



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Effect of forced convection on protein and nanoparticle
binding in microplate assays“

Verfasserin

Regina Nowotny

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth

*Lernen ist wie rudern gegen den Strom –
wer aufhört, treibt zurück.*

aus China

Ich widme diese Arbeit meinem Großvater, Rudolf Baumann, der mir durch seine
Fürsorge und seinen Stolz auf meine Leistungen immer das Gefühl gab
etwas ganz Besonderes zu sein.

Mein besonderer Dank gilt Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für seine Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit und die vielen positiven Anregungen.

Ebenso ein großer Dank an Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Bereitstellung dieses spannenden Themas für meine Diplomarbeit.

Mag. Dr. Christian Fillafer danke ich für seine Mithilfe während meiner praktischen Arbeit.

Ganz besonders herzlich danke ich meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich immer in allem unterstützten sowie meinen Geschwistern und Freunden, die meinen Weg begleiteten.

All diese Menschen haben dazu beigetragen, dass mir die Zeit meiner Diplomarbeit nicht nur viele neue Erfahrungen geschenkt hat sondern vor allem als die schönste und spannendste Zeit meines Studiums in Erinnerung bleiben wird.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
PROBLEMSTELLUNG	3
ERGEBNISSE UND DISKUSSION	7
LITERATURVERZEICHNIS	16
ANHANG	19

Manuskript „Effect of forced convection on protein and nanoparticle binding in microplate assays”

ABSTRACT	20
1. INTRODUCTION	21
2. MATERIALS AND METHODS	23
3. RESULTS AND DISCUSSION	28
4. CONCLUSIONS	38
SUPPORTING INFORMATION	39
REFERENCES	40
LEBENS LAUF	43

PROBLEMSTELLUNG

Die Entwicklung und Formulierung von biotechnologisch hergestellten Arzneistoffen ist eines der zukunftsreichsten Gebiete in der pharmazeutischen Forschung. Diese Wirkstoffklasse umfasst Peptide und Proteine sowie Desoxyribonukleinsäuren (DNS), Ribonukleinsäuren (RNS) und andere Makromoleküle. Der hohen Wirksamkeit dieser Substanzen steht jedoch eine meist unzureichende Stabilität nach Applikation *in vivo* gegenüber. So wird die Bioverfügbarkeit dieser Moleküle nach peroraler Applikation insbesondere durch Denaturierung im sauren Milieu des Magens und enzymatische Degradation im Gastrointestinaltrakt limitiert. Um diese Abbaumechanismen zu umgehen und therapeutisch effektive Plasmaspiegel zu erzielen, könnten Formulierungen verwendet werden, bei denen der Wirkstoff in biokompatiblen und bioabbaubaren Nano- oder Mikropartikeln inkorporiert ist. Durch Einbau in die Teilchenmatrix sollte so der Arzneistoff vor Degradation geschützt und erst am Resorptionsort freigesetzt werden. An der Oberfläche dieser Teilchen können darüber hinaus mittels chemischer Konjugationstechniken Liganden immobilisiert werden. Durch Einbringen dieser Moleküle soll es ermöglicht werden, dass die Wirkstoffträger spezifisch an erkranktes Gewebe binden. Dies hätte zur Folge, dass gesunde Körperzellen nur einer vergleichsweise geringen Wirkstoffkonzentration ausgesetzt wären. Insgesamt sollte also durch den Einsatz von zielgerichteten Formulierungen die benötigte Dosierung und die Inzidenz von Nebenwirkungen reduziert werden können.

Im Rahmen der pharmazeutisch-technologischen Entwicklung hat daher die Erforschung der Interaktion von zielgerichteten Wirkstoffträgersystemen mit Zellen und Geweben einen hohen Stellenwert. Bei klassischen präklinischen biopharmazeutischen Untersuchungen wird die Bindung von Konjugaten und Partikeln an beschichtete Oberflächen oder Zellschichten meist

in Mikrotiterplattenassays untersucht. Mikrotiterplatten nehmen als Materialien insgesamt in sehr vielen Disziplinen der Pharmazie und Biomedizin eine bedeutende Stellung ein. Dies umfasst unter anderem deren Einsatz bei der Kultivierung von Zellen sowie bei der Durchführung von immunologischen Analyseverfahren (ELISA). Die standardisierbare Handhabung, die breite Auswahl an Modellen, Materialien und Oberflächenbeschichtungen sowie die hohe Zahl an Parallelbestimmungen in Mikrotiterplatten ermöglichen flexible, aber auch gut reproduzierbare Versuchsbedingungen. Darüber hinaus lässt sich sowohl die Befüllung der Reaktionsgefäße als auch die analytische Erfassung des Messergebnisses einfach und kostengünstig automatisieren. Standardmäßig werden Mikrotiterplattenassays unter stationären Bedingungen durchgeführt. Die in solchen stationären Ansätzen beobachteten Reaktionsgeschwindigkeiten sind jedoch Schwankungen unterworfen und tendenziell langsam.[1] Eine Optimierung dieser Versuchsbedingungen könnte, insbesondere da meist nur geringe Konzentrationen an Testsubstanz zur Verfügung stehen, die Sensitivität und Reproduzierbarkeit dieser Analysen deutlich erhöhen.

Unter stationären Umgebungsbedingungen bestimmen Diffusion und Sedimentation den Transport des Analyten zur reaktiven Oberfläche am Boden der Mikrotiterplatte. Die Deposition durch Sedimentation ist im Fall von Proteinen und den meisten Nanopartikeln jedoch zu vernachlässigen, da der hydrodynamische Radius dieser Teilchen sehr klein ist und ihre Dichte nahe an der des wässrigen Versuchsmediums liegt. Die mittlere diffusive Transportgeschwindigkeit eines Teilchens wird von dessen Diffusionskoeffizient bestimmt. Dieser ist indirekt proportional zum Radius des Teilchens. Er liegt für Proteine bzw. Nanopartikel mit einem Durchmesser von 100 nm in der Größenordnung von $\sim 1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bzw. $\sim 5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Bei durchschnittlichen Mikrotiterplattenassays beträgt die Füllhöhe des Testmediums meistens $\geq 1 \text{ mm}$. Proteine und Nanopartikel können solche makroskopischen

Distanzen über Diffusion nur vergleichsweise langsam zurücklegen. Die Bindung an das jeweilige Adsorbens hingegen verläuft bei den meisten Immunoassays und pharmazeutisch relevanten Bindungsstudien durchwegs spontan. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Bindung an die Oberfläche von der Diffusionsgeschwindigkeit des Analyten kontrolliert wird.[2] Durch eine effiziente Durchmischung des Inhalts des Mikrotiterplattenwells könnte diese Limitation umgangen werden. Kürzere Inkubationszeiten sowie verbesserte Sensitivität wären die Folge.[1,3] Derart forcierte Konvektion wird häufig über einen externen Temperaturgradienten induziert.[1] Die resultierende Inkonstanz der Temperatur ist jedoch insbesondere bei Bindungsstudien an Zellen von Nachteil. Hierbei soll nämlich oft nur die Adhäsion an die Zellmembran untersucht werden. Bei Temperaturen $>4^{\circ}\text{C}$ variiert jedoch die Zusammensetzung der Zellmembran in Abhängigkeit von der Stoffwechselrate und aktive Internalisationsprozesse finden statt. Um diese Prozesse zu unterdrücken, wird die Inkubationstemperatur auf 4°C eingestellt. Die Erzeugung von Konvektion durch Wärmezufuhr wäre bei solchen Untersuchungen kontraproduktiv. Weiters konnte gezeigt werden, dass die Durchmischung mittels thermischer Konvektion schlecht reproduzierbar und somit für systematische Bindungsstudien kaum geeignet ist.[1] Um die Reaktionsansätze dennoch effizient zu durchmischen, steht prinzipiell eine Reihe weiterer Technologien zur Verfügung. Zumeist werden hierfür Orbitalschüttler, magnetische Rührer, Ultraschall oder akustische Oberflächenwellen (AOW, oft auch SAW für surface acoustic wave) verwendet.[4] Beim Einsatz in zellkulturbasierten Mikrotiterplattenassays ist jedoch zu beachten, dass nichtinvasive Mischtechniken erforderlich sind um die Integrität des Zelllayers nicht zu beeinträchtigen. Weiters darf es zu keinen Cross-Kontaminationen zwischen den einzelnen Assays kommen. Mikrotiterplattenmischer, die auf akustischen

Oberflächenwellen basieren, stellen eine Technologie dar, die diesen Anforderungen gerecht wird.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollte untersucht werden, inwiefern durch akustische Oberflächenwellen erzeugte dynamische Inkubationsbedingungen die Bindungsrate von Analyten in 96-well Mikrotiterplattenassays beeinflussen. Akustische Oberflächenwellen sind durch Transducer ausgelöste Körperschallwellen, die sich planar in zwei Dimensionen ausbreiten. Bei Einkopplung in eine Flüssigkeit erzeugen sie einen Druckgradienten, der zu interner Konvektion führt. Um die breite Anwendbarkeit des Modells zu zeigen, sollten Adhäsionsstudien mit unterschiedlichen Reaktionspartnern durchgeführt werden. Erstens sollte die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Weizenlektin und von mit Weizenlektin modifizierten PLGA-Nanopartikeln an ein Zellmodell des menschlichen Darmepithels untersucht werden. Weiters sollte die Bindung von Biotin-gekoppelten Quantenpunkten an Avidin beschichtete Polystyroloberflächen ermittelt werden. Zuletzt sollte das Ausmaß der Adhäsion von negativ geladenen Nanopartikeln an mit Poly(L-Lysin) (PLL) beschichtete Mikrotiterplatten untersucht werden. Die Bindung der Analyten sollte mittels Fluorimetrie bestimmt und schließlich in Abhängigkeit der Inkubationsbedingungen (stationär oder in Gegenwart von forcierter Konvektion) diskutiert werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte zum Manuskript

„Effect of forced convection on protein and nanoparticle binding in microplate assays“

C. Fillafer, R. Nowotny, M. Wirth, F. Gabor

(siehe Anhang) maßgeblich beigetragen werden.

