokale wijze uitstulpingen in de kernmembraan veroorzaakt. Cellen met expressie van Vpr vertoonden ook een minder uniforme expressie van lamines A en B en defecten in de structuur van lamine C ter hoogte van de uitstulpingen. De auteurs vonden dat de uitstulpingen aanleiding konden geven tot rupturen in de kernmembraan. Wee1, een nucleair proteïne betrokken in de celcyclus, kon als gevolg van de rupturen tijdelijk in het cytoplasma teruggevonden worden (Figuur 2.5). Cdc25C ('cell division cycle protein 25C') en cycline B1, twee proteïnen die zich voornamelijk in het cytoplasma bevinden, konden door de rupturen in toegenomen mate in de kern worden gedetecteerd (Figuur 2.5). Het was uit het onderzoek niet duidelijk op welke manier Vpr effecten op de kernmembraan en lamina uitoefent.



Figuur 2.5: Transiënte opname van GFP-gelabelde proteïnen in het cytoplasma of de kern bij HeLa cellen met expressie van Vpr (de Noronha et al., 2001)

De Vos et al. (2011) stelden vast dat in NHDF (normale humane dermale fibroblasten) cellen, afkomstig van patiënten met een laminopathie en getransfecteerd met EYFP ('enhanced yellow fluorescent protein')-NLS, een reversibel verlies optrad van het signaal in de kern ten

gevolge van rupturen in de kernmembraan. Er werden plotse afnames van het signaal in de nucleus en gelijktijdige toenames van het signaal in het cytoplasma vastgesteld, waarna het signaal in de kern zich binnen de 5 tot 60 minuten herstelde (Figuur 2.6). Dit terwijl bij de controlecellijnen het intranucleaire signaal stabiel bleef. Om een causaal verband te kunnen aantonen tussen de lagere aanwezigheid of afwezigheid van functionele A-type lamines en de rupturen in de kernmembraan, werd gebruik gemaakt van zowel een ‘knock-down’ als een ‘knock-out’ cellijn voor lamine A/C. Er werd gevonden dat 18,5 % van de ‘knock-down’ cellen en 48 % van de ‘knock-out’ cellen rupturen vertoonden, terwijl geen rupturen konden worden vastgesteld bij de controlecellijnen. Aan de hand van fluorescente labels werden translocaties van cytoplasma naar nucleus waargenomen van de transcriptiefactor RelA en van het regulatorische proteïne cycline B1. Omgekeerd ondergingen de transcriptiefactor Oct1 en het PML tumor suppressor proteïne translocatie van nucleus naar cytoplasma. Ook bepaalde grotere celstructuren zoals de PML nucleaire lichamen of mitochondria ondergingen translocatie. Bij deze grotere structuren was de translocatie onomkeerbaar. Deze verstoring van de nucleaire compartimentalisatie wordt een belangrijke rol toegeschreven in de pathologie van laminopathieën. In geval bijvoorbeeld mislokalisatie van een essentiële transcriptiefactor optreedt bij ruptuur van de kernmembraan, kan genexpressie drastisch beïnvloed worden.



Figuur 2.6: Herhaaldelijke nucleaire rupturen met efflux van EYFP-NLS uit de kern gevolgd door herstel van het nucleair signaal bij fibroblasten van een laminopathiepatiënt (De Vos et al., 2011). De scale bar geeft 10 μm weer.

In aanvulling hierop onderzochten Tamiello et al. (2013) wat de invloed is van de stijfheid van het substraat waarop cellen gegroeid worden op nucleaire rupturen en compartimentalisatie. Primaire fibroblasten van een patiënt met HGPS werden gegroeid op substraten met stijfheden van 3 tot 80 kPa, die bestonden uit polyacrylamide gecoat met collageen I. NHDF cellen werden gebruikt als negatieve controle. Aan de hand van transfectie met EYFP-NLS konden nucleaire rupturen worden gedetecteerd in tot 34 % van de patiëntencellen gegroeid op substraten met stijfheden groter dan 3 kPa. Bij een stijfheid van 3 kPa en bij de negatieve controle werden geen rupturen vastgesteld. Bij stijfheden groter dan 3 kPa, stelden de auteurs ook een toename vast in het aantal cellen met cytoplasmatische PML nucleaire lichamen ten opzichte van de controle. Er werd besloten dat op zachte substraten geen nucleaire rupturen of verlies van compartimentalisatie optreedt. De verklaring die de auteurs hiervoor geven, is dat bij zachtere substraten de kernmembraan aan kleinere krachten vanuit het cytoskelet wordt

onderworpen. Het cytoskelet wordt als medium gezien dat mechanische invloeden vanuit de extracellulaire matrix via het LINC-complex overdraagt naar de lamina.

2.4 Gecontroleerde inductie van rupturen

Het gegeven dat de rupturen in de kernmembraan die optreden bij laminopathieën niet-letaal zijn, doet vermoeden dat ze een rol spelen in de pathogenese. Het is namelijk onduidelijk hoe de cellen herhaaldelijke rupturen in de kernmembraan kunnen overleven, gezien het verlies van compartimentalisatie van bijvoorbeeld nucleaire factoren betrokken in transcriptie of DNA-replicatie (Tamiello et al., 2013).

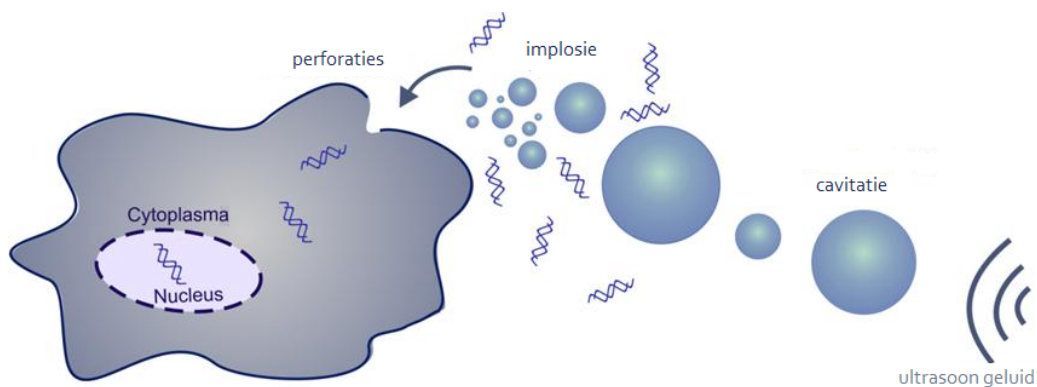
Het optreden van de rupturen is echter een stochastisch verschijnsel. Het is dan ook moeilijk te voorspellen waar en wanneer rupturen zullen plaatsgrijpen. Om de exacte consequenties op celniveau beter te begrijpen, kan het daarom interessant zijn om technieken in te zetten die toelaten om op gerichte wijze rupturen in de membraan te induceren.

Fysische technieken maken het mogelijk om gericht te werk te gaan, zelfs tot op het niveau van de individuele cel (Haas et al., 2001; Fan et al., 2012; Xiong et al., 2014). Mogelijke fysische technieken die besproken zullen worden zijn sonoporatie, elektroporatie, en in het bijzonder, fotoporatie. De technieken zijn goed gekarakteriseerd op het niveau van de celmembraan. Toch worden ook enkele voorbeelden beschreven van experimenten op het niveau van de kernmembraan.

2.4.1 Sonoporatie

Bij sonoporatie wordt ultrasoon geluid gebruikt om de celmembraan te permeabiliseren. Ultrasoon geluid heeft een frequentie hoger dan 20 kHz (tot circa 20 MHz). Het plant zich voort als een longitudinale golf, waarbij opeenvolgende compressies en expansies plaatsvinden van het voortplantingsmedium. Als de amplitude van de akoestische druk groter is dan de omgevingsdruk in de vloeistof, kan negatieve druk ontstaan. Omdat de oplosbaarheid van een gas recht evenredig is met de druk, worden bij negatieve druk dampbellen gevormd (cavitatie). Bij propagatie van de golf ondergaan die achtereenvolgens expansie en compressie. Bij lage golfintensiteiten spreekt men van stabiele cavitatie. Bij voldoende hoge golfintensiteit daarentegen, treedt inertiële cavitatie op. Tijdens de cycli van expansie en compressie vindt dan een netto toename in het volume van de dampbellen plaats. Bij het bereiken van een kritische grootte van de dampbel, vindt plotse implosie van de dampbel plaats. Het gas wordt in enkele nanoseconden gecompriëerd. Door de hoge energie van het proces kan lokaal een temperatuur van duizenden graden Celsius en een druk van meerdere honderden atmosfeer bereikt worden (Nieves-Soto et al., 2012; Fan et al., 2014).

Wanneer korte pulsen van ultrasoon geluid toegepast worden op cellen, wordt de celmembraan fysisch aangetast en kunnen moleculen uit de omgeving opgenomen worden in de cel. Bij cavitatie, en in het bijzonder bij implosie, vinden in de nabijgelegen cellen namelijk transiënte openingen in de celmembraan plaats (Figuur 2.7)(Schlicher et al., 2006; Fan et al., 2014).



Figuur 2.7: Cavitatie en implosie onder invloed van ultrasoon geluid leiden tot sonoporië waarbij moleculen zoals bijvoorbeeld nucleïne-zuren in de cel kunnen worden opgenomen (De Cock, 2014)

Ultrasoon geluid kan als techniek op zich ingezet worden voor transfectie. Echter, wanneer microscopisch kleine partikels van enkele μm diameter worden toegediend voor sonoporië, dan worden de effecten aanzienlijk versterkt. Deze partikels verhogen de probabiliteit van sonoporië (Stevenson et al., 2010a). Ze bestaan uit een gasvormige kern met een stabiliserend omhulsel. In het kader van gentherapie kan voor co-injectie van het DNA of RNA gekozen worden. De partikels en het DNA/RNA worden dan gelijktijdig toegediend. Ook injectie van geladen partikels is een mogelijkheid. Het DNA/RNA kan dan via elektrostatische interacties aan het omhulsel van de partikels binden. Nog kan het DNA/RNA verpakt worden in een gebiotinyleerd lipoplex en via een intermediair avidine binden aan een eveneens gebiotinyleerd partikel (De Temmerman et al., 2011; Fan et al., 2014).

Newman & Bettinger (2007) stellen dat het niet waarschijnlijk is dat ultrasoon geluid op directe wijze perturbatie van de kernmembraan veroorzaakt. De achterliggende redenering is dat ultrasoon geluid met een frequentie in de grootteorde van kilo- tot megahertz, een golflengte heeft die veel groter is dan de cel zelf. Ook zouden de fysische effecten van extracellulaire cavitatie of implosie verzwakt worden door de viscositeit van het cytoplasma. Indirecte effecten op de kernmembraan worden evenwel niet uitgesloten.

2.4.2 Elektroporië

Elektroporië bestaat erin cellen voor korte tijd aan intense elektrische velden bloot te stellen. De pulsen hebben meestal een duur in de grootteorde van minder dan een microseconde tot enkele milliseconden en een sterkte van honderden volt per centimeter. Bij nauwkeurige vaststelling van de optima van deze beide parameters, kan reversibele permeabilisatie van de membraan met behoud van de celviabiliteit bereikt worden (Bellard & Teissié, 2009).

De permeabilisatie is het gevolg van een toename in het transmembranair potentiaalverschil. Deze potentiaal beschrijft het spanningsverschil tussen het cytoplasma en het extracellulaire milieu van een cel, of bijvoorbeeld ook tussen het nucleoplasma en het cytoplasma. Wanneer deze hoog genoeg is, wijzigen lokaal de eigenschappen van de membraan en vormen er zich transiënte poriën (Bellard & Teissié, 2009).

Chen et al. (2004) onderzochten het effect van pulsen van 60 en 10 ns op zowel cel- als kernmembraan van HL-60 cellen. Deze pulsen zijn veel korter qua tijdsduur (ns) dan de pulsen die standaard gebruikt worden voor elektroporatie van de celmembraan (ms). Toch stelden ze vast dat pulsen van 60 ns en 26 kV/cm een vertraagd effect op de celmembraan uitoefenden. Veranderingen in de integriteit van de celmembraan werden gemeten door de toename in intracellulaire fluorescentie van propidiumjodide te registreren. Propidiumjodide is een intercalerend agens dat bij excitatie rood-oranje licht emitteert. Tijdelijke permeabilisatie van de celmembraan werd gedetecteerd 4,5 tot 26,5 minuten na de behandeling. De vertraging is waarschijnlijk te wijten aan een indirect effect, waarbij de puls organellen zoals de kern of de mitochondria beïnvloedt, die op hun beurt de functie en structuur van de cel en haar membraan beïnvloeden. Bij pulsen van 10 ns en 65 kV/cm daarentegen, werd tot 30 minuten na de behandeling geen toename in fluorescentie gedetecteerd. Echter, op niveau van de kernmembraan werden wel veranderingen waargenomen voor de pulsen van 10 ns. Hiertoe werden de cellen gekleurd met acridine-oranje. Acridine-oranje is een intercalerend agens dat bij excitatie groen licht emitteert. De kern kreeg een onregelmatige vorm en bij sommige cellen vormden zich pseudopodia. Ook nam de fluorescentie van het acridine-oranje in de kern af, terwijl in het cytoplasma de fluorescentie toenam. Dit zou betekenen dat een deel van het nucleair DNA, ten gevolge van permeabilisatie van de kernmembraan door de puls, kon migreren naar het cytoplasma. Bij pulsen van 60 ns werd hetzelfde effect waargenomen, maar dan met een vertraging van enkele minuten. In alle gevallen beïnvloedden de pulsen de celviabiliteit niet. Er kan worden besloten dat beide types pulsen uit het onderzoek gebruikt kunnen worden om de kern te perturberen.

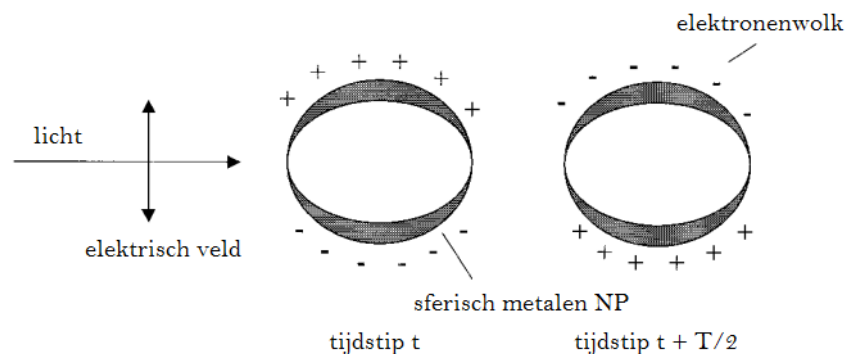
Nog onderzochten Chen et al. (2007) of pulsen van 10 ns en 150 kV/cm niet alleen permeabilisatie van de kernmembraan kunnen veroorzaken, maar ook bepaalde subnucleaire structuren kunnen beïnvloeden. In Jurkat cellen voerden ze immunolabeling uit met het Smith antigen antilichaam (Y12) en met een secundair antilichaam gelabeld met FITC (fluoresceïne isothiocyanaat). Het Smith antigen is een niet-histon nucleair eiwit dat geassocieerd met RNPs voorkomt, waardoor het beschouwd kan worden als specifiek voor nucleaire speckles. Ze vonden dat de pulsen een toename met een factor 2,5 in het fluorescente signaal van de nucleaire speckles veroorzaakten. Het aantal nucleaire speckles en hun groottes namen toe door de behandeling. Vermoedelijk wijzen deze veranderingen op een verstoring van transcriptie of splicing van pre-mRNA, waardoor de snRNPs en splicing factoren zich in de nucleaire speckles opstapelen. Door de respons van de snRNPs op de pulsen via immunolabeling te onderzoeken, kan duidelijk worden op welke manier de genexpressie precies beïnvloed wordt.

2.4.3 Fotoporatie

Fotoporatie wordt bereikt door laserlicht te focussen op individuele cellen. Hiervoor kunnen verschillende laserbronnen ingezet worden. Op basis van de output kan een onderscheid gemaakt worden tussen continue en gepulste lasers. Continue lasers zenden ononderbroken licht uit met een constant vermogen, terwijl gepulste lasers het licht in kortdurende pulsen uitzenden en hogere vermogens kunnen bereiken.

De werking van continue lasers is gebaseerd op lokale opwarming van de celmembraan. Hierdoor neemt lokaal de membraanfluiditeit toe en kan fotoporatie van een enkele cel mogelijk gemaakt worden. Voor gepulste lasers, is de werking sterk afhankelijk van de duur van de puls. Bij hele korte pulsen van enkele femtoseconden, worden bij hoge frequenties van de puls (MHz) vrije elektronen gevormd aan het celoppervlak. Er wordt een plasma gecreëerd dat zorgt voor de vorming van een porie in de celmembraan. Bij lagere frequenties van de puls (kHz) worden als gevolg van thermo-elastische stress openingen in de celmembraan gevormd. Bij pulsen met een duur van enkele nanoseconden, worden vrije elektronen gevormd, maar wordt ook warmte gegenereerd, met thermo-elastische stress en de vorming van dampbellen tot gevolg. Deze dampbellen kunnen, net zoals bij sonoporatie, cavitatie en implosie ondergaan. Pulsen met een duur van femtoseconden, zijn bijgevolg geschikt voor de behandeling van een enkele cel, terwijl de effecten van pulsen met een duur van nanoseconden van invloed zijn op tientallen cellen tegelijkertijd (Stevenson et al., 2010a,b; Heinemann et al., 2013).

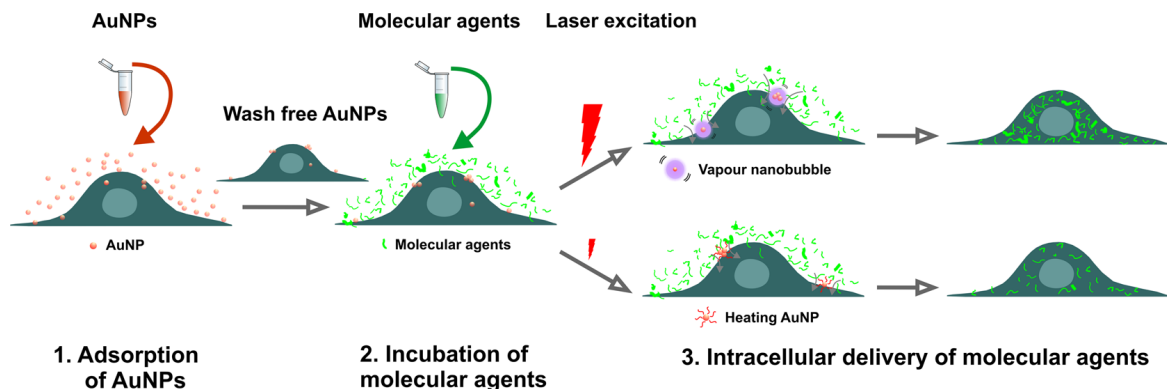
Ook kunnen metallische nanopartikels toegevoegd worden voor fotoporatie. In veel gevallen wordt als metaal goud gekozen, dat unieke grootte-afhankelijke fysico-chemische en optische eigenschappen bezit (Jain et al., 2012). Door dit soort nanopartikels (NP's) toe te voegen en te laten hechten aan de celmembraan, kan het effect van fotoporatie bereikt worden bij lagere laserintensiteiten. Er kan dan ook niet-gefocust laserlicht gebruikt worden, waardoor meerdere cellen tegelijkertijd kunnen behandeld worden. Bij het belichten van metallische NP's met voldoende kleine afmetingen, treedt namelijk absorptie plaats van licht uit het zichtbare en nabije UV-spectrum. De absorptie gaat samen met de vorming van zogeheten 'surface plasmons', coherente oscillaties van de vrije elektronen in het metaal ter hoogte van het oppervlak van het NP. Bij bepaalde lichtfrequenties kan resonantie optreden ('surface plasmon resonance' of SPR), wat resulteert in een lokale versterking van het licht in de nabijheid van de NP's (El-Sayed, 2001). Een dergelijke lokale versterking van het licht veroorzaakt effecten die opnieuw afhankelijk zijn van het soort laserbron en van de duur van de puls.



Figuur 2.8: De vorming van 'surface plasmons' met periode T bij sferische metalen NP's onder invloed van licht (Link & El-Sayed, 2000)

Continue lasers en gepulste lasers met pulsen van langere duur (> 10 ns) veroorzaken opwarming van de aan de celmembraan geadsorbeerde AuNP's (gouden nanopartikels). Er worden poriën gevormd doordat lokaal de membraanfluiditeit toeneemt of doordat integrale membraanproteïnen denatureren. Gepulste lasers met pulsen van relatief korte duur (< 10 ns)

daarentegen, veroorzaken een veel snellere en sterkere opwarming. Hierbij verdampt het water rondom de AuNP's en worden dampbellen gevormd. Deze dampbellen worden 'vapour nanobubbles' (VNBs) genoemd. Door de korte levensduur van de dampbel van minder dan een microseconde, is diffusie van de warmte van de AuNP's in de omgeving miniem. De meeste energie wordt omgezet in mechanische energie in de vorm van cavitatie en implosie. Door de mechanische energie van de dampbellen worden poriën in de membraan gevormd waarlangs diffusie kan plaatsvinden. Dit mechanisme leidt tot hoge transfectie-efficiënties en tot weinig of zelfs geen cytotoxiciteit. Dit in tegenstelling tot de directe opwarming die plaatsvindt bij continue lasers en gepulste lasers met pulsen van langere duur, waarbij de celviabiliteit na laserbehandeling substantieel lager ligt (Figuur 2.9)(Xiong et al., 2014).



Figuur 2.9: Afhankelijk van de laserintensiteit worden bij fotoporatie met AuNP's dampbellen gevormd of vindt opwarming van de AuNP's plaats (Xiong et al., 2014)

Dam et al. (2012) onderzochten of nucleoline gebruikt kon worden om constructen nabij de kern te brengen. Nucleoline is het meest voorkomende proteïne in de nucleolus van normale cellen. In kankercellen echter, vindt overexpressie plaats van de proteïne in het cytoplasma, waarna de proteïne zich begeeft naar de celmembraan. Als construct werden gouden NP's ('nanostars'), gekoppeld aan een specifiek aptameer, gebruikt. Voor het aptameer werd gekozen voor AS1411, een molecule ssDNA met een hoge affiniteit voor nucleoline. Door de kern te kleuren met DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindool) en het construct te labelen met Cy5, kon in HeLa cellen worden waargenomen dat vanaf 5 en tot 24 uur na toevoeging van het construct, beide signalen meer en meer overlap vertoonden. Er werd besloten dat de constructen door het nucleoline van aan de celmembraan tot nabij de kern werden getransporteerd. Over het mechanisme waarmee nucleoline de constructen opneemt in de cel en vervolgens naar de kern brengt, bestaat nog onduidelijkheid. Ook werd besloten dat de aanwezigheid van de aptameren in lokaal hoge concentraties in de nabijheid van de kern, leidde tot lokale, morfologische veranderingen in de kernmembraan. Deze verschijnselen traden bovendien niet op wanneer het vrije aptameer werd toegediend, waaruit volgt dat de gouden 'nanostars' nodig zijn om de lokaal hoge concentraties aan aptameer te kunnen bereiken. De morfologische veranderingen in de kernmembraan kunnen het functioneren van de kern verstoren, met schadelijke effecten op het celmetabolisme en zelfs celdood tot gevolg. Op die manier zou deze techniek kunnen ingezet worden om tumoren te bestrijden.

