



MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Untersuchungen zur Aufnahme und Genotoxizität nanopartikulären Platins in humanen Kolonkarzinomzellen

Verfasserin

Katharina Jarolim, BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt: Chemie

Betreuerin: Prof. Dr. rer. nat. Doris Marko

Für meine Eltern

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. D. Marko für die Überlassung des interessanten Themas und ihren Hilfestellungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

Ich danke Dr. rer. nat. Helge Gehrke, der trotz des zeitgleichen Abschlusses seiner Dissertation stets Zeit gefunden hat, mir unterstützend mit seinem Rat zur Seite zu stehen und mir viel beigebracht hat in dieser Zeit

Ich danke den KollegInnen aus dem Arbeitskreis, die eine entspannte, aber auch produktive Arbeitsatmosphäre und eine freundschaftlich verbundene Gemeinschaft geschaffen haben

Ich danke meinen FreundInnen, die mir durch ihre Liebenswürdigkeiten, ihren Humor und ihre verrückten Wesen in anstrengenden Phasen geholfen haben, den Kopf frei zu kriegen.

Ich danke schließlich meiner Familie, die mir dies alles, nicht zuletzt durch die Weitergabe hervorragender Gene, ermöglicht und mich mit viel Liebe und Unterstützung begleitet hat

Inhalt

I.	Abkürzungsverzeichnis	II
1.	Einleitung	1
2.	Theoretische Grundlagen	3
2.1.	Begriffe und Definition	3
2.2.	Eigenschaften	5
2.2.1.	Oberfläche	6
2.2.2.	Quantenmechanik	7
2.3.	Vorkommen und Verwendung	10
2.3.1.	Medizin und Pharmazie	10
2.3.2.	Kosmetik	12
2.3.3.	Lebensmittel	14
2.4.	Herstellungsverfahren	15
2.4.1.	Top-Down VS Bottom-Up	15
2.4.2.	Reaktivabscheidung aus überkritischem CO ₂	16
2.5.	Nanotoxikologie	17
2.5.1.	Allgemeines	17
2.5.2.	Charakterisierung nanostrukturierter Materialien in toxikologischen Untersuchungen	18
2.5.3.	Einfluss physikochemischer Charakterisitika	18
2.5.4.	Charakterisierungsverfahren	21
2.5.5.	Einheit und Menge der applizierten Dosis	26
2.5.6.	Wechselwirkung mit biologischen Strukturen	27
2.5.7.	Aufnahmerouten in den Körper	27
2.5.8.	Zelluläre Aufnahmemechanismen	29
2.5.9.	Generierung reaktiver Sauerstoffspezies	32
2.5.10.	Genotoxizität	35

2.5.11.	γ -H2AX als Indikator von DNA-Doppelstrangbrüchen	36
2.6.	Platin	38
2.6.1.	Eigenschaften	38
2.6.2.	Vorkommen & Verwendung	38
2.6.3.	Umwelt-Eintrag	38
2.6.4.	Toxizität von Platin	40
2.6.5.	Toxizität von nanopartikulärem Platin	43
2.7.	Charakterisierung der Nanopartikel	45
3.	Zielsetzung	51
4.	Ergebnisse und Diskussion	53
4.1.	Charakterisierung der Nanopartikel	53
4.1.1.	Partikelgrößenverteilung mittels DLS	53
4.1.2.	Zeta-Potential	56
4.1.3.	Zusammenfassung der Partikelcharakterisierung	59
4.2.	Zelluläre Aufnahme von nanopartikulärem Platin	60
4.2.1.	Zeitabhängige Aufnahme	60
4.2.2.	Untersuchung des zellulären Aufnahmemechanismus	73
4.2.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aufnahme der Pt -NP	76
4.3.	Zytotoxizität von Platin-Nanopartikeln	78
4.3.1.	Bisherige Ergebnisse	78
4.3.2.	Untersuchung des Zellwachstums	79
4.3.3.	Beeinflussung der Membranintegrität	82
4.3.4.	Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität	84
4.4.	Charakterisierung des genotoxischen Potentials	86
4.4.1.	Comet Assay	86
4.4.2.	Untersuchung der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen	87
4.4.3.	DNA-Platinierung	90

4.5.	Gesamtdiskussion	95
5.	Zusammenfassung & Ausblick	103
6.	Material & Methoden	105
6.1.	Chemikalien & Kits	105
6.2.	Materialien & Geräte	108
6.3.	Synthese der Pt-NP mittels SFRD	110
6.4.	Berechnungen	111
6.5.	Zellkultur	112
6.5.1.	Zelllinie	112
6.5.2.	Kultivierung	112
6.5.3.	Mediumwechsel und Ultraschallbehandlung der Pt-NP-Suspension ...	113
6.5.4.	Subkultivierung	113
6.5.5.	Zellzahl und Viabilität	114
6.5.6.	Einfrieren	115
6.5.7.	Auftauen	116
6.6.	Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels Western Blot	116
6.7.	Bestimmung der Zytotoxizität	123
6.7.1.	Untersuchung des Zellwachstum	124
6.7.2.	Untersuchung der Integrität der Zellmembran	125
6.7.3.	Untersuchung der mitochondrialen Aktivität	127
6.8.	Messung des Zeta-Potentials und der Partikelgrößenverteilung	129
6.9.	Raster-Transmissionselektronenmikroskopie	129
6.10.	Bestimmung des Platingehalts in Zell-DNA mittels ICP-MS	132
6.11.	Probenvorbereitung für Elektronenmikroskopie	136
7.	Literatur	137
8.	Anhang	146
A)	Formeln	146

B) Daten	147
C) Abstract	154
D) Lebenslauf	155

I. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidsulfat
β -CD	β -Cyclodextrin
BSA	Bovine Serum Albumin
CNT	Carbon Nanotubes
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FKS	Fötales Kälberserum
GIT	Gastrointestinaltrakt
HRP	Horseradish Peroxidase
HRTEM	High Resolution Transmission Electronmicroscopy
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IL	Interleukin
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
LDH	Laktatdehydrogenase
LumiGLO	Luminol-Lösung
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NAH/H ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
P / S	Penicyllin / Streptomycin
PBS	Phosphate buffered Saline
PGE	Platingruppenelement
PIPES	(2-[4-(2-Sulfoethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	Particle Size Distribution
Pt	Platin
QD	Quantenpunkt („Quantum Dot“)
RNS	Reaktive Stickstoffspezies („Reactive Nitrogen Species“)

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies („Reactive Oxygen Species“)
RT	Raumtemperatur
SCF	Supercritical Fluid
sc-CO ₂	Überkritisches CO ₂ („Supercritical CO ₂ “)
SDS	Natriumdodecylsulfat („Sodium Dodecylsulfate“)
SEM	Scanning Electronmicroscopy
SRB	Sulforhodamin B
SWCNT	Single Walled Carbon Nanotube
TCA	Trichloressigsäure („Trichloric acetic acid“)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
WST-1	Watersoluble Tetrazolium

1. Einleitung

Unter dem Begriff Nanotechnologie wird die Erforschung des Verhaltens und der Bearbeitung von Materialien im Größenbereich zwischen 1 und 100 nm verstanden und umfasst somit den Bereich zwischen atomaren und makroskopischen Strukturen. Die chemischen, physikalischen und biologischen Prozesse gestalten sich in diesen Dimensionen auf verschiedenartige Weise anders als die derselben Materialien im mikroskaligen Bereich. Die aus den modifizierten Verhaltensweisen resultierenden Eigenschaften haben nanoskaligen Materialien innerhalb eines kurzen Zeitraumes zu einer Vielfalt neuer Anwendungen auf diversen Gebieten, von Elektronik bis hin zur Lebensmitteltechnologie, verholfen. Zwischen 2000 und 2011 wurden von Regierungen weltweit insgesamt 67 Milliarden US Dollar zur Förderung der Forschung auf dem Gebiet der Nanotechnologie ausgegeben [Cientifica, 2011]. Die Zahl der Konsumgüter, die Nanomaterialien enthalten, hat sich in 5 Jahren versechsfacht [Nanotechproject, 2011] und Schätzungen zufolge werden 2015 15 % aller globalen Ausgaben für Produkte getätigt werden, die nanostrukturierte Materialien enthalten bzw. mit diesen hergestellt wurden, was einem Umsatz von 3,1 Milliarden US Dollar entspricht [Lloyd's, 2007].

Einhergehend mit dem Nutzen, den die Gesellschaft aus der Nanotechnologie ziehen kann, ergeben sich möglicherweise auch Risiken und Gefahren für Mensch und Umwelt, die auf den eingangs erwähnten andersartigen Verhaltensweisen nanostrukturierter Materie beruhen. Daher ist von Bedeutung, dass die Erforschung eines potentiellen Gefahrenpotentials mit der ständig wachsenden und sich weiterentwickelnden Nanotechnologie mithält. Auf Grund der mangelnden Datenlage sind zurzeit noch keine verbindlichen gesetzlichen Regelungen für den Umgang vorhanden. Dennoch sind sich sowohl Staat als auch Gesellschaft der Notwendigkeit von Aufklärung und Forschung hinsichtlich der toxikologischen Auswirkungen der Nanotechnologie bewusst. Das Institut für Technikfolgenabschätzung der österreichischen Akademie der Wissenschaften hat beispielsweise mit der Gründung des Projekts Nano Trust 2007 eine Plattform gegründet, die sich der Aufklärung der gesundheitlichen Risiken und der gesellschaftlichen Aspekte der Nanotechnologie verschrieben hat [ÖAW, 2012].

Ein Bereich, der von den nanotechnologischen Entwicklungen profitieren wird, ist die Lebensmittelindustrie. Der Nanolebensmittelsektor („Nanofood“) wurde für 2012 auf 5,8 Milliarden US Dollar geschätzt [Chaudhry *et al.*, 2010]. Mit Nanopartikeln könnten sich in

Zukunft Geschmack, Viskosität oder Farbe nach Wunsch einstellen lassen. Nanotechnologie wird bereits in auf dem Markt befindlichen Produkten kommerziell verbreitet. Nanozusätze finden sich zur Verbesserung von Textur und Stabilität in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln, darunter beispielsweise nanostrukturiertes Titandioxid als optischer Aufheller in Soßen oder nanopartikuläres Siliciumdioxid, das zur Verbesserung der Rieseigenschaften von Salz und Gewürzen, sowie zur Optimierung der Fließeigenschaften von Ketchup eingesetzt wird [Chaudhry *et al.*, 2010]. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass aufgrund der zunehmenden Produktion von nanotechnologisch hergestellten Produkten zu einem erhöhten Eintrag in die Umwelt und damit möglicherweise auch eine Kontamination der Nahrungskette nicht auszuschließen ist.

Obwohl ein breites Spektrum an Untersuchungen zur toxikologischen Auswirkung von Nanopartikeln auf Respirationssystem und Haut existiert, wurde dem Verhalten von Nanopartikeln im Gastrointestinaltrakt in nanotoxikologischen Veröffentlichungen bislang zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Diese Fragestellung gewinnt jedoch gerade im Zusammenhang mit der potentiellen oralen Aufnahme von nanostrukturierten Materialien zunehmend an Bedeutung und stellt, in Hinblick auf die Markteinführung zahlreicher nanotechnologisch bearbeiteter Produkte innerhalb der nächsten 20 Jahre [Schulte, 2005], die Forschung vor neue Herausforderungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Auswirkung von nanostrukturiertem Platin auf Karzinomzellen des Gastrointestinaltrakts untersucht. Platin-Nanopartikel gelangen hauptsächlich über den Ausstoß von Autoabgasen in die Umwelt [Artelt *et al.*, 1999b] und gelangen nach Einatmen durch Verschlucken des nanopartikelhaltigen Mucus in den Gastrointestinaltrakt. Nanostrukturierte Platinpartikel sollen modellhaft für nanoskalige Materialien stehen, die als Kontaminante in der Umwelt auftreten kann. In dieser Arbeit soll dabei der Fokus einerseits auf den zellulären Aufnahmemechanismus der Nanopartikel gelegt werden, andererseits sollen die zytotoxischen sowie genotoxischen Effekte, die von Zellen internalisiertes, nanopartikuläres Platin ausübt, untersucht werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Begriffe und Definition

Die Nanotechnologie (griechisch: nanos/lateinisch: nanus für Zwerg) erhielt ihren Anstoß durch Richard Feynman, der 1956 in einer Rede vor der amerikanischen Gesellschaft für Physik erstmals von der Möglichkeit, Objekte auf atomarem Maßstab präzise aufzubauen und zu bearbeiten, sprach [Feynman, 1959].

Mit einer Definition des Begriffs Nanotechnologie hat sich das 2005 gegründete technische Komitee „Nanotechnologies TC229“ der Organisation für Normierung (ISO – ‚International Organisation for Standardization‘) befasst. Die ISO hat 2008 eine Standardisierung von nanotechnologischen Terminologien und Definitionen in Form der Spezifikation ISO/TS 27687:2008 publiziert [ISO/TS27687:2008]. Die EU-Kommission hat ebenfalls am 18. Oktober 2011 eine Empfehlung zur Nanotechnologie veröffentlicht. Diese stützt sich auf wissenschaftliche Gutachten des Ausschusses „Neu auftretende und neu identifizierte Gesundheitsrisiken“ (SCENIHR – ‚Scientific committee on emerging and newly identified health risks‘). E 2011/696/EU enthält Definitionen, die als Referenz herangezogen werden können, wann ein Material als Nanomaterial zu klassifizieren ist [2011/696/EU]. Bis Dezember 2014 soll evaluiert werden, ob die Empfehlung den Ansprüchen von Wissenschaft und Technik gerecht wird.

Sowohl die Definition der ISO als auch jene der EU-Kommission ziehen die Größe als ausschlaggebendes Kriterium heran. Danach werden jene Materialien als Nanomaterialien bezeichnet, die selbst bzw. deren Bestandteile in mindestens einer Dimension nanoskalig sind. Als nanoskalig werden Objekte bezeichnet, wenn diese so strukturiert sind, dass mindestens eine ihrer drei Dimensionen (Länge, Breite, Dicke) zwischen 1 und 100 nm beträgt. Die EU-Kommission hebt zusätzlich hervor, dass das Kriterium der Nanoskalierung auf mindestens 50 % der enthaltenen Partikel zutreffen muss. Abbildung 2.2 zeigt eine graphische Darstellung der Unterteilungen von Nanomaterialien laut E 2011/696/EU und ISO/ITC229.

