



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7477

**Aufnahme und Transport von
Nanopartikeln in die Zelle:
Mechanismus und
toxikologische Aspekte**

N. Niemeier

Institut für Toxikologie und Genetik

April 2009

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-074778

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7477

**Aufnahme und Transport von
Nanopartikeln in die Zelle:
Mechanismus und toxikologische
Aspekte**

Nicole Niemeier

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH) genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2009

Aufnahme und Transport von Nanopartikeln in die Zelle: Mechanismus und toxikologische Aspekte

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von
Nicole Niemeier
aus Berlin
2009

19. Dezember 2008

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse
Referent: Prof. Dr. H. F. Krug
Korreferent: Prof. Dr. D. Marko
Tag der mündlichen Prüfung:

Ich versichere hiermit wahrheitsgemäß, die Arbeit bis auf die dem Aufgabensteller bereits bekannte Hilfe selbständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde.

Karlsruhe, den 6. Januar 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	11
2	Summary	13
2.1	Uptake and transport of nanoparticles into cells: mechanism and toxicological aspects	13
3	Abkürzungsverzeichnis	15
4	Einleitung	19
4.1	Nanotechnologie und Nanopartikel	21
4.1.1	Nanopartikel - Vorteile und Risiken	23
4.2	Silica Partikel	25
4.2.1	Herstellung	26
4.2.2	Technische Anwendung	26
4.3	Die Lunge - Hauptaufnahmeweg für Nanopartikel	27
4.4	Mechanismen der Partikelaufnahme in die Zelle	28
4.4.1	Endozytose allgemein	29
4.4.2	Phagozytose	31
4.4.2.1	Fc-Rezeptor (FcR) vermittelte Phagozytose	32
4.4.2.2	Komplement-Rezeptoren (CR) vermittelte Phagozytose	34
4.4.2.3	Mannose-Rezeptoren (MR) vermittelte Phagozytose	35
4.4.2.4	Scavenger-Rezeptoren (ScR) vermittelte Phagozytose	37
4.4.3	<i>Clathrin coated pits</i> vermittelte Endozytose	38
4.4.4	Caveolae vermittelte Endozytose	40
4.5	Wirkung von Partikeln auf zellulärer und molekularer Ebene	41
4.5.1	Oxidativer Stress	41

4.5.2	Kernlokalisierung und Topoisomerasebeeinträchtigung	42
4.6	Zielsetzung der Arbeit	43
5	Material und Methoden	45
5.1	Chemikalien und Lösungen	45
5.2	Laborgeräte und Programmsoftware	46
5.3	Zellkultur	46
5.3.1	Die Epithel-Zelllinie A549	48
5.3.2	Die Endothel-ähnliche Zelllinie ECV304	49
5.3.3	Die Monozyten-Zelllinie THP-1	49
5.3.3.1	Differenzierung von THP-1 Zellen	50
5.3.4	Zellzahlbestimmung	50
5.3.5	Langzeitkonservierung	50
5.3.6	In-Kulturnahme der Zellen	51
5.4	Partikel	52
5.4.1	Partikelcharakterisierung	52
5.5	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	53
5.5.1	Probenpräparation	54
5.5.1.1	Fixierung und Entwässerung	54
5.5.1.2	Einbettung in Epoxidharz (EPON 812)	55
5.5.1.3	Ultamikrotomie und Transmissionselektronenmikroskopie	55
5.6	Messung der Zellvitalität und Proliferationsaktivität	57
5.6.1	Zellzahl	57
5.6.2	MTT Test	58
5.6.3	WST-1 Test	60
5.6.4	LDH Test	61
5.6.5	Zellproliferation-Messung mittels ELISA (BrdU)	63
5.7	Bestimmung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies	64
5.7.1	DCF Test	64

5.7.2	DHR123 Test	65
5.7.3	DTNB Test	66
5.8	Durchflusszytometrische Bestimmung der Partikelaufnahme	68
5.8.1	Messtechnik	68
5.8.2	Praktische Durchführung	70
5.8.3	Studien zur Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit	70
5.8.4	Studien zur Energieabhängigkeit der Aufnahme . .	71
5.8.4.1	Hemmung der Partikelaufnahme durch tiefe Temperaturen	71
5.8.4.2	Hemmung der Atmungskette mit Dinitrophenol	72
5.8.5	Inhibition der Aufnahmewege in die Zelle	73
5.9	Methoden zur Proteinanalytik	73
5.9.1	Herstellung von Ganzzellextrakten	73
5.9.2	Proteinbestimmung	74
5.9.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	75
5.9.4	Western Blotting durch Elektrotransfer	77
5.9.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen	78
5.10	Immunfluoreszenzmikroskopie	79
5.10.1	Fixierung der Zellen	79
5.10.2	Fluoreszenzfärbung durch Antikörperbindung . . .	80
5.10.3	Kernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) . . .	80
5.10.4	Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit Rhodamin Phalloidin	81
5.11	Methoden zur DNA-Analytik	81
5.11.1	RNA Isolierung	81
5.11.2	Umschreibung der RNA in c-DNA mittels Reverser Transkriptase	83
5.11.3	Detektion spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR	84

5.12	Studien zur Aufnahme trojanischer Peptoide	86
5.13	Statistische Auswertung	89
6	Ergebnisse	91
6.1	Partikelcharakterisierung	91
6.1.1	Berechnung der Partikelanzahl und Gesamtoberfläche	92
6.1.2	Zetapotenzial und Größenverteilung	92
6.1.2.1	Größenverteilung	93
6.1.2.2	Zeta Potenzial	94
6.1.3	TEM Aufnahmen der Silica Partikel	95
6.2	Akute Toxizität nach Partikelexposition	96
6.2.1	Bestimmung der Zellvitalität mittels Zellzählung .	96
6.2.2	Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des WST-1 Tests	97
6.2.3	Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des MTT Tests	100
6.2.4	Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des LDH Tests	102
6.2.5	Messung der Zellproliferationsaktivität mittels ELISA (BrdU)	103
6.3	Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	104
6.3.1	DCF Test	104
6.3.2	DHR123 Test	106
6.3.3	DTNB Test	107
6.4	Durchflusszytometrische Aufnahmebestimmung	108
6.4.1	Konzentrationsabhängigkeit	109
6.4.2	Zeitabhängigkeit	111
6.4.3	Studien zur Energieabhängigkeit der Aufnahme . .	112
6.4.3.1	Aufnahmeinhibition durch Kälte	112
6.4.3.2	Aufnahmeinhibition durch Dinitrophenol	113

6.4.4	Inhibition der verschiedenen Aufnahmewege in die Zelle	114
6.4.4.1	Inhibition der Phagozytose allgemein . . .	117
6.4.4.2	Inhibition der Phagozytose Rezeptoren . .	118
6.4.4.3	Inhibition der Fc γ -Rezeptor (Fc γ R) vermittelten Phagozytose	118
6.4.4.4	Inhibition der Komplement-Rezeptor (CR) vermittelten Phagozytose	119
6.4.4.5	Inhibition der Mannose-Rezeptor (MR) vermittelten Phagozytose	121
6.4.4.6	Inhibition der Scavenger-Rezeptor (ScR) vermittelten Phagozytose	122
6.4.4.7	Inhibition der <i>Clathrin coated pit</i> vermittelten Endozytose	124
6.4.4.8	Inhibition der Caveolae vermittelten Endozytose	125
6.5	Proteinnachweis mittels RT-PCR	128
6.5.1	Nachweis der Phagozytose Rezeptoren auf RNA Ebene	129
6.5.2	Nachweis Clathrin und Caveolin I auf RNA Ebene	130
6.6	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Silica Nanopartikel	131
6.7	TEM Nachweis und Lokalisation von Silica Partikeln . . .	133
6.8	Untersuchungen zur Degradation des nukleären Enzyms Topoisomerase I	137
6.8.1	Messung des Topoisomerase I Gehalts mittels Western Blot	138
6.8.2	Topoisomerase I Detektion mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	140
6.9	Toxizität und Aufnahmeverhalten trojanischer Peptide . .	144
7	Diskussion	149
7.1	Charakterisierung der Silica Nanopartikel	153

7.2	Partikeldosis-Relevanz und akute Toxizität	155
7.3	Kein Einfluss auf das Zellwachstum durch Silica Nanopartikel	157
7.4	Oxidativer Stress	158
7.5	Aufnahme von Partikeln in Zellen und Kernlokalisierung .	160
7.5.1	Heterogenität der unterschiedlichen Zelllinien und Nanopartikel	162
7.5.2	Aufnahmewege der Silica Nanopartikel in verschiedene Zelllinien	163
7.5.2.1	Energieabhängige Aufnahmeprozesse und Aktinbeteiligung	164
7.5.2.2	Phagozytotischer Mechanismus der Silica Nanopartikel Aufnahme	167
7.6	Kernlokalisierung und Auswirkungen auf nukleäre Proteine	171
7.7	Nanopartikel als Wirkstofftransporter in der Medizin . . .	172
8	Abbildungsverzeichnis	177
9	Tabellenverzeichnis	181
10	Literaturverzeichnis	183
11	Veröffentlichungen	203
12	Lebenslauf	205
13	Danksagung	207

1 Zusammenfassung

Das Zeitalter der Nanotechnologie bietet viel versprechende neue Möglichkeiten für Industrie und Forschung. Die Anwendung von Nanostrukturen als Vehikel für gezielte medizinischen Wirkstofftransporte in den Körper ist hierbei Gegenstand der aktuellen medizinischen Forschung. Die Aufnahmewege für Nanopartikel in die Zelle sind hierbei von größter Bedeutung.

In dieser Studie lag daher das Hauptaugenmerk auf den Mechanismen der Aufnahme von synthetischen, amorphen Silica Nanopartikel in verschiedenen Zelltypen.

Als Modellpartikel wurden Silica Partikel in vier verschiedenen Größen (20, 50, 70 und 200 nm) gewählt.

Außerdem wurden, als weiteres Beispiel für synthetische Nanostrukturen, die in der Medizin zum Einsatz kommen sollen, verschiedene peptoidische Transporter auf ihre Toxizität, Fähigkeit zur Zell- und Zellkernpenetration durch Verwendung unterschiedlicher Seitenketten (Guanidinyll oder Amino) hin untersucht.

Als Zellmodell wurden Zelllinien gewählt, die charakteristisch für den Aufbau der menschlichen Lunge sind (A549, ECV304, THP-1), da aufgrund der großen Oberfläche die Lunge als einer der Hauptaufnahmewege für Nanopartikel in den Körper gilt und die nicht invasive Verabreichung von Medikamenten durch Inhalation Gegenstand wissenschaftlichen Interesses ist.

Mit Hilfe von molekularbiologischen, durchflusszytometrischen, fluoreszenz- und transmissionselektronischenmikroskopischen Techniken konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden.

Silica Nanopartikel und peptoidischen Transporter zeigten in biologischen Systemen keine akute Toxizität oder Auswirkungen auf die Proliferationsaktivität.

Eine Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Silica Partikel konnte nicht gezeigt werden.

Alle Partikel und Peptide penetrieren Zellen verschiedensten Typs in einer konzentrations- und zeitabhängigen Art und Weise.

Die Silica Partikel lokalisierten in zytoplasmatischen, membrangebundenen Vesikeln und lamellaren Körpern, konzentriert in der Nähe des

Zellkerns, wurden aber nicht in ihm oder in anderen Zellorganellen gefunden. Desweiteren zeigten sie keine negativen Effekte auf das nukleäre Enzym Topoisomerase I.

Der Aufnahmemechanismus, der beschrieben wurde, war abhängig vom Grad der Agglomeration der Partikel und somit von der Größe dieser Agglomerate.

Primärpartikel, die die Zelle erreichen, in diesem Fall die 200 nm Partikel, nahmen hauptsächlich den Weg der Clathrin vermittelten Endozytose.

Partikelagglomerate im Mikrometerbereich wurden über phagozytische Mechanismen internalisiert. Zelltypabhängig waren hier die Scavenger- Komplement- und $Fc\gamma$ -Rezeptoren beteiligt, abhängig davon, welche der genannten Rezeptoren in der jeweiligen Zelllinie vorhanden waren. Die peptoidischen Transporter zeigten aufgrund ihrer geringen Größe eine sehr schnelle Aufnahme in die untersuchten Zellen, und die Wahl der an das Peptoid angehängten Seitenketten machten sogar eine Penetration in den Zellkern möglich.

Somit erscheinen die Silica Partikel und peptoidischen Transporter als medizinische Wirkstofftransporter geeignet. Allerdings ist eine genaue Charakterisierung der Partikel für den Einsatz in biologischen Systemen unumgänglich, um die gewünschte Partikelgröße einsetzen zu können. Die hier gefundenen Erkenntnisse zu den Aufnahmewegen machen, über eine Funktionalisierung der Partikeloberfläche, die gezielte und schnelle Aufnahme in Zellsysteme möglich.

Diese Erkenntnisse eröffnen die Möglichkeit eines gezielten Wirkstofftransports in ganz bestimmte Zellkompartimente und vergrößern das Potential der nutzbaren Transportsysteme und deren pharmazeutische Anwendung.

2 Summary

2.1 Uptake and transport of nanoparticles into cells: mechanism and toxicological aspects

The age of nanotechnology offers promising new applications for industry and research. The use of nanostructures as a vehicle for targeted drug transport is a current topic in biomedical research. Here, the uptake mechanisms for nanoparticles into cells are of great importance.

In this study, we focused on the mechanisms of uptake of synthetic, amorphous silica nanoparticles into different cell types. Silica particles of four different sizes (20, 50, 70 and 200 nm) were used. Moreover, as an example of synthetic nanostructures which may be applied clinically, peptoidic carriers have been examined with regard to their toxicity and their ability to penetrate cells and the nucleus due to use of different side chains (guanidinyl or amino).

Cell lines have been used which are typical for the human lung (A549, ECV304, THP-1), because the lung is supposed to be one of the main portals of entry for nanoparticles due to its large surface; moreover the non-invasive application of drugs via inhalation is of scientific interest.

Using biomolecular and flow-cytometrical techniques as well as fluorescence- and transmission electron microscopy, the following results have been obtained.

Silica nanoparticles and peptoidic carriers showed no acute toxicity to biological systems nor affected proliferation. Induction of reactive oxygen species by silica nanoparticles could not be demonstrated.

All particles and peptoids penetrate different cell types in a concentration- and time-dependent manner.

Silica particles are localized to cytoplasmic, membrane-bound vesicles and lamellar bodies, mainly close to the nucleus, but never inside the nucleus or other organelles. Furthermore, they displayed no impairment of the nuclear enzyme topoisomerase I.

The chosen uptake mechanism was dependent on the state of agglomeration of the particles and of the size of these agglomerates.

Primary particles entering the cell (in this case the 200 nm particles) mainly chose clathrin-mediated endocytosis.

Agglomerates ranging in the micron size were internalized via phagocytic mechanisms. Depending on the cell type, scavenger-, complement- and Fcy-receptors were involved (dependent on the existence of these receptors in the respective cell lines). Peptoidic carriers were, due to their small size, taken up very rapidly into the examined cells, and the right choice of side chains enabled penetration of the nucleus.

Thus, silica particles and peptoidic carriers are suitable as drug carriers. However, a comprehensive characterisation of the particles is indispensable before the use in biological systems, in order to use the right size. The results on uptake mechanisms described herein enable fast and targeted uptake into cell systems by functionalisation of the particle surface.

These results provide the possibility of targeted drug delivery into specific cell compartments and enlarge the potential of usable transport systems and their pharmaceutical application.

3 Abkürzungsverzeichnis

50C	50 nm Silica Nanopartikel funktionalisiert mit Carboxylgruppen
70P	70 nm Silica Nanopartikel der Firma Postnova
A549	Humane Alveolarepithelzelllinie
AM	Alveolarmakrophagen
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CR	Komplement-Rezeptor(en)
CRD	C-Typ Lektin-Kohlehydrat-Erkennungseinheiten (<i>Carbohydrat recognition domains</i>)
Cyt-D	Cytochalasin-D
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate
DEP	<i>Diesel Exhaust Particles</i>
DHR123	Dihydrorhodamin 123
DMEM	Zellkulturmedium (<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	2,4-Dinitrophenol
ECL	verstärktes Chemilumineszenzsystem (<i>Enhanced Chemiluminescence</i>)
ECV304	Humane endothelähnliche Zelllinie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoreszein-isothiozyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward light scatter angle</i>)
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (<i>Hank's buffered salt solution</i>)

HDL	<i>High Density Lipoproteine</i>
hiFCS	hitzeinaktiviertes FCS
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
ICP-MS	Induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
Ig	Immunglobuline
ITAM	Immunglobulin-Tyrosine-Activation Motif
ITIM	Immunglobulin-Tyrosine-Inhibitory Motif
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>Low Density Lipoproteine</i>
M199	Zellkulturmedium (Medium 199)
MARCO	Makrophagen Rezeptor mit (c)Kollagener Struktur
M- α -D-MP	Methyl- α -D-mannopyranosid
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
MR	Mannose-Rezeptor
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NF- κ -B	Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor- κ B
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphat bufferd saline</i>)
PBS-/-	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein-Kinase C
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol(PI)3-Kinase
PMA	Phorbol-12-Myristol-13-acetat
p-Nitro	p-Nitro-phenyl-methyl-disulfid
PolyG	Polyguanyl Säure (<i>Polyguanylic Acid</i>)
PolyI	Polyinosin Säure (<i>Polyinosinic Acid</i>)
PVDF	Polyvinylidendifluorid

RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt im Roswell Park Memorial Institute, USA)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverses Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
ScR	Scavenger-Rezeptor(en)
SDS	Natrium(Sodium)dodecylsulfat
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SiO ₂	Siliciumdioxid
SOD	Superoxiddismutase
Src	Sarcoma
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side light scatter angle</i>)
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THP-1	Humane Makrophagenzelllinie
TNF- α	Tumor Nekrosefaktor- α
TPA	12-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	20 Polyoxyethen-sorbitan-monolaurat
UFP	Ultrafeine Partikel
ÜN	über Nacht
v/v	Volumenanteil pro Volumen
WST-1	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

„There is plenty of room at the bottom!“ (1959)
Richard Phillips Feynman (1918 - 1988)
amerikanischer Physiker und Nobelpreisträger
für Physik (1965)

4 Einleitung

Während der gesamten Evolution des Menschen war dieser einer Exposition mit nanoskaligen Materialien aus natürlichen Quellen ausgesetzt. In Form von ultrafeinen Stäuben entstammen diese z. B. Vulkanausbrüchen, Waldbränden oder Sandstürmen. Diese natürliche Belastung erhielt im Laufe der menschlichen Entwicklung, und ganz besonders seit Beginn der industriellen Revolution, Zuwachs durch Partikel anthropogenen Ursprungs, wie z. B. durch Rußpartikel aus Verbrennungsmotoren, Hausfeuerung oder dem Straßenverkehr (Oberdörster et al., 2005).

In den letzten zwei Jahrzehnten entwickelte sich eine neue, anwendungsbezogene Technologie, die mittlerweile als eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts gilt, die Nanotechnologie. Dieser neue Zweig der Wissenschaft und Industrie beschäftigt sich damit, neue Materialien und Techniken auf dem nanometer Level (10^{-9} m) zu entwickeln, die unser Leben auf vielfältige Weise positiv beeinflussen sollen und schon beeinflussen. Solche Materialien kommen in so unterschiedlichen Konsumprodukten wie Sonnencreme, Autopolitur, Druckertonern, Tennisschlägern oder auch als Zusatz in Sportkleidung vor. Außerdem werden sie bei vielen industriellen Prozessen, wie dem Bau von Halbleiterelementen oder aber auch im medizinischen Bereich wie der Diagnostik oder Wirkstoffapplikation verwendet (Hoet et al., 2004; Nel et al., 2006). Diese neue Technologie bietet ungeahnte und neue Anwendungsmöglichkeiten für altbekannte Materialien, bedingt durch chemische und physikalische Eigenschaften, die erst durch eine Manipulation auf der Nano-Ebene auftreten. Der Fantasie scheinen keine Grenzen mehr gesetzt. Pläne für einen „Fahrstuhl ins Weltall“ (<http://www.nasa.gov/>) mit Hilfe von neuen, superleichten

ten aber unglaublich zugfesten, Carbonstrukturen, den sogenannten *Carbon Nanotubes*, stehen bereits zur Diskussion. Und, obwohl solche Vorstellungen in den Bereich der *Science Fiction* gehören, führte die Veröffentlichung des Romanes „Prey“ von Michael Crichton (1942-2008) indem Nanoroboter, die, so wie in diesem Buch beschrieben, gar nicht realisierbar sind, außer Kontrolle geraten und das menschliche Leben zu vernichten drohen, bereits zu ersten Debatten über die Gefahren der Nanotechnologie in der Weltpresse.

Eine ernstzunehmende und ganz reale Bedrohung ist aber nicht von der Hand zu weisen. Durch die Entwicklung synthetisch hergestellter Nanostrukturen, die bewusst eingesetzt werden und nicht, wie andere Partikel anthropogenen Ursprungs, als ungewolltes Nebenprodukt durch z. B. Verbrennungsprozesse entstehen, stieg und steigt die Belastung für Mensch und Umwelt, nochmals an (Moore, 2006; Kreyling et al., 2003).

Die Exposition mit solchen Nanoobjekten kann über dieselben Wege erfolgen, die auch schon für Umweltpartikel gezeigt wurden. Der Mensch kann hierbei, je nach Produkt und Art der Applikation, sowohl über die Haut, als auch über den Gastrointestinalen Trakt und ganz besonders über den Weg der Inhalation mit Nanopartikeln in Kontakt kommen (siehe Abbildung 1).

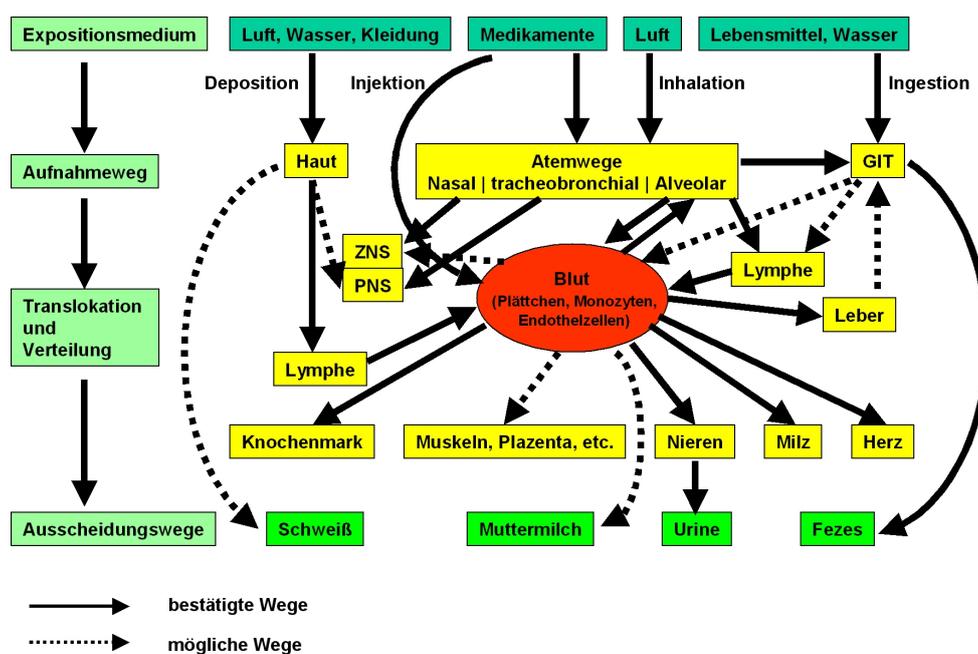


Abbildung 1: Biokinetische Wege von Nanopartikeln im menschlichen Organismus (verändert nach Oberdörster et al., 2005b).

Die Gesundheitsgefährdung durch Partikel im Nanometerbereich ist bereits schon länger bekannt (Clouter et al., 2001; Donaldson & MacNee, 2001; Limbach et al., Petersen et al., 1997; 2007; Wottrich et al., 2004) und besonders die arbeitsplatzbezogene Exposition mit synthetischen Nanostrukturen ist beachtenswert, und, obwohl es schon einige Studien zu ultrafeinen Stäuben am Arbeitsplatz gibt (Borm & Tran, 2002; Castranova & Vallyathan, 2000; Kuempel et al., 2003), existieren bisher nur wenige gesicherte Studien über diese neue Belastung (Chalupa et al., 2004; Hameri et al., 2003; Kuhlbusch et al., 2004; Kuhlbusch & Fissan, 2006; Soto et al., 2007).

Neben den vielen Vorteilen und Perspektiven, die die Nanotechnologie bereits bietet und in Zukunft zu bieten verspricht, darf man ein mögliches Gefahrenpotential durch synthetische Nanopartikel nicht aus den Augen verlieren. Einige Arbeitsgruppen beschäftigen sich auch schon seit etlichen Jahren mit diesem Thema (Desai et al., 1997; Völkel et al., 2003; Wottrich et al., 2004). Mit dem Fortschritt in Technik und Medizin kommen allerdings ständig neue Materialien auf dem Nanometerlevel hinzu und so müssen *in vitro* und *in vivo* Studien erfolgen, um die Aufnahme in biologische Systeme und eine mögliche Toxizität dieser neuen Werkstoffe einschätzen zu können.

4.1 Nanotechnologie und Nanopartikel

Aber was genau versteht man unter dem Begriff Nanotechnologie und was sind Nanopartikel?

Der Begriff „Nano“ kommt aus dem griechischen und bedeutet „Zwerg“ und diesem Namen folgend beschäftigt sich die Nanotechnologie mit Materialien im Nanometerbereich, also im Bereich von 10^{-9} m. Sie löst damit die Mikrotechnologie des 20. Jahrhunderts ab, die vor allem die Computerchipproduktion revolutioniert hat.

Aber die Nanotechnologie ist keine Erfindung des letzten Jahrhunderts. Der Mensch nutzt, unbewusst, Nanopartikel und ihre Eigenschaften schon seit über zweitausend Jahren. So z. B. verwendeten die alten Römer Tischdecken aus Asbestfasern, Nanofasern, die sie nach dem Mahl einfach ins Feuer warfen und die, dank ihrer schweren Entflammbarkeit, daraus steril und sauber wieder hervor geholt wurden (Austin & Lim, 2008). Ein weiteres Beispiel für die Nutzung von Nanomaterialien sind die, bereits im Mittelalter geschaffenen, roten Bildelemente in

Kirchenfenstern, die ihre brillante Farbe der Verwendung von Nanogoldpartikeln als Farbpigmente verdanken.

Unter dem Begriff Nanotechnologie vereinen sich heutzutage eine große Bandbreite von Technologiebereichen, die sich mit der bewussten Produktion, Messung und Manipulation von Materialien, Oberflächen und Strukturen beschäftigt, die größenmäßig in mindestens einer Dimension zwischen einem und 100 nm liegen (ASTM Int. Standard, 2006; NSTC, Juni 2000). Als Nanopartikel nun speziell wird eine Klasse von ultrafeinen Partikeln (UFP) bezeichnet, deren Länge in drei Dimensionen zwischen 1 nm und 100 nm liegt (ASTM Int. Standard, 2006; DIN CEN ISO/TS 27687, 2008; Maynard et al., 2006; Mühlfeld et al., 2008). Unter diesen Begriff fallen sowohl die natürlich vorkommenden Partikel in diesem Größenbereich, solche, die anthropogen als Abfall- oder Nebenprodukt bei verschiedenen Prozessen entstehen, z. B. bei Verbrennungsprozessen, und die industriell synthetisierten Nanoteilchen.

Die neuen und verbesserte Eigenschaften auf dem Gebiet der Physik, Chemie und Biologie, die erst im Nanometerbereich auftreten und die sich stark von denen desselben Materials im Mikrometerbereich unterscheiden können, werden der geringen Größe dieser Strukturen zugeschrieben.

Die große Oberfläche im Verhältnis zur Partikelmasse und dem Partikelvolumen bietet viel Angriffsfläche für chemische Reaktionen in biologischen Systemen. Die Anzahl der oberflächennahen Moleküle und Atome pro Partikel steigt exponentiell mit sinkender Partikelgröße an und ebenfalls die biologische Aktivität im Vergleich mit derselben Masse an größeren Partikeln (Oberdörster et al., 2005). Diese Oberflächenstrukturen können Metallumantelungen sein, sie können Elektronendonator bzw. Elektronenakzeptor sein, hydrophile oder hydrophobe Gruppen enthalten oder organische Moleküle können an den Partikel gebunden sein. All diese Modifikationen bestimmen den physikalisch-chemischen Charakter des Partikels und beeinflussen seine Wirkung in biologischen Systemen (Aufnahme, Löslichkeit, Verteilung im Körper, Induktion von oxidativem Stress, katalytische Effekte, etc.) (siehe Abbildung 2) (Nel et al., 2006; Oberdörster et al., 2005).

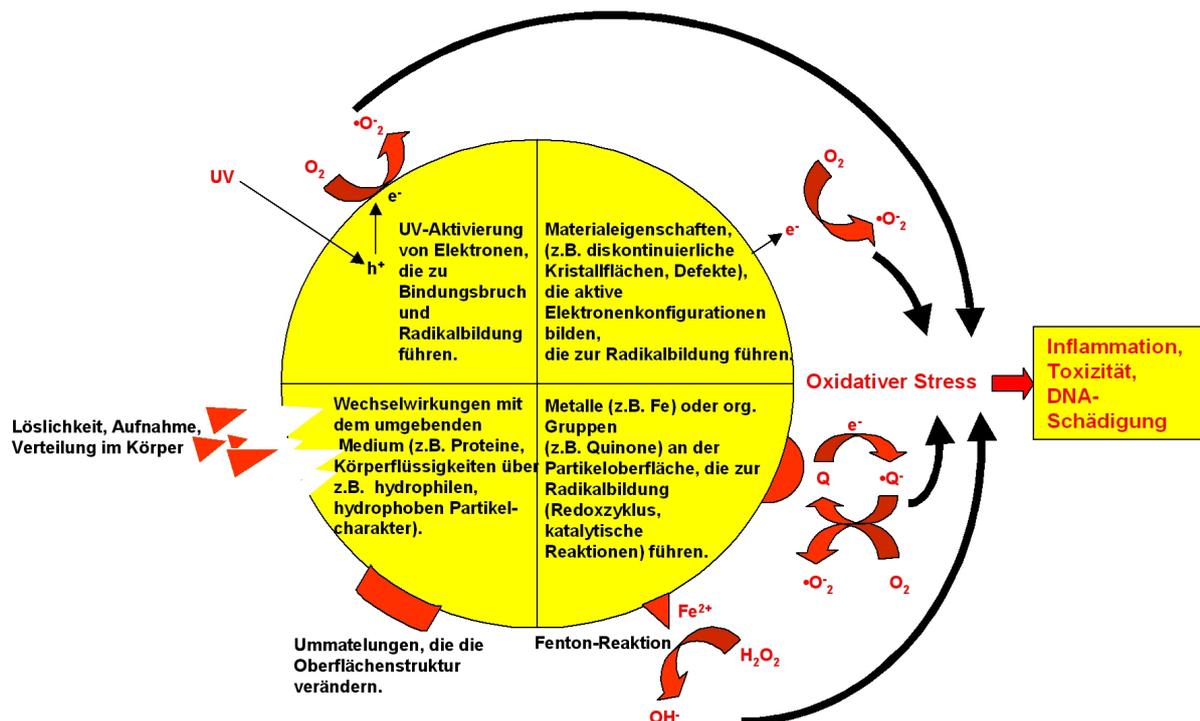


Abbildung 2: Oberflächeneigenschaften, die die Partikeleffekte auf biologische Systeme beeinflussen können (verändert nach Nel et al., 2006).

Da die Nanotechnologie mittlerweile in alle ingenieur- und naturwissenschaftlichen Bereiche, wie z. B. dem Maschinenbau, der Elektronik, der Chemie, der Medizin oder der Lebensmitteltechnologie, Einzug gehalten hat, wird spekuliert, dass sie bis 2015 einen weltweiten Marktanteil von 1 Billion Dollar einnehmen wird (Nel et al., 2006).

4.1.1 Nanopartikel - Vorteile und Risiken

Einer der Vorteile, aber auch ein Gefahrenpotential der Nanopartikel, stellt ihre geringe Größe dar. Je kleiner die Teilchen einer definierten Menge sind, desto höher ist ihre Anzahlkonzentration und damit ihre Gesamtoberfläche und chemische Reaktivität. Diese neuen und teilweise überraschenden Eigenschaften versucht man sich in der Nanotechnologie zu Nutze zu machen um Verbesserungen für unser Leben auf unterschiedlichsten Gebieten zu erreichen. So konnten mit Hilfe synthetischer Nanopartikel z. B. hochleistungsfähige Energiespeicher, Oberflächenbeschichtungen mit Selbstreinigungseffekt (Lotus-Effekt), Wandfarben oder Kleidung mit antibakteriellen Eigenschaften oder Sonnenschutzmittel mit hohem Lichtschutzfaktor entwickelt werden.

Ein besonders hervorzuhebender Punkt ist die Anwendung von nanoskaligen Materialien in der Medizin.

Eine große Anzahl von pharmazeutischen Produkten, die mit Hilfe der Nanotechnologie entwickelt wurden oder Elemente derselben darstellen oder enthalten, sind bereits für die klinische Anwendung zugelassen (Dobrovolskaia & McNeil, 2007). Allein 2006 kamen 240 nanoabhängige Produkte auf den pharmazeutischen Markt (Dobrovolskaia & McNeil, 2007). Desweiteren befinden sich viele andere in verschiedenen Stadien der vorklinischen Entwicklung (Jordan et al., 2006). Solche multifunktionalen Nanoelemente werden entwickelt um intrazelluläre Strukturen anzufärben, Immunantworten zu stimulieren oder zu unterdrücken indem sie an Proteine im Blut binden, oder als Transporter für Medikamente z. B. zur Passage durch den Magen fungieren (Desai et al., 1996; Dobrovolskaia & McNeil, 2007; Kim et al., 2006).

Ein viel diskutierter Punkt ist allerdings auch eine mögliche gesteigerte Toxizität mit steigendem Oberfläche zu Größe Verhältnis. Diese vergrößerte Oberfläche und gestiegene Partikelzahl pro Masseneinheit ermöglicht z. B. die erhöhte Bindung von Metallen oder organischen Komponenten aus der Luft, oder verstärkte Interaktionen mit biologischen Molekülen im Körper die z. B. zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führend können (Donaldson et al., 2006; Geiser et al., 2005; Moore, 2006; Nel et al., 2006; Unfried et al., 2007). Diese Interaktionen können sehr unterschiedlich sein zu denen verursacht durch größere Partikel (Oberdörster et al., 2005).

Das toxikologische Potenzial von ultrafeinen Stäuben ist bekannt und viele Studien können hier Hinweise auf ähnlich toxische Wirkungen von synthetischen Nanopartikeln geben (Fritsch et al., 2007; Geiser et al., 2005; Wottrich et al.; 2004). Im Gegensatz zu den definierten industriellen Nanopartikeln handelt es sich bei den UFP allerdings um chemisch sehr heterogene Gemische mit einem Durchmesser von 100 nm oder weniger in allen drei Dimensionen (Donaldson et al., 2005) Sie kommen hauptsächlich als Aerosole vor und wirken auf den Menschen über den Weg der Inhalation (Mühlfeld et al., 2008). Gelangen die UFP in die Atmosphäre, werden sie Teil des Schwebstaubes. Hierzu zählen alle festen und flüssigen Teilchen der Außenluft, wie organisch, biologische Partikel (Pollen, Sporen), Wassertröpfchen, Mineralstäube aus Bodenerosionen und anthropogene Partikel wie Rußteilchen. Diese oft als Abfall- und Nebenprodukte entstehenden Partikel entstammen

Verbrennungsprozessen, Abfallbeseitigung, Industrieprozessen und dem Straßenverkehr. Sie variieren in Größe, Oberflächenstruktur und chemischer Zusammensetzung. Sie können Übergangsmetalle enthalten und organische Verbindungen wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe auf ihrer Oberfläche binden, was ihre Toxizität erhöht. In diese Klasse der UFP fallen nun ebenfalls die synthetischen Nanopartikel, wenn ihre Größe in allen drei Dimensionen zwischen 1 und 100 nm liegt. Gelangen sie in die Atmosphäre, werden sie ebenfalls Teil des Schwebstaubes, können z. B. organische Moleküle binden, die ihre Toxizität erhöhen, und inhaliert werden.

Der Vorteil, der beim Übergang zum Nanomaßstab durch veränderte Stoffeigenschaften, entsteht und in der industriellen Anwendung sehr nützlich sein kann, ist also nicht von der Hand zu weisen. Die, aufgrund der verringerten Größe, stark vergrößerte Oberfläche, einhergehend mit neuen chemischen und katalytischen Eigenschaften, bietet neue Möglichkeiten, aber auch Risiken durch eine erhöhte biologische Aktivität. Parallel zur Entwicklung solcher synthetischen Nanostrukturen müssen also material- und naturwissenschaftliche Untersuchungen erfolgen.

4.2 Silica Partikel

Als Hauptuntersuchungsmaterial in dieser Arbeit dienen Silica-Nanopartikel, die aus Siliciumdioxid bestehen. Diese Partikel werden bereits seit Jahrzehnten verwendet und boten sich deshalb als Beispiel für synthetische Nanopartikel, denen der Mensch ausgesetzt ist, an.

Silicium ist nach Sauerstoff das zweithäufigste Element in der Erdkruste (Massenanteil ca. 26%). Es kommt natürlich nur in gebundener Form im Mineralreich vor.

Silicium ist der Grundstoff der Halbleitertechnik, aus dem Transistoren, integrierte Schaltkreise und Solarzellen hergestellt werden (Mortimer, 1996).

Siliciumdioxid ist eine Sammelbezeichnung für die Modifikationen der Oxide des Siliciums mit der Summenformel SiO_2 . Siliciumdioxid bildet als Teil von Silikaten wie z. B. Feldspat, Tonmineralien oder in freier Form als Quarz den Hauptbestandteil der Erdkruste und somit auch die häufigste Siliciumverbindung (Mortimer, 1996).

Es kommt in zwei natürlichen Konformationen vor, amorph und kristallin.

Kristallines Silica findet man unter anderem in Form von z. B. Bergkristall, Chalcedon, Cristobalit, α - und β -Quarz. Amorphes Silica ist in seiner Zusammensetzung sehr inhomogen. Man findet es z. B. in Form von vulkanischem Glas (Obsidian), Opal, Gesteinsglas (Tektit) oder biogen (Skelette von Radiolarien, Diatomeen und Schwämmen).

4.2.1 Herstellung

Synthetisches SiO_2 liegt meist amorph vor und wird großtechnisch in unterschiedlichen Prozessen in großen Mengen erzeugt. Die Herstellung erfolgt meist über Fällungsprozesse ausgehend von Wasserglas, das durch Aufschließen von Quarzsand mit Natriumcarbonat oder Kaliumcarbonat erhältlich ist. Je nach Prozessbedingungen nennt man es Fällungskieselensäure oder Kieselgele.

Eine weitere Herstellungsvariante ist die Erzeugung von pyrogenem SiO_2 in einer Knallgasflamme, ausgehend von Chlorsilanen wie Siliciumtetrachlorid (SiCl_4). Der bei der Knallgasverbrennung entstehende Wasserdampf zersetzt die Silane zu amorphem SiO_2 . Dieses SiO_2 -Pulver hat einen Durchmesser von 5 - 50 nm und eine spezifische Oberfläche von 50 - 600 m^2/g .

4.2.2 Technische Anwendung

Synthetisches Siliciumdioxid spielt in unserem Leben, meist unbemerkt, eine große Rolle. Es wird in Farben und Lacken genauso eingesetzt wie in modernen Fertigungsprozessen wie der Halbleitertechnik oder als Putzhilfe in Zahnpasten. Als Lebensmittelzusatzstoff (E 551) findet man es z. B. in Fruchtpulvern und Gewürzmischungen. Hier dient es als Fließhilfs- und Antibackmittel (www.Degussa.com/aerosil, 2008). Weiterhin wird es zur Bierklärung benutzt und zur Vorbeugung gegen Kornkäferbefall mit Getreide vermischt.

Die mengenmäßig größte Bedeutung kommt Siliciumdioxid in Form von Glas zu, gefolgt von der Anwendung als Füllstoff für Kunststoffe und Dichtungsmassen, besonders in Gummiartikeln. Moderne Autoreifen profitieren von einer Verstärkung durch ein spezielles SiO_2 -System. Sie sparen dadurch gegenüber den traditionell nur mit Ruß gefüllten

Gummimischungen ca 5% Treibstoff bei gleichzeitig verbesserter Sicherheitsleistung. Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet ist die Verwendung von Siliciumdioxid in der Betonherstellung. Als Zusatzstoff in der Produktion von Hochleistungs- und Ultrahochleistungsbetonen führen die Partikel in der Größenordnung von 100 nm zu einer mechanischen Erhöhung der Festigkeit, indem der Kapillarporenanteil im Zementstein verringert wird.

4.3 Die Lunge - Hauptaufnahmeweg für Nanopartikel

Mit einer respiratorischen Oberfläche von etwa 140 m^2 und einem Atemvolumen von im Schnitt 15 m^3 gilt die Lunge als einer der Hauptaufnahmewege für Nanopartikel in den Körper (Hoet et al., 2004).

Abhängig von ihrer aerodynamischen Größe können Partikel unterschiedlich tief in die Atemwege eindringen. Partikel mit einem Durchmesser $\geq 2,5 \mu\text{m}$ werden bereits im Nasen- und Rachenraum herausgefiltert und können durch Ausatmen, Niesen, Husten oder Verschlucken eliminiert werden (Heyder et al., 1986; Hoet et al., 2004; Peters et al., 2006). Partikel kleiner $2,5 \mu\text{m}$ gelangen in die mittleren und tieferen Lungenabschnitte und können bis zu den Alveolen vordringen. Allerdings ist die Verteilungsmöglichkeit und Depositionswahrscheinlichkeit auch hier weiter größenabhängig. Bis zu einer Größe von $1 \mu\text{m}$ erreichen UFP die Alveolen und können sich gleichmäßig ausbreiten, mit einem Maximum für die etwa 20 nm großen Partikel. Aufgrund ihres Diffusionsverhaltens erreichen Partikel mit einem Durchmesser von unter $1 \mu\text{m}$ nicht die Alveolen und auch nur 10% von ihnen können in den tieferen Bronchialtrakt vordringen (siehe Abbildung 3) (Heyder et al., 1986; Oberdörster et al., 2005).

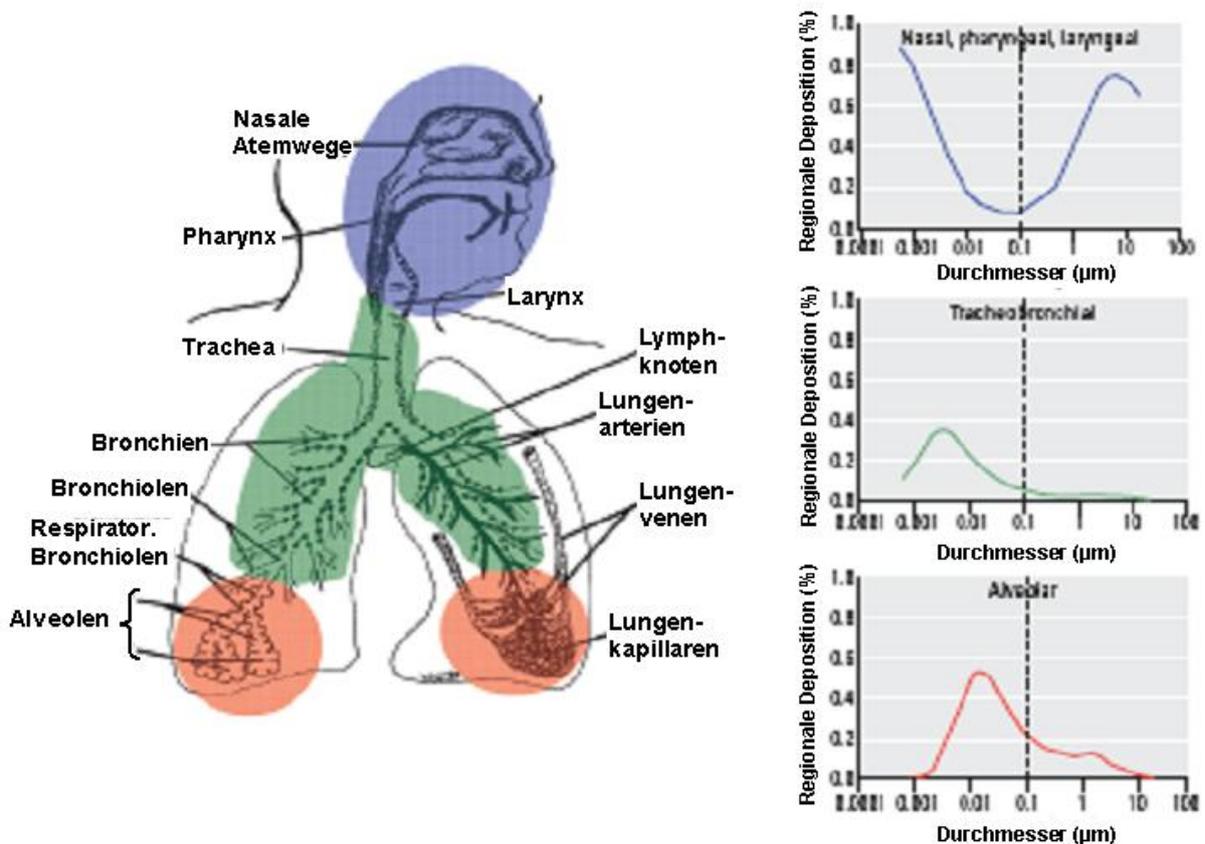


Abbildung 3: Ausbreitungs- und Depositionsmöglichkeiten von Partikeln verschiedener Größenfraktionen im menschlichen Körper (verändert nach Oberdörster et al., 2005).

Nur Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von weniger als 100 nm können das Epithel oder die alveolaren Blutkapillaren passieren und ins Interstitium oder in die Blutzirkulation gelangen (Nemmar et al., 2001, Oberdörster et al., 2000). Einmal im Blutsystem angelangt können die Partikel im ganzen Organismus verteilt werden, sekundäre Zielorgane, wie Herz, Leber, Nieren oder das zentrale Nervensystem erreichen und dort direkt von den Zellen internalisiert werden (Elder et al., 2006; Kreyling et al., 2002; Nemmar et al., 2002; Oberdörster et al., 2004).

4.4 Mechanismen der Partikelaufnahme in die Zelle

Mittlerweile ist seit einigen Jahren bekannt, dass auch Nanopartikel, natürlicher oder synthetischer Natur, von vielen Arten von Zellen aufgenommen werden können (Chithrani & Chan, 2007; Desai et al.; 1996; Gratton et al., 2008; Stearns et al., 2001; Takenaka et al., 2006; Wottrich et

al., 2004). Trotz dieser Studien, die sich mit den Wechselwirkungen von Nanopartikeln und Zellen und der daraus folgenden Partikelaufnahme beschäftigt haben, ist über die tatsächlichen molekularen Aufnahmemechanismen noch wenig bekannt.

Wasser und kleine gelöste Teilchen gelangen entweder von selbst durch die Lipiddoppelschicht in die Zelle hinein und wieder heraus, oder sie werden von Transportproteinen durch die Membran gepumpt (Alberts et al., 2004). Große Moleküle und Partikel, wie Proteine, Polysaccharide oder Mikroorganismen, durchqueren die Membran meist mit Hilfe eines anderen Mechanismus (Campbell, 1998).

4.4.1 Endozytose allgemein

Als Endozytose bezeichnet man allgemein die Aufnahme von Makromolekülen, partikulären Substanzen bis hin zu ganzen Zellen in Zellen durch begrenzte Abschnitte der Plasmamembran, die das aufzunehmende Material einschließen und, durch Abschnürung, intrazelluläre Vesikel bilden. Man unterteilt die Endozytose in zwei verschiedene Aufnahmemechanismen, abhängig von der aufzunehmenden Substanz und der Größe der gebildeten Vesikel (siehe Abbildung 4) (Überblick bei Conner & Schmid, 2003; Okamoto, 1998).

Die eine Form nennt man Phagozytose („Zell-Fressen“), bei der große Partikel wie Mikroorganismen von der Zelle umflossen werden und in große Vesikel, den Phagosomen (Durchmesser meist ≥ 250 nm), aufgenommen werden. Diese Art der Aufnahme wird meist nur von spezialisierten phagozytierenden Zellen ausgeführt.

Unter dem Begriff Pinozytose („Zell-Trinken“), zu der die meisten eukaryotischen Zellen befähigt sind, fasst man mehrere Aufnahmemechanismen zusammen (4).

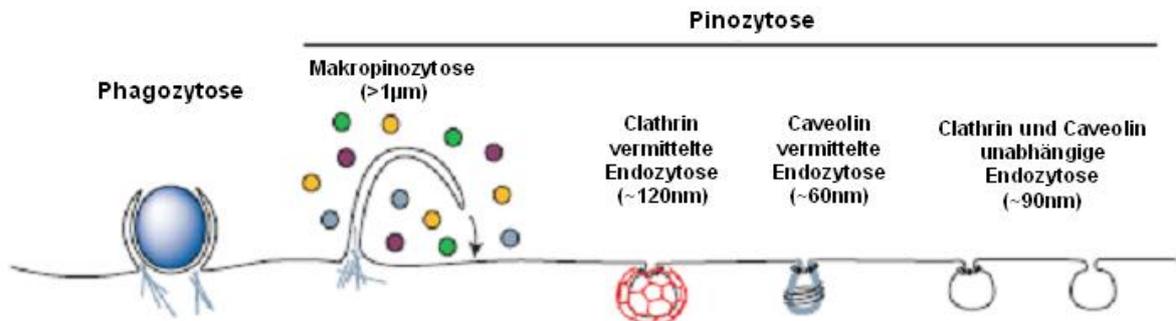


Abbildung 4: Endozytotische Aufnahmewege in die Säugerzelle. Die Wahl des Aufnahmeweges ist abhängig von der Größe des endozytotischen Vesikels, der Art des aufzunehmenden Materials und dem Mechanismus der Vesikelbildung (verändert nach Conner & Schmid, 2003).

Die Makropinozytose ist ein Aktin abhängiger Prozess, mit der eine eher unspezifische Aufnahme von Molekülen aus der extrazellulären Flüssigkeit in Verbindung gebracht wird.

Die sogenannte *Rezeptor vermittelte Endozytose* bietet der Zelle die Möglichkeit gezielt Moleküle aufzunehmen, welche an einen Rezeptor an der Zelloberfläche gebunden haben. Man findet hier die Aufnahme über Einstülpungen, die mit dem Protein Clathrin bedeckt sind (Conner & Schmid, 2003; Kirchhausen, 2000).

Als eine Sonderform der *Lipid Rafts*, Glykosphingolipid reiche Mikrodomänen in der Plasmamembran, findet man, Caveolae genannte, flaschenförmigen Einstülpungen, die mit dem Cholesterin bindenden Protein Caveolin ausgekleidet sind (Alberts et al., 2004; Gumbleton, 2001; Okamoto, 1998).

In letzter Zeit wurde noch eine Reihe weiterer Endozytoseprozesse beschrieben, die Caveolin als auch Clathrin unabhängig sind, und die möglicherweise an der Aufnahme von Nanopartikeln in die Zellen beteiligt sein könnten (Conner & Schmid, 2003; Dobrovolskaia & McNeil, 2007) Allerdings ist über diese Aufnahmewege noch so gut wie nichts bekannt. In dieser Arbeit soll daher näher auf die Phagozytose und die *Rezeptor vermittelte Endozytose* durch Clathrin und Caveolin eingegangen werden.

4.4.2 Phagozytose

Phagozytose ist eine besondere Form der Endozytose, bei der Partikel in große Endozytosevesikel, die Phagosomen, aufgenommen werden. Die klassische Phagozytose ist Aktin abhängig und Partikel werden durch die Ausbildung von Pseudopodien umschlossen (Aderem & Underhill, 1999; May & Machesky, 2001).

Phagozyten haben eine Vielzahl spezialisierter Oberflächen-Rezeptoren, deren Funktion an die Phagozytosemaschinerie der Zelle gekoppelt ist und die zu phagozytisches Material erkennen. Anders als bei der Pinozytose wird Phagozytose ausgelöst und die Rezeptoren müssen aktiviert werden. Sie übertragen ein Signal an die Zelle und starten die Zellantwort.

Je nach Erkennungsmuster des Liganden unterscheidet man zwischen opsoninabhängiger und -unabhängiger Phagozytose, woraus sich eine Einteilung der Phagozytoserezeptoren in zwei Gruppen ergibt. Während bei der opsoninunabhängigen Phagozytose Oberflächenstrukturen des aufzunehmenden Partikels (z. B. Lipoteichonsäuren oder α -Mannan der Bakterienzellwand) von spezifischen Rezeptoren erkannt werden, erfolgt bei der opsoninabhängigen Phagozytose eine vorherige Markierung durch körpereigene Substanzen (Immunglobuline (Ig) oder Komplemente (Cx)). Je nach Art dieser Oberflächenstrukturen erfolgt eine weitere Unterteilung der Phagozytose nach Art des verwendeten Rezeptortypes (siehe auch Abbildung 5):

1. Fc-Rezeptor (FcR) abhängige Phagozytose
2. Komplement-Rezeptor (CR) abhängige Phagozytose
3. Mannose-Rezeptor (MR) abhängige Phagozytose
4. Scavenger-Rezeptor (ScR) abhängige Phagozytose

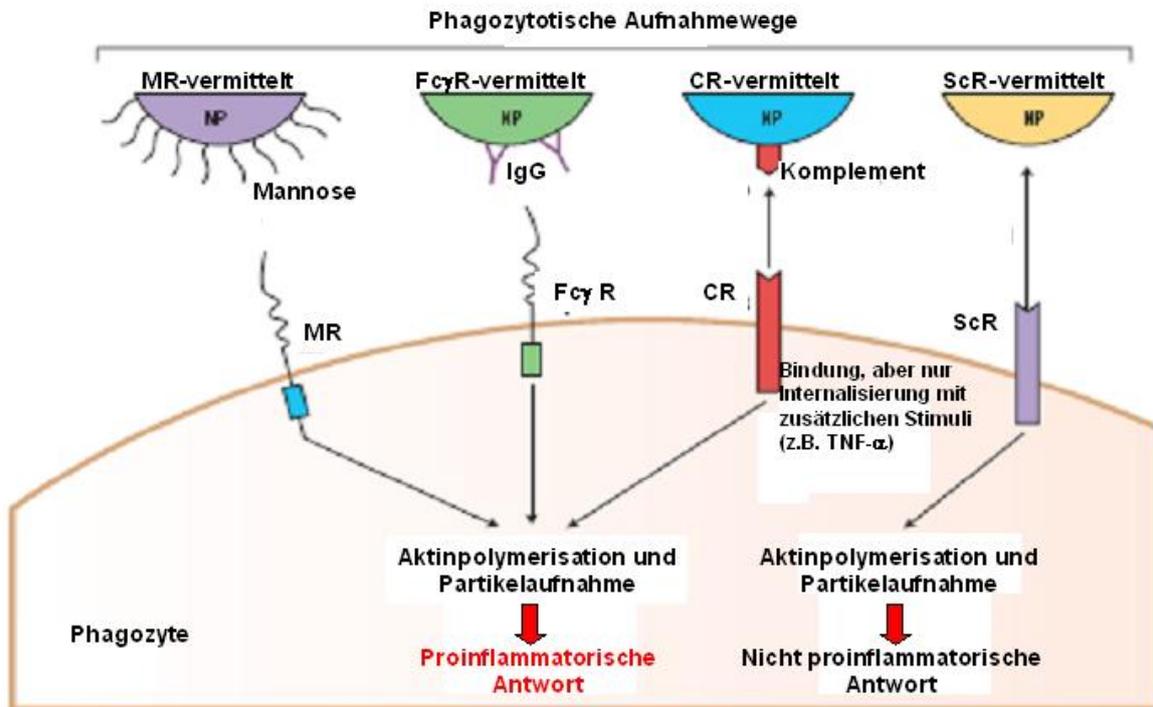


Abbildung 5: Phagozytoserezeptoren und ihre Liganden (verändert nach Dobrovol'skaia & McNeil, 2007)

Die durch die verschiedenen Rezeptoren vermittelte Phagozytose variiert in der Morphologie der Partikelbindung und -internalisierung, in der Signaltransduktionskaskade der beteiligten Mediatoren und in der induzierten Immunantwort (Aderem & Underhill, 1999). So induziert die FcR und MR vermittelte Phagozytose eine pro-inflammatorische, die Aufnahme von pathogenen Partikeln über den CR eine nicht-inflammatorische und die Phagozytose von z. B. apoptotischer Zellen durch ScR eine anti-inflammatorische Reaktion (Haberzettl, 2006).

4.4.2.1 Fc-Rezeptor (FcR) vermittelte Phagozytose

Die am besten untersuchten Phagozytose auslösenden Signale sind die Antikörper oder Immunglobuline (Ig) G, A und E. Sie schützen den Organismus, indem sie an die Oberfläche von infektiösen Mikroorganismen oder Materialien binden und eine Hülle ausbilden, in der die Schwanzdomäne eines jeden Antikörpermoleküls, die sogenannten

Fc-Domäne, nach außen gekehrt ist. Diese Antikörperhülle, speziell die Fc-Domäne, wird von speziellen Fc-Rezeptoren der Phagozyte erkannt. Die Rezeptoren werden über die Art des Ig's welches von ihnen erkannt wird in $Fc\alpha R$ (IgA), $Fc\gamma R$ (IgG) und $Fc\epsilon R$ (IgE) unterteilt. Von diesen Rezeptoren, die von vielen Zelltypen des Immunsystems exprimiert werden (Makrophagen, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile und Lymphozyten), haben jedoch nur $Fc\alpha R$ und $Fc\gamma R$ die Fähigkeit zur Phagozytose (Garcia-Garcia & Rosales, 2002; Ravetch & Bolland, 2001). Die Hauptklasse der Ig-Rezeptoren für die Phagozytose opsonierter Pathogene bilden die $Fc\gamma R$, die in verschiedene Mitglieder unterteilt werden: $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RIIA$ (CD32), $Fc\gamma RIIB$ (CD32), $Fc\gamma RIIIA$ (CD16a), $Fc\gamma RIIIB$ (CD16b). Sie unterscheiden sich in ihrer Antikörperaffinität und molekularen Struktur. Diese Rezeptoren bestehen fast alle, bis auf $Fc\gamma RIIIB$, aus einer einzelnen Proteinkette mit einer extrazellulären Ligandenbindungs-, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne.

Der $Fc\gamma RIIIB$ hat keine transmembrane und zytoplasmatische Domäne. Er ist über eine Glycophosphatidylinositolkette in der Plasmamembran verankert. Durch eine Ligandeninteraktion mit ihm kann eine Kalziumsignalkaskade und Aktinpolymerisation eingeleitet werden (Garcia-Garcia & Rosales, 2002; Ravetch & Bolland, 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIA$ als auch $Fc\gamma RIIIA$ die Phagozytose einleiten können, $Fc\gamma RIIB$ der negativen Regulation derselben dient und die Aufgaben des $Fc\gamma RIIIB$ noch weitestgehend unbekannt sind (Garcia-Garcia & Rosales, 2002).

Der einleitende Schritt der $Fc\gamma R$ induzierten Phagozytose, die auch als Typ I Phagozytose beschrieben wird, ist die extrazelluläre Wechselwirkung zwischen dem IgG opsonierten Liganden und dem Rezeptor (Aderem & Underhill, 1999). Durch eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und der Plasmamembran kommt es dann zur Bildung von Pseudopodien, die den Partikel umschließen, und dann, durch Verschmelzen ihrer Enden, ein Phagosom ausbilden (May & Machesky, 2001).

Diese Rezeptoraktivierung bewirkt gleichzeitig die Induktion einer proinflammatorischen Signalkette, sowie die Bildung von antimikrobiellen Substanzen. Eine induzierte Reaktion ist die Bildung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), die einerseits die phagosomale Lyse

des Pathogens bewirkt, aber auch Transkriptionsfaktoren wie NF- κ -B aktiviert, was zur Synthese von z. B. TNF- α und somit einer proinflammatorischen Antwort führt (Aderem & Underhill, 1999; Aderem, 2003; Cox et al., 1999; Greenberg, 2001; Underhill & Ozinsky, 2002).

4.4.2.2 Komplement-Rezeptoren (CR) vermittelte Phagozytose

Das Komplementsystem ist ein System aus Plasmaproteinen, das im Zuge der Immunantwort aktiviert werden kann. Die mehr als 30 Proteine des menschlichen Komplementsystems sind im Blutplasma gelöst oder zellgebunden, haben stark zellzerstörende Eigenschaften und dienen hauptsächlich der Abwehr von Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen und Parasiten. Die Hauptaufgabe besteht darin, die Oberfläche von Krankheitserregern zu bedecken, um so den Phagozyten auch die Zerstörung jener Erreger zu ermöglichen, die sie sonst nicht erkennen würden (Opsonierung). Daneben löst es eine Reihe von Entzündungsreaktionen aus, die den Kampf gegen eine Infektion unterstützen. Die Fragmente einiger Komplementproteine wirken als Chemokine, die weitere Phagozyten zum Infektionsherd locken. Eine weitere Funktion ist die direkte Zerstörung von Bakterien durch das Einfügen von Poren in deren Zellmembran.