Um den Prozess der Bindung von Analyten an eine beschichtete oder mit einem Zellrasen bewachsene Mikrotiterplattenoberfläche untersuchen zu können, müssen die Transportprozesse zur reaktiven Oberfläche berücksichtigt werden. In Mikrotiterplattenassays werden häufig Proteine oder Nanopartikel eingesetzt, die sich durch eine annähernd gleiche Dichte wie das wässrige Versuchsmedium auszeichnen. Bei diesen Analyten wird der Transport zur reaktiven Oberfläche hauptsächlich durch Diffusion bestimmt. Der Diffusionskoeffizient eines Teilchens lässt sich nach (1) berechnen

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta r} \quad (1)$$

wobei k_B die Boltzmann Konstante, T die Temperatur, η die Viskosität des Mediums und r den hydrodynamischen Radius des Partikels darstellt. In wässrigem Medium mit einer mittleren Viskosität von etwa $0,001 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sind Proteine bei Raumtemperatur durch einen Diffusionskoeffizient von $\sim 1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ charakterisiert. Bei Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 100 nm liegt D bei etwa $5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Die sich daraus ergebende Zeitdauer für Diffusion über makroskopische Distanzen kann mittels (2)

$$\Delta t = \frac{\overline{\Delta S^2}}{2D} \quad (2)$$

berechnet werden. Hierbei entspricht $\overline{\Delta S^2}$ dem Quadrat der mittleren zurückgelegten Wegstrecke und Δt der Beobachtungsdauer. Demnach benötigen Proteine wie WGA bzw. Nanopartikel in einem Größenbereich von ~100 nm 80 Minuten bzw. 1670 Minuten um eine Strecke von 1 mm zurückzulegen. Aufgrund dieser doch recht unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten wird sich auch die Bindungsrate von Proteinen bzw. Nanopartikeln an der adsorptiven Oberfläche unterscheiden.

In der pharmazeutisch technologischen Forschung kommen oftmals Partikel zum Einsatz, die deutlich größer als 100 nm sind und eine höhere Dichte als wässriges Medium aufweisen. In diesen Systemen wird die Deposition der Teilchen in erster Linie durch Sedimentation bestimmt.[5] Die Sedimentationsgeschwindigkeit im Gleichgewicht von Reibung und Gravitation lässt sich über (3)

$$v = \frac{2}{9} \frac{g r^2 (\rho_s - \rho_l)}{\eta} \quad (3)$$

berechnen. Hierbei steht g für die Beschleunigung im Schwerfeld der Erde und ρ_s sowie ρ_l für die Dichte des Partikels bzw. Mediums.

Sowohl diffusiver Transport als auch eine Deposition über Sedimentation verlaufen in den meisten Systemen so langsam, dass sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Bindungsreaktion darstellen. Dadurch wird sowohl die Reaktionskinetik beeinflusst als auch die Sensitivität des Assays limitiert.[1,3]

Der Einsatz von SAWs bietet eine Möglichkeit zur kontrollierten und reproduzierbaren Erzeugung von forcierter Konvektion in Mikrotiterplattenwells. Dadurch könnte die Transportgeschwindigkeit des Analyten zur reaktiven Oberfläche deutlich erhöht werden.

Dies wiederum sollte sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit beschleunigen als auch die Sensitivität des Assays verbessern.

Zunächst wurde die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Weizenlektin (f-WGA) an Caco-2 Zellen sowohl unter statischen Bedingungen als auch in Gegenwart von forcierter Konvektion untersucht. Bei Weizenlektin (WGA) handelt es sich um ein säurestabiles dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von ~36 kDa. Lektine sind generell in der Lage spezifisch mit Zuckerstrukturen zu interagieren. WGA besitzt beispielsweise vier Bindungsstellen zur Wechselwirkung mit N-Acetyl-D-Glucosamin und N-Acetylneuraminsäureresten, die neben anderen auch in der Glykokalyx eukaryotischer Zellen vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass WGA aufgrund dieser Wechselwirkung an Blasenkrebszellen [6], Chondrozyten [7], mikrovaskuläre Endothelzellen [8] sowie intestinale Zelllinien wie Caco-2 Zellen bindet [9]. Um die Auswirkungen von forcierter Konvektion auf das Bindungsverhalten von WGA an intestinale Epithelzellen zu untersuchen, wurden Caco-2 Zellen in Mikrotiterplatten sieben Tage lang kultiviert. Die danach konfluenten Zellmonolayer wurden bis zu 240 Minuten mit fluoreszenzmarkiertem WGA inkubiert. Um ein möglichst einfaches Testsystem zu gewährleisten, wurden alle Untersuchungen in isotonem HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 (isoHEPES) durchgeführt. Dadurch konnten etwaige Interaktionen von WGA mit Komponenten des Zellkulturmediums ausgeschlossen werden. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass in isoHEPES auch nach Inkubation über vier Stunden keine morphologischen Veränderungen der Zelllayer auftraten. Ähnliches wurde auch unter dynamischen Bedingungen beobachtet. Um das Ausmaß der Bindung von f-WGA an Caco-2 Zellen zu bestimmen, wurden Fluoreszenzintensitätsmessungen durchgeführt. Für die spätere Quantifizierung der zellgebundenen Proteinmenge wurden in Vorversuchen

Kalibrationsgeraden erstellt. Um ausschließlich die Bindung von f-WGA an den Caco-2 Monolayer zu erfassen, wurden alle Untersuchungen bei 4°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur werden der zelluläre Metabolismus und aktive Internalisationsprozesse weitgehend inhibiert. Die Zusammensetzung der Zellmembran sollte daher während des gesamten Versuchs weitgehend konstant gewesen sein. Darüber hinaus kann angenommen werden, dass gebundene Analyten an der extrazellulären Membranseite verbleiben und nicht in die Zelle aufgenommen werden.

Das Ausmaß der Bindung von f-WGA an Caco-2 Monolayer war erwartungsgemäß abhängig von der eingesetzten Konzentration und von der Inkubationszeit. Außerdem wurden unter stationären Bedingungen bzw. in Gegenwart von forcierter Konvektion unterschiedliche Bindungsraten beobachtet. Nach Inkubation der Zellen mit 1,1 µg, 3,3 µg bzw. 11,1 µg f-WGA wurden unter stationären Bedingungen nach fünf Minuten $0,05 \pm 0,01$ µg, $0,18 \pm 0,01$ µg bzw. $0,41 \pm 0,02$ µg zellgebundenes f-WGA detektiert (Anhang, Figure 1). Durch kontinuierliches Mischen des Ansatzes konnten deutlich höhere Bindungsraten erzielt werden (Anhang, Figure 2). Hierbei waren nach fünfminütiger Inkubationszeit bereits $0,15 \pm 0,01$ µg, $0,43 \pm 0,05$ µg bzw. $0,52 \pm 0,05$ µg f-WGA an die Zellmembran gebunden. Dies entspricht einer 3-fach, 2,4-fach bzw. 1,3-fach höheren Bindung als unter stationären Bedingungen. Im weiteren Versuchsverlauf über 240 Minuten konnte sowohl im stationären als auch im dynamischen Aufbau eine Absättigung der Zellmembran mit f-WGA festgestellt werden (Anhang, Figure 1 und 2). Im Fall von 3,3 µg und 11,1 µg f-WGA wurden nach 240 Minuten unter stationären und dynamischen Bedingungen ähnliche zellgebundene Lektinmengen detektiert. Für die niedrigste Konzentration galt dies jedoch nicht. Hier wurde während 240 Minuten kein Gleichgewichtszustand erreicht (Anhang, Figure 1).