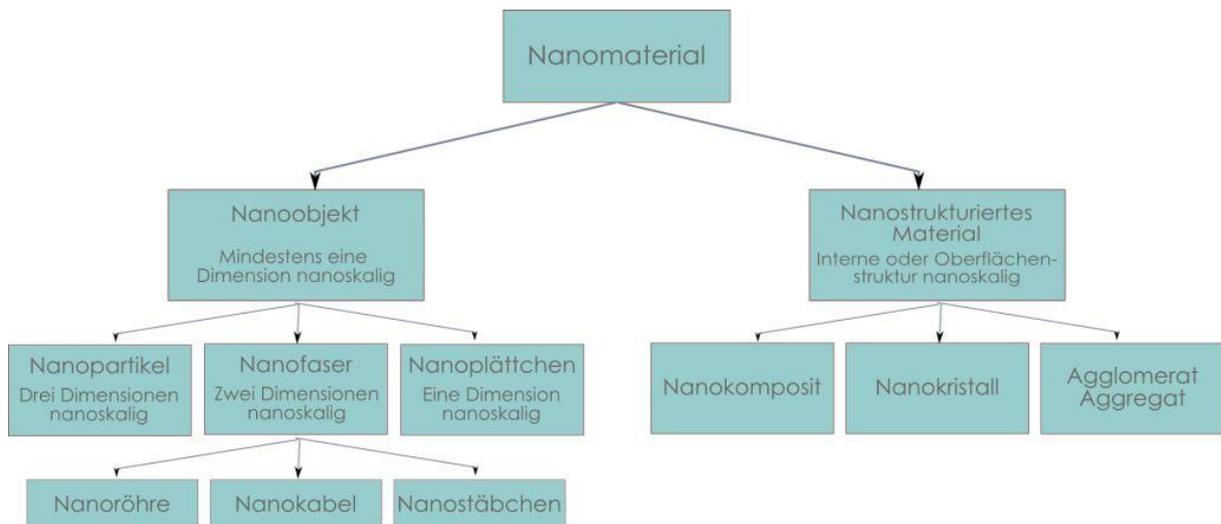


Abbildung 2.2 Übersicht über die Definitionen in der Nanotechnologie laut ISO und EU-Kommission [modifiziert nach International Organization for Standardization, 2008]

Ein Partikel wird laut EU 2011/696 als „sehr kleines Teilchen einer Substanz mit definierten physikalischen Grenzen“ definiert. Partikel mit Durchmessern zwischen 1 und 100 nm werden als Nanopartikel (NP, siehe Abbildung 2.1 A) definiert. Gezielt synthetisch hergestellte NP werden als ENP („Engineered Nanoparticles“) bezeichnet. Partikel, die nicht beabsichtigt und kontrolliert hergestellt werden, sondern als Nebenprodukte entstehen, können je nach Durchmesser unterteilt werden in ultrafeine Partikel ($< 0,1 \mu\text{m}$, UFP), feine

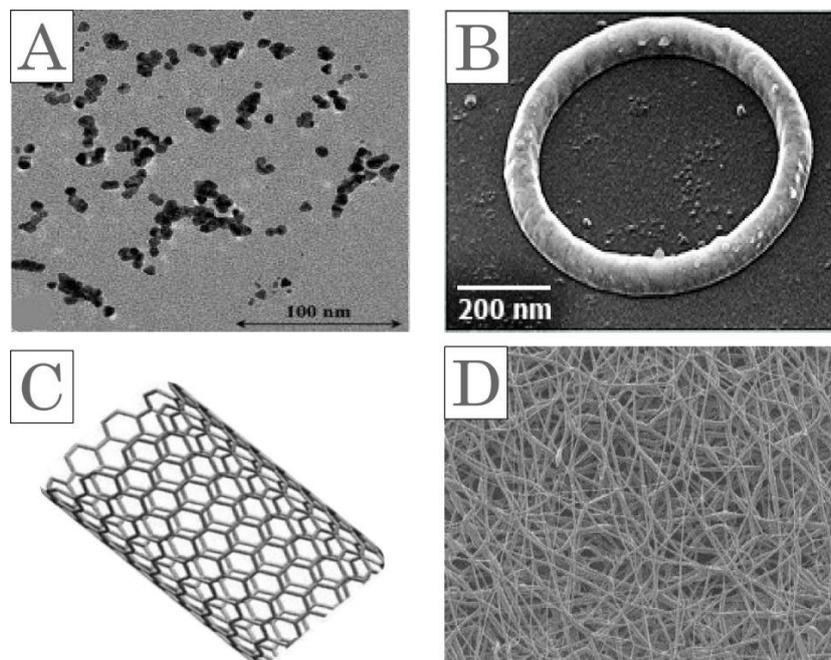


Abbildung 2.1 Ausgewählte Nanomaterialien A) Nanopartikel [entnommen aus Pelka *et al.*, 2009] B) Nanoring [entnommen aus Katra, 2009] C) Nanoröhren [entnommen aus Say People, 2012] D) Nanofasern [entnommen aus Yoshimoto *et al.*, 2003]

Partikel ($< 2,5 \mu\text{m}$, FP) oder grobe Partikel ($> 2,5 \mu\text{m}$, GP) [Oberdörster, 2005; Napierska *et al.*, 2010].

Als Agglomerate werden durch van der Waals-Kräfte lose gebundene Partikel bezeichnet, während Aggregate durch starke Bindungen der Partikel untereinander zusammengehalten werden („versintert“) [SCENIHR, 2010].

Gezielt synthetisierte ENP weisen, im Gegenteil zu unbeabsichtigt in technischen Prozessen anfallenden Nanopartikeln, eine homogene Größenverteilung auf. Während ENP zu einem bestimmten Verwendungszweck hergestellt werden und daher definierten Vorgaben bezüglich einer homogenen Größenverteilung genügen müssen, weisen als Nebenprodukte entstandene Partikel einer Charge ein inhomogenes Größenverteilungsmuster auf, eine sogenannte Dispersität. ENP besitzen überwiegend einheitliche physikochemische Eigenschaften, da sie einen spezifischen Zweck erfüllen sollen, während als Nebenprodukte anfallende NP eher zu variierenden chemischen Zusammensetzungen tendieren.

Sind nanostrukturierte Objekte nicht sphärisch, so werden sie nach ihrer jeweiligen Form benannt. Vier repräsentative Nanostrukturen sind in Abbildung 2.1 abgebildet, darunter neben den erwähnten Nanopartikeln der Nanoring (Abbildung 2.1 B), die zylindrischen Nanoröhrchen (Abbildung 2.1 C), die aus einer Graphenschicht (SWCNT - Einwandige bzw. ‚Single Walled Carbon Nanotube‘,) oder mehreren (MWCNT - Mehrwandige bzw. ‚Multi Walled Carbon Nanotube‘) aufgebaut sind. Stäbchen- bzw. fadenförmige Nanostrukturen werden unter HARN (‚High Aspect Ratio Nanoparticles‘) zusammengefasst, dazu zählen auch die Nanofasern (Abbildung 2.1 D). Der Begriff HARN rührt vom großen Verhältnis der Länge zum Durchmesser fadenförmiger Nanostrukturen her (hohes Aspektverhältnis – ‚High Aspect‘) [Donaldson, 2008].

2.2. Eigenschaften

Die Eigenschaften nanoskaliger Spezies lassen sich nicht durch bloßes Extrapolieren der naturwissenschaftlichen Gesetze ihrer größeren Analoga auf kleine Maßstäbe erklären. Nanostrukturierte Objekte verhalten sich aufgrund ihrer zwischen atomaren bzw. molekularen und mikroskopischen Dimensionen rangierenden Maße sowohl chemisch als

auch physikalisch anders. Diesem Phänomen liegt eine Reihe von Ursachen zugrunde, die im Folgenden erläutert werden.

2.2.1. Oberfläche

Eine Ursache für die andersartigen Eigenschaften nanoskaliger Objekte ist deren Oberfläche. Zur Veranschaulichung wird ein Würfel mit einer Gesamtoberfläche von 6 cm^2 herangezogen (siehe Abbildung 2.3 A). Wird dieser bei gleich bleibendem Volumen in kleinere Teile zerlegt, so erhöht sich die vorhandene Gesamtoberfläche mit zunehmender Miniaturisierung des Systems. Das Verhältnis Oberfläche zu Volumen, sowie die Anzahl der Partikel bei gleichbleibendem Volumen, wird in kleineren Dimensionen zusehends größer. Gleichzeitig erhöht sich das Verhältnis der an der Oberfläche befindlichen Atome (N_s) zur Gesamtzahl der Atome (N_c) bei kleiner werdendem Partikeldurchmesser exponentiell. Je geringer der Partikeldurchmesser, desto höher wird der Prozentsatz an Oberflächenatomen (Abbildung 2.3 B).

Tabelle 2.1 verdeutlicht die Zunahme der Oberfläche, sowie der Zahl der Partikel, wenn der Durchmesser derselben reduziert wird.

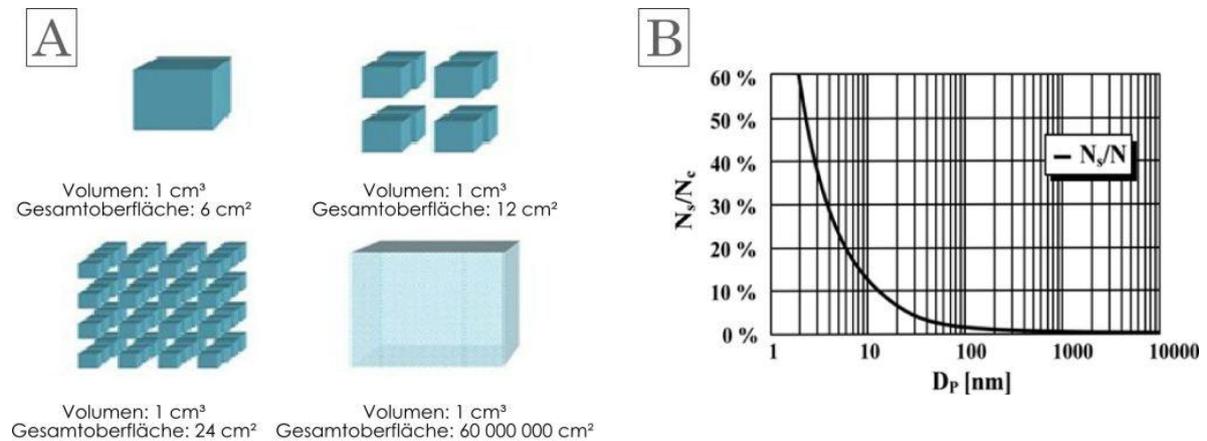


Abbildung 2.3

Schematische Darstellung des Volumen/Oberflächen-Verhältnisses bei nanostrukturierten Materialien A) Zunahme der Oberfläche bei kleiner werdender Dimension [modifiziert nach Nanotechproject, 2009] B) Verhältnis Oberflächenatome zu Gesamtpartikel bei kleiner werdendem Partikeldurchmesser [entnommen aus Oberdorster *et al.*, 2005]

Tabelle 2.1 Zusammenhang zwischen Partikelanzahl, -oberfläche und dem Partikeldurchmesser [Daten entnommen aus Oberdorster *et al.*, 2005].

Partikeldurchmesser [nm]	Partikelanzahl [1/cm ³]	Partikeloberfläche [µm ²]
5000	0,15	12
250	1200	240
20	2400000	3016
5	153000000	12000

Die große Anzahl und Oberfläche nanodimensionaler Partikel ist für die hohe Reaktivität des Materials verantwortlich. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Gesamtoberfläche und damit deren Energie bei einem definierten Volumen von Partikeln durch $\frac{3V}{R}$ beschrieben werden kann, wobei R dem Radius und V dem Gesamtvolumen entspricht. Da die Oberflächenenergie demnach proportional zu $1/R$ ist, hat ein definiertes Volumen an Partikeln bei Partikeldurchmessern im nm-Bereich eine 1000-fach größere Reaktivität im Vergleich zu Partikeln im mikroskopischen Maßstab [Guo *et al.*, 2009].

Zur Oberflächenenergie tragen ebenso kohäsive Kräfte bei, die die atomaren Bausteine eines Partikels zusammenhalten. Im Inneren sind die Atome gleichmäßig voneinander umgeben, die kohäsiven Kräfte werden daher kompensiert. Auf die Atome an der Oberfläche, die weniger Nachbarn haben, wirkt die Kohäsivkraft in Summe nach innen gerichtet. Aufgrund der höheren Atomanzahl an der Oberfläche nanodimensionaler Stoffe ist auch das Ausmaß der kohäsiven Kräfte größer. Dies trägt ebenfalls zur Erhöhung der Oberflächenenergie bei [Nanda, *et al.*, 2003].

Nanoobjekte haben zusammengefasst aufgrund ihrer Größe und der höheren Oberfläche eine erhöhte Energie. Materialien sind jedoch stets bestrebt, diese so gering wie möglich zu halten. Ein Kristall in Nanodimensionen muss eine Minimierung seiner Gesamtenergie primär über Reduktion der Oberflächenenergie bewerkstelligen, was die Gleichgewichtspositionen seiner Oberflächenatome beeinflusst. Daraus resultieren in Nanomaterialien Ordnungsprozesse, die neue Oberflächenstrukturen und -symmetrien zur Folge haben [Guo *et al.*, 2009].

2.2.2. Quantenmechanik

Durch die Annäherung der Dimensionen nanoskaliger Materialien an das atomare Niveau verliert die klassische Physik zunehmend ihre Gültigkeit. In Nano-Größenordnungen wird

diese durch quantenmechanische Effekte ersetzt, die Vorgänge im atomaren und subatomaren Bereich beschreiben. Zur Veranschaulichung dieses Phänomens wird das Teilchen im Kasten betrachtet.

Hierbei stellen zwei Energiebarrieren Hindernisse für ein atomares Teilchen dar, das aufgrund seiner geringeren Energie diese nach der klassischen Physik nicht überwinden kann und so dazwischen ohne Energieverlust hin und her reflektiert wird. Klassisch betrachtet kann das Teilchen jegliche kinetischen Energie- und Impulswerte annehmen. Dem Welle-Teilchen-Dualismus zufolge wird der quantenmechanische Zustand des Teilchens mit der Schrödingergleichung, in Form einer sogenannten Wellenfunktion (WF) Ψ , beschrieben. Da die Energiebarriere infinit hoch ist, darf Ψ des Partikels nur solche Werte annehmen, deren Wellenlänge und Energie den Existenzbedingungen genügen. Andernfalls würde es nach Reflektion der WF an den Wänden der Barrieren zu einer negativen Interferenz, einer Auslöschung, kommen. Da die Energiezustände des Teilchens im Kasten nur in gequantelten Werten vorkommen, wird dieses Phänomen als Quanten-Beschränkung („Quantum Confinement“) bezeichnet. Diese tritt ab einer gewissen Größenordnung, wenn sich der Radius des Objektes dem Bohr’schen Exzitonradius nähert, also im Nanobereich, auf [Sapra *et al.*, 2002]. Man unterscheidet in der Terminologie der Nanotechnologie nach der Zahl der Dimensionen, auf die die Elektronen eines Objekts räumlich beschränkt werden (Abbildung 2.4). Alle drei Raumdimensionen eines

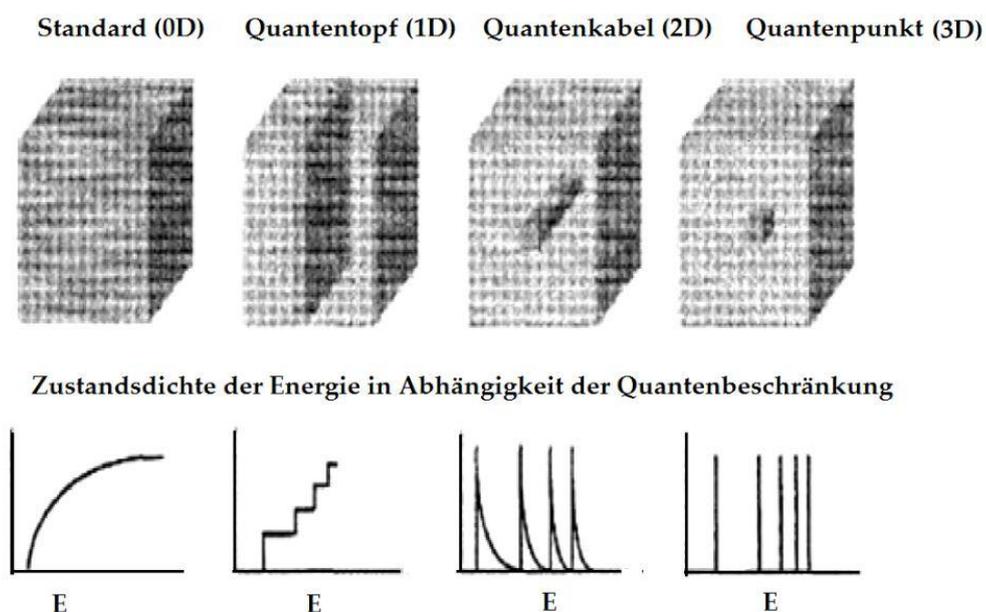


Abbildung 2.4 Quantenphysikalische Eigenschaften nanostrukturierter Verbindungen. Energiezustände der Elektronen in Abhängigkeit der Beschränkung [modifiziert nach Xu, 2008]

Quantenpunkts (QP) liegen im nm-Bereich, weshalb die Bewegung der Elektronen auf 0 Dimensionen beschränkt ist, dies wird als dreidimensional beschränktes System bezeichnet. Die praktischen Auswirkungen der Quanten Beschränkung sind im folgenden Absatz erläutert.