Die Komplement-Rezeptoren erkennen, durch Komponenten des Komplementsystems opsonierte, Partikel und Mikroorganismen und leiten die Phagozytose ein. Sie werden in drei Klassen unterteilt (Dip & Anderson, 2000; Ghiran et al., 2000):

Der CR1 (CD35) wird auf Erythrozyten, Phagozyten und Lymphozyten exprimiert. Dieser monomere Rezeptor besteht aus einer transmembranen Proteinkette mit einer großen extrazellulären Erkennungsdomäne und einem kurzen intrazellulären Ende. Er erkennt und bindet C1q, C4b und C3b opsonierte Partikel, kann aber nicht ihre Phagozytose einleiten.

CR3 (CD11b/CD18, Mac1) und CR4 (CD11c/CD18, gp150/95) gehören zur Familien der Integrine und werden von Neutrophilen und Monozyten expremiert. Die Expression ist allerdings sehr gering, wird aber, bei der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen, verstärkt (Ofek et al., 1996; Takizawa et al., 1996). Die Heterodimere bestehen aus α - und β -Ketten. Sie erkennen und phagozytieren mit inaktiven Komplement Komponenten (iC3b) opsonierte Partikel.

Im Gegensatz zur Aufnahme von IgG-opsonierten Liganden durch den konstitutiv aktivierten FcR, muss die Phagozytose von Komplement opsonierten Liganden aktiviert werden durch, z. B. PMA (Phorbol-12-Myristol-13-acetat) oder TNF- α . Der Prozess der Phagozytose bedarf auch hier einer umfassenden Aktinrekrutierung, ist aber, im Gegensatz zur Phagozytose über FcR, ein eher passiver Prozess. Es werden nur kleine Pseudopodien ausgebildet und der Partikel sinkt eher in die Zelle, als dass er umschlossen wird (Allen & Aderem, 1996). Ein möglicher Mechanismus der CR3 vermittelten Phagozytose sieht folgendermaßen aus: Nach einer Aktivierung des Rezeptors durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , über PKC, bei der vermutlich die β -Untereinheit des Rezeptors phosphoryliert wird, kommt es zu einer Konformationsänderung und zu einer Clusterung des CR. Dies ermöglicht die Bindung des aufzunehmenden Partikels (May et al., 2000; May & Machesky, 2001). Anschließend erfolgt die Aktivierung der GTPase RhoA, was als TypII Phagozytose bezeichnet wird. Dadurch wird sowohl die Serin/Threonin-Kinase ROCK, als auch Arp2/3 aktiviert, welche dann, über Zytoskelettproteine wie Vinculin oder Paxilin, zur Internalisierung führende Aktinumstrukturierung bewirken (Greenberg, 2001).

Abschließend seien noch die ebenfalls zur Familie der Integrine gehörenden heterodimeren Moleküle $\alpha_5\beta_1$ oder $\alpha_v\beta_3$ genannt. Diese sind als Adhäsionsmoleküle bekannt und werden von Makrophagen, Mikroglia, dendritischen Zellen und retinalen Epithelzellen expremiert. Sie vermitteln vor allem die Phagozytose apoptotischer Zellen (Savill et al., 1990).

4.4.2.3 Mannose-Rezeptoren (MR) vermittelte Phagozytose

Die Mannose-Rezeptoren gehören zur Familie der C-Typ Lektin-Rezeptoren. Die Bindung an unterschiedliche Erreger wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten erfolgt über eine Kalzium abhängige Erkennung von typischen Zuckerverbindungen. Z. B. erkennen sie Zymosanpartikel aus der Zellwand von Hefen (*Sacchaomyces cerevisiae*), die aus α -Mannan, Mannoproteinen und β -Glucan bestehen. Die Bindung von Lektinen, speziellen Proteine, die fest an einen spezifischen Zucker gebunden sind, an der Oberfläche ist eine Art von Opsonierung. Die Bindung und Aufnahme durch Mannose-Rezeptoren läßt sich z. B.

durch α -Mannan, β -Glucan oder Mannoproteine hemmen (Janusz et al., 1986; Noorman et al., 1997; Sung et al., 1983).

Der Makrophagen Mannose-Rezeptor (MR,CD206) kommt in Makrophagen und dendritischen Zellen vor. Er bindet Mannoseoligosaccharide wie α -Mannan, das unter anderem auf der Oberfläche von Bakterien, Pilzen und Einzellern zu finden ist, und vermittelt deren Phagozytose. Es handelt sich um einen transmembranen Rezeptor, der eine extrazelluläre N-terminale Domäne mit acht C-Typ Lektin-Kohlehydrat-Erkennungseinheiten (*Carbohydrat recognition domains*, CRD) gefolgt von Fibronectin TypII Wiederholungen besitzt, die mit einer Cysteinereichen Region beendet wird. Intrazellulär folgt eine kurze C-terminale zytosolische Domäne (Stahl & Ezekowitz, 1998).

Dectin-1 erkennt β -Glucan und wird von Makrophagen exprimiert. β -Glucanpolysaccharide findet man in der mikrobiellen Zellwand. Dieser Rezeptor vermittelt die Erkennung und Phagozytose dieser Polysaccharide. Er besteht aus einer kurzen extrazellulären Domäne mit einer CRD-Einheit, einer transmembranen Untereinheit und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz, mit einer möglichen ITAM-Domäne.

Diese beiden Rezeptoren erkennen Zymosan und koordinieren dessen Aufnahme durch Makrophagen (Underhill & Ozinsky, 2002).

Weiterhin gehören der Phospholipase A2-Rezeptor (PLA2R), DEC-205 und ENDO180 zur Familie der C-Typ Lektin-Rezeptoren. Diese Rezeptoren scheinen aber keine phagozytotische Funktion zu besitzen.

Über den molekularen Mechanismus der MR-vermittelten Phagozytose ist noch wenig bekannt. Allerdings konnte für die Aufnahme von Zymosan Partikeln gezeigt werden, dass Proteine wie F-Aktin und Protein-Kinase C (PKC) zum sich ausbildenden Phagosom rekrutiert werden (Allen & Aderem, 1996).

Durch die Interaktion von Liganden mit dem MR wird, wie bei der FcR vermittelten Phagozytose, ein pro-inflammatorisches Signal eingeleitet, welches zur Bildung von ROS und pro-inflammatorischen Zytokinen führen kann (Mytar et al., 2004). Auch eine MR vermittelte Aktivierung des NF- κ B durch *Pneumocystis pneumonia* konnte gezeigt werden (Zhang et al., 2004).

Die phagozytotischen Signale des FcR und des MR sind also pro-

inflammatorisch, im Gegensatz zu denen des CR.

4.4.2.4 Scavenger-Rezeptoren (ScR) vermittelte Phagozytose

Bei den Scavenger-Rezeptoren („Straßenfeger“) handelt es sich um eine große Gruppe von transmembranen Molekülen, die an der Rezeptor vermittelten Endozytose von polyanionischen Liganden wie z. B. LDL (*Low density Lipoproteine*) oder der Polynukleotide Poly I (*Polyinosinic Acid*) und Poly G (*Polyguanylic Acid*) beteiligt sind. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle in der opsoninunabhängigen Immunabwehr von Bakterien, Partikeln und apoptotischen Zellen und in der Adhäsion von Makrophagen (Arredouani et al., 2005; Palecanda & Kobzik, 2001; Palecanda et al., 1999; Peiser et al., 2002; Platt & Gordon, 2001).

Nach strukturellen Gesichtspunkten teilt man die ScR in drei Klassen, A, B und C, ein.

ScR der Klasse A kommen vor allem in Monozyten, peritonealen sowie Gewebemakrophagen, dendritischen Zellen und sinusoidalem Epithelium (z. B. in der Leber) vor (Greaves & Gordon, 2005; Palecanda & Kobzik, 2001; Peiser et al., 2002). Zu dieser Klasse gehören ScR-AI und -AII und der zusätzlich in der Milz und in Lymphknoten zu findende MARCO (Makrophagen Rezeptor mit (C)Kollagener Struktur). Sie binden an unterschiedlichste polyanionische Liganden. Es handelt sich um homotrimere Glykoproteine bestehend aus drei 77 kDa großen Monomeren.

Sie binden bevorzugt acetyliertes und oxidiertes LDL. MARCO bindet zusätzlich Bakterien. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von MARCO auch durch Partikel hochreguliert wird (Peiser et al., 2002).

Die ScR haben extrazellulär eine α -helikale *coil-coiled* Domäne, gefolgt von einer Kollagen ähnlichen Domäne, die wichtig für die Liganden Bindung ist. ScR-AI hat zusätzlich eine Cystein reiche Domäne, die bei vielen Zelloberflächen-Rezeptoren und löslichen Proteinen gefunden wird. MARCO hat sowohl eine Kollagen ähnliche als auch eine Cystein reiche Domäne. Der C-Terminus von ScR-AI ist länger als bei ScR-AII. Intrazellulär folgt der transmembranen Domäne eine relativ kurze zytoplasmatische Region (Palecanda & Kobzik, 2001). Die Bindung und Aufnahme durch Scavenger-Rezeptoren Klasse A läßt sich z. B. durch Poly I (Polyinosin Säure), Poly G (Polyguanyl Säure) oder Fucoidan kompetitiv hemmen (Kanno et al., 2007; Kraal et al., 2000; Palecanda &

Kobzik, 2001).

Als vierter ScR dieser Klasse sei ScR-III zu nennen, der aber nur im Endoplasmatischen Retikulum gefunden wird. Die Bedeutung dieses Rezeptors wird dadurch unterstrichen, dass in Mäusen, bei Abwesenheit dieses Rezeptors, bestimmte Bakterien nicht mehr wirksam abgewehrt werden können.

Zu den ScR der Klasse B gehören die monomeren Rezeptoren CD36 und ScR-BI. CD36 ist ein 88 kDa und ScR-BI ein 57 kDa großes Glycoprotein. CD36 wird expremiert auf Makrophagen, Monocyten, Epithelzellen, Endothelzellen, adipösem Gewebe und Blutplättchen. ScR-BI auf adipösem, Lungen- und Lebergewebe (Palecanda & Kobzik, 2001).

Beide binden acetyliertes und oxidiertes LDL. ScR-BI bindet außerdem HDL (*High density Lipoproteine*) und apoptotische Zellen und CD36 bindet Trombospondin.

Sie besitzen eine sehr kurze zytosolische C-terminale Domäne, die reich an Prolin, Glycin und Cystein ist. Nach der transmembranen Domäne folgt eine große extrazelluläre Domäne, die N-terminal viele N-Glykosylierungsseiten aufweist.

Der Vollständigkeit halber seien hier noch folgende ScR zu nennen.

Klasse B ScR binden acetyliertes LDL, Poly I und mikrobielles β -Glucan. LOX-1, eine 48 kDa großes Lektin ähnliches Transmembranprotein, welches auf Endothelzellen und Makrophagen zu finden ist und u. a. Bakterien, LDL und apoptotische Zellen bindet.

Es ist noch nicht endgültig geklärt, ob die ScR nach Ligandenbindung in der Lage sind, alleine die Phagozytose einzuleiten und selbständig die nötige Aktivierung des Aktinzytoskeletts zu bewirken, zahlreiche Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* sprechen aber dafür (Hamilton et al., 2006; Kanno et al., 2007; Kobzik, 1995). Die Ligandenbindung bei ScR-A und ScR-B bewirkt aber die Induktion der Freisetzung von ROS und TNF in Monozyten (Mytar et al., 2004).

4.4.3 *Clathrin coated pits* vermittelte Endozytose

Eine Form der Rezeptor vermittelten Endozytose verläuft über Clathrin bedeckte Einstülpungen, den sogenannten *Clathrin coated pits*. Sie waren die ersten beschichteten Vesikel, die entdeckt wurden (Alberts et al., 2004; Okamoto, 1998). Sie nehmen etwa 2% der Fläche der Plasmamem-

bran ein.

Die Clathrin vermittelte Endozytose läßt sich grob in vier Schritte einteilen: Die Keimbildung, die voranschreitende Einstülpung der Membran (Knospung), die Abschnürung des Vesikels und schließlich die *Uncoating* Reaktion, in der die Proteinhülle des Vesikels wieder abgestreift wird.

Die Lebenszeit einer Einstülpung ist kurz. Sie wird in etwa einer Minute gebildet, stülpt sich während dieser Zeit ein und schnürt sich als Clathrin beschichtetes Vesikel ab. Dann wirft sie innerhalb von Sekunden ihre Hülle ab und verschmilzt mit frühen Endosomen. Je nach Zelltyp entstehen hier Vesikeln mit Durchmessern von 100 - 200 nm (Conner & Schmid, 2003; Kirchhausen, 2000).

Treibende Kraft hinter der Clathrin vermittelten Endozytose ist die Fähigkeit des Proteins Clathrin, sich zu polyedrischen Käfigen aus Fünf- und Sechsecken zusammenzulagern. Diese Reaktion ist energetisch begünstigt und findet, unter geeigneten Pufferbedingungen, auch spontan im Reagenzglas statt. Es wird vermutet, dass die bei der Käfigbildung freiwerdende Energie ausreicht, um ein Vesikel von der Plasmamembran abzuschneiden. Clathrin besitzt eine dreibeinige Struktur (Triskelion). Es besteht bei Säugern aus drei identischen schweren Ketten (HC) mit einer Masse von 192 kD und einer Länge von 1675 Aminosäureresten, an die sich in der Achsen- oder Nabenregion der Triskelions jeweils eine leichte Kette (LC) anlagert (Kirchhausen, 2000). Da Clathrin selbst nicht an Membranen binden kann, benötigt es hierfür die Hilfe von, an der Donormembran gebundenen, Adapterproteinen (Adaptin, AP-Komplexe, AP180), die in Abhängigkeit vom vermittelten Transportweg variieren. Mit der Anlagerung von Clathrin an diese Adapterproteine ist eine fortschreitende Krümmung der Donormembran verbunden, die durch membranverändernde Proteine wie z. B. Endophilin unterstützt wird. Vor der Abtrennung des Clathrin-umhüllten Vesikels ist dieses nur noch über eine enge flaschenhalsartige Struktur mit der Donormembran verbunden (Kaksonen, 2008; Kirchhausen, 2000; Sorkin, 2004). Die Abtrennung erfolgt durch die GTPase Dynamin (Gold et al., 1999; Henley et al., 1999).

Die Entfernung der Clathrin Hülle vom gebildeten Vesikel erfolgt unmittelbar im Anschluss, so dass weitere Proteininteraktionen, die für den Transport des Vesikels oder die anschließende Fusion mit der Zielmembran nötig sind, an der Oberfläche des Vesikels ungehindert

stattfinden können.

4.4.4 Caveolae vermittelte Endozytose

Zellen können zusätzlich zu den Clathrin beschichteten Gruben und Vesikeln durch einen weiteren Mechanismus Pinozytosevesikel bilden, die sogenannten Caveolae, die in allen Säugerzellen zu finden sind und in Größenordnungen von 60 - 100 nm vorkommen. Man glaubt, dass sie als eine Sonderform aus *Lipid Rafts* entstehen, die als Hauptkomponente zusätzlich Caveolin, ein "Haarnadel-artig" integriertes Protein mit mehreren Transmembranbereichen, beinhalten (Gumbleton, 2001; Harder & Simons, 1997; Okamoto, 1998).

Die Synthese und Integration von Caveolin in Membranen erfolgt am Endoplasmatischen Retikulum (ER), die Oligomerisierung des Proteins in große Homo-Oligomere wird durch Cholesterin stimuliert und durch Palmitoylierung, auf dem Weg zur Plasmamembran, innerhalb des Golgi-Komplexes stabilisiert. Zusätzlich zum Einbau von Cholesterin in die *Lipid Rafts* erfolgt im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) die Anreicherung des Lipidkerns mit Glykosphingolipiden, Sphingomyelin und GPI-Proteinen. Der Transport der *Lipid Rafts* zur Plasmamembran erfolgt nach Einbau in die Membran von exozytotischen Vesikeln (Gumbleton, 2001; Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001).

Die Rolle dieser Transportkompartimente ist vielfältig. Man nimmt an, dass sich die Caveolae im Unterschied zu Clathrin beschichteten Vesikeln, aufgrund der Eigenschaften der Lipidzusammensetzung der Caveolae-Membran einstülpen und ihre Fracht aufnehmen, und nicht durch Aufbau einer zytosolischen Proteinhülle. Caveolae schnüren sich von der Plasmamembran ab und können ihren Inhalt entweder an Endosomen ähnlichen Kompartimente, oder durch Transcytose als exozytotische Kompartimente an die gegenüberliegende Plasmamembran einer Zelle abgeben. So sind Caveolae unter anderem an der Ausschleusung von Cholesterin aus der Zelle beteiligt, und, ähnlich wie bei der Clathrin abhängigen Endozytose, nutzen einige Tierviren Caveolae-abgeleitete Vesikel zum Eindringen in die Zelle (Alberts et al., 2004).

4.5 Wirkung von Partikeln auf zellulärer und molekularer Ebene

4.5.1 Oxidativer Stress

Unter Oxidativem Stress versteht man eine Situation, in der die Zelle bestimmten Molekülen mit erhöhter chemischer Reaktivität ausgesetzt ist. Diese sogenannten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS) besitzen meist ein oder mehrere ungepaarte Elektronen, werden auch als freie Radikale bezeichnet und sind hochgradig instabil. Zu ihnen zählen Moleküle wie das Superoxid-Anion ($\cdot\text{O}_2^-$), das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) oder Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$). Um sich das fehlende Elektron anzueignen, attackieren und verändern sie benachbarte Moleküle. Dies können sowohl Lipide, Proteine als auch DNA sein (Ho et al., 2002; Leonarduzzi et al., 2000). Andere Moleküle wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hypochlorsäure (HOCl) oder Peroxynitrit (ONOO^-) sind reaktive, aber nicht radikalische Moleküle, die dennoch oxidierende Effekte haben und so zum Oxidativen Stress beitragen können. So kann es z. B. in Anwesenheit von Metallen wie Eisen zur Fenton Reaktion kommen, in der H_2O_2 zum hochreaktiven $\cdot\text{OH}$ oxidiert wird (Nel et al., 2006).

Als endogene Quellen für die Entstehung von ROS/RNS gelten z. B. NADPH-Oxidasen, Cyclooxygenasen sowie mitochondriale Enzyme der Atmungskette. Im letzteren Fall kann es z. B. bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zur Bildung von $\cdot\text{OH}$ kommen. Als exogene Quellen gelten ionisierende und UV-Strahlung, aber auch an z. B. Partikel gebunden Metalle oder organische Gruppen wie Chinone, die zur Radikalbildung führende Reaktionen katalysieren (Klotz et al., 2001; Nel et al., 2006; Völkel et al., 2003).

Um das Gleichgewicht zwischen Bildung und Eliminierung von ROS/RNS zu wahren, besitzt der Körper verschiedene zelluläre Schutzmechanismen wie Schutzenzyme (Glutathionperoxidase, Hämoxygenase-1, Katalase und Superoxiddismutase) und Antioxidantien (Glutathion, Beta-Karotin und Vitamin C und E), die den oxidativen Abbau verhindern. Die Bindung von Eisen durch Transport- und Speichermoleküle (Transferrin und Ferritin) ist ein weiterer wichtiger Schutzmechanismus.

Oxidativer Stress, ausgelöst durch einen zeitweiligen Anstieg von

ROS/RNS oder auch durch eine reduzierte antioxidative Abwehr und die damit einhergehende Induktion von Signalwegen, Schädigung von zellulären Strukturen bis hin zu Apoptose oder Nekrose kann zu vielerlei Krankheitsbildern führen. Hierzu gehören kardiovaskuläre Erkrankungen (Arteriosklerose), Entzündungsreaktionen (Kamata, et al., 2005; Rahman & MacNee, 1999), Autoimmun- und Atemwegserkrankungen (Kelly, 1999), neurodegenerative Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson) und Tumorentstehung. Seit Mitte des letzten Jahrhunderts gelten ROS/RNS außerdem als Schlüsselfaktoren im Alterungsprozess. Man darf allerdings nicht außer acht lassen, dass Radikale in geringen Konzentrationen als wichtige Botenstoffe in der Signaltransduktion und Genregulation fungieren (Lander, 1997).

4.5.2 Kernlokalisierung und Topoisomerasebeeinträchtigung

Ein viel diskutierter Punkt in der Fachliteratur ist die mögliche Penetration des Zellkerns durch Nanopartikel, gefolgt von direkten Auswirkungen auf nukleäre Proteinstrukturen.

Bisher konnte nur in sehr wenigen Studien von einer solchen Penetration berichtet werden (Chen & von Mikecz, 2005). Hierbei handelte es sich meist um Partikel, die entweder kleiner als die Kernporen (kleiner als 39 nm) (Gupta et al., 2003; Panté & Kann, 2001), oder mit speziellen Kernlokalisationssequenzen gekoppelt waren.

Da eine mögliche Kernlokalisierung gerade im medizinischen Bereich für die gezielte Applikation von Medikamenten und Gentherapie von Interesse ist wurde in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf diesen Punkt gelegt. Zusätzlich wurde eine mögliche Auswirkung der aufgenommenen Partikel auf ein wichtiges nukleäres Enzym, die Topoisomerase I, untersucht.

Topoisomerasen sind nukleäre Enzyme, die in einer Vielzahl von zellulären Aktivitäten wie Chromosomen-Kondensation, DNA Replikation, Transkription, Rekombination und Segregation während der Mitose involviert sind (Pommier et al., 1998).

Die humane Topoisomerase I hat eine Größe von etwa 100 kDa. Sie ist in der Lage vorübergehend Einzelstrangbrüche einzuführen, um super-spiralisierte DNA zu entspannen, die am Ende der Reaktion wieder religiert wird (Alberts et al., 2004; Pommier et al., 1998).

Im Nukleoplasma von Interphase Zellen ist die Topoisomerase I

gleichmäßig verteilt und teilweise um die Nukleoli in ringartigen Strukturen konzentriert. Es konnte auch gezeigt werden, dass diese Enzyme in Regionen des Genoms lokalisiert sind, die an der aktiven RNA-Synthese beteiligt sind, um möglicherweise superhelicalen Stress der DNA zu reduzieren und so die Funktionalität der RNA Polymerase zu gewährleisten (Pommier et al., 1998).

Die DNA Topoisomerase I und II stellten sich als Zielstrukturen für Autoantikörper im Serum von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes und auch von Antitumormedikamenten und Antibiotika. Erhöhte Level von DNA Topoisomerase I wurden in kolorektalen Tumoren gefunden, im Vergleich mit normaler Kolon Mukosa, als ein Resultat gesteigener Transkription oder mRNA Stabilität (Chen et al., 2005).

4.6 Zielsetzung der Arbeit

Synthetische Nanopartikel repräsentieren eine neue Klasse von Nanomaterialien, die in der Industrie, in den Biowissenschaften und in der Medizin neue Anwendungsmöglichkeiten eröffnen. Obwohl bereits auf vielfältige Weise in verschiedenen Fachbereichen genutzt, ist bis heute noch wenig über die Aufnahmewege von Nanopartikeln in die Zelle und ihrem Einfluss auf zelluläre Wirkungsmechanismen bekannt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen synthetische Siliciumdioxid Nanopartikel in vier verschiedenen Größen (20, 50, 70 und 200 nm).

Neben Untersuchungen zur akuten Toxizität und der Bildung von ROS/RNS, bilden Experimente, die das Aufnahmeverhalten dieser Partikel in verschiedene Zelllinien betreffen, einen Schwerpunkt dieser Studie. Insbesondere die Wahl des Aufnahmeweges ist hier von Interesse.

Mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren soll untersucht werden, ob unterschiedliche Partikelgrößen unterschiedliche Aufnahmewege beschreiten. Eine durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen erfolgt, um Aufschluss über die Art und Weise der Partikelaufnahme zu erlangen.

Nach Partikelinkubation soll durch elektronenmikroskopische Aufnahmen die Lokalisation der Partikel in der Zelle untersucht werden.

Da in der medizinischen Wirkstoffentwicklung die Applikation aktiver Substanzen in biologische Systeme mit Hilfe von Transportern im Nan-

maßstab von großem Interesse ist, wurden in dieser Arbeit, in einer Kooperation mit Frau Dr. Tina Schröder und dem Institut für Organischen Chemie der Universität Karlsruhe, zusätzlich unterschiedliche peptoidische, polylysin-, bzw. polyargininartige Transporter auf ihre Toxizität und Fähigkeit zur Zellpenetration untersucht. Durch verschiedene Modifikationen oder Biokonjugationen soll die Möglichkeit des Transports von Wirkstoffen ins Zellzytosol oder in den Zellkern getestet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nun zusammenfassend folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie reagieren die untersuchten Zellen auf die Belastung mit synthetischen Nanopartikeln und peptoidischen Wirkstofftransportern in Hinblick auf die akute Toxizität, Steigerung der Proliferationsrate und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies?
2. Penetrieren diese Partikel und die Transporter Zellen und welches sind die Zielstrukturen in der Zelle?
3. Wenn ja, in welchem Umfang in Bezug auf Konzentration und Zeitabhängigkeit erfolgt die Penetration der Zellen?
4. Welche Aufnahmewege und Rezeptoren sind an der Aufnahme der Partikel beteiligt?
5. Inwieweit kommt es zur Degradation der Topoisomerase I, als Beispiel für ein nukleäres Enzym, durch die Aufnahme von Partikeln?

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Vertrieb
2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1)	Roche Applied Science, Mannheim
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H ₂ DCF-DA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ATP Bioluminescence Assay Kit HS II	Roche Applied Science, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Casyton ^R	Innovatis, Reutlingen
Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit	Roche Applied Science, Mannheim
Chloroform (Reinheit 99,0-99,4%)	Merck KGaA, Darmstadt
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Applied Science, Mannheim
Dihydrorhodamin 123	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ECL TM Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fötales Kälber Serum (FKS)	GIBCO ^R Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler TM DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH Life Sciences, St. Leon Rot
Glutaraldehydlösung 25%	Merck KGaA, Darmstadt
HBSS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Isopropanol	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol (Reinheit 99,9%)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Natriumcacodylat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Osmiumtetroxid	Plano GmbH, Wetzlar
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH Life Sciences, St. Leon.Rot
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin Lösung	GIBCO ^R Invitrogen, Karlsruhe
Phalloidin Rhodamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Rotiphorese ^R Gel 30	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Triton X-100	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-BASE)	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe
Tween ^R 20	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt

5.2 Laborgeräte und Programmsoftware

Tabelle 2: Laborgeräte und Software

Gerät/Software	Vertrieb
Analysewaage Sartorius 1602 MP	Sartorius AG Mechatronik, Göttingen
Transilluminators GelPrint 2000i	MWG-Biotech, Ebersberg
Brutschrank CB 210	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Casy ^R 1	Innovatis, Reutlingen
Digifuge	Heraeus Christ, Fellbach
Durchflusszytometer <i>Flow Cytometer BD LSR II</i> (FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop DM IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar
Fluoreszenzreader FL600, Software: Lambda KC4 2.7	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT
Hamamatsu Orca-ER Digital Kamera (C4742-80-12AG)	Hamamatsu Photonics K.K., Japan
Heidolph Polymax 1040 Schüttler	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik
Improvisation Volocity 4, Grid Convocal	Improvisation, Coventry, England
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge</i> 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroplatten-/Absorptions-Reader, Software: SOFTmax Pro 3.1	VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, USA
Plattenzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Sonifier B15	Branson, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sterilbank Lamin Air ^R HB 2460	Heraeus Christ, Fellbach
Tischzentrifuge <i>Centrifuge</i> 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Transmissions Elektronenmikroskop (TEM) EM 109T	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Ultramikrotom UC6	Leica Microsystems, Wetzlar
Waage Mettler PC180	Mettler Waagen GmbH, Gießen
Zetasizer Nanoseries Nano-ZS ZEN 3600	Malvern Instruments Ltd., UK

5.3 Zellkultur

Als Zellkultur bezeichnet man das Kultivieren von Zellen eukaryotischen Ursprungs. Die Zellen können so unter gleich bleibenden Bedingungen vermehrt werden. Dies bringt den Vorteil reproduzierbarer Ergebnisse ohne Individuen abhängige Unterschiede zu erzeugen, da immer wieder Zellen aus demselben Individuum verwendet werden. Desweiteren können mit dieser Technik Tierversuche vermieden werden. Zelllinien werden in speziellen Nährmedien kultiviert, welche die jeweils nötigen Aminosäuren, Salze und Vitamine für ein optimales

Wachstum bereitstellen. Zusätzlich erfolgte eine Anreicherung der Medien mit spezifischen Komponenten wie der essentiellen Aminosäure L-Glutamin, Antibiotika zur Vermeidung von Kontaminationen und Serum. Seren sind ein Hauptbestandteil von Nährmedien, die Hormone, Wachstumsfaktoren, Bindungs- und Anheftungsfaktoren, zahlreiche zur Synthese nötige Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente, Puffer- und Neutralisationssysteme wie Albumin und Immunglobuline liefern. Verwendet wird meist fötales Kälberserum (FKS). Eine Erwärmung des Serums auf 56°C für 30 min nennt man Hitzeinaktivierung. Sie verändert die Eigenschaften des Serums. Es inaktiviert bestimmte Wachstumsfaktoren und vermindert oder beseitigt ganz allgemein störende Einflüsse. Für Versuche zur Inhibition der Komplement Rezeptoren wurde Medium mit hitzeinaktiviertem FKS (hi-FKS) verwendet. Für alle anderen Versuche und die Zellkultur allgemein kam unbehandeltes FKS zum Einsatz.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte immer bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank (Typ CB 210) der Firma WTB Binder Labortechnik.

Die Zellpassage erfolgte für alle Zelllinien einmal pro Woche kurz vor Erreichen der 100%igen Konfluenz. Hierfür wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 2 ml PBS^{-/-} gewaschen, wodurch Mediumreste und Kalzium/Magnesium entfernt wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen für 5 min mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank. Die Peptidase Trypsin ist ein Verdauungsenzym aus dem Dünndarm, welches regioselektiv Peptidbindungen spaltet und in adhärenen Zellkulturen verwendet wird um die Zellen vom Gefäßboden zu lösen und zu vereinzeln. Die Trypsinwirkung wurde nach erfolgter Ablösung der Zellen durch Zugabe von 10 ml des jeweiligen Kulturmediums gestoppt. Anschließend wurde nach Zentrifugation (350xg) der Zellsuspension durch Verwerfen des Überstandes und Resuspendierung des Zellpellets in 20 ml frischem Medium das Trypsin/EDTA Gemisch entfernt.

In allen Versuchen, wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen nach erfolgter Partikelinkubation zweimal gewaschen. Einmal mit einem sauren Waschpuffer (Tab. 3), um auf der Zelloberfläche haftende Partikel zu entfernen, und einmal mit Phospat gepufferter Saline ohne Magnesium und Kalzium (PBS^{-/-}) um Reste des Waschpuffers zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen entsprechend den jeweiligen

Versuchsprotokollen weiterbehandelt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des sauren Waschpuffers

- 28 mM Natriumacetat
- 117 mM Natriumchlorid
- 2 mM EDTA-Na₂-Salz
- gelöst in dest. H₂O (pH 5)

Die Grundmedien sowie alle Medienzusätze, Trypsin/EDTA und Antibiotika stammen von Gibco Life Technologies, Karlsruhe. Sofern nicht anders angegeben, stammen alle Zellkulturgefäße von der Firma Sarstedt AG & Co, Nürnberg und alle Multi-Lochplatten von der Firma Greiner, Frickenhausen.

5.3.1 Die Epithel-Zelllinie A549

Bei den A549 Zellen (ATCC, CCL-185, Rockville, MD, USA) handelt es sich um humane Alveolarepithelzellen vom Typ II, welche 1972 aus dem Lungenkarzinom eines 58-jährigen männlichen Patienten entnommen wurden (Giard et al., 1973).

Die Zellen wachsen adhärent und bilden in Zellkultur einen einschichtigen Zellrasen (Monolayer) aus. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 22h. Die Zellen wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz einmal pro Woche passagiert und jeweils 2×10^5 Zellen in 20 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit Zusätzen (Tab. 4) in eine neue Flasche ausgesät.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Kulturmediums für A549 Zellen (500 ml)

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- 10% FKS (fötales Kälberserum)
- 2 mM L-Glutamin
- 50.000 U Penicillin G Natrium
- 50 mg Streptomycin Sulfat

5.3.2 Die Endothel-ähnliche Zelllinie ECV304

Bei den ECV304 Zellen (European Collection of Animal Cell Cultures ECACC, Salisbury, UK) handelt es sich um eine spontan transformierte humane Endothel-ähnliche Zelllinie aus der Umbilikalvene eines neugeborenen japanischen Mädchens (Takahashi et al., 1990; Hughes, 1996). Lange Zeit wurden diese Zellen für Endothelzellen gehalten, neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass es sich um ein Derivat der humanen Harnblasen-Karzinom-Zelllinie T-24 handelt. Aufgrund der starken Ausprägung endothelialer Eigenschaften und der leichten Handhabbarkeit können sie jedoch weiterhin als Modell für Fragestellungen das Endothel allgemein betreffend verwendet werden (Bubenik et al., 1973; Dirks et al., 1999; Drexler et al., 2002; Suda et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit dienten die ECV304 Zellen als Modell für das pulmonale Endothel.

Die Zellen wachsen adhärent und bilden einen Monolayer. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 24h. Die Zellen wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz einmal pro Woche passagiert und jeweils 2×10^5 Zellen in 20 ml Medium 199 mit Zusätzen (Tab. 5) in eine neue Flasche ausgesät.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Kulturmediums für ECV304 Zellen (500 ml)

- Medium 199
- 10% FKS (fötales Kälberserum)
- 2 mM L-Glutamin
- 50.000 U Penicillin G Natrium
- 50 mg Streptomycin Sulfat

5.3.3 Die Monozyten-Zelllinie THP-1

Bei den THP-1 Zellen (ATCC, TIB-202, Rockville, MD, U.S.A.) handelt es sich um eine humane monozytische Zelllinie, ursprünglich isoliert aus einem 1 Jahr alten Jungen mit akuter monozytischer Leukämie (Tsuchiya et al., 1980). Es handelt sich um Suspensionszellen die lockere Anhäufungen bilden. Fast keine Zellen heften sich an der Oberfläche des Zellkulturgefäßes an.

Die Verdopplungszeit der undifferenzierten Zellen beträgt etwa 26h.

Diese Zellen wurden einmal pro Woche 1:20 gesplittet und in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium mit Zusätzen (Tab. 6) in eine neue Flasche ausgesät.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Kulturmediums für THP-1 Zellen (500 ml)

- RPMI 1640
- 10% FKS (fötales Kälberserum)
- 3 mM L-Glutamin
- 25.000 U Penicillin G Natrium
- 25 mg Streptomycin Sulfat

5.3.3.1 Differenzierung von THP-1 Zellen

Die Zugabe von TPA regt die Zellen an, sich zu Makrophagen zu differenzieren. Für alle Versuche wurden Zellen in der differenzierten Form verwendet. Nach der Zellpassage wurden die geernteten, undifferenzierten Zellen gezählt, die gewünschte Zellzahl für die Versuche ausgesät und durch eine 24h Inkubation im Brutschrank mit 8 nM 12-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) in reife Zellen mit Makrophageeigenschaften differenziert (Tsuchiya et al., 1982).

5.3.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 200 μ l der Zellsuspension nach dem abtrypsinieren und resuspendieren mit Casyton® (Innovatis, Reutlingen) 1:100 verdünnt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des CASY®1 Cell Counters (Innovatis, Reutlingen) in der verdünnten Lösung.

5.3.5 Langzeitkonservierung

Das Einfrieren einer Zelllinie wird sowohl als schützende Maßnahme vor Verlust durch z. B. Kontaminationen oder genetischen Veränderungen angewendet als auch zur Aufbewahrung von Zelllinien, die nicht permanent in Gebrauch sind. Auf diese Weise ist es möglich jederzeit Zellen von jungen Passagen zur Verfügung zu haben. Die Lagerung er-

folgt in flüssigem Stickstoff bei -196°C . Ziel dieser Kryokonservierung ist es die Stoffwechselaktivität und Zellvermehrung vollständig, aber reversibel, zum Erliegen zu bringen. Auch genetische Veränderungen werden so verhindert. Eine kurzfristige Lagerung (Tage bis Wochen) der Zellen kann auch bei -80°C erfolgen.

Das Einfrieren der Zellen ist ein langsamer Prozess, bei dem die Einfriergeschwindigkeit 1°C pro Minute nicht überschreiten sollte. Um die Bildung von Eiskristallen, welche die Zellen irreversibel schädigen, zu verhindern wird dem Einfriermedium 10% DMSO oder Glycerin zugegeben. Zusätzlich kann über die Geschwindigkeit des Einfrierprozesses der Entstehung von Eiskristallen positiv entgegengewirkt werden. Zur Optimierung dieses Prozesses wurde das Gefriergefäß Cryo 1°C Freezing container (NalgeneTM, Labware, USA) eingesetzt. Dieses wird mit Isopropanol gefüllt und bei 4°C bis zu seiner Verwendung vorgekühlt. Die zum Einfrieren gewünschte Zellzahl wurde mit $350\times g$ für 5 min abzentrifugiert und anschließend in eiskaltem PBS^{-/-} gewaschen. Für jedes Kryogefäß wurden 5×10^6 Zellen in 1 ml eiskaltem Medium (inkl. 10% DMSO) vorbereitet. Die Zellen wurden zunächst im Gefriergefäß für 2h bei -20°C und anschließend über Nacht bei -80°C gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Kryogefäße in flüssigen Stickstoff überführt. Um Kontaminationen zu vermeiden müssen alle Schritte des Einfrierens und das Auftauen unter absolut sterilen Bedingungen erfolgen.

5.3.6 In-Kulturnahme der Zellen

Das Auftauen einer Zellkultur muss im Gegensatz zum Einfrieren sehr schnell vonstatten gehen. Deshalb muss das benötigte Kulturmedium bereits auf 37°C vorgewärmt und kurz vor dem Auftauen der Zellen in einem Reaktionsgefäß bereitgestellt werden. Das gefrorene Kryoröhrchen wurde für den Transport aus dem Stickstoffbehälter ins Labor in Eis eingebettet und zum schnellen Auftauen in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Die aufgetauten Zellen wurden dann sofort in das vorgelegte Medium pipettiert. Zur Beseitigung des zellschädigenden DMSO aus der Kultur wurde die Suspension für 5 min mit $350\times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in neues Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre kultiviert.

Da die Zellen beim Auftauprozess großem Stress ausgesetzt sind, wurden sie frühestens nach 14 Tagen Kultur für Versuche verwendet.

5.4 Partikel

Für diese Arbeit wurden kommerziell erhältliche Siliciumdioxid Partikel (Silica) (Kisker Biotech, Steinfurt) in vier verschiedenen Größen (Durchmesser 20, 50, 70 und 200 nm) verwendet. Außerdem wurden Partikel (Durchmesser 70 nm) der Firma Postnova Analytics (Landsberg/Lech) zu Vergleichszwecken verwendet, die im Folgenden zur Unterscheidung immer mit 70P nm dargestellt werden. Die Partikel waren mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, der, laut Hersteller, in die gesamte Matrix des Partikels eingelagert war und nicht nur als *Coating* vorlag. Alle Partikel lagen als Stammsuspensionen in Wasser vor und wurden im Kühlschrank aufbewahrt. Die Konzentrationen der Stammsuspensionen waren 25 mg/ml respektive 50 mg/ml (nur 200 nm).

Für alle Zellkultur- und Partikelcharakterisierungsversuche wurden die Partikelsuspensionen frisch angesetzt. Hierzu wurde eine Suspension in Zellkulturmedium mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt, mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Sonifier 250, Branson, Danbury CT, USA) behandelt (30 Impulse, je eine Sekunde, *output control* 40%, *duty cycle* 4) um eine möglichst gleichmäßige Dispersion mit vereinzelt Partikeln zu erhalten. Ein Aufschäumen der Suspension wurde vermieden. Anschließend wurden die Partikel in der jeweilig gewünschten Konzentration zu den Zellkulturen gegeben.

Obwohl alle in dieser Arbeit verwendeten Partikel in Suspension zur Aggregation neigten wurde auf die Zugabe von chemischen Zusätzen (z. B. DMSO, DMF) oder *Surfactants* (Tween 80, SDS) verzichtet, um störende Einflüsse auf die Zellkulturen und ein Verfälschen der Vitalitätstests zu vermeiden.

5.4.1 Partikelcharakterisierung

Zusätzlich zu den Angaben des Herstellers wurden die verwendeten Partikel zur Charakterisierung am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) auf Größe, Gestalt und Oberflächenstruktur hin optisch untersucht.

Weiterhin wurde die Anzahl der Partikel und die Gesamtoberfläche pro μg Partikel in der Partikellösung, ausgehend von den Angaben des Herstellers, berechnet.

Eine Zetapotenzialmessung der Partikel sowohl in Wasser, Kulturmedium mit FCS und Kulturmedium mit hitzeinaktiviertem FCS und eine Messung der Größenverteilung in den genannten Medien wurde freundlicherweise von Dr. M. Bur (Universität des Saarlandes, Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie) mit einem Zetasizer Nanoseries Nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd., UK) durchgeführt.

Das Zetapotenzial ist das elektrische Potenzial, auch Coulomb Potential genannt, an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in Suspension. Es beschreibt die Fähigkeit eines, von einer Ladung hervorgerufenen, Feldes, Kraft auf andere Ladungen auszuüben. Die Differenz des elektrischen Potenzials an zwei Orten ist die elektrische Spannung. Befinden sich geladene Partikel in Suspension, wird dessen Potenzial durch Anlagerung von Ionen im Suspensionsmedium kompensiert. Auf der Partikeloberfläche lagern sich fest gebundene Ionen in der sogenannten Helmholtz-Schicht an. Weitere Ionen lagern sich eher locker gebunden in einer ungeordneten Schicht an. Das Partikel erscheint aus großer Entfernung elektrisch neutral. Bewegt sich das Partikel, wird durch Reibung ein Teil der locker gebundenen Schicht abgeschert und es erscheint nicht mehr elektrisch neutral, sondern besitzt wieder ein Potenzial, das Zetapotenzial. Es ist bei gleichem Medium eine relative Messgröße für das Oberflächenpotenzial und somit für die Ladung des Partikels. Gemessen werden kann es, indem man das geladene Partikel durch ein elektrisches Feld bewegt. Die resultierende Geschwindigkeit ist das Maß für das Zetapotenzial.

5.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissionselektronenmikroskopie dient dazu Feinstrukturen von Zellen und sehr kleinen Organismen dann darzustellen, wenn das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskopes an seine Grenzen stößt (Plattner & Zingsheim, 1987). Der Aufbau eines TEM ähnelt im Prinzip dem des Lichtmikroskopes. An Stelle der Glühbirne zur Beleuchtung des Objektes benutzt man eine Elektronenquelle (gebogener Wolframdraht als Kathode) (Flegler et al., 1995; Goodhew & Humphreys, 1991).

Mit ihrer Hilfe erreicht man eine deutlich höhere Auflösung als mit einem Lichtmikroskop die in etwa dem Durchmesser eines Atoms entspricht (derzeit etwa 0,1 nm im Vergleich zu 1 μm). Das elektronenmikroskopische Endbild ist eine Strukturdarstellung durch Helligkeitsunterschiede (Rieder & Schmidt, 1987) und wird mit Hilfe einer empfindlichen CCD-Kamera (*charged coupled device* digital an einen Computer übermittelt).

5.5.1 Probenpräparation

Für die TEM wurden jeweils 1×10^6 Zellen der Zelllinien A549 und ECV304 in Transwell®-Kultursysteme auf Polycarbonat Membranen ausgesät und über Nacht zum Anwachsen im Brutschrank inkubiert. Bei diesem System trennt der Transwell®-Einsatz mit der Membran die Kulturschale in eine obere und eine untere Kammer. Die Membran hat einen Durchmesser von 24 mm mit einer Wachstumsfläche von $4,67 \text{ cm}^2$ und Poren mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$.

Am nächsten Tag wurden die Zellen mit $0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. $21,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$ respektive $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) der jeweiligen Partikelsuspension behandelt und für 24 bzw. 48h inkubiert. Nach der Partikelinkubation wurde das Zellmedium über der Membran vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal gewaschen. Anschließend wurde der Membraneinsatz in eine Petrischale mit speziellem $\text{PBS}^{+/+}$ überführt um ein Austrocknen der Membran zu vermeiden und je drei kleine runde Membranproben mit Hilfe eines Biopsie Punches (Stiefel, Wächtersbach) ausgestanzt und für die weitere Behandlung in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt indem die Fixierungslösung bereits vorgelegt war.

5.5.1.1 Fixierung und Entwässerung

Die Fixierung der Proben erfolgte in Karnovsky's Fixants über Nacht im Kühlschrank bei 4°C . Am nächsten Tag wurden mit Hilfe eines Überkopfschüttlers die Proben 10 min in $\text{PBS}^{+/+}$ gewaschen und anschließend in 1%igem Osmiumtetroxid für 7 min inkubiert. Osmiumtetroxid dient der Kontrastierung der Proben und der Fixierung der Zellmembranen durch Aufhebung ihrer osmotischen Wirkung. Nach einem weiteren 10 minütigem Waschschrift erfolgte die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 95%) für je 2 min, 100% (getrocknet) und Propylenoxid (getrocknet) für je 5 min.

5.5.1.2 Einbettung in Epoxidharz (EPON 812)

Als Einbettungsharz wurde EPON 812 verwendet. Zuerst wurden die Proben für 20 min in einer Mischung aus 30% Einbettungsharz und 70% Propylenoxid inkubiert gefolgt von einer weiteren 20 minütigen Einbettungsstufe in 70% Einbettungsharz und 30% Propylenoxid. Anschließend wurden die Proben in reinem EPON 812 für 1 h inkubiert. Mit einer Pinzette wurden die Membranstücke in mit reinem EPON 812 halb gefüllte Einbettungsformen aus Silikon überführt, dort ausgerichtet, und mit Einbettungsharz überschichtet. Die Polymerisation erfolgte nun für mindestens drei Tage in einem Wärmeschrank bei 60°C.

5.5.1.3 Ultramikrotomie und Transmissionselektronenmikroskopie

Die ausgehärteten Blöckchen wurden mit Hilfe eines Trimmgerätes in Form geschnitten. In einem Ultramikrotom (UC6k, Leica Microsystems, Wetzlar) wurden mit einem Diamantmesser (ultra 45°, Diatome, CH) 50-70 nm dicke Schnitte angefertigt und diese auf runde Netzchen (*Grids*) aus Gold (Kisker, Steinfurt) mit hexagonalen Maschen (300 *Mesh/Grid*) überführt. Bei einigen Schnitten erfolgte eine Nachkontrastierung mit Uranylcitrat in Methanol für 5 min und Bleicitrat für 3 min nach Reynolds (1963).

Die Charakterisierung der Partikel erfolgte durch Auftropfen von 10 µl einer jeweils 100 µg/ml konzentrierten Partikellösung, sowohl in Wasser als auch in Medium, auf mit Formvar beschichtete Kupfergrids (75 *Mesh/Grid*, Plano, Wetzlar).

Nach Trocknung der Proben (mindestens ein Tag) wurden diese Objektträger in einen Probenhalter eingespannt und über eine Schleuse in das Transmissionselektronenmikroskop (EM 109T, Carl-Zeiss AG, Oberkochen) eingeführt. Die Aufnahmen der präparierten Zellen und Partikel erfolgten bei 50 kV.

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen für die Transmissionselektronenmikroskopie

- PBS Puffer
 - Stammlösung A: 350,63 g NaCl, ad 2 L H₂O
 - Stammlösung B: 146,31 g Na₂HPO₄ × 2H₂O, 24,56 g Na₂HPO₄ × H₂O, ad 2 L H₂O
 - 50 ml A, 40 ml B, ad 1000 ml ddH₂O, pH Wert 7,4
- 20 % Paraformaldehyd
 - 8 g Paraformaldehyd, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
 - 40 ml H₂O, rühren und erwärmen
 - 1 M NaOH tropfenweise bis Lösung klar ist
- 0,2 M Natriumcacodylatpuffer
 - 42,8 g Natriumcacodylat, SERVA GmbH, Heidelberg
 - ad 1000 ml H₂O
 - pH Wert 7,3 mit 0,1 M HCl
- Karnovsky's Fixants
 - 0,5 ml Paraformaldehyd (20%)
 - 2,5 ml Glutaraldehydlösung (25%), Merck, Darmstadt
 - Natriumcacodylat Puffer (0,2 M)
 - 7 ml ddH₂O
- Osmiumtetroxid OsO₄
 - 2 ml OsO₄ 4%, Polysciences, Inc., Eppelheim
 - 6 ml Natriumcacodylat Puffer (0,1 M)
- EPON 812 (100 ml), Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
 - Lösung A: 29,4 g EPON 812 (Glycidether 100), 21,8 g DDSA (Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid)
 - Lösung B: 27,4 g EPON 812, 24,4 g MNA (Methylnadicanhydrat)
 - jeweils 30 min rühren, zusammengeben, 30 min rühren
 - 1,8 g DMP30 (Dimethylaminomethyl-phenol), Polymerisationsbeschleuniger, 30 min rühren
 - in 10 ml Spritzen bei -20°C lagern
- Propylenoxid getrocknet, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
 - Molekularsieb, Porenweite 0,3 nm, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
- Ethanol getrocknet, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
 - Molekularsieb, Porenweite 0,3 nm, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe

Tabelle 8: Verwendete Materialien und Geräte für die Transmissionselektronenmikroskopie

- Formvar, Plano, Wetzlar
- Biopsy Punch, Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main
- Transwell®-Kultursystem (Polycarbonat Membran 24 mm, 0,4 μm Porengröße), Corning Life Sciences, USA)
- Ultratrimm
- Diamantmesser (ultra 45°, Diatome, CH)
- Ultramikrotom UC6k, Leica Microsystems, Wetzlar
- Kupfergrids 75 Mesh, Plano, Wetzlar
- Goldgrids 300 Mesh, Kisker, Steinfurt
- Transmissionselektronenmikroskop (TEM) EM 109T, Carl Zeiss AG, Oberkochen

5.6 Messung der Zellvitalität und Proliferationsaktivität

Mit Hilfe von Vitalitäts- und Proliferationstests können unterschiedliche Chemikalien und Partikel auf ihr zytotoxisches und/oder proliferationshemmendes Verhalten hin untersucht werden. Hierbei können direkte Methoden, z. B. Zellauszählung, Anfärbung toter Zellen, Einbau von Farbstoffen in die DNA teilungsaktiver Zellen oder indirekte Methoden, z. B. Messung der Stoffwechselaktivität oder Zellmembranintegrität gewählt werden um Rückschlüsse auf die Vitalität und Teilungsfähigkeit der Zellen zu ziehen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte als direkte Methode eine Zellzählung mit Hilfe des CASY®1 Cell Counters und des BrdU Tests. Weiterhin wurden der MTT, LDH, und WST-1 als indirekte Methoden gewählt, die im Folgenden beschrieben werden.

5.6.1 Zellzahl

Die einfachste Methode um eine Aussage über akut toxische Auswirkungen auf Zellen einer Zellkultur zu machen, ist eine Zählung der Zellzahl nach erfolgter Inkubation mit der zu testenden Substanz. Im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollpopulation kann man schnell und einfach eine Beeinträchtigung der Zellvitalität feststellen.

Für diesen Versuch wurden in 6er Multi-Lochplatten je 1×10^6 Zellen

ausgesät, über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte der Start der Inkubation mit den zu testenden Partikelsuspensionen. Getestet wurden die Auswirkungen durch die Partikelbelastung nach 24, 48 und 72h. Hierfür wurde wie in Kapitel 5.3.4 beschrieben die Zellzahl ermittelt und mit der gemessenen Zellzahl der jeweiligen Kontrolle verglichen.

5.6.2 MTT Test

Der von Mosmann (1983) beschriebene MTT Test ist ein häufig verwendeter Vitalitätstest der die Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen bestimmt, indem die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen wird. MTT ist die Abkürzung für das gelbe Tetrazoliumsalz 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid. Es wird von lebenden Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien mittels NADH in einer Succinat-abhängigen Dehydrogenasen-katalysierten Reaktion zu wasserunlöslichen, blauen Formazan-Kristallen reduziert. Dieser Reaktionsschritt ist irreversibel. Für die photometrische Auswertung am Mikroplatten-/Absorptions-Reader werden die alkohollöslichen Kristalle mittels eines Isopropanol/HCl-Gemisches gelöst und der Einfluss des im Medium vorhandenen pH-Indikators Phenolrot durch die HCl-Ansäuerung minimiert. Hierbei färbt sich das Phenolrot gelb und stört so die Messung bei einer Wellenlänge von 570 nm am wenigsten. Die Höhe der Absorption ist dabei proportional zur mitochondrialen Stoffwechselaktivität der Zellen (Denizot & Lang, 1986) (siehe Abbildung 6).

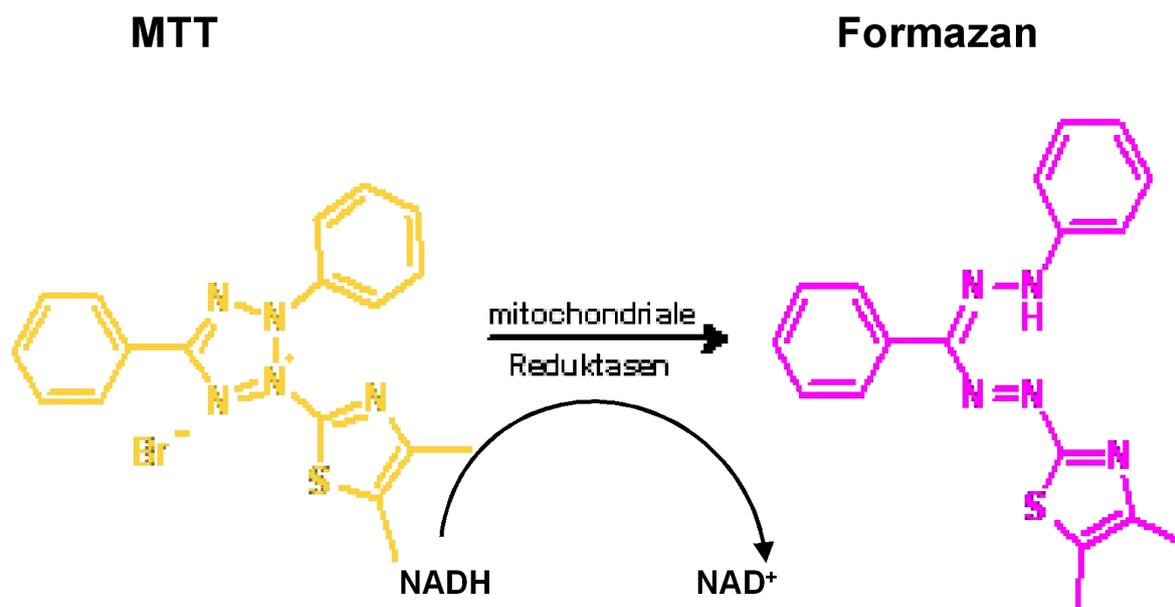


Abbildung 6: Mitochondriale Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses (MTT) zum blauen Formazanprodukt (verändert aus Produktkatalog Boehringer Mannheim, Cell Proliferation Kit I MTT)

Die Durchführung des Tests erfolgte in 96er Multi-Lochplatten. Pro Vertiefung wurden 25.000 Zellen ausgesät und über Nacht zum Anwachsen im Brutschrank inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit den entsprechenden Verdünnungen der Partikellösungen bzw. der zu testenden Chemikalien. Je Ansatz wurde eine fünffach-Bestimmung durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Platte in der Plattenzentrifuge zentrifugiert (350xg, 5 min) und der Überstand in eine neue Platte überführt um ihn für den LDH-Test zu verwenden (siehe Kapitel 5.6.4). Zu allen Ansätzen wurde nun eine MTT-Reaktionslösung mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml (in HBSS) zugegeben und für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (350xg, 5 min) wurden die gebildeten Formazan-Kristalle sedimentiert, der Überstand verworfen und die Kristalle mit 200 μ l Isopropanol/HCl je Vertiefung in Lösung gebracht. Durch erneute Zentrifugation wurde gewährleistet, dass noch vorhandene Zellbruchstücke für die anschließende Messung nicht mit in eine neue Platte überführt wurden, sondern nur der reine Überstand mit den gelösten Formazan-Kristallen. Die Proben wurden nun im Absorptions-Reader bei 550 nm gegen einen Leerwert (Isopropanol/HCl, zellfrei) gemessen. Hierbei korreliert die gemessenen Absorption mit der Menge an gebildetem Formazan, dies bedeutet, je niedriger die Absorption, desto weniger Formazan wurde

gebildet und desto niedriger ist die mitochondriale Aktivität als Maß für die Vitalität.

Tabelle 9: Material und Lösungen für den MTT Test

- MTT Stammlösung 5 mg/ml in HBSS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Isopropanol mit 1% HCl
- 96er Multi-Lochplatten
- Plattenzentrifuge
- Mikroplatten-/Absorptions-Reader

5.6.3 WST-1 Test

Ebenso wie der MTT Test bietet der WST-1 Test eine Möglichkeit die Vitalität von kultivierten Zellen anhand der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen zu überprüfen. hierfür wird ebenfalls ein Tetrazolium-Salz (schwach rötlich), das 2-(4-iodophenyl)-3(4-nitrophenyl)-5(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) verwendet. Es wird von lebenden Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien mittels NADH in einer ebenfalls Succinat-abhängigen, Dehydrogenase-katalysierten Reaktion zu einem gelben Formazan-Farbstoff reduziert, der im Gegensatz zum MTT Test wasserlöslich ist und ohne Isopropanol/HCl Extraktion gemessen werden kann. Die Intensität der Gelbfärbung korreliert auch hier mit der Menge an aktiven Dehydrogenasen. Dies bedeutet, je höher die Absorption, also die Intensität der Gelbfärbung, desto größer die Zahl der vitalen bzw. proliferierenden Zellen (siehe Abbildung 7).

Für die Durchführung des WST-1 Testes wurden die Zellen gemäß der Vorschrift für den MTT Test ausgesät und behandelt (siehe Kapitel 5.6.2). Nach erfolgter Partikel- bzw. Chemikalieninkubation wurden die Platten zentrifugiert (350xg, 5 min) und der Überstand verworfen. Zu allen Ansätzen wurde nun eine WST-1-Reaktionslösung mit einer Endkonzentration von 10% (in HBSS) zugegeben und für 2h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit dem gebildetem Formazan-Farbstoff in eine neue Platte überführt und im Absorptionsreader bei 450 nm gegen einen Leerwert (HBSS) gemessen. die

gemessene Absorption korreliert mit der Menge an gebildetem Formazan. Je geringer die Absorption, desto geringer war die mitochondriale Aktivität der Dehydrogenasen als Maß für die Vitalität der Zellen.

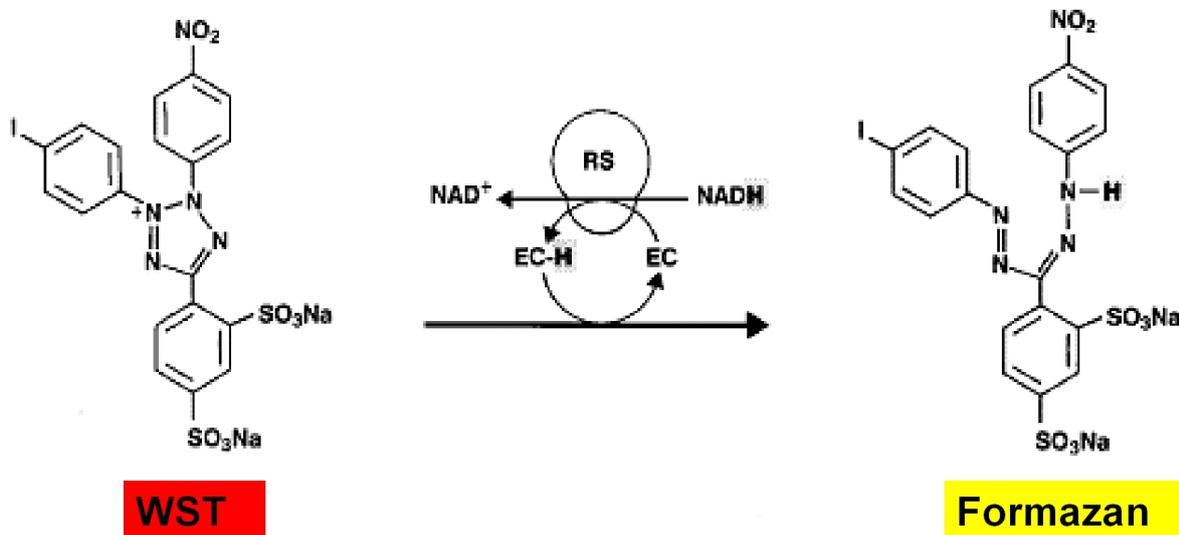


Abbildung 7: Mitochondriale Reduktion des rötlichen Tetrazoliums Salzes (WST) zum gelben Formazanprodukt (RS = mitochondriale Reduktasen) (verändert nach: www.roche.com)

Tabelle 10: Material und Lösungen für den WST Test

- WST-1 Lösung in HBSS, Roche Applied Science, Mannheim
- 96er Multiloch-Platten
- Plattenzentrifuge
- Mikroplatten-/ Absorptions-Reader

5.6.4 LDH Test

Der LDH Test ist ein weiterer *in vitro* anwendbarer Test, der eine Aussage über die Zytotoxizität einer Substanz erlaubt. Das Prinzip beruht hierbei auf der Bestimmung der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand der Zellen. LDH ist ein zytosolisches Enzym, dass nicht sekretiert wird und nur im Überstand nachweisbar ist, wenn es aus beschädigten oder zerstörten Zellen freigesetzt wurde. Je höher also der Grad an Zellschädigungen, desto größer ist die Menge an frei-

gesetztem LDH im Überstand (Rae, 1975).