Een interessante strategie zou kunnen zijn, om niet in de eerste plaats het transport van de aptameren, maar wel het transport van de gouden NP's richting kern te beogen. De gouden NP's kunnen naar de kern getransporteerd worden door deze te koppelen aan een aptameer specifiek voor nucleoline. Door vervolgens fotoporatie toe te passen met een laserintensiteit die leidt tot de generatie van dampbellen, is het wellicht mogelijk de kernmembraan te fotoporieren.

Xiong et al. (2014) gebruikten positief geladen, gouden NP's van 70 nm diameter en met een concentratie van $8,2 \times 10^7$ NP's/ml voor fotoporatie van HeLa cellen. Transfectie met FITC-dextraan met een moleculair gewicht van 10 kDa, bij een laserintensiteit ($2,04 \text{ J/cm}^2$) die leidde tot de generatie van dampbellen of VNBs, leverde 85 % positieve cellen op. Er werd geen merkbare cytotoxiciteit vastgesteld. In H1299 cellen die stabiel EGFP ('enhanced green fluorescent protein') tot expressie brengen, werd de efficiëntie van de 'knock-down' onderzocht na transfectie met anti-EGFP siRNA ('small interfering RNA'), opnieuw bij een laserintensiteit van $2,04 \text{ J/cm}^2$. De efficiëntie bedroeg meer dan 80 %. Of het met deze techniek, waarbij fotoporatie bereikt wordt doordat VNBs gecreëerd worden ter hoogte van de gouden NP's, mogelijk is ook de kern te perturberen, moet het onderwerp uitmaken van deze thesis.

2.5 Scope van het onderzoek binnen deze thesis

Het doel van deze thesis is om met behulp van fotoporatie op gerichte wijze rupturen in de kernmembraan te induceren. Er zullen AuNP's gebruikt worden om door middel van VNBs de kernmembraan transiënt te permeabiliseren.

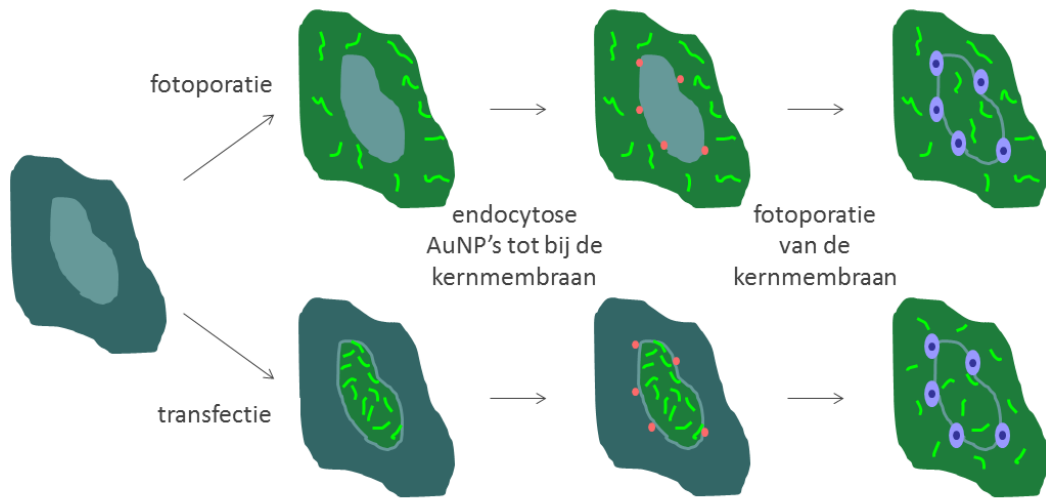
Om de geïnduceerde rupturen te kunnen waarnemen, zal gebruik gemaakt worden van fluorescente proteïnen. Translocaties van fluorescent signaal van zowel het cytoplasma naar de kern als van de kern naar het cytoplasma, worden beoogd (Figuur 2.10).

Voor het fluorescent signaal in het cytoplasma, zal fotoporatie van de celmembraan met een fluorescent proteïne toegepast worden. Om exclusie uit de kern te bekomen, worden moleculen gebruikt die bestaan uit de fluorescente proteïne gekoppeld aan dextraan. Voor verschillende groottes van het dextraan zal de mate van exclusie uit de kern worden nagegaan.

Het fluorescent signaal in de kern wordt bekomen door gebruik te maken van transfectie via liposomen. Een plasmide coderend voor een fluorescent proteïne gekoppeld aan een NLS wordt hierbij in de cel gebracht.

Aan de cellen met cytoplasmatisch of nucleair fluorescent signaal, zullen vervolgens AuNP's worden toegevoegd. Er zal geprobeerd worden om deze via endocytose tot in de nabijheid van de kernmembraan te laten transporteren.

Na selectie van een geschikt tijdstip na toevoeging van de AuNP's, zal uiteindelijk fotoporatie van de kernmembraan plaatsvinden. De fluorescente signalen in de kern en het cytoplasma zullen gekwantificeerd worden en vergeleken met deze van voor fotoporatie van de kernmembraan.



Figuur 2.10: Overzicht van de twee grote strategieën die gevolgd zullen worden om via fotoporatie de kernmembraan te perturberen

3 Materiaal en methoden

3.1 Celcultuur

Er werd gebruik gemaakt van de HeLa-celijn en de ECV-304 ('endothelial cells of vein-304')-celijn. Beide zijn humane, immortale cellijnen, verkregen uit cellen van respectievelijk baarmoederhalskanker en blaaskanker.

De cellen werden gegroeid in kweekflessen van 25 cm² (T25) of 75 cm² (T75), in 'Dulbecco's modified Eagle's medium' (DMEM) met 4,5 g/l glucose en L-glutamine (BE12-604F, Lonza Group Ltd., Verviers, België), gesupplementeerd met 10 V% foetaal bovine serum (FBS) (10270-106, Life Technologies Europe BV, Gent, België) en 1 V% Penicilline-Streptomycine (PS) (10000 U/ml penicilline en 10000 µg/ml streptomycine) (15140-122, Life Technologies Europe BV, Gent, België). Dit celmedium wordt hierna DMEM⁺ genoemd. Incubatie vond plaats in een bevochtigde atmosfeer met 5 V% CO₂ en bij 37°C.

Om de cellen te splitsen of uit te zetten aan een bepaalde dichtheid, werd eerst twee keer gewassen met 'phosphate buffered saline' (PBS) (met 0,0067 M PO₄³⁻, zonder Ca²⁺ en zonder Mg²⁺, BE17-516F, Lonza Group Ltd., Verviers, België). Vervolgens werd trypsine-EDTA toegevoegd (ethyleendiaminetetra-azijnzuur) (170 U/ml trypsine en 200 mg/l EDTA) (BE17-161E, Lonza Group Ltd., Verviers, België). Na enkele minuten incuberen werd de trypsine geblust met DMEM⁺. De celsuspensie werd vervolgens gecentrifugeerd bij 1000 rpm gedurende 5 minuten en de pellet werd geresuspendeerd in DMEM⁺. Voor het splitsen van de cellen werd meestal een verhouding van 1:8 aangehouden. Voor het uitzetten aan een bepaalde dichtheid, werden de cellen geteld. De celsuspensie werd verdund in 0,4 % trypaanblauw (15250-061, Life Technologies Europe BV, Gent, België) en de cellen geteld met de Bürker telkamer (0640211, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Duitsland).

3.2 Modificaties

3.2.1 Plasmiden

De HeLa- en ECV-304-cellen werden getransfecteerd met één van twee plasmiden: pEYFP-NLS of pmCherry-NLS. De genen die coderen voor de fluorescente proteïnen hebben een C-terminale fusie met een NLS ondergaan. Beide plasmiden bevatten een kanamycine resistentiegen voor positieve selectie in bacteriën en een Geneticine[®] (G418 sulfaat) (10131-035, Life Technologies Europe BV, Gent, België) resistentiegen voor selectie in humane cellen.

De plasmiden werden vermenigvuldigd in *E. coli* TOP10 cellen (verkregen van de onderzoeksgroep Toegepaste Moleculaire Genetica, vakgroep Moleculaire Biotechnologie, Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen, UGent). Dit zijn hitteschok-competente cellen, bestemd voor transformatie. Aan 50 µl van de cellen werd 5 µl plasmide toegevoegd. Na vijf minuten incubatie op ijs, vond transformatie plaats door toediening van een hitteschok van 45 seconden bij 42°C. Na nogmaals vijf minuten incubatie op ijs, werd 800 µl SOC ('Super Optimal broth with Catabolite repression') -medium (15544-034, Life Technologies Europe BV, Gent,

België) toegevoegd. De celsuspensie werd gedurende 1 uur geïncubeerd bij 37°C en 200 rpm. Vervolgens werden de cellen uitgeplaat op LB ('lysogeny broth') agar platen met 50 µg/ml kanamycine (11815024, Life Technologies Europe BV, Gent, België) ter selectie van de transformanten. Voor de LB agar werd 25 g/l LB (L3022, Sigma-Aldrich bvba, Diegem, België) en 15 g/l agar (A1296, Sigma-Aldrich bvba, Diegem, België) opgelost in bigedestilleerd water en geautoclaveerd. De platen werden overnacht geïncubeerd bij 37°C.

De volgende dag werd met een pipettip één kolonie van een plaat opgepikt en geresuspendeerd in 3 ml LB met 50 µg/ml kanamycine. De celsuspensie werd 12 tot 18 uur in een schudincubator bij 37°C geplaatst.

Tenslotte werden de plasmiden geïsoleerd met behulp van de GeneJET Plasmid Miniprep Kit (K0503, Life Technologies Europe BV, Gent, België). De plasmideconcentratie werd bepaald met de NanoDrop 2000 spectrofotometer (ND-2000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

Om een back-up te hebben van de cellen, werd vanuit de vloeibare cultuur voor elk plasmide een glycerolstock aangemaakt door de cultuur 1:2 te verdunnen in glycerol (49781, Sigma-Aldrich bvba, Diegem, België) en te bewaren bij -80°C. Wanneer geen plasmide meer voorhanden was, werden vanuit de glycerolstock opnieuw vloeibare culturen aangemaakt, waaruit dan de plasmiden werden geïsoleerd.

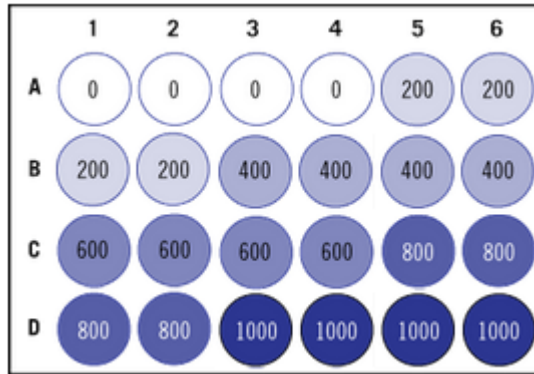
3.2.2 Ontwikkeling van stabiele cellijnen

Transfectie is het proces waarbij genetisch materiaal binnengebracht wordt in dierlijke cellen. Bij transiënte transfectie, kan het plasmide zich niet vermenigvuldigen na transfectie. De dochtercel bevat dan na elke celdeling telkens slechts ongeveer de helft van het aantal kopieën van de moedercel. Daarenboven vindt geleidelijke afbraak van het plasmide plaats, zodat uiteindelijk al het plasmide verloren gaat (Addgene, 2014). Omwille hiervan werd voor stabiele transfectie gekozen, waarbij het plasmide blijvend onderdeel is van het genoom, ofwel als episoom, ofwel als onderdeel van het chromosomaal DNA (Lonza, 2012; Life Technologies, 2015b).

Antibioticum afdodingscurve

De eerste stap in de ontwikkeling van een stabiele cellijn, was het opstellen van de antibioticum afdodingscurve voor de HeLa- en de ECV-304-cellijn. De curve dient om de optimale antibioticumconcentratie ter selectie van de stabiel getransfecteerde cellen te bepalen. Een antibioticum afdodingscurve is een dosis-responscurve die het verloop weergeeft van het aantal levende cellen in functie van toenemende concentraties antibioticum. Het antibioticum dat gebruikt werd, was Geneticine[®].

Voor elk van beide celtypes werden cellen uitgezet in DMEM⁺. Na 24 uur werd antibioticum toegevoegd aan de cellen in subconfluente toestand (Figuur 3.1). Confluente, niet-groeiende cellen kunnen namelijk resistentie vertonen tegen de effecten van Geneticine[®] (Thermo Fisher Scientific Inc., 2015a; Addgene, 2014; Life Technologies, 2015a).



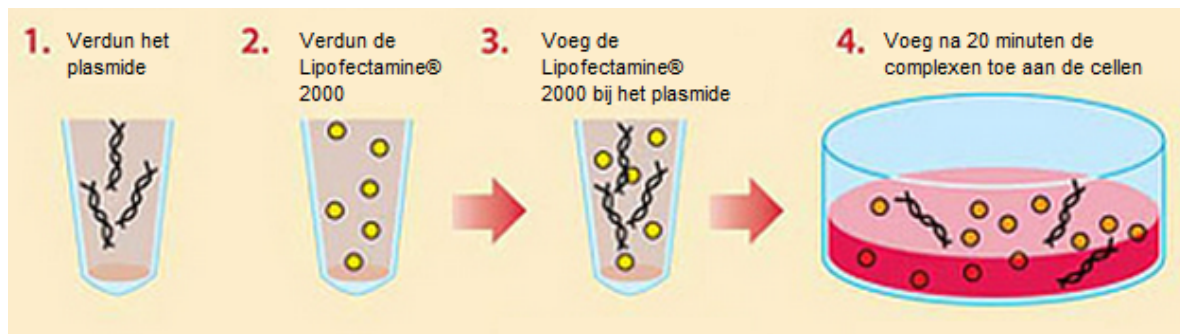
Figuur 3.1: 24-well plaat met Geneticine[®] concentratiebereik van 0 tot 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Mirus Bio LLC, 2015a)

Om de twee tot drie dagen werd het medium met het antibioticum vervangen. Dit enerzijds om het celdebris te verwijderen en anderzijds om de selectiedruk aan te houden, aangezien Geneticine[®] niet stabiel is bij 37°C (Whitley, 2006; Lonza, 2012). Drie en zeven dagen na de eerste toediening van het antibioticum werd het aantal levende cellen voor twee van de vier wells per concentratie geteld. Ten vroegste drie dagen na de eerste blootstelling aan het antibioticum kon celdood worden vastgesteld (Whitley, 2006; Thermo Fisher Scientific Inc., 2015a).

Transfectie

Transfecties gebeurden in 6-well platen. De cellen werden uitgezet 24 uur voor transfectie aan een zodanige densiteit dat de cellen circa 90 % confluentie bereikt hadden op het moment van transfectie. Als transfectiereagens werd Lipofectamine[®] 2000 gebruikt (11668-027, Life Technologies Europe BV, Gent, België).

Voorafgaand aan de transfectie, werden plasmide en Lipofectamine[®] 2000 op kamertemperatuur gebracht. Vervolgens werden 4 μg plasmide en 9 μl Lipofectamine[®] 2000 afzonderlijk verdund in 250 μl DMEM en vond vijf minuten incubatie plaats bij kamertemperatuur (Figuur 3.2). De Lipofectamine[®] 2000 werd daarna al druppelend aan het plasmide toegevoegd (Figuur 3.2). Vanaf dat moment vormden zich lipoplexen, complexen tussen DNA en de kationische lipiden van Lipofectamine[®] 2000. Na twintig minuten incubatie bij kamertemperatuur en na de cellen tweemaal gewassen te hebben met DMEM, werden de complexen op de cellen gebracht (Figuur 3.2). Onmiddellijk na toevoeging werd de 6-well plaat goed heen en weer bewogen om concentratie van de complexen te vermijden. Na 1 uur werd DMEM⁺ toegevoegd zodat het totale volume medium 2 ml bedroeg. Na 24 uur werd het medium vervangen door DMEM⁺.



Figuur 3.2: Transfectieprocedure voor Lipofectamine® 2000 (Life Technologies, 2015a)

Selectie

Selectie werd uitgevoerd met Geneticine® aan de optimale antibioticumconcentratie, bepaald volgens de afdodingscurve. De eerste dosis werd 72 uur na transfectie toegediend aan de cellen in subconfluente toestand (Life Technologies, 2015a). Bij transiënte transfectie kan het plasmide gedurende meerdere dagen tot zelfs enkele weken in de cellen aanwezig blijven. De selectie werd daarom gedurende minimaal twee weken aangehouden waarbij elke twee tot drie dagen het medium met het antibioticum werd vernieuwd (Lonza, 2012; Life Technologies, 2015b).

Stabiele transfectie treedt bij benadering op bij 0,1 tot 0,01 % van de getransfecteerde cellen (Whitley, 2006; Life Technologies, 2015b). Omwille van de lage efficiëntie waarmee stabiele transfectie plaatsvindt, werd de selectie aangehouden tot voldoende expansie van de cellen.

Om de antibioticumrespons te kunnen evalueren, werd ook selectie toegepast op een niet-getransfecteerde controle. Deze werd via lichtmicroscopie gecontroleerd op celdood.

Isolatie van stabiel getransfecteerde klonen en expansie

Na selectie werden polyklonale, stabiel getransfecteerde cellijnen bekomen. Deze cellijnen bestaan uit een gemengde populatie van Geneticine®-resistente cellen (Lonza, 2012).

Binnen zo'n populatie bestaat er een grote diversiteit aan expressieniveaus van het gen coderend voor het fluorescente proteïne. Bijkomend gegeven is dat het gemiddelde expressieniveau van het transgen binnen een polyklonale cellijn met de tijd afneemt. De verklaring hiervoor is dat bij stabiele transfectie de meeste cellen het transgen zwak tot expressie brengen en dat deze cellen een groeivoordeel hebben ten opzichte van de cellen die het transgen sterk tot expressie brengen. Ook zijn er cellen die enkel het resistentiegen en niet het gen coderend voor het fluorescente proteïne tot expressie brengen. Om de niet-fluorescente fractie van de cellen te elimineren en om genetische homogeniteit binnen de fluorescente fractie te creëren, werden individuele, fluorescente cellen geïsoleerd en monoklonale cellijnen gegenereerd (Kim, 2007; Lodish et al., 2008; Lonza, 2012).

Drie verschillende methoden werden gebruikt: 'limiting dilution', 'cloning discs' en 'Fluorescence-Activated Cell Sorting/Sorter' (FACS).

‘Limiting dilution’

Voor ‘limiting dilution’ werden de cellen aan een zodanig lage densiteit uitgezet dat er gemiddeld minder dan één cel per well aanwezig was. De procedure werd uitgevoerd in 96-well platen (Lonza, 2012; Mirus Bio LLC, 2015b). In sommige van de wells waarin net één cel was uitgezet, vormde er zich een kolonie, die als monoklonaal beschouwd werd (Lodish et al., 2008). De kolonie kon dan verder in celaantal toenemen tot een monoklonale cellijn.

‘Cloning discs’

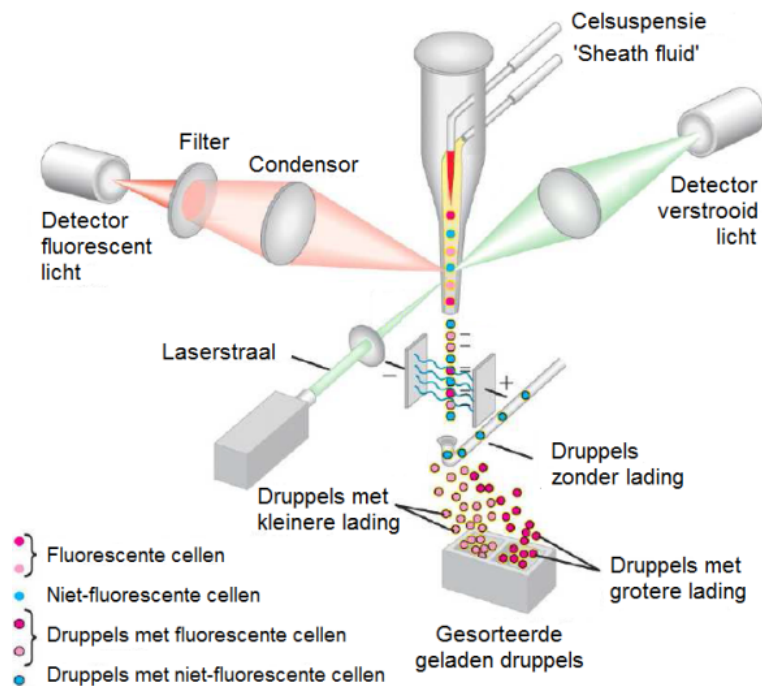
Als ‘cloning discs’ werden steriele schijfjes filtreerpapier gebruikt met een diameter van 5 mm. De cellen werden aan lage densiteit uitgezet in petriplaten en gegroeid tot zich afzonderlijke kolonies vormden (Mirus Bio LLC, 2015b). Alle cellen binnen iedere kolonie werden gecontroleerd op nucleaire fluorescentie. In geval van een positieve kolonie, werd de petriplaat gewassen met PBS. Een ‘cloning disc’ werd in trypsine gedoopt en op de kolonie geplaatst. Na enkele minuten incuberen werd de ‘cloning disc’ met de cellen overgebracht naar een 24-well plaat. Eens geïsoleerd, kon de kolonie dan verder in celaantal toenemen tot een monoklonale cellijn. De beschreven methode is gebaseerd op het oorspronkelijke protocol voor het gebruik van ‘cloning discs’ door Domann & Martinez (1995).

FACS

Met de term FACS kan zowel verwezen worden naar de methode als naar het instrument waarmee de methode wordt uitgevoerd. Hierbij worden specifieke, fluorescente cellen gescheiden uit een mengsel van cellen in suspensie (Lodish et al., 2008; Mirus Bio LLC, 2015b).