Unter dynamischen Bedingungen hatten im Fall von 11,1 µg f-WGA nach Inkubation über fünf Minuten bereits 70% der nach 240 Minuten als zellassoziiert detektierten Lektinmenge gebunden. Unter stationären Bedingungen konnte im Vergleich dazu lediglich eine Bindung von 47% detektiert werden. In Analogie dazu wurde auch bei niedrigeren f-WGA-Konzentrationen eine Beschleunigung der Interaktionsrate durch SAW-induzierte Konvektion beobachtet. Nach fünfminütiger Inkubation unter dynamischen Bedingungen hatten im Fall von 3,3 µg f-WGA bereits 65%, verglichen mit 35% unter stationären Bedingungen, der finalen Menge gebunden. Folglich konnte gezeigt werden, dass durch forcierte Konvektion insbesondere bei niedrigen Konzentrationen des Analyten eine Erhöhung der Empfindlichkeit und der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden kann (Anhang, Figure 1 und 2).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Bindung von mit WGA oberflächlich modifizierten Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Nanopartikeln an Caco-2 Zellen untersucht. Hierbei wurden wiederum stationäre und dynamische Untersuchungen parallel durchgeführt. Um die Nanopartikel fluorimetrisch quantifizieren zu können, wurde mittels einer Öl-in-Wasser (o/w) Solvent-Evaporation-Technik das Fluorophor Bodipy 493/503 in die PLGA Nanopartikel eingebaut.[10] PLGA ist ein von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassenes Polymer und bietet den Vorteil, biokompatibel und bioabbaubar zu sein. Die Teilchen wurden mit WGA modifiziert, um eine spezifische Bindung der Nanopartikel an den Caco-2 Zellschicht zu ermöglichen. Dazu wurde Weizenlektin kovalent mittels einer EDAC/NHS-Aktivestermethode an die Oberfläche der PLGA-Nanopartikel gekoppelt. Neben unvermeidbaren "unspezifischen" Interaktionen zwischen der Teilchenoberfläche und dem Caco-2 Monolayer sollten die Partikel dadurch hauptsächlich über die Lektinmoleküle an die zelluläre Glykokalyx binden. Die für diese Untersuchungen eingesetzten Teilchen waren

durch eine mittlere Partikelgröße von $137,3 \pm 2,37$ nm und ein Zetapotential von $-30,4 \pm 1,42$ mV charakterisiert. Caco-2 Monolayer, die sieben Tage lang kultiviert worden waren, wurden unter stationären und dynamischen Versuchsbedingungen mit 25 µg bzw. 50 µg WGA-Nanopartikel (WGA-NP) pro well inkubiert. Generell wurden dabei ähnliche Effekte wie bei den Experimenten mit f-WGA beobachtet. Nach fünfminütiger Inkubationszeit lagen unter stationären Bedingungen $0,09 \pm 0,03$ µg bzw. $0,66 \pm 0,04$ µg WGA-NP in zellassoziierter Form vor (Anhang, Figure 3). Im Vergleich dazu hatten unter dynamischen Bedingungen $0,33 \pm 0,02$ µg bzw. $1,06 \pm 0,02$ µg Nanopartikel gebunden (Anhang, Figure 4). Für eine Inkubationsdauer zwischen fünf und 240 Minuten wurde unter stationären Bedingungen ein nahezu linearer Anstieg der zellgebundenen Fluoreszenzintensität ohne Sättigungserscheinungen detektiert. Dieser Effekt konnte unter dynamischen Bedingungen nicht beobachtet werden. Hier erfolgte beim Einsatz von 50 µg WGA-NP nach 240 Minuten eine Gleichgewichtseinstellung.

Darüber hinaus wurde in einem zellfreien System die Bindung von Biotin-konjugierten Quantenpunkten an mit Avidin beschichtete Mikrotiterplatten untersucht. Die verwendeten Quantenpunkte bestehen aus einem CdSe-ZnS Kern, der über eine Polymerhülle direkt mit 5 – 7 Molekülen Biotin konjugiert ist. Die etwa 11 nm großen Quantenpunkte fluoreszieren aufgrund ihres Halbleiterkerns. Biotin ist durch eine hohe Bindungsaffinität zu Streptavidin und Avidin, einem tetrameren Glykoprotein aus Eiklar mit einem MG von ~66 kDa, charakterisiert. Für diese Untersuchungen wurden Mikrotiterplatten mit Avidin beschichtet und etwaige Restbindungsstellen auf der Polystyroloberfläche mit bovinem Serumalbumin (BSA) abgesättigt. Der Biotin-Avidin Komplex zeichnet sich durch eine äußerst geringe Dissoziationsrate von $7,5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ aus.[11] Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass

sich einmal gebundene Quantenpunkte während der Versuchsdauer von 240 Minuten nicht mehr von der Platte ablösen.

Mit Avidin beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit 0,1 pmol, 0,25 pmol bzw. 0,5 pmol biotinylierten Quantenpunkten unter stationären Bedingungen und in Gegenwart von SAW-induzierter Konvektion inkubiert. Unter stationären Bedingungen wurden nach fünf Minuten $0,009 \pm 0,007$ pmol, $0,012 \pm 0,007$ pmol bzw. $0,02 \pm 0,008$ pmol plattengebundene Partikel detektiert (Anhang, Figure 5). Die Bindung der Nanopartikel nahm mit fortschreitender Inkubationsdauer linear zu. Die Linearität ist hierbei deutlicher ausgeprägt als im Fall der Bindung von WGA-NP an Caco-2 Zellen. Mit forcierter Konvektion wurde beim Einsatz von 0,25 pmol bzw. 0,5 pmol Quantenpunkten nach fünf Minuten eine 3-fach bzw. 2,5-fach höhere Bindung beobachtet (Anhang, Figure 6). Im Fall der niedrigsten Konzentration (0,1 pmol) konnte nach fünf Minuten noch kein Unterschied zum stationären Versuchsaufbau festgestellt werden. Im weiteren Verlauf der Untersuchung ergab sich jedoch unter dynamischen Bedingungen eine erhöhte Bindung von biotinylierten Quantenpunkten. Nach einer Inkubationsdauer von 240 Minuten war 70% der ursprünglich eingesetzten Partikelmenge mit der Mikrotiterplattenoberfläche assoziiert. Ein Teil der restlichen 30% war darüber hinaus vermutlich an die ebenfalls mit Avidin beschichtete Wand des Mikrotiterplattenwells gebunden. Folglich kann von einer nahezu quantitativen Bindung der biotinylierten Quantenpunkte an die Avidin-beschichtete Polystyroloberfläche ausgegangen werden. Unter dynamischen Bedingungen konnte auch für Konzentrationen von 0,25 pmol bzw. 0,5 pmol eingesetzter Quantenpunkte nach 240 Minuten eine Sättigung der Oberfläche detektiert werden. Nach anfänglichen Unterschieden in der Bindung war die Interaktionsrate bei diesen beiden Konzentrationen ab einer Inkubationszeit von 30 Minuten annähernd vergleichbar. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass die maximale

Bindungskapazität für biotinylierte Quantenpunkte im vorliegenden System bei etwa 0,16 pmol liegt. Unter stationären Bedingungen wurden nach 240 Minuten nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration (0,5 pmol) ähnliche finale Bindungswerte verzeichnet. Um die Gleichgewichtskonzentrationen unter stationären Bedingungen jedoch exakt bestimmen zu können, müssten die Inkubationszeiten deutlich verlängert werden.

In einem Modellsystem für elektrostatische Interaktionen wurde die Bindung von carboxylierten, fluoreszierenden Polystyrolnanopartikeln mit einem Durchmesser von 100 nm an mit PLL bzw. BSA beschichtete Mikrotiterplatten untersucht. Durch die Adsorption von PLL wurden an der Oberfläche der Mikrotiterplattenwells positiv geladene Gruppen eingeführt. Im Gegensatz dazu sollten sich mit BSA beschichtete Mikrotiterplatten durch eine deutlich geringere Dichte an positiven Ladungsträgern auszeichnen. Nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten wurde die oberflächenassoziierte Teilchenmenge fluorimetrisch bestimmt. Erwartungsgemäß wurde auf albuminmodifizierten Oberflächen nur eine geringfügige Bindung von negativ geladenen Polystyrolnanopartikeln detektiert (Anhang, Figure 7, Supporting Information S.1). Im Gegensatz dazu war an PLL-beschichteten Oberflächen eine deutlich höhere Assoziation der Teilchen feststellbar. Mit forcierter Konvektion wurde nach 120 Minuten eine 3,5-fach, 2-fach bzw. 2-fach höhere Bindung, für eine eingesetzte Suspension aus 0,628 μl , 1,256 μl bzw. 3,768 μl Polystyrolnanopartikel pro Milliliter, verglichen mit stationären Inkubationsbedingungen, erreicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte experimentell belegt werden, dass durch forcierte Konvektion in Mikrotiterplattenassays erhöhte Bindungsraten verglichen mit stationären