Die LDH-Aktivität im Überstand wird indirekt mittels eines kommerziell erhältlichen enzymatischen Tests bestimmt. Es finden zwei Redox-Reaktionen statt: Im ersten Schritt wird Laktat durch LDH zu Pyruvat oxidiert, während das Co-Enzym NAD^+ durch die Übertragung von zwei Wasserstoffatomen (vom Substrat Laktat) zu NADH/H^+ reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert der im Testsystem enthaltene Katalysator Diaphorase Wasserstoff vom entstandenen NADH/H^+ auf das schwach gelbfarbene Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), welches dadurch zu dem rot gefärbten Formazan-Salz reduziert wird, während das NADH/H^+ wieder zu NAD^+ oxidiert wird. Diese Formazan-Farbstoff Bildung kann nun im Absorptionsreader bei 490 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) kolorimetrisch gemessen werden. Die Menge an LDH korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan-Salz und ist direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen. Als Positivkontrolle dienen Zellen, die unter Zugabe des Detergens Triton-X 100 (1%) vollständig lysiert wurden. Für die Durchführung des LDH-Tests wurden 25 μl Überstand aus den Ansätzen des WST Tests verwendet (siehe Kapitel 5.6.3) und in eine neue Platte überführt. Je Well wurden 75 μl PBS-/- zugegeben. Anschließend wurde die LDH-Reaktionslösung entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet und je Vertiefung 75 μl auf die Proben gegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln. Als Anhaltspunkt für das Fortschreiten Reaktion diente die Positivkontrolle, die nicht zu dunkel rot werden durfte, da die Messung im Absorptionsreader sonst zu ungenau werden würde. Durch Zugabe von 1 N HCl wurde die Reaktion abgestoppt und die Proben anschließend gegen einen Leerwert ($\text{PBS}^{-/-}$) im Absorptionsreader gemessen.

Tabelle 11: Material und Lösungen für den LDH Test

- Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche Applied Science, Mannheim
- 10% Triton-X 100
- 1 N HCl
- 96er Multi-Lochplatten
- Plattenzentrifuge
- Mikroplatten-/Absorptions-Reader

5.6.5 Zellproliferation-Messung mittels ELISA (BrdU)

Lebende, sich vermehrende (proliferierende) Zellen zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie in der Synthese-Phase der Mitose (Zellteilung) DNA synthetisieren. Der BrdU-Test ist eine kolorimetrische Methode nicht nur die Vitalität von Zellen, sondern auch ihre Fähigkeit zur Vermehrung zu untersuchen. Hierbei lässt man proliferierende Zellen anstelle der Base Thymidin das Pyrimidinanalogon 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) in die neusynthetisierte DNA einbauen. Die DNA wird nach erfolgter Inkubation mit der zu testenden Substanz und dem BrdU durch das Reagenz FixDenat denaturiert. Dies ermöglicht den primären Peroxidase gekoppelten Anti-BrdU-Antikörper das inkorporierte BrdU zu erreichen und an dieses zu binden und einen Immunkomplex zu bilden. Anschließend wird Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben, das, durch die an den BrdU-Anti-BrdU-Komplex gekoppelte Peroxidase, zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Diese Farbe schlägt, durch die anschließend zugegebene Schwefelsäure, in gelb um. In einer photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) kann die Farbintensität gemessen werden. Sie korreliert mit der Anzahl proliferierender Zellen. Je höher der Grad der Zellproliferation ist, desto höher ist die Menge an eingebautem BrdU und somit die Farbintensität.

Für die Durchführung des Tests wurden 25.000 Zellen pro Loch in 96er Multi-Lochplatten ausgesät und über Nacht zum Anwachsen in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die Partikelsuspensionen in den entsprechenden Verdünnungen zu den Zellen gegeben und erneut

im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe der BrdU-Lösung und die einzelnen Wasch- und Färbeschritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Die Messung und Auswertung der Proben erfolgte im Absorptionsreader bei 450 nm

5.7 Bestimmung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Der Nachweis intrazellulärer reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS), die zu Oxidativem Stress führen können, erfolgte mit Hilfe dreier Testverfahren.

5.7.1 DCF Test

In diesem Test erfolgt die Umwandlung des nicht-fluoreszierenden 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat ($H_2DCF-DA$) in das fluoreszierende 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) (Wan et al., 1993). ($H_2DCF-DA$) ist ungeladen und zellpermeabel. In der Zelle wird es durch unspezifische Esterasen zum geladenen Dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF) deacetyliert, welches jetzt die Zelle nicht mehr verlassen kann. In Gegenwart von Peroxidase/ H_2O_2 , $\cdot OR$, $\cdot OH$, $\cdot O_2^-$ sowie $ONOO^-$ wird der Farbstoff zum fluoreszierende DCF oxidiert, das im Fluoreszenzreader bei 488 nm Anregung und 530 nm Emission detektiert werden kann.

Für die Durchführung des Testes wurden 25.000 Zellen pro Vertiefung einer 96er Multi-Lochplatte ausgesät und über Nacht zum Anwachsen im Brutschrank inkubiert. Nach der anschließenden Partikelexposition der Zellen wurde der Mediumüberstand abgesaugt und die Zellen einmal mit saurem Waschwasser und mit HBSS gewaschen, damit möglichst wenige Partikel das Fluoreszenzsignal stören können. Als Positivkontrolle wurden die Zellen 1h vor Ende der Inkubation mit $250 \mu M H_2O_2$ behandelt. Danach erfolgte die Zugabe von $100 \mu l$ einer $50 \mu M H_2DCF-DA$ pro Vertiefung und einer 40 min Inkubation im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen, $200 \mu l$ HBSS zugegeben und am Fluoreszenzreader gemessen.

Da mit diesem Testsystem das Superoxidanion Radikal $\cdot O_2^-$ nicht sicher detektiert werden kann, da es auch während der Umwandlung von $H_2DCF-DA$ zu DCF entsteht und auch die Disproportionierung von $\cdot O_2^-$ zu H_2O_2 in Anwesenheit von Peroxidasen mehr $H_2DCF-DA$ zu

DCF umwandelt, was zur Selbstauffreicherung des Testsystems führt (Bonini et al., 2006; Rota et al., 1999), wurden die Ergebnisse mit weiteren Testsystemen bestätigt.

Tabelle 12: Material und Lösungen für den DCF Test

- 5 mM (in DMSO) 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA), Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Merck KGaA, Darmstadt
- 96er Multi-Lochplatten
- Fluoreszenzreader, MWG-Biotech AG, Ebersberg
- Software: Lambda KC4 2.7

5.7.2 DHR123 Test

Ebenso wie der DCF Test ist der DHR123 Test eine Methode um die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies zu messen. In diesem Test wird das zellgängige, nicht fluoreszierende Dihydrorhodamin (DHR123) durch die Radikale $\cdot\text{O}_2^-$ und $\text{NO}\cdot$ zum fluoreszierenden Rhodamin123 oxidiert, welches sich hauptsächlich in die Mitochondrien einlagert. Peroxidase/H₂O₂ und HOCl können ebenfalls DHR123 oxidieren (siehe Abbildung 8).

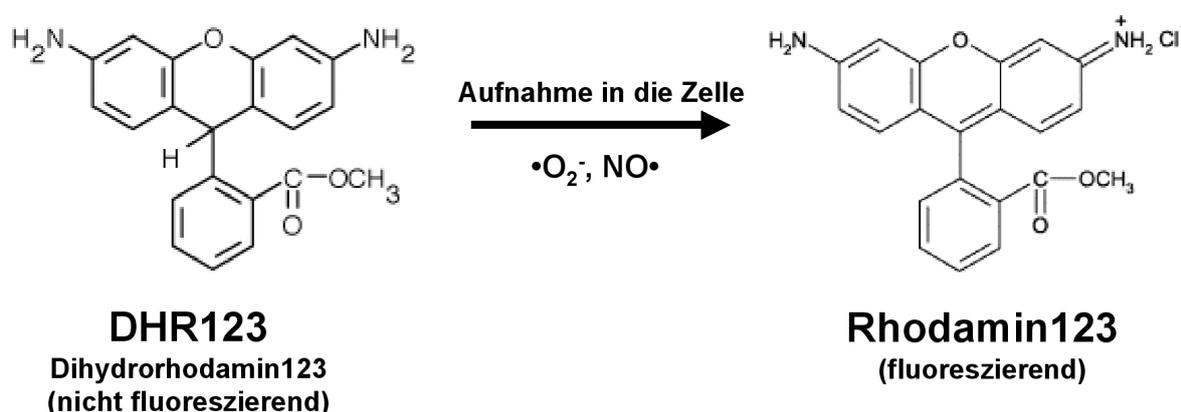


Abbildung 8: Messung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies mittels DHR123 Test. DHR123 gelangt in die Zelle und wird durch Radikale zu Rhodamin123 umgewandelt (verändert nach <http://probes.invitrogen.com>).

Die Durchführung des DHR123 Tests wurde gemäß den Vorschriften

des DCF Tests mit 100 μl 10, μM DHR123 durchgeführt, und am Fluoreszenzreader bei 488 nm Anregung und 530 nm Emission gemessen.

Tabelle 13: Material und Lösungen für den DHR123 Test

- 10 mM (in DMSO) Dihydrorhodamin123 (DHR123), Molecular Probes Inc., Leiden Niederlande
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Merck KGaA, Darmstadt
- 96er Multi-Lochplatten
- Fluoreszenzreader, MWG-Biotech AG, Ebersberg
- Software: Lambda KC4 2.7

5.7.3 DTNB Test

Mit Hilfe der Detektionsreagenz 5,5'-Dithio-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) kann der intrazelluläre Gehalt an Glutathion (GSH) und seiner oxidierten Form dem Glutathion-Disulfid (GSSG) gemessen werden. Glutathion ist ein Tripeptid (γ -Glutamin-Cystein-Glycin), das in allen Zellen und allen Organismen z. T. in hohen Konzentrationen vorkommt. GSH hält das Redoxpotential in den Zellen konstant, indem es die Thiolgruppen von Proteinen reduziert, es dient als Antioxidanz, aber auch der Entgiftung von Xenobiotika (Glutathion-S-Transferase), der Synthese von Leukotrienen und ist am Transport und der Speicherung von Cystein beteiligt. Außerdem spielt es eine Rolle in der Signaltransduktion, bei der Zellproliferation, Genexpression und in der Apoptose. In unserem Fall steht die Rolle als Antioxidanz im Vordergrund. Im normalen Zellstoffwechsel liegt ein hoher Überschuss an der reduzierten Form, dem GSH, vor. $\cdot\text{O}_2^-$ Radikale werden durch die Superoxiddismutase zu H_2O_2 reduziert. Dieses wird mit Hilfe der Glutathionperoxidase unter Oxidation von GSH zu GSSG zu $2\text{H}_2\text{O}$ umgewandelt. Die NADPH-abhängige Glutathionreduktase (GR) reduziert dann GSSG wieder zu GSH. Bei erhöhter Belastung mit Sauerstoffradikalen erhöht die Zelle den Gehalt an GSH und GSSG und dieser Anstieg ist messbar.

DTNB wird durch die Thiolgruppen des GSH unter Bildung von 5'-Thio-(2-nitrobenzoesäure) (TNB) reduziert, wobei GSSG entsteht. Bei der Bestimmung des GSH Gehalts sind nun die Konzentrationen von

DTNB, NADPH und Glutathionreduktase so eingesetzt, dass die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion proportional zur Konzentration des Glutathions verläuft. Die Bildung bzw. Zunahme von TNB lässt sich im Absorptionsreader bei 412 nm messen.

Für die Durchführung wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung in 6er Multi-Lochplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Exposition. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit $250 \mu\text{M}$ H_2O_2 behandelt. Nach der Exposition wurden die Zellen einmal mit saurem Waschpuffer und einmal mit $\text{PBS}^{-/-}$ gewaschen, mit Trypsin geerntet und abzentrifugiert (5 min, $350 \times g$). Das Zellpellet wurde mit 150

μl einer 10 mM HCl -Lösung überschichtet, gevortext und bei -80°C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und die Zelllysate resuspendiert. $10 \mu\text{l}$ des Lysats wurden zur Proteinbestimmung verwendet (s. Kapitel 5.9.2). $120 \mu\text{l}$ wurden zur Bestimmung der GSH Konzentration verwendet. Dafür wurden für 10 min $30 \mu\text{l}$ einer $6,5\%$ igen (w/v) Sulfosalizylsäure zugefügt, um die Proteine zu präzipitieren. Anschließend wurden die Präzipitate zentrifugiert ($10.000 \times g$, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde zur Glutathion-Bestimmung eingesetzt und bis zur Messung bei -20°C gelagert. Für die Messung wurden pro Reaktionsansatz $10 \mu\text{l}$ der Probe bzw. des GSH-Standards ($0-50 \mu\text{M}$) in eine 96er Multi-Lochplatte gegeben, mit $40 \mu\text{l}$ GSH-Reaktionspuffer auf ein Volumen von $50 \mu\text{l}$ gebracht und anschließend mit $100 \mu\text{l}$ der Enzymreaktionslösung versetzt. Die Messung erfolgte am Absorptionsreader über 3 min bei einer Wellenlänge von 412 nm. Die GSH Konzentration wurde mit Hilfe der Eichgerade ermittelt und auf die ermittelte Proteinkonzentration bezogen.

Tabelle 14: Material und Lösungen für den DTNB Test

GSH-Puffer:
• 0,1 M NaH ₂ PO ₄ H ₂ O
• 5 mM EDTA (pH 7,4)
Enzym-Reaktionslösung:
• 0,3 mM NADPH
• 0,225 mM DTNB
• 1,5 U/ml GR in GSH-Puffer
• 96er Multi-Lochplatten
• Fluoreszenzreader, MWG-Biotech AG, Ebersberg
• Software: Lambda KC4 2.7

5.8 Durchflusszytometrische Bestimmung der Partikel- aufnahme

5.8.1 Messtechnik

Die fluoreszenzunterstützte Durchflusszytometrie ist eine relativ junge Labortechnik, die in der Medizin meist für die Untersuchung von Zellen des Blutes oder Knochenmarks eingesetzt wird. Mit dieser Technik können verschiedene Eigenschaften von Zellen oder anderen Teilchen untersucht werden, während diese in einem Flüssigkeitsstrom hintereinander durch eine dünne Messkammer fließen.

Ein Durchflusszytometer besteht aus einer Flusskammer, einer optischen Bank und einer Analyseeinheit. Zellen in Suspension werden durch die Passage der Träger- oder Scheideflüssigkeit vereinzelt. Hierbei fließt die Probenflüssigkeit als laminarer Strom durch einen zentralen Kern und mischt sich nicht mit der schneller fließenden Scheideflüssigkeit. Durch die Geschwindigkeitsunterschiede der beiden Strömungen werden die Zellen hydrodynamisch vereinzelt (hydrodynamische Fokussierung) und passieren dann nacheinander die optische Bank, bestehend aus einer Linse die das Licht aus einem bzw. zwei Lasern bündelt. Bei dem, für die Untersuchungen der Partikel-
aufnahme verwendeten, Durchflusszytometer handelt es sich um ein Flow Cytometer BD LSR II

(FACS)(BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg). Als Laser wurde ein Argonlaser (Laser 488nm Spectra-Physics 163, Argonion 488nm (blue)) verwendet, der Licht mit einer Wellenlänge von 488nm erzeugt, welches von den Zellen ohne Veränderung der Wellenlänge in vorwärts und seitwärts Richtung gestreut wird. Das Streulicht wird durch einen Bandpassfilter verstärkt und von einer Photodiode detektiert.

Folgende Eigenschaften von Zellen werden mit Hilfe der fluoreszenzunterstützten Durchflusszytometrie gemessen:

Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Light Scatter Angle*, FSC), auch Volumen- oder Größensignal genannt, ist das Licht, welches in Richtung der Lichtquelle gestreut wird. Es wird von einem Photodetektor gemessen und steht in Relation zur Größe und zum Volumen der Zelle. Das heißt, kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes. Weiterhin ist es abhängig vom Brechungsindex der Zelle.

Das Seitwärtsstreulicht (*Side Light Scatter Angle*, (90°), SSC) wird von einem im rechten Winkel zur Lichtquelle des einfallenden Lichtes stehenden Photomultiplier gemessen. Detektiert wird das Licht, welches von der Zelloberfläche seitlich gestreut wird. Es hängt neben der Größe, der Oberflächenbeschaffenheit auch sehr stark von der internen Struktur einer Zelle ab und damit von ihrer Granularität. Finden sich in der Zelle z. B. sehr viele Lysosomen, dann hat sie ein großes Seitwärtsstreulicht, finden sich nur wenige, dann ist ihr Seitwärtsstreulicht gering. Das SSC wird auch als Granularitäts- oder orthogonales Licht-Streu-Signal bezeichnet.

Während die Streulichtintensitäten, die durch des FSC-Detektor und SSC-Photomultiplier gemessen werden, von den physiologischen Charakteristika der Zellen abhängen, liegen im hier benutzten Durchflusszytometer sechs Photomultipliere vor, die von den Zellen emittiertes Fluoreszenzlicht detektieren können. Diese Fluoreszenzdetektoren (FL1, FL2, FL3, FL4, FL5, FL6) stehen ebenfalls im rechten Winkel zum einfallenden Licht des Argonlasers.

Während die gemessenen Fluoreszenzintensitäten logarithmisch verstärkt werden, werden FSC-Signale meist linear verstärkt. Die FSC-Photodiode hat fünf Verstärkungsstufen, die je nach Zellgröße verwendet werden (E00, E01, E02, E03 für Zelldurchmesser von 5-10 μm) und E-1 (Zelldurchmesser 15-30 μm). Alle anderen Detektoren können

auf Verstärkungen zwischen 150 und 1000 Volt eingeregelt werden. Alle im Folgenden verwendeten Detektorparameter sind in Tabelle 15 aufgeführt. Zur Bestimmung der Partikelaufnahme wurde für nicht fluoreszierende Partikel das FSC und das SSC als Maß für die Größe und Granularität ungefiltert aufgenommen. Die Aufnahme von fluoreszierenden Partikeln wurde mit Hilfe des Fluoreszenzdetektors FL1 (Emission 530nm +/- 28 nm, z. B. FITC, GFP, DHR) dokumentiert. Die Signale werden auf einem Computer mit Hilfe der Software CELLQuestTM (Becton Dickinson, Heidelberg) graphisch dargestellt und quantifiziert.

Tabelle 15: Detektorparameter und Einstellungen zur Messung der Partikelaufnahme

Detektor	Voltage	AmpGain
FSC	E00	1,00
SSC	680	Log
FL1 A549	520	Log
FL1 ECV304	500	Log
FL1 THP-1	480	Log

5.8.2 Praktische Durchführung

Die Untersuchungen zur Partikelaufnahme und deren Inhibition mit verschiedenen Inhibitoren erfolgten je in drei Ansätzen und in mindestens drei unabhängigen Experimenten. Für alle Versuche wurden, wenn nicht anders beschrieben, jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung in 24er Multi-Lochplatten ausgesät und über Nacht zum Anwachsen in den Brutschrank gestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Inhibitoren und Partikelsuspensionen. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Versuchsansatz mit unbehandelten Zellen. Nach der Inkubation wurden die Zellen gründlich mit einem sauren Waschpuffer und mit PBS^{-/-} gewaschen, mit Trypsin (5 min) bzw. Accutase (10 min) für die THP-1 Zellen, vom Boden gelöst und zentrifugiert (350xg, 5 min). Das Zellpellet wurde in eiskaltem PBS^{-/-} resuspendiert und die Zellen maximal 1h auf Eis bis zur Messung gelagert.

5.8.3 Studien zur Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit

Um quantitative Aussagen über die Partikelaufnahme in Zellen machen und Unterschiede im Aufnahmeverhalten der verschiedenen Zelllinien beurteilen zu können, wurden mit allen drei Zelllinien Studi-

en zur Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit durchgeführt. Um die Zeitabhängigkeit im Aufnahmeverhalten zu untersuchen wurden je Partikel $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) auf die Zellen gegeben und für 1, 4, 6, 24 und 48h Stunden inkubiert. Um die Konzentrationsabhängigkeit im Aufnahmeverhalten zu untersuchen wurden je Partikel für 4h folgende Konzentrationen getestet: 0, 0.5, 5, 12.5, 25, 37.5, $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0, 1, 10, 25, 50, 75, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$).

5.8.4 Studien zur Energieabhängigkeit der Aufnahme

Um eine Aussage zu treffen, ob die Aufnahme der Silica Nanopartikel ein energieabhängiger Prozess ist oder auf Diffusion beruht, wurden zwei verschiedene Methoden zur Inhibition der Aufnahme in A549 Zellen verwendet.

5.8.4.1 Hemmung der Partikelaufnahme durch tiefe Temperaturen

Da an energieabhängigen Aufnahmeprozessen viele Enzyme beteiligt sind und auch die Membranfluidität eine wichtige Rolle spielt, ist der einfachste Weg diese Prozesse zu unterbinden, das Herabsenken der Temperaturen. Dies führt dazu, dass Enzyme nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr funktionieren, da sie ein Temperaturoptimum besitzen, dass bei den hier verwendeten Zellen bei 37°C liegt. Außerdem versteift sich nach dem Flüssig-Mosaik-Modell die Membran mit sinkenden Temperaturen mehr und mehr, und in die Membran eingelagerte Proteine und Protein-Porenkomplexe sind nicht mehr beweglich genug um dorthin zu wandern wo sie für Aufnahmeprozesse benötigt werden.

Für diesen Versuch wurden 1×10^5 Zellen in 12er Multilochplatten ausgesät und im Brutschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 1h im Kühlschrank bei 4°C vorinkubiert. Um ein versehentliches Anheben der Temperatur beim Öffnen der Tür zu verhindern wurden die Kulturplatten mit Kühlakkus umgeben. Außerdem erfolgten alle Schritte außerhalb des Kühlschranks auf Eis. Ohne die Kühlung zu unterbrechen, wurden die auf Eis gelagerten Partikelsuspensionen in drei verschiedenen Konzentrationen (2.63 , 13.16 , $26.32 \mu\text{g}/\text{cm}^2 = 10$, 50 , $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) auf die Zellen gegeben und für 1, 3, 6h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem saurem Waschpuffer und $\text{PBS}^{-/-}$ gewaschen und mit einem Zellschaber abgeschabt. Als Kontrol-

le fungierten unbehandelte Zellen und die selbe Versuchsanordnung bei 37°C.

5.8.4.2 Hemmung der Atmungskette mit Dinitrophenol

Wichtig für Energieabhängige Aufnahmeprozesse ist die Anwesenheit des zellulären Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP). Bei der Hydrolyse seiner Phosphatbindungen wird Energie freigesetzt, die die Zelle für endergonische Prozesse verwenden kann. Mit Hilfe der ATP-Synthase, einem Enzymkomplex in der Innenmembran der Mitochondrien, wird die Bildung von ATP aus ADP (Adenosindiphosphat) und anorganischen Phosphat in der Atmungskette durch oxidativen Phosphorylierung katalysiert. Außerdem kann die Zelle in der Glycolyse durch die Spaltung von Glucose ATP gewinnen.

Um energieabhängige Aufnahmeprozesse zu inhibieren wurde hier als zweite Möglichkeit ein Atmungskettenentkopplers, das 2,4-Dinitrophenol (DNP) eingesetzt. Es verursacht einen Kurzschluss im Protonengradienten, indem es die Membran für Protonen durchlässig macht. So fehlt die protonenmotorische Kraft, die für die ATP-Synthese nötig ist.

Um der Zelle die Möglichkeit zu nehmen Energie aus der Glycolyse zu beziehen, wurden die Zellen zusätzlich 1h vor Einsatz des Inhibitors und im weiteren Versuchsverlauf mit glucosefreiem Medium inkubiert. Die Wirkung der ATP-Depletion wurde vorher mit Hilfe eines ATP-Biolumineszenz Assays (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche Applied Science, Mannheim) am Fluoreszenzreader überprüft. Der Test nutzt die ATP-Abhängigkeit des Enzyms Luciferase für die Oxidation von Luciferin. Das bei dieser Reaktion freiwerdende Licht kann detektiert werden und steht im direkten Zusammenhang mit dem Gehalt an ATP in der Zelle. Mit Hilfe einer ATP-Standardkurve kann der Gehalt an ATP berechnet werden. Hierfür wurden die Zellen für 1h mit verschiedenen Konzentrationen DNP in glucosefreiem Medium behandelt, die Zellen lysiert, das Luciferasereagenz des Kits zugegeben und die Messung gestartet (Daten nicht gezeigt).

Die für die anschließenden Inhibitionsversuche am FACS verwendete DNP Konzentration ergab sich aus diesen Versuchen zur ATP-Depletion und ist in Tabelle 16 dargestellt. Die Zellen wurden 1h mit DNP vorinkubiert und anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Parti-

kelsuspensionen in einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) für weitere 3h.

5.8.5 Inhibition der Aufnahmewege in die Zelle

Um die möglichen Wege der Partikelaufnahme in Zellen untersuchen zu können, wurden gezielt die in Kapitel 4.4 genannten Aufnahmewege mit spezifischen Inhibitoren (Tab. 16) gehemmt. Dafür wurde die entsprechende Menge an Inhibitor in das Kulturmedium pipettiert und die Zellen bei 37°C im Brutschrank für 1h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen zusätzlich mit den Partikelsuspensionen in einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) für weitere 3h. Diese Inkubationszeit wurde gewählt, da sich zeigte, dass nach einer längeren Inkubationszeit von 24h die Inhibitoren teilweise durch die Zellen abgebaut waren und keinen Effekt auf die Partikelaufnahme mehr hatten (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 16: Verwendete Inhibitoren, deren Konzentration und Funktion

Inhibitor	eingesetzte Konzentration	Funktion
Cytochalasin D (Stock: 10 mM)	$15 \mu\text{M}$	Inhibitor des Aktinzytoskeletts
Dinitrophenol (Stock: 1 M)	$500 \mu\text{M}/1 \text{ mM}$	Inhibitor der Atmungskette
Mannan (Stock: 1 mg/ml)	$10 \mu\text{g}/\text{ml}$	Inhibitor des Mannoserezeptors
M- α -D-MP (Stock: 10 mg/ml)	$200 \mu\text{g}/\text{ml}$	Inhibitor des Mannose-Rezeptors
Poly-G (Stock: 5 mg/ml)	$200 \mu\text{g}/\text{ml}$	Inhibitor der Scavanger-Rezeptoren
Fucoidan (Stock: 1 mg/ml)	$10 \mu\text{g}/\text{ml}$	Inhibitor der Scavanger-Rezeptoren
Chlorpromazin (Stock: 1 mM)	$25 \mu\text{M}$	Inhibitor der Clathrin vermittelten Endocytose
Filipin (Stock: 5 mg/ml)	$5 \mu\text{g}/\text{ml}$	Inhibitor der Caveolin vermittelten Endocytose
p-Nitro (Stock: 20 mg/ml)	$10 \mu\text{g}/\text{ml}$	Inhibitor der Fc γ -Rezeptoren
Lovastatin (Stock: 25 mg/ml)	$100 \mu\text{M}$	Inhibitor der Fc γ -Rezeptoren
Camptothecin (Stock: 10 mM)	$10 \mu\text{M}$	Inhibitor der Topoisomerase I

5.9 Methoden zur Proteinanalytik

5.9.1 Herstellung von Ganzzellextrakten

Für alle Versuche zur Proteinanalytik wurden 1×10^6 Zellen pro Vertiefung in 6er Multi-Lochplatten in einem Volumen von 2 ml Zellkulturmedium ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Mediumüberstand entfernt und es erfolgte die jeweilige Inkubation mit Partikeln in frischem Zellkulturmedium in einem Volumen von 1 ml. Nach Behandlung wurden die Zellen mit saurem Waschpuf-

fer und PBS^{-/-} gewaschen und mit einem Plastikschaber (Nunc, Rochester, NY, USA) in 1 ml PBS^{-/-} abgeschabt. Die Vertiefungen wurden noch mit 1 ml PBS^{-/-} nachgespült. Anschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (400xg, 5 min, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 100 µl denaturierendem RIPA-Lysepuffer (siehe Tab. 17) aufgenommen und 30 min auf Eis lysiert. Da bei diesem Zellaufschluß vorhandene Proteasen und Phosphatasen freigesetzt werden, wurden dem Lysepuffer Proteaseinhibitoren und alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Nach Ablauf der Lyse wurden die Proben zentrifugiert (21000xg, 10 min, 4°C) und der klare, Überstand mit den Ganzzell-extrakten vorsichtig abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 17: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers

<ul style="list-style-type: none">• 150 mM NaCl• 20 mM Tris-HCl, pH 7,4• 0,5% Deoxycholat, Na-Salz• 0,1% SDS• 1% Triton-X 100• gelöst in dest. H₂O, pH 8 <p>Proteaseinhibitoren frisch auf 1 ml RIPA-Lysepuffer:</p> <ul style="list-style-type: none">• 0,1 mM Natriumvanadat• 2 µg/ml Leupeptin• 2 µg/ml Aprotinin• 1 mM PMSF
--

5.9.2 Proteinbestimmung

Um einen gleichmäßigen Proteinansatz im Western Blot zu gewährleisten, wurde die Proteinkonzentration in den Zelllysaten nach der Methode von Smith et al. (1985) mit Hilfe der Biuret-Reaktion (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Die Methode basiert auf der Komplexbildung von Proteinen mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung. Es folgt eine Reduktion der Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen, die mit Bicin-

chonsäure (BCA) einen wasserlöslichen, violetten Farbkomplex bilden. Dieser zeigt eine starke Lichtabsorption bei 562 nm, die linear zur ansteigenden Proteinkonzentration zunimmt und im Absorptionsreader gemessen werden kann.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde eine Eichkurve mit Proteinlösungen bekannter, steigender Konzentration aus Rinderserum-Albumin (BSA) in PBS^{-/-} erstellt (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Jeweils 10 μl wurden in Doppel-Bestimmung in eine 96er Multi-Lochplatte pipettiert, und ebenfalls je 10 μl des zu messenden Proteinlysates. Hinzugefügt wurden 200 μl BCA-Reagenz, bestehen aus 50 Teilen BCA-Lösung und einem Teil einer 4% CuSO₄-Lösung. Nach anschließender 30 minütiger Inkubation im Brutschrank und einer kurzen Abkühlphase wurden die Proben bei 562 nm im Absorptionsreader gemessen (Molecular Devices, USA) und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Software SOFTmax®PRO 3.0 (Molecular Devices, USA) und der Standard-Eichgerade ermittelt.

Entsprechend den Ergebnissen aus der Proteinbestimmung wurden je 10 μg in 1 x SDS-Gel-Ladepuffer (Lämmli-Puffer)(Tab. 19), mit RIPA-Lysepuffer angesetzt, aufgenommen und für die weitere Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) vorbereitet.

5.9.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gel-Elektrophorese dient der Analyse von Proteingemischen und ermöglicht eine schnelle Bestimmung durch Auftrennung von Proteinen über deren Molekulargewichte (Laemmli, 1970). Die Auftrennung der Proteine erfolgt unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von anionischen Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat (SDS). SDS unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen und bildet mit Proteinen negativ geladene Komplexe mit konstantem Ladungs-/Masseverhältnis (Lehninger, 1977; Stryer, 1988). So unterscheiden sich die Komplexe nur noch durch ihre Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelen, in denen der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Pluspol (Anode) wandert und der Molekularsiebeffekt der Gel-Matrix die Proteine nach ihrem Molekulargewicht

auftrennt.

Das Gel setzt sich aus einem engporigen Trenngel mit einer Polyacrylamidkonzentration von 10% und einem 5% weitporigen Sammelgel zusammen. Zur Herstellung der Gele wird eine Acrylamid-Fertiglösung verwendet (Rotiphorese® Gel 30, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe), welche neben 30% Acrylamid bereits mit 0,8% Bisacrylamid versetzt war. Die Gele wurden gemäß Tab. 18 angesetzt. Unmittelbar vor dem Gießen wurde Tetramethylethyldiamin (TEMED) zum Start der Polymerisation zugegeben.

Tabelle 18: Zusammensetzung eines 5%igen Sammel- und 10%igen Trenngels

	Sammelgel 5%	Trenngel 10%
Rotiphorese ^R Gel 30	1,70 ml	3,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	2,50 ml
2 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,62 ml	-
20% SDS	0,05 ml	0,05 ml
dest. H ₂ O	7,47 ml	4,00 ml
10% APS	0,10 ml	0,10 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

Zuerst wurde das Trenngel in einer vertikalen Apparatur (BioRad, München) mit 0,75 mm Spacern gegossen und zur Vermeidung von Blasenbildung und der Gewährleistung einer gleichmäßigen Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol abgekippt, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und mit einem 10er Probenkamm versehen. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Kamm entfernt, die Gele in die Elektrophorese-Apparatur (BioRad, München) eingespannt und diese mit Laufpuffer (Tab. 20) gefüllt. Die zu analysierenden Proteinlysate wurden mit 1 x Lämmli-Puffer (Tab. 19) auf 15 µl aufgefüllt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 170 V, 400 mA, für etwa 1h.

Tabelle 19: Zusammensetzung des 2 x SDS-Gel-Ladepuffer (Lämmli-Puffer)

- 2 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8)
- 2,5 ml 20% SDS
- 2,85 ml Glycerol
- 0,01 g Bromphenolblau
- 0,5 ml β -Mercapthoethanol
- 4,65 ml dest. H₂O

Tabelle 20: Zusammensetzung des Laufpuffers

- 25 mM Tris-BASE
- 1,2 mM Glycin
- 1% SDS (w/v)
- gelöst in dest. H₂O

5.9.4 Western Blotting durch Elektrotansfer

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, 0,45 μ m Porengröße, Millipore GmbH, Schwalbach) erfolgte mittels *Tank Blot*-Verfahren um spezifische Proteine anschließend durch Immunfärbung sichtbar zu machen (Gultekin & Heermann, 1988; Towbin et al., 1979). Um Verunreinigungen zu beseitigen und die Proteinbindestellen zu aktivieren, wurde die Membran zunächst mit Methanol gespült und anschließend mit dest. Wasser gewaschen. Nun wurde die Membran luftblasenfrei auf das Gel überführt und je zwei Lagen Filterpapiere (Protean Blotpapier, BioRad, München) als äußere Begrenzungen verwendet. Dieser Aufbau wurde in eine Blot-Halterungskassette eingespannt und in eine mit speziellem Blotpuffer gefüllte Blotkammer überführt. Das Gel kommt hierbei in Richtung der Kathode und die Membran in Richtung der Anode zu liegen, damit die negativ geladenen Proteine auf die Membran gezogen werden können. Die Zugabe eines Kühlakkus und ständiges Rühren verhindert eine Erwärmung der Apparatur. 1h Transfer erfolgt bei 100 V und 400 mA.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Blotpuffers

- 25 mM Tris-BASE
- 192 mM Glycin
- 10% Methanol (v/v)
- gelöst in dest. H₂O

5.9.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran für 5 min in PBS-T (PBS^{+/+} mit 0,1% Tween-20 (v/v)) gewaschen um das Methanol zu entfernen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran anschließend für 1h bei Raumtemperatur in 5%iger Magermilch in PBS-T auf einer Wippe inkubiert. Danach wurde die Membran 3x für je 10 min mit PBS-T gewaschen und mit den jeweiligen (Tab. 22) aufgeführten Primärantikörpern in 5%iger Magermilch in PBS-T über Nacht bei 4 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden überschüssige Antikörpermoleküle durch dreimaliges Waschen mit PBS-T für je 10 min entfernt. Anschließend wurde die Membran mit dem gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichteten sekundären, Meerrettichperoxidase-gekoppelten, Antikörper in 5%iger Magermilch in PBS-T auf einer Wippe bei Raumtemperatur 1h inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran erneut 3x für je 10 min in PBS-T gewaschen.

Tabelle 22: Auflistung der verwendeten Antikörper für die Proteinanalytik

primäre Antikörper	Verdünnung	Vertrieb
anti-Caveolin I	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
anti-Clathrin	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
anti-Topoisomerase I	1 : 1000 / 1 : 250	Abcam, UK
anti-Aktin	1 : 2000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
anti-ERK1/2	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Vertrieb
anti-Goat-HRP	1 : 3000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
anti-Mouse-HRP	1 : 4000	Dako, Glostrup, Denmark
anti-Rabbit-HRP	1 : 3000	Amersham Biosciences, München
anti-Mouse-AlexaFluor 594	1 : 1000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
anti-Mouse-AlexaFluor 546	1 : 1000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Die Visualisierung der immobilisierten Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte mittels ECL-System (*Enhanced Chemiluminescence*, ECL PlusTM Western Blotting Detection Reagent, Amersham Biosciences, München). Dazu wurden die beiden Komponenten des ECL-Kits 40:1 (v/v) gemischt. Die Membran wurde mit der Reagenz benetzt, 5 min inkubiert, in Frischhaltefolie verpackt und in eine Filmkassette überführt. Die, an die sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase, katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine lichtemittierende Reaktion aus. Die Detektion erfolgte in einer Dunkelkammer mit einem speziellen Film (HyperfilmTM-ECL, Amersham Biosciences, München), der an den spezifischen Stellen durch das emittierte Licht belichtet wird, was sich nach Entwicklung des Filmes als Schwärzung zeigt. Die Belichtung hängt von der Menge des vorhandenen Proteins und der gekoppelten Menge an HRP-Antikörper ab. Die entwickelten Filme wurden anschließend mit Hilfe eines Flachbettscanners eingescannt. Als Software zur quantitativen Auswertung der Proteinbanden kam GelScan Pro Version 4 (BioSciTec Science Group, Marburg) zum Einsatz.

5.10 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist ein Verfahren um Proteine und Strukturen im subzellulären Bereich mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops darzustellen. Dies kann über, mit fluoreszierenden Farben gekoppelte, Antikörper oder über Chemikalien, die direkt an die zu färbenden Strukturen binden, stattfinden. Die Betrachtung der Proben erfolgt in einem Fluoreszenzmikroskop (DM IRE2, Leica Microsystems, Wetzlar). Mit Hilfe einer Digitalkamera (Hamamatsu Orca-ER C4742-80-12AG, Hamamatsu Photonics K.k., Japan) wurden die Bilder digital gespeichert und anschließend mit Computer mittels der Software Improvion Volocity 4 (Improvion, Coventry, England) bearbeitet.

5.10.1 Fixierung der Zellen

Für die Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurden 1×10^5 Zellen je Kammer in gekammerte Objektträger, sogenannte *4er Chamber Slides* (Lab-Tek® Chambered 1 Borosilicate Coverglass System, Nunc, Rochester, NY, USA), ausgesät und über Nacht im Brutschrank zum Anwachsen inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit

den jeweiligen Partikellösungen. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen einmal mit saurem Waschpuffer und einmal mit PBS^{-/-} gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch eine 30 minütige Inkubation mit 4%igem Paraformaldehyd auf Eis fixiert. Damit die Antikörper, bzw. färbenden Chemikalien in die Zellen eindringen können, erfolgte, nach zweimaligem Waschen mit PBS^{-/-}, eine 3 minütige Inkubation mit 1%igem TritonX 100 in PBS^{-/-} (bzw. 30 min mit 0,2%igem für die Topoisomerase I Anfärbung) um die Zellmembranen zu permeabilisieren.

5.10.2 Fluoreszenzfärbung durch Antikörperbindung

Um bestimmte Proteine in der Zelle durch mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelten Antikörpern hervorzuheben, wurden die Zellen zunächst, ähnlich wie im Western Blot Verfahren, mit 3%igem BSA in PBS-T 1h bei Raumtemperatur geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem primären Antikörper gegen Topoisomerase I (anti rabbit) in 3%igem BSA in PBS-T, in einer 1:250 Verdünnung über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag erfolgte, nach dreimaligem Waschen mit PBS-T die Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper (ALEXA, anti rabbit, 495 nm Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in 3%igem BSA in PBS-T in einer 1:1000 Verdünnung für 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen nochmals 3x mit PBS-T gewaschen und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

5.10.3 Kernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342)

Um die Kernstrukturen hervorzuheben wurden die fixierten Zellen mit 10 μ M Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) für 30 min inkubiert. Es handelt sich um einen membrangängigen Farbstoff, der auch an unpermeabilisierten Zellen angewandt werden kann und bevorzugt an AT-reiche Sequenzen der DNA bindet, ohne zu interkalieren. Somit kommt es zur Färbung des Zellkerns. Um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, müssen die Zellen anschließend mit PBS^{-/-} gewaschen und bis zur mikroskopischen Untersuchung bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden. Die Betrachtung der Proben erfolgt bei einer maximalen Anregung im UV-Bereich (360 nm) und einer Emission im Blau-Bereich (425 nm).

5.10.4 Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit Rhodamin Phalloidin

Um das Aktin-Zytoskelett der Zellen hervorzuheben wurde eine Färbemethode mittels Rhodamin Phalloidin gewählt. Phalloidin ist ein Toxin des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloide*), ein Cyclopeptid das zu den Phallotoxinen gehört und irreversibel an F-Aktin bindet. Gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin lässt sich so das Zytoskelett darstellen und charakterisieren.

Für diese Färbung wurden die fixierten Zellen mit einer 1:30 Verdünnung (in PBS^{-/-}) der Rhodamin Phalloidin Lösung für 2h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS^{-/-} gewaschen um den restlichen Farbstoff zu entfernen. Bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Zellen bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Anregung erfolgte bei 554nm und die Emission im Rot-Bereich (573 nm).

5.11 Methoden zur DNA-Analytik

Zum Nachweis bestimmter Proteine und Rezeptoren bereits auf RNA-Ebene wurde die Methodik der Reversen Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) gewählt. Hierbei wird das Vorhandensein der Gene, die für bestimmten Proteine codieren, qualitativ nachgewiesen. Hierfür wird zunächst die gesamte RNA der Zellen isoliert, diese in cDNA umgeschrieben, und kleine Teilstücke der gesuchten Gene mit Hilfe von DNA-Primern vermehrt (amplifiziert) und auf Agarose-Gelen dargestellt. Diese Methode ist äußerst empfindlich, da sie sogar ein einzelnes DNA-Molekül in einer Probe entdecken kann. außerdem ist sie eine kostengünstige Alternative zum Western Blotting, da die verwendeten Primer wesentlich günstiger sind als Antikörper (Alberts et al., 2004).

Gezeigt wurde hier nicht nur die Anwesenheit gesuchter DNA-Fragmente in unbehandelten Kontrollzellen, sondern auch in mit Silica Partikeln für 4h und 24h in einer Konzentration von 100 µg/ml (10,4 µg/cm²) behandelten Ansätzen.

5.11.1 RNA Isolierung

Für die Durchführung der RT-PCR wurden 5x10⁵ Zellen in 6er Multi-Lochplatten ausgesät und über Nacht zum Anwachsen im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation der Zellen mit den

jeweiligen Partikellösungen in Medium für 4h bzw. 24h. Nach der Inkubation folgte die Ernte der Zellen. Hierfür wurden die Zellen einmal mit saurem Waschpuffer und einmal mit PBS^{-/-} gewaschen, mit Trypsin vom Boden der Mult-Lochplatte abgelöst und in 1,5 ml Eppendorffreaktionsgefäßen abzentrifugiert (350xg, 5 min, 4 °C). Anschließend erfolgte die Isolierung der gesamten RNA der Zellen mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kits (Roche Applied Science, Mannheim), bei dem zuerst die Zellen lysiert werden, gefolgt von einem DNA-Verdau, mehreren Waschschritten und der Elution der RNA in dest. Wasser. Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe eines NanoDrop (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, UK) gemessen.

Um die Reinheit der isolierten RNA zu testen wurde 1 µg pro Probe auf einem 0,86%igen RNA-Agarose-Checkgel mit 6,4% Formaldehyd bei 80 V für 120 min laufen gelassen. Hierfür wurde die RNA zuerst mit 7 µl Denaturierungspuffer (Tab. 24) versehen, auf 14 µl mit dest. H₂O aufgefüllt und für 15 min im Heizblock bei 65°C inkubiert. Nach kurzer Abkühlung der Proben wurden 10 µl pro Bahn aufs Gel geladen (Tab. 23). Die RNA-Visualisierung erfolgte mit Hilfe eines Transilluminators. Bei reiner RNA sollte für Eukaryotische Zellen sowohl die 28S- als auch die 18S-Bande zu sehen sein, erstere etwa 2,5x stärker als die zweite.

Tabelle 23: Zusammensetzung des RNA-Laufpuffers 20x

- 20 mM 3-N-(Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)
- 5 mM Natriumacetat
- 0,5 M EDTA-Na₂-Salz
- gelöst in 250 ml dest. H₂O (pH 7)

Tabelle 24: Zusammensetzung des Formamid-Denaturierungspuffers

- 350 μl Formaldehyd 37%
- 120 μl MOPS (20x)
- 500 μl Formamid
- 100 μl Bromphenolblau (6x)
- gelöst in dest. H_2O (pH7)
- 1 μl Ethidiumbromid auf 200 μl Puffer

5.11.2 Umschreibung der RNA in c-DNA mittels Reverser Transkriptase

Im folgenden Schritt wurde nun die gewonnene RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierzu wird 1 μg RNA jeder Probe mit dest. H_2O auf 13,5 μl aufgefüllt und mit 0,5 μl Random Primer (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gemixt und 5 min bei 70 °C auf dem Heizblock aktiviert. Anschließend wurde der Mastermix (Tab. 25) zugegeben und das Ganze 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes folgte die reverse Transkription der RNA in cDNA für 60 min bei 50 °C auf dem Heizblock gefolgt von einer 15 minütigen Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C. Die so gewonnene c-DNA wurde mit dest. H_2O 1:10 verdünnt und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der c-DNA wurde am NanoDrop ermittelt.

Tabelle 25: Zusammensetzung des RT-Mastermixes

- 5 μl 5x Reverse Transkriptase Puffer
- 1,25 μl dNTP's, je 10mM
- 0,5 μl Reverse Transkriptase
- 4,25 μl dest. H_2O

5.11.3 Detektion spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR

Mit Hilfe der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) wurde qualitativ die Anwesenheit der Gene für verschiedener Proteine und Rezeptoren (siehe Tab. 26) in den drei verwendeten Zelllinien nachgewiesen.

Hierfür wurden zunächst mit Hilfe der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein> über den genetischen Code des jeweilig gesuchten Proteins zwei synthetische Oligonucleotide entworfen, die komplementär zu einer Sequenz auf jeweils einem Strang der Doppelsehelix an den entgegengesetzten Enden der anzureichernden DNA-Region sind, die sogenannten vorwärts (*forward*, fw) und rückwärts (*reverse*, rev) Primer. Diese bestimmen in der, durch eine spezielle hitzeresistente DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus der Archaea *Thermus aquaticus* katalysierten, *in vitro*-DNA-Synthese das DNA-Segment, das vervielfältigt wird. Die entworfenen Primer (siehe Tab. 26) wurden von der Firma Metabion (Martinsried) hergestellt, 1:10 verdünnt dem PCR-Mastermix (siehe Tab. 27) und in der nun folgenden PCR eingesetzt.

Tabelle 26: Auflistung der mittels PCR gesuchten DNA-Fragmente, der Sequenzen der verwendeten PCR-Primer, ihrer Annealing Temperatur und der Größe des PCR-Produktes in Basenpaaren (Bp)

DNA-Fragment von	Primer (fw, rev)	Annealing Temperatur	Größe PCR-Produkt (Bp)
MARCO	5' -GAGATCCTCTGCCTTCCCAC-3', 5' -CTCAGTGTCCGTCAGGATTG-3'	57 °C	374
Clathrin HC	5' -CAGATTGAAACTGCTTCTGC-3', 5' -GAAGAGGGAATTCTCATTGC-3'	53 °C	234
Caveolin-1	5' -GCAAATACGTAGACTCGGAG-3', 5' -GCAATCACAAGTCAATCTTGA-3'	55 °C	187
ScR A1	5' -CATAGTGGCCAAGACATATC-3', 5' -GGCCAAGGGTAATAGAAATG-3'	55 °C	298
CD36 ScR B	5' -GCAAATGCAAAGAAGGGAGA-3', 5' -CTTCTCATCACCAATGGTTC-3'	53 °C	259
CD32 Fc γ RII	5' -GTGCTGTGCTTTCCGAATG-3', 5' -CTTGGACAGTGATGGTCAC-3'	53 °C	249
CD64 Fc γ RI	5' -ACAGAGGCTGGCTACTACTG-3', 5' -GTGATATTCCTGCTGATGTG-3'	55 °C	225
CD16Fc γ RIII	5' -GTGCAGCTCATATCGGCTG-3', 5' -TGAGATGGTGCCAAACCTTG-3'	55 °C	268

Tabelle 27: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes

- 5 μ l 5x Taq-Polymerase Puffer
- 0,5 μ l dNTP's, je 10mM
- 1 μ l fw Primer
- 1 μ l rev Primer
- 0,25 μ l Taq-Polymerase

Die PCR geht von einer doppelsträngigen DNA aus, und jeder Reaktionszyklus beginnt mit einer kurzen Hitzebehandlung um die beiden Stränge zu trennen (Denaturierung der DNA). Nach der Strangtrennung wird die DNA in Gegenwart eines großen Überschusses der beiden Oligonucleotidprimer abgekühlt, damit diese mit komplementären Sequenzen auf den beiden DNA-Strängen hybridisieren können. Die Temperatur bei der dies geschieht ist abhängig von der Länge der Primer und heißt Annealing Temperatur. Dann wird diese Mischung mit der Taq-Polymerase und den vier Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTP's) inkubiert, damit DNA, beginnend mit den beiden Primern, synthetisiert werden kann. Der gesamte Zyklus beginnt nun von vorne, ausgehend von der Hitzebehandlung zur Trennung der neu synthetisierten DNA-Stränge. Das Verfahren wurde für 30 Zyklen durchgeführt. Innerhalb weniger Zyklen gibt es ein vorherrschendes DNA-Fragment, das Gesuchte. Es ist identisch zur Sequenz, die von den beiden Primern auf der Originalvorlage, dem genetischen Code zum gesuchten Protein, eingegrenzt wird plus der Sequenz der beiden Primer. Abschließend erfolgt eine sogenannte End-Elongation um dem Enzym Gelegenheit zu geben den Bau angefangener komplementärer Stränge zu vervollständigen (Alberts et al., 2004). Das allgemeine PCR-Programm ist in Tabelle 28 dargestellt. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Primus96, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

Tabelle 28: Allgemeines PCR-Programm, die Annealing Temperatur ist spezifisch für die jeweilig verwendeten Primer

- 2 min 94 °C = Denaturierung der DNA
- 30x 30 sec 94 °C = Denaturierung der DNA
- 30x 30 sec Annealing Temperatur = Binden der Primer
- 30x 45 sec 72 °C = Elongation, Bau des komplementären Stranges
- 5 min 72 °C = End-Elongation
- Abkühlung auf 4 °C

Die Visualisierung der gesuchten DNA-Fragmente erfolgte qualitativ mit Hilfe eines Transilluminators. Die ausgedruckten Filme wurden anschließend mit Hilfe eines Flachbettscanners eingescannt.

5.12 Studien zur Aufnahme trojanischer Peptide

In der medizinischen Wirkstoffentwicklung ist die Applikation aktiver Substanzen in biologische Systeme mit Hilfe von Transportern im Nanomaßstab Gegenstand aktueller Forschung. Solche *Carrier* dürfen keine toxischen Effekte hervorrufen und müssen ihre angebondenen Wirkstoffe gezielt und effektiver als die freie Substanz allein an den Wirkort bringen. Deshalb wurden in dieser Arbeit in einer Kooperation mit der Organischen Chemie der Universität Karlsruhe zusätzlich unterschiedliche peptoidische, polylysin-, bzw. polyargininartige Transporter auf ihre Toxizität und Fähigkeit zur Zellpenetration untersucht.

Durch verschiedene Modifikationen oder Biokonjugationen, im vorliegenden Fall durch die Veränderung der Seitenkettenamine zu Guanidingruppen, sollte die Möglichkeit des Transports von Wirkstoffen ins Zellzytosol oder in den Zellkern untersucht werden. Diese Peptide wurden zusätzlich mit Fluorophoren konjugiert um sie sowohl am Fluoreszenzmikroskop, als auch am Durchflusszytometer untersuchen zu können. Untersucht wurden die Guanidinyln-Peptide 11 und 12 im Vergleich mit einem Amino-Peptoid 10, als auch die entsprechenden Peptide ohne Fluorophor (10 w/o, 11 w/o), um festzustellen, ob evtl. auftretende toxische Effekte auf die Fluorophore oder auf die Peptide zurückzuführen sind. Die Strukturformeln der verwendeten Transporter sind in den Ab-

bildungen (9, 10, 11, 12, und 13) aufgeführt.

Neben Untersuchungen zur toxischen Wirkung war das Ziel dieser Kooperation, herauszufinden, welchen Einfluss die Wahl der Seitenketten und Rückgratlängen der Transporter auf die Art und Geschwindigkeit der zellulären Aufnahme und die Zielorte in der Zelle haben.

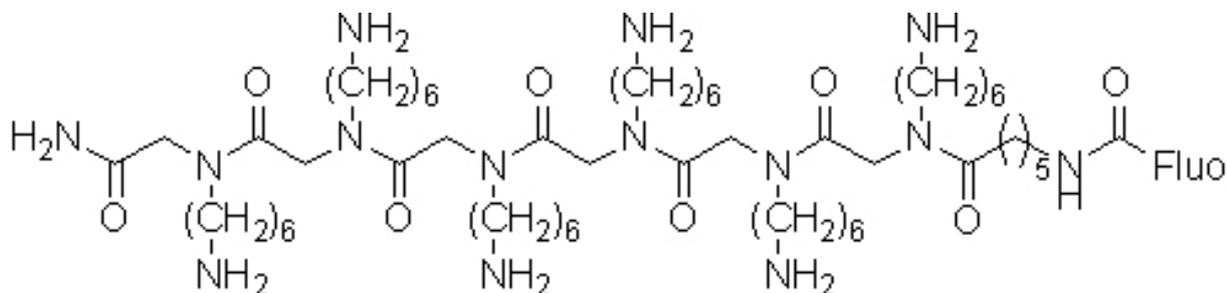


Abbildung 9: Fluoreszein-markiertes Hexamer $\text{NH}_2\text{-}[6(6)_6]\text{-Fluo} = 10$.

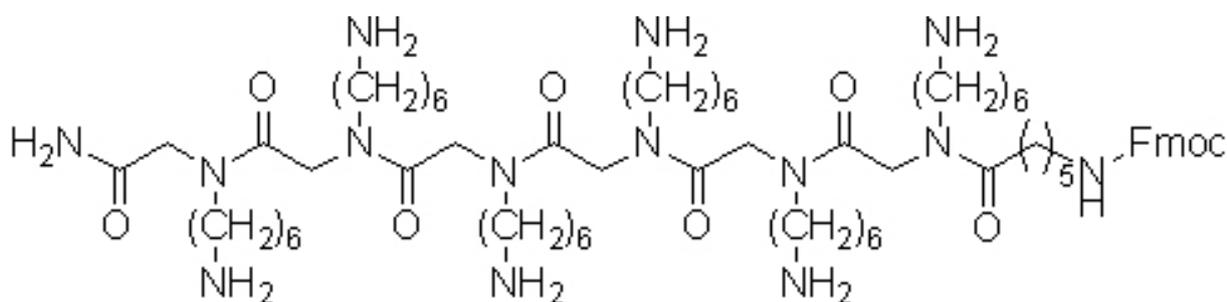


Abbildung 10: Fluoreszein-markiertes Hexamer $\text{NH}_2\text{-}[6(6)_6]\text{-Spac} = 10$ w/o.

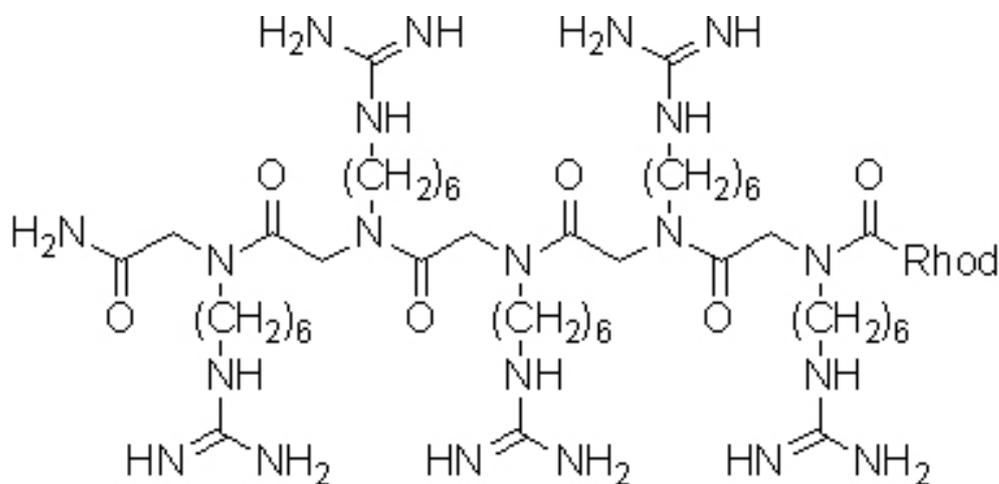


Abbildung 11: Rhodamin-markiertes Pentamer mit Guanidinseitenketten $\text{NH}_2\text{-}[5(6^G)_5]\text{-Rhod} = 11$.

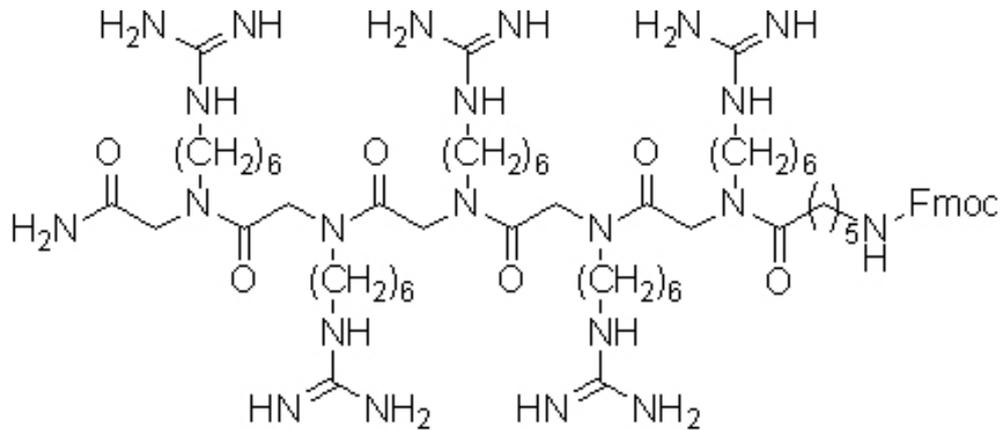


Abbildung 12: Pentamer mit Guanidinseitenketten NH₂-[5(6^G)₅]-Spac = 11 w/o.

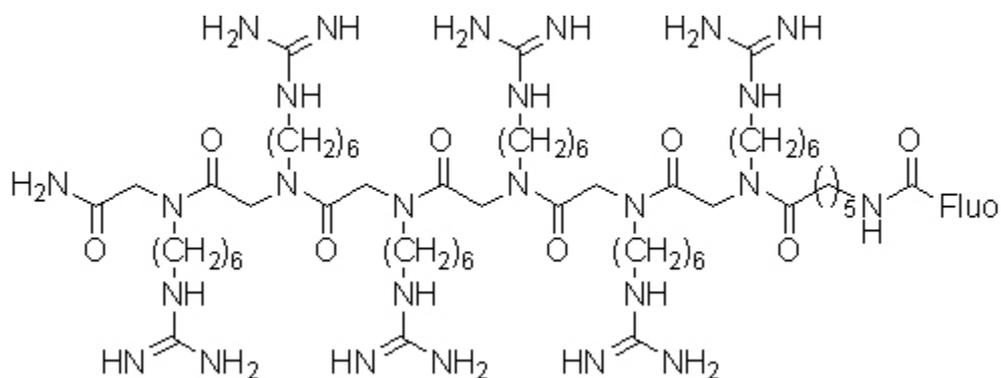


Abbildung 13: Fluoreszein-markiertes Hexamer mit Guanidinseitenketten NH₂-[6(6^G)₆]-Fluo = 12.

Die Untersuchungen erfolgten unter der Verwendung der humanen Lungenepithelzelllinie A549, um festzustellen, ob eine Aufnahme der Transporter als Aerosol möglich sein könnte, und der endothelähnlichen Zelllinie ECV304 um zu testen, ob die Transporter nach intravenöser Gabe die die Blutgefäße auskleidenden Zellen penetrieren können.

Getestet wurden verschiedene Konzentrationen und Zeitpunkte auf ihre Toxizität mit dem WST-1 und LDH Test. Ebenso wurde eine konzentrationsabhängige Aufnahme der Peptide quantitativ mit Hilfe des Durchflusszytometers und qualitativ mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Peptide wurden hierfür in den entsprechenden Konzentrationen dem Zellmedium zugefügt und die Behandlung der Zellen erfolgte in allen Experimenten wie für die Partikelexposition beschrieben.

5.13 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten wurden jeweils als arithmetische Mittel (M) \pm der dazugehörigen Standardabweichung (SEM, *standard error of the mean*) dargestellt. Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde der Student's t-Test angewendet. Die statistische Auswertung mithilfe dieses Tests erfolgte bei Versuchen mit mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die p-Werte $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) wurde zur Anzeige signifikanter Unterschiede verwendet.