Die quantenmechanischen Zustände eines Kristalls liegen dicht beieinander, die Atomorbitale überlappen, weshalb die energetischen Zustände als nicht lokalisierte, verschmierte Bänder zusammengefasst werden. Die beiden energiereichsten Bänder eines Kristalls, Valenz- und Leitungsband, werden durch die Bandlücke getrennt. Liegen alle drei Dimensionen des Kristalls im Nanobereich (QP, NP), so kommt es zu einem Übergang der kontinuierlichen Energiezustände der Bänder zu einem diskreten Energiespektrum mit gequantelten Werten, begründet durch die oben beschriebene Quanten Beschränkung. Durch die Verschiebung der verschmierten Energiezustände in mikroskopischen Dimensionen hin zu diskreten Energieniveaus im Nanodimensionalen wird die Bandlücke größenabhängig. Je kleiner der Partikel und damit die Bewegungsräume der Elektronen einschränkenden Dimensionen, desto größer die zu überwindende Lücke sowie die zur Anregung nötige Energie. Benötigen Partikel mehr Energie, um ein Elektron in einen höheren Energiezustand zu befördern, wird auch mehr Energie frei, wenn dieses wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Im sichtbaren Bereich wird dies als Blau-Verschiebung (Blue Shift) bezeichnet, da die emittierte Wellenlänge mit kleiner werdendem Partikeldurchmesser geringer und daher das emittierte Licht von Rot zu Blau, das eine

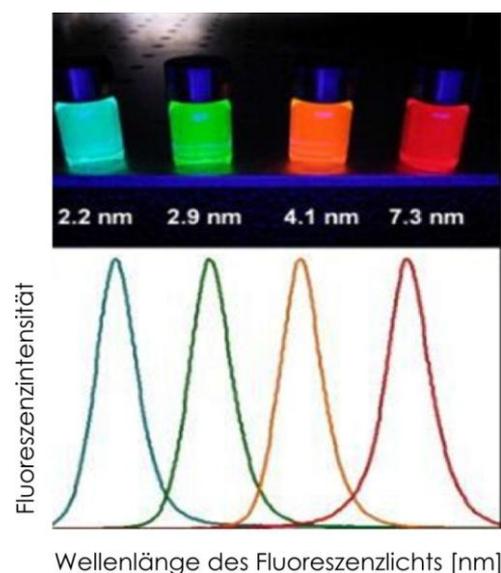


Abbildung 2.5

Eine Auswirkung der Quanten-Beschränkung von Nanomaterialien. Die größenabhängige Farbemission von Quantenpunkten aus demselben Material [modifiziert nach Smith *et al.*, 2008]

kürzere Wellenlänge hat, verschoben wird. Diese Eigenschaft der größenabhängigen Farbemission von nanostrukturierten Objekten wird bei QP in lichtemittierenden Dioden (LED – ‚Light emitting Diode‘) genutzt (siehe Abbildung 2.5). In zweidimensional beschränkten Systemen, wie Nanoröhren oder -stäben, erscheinen die Emissionsenergien als verschmierte Spektren, da sich die Exzitonen frei durch das Material bewegen können, während sie bei QP durch die Potentialbarrieren lokalisiert vorliegen, wodurch es zu den beobachteten scharfen Emissionslinien kommt [Cao *et al.*, 2008].

2.3. Vorkommen und Verwendung

Da der Einsatz von Nanotechnologie ein breites Spektrum an Substanzen umfasst, finden nanostrukturierte Objekte Verwendung in einer großen Zahl von Anwendungsgebieten. Diese stehen nach wie vor am Beginn ihrer Entwicklung. Für 2015 wird der durch Nanotechnologie erwirtschaftete Umsatz auf 2,5 Billionen US Dollar geschätzt [Lux Research, 2010].

Da Nanotechnologie in vielen Bereichen eingesetzt wird, sollen im Folgenden die wichtigsten vorgestellt und die jeweiligen Einsatzgebiete erläutert werden.

2.3.1. Medizin und Pharmazie

Der weltweite Nanomedizin-Markt, welcher Nanopharmazeutika und –transportsysteme einschließt, betrug 2011 72,8 Milliarden US Dollar und wurde für 2016 auf 130,9 Milliarden US Dollar geschätzt [Global Information Inc., 2012]. 2004 befanden sich 38 medizinische Produkte mit Nanotechnologie auf dem europäischen Markt, die einen Umsatz von 5,4 Milliarden Euro erwirtschafteten [Joint Reserach Centre, 2008]. Die EU ist derzeit führend in der Forschung der Nanomedizin, 2008 wurden 36 % aller Publikationen zu diesem Thema von den Ländern der EU-25 veröffentlicht, 4 % mehr als die USA publizierte. Der Medizin- und Pharmaziesektor bietet eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten für Nanotechnologie. Die Dimension nanoskopischer Materialien erlaubt den Eingriff auf Ebene der Moleküle, die in biochemischen Prozessen von Bedeutung sind. Hierdurch ergeben sich Möglichkeiten, bis dato unlösbare Problemstellungen mit neuen Werkzeugen zu bearbeiten. Erleichtertes Passieren biologischer Membranen sowie die Erschließung neuer Transportwege im Körper, die Wirkstoffen mit herkömmlichen Transportsystemen nicht zugänglich sind, werden durch das Heranziehen nanoskaliger Materialien ermöglicht. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) kann beispielsweise von 98 % aller Arzneien

nicht passiert werden [Pardridge, 2003], was einigen nanoskaligen Partikeln möglich ist, da die Tight Junctions der endothelialen Zellmembranen der BHS 4-6 nm groß sind und NP diese passieren können [Simkó, 2011].

Pharmakologisch aktive Substanzen (kleine Moleküle, Proteine, DNA) in optimalen Dosen gezielt an den Ort ihrer Wirkung im Organismus zu bringen und dadurch die toxikologischen Nebeneffekte so gering wie möglich zu halten ist eines der Hauptbestreben der pharmazeutischen Forschung. Nanotransportsysteme, die mit den jeweiligen Wirkstoffen beladen sind, können deren pharmakokinetische Profile für den gewünschten Einsatz optimieren. Peters et al. haben z. B. 2009 ein auf nanopartikulärer Lipid-Mizellentechnik basierendes Diagnostik- und Therapeutik-System entwickelt, das es ermöglicht, fluoreszierende Farbstoffe oder Antikoagulanzen direkt zu arteriosklerotischen Plaques zu transportieren. Hierbei ordnen sich Lipidpeptide zu Mizellen zusammen, die je nach Fragestellung Fluorophor oder Therapeutikum enthalten (siehe Abbildung 2.6). Die Mizellen gelangen an den Ort ihrer Bestimmung, wo sie den verkapselten Wirkstoff freisetzen, indem ein an der Mizellenoberfläche befindliches Peptid mit dem Serumprotein Fibrin, das gehäuft in Plaques auftritt, wechselwirkt [Peters *et al.*, 2009].

Den gezielten Transport von Wirkstoffen mittels Nanotechnologie wird auch in der Krebstherapie genutzt. Ein großer Nachteil der Chemotherapie ist die Schädigung gesunder Organe aufgrund der Toxizität der verabreichten Substanzen. Durch die Verknüpfung spezifischer Antikörper mit Nanotransportsystemen können die Chemotherapeutika gezielt zu den Tumorzellen gelangen [Fay *et al.*, 2011]. Beispielsweise

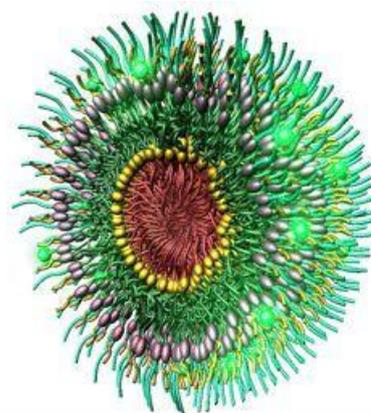


Abbildung 2.6

Einsatzmöglichkeit nanodimensionaler Materialien in Pharmazie und Medizin: 3D-Struktur der multifunktionalen Lipopeptid-Mizelle zum Transport von Wirkstoff [entnommen aus Peters *et al.*, 2009].

wird Doxorubicin, ein Zytostatikum mit breitem Anwendungsspektrum, verkapselt in ein thermosensitives Dextranderivat, im Tumor auf Grund der dort herrschenden Temperatur und Acidität freigesetzt [Zhang, *et al.*, 2007]. Statt eines verkapselten Substrates kann der Nanopartikel selbst den Tumortod induzieren, z. B. in Form sogenannter Nanoschalen („Nanoshell“). Ein dielektrischer Kern, umgeben von Gold, wird in die Zellen aufgenommen und emittiert dort nach Anregung im nahen Infrarot-Bereich Wärme, die zum photothermisch induzierten Tod der Karzinomzellen führt [Hirsch *et al.*, 2003; Lal *et al.*, 2008].

Verbesserte Resorptionseigenschaften, Bioverfügbarkeit und Bioabbaubarkeit sind weitere Endpunkte nanotechnologischer Forschung im pharmazeutischen Bereich. Dadurch sollen die Einsatzkosten gesenkt und der Grad der Automatisierung gehoben werden. Beispielsweise wurde dieses Prinzip eingesetzt, um dem Immunsuppressivum Rapamun® eine verbesserte Wasserlöslichkeit zu verleihen. Durch die NanoCrystal®-Technologie wird die Einnahme für den/die PatientIn erleichtert und eine spezifischere Dosis kann verabreicht werden kann [Shen *et al.*, 2007]. Ebenso beträgt die Bioverfügbarkeit von in Lipid-NP verkapseltem Quercetin ein fünffaches der Bioverfügbarkeit der reinen Flavonoid-Suspension, da das unhydrophile Polyphenol schlecht über den GIT absorbiert wird [Li *et al.*, 2009].

2.3.2. Kosmetik

Die Firma Estée Lauder ist Pionier auf dem Gebiet nanobasierter Kosmetika und brachte 2006 die ersten Produkte dieser Sparte heraus. Zwei Jahre später betrugen die Ausgaben des größten Kosmetikproduzent weltweit, L’Oreal, 600 Millionen US Dollar für Patente auf nanotechnologische Produkte [NanoScienceInstitute, 2008]. 2011 waren 143 registrierte Kosmetika mit nanotechnologisch hergestellten Inhaltsstoffen erhältlich. Der Markt für Nanotechnologie in der Kosmetikbranche wird für 2012 auf 155,8 Millionen US Dollar geschätzt [CosmeticsBusiness, 2011; Nanotechproject, 2011].

Nanoskalige Inhaltsstoffe finden in der Kosmetik Verwendung in Haut- und Haarpflegeprodukten, Deodorants, Sonnencremen, Nagellack, Make-Up, Wimperntuschen und Zahnpasten. Die Sangi GesmbH. in Japan verkauft z. B. für den privaten und zahnärztlichen Gebrauch mit Nanokristallen versetzte Zahnpflegeprodukte. Zahnpasten können je nach Schwere der dentalen Vorbelastung (normal, Raucher, etc.) mit entsprechend niedrigem oder hohem Gehalt an Nano-Hydroxyapatit erworben werden.

Dieser soll sich als schützende Schicht über den Zahnschmelz legen und gegebenenfalls beschädigte Stellen auffüllen.

Nanoverkapselungssysteme sollen den Transport aktiver Substanzen in tiefere Hautschichten ermöglichen. Die Inhaltsstoffe herkömmlicher Cremes gelangten bis dato nicht in die Hautschichten unterhalb des Stratum Corneum, in denen die Zellerneuerung stattfindet, was mit nanostrukturiertem Trägermaterial möglich ist [Greßler, 2009]. Durch den gezielten Transport und Eingriff in den Stoffwechsel können die eingesetzten Substanzen sowohl mengenmäßig minimiert eingesetzt, als auch besser vor ungewolltem Abbau geschützt werden. Es werden Liposome, Mizellen, Lipid-NP und Nanoemulsionen verwendet. Der Vorteil letzterer gegenüber dem Mizellensystem besteht darin, dass das Öl-in-Wasser-Gemisch keine synthetischen Tenside enthält und daher Fettbestandteile der Haut nicht wasserlöslich gemacht und ausgewaschen werden, weshalb sie sich besonders für sensible Haut eignen. Mit Hilfe von Liposomen und Mizellen können, ähnlich den Nanotransportsystemen in der Medizin (siehe Abschnitt 2.3.1), fettlösliche Vitamine und Enzyme zielgerichtet an den Wirkungsort gelangen.

Silber in Nanoform ist das meist verwendete Nanomaterial in Kosmetikerzeugnissen, da es antibakteriell wirkt und so der mikrobiellen Zersetzung von Schweiß entgegenwirkt [Cho *et al.*, 2005]. Nanostrukturiertes Titandioxid und Zinkoxid werden in Sonnencremes eingesetzt. Im Mikromaßstab sind diese schon lange als UV-Absorber in Gebrauch, nanoskalig fällt jedoch der Effekt weißer Rückstände auf der Haut, verursacht durch die größeren Partikel, weg und die Nano-Sonnencremes sind transparent.

Die Verwendung nanostrukturierter Inhaltsstoffe in Kosmetikprodukten birgt Nebenwirkungen. Aufgrund mangelnder toxikologischer Untersuchungen gibt es noch keine Regelungen, die den Einsatz von Nanotechnologie im Kosmetikbereich limitieren. Das Bewusstsein der Gesellschaft für das möglicherweise von Nanomaterialien ausgehende Schädigungspotential ist in den vergangenen Jahren gewachsen. Nanosilber fand beispielsweise in letzter Zeit in den Medien vermehrt Erwähnung aufgrund vermuteter negativer Gesundheitseffekte ¹. Die EU hat auf die Bedenken der KonsumentInnen mit der Einführung einer Kosmetikverordnung, die ab 2013 die Angabe von Nanoinhaltsstoffen verpflichtend macht, reagiert [2011/1169/EU].

¹ Die Presse vom 4.2.2012: „Wort der Woche: Nanosilber“; Stuttgarter Zeitung vom 13.2.2012: „Gefahr für den Menschen“; Kurier vom 30.1.2012: „Antibakterielle Beschichtungen: gefährliche Silber-Teilchen“

2.3.3. Lebensmittel

Als Nanolebensmittel („Nanofood“) werden Nahrungsmittel bezeichnet, bei deren Herstellung, Verarbeitung oder Verpackung Nanotechnologie eingesetzt werden. Viele dieser Konzepte befinden sich noch in der Entwicklung und werden voraussichtlich erst in den kommenden Jahren Marktreife erlangen. Die Firmen, die an nanotechnologischen Einsatzmöglichkeiten im Lebensmittelsektor forschen, werden von der Unternehmensberatung H.K. Consultancy auf über 200 geschätzt [HKC, 2010]. Darunter befinden sich namhafte Lebensmittelkonzerne wie Nestlé, Kraft Foods, Group Danone und Cadbury Schweppes [BUND, 2008]. Es existieren Prognosen, wonach der Nanolebensmittelmarkt 2012 ein Volumen von 5,8 Milliarden US Dollar umfassen soll [Chaudhry *et al.*, 2010].

Nanotechnologie soll im Lebensmittelsektor sowohl die Sicherheit als auch den gesundheitlichen Nutzen für den/die KonsumentIn optimieren. Dies kann einerseits über den direkten Einsatz nanoskaliger Materialien im Lebensmittel, andererseits über die Verwendung von Nanostoffen in Verpackungen gewährleistet werden. Ersteres wird beispielsweise durch Nanoverkapselungen erreicht, die eine erhöhte Aufnahme und Bioverfügbarkeit von Vitaminen, Mineralien etc. in Lebensmitteln oder Nahrungsergänzungsmitteln ermöglichen sollen. Nanodimensionierte Mizellensysteme erleichtern, wie im Fall der seit 2005 patentierten „Solubilisierungstechnologie“ von Aquanova [Aquanova, 2006], die Resorption fettlöslicher Stoffe. Vitamine, Omega-3-Fettsäuren und andere lipophile Mikronährstoffe sind in Form von Mizellen-Emulsionen erhältlich. Fairvital bietet antibakterielles kolloidales Silber zum Kauf als Lebensmittelzusatzstoff, Toddler Health verspricht bessere biologische Verfügbarkeit von Eisen in einem Kindergetränk durch Zugabe desselben in Nanopartikelform. Nanotechnologie kann auch das optische Erscheinungsbild von Lebensmitteln verbessern. Mars Inc. hat beispielsweise das Patentrecht an einem Schokoladeüberzug aus TiO₂-NP, der der Entstehung des weißen Fetteifs an der Oberfläche, entstanden durch falsche Lagerung, entgegenwirken soll.

Lebensmittelkontaktmaterialien wie Verpackungen können durch den Gebrauch von Nanotechnologie ebenfalls eine Verbesserung ihrer Eigenschaften erhalten. Die Firma Nanocor hat beispielsweise ein Nanokomposit entwickelt, das dank einer erhöhten mechanischen Barriere einerseits durch das Fernhalten von Sauerstoff die Haltbarkeit verlängern, andererseits erwünschte Stoffe wie Vitamine und Aromen länger konservieren kann. Eingearbeitete Nanostrukturen, die nach Reaktion mit Chemikalien die Anwesenheit von pathogenen Keimen signalisieren oder als Sensoren die Temperatur und Feuchtigkeit

im Inneren zeigen sind zwei weitere Möglichkeiten, wie Nanotechnologie zukünftig den Sektor der Lebensmittelindustrie bereichern kann.