Bedingungen erzielt werden. Bei Nanopartikeln wurde im stationären Aufbau ein verlangsamer linearer Anstieg der platten- bzw. zellassozierten Fluoreszenzintensität verzeichnet. Dieser Effekt wurde unter dynamischen Inkubationsbedingungen nicht beobachtet. Hier erfolgte in den meisten Fällen im Verlauf einer Inkubationsdauer von 240 Minuten eine Gleichgewichtseinstellung. Dies ist an einem Abflachen der Bindungskurve erkennbar. Generell belegen die erhaltenen Ergebnisse, dass SAW-induzierte Durchmischung von Mikrotiterplattenassays zu beschleunigten Reaktionsraten und erhöhter Sensitivität führen kann.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] T. Beumer, P. Haarbosch, W. Carpay. Convection during incubation of microplate solid phase immunoassay: effects on assay response and variation. *Analytical Chemistry*, 68:1375-1380, 1996.
- [2] M. Stenberg, H. Nygren. Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. *Journal of Immunological Methods*, 113:3-15, 1988.
- [3] A.J. Pesce, J.G. Michael. Artifacts and limitations of enzyme immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, 150:111-119, 1992.
- [4] J. Comley. Microplate mixing, bioassay panacea or of unproven distraction. *Drug Discovery World*, Winter Issue:35-46, 2007.
- [5] J.G. Teeguarden, P.M. Hinderliter, G. Orr, B.D. Thrall, J.G. Pounds. Particokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences*, 95:300-312, 2007.
- [6] V.E. Plattner, M. Wagner, G. Ratzinger, F. Gabor, and M. Wirth. Targeted drug delivery: Binding and uptake of plant lectins using human 5637 bladder cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(2):572–576, 2008.
- [7] S. Toegel, N. Harrer, V.E. Plattner, F.M. Unger, H. Viernstein, M.B. Goldring, F. Gabor, and M. Wirth. Lectin binding studies on c-28/i2 and t/c-28a2 chondrocytes provide a basis for new tissue engineering and drug delivery perspectives in cartilage research. *Journal of Controlled Release*, 117(1):121–129, 2007.
- [8] V.E. Plattner, B. Germann, W. Neuhaus, C.R. Noe, F. Gabor, and M. Wirth. Characterization of two blood-brain barrier mimicking cell lines: Distribution of lectin-binding

sites and perspectives for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1-2):34–41, 2010.

[9] F. Gabor, M. Stangl, and M. Wirth. Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines caco-2, ht-29 and hct-8. *Journal of Controlled Release*, 55(2- 3):131–142, 1998.

[10] C. Fillafer, D.S. Friedl, M. Wirth, F. Gabor. Fluorescent bionanoprobes to characterize cytoadhesion and cytoinvasion. *Small*, 4:627-633, 2008.

[11] U. Piran, W.J. Riordan. Dissociation rate constant of the biotin-streptavidin complex. *Journal of Immunological Methods*, 133:141-143, 1990.

ANHANG: Manuskript

Effect of forced convection on protein and nanoparticle binding in microplate assays

*Christian Fillafer, Regina Nowotny, Michael Wirth, Franz Gabor**

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics

Faculty of Life Sciences

University of Vienna

Vienna, Austria

*Corresponding author:

Prof. Dr. Franz Gabor

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Faculty of Life Sciences

University of Vienna

Althanstr. 14

1090 Vienna (Austria)

Phone: (+43)-1-4277-55406

Fax: (+43)-1-4277-9554

E-Mail: franz.gabor@univie.ac.at

ABSTRACT

The binding of proteins, conjugates and nanoparticles to cells and tissues is of particular interest in the development of targeted drug carrier systems. Typically, binding studies are performed in microplates. This allows for adequate throughput, compatibility with cell cultivation and automated readout with suitable photometers or fluorimeters. In most cases experiments are carried out under stationary conditions which has been suspected to decrease the sensitivity and response time of the assays. In order to improve these parameters, forced convection was applied to protein and nanoparticle binding assays in 96 well microplates. This was achieved with a non-invasive mixing technology based on surface acoustic waves (SAW). The interactions studied comprised wheat germ agglutinin (WGA) and WGA-conjugated nanoparticles on Caco-2 monolayers, biotinylated quantum dots on avidin-coated plates and negatively charged polystyrene nanoparticles on poly(L-lysine) (PLL)-coated plates. In all investigated systems forced convection was associated with higher binding rates and more rapid saturation of the adsorbent surface as compared to stationary conditions. Characteristically, these effects increased with a lower initial concentration of the analyte. In the case of WGA-binding to Caco-2 monolayers, for example, a 3-fold, 2.4-fold, and 1.3-fold higher mass of lectin was bound due to convection when the initial concentrations were 1.1 μg , 3.3 μg , and 11.1 μg respectively. The results obtained in the present study indicate that non-invasive SAW-mixing can clearly increase analyte transport to the adsorbent and thus has considerable potential for improving the reproducibility and sensitivity of microplate binding assays.

1. INTRODUCTION

Microplate-based biochemical assays represent some of the most commonly used analytical techniques in biomedical and pharmaceutical research. Since microplates contain a multitude of standardized reaction wells, analyses can be carried out reproducibly and with high throughput. This has facilitated screening and comparing the activity of compounds in cell or tissue models. Moreover, highly sensitive techniques such as enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) have been established for the quantitative detection of minute amounts of substance. In drug delivery research microplate assays are widely used to investigate the cell-binding properties of drug carriers and conjugates. This is especially relevant for the development of targeted formulations, which are engineered to specifically bind to a certain cell type. For this purpose high sensitivity of the assay is required since in most cases only low sample concentrations are available. Moreover, highly responsive assays are beneficial since they allow detecting even marginal differences in affinity. Another prerequisite that should be granted in order to facilitate comparison between samples is reproducibility of the assay response. Generally however, these analyses are carried out in a stationary setup which impedes sensitivity and reproducibility.[1] Under stationary conditions transport of analyte to the reactive interface at the bottom of the microplate well is mainly determined by diffusion and sedimentation. Since the latter is negligible for proteins and nanoparticles with a similar density like that of the aqueous test medium, diffusion will account for mass transport to the adsorbent. At this, it has to be taken into account that diffusion is a rather slow process over macroscopic distances and that the typical filling level of a microplate well is in the range of ≥ 1 mm. Thus, it becomes clear that a considerable portion of the analyte has a low probability of binding in this transport regime. If sterically

accessible targeters with high affinity are used, binding of the drug carrier system will occur rather rapidly once the formulation is in close proximity to the cell or tissue surface. As a consequence, the binding rate will be controlled by diffusional transport to the interface.[2] Mixing of the well content could overcome this limitation by increasing analyte flux towards the surface. Thereby, shorter incubation periods as well as higher assay sensitivity might be achieved.[1,3] Classically, convection is induced by external temperature gradients.[1] However, applicability of this method for cell assays is limited, since variations in temperature might induce changes in the membrane state and cellular metabolism. Furthermore, it has been found that mixing by thermal convection can not be achieved in a reproducible manner.[1] Alternatively, orbital shakers, magnetic stirrers, sonicators as well as surface acoustic wave (SAW)-mixers can be employed for stirring of the microplate well content.[4] The latter devices are compatible with cell-based assays and bear no risk of cross-contaminations due to the non-invasive mixing principle.[5] In the present study the effect of forced convection induced by SAW-mixing on reaction rates in 96 well microplate binding assays was studied. Wheat germ agglutinin (WGA) and WGA-conjugated nanoparticles served as pharmaceutically relevant model ligands with different hydrodynamic radius. Binding of these analytes to intestinal epithelial Caco-2 monolayers was investigated under forced convection and compared with stationary conditions. Additionally, the binding of biotinylated quantum dots to avidin-coated surfaces and the binding of negatively charged nanoparticles to poly(L-lysine) (PLL)-coated surfaces was studied.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BOD) and Qdot® 655 Biotin-Conjugate Kit were obtained from Molecular Probes (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA). Resomer® RG503H (PLGA; lactide/glycolide ratio 50:50, inherent viscosity 0.32-0.44 dl/g, acid number > 3 mg KOH/g) was acquired from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC), N-hydroxysuccinimide (NHS), Pluronic® F-68 (poloxamer 188), albumin from bovine serum (BSA), Poly-L-Lysine hydrobromide (90000 g/mol) and avidin from egg white (expressed in Corn, Affinity purified) were bought from Sigma Aldrich (Vienna, Austria). Unconjugated wheat germ agglutinin (WGA) isolated from *Triticum vulgare* and fluorescein-labelled wheat germ agglutinin (f-WGA) were purchased from Vector laboratories (Burlingham, USA). Fluoresbrite™ carboxy YG 0.10 micron microspheres were obtained from Polysciences Inc. (Polysciences Europe GmbH, Germany). All other chemicals used were of analytical purity.

2.2. Preparation of BOD-loaded PLGA-nanoparticles (BOD-NP)

The BOD-labelled PLGA-nanoparticles were prepared by an o/w solvent evaporation technique.[6] Briefly, 0.25 mg BOD and 400 mg PLGA were dissolved in 2 g ethyl acetate. This solution was emulsified with 6 g of a 10% aqueous solution of poloxamer 188 by sonication under water cooling for 50 s yielding the o/w emulsion (sonifier: Baldelin electronic UW 70/HD 70, tip: MS 72/D, Berlin, Germany), which was poured into 100 g of a 1% aqueous solution of poloxamer 188. After mechanical stirring (600 rpm) for 1 h at room temperature, the residual ethyl acetate was removed under reduced pressure. The final

particle suspension was filtered (1 µm pore size) in order to eliminate aggregates. All procedures were performed under protection from light to prevent photobleaching of the fluorophore.