6 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten sowohl das Aufnahmeverhalten, Aufnahmewege und Zielstrukturen in der Zelle und die biologischen Auswirkungen von synthetischen Siliciumdioxid (Silica) Nanopartikeln, in vier verschiedenen Größen, auf Zellen untersucht werden.

In *in vitro* Experimenten wurden Zellen verschiedener Zelllinien eingesetzt, die Zielzellen der menschlichen Lunge und der direkt angrenzenden Blutgefäße repräsentieren. Als Hauptmodellsystem diente die etablierte, humane Lungenepithelzelllinie A549. Desweiteren wurden humane Endothelzellen der Zelllinie ECV304 untersucht, und abschließend, als Beispiel für humane Makrophagen, die myeloische Zelllinie THP-1, die durch TPA zu Makrophagen differenziert wurde.

In diesem Kapitel werden die gewonnenen Versuchsergebnisse zusammenfassend in Form von Tabellen und Diagrammen dargestellt. Weiterhin wurde mittels des in Kapitel 5.13 vorgestellten statistischen Testverfahrens überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen vorhanden waren.

6.1 Partikelcharakterisierung

Von den in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Silica Partikeln, waren durch den Hersteller folgende Daten und Charakteristika bekannt (siehe Tab.29):

Tabelle 29: Daten zu den verwendeten Silica Partikeln (laut Kisker Biotech, Steinfurt)

Produkt-Name	sicastar ^R -greenF
Vorliegende Form	in wässriger Suspension
Verwendete Größen	20, 50, 70, 200 nm
Oberfläche	glatt
Form	spärlich
Dichte	2,0 g/ccm
Porosität	nicht porös
Stabil in	wässrigem Puffer, org. Lösungsmitteln
Nicht stabil in	stark basischen Medien, Hydrofluorische Säure
Optische Eigenschaften	grün fluoreszierend
Anregung	485 nm
Emission	510 nm

Die Partikel wurden in Wasser suspendiert geliefert. Die Partikel blieben stabil in Suspension und sedimentierten nicht. Durch das größenbe-

dingte Lichtbrechungsverhalten lagen die 20, 50 und 70 nm Partikel in einer klaren, leicht gelblichen, und die 200 nm in einer gelblichen, milchig trüben Suspension vor.

Um sie zusätzlich genauer zu charakterisieren wurden verschiedene Methoden verwendet:

6.1.1 Berechnung der Partikelanzahl und Gesamtoberfläche

Ausgehend von den Angaben des Herstellers wurden die Anzahl (in Millionen) und die Oberfläche (in cm^2) der Partikel berechnet, bezogen auf eine Suspension mit einem Gehalt von $1 \mu\text{g}$ Partikel.

Tabelle 30: Berechnung der Anzahl und Gesamtoberfläche für eine $1 \mu\text{g}$ Partikel enthaltende Suspension

Partikeldurchmesser [nm]	Partikelanzahl pro μg [$\times 10^6$]	Gesamtoberfläche pro μg [cm^2]
20	119366,207	1,500
50	7639,437	0,600
70	2784,052	0,429
200	119,366	0,150

Aus Tabelle 30 ist ersichtlich, dass die Anzahl der Partikel um den Faktor 1000 und die Gesamtoberfläche der Partikel um den Faktor 10 steigt, wenn sich der Partikeldurchmesser um den Faktor 10 verringert.

6.1.2 Zetapotenzial und Größenverteilung der Silica Partikel

Die Größenverteilung und das Zetapotenzial der Partikel sowohl in Wasser (was dem Vorliegen der Partikel in der Stammsuspension des Herstellers entsprach), als auch in Zellkulturmedium mit FCS bzw. mit hitzeinaktiviertem FCS (hiFCS) wurde mit Hilfe eines Zetasizers (Nanoseries Nano-ZS ZEN 3600, Malvern Instruments Ltd., UK) von Dr. Michael Bur (Universität des Saarlandes, Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie) durchgeführt. Hierfür wurden die Partikel in einer Konzentration von 1 mg/ml in jeweils 4 ml des angegebenen Mediums angesetzt, wie in Kapitel 5.4 beschrieben, beschallt und verschickt. Der Transport dauerte etwa zwei Tage. Direkt vor der Messung wurden die Partikellösungen nochmals 1:1 mit Wasser verdünnt und in einem Ultraschallwasserbad (Bandelin Sonorex Super RK 106, Frequenz 35 kHz) für 5 min beschallt und sofort gemessen. Je Probe wurden drei Messungen durchgeführt. Weiterhin wurden, beispielhaft für alle, die 50 nm Partikel aus der wässrigen Suspension frisch in Medium gege-

ben, beschallt und vermessen, um zu sehen, ob ein Einfluss des langen Transportes in Zellkulturmedium auf das Aggregationsverhalten und somit der Größenverteilung und dem Zetapotenzial der Partikel vorlag. Die Mittelwerte aus den drei Messungen sind in den folgenden Tabellen 31, 32, 33, dargestellt.

6.1.2.1 Größenverteilung

Tabelle 31: Größenverteilung der untersuchten Silica Partikel. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (sofern bekannt).

Partikeldurchmesser [nm]	Größenverteilung in H ₂ O	Größenverteilung in Medium + FCS	Größenverteilung in Medium + hiFCS
20	42,87 \pm 0,28	1237	884,4
50	47,84 \pm 0,57	1207	1032
70	58,21 \pm 0,30	1185	240,97 \pm 2,4
70P	95,04 \pm 0,46	895,4	175,77 \pm 0,87
200	220,63 \pm 0,06	254,13 \pm 1,78	249,2 \pm 1,65

Aus Tabelle 31 ist ersichtlich, dass trotz Ultraschallbehandlung, die gemessenen Partikeldurchmesser in H₂O nicht den Herstellerangaben entsprachen. Der gemessene mittlere Durchmesser der 20 nm Partikel ist doppelt so groß, der der 70 nm ist kleiner, der der 70P nm und 200 nm größer und nur die Herstellerangaben für die 50 nm Partikel entsprechen in etwa dem gemessenen Durchmesser.

Der ermittelte Partikeldurchmesser in Medium, nach einem zwei tägigen Transport, mit anschließender Ultraschallbehandlung direkt vor der Messung, war für die 20 nm Partikel etwa 62x, für die 50 nm etwa 24x, für die 70 nm 17x, für die 70P nm 13x größer. Nur die 200 nm Partikel wurden mit etwa dem gleichen Durchmesser gemessen und agglomerierten fast gar nicht.

Die Agglomeration in Medium mit hiFCS war geringer als in Medium mit nicht denaturiertem FCS. Hier war der ermittelte Partikeldurchmesser für die 20 nm Partikel etwa 44x, für die 50 nm 21x, für die 70 nm 3x, für die 70P nm 2,5x größer. Die 200 nm Partikel wurden wieder mit etwa dem gleichen Durchmesser gemessen.

Tabelle 32: Größenverteilung der 50 nm Silica Partikel über die Zeit. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Größenverteilung in H ₂ O	Größenverteilung in Medium 0 min	Größenverteilung in Medium 15 min	Größenverteilung in Medium 30 min	Größenverteilung in Medium 45 min
48,45 \pm 1,22	113,70 \pm 3,31	124,07 \pm 1,97	131,77 \pm 0,23	137,33 \pm 0,97

Um die Zeitabhängigkeit im Agglomerationsverhalten beurteilen zu können, wurden beispielhaft für alle Partikel die 50 nm Partikel untersucht, da hier der Ausgangsdurchmesser in etwa den Herstellerangaben entsprach und somit davon ausgegangen wurde, dass keine Partikelagglomeration in H₂O vorlag. Von dieser Stammsuspension in H₂O wurde jeweils eine Probe 1:1 in Medium gegeben, beschallt und nach den in Tabelle 32 angegebenen Zeitpunkten der Partikeldurchmesser gemessen. Im Vergleich mit dem Partikeldurchmesser in H₂O war der Durchmesser in Medium sofort um das 2,3-fache, nach 15 min um das 2,6-fache, nach 30 min um das 2,7-fache und nach 45 min um das 2,8-fache angestiegen.

6.1.2.2 Zeta Potenzial

Tabelle 33:]

Zetapotenzial der untersuchten Silica Partikel in [mV]. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (sofern

	Partikeldurchmesser [nm]	Zetapotenzial in H ₂ O	Zetapotenzial in Medium + FCS	Zetapotenzial in Medium + hiFCS
	20	-16,03 \pm 1,78	-12	-8,45
bekannt).	50	-17,17 \pm 0,35	-6,95	-7,41
	70	-17,90 \pm 0,36	-8,32	-5,6
	70P	-16,27 \pm 1,55	-4,84	-8,05
	200	-25,30 \pm 0,89	-8,64	-11,5

Das Zetapotenzial der 20, 50 und 70 nm Silica Partikel in H₂O betrug zwischen etwa -16 und -18 mV, für die 200 nm Partikel etwa -25 mV. In Medium sank das Zetapotenzial auf etwa -12 bis -5 mV und lag in Medium mit hiFCS in etwa demselben Bereich. Standardabweichungen konnte das Messgerät hier nicht ermitteln, da die Messungen in Medium sehr uneinheitlich waren.

6.1.3 TEM Aufnahmen der Silica Partikel

Die morphologische Charakterisierung der Partikel erfolgte durch Auftropfen von $10\ \mu\text{l}$ einer jeweils $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ konzentrierten Partikellösung, sowohl in Wasser als auch in Medium, auf mit Formvar beschichtete Kupfergrids. Nach anschließender Trocknung wurden die Silica Partikel am TEM auf Größe, Form und Oberfläche hin untersucht.

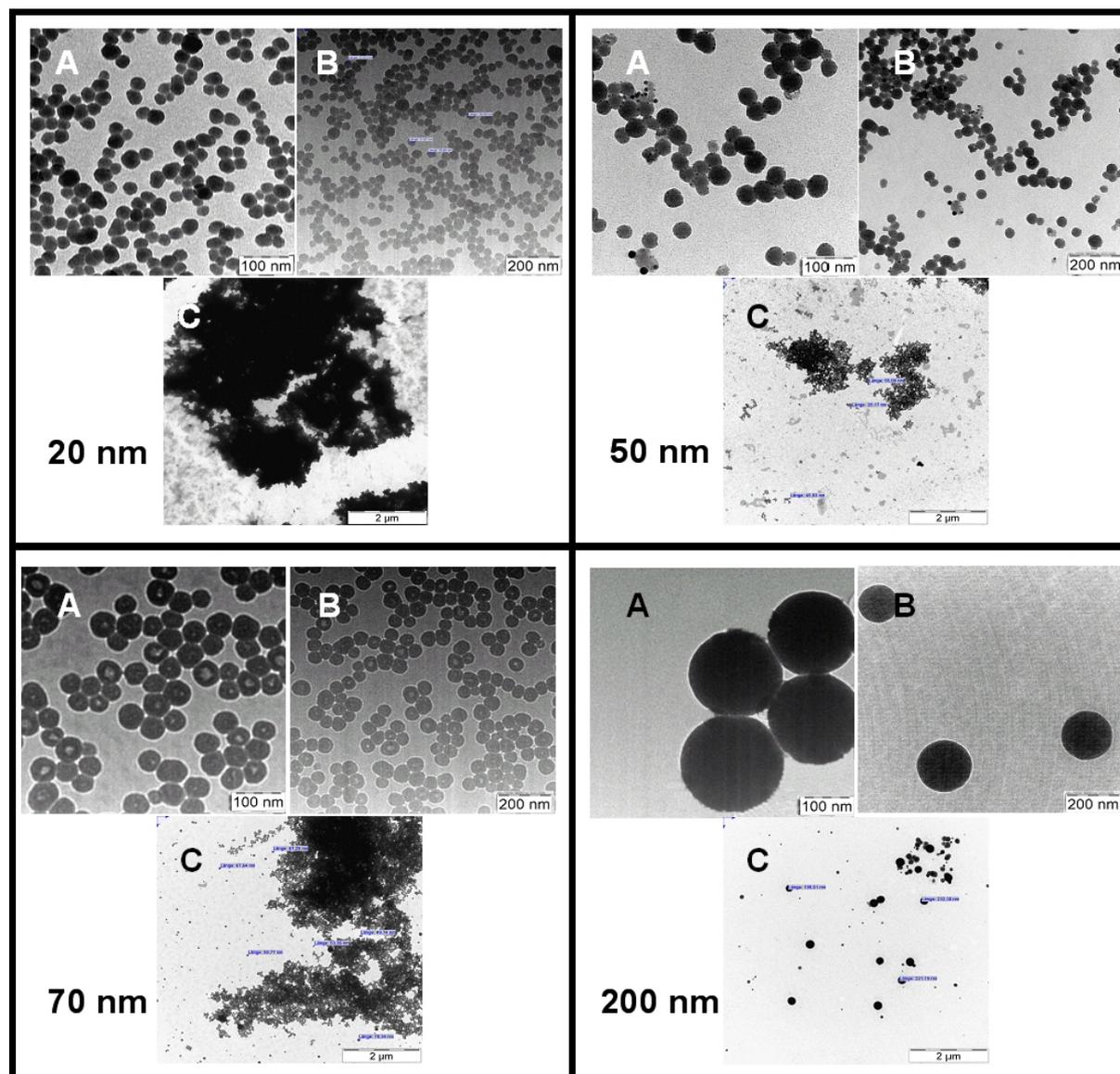


Abbildung 14: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Silica Partikel. (A) und (B) = Silica in H_2O , (C) = Silica in Medium. (A) Vergrößerung 85.000x, (B) Vergrößerung 50.000x, (C) Vergrößerung 7.000x

Aus Abbildung 14 ist ersichtlich, dass die Partikel elektronendicht und somit als dunkle Punkte zu erkennen sind. Außerdem ist erkennbar,

dass die Partikel rund sind und eine glatte Oberfläche besitzen, und dass sie sich in Medium zu großen Agglomeraten zusammenlagern. Nur die 200 nm Partikel zeigen kein solches Agglomerationsverhalten. Diese Ergebnisse decken sich mit denen, die durch die Größenmessung gewonnen wurden.

6.2 Akute Toxizität nach Partikelexposition

Zelltoxische Wirkungen sind für viele Partikel *in vivo* und *in vitro* bekannt. Sowohl der Partikeltyp als auch die Dosis bestimmen hier die Toxizität (Xu et al., 2002; Hart et al., 1998; Warshawsky et al., 1994). Da in dieser Arbeit der Mechanismus der Partikelaufnahme ohne Beeinflussung durch zytotoxische Effekte untersucht werden sollte, war zunächst eine Toleranzuntersuchung der Silica Nanopartikel nötig. Um den Einfluss auf die Vitalität von Zellen zu untersuchen, wurden verschiedenen Vitalitätstests und ein Proliferationstest ausgewählt und unterschiedliche Konzentrationen und Zeitpunkte getestet, da aus der Literatur bekannt war, dass verschiedene Testsysteme in Gegenwart von synthetischen Nanopartikeln, durch mögliche Interaktion zwischen Partikel und Testsystem, unterschiedliche Ergebnisse liefern können (Wörle-Knirsch et al., 2006).

6.2.1 Bestimmung der Zellvitalität mittels Zellzählung

Zur Untersuchung der akuten Toxizität der Silica Nanopartikel wurde zunächst das Wachstumsverhalten von A549 und ECV304 Zellen durch Bestimmung der Zellzahl beurteilt. Hierfür wurde, wie in Kapitel 5.3.4 beschrieben, die Zellzahl nach einer 24, 48 und 72 stündigen Partikelexposition mit $10,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) ermittelt und mit der gemessenen Zellzahl der jeweiligen unbehandelten Kontrolle verglichen.

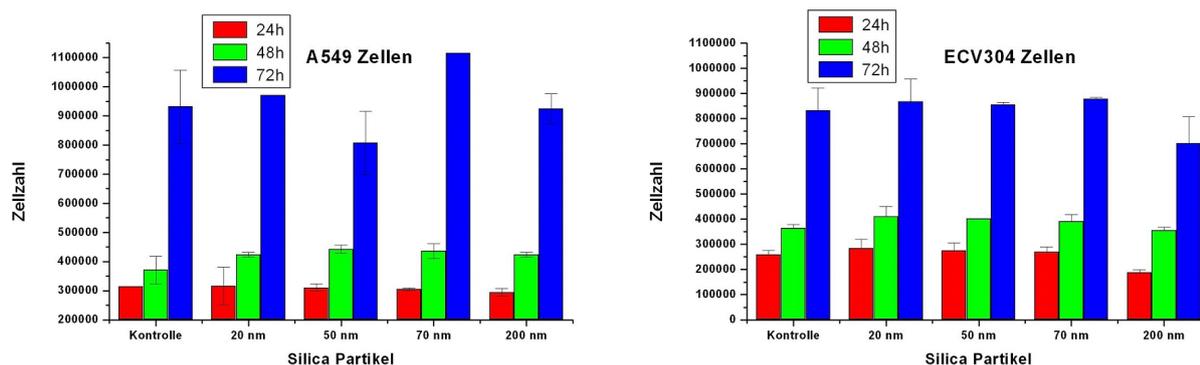


Abbildung 15: Silica Nanopartikel haben keinen Einfluss auf das Wachstum von A549 und ECV304 Zellen. Bestimmung der Zellzahl nach 24, 48 und 72h Partikelexposition mit $10,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

Aus Abbildung 15 ist ersichtlich, dass im Vergleich mit der Kontrolle, zu keinem der drei gemessenen Zeitpunkte ein signifikanter Rückgang in der Zellzahl zu verzeichnen war, und somit durch die Behandlung mit Silica Partikeln kein Verlust in der Vitalität für beide untersuchten Zelllinien, erfolgte. Die Verdopplung der Zellzahl erfolgte in etwa in der aus der Literatur bekannten Zeit (22h für A549 und 24h für ECV304 Zellen), wurde allerdings erst im Zeitintervall zwischen 48 und 72h erreicht. Dies entsprach der Erwartung, dass die Zellen eine gewisse Anwachszeit nach der Aussaat benötigen, bevor sie normales Wachstumsverhalten zeigen.

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Zellwachstumsversuchen wurde im Folgenden der Einfluss von Silica Partikeln auf die Zellvitalität mit Hilfe des WST-1, MTT und LDH Tests untersucht. Zur graphischen Darstellung und für einen besseren Vergleich der Ergebnisse untereinander wurden die unbehandelten Kontrollen gleich 100% Vitalität und die Messwerte der behandelten Ansätze dazu ins Verhältnis gesetzt, und als Prozent der Kontrolle dargestellt.

6.2.2 Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des WST-1 Tests

In diesem Test wird die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen untersucht, indem diese die Reduktion eines Tetrazoliumsalzes in ein Formazan Produkt katalysieren. Die Aktivität der Dehydrogenasen ist ein Maß für die Vitalität der Mitochondrien und dient so zugleich der Bestimmung der Vitalität der gesamten Zelle. Mit Hilfe des WST-1 Tests wurde der Einfluss der Silica Partikel auf die Vitalität von A549

und ECV304 Zellen für vier verschiedene Zeitpunkte (3, 24, 48, 72h), und auf THP-1 Zellen für 24h untersucht. Getestet wurden zwei verschiedene Konzentrationen ($0,625 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)).

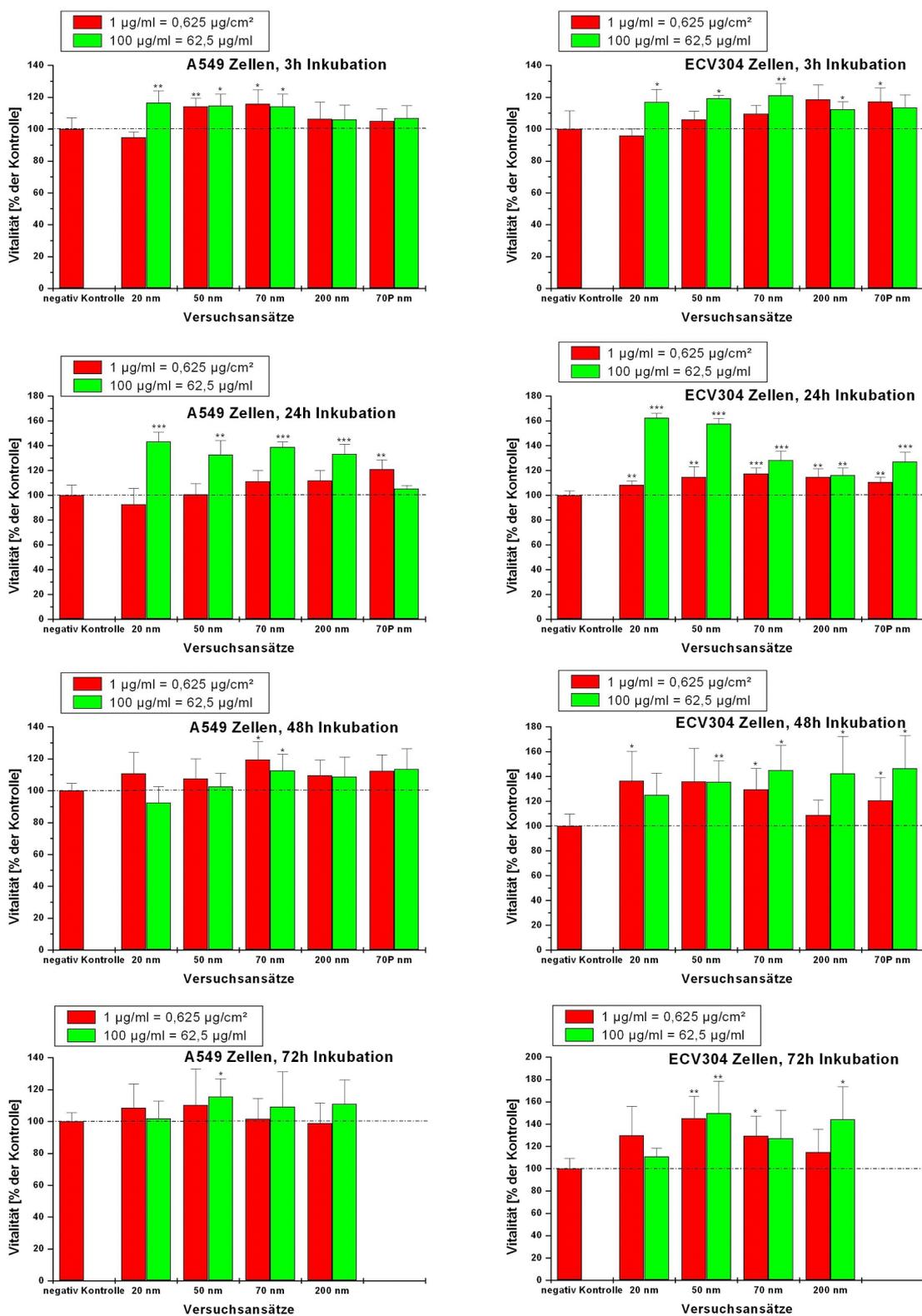


Abbildung 16: A549 und ECV304 Zellen wurden 3h, 24h, 48h und 72h mit $0,625 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln inkubiert. Gezeigt ist der Effekt auf die Zellvitalität in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis, ermittelt mit dem WST-1 Test. Dargestellt sind die Mittelwerte als Prozent der unbehandelten Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Aus Abbildung 16 ist ersichtlich, dass für alle Zeitpunkte, beide Konzentrationen und in beiden Zelllinien kein Verlust der Vitalität zu verzeichnen war. Im Gegenteil ergab das Testsystem, ohne erkennbares Muster, unabhängig von Zeitpunkt, Konzentration oder der verwendeten Partikelgröße, zum Teil signifikant höhere Messwerte. Z. B. lagen die Werte nach 24h Inkubation in ECV304 Zellen für Ansätze mit 20 und 50 nm Partikeln mehr als 60% über denen der unbehandelten Kontrolle.

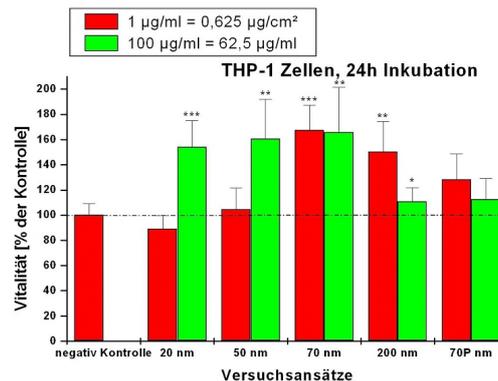


Abbildung 17: THP-1 Zellen wurden 24h mit $0,625 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln inkubiert. Gezeigt ist der Effekt auf die Zellvitalität in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis, ermittelt mit dem WST-1 Test. Dargestellt sind die Mittelwerte als Prozent der unbehandelten Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Auch für die THP-1 Zellen konnte nach 24h Inkubation mit zwei verschiedenen Konzentrationen der Silica Nanopartikel kein Effekt auf die Vitalität verzeichnet werden (siehe Abbildung 17). Für diese Zelllinie konnten ebenfalls ohne erkennbares Muster teilweise signifikant höhere Messwerte beobachtet werden, die z. B. für die Ansätze mit 50 und 70 nm Partikeln, wie in den ECV304 Zellen, mehr als 60% über denen der unbehandelten Kontrolle lagen.

6.2.3 Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des MTT Tests

Mit Hilfe des MTT Tests, der ebenfalls die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen untersucht, wurde der Einfluss der Silica Partikel auf A549 und ECV304 Zellen für zwei Zeitpunkte (4, 48h) untersucht. Getestet wurden zwei verschiedene Konzentrationen ($0,625 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)).

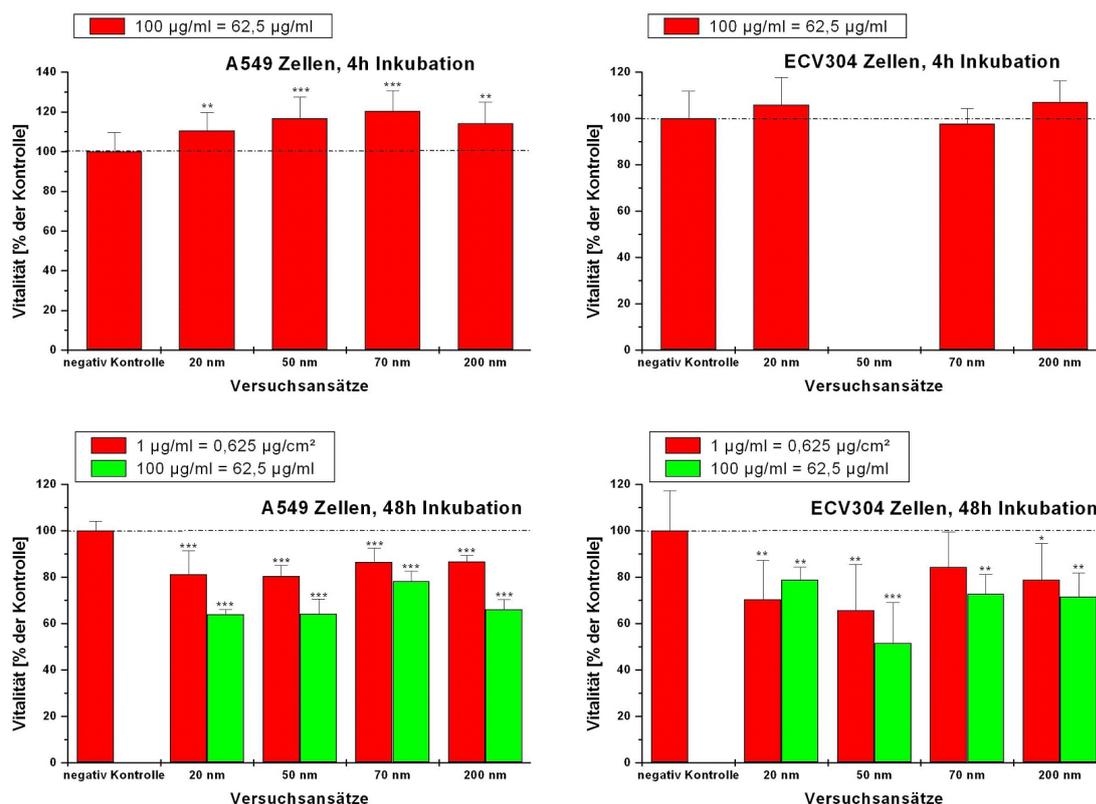


Abbildung 18: A549 und ECV304 Zellen wurden 4h bzw 48h mit $0,625 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln inkubiert. Gezeigt ist der Effekt auf die Zellvitalität in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis, ermittelt mit dem MTT Test. Dargestellt sind die Mittelwerte als Prozent der unbehandelten Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Aus Abbildung 18 ist ersichtlich, dass nach 48h Inkubationszeit mit beiden Konzentrationen und für alle Partikelgrößen ein signifikanter Effekt zu verzeichnen war. Diese Effekte war konzentrationsabhängig, mit Ausnahme für die 20 nm Partikel in den ECV304 Zellen. Hier zeigte die niedrigere Konzentration einen positiven Effekt auf die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen. Der größte negative Effekt in Bezug auf die mitochondriale Aktivität von fast 50% war für die hohe Konzentration der 50 nm Partikel in den ECV304 Zellen zu verzeichnen. Nach nur 4h Inkubation konnten keine negativen Effekte der Partikel auf die Zellen gemessen werden, was dem Inkubationszeitraum der meisten Experimente zur Partikelaufnahme entsprach.

6.2.4 Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des LDH Tests

Aufgrund der Abweichung der Ergebnisse des WST-1 Tests von denen des MTT Tests wurde als weitere Vitalitätstest der LDH Test eingesetzt. Er detektiert Schädigungen der Zellmembran über die Messung des Gehalts an Laktatdehydrogenase (LDH), ein zytoplasmatisches, nicht membranpermeables Enzym, im Überstand der Zellen. Er dient somit als Maß für die Membranintegrität und somit die Zellvitalität.

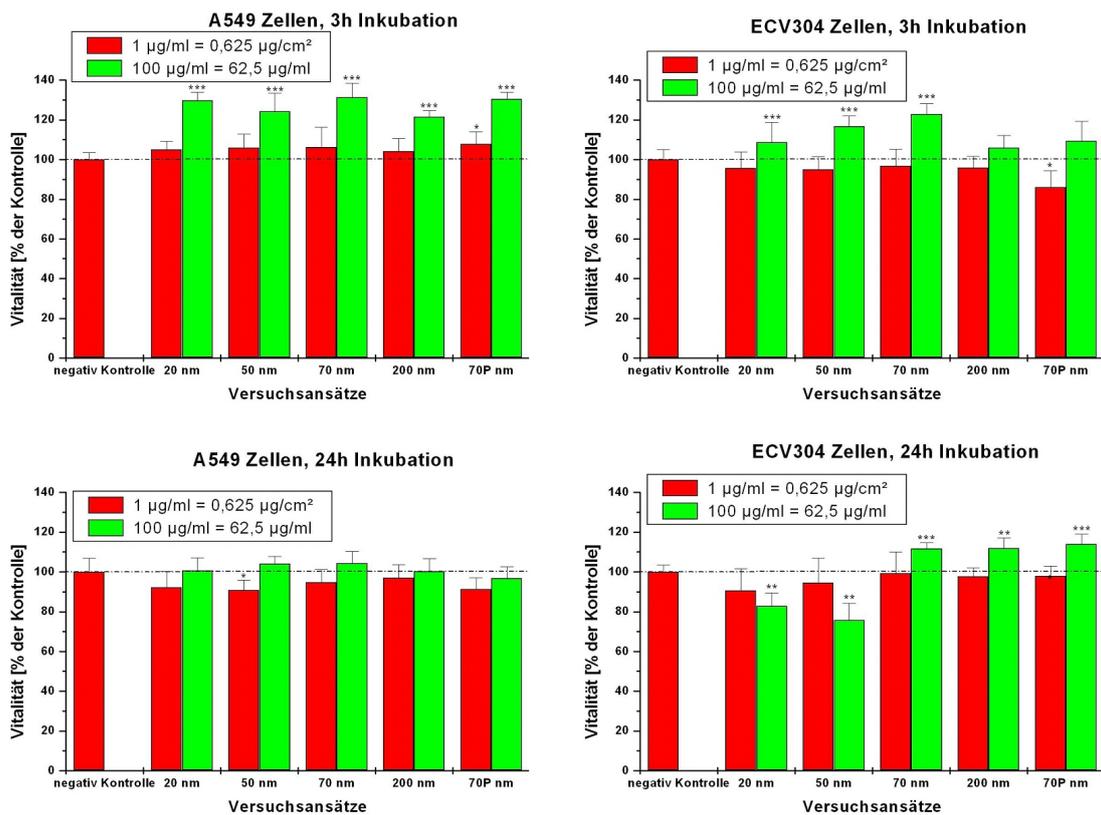


Abbildung 19: A549 und ECV304 Zellen wurden 3h bzw 24h mit $0,625 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln inkubiert. Gezeigt ist der Effekt auf die Zellvitalität in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis, ermittelt mit dem LDH Test. Dargestellt sind die Mittelwerte als Prozent der unbehandelten Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Im LDH Test zeigte sich nach 3h Inkubationszeit in den A549 Zellen keinen Effekt auf die Vitalität für alle Partikelgrößen (siehe Abbildung 19). Dasselbe Ergebnis zeigte sich für die ECV304 Zellen, mit Ausnahme der 70P nm Partikel, die einen leichten Vitalitätsverlust für die niedrige Konzentration verzeichneten. Für die hohe Konzentration, ähnlich wie im WST Test, konnte nach 3h Inkubation ein Rückgang im Gehalt an freiem LDH für beide Zelllinien und alle Partikelgrößen gemessen werden.

Auch nach 24h Inkubation konnte in den A549 Zellen keine akut negativen Effekte auf die Vitalität gemessen werden. In den ECV304 Zellen zeigte sich nach 24h für die 20 und 50 nm Partikel, nach Inkubation mit der hohen Konzentration, eine signifikante Erhöhung im Gehalt an LDH im Zellüberstand. Diese Effekte konnten aber für die 70 und 200 nm Partikel nicht gemessen werden. Im Gegenteil, zeigte sich hier für die hohe Konzentration ein Rückgang im Gehalt an LDH im Überstand.

6.2.5 Messung der Zellproliferationsaktivität mittels ELISA (BrdU)

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse in Bezug auf biologische Effekte verursacht durch eine Inkubation mit Silica Partikeln durch die drei vorgestellten Tests zur akuten Toxizität, sollte mit Hilfe des BrdU Tests ein Einfluss der Silica Nanopartikel auf die Zellproliferation untersucht werden. In diesem Test wird anstelle der Base Thymidin ein Pyrimidinanalogon in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen eingebaut. Dieses Analogon wird mit Hilfe eines Peroxidase gekoppelten Antikörpers nachgewiesen, der Tetramethylbenzidin zu einem blauen Farbstoff umwandelt. So kann die Anzahl proliferierender Zellen quantitativ nachgewiesen werden.

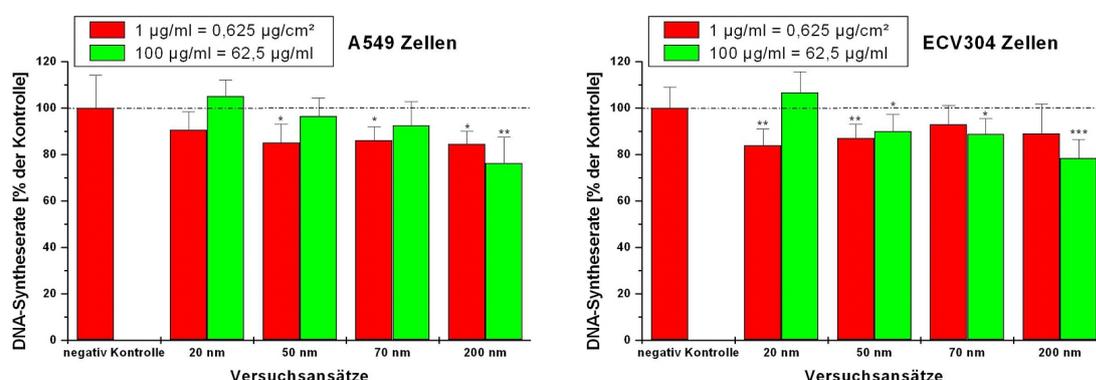


Abbildung 20: Keine Erhöhung in der Proliferationsrate nach Inkubation mit Silica Nanopartikeln. Die DNA-Syntheserate von A549 und ECV304 Zellen, wurde mit dem BrdU-Assay ermittelt. Die Zellen wurden 48h mit $0,625 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln inkubiert. Gezeigt ist die Proliferationsrate in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis. Dargestellt sind die Mittelwerte als Prozent der unbehandelten Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Mit Hilfe des BrdU Tests konnten nur kleine Effekte in Bezug auf die DNA-Syntheserate gemessen werden (siehe Abbildung 20), was sich mit den Ergebnissen der Zellzählung deckt. Nach einer Inkubationszeit von

48h konnte in den A549 Zellen ein leichter Rückgang in der Proliferationsrate für die Ansätze mit den niedrigen Konzentrationen der 50, 70 und 200 nm gezeigt werden (17%). Und nur für die 200 nm Ansätze fand sich hier auch ein Rückgang für die hohe Konzentration. In den ECV304 Zellen fand sich ebenfalls ein leichter Rückgang in der Proliferationsaktivität für die niedrige Konzentration, in den Ansätzen mit 20 und 50 nm Partikeln und für die hohen Konzentrationen in den Ansätzen mit den 50, 70 und 200 nm Partikeln. Der größte Rückgang von 22% fand sich in beiden Zelllinien für die hohe Konzentration der 200 nm Partikel. Für keinen der Partikel konnte eine Erhöhung in der Proliferationsrate verzeichnet werden.

6.3 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Eine stetig wachsende Zahl von wissenschaftlichen Veröffentlichungen zeigen einen Zusammenhang zwischen der Exposition mit Nanopartikeln und der Induktion von ROS, die Oxidativen Stress hervorrufen können. Die Größe, die Oberfläche und das Material der Nanopartikel scheinen hierbei wichtige Faktoren zu sein (Donaldson et al., 2004; Nel et al., 2005; Oberdörster et al., 2005). Aus diesem Grund wurde als ein weiterer toxikologischer Parameter das oxidative Potential der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Silica Nanopartikel untersucht. Drei verschiedene Messverfahren kamen zum Einsatz. Als Positivkontrolle diente in allen Versuchen eine Inkubation mit 250 μM H_2O_2 .

6.3.1 DCF Test

Zum Nachweis von intrazellulärem Oxidativem Stress im Anschluss an eine Inkubation mit Silica Nanopartikeln, wurde der DCF Test eingesetzt. In diesem Test passiert ein unpolarer Fluoreszenz-Farbstoff ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) die Zellmembran und wird im Zytoplasma durch intrazelluläre Esterasen zum geladenen H_2DCF hydrolysiert, dass nicht mehr austreten kann. Intrazellulär gebildete ROS (Peroxidase/ H_2O_2 , $\cdot\text{OR}$, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ sowie ONOO^-) oxidieren H_2DCF zum DCF Fluorochrom, welches nach Anregung bei 480 nm bei 530 nm Licht emittiert. Die Messung der unbehandelten Kontrollen wurde gleich 100% Fluoreszenz und die Messwerte der behandelten Ansätze dazu ins Verhältnis gesetzt und als Prozent der Kontrolle dargestellt. Getestet wurden zwei verschieden

Inkubationszeiten (1h, 24h) und zwei unterschiedliche Konzentrationen, $31,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$), $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) in A549 und ECV304 Zellen.

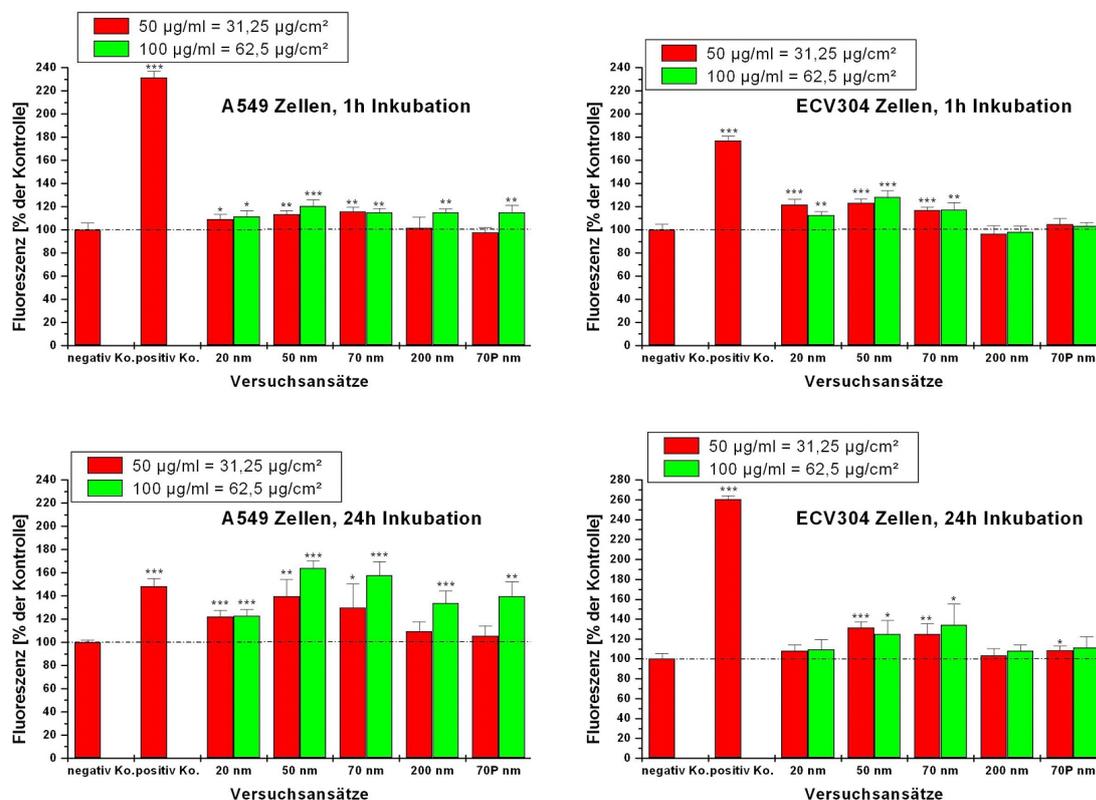


Abbildung 21: Leichte Induktion von ROS für alle Partikelgrößen in A549 Zellen. Messung der Bildung von ROS mit dem DCF Test nach Inkubation (1h, 24h) mit zwei Konzentrationen von Silica Partikeln ($31,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$), $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)) in A549 und ECV304 Zellen. Als positiv Kontrolle diente eine Inkubation mit $250 \mu\text{M}$ H_2O_2 , als negativ Kontrolle eine Inkubation mit H_2O . Dargestellt sind die Mittelwerte als Prozent der unbehandelten Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Bestimmung von intrazellulären ROS mit dem DCF Test aufgeführt. In den A549 Zellen ist bereits nach 1h Inkubation mit den Silica Nanopartikeln ein leichter, aber signifikanter, Anstieg in der Fluoreszenz, der Konzentrationsabhängig ist, für alle Partikelgrößen zu verzeichnen. Dieser Anstieg bestätigt sich nach 24h und ist am höchsten (über 60% höhere Fluoreszenz) für die 50 nm, gefolgt von den 70 nm Partikel. Für die ECV304 Zellen ist nur für die 20, 50 und 70 nm Partikel nach 1h ein leichter Anstieg in der Fluoreszenz, der nicht konzentrationsabhängig ist, zu verzeichnen, der sich nach 24h nur für die 50 und 70 nm Partikel bestätigt, aber nicht erhöht.

6.3.2 DHR123 Test

DHR123 dient der Detektion von $\cdot\text{O}_2^-$ und $\text{NO}\cdot$ durch Oxidation des zellgängigen, nicht fluoreszierenden Dihydrorhodamin (DHR123) zum fluoreszierenden Rhodamin123. Peroxidase/ H_2O_2 und HOCl können ebenfalls DHR123 oxidieren. Die Messbedingungen und Form der Darstellung entsprechen denen des DCF Tests. Getestet wurden zwei verschiedenen Inkubationszeiten (1h, 24h) und zwei unterschiedliche Konzentrationen, $31,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$), $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) in A549 und ECV304 Zellen.

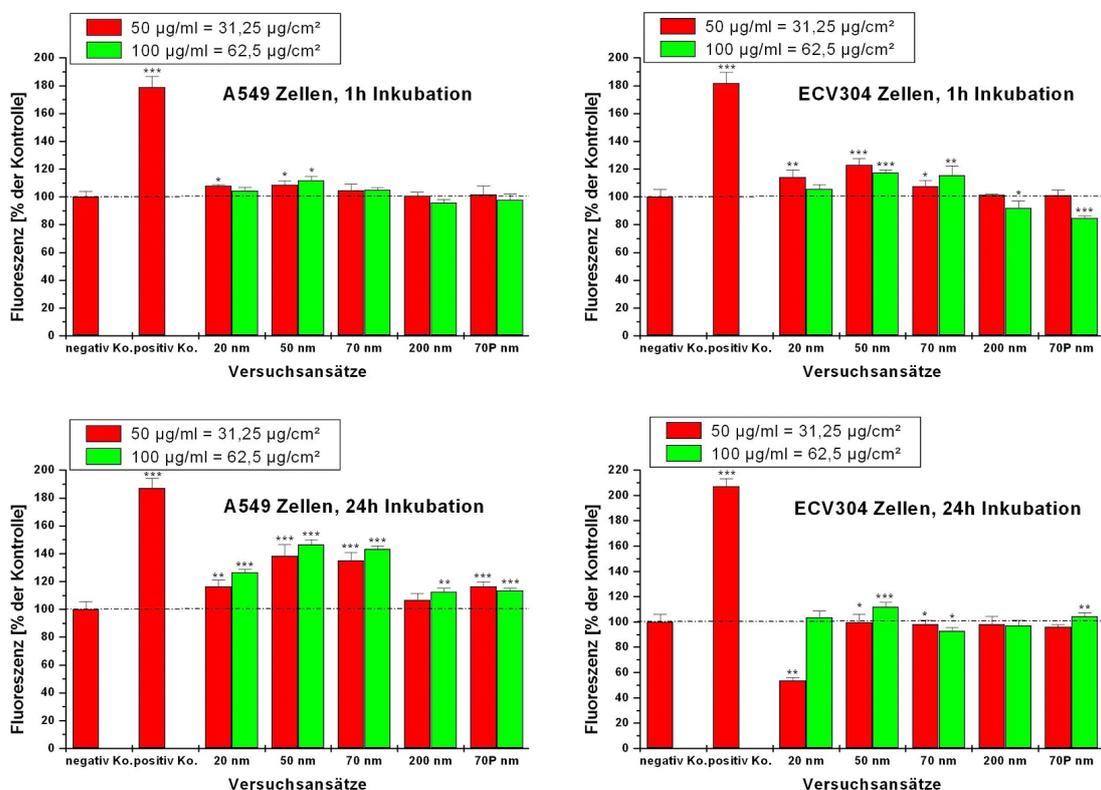


Abbildung 22: Leichte Induktion von ROS für alle Partikelgrößen in A549 Zellen. Messung der Bildung von ROS mit dem DHR123 Test nach Inkubation (1h, 24h) mit zwei Konzentrationen von Silica Partikeln ($31,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$), $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)) in A549 und ECV304 Zellen. Als positiv Kontrolle diente eine Inkubation mit $250 \mu\text{M}$ H_2O_2 , als negativ Kontrolle eine Inkubation mit H_2O . Dargestellt sind die Mittelwerte als Prozent der unbehandelten Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Aus Abbildung 22 ist ein ähnliches Ergebnis für die Bestimmung intrazellulärer ROS mit dem DHR123 Test erkennbar, wie im DCF Test. Ein leichter, aber nur für die 50 nm Partikel, signifikanter Anstieg in der Fluoreszenz ist nach 1h Inkubation in den A549 Zellen zu verzeich-

nen. Dieser Anstieg bestätigt und erhöht sich nach 24h für alle Partikelgrößen. Außerdem scheint auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit in der Induktion von ROS zu bestehen. Für die ECV304 Zellen finden sich keine eindeutigen Ergebnisse. Ein leichter, nicht konzentrationsabhängiger Anstieg zeigt sich nach 1h für die 20, 50 und 70 nm Partikel, der sich nach 24h nur für die 50 nm bestätigt aber nicht erhöht. Ähnlich wie im DCF Test fand sich weder nach 1h noch nach 24h eine Erhöhung in der Fluoreszenz für die 200 und 70P nm Ansätze.

6.3.3 DTNB Test

Um die Ergebnisse nochmals zu überprüfen, wurde abschließend die Zelllinie A549 auf Bildung von ROS mit dem DTNB Test untersucht. Hierbei erfolgt die Messung von ROS nicht direkt über die Bildung eines Fluoreszenzfarbstoffs, sondern über die Erhöhung des intrazellulären Gehalts an Glutathion, dass reduziert als GSH und in seiner oxidierten Form als GSSG vorliegt. GSH wirkt unter anderem als Antioxidanz und wird bei oxidativer Belastung durch H_2O_2 zu GSSG oxidiert. Im DNTB Test wurde nun der Gesamtgehalt an GSH und GSSG nach vier verschiedenen Inkubationszeiträumen (0.5, 1h, 2h, 24h) mit $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) an Silica Partikeln in A549 Zellen bestimmt.

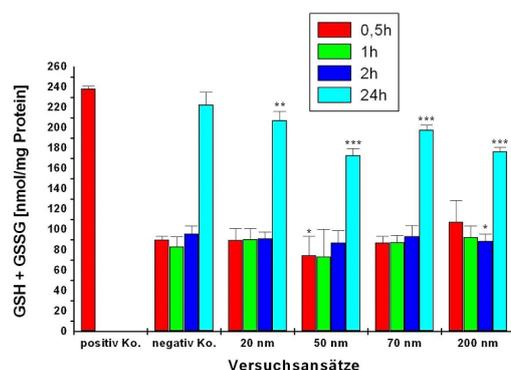


Abbildung 23: Messung des Gehalts an GSH und GSSG mit dem DTNB Test. Nach einer Inkubation von 0.5, 1h, 2h, 24h mit $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln in A549 Zellen. Als positiv Kontrolle diente eine Inkubation mit $250 \mu\text{M}$ H_2O_2 , als negativ Kontrolle eine Inkubation mit H_2O . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Abbildung 23 zeigt, dass kein Anstieg im Gehalt an GSH/GSSG für alle Partikelgrößen und Zeitpunkte zu verzeichnen war. Im Gegenteil zeigte sich nach 24h sogar ein signifikanter Rückgang im Gehalt dieses Peptids

für alle Partikelgrößen im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, dies könnte aber auch an einem leichten Rückgang in der Zellzahl liegen.

6.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Partikel- aufnahme und der Aufnahmewege

Da die Bestimmung der Partikelaufnahme mit Hilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie ein sehr zeitaufwändiger Vorgang ist, wurde zur Ermöglichung einer umfassenden Untersuchung der Partikelaufnahme und der speziellen Aufnahmewege, die Durchflusszytometrie gewählt. Durch die lineare Abhängigkeit der im Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzintensität ist eine schnelle und genaue Aufnahme rate fluoreszierender Partikel bestimmbar (Parod & Brain, 1983).

Die Untersuchungen zur Partikelaufnahme und deren Inhibition mit verschiedenen Inhibitoren in die drei Zelllinien erfolgte wie in Kapitel 5.8 beschrieben.

Abbildung 24 zeigt für alle drei verwendeten Zelllinien und alle vier Partikelgrößen charakteristische und repräsentative Aufnahmehistogramme. Gezeigt ist die Aufnahme der fluoreszierenden Silica Partikel nach einer Inkubationszeit von 3h mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) in die Zellen. Eine unbehandelte Kontrolle wurde in jedem Versuch als nicht fluoreszierend markiert (M1) und im Verhältnis dazu der Anteil an fluoreszierenden Zellen gemessen (M2). Dieser Anteil stellt sich in den Histogrammen als Wanderung des Peaks in Richtung steigender Fluoreszenz, entlang der X-Achse nach rechts dar. Je mehr fluoreszierende Partikel eine Zelle aufgenommen hat, desto weiter rechts wird sie im Histogramm dargestellt. Auf diese Weise lässt sich quantitativ und schnell der Anteil an Zellen in Prozent ermitteln, die fluoreszierende Partikel aufgenommen haben.

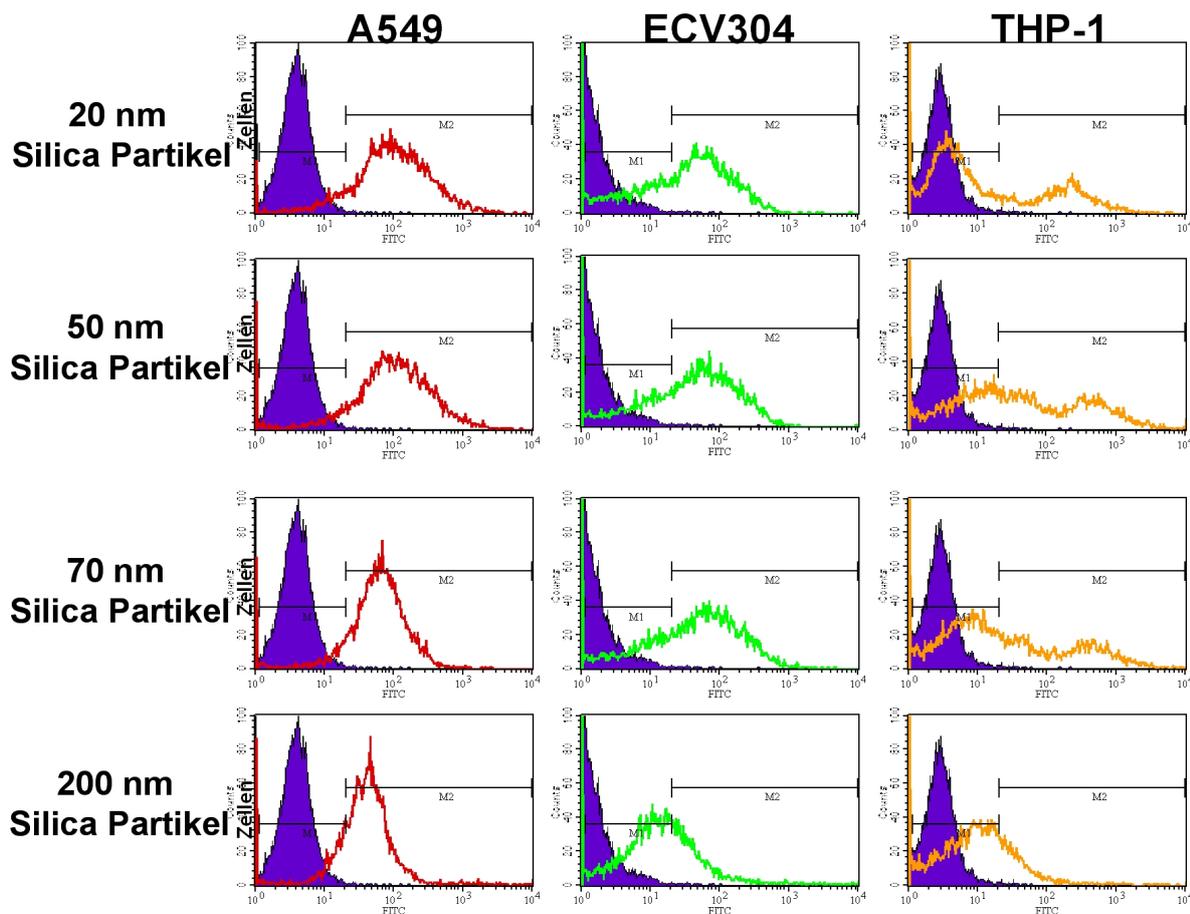


Abbildung 24: Repräsentative Histogramme der Aufnahme fluoreszierender Silica Partikel in A549, ECV304 und THP-1 Zellen nach 3h Inkubation mit $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$). Die unbehandelte Kontrolle ist als M1 markiert und in blau dargestellt. Im Verhältnis dazu sind die mit Partikeln inkubierten Zellen als farbige Linie gezeigt. Für alle Partikelgrößen und Zelllinien ist eine deutliche Migration des Zellpeaks in Richtung steigender Fluoreszenz zu verzeichnen. Alle Zellen im M2 markierten Bereich wurden als fluoreszierend gewertet.

6.4.1 Konzentrationsabhängigkeit

Um die Konzentrationsabhängigkeit und partikelgrößenabhängige Unterschiede im Aufnahmeverhalten aller verwendeten Zelllinien zu untersuchen, wurden je Partikel für 4h folgende Konzentrationen getestet: $0, 0.5, 5, 12.5, 25, 37.5, 50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 \mu\text{g}/\text{ml}$).

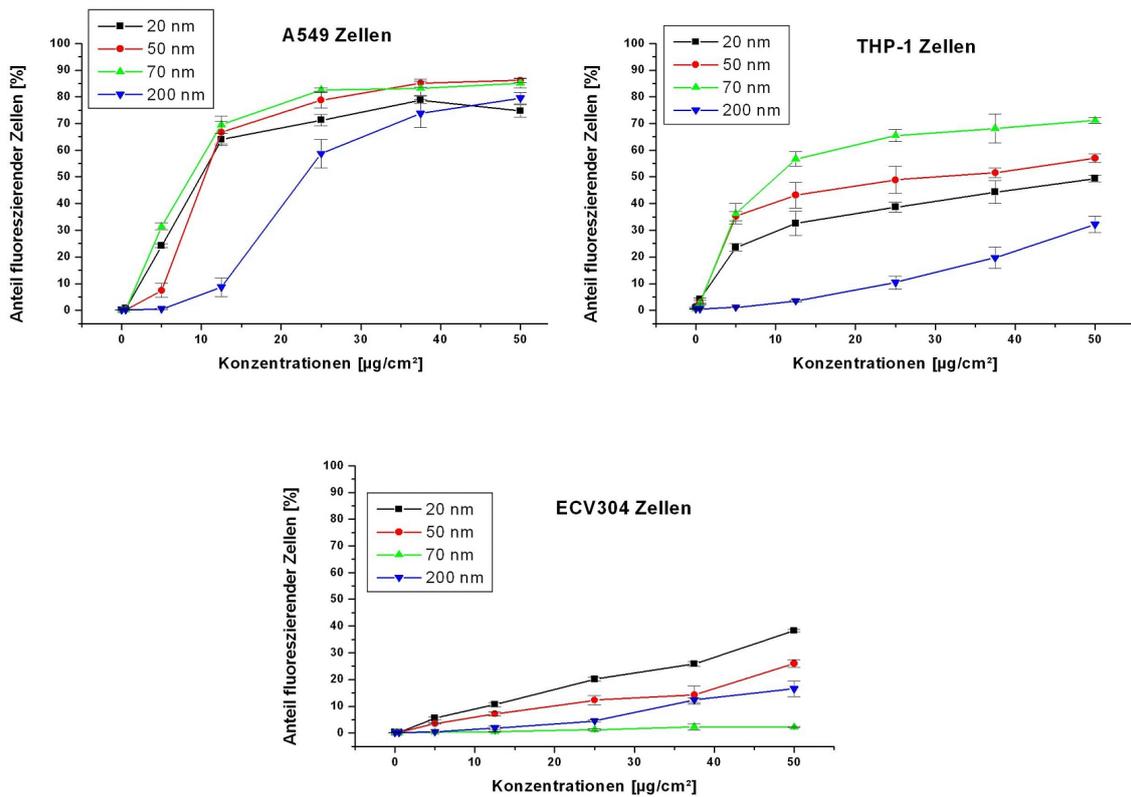


Abbildung 25: Konzentrationsabhängigkeit in der Aufnahme von Silica Partikeln in A549, ECV304 und THP-1 Zellen nach 4h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche.

Abbildung 25 demonstriert die Konzentrationsabhängigkeit im Aufnahmeverhalten der Zellen. Für alle Partikelgrößen und in allen drei Zelllinien steigt der Anteil an fluoreszierenden Zellen mit steigender Partikelkonzentration an. Es handelt sich dabei um Zellen, die genug fluoreszierenden Silica Nanopartikel aufgenommen haben, um durch das FACS detektiert zu werden. Im getesteten Zeitraum von 3h zeigen sich die A549 Zellen im Aufnahmeverhalten am effektivsten. Die Aufnahme liegt hier bei 75 - 90% und erreicht für die 20, 50 und 70 nm bereits bei $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und für die 200 nm Partikel bei $37,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ein Plateau. Am besten werden die 70, gefolgt von den 50 und 20 nm Partikeln aufgenommen. Die 200 nm Partikel werden am langsamsten internalisiert, erreichen aber ebenfalls mit der höchsten verwendeten Konzentration das Plateau.

Am zweiteffektivsten internalisieren die THP-1 Zellen die fluoreszierenden Partikel. Ein Plateau in der Aufnahme ist für die verwendeten Konzentrationen aber nicht zu erkennen. Auch in dieser Zelllinie ist die Ef-

fektivität in der Aufnahme der Partikel scheinbar größenabhängig. Am Besten werden auch hier die 70 nm Partikel aufgenommen, gefolgt von den 50, 20 und 200 nm Partikeln.

Anders sieht es in den ECV304 Zellen aus. Hier ist die Internalisierung der Partikel am langsamsten und die 70 nm Partikel werden am schlechtesten aufgenommen. Am besten werden hier die kleinsten, die 20 nm Partikel aufgenommen, gefolgt von den 50 und 200 nm Partikeln. Ein Plateau in der Aufnahme ist mit den verwendeten Konzentrationen auch hier noch nicht zu erkennen.