Vergleichbar mit Anwendungen von Nanotechnologie im Kosmetiksektor (siehe Abschnitt 2.3.2), besteht auch bei Lebensmitteln mit nanostrukturierten Inhaltsstoffen bzw. Kontaktmaterialien Schädigungspotential für den Menschen. Da bis dato im Gegensatz zu Forschungen am Einsatz von Nanotechnologie im Lebensmittelbereich nur eine begrenzte Zahl toxikologischer Gutachten vorliegt, gibt es bis jetzt keine Nanoinhaltsstoffe, deren Verwendung untersagt ist. Die 2011 von der EU erlassene Verordnung 1169 verpflichtet die Konzerne, alle Nanotechnologie enthaltenden Lebensmittel ab Herbst 2014 zu kennzeichnen. Lebensmittel die technisch hergestellte Nanomaterialien enthalten oder aus diesen gemacht sind, müssen das in Klammern gesetzte Wort „Nano“ im Zutatenverzeichnis vermerkt haben [2011/1169/EU].

2.4. Herstellungsverfahren

Bei der Synthese von Nanomaterialien wird zwischen zwei grundlegenden Vorgehensweisen unterschieden. Einerseits gibt es Bottom-Up-Methoden (vom Kleinen zum Großen), andererseits Top-Down-Verfahren (vom Großen zum Kleinen). Erfolgt die Herstellung von Nanomaterialien nach der weiter verbreiteten Bottom Up-Methode her, so werden diese aus ihren atomaren Bausteinen „aufgebaut“, während bei den Top-Down-Verfahren größere Strukturen „zerkleinert“ werden [Bhushan, 2007]. Im Folgenden wird auf die beiden Methoden kurz eingegangen.

2.4.1. Top-Down VS Bottom-Up

Zu den Top-Down-Verfahren zählen die mechanische Zerkleinerung, beispielsweise durch Mahlverfahren, und die Lithographie, in deren Zuge das gewünschte Muster auf ein lichtempfindliches Substrat aufgebracht wird. Im Fall des Top-Down-Zugangs ist sowohl der Energieaufwand als auch das Anfallen von Nebenprodukten bei gleichzeitig weniger reproduzierbaren Ergebnissen erheblicher, verglichen mit dem Stück um Stück-Aufbau der Bottom-Up-Methode [Berger, 2009].

Zu den Bottom-Up-Verfahren gehört u. a. die Selbstassemblierung, eine spontane Selbstorganisation von Atomen zu thermodynamisch stabileren Verbindungen. Epitaxie stellt ebenso eine Bottom-Up-Methode dar und bezeichnet das selbstständige Kristallwachstum der Ausgangskomponenten. Epitaxiales Wachstum setzt mindestens zwei Phasen

unterschiedlicher Aggregatzustände voraus, eine feste und eine gasförmige oder flüssige, an deren Grenzfläche eine Übersättigung herrscht, sodass sich die Moleküle an der festen Oberfläche abscheiden. Die Morphologie und Geschwindigkeit des Wachstums kann durch thermodynamische Parameter, wie die Temperatur, eingestellt werden. Ist die zweite Phase neben der Festphase gasförmig, wird der Prozess als chemische Gasphasenabscheidung (CVD – ‚Chemical Vapour Deposition‘) bezeichnet. Diese macht sich Reaktionen der Komponenten in der Gasphase zu Nutze, die sich in dessen Verlauf auf einem dünnen Film abscheiden. Der Nachteil der Methode ist, dass ein hoher Dampfdruck und thermisch gekoppelte Transport- und Abscheidungsprozesse hohe Temperaturen ($> 600\text{ °C}$) und lineare Substrate voraussetzen. Dies kann mit der 1998 von Watson *et al.* patentierten überkritischen Reaktivabscheidung (SFRD – ‚Supercritical Fluid Reactive Deposition‘) umgangen werden.

2.4.2. Reaktivabscheidung aus überkritischem CO_2

Die Herstellung metallischer Nanopartikel mit dem SFRD-Verfahren hat den Vorteil, dass poröse Substrate und niedrigere Temperaturen verwendet werden können. Die Reaktanden, organische Verbindungen des jeweiligen Metalls, werden bei ca. 80 °C in einer überkritischen Flüssigkeit (SCF – ‚Supercritical Fluid‘) gelöst und nach Reduktion auf organischen oder anorganischen Feststoffen metallisch abgeschieden [Watkins *et al.*, 1998; 1999]. Die Pt-NP, die im Zuge dieser Arbeit verwendet wurden, wurden mittels Reaktivabscheidung aus überkritischem CO_2 vom Institut für technische Thermodynamik und Kältetechnik des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) im Rahmen eines interdisziplinären Projektes synthetisiert. Im Rahmen dieser Synthese wird der organometallische Platinkomplex $(\text{Pt}(\text{COD})\text{Me}_2)$ (1,5-(Cyclooctadien)-dimethylplatin(II)) in

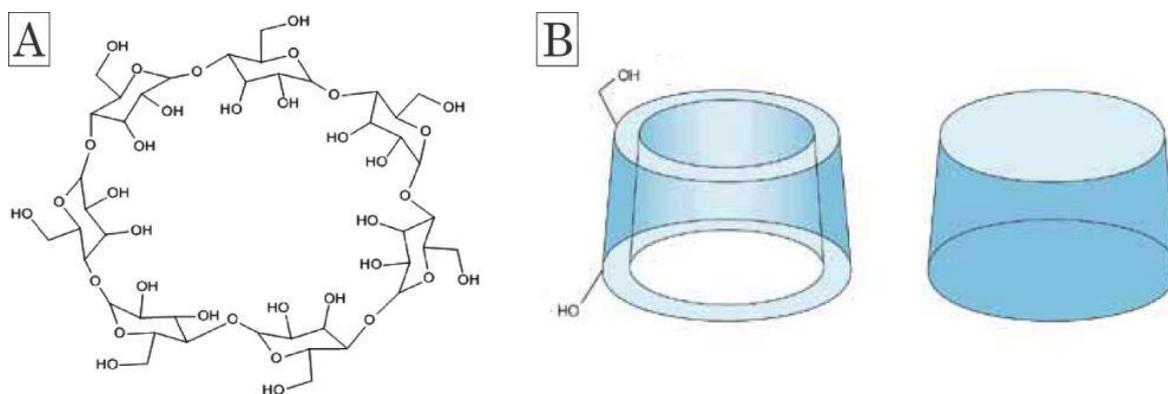


Abbildung 2.7 A) Strukturformel von β -Cyclodextrin B) Eine Darstellung der kelchförmiger Struktur von β -Cyclodextrin [entnommen aus Davis *et al.*, 2004]

überkritischem CO₂ (sc-CO₂ - ‚Supercritical CO₂‘) gelöst, anschließend durch Zugabe von H₂ reduziert und auf einem porösen Trägermaterial, β-Cyclodextrin (ein cyclisches Heptasaccharid aus Glucose (siehe Abbildung 2.7 A und B)), als metallisches Platin in nanopartikulärer Form abgeschieden [Türk *et al.*, 2012].

Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 2.8 dargestellt:

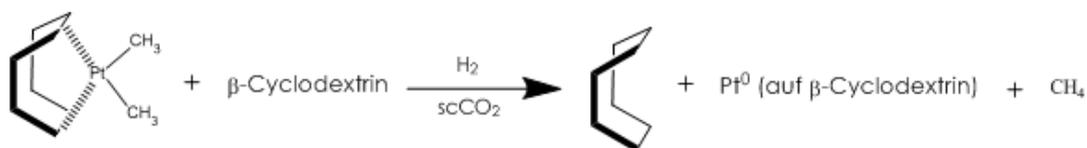


Abbildung 2.8 Reaktion von Pt(COD)Me₂ zu Pt⁰ auf β-Cyclodextrin im Rahmen des SFRD- Verfahrens (‚Supercritical Fluid Reactive Deposition‘).

SCF besitzen Eigenschaften, die zwischen jenen von Gasen und Flüssigkeiten liegen. Beispielsweise ist die Dichte von sc-CO₂ (39,85 °C, 10 MPa) nicht so groß wie für flüssiges CO₂ (26,85 °C, 50 MPa), übersteigt jedoch jene des gasförmigen Stoffes (39,85 °C, 0,1 MPa). Umgekehrt verhält es sich mit den Diffusionskonstanten gelöster Stoffe in SCF, die größer sind als in flüssigen Lösungsmitteln, jedoch nicht so groß wie in Gasen [Williams *et al.*, 2000].

Sc-CO₂ ist unter den überkritischen Flüssigkeiten jene, die am häufigsten in der SFRD verwendet wird, da die kritische Temperatur von CO₂ bereits bei 31 °C und der kritische Druck bei 7,39 MPa liegt, wodurch keine extrem Bedingungen erforderlich sind. Weiters ist sc-CO₂ kostengünstig und weder entflammbar noch toxisch. Nachteile der Methode ergeben sich durch die Vielzahl an physikochemischen Faktoren, die die Partikelgröße und -verteilung beeinflussen, wie Reduktionsbedingungen, Art und Menge des Vorläuferkomplexes, Oberflächeneigenschaften des Substrates und dessen chemische Natur. Dadurch wird eine genaue Einstellung der gewünschten Größe synthetisierter Partikel sowie eine homogene Größenverteilung erschwert [Zhang *et al.*, 2006].

2.5. Nanotoxikologie

2.5.1. Allgemeines

Die Zahl der auf dem internationalen Markt erhältlichen Produkte, die mit Nanotechnologie hergestellt werden bzw. Nanomaterialien enthalten, steigt kontinuierlich

[Nanotechproject, 2011]. Bedingt durch Eigenschaften nanostrukturierter Materialien, wie erhöhte Reaktivität oder die Möglichkeit, biologische Membranen zu passieren, können schädigende Wirkungen auf den menschlichen Organismus oder die Umwelt auftreten. Da das toxikologische Profil, das für den jeweiligen Stoff in den bisher gebräuchlichen Dimensionen erstellt wurde, nicht einfach auf den nanoskaligen Maßstab übertragbar ist, müssen Nanomaterialien wie neuartige Substanzen behandelt und neu bewertet werden. Der Begriff Nanotoxikologie fand erstmals 2004 in einem Übersichtsartikel eines Medizinjournals Erwähnung [Donaldson, 2004]. 2005 waren 179 Publikationen veröffentlicht, die die toxikologischen Auswirkungen nanotechnologisch erzeugter Materialien auf Umwelt und Mensch zum Thema hatten, 2009 bereits 791 Veröffentlichungen [National Nanotechnology Initiative, 2010]. Ausgehend von der Definition klassischer Toxikologie kann Nanotoxikologie als „die Wissenschaft der Effekte von NP (beabsichtigt hergestellt oder nicht) auf lebende Organismen“ bezeichnet werden [Clift *et al.*, 2010].

Eine solide wissenschaftliche Datenlage kann, neben Aufklärung über gesundheitliche Risiken, auf der Gegenseite dazu beitragen, Befürchtungen der KonsumentInnen bezüglich Nanoprodukten entgegenzuwirken und so einerseits vor potentiell gesundheitsschädlichen Stoffen schützen, aber auch die Vorteile der Nanotechnologie für die Gesellschaft zugänglich machen.

2.5.2. Charakterisierung nanostrukturierter Materialien in toxikologischen Untersuchungen

Im Rahmen nanotoxikologischer Untersuchungen ist eine ausreichende Charakterisierung der verwendeten nanostrukturierten Materialien erforderlich. Dabei sind einige Faktoren zu berücksichtigen, die in den folgenden Kapiteln diskutiert werden.

2.5.3. Einfluss physikochemischer Charakteristika

Ein grundlegendes Problem der Nanotoxikologie ist das breite Spektrum nanoskaliger Verbindungen und deren physikochemischer Eigenschaften, was eine allgemeine toxikologische Aussage über „die Nanomaterialien“ nicht zulässt. Der wissenschaftliche Ausschuss der europäischen Kommission SCENIHR erwähnt in seiner Empfehlung zum Thema Nanotechnologie die Nanotoxizität bestimmende Mediatoren, die in jeder nanotoxikologischen Untersuchung ausreichend charakterisiert werden sollen: die Größe in

Form des Partikeldurchmesser sowie die Größenverteilung, die spezifische Oberfläche bezogen auf das Volumen, vorhandene Oberflächenmodifikationen und allgemeine physikochemische Charakteristika wie Form oder Kristallinität [SCENIHR, 2010]. Auf die wichtigsten dieser Punkte wird im Folgenden kurz eingegangen.

Größe Dass der Durchmesser des Nanomaterials eine Rolle spielt wurde in vielen Toxikologie-Untersuchungen demonstriert. Beispielsweise wurde anhand von Ag-NP ($55 \text{ nm} \geq \text{Ø} \geq 15 \text{ nm}$), die wegen ihrer bakterientötenden Eigenschaften in Deodorants und anderen Kosmetikprodukten verwendet werden, ein indirekt proportionaler Zusammenhang zwischen Durchmesser und Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS – ‚Reactive Oxygen Species‘) in alveolaren Makrophagen gezeigt [Carlson *et al.*, 2008]. TiO₂-NP verursachen bei Durchmessern von 10 und 20 nm in humanen Bronchialepithelzellen oxidative DNA-Schäden, Lipidperoxidation und Mikronuklei-bildung, bei Dimensionen über 200 nm wurde kein oxidativer Stress nachgewiesen [Gurr *et al.*, 2005].

Form Neben der Größe spielt auch die Form eine Rolle. Stäbchenförmige HARN ($\text{Ø} = 20 - 150 \text{ nm}$) können beispielsweise in Makrophagen zu unvollständiger Phagozytose führen, was die Entstehung von ROS zur Folge hat. Gerade Nanoröhrchen induzieren in Makrophagen mehr dieser Sauerstoffverbindungen als gewundene [Brown *et al.*, 2007].

Kristallinität Auch die Kristallinität hat Einfluss auf die toxikologische Verhaltensweise. So weisen TiO₂-NP ($\text{Ø} = 15 \text{ nm}$ und 30 nm) je nach Kristallstruktur unterschiedliche Wirkungsarten auf. Bei der Anatase-Kristallstruktur ist die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies höher als für Rutil und da der Anteil der Anatase-Phase bei kleiner werdendem Durchmesser zunimmt, generieren 15 nm TiO₂-NP aufgrund ihrer Zusammensetzung mehr ROS als jene mit 30 nm Durchmesser [Auffan *et al.*, 2009].

Oberflächenmodifikation Die chemischen Gruppen an der Partikeloberfläche tragen zur Art der Wechselwirkungen mit der Zellmembran bzw. den Organellen bei. Poly(methylacrylat) - NP mit > 0,1 % Poloxamin 908² - Gruppen auf der Oberfläche enden 30 Minuten nach intravenöser Zufuhr in Ratten zu 13 % in der Leber. Ohne Oberflächenmodifikation nur zu 75 % [Araujo *et al.*, 1999]. Dawson *et al.* wiesen nach, dass NP in Abhängigkeit ihrer Oberflächenladung Zelllipidmembranen strukturell reorganisieren [Dawson *et al.*, 2009]. Die Toxizität von SiO₂-NP hängt maßgeblich von der Verteilung und Häufigkeit der Silanolgruppen an der Oberfläche der Partikel ab [Daniel *et*

² Poloxamin 908 ist ein tensidisches Ethylenoxid/Propylenoxid Block-Copolymer

al., 1995; Fubini *et al.*, 1999]. Es wird vermutet, dass dies durch die erhöhte Zahl der positiven Oberflächenladungen verursacht wird [Bagchi, 1992].

Unterschiedliche Herstellungsverfahren Jedes Nanomaterial wird mittels anderer Verfahren produziert. Durch synthesebedingte Unterschiede physikochemischer Strukturen innerhalb ein und desselben nanostrukturierten Materials wird möglicherweise dessen toxisches Verhalten beeinflusst [Suh *et al.*, 2009]. Im Rahmen der Produktion kann es ebenfalls zu Kontaminationen kommen. Bei den gebräuchlichsten Syntheseverfahren vieler CNTs werden beispielsweise Metallkatalysatoren und feste Substrate als Wachtstumsunterlagen verwendet. Dadurch können je nach Prozess unterschiedliche Konzentrationen von Metallkontaminationen oder amorphen Kohlenstoffresten vorhanden sein, die in Verdacht stehen, für die ROS-Generierung verantwortlich zu sein [Aillon *et al.*, 2009]. Erwiesenermaßen hat die Art der Synthetisierung maßgeblichen Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften und dadurch bedingte Verhaltensweisen wie Agglomeration und Aggregation.