Als eerste wordt de geconcentreerde celsuspensie in FACS-buffer, samen met de buffer (‘sheath fluid’), geïnjecteerd (Figuur 3.3). Dit gebeurt op zo een manier dat de cellen daarna als enkele cellen langs de laserstraal passeren (Estes, 2006; Lodish et al., 2008). De laserstraal emitteert licht aan excitatiegolflengte. Het door elke cel geëmitteerde fluorescentielicht alsook het verstrooide licht worden gemeten (Figuur 3.3). Uit metingen van het verstrooide licht, kan informatie verkregen worden omtrent de morfologie van de cellen (Estes, 2006; Lodish et al., 2008; De Schutter, 2014). Vervolgens passeren de cellen door een ‘nozzle’, waarbij druppels gevormd worden die elk een cel bevatten (Figuur 3.3). Meteen hierop wordt aan elke druppel een elektrische lading toegekend die proportioneel is met de fluorescentie-intensiteit van de cel (Lodish et al., 2008; De Schutter, 2014). De druppels worden tenslotte gescheiden op basis van lading onder invloed van een elektrisch veld (Figuur 3.3).

Voor de FACS-buffer werd gewerkt met een filtersteriele oplossing PBS met 2 mM EDTA (dinatriumzout, dihydraat, ED2SS, Sigma-Aldrich bvba, Diegem, België), 1 m/V % BSA (bovine serum albumine) (A7030, Sigma-Aldrich bvba, Diegem, België) en 25 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethaansulfonzuur) (1 M, in 0,85 % NaCl, filtersteriel, 17-737F, Lonza Group Ltd., Verviers, België) (Rockefeller University, 2015a).



Figuur 3.3: Werking en componenten van een FACS (Lodish et al., 2008)

Voor het ‘sorten’ werd gebruik gemaakt van de FACS van het Centrum voor Medische Genetica Gent (CMGG), verbonden aan het Universitair Ziekenhuis Gent en de Universiteit Gent. Het toestel betreft een ‘S3 Cell Sorter’ met de bijbehorende ProSort software (145-1002, Bio-Rad Laboratories Inc., Nazareth, België). Voor het ‘sorten’ werd bijstand verleend door dr. Filip Matthijssens (postdoctoraal onderzoeker ‘Leukemia Genomics Group’ aan het CMGG).

Voor het ‘sorten’ van afzonderlijke cellen, werden 96-well platen met uitneembare 8-well strips met DMEM⁺ gebruikt. Na twee weken werden de wells gecontroleerd op kolonies. Bij voldoende cellen per well, werd opgeschaald naar een 24-well plaat en tenslotte naar een T25.

3.2.3 Kernkleuring

Invloed van permeabilisatie na fixatie op kleuring met DAPI of Hoechst 33342

HeLa-cellen werden gefixeerd door toevoeging van een 3 % formaldehydeoplossing (43368, Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Duitsland) voor tien minuten bij kamertemperatuur. Vervolgens werden de cellen drie maal gewassen met PBS en werd kernkleuring toegepast, al dan niet voorafgegaan door permeabilisatie. Om de cellen te permeabiliseren, werd een 0,5 % oplossing Triton X-100 (X100, Sigma-Aldrich bvba, Diegem, België) in PBS toegevoegd voor vijf minuten, gevolgd door drie maal wassen met PBS. Voor de kernkleuring werden de cellen tien minuten geïncubeerd met een 2 µg/ml oplossing DAPI (D1306, Life Technologies Europe BV, Gent, België) of Hoechst 33342 (trihydrochloride, trihydraat, 10 mg/ml, H3570, Life Technologies Europe BV, Gent, België) in PBS, opnieuw gevolgd door drie maal wassen met PBS.

Optimalisatie van kleuring met Hoechst 33342 op levende cellen

Voor zowel de HeLa- als de ECV-304-cel lijn werden de optimale concentratie en incubatietijd voor Hoechst 33342 bepaald. De cellen werden gewassen met PBS, waarna Hoechst 33342, verdund in DMEM⁺, in concentraties van 0, 1, 2 of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ toegevoegd werd. Na 5, 10, 15, 20 of 30 minuten incubatie bij 37°C, werd drie maal gewassen met PBS en DMEM⁺ toegevoegd.

3.3 Microscopie

Voor de opnames werd gebruik gemaakt van twee microscopen: een ‘widefield’ microscoop en een confocale microscoop.

Als ‘widefield’ microscoop werd de Eclipse Ti omgekeerde ‘widefield’ microscoop (Tabel 3.1) en bijbehorende software NIS-Elements AR v. 4.20.01 (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Nederland) gebruikt.

Tabel 3.1: Karakteristieken van de gebruikte ‘filter cubes’ van de Eclipse Ti microscoop

fluorescentie	excitatiefilter	dichroïsche spiegel	emissiefilter
DAPI/Hoechst 33342	340-380 nm	400 nm	435-485 nm
EYFP	460-500 nm	505 nm	510-560 nm
mCherry	528-553 nm	565 nm	590-650 nm

Als confocale microscoop werd de Digital Eclipse C1si confocale microscoop (Tabel 3.2) en bijbehorende software NIS-Elements AR v. 4.13.04 (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Nederland) gebruikt.

Tabel 3.2: Karakteristieken van de gebruikte lasers en filters van de Eclipse C1si microscoop

fluorescentie of reflectie	laser	emissiefilter
Hoechst 33342	408 nm	420-460 nm
FITC/EYFP	488 nm	500-550 nm
AuNP's	561 nm	570-620 nm

3.4 Beeldanalyse

De beeldanalyse gebeurde in ImageJ v. 1.49m (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Er werd gebruik gemaakt van twee macro's, geschreven en gedeeld door prof. dr. ir. Winnok De Vos.

De macro MeasureNuclearSignal meet de intensiteit in de celkern in een bepaald kanaal, na nucleaire segmentatie op basis van het kanaal met het fluorescentiesignaal van de kernkleuring.

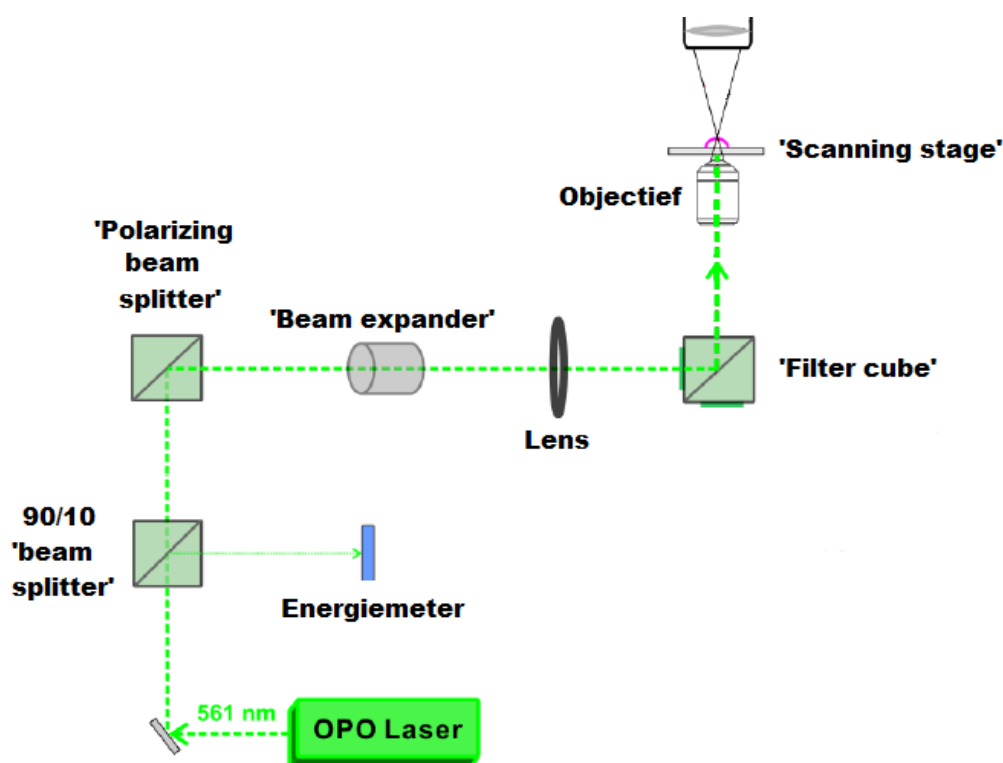
De macro Dist2Nuc meet de afstand van elk AuNP tot de kernmembraan in het kanaal met het signaal van de AuNP's, na nucleaire segmentatie op basis van het kanaal met het fluorescentiesignaal van de kernkleuring.

3.5 Fotoporatie-experimenten

3.5.1 Laser setup

Voor de laser werd gebruik gemaakt van de Opolette HE 355 LD (OPOTEK Inc., Carlsbad, Californië, USA). Deze bestaat uit een gepulste laser (pulsfrequentie 20 Hz) die licht uitzendt met een golflengte van 355 nm (OPOTEK Inc., 2008). Doordat de laser voorzien is van een optische parametrische oscillator (OPO), kan echter licht gegenereerd worden met een golflengte variërend van 410 tot 2200 nm (OPOTEK Inc., 2008). Het achterliggende principe is gebaseerd op de niet-lineaire polarisatie van een kristal (van den Heuvel, 1998; Guang & Song, 1999; Mes, 2003), ad hoc een neodymium-gedoteerd yttrium-aluminium-granaat kristal (Nd:YAG) (OPOTEK Inc., 2008). Wordt licht van een hoge intensiteit door het kristal gestuurd, dan is de polarisatie die optreedt niet langer recht evenredig met de elektrische veldsterkte van het invallende licht (van den Heuvel, 1998; Mes, 2003). Er ontstaan dan twee lichtgolven, met frequenties verschillend van deze van het invallende licht (van den Heuvel, 1998; Radboud University, 2015). De gewenste frequenties kunnen bekomen worden door ofwel de hoek waaronder het licht invalt op het kristal ('angle tuning'), ofwel de temperatuur van het kristal ('temperature tuning'), te laten variëren (van den Heuvel, 1998; Guang & Song, 1999; Radboud University, 2015). Voor de uitgevoerde fotoporatie-experimenten was de opstelling zo, dat licht gegenereerd werd met een golflengte van 561 nm (Figuur 3.4). De gewenste golflengte kon worden ingesteld met de OPOTEK Control Software v 1.2.23 (OPOTEK Inc., Carlsbad, Californië, USA). Hiermee kon ook de laserenergie geregeld worden.

Het laserlicht werd door een 'beam splitter' gestuurd, die 10 % van het laserlicht reflecteert naar een energiemeter (J-25MB-LE, Coherent Inc., Santa Clara, Californië, USA) en 90 % van het laserlicht doorlaat (Figuur 3.4). De laserenergie kon worden afgelezen met de software EnergyMax PC (Coherent Inc., Santa Clara, Californië, USA). Het doorgelaten laserlicht ging vervolgens naar een 'polarization beam splitter cube' (Figuur 3.4), die fijne regulatie van de laserenergie toelaat (Passinger, 2008; Cicchi et al., 2013). De 'beam expander' zorgde ervoor dat de grootte van de laserspot afneemt over langere afstand (Figuur 3.4) (Wavelength Opto-Electronic, 2012; Qioptiq Photonics, 2015; ULO Optics, 2015). Door gebruik te maken van een 'filter cube' (Figuur 3.4) was het mogelijk om van 'filter cube' te wisselen en zo het optische pad te onderbreken, zonder daarbij het laserlicht zelf te moeten uitschakelen. Tot slot ging het licht door een 10x droog objectief met numerieke apertuur (NA) 0,3 en 'working distance' (WD) 16,0 mm. Een elektronische 'scanning stage' (ProScan III, Prior Scientific, Cambridge, Verenigd Koninkrijk) werd gebruikt om met het laserlicht het staal te kunnen scannen (Figuur 3.4). Via de Prior Freeware Controller Demo (Prior Scientific, Cambridge, Verenigd Koninkrijk) konden het patroon en de startposities voor het scannen worden ingegeven.



Figuur 3.4: Optische setup voor fotoporatie-experimenten (Xiong et al., 2014)

3.5.2 AuNP's

Voor alle experimenten uitgevoerd in dit onderdeel, werd gebruik gemaakt van sferische AuNP's met een diameter van 70 nm (CU11-70-P30-50, Nanopartz Inc., Loveland, Colorado, USA) (Bijlage A). De AuNP's zijn gecoat met een positief polymeer van 1,5 nm dikte (Bijlage A), dat is opgebouwd uit vertakte amines (Technical Support Nanopartz Inc., persoonlijke communicatie, 5 augustus 2015).

Er werd telkens vertrokken van een 70x verdunning in gedemineraliseerd water als stockoplossing. Deze verdunning bevatte $1,6 \times 10^{10}$ AuNP's per ml (Bijlage A).

De grootteverdeling van de AuNP's werd geanalyseerd met de Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Verenigd Koninkrijk). Dit werd gedaan voor partikels voor fotoporatie en na één en twee keer fotoporatie.

3.5.3 Fotoporatie van de celmembraan

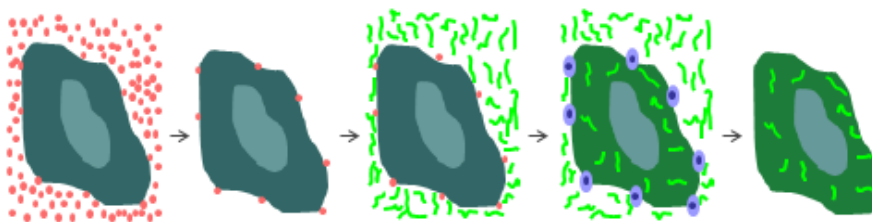
Voor het genereren van cellen met een fluorescent signaal in het cytoplasma, werd gebruik gemaakt van moleculen FITC-dextraan met moleculaire gewichten van 40, 70 en 150 kDa (FD40, FD70 en FD150) (FD40, 46945 en 46946, Sigma-Aldrich bvba, Diegem, België). Dextraan is een synthetisch polymeer dat is opgebouwd uit lineaire ketens van α -D-glucose. De moleculen FITC-dextraan dienden als modelmoleculen om de geïnduceerde rupturen in de kernmembraan te kunnen waarnemen.

Er werd telkens vertrokken van een 50 mg/ml verdunning FITC-dextraan in PBS als stockoplossing.

De cellen werden uitgezet in zwarte, polystyreen 96-well platen met transparante bodem. Per molecule FITC-dextraan werden drie wells voorzien. Er werden ook drie wells voorzien voor een negatieve controle. Deze cellen werden aan dezelfde condities van fotoporatie onderworpen, maar kregen geen FITC-dextraan toegediend. Er werd telkens één well van elke conditie per keer behandeld. In totaal vond dan drie keer fotoporatie plaats. De cellen werden vooraf gekleurd met Hoechst 33342.

De stockoplossing AuNP werd 200x verdund in DMEM⁺ ($8,2 \times 10^7$ AuNP's per ml). De stockoplossing FITC-dextraan werd 10x verdund in DMEM⁺ (5 mg/ml).

Na de cellen gewassen te hebben met PBS, werd 200 μ l van de oplossing AuNP's ($1,6 \times 10^7$ AuNP's) per well toegevoegd (Figuur 3.5). Na een halfuur incubatie bij 37°C, werd één keer gewassen met PBS om de niet-geadsorbeerde AuNP's te verwijderen (Figuur 3.5). Aan de vier wells werd vervolgens 100 μ l DMEM⁺ toegevoegd. Via de OPOTEK Control Software v1.2.23 werd de laserenergie zo ingesteld dat de gemiddelde pulsenergie weergegeven door EnergyMax PC ongeveer 120 μ J bedroeg. Met een diameter van het laserlicht van 150 μ m, komt dit neer op een energiedensiteit van 1,3 J/cm². Deze densiteit ligt boven de VNB 'threshold'. Hierbij vindt bij bestraling vorming van VNBs plaats in plaats van louter opwarming van de AuNP's (Xiong et al., 2014). In Prior Freeware Controller Demo werd een patroon ingegeven waarbij een regio van 7 x 7 mm lijn per lijn gescand werd van rechtsonder naar linksboven aan een snelheid van 3 mm per seconde en met een afstand tussen de lijnen van 150 μ m. Vlak voor de laserbehandeling van een well werd 100 μ l van de oplossing FITC-dextraan aan de well toegevoegd (Figuur 3.5). Zo bedroeg de uiteindelijke concentratie FITC-dextraan bij fotoporatie 2,5 mg/ml. Het scannen van een well duurde 2,5 minuten. Voor de negatieve controle werd 100 μ l DMEM⁺ toegevoegd voor de duur van het scannen.



Figuur 3.5: Procedure voor fotoporatie van de celmembraan

Onmiddellijk na het scannen van een well werd heel voorzichtig het medium afgenomen en heel voorzichtig 200 μ l DMEM⁺ toegevoegd. Dit is nodig om het overgebleven extracellulaire FITC-dextraan te verwijderen en om endocytose van FITC-dextraan te verhinderen. Meteen hierop werd 200 μ l DMEM⁺ met 25mM HEPES toegevoegd aan de wells voor detectie. De opnames gebeurden met de Digital Eclipse C1si confocale microscoop.

3.5.4 Optimale condities voor fotoporatie van de kernmembraan

Het bepalen van de optimale condities voor fotoporatie van de kernmembraan bestond uit twee aspecten. Ten eerste werd nagegaan of er een optimale tijdsduur voor endocytose van de AuNP's kon gevonden worden, waarbinnen de AuNP's zo dicht mogelijk tot bij de kernmembraan kwamen. Hiertoe vond beeldacquisitie plaats op zes verschillende tijdpunten na toevoeging van de AuNP's. Daarnaast werden vier verschillende concentraties van AuNP's getest, om te weten te komen met hoeveel geïnternaliseerde partikels deze concentraties overeenkwamen. Dit is van belang om de celtoxiciteit bij fotoporatie zoveel mogelijk te beperken.

De cellen werden uitgezet in zwarte, polystyreen 96-well platen met transparante, glazen bodem. Per concentratie AuNP werden drie wells voorzien. Er werden ook drie wells voorzien voor een negatieve controle. Aan deze cellen werden geen AuNP's toegevoegd. Voor elk tijdpunt werden één 96-well plaat uitgezet. Op die manier werd vermeden dat eenzelfde plaat herhaaldelijk uit de incubator werd gehaald en zo endocytose beïnvloed werd. De cellen werden vooraf gekleurd met Hoechst 33342.

De stockoplossing AuNP werd 200x, 100x, 50x of 10x verdund in DMEM⁺ ($8,2 \times 10^7$, $1,6 \times 10^8$, $3,3 \times 10^8$ of $1,6 \times 10^9$ AuNP's per ml).

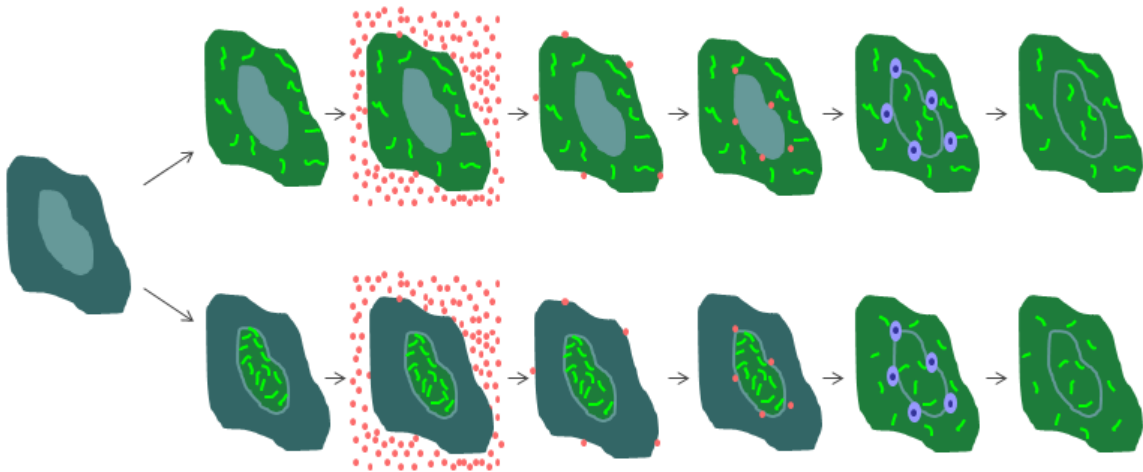
Na de cellen gewassen te hebben met PBS, werd 200 μ l van de oplossing AuNP's per well toegevoegd. Aan de negatieve controle werd 200 μ l DMEM⁺ toegevoegd. Na een halfuur incubatie bij 37°C, werd één keer gewassen met PBS om de niet-geadsorbeerde AuNP's te verwijderen (Figuur 3.6).

Detectie vond plaats 1 uur, 2 uur, 4 uur, 8 uur, 16 uur of 24 uur na toevoeging van de AuNP's. Vlak voor detectie werd 200 μ l DMEM⁺ met 25mM HEPES toegevoegd aan de wells. De detectie van de AuNP's was niet gebaseerd op fluorescentie, maar op verstrooiing van het licht door de AuNP's (Nikon MicroscopyU, 2013; Xiong et al., 2014). De opnames gebeurden met de Digital Eclipse C1si confocale microscoop.

3.5.5 Fotoporatie van de kernmembraan

Fotoporatie van de kernmembraan werd toegepast op cellen met ofwel cytoplasmatische ofwel nucleaire fluorescentie.

Op een geschikt tijdstip na toediening van een geschikte concentratie AuNP's voor endocytose, werd fotoporatie van de kernmembraan toegepast (Figuur 3.6). Bij fotoporatie van de celmembraan bedroeg de gemiddelde puls-energie van de laser ongeveer 120 μ J. Voor de kernmembraan werden, naast deze pulsenergie, ook hogere gemiddelde pulsenergieën van 240 en 480 μ J uitgetest.



Figuur 3.6: Procedure voor fotoporatie van de kernmembraan voor cellen met cytoplasmatische of nucleaire fluorescentie

De cellen werden uitgezet in zwarte, polystyreen 96-well platen en vooraf gekleurd met Hoechst 33342.

Voor wat betreft het FITC-dextraan, onderging de ene helft van de cellen enkel fotoporatie van de celmembraan, de andere helft onderging fotoporatie van de celmembraan gevolgd door fotoporatie van de kernmembraan. Per molecule FITC-dextraan werden drie wells voorzien. In geval van meerdere pulsenergieën, werden ook per pulsenergie drie wells uitgezet. Er werden ook twee keer drie wells voorzien voor twee negatieve controles. De cellen van de eerste negatieve controle werden aan dezelfde condities van fotoporatie onderworpen, maar kregen geen FITC-dextraan toegediend. De cellen van de tweede negatieve controle kregen FITC-dextraan toegediend voor de duur van de fotoporatie, maar ondergingen geen laserbehandeling.