6.4.2 Zeitabhängigkeit

Um die Zeitabhängigkeit im Aufnahmeverhalten zu untersuchen wurden die Zellen mit $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) je Partikel für 3, 24 und 48h Stunden inkubiert.

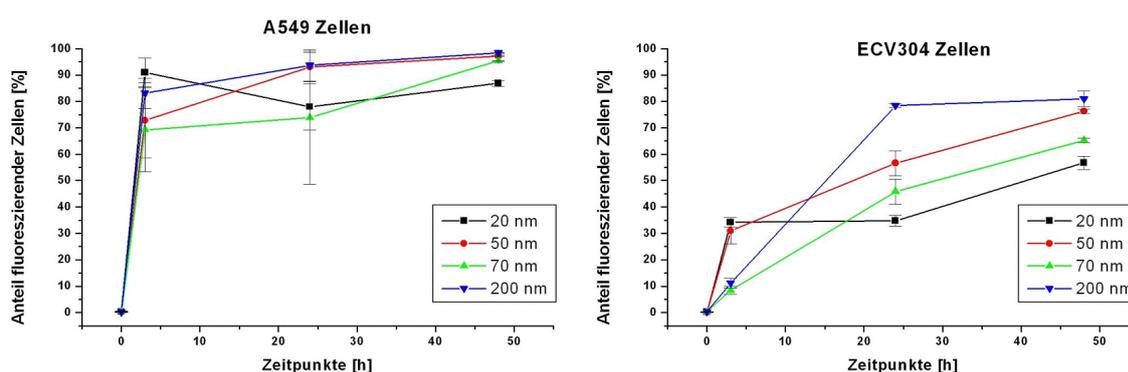


Abbildung 26: Zeitabhängigkeit in der Aufnahme von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln in A549 und ECV304 Zellen. Gezeigt ist die Aufnahme der Silica Nanopartikel in A549 und ECV304 Zellen nach, 3, 24 und 48h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche.

Abbildung 26 zeigt eine deutliche Zeitabhängigkeit in der Aufnahme der Silica Partikel für die ECV304 Zellen, wobei auch nach 48h noch keine Sättigung in der Aufnahme erreicht zu sein scheint. Linear stellt sich hier die Aufnahme der 50 nm Partikel dar. Die 70 nm Partikel werden zuerst auch hier am schlechtesten aufgenommen, „überholen“ dann aber für die beiden späteren Inkubationszeitpunkte die 20 nm Partikel. Die Aufnahme der 200 nm Partikel erscheint nach 24 und 48h am höchsten, obwohl sie nach 3h Inkubation, ähnlich wie im Versuch zur Konzentrationsabhängigkeit, mit am schlechtesten internalisiert wurden. Diese Unterschiede im Aufnahmeverhalten der einzelnen Partikeltypen in der

jeweiligen Zelllinie sind allerdings alle sehr gering und nicht überzubewerten.

6.4.3 Studien zur Energieabhängigkeit der Aufnahme

Um eine Aussage zu treffen, ob die Aufnahme der Silica Nanopartikel durch energieabhängige Prozesse vermittelt wird oder auf Diffusion beruht, wurden zwei verschiedene Methoden zur Inhibition der Aufnahme in A549 Zellen verwendet, Inhibition durch Kälte und Inhibition durch den Atmungskettenentkoppler Dinitrophenol.

6.4.3.1 Aufnahmeinhibition durch Kälte

In diesem Experiment wurde die Aufnahme von Silica Partikeln bei zwei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 37 °C) untersucht, um zu testen, ob ein Unterschied in der Aufnahmeeffektivität und somit eine Energieabhängigkeit im Aufnahmeverhalten vorliegt. Getestet wurden drei verschiedene Zeitpunkte (1h, 3h, 6h) und drei verschiedene Konzentrationen (10, 50, 100 µg/ml = 2.63, 13.16, 26.32 µg/cm² und somit gleichzeitig eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit.

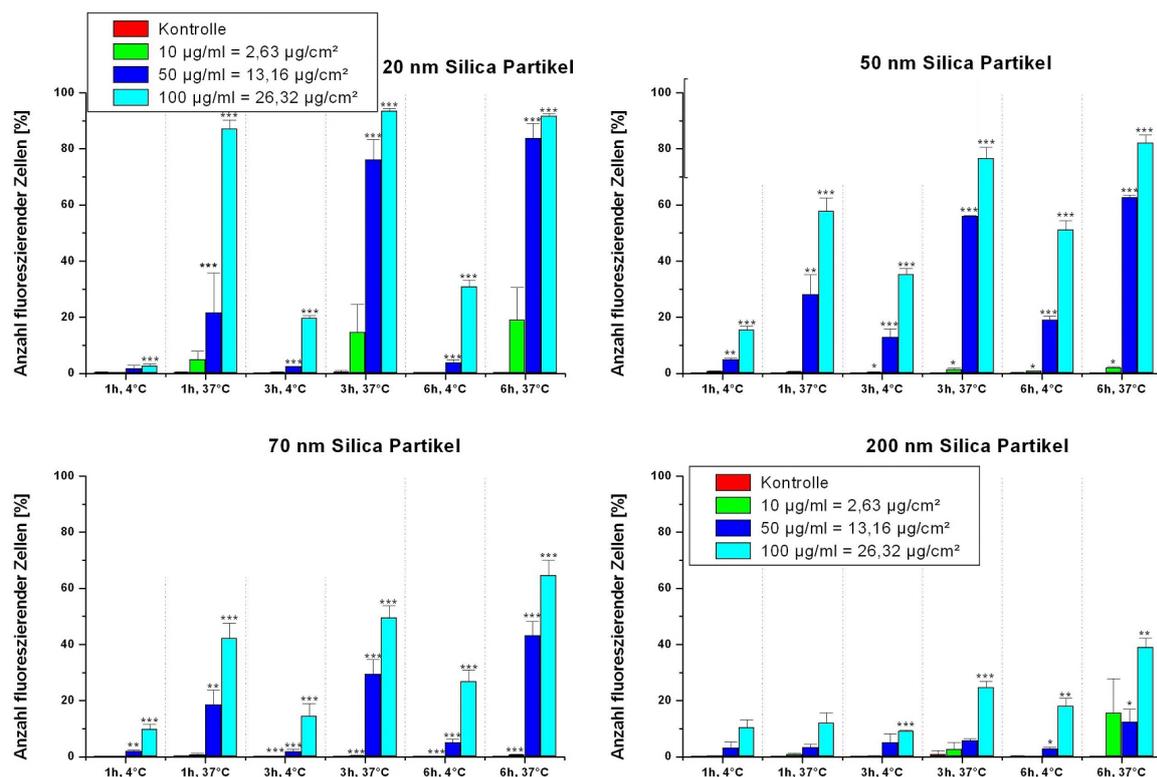


Abbildung 27: Aufnahmeinhibition durch Kälte in A549 Zellen. Getestet wurden drei verschiedene Zeitpunkte (1h, 3h, 6h) und drei verschiedene Konzentrationen (10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 2,63, 13,16, 26,32 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ Vergleich der Aufnahme zwischen 4 °C und 37 °C je Zeitpunkt und Konzentration)

Abbildung 27 zeigt für jeden Partikel eine klare Konzentrations- und Zeitabhängigkeit im Aufnahmeverhalten in A549 Zellen. Unabhängig davon ist für jeden Zeitpunkt und für alle verwendeten Nanopartikel ein signifikanter, temperaturabhängiger Unterschied im Aufnahmeverhalten zu verzeichnen. Die Aufnahme der Partikel ist bei 4 °C signifikant niedriger als bei 37 °C. Dies deutet auf energieabhängige Aufnahmeprozesse bei der Internalisierung der verwendeten Nanopartikel hin. Eine Aufnahme über Diffusion sollte bei einer Temperatur von 4 °C noch nicht beeinträchtigt sein, da eine Temperatur bedingte Einschränkung der Brown'schen Molekularbewegung hier noch nicht vorliegt.

6.4.3.2 Aufnahmeinhibition durch Dinitrophenol

Wichtig für energieabhängige Aufnahmeprozesse ist die Anwesenheit des zellulären Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP). Um energieabhängige Aufnahmeprozesse zu inhibieren wurde hier als zweite Möglichkeit ein Atmungskettenentkoppler, das 2,4-Dinitrophenol

(DNP) eingesetzt. Es verursacht einen „Kurzschluss“ im Protonengradienten, indem es die Membran für Protonen durchlässig macht. So fehlt die protonenmotorische Kraft, die für die ATP-Synthese nötig ist.

In diesem Experiment wurde die Aufnahme von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln in A549 Zellen untersucht. Betrachtet wurde eine Hemmung in der Aufnahme bedingt durch Depletion des ATP Gehalts der Zelle mit Hilfe des DNP's, im Vergleich mit einer partikelexponierten Positiv Kontrolle ohne Inhibitor. Die Zellen wurden vor Partikelzugabe 2h in Glucose freiem Medium und davon zusätzlich 1h mit $500 \mu\text{M}$ bzw. 1 mM (DNP) vorinkubiert, gefolgt von 3h Inkubation mit Partikeln und DNP.

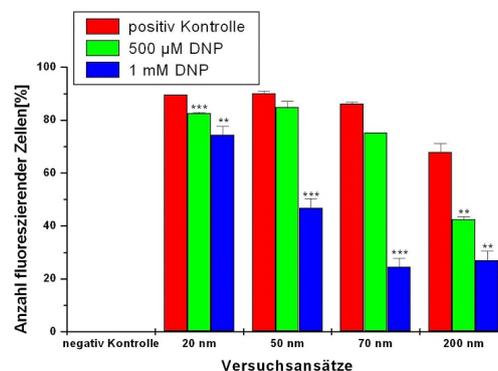


Abbildung 28: Aufnahmeinhibition durch Dinitrophenol (DNP) in A549 Zellen. Untersucht wurden die Aufnahme von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel, nach 3h Inkubation. Gezeigt ist die Aufnahme aller Partikelgrößen ohne Inhibitor (positiv Kontrolle) und für zwei verschiedene Inhibitorenkonzentrationen, $500 \mu\text{M}$ bzw. 1 mM DNP. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit der Positivkontrolle)

Abbildung 28 ist ersichtlich, dass für jede Nanopartikelgröße im Vergleich mit der positiv Kontrolle eine Inhibition in der Partikelaufnahme in A549 Zellen durch DNP zu verzeichnen war. Diese Inhibition ist abhängig von der Konzentration des eingesetzten Inhibitors und für die 70 nm Partikel mit einem Rückgang in der Aufnahme um fast 74% am größten. Dieser Versuch zeigt somit, dass ATP-abhängige Aufnahmeprozesse an der Interanlisierung aller verwendeten Silica Nanopartikel beteiligt sind.

6.4.4 Inhibition der verschiedenen Aufnahmewege in die Zelle

Für die Partikelaufnahme können verschiedene Mechanismen (klassische Phagozytose, rezeptorvermittelte Endozytose) verantwortlich sein.

Dabei wird der Mechanismus der Partikelaufnahme unter anderem von der Größe des zu internalisierenden Partikel bestimmt. Aufgrund des Agglomerationsverhaltens der verwendeten Partikel, und der damit einhergehenden angestiegenen Größe im Vergleich zu den Primärpartikeln (vergleiche 6.1.2.1) wurde als Aufnahmemechanismus sowohl die klassische Phagozytose als auch *Clathrin coated pits* und Caveolae vermittelte Endozytose in Betracht gezogen.

Um die möglichen Wege der Partikelaufnahme in Zellen untersuchen zu können, wurden gezielt die in Kapitel 4.4 genannten Aufnahmewege und Rezeptoren mit spezifischen Inhibitoren (Tab. 16) gezielt gehemmt. Die Inhibition der Aufnahmewege erfolgte unter nicht zelltoxischen Bedingungen. Mit Hilfe des WST-1 Tests wurden alle eingesetzten Inhibitoren auf eine akut toxische Wirkung für 4h und 24h in A549 und ECV304 Zellen hin untersucht. Gezeigt sind die Daten nach 4h Inkubation (siehe Abbildung 29). Für beide Inkubationszeiträume ergab sich keine akute Toxizität.

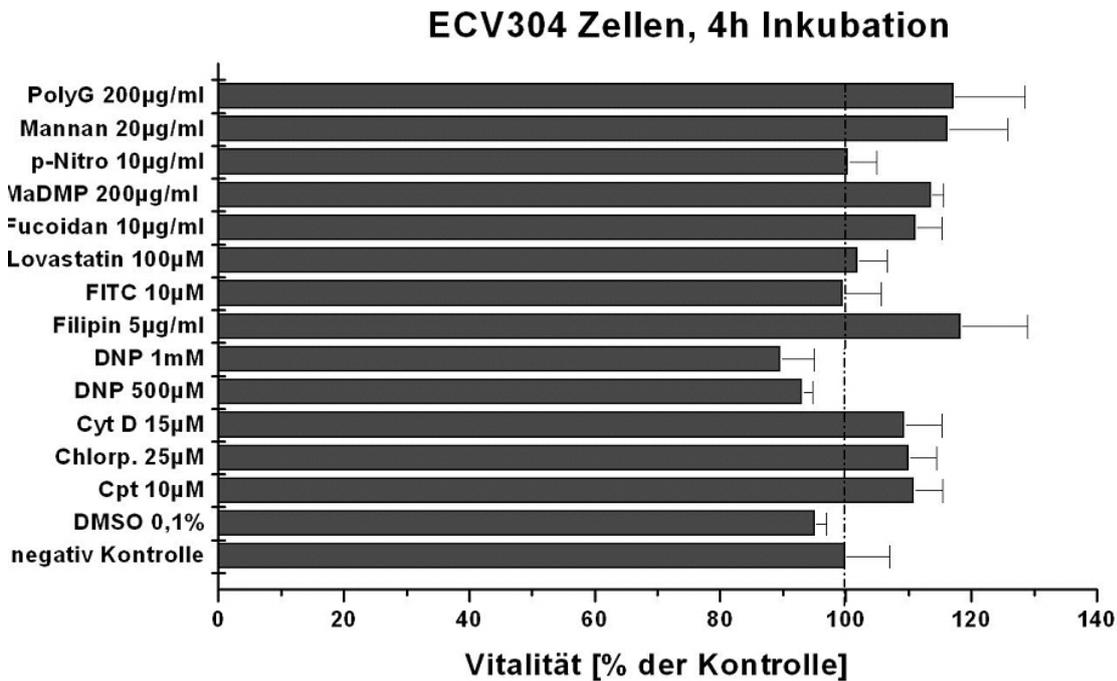
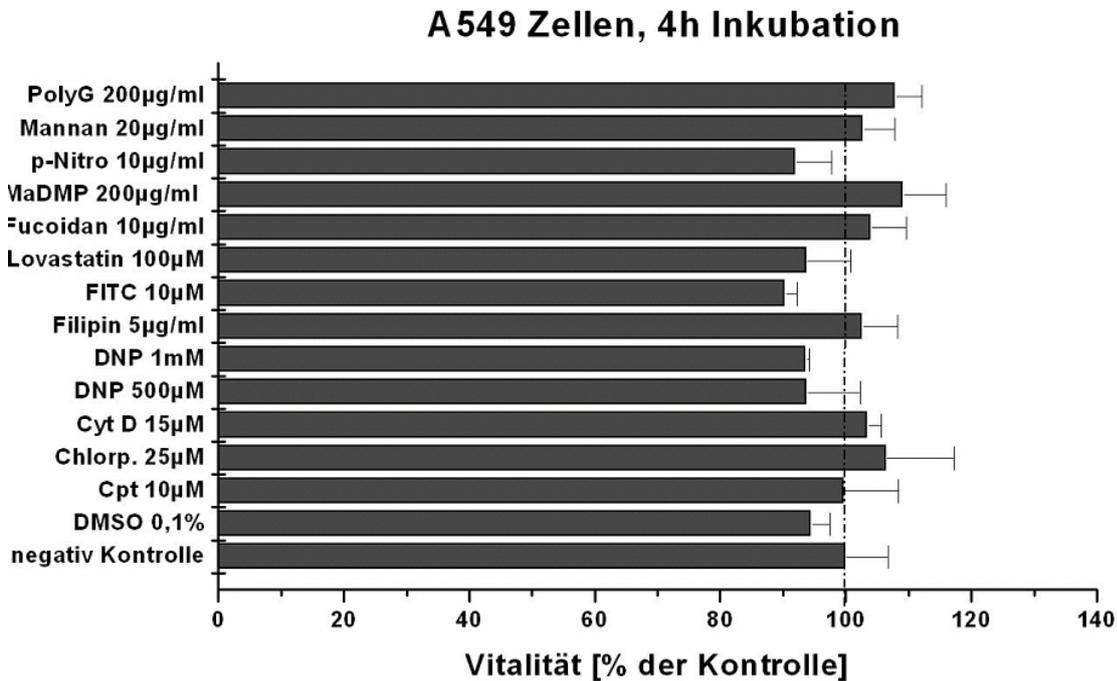


Abbildung 29: Gezeigt ist der Effekt der eingesetzten Inhibitoren auf die Zellvitalität von A549 und ECV304 Zellen, ermittelt mit dem WST-1 Test. Es erfolgte eine 4h Inkubation mit den jeweilig verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle)

6.4.4.1 Inhibition der Phagozytose allgemein

Da alle phagozytotischen Aufnahmemechanismen aktinabhängig sind, wurde zunächst überprüft, ob die Aufnahme der Silica Partikel in die Zelle durch Hemmung des Aktinzytoskeletts zuunterbinden sei. Die Inhibition erfolgte mit Cytochalasin D (Cyt D). Cyt D ist ein zellpermeables Pilztoxin (von *Zygosporium mansonii*). Es inhibiert die Poly- und Depolymerisation des Aktinzytoskeletts, indem es an das *barbed*-(Plus)-Ende der Aktin-Filamente bindet. Dadurch wird die, für die Phagozytose wichtige Rekrutierung des Aktinzytoskeletts, verhindert.

Nach 1h Vorinkubation mit 15 μM Cyt D folgte eine Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel und 15 μM Cyt D für weitere 3h.

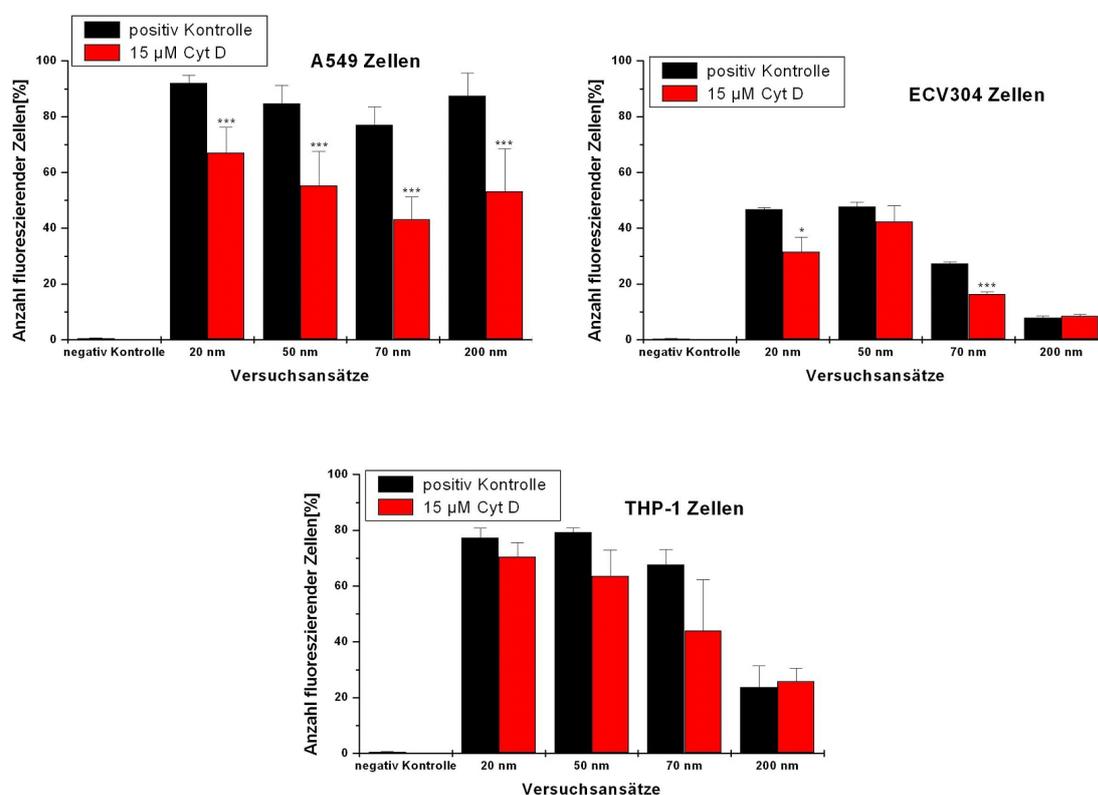


Abbildung 30: Aufnahmeinhibition durch 15 μM Cytochalasin D (Cyt D) in A549, ECV304 und THP-1 Zellen. Es erfolgte eine 3h Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit der Positivkontrolle)

Abbildung 30 zeigt für alle drei Zelllinien einen Rückgang in der Aufnahme aller verwendeten Nanopartikel, außer für die 200 nm in den ECV304 und THP-1 Zellen. Dieser Rückgang ist in den A549 Zellen

hoch signifikant für alle Partikelgrößen und mit 50% für die 70 nm am höchsten. Ebenfalls hoch signifikant ist der Rückgang für die 70 nm Partikel in den ECV304 Zellen. Die Stärke des Rückganges hängt auch von der Konzentration des eingesetzten Inhibitors ab, so konnte für A549 Zellen gezeigt werden, dass die Inhibition der Aufnahme für alle Partikelgrößen höher war bei Verwendung von 30 μM Cyt D (Daten nicht gezeigt). Allerdings war die Aufnahme nicht komplett zu unterbinden. Somit konnte gezeigt werden, dass aktinabhängige Aufnahmeprozesse an der Internalisierung der Nanopartikel beteiligt sind.

6.4.4.2 Inhibition der Phagozytose Rezeptoren

In Ermangelung kommerziell erhältlicher blockierender Antikörper für die verschiedenen Phagozytose Rezeptoren humaner Zellen, kamen verschiedenen Chemikalien und kompetitiv wirkende Liganden zum Einsatz, die in Tab. 16 gezeigt sind.

6.4.4.3 Inhibition der $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor ($\text{Fc}\gamma\text{R}$) vermittelten Phagozytose

Die Inhibition der $\text{Fc}\gamma$ Rezeptoren erfolgte mit Hilfe der Chemikalie p-Nitro-phenyl-methyl-disulfid (p-Nitro). Durch eine Studie von Foo et al. (2007) war bekannt, dass Disulfid Brücken in Kombination mit einer p-Nitrophenyl Gruppe spezifisch die $\text{Fc}\gamma$ vermittelte Phagozytose inhibieren, indem die Disulfid Brücken mit den freien Sulfhydryl Gruppen der Rezeptoren reagieren. Die Chemikalie wurde freundlicherweise von Esther Birtalan (Universität Karlsruhe (TH), Institut für Organische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. S. Bräse) synthetisiert.

Nach 1h Vorinkubation mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ p-Nitro-phenyl-methyl-disulfid (p-Nitro) folgte eine Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ p-Nitro für weitere 3h.

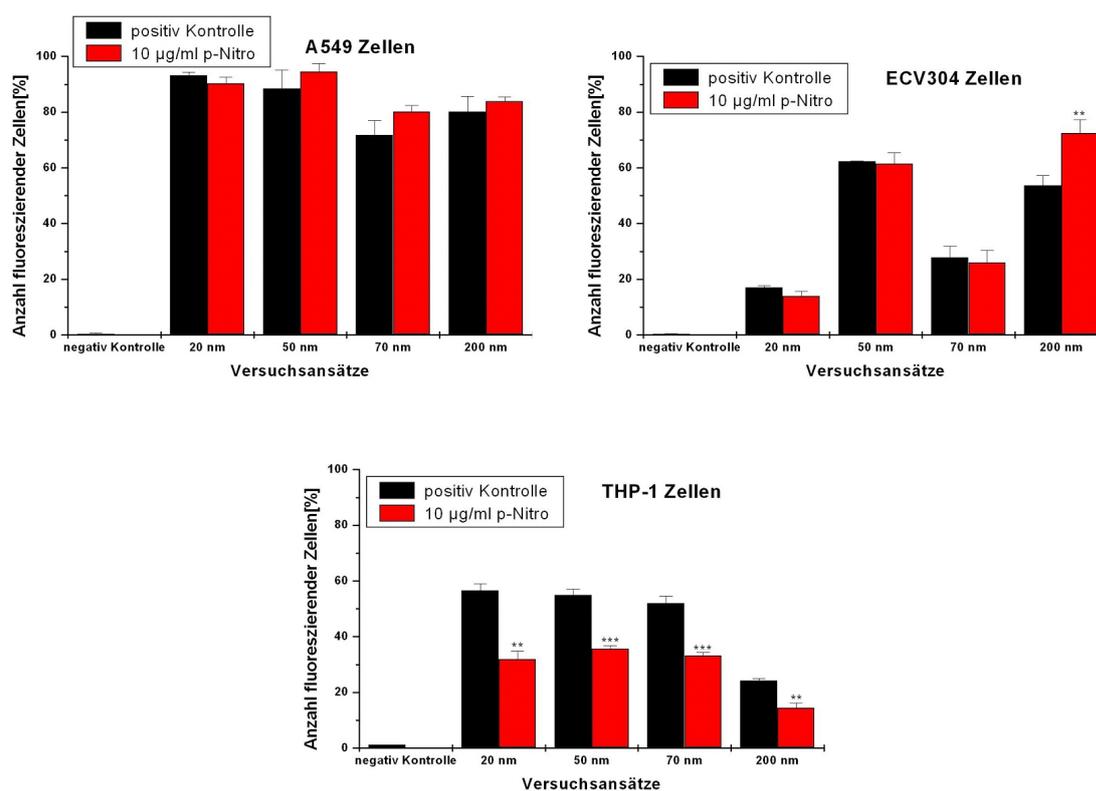


Abbildung 31: Eine Aufnahmeinhibition durch p-Nitro (10 µg/ml) ist nur in THP-1 Zellen nachweisbar. Es erfolgte eine 3h Inkubation mit 50 µg/cm² (100 µg/ml) Silica Partikeln in A549, ECV304 und THP-1 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM dreier unabhängiger Versuche (*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001 im Vergleich mit der Positivkontrolle)

Abbildung 31 zeigt deutlich, dass eine Inhibition der Aufnahme von Silica Nanopartikeln nur für die THP-1 Zellen erreicht werden konnte. Dieser Rückgang war für alle Partikelgrößen hoch signifikant und ungefähr im selben Bereich (20 nm 44%, 50 nm 35%, 70 nm 36% und 200 nm 41% Rückgang).

Als weiterer, aus der Literatur bekannter Inhibitor kam Lovastatin (Mevinolin) in einer Konzentration von 100 µM in A549 und ECV304 Zellen zum Einsatz (Haberzettl et al., 2008; Loike et al., 2004). Es zeigte sich ein Rückgang in der Aufnahme aller Partikelgrößen in beiden Zelllinien (Daten nicht gezeigt).

6.4.4.4 Inhibition der Komplement-Rezeptor (CR) vermittelten Phagozytose

Die Inhibition der Komplement-Rezeptoren erfolgte durch Verwendung hitzeinaktivierten FCS im Medium (hiFCS). Die Inaktivierung erfolgte durch Erhitzen des FCS für 30 min auf 56 °C. Dieser Weg der Inhibition

wurde gewählt, da keine blockierende Antikörper für humane CR, oder chemische Inhibitoren bekannt waren. Außerdem war aus der Literatur bekannt, dass eine Aufnahme über diesen Rezeptortyp durch eine relativ unspezifische Opsonierung der Partikel mit Komplement vermittelt wird (Aderem & Underhill, 1999) und diese Aufnahme durch Verwendung von denaturiertem FCS inhibiert werden kann (O'Brien & Melville, 2003).

Nach 1h Vorinkubation mit hiFCS im Medium folgte eine Inkubation mit $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel im selben Medium für weitere 3h.

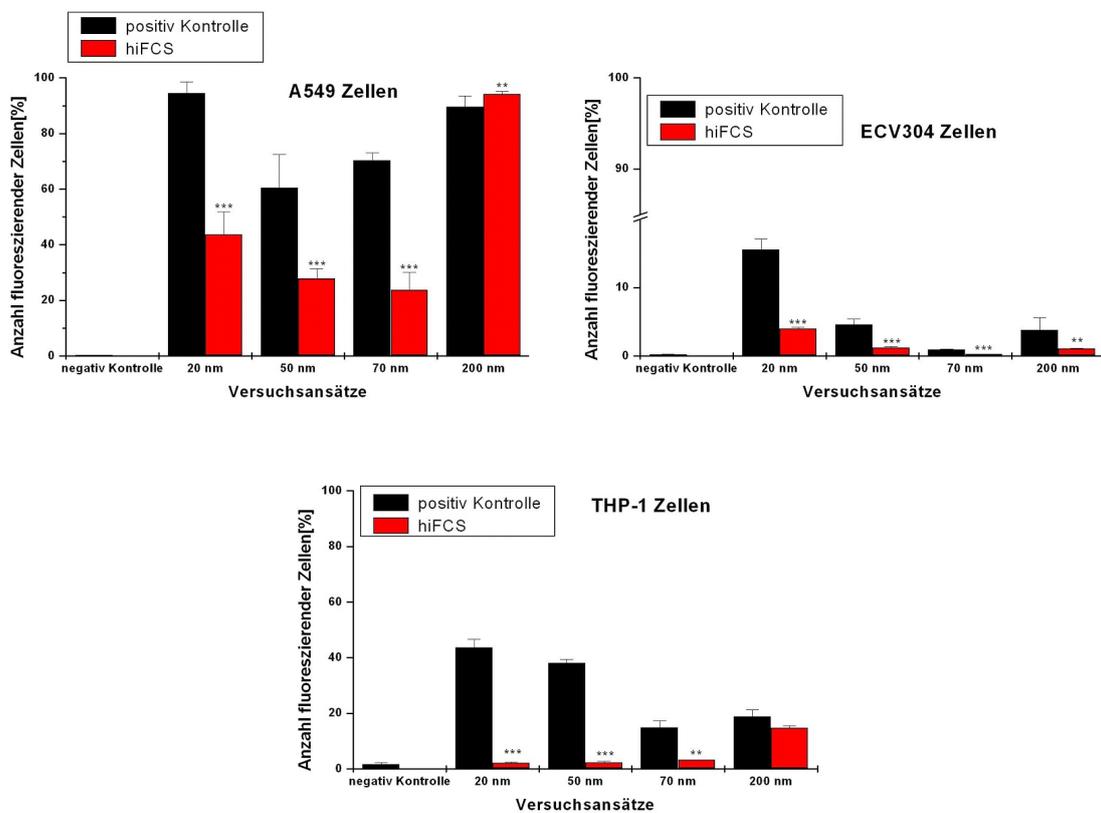


Abbildung 32: Aufnahmeinhibition durch hiFCS in A549, ECV304 und THP-1 Zellen. $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel, 3h Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit der Positivkontrolle)

Abbildung 32 zeigt einen hoch signifikanten Rückgang in der Aufnahme aller Partikelgrößen für die ECV304 Zellen. Ebenfalls hoch signifikant war die Inhibition der Aufnahme in den A549 Zellen für die 20, 50 und 70 nm großen Silica Partikel. Dieser war für die 70 nm Partikel mit 74% am größten. Allerdings war in dieser Zelllinie die Aufnahme der 200 nm Partikel nicht gehemmt, sondern, im Gegenteil, sogar signifikant erhöht.

In den THP-1 Zellen konnte die Aufnahme, wie in den ECV304 Zellen, für alle Partikelgrößen inhibiert werden. Die Inhibition war hier allerdings nur für die 20, 50 und 70 nm hoch signifikant. Ein Rückgang in der Aufnahme der 200 nm Partikel konnte gemessen werden, allerdings war er nicht signifikant.

6.4.4.5 Inhibition der Mannose-Rezeptor (MR) vermittelten Phagozytose

Zur Inhibition des zu den Lektinen gehörenden Mannose-Rezeptors wurde ein Ligand verwendet, der zu einer kompetitiven Hemmung des Rezeptors führt, das Mannan.

Nach 1h Vorinkubation mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mannan folgte eine Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mannan für weitere 3h.

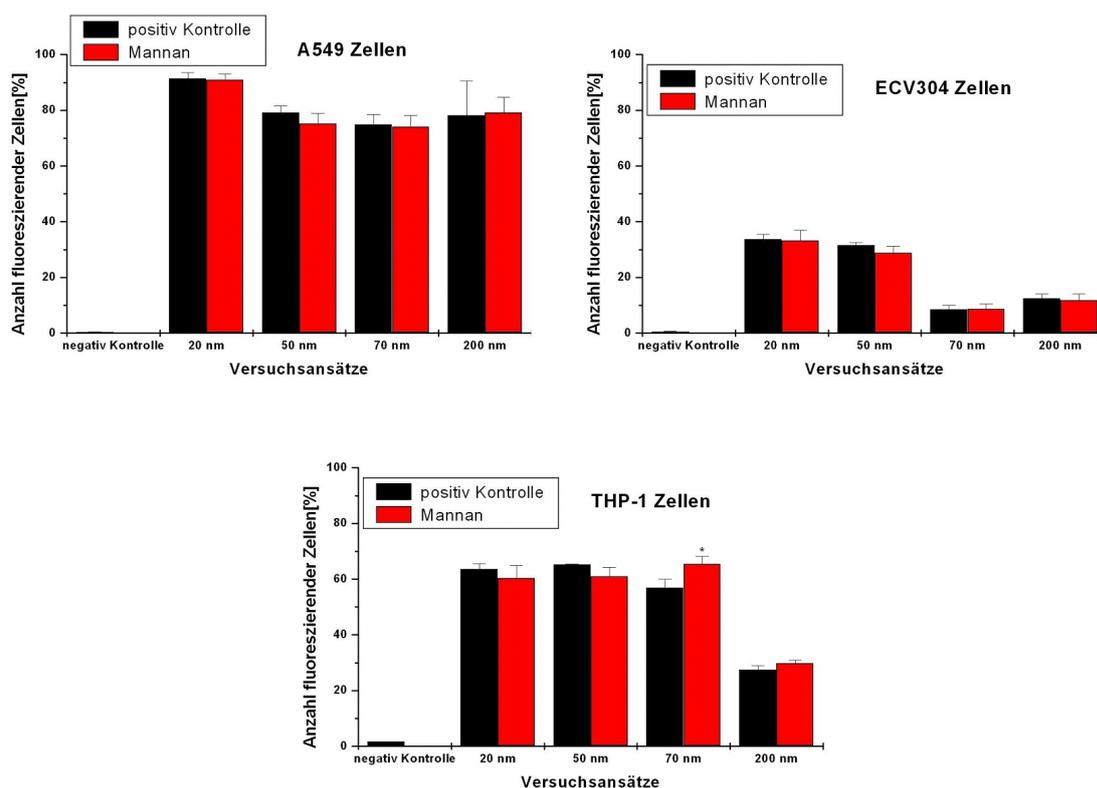


Abbildung 33: Aufnahmeinhibition durch Mannan 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in A549, ECV304 und THP-1 Zellen. 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel, 3h Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit der Positivkontrolle)

Abbildung 33 zeigt, dass die Aufnahme aller Partikeltypen in alle drei Zelllinien nicht inhibiert werden konnte.

Um diese Ergebnisse abzusichern und ungewollte Nebeneffekte auszuschließen, wurde zusätzlich mit einem weiteren Inhibitor, Methyl- α -D-mannopyranosid (M- α -D-MP), der MR vermittelten Phagozytose überprüft, ob die Aufnahme der Silica Partikel in die Zellen zu beeinträchtigen sei. Dieser agonistische Inhibitor wirkt ebenfalls als Ligand und hemmt den MR kompetitiv. Diese Experimente wurden nur mit A549 und ECV304 Zellen durchgeführt.

Nach 1h Vorinkubation mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M- α -D-MP folgte eine Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M- α -D-MP für weitere 3h.

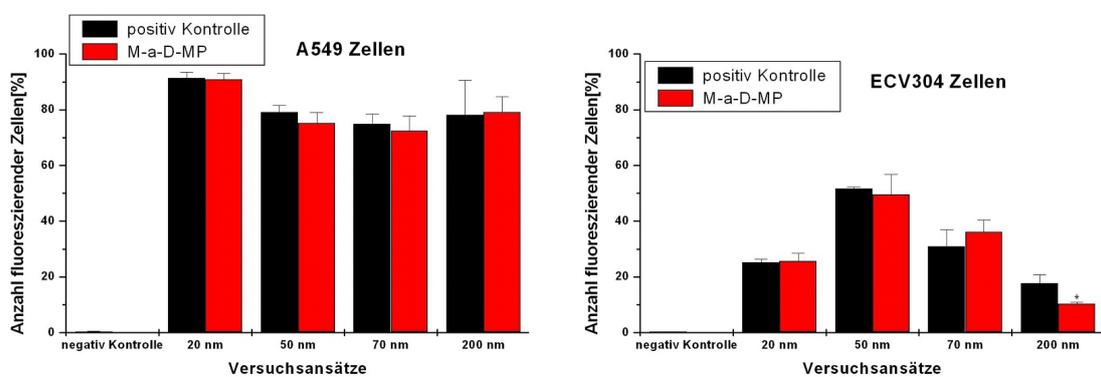


Abbildung 34: Aufnahmeinhibition durch M- α -D-MP 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in A549 und ECV304 Zellen. 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel, 3h Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit der Positivkontrolle)

Abbildung 34 bestätigt die Ergebnisse der Versuche zur Inhibition mit Mannan für die A549 und ECV304 Zellen. Die Aufnahme aller Partikelgrößen in A549 Zellen konnte nicht inhibiert werden. Ebenso die Aufnahme der 20, 50 und 70 nm Partikel in die ECV304 Zellen. Lediglich für die 200 nm Partikel konnte eine, auf dem Niveau $p \leq 0,05$, leichte Inhibition erreicht werden.

6.4.4.6 Inhibition der Scavenger-Rezeptor (ScR) vermittelten Phagozytose

Die Inhibition der Gruppe der Scavenger-Rezeptoren erfolgte mit Hilfe zweier verschiedener Inhibitoren. Zuerst erfolgten Untersuchungen zur Aufnahmehemmung mit einem kompetitiven Inhibitor, der als Ligand spezifisch an die Rezeptoren bindet, Polyguanyl Säure (PolyG) (Kanno et al., 2007; Kraal et al., 2000).

Nach 1h Vorinkubation mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PolyG folgte eine Inkubation mit

50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PolyG für weitere 3h.

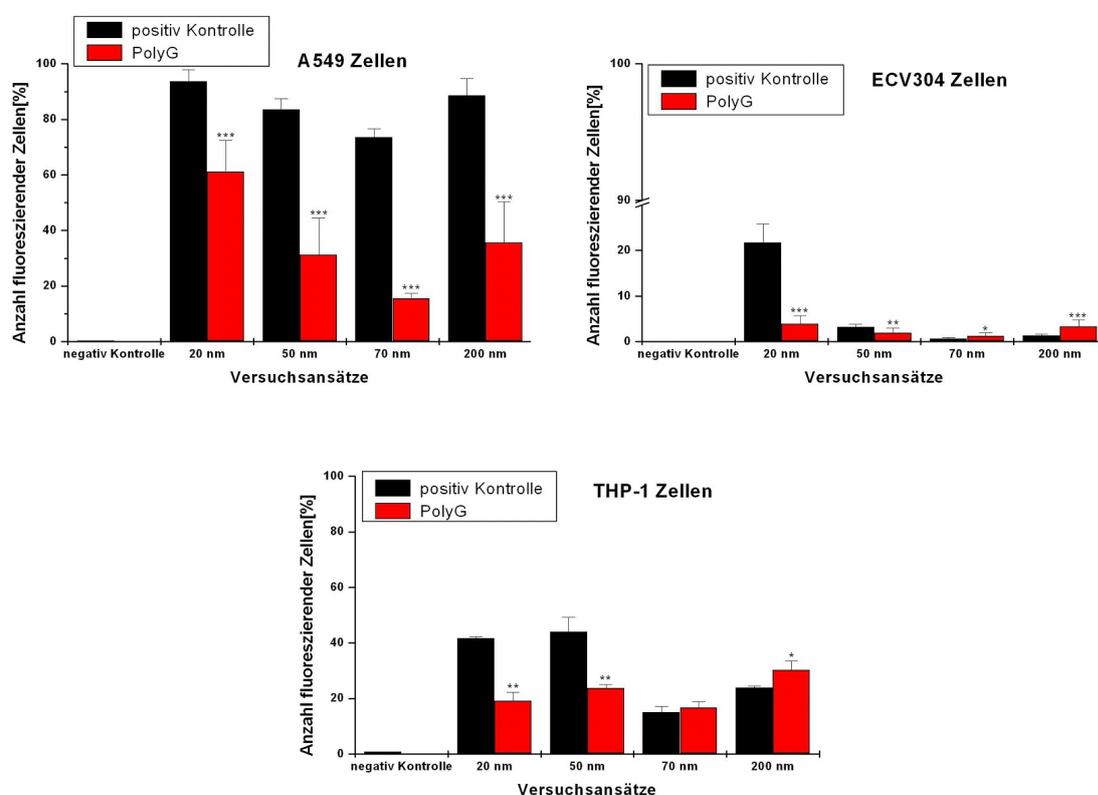


Abbildung 35: Aufnahmeinhibition durch PolyG 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in A549, ECV304 und THP-1 Zellen. 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel, 3h Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit der Positivkontrolle)

Abbildung 35 zeigt eine hoch signifikante Inhibition in der Aufnahme aller Partikeltypen in A549 Zellen mit Hilfe des Liganden PolyG. Der Rückgang betrug hier für die 50 und 70 und 200 nm Partikel sogar fast 80%. Ebenfalls hoch signifikant ist die Hemmung für 20 und 50 nm Silica Partikel in ECV304 und THP-1 Zellen. Die Aufnahme der 70 und 200 nm Partikel hingegen steigt für diese beiden Zelllinien sogar an, im Falle der 200 nm sogar signifikant, ebenso im Falle der 70 nm in den ECV304 Zellen.

Um diese Ergebnisse abzusichern, wurde auch hier zusätzlich mit einem weiteren Inhibitor der ScR vermittelten Phagozytose, Fucoidan, überprüft, ob die Aufnahme der Silica Partikel in die Zellen zu hemmen sei. Dieser agonistische Inhibitor wirkt ebenfalls als Ligand und hemmt den ScR kompetitiv. Diese Experimente wurden nur mit A549 und ECV304 Zellen durchgeführt.

Nach 1h Vorinkubation mit $10 \mu\text{g/ml}$ Fucoidan folgte eine Inkubation mit $50 \mu\text{g/cm}^2$ ($100 \mu\text{g/ml}$) Silica Partikel und $10 \mu\text{g/ml}$ Fucoidan für weitere 3h.

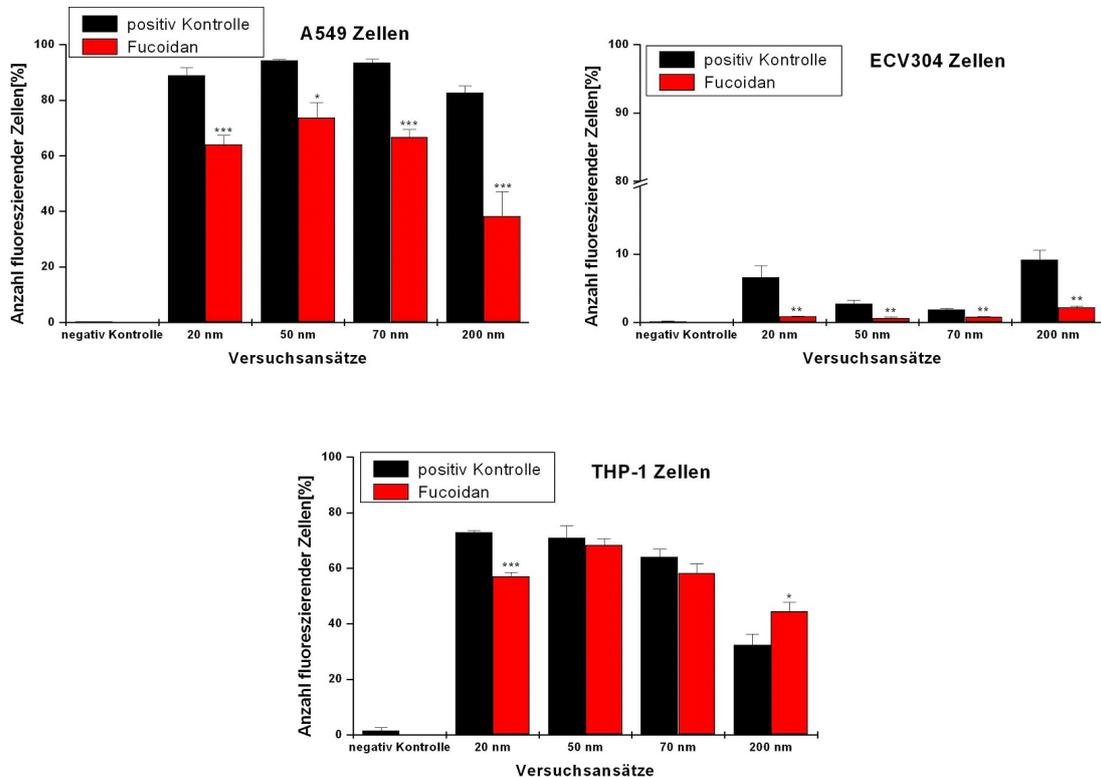


Abbildung 36: Aufnahmeinhibition durch Fucoidan $10 \mu\text{g/ml}$ in A549, ECV304 und THP-1 Zellen. $50 \mu\text{g/cm}^2$ ($100 \mu\text{g/ml}$) Silica Partikel, 3h Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit der Positivkontrolle)

Aus Abbildung 36 ist ersichtlich, dass mit diesem Inhibitor ein signifikanter Rückgang in der Aufnahme aller Partikeltypen in A549 und ECV304 Zellen erreicht wurde. Für die THP-1 Zellen konnte nur ein Rückgang in der Aufnahme der 20 nm Partikel erreicht werden. Die Aufnahme der 200 nm Silica Partikel stieg hier auf dem Niveau $p \leq 0,05$ sogar signifikant an.

6.4.4.7 Inhibition der *Clathrin coated pit* vermittelten Endozytose

Als ein weiterer möglicher Aufnahmeweg für Nanopartikel gelten Vesikel, die mit dem Protein Clathrin bedeckt sind, die sogenannten *Clathrin coated pits*. Es handelt sich dabei um eine andere Form der Rezeptor vermittelten Endozytose. Dieser Weg der Aufnahme kann spezifisch mit

dem Phenothiazin-Derivat Chlorpromazin inhibiert werden.

Nach 1h Vorinkubation mit 25 μM Chlorpromazin folgte eine Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel und 25 μM Chlorpromazin für weitere 3h.

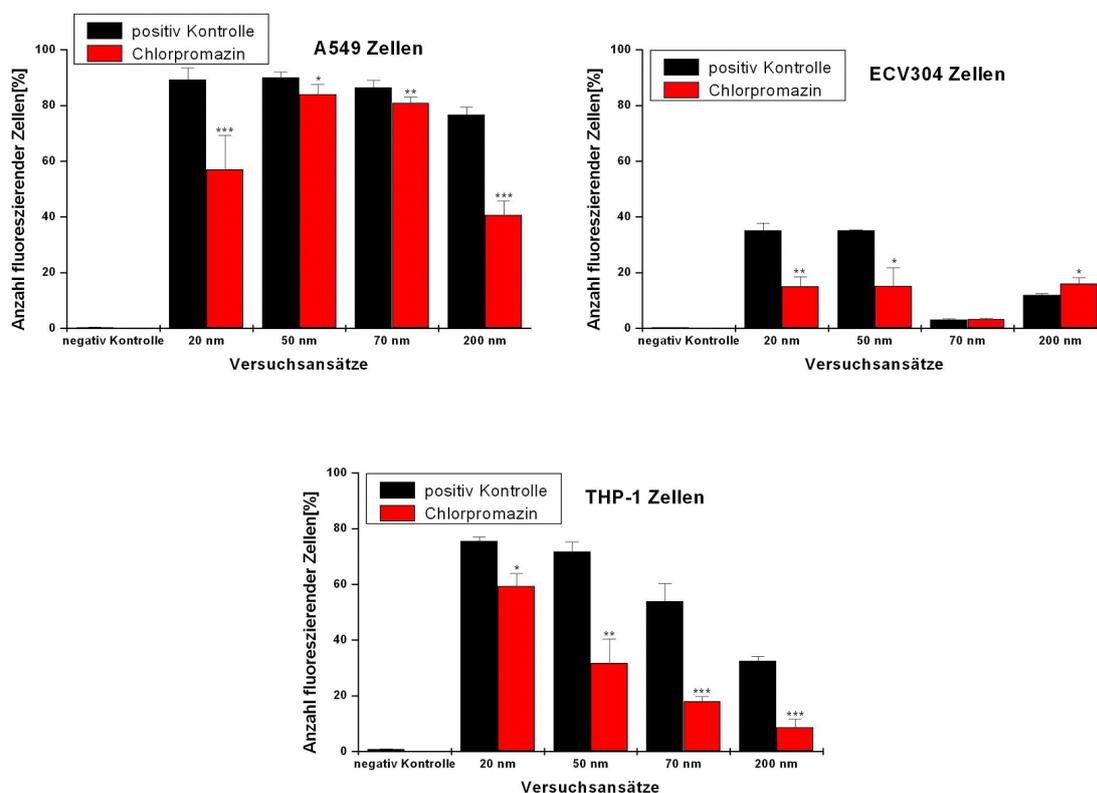


Abbildung 37: Aufnahmeinhibition durch Chlorpromazin 25 μM in A549, ECV304 und THP-1 Zellen. 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel, 3h Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit der Positivkontrolle)

Abbildung 37 zeigt einen signifikanten Rückgang in der Aufnahme aller Partikelgrößen in THP-1 und A549 Zellen. Der Rückgang in der Aufnahme war in den A549 Zellen für die 200 nm Partikel mit 52% am höchsten. In ECV304 Zellen konnte ein solcher Rückgang nur für die 20 und 70 nm Partikel beobachtet werden. die Aufnahme der 200 nm Partikel stieg hier sogar an.

6.4.4.8 Inhibition der Caveolae vermittelten Endozytose

Als letzter Aufnahmeweg wurde die Caveolae vermittelte Endozytose untersucht. Diese flaschenförmigen Einstülpungen, die eine Sonderform der *Lipid Rafts* darstellen, bilden Vesikel in der Größenordnung von

60-100 nm, die mit dem Protein caveolin assoziiert sind (Alberts et al., 2004) und lassen sich spezifisch mit dem Pilztoxin des Aktinomyceten *Streptomyces filipinensis* inhibieren.

Nach 1h Vorinkubation mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Filipin folgte eine Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Filipin für weitere 3h.

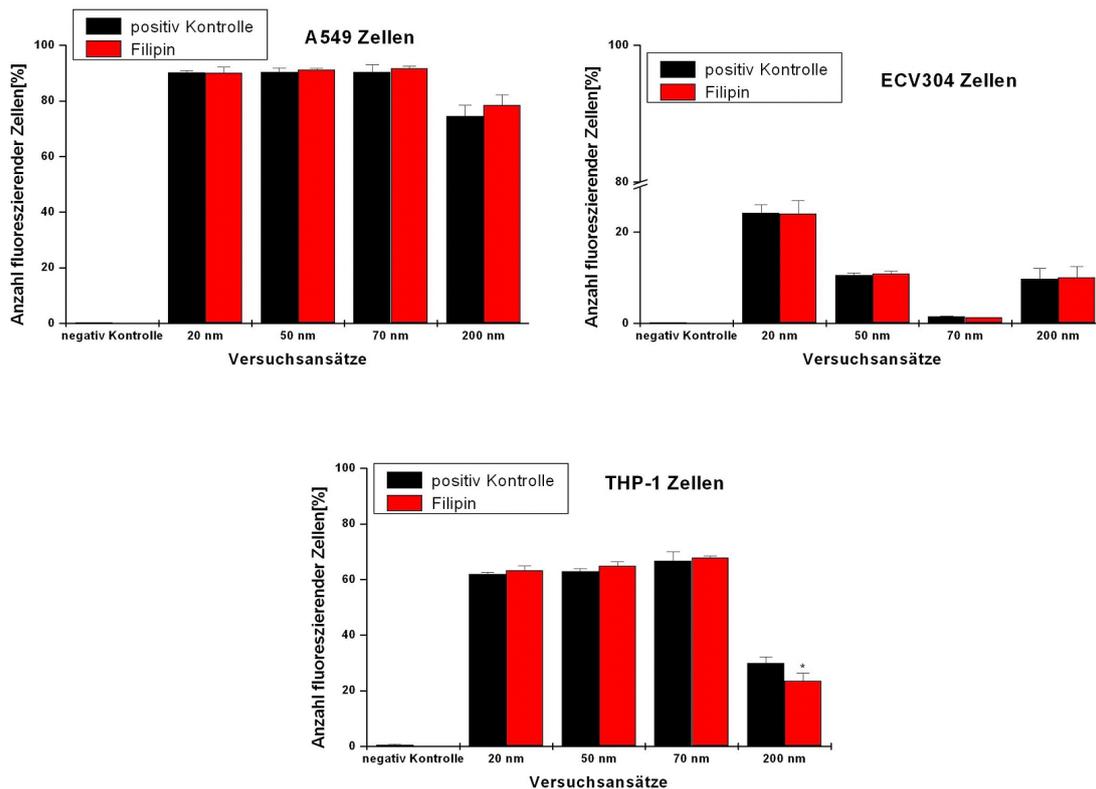


Abbildung 38: Aufnahmeinhibition durch Filipin 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in A549, ECV304 und THP-1 Zellen. 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel, 3h Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Versuche (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit der Positivkontrolle)

Abbildung 38 zeigt, dass in keiner der untersuchten Zelllinien eine Hemmung in der Aufnahme der Silica Nanopartikel gefunden werden konnte.

In Tabelle 39 sind zusammenfassend die Ergebnisse der Studien zur Aufnahmeinhibition der vier verschiedenen Silica Nanopartikel (20, 50, 70 und 200 nm) dargestellt. Gezeigt sind sowohl die Ergebnisse der einzelnen Rezeptoren der Phagozytose vermittelten Endozytose, als auch die, der Clathrin und Caveolae vermittelten Endozytose, für die verwendeten Zelllinien A549, ECV304 und THP-1:

Zelllinie	Silica Partikel	Clathrin	Caveolae	Scavenger	Komplement	Mannose	Fc γ
A549	20 nm	✓	-	✓	✓	-	-
	50 nm	✓	-	✓	✓	-	-
	70 nm	✓	-	✓	✓	-	-
	200 nm	✓	-	✓	-	-	-
ECV 304	20 nm	✓	-	✓	✓	-	-
	50 nm	✓	-	✓	✓	-	-
	70 nm	-	-	-	✓	-	-
	200 nm	-	-	-	✓	-	-
THP-1	20 nm	✓	-	✓	✓	-	✓
	50 nm	✓	-	✓	✓	-	✓
	70 nm	✓	-	-	✓	-	✓
	200 nm	✓	-	-	-	-	✓

Abbildung 39: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Studien zur Inhibition der Aufnahme mit Hilfe der Fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS). Grüner Haken: Inhibition der Aufnahme war möglich, roter Strich: keine Inhibition

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mannose-Rezeptor und die Caveolae vermittelte Endozytose nicht an der Aufnahme der Nanopartikel in die getesteten Zelllinien, A549, ECV304 und THP-1, beteiligt sind. Der Aufnahmeweg über die Fc γ Rezeptoren kommt nur in den THP-1 Zellen zum Einsatz, dieser allerdings für alle Partikelgrößen. Komplement-Rezeptoren werden in allen drei Zelllinien für die Aufnahme der Silica Nanopartikel verwendet. In A549 und THP-1 Zellen werden nur die 200 nm Partikel nicht über diesen Weg in die Zellen internalisiert. Im Gegensatz dazu werden alle Partikeltypen über die Scavenger-Rezeptoren in die A549 Zellen aufgenommen. In den ECV304 und THP-1 Zellen allerdings werden nur die 20 und 50 nm Partikel über diesen Weg in die Zellen aufgenommen. Eine Partikelinternalisierung über die Clathrin vermittelte Endozytose konnte in A549 und THP-1 Zellen für alle Partikeltypen gezeigt werden, wobei hier die 200 nm

Partikel über diesen Weg am stärksten aufgenommen werden. In den ECV304 Zellen erfolgte nur für die 20 und 50 nm Partikel die Aufnahme in die Zelle über *Clathrin coated pits*.

6.5 Nachweis, an der Aufnahme von Silica Nanopartikeln beteiligter Proteine *via* RT-PCR

Zum Nachweis bestimmter Proteine und Rezeptoren bereits auf der RNA-Ebene, wurde die Methodik der Reversen Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) gewählt. Hierbei wird das Vorhandensein der Gene, die für bestimmten Proteine codieren, qualitativ nachgewiesen. Gezeigt werden sollte hier nicht nur die Anwesenheit gesuchter DNA-Fragmente in unbehandelten Kontrollzellen, sondern auch in, mit Silica Partikeln für 4h und 24h in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (10,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) behandelten, Ansätzen, um einen eventuellen Unterschied in der Expression durch die Partikelexposition feststellen zu können. 50C stehen hier für Silica Partikel der Größe 50 nm die mit Carboxylgruppen auf der Oberfläche funktionalisiert wurden.

Leider konnten nicht alle Rezeptoren untersucht werden, da in Ermangelung des genetischen Codes für manche Rezeptoren in humanen Zellen, nicht für alle Primer designed werden konnten.

Getestet wurde auf die Anwesenheit folgender Proteine:

Tabelle 34: Mit Hilfe der RT-PCR untersuchte Proteine

Aufnahmeweg	Protein
<i>Clathrin coated pits</i> vermittelte Endozytose	Clathrin
Caveolin vermittelte Endozytose	Caveolin I
Fc γ vermittelte Phagozytose	Fc γ RI (CD64) Fc γ RII (CD32) Fc γ RIII (CD16)
Scavenger Rezeptor vermittelte Phagozytose	ScR-AI MARCO ScR-B (CD36)

6.5.1 Nachweis der Phagozytose Rezeptoren auf RNA Ebene

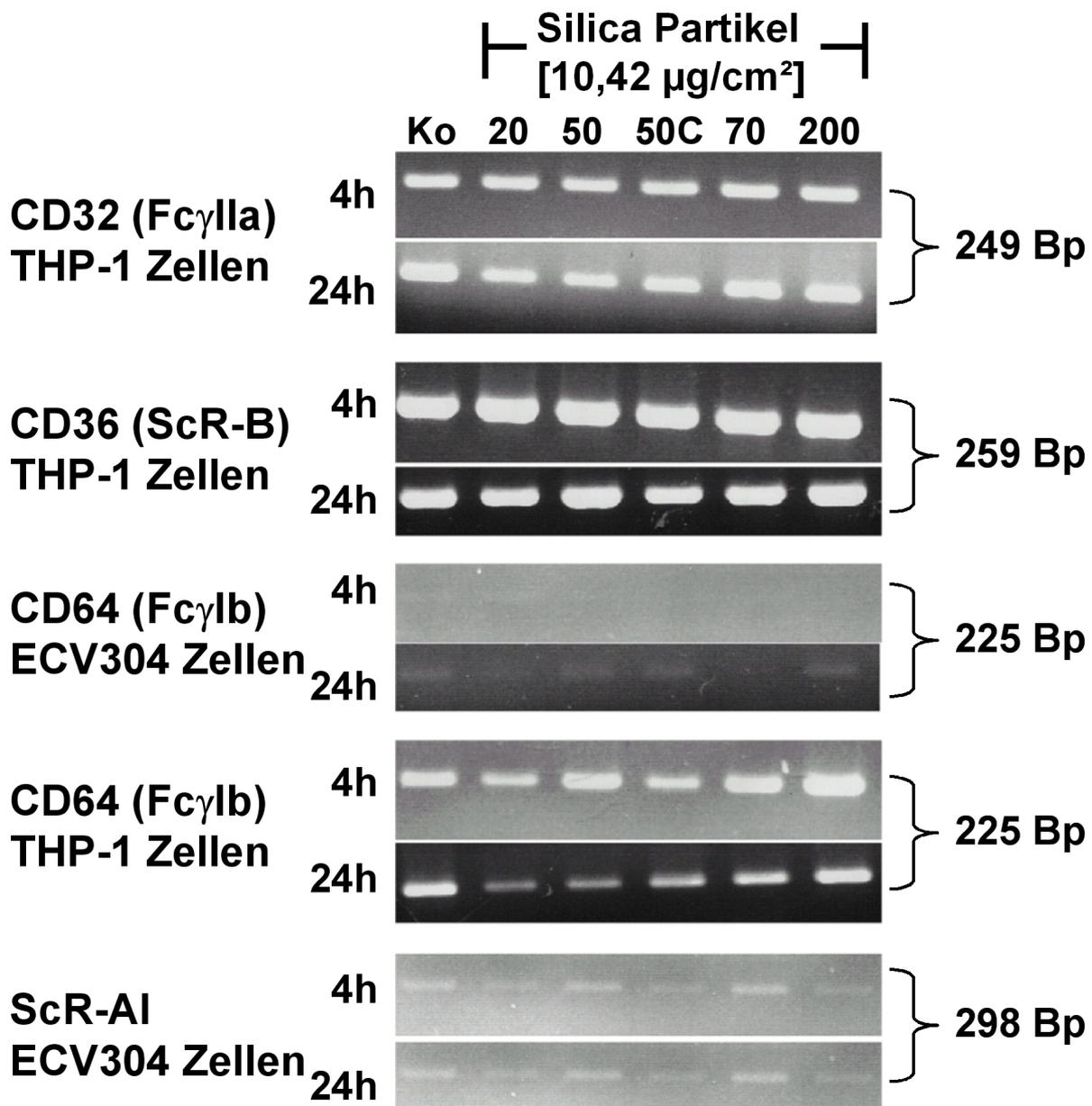


Abbildung 40: Rezeptornachweis auf RNA Ebene nach 4h und 24h Inkubation mit 10,42 µg/cm² (100 µg/ml) Silica Partikeln. Rechts dargestellt ist die Größe des PCR-Produktes in Basenpaaren (Bp). Gezeigt sind repräsentative DNA Bilder der gefundenen Rezeptoren, dreier, unabhängiger Versuche.