2.3. Particle size and zeta potential analysis

Prior to all measurements the nanoparticle suspensions were diluted 1:20 with double distilled water. The mean particle size and size distribution were determined by dynamic light scattering on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). Zeta potential analyses were carried out at 25°C in triplicate in disposable folded capillary cells.

2.4. Protein coupling to the nanoparticle surface

WGA was conjugated to the nanoparticle surface by a commonly used carbodiimide-mediated coupling procedure. 20 ml of the nanoparticle suspension were purified twice with 40 ml of 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 (HEPES) using a tangential flow filtration system (Vivaflow 50; 100 000 MWCO PES, Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany) to adjust the pH and to eliminate PLGA monomers as well as non-encapsulated BOD. Subsequently, 240 mg EDAC dissolved in 750 µl HEPES and 10 mg NHS dissolved in 500 µl HEPES, were added to the suspension and incubated end-over-end for 2 h at room temperature. To remove excess cross-linking agents, the suspension was washed twice with 40 ml HEPES, the second time containing 0.3% poloxamer 188, followed by addition of 0.67 mg WGA in 1 ml HEPES. After end-over-end incubation overnight at room temperature, 300 mg glycine in 3 ml HEPES were added to saturate unreacted coupling sites during further incubation at room temperature for 1 h. Finally, the surface modified nanoparticles were

washed twice with 40 ml HEPES and once with HEPES containing 0.3% poloxamer 188 to remove excess coupling agents.

2.5. Cell culture

The Caco-2 cell line was purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and was used between passages 38 and 45. Tissue culture reagents were obtained from Sigma (St. Louis, USA) and Gibco Life Technologies Ltd. (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA). Cells were cultivated in RPMI 1640 cell culture medium containing 10% fetal calf serum, 4 mM L-glutamine and 150 µg/ml gentamycine in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C and were subcultured by animal origin free TrypLE Select (Gibco). For cultivation in 96 well microplates (tissue culture treated, Iwaki, Asahi Glass Co, Japan) 17000 cells were seeded into each well and cultivated for seven days until a confluent monolayer had formed.

2.6. Coating of microplates with avidin

96 well microplates (high-binding, Greiner Bio One GmbH, Austria) were coated with a 0.1 mg/ml solution of avidin in 100 mM Na₂CO₃/NaHCO₃ pH 10.0. 100 µl of this solution were added per well and the plate was incubated for 12 h at room temperature. Subsequently, the avidin solution was removed and potentially free binding sites were blocked by incubation with 100 µl of a 1 mg/ml solution of BSA in PBS pH 7.4 for 1 h at room temperature. Upon removal of the BSA solution, the plates were washed once with PBS and stored in PBS at 4°C until use.

2.7. Coating of microplates with poly(L-lysine) (PLL)

96 well microplates (high-binding, Greiner Bio One GmbH, Austria) were coated with a 1 mg/ml solution of PLL (MW ~90000 g/mol) in a 1 M aqueous solution of sodium chloride. In parallel, wells were coated with a 10 mg/ml aqueous solution of BSA in distilled water. 100 µl/well of these solutions were added and the microplate was incubated under constant shaking overnight at room temperature. To avoid evaporation of the coating solution, the microplates were sealed with parafilm. Subsequently, the coating solutions were removed and the microplates were washed thrice with 100 µl of distilled water per well. To block free binding sites, 100 µl of a 10 mg/ml aqueous solution of BSA were added per well and incubated for 60 min at room temperature under constant shaking. Finally, the wells were washed once with 100 µl of distilled water and stored in distilled water until used.

2.8. Mixing of analytes in microplate wells

In order to non-invasively mix the content of 96 well plates, a SAW-based microplate mixer (Advantix PlateBooster96, Beckmann Coulter Biomedical GmbH, Germany) was used. All experiments were carried out at 4°C. To enable transmission of the SAWs, 400 µl of water were spread over the instrument surface before the pre-cooled microplates were set on top.

2.9. Binding of f-WGA and WGA-BOD-nanoparticles to Caco-2 monolayers under stationary conditions and mixing

Fluorescein-labelled WGA (1.1 µg, 3.3 µg, and 11.1 µg per well in isotonic HEPES) and BOD-nanoparticles coated with WGA (25 µg and 50 µg per well in isotonic HEPES) were used as soluble ligand and ligand-conjugated nanoparticles respectively. Caco-2 monolayers were stored at 4°C for about 1h before removing the cell culture medium. Each well was

washed once with 100 µl of pre-cooled isotonic HEPES and subsequently 100 µl of the pre-cooled analyte solution were added. Following incubation under stationary and dynamic conditions for up to 240 min at 4°C, the Caco-2 monolayers were washed thrice with isotonic HEPES. The mean cell-associated fluorescence intensity was determined with a microplate reader (ex/em: 480/525nm, Tecan Infinite 200i, Tecan GmbH, Austria).

2.10. Binding of biotin-conjugated quantum dots to avidin-coated microplates under stationary conditions and mixing

100 µl containing 0.1 pmol, 0.25 pmol, and 0.5 pmol biotinylated quantum dots in HEPES were transferred to avidin-coated 96 well microplates. Following incubation for up to 240 min at 4°C and three washing steps with HEPES, the mean plate-associated fluorescence intensity per well was determined using a microplate reader (ex/em: 525/655nm).

2.11. Binding of negatively charged nanoparticles to PLL-coated microplates under stationary conditions and mixing

Microplates, which had been coated with PLL or BSA as control, were washed once with 100 µl HEPES per well. Afterwards, 100 µl of a 0.628 µl/ml, 1.256 µl/ml, and 3.768 µl/ml suspension of fluorescent carboxylated polystyrene nanoparticles (diameter: 100 nm) in HEPES were added per well. Subsequently, the plates were incubated for 30 min at 4°C under stationary conditions and mixing. After three washing steps with HEPES, the mean plate-associated fluorescence intensity per well was determined with a microplate reader (ex/em: 480/525nm).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. General considerations

In microplate assays mass transport of proteins and nanoparticles with a density close to that of the aqueous medium is controlled by diffusion. The diffusion coefficient (D) of a substance can be calculated from (1)

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta r} \quad (1)$$

where k_B is Boltzmann's constant, T is the temperature, η is the medium's viscosity, and r is the hydrodynamic radius of the particle. For proteins in an aqueous medium with a viscosity of $\sim 0.001 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at room temperature, D typically is in the order of magnitude of $\sim 1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ while for nanoparticles with a diameter of 100 nm it is $\sim 5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. The time scales involved in diffusive transport over macroscopic distances in one dimension can be estimated from (2)

$$\Delta t = \frac{\overline{\Delta S^2}}{2D} \quad (2)$$

with $\overline{\Delta S^2}$ as the 1-dimensional mean square displacement and Δt as the observation period. For a typical protein such as WGA and nanoparticles with a diameter of $\sim 100 \text{ nm}$ the mean time to travel 1 mm is about 80 min and 1670 min respectively. From this estimation it is obvious that in a diffusion-controlled regime the reaction rate at the adsorbent surface will be clearly different for proteins, conjugates and nanoparticles since their transport velocity differs by more than one order of magnitude. In the case of nanoparticles for pharmaceutical application, which are often larger than 100 nm and denser than water, sedimentation is expected to determine particle deposition aside from diffusion.[7] In equilibrium of friction and gravitation the sedimentation velocity v of a sphere can be calculated according to (3)

$$v = \frac{2}{9} \frac{g r^2 (\rho_s - \rho_l)}{\eta} \quad (3)$$

with g as the gravitational acceleration, ρ_s and ρ_l as the density of the sphere and liquid respectively. Consequently, in a sample of polydisperse particles those with larger radius will settle more rapidly leading to an inhomogeneous deposition profile over time. The latter as well as limited mass transport of analyte to the adsorbent surface could affect reproducibility, comparability and sensitivity of microplate assays.[1,3] SAW-mixing might serve as a means of eliminating sedimentation gradients and accelerating mass transport to the reactive interface especially since the transport velocities induced by forced convection clearly exceed those by diffusion or sedimentation.

3.2 . Binding of WGA and WGA-conjugated nanoparticles to Caco-2 monolayers

under stationary conditions and forced convection

a.) WGA

WGA from *triticum vulgare* is a dimeric protein with MW of ~36 kDa which possesses two high and two low affinity binding sites for N-acetyl-D-glucosamine and N-acetylneuraminic acid residues. It has been shown to bind to bladder cancer cells [8], chondrocytes [9], brain microvascular endothelial cells [10], as well as enterocyte-like cell lines such as Caco-2 cells.[11] This binding is due to specific interactions of the lectin with corresponding carbohydrates of the cells' glycocalyx. To investigate the association of WGA with intestinal epithelial cells under stationary and mixing conditions, Caco-2 monolayers cultivated in microplates were incubated with different amounts of fluorescein-labelled WGA (f-WGA). In order to grant reproducible conditions and a simple test system, all binding studies were carried out in isotonic buffer. Thereby, any potential cross-reactions of WGA with components of the cell culture medium were eliminated. As a consequence however the

duration of the experiments was limited since cells cannot be incubated in buffer indefinitely. Importantly, in course of the longest incubation period of 240 min, no morphological alterations of the Caco-2 monolayers were observed under stationary conditions and SAW-pumping. The binding rate of lectin molecules to the cell monolayer was determined by fluorescence intensity measurements. Binding of f-WGA results in an increase of cell-associated fluorescence that is proportional to the WGA mass. The proportionality to calculate the latter can be obtained from calibration curves. Since the incubation temperature in the experiments had been set to 4°C, cellular metabolism as well as active internalisation processes were reduced to a minimum. Thus, it can be expected that the chemical composition of the plasma membrane remained relatively uniform. Moreover, a removal of membrane-bound lectin molecules by uptake into the cells is precluded. As a consequence, it can be assumed that the adsorbent's binding capacity was widely constant in course of the experiment.