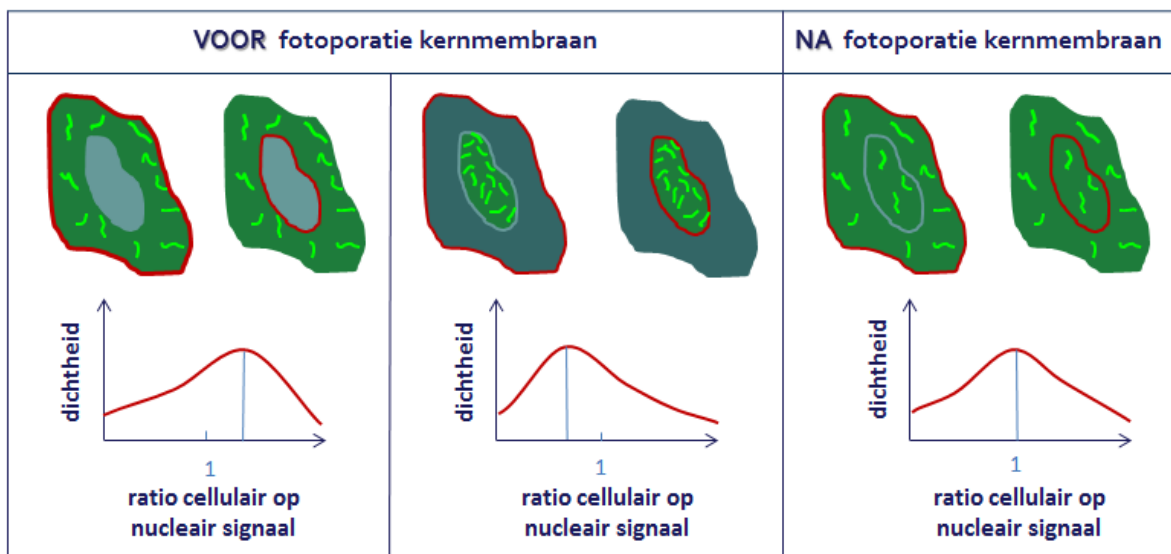
Voor wat betreft de getransfecteerde cellen met nucleaire fluorescentie, onderging de ene helft van de cellen geen fotoporatie van de kernmembraan en de andere helft wel.

De opnames gebeurden met de Digital Eclipse C1si confocale microscoop. Vlak voor detectie werd 200 μ l DMEM⁺ met 25mM HEPES toegevoegd aan de wells.

4 Resultaten

4.1 Ontwikkeling van een methode om nucleaire en cellulaire fluorescentiesignalen te kwantificeren

Om geïnduceerde rupturen in de kernmembraan te kunnen waarnemen, werd gebruik gemaakt van FITC-dextraan of van EYFP-NLS. Translocaties van fluorescent signaal van zowel het cytoplasma naar de kern (FITC-dextraan) als van de kern naar het cytoplasma (EYFP-NLS), moesten dus gekwantificeerd kunnen worden. Hiervoor werden de cellulaire en nucleaire signalen voor en na fotoporatie van de kernmembraan bepaald en de ratio van het cellulair op het nucleair signaal berekend (Figuur 4.1).



Figuur 4.1: Schematisch overzicht van kwantificatie van nucleaire en cellulaire fluorescentiesignalen ter berekening van de ratio van het cellulair op het nucleair signaal

Kwantificatie van het nucleair signaal was mogelijk door beeldanalyse van de cellen na kernkleuring. Aan de hand van de macro MeasureNuclearSignal, konden de celkernen gesegmenteerd worden. Vervolgens werd de intensiteit in de celkern gemeten in het kanaal met het fluorescentiesignaal van FITC-dextraan of EYFP-NLS.

Voor kwantificatie van het cellulair signaal was er geen cytoplasmatische fluorescente merker zoals voor de celkern. Voor elke gesegmenteerde celkern werd de daarbij horende cel manueel gesegmenteerd.

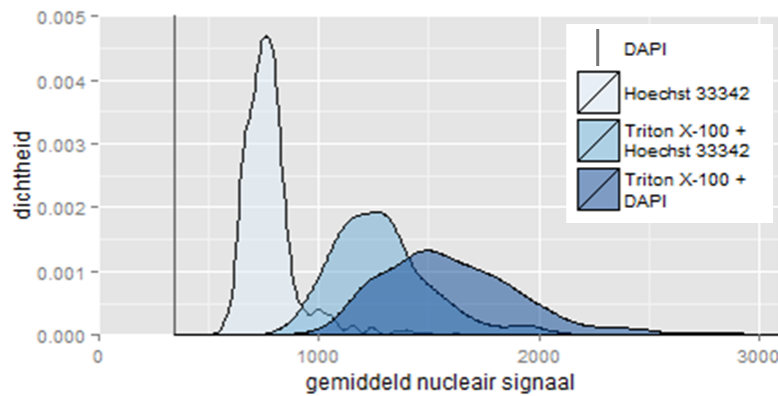
Hierna volgen de resultaten van vergelijking tussen verschillende methoden voor kernkleuring. Vervolgens worden de resultaten van optimalisatie van de gekozen methode gegeven.

4.1.1 Invloed van permeabilisatie na fixatie op kleuring met DAPI of Hoechst

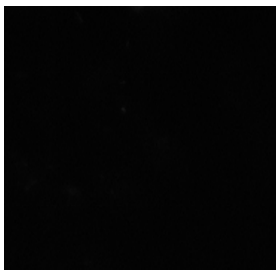
De macro MeasureNuclearSignal werd gebruikt voor nucleaire segmentatie en meting van het nucleair signaal voor verschillende methoden voor kernkleuring. De resultaten van de kwantificatie zijn weergegeven in Figuur 4.2. Voor de cellen gekleurd met DAPI zonder Triton X-100 was het signaal niet te onderscheiden van het achtergrondsignaal. Voor deze cellen was segmentatie niet mogelijk en werd het gemiddelde totale signaal weergegeven als een verticale lijn in Figuur 4.2.

Uit de dichtheidscurven en de beelden (Figuur 4.2) komt naar voor dat het mogelijk is om kernkleuring uit te voeren zonder vooraf te permeabiliseren, indien Hoechst 33342 gebruikt wordt in plaats van DAPI. De keuze voor een methode zonder permeabilisatie is van belang om te verhinderen dat het FITC-dextraan of EYFP-NLS na fotoporatie uit de cel lekt.

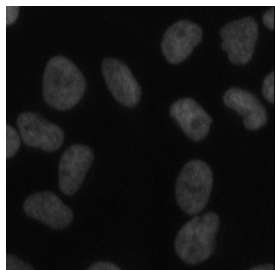
(a)



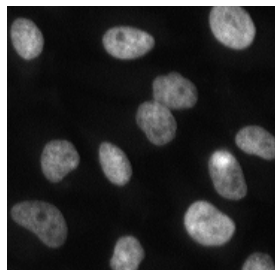
(b)



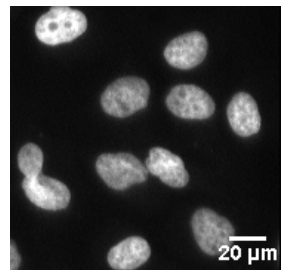
(c)



(d)



(e)

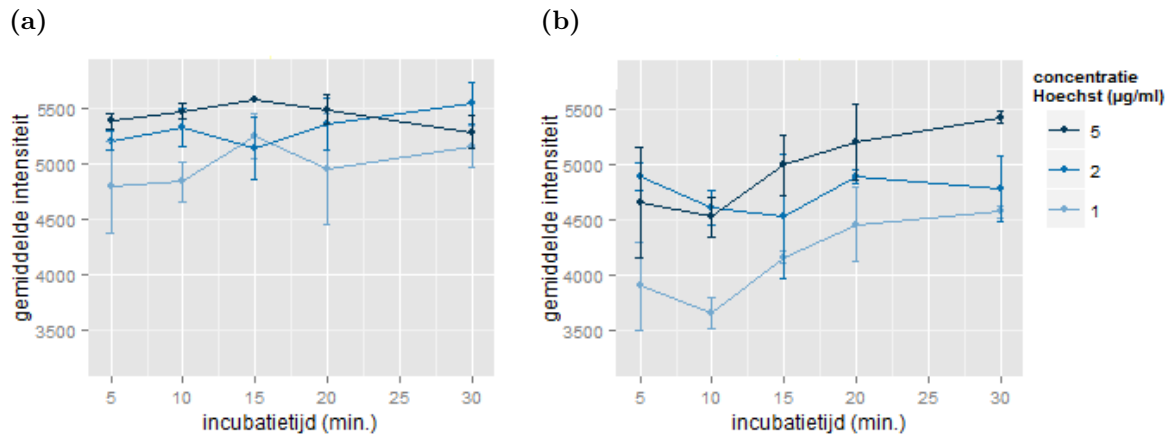


Figuur 4.2: (a) Dichtheidscurven voor gemiddeld nucleair signaal van gefixeerde HeLa cellen na kernkleuring. Beelden na kleuring met (b) DAPI zonder Triton X-100, (c) Hoechst zonder Triton X-100, (d) Hoechst met Triton X-100 en (e) DAPI met Triton X-100.

4.1.2 Optimalisatie van Hoechst-kleuring op levende cellen

Met de macro MeasureNuclearSignal werd de intensiteit in de kern gemeten na kleuring met Hoechst 33342. Omdat nucleaire segmentatie voor de stalen zonder Hoechst 33342 niet mogelijk was, werd voor deze stalen de gemiddelde intensiteit per beeld gemeten. Voor verschillende concentraties werden de gemeten intensiteiten uitgezet in functie van de incubatietijd (Figuur 4.3).

Voor de drie concentraties samen waren de standaardafwijkingen groter voor de kortste incubatieduur dan voor de langste. Uit tijdsoverwegingen werd echter voor de kortere incubatieduur van vijftien minuten gekozen. Bovendien zijn de fluorescentie-intensiteiten van Hoechst 33342 minder van belang, aangezien voor de fotoporatie-experimenten het signaal enkel diende tot segmentatie van de nucleus. In dezelfde logica werd geoordeeld dat een concentratie van 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ een voldoende sterk signaal opleverde voor dit doeleinde.



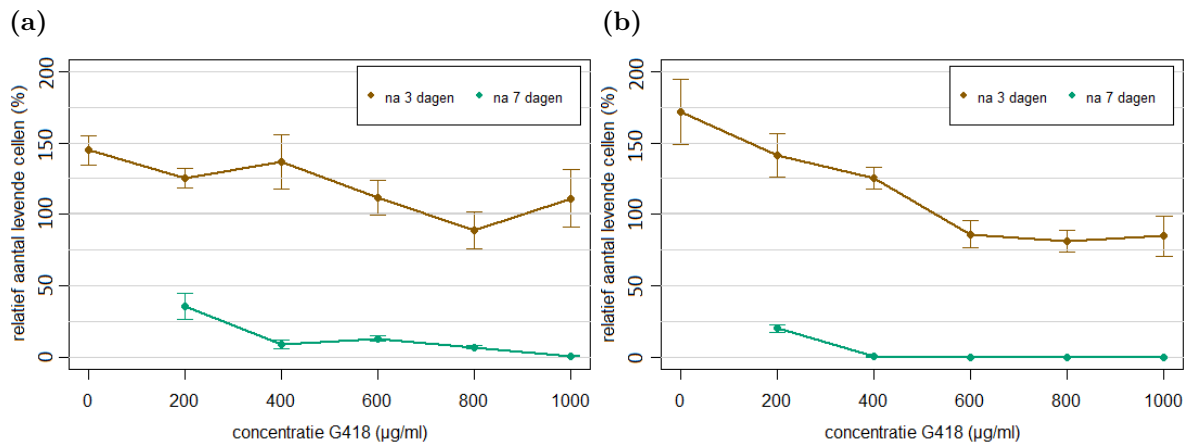
Figuur 4.3: Intensiteit nucleaire fluorescentie na Hoechst 33342 kleuring bij verschillende concentraties en incubatietijden voor (a) ECV-304 en (b) HeLa

4.2 Monoklonale, stabiel getransfecteerde cellijnen met nucleaire fluorescentie

4.2.1 Antibioticum afdodingscurve

De G418 afdodingscurven voor ECV-304 en HeLa zijn terug te vinden in Figuur 4.4. Het gemiddelde van het relatieve aantal cellen in twee wells werd uitgezet in functie van de concentratie antibioticum. De optimale concentratie Geneticine[®] werd bepaald als de laagste geteste concentratie waarbij alle cellen dood waren na zeven dagen selectie (Mirus Bio LLC, 2015a). Voor de gebruikte batch Geneticine[®] is dat 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ voor de ECV-304 cellen en 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ voor de HeLa cellen. Deze concentraties liggen binnen de standaardrange voor Geneticine[®] die gaat van 100 tot 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Life Technologies, 2015a; Mirus Bio LLC, 2015a).

Het is waarschijnlijk dat de laagste concentratie waarbij totale celdood optreedt na zeven dagen tussen 800 en 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ligt voor ECV-304 en tussen 200 en 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ voor HeLa. De optimale concentratie werd echter niet nauwkeuriger bepaald binnen deze intervallen.



Figuur 4.4: G418 afdodingscurven voor (a) ECV-304 en (b) HeLa. Aantallen zijn relatief ten opzichte van aantal uitgezette cellen. Aantallen na 7 dagen bij 0 $\mu\text{g/ml}$ Geneticine[®] zijn niet weergegeven om een meer leesbare grafiek te bekomen. Deze bedroegen $410 \pm 50\%$ voor ECV-304 en $730 \pm 95\%$ voor HeLa.

4.2.2 Isolatie van stabiel getransfekteerde klonen en expansie

Via ‘limiting dilution’ en ‘cloning discs’ werd er niet in geslaagd een stabiel getransfekteerde, fluorescente, monoklonale cellijn te bekomen. Het isoleren van cellen en de expansie ervan vormden op zich geen probleem. De moeilijkheid lag er daarentegen wel in om een fluorescente kloon of kolonie weten te isoleren. Om toch een monoklonale, fluorescente cellijn te kunnen genereren, werd overgeschakeld op FACS.

Een overzicht van de celaantallen op verschillende momenten na het ‘sorten’ via FACS, is terug te vinden in Tabel 4.1. Na twee weken hebben zich voor beide celtypes evenveel kolonies gevormd, hoewel voor HeLa drie keer zoveel wells werden gevuld als voor ECV-304 (Tabel 4.1).

Tabel 4.1: Overzicht per celttype en per getransfekteerd plasmide van evolutie in aantal cellen na ‘sorten’ via FACS

	aantal wells meteen na FACS	aantal kolonies na 14 dagen	aantal cellijnen na 36 dagen
HeLa mCherry-NLS	192	9	2
HeLa EYFP-NLS	192	2	0
ECV-304 mCherry-NLS	29	1	1
ECV-304 EYFP-NLS	96	10	6
totaal	509 wells	22 kolonies	9 cellijnen

4.2.3 Expressie-analyse van de stabiel getransfekteerde cellijnen

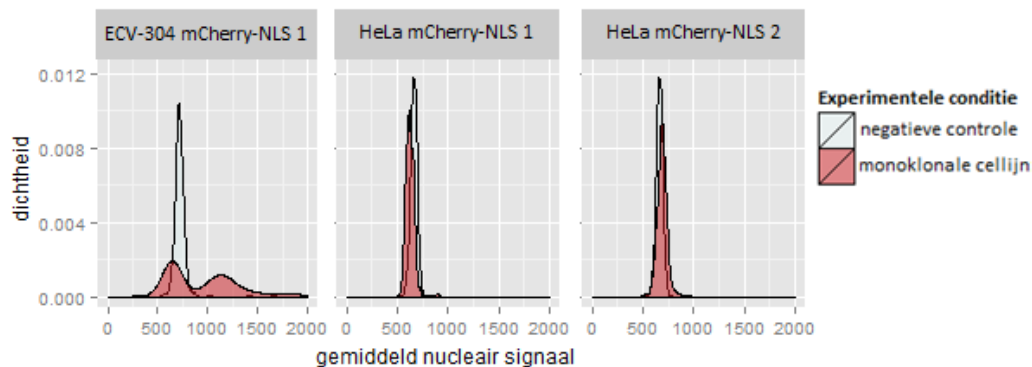
Op de via FACS bekomen stabiele cellijnen (Tabel 4.1) werd kernkleuring met Hoechst 33342 toegepast. Met de macro MeasureNuclearSignal, werd de fluorescentie in de kern voor EYFP-NLS of mCherry-NLS nagegaan.

Per monoklonale cellijn werden twee grafieken opgesteld (Figuur 4.6 en Figuur 4.5). De eerste gaf de dichtheidscurve voor de monoklonale cellijn weer, de tweede de dichtheidscurve voor de monoklonale cellijn in een 1:1 verhouding met de niet-getransfecteerde controle. Het doel hiervan was om het monoklonale, fluorescente karakter van de cellijn na te gaan. In geval de cellijn monoklonaal was, dan zou de eerste dichtheidscurve één piek vertonen en de tweede twee pieken. Voor beide cellypes werd ook de niet-getransfecteerde controle afzonderlijk uitgezet.

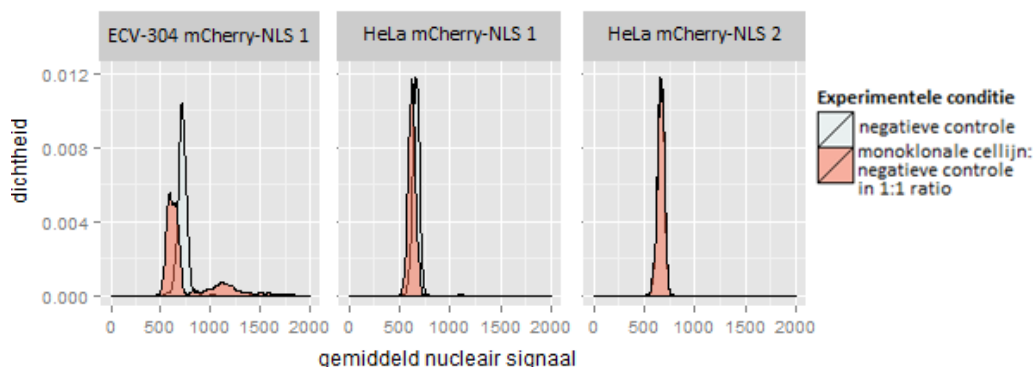
De data voor ECV-304 mCherry-NLS 1 vertonen een bimodale verdeling (Figuur 4.5). Het is waarschijnlijk dat het een biklonale cellijn betreft, met circa de helft van de cellen fluorescent en de andere helft niet-fluorescent. De cellijnen HeLa mCherry-NLS 1 en HeLa mCherry-NLS 2 werden niet weerhouden omwille van de volledige overlap van de dichtheidscurven met die van de negatieve controle (Figuur 4.5).

De cellijnen ECV-304 EYFP-NLS 3 en 4 werden niet weerhouden omwille van de grote overlap van de dichtheidscurven met die van de negatieve controle. Bij de weerhouden cellijnen ECV-304 EYFP-NLS 1, 2, 5 en 6 werden in Figuur 4.6a Figuur 4.6b respectievelijk uni- en bimodale verdelingen waargenomen.

(a) Monoklonale cellijnen

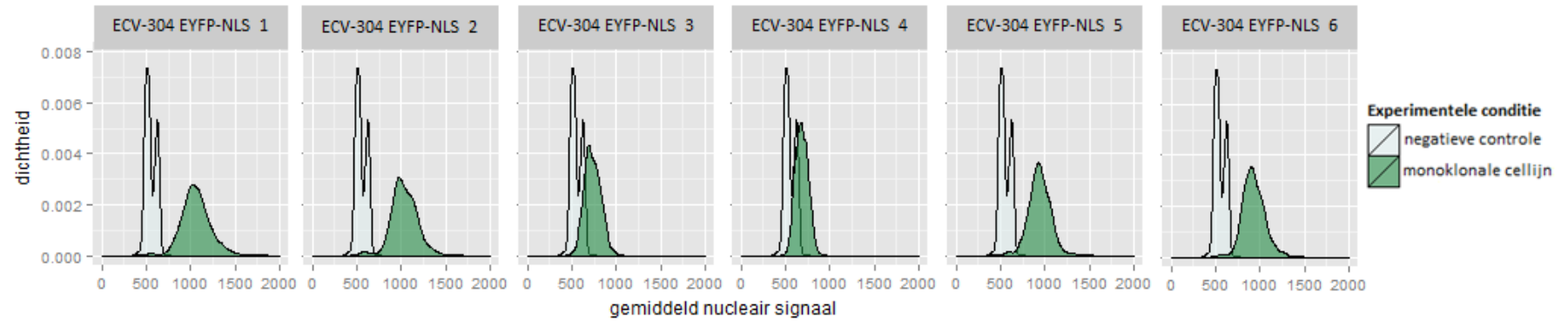


(b) Monoklonale cellijnen in een 1:1 verhouding met negatieve controle cellen

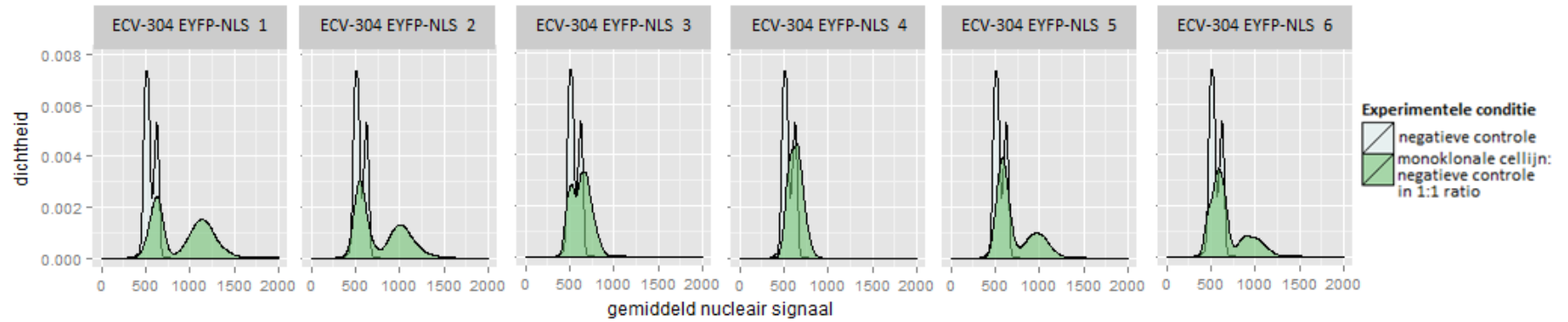


Figuur 4.5: Dichtheidscurven van fluorescentie-intensiteit mCherry-NLS voor monoklonale, stabiel getransfecteerde cellijnen

(a) Monoklonale cellijnen



(b) Monoklonale cellijnen in een 1:1 verhouding met negatieve controle cellen



Figuur 4.6: Dichtheidscurven van fluorescentie-intensiteit EYFP-NLS voor monoklonale, stabiel getransfecteerde cellijnen

4.3 Fotoporatie van de celmembraan

De resultaten in dit onderdeel zijn afkomstig van beelden van levende cellen. Zowel op HeLa- als ECV-304-cellen werd fotoporatie van de celmembraan toegepast met FITC-dextraan van verschillende moleculaire massa's.