Abbildung 40 zeigt die nachweisbaren Rezeptoren der Phagozytose in den jeweiligen Zelllinien. In A549 Zellen konnte keiner der gesuchten Rezeptoren detektiert werden. In ECV304 Zellen wurden als Vertreter der Scavenger Rezeptoren der ScR-AI und als Vertreter der Fc γ Rezeptoren der CD64 gefunden. In den THP-1 Zellen konnten als Vertreter der Scavenger Rezeptoren der CD36 und zwei Fc γ Rezeptoren, CD64

und CD32, nachgewiesen werden.

6.5.2 Nachweis Clathrin und Caveolin I auf RNA Ebene

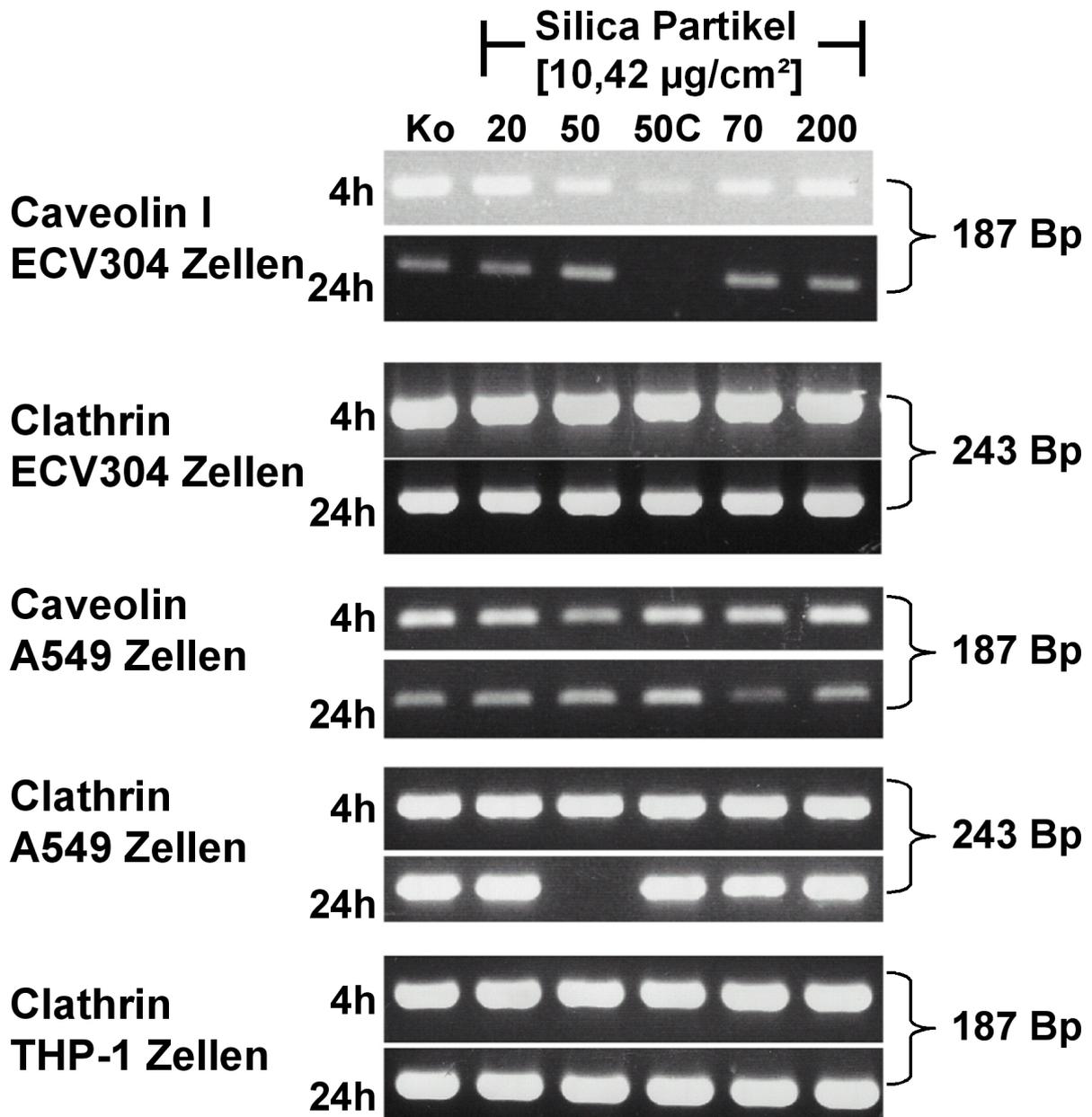


Abbildung 41: Nachweis von Clathrin und Caveolin I auf RNA Ebene nach 4h und 24h Inkubation mit $10,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln. Rechts dargestellt ist die Größe des PCR-Produktes in Basenpaaren (Bp). Gezeigt sind repräsentative DNA Bilder der gefundenen Proteine, dreier, unabhängiger Versuche.

Abbildung 41 zeigt den Nachweis der Proteine Clathrin und Caveolin I in A549, ECV304 und THP-1 Zellen. Beide Proteine waren in A549 und ECV304 Zellen nachweisbar. In THP-1 Zellen allerdings konnte nur Cla-

thrin detektiert werden.

6.6 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Silica Nanopartikel

Um zu untersuchen, ob die verwendeten Silica Nanopartikel in die Zellen eindringen, oder nur an der Oberfläche haften, erfolgten zunächst Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 630x Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv. Hierzu wurden A549 und ECV304 Zellen mit den Partikeln inkubiert und fixiert. Zur besseren Orientierung erfolgte zusätzlich eine Gegenfärbung der Zellkerne in blau mit dem zellpermeablen Farbstoff Bisbenzimid, der mit der zellulären DNA interkaliert, und der Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts in rot mit Rhodamin Phalloidin.

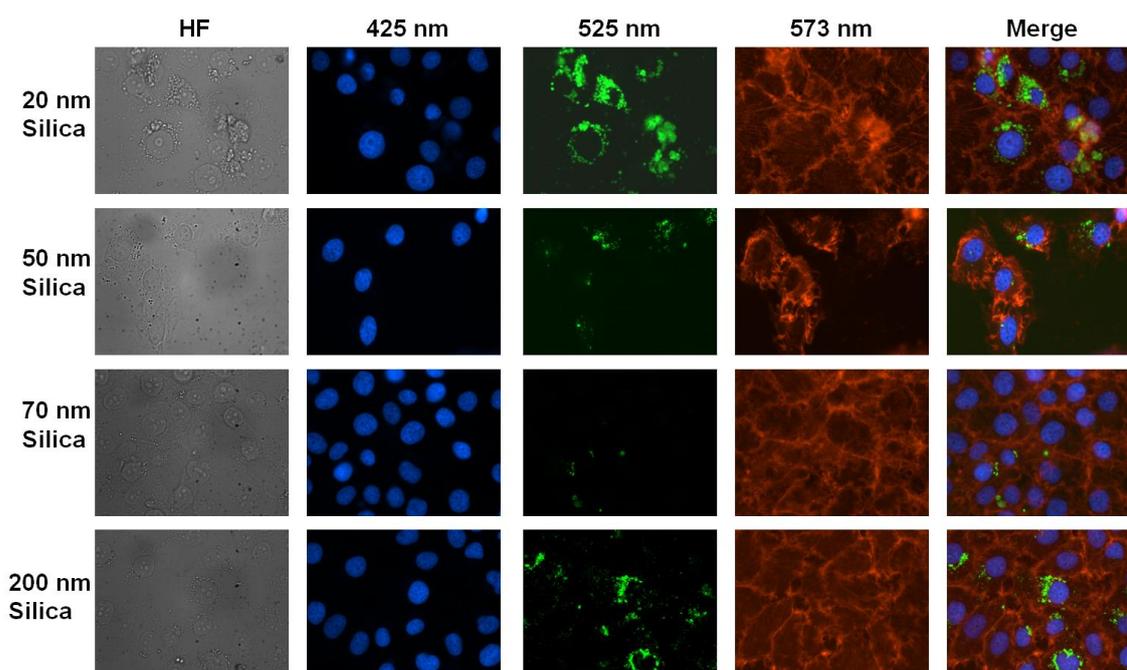


Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopie von Silica Nanopartikeln in ECV304 Zellen. Die Zellen wurden 48h mit $58,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert und anschließend für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen. Silica Partikel erscheinen grün, Zellkerne wurden mit Bisbenzimid blau, und das Zytoskelett mit Rhodamin Phalloidin rot angefärbt. Vergrößerung: 630x, Ölimmersionsobjektiv, HF = Hellfeld.

Beispielhaft gezeigt werden hier repräsentative Fluoreszenzbilder nach einer 48h Inkubation mit $58,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln. Für jedes Bild wurde auf die Mitte der Zellkerne fokussiert um Partikel in der Zelle scharf darzustellen und von auf der Außenseite der Zellen haf-

teten Partikeln unterscheiden zu können. Desweiteren sollte eine mögliche Kernlokalisierung so zu erkennen sein.

Abbildung 42 zeigt, dass alle Partikelgrößen in ECV304 Zellen zu finden waren. Sie lagerten sich nach 48h Inkubation verstärkt um den Zellkern herum in vesikulären Strukturen an, die sich teilweise im Golgi Apparat zu befinden scheinen, penetrierten aber nicht in den Kern. Die stärkste Aufnahme fand sich für die 20 und 200 nm großen Partikel.

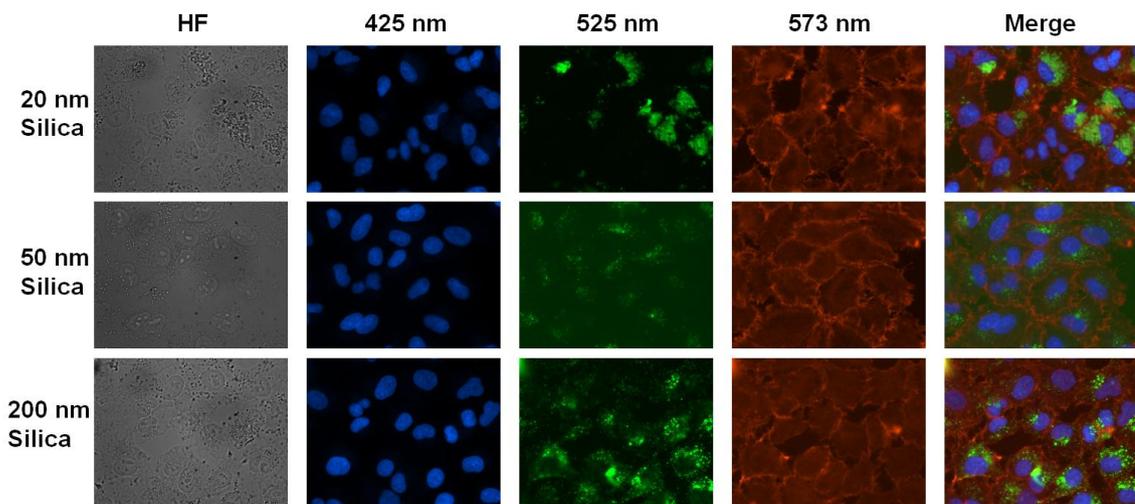


Abbildung 43: Fluoreszenzmikroskopie von Silica Nanopartikeln in A549 Zellen. Die Zellen wurden 48h mit $58,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert und anschließend für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen. Silica Partikel erscheinen grün, Zellkerne wurden mit Bsbenzimid blau, und das Zytoskelett mit Rhodamin Phalloidin rot angefärbt. Vergrößerung: 630x, Ölimersionsobjektiv, HF = Hellfeld.

Aus Abbildung 43 ist ersichtlich, dass mit denen der ECV304 Zellen vergleichbare Ergebnisse nach 48h Inkubation für die A549 Zellen gefunden wurden. Allerdings scheint die Aufnahme aller Partikelgrößen generell hier etwas höher zu sein, was sich mit den Daten aus der FACS Analyse zur Konzentrations- und Zeitabhängigkeit deckt. Auch hier fanden sich alle Partikeltypen in den Zellen in vesikulären Strukturen wieder, überall im Zytoplasma, aber besonders konzentriert in der Nähe der Zellkerne. Keine Partikel penetrierten den Kern. Die höchste Aufnahme findet sich auch hier für die 20 und 200 nm Partikel, vergleichbar mit den Ergebnissen der ECV304 Zellen. Der Golgi Apparat scheint auch hier als Zielstruktur für Partikel gefüllte Vesikel zu dienen.

Generell ist zu bemerken, dass, obwohl die Inkubationszeit beiden Zelllinien für zwei Zellteilungen reichte, in denen die Kernmembran ab und

wieder aufgebaut wird, keine Partikel in den Zellkernen zu finden waren.

6.7 Transmissionselektronenmikroskopischer Nachweis und Lokalisation der Silica Nanopartikel

Um die Silica Nanopartikel in den Zellen definitiv lokalisieren und Zielstrukturen der Partikel eindeutiger identifizieren zu können, wurde außerdem die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt. Gezeigt sind A549 Zellen die 48h mit $20,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln inkubiert und anschließend für die TEM Analyse vorbereitet und präpariert wurden.

In den folgenden Abbildungen (44, 45, 46, 47) sind repräsentative A549 Zellen gezeigt, mit verschiedene Vergrößerungen, die durch schwarze Rahmen hervorgehoben wurden. Die Silica Nanopartikel wurden mit roten Pfeilen markiert. Es ist erkennbar, dass alle Partikelgrößen von A549 Zellen aufgenommen wurden. In keinem Fall penetrierten Partikel den Zellkern oder Mitochondrien. Erkennbar ist außerdem, dass die Partikel, unabhängig von ihrer Größe, in Vesikel ähnlichen Strukturen, umgeben von einer dünnen Membran, vorliegen. Die selben Ergebnisse fanden sich für ECV304 Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine Konzentrationsabhängigkeit in der Aufnahme konnte ebenfalls gezeigt werden, da außer der hohen Konzentration, auch eine sehr niedrige Konzentration, $0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$), über den genannten Zeitraum getestet wurde. Eine Zeitabhängigkeit im Aufnahmeverhalten zeigte sich ebenfalls, da die Aufnahme nicht nur für 48h, sondern auch für 24h untersucht wurde. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die mit Hilfe des FACS gefunden wurden.

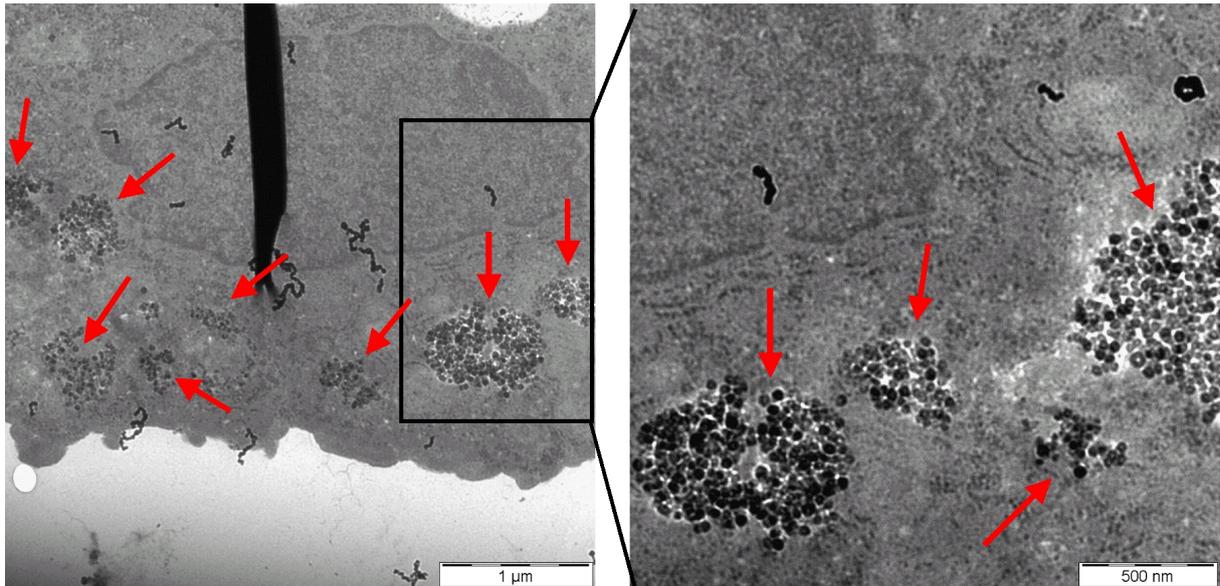


Abbildung 44: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 20 nm Partikeln in A549 Zellen. Die Zellen wurden 48h mit $20,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert und anschließend für die TEM vorbereitet. Dargestellt sind repräsentative TEM-Aufnahmen. Die roten Pfeile markieren die mikroskopisch detektierten Silica Partikel.

In Abbildung 44 erkennt man die 20 nm Silica Partikel als große Agglomerate im Zytoplasma. Keine Partikel finden sich im Zellkern oder in anderen Organellen. Gut erkennbar ist außerdem das raue Endoplasmatische Retikulum mit Ribosomen.

In Abbildung 45 erkennt man die 50 nm Silica Partikel ebenfalls als große Agglomerate im Zytoplasma. Gezeigt sind drei verschiedene Zellen (A, B, C) mit jeweils einer Vergrößerung. Mit gelben Pfeilen wurden Mitochondrien markiert. In diesen Organellen finden sich keine Partikel und auch in den Zellkernen sind keine Partikel erkennbar. Der lila Pfeil markiert eine charakteristische Struktur einen Lamellar Körper. In solchen Strukturen, zusätzlich zu vesikulären Strukturen, fanden sich oftmals die Partikel. Deutlich erkennbar ist in Abbildung B auch das raue Endoplasmatische Retikulum um das Mitochondrium lokalisiert, an das sich ebenfalls keine Partikel angelagert haben. Außerdem erkennt man in Abbildung C sehr gut die dünne Membran um das Partikelagglomerat.

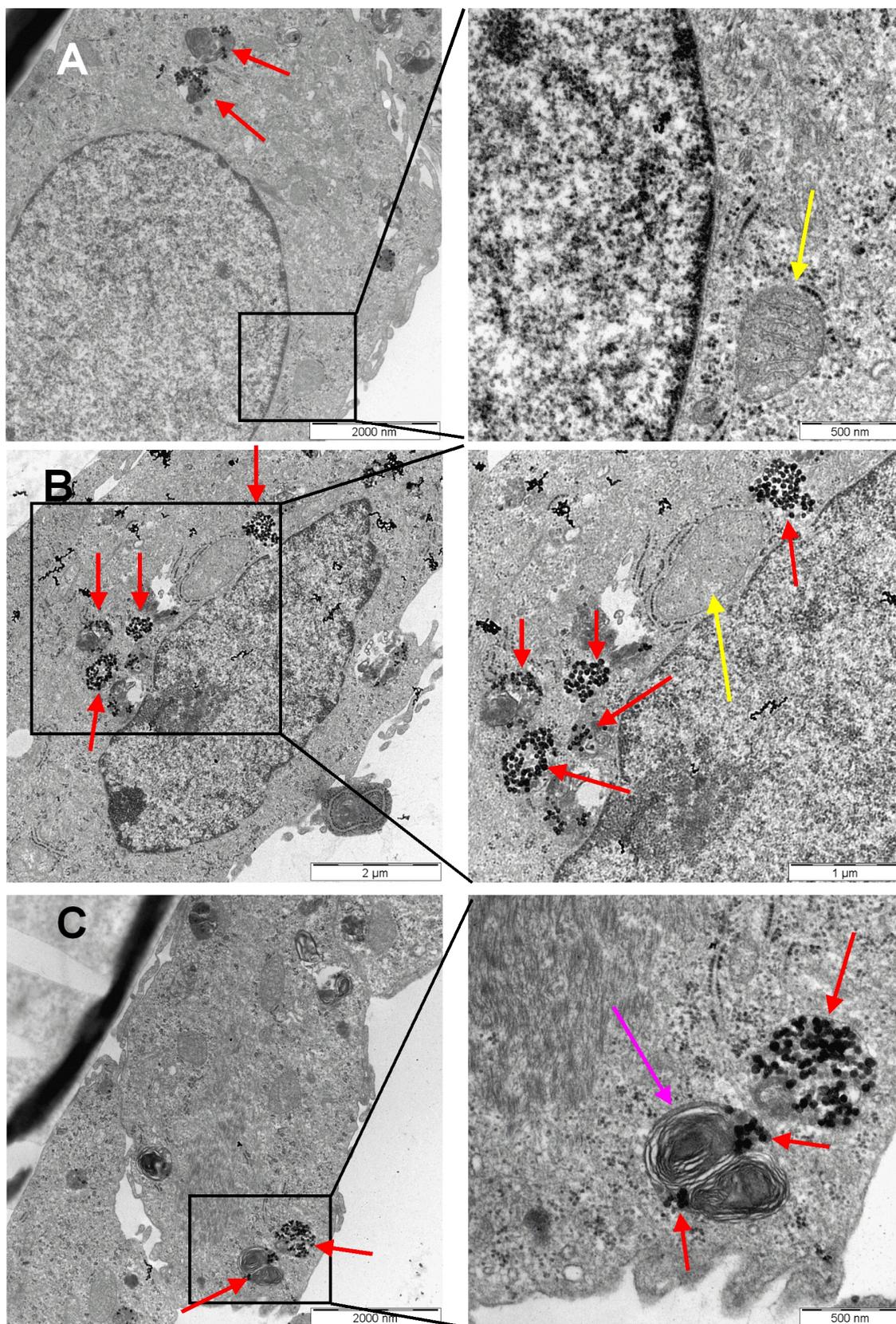


Abbildung 45: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 nm Partikeln in A549 Zellen. Die Zellen wurden 48h mit $20,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert und anschließend für die TEM vorbereitet. Dargestellt sind repräsentative TEM-Aufnahmen von drei verschiedenen Zellen (A, B, C). Die roten Pfeile markieren die mikroskopisch detektierten Silica Partikel, die gelben Pfeile Mitochondrien und der lila Pfeil einen Lamellar Körper.

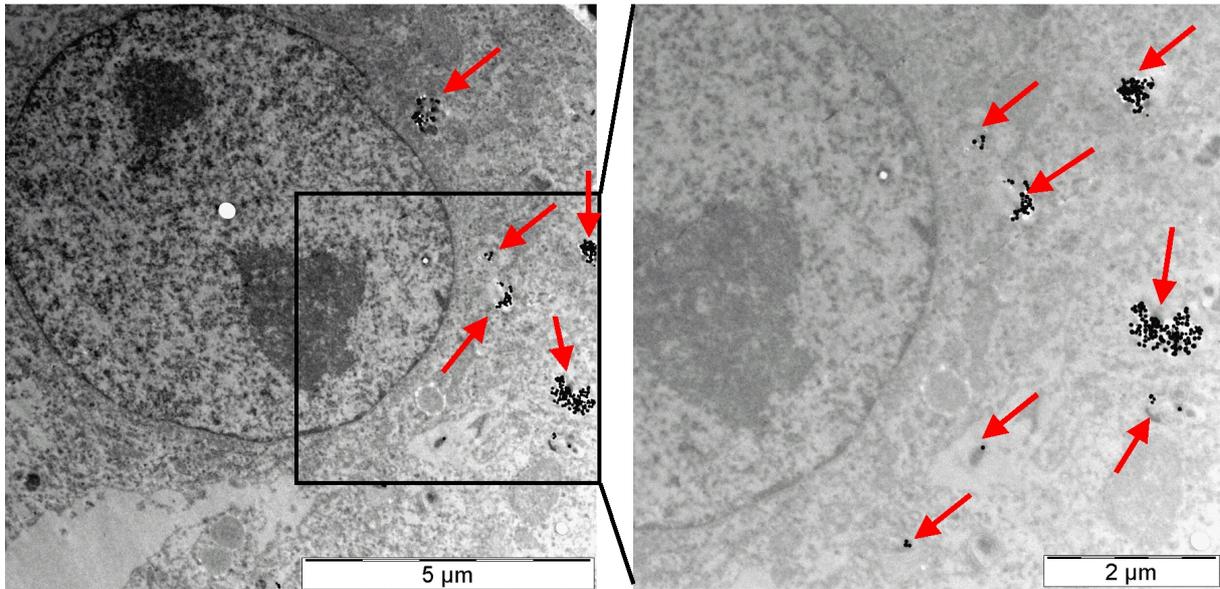


Abbildung 46: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 70 nm Partikeln in A549 Zellen. Die Zellen wurden 48h mit $20,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert und anschließend für die TEM vorbereitet. Dargestellt sind repräsentative TEM-Aufnahmen. Die roten Pfeile markieren die mikroskopisch detektierten Silica Partikel.

In Abbildung 46 erkennt man die 70 nm Silica Partikel teilweise vereinzelt, teilweise als Agglomerate im Zytoplasma. Auch hier finden sich im Zellkern keinerlei Partikel.

In Abbildung 47 erkennt man die 200 nm Silica Partikel im Zytoplasma der Zelle, teilweise in vesikulären Strukturen. Im Gegensatz zu den anderen Partikelgrößen, bilden diese Partikel keine großen Agglomerate, sondern liegen meist vereinzelt vor. Weder im Zellkern, noch mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert, sind Partikel zu finden. Aufgrund der Härte der Partikel und des Wassergehalts in diesen größten, verwendeten Partikeln, der auch durch die Ethanol-trocknung nicht entfernt werden konnte, kam es zu Rissen im Epoxidharz beim Schneiden mit dem Ultramikotom, die sich hier als weiße Flecken manifestieren.

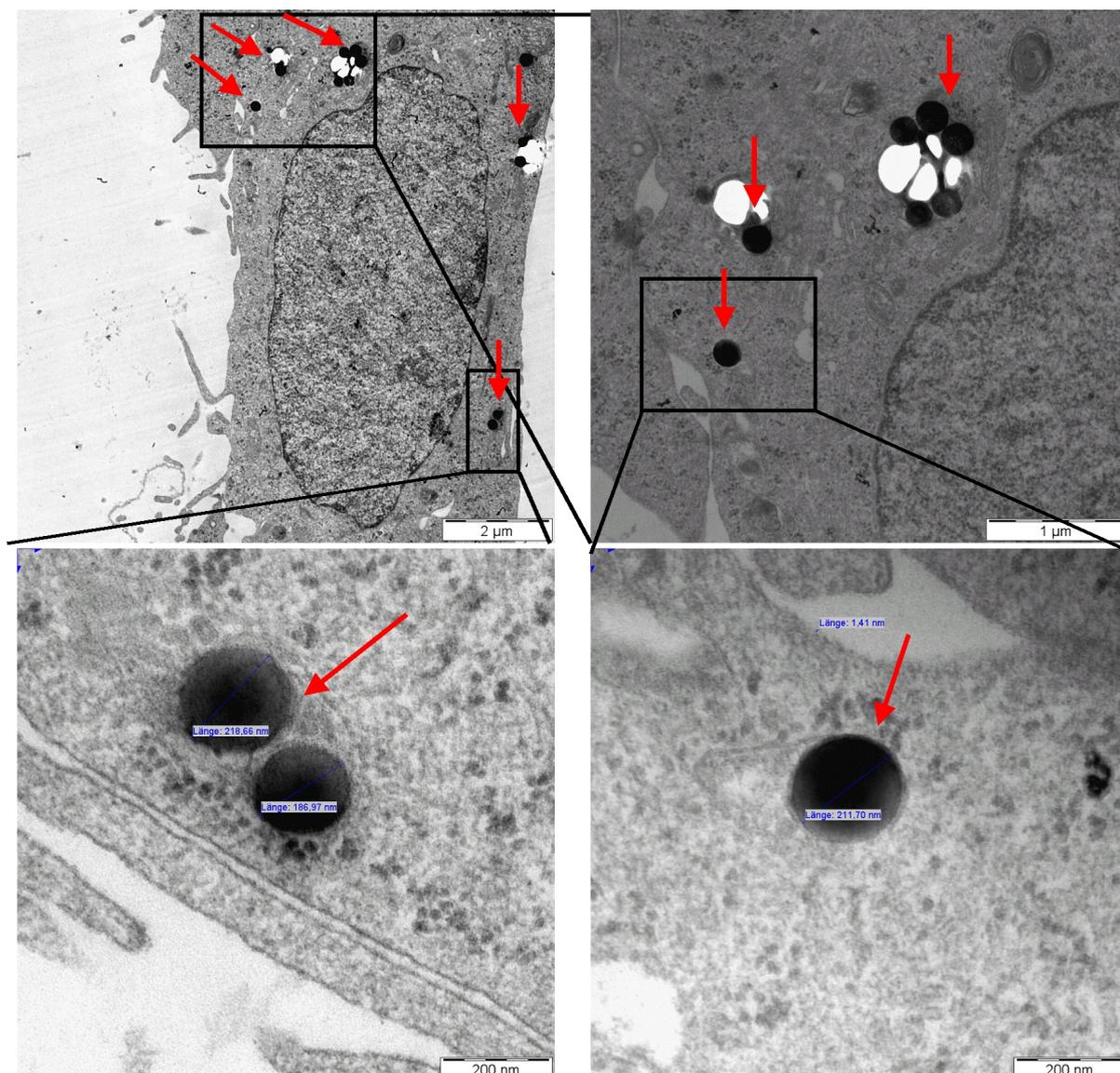


Abbildung 47: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 200 nm Partikeln in A549 Zellen. Die Zellen wurden 48h mit $20,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert und anschließend für die TEM vorbereitet. Dargestellt sind repräsentative TEM-Aufnahmen. Die roten Pfeile markieren die mikroskopisch detektierten Silica Partikel.

6.8 Untersuchungen zur Degradation des nukleären Enzyms Topoisomerase I

Nach Hinweisen aus der Literatur (Chen & von Mikecz, 2005) wurde als Beispiel für die Auswirkung von Silica Nanopartikeln auf nukleäre Enzyme, nach einer vermuteten Penetration der Partikel in den Zellkern, die Topoisomerase I ausgewählt.

Untersucht wurde der Gehalt und eine mögliche Degradation des Enzyms mit Hilfe des Western Blot Verfahrens. Zusätzlich wurden mit

Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie Immunfluoreszenzbilder erstellt, in denen die Topoisomerase I mit einem spezifischen Antikörper primär markiert wurde und anschließend mit dem passenden sekundären Antikörper detektiert werden konnte, da dieser mit einem roten Fluorophor gekoppelt war. Hier sollte sich eine Degradation als Bildung größerer klusterähnliche Gebilde im Zellkern manifestieren.

6.8.1 Messung des Topoisomerase I Gehalts mittels Western Blot

Die Messung des Topoisomerase I Gehalts in A549 und ECV304 Zellen erfolgte mit Hilfe des Western Blot Verfahrens nach einer 4h Inkubation mit $10,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikeln, bzw. Fluoreszein-isothiozyanat (FITC, $10 \mu\text{M}$). Als Positivkontrolle für eine mögliche Degradation des Proteins diente die Inkubation mit dem Antitumor Wirkstoff Camptothecin (Cpt, $10 \mu\text{M}$), der Topoisomerase Kluster induzieren kann (Chen & von Mikecz, 2005). Die Zellen wurden nach der Behandlung geerntet und lysiert. Es folgte eine elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-PAGE und anschließender Detektion mit spezifischen Antikörpern im Western Blot. Zur Kontrolle, ob in jeder Spur identische Mengen des Zelllysates aufgetragen worden waren, wurde die Membran mit Aktin Antikörpern als Ladekontrolle untersucht.

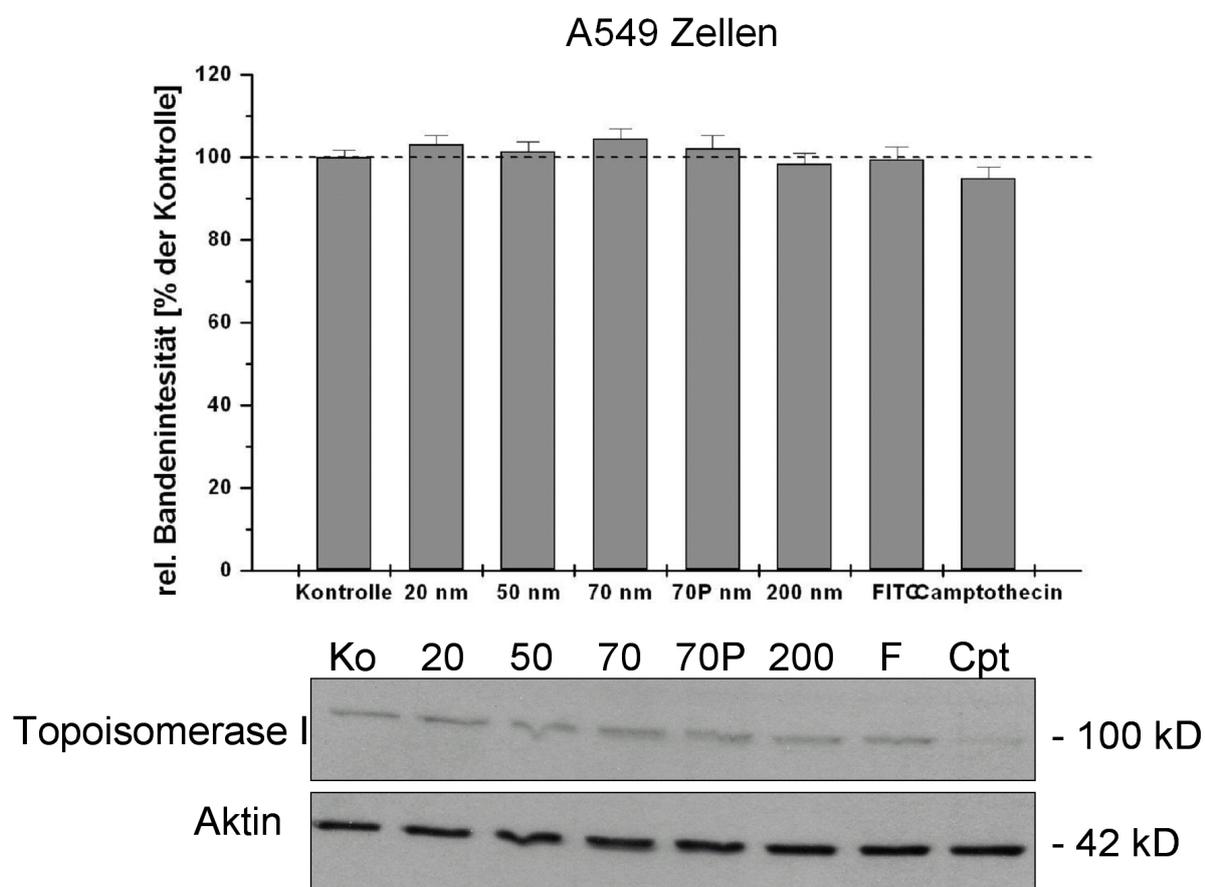


Abbildung 48: Topoisomerase I Gehalt in A549 Zellen nach 4h Inkubation mit $10,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel, 4h Inkubation. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot dreier, unabhängiger Versuche, sowie im Diagramm die Mittelwerte \pm SEM im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. F = FITC, Cpt = Camptothecin

In Abbildung 48 erkennt man, qualitativ im Western Blot, für alle Partikelgrößen und die Farbstoffkontrolle FITC in A549 Zellen keinen Rückgang im Gehalt an Topoisomerase I im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Für die Positivkontrolle Camptothecin zeigt sich ein leichter Rückgang im Signal. Diese Beobachtung bestätigte sich nach Auswertung der Bandenintensität mit der Software GelScan Pro Version 4 (BioSciTec Science Group, Marburg) auch quantitativ.

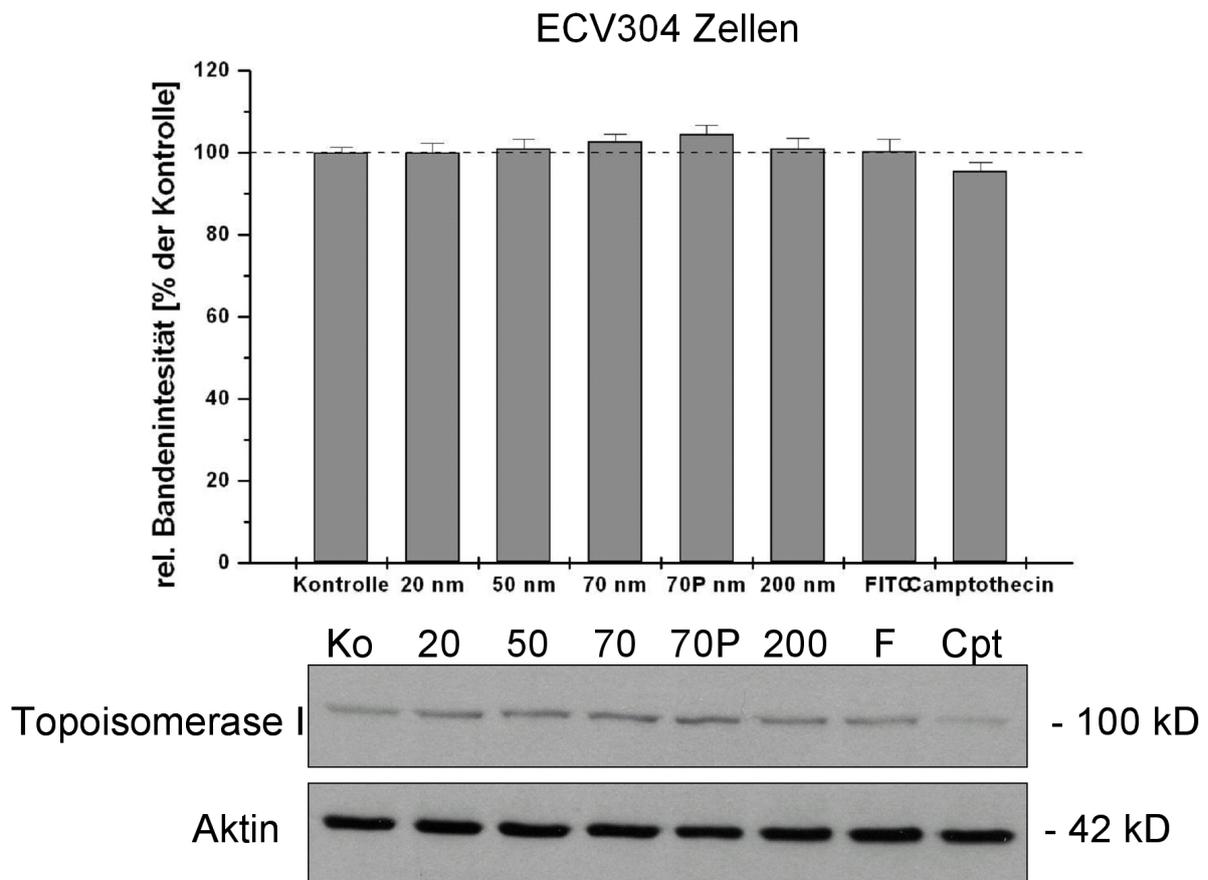


Abbildung 49: Topoisomerase I Gehalt in ECV304 Zellen nach 4h Inkubation mit $10,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel, 4h Inkubation. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot dreier, unabhängiger Versuche, sowie im Diagramm die Mittelwerte \pm SEM im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. F = FITC, Cpt = Camptothecin

In Abbildung 49 findet sich für die ECV304 Zellen das gleiche Ergebnis. Qualitativ im Western Blot, für alle Partikelgrößen und die Farbstoffkontrolle FITC ist ebenfalls kein Rückgang im Gehalt an Topoisomerase I, im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, zu messen. Für die Positivkontrolle Camptothecin zeigt sich auch hier ein leichter Rückgang im Signal. Diese Beobachtung bestätigte sich auch hier nach Auswertung der Bandenintensität quantitativ.

6.8.2 Topoisomerase I Detektion mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

A549 Zellen wurden zunächst entsprechend der Vorgehensweise von Chen & von Mikecz (2005) für 4h mit $14,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Nanopartikeln (grün) inkubiert. Nach anschließender Fixierung und

Präparation der Zellen, erfolgte die Detektion der Topoisomerase I (rot) mittels Antikörperkopplung und die Gegenfärbung der Zellkerne mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33342). Nun wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt sind die Fluoreszenzen in allen drei Kanälen, das korrespondierende Hellfeldbild (HF) und eine Übereinanderlegung der Bilder (Merge).

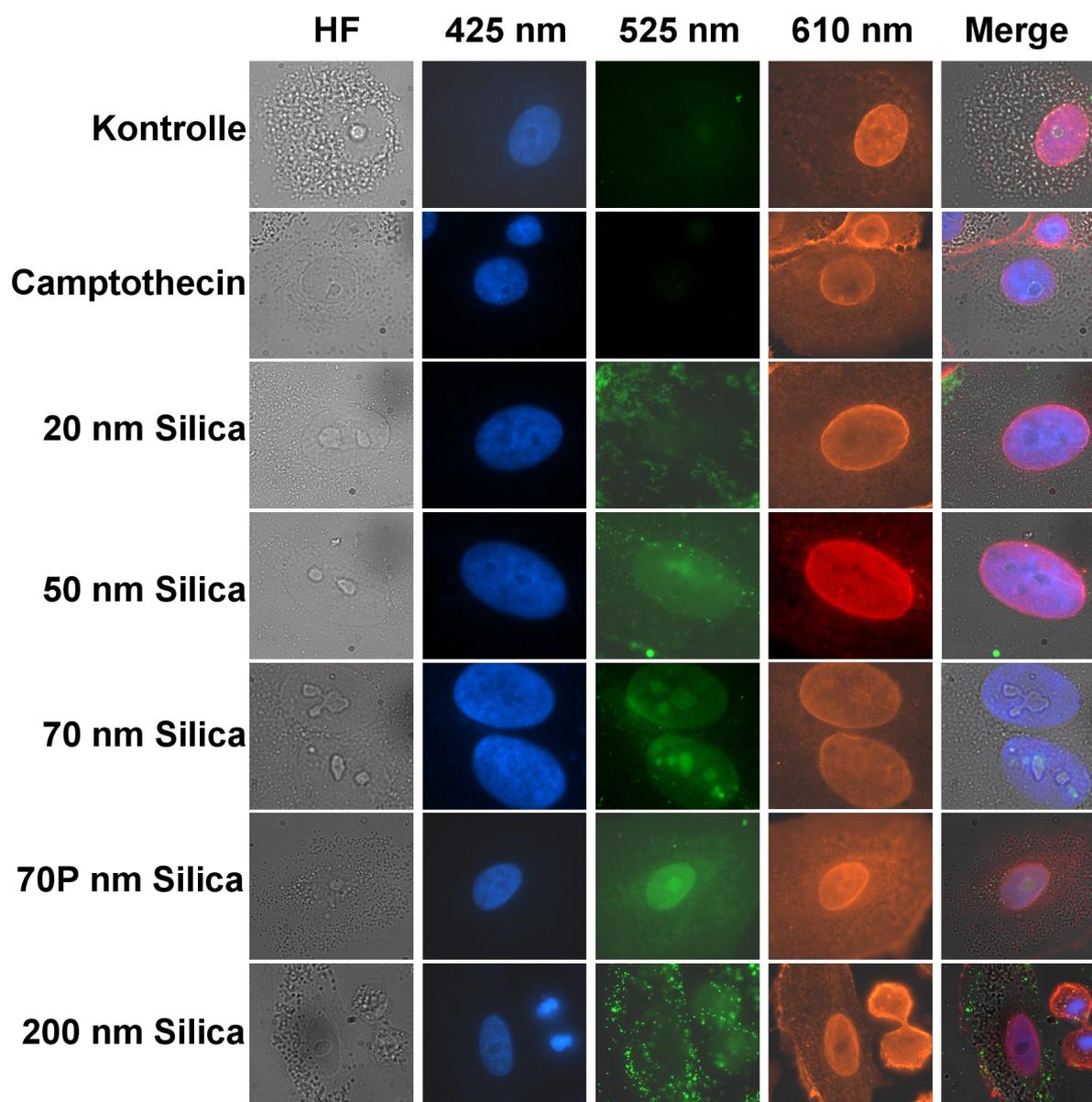


Abbildung 50: Topoisomerase I Färbung von A549 Zellen. Die Zellen wurden 4h mit $14,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel inkubiert. Topoisomerase I wurde mit spezifischen Antikörpern rot markiert. Die Silica Partikel fluoreszieren grün. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid blau angefärbt. Die gezeigten Bilder stellen repräsentative Ergebnisse der gewonnenen Bildsätze dar. Vergrößerung: 630x, Ölimmersionsobjektiv, HF = Hellfeld

In Abbildung 50 sind Ausschnitte von Fluoreszenzbildern dargestellt,

die auf den Kernbereich fokussiert wurden. Man erkennt, im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, keine verstärkte Bildung von Topoisomerase I Kluster in den Zellkernen. In der Camptothecin Positivkontrolle ist ein größerer Cluster erkennbar. Für die 200 nm Partikel zeigt sich eindeutig, dass diese nicht im Zellkern lokalisiert sind. Für die anderen Partikelgrößen ist dies nicht einwandfrei zu sagen, da sich herausstellte, dass der Farbstoff der Kernfärbung (Bisbenzimid) auch stark im grünen Kanal Licht emittiert, sowohl direkt am Mikroskop sichtbar, als auch mit Hilfe der Digitalkamera auf dem PC, und so zu falsch positiven Ergebnissen in Bezug auf die Kernlokalisierung der Silica Partikel führt.

Aus diesem Grunde erfolgte eine erneute Exposition der A549 Zellen mit Silica Nanopartikeln. Diesmal wurde eine längere Inkubationszeit (24h) mit einer höheren Konzentration gewählt, $58,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$), um eventuelle Effekte der Partikel auf die Topoisomerase I eindeutig erkennen zu können. Außerdem wurde in diesem Fall darauf verzichtet, die Zellkerne mit Bisbenzimid gegenzufärben, um falsch positive Ergebnisse für die mögliche Kernlokalisierung der Partikel zu vermeiden.

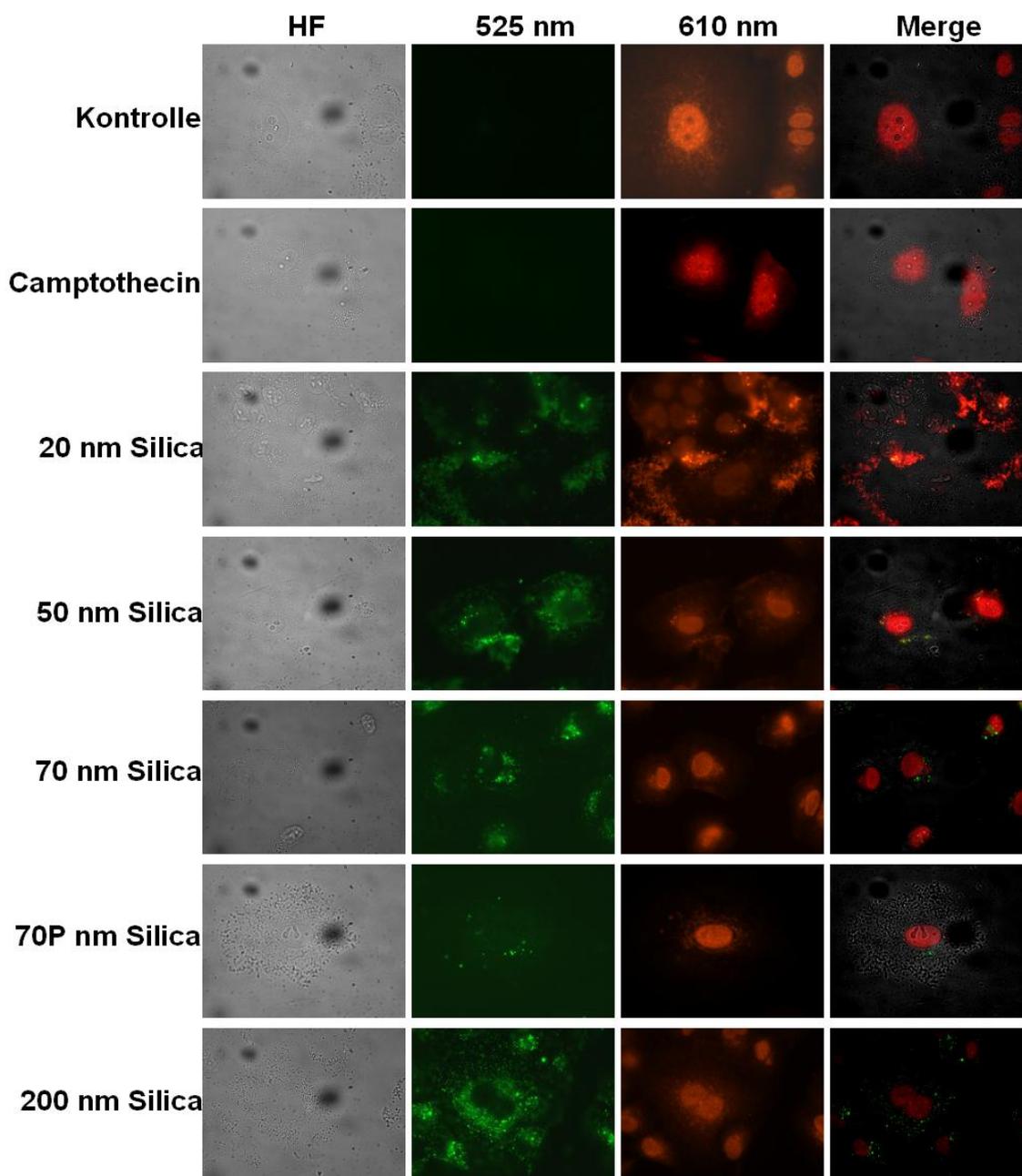


Abbildung 51: Topoisomerase I Färbung von A549 Zellen. Die Zellen wurden 24h mit $58,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) Silica Partikel inkubiert. Topoisomerase I wurde mit spezifischen Antikörpern rot markiert. Die Silica Partikel fluoreszieren grün. Die gezeigten Bilder stellen repräsentative Ergebnisse der gewonnenen Bildsätze dar. Vergrößerung: 630x, Ölimmersionsobjektiv, HF = Hellfeld

In Abbildung 51 sieht man nun eindeutig für alle Partikelgrößen, dass keine Partikel im Zellkern lokalisiert sind, sondern sich bevorzugt in der Nähe der Kerne befinden. Besonders gut erkennbar ist dies für die 200, 70 und 50 nm Partikel. Für die 20 nm Partikel zeigte sich dies auch, allerdings ist hier zu bemerken, dass die Färbung der Topoisomeras I nicht so

stark war, da sich der Antikörper hier bevorzugt an die Partikel band. So sich die Kerne nicht so gut erkennbar. Desweiteren ist auch in diesem Versuch keine verstärkte Klusterbildung der Topoisomerase I im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, zu erkennen. In einer höheren Vergrößerung zeigte sich dies auch für die 20 nm Partikel. Im Gegenteil waren sogar in der unbehandelten Kontrolle klusterähnliche Strukturen im Kern zu finden, und somit ist dies nicht unbedingt ein Zeichen für die Auswirkungen kernlokalisierter Silica Nanopartikel auf nucleäre Enzyme, wie von Chen & von Mikecz (2005) behauptet.

6.9 Toxizität und Aufnahmeverhalten trojanischer Peptoide

Die Aufnahme in die Zellen ist nicht nur unter toxikologischem Aspekt von Interesse, auch aus medizinischen Gründen ist eine zielgerichtete Aufnahme wünschenswert, wenn damit Partikelsysteme in die Zelle gelangen, die einen gewünschten Effekt ausüben. Dazu wurden gemeinsam mit Dr. Tina Schröder Versuche durchgeführt, in denen sogenannte trojanische Peptoide eingesetzt wurden, die diese im Rahmen ihrer Doktorarbeit synthetisiert hatte. Diese möglichen Transporter wurden in Bezug auf ihre Toxizität, Aufnahmeeffektivität und Fähigkeit bestimmte Zielstrukturen in der Zelle anzusteuern, hin untersucht.

Zur Bestimmung der Aufnahmerate wurden die Guanidinyl-Peptoide 11 und 12 im Vergleich mit einem Amino-Peptoid 10 via FACS-Analyse an A549 Zellen untersucht. Die Verwendung der Lungenepithelzelllinie A549 wurde gewählt, um so feststellen zu können, ob eine Aufnahme der Transporter als Aerosol möglich sein könnte.

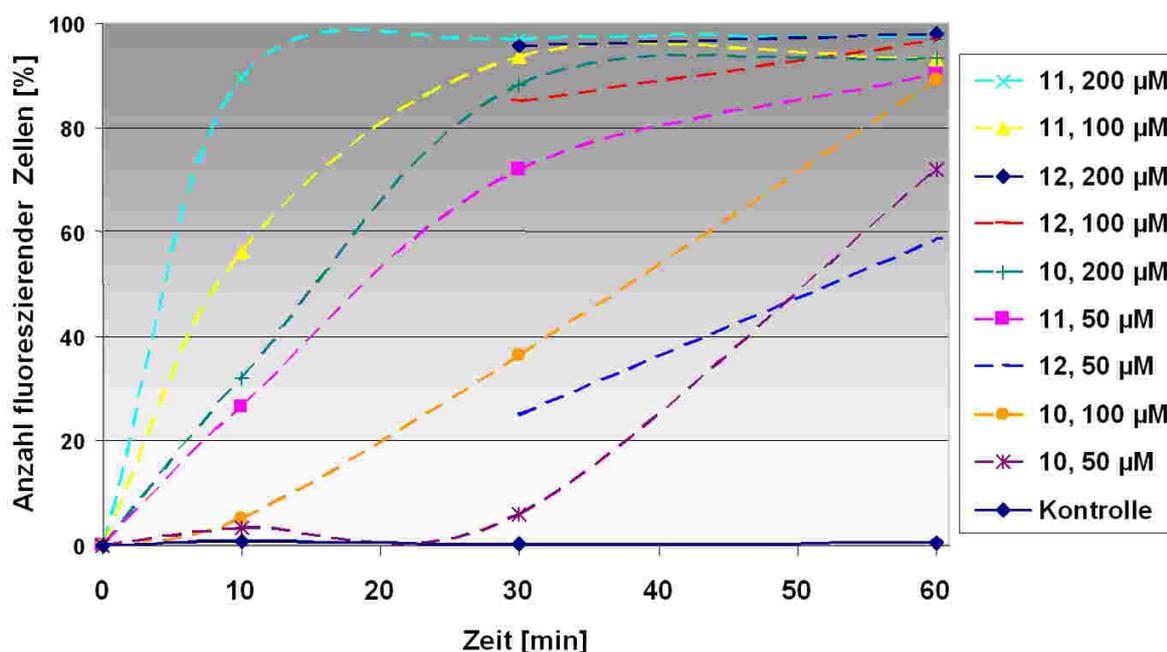


Abbildung 52: FACS-Analyse der zellulären Aufnahme der Transporter 10, 11 und 12 in A549 Zellen. Gezeigt sind je drei verschiedene Konzentrationen und drei verschiedene Zeitpunkte. Transporter 12 wurde dabei nur für 30 und 60 min analysiert.

Die Abbildung 52 zeigt eine wesentlich höhere Aufnahme rate für die Guanidiny l-Peptide als für das Amino-Peptoid. Die Tests wurden mit ECV304 Zellen wiederholt (Daten nicht gezeigt) und führten zu identischen Ergebnissen. eine eindeutige konzentrations- und zeitabhängige Erhöhung in der Anzahl fluoreszierender Zellen konnte für beide Zelllinien festgestellt werden. Für die höchste Konzentration der Guanidiny l-Peptide (200 μM) waren bereits nach 10 min über 90% der Zellen fluoreszent. Im Gegensatz dazu zeigte der Amino-transporter 10 unter gleichen Bedingungen lediglich 32% Aufnahme in die Zellen. Der Einfluss des jeweiligen Fluorophors, war nur insofern von Bedeutung, als dass Fluorezein einen geringeren Extinktionskoeffizienten aufweist und somit schlechter zu detektieren ist.

Neben der FACS-Analyse wurden die genannten Transporter auch mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Nach erfolgter Inkubation mit verschiedenen Transportern wurden die Zellen fixiert und eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Bisbenzimid (siehe Abbildung 53)

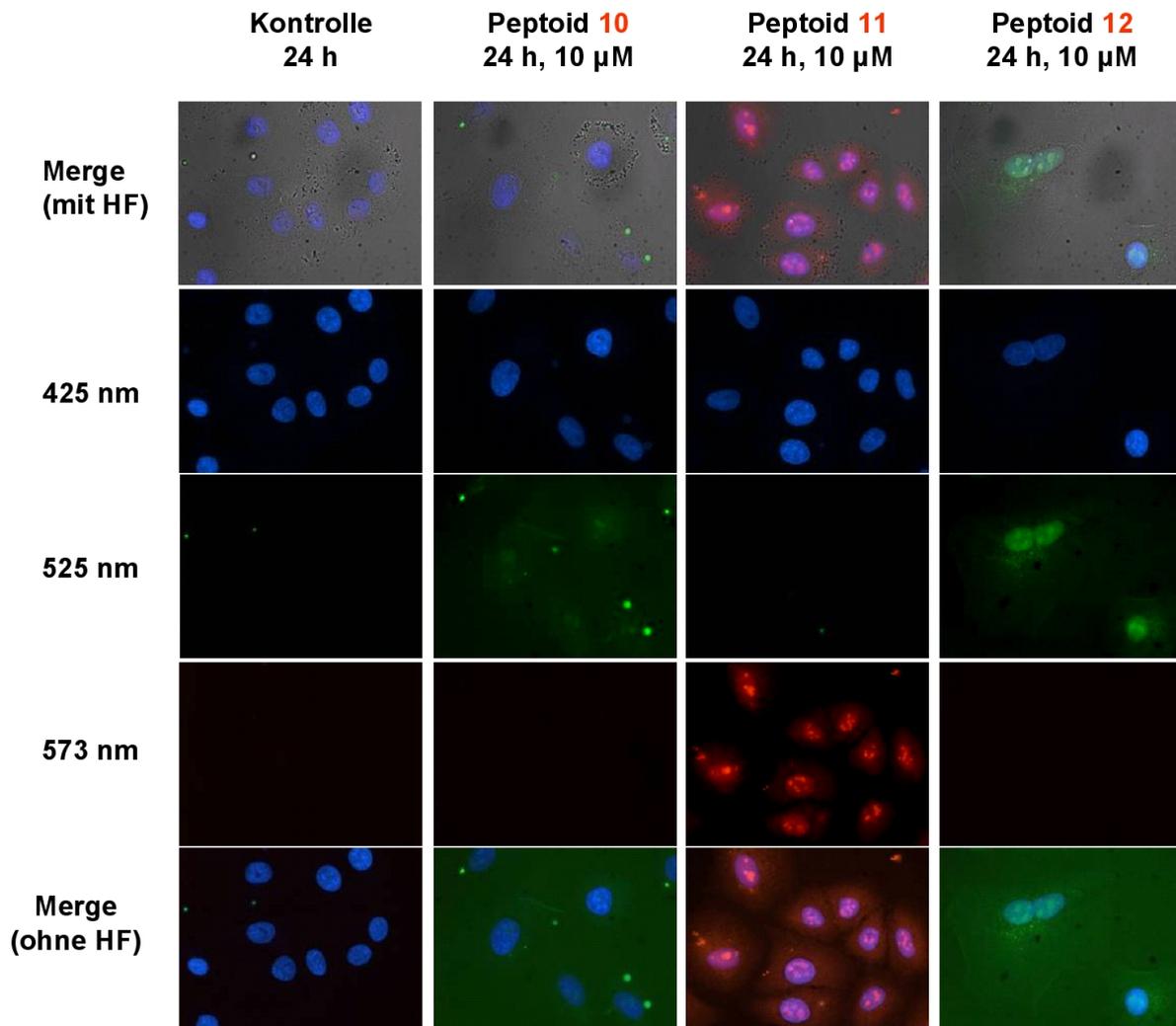


Abbildung 53: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transporter 10, 11 und 12 in A549 Zellen. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ für 24h inkubiert. Die Guanidinyl-Peptide 11 und 12 zeigen eine bevorzugte Anreicherung im Zellkern, wohingegen der Aminotransporter 10 nicht im Zellkern akkumuliert. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid (blau) gegengefärbt. HF = Hellfeld

Die Guanidinyltransporter 11 und 12 akkumulierten im Zellkern, wohingegen der Aminotransporter 10, nur im Zytosol in vesikulären Strukturen zu detektieren war und nicht im Zellkern lokalisierte. Mit demselben Ergebnis wurden der Aminotransporter 10 und der Guanidinyltransporter 11 für die Konzentrationen $1\mu\text{M}$ und $50\mu\text{M}$ und 30 min, bzw. 24h untersucht (Daten nicht gezeigt).