As expected, the amount of cell-bound lectin increased with duration of incubation and with the f-WGA concentration employed. Interestingly, different binding rates were observed under stationary and mixing conditions. Upon incubation for 5 min under stationary conditions, $0.05 \pm 0.01 \mu\text{g}$, $0.18 \pm 0.01 \mu\text{g}$, and $0.41 \pm 0.02 \mu\text{g}$ of f-WGA were determined to be cell-bound if 1.1 μg , 3.3 μg , and 11.1 μg of f-WGA had been added to the well respectively (Figure 1). As illustrated in Figure 2, mixing of the analyte solution in the well led to higher binding rates. Within 5 min the quantities of cell-associated f-WGA amounted to $0.15 \pm 0.01 \mu\text{g}$, $0.43 \pm 0.05 \mu\text{g}$, and $0.52 \pm 0.05 \mu\text{g}$ respectively for the lowest, medium, and highest concentration. This corresponds to a 3-fold, 2.4-fold, and 1.3-fold higher mass of WGA bound to the Caco-2 monolayer as compared to that under stationary conditions. With further incubation up to 240 min saturation of the binding sites at the cell membrane with f-WGA

occurred. This was indicated by the formation of a plateau in the binding curves (Figure 1 and 2). For 3.3 μg and 11.1 μg f-WGA employed the respective amounts of cell-bound f-WGA after 240 min were comparable for stationary incubation and mixing. Only in case of the lowest concentration of f-WGA, no saturation had occurred in the stationary setup (Figure 1). As to be expected from the reaction rates after 5 min, saturation was reached earlier with forced convection. At the highest concentration employed 70% of the f-WGA molecules that were cell-associated after 240 min had already bound within 5 min. In comparison, only 47% of the final amount of bound lectin had been cell-associated after 5 min if the experiment was conducted under stationary conditions. Similarly, also for the lower concentrations of f-WGA steeper slopes of the binding curves were observed when SAWs were employed to mix the analyte solution within the well. In case of 3.3 μg f-WGA added, 65% of the final amount of bound lectin had been cell-associated after 5 min as compared to 35% under stationary conditions.

Generally, SAW-mixing led to increased sensitivity of the WGA-binding assay and accelerated saturation of the surface with analyte. These effects were more prominent when lower concentrations of WGA were employed (Figure 1 and 2).

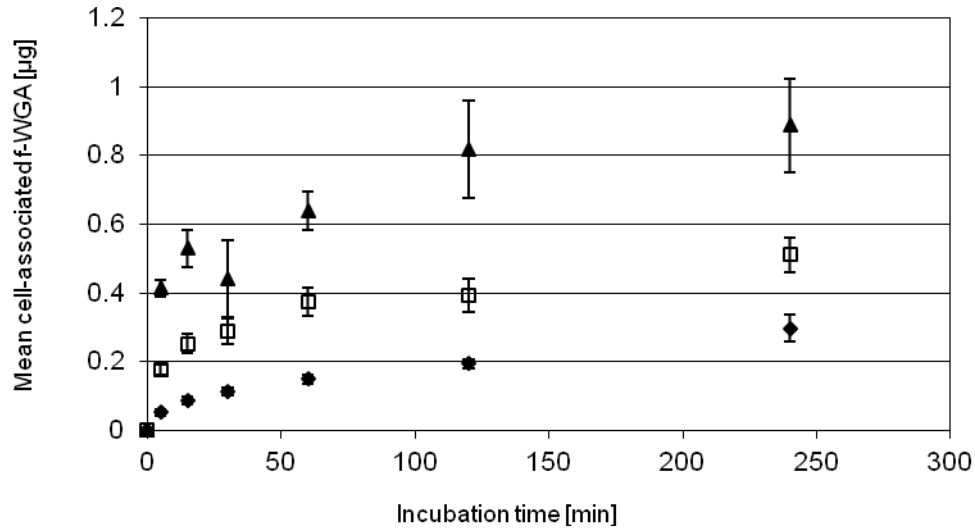


Figure 1. Mean cell-associated f-WGA on Caco-2 cells, incubated with 1.1 µg (◆), 3.3 µg (□), and 11.1 µg (▲)

f-WGA per well under stationary conditions

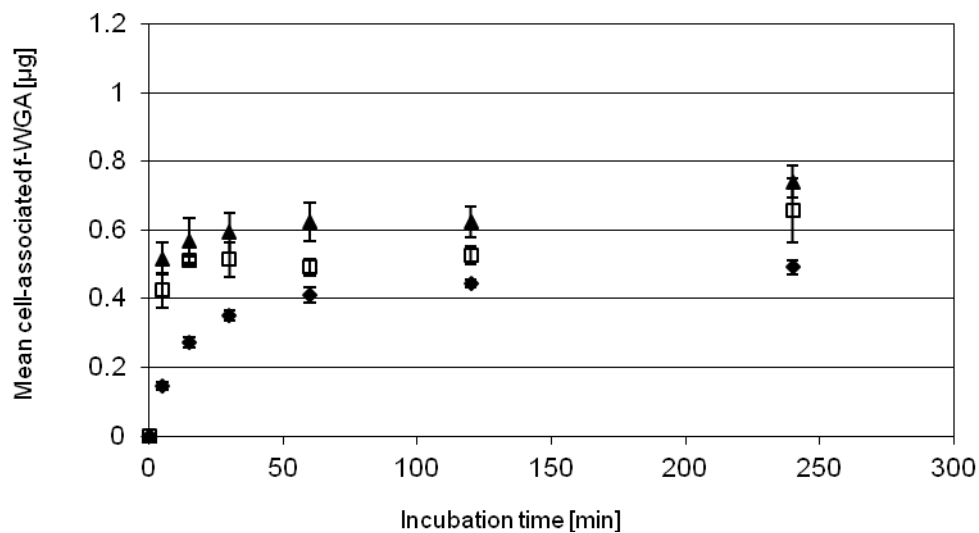


Figure 2. Mean cell-associated f-WGA on Caco-2 cells, incubated with 1.1 µg (◆), 3.3 µg (□), and 11.1 µg (▲)

f-WGA per well under dynamic conditions

b.) WGA-conjugated nanoparticles

For the present analysis it is assumed that a bond between one WGA molecule and the corresponding carbohydrate in the cellular glycocalyx suffices to immobilize a nanoparticle at the membrane. Upon initial adhesion further bonds might be formed which however only contribute to interaction strength but not to the reaction rate as observed by fluorimetry.

Moreover, it is likely that also nonspecific interactions between the polymer nanoparticle and the cell membrane contribute to binding. In order to render the nanoparticles detectable a fluorescence labelling technique relying on the fluorophore BOD was employed.[6] After production of the colloids by a solvent evaporation technique, WGA was covalently conjugated to the particle surface by an EDAC/NHS active ester method. As determined by dynamic light scattering, the fluorescent protein-modified nanoparticles had a mean diameter of 137.3 ± 2.37 nm and a zeta potential of -30.4 ± 1.42 mV. When incubated with Caco-2 monolayers under stationary conditions and mixing, similar results as for f-WGA were obtained. Upon incubation for 5 min under stationary conditions 0.09 ± 0.03 μ g and 0.66 ± 0.04 μ g of cell-associated nanoparticles were detected in case of 25 μ g and 50 μ g WGA-BOD-nanoparticles added to the well respectively (Figure 3). When the well content was mixed by the SAW-pump a steeper slope of the binding curves was observed (Figure 4). Within 5 min 0.33 ± 0.02 μ g and 1.06 ± 0.02 μ g of colloids had bound to the cell layer. Interestingly, after an initial surge of binding further association of particles with the cell membrane depended almost linearly on incubation time under stationary conditions. This was not the case with forced convection. After incubation for 240 min, saturation of the Caco-2 monolayer with WGA-BOD-NP was approached in case of 50 μ g added per well. If prolonged incubation in buffer had been possible, longer incubation times could have clarified whether saturation of the surface is generally reached at ~ 2.5 μ g WGA-BOD-NP.