Per molecule FITC-dextraan werd de dichtheidscurve opgesteld van het FITC-signaal in de kern. Hetzelfde werd gedaan voor het FITC-signaal in de cel. Ook voor de ratio van het signaal in de cel en dat in de nucleus, werd een dichtheidscurve opgesteld.

4.3.1 Fotoporatie celmembraan van HeLa-cellen met FD40, FD70 of FD150

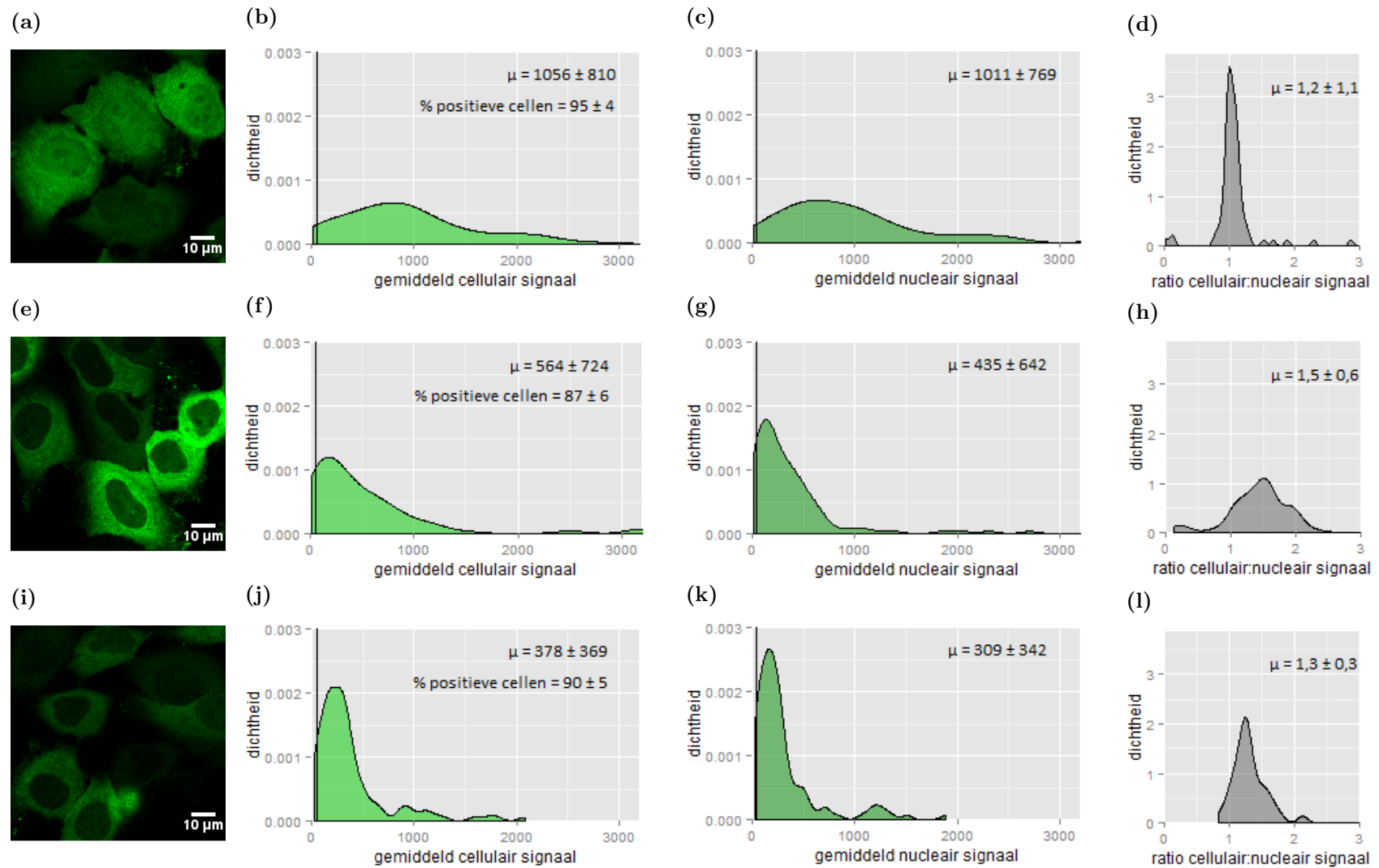
Uit een eerste experiment met HeLa-cellen werd afgeleid dat voor FITC-dextraan met een moleculair gewicht van 70 en 150 kDa (Figuur 4.7e-h en 4.7i-l) sterkere exclusie uit de nucleus plaatsvindt dan voor FITC-dextraan met een moleculair gewicht van 40 kDa (Figuur 4.7a-d). Voor FD40 kan op basis van de bekomen resultaten zelfs besloten worden dat er geen exclusie plaatsvindt. De dichtheidscurve voor het cellulair signaal is nagenoeg gelijk aan deze voor het nucleair signaal (Figuur 4.7a en 4.7b). Ook vertoont de dichtheidscurve van de ratio van beide signalen een piek bij waarde 1 (Figuur 4.7c).

Uit de dichtheidscurven voor het cellulair en het nucleair signaal (Figuur 4.7b en c, 4.7f en g en 4.7j en k) kan worden afgeleid dat het gemiddelde signaal alsook de spreiding afneemt met toenemende grootte van het FITC-dextraan. Dit terwijl het aantal positieve cellen voor de drie verschillende moleculen ongeveer gelijk blijft.

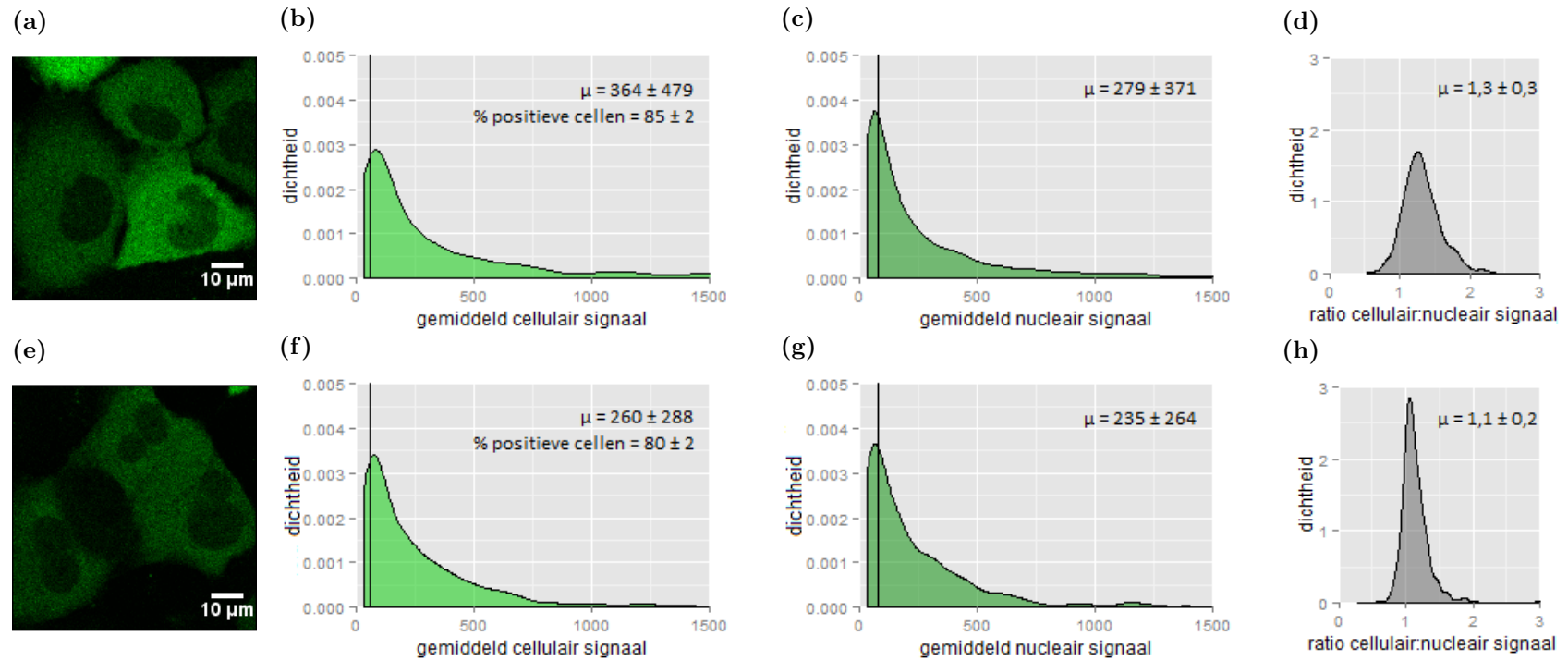
De dichtheidscurven voor de ratio van cellulair op nucleair signaal vertonen een gemiddelde ratio die hoger ligt voor FD70 dan voor FD150. Nochtans zou op basis van de grootte van de moleculen verwacht worden dat deze ratio lager ligt voor FD70 dan voor FD150, of dat ze gelijk zijn (bij even sterke exclusie uit de nucleus). De verklaring voor de gevonden ratio's ligt waarschijnlijk in de lagere cellulaire (en nucleaire) signalen voor FD150 dan voor FD70. De sensitiviteit van detectie is namelijk lager bij lagere signalen. Hierdoor liggen de gemeten cellulaire en nucleaire signalen voor FD150 minder ver uiteen en kan de gemeten ratio kleiner zijn dan de werkelijke.

4.3.2 Fotoporatie celmembraan van ECV-304-cellen met FD70 of FD150

Het experiment werd herhaald op ECV-304-cellen (Figuur 4.8) en de bevindingen voor FD70 en FD150 zijn gelijkaardig als deze voor de HeLa-cellen. FD40 werd niet meer meegenomen in dit experiment omdat bij de HeLa-cellen geen exclusie uit de nucleus kon worden vastgesteld, wat in overeenstemming was met de nucleaire exclusielimiet.



Figuur 4.7: Dichtheidscurven voor cellulair en nucleair signaal en ratio cellulair op nucleair signaal voor HeLa-cellen in FITC-kanaal na fotoprotatie van celmembraan met (a-d) FD40, (e-h) FD70, (i-l) FD150. Verticale lijnen duiden maximum intensiteit voor negatieve controle aan.



Figuur 4.8: Dichtheidscurven voor cellulair en nucleair signaal en ratio cellulair op nucleair signaal voor ECV-304-cellen in FITC-kanaal na fotoprotatie van celmembraan met (a-d) FD70, (e-h) FD150. Verticale lijnen duiden maximum intensiteit voor negatieve controle aan.

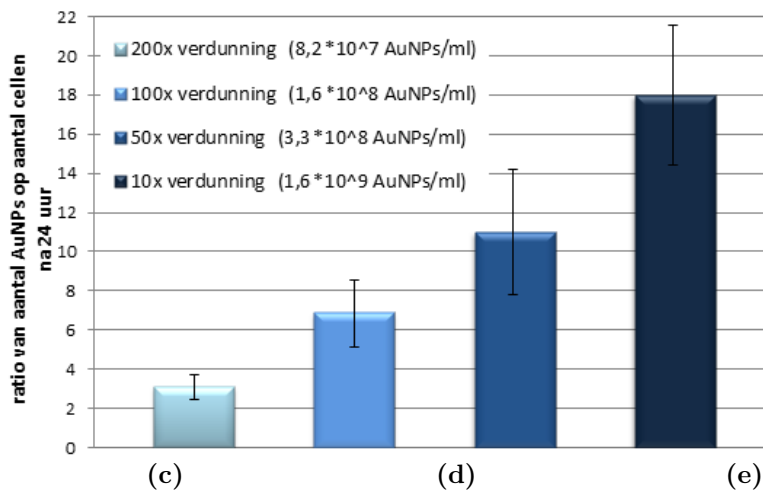
4.4 Endocytose van AuNP's tot bij de kernmembraan

4.4.1 Aantal geïnternaliseerde AuNP's na 24 uur endocytose

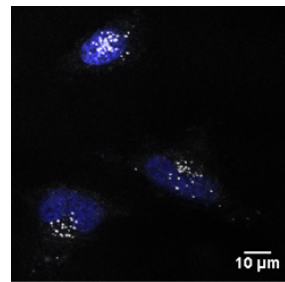
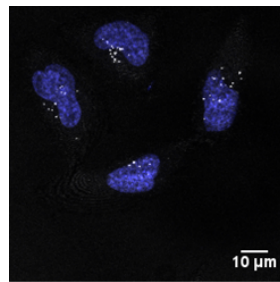
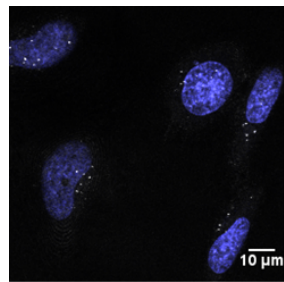
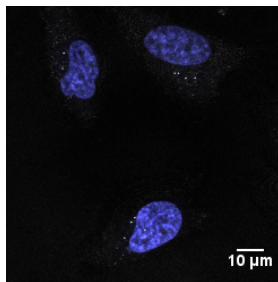
In een eerste experiment werd bij HeLa-cellen nagegaan of er een verband is tussen het aantal toegevoegde AuNP's en het aantal geïnternaliseerde AuNP's. AuNP's werden toegediend in vier concentraties. Detectie vond plaats na 24 uur. Per concentratie AuNP's werd de ratio van het aantal partikels op het aantal cellen weergegeven onder de vorm van een staafdiagram.

Er werd gevonden dat meer AuNP's geïnternaliseerd worden bij toenemende concentraties AuNP's (Figuur 4.9). Voor de drie laagste concentraties verdubbelt de ratio van het aantal AuNP's op het aantal cellen ongeveer met de concentratie. Voor de hoogste concentratie echter, ligt de ratio niet evenredig hoger.

(a)



(b)



Figuur 4.9: (a) Staafdiagram voor ratio van aantal geïnternaliseerde AuNP's op aantal cellen (per beeld) na 24 uur. Beelden van z-projecties van HeLa-cellen in TRITC en Hoechst kanaal voor (b) 200x, (c) 100x, (d) 50x en (e) 10x verdunning van AuNP stockoplossing.

Op basis van dit resultaat werd besloten om de 10x verdunning niet meer mee te nemen in volgende experimenten. Bij deze verdunning worden de AuNP's minder snel geïnternaliseerd en zou het kunnen dat er nog partikels aan de celmembraan geadsorbeerd zijn bij fotoporatie van de kernmembraan. Het FITC-dextraan dat in een eerste stap in het cytoplasma werd gebracht, zou dan weer uit de cel kunnen, in plaats van in de kern terecht te komen.

Een andere interessante vaststelling is dat, voor eenzelfde concentratie van toegevoegde partikels, het aantal geïnternaliseerde partikels na 24 uur verschilt van het aantal geadsorbeerde partikels na 30 minuten. Xiong et al. (2014) rapporteren gemiddeld acht geadsorbeerde partikels voor de 200x verdunning en vijftien partikels voor de 100x verdunning. Voor beide verdunningen ligt het gemiddelde aantal geïnternaliseerde partikels na 24 uur op slechts ongeveer de helft hiervan. Dit wijst erop dat er binnen dit tijdsinterval niet alleen endocytose, maar ook exocytose van de AuNP's kan plaatsvinden.

4.4.2 Afstand van AuNP's tot kernmembraan in functie van de tijd na toevoeging

In een tweede experiment werd bij ECV-304-cellen nagegaan op welke afstand tot de kernmembraan de AuNP's zich bevinden op verschillende tijdstippen na toevoeging. AuNP's werden toegediend in drie concentraties met detectie op zes verschillende tijdstippen na toevoeging van de AuNP's. Voor de beeldanalyse werd de macro Dist2Nuc gebruikt.

Reeds na één uur werden de meeste partikels in de buurt van de kernmembraan teruggevonden (Figuur 4.10). Om te weten of er een tijdstip was waarop de gemiddelde afstand tot de kernmembraan significant kleiner was dan op de andere tijdstippen, werd ANOVA gebruikt.

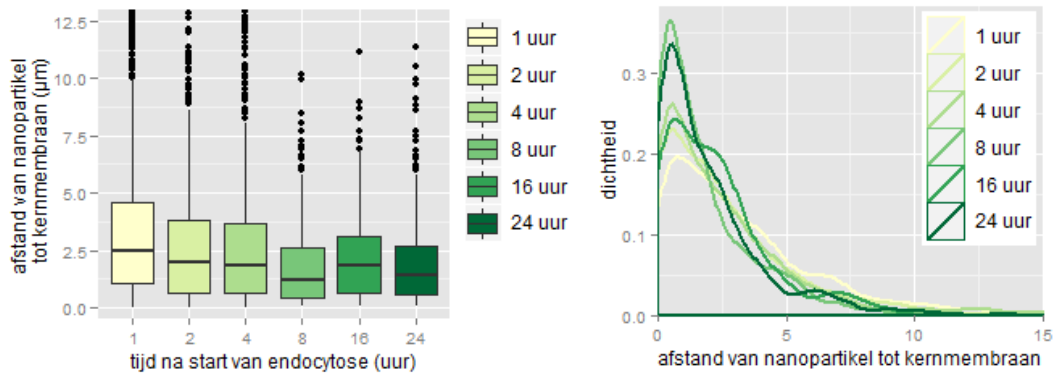
Aan de assumptie met betrekking tot homoscedasticiteit werd niet voldaan, waardoor Welch ANOVA toegepast werd. Er werd een significant verschil gevonden tussen de tijdstippen ($F(5,2574) = 35.685$, $p < 0.01$). Post-hoc Games-Howell analyse toonde aan dat, behalve voor de eerste twee en de laatste drie tijdstippen onderling, de gemiddelden voor alle paarsgewijze vergelijkingen verschilden (significantielevel 0.05). De gemiddelden bedroegen $3.38 \pm 3.43 \mu\text{m}$ na 1 uur, $3.23 \pm 4.19 \mu\text{m}$ na 2 uur, $2.8 \pm 3.21 \mu\text{m}$ na 4 uur, $2.17 \pm 2.68 \mu\text{m}$ na 8 uur, $2.48 \pm 2.17 \mu\text{m}$ na 16 uur en $2.32 \pm 2.41 \mu\text{m}$ na 24 uur.

Doordat de resultaten zijn weergegeven als dichtheidscurven (Figuur 4.10), zijn deze genormaliseerd naar het aantal AuNP's dat werd opgenomen. Echter, bij weergave van de resultaten onder de vorm van histogrammen (data niet weergegeven), werd duidelijk dat het aantal AuNP's voor eenzelfde verdunning afnam met de tijd. Van 1 tot 4 uur na het begin van endocytose bleef het aantal AuNP's grofweg constant. Vervolgens werd een sterke afname genoteerd tussen 4 en 8 uur na het begin van endocytose. Hierna was de afname in aantal AuNP's minder sterk. Net zoals bij de HeLa-cellen (Figuur 4.9) lag het aantal AuNP's na 24 uur nog slechts op ongeveer de helft van het aantal na 1 uur endocytose.

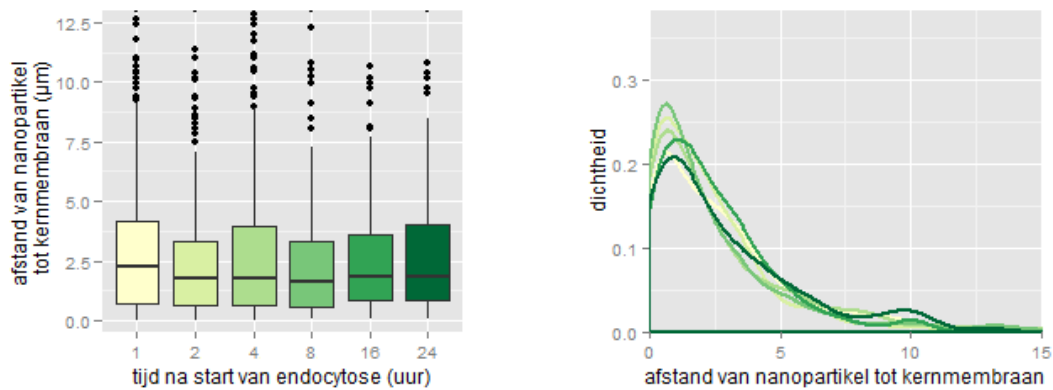
Met dit gegeven van exocytose moet rekening worden gehouden bij de keuze voor het optimale tijdstip voor fotoporatie van de kernmembraan. Uit ANOVA volgt dat 8 uur het optimale tijdstip is omdat dan de gemiddelde afstand tot de kernmembraan het kleinst is. Echter, vanaf 4 uur is er een toename in het aantal partikels dat zich weg van de kernmembraan en richting de celmembraan begeeft. Het is duidelijk dat niet het gewenste effect bereikt zal worden wanneer VNBs gevormd worden ter hoogte van AuNP's die zich niet langer ter hoogte van de kernmembraan bevinden.

Voor de keuze voor de geschikte concentratie AuNP's werd een afweging gemaakt tussen twee elementen. Enerzijds is een voldoende hoog aantal partikels nodig om een meetbaar effect te bekomen, anderzijds mag het aantal niet te hoog liggen om celtoxiciteit zoveel mogelijk te beperken. Er werd beslist om de 100x verdunning ($1,6 \times 10^8$ AuNP's/ml) te gebruiken voor fotoporatie van de kernmembranen.