Um zu verifizieren, dass die Systeme als mögliche Wirkstofftransporter verwendet werden können, wurden die Verbindungen ohne Wirkstoff (allerdings zum Teil mit Fluorophor) auf ihre zytotoxischen Eigenschaf-

ten untersucht. Hierbei wurden wiederum A549 und ECV304 Zellen verwendet. Die Eigenschaften der Transporter bezüglich ihrer toxischen Einflüsse auf Zellen wurden durch zwei verschiedene Methoden kreuzuntersucht. Dabei wurden der WST-1 Tests und der LDH Test durchgeführt. Bei den toxikologischen Untersuchungen wurden sowohl fluoreszenzmarkierte Transporter (Guanidinyl-Peptide 11 und 12, sowie Amino-Peptoid 10) als auch die entsprechenden Peptide ohne Fluorophor untersucht, damit festgestellt werden konnte, ob evtl. auftretende toxische Effekte auf die Fluorophore oder auf die Peptide zurückzuführen sind. Dabei wurden die Transporter in Konzentrationen von 20 - 200 μM eingesetzt.

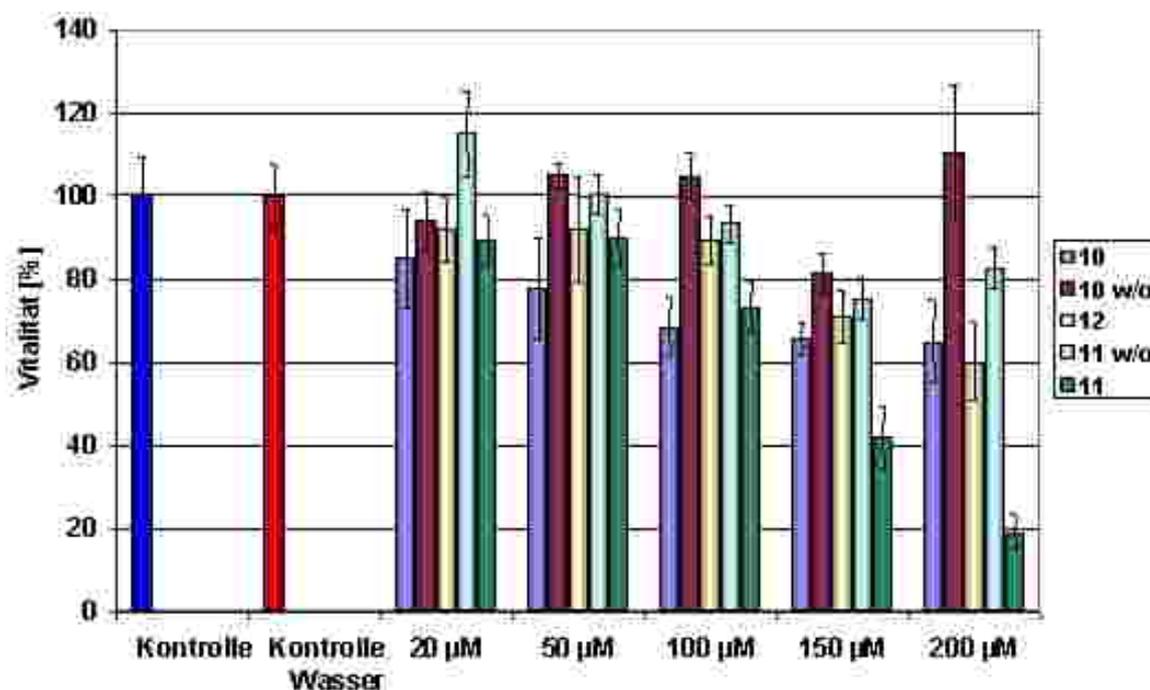


Abbildung 54: Toxikologische Untersuchungen der Transporter 10, 11 und 12 mit Hilfe des WST-1 Test. 10 und 11 auch ohne Fluorophor (w/o). A549 Zellen wurden 48h in den angegebenen Konzentrationen mit den Transportern inkubiert.

Aus Abbildung 54 ist ersichtlich, dass die mit den Guanidinyl-Peptoiden behandelten Zellen eine leichte Abnahme der Vitalität für Konzentrationen über 100 μM zeigen. Dabei war das rhodaminmarkierte Peptoid 11 deutlich toxischer als das fluoreszenzmarkierte Peptoid 12. Das Amino-Peptoid 10 zeigte kaum Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Die unmarkierten Peptide zeigten eine deutlich niedrigere Toxizität, be-

sonders im Vergleich mit dem rhodamingekoppelten Transporter. Somit sind evtl. vorkommende toxische Effekte auf die Zellen in den gezeigten Untersuchungen auf das Fluorophor zurückzuführen.

Diese Ergebnisse wurden mit dem LDH Test und mit ECV304 Zellen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

7 Diskussion

Im Zeitalter der Nanotechnologie ist die Exposition des Menschen mit synthetischen Nanopartikeln, sowohl am Arbeitsplatz, als auch in der Freizeit, ein immer größeres Problem. Zusätzlich zu der Belastung mit feinen und ultrafeinen Stäuben, die vorwiegend Verbrennungsprozessen in Verkehr und Industrie entstammen, steigt die Exposition mit der stetigen Entwicklung neuer Produkte und Anwendungen, die diese wohldefinierten Nanoobjekte enthalten, beständig an (Kreyling et al., 2003; Moore, 2006). Viele Studien konnten einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten partikulären Belastung und einem gesteigerten Gesundheitsrisiko, besonders in Bezug auf Erkrankungen der Atemwege und des Herz-Kreislaufsystems, verbunden mit einer erhöhten Mortalitätsrate, in der Bevölkerung zeigen (Castranova, 2000; Dockery et al., 2005; Schwartz et al., 2001). Und, obwohl seit den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts, durch den Einsatz effektiver Partikelfilter im Mikrometerbereich, in der Industrie ein Rückgang in der Massenkonzentration anthropogener Partikelemission zu verzeichnen ist, steigt die Partikelanzahlkonzentration ultrafeiner Partikel, unter anderem durch den vermehrten Einsatz synthetischer Nanopartikel, sogar an, und dieser Partikelfraktion wird in vielen Studien ein höheres gesundheitsschädliches Potential zugerechnet als größeren Partikeln (Oberdörster, 2001; Wichmann et al., 2000).

Das toxikologische Potential, aber auch die Vorteile in Bezug auf völlig neue Anwendungsmöglichkeiten altbekannter Materialien, sobald wir uns im Nanometerbereich befinden, liegt in den Partikeleigenschaften. Diese werden beeinflusst von der Größe, chemischen Zusammensetzung, Oberflächenstruktur, Löslichkeit, Form und Aggregatzustand der Partikel.

Das große Verhältnis von Oberfläche zu Masse ist hier ein toxikologisch wichtiger Aspekt. So findet man in $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Umweltstaub pro ml Luft 2.390.000 Partikel mit einem Durchmesser von $0,02 \mu\text{m}$, die eine Oberfläche von $3000 \mu\text{m}^2$ aufweisen. Der Partikel- wie auch Oberflächenanteil verringert sich drastisch, wenn Partikel von $0,5$ oder $2 \mu\text{m}$ Durchmesser betrachtet werden (auf 153 bzw 2 Partikel/ml Luft; auf 120 bzw $30 \mu\text{m}^2/\text{ml}$ Luft) (Haberzettl, 2006).

Aufgrund der geringen Größe und der engen Krümmung steigt das Verhältnis der Atome und Moleküle auf der Partikeloberfläche stark an.

Oberflächenstrukturen wie Metallummantelungen, Elektronendonor- und Elektronenakzeptorgruppen, hydrophile und hydrophobe Gruppen und Defekte in der Kristallstruktur definieren den physikalisch-chemischen Charakter der Partikel und führen dazu, dass sich verwendete Materialien plötzlich völlig anders in biologischen Systemen verhalten als Partikel im Mikrometermaßstab aus demselben Material (Nel et al., 2006, Oberdörster et al., 2005). So konnte z. B. in einer *in vitro* Studie gezeigt werden, dass ultrafeine Titandioxid Partikel, unabhängig vom Aggregationszustand, zur Bildung von signifikant erhöhten ROS und IL-8 Leveln führen, im Vergleich mit der feinen Partikelfraktion (Singh et al., 2007). Diese können so eine wichtige Rolle bei der Auslösung von Entzündungen spielen (Brown et al., 2004). Auch führte eine Oberflächenmodifikation von Quarz mit z. B. Aluminiumlaktat zu einer veränderten Toxizität, in diesem Falle einer verringerten, in A549 Zellen (Schins et al., 2002).

Aufgrund dieser großen Oberfläche und einer damit einhergehenden erhöhten Reaktivität können Schadstoffe wie Schwermetalle und Kohlenwasserstoffe aber auch bestimmte Medikamente oder DNA, besonders gut angelagert und, z. B. bei einer Exposition über die Atemwege, bis tief in den alveolaren Bereich der Lunge transportiert werden (Oberdörster et al., 2005). Dies ist einer der interessanten Aspekte der Nanopartikel im positiven Sinne mit denen sich unter anderem die medizinische Forschung beschäftigt (Dobrovolskaia & McNeil, 2007).

Aufgrund der großen Oberfläche gilt die Lunge als einer der Hauptaufnahmewege für Nanopartikel in den Körper (Hoet et al., 2004). Für eine Aufnahme von synthetischen Nanopartikeln über den gastrointestinalen Trakt, der zwar eine viel größere spezifische Oberfläche besitzt (2000 m²) sprechen bisher nur wenige Hinweise (Desai et al., 1996 und 1997; Sonavane et al., 2008). Hinzu kommt, dass die Exposition über Nahrungsaufnahme hier weit geringer ist als über die Atemwege (ca. 4 L Volumen im Vergleich zu 15.000 L). Eine Exposition über die Haut (1,5 m²), besonders am partikelbezogenen Arbeitsplatz, scheint lediglich bei einer verletzten Oberfläche der Haut eine Rolle zu spielen (Hoet et al., 2004; Sonavane et al., 2008).

Unabhängig davon welchen Aufnahmeweg die Partikel in den Organismus beschreiten, berichten viele Studien von einem Übertritt in das Herz-Kreislaufsystem und einer anschließenden Verteilung im ganzen Organismus mit sekundären Zielorganen, wie Herz, Leber, Nieren oder

das zentrale Nervensystem (Elder et al., 2006; Kreyling et al., 2002; Nemmar et al., 2002; Oberdörster et al., 2004; Takenaka et al., 2006). Allerdings zeigte sich für die getesteten Partikel, dass die systemische Verteilung von Partikeln im Organismus gering ausfällt.

Generell zeigen eine ständig ansteigende Zahl von Studien eine Aufnahme von synthetischen Nanopartikeln in die verschiedensten Arten von Zellen und Auswirkungen toxikologischer Art im Zusammenhang mit der vergrößerten Oberfläche und höheren Reaktivität (Lin et al., 2006; Singh et al., 2007; Soto et al., 2007; Unfried et al., 2007; Warheit et al., 2007). Über die beschrittenen Aufnahmewege in die Zellen ist allerdings noch wenig bekannt. Geiser et al. (2005) fanden ultrafeine Titandioxid Partikel in Zellen, nicht mit Membranen assoziiert, die so direkten Zugang hatten zu intrazellulären Proteinen, Organellen und DNA, was das mögliche toxische Potential der Partikel erhöhen würde. Die Aufnahme über endozytotische Prozesse schlossen sie aus und favorisierten Diffusion oder eine sogenannte *adhäsive interaction*. Eine Aufnahme über rezeptorvermittelte Endozytose wird allerdings in den meisten Studien favorisiert (Conner & Schmid, 2003; Mühlfeld et al., 2008; Nel et al., 2006), aber auch phagozytotische Aufnahmemechanismen werden diskutiert (Dobrovolskaia & McNeil, 2007).

In diesem Zusammenhang steht allerdings auch der Einsatz solcher Strukturen in einem neuen Bereich der Wissenschaft, der Nanomedizin (Dobrovolskaia & McNeil, 2007). Die geringe Größe in Verbindung mit der großen Oberfläche machen Nanopartikel zu idealen Vehikeln, um z. B. DNA gezielt in die Zelle zu transportieren (Bharali et al., 2005; Roy et al., 2005), und die Aufnahmewege für Nanopartikel in die Zelle sind hier von größter Bedeutung. Bestimmte Oberflächenmodifikationen werden untersucht, die es möglich machen sollen, ganz bestimmte Zellen, z. B. Tumorzellen anzuvisieren, um Wirkstoffe an ihren Einsatzort zu transportieren (Bharali et al., 2005) oder eine mechanische Zerstörung der Zielzellen einzuleiten (Jordan et al., 2006).

Die Lunge wird hier als Eingangsportal für die nichtinvasive Verabreichung, schnelle und systemische Verteilung von Medikamenten, wie z. B. Insulin, mit Hilfe solcher Nanotransporter diskutiert (Patton et al., 2004). Aufgrund ihrer geringen Toxizität werden neben Peptiden, β -Peptiden, Polymere und Liposome auch amorphe Silica Nanopartikel, aufgrund ihrer geringen Toxizität, als Transportvehikel untersucht (Bharali et al., 2005; Gemeinhart et al., 2005; Roy et al., 2005).

In dieser Studie lag daher das Hauptaugenmerk auf den Mechanismen der Aufnahme von synthetischen, amorphen Silica Nanopartikel in verschiedenen Zelltypen.

Als Modellpartikel wurden Silica Partikel in vier verschiedenen Größen (20, 50, 70 und 200 nm) gewählt. Sie wurden auf ihre akute Toxizität, Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Wahl des Aufnahmeweges in Abhängigkeit der Partikelgröße in *in vitro* Systemen untersucht. Desweiteren war die Lokalisation internalisierter Partikel in der Zelle von Interesse. Geklärt werden sollte hier, ob die Partikel den Zellkern penetrieren und Auswirkungen auf nukleäre Enzyme, am Beispiel der Topoisomerase I, haben.

Außerdem wurden, als weiteres Beispiel für synthetische Nanostrukturen, die in der Medizin zum Einsatz kommen sollen, verschiedene peptoidische Transporter auf ihre Toxizität, Fähigkeit zur Zell- und Zellkernpenetration durch Verwendung unterschiedlicher Seitenketten (Guanidinyll oder Amino) hin untersucht.

Als Zellmodell wurden Zelllinien gewählt, die charakteristisch für den Aufbau der menschlichen Lunge sind, Lungenepithelzellen (A549), Endothel-ähnliche Zellen (ECV304) und zu Makrophagen differenzierte Monozyten (THP-1). Diese Zelllinien wurden deshalb ausgewählt, da die Partikelexposition über die Atemwege einer der bedeutendsten Aufnahmewege in den Organismus darstellt und ein möglicher Übertritt von Partikeln in das Blutssystem postuliert wird.

Ein *in vitro* Testsystem wurde aus verschiedenen Gründen gewählt. Zwar beruhen viele Arbeiten im Bereich der Inhalationstoxikologie auf Tierversuchen, allerdings ist die Übertragbarkeit auf den Menschen oft schwierig. Zum einen unterliegen *in vivo* Studien oft großen Schwankungen durch individuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren. Außerdem ist die Tierhaltung mit immer höheren Kosten verbunden und der Zugriff auf zelluläre und molekulare Parameter nicht immer einfach. Zum anderen ist zwar die Komplexität der Organismen mit der des Menschen vergleichbar, aber die Art der Atmung (z. B. obligate Nasenatmung bei Ratten), der Aufbau der Atemwege (Länge der Trachea und Bronchien) nicht mit denen des Menschen vergleichbar. Hinzu kommt, dass Tierversuche auch immer mit ethischen Problemen behaftet sind. *In vitro* Studien bieten hier viele Vorteile. Eine Standardisierung des Testsystems ist möglich, mit hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, bei gleichzeitiger Kostenersparnis. Zudem ist der Zugriff auf ei-

ne große Bandbreite von Untersuchungsmethoden möglich und interindividuelle Unterschiede fallen nicht ins Gewicht. Nichts desto trotz können *in vitro* Studien *in vivo* Experimente nicht ganz ersetzen, da die Antwort des Organismus auf einen Schadstoff auch immer auf der Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen beruht.

Zusammenfassend sollten die Ergebnisse dieser Studie helfen, die Aufnahmeprozesse von synthetischen Nanopartikeln in Zellen zu verstehen, toxische Auswirkungen zu vermeiden und die Verwendung solcher wohldefinierter Strukturen im Bereich der Medizin zu fördern.

Im nun folgenden Kapitel sollen die dargestellten Ergebnisse vergleichend diskutiert und in Zusammenhang mit Erkenntnissen aus früheren Arbeiten gebracht werden.

7.1 Charakterisierung der Silica Nanopartikel

Eine systematische Untersuchung der molekularen Vorgänge, die der pathologischen Wirkung von Umweltpartikeln zugrunde liegt, wird durch die Komplexität und Variabilität in der Zusammensetzung ultrafeiner Partikelfractionen erschwert.

Im Gegensatz dazu weisen die in dieser Studie eingesetzten Silica Modellpartikel eine konsistente, homogene Zusammensetzung auf. Damit eignen sie sich besser für grundlegende mechanistische Untersuchungen zur Partikelaufnahme, deren Ergebnisse dazu dienen können, die Wirkungsweise „realer“ Umweltpartikel zu klären. Außerdem lassen sich so Erkenntnisse für den gezielten Einsatz solcher Modellsysteme in der Medizin gewinnen, wie er vielfach in präklinischen Studien, z.B für den Einsatz als nicht virale Vektoren für den DNA Transport in Zellen bereits erforscht wird (Bharali et al., 2005; Roy et al., 2005). Ein weiterer Vorteil dieser Modellpartikel ist, dass sie als Fraktion mit einer bestimmten Größenverteilung und gleichen physikalisch-chemischen Parametern, kommerziell erhältlich und mit den gleichen Eigenschaften nachlieferbar sind.

Trotz der Angaben des Herstellers zur Größe, erfolgte eine genauere Charakterisierung der Partikel *via* TEM, Zetapotenzial Messung und Messung der Größenverteilung *via* dynamischer Lichtstreuung. Die Untersuchung der Partikel erfolgte in Wasser und in Medium. Dies ist zur Beurteilung des Verhaltens von Nanopartikeln in biologischen Systemen besonders wichtig, da sich herausstellte, dass Nanopartikel in verschie-

denen Medien teilweise sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (Dutta et al., 2007; Schulze et al., 2008). Es zeigte sich, dass die gemessenen Partikelgrößen in Wasser nur in etwa den Herstellerangaben entsprachen und für die 20 nm Partikel sogar etwa doppelt so groß waren. In Medium mit FCS zeigte sich, dass die Partikel, bis auf die 200 nm Partikel, große Agglomerate im Mikrometer Bereich bilden. Auch in Medium mit hiFCS bildeten sich für die 20 und 50 nm Partikel große Agglomerate, die allerdings nicht ganz die Größe erreichten, wie mit intaktem FCS. Die 70 nm Agglomerate waren viel kleiner und die 200 nm Partikel zeigten auch hier keine Agglomeration. Dies deckt sich nicht mit Studien, die besagen, dass Serumproteine eine Agglomeration der Partikel verhindern und eine Art sterische Schutzhülle um die Partikel bilden (Geys et al., 2006; Schulze et al., 2008). Diese hier festgestellte Agglomeration der drei kleineren Partikeltypen im Medium, wurde durch die TEM Aufnahmen bestätigt, die auch zeigen, dass die Partikel spärlich sind und die Größenverteilung eng ist. Die TEM Aufnahmen machen allerdings auch deutlich, dass sich die Nanopartikel, trotz Ultraschallbehandlung in biologischen Medien so gut wie nicht vereinzeln lassen. Am Beispiel der 50 nm konnte festgestellt werden, dass diese Agglomeration bereits nach kürzester Zeit, trotz vorhergehender Ultraschallbehandlung, stattfindet. Nach diesen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass nur die 200 nm Partikel im Zellversuch als primäre Partikel die Zellen erreichen.

Die Zetapotenzialmessung ergab einen Anstieg des Potenzials für alle Partikel in Medium, was einer Anlagerung von kationischen Serumproteinen auf der Partikeloberfläche entspricht. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Schulze et al. (2008). Ein erhöhtes Zetapotential der Partikel scheint die Aufnahme in die Zellen zu begünstigen (Dobrovolskaia & McNeil, 2007; Orr et al., 2007), da kationische Moleküle besser an der negativen Zelloberfläche zu binden scheinen als anionische (Chithrani et al., 2006).

Diese Studie zeigt die Notwendigkeit einer genauen Charakterisierung eingesetzter Nanopartikel vor dem Einsatz in biologischen Systemen. Nur ausgehend von den physikalischen Eigenschaften direkt nach der Herstellung und in nicht biologisch verwendbaren Lösungsmitteln, könnte es hier, im Falle der drei kleinere Partikeltypen, zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse kommen.

7.2 Partikeldosis-Relevanz und akute Toxizität

In Tier- und Humanstudien werden je nach Expositionsmethode und Versuchsobjekt häufig Dosen im mg (Instillierung) oder $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Inhalation) Bereich eingesetzt (Albrecht et al., 2004; Warheit et al., 2005). Diese Belastungen sind weitaus geringer als die, in dieser Studie eingesetzten *in vitro* Partikeldosen ($0,625 - 62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Durch eine Arbeitsplatz bedingte Exposition können solche Belastungen zwar erreicht werden (Kuempel et al., 2003), generell ist die Umweltbelastung aber weitaus niedriger als die hier eingesetzten Dosen. Im Rahmen dieser Arbeit sind die gewählten Dosen dennoch zu tolerieren, da es sich um eine mechanistische Studie handelt, in der signifikante Effekte nach relativ kurzer Expositionszeit erreicht werden sollten. Die eingesetzten Dosen waren ausreichend, um solche signifikanten Effekte zu ermitteln, lagen aber noch innerhalb oder sogar unterhalb des Konzentrationsbereich anderer *in vitro* Studien ($125,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Renwick et al., 2000; $133 \mu\text{g}/\text{ml}$ Iyer et al., 1996). Desweiteren ist anzumerken, dass sich in der Lunge, z. B. nach einer Exposition mit Quarz, sogenannte *Hot spots* bilden können, in denen es durch Akkumulation der Partikel zu hohen Partikelkonzentrationen kommen kann (Haberzettl, 2006).

Um zu gewährleisten, dass in den Untersuchungen nur Konzentrationen der Silica Partikel zum Einsatz kamen, die keine akut toxischen Auswirkungen auf die Zellen haben, um falsche Interpretationen der Ergebnisse zu vermeiden, wurden verschiedene gängige Vitalitätstests durchgeführt. Zum Einsatz kamen der WST-1, der LDH und der MTT Test, kolorimetrische Verfahren, die alle auf der Umsetzung und Messung eines Farbstoffes beruhen.

Diese drei verschiedenen Testsysteme wurden gewählt, da aus der Literatur bekannt war, dass Nanopartikel mit Testsysteme interagieren können. Der MTT und der WST-1 Test beruhen beide auf der Messung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen, verwenden aber unterschiedliche Formazansalze. So konnten Wörle-Knirsch et al. (2006) zeigen, dass sich *Carbon Nanotubes* mit dem unlöslichen MTT-Formazan verbinden, so den Vitalitätstest beeinflussen und zu falsch positiven Ergebnissen führen können, dies aber nicht für den WST-1 Test zutrifft. Laaksonen et al. (2007) zeigten für Silikon Mikropartikel, dass diese den MTT Test verfälschen, indem es zu Redoxreaktionen an den Partikeln kommt, die zu einer falschen Aussage in Bezug auf die Zytotoxizität

führen. Um die Ergebnisse zu verifizieren kam zusätzlich der LDH Test zum Einsatz, der die Laktatdehydrogenase als ein zytoplasmatisches Enzym im Überstand des Zellsystems als Parameter für die Membranintegrität nutzt.

Die drei Vitalitätstest zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse. Der MTT Test ergab in A549 und ECV304 Zellen nach 4h Inkubation keinen, aber nach 48h einen signifikanten, konzentrationsabhängigen Vitalitätsverlust für alle Partikeltypen.

Im Gegensatz dazu zeigte der WST Test nicht nur keinen Verlust, sondern sogar eine erhöhte Vitalität, unabhängig von Konzentration, Zeitpunkt und Partikelgröße für alle drei verwendeten Zelllinien.

Der LDH Test zeigte ebenfalls eine solche erhöhte Vitalität nach 3h Inkubation. Nach 24h fand sich in den A549 Zellen keine solche erhöhte Aktivität, aber auch kein Verlust in der Vitalität. In den ECV304 Zellen allerdings zeigten die 20 und 50 nm Partikel für die hohen Konzentrationen einen Verlust, für die anderen Partikelgrößen aber einen Anstieg in der Vitalität.

Wie sind diese unterschiedlichen Ergebnisse nun zu interpretieren?

Die Erhöhung in der Vitalität des LDH Tests könnte durch die Bindung des Enzyms LDH an die Partikeloberfläche zu erklären sein, was einerseits einen Austritt dieses Enzyms aus defekten Zellen minimiert, andererseits die Grundaktivität des LDH im Überstand, die für die Kontrollzellen gemessen wird, blockt und so zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte. So zeigten auch Monteiro-Riviere & Inman (2006), dass Farbstoffe und andere Substanzen auch an andere Partikel als *Carbon Nanotubes* binden und somit solche Testverfahren stören können.

Die erhöhte Vitalität im WST-1 Test ist so nicht zu erklären. Hier könnte eine erhöhte Aktivität der Dehydrogenasen vorliegen, oder eine höhere Zellanzahl, bedingt durch eine partikelinduzierte gesteigerte Proliferation. Interaktionen des Farbstoffs mit den Partikeln ist denkbar.

Der Verlust in der Vitalität im MTT Test könnte auch hier, ähnlich wie für die *Carbon Nanotubes* beschrieben (Wörle-Knirsch et al., 2006), durch eine Interaktion des Formazans mit den Partikeln zu erklären sein. Dies zeigten auch Laaksonen et al. (2007) für mesopore Silica Mikropartikel. Dafür spricht außerdem, dass dieser Effekt noch nicht nach 4h messbar war, sondern erst nach längerer Inkubationszeit, in der die Partikel Zeit hatten mit dem Farbstoff in Kontakt zu treten.

Betrachtet man die Testverfahren und eingesetzten Partikel genauer, so

stellt man allerdings fest, dass die Tests und auch die Partikel in einem sehr ähnlichen Wellenlängenbereich sowohl angeregt werden, als auch Licht emittieren (Emission: WST-1 450 nm, LDH 490 nm, MTT 550 nm und Silica Partikel 510 nm). Es ist also denkbar dass eine erhöhte Vitalität im WST-1 und LDH Test auf die zusätzliche Lichtemission der Partikel zurückzuführen ist.

Zusammengefasst bestätigen diese Ergebnisse, dass gängige kolorimetrische Vitalitätstests nicht für eine quantitative Toxizitätsuntersuchung von Nanopartikeln geeignet sind und daher Alternativen gesucht werden müssen.

7.3 Kein Einfluss auf das Zellwachstum durch Silica Nanopartikel

Um zu testen, ob die Ergebnisse über eine scheinbar gesteigerte Vitalität aus den Zytotoxizitätstests, nicht doch auf einem partikelinduziertem gesteigertem Zellwachstum beruhen, und um eine definitive Aussage über toxikologische Auswirkungen der Partikel auf die Zellen für die weiteren Versuche treffen zu können, erfolgten zwei weitere Untersuchungen.

In einer einfachen Zellzählung ohne Einfluss störender Chemikalien oder Farbstoffe zeigte sich weder ein Rückgang noch eine Zunahme im Wachstumsverhalten der Zellen in Anwesenheit der verwendeten Silica Partikel. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien zu amorphen Silica Partikeln (Xing et al., 2005). Hier herrscht ein eindeutiger Unterschied zu kristallinen Silica Partikeln (Quarz), die in vielen Untersuchungen eine hohe Toxizität aufwiesen (Borm & Tran, 2002; Castranova, 2000 und 2004).

Neben der Überprüfung der Wachstumsrate wurde auch die DNA-Neusyntheserate mit Hilfe des BrdU Tests untersucht. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Vitalitätstests ergaben sich auch hier Widersprüche. So zeigte sich teilweise für die niedrige Konzentration ein Rückgang in der Syntheserate, aber nicht für die hohe. Ein konzentrationsabhängiger Rückgang wurde nur für die 200 nm Partikel gemessen. Da dieser Test ebenfalls ein kolorimetrischer Test ist, der noch dazu eine Antikörperbindung erfordert, können ihn verschiedene Faktoren beeinflussen. Zum Einen emittiert auch der Farbstoff der in diesem Test verwendet wird ungefähr im Bereich der Partikelemission Licht (450 nm), zum Anderen ist denkbar, dass sowohl der Primär- als auch der Sekundäran-

तिकörper an die Partikel binden können. Sollte so der Erstantikörper, aufgrund der amorphen Struktur der Partikel und durch sterische Effekte dem Zweitantikörper entzogen sein, würde das den Rückgang in der gemessenen Farbintensität erklären, da nicht genug Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper in der Zelle gebunden wäre. Auch Redoxreaktionen auf der Partikeloberfläche und die mögliche Bildung von ROS (Nel et al., 2006), die mit den Antikörpern interagieren, wären denkbar. Allerdings erklärt dies nicht, warum dieser Effekt für die hohen Partikelkonzentrationen nur bei den 200 nm Partikeln auftritt.

Aufgrund der Beobachtung dass zwei Vitalitätstests und die Zellzählung auch nach 72h keinen akut toxischen Effekt der eingesetzten Partikelkonzentrationen zeigten, wurden diese als geeignet für die weiteren Untersuchungen angesehen. Auch unter dem Lichtmikroskop ließen optische Kontrollen keinen negativen Einfluß auf die Zellmorphologie und das Zellwachstum erkennen, die Zellen sahen „gesund“ aus. Die oft getroffene Vermutung, dass, je kleiner die Partikel sind, desto größer sei ihre toxische Wirkung (Nel et al., 2006, Oberdörster et al. 2005), konnte nicht bestätigt werden.

7.4 Oxidativer Stress

Eine partikelinduzierte Radikalbildung könnte ein weiterer, an einer zelltoxischen Wirkung beteiligter Effekt sein, der eine höhere Zelltoxizität von Nanopartikeln im Vergleich mit Mikrometerpartikeln erklärt. Normalerweise halten sich die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch z. B. die oxidative Phosphorylierung, und antioxidative Mechanismen, wie Glutathion, in der Zelle die Waage. Kommt allerdings eine ROS-Bildung bedingt durch äußere Einflüsse wie UV-Strahlung, chemische Schadstoffe oder auch Partikel hinzu, kann dieses Gleichgewicht kippen. Es entsteht Oxidativer Stress, der zur Aktivierung verschiedener pro-inflammatorischer Mechanismen, wie der Bildung von Cytokinen und Chemokinen führen kann (Klotz et al., 2001; Nel et al., 2006; Völkel et al., 2003).

Bedingt durch die größere reaktive Oberfläche und eine partikelinduzierte Aktivierung von Enzymen, wie z. B. Oxygenasen, Peroxidasen oder Cytochrom P450 können ROS in Zellen durch Partikel generiert werden (Li et al., 2003; Völkel et al., 2003). Diese wirken schädigend auf zelluläre Strukturen, wie Nukleinsäuren, Lipide oder Proteine. Ei-

ne solche Zellschädigung ist die Vorstufe für eine Entzündung im Gewebe und damit einhergehender Krankheitsbilder wie Fibrose, Silicose und letztlich die Entstehung von Tumoren (Castranova, 2004; Dick et al., 2003; Rahman, 2002). Viele Studien berichten von einer Partikel induzierten ROS Bildung (Li et al., 2003; Lin et al., 2006; Singh et al., 2007). Eine gesteigerte Reaktivität wird hier mit dem großen Oberfläche zu Größe Verhältnis der Nanopartikel in Verbindung gebracht. So wird Nanopartikeln aufgrund ihrer großen Oberfläche eine hohe Bedeutung in der Induktion von Oxidativem Stress beigemessen (Nel et al., 2006, Oberdörster, et al., 2005). Viele Studien konnten zeigen, dass eine Exposition mit Quarzpartikeln, der kristallinen Form des Siliciumdioxids, zu einer dosisabhängigen ROS-Bildung führt (Albrecht et al., 2004; Imrich et al., 1999; Porter et al., 2004; Rao et al., 2004). Für die amorphe Form der Siliciumdioxid Partikel konnten allerdings nur sehr wenige Studien zelltoxische Effekte und die Induktion von oxidativem Stress feststellen (Lin et al., 2006).

In dieser Arbeit geschah der Nachweis von unspezifischen, intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies mit Hilfe des DCF, des DHR123 und des DNTB Tests. Sowohl der DCF als auch der DHR123 Test beruhen auf der Bildung und Messung eines Fluoreszenzfarbstoffs aus einer nicht fluoreszierenden Vorstufe durch ROS bei einer Wellenlänge von 530 nm. Der DTNB Test ist ebenfalls ein kolorimetrischer Test, der allerdings keine Fluoreszenz detektiert und bei einer Absorption von 412 nm gemessen wird.

Im DTNB Test konnte kein Anstieg im Gehalt des antioxidativ wirkenden Glutathions in A549 und ECV304 gemessen werden. Nach 24h Inkubation zeigte sich sogar ein signifikanter Rückgang in der Menge dieses Peptids für alle Partikeltypen. Mit Hilfe der anderen beiden Testverfahren konnte in A549 Zellen ein konzentrationsabhängiger Anstieg intrazellulärer ROS für alle Partikelgrößen, außer den 200 nm Partikeln, gemessen werden. In ECV304 Zellen zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse ohne erkennbares Muster. Nur für die 200 nm Partikel war für jede getestete Konzentration und jeden Zeitpunkt kein Anstieg in der Induktion von ROS zu verzeichnen. Natürlich kann man von der Annahme ausgehen, dass unterschiedliche Zellen nicht ähnlich auf eine Exposition mit Nanopartikel reagieren müssen. Denkt man aber an die Ergebnisse der Vitalitätstests, so stellt sich allerdings auch hier die Frage, nach einer Beeinflussung der Testsysteme durch die fluoreszierenden Partikel. Die

Eigenfluoreszenz der Partikel könnte zu einem falsch positivem Ergebnis in der Induktion der ROS geführt haben. Nur lässt sich damit nicht erklären, warum die 200 nm Partikel mit ihren starken fluoreszierenden Eigenschaften „aus der Rolle fallen“. Unterschiede im partikelbezogenen Aufnahmeverhalten der Zellen könnten hier einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden untersuchten Zelllinien geben.

Zusammengefasst zeigen auch diese Testergebnisse die Notwendigkeit für Alternativen, die nicht auf der Messung kolorimetrischer Eigenschaften beruhen. Desweiteren konnte auch auf diese Weise bestätigt werden, dass amorphes im Vergleich zu kristallinem Siliciumdioxid sehr wenig toxisch ist und sich für das Studium der Aufnahmemechanismen besonders eignet und auch mit relativ hohen Konzentrationen gearbeitet werden kann.

7.5 Aufnahme von Partikeln in Zellen und Kernlokalisierung

Neben den Auswirkungen der Partikelcharakteristika auf die Zelltoxizität, muss ihr Einfluss auf andere biologische Funktionen beachtet werden. So haben Partikeloberflächeneigenschaften unter anderem Auswirkungen auf die zelluläre Aufnahme und auch auf die Verteilung der Partikel in der Zelle.

In dieser Arbeit konnte die Partikelaufnahme sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) dokumentiert werden.

Am Fluoreszenzmikroskop konnte beobachtet werden, dass die Silica Nanopartikel eindeutig mit den Zellen assoziieren, unabhängig von ihrer Größe. Es zeigte sich, dass sie sich in der Nähe des Zellkerns in vesikulären Strukturen konzentrierten, aber nie im Zellkern gefunden werden konnten. Zu denselben Ergebnissen kamen Gemeinhart et al. (2005) für Silica Partikel in CHO Zellen. Dies legt nahe, dass die Partikel wirklich in die Zellen aufgenommen wurden, und nicht nur auf der Oberfläche hafteten. Würden die Partikel nur auf der Zelloberfläche haften, würden sie, rein optisch von „oben“ betrachtet, auch auf dem Kern liegen, wenn auch außerhalb der Zelle, und könnten fälschlicherweise als in den Kern penetriert betrachtet werden. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien über fluoreszierende Nanopartikel. So fanden z. B.

Xing et al. (2005) fluoreszierende 50 nm Silica gecoatete Nanopartikel in HeLa Zellen, oder Geiser et al. (2005) fluoreszierende Polystyrolpartikel ((1, 0,2 und 0,078 μm) in Makrophagen. Rejman et al. (2004) fanden 50, 200 und 500 nm fluoreszierende Mikrosphären in B16/F10 Zellen. Eine Kernlokalisation fluoreszierender Nanopartikel konnten allerdings bisher nur Chen & von Mikecz (2005) zeigen und auch von einer Kernlokalisation nicht fluoreszierender Nanopartikel wurde bisher nur selten berichtet. So zeigten Geiser et al. (2005) in TEM Aufnahme nur einzelne Titandioxidpartikel im Kern von Fibroblasten. Konträr dazu fanden Singh et al. (2007), und auch Stearns et al. (2001), die ebenfalls mit Titandioxid Nanopartikeln arbeiteten, in ihren TEM Studien keine Partikel im Zellkern oder in anderen Zellorganellen. Ebenso wie Takenaka et al. (2006), die ultrafine Goldpartikel in Vesikeln, aber nie im Kern von Makrophagen fanden. Diese Befunde werden bestätigt durch die TEM Aufnahmen dieser Arbeit, die zeigen, dass die Partikel nicht nur an der Zelloberfläche haften, sondern auch die Zellmembrangrenze überwinden konnten und im Zytosol vorzufinden waren. Die Silica Partikel waren sehr gut identifizierbar und lagen, mit Ausnahme der 200 nm Partikel, als große Agglomerate vor. Sie fanden sich überwiegend in membrangebundenen Einschlüssen im Zytoplasma und konnten teilweise in lamellaren Körperchen identifiziert werden. Im Zellkern, Mitochondrien oder assoziiert mit dem rauen Endoplasmatischen Retikulum konnten sie allerdings nie gefunden werden Dies deckt sich mit Beobachtungen von Stearns et al. (2001), die ebenfalls an A549 Zellen mit Hilfe von TEM-Aufnahmen zeigen konnten, dass nach 24h Inkubation mit ultrafeinen Titandioxid Partikeln, diese in großer Zahl in membranumhüllten Einschlüssen und zum Teil in lamellaren Körperchen zu finden waren.

Da in dieser Arbeit weder in Fluoreszenzstudien, noch in TEM Aufnahmen, auch nach einer langen Inkubationszeit, in der mehrere Zellteilungen stattfanden, die unterschiedlich großen Nanopartikeltypen im Kern gefunden werden konnten, stellt sich somit die Frage, ob es sich bei den wenigen Studien, die Partikel im Zellkern detektieren konnten, nicht um Artefakte handelt, wie diese z. B. bei der Präparation für die TEM auftreten können, oder, ob es sich, im Falle fluoreszierender Partikel, nicht um abgelöste Farbstoffmoleküle handelt, die in den Kern translozierten.

7.5.1 Heterogenität der unterschiedlichen Zelllinien und Nanopartikel

Aus der Kombination der durchflusszytometrischen Messergebnisse mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ließ sich eine unterschiedliche konzentrations- und zeitabhängige Aufnahmekapazität für verschiedene Partikel in verschiedene Zelltypen zeigen, wobei die Größe hier ein entscheidender Faktor zu sein schien, was sich mit anderen Studien deckte (Desai et al., 1997). Diese Ergebnisse konnten allerdings nicht mit denen der TEM Studien bestätigt werden. Hier zeigte sich z. B. für die 200 nm Partikel in A549 Zellen eine viel geringere Anzahl im Zytoplasma, obwohl diese Partikel am FACS nach der gleichen Inkubationszeit mit derselben Konzentration, mit den anderen Partikeltypen vergleichbare, Aufnahmezeiten zeigten und am Fluoreszenzmikroskop sogar die höchsten. Deshalb muss hier die individuelle Stärke der Fluoreszenz der einzelnen Partikel beachtet werden. So stellte sich heraus, dass die 200 nm Partikel sehr stark fluoreszierten, was auf eine größenbedingte Einlagerung von mehr Fluorochrommolekülen zurückzuführen sein dürfte. Dies erscheint logisch, wenn man bedenkt, dass sich das Volumen vertausendfacht, wenn sich der Durchmesser verzehnfacht. Vom Hersteller war bekannt, dass das Fluorophor nicht nur oberflächengebunden, sondern in der gesamten Matrix der Partikel eingelagert sei und so erklärt sich, dass bereits sehr wenige dieser großen Partikel in der Zelle zu starken Signalen und frühen Detektion am FACS führten. Desweiteren müssen Chargenunterschiede in der Intensität der Partikel berücksichtigt werden. Es zeigte sich hier, dass unterschiedliche Chargen desselben Partikeltyps unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten aufwiesen. Deshalb lässt sich, nur über die Fluoreszenz, keine Aussage über größenbedingte Unterschiede in der Aufnahmezeit innerhalb einer Zelllinie treffen. Dies stellt auch andere *in vitro* Untersuchungen mit fluoreszierenden Partikeln in Frage, wie z. B. die Studie von Geiser et al. (2005) mit fluoreszierenden Polystyrolpartikel (1, 0,2 und 0,078 μm). Sie fanden über die Auswertung der Fluoreszenzintensität in Makrophagen Aufnahmezeiten von 77% für die ultrafeinen, 21% für die 200 nm und 56% für die 1 μm großen Partikel. Allerdings können Vergleiche zwischen verschiedenen Zelllinien, denselben Partikeltyp betreffend, gemacht werden. So fanden sich in dieser Arbeit im Vergleich der einzelnen Zelllinien für jede Partikelgröße die höchsten Aufnahme-

raten in den A549 Zellen, gefolgt von den THP-1 und den ECV304 Zellen.

Ein Größenunterschied der Zellen aus den hier verwendeten Zelllinien könnte ein Grund für den Unterschied in der Aufnahme rate sein (Zetterberg et al., 1998). Die geringere Partikel Aufnahme durch die THP-1 im Vergleich zu den A549 Zellen könnte auf eine geringere Wechselwirkungsmöglichkeit zwischen Partikel und Zelloberfläche zurückzuführen sein. Dies wirkt sich besonders bei hohen Konzentrationen aus, da hier nicht das Zusammentreffen von Partikel und Zelle, sondern die Effizienz der Wechselwirkungen die Reaktionsgeschwindigkeit der Aufnahme prozesse bestimmt. Allerdings erklärt dies nicht den Unterschied in der Aufnahme rate zwischen ECV304 und A549 Zellen, da beide in etwa die gleiche Größe aufweisen. Somit müssen noch andere Parameter die Unterschiede in der Aufnahme rate bestimmen. Hier könnte die unterschiedliche Spezialisierung der verschiedenen Zelltypen das unterschiedliche Aufnahme verhalten erklären. Die überraschend niedrige Aufnahme rate der THP-1 Zellen, die als Makrophagen ja klassischerweise ganz besonders die Fähigkeit zur Phagozytose von Partikeln aufweisen sollten, im Vergleich mit den A549 Zellen, könnte mit verschiedenen Faktoren verbunden sein. Zum Einen könnte die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen nicht vollständig erfolgt sein, zum Anderen ist nicht klar, zu welcher Art von Makrophagen die Zellen differenzierten. So ist bekannt, dass es signifikante Unterschiede in der phagozytotischen Aktivität alveolärer im Vergleich zu interstitiellen Makrophagen gibt, bei der erstere sowohl eine schnellere Bindungs- als auch Aufnahme fähigkeit zeigen (Fathi et al., 2001).

7.5.2 Aufnahmewege der Silica Nanopartikel in verschiedene Zelllinien

Die vorliegenden Ergebnisse sowie Hinweise aus der Literatur belegen eindeutig, dass Nanomaterialien von verschiedensten Zelltypen aufgenommen werden (Geiser et al., 2005; Rejman et al., 2004; Stearns et al. 2001). Die genauen Aufnahme mechanismen sind allerdings noch weitestgehend unklar (Long et al., 2007).

Die Aufnahme rate wird, neben der Größe auch von anderen Faktoren, wie den Partikel oberflächeneigenschaften, Morphologie oder dem Aggregationsverhalten beeinflusst (Wiesner et al., 2006; Limbach et al.,

2005). Dabei spielen Wechselwirkungen zwischen dem Partikel und den verschiedenen, die Aufnahme regulierenden, Parameter, wie Rezeptoren, Membranlipide der Zelloberfläche und Proteine des umgebenden Mediums eine Rolle. Unterschiedliche Aufnahmemechanismen sind hier denkbar (Phagozytose, Makropinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose oder Diffusion) (Conner & Schmid, 2003; Dobrovolskaia & McNeil, 2007; Rothen-Rutishauser et al., 2006). Verschiedene oder unterschiedlich starke Interaktionen können somit partikelspezifische Aufnahmeraten erklären.

7.5.2.1 Energieabhängige Aufnahmeprozesse und Aktinbeteiligung

Untersuchungen des Aufnahmemechanismus inhalierbarer Partikel durch Lungenmakrophagen, -epithel- oder -endothelzellen werden schon seit Jahren durchgeführt. Der tatsächliche Aufnahmeweg, vor allem für die ultrafeinen Partikel wird jedoch noch immer kontrovers diskutiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen intensiv auf eine Energieabhängigkeit in der Aufnahme der verschieden Nanopartikel hin und die Beteiligung des Aktinzytoskeletts scheint in allen drei untersuchten Zelllinien für die Mehrzahl der Aufnahmeprozesse von Bedeutung zu sein. Dies deckt sich mit Ergebnissen vieler Studien, die zum Teil sehr unterschiedliche Arten von Nanopartikeln untersuchten. So fanden Xing et al. (2005) in Kältestudien einen klaren Rückgang in der Aufnahme fluoreszierender Silica gecoateter Nanopartikel in HeLa Zellen. Qaddoumi et al. (2004) konnten für 100 nm PLGA Partikel eine Hemmung der Aufnahme durch Kälte, Cytochalasin D und metabolische Inhibitoren wie DNP zeigen. Auch Kim et al. (2006) konnten durch Experimente mit Kälte und metabolischen Inhibitoren einen Rückgang in der Aufnahme von 50 nm Magnetpartikeln mit Silicahülle in Lungenzellen zeigen und so eine Energieabhängigkeit in der Aufnahme postulieren. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse von Stearns et al. (2001) die für 50 nm Titan-dioxidpartikel mit Cytochalasin D keinen Rückgang in der Aufnahme in A549 Zellen zeigen konnten. Da in dieser Arbeit unter anderem dieselbe Zelllinie zum Einsatz kam und ein klarer energie- und aktinabhängiger Rückgang für die 50 nm Silica Partikel gefunden wurde, stellt sich hier die Frage, ob die Aufnahmemechanismen nicht nur von der Größe der Partikel, sondern auch vom Material beeinflusst werden.

Generell ließ sich die Aufnahme der Partikel nicht vollständig inhibieren, obwohl sich, in Bezug auf den Inhibitor, ein konzentrationsabhängiger Rückgang mit dem Einsatz von Cytachalasin D (Cyt D) zeigte. Dies mag mit der Assoziation von Partikeln auf der Zelloberfläche zusammenhängen, die nicht weggewaschen wurden, da Cyt D nur die Aktinpolymerisation verhindert, was zu einer Verklusterung des Zellskeletts führt und nicht die Anlagerung von Partikeln auf der Zelloberfläche unterbindet (Parod & Brain, 1986). Dies kann durchflusszytometrisch zur gleichen Signalerhöhung wie eine Aufnahme führen (Stringer et al. 1996). Der Einsatz von Cyt D zeigte auf die Aufnahme der 200 nm Partikel in ECV304 und THP-1 Zellen keine Wirkung, was den Schluss zulässt, dass hier zwar energieabhängige Mechanismen greifen, diese aber nicht aktinabhängig sind.

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass energieabhängige Aufnahmeprozesse an der Internalisierung der Partikel in die Zellen beteiligt sind, stellte sich die Frage nach den genaueren Aufnahmemechanismen. Da eine Aktinbeteiligung gezeigt, die Aufnahme aber nicht ganz unterbunden werden konnte, kamen neben phagozytotischen Prozessen als Aufnahmemechanismus, gegen die die allerdings die geringe Größe der Partikel sprach, auch *Clathrin coated pits* und Caveolae, in Frage. Allerdings mussten auch die Beobachtungen aus der Größenmessung berücksichtigt werden, in denen sich die Partikel als große Agglomerate zeigten, die durchaus über phagozytotische Prozesse in die Zellen aufgenommen werden könnten

Churg konnte bereits 1996 eine mögliche Beteiligung des Zytoskeletts an der Partikelaufnahme durch Monolayer-Kulturen zeigen. Hierbei wurden die größeren Partikel vermutlich über einen Phagozytosemechanismus internalisiert, während für die kleinen Partikel ein Endozytosemechanismus über Clathrin bedeckte Vesikel diskutiert wurde. Geiser et al. (2005) konnten in alveolaren Makrophagen die Aufnahme feiner Polystyrolpartikel (1, 0.2 μm) mit Cyt D inhibieren, konnten dies aber nicht für 78 nm große Partikel zeigen. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls dafür, dass die Aufnahme ultrafeiner Modellpartikel nicht über einen klassischen Phagozytose Mechanismus abläuft. Auch Chithrani et al. (2006) fanden die Aufnahme von 50 nm kolloidalen Goldpartikeln über Clathrin vermittelte Endozytose erfolgt, ebenso wie Rejman et al. (2004), die diesen Aufnahmeweg für Partikel kleiner 200 nm aufzeigten. Dem widersprechend zeigen Veiga & Cossart (2006) die Beteiligung von Cla-

thrin und auch Aktin an der Aufnahme von Bakterien mit einer Größe von etwa $1\mu\text{m}$, was somit nicht ausschließt, dass in diesem Falle eine Aufnahme der Agglomerate teilweise über *Clathrin coated pits* erfolgt sein könnte in Verbindung mit einer Beteiligung des Zytoskeletts.

Auch Oberdörster et al. (2005) und Nel et al. (2006) beschreiben zusammenfassend für die Aufnahme von ultrafeinen Partikeln durch nicht-phagozytische Zellen, einen Caveolin oder Clathrin abhängigen, endozytotischen Mechanismus. Beide zeigen jedoch auf, dass neben der Partikelgröße die Partikeloberflächeneigenschaften und mögliche Modifikationen durch Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium (z. B. mit Proteinen des Lungen-Surfactants) die Aufnahme beeinflussen können.

Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen keine Beteiligung von Caveolae an der Aufnahme aller Partikelgrößen. Aus der Literatur sind diesen Aufnahmewege für Nanopartikel in die Zelle auch nur aus wenigen Studien bekannt. So konnten Rejman et al. (2004) diesen Weg für 500 nm große Partikel benennen, was allerdings merkwürdig erscheint, da eine maximale Größe der Caveolae von 100 nm in der Literatur beschrieben wird (Alberts et al., 2004, Gumbleton, 2001). In dieser Studie zeigte sich außerdem für die THP-1 Zellen, dass mit Hilfe der RT-PCR kein Caveolin in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte.

Eine Clathrin vermittelte Endozytose ist in dieser Studie in allen Zelllinien an der Aufnahme beteiligt, ganz besonders für die 200 nm Partikel in A549 und THP-1 Zellen. Sie scheint aber nicht allein für die Aufnahme verantwortlich zu sein, da sich auch hier die Aufnahme mit einem typischen Inhibitor, dem Chlorpromazin, nicht komplett unterbinden ließ. Ein Zelllinien spezifischer Unterschied zeigte sich ebenfalls, da die Aufnahme von 200 und 70 nm Partikeln in ECV304 Zellen überhaupt nicht zu inhibieren war. So scheint dieser Aufnahmeweg für die zuletzt genannten Partikel hier nicht beschränkt zu werden, obwohl er, gerade für die 200 nm Partikel in den anderen beiden Zelllinien den Hauptaufnahmeweg darzustellen scheint.

Wie oben bereits erwähnt, könnte die Aufnahme mehr von Oberflächeneigenschaften als von der Größe der Partikel abhängen. Die Aufnahme könnte durch Wechselwirkungen der Partikel mit Substanzen des umgebenden Mediums beeinflusst sein (Dutta et al., 2007). Ein solches *Coating* könnte zu einem Vergrößerungseffekt führen, wie die Größenmessungen in Medium mit Serumproteinen in dieser Studie für die 20, 50

und 70 nm Partikel, durch Agglomeration zeigten, oder Markierungseffekte (Opsonierung) bewirken, die auch ultrafeine Partikel den Rezeptoren der klassischen Phagozytose zugänglich machen würden. Dieser ausbleibende Vergrößerungseffekt für die 200 nm Partikel könnte die fehlende Hemmung der Aufnahme durch Cyt D und die gesteigerte Hemmung für die Clathrin vermittelte Endozytose erklären, da diese Partikel in etwa ihre Primärgröße beibehielten, nicht agglomerierten und so in etwa der Größe Clathrin beschichteter Vesikel entsprachen (Conner & Schmid, 2003; Kirchhausen, 2000). Eine unterschiedliche Affinität der Partikel zu diesen Substanzen kann zu einer verschiedenen schnellen oder starken Ummantelung derselben führen. Dies würde sich auf die Stärke der Aufnahme, wie auch auf die Aufnahmegeschwindigkeit auswirken. Mögliche ummantelnde Substanzen, die die Partikel für die klassische Phagozytose markieren, könnten Immunglobuline, Komplement (Opsonierung), Zucker oder Lipide sein. Z. B. konnte eine Studie mit Titandioxid zeigen, dass die Opsonierung der Partikel mit Surfactant-Protein-A zur Erhöhung der Phagozytoserate führt (Stringer & Kobzik, 1996). In diesem Zusammenhang muss hier erwähnt werden, dass, je länger die Partikel eines Typs nach der Ultraschallbehandlung in Suspension standen, bevor die Inkubation mit den Zellen startete, desto mehr Partikel wurden anschließend von den Zellen aufgenommen. Dies zeigte sich schon, wenn nur wenige Minuten Unterschied bestanden im Zeitraum zwischen Ultraschallbehandlung und Inkubationsstart. Eine Erklärung hierfür wären verstärkte Interaktionen von Serumproteinen des Mediums, in dem die Ultraschallbehandlung stattfand, mit den Nanopartikeln und damit verbundene stärkere Interaktion mit verschiedenen Rezeptortypen auf der Zelloberfläche.

7.5.2.2 Phagozytotischer Mechanismus der Silica Nanopartikel Aufnahme

Neben den Ergebnissen zur Aufnahme über *Clathrin coated pits* deuten die Inhibitionsstudien zur Aktinbeteiligung am Aufnahmeprozess und die gemessene Größe der Agglomerate für die 20, 50 und 70 nm Partikel auf die Beteiligung klassischer phagozytotischer Aufnahmemechanismen an der Internalisierung der verwendeten Silica Nanopartikel in die THP-1, aber auch in die A549 und ECV304 Zellen hin, obwohl die letzteren keine klassischen Phagozyten darstellen. Diese Möglichkeit als Aufnahmeprozesse wird bestätigt durch May & Machesky (2001),

die eine „Basismaschinerie“ der Phagozytose beschrieben, die in den meisten Zelltypen erhalten zu sein scheint. Deshalb sollte hier nun der oder die an der Phagozytose beteiligten Rezeptor(en) spezifiziert werden. Die klassische Phagozytose verfügt über ein breites Spektrum von Rezeptoren (wie in der Einleitung eingehend beschrieben) (Dobrovolskaia & McNeil, 2007). Eine Bestimmung der beteiligten Rezeptoren erfolgte zunächst durch durchflusszytometrische Inhibitionsstudien. Zur Rezeptorblockierung wurden relativ spezifische Liganden oder Chemikalien verwendet. Um ungewollte Nebeneffekte auszuschließen, wurden, soweit möglich, pro Rezeptortyp zwei verschiedene Inhibitoren untersucht. Aus diesen Untersuchungen ergab sich keine Beteiligung des Mannose-Rezeptors an der Aufnahme der Partikel in alle drei Zelllinien. Dies bestätigte die Erwartungen, da dieser Rezeptor in humanen Zellen nur für Makrophagen beschrieben wurde. Da eine Inhibition dieses Rezeptors auch in den hier verwendeten, zu Makrophagen differenzierten, THP-1 Zellen keine Hemmung in der Aufnahme aller Partikelgrößen zeigte, scheint dieser Weg für die Internalisierung der hier verwendeten Partikel nicht von Bedeutung zu sein. Eine andere Möglichkeit wäre, dass dieser Rezeptor nicht auf den untersuchten Zelltypen existiert. Letzteres konnte in Ermangelung von spezifischen Antikörpern und Primern weder im Western Blot noch mittels RT-PCR verifiziert werden und bleibt noch zu untersuchen.

Oberflächenrezeptoren, wie die Scavenger Rezeptoren wurden hingegen als mögliche Aufnahmemechanismen für Partikel bereits diskutiert (Husemann et al., 2002; Kim et al., 2005; Palecanda et al., 1999). Die Ergebnisse der Inhibitionsexperimente zeigten denn auch eine Hemmung der Aufnahme aller Partikelgrößen in A549 Zellen und für die 20 und 50 nm Partikel in ECV304 und THP-1 Zellen. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Kobzik (1995), der die Inhibition der Aufnahme unterschiedlicher Partikel mit einem Durchmesser um $1\mu\text{m}$ durch verschiedenen ScR-Liganden in Hamster Makrophagen zeigte. Die gezeigte Inhibition konnte ebenfalls in humanen alveolären Makrophagen *in vitro* und *in vivo* in Mäusen demonstriert werden (Kobzik, 1995). Der Einsatz eines spezifischen blockierenden Antikörpers gegen den Makrophagen Scavenger Rezeptor (MARCO) führte in COS Zellen wie auch in Maus Makrophagen zu einer deutlichen Reduktion der Titandioxid Aufnahme (Palecanda & Kobzik, 2000). Alveoläre Makrophagen von MARCO^{-/-} Mäusen wiesen ebenfalls eine verminderte Aufnahmekapazität

pazität von Titandioxid auf, und die exponierten Mäuse zeigten eine verstärkte Entzündungsreaktion (Arredouani et al., 2006, 2004). Weitere Untersuchungen der Rolle des ScR in der pathogenen Wirkung von Partikelexposition demonstrieren eine Beteiligung des ScR an der Quartz-induzierten Zelltoxizität und Apoptose (Chao et al. 2001; Hamilton et al., 2000). Somit scheint der ScR sowohl für die Aufnahme von nicht opsonierten Partikeln wie auch an der Regulierung der Immunantwort nach Partikelexposition beteiligt zu sein. Obwohl via RT-PCR die Existenz dreier charakteristischer ScR (MARCO, ScR AI, CD36) in A549 Zellen nicht, in ECV304 Zellen nur der ScR AI und in THP-1 Zellen nur CD36 gezeigt werden konnte, ist eine Beteiligung dieses Rezeptortyps an der Aufnahme von Nanopartikeln sehr wahrscheinlich und es ist durchaus möglich, dass noch nicht beschriebene ScR an der Internalisierung von Nanopartikeln beteiligt sein könnten. Ein interessanter Unterschied zwischen Nanopartikeln und Mikrometerpartikeln zeigt sich hier in einer Studie mit Quarzpartikeln von $1\ \mu\text{m}$, die den Weg der ScR vermittelten Aufnahme ausschloss und für Mikrometer als Hauptaufnahmeweg die $\text{Fc}\gamma\text{R}$ vermittelte Phagozytose beschrieb (Haberzettl, 2006). Es bleibt hier in weiteren Studien gezielt die verschiedenen Rezeptoren zu testen, um diesen Aufnahmeweg zu spezifizieren.

Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Inhibition der Komplement Rezeptoren zeigten eine Beteiligung an der Aufnahme der 20, 50 und 70 nm Partikel in alle drei verwendeten Zelllinien, und auch für die 200 nm Partikel in den ECV304 Zellen. Dies erscheint nicht weiter verwunderlich, da eine unspezifische Opsonierung durch Komplement im Zellkulturmedium und die gezeigte Größenveränderung, wie weiter oben bereits eingehend diskutiert, eine Aufnahme über diesen Rezeptortyp wahrscheinlich und attraktiv macht. Verwunderlich erscheint hier nur die Aufnahme der 200 nm Partikel in ECV304 Zellen, da diese von der Größenveränderung ausgenommen blieben. Nichts desto trotz scheint eine Opsonierung auszureichen, um diesen Weg der Aufnahme bei dieser Zelllinie zu beschleunigen. In den anderen beiden Zelllinien scheint dieser Aufnahmeweg nicht der Weg der Wahl für die Internalisierung der 200 nm sein, was wieder zelltypspezifische Unterschiede im Aufnahmeverhalten deutlich macht. Für einen solchen Opsonierungseffekt spricht auch, dass Plasma behandelte kristalline Quarzpartikel in geringem Maß an CR3b (Opsonierung für die CR Erkennung) und im hohen Maß an IgG, IgA und IgM binden. Die Vorbehandlung pro-

monozytischer Zellen mit Interferonen führte zu einer erhöhten Expression von $Fc\gamma RI$ und auch $CR3$ und $CR4$, die zu einer erhöhten Phagozytoserate im Vergleich mit unbehandelten Quarzpartikeln führt (Hettland et al., 2000). Der Nachweis der Existenz dieser Rezeptoren in den untersuchten Zelllinien könnte in Ermangelung von Antikörpern oder Primern nicht erfolgen und bleibt nachzuholen.