Agglomeration und Aggregation Je nach Stabilität kommen NP in flüssiger Suspension weiterhin einzeln vor oder agglomerieren, Aggregate behalten ihre Form bei bzw. bilden mit weiteren Aggregaten agglomerierte Strukturen [Oberdörster, 2010b]. Wie aus Abbildung 2.9 ersichtlich beeinflusst die Art der zwischenpartikulären Bindung in Suspension den hydrodynamischen Radius (R_H). Die Größe des R_H hat Einfluss auf die

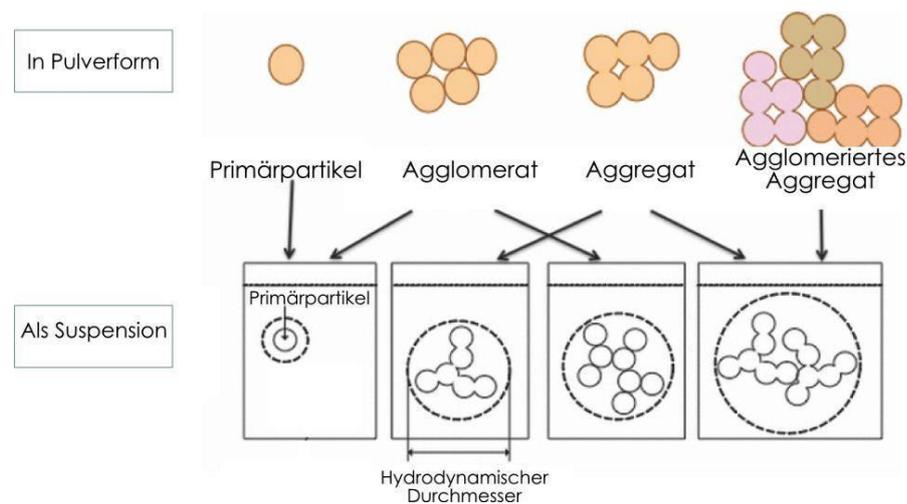


Abbildung 2.9 NP in der Luft (als Pulver) und in flüssiger Dispersion. Die Partikel können einzeln in Form von Primärpartikeln oder durch schwache van der Waals Kräfte gebunden, als Agglomerate, vorkommen. Herrschen starke Wechselwirkungen zwischen den Partikeln vor, so spricht man von Aggregaten [modifiziert nach Oberdörster, 2010a].

Wechselwirkung zwischen den Nanomaterialien und zellulären Strukturen [Armstrong *et al.*, 2004]. NP, die im Inkubationsmedium einzeln vorliegen und nicht agglomeriert/ aggregiert, sind in nanotoxikologischen Versuchen wünschenswert, da eine Aussage über das Verhalten des einzelnen NP definierten Durchmessers und Oberfläche gemacht werden kann. Um Agglomeration zu reduzieren, können Verfahren wie Ultraschall oder die Zugabe von Tensiden angewandt werden, Aggregate können nicht aufgelöst werden [Neugart *et al.*, 2007]. Agglomerationen lassen sich auch durch Oberflächenmodifikationen verhindern, beispielsweise durch mehrfach geladene Ionen auf TiO₂-NP oder einen Polymerüberzug auf QP [Neugart *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008a].

Um eine ausreichende Charakterisierung nanostrukturierter Materialien im Vorfeld nanotoxikologischer Untersuchungen sicherzustellen, gibt es diverse Methoden, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

2.5.4. Charakterisierungsverfahren

Für nanotoxikologische Untersuchungen ist es notwendig, die verwendeten Nanomaterialien ausreichend zu charakterisieren, um die Effekte interpretieren und in den richtigen Kontext setzen zu können. Die Interessensvereinigung „Minimale Charakterisierung von Nanopartikeln“ (MINChar – ‚Minimum Information on Nanoparticle Characterization‘) stellte 2009 Gesichtspunkte vor, nach denen die Charakterisierung nanostrukturierter Materialien erfolgen sollte. Dazu gehört u. a. die Partikelgröße und die Neigung in Dispersion zu agglomerieren, was ein Maß für die Stabilität darstellt [MINChar Initiative, 2009]. Eine geringe Agglomeration im Suspensionsmedium ist wünschenswert, da sich die experimentellen Ergebnisse auf das Verhalten einzelner Partikel beziehen lassen und nicht auf das der Agglomerate, die andere Eigenschaften als einzelne NP aufweisen können. [Oberdörster, 2010b]. Zur Bestimmung der Größe von Nanostrukturen bieten sich Elektronenmikroskopie-Aufnahmen und die dynamische Lichtstreuung (DLS – ‚Dynamic Light Scattering‘) an [Hall *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008a]. Die Neigung zur Agglomeration von Nanopartikeln in Flüssigkeit kann über das Zeta-Potential untersucht werden.

Zeta-Potential

Befindet sich ein Partikel in wässriger Suspension wird er aufgrund der Adsorption von Ionen von einer Oberflächenschicht, der elektrischen Doppelschicht, umgeben, bis eine elektrisch neutrale Nettoladung vorliegt. Die Doppelschicht ist aus zwei Schichten aufgebaut, der inneren starren, die aus fest gebundene Ionen besteht und der äußeren diffusen Schicht (siehe Abbildung 2.10).

Wandert der Partikel in der Flüssigkeit, z. B. aufgrund der brown'schen Molekularbewegung, bewegt sich ein Teil der Ionen mit, jene fest gebundenen innerhalb der sog. Abschergrenze, der Rest bleibt zurück. Das Potential, dies an der Abschergrenze herrscht, wird als Zeta-Potential (ζ) bezeichnet. Dieses kann bestimmt werden, indem die elektrophoretische Mobilität des Partikels bei Anlegen eines elektrischen Feldes gemessen wird. Anschließend kann ζ über die Henry Gleichung berechnet werden:

$$U_E = \frac{2\varepsilon \zeta f(Ka)}{3\eta}$$

U_E ist die angelegte Spannung, ε die Dielektrizitätskonstante, η die Viskosität und $f(Ka)$ die Henry Funktion, die vom Dispersionsmedium abhängt, meist Wasser. Die Größe des ζ stellt ein Maß für die Stabilität der Suspension dar, da Partikel gleicher Ladung sich bei hohem Zeta-Potential stärker elektrostatisch abstoßen und so weniger zu Agglomeration durch van der Waals Kräfte neigen. Dies ist abhängig von der Ionenstärke der umgebenden

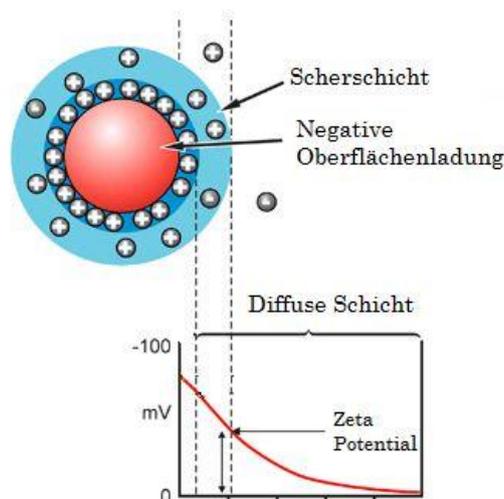


Abbildung 2.10

Aufbau der elektrischen Doppelschicht eines negativ geladenen Partikels. In unmittelbarer Nähe zum Partikel liegt die starre Schicht (nicht angezeigt), darauf folgt die diffuse Schicht. Bei Bewegung des Partikels kommt es am Rande der diffusen Schicht, an der Scherschicht, zur Bildung des Zeta-Potentials [modifiziert nach Malvern Instrument Ltd., 2009]

Flüssigkeit, da die Oberflächenladung des Partikels von jener der Gegenionen überlagert werden kann, sowie vom pH. Metallische NP agglomerieren am stärksten, wenn der pH jenem ihres isoelektrischen Punktes entspricht. Von einem großen ζ und demnach einer stabilen Suspension kann ab einem Wert von $\geq |30 \text{ mV}|$ gesprochen werden [Malvern Instrument Ltd., 2009].

Das ζ der Pt-NP wird im Zuge dieser Arbeit mit dem ZetaSizer Nano von Malvern bestimmt. Die Messung basiert auf der Wanderung der NP mit einer Geschwindigkeit proportional zum ζ nach Anlegen eines elektrischen Feldes durch zwei Elektroden in einer Küvette (siehe Abbildung 2.11). Der ZetaSizer ermittelt die elektrophoretische Mobilität der NP mit einer Kombination zweier Techniken, die gemeinsam als M3-PALS bezeichnet werden. Er verfügt einerseits über die Laser Doppler Anemometrie (LDA), die sog. M3 Messung. Dabei wird ein Laserstrahl in die Probe gelenkt, an die ein elektrisches Feld angelegt ist, und die elektrophoretische Mobilität der Partikel anhand des Frequenzmusters des gestreuten Strahls bei einem Winkel von 17° bestimmt. Zusätzlich kann die Mobilität über die Phasenverschiebung des Streulichtes im Rahmen der sog. PALS (‘Phase Analysis Light Scattering’)-Technologie ermittelt werden. Aus diesen Informationen berechnet die Software im Anschluss über die Henry Formel das Zeta-Potential [Malvern Instrument Ltd., 2009].

Partikelgrößenverteilung

Die DLS-Messung nutzt ebenso wie die Zeta-Potential-Bestimmung die Streuung von Laserlicht am Probemolekül. Durch die brown’sche Bewegung der NP in einer Flüssigkeit weist das gestreute Licht innerhalb eines definierten Zeitraums Schwankungen in seiner Intensität auf, die vom Detektor aufgezeichnet werden. Die Software berechnet aus diesem

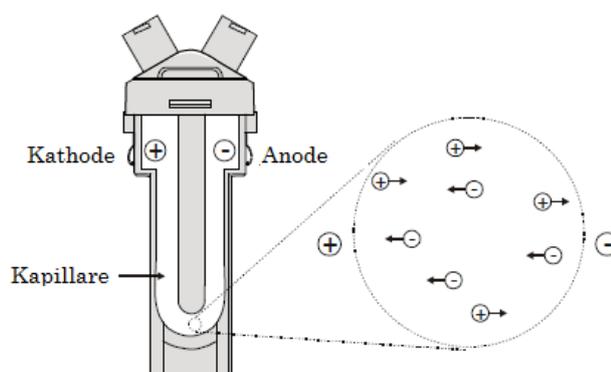


Abbildung 2.11

Partikel migrieren je nach Ladung im elektrischen Feld der Küvette [modifiziert nach Malvern Instrument Ltd., 2009]

Muster die Bewegungsgeschwindigkeit der Partikel, die proportional zu deren Größe ist (große Moleküle diffundieren langsamer als kleine). Der ZetaSizer arbeitet zur Erfassung der Intensitätsschwankungen des Streulichtes mit der NIBS („Non-Invasive Back Scatter“-Technologie). NIBS bestimmt das von dem Kolloid gestreute Licht bei einem Winkel von 173° statt der üblichen 90° . Das Streulicht muss so nicht die ganze Probe durchqueren und die Empfindlichkeit steigt um zwei Größenordnungen, wodurch kleine Partikel im niedrigen nm-Bereich besser erfasst werden. Da sich der Detektor nahe an der Suspension befindet, diese jedoch nicht berührt („Non-Invasive“), muss das gestreute Licht nur einen kleinen Weg zurück legen, weshalb die Signalverfälschung durch Vielfachstreuung an Nachbarspartikeln minimiert wird. Die PSD wird anschließend bezogen auf die Streulichtintensität vom Gerät berechnet.

Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopie (EM) liefert eine bessere Auflösung als die klassische Lichtmikroskopie, da die Wellenlänge eines Elektrons ca. 100000-mal geringer ist als jene eines Photons. Dadurch können Strukturen bis 0,1 nm aufgelöst werden. EM ist deshalb die Methode der Wahl zum Erstellen von Abbildungen von Proben im mikro- und nanodimensionalen Bereich [Bozzola *et al.*, 1999].

Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (SEM – „Scanning Electron Microscopy“) werden die Elektronen in Form eines fokussierten Strahls als feine Sonde über die Oberfläche einer festen Probe „gerastert“. Diese Primärelektronen führen durch unelastische Stöße mit den Atomen des Objekts zur Emission von Sekundärelektronen, die, von einem entsprechenden Detektor erfasst, eine topographische Abbildung der Probenspezies liefern. Bei sehr dünnen Proben ist es möglich, dass die Elektronen diese durchlaufen, wobei sie durch die Atomstrukturen gestreut werden können. Der Streuwinkel hängt bei Proben homogener Dicke von ihrer lokalen Zusammensetzung ab. So wird ein 3D-ähnliches Abbild der Probenspezies erstellt. Zusätzlich zu den Sekundär- und Streuelektronen werden Röntgenstrahlen emittiert, was die Identifizierung des Probenmaterials mit der sog. Energie-dispersiven Röntgen Spektroskopie (EDXS – „Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy“) zulässt, die im Zuge dieser Arbeit verwendet wurde. Dabei werden die nach Anregung mittels Elektronenstrahl emittierten Röntgenstrahlen des Elements als charakteristische Linienspektren heran gezogen [Li, 2008].

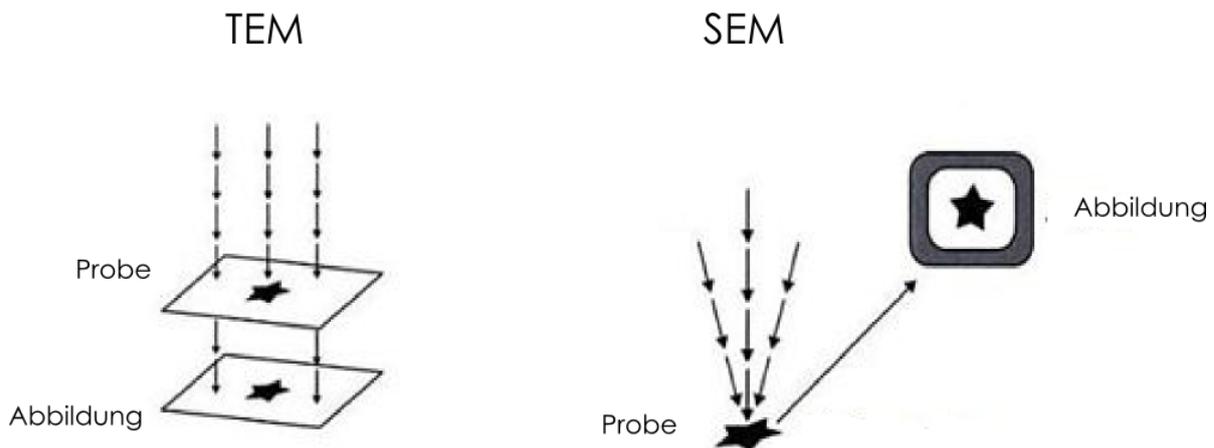


Abbildung 2.12 Funktionsprinzipien der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und der Rasterelektronenmikroskopie (SEM) [modifiziert nach Bozzola *et al.*, 1999]

Transmissionselektronenmikroskopie

In der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wird eine dünne Probenspezies (im nm-Bereich) mit einem Elektronenstrahl einer Beschleunigungsenergie von 200 kV - 500 kV beleuchtet. Das Bild wird im Fall der TEM mit Hilfe der Elektronen, die die Probe passieren und am Detektor auftreffen, erstellt. Abbildung 2.12 zeigt eine Übersicht der die Funktionsprinzipien von TEM und SEM.

Raster-Transmissionselektronenmikroskopie

In der Raster-Transmissionselektronenmikroskopie (STEM-, Scanning Transmission Electron Microscopy) werden Vorzüge der SEM und der TEM vereinigt. Durch die Detektion der gestreuten bzw. in sehr kleinen Winkel (Hellfeld STEM) oder in größeren Winkeln gestreuten (Dunkelfeld STEM) Elektronen ergibt sich ein durch die lokale Zusammensetzung bestimmtes Bild der Probe. Ebenso wird der Betrieb bei höheren Spannungen als jene der SEM möglich, wodurch die Elektronen schneller werden und Energien von 100 KeV bis 1000 KeV erreichen. Dadurch können Abbildungen von sehr dünnen (10 nm – 50 nm) Proben gemacht werden [Davis, 2011].

Bei Bestrahlung der Probe mit einem fokussierten Ionenstrahl (FIB – ‚Focussed Ion Beam‘) kommt es zu Wechselwirkungen der Probenatome mit Ionen. Die Auflösung eines FIB-Bildes erreicht nicht die Qualität einer mittels Elektronenmikroskopie erstellten Aufnahme, wird jedoch den Elektronenstrahl einer SEM hinzugefügt, erhält man Bilder mit hoher

Auflösung [Giannuzzi *et al.*, 2004]. Diese Anordnung wird als Dualstrahl bezeichnet, der auch im Zuge der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

Neben einer umfassenden Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften eingesetzter nanostrukturierter Materialien, ist die Wahl der entsprechenden Dosierung in nanotoxikologischen Verfahren von Bedeutung. Zunächst ist jedoch die Einheit derselben festzulegen.