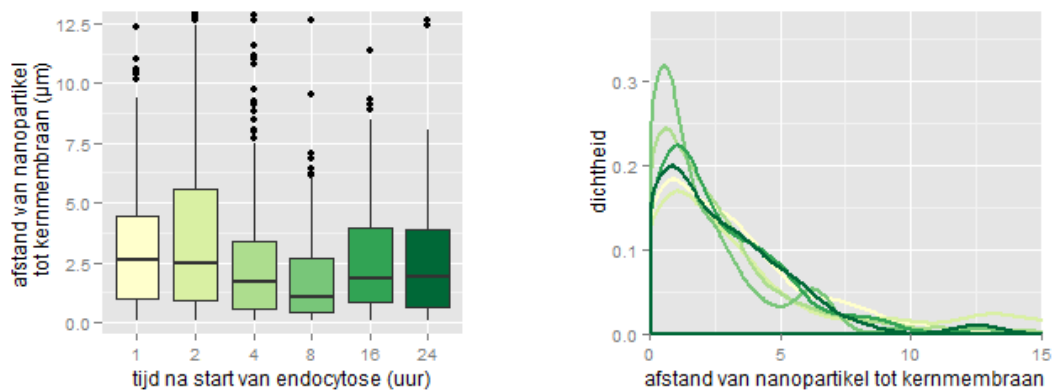
(a) 50x AuNP verdunning ($3,3 \times 10^8$ AuNP's/ml)



(b) 100x AuNP verdunning ($1,6 \times 10^8$ AuNP's/ml)



(c) 200x AuNP verdunning ($8,2 \times 10^7$ AuNP's/ml)



Figuur 4.10: Dichtheidscurven en boxplots voor afstand van AuNP's tot kernmembranen op verschillende tijdstippen na toevoeging van AuNP's aan ECV-304-cellen

4.5 Fotoporatie van de kernmembraan

Zowel op HeLa- als ECV-304-cellen werd fotoporatie van de kernmembraan toegepast na voorafgaande fotoporatie van de celmembraan met FITC-dextraan. Ook werd fotoporatie van de kernmembraan toegepast op cellen met expressie van EYFP-NLS. Voor de experimenten met FITC-dextraan zijn de resultaten afkomstig van beelden van levende cellen, voor EYFP-NLS van beelden van gefixeerde cellen. Fixatie vond plaats 15 minuten na fotoporatie. Er werd voor fotoporatie van de kernmembraan telkens gewerkt met de 100x AuNP verdunning ($1,6 \times 10^8$ AuNP's/ml).

Voor zowel voor als na fotoporatie van de kernmembraan, werden de dichtheidscurven opgesteld van het cellulair en nucleair fluorescentiesignaal en van de ratio van beide.

4.5.1 Fotoporatie kernmembraan van ECV-304-cellen met FD70 of FD150

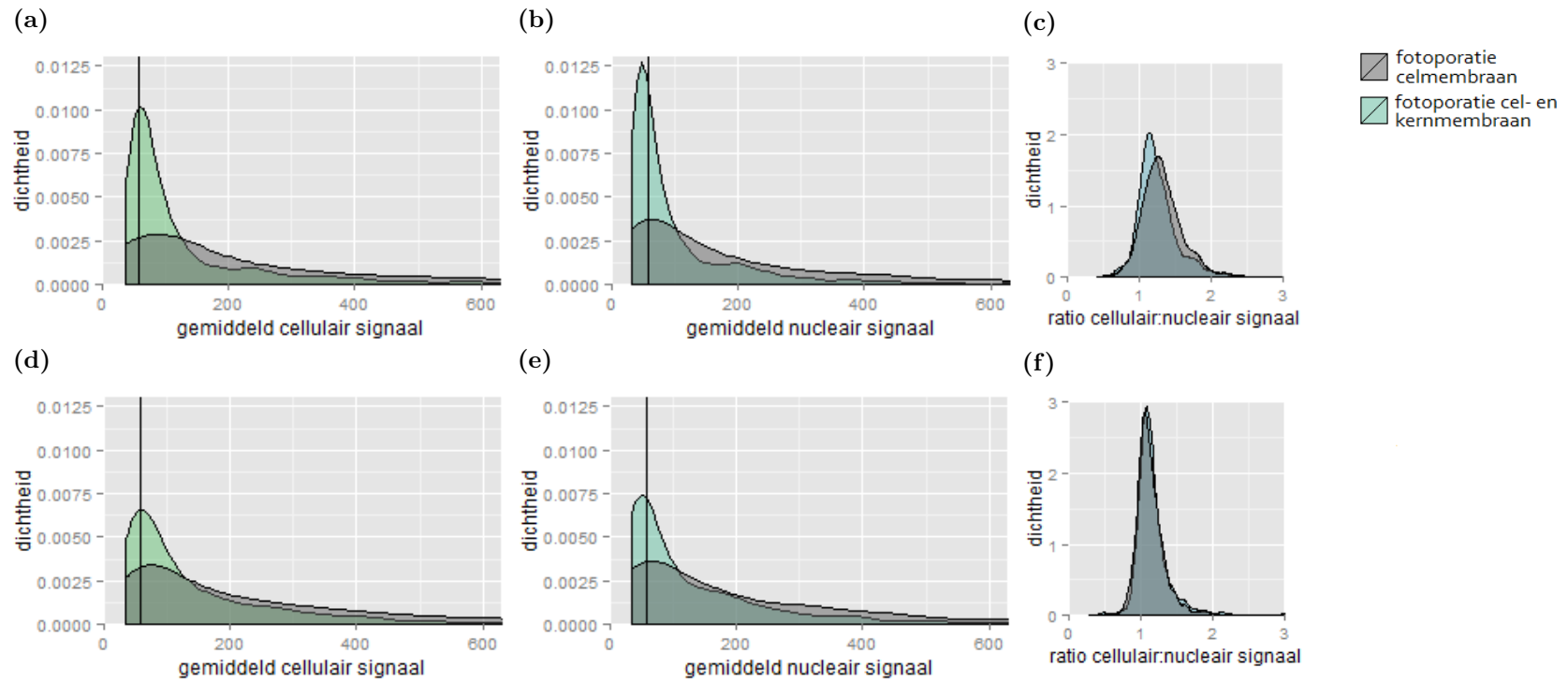
In een eerste experiment vond na 8 uur endocytose van de AuNP's fotoporatie van de kernmembraan plaats op cellen met FD70 of FD150 bij een gemiddelde pulsenergie van $120 \mu\text{J}$. Uit Figuur 4.11 wordt duidelijk dat voor zowel FD70 als FD150 de cellulaire en nucleaire signalen sterk achteruitgaan bij fotoporatie van de kernmembraan. Er wordt gedacht dat het tijdstip waarop fotoporatie plaatvond niet geschikt was. Mogelijk bevond een deel van de geïnternaliseerde AuNP's zich ter hoogte van de celmembraan en niet nabij de kernmembraan, waardoor het FITC-dextraan uit de cel kon.

4.5.2 Fotoporatie kernmembraan van HeLa-cellen met FD70

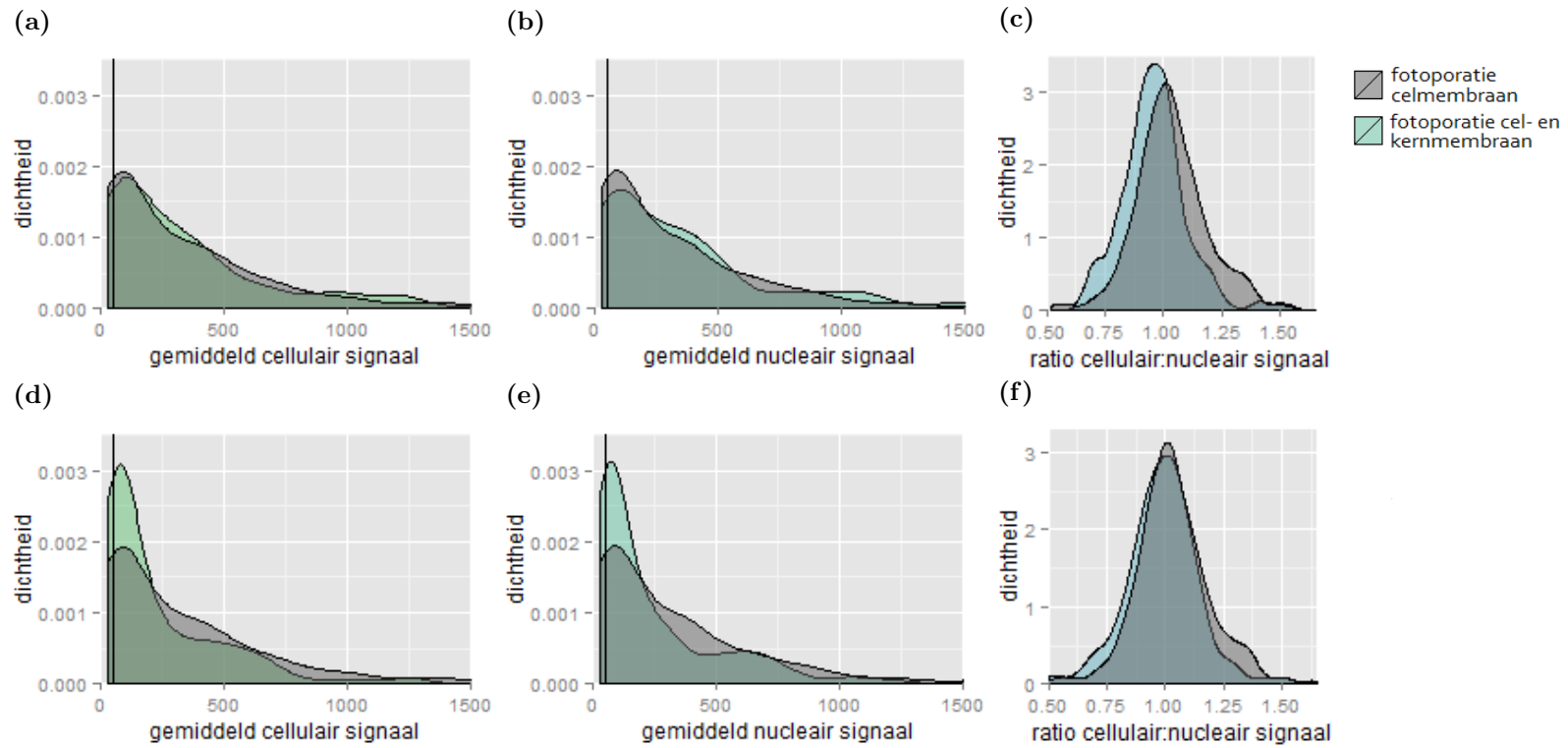
In een tweede experiment vond na 4 uur endocytose van de AuNP's fotoporatie van de kernmembraan plaats op cellen met FD70. De gemiddelde pulsenergie lag op 120, 240 of $480 \mu\text{J}$. Voor de hoogste pulsenergie waren geen intensiteitsmetingen mogelijk omwille van de sterke celdood die optrad. Uit Figuur 4.12 wordt afgeleid dat voor een gemiddelde pulsenergie van $240 \mu\text{J}$ de cellulaire en nucleaire signalen opnieuw achteruitgaan. Bij een gemiddelde pulsenergie van $120 \mu\text{J}$ blijven de intracellulaire signalen stabiel. Er werd bovendien een bescheiden daling in de ratio van het cellulair op het nucleair signaal gevonden van $1,03 \pm 0,16$ naar $0,96 \pm 0,14$.

4.5.3 Fotoporatie kernmembraan van HeLa-cellen met FD70 of EYFP-NLS

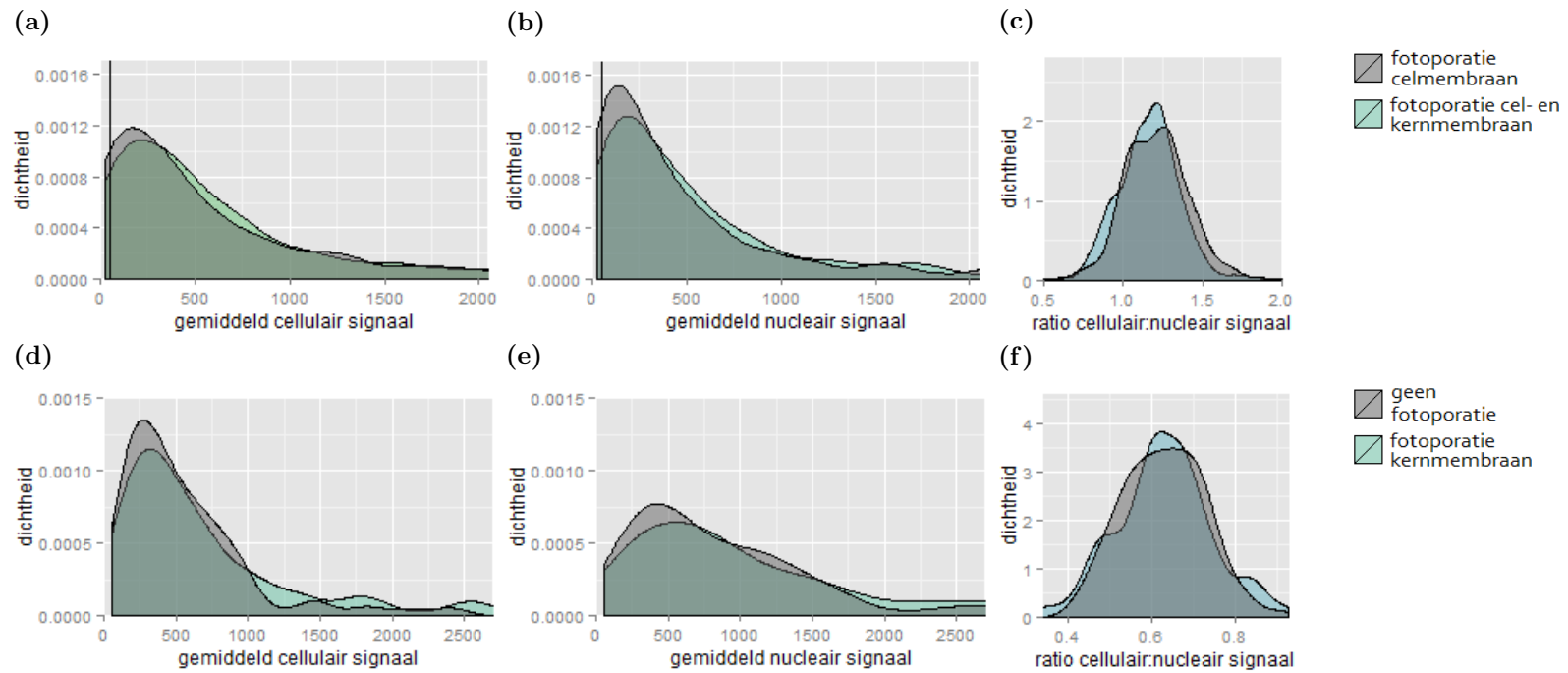
Het experiment van fotoporatie van de kernmembraan na 4 uur endocytose van de AuNP's op cellen met FD70, bij een gemiddelde pulsenergie van $120 \mu\text{J}$, werd herhaald. Onder dezelfde condities werd ook fotoporatie van de kernmembraan toegepast op HeLa-cellen, 48 uur van tevoren getransfecteerd met pEYFP-NLS. Uit de resultaten voor FD70 (Figuur 4.13) kan opnieuw een bescheiden daling in ratio van cellulair op nucleair signaal van $1,21 \pm 0,20$ naar $1,17 \pm 0,20$ worden vastgesteld. Voor de cellen met EYFP-NLS blijft de ratio onveranderd, met een gemiddelde waarde van $0,63 \pm 0,09$ voor fotoporatie en $0,63 \pm 0,12$ na fotoporatie. Wel werd een toename vastgesteld in het aantal cellen met een ratio hoger dan 0,8. Dit aantal nam toe van $4 \pm 3 \%$ naar $8 \pm 4 \%$.



Figuur 4.11: Dichtheidscurven voor cellulair en nucleair signaal en ratio cellulair op nucleair signaal voor ECV-304-cellen in FITC-kanaal na fotoporatie van de celmembraan met (a-c) FD70 en (d-f) FD150, en fotoporatie van de kernmembraan met $120 \mu\text{J}$ als gemiddelde pulsenergie. Fotoporatie van de kernmembraan vond plaats 8 uur na toevoeging van de AuNP's. Verticale lijnen duiden maximum intensiteit voor negatieve controles aan.



Figuur 4.12: Dichtheidscurven voor cellulair en nucleair signaal en ratio cellulair op nucleair signaal voor HeLa-cellen in FITC-kanaal na fotoporatie van de celmembraan met FD70 en fotoporatie van de kernmembraan met (a-c) 120 μJ en (d-f) 240 μJ als gemiddelde pulsenergie. Fotoporatie van de kernmembraan vond plaats 4 uur na toevoeging van de AuNP's. Verticale lijnen duiden maximum intensiteit voor negatieve controles aan.

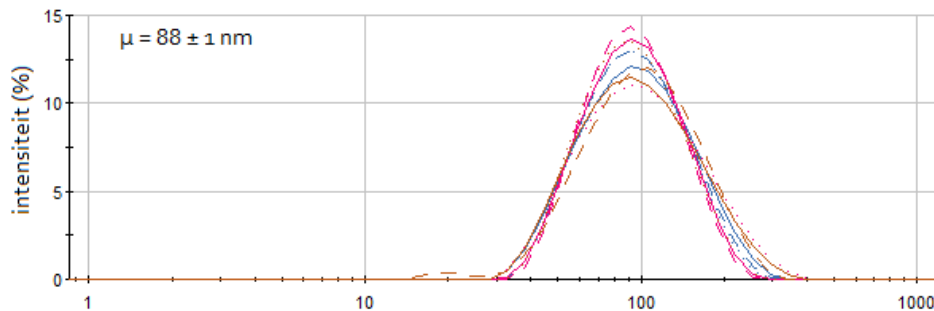


Figuur 4.13: Dichtheidscurven voor cellulair en nucleair signaal en ratio cellulair op nucleair signaal in FITC-kanaal na fotoporatie van de kernmembraan met $120 \mu\text{J}$ als gemiddelde pulsenergie (a-c) voor HeLa-cellen met FD70 en (d-f) voor HeLa-cellen met EYFP-NLS. Fotoporatie van de kernmembraan vond plaats 4 uur na toevoeging van de AuNP's. Verticale lijnen duiden maximum intensiteit voor negatieve controles aan.

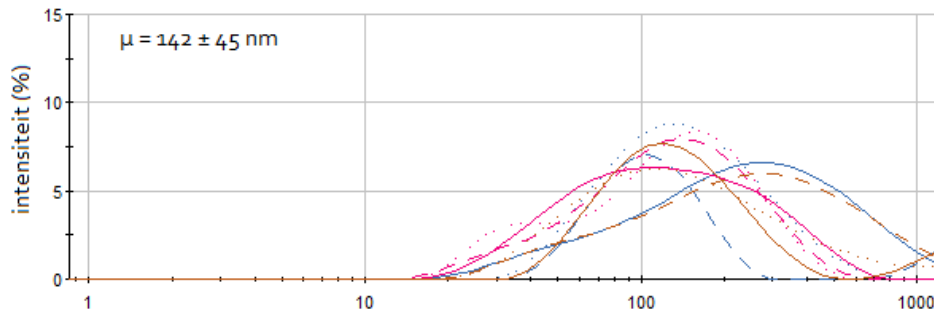
4.6 AuNP's na fotoporatie

Uit Figuur 4.14 wordt afgeleid dat de gemiddelde diameter van de partikels groter is dan de 70 nm die op de datasheet van de AuNP's (Bijlage A) staat weergegeven. Ook kon worden vastgesteld dat de groottedistributie breder werd na fotoporatie van de AuNP's. Zowel grotere als kleinere partikels worden gevormd, wat wijst op aggregatie en fragmentatie van de AuNP's. Bij twee keer fotoporatie werden bijkomend pieken vastgesteld bij diameters kleiner dan 20 nm. Voor de meeste partikels bleef de diameter bij fotoporatie evenwel onveranderd.

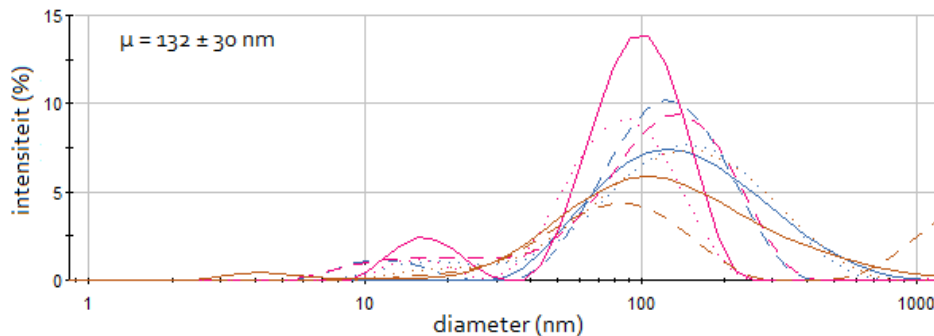
(a) AuNP's zonder fotoporatie



(b) AuNP's na één keer fotoporatie



(c) AuNP's na twee keer fotoporatie



Figuur 4.14: Groottedistributie van AuNP's zonder fotoporatie, na één en na twee keer fotoporatie. Drie kleuren geven verschillende stalen aan. Drie lijntypes van eenzelfde kleur geven verschillende metingen van eenzelfde staal aan. Standaarddeviaties zijn van gemiddelden van negen metingen voor één conditie.

5 Discussie

In deze thesis werd een eerste stap gezet naar gerichte fotoporatie van de kernmembraan. Om de efficiëntie van de fotoporatie te kwantificeren, werd een microscopische methode op punt gesteld, gebaseerd op bepaling van de ratio van cellulair op nucleair fluorescentiesignaal. Twee fluorescente merkers werden hiervoor aangewend: (1) fluorescent dextraan dat via een eerste fotoporatie in het cytoplasma werd gebracht, en (2) een stabiele EYFP-NLS reporter-celijn. Om nucleaire fotoporatie na spontane opname van goudpartikels te realiseren, werd het tijdstip gezocht, waarop de partikels zich het dichtst bij de kern bevonden. Fotoporatie op dit tijdstip leidde echter niet tot aanzienlijke verschuivingen in de ratio van het cellulair op het nucleair signaal.

Hieronder worden de belangrijkste resultaten van dit werk besproken, samen met enkele kritische bedenkingen en perspectieven voor verder onderzoek.

5.1 Monoklonale, stabiele cellijnen met nucleaire fluorescentie zijn tot stand gebracht

5.1.1 FACS is een efficiënte techniek om getransfecteerde klonen te isoleren

Via FACS werd erin geslaagd om stabiele cellijnen te bekomen. De kansen op slagen liggen vele malen hoger bij FACS dan bij bijvoorbeeld ‘limiting dilution’. De verklaring hiervoor is op zijn minst tweeledig.

Ten eerste kan na het sorteren via FACS met hoge zekerheid gesteld worden dat elke well van een 96-well plaat één cel bevat. Bij ‘limiting dilution’ daarentegen bevatte slechts twee derde van de wells van een 96-well plaat gemiddeld minder dan één cel per well.