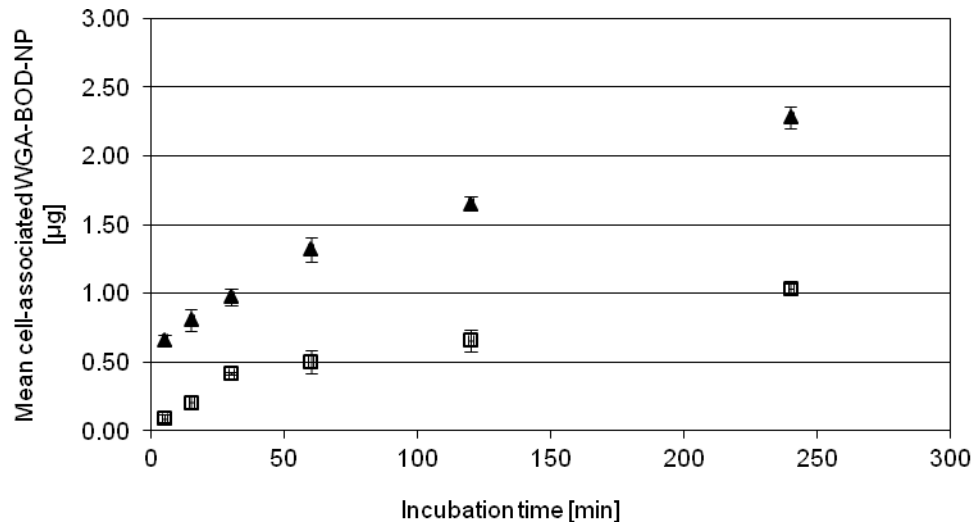


Figure 3. Mean cell-associated WGA-BOD-nanoparticles on Caco-2 cells, incubated with 25 µg (□) and 50 µg (▲) WGA-BOD-nanoparticles/well under stationary conditions

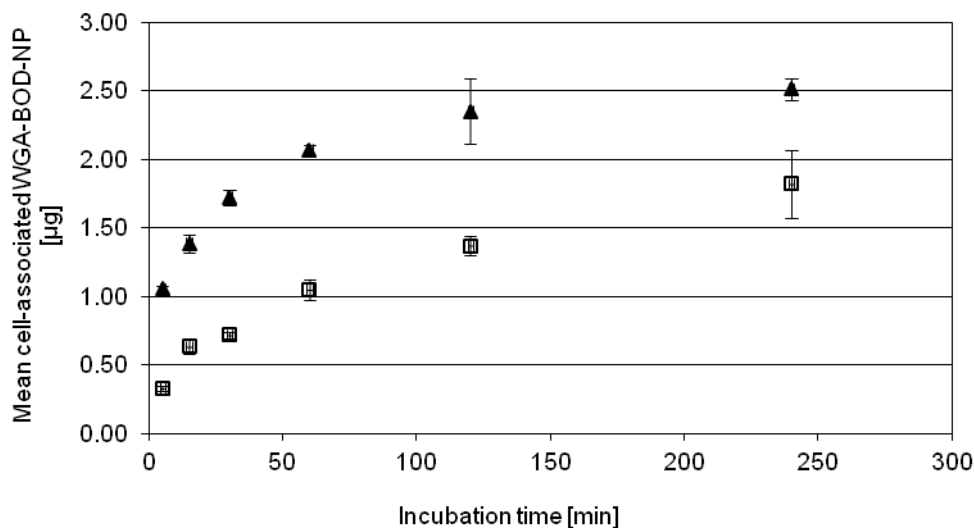


Figure 4. Mean cell-associated WGA-BOD-nanoparticles on Caco-2 cells, incubated with 25 µg (□) and 50 µg (▲) WGA-BOD-nanoparticles/well under flow conditions

3.3 . Binding of biotinylated quantum dots to avidin-coated microplates under stationary conditions and forced convection

The quantum dots used consist of CdSe-ZnS cores that are coated with a polymer shell. Due to specific properties of the semiconductor core, these particles fluoresce without additional labelling. The polymer shell of the quantum dots is directly conjugated with biotin leading to

nanoparticles with a mean diameter of 11 nm and 5 - 7 biotin molecules at their surface. Biotin is a low molecular weight coenzyme that binds to avidin and streptavidin with very high affinity. To investigate the binding rates of biotinylated quantum dots to avidin under stationary conditions and mixing, avidin-coated microplates were used. In order to reduce nonspecific binding of particles to the polystyrol surface, coating of the plate with avidin was succeeded by treatment with BSA. This is a standard procedure to block reactive sites that have not been covered by the initial coating step. The egg white avidin which was used is a basic tetrameric glycoprotein with MW of ~66 kDa that has four binding sites for biotin. The biotin-egg white avidin complex has a very low dissociation rate constant of $7.5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$. [12] As a consequence, once bound to avidin a biotinylated particle has a low probability of detaching from the surface within the maximum incubation period involved in the present experiments.

Upon incubation of avidin-coated microplates with 0.1 pmol, 0.25 pmol, and 0.5 pmol biotinylated quantum dots for 5 min under stationary conditions, 0.009 ± 0.007 pmol, 0.012 ± 0.007 pmol, and 0.02 ± 0.008 pmol particles were associated with the surface (Figure 5). After this initial surge, the amount of plate-associated fluorescence increased linearly with time as in the case of WGA-BOD-NP. This was underlined by coefficients of determination ≥ 0.98 obtained from fitting the data points with a linear equation. As indicated by the lack of plateau formation of the binding curves no saturation of the surface had occurred within 240 min. Similar to the results obtained with WGA, forced convection induced by the SAW-platform led to increased interaction rates (Figure 6). In case of 0.25 pmol and 0.5 pmol nanoparticles employed this was evident as a 3-fold and 2.5-fold higher binding after 5 min. When 0.1 pmol quantum dots were added per well, binding after 5 min was comparable to that under stationary conditions. However, in course of further incubation the amount of

plate-bound nanoparticles was at least 2-fold higher when SAWs mixed the assay. After 240 min, about 70% of the initially added biotinylated particles were associated with the well bottom for the lowest concentration employed. Considering the low dissociation rate constant of the avidin-biotin complex it seems possible that at this stage the solution had widely been depleted of quantum dots. It is likely that a considerable portion of the residual 30% of the particles was bound to the wall of the well. This surface is similarly coated with avidin and thus might also sequester nanoparticles. However, since the optical pathway of the fluorimeter passes through the centre of the well these particles are most likely not included in the fluorescence intensity measurement. In case of addition of 0.25 pmol and 0.5 pmol of biotinylated quantum dots, saturation of avidin with nanoparticles had occurred after 240 min (Figure 6). Although the slope of the binding curves of these two concentrations differs within the first 15 min of incubation, it ranges on a comparable level after 30 min and in spite of the difference in concentration the quantities bound after 240 min are quite similar. This indicates that the saturation concentration of biotinylated quantum dots at the well surface probably ranges at about 0.16 pmol. Under stationary conditions, a similar surface coverage was almost reached with the highest nanoparticle concentration employed. In order to determine the surface saturation concentration unambiguously, however, clearly longer incubation periods would have been required.

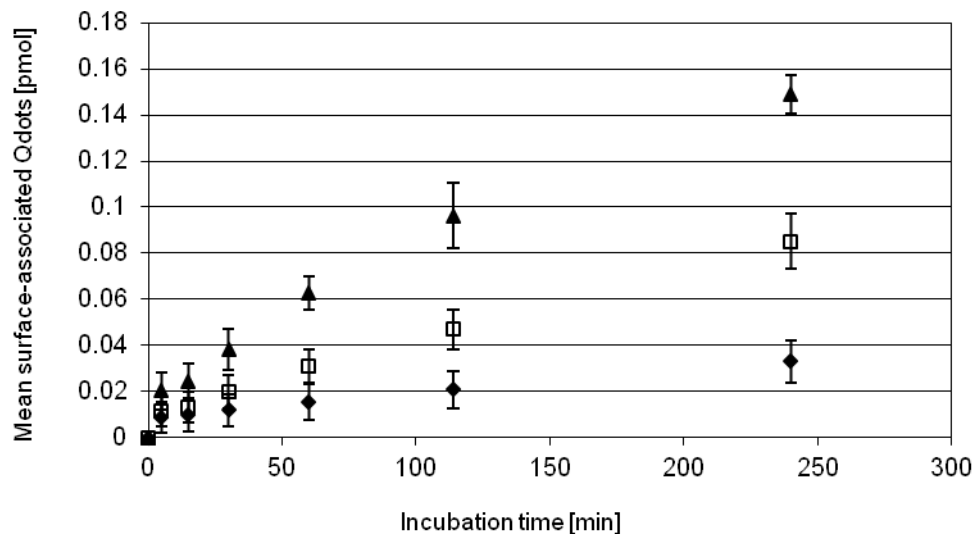


Figure 5. Mean Binding of 0.1 pmol (◆), 0.25 pmol (□), and 0.5 pmol (▲) biotin-conjugated quantum dots on avidin coated microplates under stationary conditions