Eine Aufnahmehemmung in Bezug auf die $Fc\gamma R$ konnte nur für die THP-1 Zellen gezeigt werden. Dies scheint glaubwürdig, da dieser Rezeptortyp für klassische Phagozyten sehr typisch und auf anderen Zelltypen selten nachzuweisen ist (May & Machesky, 2001). Allerdings konnte hier mit Hilfe der RT-PCR die Existenz des $CD64$ ($Fc\gamma Ib$) auf ECV304 Zellen gezeigt werden. In den THP-1 Zellen fanden sich zwei der drei in dieser Studie gesuchten $Fc\gamma R$, $CD64$ und $CD32$. Für eine herausragende Rolle in der Phagozytose von Partikeln besonders im μm Bereich sprechen viele Studien (Desjardins et al., 2005; Haberzettl et al., 2008). So konnten Gagnon et al. (2002) die Aufnahme von $3\mu m$ Latexbeads, opsoniert mit Albumin, in Makrophagen über den Weg der FcR vermittelten Phagozytose zeigen. Die Größenmessung der hier verwendeten Nanopartikel in Erinnerung rufend, die Agglomerate von etwa $1\mu m$ für die 20, 50 und 70 nm Partikel zeigte, spricht dies ebenfalls für die Phagozytose vermittelte Aufnahme größerer, opsonierter Agglomerate aus den hier verwendeten Nanopartikeln. Für die Hemmung mit Lovastatin muß beachtet werden, dass Lovastatin die Cholesterolsynthese inhibiert und so nicht unbedingt nur auf die $Fc\gamma$ vermittelten Phagozytose einwirkt, die von Cholesterolsynthese reguliert wird, dies habe zwar keinen Einfluss auf die Membranfluidität (Loike et al., 2004), es kann allerdings nicht gesagt werden, ob eine Hemmung in der Aufnahme nicht auf der Stilllegung anderer zellulärer Prozesse beruht, da Lovastatin z. B. auch alle GTPasen blockiert. Somit kann nicht genau gesagt werden, ob der Rückgang in der Aufnahme hier auf eine spezifische Inhibition der Rezeptoren zurückzuführen ist. Die Suche nach weiteren geeigneten spezifischen Inhibitoren, oder die Entwicklung spezifischer rezeptorblockierender Antikörper ist somit erforderlich für weiterführende Studien der Aufnahmewege von Nanopartikeln in humane Zellen.

Die biologische Relevanz der hier gezeigten Aufnahmemechanismen, die durch eine, Medium bedingte, Opsonierung hervorgerufen worden sein könnte, zeigt sich in der Lunge durch Surfactantproteine und

darin enthaltene Immunglobuline. Der Surfactant ist eine die Alveolen auskleidende Schicht, die dazu dient die Oberflächenspannung an der Gas/Flüssigkeits-Interphase zu reduzieren, um einen Lungenkollaps zu verhindern. Außerdem dient er der Abwehr von Pathogenen. Komponenten des Surfactant können hierbei mit alveolaren Zellen, inhalieren Partikeln oder Mikroorganismen interagieren und zu einer Immunantwort führen (Johansson et al., 1994; McCormack & Whitsett, 2002). Die Hauptkomponente des Surfactant, das SP-A (*pulmonary Surfactant Protein-A*) erhöht hier sowohl die FcR- als auch die CR1-vermittelte Phagozytosekapazität (Tenner et al., 1989).

7.6 Kernlokalisation und Auswirkungen auf nukleäre Proteine

Hinweisen aus der Literatur folgend (Chen & von Mikecz, 2005) wurde in dieser Studie ein besonderes Augenmerk auf eine mögliche Penetration des Zellkerns durch die hier verwendeten Partikel gelegt. Bei diesen Partikeln handelte es sich um die gleichen, die in der genannten Studie zum Einsatz kamen. Konträr zu den Ergebnissen von Chen & von Mikecz, (2005) konnte in dieser Arbeit keine Kernlokalisation für die eingesetzten Partikel festgestellt werden, wie bereits oben eingehend diskutiert wurde und sich mit den Daten zahlreicher Studien deckt (Stearns et al., 2001; Takenaka et al., 2006; Xing et al., 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden durch fluoreszenzmikroskopische Studien erlangt, die auch als Methodik bei Chen & von Mikecz, (2005) eingesetzt worden war. Diese Arbeitsgruppe fand hier allerdings eine Kernlokalisation der 50 nm Partikel, obwohl die geringe Größe der Kernporen (26 μm) (Panté et al., 2002) und die hier gezeigte Agglomeration dieser Partikel in biologischen Medien dagegen spricht. Panté et al. (2002) fanden, dass maximal 39 μm große Goldkomplexe durch die Kernporen penetrieren konnten, und dies auch nur, weil diese mit Kernlokalisationssequenzen gekoppelt waren. Desweiteren konnte hier auf eine definitive Nachweismethode zurückgegriffen werden, die nicht von Chen & von Mikecz, (2005) eingesetzt worden war, die Transmissionselektronenmikroskopie. Auch hier konnte keine Kernlokalisation der Partikel festgestellt werden, auch speziell für die 50 nm Partikel nicht. Aufgrund der Assoziation mit einem grünen Fluorophor der in beiden Studien eingesetzten Partikel, läßt sich vermuten, dass Chen & von Mikecz, (2005)

einem Artefakt aufgelegt sind und in ihrem Fall nur das Fluorophor in den Kern gewandert ist. Dies würde sich mit der Äußerung von Frau von Mikecz decken, die auf dem Kongress zur Inhalationstoxikologie in Hannover 2008 beschrieb, dass sie diese Kerneffekte nur für „frische“ Partikel fände. Dies spräche für eine Degradation des Fluorophors mit der Zeit und damit einhergehend den Verlust in der Beobachtbarkeit dieser Effekte.

Eine weitere Ursache für die von Chen & von Mikecz, (2005) gefundene Kernfärbung könnten auch Kreuzstrahlungen anderer Fluorophore in den grünen Kanal sein, wie er in der vorliegenden Studie für Bisbenzimid gezeigt werden konnte, die zu falsch positiven Ergebnissen in Bezug auf eine Kernlokalisierung geführt haben könnten. Diese Kreuzeffekte in der Lichtemission fanden sich bei Untersuchungen der Degradation der Topoisomerase I, einem Kern assoziierten Enzym, durch die eingesetzten Nanopartikel und ihre vermutete Kernlokalisierung betreffend, mit dem Fluoreszenzmikroskop. Eine solche Degradation der Topoisomerase I und Proteinklusterbildungen im Zellkern, die von Chen & von Mikecz, (2005) postuliert und mit fluoreszenten Bildern gezeigt wurde, konnten weder für die von Chen & von Mikecz, (2005) eingesetzten Konzentrationen der Nanopartikel, noch durch höhere Konzentrationen erreicht werden. Außerdem zeigte sich, dass auch in unbehandelten Kontrollzellen solche Kluster vorkommen, und dies nicht automatisch für einen adversen Effekt auf die Topoisomerase steht. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Schwachstellen der Studie von Chen & von Mikecz, (2005), denn wo keine Kernlokalisierung, da auch keine direkten Effekte auf nukleäre Enzyme.

7.7 Nanopartikel als Wirkstofftransporter in der Medizin - Stand der Dinge und Zukunftsvision

In der medizinischen Wirkstoffentwicklung ist die gezielte Applikation aktiver Substanzen in biologische Systeme Gegenstand des Interesses. Um Wirkstoffe mit geringer Bioverfügbarkeit an den Wirkungsort bringen zu können, wurden in den letzten Jahren vermehrt nicht-invasive Methoden entwickelt. So wurden z. B. Peptide, β -Peptide, Polymere und Liposome als Transportvehikel (*Carrier*) eingesetzt (Desai et al., 1996; Qaddoumi et al., 2004; Schröder et al., 2007; Suh et al., 2003). Dabei stellt die Zellpenetration und die gezielte Verabreichung von Medika-

menten in spezifische Kompartimente der Zelle oder zum Durchqueren der Blut-Hirn-Schranke eine besondere Herausforderung dar (Kreuter et al., 2002; Tosi et al., 2007). Effektive Transportmechanismen werden hierfür gesucht und Nanopartikel stellen ein viel versprechendes Transportmittel dar. Amorphe Silica Nanopartikel wurden in diesem Zusammenhang, aufgrund ihrer geringen Toxizität, als Transportvehikel bereits untersucht und präklinische Tests laufen bereits (Bharali et al., 2005; Gemeinhart et al., 2005; Roy et al., 2005).

Durch die verschiedenen Schutzmechanismen der Organismen müssen solche Transporter von Medikamenten oder Nukleinsäuren bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um an den Wirkungsort gelangen zu können. Je nach gewünschter Anwendung müssen sie eine gewisse Hydro- oder Lipophilie aufweisen, dürfen eine bestimmte Größe nicht überschreiten, oder eine ganz bestimmte Anzahl an Wasserstoffbrücken-Donoren oder -Akzeptoren haben, um z. B. nach Injektion durch die Blutbahn zu den Zielzellen zu gelangen und dort die Zellmembran durchdringen zu können (Schröder, 2008). Solche *Carrier* dürfen keine toxischen Effekte hervorrufen und müssen ihre angebundene Wirkstoffe gezielt und effektiver als die freie Substanz allein an den Wirkort bringen.

In dieser Studie wurden neben den amorphen Silica Nanopartikel auch peptoidische Transporter eingehend untersucht. In einer Kooperation mit Frau Dr. Tina Schröder und dem Institut für Organischen Chemie der Universität Karlsruhe, wurden zusätzlich unterschiedliche peptoidische, polylysin-, bzw. polyargininartige Transporter auf ihre Toxizität und Fähigkeit zur Zellpenetration untersucht. Durch verschiedene Modifikationen oder Biokonjugationen sollte die Möglichkeit des Transports von Wirkstoffen ins Zellzytosol oder in den Zellkern getestet werden. In diesen Studien zeigte sich eine klare konzentrations- und zeitabhängige Aufnahme der Transporter in A549 und ECV304 Zellen. Desweiteren ergaben sich nur eine geringe Toxizität, die hauptsächlich auf die Anwesenheit der für die Detektion erforderliche Fluorophore zurückzuführen war. Aufgrund der geringen Größe von unter 10 nm (je nach Länge des Peptoidrückgrats) konnte eine schnelle Aufnahme in Zellen erreicht werden und die Wahl der an das Peptoid angehängten Seitenketten machten sogar eine Penetration in den Zellkern möglich. Es zeigte sich, dass Guanidinylseitenketten, im Gegensatz zu Aminoseitenketten, wie eine Kernlokalisationssequenz fungierten und die Trans-

porter so in den Zellkern penetrieren konnten. Dies bestätigt die oben genannte Vermutung, dass Nanostrukturen, und seien sie auch noch so klein, nur mit Hilfe einer solchen Sequenz zur Kernpenetration fähig sind, und es sich bei den Ergebnissen von Chen & von Mikecz, (2005) um Artefakte handeln muss.

Diese Erkenntnisse eröffnen die Möglichkeit eines gezielten Wirkstofftransports in Zellkerne und vergrößern das Potential der nutzbaren Transportsysteme und deren pharmazeutische Anwendung.

Zusammenfassend zeigte sich für die Silica Nanopartikel folgende Ergebnisse:

1. In biologischen Systemen zeigen sie keine akute Toxizität oder Auswirkungen auf die Proliferationsaktivität.
2. Eine Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies konnte nicht gezeigt werden.
3. Alle Partikelgrößen penetrieren Zellen verschiedensten Typs in einer konzentrations- und zeitabhängigen Art und Weise
4. Sie lokalisieren in zytoplasmatischen, membrangebundenen Vesikeln und lamellaren Körpern, konzentriert in der Nähe des Zellkerns, werden aber nicht in ihm oder in anderen Zellorganellen, wie Mitochondrien gefunden.
5. Sie zeigen keine negativen Effekte auf die Topoisomerase I.
6. Der Aufnahmemechanismus, der beschrieben wird, ist abhängig vom Grad der Agglomeration der Partikel und somit von der Größe dieser Agglomerate.
7. Primärpartikel, die die Zelle erreichen, in diesem Fall die 200 nm Partikel, nehmen den Weg der Clathrin vermittelten Endozytose.
8. Partikelagglomerate im Mikrometerbereich, wie es hier hauptsächlich für die 20, 50 und 70 nm Partikel der Fall war, werden über phagozytische Mechanismen internalisiert.
9. Zelltypabhängig sind hier die Scavenger- Komplement- und Fc γ - Rezeptoren beteiligt, abhängig davon, welche der genannten Rezeptoren in der jeweiligen Zelllinie vorhanden sind.

Somit erscheinen die Silica Partikel als Wirkstofftransporter geeignet. Allerdings ist eine genaue Charakterisierung der Partikel für den Einsatz in biologischen Systemen unumgänglich, um die gewünschte Partikelgröße einsetzen zu können. Die hier gefundenen Erkenntnisse zu den Aufnahmewegen machen, über eine gezielte Funktionalisierung der Partikeloberfläche, die gezielte und schnelle Aufnahme in Zellsysteme möglich.

Dasselbe gilt für die untersuchten peptoidischen Transporter. Diese zeigten eine geringe Toxizität, die hauptsächlich auf die Anwesenheit der für die Detektion erforderliche Fluorophore zurückzuführen waren. Aufgrund der geringen Größe konnte eine schnelle Aufnahme in Zellen erreicht werden und die Wahl der an das Peptoid angehängten Seitenketten machten sogar eine Penetration in den Zellkern möglich.

Somit scheint der gezielte Wirkstofftransport, nicht nur in Zellen, sondern auch in ganz bestimmte Zellkompartimente, mit Hilfe von Nanostrukturen in greifbare Nähe gerückt zu sein.

8 Abbildungsverzeichnis

1	Biokinetische Wege von Nanopartikeln im menschlichen Organismus	20
2	Oberflächeneigenschaften, die die Partikeleffekte auf biologische Systeme beeinflussen können	23
3	Ausbreitungs- und Depositionsmöglichkeiten von Partikeln verschiedener Größenfraktionen im menschlichen Körper	28
4	Endozytische Aufnahmewege in die Säugerzelle	30
5	Phagozytoserezeptoren und ihre Liganden	32
6	Mitochondriale Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes (MTT) zum blauen Formazanprodukt	59
7	Mitochondriale Reduktion des rötlichen Tetrazoliumsalzes (WST) zum gelben Formazanprodukt	61
8	Messung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies mittels DHR123 Test	65
9	Fluoreszein-markiertes Hexamer	87
10	Fluoreszein-markiertes Hexamer	87
11	Rhodamin-markiertes Pentamer mit Guanidinseitenketten	87
12	Pentamer mit Guanidinseitenketten	88
13	Fluoreszein-markiertes Hexamer mit Guanidinseitenketten	88
14	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Silica Partikel. (A) und (B) = Silica in H ₂ O, (C) = Silica in Medium. (A) Vergrößerung 85.000x, (B) Vergrößerung 50.000x, (C) Vergrößerung 7.000x	95
15	Bestimmung der Zellvitalität mittels Zellzählung	97
16	Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des WST-1 Tests in A549 und ECV304 Zellen	99
17	Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des WST-1 Tests in THP-1 Zellen	100
18	Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des MTT Tests . . .	101
19	Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des LDH Tests . . .	102

20	Messung der Zellproliferationsaktivität mittels ELISA (BrdU)	103
21	Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels DCF Test . . .	105
22	Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels DHR123 Test .	106
23	Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels DTNB Test . .	107
24	Repräsentative Histogramme der Aufnahme fluoreszieren- render Silica Partikel	109
25	Konzentrationsabhängigkeit in der Aufnahme von Silica Partikeln	110
26	Zeitabhängigkeit in der Aufnahme von Silica Partikeln . .	111
27	Aufnahmeinhibition durch Kälte	113
28	Aufnahmeinhibition durch Dinitrophenol (DNP)	114
29	Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des WST-1 Tests nach Inkubation mit den Inhibitoren	116
30	Aufnahmeinhibition durch Cytochalasin D	117
31	Aufnahmeinhibition durch p-Nitro	119
32	Aufnahmeinhibition durch hiFCS	120
33	Aufnahmeinhibition durch Mannan	121
34	Aufnahmeinhibition durch M- α -D-MP	122
35	Aufnahmeinhibition durch PolyG	123
36	Aufnahmeinhibition durch Fucoidan	124
37	Aufnahmeinhibition durch Chlorpromazin	125
38	Aufnahmeinhibition durch Filipin	126
39	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Stu- dien zur Inhibition der Aufnahmewege mit Hilfe der Fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS). Grüner Haken: Inhibition der Aufnahme war möglich, roter Strich: keine Inhibition	127
40	Rezeptornachweis auf RNA Ebene	129
41	Nachweis von Clathrin und Caveolin I auf RNA Ebene . .	130
42	Fluoreszenzmikroskopie von Silica Nanopartikeln in ECV304 Zellen	131

43	Fluoreszenzmikroskopie von Silica Nanopartikeln in A549 Zellen	132
44	TEM Aufnahmen von 20 nm Partikeln	134
45	TEM Aufnahmen von 50 nm Partikeln	135
46	TEM Aufnahmen von 70 nm Partikeln	136
47	TEM Aufnahmen von 200 nm Partikeln	137
48	Topoisomerase I Gehalt in A549 Zellen	139
49	Topoisomerase I Gehalt in ECV304 Zellen	140
50	Topoisomerase I Färbung von A549 Zellen am Fluoreszenzmikroskop 4h	141
51	Topoisomerase I Färbung von A549 Zellen am Fluoreszenzmikroskop 24h	143
52	FACS-Analyse der zellulären Aufnahme von peptoidischen Transportern	145
53	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der peptoidischen Transporter	146
54	Toxikologische Untersuchungen peptoidischer Transporter mittels WST-1 Test	147

9 Tabellenverzeichnis

1	Chemikalien	45
2	Laborgeräte und Software	46
3	Zusammensetzung des sauren Waschpuffers	48
4	Zusammensetzung des Kulturmediums für A549 Zellen (500 ml)	48
5	Zusammensetzung des Kulturmediums für ECV304 Zellen (500 ml)	49
6	Zusammensetzung des Kulturmediums für THP-1 Zellen (500 ml)	50
7	Verwendete Puffer und Lösungen für die Transmissions- elektronenmikroskopie	56
8	Verwendete Materialien und Geräte für die Transmissi- onselektronenmikroskopie	57
9	Material und Lösungen für den MTT Test	60
10	Material und Lösungen für den WST Test	61
11	Material und Lösungen für den LDH Test	63
12	Material und Lösungen für den DCF Test	65
13	Material und Lösungen für den DHR123 Test	66
14	Material und Lösungen für den DTNB Test	68
15	Detektorparameter und Einstellungen zur Messung der Partikelaufnahme	70
16	Verwendete Inhibitoren, deren Konzentration und Funktion	73
17	Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers	74
18	Zusammensetzung eines 5%igen Sammel- und 10%igen Trenngels	76
19	Zusammensetzung des 2 x SDS-Gel-Ladepuffer (Lämmli- Puffer)	77
20	Zusammensetzung des Laufpuffers	77
21	Zusammensetzung des Blotpuffers	78

22	Auflistung der verwendeten Antikörper für die Protein-analytik	78
23	Zusammensetzung des RNA-Laufpuffers 20x	82
24	Zusammensetzung des Formamid-Denaturierungspuffers	83
25	Zusammensetzung des RT-Mastermixes	83
26	Auflistung der mittels PCR gesuchten DNA-Fragmente, der Sequenzen der verwendeten PCR-Primer, ihrer Annealing Temperatur und der Größe des PCR-Produktes in Basenpaaren (Bp)	84
27	Zusammensetzung des PCR-Mastermixes	85
28	Allgemeines PCR-Programm, die Annealing Temperatur ist spezifisch für die jeweilig verwendeten Primer	86
29	Daten zu den verwendeten Silica Partikeln	91
30	Berechnung der Partikel Anzahl und Gesamtoberfläche . .	92
31	Größenverteilung der untersuchten Silica Partikel	93
32	Größenverteilung der 50 nm Silica Partikel über die Zeit .	94
33	Zetapotenzial der untersuchten Silica Partikel in [mV . . .	94
34	Mit Hilfe der RT-PCR untersuchte Proteine	128

10 Literaturverzeichnis

- Aderem, A. & Underhill, D.M.** (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593-623.
- Aderem A.** (2003). Phagocytosis and inflammatory response. *JID* 187(2), 340-345.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P.** (2004). Molekularbiologie der Zelle. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.*
- Albrecht, C.; Schins, R.P.F.; Höhr, D.; Becker, A.; Shi, T.; Knaapen, A.M. & Borm, P.J.A.** (2004). Inflammatory time course after quartz instillation. Role of tumor necrosis Factor. α and particle surface. *Am. Resp. Cell Mol. Biol.* 31, 292-301.
- Allen, L.A. & Aderem, A.** (1996). Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement and Fc receptor mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* 184(2), 627-637.
- Arredouani, M.S.; Yang, Z.; Ning, Y.Y.; Quin, G.; Soininen, R.; Tryggvason, K. & Kobzik, L.** (2004). The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J. Exp. Med.* 200(2), 267-272.
- Arredouani, M.S.; Palecanda, A.; Koziel, H.; Huang, Y.-C.; Imrich, A.; Sulahian, T.H.; Ning, Y.Y.; Yang, Z.; Pikkarainen, T.; Sankala, M.; Vargas, S. O.; Takeya, M.; Tryggvason, K. & Kobzik, L.** (2005). MARCO is the major binding receptor for unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 175, 6085-6064.
- ASTM International Standards** (2006). E2456-06, Standard terminology relating to nanotechnology.
- Austin, R. H. & Lim, S-f.** (2008). The Sackler Colloquium on promises and perils in nanotechnology for medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(45), 17217-17221.
- Bharali, D. J.; Kleibor, I.; Stachowiak, E. K.; Dutta, P.; Roy, I.; Kaur, N.; Bergey, E. J.; Pradas, P.N. & Stachowiak, M.K.** (2005). Organically modified silica nanoparticles: a noviral vector for *in vivo* gene delivery and expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(32), 11539-11544.

-
- Bonini, M. G.; Rota, C.; Tomasi, A. & Mason, R. P.** (2006). The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy?. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 968-975.
- Borm, P. J. A.; Höhr, D.; Steinfartz, Y.; Zeitträger, I. & Albrecht, C.** (2000). Chronic inflammation and tumor formation in rats after intratracheal instillation of high doses of coal dust, titanium dioxide and quartz. *Inh. Toxicol* 12(3), 225-231.
- Borm, P. J. A. & Tran, L.** (2002). From quartz hazard to quartz risk: the coal mines revisited. *Ann. Occup. Hyg.* 46(1), 25-32.
- Brown, D. M.; Donaldson, K.; Borm, P. J.; Schins, R. P.; Dehnhardt, M.; Gilmour, P.; Jimenez, L. A. & Stone, V.** (2004). Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286, L344-L353.
- Bubenik, J.; Baresova, M.; Viklicky, V.; Jakoubkova, J.; Sainerova, H. & Donner, J.** (1973). Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumor-specific antigen. *Int. J. Cancer* 11, 765-773.
- Campbell, N. A.** (1998). *Biologie. Hrsg. Markl, J., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.*
- Castranova, V.** (2000). From coalmine dust to quartz: mechanisms of pulmonary pathogenicity. *Inh. Toxicol.* 12(3), 7-14.
- Castranova, V. & Vallyathan, V.** (2000). Silicosis and coal workers pneumoconiosis. *Environ. Health Perspect.* 108(4), 675-684.
- Castranova, V.** (2004). Signalling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 37(7), 916-925.
- Chalupa, D. C.; Morrow, P. E.; Oberdörster, G.; Utell, M. J. & Frampton, M. W.** (2004). Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environm. Health Perspect.* 112(8), 879-882.
- Chao, S. K.; Hamilton, R. H.; Pfau, J. C. & Holian A.** (2001). Cell surface regulation of silica induced apoptosis by the SR-A scavenger receptor in a murine lung macrophage cell line (MH-S). *Toxicol. Appl. Pharmacol* 174, 10-16.
- Chen, M.; Dittmann, A.; Kuhn, A.; Ruzicka, T. & von Mikecz, A.** (2005).

- Recruitment of topoisomerase I (Scl-70) to nucleoplasmic proteasomes in response to xenobiotics suggests a role for altered antigen processing in scleroderma. *Arthr. Rheum.* 52(3), 877-884.
- Chen, M. & von Mikecz, A.** (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp. Cell Research* 305, 51-62.
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. & Chan, W. C. W.** (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 6(4), 662-668.
- Chithrani, B. D. & Chan, W. C. W.** (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 7(6), 1542-1550.
- Churg, A.** (1996). The uptake of mineral particles by pulmonary epithelial cells. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 154, 1124-1140.
- Clouter, A.; Brown, D.; Höhr, D.; Borm, P. & Donaldson, K.** (2001). Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus standard DQ12 quartz: Particle surface correlates. *Toxicol. Sciences.* 63, 90-98.
- Colvin, V. L.** (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat. Biotechnol.* 21, 1166-1170.
- Conner, S. D. & Schmid, S. L.** (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
- Cox, D.; Tseng, C. C.; Bjekic, G. & Greenberg, S.** (1999). A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* 274, 1240-1247.
- Denizot, F. & Lang, R.** (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89, 271-277.
- Desai, M. P.; Labhasetwar, V.; Amidon, G. L. & Levy, R. J.** (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. *Pharmac. Research* 13(12), 1838-1844.
- Desai, M. P.; Labhasetwar, V.; Walter, E.; Levy, R. J. & Amidon, G. L.** (1997). The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharmac. Research* 14(11), 1586-1573.
- Desjardin, M.; Houde, M. & Gagnon, E.** (2005). Phagocytosis: the convo-

-
- luted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunolog. Rev.* 207, 158-165.
- Diabaté, S.; Mühlhopt, S.; Paur, H.R. & Krug, H.F.** (2002). Pro-inflammatory effects in lung cells after exposure to fly ash aerosol via the atmosphere or the liquid phase. *Ann. occup. Hyg.* 46, 382-385.
- Dick, C. A.; brown, D. M.; Donaldson, K. & Stone, V.** (2003). The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particles types. *Inh. Toxicol.* 15, 39-52.
- DIN CEN ISO/TS 27687** (2008). Nanotechnologien - Terminologie und Begriffe für Nanoobjekte - Nanopartikel, Nanofasern und Nanoplättchen. 1-13.
- Dip, K. & Anderson, T.** (2000). BETA 2 integrin signaling in leukocytes. *Font. Biosci.* 5, 438-451.
- Dirks, W. G.; MacLeod, R. A. & Drexler, H. G.** (1999). ECV304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross-contamination at source. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 35, 558-559.
- Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E.** (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnol.* 223, advanced online publication, 1-10.
- Dockery, D. W.; Luttmann-Gibson, H.; Rich, D. Q.; Link, M. S.; Schwartz, J. D.; Gold, D. R.; Koutrakis, P.; Verrier, R. L. & Mittleman, M. A.** (2005). Particulate air pollution and nonfatal cardiac events. Part II. Association of air pollution with confirmed arrhythmias recorded by implanted defibrillators. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 124, 83-126.
- Donaldson, K. & MacNee, W.** (2001). Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM10). *Int. Hyg. Environ. Health* 203, 411-415.
- Donaldson, K.; Stone, V.; Tran, L.; Kreyling, W. & Borm, P. J.** (2004). Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.* 61 727-728.
- Donaldson, K.; Tran, L.; Jimenez, L. A.; Duffin, R.; Newby, D. E. & Mills, N.** (2005). Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Part. Fibre Toxicol.* 2(10) 1-14.
- Donaldson, K.; Stone, V.; Tran, L.; Kreyling, W. & Borm, P. J. A.** (2006). Nanotoxicology. <http://www.occenvmed.com>.
- Drexler, H. G.; Quentmeier, H.; Dirks, W. G. & MacLeod, R. A.** (2002).

- Bladder carcinoma cell line ECV304 is not a model system for endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 38, 185-186.
- Dutta, D.; Sundaram, S. K.; Teerguarden, J. G.; Riley, B. J.; Fifield, L. S.; Jacobs, J. M.; Addleman, S. R.; Kaysen, G. A.; Moudgil, B. M. & Weber, T. J.** (2007). Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol Sciences* 100(1), 303-315.
- Elder, A.; Gelein, R.; Silva, V.; Feikert, T.; Opanashuk, L. & Carter, J.** (2006). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ. Health Perspect.* 114(8), 1172-1178.
- Fathi, M.; Johansson, A.; Lundborg, M.; Orre, L.; Skold, C.M. & Camner, P.** (2001). Functional and morphological differences between human alveolar and interstitial macrophages. *Exp. Mol. Pathol* 70(2), 77-82.
- Flegler, S. L.; Heckman, J.W.Jr. & Klomprens, K.L.** (1995). Elektronenmikroskopie (Grundlagen-Methoden-Anwendungen). *Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.*
- Foo, A. H.; Fletscher, S. P.; Langler, R. F.; Porter, C. H. & Branch, D. R.** (2007). Structure-function studies for *in vitro* chemical inhibition of Fc γ receptor-mediated phagocytosis. *Transfusion* 47, 290-298.
- Fritsch, S.; Diabaté, S. & Krug, H. F.** (2007). Incinerator fly ash provokes alteration in redox equilibrium and liberation of arachidonic acid *in vitro*. *Biol. Chem.* 387, 1421-1428.
- Gagnon, E.; Duclos, S.; Rondeau, C.; Chevet E.; Cameron, P. H.; Steele-Mortimer, O.; Paiement, J.; Bergeron, J. J. M. & Desjardins, M.** (2002). Endoplasmatic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131.
- Gallagher, J.; Heinrich, U.; George, M.; Hendee, L.; Phillips, D. H. & Lewtas, J.** (1994). Formation of DNA adducts in rat lung following chronic inhalation of diesel emissions, carbon black and titanium dioxide particles. *Carcinogenesis* 15, 1291-1299.
- Garcia-Garcia, E. & Rosales, C.** (2002). Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 72, 1092-1108.
- Geiser, M.; Rothen-Rutishauser, B.; Kapp, N.; Schürch, S.; Kreyling, W.; Schulz, H.; Semmler, M.; Im Hof, V.; Heyder, J. & Gehr, P.** (2005).

-
- Ultrafine particles cross cellular membranes by nophagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Persp.* 113(11), 1555-1560.
- Gemeinhart, R. A.; Luo, D. & Saltzman, W. M.** (2005). Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. *Bio-technol. Prog.* 21, 532-537.
- Geys, J.; Coenegrachts, L.; Vercammen, J.; Engelborghs, Y.; Nemmar, A.; Nemery, B. & Hoet, P. H. M.** (2006). *In vitro* study of the pulmonary translocation of nanoparticles. A preliminary study. *Toxicol. Lett.* 160, 218-226.
- Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H. & Parks, W. P.** (1973). *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417-1423.
- Ghiran, I.; Barbashov, S. F.; Klickenstein, L. B.; Tas, S. W.; Jensenius, J. C. & Nicolson-Weller, A.** (2000). Complement C1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectins. *Exp. Med.* 192, 1797-1808.
- Gold, E. S.; Underhill, D. M.; Morrissette, N. S.; Guo, J.; McNiven, M. A. & Aderem, A.** (1999). Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* 190(12), 1849-1856.
- Goodhew, P. J. & Humphreys, F. J.** (1991). Elektronenmikroskopie (Grundlagen und Anwendungen). *McGraw-Hill Book Company, London.*
- Gratton, S. E. A.; Ropp, P. A.; Pohlhaus, P. D.; Luft, J. C.; Madden, V. J.; Napier, M. E. & DeSimone, J. M.** (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(33), 11613-11618.
- Greaves, D. R. & Gordon, S.** (2005). Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors *J. Lipid Research* 46, 11-20.
- Greenberg, S.** (2001). Diversity in phagocytosis signaling. *Cell Sciences* 114(6), 1039-1040.
- Gultekin, H. & Heermann, K. H.** (1988). The use of polyvinylidene-difluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* 172, 320-329.
- Gumbleton, M.** (2001). Caveolae as potential macromolecule trafficking

- compartments within alveolar epithelium. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49, 281-300.
- Gupta, A. K.; Gupta, M.; Yarwood, S. J. & Curtis, A. S. G.** (2003). Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts. *J. Contr. Release* 95, 197-207.
- Haberzettl, P.** (2006). Mechanismen und Konsequenzen der Partikelaufnahme in alveolaren Makrophagen. Rolle des Aktzytoskeletts und des Fc γ -Rezeptors-II. *Dissertation, Universität Düsseldorf*.
- Haberzettl, P.; Schins, R. P. F.; Höhr, D.; Wilhelmi, V.; Borm, P. J. A. & Albrecht, C.** (2008). Impact of the Fc γ II-receptor on quartz uptake and inflammatory response by alveolar macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294, 1137-1148.
- Hameri, K.; Gaman, A.; Hussein, T.; Raisanen, J.; Niemela, R.; Aalto, P. P. & Kulmala, M.** (2003). Particle concentration profile in a vertical displacement flow: A study in an industrial hall. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 18, 183-192.
- Hamilton, R. H; de Villiers, W. J. S. & Hollian, A.** (2000). Class a type II scavenger receptor mediates silica induced apoptosis in chinese hamster ovary cell line *Toxicol. Appl. Pharmacol* 162, 100-106.
- Hamilton Jr., R. F; Thakur, S. A.; Mayfair, J. K. & Hollian, A.** (2006). MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. *J. Biol. Chem.* 281(45), 34218-34226.
- Harder, T. & Simons, K.** (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 534-542.
- Harrison, R. M., Smith, D. J. T. & Kibble, A. J.** (2004). What is responsible for the carcinogenicity of PM_{2.5}?. *Occup. Environ. Health Perspect.* 109(4), 599-604.
- Hart, G. A. & Hesterberg, T. W.** (1998). *in vitro* toxicity of respirable-size particles of diatomaceous earth and crystalline silica compared with asbestos and titanium dioxide. *J. Occup. Environ. Med.* 40(1), 29-42.
- Henley, J. R.; Cao, H. & McNiven, M. A.** (1999). Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. *Faseb J.* 13, S243-S247.
- Hetland, G.; Namork, E.; Schwarze P. E. & Aase, A.** (2000). Mechanism

-
- for uptake of silica particles by monocytic U937 cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 19(7), 412-419.
- Heyder, J.; Gebhart, J.; Rudolf, G.; Schiller, C. & Stahlhofen, W.** (1986). Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005-15 μm . *J. Aerosol Sci.* 17, 811-825.
- Ho, Y. S.; Liou, H. B.; Lin, J. K.; Jeng, J. H.; Pan, M. H.; Lin, Y. P.; Guo, H. R.; Ho, S. Y.; Lee, C. C. & Wang, Y. J.** (2002). Lipid peroxidation and cell death mechanisms in pulmonary epithelial cells induced by peroxynitrite and nitric oxide. *Arch. Toxicol.* 76, 484-493.
- Hoet, P. H. M.; Brüske-Hohlfeld, I. & Salata, O. V.** (2004). Nanoparticles - known and unknown health risks. *J. Nanobiotech.* 2(12), 1-15.
- Hughes, L. S.; Cass, G. R.; Gone, J.; Ames, M. & Olmez, I.** (1998). Physical and chemical characterization of atmospheric ultrafine particles in the Los Angeles area. *Environ. Sci. Technol.* 83, 591-599.
- Husemann, J.; Loike, J. D.; Anankov, R.; Febbraio, M. & Silverstein, S. C.** (2002). Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40, 195-205.
- Ibald-Mulli, A.; Wichmann, H. E.; Kreyling, W. & Peters, A.** (2002). Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J. Aerosol. Med.* 15, 189-201.
- Imrich, A.; Ning, Y. Y. & Kobzik, L.** (1999). Intracellular oxidant production and cytokine response in lung macrophages: evaluation of fluorescent probes. *J. Leukoc. Biol.* 65(4), 499-507.
- Iyer, R.; Hamilton, R. F.; Li, L. & Holian, A.** (1996). Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114, 84-92.
- Janusz, M. J.; Austen, K. F. & Czop, J. K.** (1986). Isolation of soluble yeast beta-glucans that inhibit human monocyte phagocytosis mediated by beta-glucans receptor. *J. Immunol* 137, 3270-2376.
- Johansson, J.; Curstedt, T. & Robertson M.** (1994). The proteins of the surfactant system. *Eur. Resp. J* 7(2), 372-391.
- Jordan, A.; Scholz, R.; Maier-Hauff, K.; van Landeghem, F. K.; Waldöfner, N.; Teichgräber, U.; Pinkernelle, J.; Bruhn, H.; Neumann, F.; Thiesen, B.; von Deimling, A. & Felix, R.** (2006). The effect of ther-

- motherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J. Neurooncol.* 78(1), 7-14.
- Kaksonen, M.** (2008). Taking apart the endocytic machinery. *J. Cell. Biol.* 180(6), 1059-1060.
- Kamata, H.; Honda, S.; Maeda, S.; Chang, L.; Hirata, H. & Karin, M.** (2005). Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120(5), 649-661.
- Kanno, S.; Furuyama, A. & Hirano, S.** (2007). A murine scavenger receptor MARCO recognizes polystyrene nanoparticles. *Toxicol. Sciences* 97(2), 398-406.
- Kelly, F. J.** (1999). Gluthathione: in defence of the lung. *Food and Chem. Toxicol.* 37, 963-966.
- Kim, S. R.; Lee, D. Y.; Chung, E. S.; Oh, U. T.; Kim, S. U. & Jin, B. K.** (2005). Transient receptor potential vanilloid subtype I mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurosci.* 25, 662-671.
- Kim, J.-S.; Yoon, T.-J.; Yu, K.-N.; Noh, M. S.; Woo, M.; Kim, B.-G.; Lee, K.-H.; Sohn, B.-H.; Park, S.-B.; Lee, J.-K. & Cho, M.-H.** (2006). Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *J. Vet. Sci.* 7(4), 321-326.
- Kirchhausen, T.** (2000). Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 699-727.
- Klotz, L.-O.; Holbrock, N. J. & Sies, H.** (2001). UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. *Curr. Probl. Dermatol.* 29, 95-113.
- Kobzik, L.** (1995). Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. *Am. Assoc. Immunol.*, 367-376.
- Kraal, G.; van der Laan, L. J. W.; Elomaa, O. & Tryggvason, K.** (2000). The macrophage receptor MARCO. *Microb. Infect.* 2, 313-316.
- Kreyling, W.; Semmler, M.; Erbe, F.; Mayer, P.; Takenaka, S. & Schulz, H.** (2002). Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from the lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J. toxicol Environm. Health, Part A* 65, 1513-1530.
- Kreyling, W. G.; Tuch, T.; Peters, A.; Pitz, M.; Heinrich, J. & Stolzel, M.** (2003). Diverging long-term trends in ambient urban particle mass

-
- and number concentrations associated with emission changes caused by the German unification. *Atmos. Environ.* 37, 3841-3848.
- Kuempel, E. D.; Attfield, M. D.; Vallyathan, V.; Lapp, N. L.; Hale, J. M.; Smith, R. J. & Castranova, V.** (2003). Pulmonary inflammation and crystalline silica in respirable coal mine dust: dose response. *J. Biosci.* 28(1), 61-69.
- Kuhlbusch, T. A.; Neumann, S. & Fissan, H.** (2004). Number size distribution, mass concentration, and particle composition of PM1, PM2.5 and PM10 in bag filling areas of carbon black production. *J. Occup. Environ. Hyg.* 1, 660-671.
- Kuhlbusch, T. A. & Fissan, H.** (2006). Particle characteristics in the reactor and pelletizing areas of carbon black production. *J. Occup. Environ. Hyg.* 3, 558-567.
- Kurzchalia, T. V. & Parton, R. G.** (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 424-431.
- Kwiatkowska, K. & Sobota, A.** (1999). Signaling pathways in phagocytosis. *BioEssays* 21, 422-431.
- Laaksonen, T.; Santos, H.; Vihola, H.; Salonen, J.; Riikonen, J.; Heikkila, T.; Peltonen, L.; Kumar, N.; Murzin, D. Y.; Lehto, V. P. & Hirvonen, J.** (2007). Failure of MTT as a toxicity testing agent for mesoporous silicon microparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1913-1918.
- Lämml, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lander, H. M.** (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11, 118-124.
- Lehninger, A. L.** (1977). *Biochemie. 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim.*
- Leonarduzzi, G.; Arkan, M. C.; Basaga, H.; Chiarpotto, E.; Sevianian, A. & Poli, G.** (2000). Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1370-1378.
- Li, N.; Sioutas, C.; Cho, A.; Schmitz, d.; Misra, C.; Sempf, J.; Wang, M.; Oberley, T.; Froines, J. & Nel, A.** (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* 111(4), 455-460.
- Limbach, L. K.; Li, Y.; Grass, R. N.; Brunner, T. J.; Hintermann, M. A.; Muller, M.; Gunther, D. & Stark, W.** (2005). Oxide nanoparticle upt-

- ake in human lung fibroblasts: effects of particles size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9370-9376.
- Limbach, L. K.; Wick, P.; Manser, P.; Grass, R. N.; Bruinink, A. & Stark, W.** (2007). Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity in oxidative stress. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4158-4163.
- Lin, W.; Huang, Y.-w.; Zhou, X.-D. & Ma, Y..** (2006). *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 217, 252-259.
- Loike, J. D.; Shabatai, D. Y.; Neuhut, R.; Malitzky, S.; Lu, E.; Husemann, J.; Goldberg, I. J. & Silverstein, s. C.** (2004). Statin inhibition of Fc receptor-mediated phagocytosis by macropophages is modulated by cell activation and cholesterol. *Arteriscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2051-2056.
- Long, T. C.; Tajuba, J.; Sama, P.; Saleh, N.; Swartz, C.; Parker, J.; Hester, S.; Lowry, G. V. & Veronesi, B.** (2007). Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ. Health Perspect.* 115, 1631-1637.
- May, R. C. & Machesky, L. M.** (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Science* 114, 1061-1077.
- May, R. C.; Hall, A. & Machesky, L. M.** (2000). Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by Fc γ R or CR3. *Nature Cell Biol.* 2(4), 246-248.
- Maynard, A. D.; Aitken, R. J.; Butz, T.; Colvin, V.; Donaldson, K.; Oberdörster, G.; Philbert, M. A.; Ryan, J.; Seaton, A. & Stone, V.** (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444, 267-269.
- McCormack, F. X. & Whitsett, J. A.** (2002). The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *The J. Clin. Invest.* 109(6), 707-712.
- Monteiro, R. & Van De Winkel, J.** (2003). IgA Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 177-204.
- Monteiro-Riviere, N. A. & Inman, A. O.** (2006). Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. *Carbon* 44, 1070-1078.
- Moore, M. N.** (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for

-
- the health of the aquatic environment?. *Environ. Int.* 32(8), 967-976.
- Mortimer, C. E.** (1996). *Chemie. Das Basiswissen der Chemie. Georg Thieme Verlag, 6. Auflage, Stuttgart/New York*
- Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1666-1680.
- Mühlfeld, C.; Gehr, P. & Rothen-Rutishauser, B.** (2008). Translocation and cellular entering mechanisms of nanoparticles in the respiratory tract. *Swiss. Med. WKLY* 138(27-28), 387-391.
- Mytar, B.; Wolozyn, M.; Macura-Biengun, A.; Hajto, B.; Ruggiero, I.; Piekarska, B. & Zembala, M.** (2004). Involvement of pattern recognition receptors in the induction of cytokines and reactive oxygen intermediates production by human monocytes/macrophages stimulated with tumor cells. *Anticancer Res.* 24(4), 2287-2293.
- Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L. & Li, N.** (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622-627.
- Nemmar, A.; Vanbilloen, H.; Hoylaerts, M.; Hoet, P.; Verbruggen, A. & Nemery, B.** (2001). Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am. Respir. Crit. Care Med.* 164(9), 1665-1668.
- Nemmar, A.; Hoet, P. H. M.; Vanquickenborne, B.; Dinsdale, D.; Thomeer, M.; Hoylaerts, M. F.; Vanvilloen, H.; Mortelmans, L. & Nemery, B.** (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105, 411-414.
- Nichols, B. J. & Lippincott-Schwartz, J.** (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* 11(10), 406-412.
- Nikula, K. J.; Snipes, M. B.; Barr, E. B.; Griffith, W. C.; Henderson, R. F. & Mauderly J. L.** (1995). Comparative toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 25, 80-94.
- Noorman, F.; Barrett-Bergshoeff, M. M.; Biessen, E. A. L.; Van De Bilt, E.; Van Berkel, T. J. C. & Rijken, D. C.** (1997). Cluster mannosides can inhibit mannose receptor-mediated tissue-type plasminogen activator degradation by both Rat and human cells. *Hematology* 26, 1303-1310.
- Oberdörster, G; Finkelstein, J.; Johnston, C.; Gelein, R.; Cox, C.; Baggs,**

- R. & Elder, A.** (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 96, 5-86.
- Oberdörster, G.** (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74 1-8.
- Oberdörster, G.; Sharp, Z.; Atudorei, V.; Elder, A.; Gelein, R. & Kreyling, W.** (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol.* 16(6-7) 437-445.
- Oberdörster, G.; Oberdörster, E. & Oberdörster, J.** (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113(7), 823-839.
- Oberdörster, G.; Maynard, A.; Donaldson, K.; Castranova, V.; Fitzpatrick, J.; Ausman, K.; Carter, J.; Karn, B.; Kreyling, W.; Lai, D.; Olin, S.; Monteiro-Riviere, N.; Warheit, D. & Yang, H.** (2005b). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle Fibre Toxicol.* 2(8), 1-15.
- O'Brien, D.K. & Melville, S.B.** (2003). Multiple effects on *Clostridium perfringens* binding, uptake and trafficking to lysosomes by inhibitors of macrophage phagocytosis receptors. *Microbiology* 149, 1377-1386.
- Ofek, I.; Goldhar, J. & Keisari, Y.** (1996). Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 239-276.
- Okamoto, C.T.** (1998). Endocytosis and transcytosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29, 215-228.
- Orr, G.; Panther, D.J.; Phillips, J.L.; Tarasevich, B.J.; Dohnalkova, A.; Hu, D.; Teeguarden, J.G. & Pounds, J.G.** (2007). Submicrometer and nanoscale inorganic particles exploit the actin machinery to be propelled along microvilli-like structures into alveolar cells. *ACSNano* 1(5), 463-475.
- Palecanda, A.; Paulauskis, J.; Al-Mutairi, E.; Imrich, A.; Qin, G.; Suzuki, H., Kodama, T.; Tryggvason, K.; Koziel, H. & Kobzik, L.** (1999). Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unsonized environmental particles. *J. Exp. Med.* 189(9), 1497-1506.
- Palecanda, A. & Kobzik, L.** (200). Alveolar macrophage-environmental particle interaction: analysis by flow cytometry. *Methods* 21, 241-247.

-
- Palecanda, A. & Kobzik, L.** (2001). Receptors for unopsonized particles: The role of alveolar macrophage scavenger receptors. *Curr. Molecular Med.* 1, 589-595.
- Panté, N. & Kann, M.** (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameter of ≈ 39 nm. *Molec. Biol Cell* 13, 425-434.
- Parod, R. J. & Brain, J. D.** (1983). Uptake of latex particles by macrophages: characterization using flow cytometry. *Am. J. Physiol.* 245(3), CC220-226.
- Parod, R. J. & Brain, J. D.** (1986). Immune opsonin-independent phagocytosis by pulmonary macrophages. *J. Immunol.* 136(6), 2041-2047.
- Patton, J. S.; Fishburn, C. S. & Weers, J. G.** (2004). The lung as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 338-344.
- Peiser, L.; Subhankar, M. & Siamon, G.** (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 123-128.
- Pernis, B.** (2005). Silica and the immune system. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 76(2), 38-44.
- Peters, A.; Wichmann, H. E.; Tuch, T.; Heinrich, J. & Heyder, J.** (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 1376- 1383.
- Peters, A.; Veronesi, B.; Calderón-Garciduenas, L.; Gehr, P.; Chen, L. C.; Geiser, M.; Reed, W.; Rothen-Ruthishauser, B.; Schürch, S. & Schulz, H.** (2006). Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part. Fibre Toxicol.* 3(13), 1-13.
- Platt, N. & Gordon, S.** (2001). Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional?- The mouse tail. *J. Clin. Investigations* 108(5), 649-654.
- Plattner, H. & Zingsheim, H. P.** (1987). Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie (Ein kritischer Leitfaden zur biologischen Ultrastrukturforshung für Biologen und Mediziner). *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.*
- Pommier, Y.; Pourquier, P.; Fan, Y. & Strumberg, D.** (1998). Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1400, 83-106.
- Pope, C. A. III, Burnett, R. T.; Thun, M. J.; Calle, E. E.; Krewski, D.; Ito, K. & Thurston, G. D.** (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality

- and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J. Am. Med. Assoc.* 287, 1132-1147.
- Porter, D. W.; Hubbs, A. F.; Mercer, R.; Robinson, V. A.; Ramsey, D.; McLaurin, J.; Khan, A.; Batelli, L.; Brumbaugh, K.; Teass, A. & Castranova, V.** (2004). Progression of lung inflammation and damage in rats after cessation of silica inhalation. *Toxicol. Sciences* 79, 370-380.
- Qaddoumi, M. G.; Ueda, H.; Yang, J.; Davda, J.; Labhasetwar, V. & Lee, V. H. L.** (2004). The characteristics and mechanisms of uptake of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers. *Pharmac. Research* 21(4), 641-648.
- Rae, T.** (1975). A study on the effects of particulate metals of orthopaedic interest on murine macrophages *in vitro*. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* 57(4), 444-450.
- Rahman, I. & MacNee, W.** (1999). Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am. Physiol. Soc.*, 1067-1088.
- Rahman, I.** (2002). Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr. Drug targets. Inflamm. Allergy* 1, 291-315.
- Rao, K. M. K.; Porter, D.; Meighan, T. & Castranova, V.** (2004). The source of inflammatory mediators in the lung after silica exposure. *EHP* 112(17), 1679-1685.
- Ravetch, J. V. & Bolland, S.** (2001). IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290.
- Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S. & Hoekstra, D.** (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 377, 159-169.
- Renwick, L. C.; Donaldson, K. & Clouter, A.** (2001). Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 119-127.
- Reynolds, E. S.** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17, 208-212.
- Rieder, N. & Schmidt, K.** (1987). Morphologischen Arbeitsmethoden in der Biologie. *VCH Verlag, Weinheim.*
- Rimal, B.; Greenberg, A. K. & Rom, W. N.** (2005). Basic pathogenetic

-
- mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr. Opinion in Pul. Med.* 11(1), 169-173.
- Rota, C.; Chignell, C. F. & Mason, R. P.** (1999). Evidence for free radical formation during the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 873-881.
- Rothen-Rutishauser, B. M.; Schurch, S.; Hänni, B.; Kapp, N. & Gehr, P.** (2006). Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4353-4359.
- Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Bharali, D. J.; Pudavar, H. E.; Mistretta, R. A.; Kaur, N. & Pradas, P. N.** (2005). Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(2), 279-284.
- Sagai, M.; Lim, H. & Ichinose, T.** (2000). Lung carcinogenesis by diesel exhaust particles and the carcinogenic mechanism via active oxygens. *Inh. Toxicol.* 12(3), 215-223.
- Samet, J. M.; Dominici, F.; Currier, F. C.; Coursac, I. & Zeger, S. L.** (2000). Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N. Engl. J. Med.* 343, 1742-1749.
- Sautès-Fridman, C.; Cassard, L.; Cohen-Solal, J. & Fridman, W. H.** (2003). Fc gamma receptors: a magic link with the outside world. *ASHI Quarterly* 4, 148-151.
- Savill, J.; Dransfield, I.; Hogg, N. & Haslett, C.** (1990). Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343(11), 170-172.
- Schins, R. P. F.; Duffin, R.; Höhr, D.; Knaapen, A. M.; Shi, T.; Weisshaupt, C.; Stone, V.; Donaldson, K. & Borm, P. J. A.** (2002). Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1166-1173.
- Schröder, T.; Schmitz, K.; Niemeier, N.; Balaban, T. S.; Krug, H. F.; Schepers, U. & Bräse, S.** (2007). Solid-phase synthesis, bioconjugation

- tion, and toxicology of novel cationic oligopeptoids for cellular drug delivery. *Bioconjugate Chem.* 18, 342-354.
- Schröder, T.** (2008). Synthese und Anwendung neuer funktionalisierter Peptide als zellgängige (Antitumor-) Wirkstofftransporter. *Dissertation, Universität Karlsruhe.*
- Schulze, C.; Kroll, A.; Lehr, C.-M.; Schäfer, U. F.; Becker, K.; Schnekenburger, J.; Schulze Isfort, C.; Landsiedel, R. & Wohlleben, W.** (2008). Not ready to use – overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicol.* 2(2), 51-61.
- Schwartz, J.; Ballester, F.; Saez, M.; Perez-Hoyos, S.; Bellido, J.; Cambra, K.; Arribas, F.; Canada, A.; Perez-Boillos, M. J. & Sunyer, J.** (2001). The concentration-response relation between air pollution and daily deaths. *Environ. Health Perspect.* 109, 1001-1006.
- Singh, S.; Shi, T.; Duffin, R.; Albrecht, C.; van Berlo, D.; Höhr, D.; Fubini, B.; Martra, G.; Fenoglio, I.; Borm, P. J. A. & Schins, R. P. F.** (2007). Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 222(2), 141-151.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J. & Klenk, D. C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Sonavane, G.; Tomoda, K.; Sano, A.; Ohshima, H.; Terada, H. & Makino, K.** (2008). *In vitro* permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Colloids Surfaces B: Biointerf.* 65, 1-10.
- Sorkin, A.** (2004). Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16, 392-399.
- Soto, K.; Garza, K. M. & Murr, L. E.** (2007). Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomaterialia* 3, 351-358.
- Stahl, P. D. & Ezekowitz, R. A. B.** (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 50-55.
- Stearns, R. C.; Paulauskis, J. D. & Godleski, J. J.** (2001). Endocytosis of

-
- ultrafine particles by A549 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 108-115.
- Stringer, B.; Imrich, A. & Kobzik, L.** (1996). Lung epithelial cell (A549) interaction with unopsonized environmental particulates: quantitation of particles-specific binding and IL-8 production. *Exp. Lung Research* 22, 494-508.
- Stringer, B. & Kobzik, L.** (1996). Alveolar macrophage uptake of the environmental titanium dioxide: role of surfactant components. *Am. Resp. Cell Mol. Biol.* 14(2), 155-160.
- Stryer, L.** (1988). *Biochemistry. International Student Edition, 3. Auflage, W. H. Freeman and Company, New York.*
- Suda, K.; Rothen-Rutishauser, B.; Gunthert, M. & Wunderli-Allenspach, H.** (2001). Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 37, 505-514.
- Suh, J.; Wirtz, D. & Hanes, J.** (2003). Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(7), 3878-3882.
- Sung, S. S.; Nelson, R. S. & Silverstein, S. C.** (1983). Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.* 96, 160-166.
- Takahashi, K.; Sawasaki, Y.; Hata, J.; Mukai, K. & Goto, T.** (1990). Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26, 265-274.
- Takenaka, S.; Karg, E.; Kreyling, W. G.; Lentner, B.; Möller, W. & Behnke-Semmler, M.** (2006). Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal. Toxicol.* 18, 733-740.
- Takizawa F.; Tsuji, S. & Nagasawa, S.** (1996). Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Lett.* 397, 269-272.
- Tenner, A. J.; Robinson, S. L.; Borchelt, J. & Wright, J. R.** (1989). Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and Cr1-mediated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 264(23), 13923-13928.

- Towbin, H.; Stähelin, T. & Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24, 145-149.
- Tsuchiya, s.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T. & Tada, K.** (1980). Establishment and characterization of human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171-176.
- Tsuchiya, S.; Kobayashi, Y.; Goto, Y.; Okumura, H.; Nakae, S.; Konno, T. & Tada, K.** (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by phorbol diester. *Cancer res.* 42, 1530-1536.
- Underhill, D.M. & Ozinsky, A.** (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in Action. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 825-852.
- Unfried, K.; Albrecht, C.; Klotz, L.-O.; von Mikecz, A.; Grether-Beck, S. & Schins, R. P. F.** (2007). Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1-20.
- Veiga, E. & Cossart, P.** (2006). The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends Cell Biol.* 16(10), 499-504.
- Völkel, K.; Krug, H. F. & Diabaté, S.** (2003). Formation of reactive oxygen species in rat epithelial cells upon stimulation with fly ash. *J. Biosci.* 28(1), 51-55.
- Wan, C. P.; Myung, E. & Lau, B. H.** (1993). An automated microfluorometric assay for monitoring oxidative burst activity of phagocytes. *J. Immunol. Methods* 159, 131-138.
- Warheit, D. B.; Brock, W. J.; Lee, K. P.; Webb, T. R.; & Reed, K. L.** (2005). Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol. Sci.* 88(2), 514-524.
- Warheit, D. B.; Webb, T. R.; Colvin, V. L.; Reed, K. L. & Sayes, C. M.** (2007). Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol. Sci.* 95(1), 270-280.
- Warshawsky, D.; Reilman, R.; Cheu, J.; Radike, M. & Rice, C.** (1994). Influence of particle dose on the cytotoxicity of hamster and rat pulmonary alveolar macrophages *in vitro*. *J. Toxicol. Environ. Health* 42(4), 407-421.
- Wichmann, H. E.; Spix, C.; Tuch, T.; Wolke, G.; Peters, A.; Heinrich,**

-
- J.; Kreyling, W. G. & Heyder, J.** (2000). Daily mortality and fine and ultrafine particles in erfurt, germany part I: role of particle number and particle mass. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 98, 5-86.
- Wiesner, M. R.; Lowry, G. V.; Alvarez, P.; Dionysiou, D. & Biswas, P.** (2006). Assesing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4336-4345.
- Wörle-Knirsch, J. M.; Pulskamp, K. & Krug, H. F.** (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 6, 1261-1268.
- Woodruff, T.; Parker, J. & Schoendorf, K.** (2006). Fine particulate matter (PM_{2.5}) air pollution and selected causes of postneonatal infant mortality in California. *Environ. Health Perspect.* 114(5), 786-790.
- Wottrich, R.; Diabaté, S. & Krug, H. F.** (2004). Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 353-361.
- Xing, X.; He, X.; Peng, J.; Wang, K. & Tan. W.** (2005). Uptake of silica-coated nanoparticles by HeLa cells. *J. Nanosci. Nanotech.* 5(10), 1688-1693.
- Xu, H.; Hoet, P. H. & Nemery, B.** (2002). *In vitro* toxicity assessment of polyvinyl chloride particles and comparison of six cellular systems. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65(16), 1141-1159.
- Zetterberg, G.; Johansson, A.; Lundahl, J.; Lundborg, M.; Sköld, C. M.; Tornling, G.; Camner, P. & Eklund, A.** (1998). Differences between rat alveolar and interstitial macrophages 5wk after quartz exposure. *Am. Physiological Society*, L226-L234.
- Zhang, J.; Zhu, J.; Imrich, A.; Cushion, M.; Kinane, T. B. & Koziel, H.** (2004). Pneumocystis activates human alveolar macrophages NF- κ B signaling through mannose receptors. *Infect. Immunity*, 3147-3160.
- Zhang, J.; Zhu, J.; Bu, X.; Cushion, M.; Kinane, T. B.; Avraham, H. & Koziel, H.** (2005). Cdc42 and RhoB activation are required for mannose receptor-mediated phagocytosis by human alveolar macrophages. *Mol. Biol. Cell.* 16, 824-834.

11 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wissenschaftliche Artikel

Schröder, T.; Schmitz, K.; Niemeier, N.; Balaban, T.S.; Krug, H.F.; Schepers, U. & Bräse, S. (2007). Solid-Phase synthesis, bioconjugation, and toxicology of novel cationic oligopeptoids for cellular drug delivery. *Bioconj. Chem.* 18, 342-354.

Schröder, T.; Niemeier, N.; Afonin, S.; Ulrich, A.S.; Krug, H.F. & Bräse, S. (2008). Peptoidic amino- and guanidinium-carrier systems: targeted drug delivery into the cell cytosol or the nucleus. *J. Med. Chem.* 51, 376-379.

Posterbeiträge:

Niemeier, N.; Fischer, K.B. & Krug, H.F. (November 2006). Uptake and transport of nanoparticles in cells; mechanism and toxicological aspects. *Signal Transduktion: Receptors, Mediators and Genes; Weimar.*

Schröder, T.; Niemeier, N.; Schmitz, K.; Schepers, U.; & Bräse, S. (März 2007). Drug delivery *via* paptoids: synthesis, toxicology and applications. *Joint German-Swiss Meeting on Medicinal Chemistry, „Frontiers in Medicinal Chemistry“, Berlin.*

Nau, K.; Geiger, D.W.; Niemeier, N.; Fischer, K.B. & Krug, H.F. (Juni 2007). Uptake mechanisms and toxicological aspects of synthetic nanoparticles in human cells. *EuroNanoForum, Düsseldorf.*

Niemeier, N. & Krug, H.F. (August 2007). Uptake and transport of nanoparticles in cells; mechanism and toxicological aspects. *CFN Summer School on Nano Biology, Bad Herrenalb.*

Niemeier, N.; Geiger, D.W. & Krug, H.F. (Juni 2008). Uptake and transport of nanoparticles in cells: mechanism and toxicological aspects. *11th International Inhalation Symposium (INIS), Hannover.*

Niemeier, N.; Geiger, D.W. & Krug, H.F. (September 2008). Uptake and transport of nanoparticles in cells: mechanism and toxicological aspects. *NanoTox, 2th International Conference, Zürich.*