Ten tweede worden via FACS enkel fluorescente cellen in de wells gebracht, terwijl de cellen in de wells bij ‘limiting dilution’ ook voor een deel uit niet-fluorescente cellen bestaan. Na twee weken antibioticumselectie, lag het aantal fluorescente cellen in de polyklonale, getransfecteerde cellijnen voor zowel HeLa als ECV-304 overigens nog slechts op circa 10 % (dr. Filip Matthijssens, persoonlijke communicatie, 12 mei 2015).

Een bijkomende factor die in het nadeel kan spelen van ‘limiting dilution’, is de langere tijd die nodig was om een 96-well plaat te vullen. Voor ‘limiting dilution’ bevonden de cellen zich circa dertig minuten bij kamertemperatuur zonder CO₂-voorziening, terwijl deze tijd voor FACS minder dan vijf minuten bedroeg. Bovendien werden 96-well platen bij ‘limiting dilution’ na 24 uur visueel gecontroleerd op de aanwezigheid van één cel, terwijl de 96-well platen bij FACS niet uit de incubator moesten worden gehaald om dit na te gaan.

5.1.2 Klonale expansie eenvoudiger voor ECV-304-cellen dan HeLa-cellen

Na expansie van de via FACS geselecteerde klonen, werden negen cellijnen bekomen: twee HeLa-celijn en zeven ECV-304-celijn. Nochtans waren er na FACS'en drie keer zoveel wells met HeLa-cellen als met ECV-304-cellen.

Dit resultaat doet vermoeden dat ECV-304-cellen een hogere viabiliteit hebben dan HeLa-cellen na isolatie van een stabiel getransfecteerde kloon. Een andere mogelijkheid is dat voor de HeLa-cellen de criteria voor het sorteren strenger waren (i.e. dat zij over het algemeen een lagere expressie vertoonden), met als gevolg dat cellen met een hoog en na verloop van tijd letaal expressieniveau voor mCherry-NLS of EYFP-NLS geselecteerd werden. Algemeen is het wijs om bij sorteren cellen met niet de hoogste en/of minstens twee fracties van signaalsterkte te sorteren.

5.1.3 Monoklonaal, fluorescent karakter van de stabiele cellijnen

Uit de negen cellijnen werden vier monoklonale ECV-304-cellijnen met EYFP-NLS bekomen. Er werd ook één ECV-304-celijn met mCherry-NLS bekomen, die echter niet monoklonaal was. Hoewel de cellen vlak voor het sorteren door een ‘cell strainer’ gestuurd werden, zouden er dan toch twee cellen in een well terechtgekomen zijn in plaats van één. Bij het bepalen van de geschikte instellingen voor het sorteren, werd op basis van het verstrooide licht al vastgesteld dat de ECV-304-cellen meer doubletten bevatten dan de HeLa-cellen (dr. Filip Matthijssens, persoonlijke communicatie, 12 mei 2015).

Een cellijn werd als monoklonaal beschouwd als de nucleaire intensiteit een unimodale verdeling vertoonde. Als extra bevestiging van het monoklonale karakter, werd gecontroleerd of bij vermenging met niet-getransfecteerde cellen in een 1:1 verhouding, een bimodale verdeling werd waargenomen. Voor de vier monoklonale ECV-304-cellijnen was dit inderdaad het geval.

5.2 Methode voor kwantificatie van efficiëntie van nucleaire fotoporatie is ontwikkeld

5.2.1 Nucleaire exclusie is afhankelijk van de grootte van het FITC-dextraan

Exclusie uit de nucleus werd waargenomen voor FD70 en FD150, maar niet voor FD40. Deze bevinding is in overeenstemming met het gegeven dat moleculen tot ongeveer 50 à 60 kDa vrij kunnen diffunderen langs de NPC's (Lodish et al., 2008; Meyers, 2012; Schirmer & de las Heras, 2014). Deze bovengrens in moleculair gewicht komt overeen met een molecule met een diameter van 9 à 10 nm (Alberts et al., 2002; Naim et al., 2007). Ook dit is in overeenstemming met de geschatte diameter van 9 nm voor FD40 (Ciani et al., 2005).

Een bemerking die hier gemaakt moet worden, is dat niet voor alle celtypes de nucleaire exclusielimiet gelijk is (Wang & Brattain, 2007). Overigens ook voor cellen van eenzelfde celtype kan de diameter van de NPC's variëren, bijvoorbeeld onder invloed van bepaalde groeifactoren (Newmeyer, 2012).

Overigens konden bij FD70 en FD150 ook cellen gedetecteerd worden waarbij geen nucleaire exclusie optrad. De relatieve aantallen van deze cellen konden oplopen tot circa 30 %. Dit kan te wijten zijn aan bijvoorbeeld cellen in mitose of apoptose. Ook is het mogelijk dat er in deze cellen ontkoppeling van het FITC en het dextraan plaatsvond. Het FITC kan dan via

passieve diffusie in de kern terechtkomen. Eventueel is het ook mogelijk dat door fotoporatie van de celmembraan beschadiging van de kernmembraan is opgetreden.

5.2.2 De spreiding van het signaal is afhankelijk van de grootte van het FITC-dextraan

Bij vergelijking van de cellulaire en nucleaire signalen voor verschillende moleculen FITC-dextraan, werd vastgesteld dat het gemiddelde signaal alsook de spreiding afnam met toenemende grootte van het FITC-dextraan.

Een mogelijke verklaring kan een verschil zijn in de dichtheid waarmee de dextraanmoleculen gelabeld zijn met FITC. Weliswaar ligt deze voor de drie moleculen binnen een interval van 0,003 tot 0,020 mol FITC per mol glucose (Sigma-Aldrich, 1997), het betreft toch een ruim interval (verschil van factor 7 tussen boven- en ondergrens).

Een tweede verklaring is dat voor grotere moleculen FITC-dextraan, er minder moleculen in het cytoplasma worden opgenomen bij fotoporatie van de celmembraan. De exacte diameter van de VNBs gevormd bij fotoporatie is niet gekend. Deze hangt af van de parameters van zowel de AuNP's als de laser en kan variëren van 50 nm tot 1 μm (Lapotko, 2009; Xiong et al., 2014). Hoewel dus zelfs voor de kleinste diameter van 50 nm het FITC-dextraan in het cytoplasma kan worden opgenomen (FD150 heeft een geschatte diameter van 16 nm), varieert het aantal opgenomen moleculen waarschijnlijk naargelang de grootte van de molecule FITC-dextraan.

Ook voor eenzelfde grootte van FITC-dextraan, kon het cellulair FITC-signaal sterk verschillen van cel tot cel. Deze variaties kunnen verklaard worden door twee factoren. Ten eerste is er de pulsenergie van de laser, die tijdens fotoporatie tot 10 % kon afwijken van de gemiddelde pulsenergie. Hierdoor werden VNBs van uiteenlopende diameters gevormd. Ten tweede is er het aantal AuNP's dat aan de celmembraan geadsorbeerd was, dat gemiddeld 8 ± 6 AuNP's per cel bedroeg (Xiong et al., 2014). Hierdoor varieerde ook het aantal VNBs dat werd gevormd. Voor kleinere moleculen FITC-dextraan leidden deze twee factoren waarschijnlijk tot grotere variaties in influx in het cytoplasma dan voor grotere moleculen FITC-dextraan.

5.2.3 AuNP's worden spontaan opgenomen en accumuleren perinucleair

Aantal geïnternaliseerde AuNP's varieert met de concentratie en de tijd

Er werd gevonden dat het aantal geïnternaliseerde AuNP's recht evenredig toenam met de concentratie toegevoegde AuNP's voor concentraties lager dan $1,6 \times 10^9$ AuNP's/ml. Voor deze concentratie lag het aantal geïnternaliseerde partikels niet evenredig hoger.

Zhang et al. (2009) onderzochten de opname van NP's via endocytose en vonden dat deze opname afhing van de concentratie NP's geadsorbeerd aan de celmembraan. Bij lage concentraties vonden zij dat er een overmaat aan vrije receptoren is ter hoogte van het celmembraan. Er bestaat dan een lineair verband tussen de concentratie NP's aan het celoppervlak en het

aantal opgenomen NP's. Naarmate de concentratie NP's aan het celoppervlak blijft toenemen, neemt ook de competitie tussen de NP's voor de receptoren toe. Dit leidt uiteindelijk tot een verminderde toename in opnamesnelheid van NP's door de cel.

Het maximale aantal NP's dat door een cel kan worden opgenomen kan trouwens oplopen tot enkele duizenden (Cruje et al., 2014) en werd in de experimenten voor deze thesis verre van bereikt. Met het oog op het uitlokken van nucleaire rupturen via fotoporatie is het doel echter een minimale hoeveelheid nanopartikels nabij de kern te brengen om zo getrouw mogelijk de lokale disrupties na te bootsen. Hiervoor zou één partikel voldoende moeten zijn. Dit zou nauwkeurige titratie van de partikels vereisen alsook een minutieuze optimalisatie van de condities.

Ook werd gevonden dat het aantal geïnternaliseerde partikels afnam met de tijd. Er is een vermoeden dat er binnen het onderzochte tijdsinterval van 24 uur niet alleen endocytose, maar ook exocytose van de AuNP's kan plaatsvinden. De mogelijkheid tot exocytose van AuNP's wordt bevestigd door Chithrani & Chan (2007) en door Cruje et al. (2014).

Afstand van de AuNP's tot de kernmembraan is minimaal na 8 uur

De afstand tot de kernmembraan varieerde in functie van de duur van endocytose. Reeds na één uur konden veel AuNP's in de nabijheid van de kern worden gedetecteerd, als een gevolg van het proces van endocytose. Via ANOVA werd gevonden dat de gemiddelde afstand tot de kernmembraan minimaal was 8 uur na toevoeging van de AuNP's.

Perinucleaire accumulatie van AuNP's werd reeds eerder vastgesteld. Volgens verschillende bronnen bevinden de AuNP's zich hierbij in lysosomen (Shukla et al., 2005; Sandin et al., 2012). Een kritische bedenking hierbij is dat het voorkomen van de AuNP's in lysosomen een extra membraanbarrière betekent en fotoporatie van de kernmembraan kan bemoeilijken.

De intracellulaire 'trafficking' van NP's berust op een proces waarin het cytoskelet centraal staat. Als eerste polymeriseren de actinefilamenten, wat zorgt voor de instulping van de celmembraan ter hoogte van een NP en de vorming van een vesikel. Myosine, een met actine geassocieerd motorproteïne, zorgt vervolgens voor het transport van het gevormde vesikel naar de vroege endosomen. Via de microtubuli vindt dan fusie van de vesikels met de endosomen en verder transport plaats. Hierin wordt dyneïne genoemd als motorproteïne die instaat voor het gerichte transport richting de celkern. Het resultaat is uiteindelijk dat de NP's perinucleair accumuleren, tegen de diffusiegradiënt in (Panariti et al., 2012).

5.2.4 Fotoporatie kernmembraan na spontane internalisatie van AuNP's geeft bescheiden verschuiving in ratio van cellulair op nucleair signaal

AuNP's worden beïnvloed door fotoporatie

Het was voor fotoporatie van de kernmembraan niet mogelijk om de AuNP's die gebruikt werden voor fotoporatie van de celmembraan met FITC-dextraan nog een keer te gebruiken. Xiong et al. (2014) pasten meerdere opeenvolgende laserbehandelingen toe bij fotoporatie van

de celmembraan en vonden dat dit niet leidde tot een toename in ‘delivery’ in het cytoplasma. Een mogelijke verklaring is dat de partikels na generatie van VNBs niet langer geadsorbeerd zijn aan de celmembraan. Bij de wasstap na fotoporatie, waarbij het extracellulaire FITC-dextraan afgenomen wordt, worden dan ook AuNP’s afgenomen.

Ook werd gevonden dat door laserbehandeling aggregatie en fragmentatie optreedt van de AuNP’s. Bij dezelfde lasercondities, leiden de kleinere en grotere AuNP’s die werden gevormd dan mogelijk niet meer tot de generatie van VNBs. Voor kleinere of grotere AuNP’s ligt het SPR absorptiemaximum namelijk bij respectievelijk lagere en hogere golflengtes (Sigma-Aldrich, 2015). Dus ook indien er na fotoporatie van de celmembraan nog AuNP’s aan de celmembraan geadsorbeerd zijn, zal een deel hiervan geen aanleiding meer geven tot de generatie van VNBs.

Verschuiving in de ratio van cellulair op nucleair signaal

Voor cellen met FD70 waarbij fotoporatie van de kernmembraan plaatsvond bij een gemiddelde pulsenergie van $120 \mu\text{J}$ na 4 uur endocytose van de AuNP’s, kon herhaalbaar een kleine daling van minder dan 0,1 in de gemiddelde ratio van het cellulair op het nucleair signaal worden vastgesteld. Het FITC-dextraan lekte hierbij niet uit de cel. Op basis van deze daling wordt gedacht dat bij een klein deel van de cellen het nucleair signaal is toegenomen ten opzichte van het cellulair signaal ten gevolge van transiënte rupturen in de kernmembraan door fotoporatie.

Voor cellen met EYFP-NLS waarbij fotoporatie van de kernmembraan onder dezelfde condities plaatsvond, bleef de gemiddelde ratio van het cellulair op het nucleair signaal ongewijzigd. Wel werd een toename in het aantal cellen met een ratio hoger dan 0,8 waargenomen. Er wordt gedacht dat bij dit kleine deel van de cellen het cellulair signaal is toegenomen ten opzichte van het nucleair signaal door rupturen in de kernmembraan. Indien echter nucleaire rupturen optreden zoals deze ook worden geobserveerd bij pathologische condities, dan herstelt het nucleair signaal zich vrij snel (binnen de 5 tot 60 minuten) (De Vos et al., 2011), waardoor het best mogelijk is dat de effecten worden gemist in de huidige benadering.

Voor zowel FD70 als EYFP-NLS zijn de vastgestelde effecten erg beperkt en harde bewijzen dat er rupturen in de kernmembraan geïnduceerd werden, zijn er niet. Dit bewijs zou geleverd kunnen worden door fotoporatie van de kernmembraan na te gaan voor afzonderlijke cellen en preferentieel opnames te maken tijdens de fotoporatie zodat de translocatie van fluorescente moleculen kan gevisualiseerd worden. Aan cellen met FD70 of EYFP-NLS zouden dan AuNP’s voor endocytose toegevoegd worden. Na 4 uur zou microscopisch nagegaan worden bij welke cellen de AuNP’s zich in de onmiddellijke nabijheid van de kernmembraan bevinden. Tijdens, of indien onmogelijk, vlak na (binnen minder dan 5 minuten) fotoporatie van de kernmembraan zouden de cellulaire en nucleaire signalen gemeten worden en vergeleken met deze voor fotoporatie.

Gerichte inductie van rupturen in de kernmembraan

Gerichte detectie zou dan wel bewijs voor rupturen in de kernmembraan kunnen vormen, de rupturen zouden nog altijd slechts in een klein deel van de cellen optreden. Bovendien blijft er bij spontane internalisatie nog steeds een stochastische component die het moeilijk maakt te voorspellen waar de rupturen zullen optreden. Ook bestaat de kans dat de additionele membraan van het internalisatievesikel de efficiëntie van nucleaire fotoporatie ernstig belemmert.

Met het oog op een gecontroleerde, gerichte perturbatie van de kernmembraan, moet gezocht worden naar manieren om de AuNP's nog dichter bij de kernmembraan te brengen. Indien mogelijk moet getracht worden lokalisatie van de AuNP's tot tegen de kernmembraan te bereiken, in plaats van de perinucleaire lokalisatie die nu bereikt werd. Ook moet gezocht worden naar manieren waarbij de lokalisatie van de AuNP's behouden kan blijven.

Smith et al. (2014) stellen een methode voor die precieze controle toelaat van de subcellulaire lokalisatie van AuNP's. In een eerste stap worden de cellen in een oplossing van goudzouten gebracht. De zouten in oplossing kunnen worden opgenomen door de cellen. Vervolgens wordt gefocust laserlicht gebruikt op de gewenste intracellulaire lokatie, waar dan gouden NPs gevormd worden met een grootte van 2 tot 20 nm. De gevormde AuNP's zijn in dit geval, in tegenstelling tot bij endocytose, niet omgeven door een membraan. Hun intracellulaire positie bleef tot 30 minuten stabiel.

Een andere mogelijkheid, is conjugatie van de AuNP's met een NLS. Onder meer Tkachenko et al. (2004) onderzochten deze methode. Ze vonden dat NLS-geconjugeerde AuNP's met een diameter van 20 nm na incubatie met HeLa-cellen, teruggevonden konden worden in het cytoplasma en in meer of mindere mate in de nucleus. Dit toont aan dat de AuNP's uit de endosomen kunnen ontsnappen om vervolgens via actief transport langs de NPC's in de kern te worden opgenomen. De bovengrens voor opname via actief transport ligt op ongeveer 26 nm (Alberts et al., 2002). Door conjugatie van de in deze thesis gebruikte AuNP's van 70 nm met een NLS, zou dus lokalisatie van de AuNP's tot tegen de kernmembraan bereikt kunnen worden, zonder opname ervan in de nucleus.

6 Besluit

Er werd beoogd om door fotoporatie met AuNP's op gerichte wijze rupturen in de kernmembraan te induceren. Om de geïnduceerde rupturen te kunnen waarnemen, werd gebruik gemaakt van fluorescente proteïnen, gelokaliseerd in ofwel het cytoplasma ofwel de nucleus.

Voor het fluorescent signaal in het cytoplasma, werd fotoporatie van de celmembraan met FITC-dextraan van verschillende moleculaire gewichten toegepast. Er werd gevonden dat exclusie uit de nucleus optrad voor FD70 en FD150, maar niet voor FD40. Dit was in overeenstemming met de nucleaire exclusielimiet van 50 à 60 kDa die de literatuur aangeeft. De gemiddelde ratio van het cellulair op het nucleair signaal lag hoger voor FD70 dan voor FD150.

Voor het fluorescent signaal in de nucleus, werden via transfectie monoklonale, stabiele cellijnen aangemaakt met expressie van EYFP-NLS.

Aan de cellen met cytoplasmatisch of nucleair fluorescent signaal, werden vervolgens AuNP's toegevoegd. Via endocytose konden de AuNP's tot in de nabijheid van de kernmembraan gebracht worden. De gemiddelde afstand van de geïnternaliseerde AuNP's tot de kernmembraan was minimaal 8 uur na toevoeging. Het aantal geïnternaliseerde AuNP's nam recht evenredig toe met de concentratie toegevoegde AuNP's voor concentraties lager dan $1,6 \times 10^9$ AuNP's/ml.

Voor cellen met FD70 waarbij fotoporatie van de kernmembraan plaatsvond 4 uur na toevoeging van de AuNP's, kon herhaalbaar een kleine daling van minder dan 0,1 in de gemiddelde ratio van het cellulair op het nucleair signaal worden vastgesteld.

Voor fotoporatie van de kernmembraan onder dezelfde condities, bleef bij cellen met EYFP-NLS de gemiddelde ratio van het cellulair op het nucleair signaal ongewijzigd. Wel werd een toename in het aantal cellen met een ratio hoger dan 0,8 waargenomen.

Voor zowel FD70 als EYFP-NLS zijn de vastgestelde effecten erg beperkt en harde bewijzen dat er rupturen in de kernmembraan werden geïnduceerd, werden niet geleverd. Hiervoor zou fotoporatie van de kernmembraan nagegaan moeten worden op het niveau van afzonderlijke cellen.

Echter, zelfs indien daadwerkelijk rupturen in de kernmembraan plaatsvonden, konden deze slechts in een klein deel van de cellen worden geïnduceerd. Om dit te verhelpen moet getracht worden lokalisatie van de AuNP's tot tegen de kernmembraan te bereiken, in plaats van de perinucleaire lokalisatie die nu bereikt werd. Ook moet een manier gevonden worden waarbij de lokalisatie van de AuNP's behouden kan blijven.

Een mogelijkheid, is de conjugatie van de AuNP's met een NLS. Door conjugatie van voldoende grote AuNP's met een NLS, zou lokalisatie van de AuNP's tot tegen de kernmembraan bereikt kunnen worden, zonder opname ervan in de nucleus.

Een belangrijk aspect tot slot, is de toxiciteit van AuNP's. De toxiciteit van AuNP's is een complex gegeven. Het wordt beïnvloed door uiteenlopende factoren waaronder de grootte, vorm en oppervlaktelading van de AuNP's, maar ook bijvoorbeeld het gebruikte celtipe en -medium. De toxiciteit van de AuNP's werd in deze thesis niet behandeld, maar verdient zeker aandacht naar de toekomst toe.

Bibliografie

- Addgene (2014). *Plasmids 101: Mammalian Vectors* [online]. Opgeroepen op Juli 7, 2015, van <http://blog.addgene.org/plasmids-101-mammalian-vectors>.
- Akita, H., Enoto, K., Tanaka, H., Harashima, H. (2013). Particle Tracking Analysis for the Intracellular Trafficking of Nanoparticles Modified with African Swine Fever Virus Protein p54-derived Peptide. *Molecular Therapy*, 21(2): 309-317.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 1616p. (ISBN: 978 08 153 3288 6).
- Alkilany, A. M., Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what have we learned so far? *Journal of Nanoparticle Research*, 12: 2313-2333.
- Alkilany, A. M., Lohse, S. E., Murphy, C. J. (2013). The Gold Standard: Gold Nanoparticle Libraries To Understand the Nano-Bio Interface. *Accounts of chemical research*, 46(3): 650-661.
- Bellard, E., & Teissié, J. (2009). Double Pulse Approach of Electropulsation: A Fluorescence Analysis of the Nucleus Perturbation at the Single Cell Level. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 16(5): 1267-1272.
- Bio-Rad Laboratories Inc. (2014). *PureBlu Hoechst 33342 Nuclear Staining Dye* [online]. Opgeroepen op Juli 28, 2015, van <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10043283.pdf>.
- Broers, J. L. V., Ramaekers, F. C. S., Bonne, G., Yaou, R. B., Hutchison, C. J. (2006). Nuclear Lamins: Laminopathies and Their Role in Premature Aging. *Physiological Reviews*, 86: 967-1008.
- Burke, B., Stewart, C. L. (2013). The nuclear lamins: flexibility in function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14: 13-24.
- Bushnell, T. (2013). *Instrumentation – What is Sheath Fluid* [online]. Opgeroepen op Juli 18, 2015, van <http://expertcytometry.com/what-is-sheath-fluid/>.
- Cambia (2007). *Patent Lens –Technology Landscapes –Antibiotic Resistance Genes and their Uses in Plant Genetic Transformation –Neomycin phosphotransferase (npt) gene –General Aspects* [online]. Opgeroepen op Juli 7, 2015, van <http://www.cambia.org/daisy/Antibiotic/g3/1127.html>.
- Chen, N., Garner, A. L., Chen, G., Jing, Y., Deng, Y., Swanson, R. J., Kolb, J. F., Beebe, S. J., Joshi, R. P., & Schoenbach K. H. (2007). Nanosecond electric pulses penetrate the nucleus and enhance speckle formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364(2): 220-225.
- Chen, N., Schoenbach, K. H., Kolb, J. F., Swanson, R. J., Garner, A. L., Yang, J., Joshi, R. P., & Beebe, S. J. (2004). Leukemic cell intracellular responses to nanosecond electric fields. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(2): 421-427.