2.5.5. Einheit und Menge der applizierten Dosis

Würden die Nanopartikel einer Probe mit der Masse angeben, ließe dies die Tatsache außer Acht, dass sich, bei gegebener Masse, die Anzahl der Partikel sowie die Gesamtoberfläche invers zum Durchmesser verhalten. Liegen beispielsweise 1 mg sphärischer Partikel mit einem Durchmesser von je 10 μm vor, entspricht das 10^{12} Stück mit einer Gesamtoberfläche von 270 m^2 , bei 10 nm großen Partikel sind es 10^{21} NP in 1 mg, die 270000 m^2 Oberfläche ausmachen [Maynard *et al.*, 2011]. Dieses nicht proportionale Verhältnis zwischen Massen- und Oberflächendosis hat sich in einer Reihe nanotoxikologischer Untersuchungen bestätigt. Als Schlussfolgerung wurde postuliert, dass sich bei Nanomaterialien die Oberfläche als bessere Dosisangabe als die Masse oder Anzahl anbietet [Donaldson *et al.*, 2002; Oberdörster, 2010a]. Die Pt-NP dieser Arbeit konnten jedoch nicht als Oberflächenkonzentration angegeben werden, da ein großer Prozentsatz der Probe (> 90 % (w/w)) aus β -Cyclodextrin besteht, das die Oberfläche der NP überlagert. Es wurde daher die Einheit Masse pro Zellwachstumsfläche gewählt.

In bisherigen nanotoxikologischen *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen ist die Dosierung oft unrealistisch hoch gewählt, weshalb sich aus den abgeleiteten toxikologischen Ergebnissen keine Rückschlüsse auf Schäden durch die Substanzen in Konzentrationen, denen Mensch oder Umwelt tatsächlich exponiert sind, ableiten lassen. Die aus diesen hochdosiert eingesetzten nanoskalierten Stoffen erhaltenen toxikologischen Daten können jedoch als richtungweisende Grundlage für darauf aufbauende Folge-Experimente mit realistischen Dosen herangezogen werden [Oberdörster, 2010b].

Nach der Auswahl der zu applizierenden Dosis für nanotoxikologische *in vivo* Versuche sind die Wechselwirkungen des Nanomaterials im biologischen Umfeld zu berücksichtigen.

2.5.6. Wechselwirkung mit biologischen Strukturen

Nanostrukturierte Substanzen im Körper interagieren nicht wie dieselben Materialien in größeren Dimensionen mit biologischen Matrices. Die in Abschnitt 2.2 diskutierten Eigenschaften von Nanomaterialien bedingen andersartige Wechselwirkungen mit Enzymen, der DNA oder anderen Biomolekülen und legen die Vermutung einer komplexen zugrundeliegenden Biokinetik nahe. Da nanoskaliges Material in derselben Größenordnung wie biologische Moleküle liegt, können Nanospezies in Prozesse auf Zellniveau eingreifen. Nanoskalige Dimensionen ermöglichen das Passieren biologischer Membranen, wie für SiO₂-beschichtete NP ($\varnothing = 50$ nm) gezeigt, die die BHS passieren können [Kim *et al.*, 2006a]. SWCNT bzw. MWCNT ($\varnothing = 1 - 20$ nm) erlangen ebenso Zugang zur Kern-DNA, wo sie Doppelstrangbrüche und Mikronuklei induzieren [Cveticanin *et al.*, 2010; Pelka *et al.*, 2009].

Sobald Nanomaterialien in Kontakt mit biologischer Matrix kommen, werden sie von einer sogenannten Corona aus Biopolymeren, hauptsächlich Proteine und Lipide, umgeben. Dadurch ändert sich die Konformation adsorbierter Proteine, welche beispielsweise in weiterer Folge zuvor verdeckte Aminosäuren exponieren [Lynch, 2006]. Die Corona verleiht den NP eine neue Oberfläche und beeinflusst im biologischen Umfeld maßgeblich den Transport und die Wechselwirkung des nanopartikulären Material [Cedervall *et al.*, 2007; Ehrenberg *et al.*, 2009].

2.5.7. Aufnahmerouten in den Körper

In der Nanotoxikologie wird zwischen drei Hauptaufnahmerouten für die Substanzen unterschieden. Nanomaterialien können inhaliert, über den GIT oder die Haut aufgenommen werden. Die Lunge stellt den wichtigsten Aufnahmeweg dar, wird jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt, da die Aufnahme nanostrukturierter Platins in den GIT behandelt wurde. Selbiges gilt für die Haut. Nanostrukturierte Stoffe gelangen entweder über den mukoziliären Aufzug aus der Lunge oder durch direkte orale Aufnahme, z. B. über Lebensmittel oder Pharmazeutika, in den GIT. Es wurden vier Möglichkeiten, wie NP über dessen Epithelschicht aufgenommen werden, postuliert, die zum Teil bestätigt werden konnten. Eine Übersicht ist in Abbildung 2.13 zu sehen. Der Großteil der Nanomaterialien wird im GIT mittels der M-Zellen resorbiert (Abbildung 2.13 Route A). M-Zellen sind differenzierte Epithelzellen, verantwortlich für den Transport von Makromolekülen und Partikeln im Darm. Die im Ileum ansässigen sog. Peyerschen Plaques

(*Folliculi Lymphatici Aggregati*, PP), die aus je ca. 20 – 80 Lymphfollikel unterhalb der Epithelschicht aufgebaut sind, weisen eine hohe Dichte an M-Zellen auf und gelten daher als primäre Aufnahme­region des GIT für NP [Hillery *et al.*, 1994]. M-Zellen nehmen NP apikal über Endozytose auf und transportieren diese über Vesikel auf die gegenüberliegende Seite. Auf der basolateralen Seite angekommen reichen die M-Zellen die Nanomaterialien an mononukleare Zellen, Makrophagen und Dendriten, zur Phagozytose weiter. Makrophagen werden bei diesem Aufnahmemechanismus als bevorzugtes Ziel mikroskopischer und möglicherweise größerer nanoskaliger Partikel angenommen [Thoree *et al.*, 2008]. Rieux *et al.* zeigten 2005 einen um das 1000-fache erhöhten Transport mikroskaliger Latexpartikel (200 nm und 500 nm) in einem Cokulturmodell aus Darmzelllinien und M-Zellen, verglichen mit der reinen Enterozyten-Monokultur [Rieux *et al.*, 2005]. Die Effizienz der M-Zellen lässt bei Partikelgrößen zwischen 200 und 500 nm nach. Dies deckt sich mit einer anderen Veröffentlichung, in deren Zuge demonstriert wurde, dass nach oraler Einnahme von Polystyrol-NP in Ratten 6,6 % der 50 nm, 5,8 % der 100 nm, aber nur 0,8 % der 1 µm bzw. 0 % der 3 µm Partikel hauptsächlich in die PP aufgenommen werden [Jani *et al.*, 1992]. Ob partikuläre Materialien in den PP bleiben oder durch die Makrophagen weiter transportiert werden, ist größenabhängig. Partikel mit Durchmessern < 5 µm, wozu nanoskalige zählen, wurden in Untersuchungen hauptsächlich im Lymphsystem gefunden, während jene mit Durchmessern > 5 µm in den PP bleiben [Eldridge *et al.*, 1990; Jenkins *et al.*, 1994]. Es wird angenommen, dass eine optimale Aufnahme in den GIT bei einer Größe zwischen 20 nm

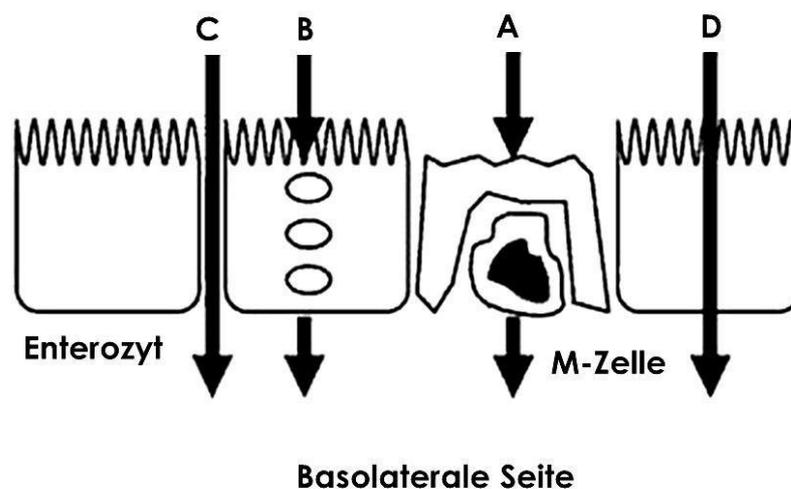


Abbildung 2.13

Aufnahmerouten in den Gastrointestinaltrakt (Route A) Transzytose durch M-Zellen (Route B) Transzytose durch Enterozyten (Route C) Parazellulärer Transport (Route D) Passive Diffusion [modifiziert nach Weber, 2010]

und 250 nm stattfindet [Jani *et al.*, 1992].

Die zweite Möglichkeit ist die Translokation von der apikalen auf die basolaterale Seite mittels Transzytose über die Enterozyten [Weber, 2010] (Abbildung 2.133, Route B). Der Mechanismus dahinter wird in Abschnitt 2.5.8 genauer erläutert. Die endozytotische Aufnahme nanopartikulären Materials im GIT ist größenabhängig. In Enterozyten von Ratten, die kolloidale Au-NP ($\varnothing = 5$ nm, 10 nm, 28 nm und 58 nm) oral verabreicht bekamen, wurden beispielsweise nur die kleineren NP ($\varnothing = 5$ und 10 nm) nachgewiesen, nicht jedoch die größeren NP ($\varnothing = 28$ nm und 58 nm) [Hillyer *et al.*, 2001]. Caco-2-Zellen, eine Zelllinie des kolorektalen Adenokarzinoms, endozytieren PLGA³-Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm mit 6-fach höherer Geschwindigkeit als jene mit 10 μ m-Durchmessern [Desai *et al.*, 1997].

Nanomaterialien können auch im Zuge des parazellulären Transports über die Tight Junctions zwischen den Zellen, die im Ausnahmefall einer Erkrankung durchlässig sind, durchströmen, da diese sonst eine effektive Barriere gegen nanopartikuläres Material bilden (Abbildung 2.133 Route C) [Ma *et al.*, 2006; Powell *et al.*, 2010].

Durch passive Diffusion gelangen nanoskalige Partikel ebenfalls auf die basolaterale Seite der gastrointestinalen Epithelschicht (Abbildung 2.133 Route D). Aus Polymeren aufgebaute Mizellen ($\varnothing = 22$ – 24 nm) können z. B. die Lipidmembran eines die Enterozytenschicht repräsentierenden *in vitro* Modells durch passive Diffusion überwinden. Dies liegt an dem amphiphilen Charakter der Polymer-Mizelle und deren geringer Neigung, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden [Mathot *et al.*, 2007].

2.5.8. Zelluläre Aufnahmemechanismen

Die eukaryotische Zellmembran besteht aus einer ca. 4 nm dicken Lipid-Doppelschicht, die hauptsächlich aus Phospholipiden und Proteinen aufgebaut ist. Aufgrund ihrer lipophilen Natur stellt sie eine Barriere für hydrophile und ionische Moleküle dar, diese können nur durch aktive Transportmechanismen passieren. In Ausnahmefällen, beispielsweise im Krankheitsfall, besteht für sehr kleine NP die Möglichkeit, dass diese zwischen Epithelzellen hindurch diffundieren können (Abbildung 2.14 (A)) [Powell *et al.*, 2010].

Die primäre Art der Internalisierung von NP < 500 nm erfolgt jedoch durch einen aktiven Prozess, der Endozytose. Hierbei hüllt die Zelle den Partikel mit ihrer Plasmamembran ein,

³PLGA = Polymilchsäure-Polyglycolsäure Co-Polymer

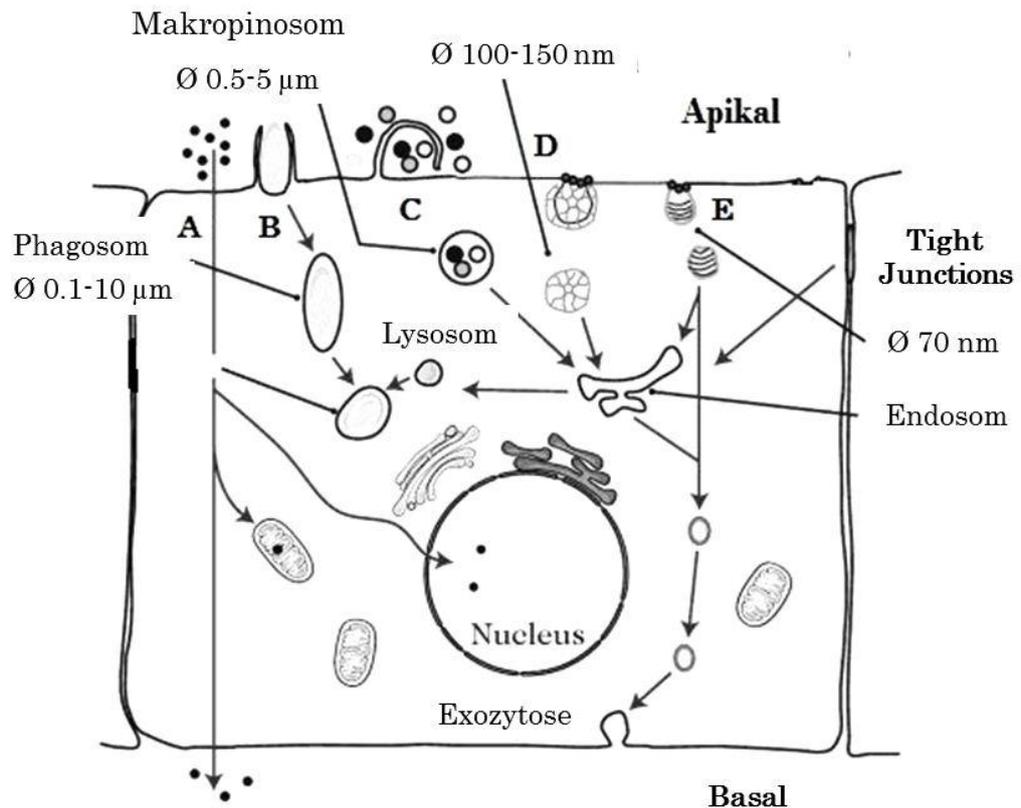


Abbildung 2.14 Mögliche Aufnahmemechanismen nanoskaliger Materialien in die Zelle. (A) Diffusion – Passive Aufnahme sehr kleiner (< 50 nm) Partikel (B) Phagozytose – Internalisierung von Partikeln > 500 nm und Abschnürung derselben in Phagosomen. (C) Makropinozytose – Unspezifische endozytotische Aufnahme von Partikeln < 200 nm in extrazellulärer Flüssigkeit und Abschnürung derselben in Makropinosomen (D) Clathrin-vermittelte Endozytose und (E) Calveolae-vermittelte Endozytose [modifiziert nach Houdy *et al.*, 2011]

schnürt ein Vesikel, dies den Partikel enthält, ab und transportiert es in Richtung Zellinneres. Je nach Art der internalisierenden Zelle lässt sich die Endozytose in zwei mögliche Aufnahmewege unterteilen - die Phagozytose, bei Partikeln mit Durchmessern über 0,5 µm (Abbildung 2.14 (B)), und die Pinozytose, die primär für Spezies mit Durchmessern kleiner als 2 µm und somit für nanoskalige Materialien von Bedeutung ist

(Abbildung 2.14 (C) – (E)) [Makrides, 2003]. Bei beiden Endozytoseprozessen werden die Vesikel, als Endosome bezeichnet, nach Internalisierung mit Lysosomen verschmolzen. Der endosomale Inhalt kann anschließend mittels lysosomaler Enzyme wie Proteasen, Hydrolasen und dem herrschenden niedrigem pH-Wert (pH = 5 - 6) abgebaut werden. Die Pinozytose lässt sich nochmal in drei Unterarten unterteilen - die Makropinozytose, die Clathrin-vermittelte, die Caveolae-vermittelte Endozytose und jeweils Variationen dieser Prozesse [Nam *et al.*, 2009].

Bei der Makropinozytose wird ein luminales Flüssigkeitsvolumen, inklusive der darin gelösten Partikel, unspezifisch durch einen Aktin-vermittelten Mechanismus aufgenommen und in sog. Makropinosomen mit Durchmessern von 0,5 - 5 μm abgeschnürt (Abbildung 2.14 (C)). Als konstitutiver Prozess unterscheidet sich dieser von den anderen beiden Mechanismen durch eine Membranrezeptor-unabhängige Aufnahme.