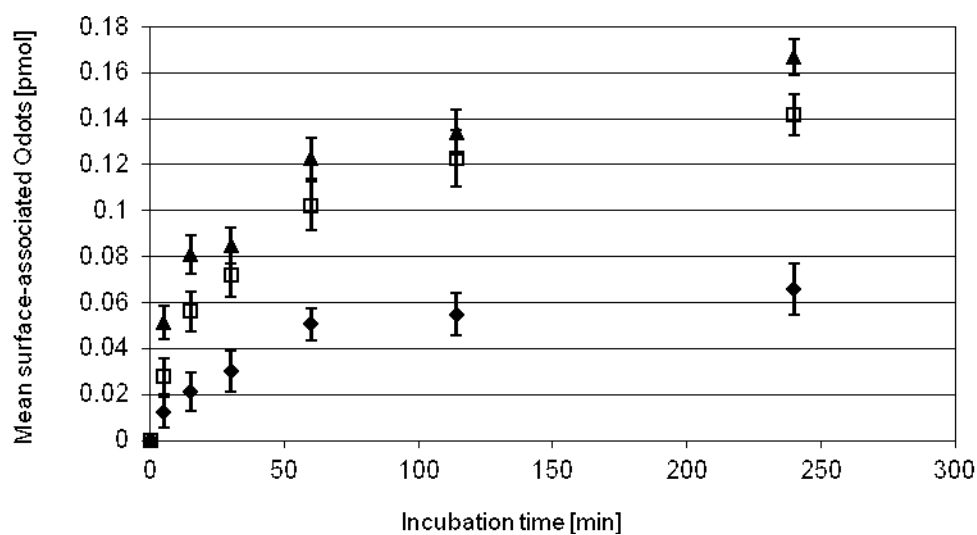


Figure 6. Mean Binding of 0.1 pmol (◆), 0.25 pmol (□), and 0.5 pmol (▲) biotin-conjugated quantum dots on avidin coated microplates under flow conditions

4. CONCLUSIONS

In the present study, the effect of forced convection on the interaction rates in microplate binding assays was investigated. At this, the content of microplate wells was stirred by a non-invasive mixing technology based on SAWs. This technique is easy to handle, compatible with cell monolayers and can operate with low analyte volumes. In all systems studied, forced convection led to higher binding rates as compared to incubation under stationary conditions (see Supporting Information S1 for nanoparticle binding to a charged microplate surface). Interestingly, after an initial surge of binding the amount of bound analyte varied linearly with incubation time in case of nanoparticles. This linearity was not given to a similar extent under dynamic conditions where binding approached a state of quasi-equilibrium rather quickly. Generally, the effect of forced convection on binding was more pronounced for low initial analyte concentrations. Saturation of the adsorbent was reached with a higher probability and within shorter time scales when the well contents were mixed. In sum, these results underline the high potential of forced convection for accelerating the response and for increasing the sensitivity of microplate assays.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank M. Sickert (Beckmann Coulter Biomedical GmbH, Germany) for providing a PlateBooster96.

SUPPORTING INFORMATION

S.1 Binding of fluorescent carboxylated polystyrene nanoparticles (diameter: 100nm) to PLL- or BSA-coated microplates under stationary conditions and forced convection

A coating procedure with the polycation PLL (MW of ~90 kDa) was employed to generate microplate wells with positively charged surface. As a control, wells were used that had only been treated with albumin from bovine serum (BSA). After incubation for 120 min a clearly higher plate-associated fluorescence intensity was observed in case of PLL-coated wells (Figure 7). Except for the highest concentration under stationary conditions, binding of nanoparticles to BSA-coated wells was only slightly above the buffer control and independent of concentration in the range tested. In contrast, in case of PLL-coated microplates forced convection induced by the SAW pump resulted in 3.5-fold, 2-fold, and 2-fold higher binding for the lowest, medium, and highest concentration of particles respectively as compared to stationary incubation.

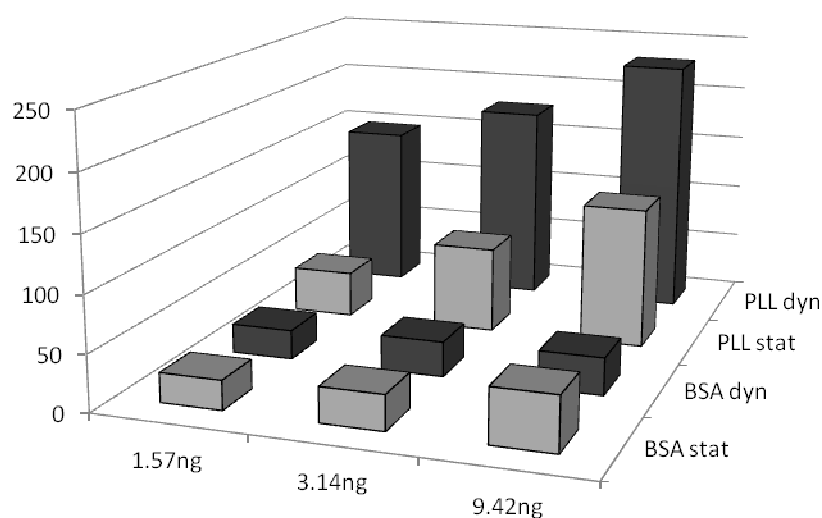


Figure 7. Relative plate-associated fluorescence intensity due to binding of fluorescent carboxylated polystyrene nanoparticles to PLL- or BSA-coated microplates under stationary conditions and mixing for 120 min.

REFERENCES

- [1] T. Beumer, P. Haarbosch, W. Carpay. Convection during incubation of microplate solid phase immunoassay: effects on assay response and variation. *Analytical Chemistry*, 68:1375-1380, 1996.
- [2] M. Stenberg, H. Nygren. Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. *Journal of Immunological Methods*, 113:3-15, 1988.
- [3] A.J. Pesce, J.G. Michael. Artifacts and limitations of enzyme immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, 150:111-119, 1992.
- [4] J. Comley. Microplate mixing, bioassay panacea or of unproven distraction. *Drug Discovery World*, Winter Issue:35-46, 2007.
- [5] C. Fillafer, G. Ratzinger, J. Neumann, Z. Guttenberg, S. Dissauer, I.K. Lichtscheidl, M. Wirth, F. Gabor, M.F. Schneider. An acoustically-driven biochip – Impact of flow on the cell-association of targeted drug carriers. *Lab on a Chip*, 9:2782-2788, 2009.
- [6] C. Fillafer, D.S. Friedl, M. Wirth, F. Gabor. Fluorescent bionanoprobes to characterize cytoadhesion and cytoinvasion. *Small*, 4:627-633, 2008.
- [7] J.G. Teeguarden, P.M. Hinderliter, G. Orr, B.D. Thrall, J.G. Pounds. Particokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences*, 95:300-312, 2007.
- [8] V.E. Plattner, M. Wagner, G. Ratzinger, F. Gabor, and M. Wirth. Targeted drug delivery: Binding and uptake of plant lectins using human 5637 bladder cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(2):572–576, 2008.
- [9] S. Toegel, N. Harrer, V.E. Plattner, F.M. Unger, H. Viernstein, M.B. Goldring, F. Gabor, and M. Wirth. Lectin binding studies on c-28/i2 and t/c-28a2 chondrocytes provide a basis for

new tissue engineering and drug delivery perspectives in cartilage research. *Journal of Controlled Release*, 117(1):121–129, 2007.

[10] V.E. Plattner, B. Germann, W. Neuhaus, C.R. Noe, F. Gabor, and M. Wirth. Characterization of two blood-brain barrier mimicking cell lines: Distribution of lectin-binding sites and perspectives for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1-2):34–41, 2010.

[11] F. Gabor, M. Stangl, and M. Wirth. Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines caco-2, ht-29 and hct-8. *Journal of Controlled Release*, 55(2- 3):131–142, 1998.

[12] U. Piran, W.J. Riordan. Dissociation rate constant of the biotin-streptavidin complex. *Journal of Immunological Methods*, 133:141-143, 1990.

LEBENS LAUF



Daten zur Person

Name: Regina Nowotny

Geburtsdatum/-ort: 01. Oktober 1985 in Wien

Eltern: Dr. Ingrid Nowotny, Allgemeinmedizinerin
Dr. Peter Nowotny, leitender Angestellter Siemens

Geschwister: Thomas (25) und Stephan (22)

Staatsbürgerschaft: Österreich

Schulbildung

09/91 - 06/95 Volksschule der Erzdiözese Wien, 1230 Wien

09/95 - 06/99 Gymnasium St. Ursula, 1230 Wien

09/99 - 06/03 Oberstufenrealgymnasium mit musikalischem Schwerpunkt
St. Ursula, 1230 Wien

Juni 2003 Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

10/03 - 09/12 Studium der Pharmazie, Universität Wien

Universitäre Tätigkeiten

April 2009	Vortrag auf der 21. Wissenschaftlichen Tagung der Österreichischen Pharmazeutischen Gesellschaft, Wien
WS 07/08 - SS 08	Tutorium der Lehrveranstaltung „Grundpraktikum aus pharm. Technologie“ am Institut der pharm. Technologie und Biopharmazie
WS 08/09 - WS 09/10	Tutorium der Lehrveranstaltung „Industrielle Arzneimittelherstellung“ am Institut der pharm. Technologie und Biopharmazie
SS 10 - SS 11	Tutorium der Lehrveranstaltung „Arzneimittelanalytik und Wirkstoffentwicklung“ am Institut der pharm. Chemie

Sonstiges

Seit 2007	Mitglied im Chor der Universität Wien
2009 – 2012	Betreuung des Messestandes der Pharmazie, BeSt Wien