- Chithrani, D. B., Chan, W. C. W. (2007). Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Letters*, 7(6): 1542-1550.
- Ciani, C., Doty, S., Fritton, S. P. (2005). *Transport of different sized probes into bone's lacunar-canalicular porosity*. Poster gepresenteerd op de 51ste jaarlijkse meeting van de 'Orthopaedic Research Society', Washington, DC.
- Cicchi, R., Sacconi, L., Vanzi, F., Pavone, F. S. (2013). How to Build an SHG Apparatus. In Pavone, F. S., Campagnola, P. J. *Second Harmonic Generation Imaging* (pp. 21-50) Taylor & Francis. (ISBN: 978 14 398 4915 6).
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P. D., & Hodzic, D. (2005). Coupling of the nucleus and cytoplasm – role of the LINC complex. *Journal of Cell Biology*, 172(1): 41-53.
- Cruje, C., Yohan, D., Yang, C., Chithrani, D. B. (2014). Intracellular Behavior of Nanoparticles Based on their Physicochemical Properties. In Soni, S., *Handbook of Research on Diverse Applications of Nanotechnology in Biomedicine*, Chemistry and Engineering (pp. 10-35) IGI Global. (ISBN 978 14 666 6364 0).
- Dahl, K. N., Ribeiro, A. J. S., Lammerding, J. (2008). Nuclear Shape, Mechanics and Mechanotransduction. *Circulation Research*, 102: 1307-1318.
- Dahl, K. N., & Kalinowski, A. (2011). Nucleoskeleton mechanics at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(5): 675-678.
- Dam, D. H. M., Lee, J. H., Sisco, P. N., Co, D. T., Zhang, M., Wasielewski, M. R., & Odom, T. W. (2012). Direct Observation of Nanoparticle – Cancer Cell Nucleus Interactions. *ACS Nano*, 6(4): 3318-3326.
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L. , & Goldman, R. D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & Dev.*, 22: 832-853.
- Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T., Goldman, R. D. (2010). Nuclear lamins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11): a000547.
- De Cock, I. (2014). *Department of Pharmaceutics - Laboratory of General Biochemistry and Physical Pharmacy - Research Projects* [online]. Opgeroepen op December 13, 2015, van <http://www.ugent.be/fw/pharmaceutics/en/research/biochemphypharm/contact/staff/inedc.htm>.
- de Noronha, C. M. C., Sherman, M. P., Lin, H. W., Cavrois, M. V., Moir, R. D., Goldman, R. D., Greene, W. C. (2001). Dynamic Disruptions in Nuclear Envelope Architecture and Integrity Induced by HIV-1 VPR. *Science*, 294: 1105-1108.
- de Roos, A. D. G. (2013). *The Origin of the Nucleus* [online]. Opgeroepen op December 10, 2015, van <http://www.design4evolution.net/7-evolution-of-cells>.

- De Schutter, K. (2014). *Celbiologie (cursus)*. Gent.
- De Temmerman, M.-L., Dewitte, H., Vandenbroucke, R. E., Lucas, B., Libert, C., Demeester, J., De Smedt, S. C., Lentacker, I., & Rejman, J. (2011). mRNA-Lipoplex loaded microbubble contrast agents for ultrasound-assisted transfection of dendritic cells. *Biomaterials*, 32(34): 9128-9135.
- De Vos, W. H., Houben, F., Kamps, M., Malhas, A., Verheyen, F., Cox, J., Manders, E. M. M., Verstraeten, V. L. R. M., van Steensel, M. A. M., Marcelis, C. L. M., van den Wijngaard, A., Vaux, D. J., Ramaekers, F. C.S., & Broers, J. L. V. (2011). Repetitive disruptions of the nuclear envelope invoke temporary loss of cellular compartmentalization in laminopathies. *Human Molecular Genetics*, 20(21): 4175-4186.
- Dittmer, T. A., & Misteli, T. (2011). Protein family review: The lamin protein family. *Genome Biology*, 12: 222.
- Dokka, S., Rojanasakul, Y. (2004). Cellular Uptake and Trafficking. In Amiji, M., M., *Polymeric Gene Delivery: Principles and Applications* (pp. 43-61) CRC Press. (ISBN: 978 02 035 0047 7).
- Domann, R., & Martinez, J. (1995). Alternative to Cloning Cylinders for Isolation of Adherent Cell Clones. *BioTechniques*, 18(4): 594.
- Dominici, S., Fiori, V., Magnani, M., Schena, E., Capanni, C., Camozzi, D., D'Apice, M. R., Le Dour, C., Auclair, M., Caron, M., Novelli, G., Vigouroux, C., Maraldi, N. M., Lattanzi, G. (2009). Different prelamin A forms accumulate in human fibroblasts: a study in experimental models and progeria. *European Journal of Histochemistry*, 53(1): e6.
- Dorner, D., Gotzmann, J., & Foisner, R. (2007). Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2 α , Rb and BAF, in transcriptional regulation. *FEBS Journal*, 274: 1362-1373.
- El-Sayed, M. A. (2001). Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes. *Accounts of Chemical Research*, 34(4): 257-264.
- Estes, D. (2006). *Flow Cytometry SOP* [online]. Opgeroepen op Juli 18, 2015, van http://www.bme.umich.edu/labs/biomembrane/research/sop/SOP_cytometry.pdf.
- Fan, Z., Liu, H., Mayer, M., Deng, C. X. (2012). Spatiotemporally controlled single cell sonoporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41): 16486-91.
- Fan, Z., Kumon, R. E., & Deng, C. X. (2014). Mechanisms of microbubble-facilitated sonoporation for drug and gene delivery. *Therapeutic delivery*, 5(4): 467-486.
- Givan, A. L. (2013). *Flow Cytometry: First Principles*. John Wiley & Sons, 296p. (ISBN 978 11 186 8839 7).

- Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K., & Spann, T. P. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes & Dev.*, 16: 533-547.
- Guang S. H., & Song H. L. (1999). *Physics of Nonlinear Optics*. World Scientific, 552p. (ISBN 978 9 8102 3319 8).
- Haas, K., Sin, W. C., Jahaverian, A., Li, Z., Cline, H. T. (2001). Single-cell electroporation for gene transfer in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(41): 16486-91. *Neuron*, 29(3): 583-91.
- Hatch, E., & Hetzer, M. (2014). Breaching the nuclear envelope in development and disease. *Journal of Cell Biology*, 205(2): 133-141.
- Heinemann, D., Schomaker, M., Kalies, S., Schieck, M., Carlson, R., Escobar, H. M., Ripken, T., Meyer, H., & Heisterkamp, A. (2013). Gold Nanoparticle Mediated Laser Transfection for Efficient siRNA Mediated Gene Knock Down. *PLoS ONE*, 8(3): e58604.
- Ho, C. Y., Lammerding, J. (2012). Lamins at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(9): 2087-2093.
- Ho, C. Y., Jaalouk, D. E., Lammerding, J. (2013). Novel insights into the disease etiology of laminopathies. *Rare Diseases*, 1: e27002.
- Invitrogen (2005). *Invitrogen detection technologies – Molecular Probes – Hoechst Stains* [online]. Opgeroepen op Juli 28, 2015, van https://www.ipmc.cnrs.fr/fichiers/recherche/microscopie/Sondes/Hoechst_33342.pdf.
- Jain, S., Hirst, D. G., O'Sullivan, J. M. (2012). Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *British Journal of Radiology*, 85(1010): 101-113.
- Kim, K. H., Hirano, T., Ohashi, S. (1996). Anticancer polymeric prodrugs, targetable. In Salamone, J., C., *Polymeric Materials Encyclopedia* (pp. 272-284) CRC Press. (ISBN: 978 08 493 2470 3).
- Kim, H. Y. (2007). Use of DNA insulator elements and scaffold/matrix-attached regions for enhanced recombinant protein expression. In Butler, M., *Cell Culture and Upstream Processing* (pp. 19-35) Garland Science. (ISBN: 978 02 039 6723 2).
- Lagrand, C. (2010). *Niet-virale afgiftesystemen voor mRNA gentherapie* [online]. Opgeroepen op November 26, 2015, van <http://www.projects.science.uu.nl/PHARMACEUTICS/Studentsreports/Lagrand/index.html>
- Lapotko, D. (2009). Optical excitation and detection of vapor bubbles around plasmonic nanoparticles. *Optics Express*, 17(4): 2538-2556.
- Life Technologies (2015a). *Life Sciences – Cell Culture & Transfection – Transfection – Transfection Protocols & Support – Transfection Reagent FAQs* [online]. Opgeroepen op Juli 7, 2015, van <http://www.lifetechnologies.com/be/en/home/life-science/cell-culture/transfection/transfection-support/transfection-reagent-faqs.html>.

- Life Technologies (2015b). *Technical Reference Library –Cell Culture Basics - Gibco® - Transfection Basics –Transfection Methods –Stable Transfection* [online]. Opgeroepen op Juli 7, 2015, van <http://www.lifetechnologies.com/be/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/stable-transfection.html>.
- Link, S., El-Sayed, M. A. (2000). Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*, 19(3): 409-453.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., & Matsudaira, P. (2008). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, 1150p. (ISBN 978 0 7167 7601 7).
- Lonza (2012). *Technical Reference Guide - Guideline for Generation of Stable Cell Lines* [online]. Opgeroepen op Mei 31, 2015, van http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_Guideline_for_Generation_of_Stable_Cell_Lines__Technical_Reference_Guide.pdf.
- Meldi, L., & Brickner, J. H. (2011). Compartmentalization of the nucleus. *Trends in Cell Biology*, 21(12): 701-708.
- Mes, J. (2003). *Doctoraatsthesis: Frequency conversion by nonlinear optics: narrow bandwidth sources and applications*. Amsterdam, Nederland: Vrije Universiteit Amsterdam. Opgeroepen op Juli 30, 2015, van https://www.nat.vu.nl/en/Images/MES_thesis_tcm69-96378.pdf.
- Meyers, R. A. (2012). *Epigenetic Regulation and Epigenomics*. John Wiley & Sons, 1254p. (ISBN 978 3 5276 6862 5).
- Mirus Bio LLC (2015a). *Applications –Stable Cell Line Generation –Antibiotic Kill Curve* [online]. Opgeroepen op Mei 31, 2015, van <https://www.mirusbio.com/applications/stable-cell-line-generation/antibiotic-kill-curve>.
- Mirus Bio LLC (2015b). *Applications –Stable Cell Line Generation –Selection & Expansion* [online]. Opgeroepen op Juli 16, 2015, van <https://www.mirusbio.com/applications/stable-cell-line-generation/selection-and-expansion-of-clones>.
- Molecular Probes (2002). *Fluorescent and Biotinylated Dextrans* [online]. Opgeroepen op Oktober 15, 2015, van <http://www.mobitec.de/probes/docs/sections/1405.pdf>.
- Mounkes, L., Kozlov, S., Burke, B., & Stewart, C. L. (2003). The laminopathies: nuclear structure meets disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13 (3): 223-230.
- Naim, B., Brumfeld, V., Kapon, R., Kiss, V., Nevo, R., Reich, Z. (2007). Passive and Facilitated Transport in Nuclear Pore Complexes Is Largely Uncoupled. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 3881-3888.

- Newman, C. M. H., & Bettinger, T. (2007). Gene therapy progress and prospects: Ultrasound for gene transfer. *Gene therapy*, 14: 465-475.
- Newmeyer, D. D. (2012). Nuclear Import in Vitro. In Jeanteur, P., *Progress in Molecular and Subcellular Biology* (pp. 30-50) Springer Science. (ISBN 978 36 427 5178 3).
- Nieves-Soto, M., Hernández-Calderón, O. M., Guerrero-Fajardo, C. A., Sánchez-Castillo, M. A., Viveros-García, T., & Contreras-Andrade, I. (2012). Biodiesel Current Technology: Ultrasonic Process a Realistic Industrial Application. In Fang Z., *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications* (pp. 177-207) InTech. (ISBN: 978 95 351 0910 5).
- Nikon MicroscopyU (2013). *Confocal Microscopy – Basics of Confocal Reflection Microscopy* [online]. Opgeroepen op Augustus 24, 2015, van <https://www.microscopyu.com/articles/confocal/reflectedconfocalintro.html>.
- OPOTEK Inc. (2008). *Opolette (HE) 355 II Data Sheet* [online]. Opgeroepen op Juli 30, 2015, van http://www.lambdaphoto.co.uk/pdfs/Opolette_355II.pdf.
- Osmanagic-Myers, S., Dechat, T., & Foisner, R. (2015). Lamins at the crossroads of mechanosignaling. *Genes & Dev.*, 29: 225-237.
- Panariti, A., Miserochi, G., Rivolta, I. (2012). The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnology Science and Applications*, 5: 87-100.
- Passinger, S. (2008). *Two-Photon Polymerization and application to Surface Plasmon Polaritons*. Cuvillier Verlag, 171p. (ISBN 978 3 8672 7662 7).
- Pennsylvania State University (2015). *Biology: Basic Concepts and Biodiversity: Subcellular Specialization* [online]. Opgeroepen op Februari 15, 2015, van https://online.science.psu.edu/biol110_sandbox_8862/node/8909.
- Pharmacocosmos (2015). *Physical Properties of Dextran* [online]. Opgeroepen op November 18, 2015, van <http://www.dextran.net/about-dextran/dextran-chemistry/physical-properties.aspx>.
- QIAGEN (2002). *The QIAGEN® Transfection Resource Book* [online]. Opgeroepen op Juli 16, 2015, van <http://www.ff.ul.pt/~mjgama/transfection%20-%20QIAGEN.pdf>.
- Qioptiq Photonics (2015). *Technical Papers – Laser Beam Expanders, Basics and Applications* [online]. Opgeroepen op Augustus 2, 2015, van <http://www.winlens.de/index.php?id=13>.
- Radboud University (2015). *Life Science Trace Gas Facility – Trace Gas Research Group – Laser sources – Optical Parametric Oscillator* [online]. Opgeroepen op Juli 30, 2015, van http://www.ru.nl/tracegasfacility/trace_gas_research/laser-sources/optical-parametric/.
- Reheul, D. (2008). *Toegepaste genetica (cursus)*. Gent.

- Rockefeller University (2015a). *Buffer Suggestions for the Cell Sorting* [online]. Opgeroepen op Juli 18, 2015, van <http://www.rockefeller.edu/fcrc/tips/cellsorting>.
- Rockefeller University (2015b). *Useful Tips to Improve Sample Quality for the Flow Cytometric Analysis and Cell Sorting (Live Cells)* [online]. Opgeroepen op Juli 18, 2015, van <http://www.rockefeller.edu/fcrc/tips/sampleprep>.
- Sandin, P., Fitzpatrick, L. W., Simpson, J. C., Dawson, K. A. (2012). High-Speed Imaging of Rab Family Small GTPases Reveals Rare Events in Nanoparticle Trafficking in Living Cells. *ACS Nano*, 6(2): 1513-1521.
- Sandoval, R. M., Molitoris, B. A. (2014). Fluorescent Dextrans in Intravital Multi-Photon Microscopy. In Weigert R., *Advances in Intravital Microscopy: From Basic to Clinical Research* (pp. 205-220) Springer. (ISBN: 978 94 017 9361 2).
- Schauen, M., Opazo, F., Rizzoli, S. (2013). *New Labeling Tools Can Help to Realize the Full Potential of Super-Resolution Microscopy - Aptamers Enable Sensitive and Accurate Labeling of Small Subcellular Structures* [online]. Opgeroepen op Oktober 15, 2015, van <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/new-labeling-tools-can-help-to-realize-the-full-potential-of-super-resolution-microscopy/>.
- Schirmer, E. C., & de las Heras, J. I. (2014). *Cancer Biology and the Nuclear Envelope: Recent Advances May Elucidate Past Paradoxes*. Springer Science & Business Media, 624p. (ISBN 978 14 899 8032 6).
- Schlicher, R. K., Radhakrishna, H., Tolentino, T. P., Apkarian, R. P., Zarnitsyn, V., & Prausnitz, M. R. (2006). Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 32(6): 915-924.
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R., R., Sastry, M. (2005). Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. *Langmuir*, 21: 10644-10654.
- Sigma-Aldrich (1997). *Product Information – Fluorescein Isothiocyanate-Dextran Sigma Stock Nos. FD-4, FD-10S, FD-20S, FD-20, FD-40S, FD-40, FD-70S, FD-70, FD-150S, FD-150, FD-250S, FD-500S, and FD-2000S* [online]. Opgeroepen op Augustus 18, 2015, van http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/fd40pis.pdf.
- Sigma-Aldrich (2008). *Product Information – Fluorescein Isothiocyanate* [online]. Opgeroepen op Augustus 6, 2015, van http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/f7250pis.pdf.
- Sigma-Aldrich (2015). *Gold Nanoparticles: Properties and Applications* [online]. Opgeroepen op December 2, 2015, van <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>

- Smith, N. I., Mochizuki, K., Niioka, H., Ichikawa, S., Pavillon, N., Hobro, A. J., Ando, J., Fujita, K., Kumagai, Y. (2014). Laser-targeted photofabrication of gold nanoparticles inside cells. *Nature Communications*, 5: 5144-5152.
- Stevenson, D. J., Gunn-Moore, F. J., & Campbell, P., & Dholakia, K. (2010a). Transfection by optical injection. In Tuchin, V. V., *Handbook of Photonics for Biomedical Science* (pp. 87-118) CRC Press. (ISBN 978 14 398 0629 6).
- Stevenson, D. J., Gunn-Moore, F. J., Campbell, P., & Dholakia, K. (2010b). Single cell optical transfection. *Journal of the Royal Society Interface*, 7: 863-871.
- Tamiello, C., Kamps, M. A. F., van den Wijngaard, A., Verstraeten, V. L. R. M., Baaijens, F. P. T., Broers, J. L. V., Bouten, C. C. V. (2013). Soft substrates normalize nuclear morphology and prevent nuclear rupture in fibroblasts from a laminopathy patient with compound heterozygous LMNA mutations. *Nucleus*, 4(1): 61-73.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010). *Instructions – Hoechst 33342* [online]. Opgeroepen op Juli 28, 2015, van https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0011717_Hoechst_33342_UG.pdf.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015a). *Technical Reference Library - Cell Culture Basics - Transfection Basics - Transfection Methods - Stable Transfection* [online]. Opgeroepen op Mei 31, 2015, van <http://www.lifetechnologies.com/be/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/stable-transfection.html>.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015b). *Fluorescence SpectraViewer* [online]. Opgeroepen op November 1, 2015, van <https://www.thermofisher.com/be/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>.
- Tkachenko, A. G., Xie, H., Liu, Y., Coleman, D., Ryan, J., Glomm, W. R., Shipton, M. K., Franzen, S., Feldheim, D. (2004). Cellular Trajectories of Peptide-Modified Gold Particle Complexes: Comparison of Nuclear Localization Signals and Peptide Transduction Domains. *Bioconjugate Chemistry*, 15: 482-490.
- ULO Optics (2015). *Beam Delivery – Beam Expanders* [online]. Opgeroepen op Augustus 2, 2015, van <http://www.ulooptics.com/beam-expanders/>.
- Van Damme, E. (2014). *Eiwitchemie (cursus)*. Gent.
- van den Heuvel, J. C. (1998). Laser jamming als verdediging tegen infrarood-geleide wapens. *Marineblad*, 11-15.
- Vandeputte, L. (2014). *Masterthesis: Controle van de nanopartikelaggregatie voor de acute toxiciteitsbepaling in vitro*. Gent , België: Universiteit Gent.
- Vishnoi, N., & Yao, J. (2014). Gene positioning and genome function. *Frontiers in Biology*, 9 (4): 255-268.

- Wang, R., Brattain, M. G. (2007). The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60 kDa. *FEBS Letters*, 581(17): 3164-3170.
- Wang, J. T. H., Teasdale, R. D., Liebl, D. (2014) Macropinosome quantitation assay. *MethodsX*, 1: 36-41.
- Wavelength Opto-Electronic (2012). *Laser Optics – Using Laser Beam Expanders* [online]. Opgeroepen op Augustus 2, 2015, van <http://www.wavelength-tech.com/Technical/Technical16.jsp>.
- Whitley, G. S. (2006). Production of Human Trophoblast Cell Lines. In Soares, M. J., & Hunt, J. S., *Placenta and Trophoblast - Methods and Protocols - Volume 1* (pp. 219-228) Springer Science & Business Media. (ISBN: 978 15 925 9983 7).
- Xiong, R., Raemdonck, K., Peynshaert, K., Lentacker, I., De Cock, I., Demeester, J., De Smedt, S. C., Skirtach, A. G., & Braeckmans, K. (2014). Comparison of Gold Nanoparticle Mediated Photoporation: Vapor Nanobubbles Outperform Direct Heating for Delivering Macromolecules in Live Cells. *ACS Nano*, 8(6): 6288-6296.
- Zastrow, M. S., Vicek, S., & Wilson, K. L. (2004). Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *Journal of Cell Science*, 117: 979-987.
- Zhang, S., Li, J., Lykotrafitis, G., Bao, G., Suresh, S. (2009). Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Advanced Materials*, 21: 419-424.

Bijlage A - Datasheet AuNP

NANOPARTZ™

The gold nanoparticle for nanotechnology

Certificate of Analysis

Product Family	Cell Uptake Gold Nanoparticles
Product Number	CU11-70-P30-50
Lot #	E3120
Form	Gold Colloid
Functionalization	Positive polymer (1.5nm thick)
Solution	18 MEG DI water

Diameter	nm	measured	DLS,TEM,UVVIS	70
SPR Abs	OD	measured	UVVIS	70
Volume	ml	measured		1
OD-ml	OD-ml	calc		70
PDI	stddev/size	measured	DLS/TEM	7%
SPR Peak	nm	measured	UVVIS	545
pH		measured	Orion	7
Zeta Potential	mV	measured	DLS	30
Concentration	nps/mL	calc		1.15E+12
Wt. conc.	mg/mL	calc		3.500
ppm		calc		3500
Wt. %	%	calc		0.3500%
Molarity	uM	calc		0.001847
Molar Ext.	M-1cm-1	calc		3.64E+10

Date
Exp Date

12/11/2014
3/11/2015

Alex Schoen, Manager Quality Control