Die Clathrin-vermittelte Endozytose funktioniert über Clathrin beschichtete Einstülpungen auf der Innenseite der Zellmembran. An diesen Stellen ist die Dichte von Membranrezeptoren, die zur Endozytose benötigt werden, 10- bis 20-mal höher. Aus den Einstülpungen schnüren sich im Zuge der Internalisierung Clathrin beschichtete Vesikel ab, die 100 - 150 nm groß sind (Abbildung 2.14 (D)).

Im Laufe der Calveolae-vermittelten Endozytose kommt es durch Wechselwirkung von Glycosphingolipiden und Cholesterol mit Calveolin, einem Membranprotein, zur Bildung kleiner Vesikel mit Durchmessern von ca. 70 nm (Abbildung 2.14 (E)).

Die Zellaufnahme ist abhängig von mehreren Faktoren, einer davon ist die Form des Materials. Makrophagen beispielsweise internalisieren stabförmige HARN schwerer als sphärische Partikel. Im Fall der länglichen Strukturen läuft die Aktin-gesteuerte Bewegung, welche nötig ist, um das Material einzustülpen, weniger effektiv ab. Dadurch werden die Materialien von der Makrophagenmembran zwar umgeben, nicht jedoch internalisiert [Champion *et al.*, 2006]. Eine Reihe von Untersuchungen zeigt, dass auch die Oberfläche einen Effekt auf die Zellaufnahme nanoskaliger Materialien hat. Die in Abschnitt 2.5.6 diskutierte Adsorption biologischer Komponenten an der NP-Oberfläche im Organismus macht eine Beeinflussung ihres Aufnahmemechanismus möglich. Diese könnten über spezifische Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mit den Oberflächengruppen die darunter liegenden NP mit einschleusen [Houdy *et al.*, 2011]. Daraus ergeben sich einerseits Anwendungsmöglichkeiten in Medizin und Pharmazie, wie die Adressierung nanopartikulärer Wirkstoffe an die Zielzelle. Bioadhäsive Substanzen, wie Vitamin E TPGS (D- α -Tocopheryl-Polyethylenglycol 1000 Succinat) oder kationische Polymere, wie Polyethylenimin, haben in Untersuchungen die Adhäsion der NP an die Zellmembran verbessert und so die Aufnahmerate erhöht [Mu *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2009]. Andererseits kann die Beeinflussung der Zellwechselwirkung mit nanostrukturiertem Material durch Makromoleküle, die im biologischen Umfeld an die Strukturen adsorbieren, die Biokinetik verändern und so ein toxikologisches Potential ausüben.

2.5.9. Generierung reaktiver Sauerstoffspezies

Ein Paradigma der Nanotoxikologie stellt die Tatsache dar, dass die Toxikologie von nanostrukturierten Stoffen maßgeblich in deren Fähigkeit, ROS und RNS (Reaktive Stickstoffspezies - ‚Reactive Nitrogenspecies‘) zu generieren, begründet liegt [Sattler *et al.*, 2009].

Molekularer Triplett-Sauerstoff, $^3\text{O}_2$, hat zwei Valenzelektronen mit parallelen Spins. Um mit anderen Verbindungen zu reagieren, bräuchte der Reaktionspartner des Sauerstoffs ein Elektronenpaar, das ebenfalls parallele Spins aufweist, was selten der Fall ist. Triplett-Sauerstoff kann jedoch in reaktionsfreudigere Formen umgewandelt werden, die als ROS/RNS bezeichnet werden. [Apel *et al.*, 2004]. In Zellen gelten diese Verbindungen als schadhaft, da sie aufgrund ihrer Reaktivität mit zellulären Strukturen, wie DNA oder Proteinen, reagieren können. Zur Generierung von innerzellulären ROS/RNS kann es natürlicherweise im Zuge der Atmungskette in den Mitochondrien kommen. Die Anwesenheit von NP kann, über verschiedene Mechanismen, die Generierung verstärken, die im Folgenden kurz erläutert werden.

Photonenaktivierung Beispielsweise kann Sauerstoff durch erhöhte katalytische Aktivität der NP-Oberfläche unter Einwirkung von Licht ein Photon absorbieren und so vom stabilen Triplettzustand ($^3\text{O}_2$) in den angeregten Singulett-Sauerstoffzustand ($^1\text{O}_2$) übergehen. Dessen Elektronenspins sind parallel ausgerichtet, weshalb das Molekül in dieser Konformation reaktiver als im Triplett-Grundzustand ist.

Elektronenübertragung Neben der Übertragung von Energie in Form der Photonaktivierung, können ROS/RNS durch Elektronenübertragung an NP-Oberflächen entstehen. Durch die in Kapitel 2.2 beschriebene geänderte Ordnung der Kristallflächen nanodimensionaler Stoffe können Regionen auf der Partikeloberfläche als Elektronendonoren oder -akzeptoren wirken. Die Elektronenübertragung auf O_2 wird so begünstigt, was die Bildung von Superoxidanionen, O_2^- , zur Folge haben kann [Nel *et al.*, 2006]. Dieser Prozess kann ebenfalls durch Photonaktivierung eingeleitet werden. Durch Adsorption des Photons springt ein Elektron/Loch-Paar vom Valenz- ins Leitungsband, diffundiert zur Oberfläche des Partikels, wo das Elektron leichter auf O_2 übertragen wird. O_2^- kann in der Zelle über diverse Mechanismen zur Generierung weiterer ROS/RNS beitragen.

Redoxcycling Sind organische Moleküle, die als sog. Redoxcycler fungieren können, vorhanden, wird die ROS/RNS-Produktion zusätzlich verstärkt. Chinone beispielsweise können im Rahmen dieses Prozesses mit Hilfe von Peroxidasen, Reduktasen und mehrerer Ein-Elektronenübertragungsschritte zwischen drei Oxidationszuständen „cyclen“. Ein radikalisches Elektron kann im Zuge dieses Redoxzyklus auf O₂ übertragen werden, wodurch O₂^{•-} entsteht, das wiederum zur Entstehung weiterer ROS/RNS beiträgt.

Fenton-Reaktion Eine weitere Möglichkeit der ROS/RNS-Generierung ist die Fenton-Typ-Reaktion. Übergangsmetalle wie Fe, Co oder V, die in vielen Herstellungsprozessen als Katalysatoren verwendet werden, können in Form von Verunreinigung in den fertigen NP vorliegen und durch den Fenton-Mechanismus zu ROS-Produktion beitragen:



Mt^{n+/(n+1)+} ist ein reduziertes/oxidiertes Übergangsmetall, meist Fe(II) oder Cu(I). Dreiwertige Eisenionen können alternativ die sog. Weiss/Fenton Reaktion mit O₂^{•-} eingehen:

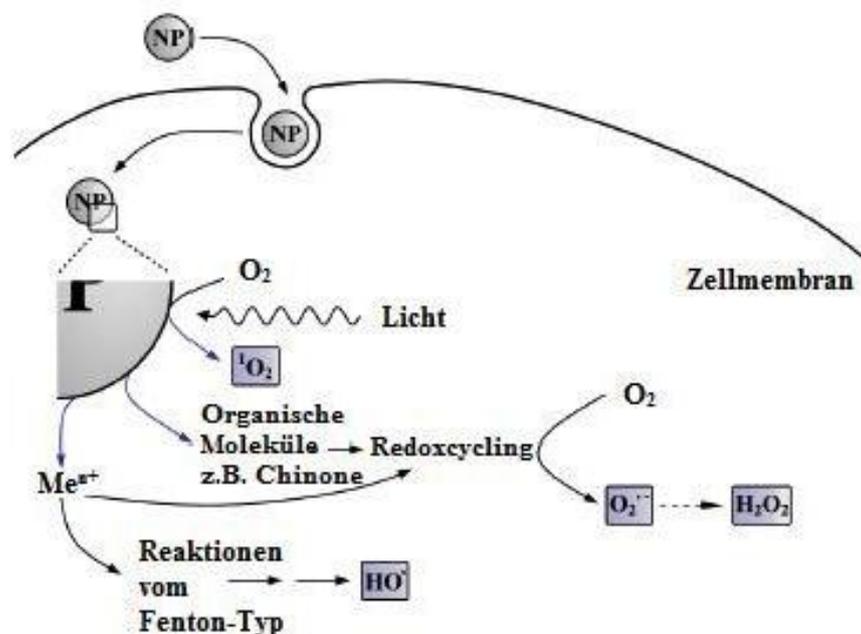
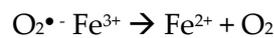


Abbildung 2.15

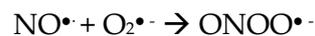
Mechanismen der ROS-Produktion durch einen metallischen Nanopartikel. An der Oberfläche des NP kann aus ³O₂ durch Photonenaktivierung oder Redoxcycling ¹O₂ entstehen, das die Bildung weiterer ROS zur Folge hat. Fenton-Typ-Reaktionen mit Metallionen tragen ebenso zur Generierung von ROS bei [entnommen aus Pelka, 2010].

In Summe ergibt sich die Nettoreaktion nach Fenton/Weiss:



Die Mechanismen zur innerzellulären Generierung von ROS/RNS durch metallische NP sind in Abbildung 2.15 übersichtlich dargestellt.

NP können nach Aufnahme auch Wechselwirkungen mit zellulären Strukturen, die die ROS/RNS-Produktion beeinflussen, eingehen. Darunter sind beispielsweise der Enzymkomplex NADPH-Oxidase (NOX), das endoplasmatische Retikulum (ER) oder die Mitochondrien. In ER und Mitochondrien ist Calcium in Form von Ca^{2+} -Ionen gespeichert, weshalb eine Interaktion mit Nanomaterialien zu einer Freisetzung desselben führen kann. Die Ca^{2+} -Ionen können zur Aktivierung von calciumabhängigen Enzymen wie z. B. der Stickstoffmonooxygenase führen, wodurch Stickstoffmonoxidradikale (NO^{\bullet}) gebildet werden können. Diese können durch Reaktion mit Superoxidanionen zur Produktion von Peroxynitrit (ONOO^{\bullet}) führen, dies oxidierend und nitrierend wirkt und so wiederum zur Generierung weiterer ROS/RNS beiträgt:



Die subzellulären Interaktionswege nanosphärischer Partikel sind in Abbildung 2.16 zusammengefasst.

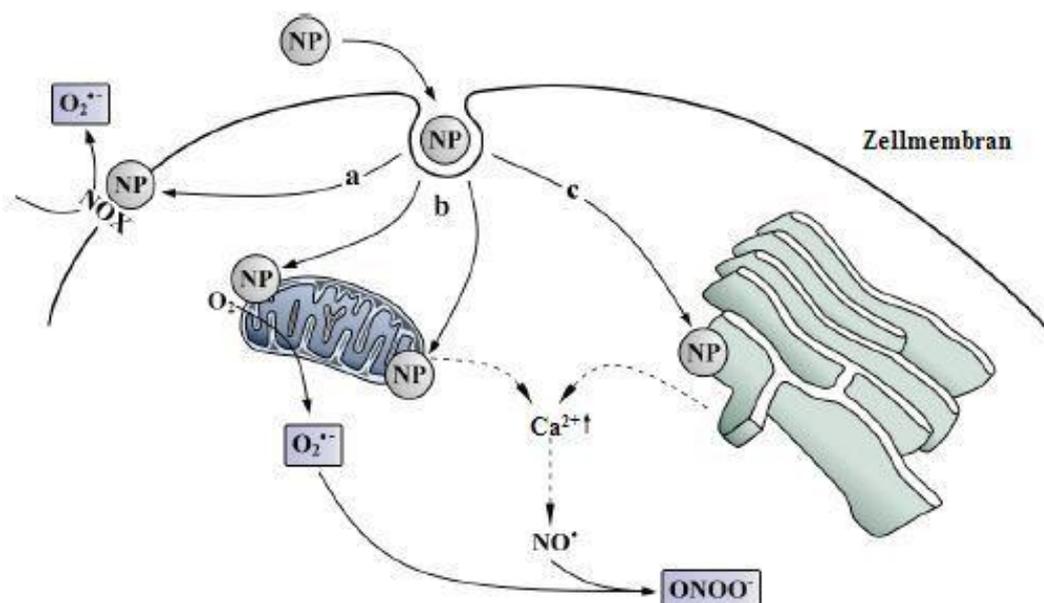


Abbildung 2.16 Zelluläre Wechselwirkungsmechanismen von NP a) mit der NADPH-Oxidase (NOX) b) mit dem Mitochondrium c) mit dem endoplasmatischen Retikulum [entnommen aus Pelka, 2010]

2.5.10. Genotoxizität

Nanomaterialien können Genotoxizität direkt, durch deren Ionen oder indirekt, durch die Induktion von ROS/RNS, verursachen [Asharani, 2009]. Als genotoxisch werden Substanzen mit potentiell schädigenden Effekten für genetisches Material bezeichnet. Zu den verursachten DNA-Schäden zählen u. a. Schwesterchromatidaustausch, unplanmäßige DNA-Synthese oder DNA-Strangbrüche [Leeuwen *et al.*, 2007].

DNA-Strangbrüche können beispielsweise durch Oxidation und Spaltung des Zuckerphosphatrückgrats bzw. der DNA-Basen entstehen, was eine DNA-Fragmentierung zur Folge hat. Über 70 modifizierte Nukleoside konnten als Oxidationsprodukte von Reaktionen zwischen DNA und HO•, ¹O₂, Sauerstoffradikalen und Hypochlorit nachgewiesen werden [Evans *et al.*, 2007]. Indirekt entstehen Strangbrüche durch einen Fehler in dem nach einer Basenschädigung einsetzenden Reparaturmechanismus. Verursacher von DNA-Strangbrüchen sind neben ROS ionisierende Strahlung, mechanische Beschädigung sowie einige Chemotherapeutika [Khanna *et al.*, 2001]. DNA-Strangbrüche werden nach Einzelstrangbrüchen (ESB) und Doppelstrangbrüchen (DSB) unterschieden.

ESB bezeichnen den Bruch eines Stranges der DNA, sie treten häufig in Zusammenhang mit dem Verlust eines Nukleotides und einem beschädigten 3' oder 5'- Ende auf der Bruchseite auf. Zur Reparatur von ESB existieren eine Reihe Mechanismen, wie die Basenexzisionsreparatur, in deren Verlauf die DNA-Läsionen entfernt werden und anschließend der Strangbruch repariert wird. Trifft die Replikationsgabel auf einen ESB im DNA-Elternstrang, der nicht repariert wurde, kann ein DSB entstehen [Kuzminov, 2001]. DSB bezeichnen das Auseinanderbrechen des Chromatins in zwei Teile aufgrund zweier Brüchen, die parallel in beiden Strängen auftreten. So wie ESB können DSB durch UV-Licht, das die DNA entweder direkt durch Bildung von quervernetzten Strängen zwischen benachbarten Pyrimidinbasen oder durch Induktion von ROS schädigt, was im Zuge der Replikation bzw. Transkription zu Brüchen führen kann, entstehen [Riballo *et al.*, 2004; Schulz, 2005]. DSB können auch bei Vorhandensein lokal benachbarter Einzelstrangbrüche entstehen.

DSB entstehen in Zellen seltener als ESB. Von ionisierender Strahlung werden DSB beispielsweise $\frac{1}{10}$ so oft induziert wie ESB, durch ROS noch seltener. ROS schädigen die DNA jedoch konzentrierter an einer Stelle des Strangs, sodass ROS-induzierte ESB hauptsächlich lokal akkumulieren. Das vermehrte Auftreten von ESB auf beiden Seiten eines DNA-Strangs erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit eines DSB in dieser Region [Zglinicki, 2003]. DSB sind für die Zelle schädlicher als ESB, da beim Bruch beider Stränge die physikalische Integrität und die Information der DNA verloren geht, während im Fall eines ESB ein zweiter intakter DNA-Strang erhalten bleibt. Die Reparatur von DSB folgt einem komplexeren Mechanismus als jener der ESB-Reparatur und führt oft zu irreversiblen Änderungen der Chromosomenstruktur, was zu Zelltod bzw. Mutationen führen kann [Lieber, 1998].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential von Pt-NP DSB zu induzieren anhand der Phosphorylierung des Histons H2AX untersucht. Im Folgenden wird daher die Theorie, die diesem Mechanismus zu Grunde liegt, erläutert.

2.5.11. γ -H2AX als Indikator von DNA-Doppelstrangbrüchen

Um die enorme Länge der nuklearen DNA kompakt zu halten, ist diese in eukaryotischen Zellen in Form von Chromosomen verpackt. Im Fall des Menschen existieren 46, angeordnet zu 23 Paaren. Ein Chromosom ist aus Chromatin aufgebaut, das aus DNA und Proteinen besteht, die in Histone und Nicht-Histone unterteilt werden. Die Untereinheiten eines Chromatins werden als Nukleosome bezeichnet (Abbildung 2.17 A). Ein Nukleosom besteht aus fünf verschiedenen Histonen, H1, H2A, H2B, H3 und H4, um die 146 DNA-Basenpaare gewickelt sind. Histone sind stark konservierte, 10–20 kDa schwere Proteine aus 100-300 Aminosäuren, davon sind 20–30 % Lysin und Arginin [Hartl *et al.*, 2001]. Jedes Nukleosom enthält ein Histon-Oktamer, das aus je zwei Exemplaren der Histone H2A, H2B, H3, H4 und DNA. Der Nukleosomenkern wird aus 140 DNA-Basenpaaren aufgebaut, die Doppel-helix windet sich 1,65-mal um das Histon-Oktamer. Die einzelnen Nukleosome sind miteinander durch Strecken freier DNA, der sog. Linker-DNA, verbunden (Abbildung 2.17 B) [Vogel *et al.*, 1997; Chakravarthy *et al.*, 2004].

Histon H2A besteht aus 129 Aminosäuren und ist 14,5 kDa schwer. Es enthält, wie H2B, ein Ubiquitin an einem Lysinrest, was vermutlich zur Lockerung der Chromatinstruktur oder der Bindung von Transkriptionsfaktoren beiträgt [Knippers, 2006]. Neben dem Haupttyp H2A existieren die Nebengruppen H2AB, H2A micro, H2AX und H2AZ. Die

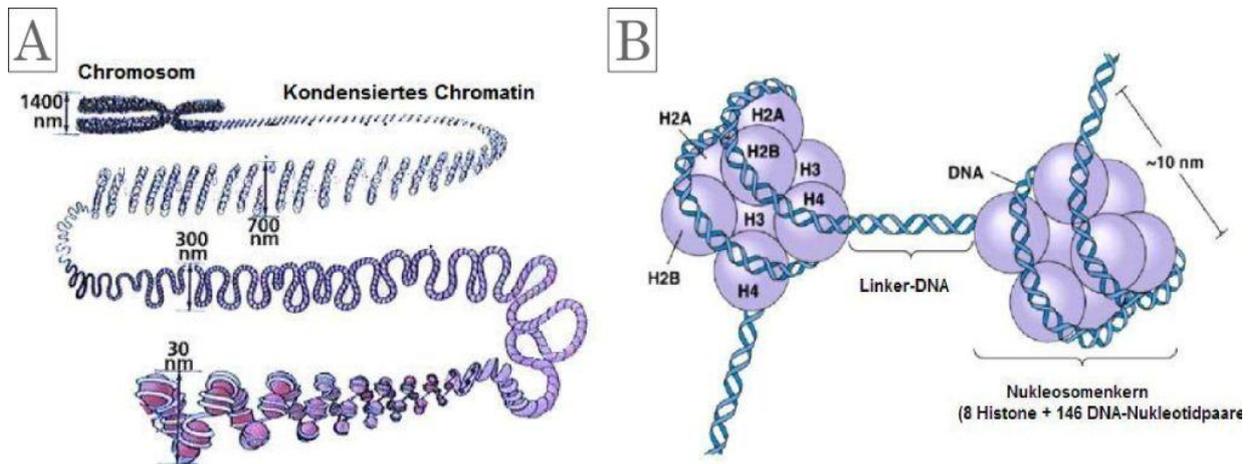


Abbildung 2.17 Aufbau eines Nukleosoms A) Die DNA-Doppelhelix wird um die Histone gewunden und zu Nukleosomen verpackt [modifiziert nach Zentrale für Unterrichtsmedien] B) Aufbau eines Nukleosoms mit dem Histon-Oktamer und der verbindenden Linker-DNA [modifiziert nach University of British Columbia]

Aminosäuresequenzen von H2AX und H2A stimmen zu 97 % überein, H2AX ist jedoch zusätzlich bei der Reparatur von DSB von Bedeutung.

Um DSB zu reparieren, wird in der Zelle eine Signalkaskade in Gang gesetzt. Im Zuge dieser wird eine Reihe von Proteinen in DNA-Abschnitten an der Stelle des DSB akkumuliert. Die Proteinakkumulationen am Ort der Bruchstelle werden als Foki bezeichnet.

Das Histon H2AX wurde als Ausgangspunkt dieser Signalkaskaden in eukaryotischen Zellen bestimmt. Es wird als Reaktion auf vorhandene DSB phosphoryliert, die Phosphorylierung findet am Serin 139 statt, das am Carboxylende des Proteins liegt. In phosphorylierter Form wird das Histon als γ -H2AX bezeichnet.

Zur Initiierung der Phosphorylierung von H2AX sind 35 DSB nötig. Die Reaktion wird von den Kinasen der Familie Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K) durchgeführt. Dazu zählen die ATM („Ataxia Telangiectasa-mutated“)-Kinase, für die nachgewiesen wurde, das Histon zuerst zu phosphorylieren, gefolgt von den Kinasen ATR („ATM and Rad 3-related“) und DNA-PK („DNA-dependent Proteinkinase“) [Burma, 2001]. Die Phosphorylierung von H2AX durch diese Kinasen betrifft große Stellen des Chromatins um den DSB und führt zur raschen Rekrutierung verschiedener Reparaturfaktoren [Rogakou, 1999]. Diese akkumulieren um die Stelle des DSB in Form sogenannter nukleärer Foki, die vermutlich zur Kennzeichnung des DNA-Bruchs dienen, wodurch der Reparaturvorgang, beispielsweise durch homologe Rekombination oder nichthomologes Endjoining, erleichtert wird [Lichten, 2005].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde UV-B-Strahlung als Positivkontrolle zur Induktion von DSB und der darauffolgenden Histon-Phosphorylierung herangezogen. Nach Behandlung mit ionisierender Strahlung werden die ersten Histone innerhalb von Sekunden phosphoryliert [Rogakou, 1998]. Die γ -H2A-Moleküle bilden Foki an den Bruchstellen, die bereits eine Minute nach UV-Bestrahlung gemessen werden können [Rogakou *et al.*, 1999]. Innerhalb von 15-30 Minuten nach Eintreten des DSB werden Hunderte H2AX Moleküle um die Bruchstelle entlang des Chromatins phosphoryliert [Bradshaw *et al.*, 2011].

2.6. Platin

2.6.1. Eigenschaften

Platin gehört, so wie die restlichen Elemente der achten Nebengruppe, zu den reaktionsträgen Edelmetallen. Seine Ordnungszahl beträgt 78. Die höchste Oxidationsstufe von Pt ist VI, ebenso kann es in den Oxidationsstufen II und IV vorkommen. Aufgrund der Dichte von 21,45 g/cm³ ist Pt ein schweres Metall, es ist jedoch bei Raumtemperatur duktil. Pt schmilzt bei 1769 °C, sein Siedepunkt liegt bei 3830 °C [Riedel *et al.*, 2011].

2.6.2. Vorkommen & Verwendung

Das seltene Metall Pt ist am Aufbau der Erdkruste mit Anteilen von 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ % beteiligt und meist mit den restlichen 8 Nebengruppenelementen vergesellschaftet, weshalb diese auch als Platinmetalle bezeichnet werden [Riedel *et al.*, 2011].

Platin wird wegen seines hohen Schmelzpunkts in Laborgeräten und Widerstandsdrähten in Thermoelementen benutzt. Es findet ebenso Verwendung in Trägerkatalysatoren der Mineralölindustrie, sowie auf keramischen Trägern als Entgiftungskatalysator für Autoabgase. Chemisch wird es als Katalysator für Hydrierungs- und Dehydrierungsreaktionen herangezogen, in Verbindung mit Rh als Katalysator für die großtechnische Oxidation von NH₃ zu NO [Enghag, 2004].

Platinbasierte Pharmazeutika werden seit den 70ern als Standard-Chemotherapeutika eingesetzt. In Abschnitt 2.6.4 wird näher auf diese Platinkomplexe eingegangen.

2.6.3. Umwelt-Eintrag

2011 wurden 119000 kg der weltweit abgebauten 192500 kg Platin für die Autoindustrie verwendet [Johnson Matthey, 2011]. Autoabgaskatalysatoren, die Elemente der

Platingruppe als katalytisch aktive Edelmetalle enthalten, um CO, NO_x und Kohlenwasserstoffe zu den Oxiden umzusetzen sind im urbanen Umfeld die Haupteintragsroute für Pt. 2011 wurde um 11300 kg mehr Pt für die Automobilindustrie benötigt als 2010, da der Bedarf an mit Pt ausgestatteten Katalysatoren und damit einhergehend der Eintrag in die Umwelt stetig wächst [Johnson Matthey, 2011].

Ein Autokatalysator besteht aus einem monolithischen Substrat, Aluminium oder Cordierit (2MgO-2Al₂O₃-5SiO₂), das mit Al₂O₃ beschichtet ist, darauf befinden sich katalytisch aktives Pt, Rh und Pd in Form des sog. ‚Washcoat‘, einer Trägersubstanz, die die Metallpartikel in dispergierter Form enthält. Bei Freisetzung der Abgase wird die Oberfläche des Washcoats chemisch und physikalisch durch den raschen Wechsel zwischen oxidativen/reduktiven Bedingungen, hohe Temperaturen und mechanische Abnutzung beansprucht, wodurch es zum Abrieb der Katalysatoroberfläche kommt. Ein kommerziell erhältlicher Katalysator enthält zwischen 0,05 % und 1,0 % Pt, bei einer durchschnittlichen Emission von 65-180 ng Pt pro gefahrenem km entspricht dies einem weltweiten Platin-Eintrag durch Autokatalysatoren in Höhe von 0,5-1,4 Tonnen pro Jahr [Barbante *et al.*, 2001]. In Straßenstaub, der laut einer Untersuchung zu 36 % aus Pt besteht, konnten Platinkonzentrationen von bis zu 307 ng/g gemessen werden [Kovacheva, 2002]. Durch den Abrieb gelangt Pt zu über 95 % in partikulärer Form mit den Abgasen in die Umwelt, laut Untersuchungen zu 43 – 74 % mit Durchmessern > 10 µm und zwischen 21 % und 36 % mit Durchmessern < 3 µm [König *et al.*, 1992; Artelt *et al.*, 1999b; Zischka *et al.*, 2002; Jean-Soro *et al.*, 2012].

Befinden sich Obst- oder Gemüsekulturen in Nähe befahrener Straßen, kann es zur Ablagerung von Schwermetallen auf diesen kommen, die Pflanzen könnten Pt aber auch über die Erde aufnehmen. In Grasproben (*Dactylis glomeratus*) wurden, je nach Entfernung zur Straße, Platinkonzentrationen zwischen 5,52 ppb und 12,04 ppb gemessen, die auch nach Waschen der Pflanzen nicht wesentlich reduziert werden konnten [Hooda *et al.*, 2008], Maisproben in Graz wiesen eine Pt-Belastung von 642 ppb auf [Wildhagen *et al.*, 1993], in Stuttgart 80 ppb [Hoppstock *et al.*, 1989]. Pt kann durch den Verzehr des kontaminierten Obst/Gemüse in den menschlichen Organismus gelangen. Analysen von menschlichem Urin ergaben einen Zusammenhang zwischen dem ausgeschiedenen Platingehalt und der Nähe stark befahrener Straßen [Bocca *et al.*, 2004].

Platin findet im medizinischen Sektor Anwendung in der Krebs-Therapie als Chemotherapeutikum. Daher ist ein weiterer wichtiger Eintragungsweg des Schwermetalls in die Umwelt über Krankenhaus-Emissionen. Eine Untersuchung in mehreren europäischen

Krankenhäusern ergab, dass 70 % des in Form von Carbo- oder Cisplatin verabreichten Pt vom menschlichen Organismus ausgeschieden wurde und in den Abwässern der Krankenhäuser endete [Kümmerer *et al.*, 1999]. Im Abwasser eines Krankenhauses wurden Pt-Konzentrationen von 115–125 ng/l gemessen, die nach Verdünnung in der Kanalisation noch 1–2 ng/l betragen [Kümmerer *et al.*, 1996].

2.6.4. Toxizität von Platin

Das toxikologische Risiko von Pt liegt in dessen Fähigkeit, stabile Komplexe mit organischen und anorganischen Liganden zu bilden, begründet. Diese Komplexe haben das Potential mit zellulären Strukturen, wie Proteine oder DNA, zu wechselwirken, sowie Ionen in der Zelle zu ersetzen und so das zelluläre Gleichgewicht zu stören [Colombo *et al.*, 2008]. Dieses Funktionsprinzip wird in der Chemotherapie ausgenutzt. Das Chemotherapeutikum Cisplatin (Diamindichloridoplatin (II)) wurde 1978 erstmals als Mittel gegen Ovarial- und Hodenkrebs zugelassen und ist seitdem die am häufigsten eingesetzte Substanz in der Chemotherapie. Carbo- (Diaminplatin(II)-cyclobutan-1,1-

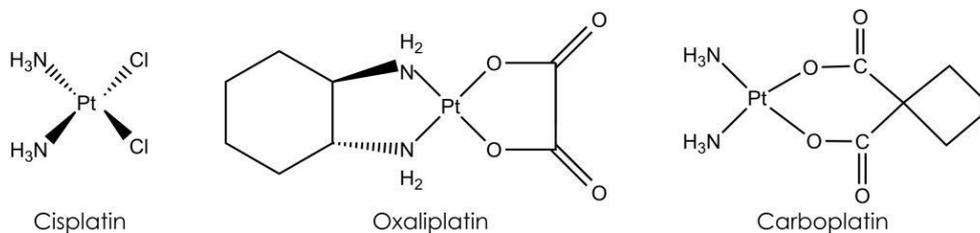


Abbildung 2.18 Strukturformeln dreier häufig verwendeter Zytostatika auf Platinbasis.

dicarboxylat) und Oxaliplatin (Trans-L-(-)-Diaminocyclohexanoxalatoplatin(II)) befinden sich derzeit in der Entwicklungsphase und werden in Zukunft zusammen mit Cisplatin bei der Bekämpfung einer Vielzahl von Krebsarten wie Kolorektal-, Brust- und Blasenkrebs Anwendung finden [Bonetti, 2008]. In Abbildung 2.18 sind die Strukturformen von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin zu sehen.

Die Wirkweise der Platin-basierten Chemotherapeutika beruht auf der Bildung kovalenter Bindungen zwischen Nucleobasen der DNA und ihren Metallzentren. Cisplatin wird unter den Pt-Zytostatika am häufigsten eingesetzt. Dessen Reaktivität ist durch die Cis-Konfiguration der Chlorid- bzw. Ammoniak-Liganden begründet. Wären diese trans konfiguriert, wäre die Verbindung wirkungslos. Der als $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ vorliegende

Komplex wird intravenös verabreicht. Der geringere Cl⁻-Gehalt im Cytoplasma der Zellen startet den Wirkmechanismus des Zytostatikums. Cisplatin wird aktiviert, indem die beiden Cl⁻-Ionen durch zwei H₂O-Moleküle ausgetauscht werden. Die kationische Form des aktivierten Komplex $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ist nun im Stande, mit der DNA zu wechselwirken [Alessio, 2011].

In der Zelle bindet das Pt²⁺-Ion von Cisplatin an die N7-Position von purinischen Nukleotiden, 90 % der gebildeten Quervernetzungen sind 1,2-d(GpG), auch 1,3-d(GpNpG) können entstehen. Die Quervernetzungen entstehen innerhalb eines Stranges, zwischen zwei Strängen oder zwischen DNA und Proteinen. Die Folge einer 1,2-d(GpG)-Cisplatin-Quervernetzung innerhalb eines Stranges einer Doppelhelix ist in Abbildung 2.1919 A und B dargestellt. Die Helix wird kann ihre Struktur nach Vernetzung zweier Guaninbasen durch Pt²⁺ des Cisplatin-Komplexes nicht mehr aufrecht halten, eine Beugung tritt ein. Aufgrund der Quervernetzungen in der Zell-DNA werden die Replikation und die RNA-Synthese inhibiert, die Zellen sterben ab [Lippert, 1999].

Der Nachteil Pt-basierter Chemotherapeutika ist, dass nicht nur Krebszellen, sondern auch andere, schnell teilende Zellen, wie Haarfollikel, betroffen sind. Da die Zytostatika keine ausgeprägte Spezifität aufweisen, können auch Zellen gesunder Organe angegriffen

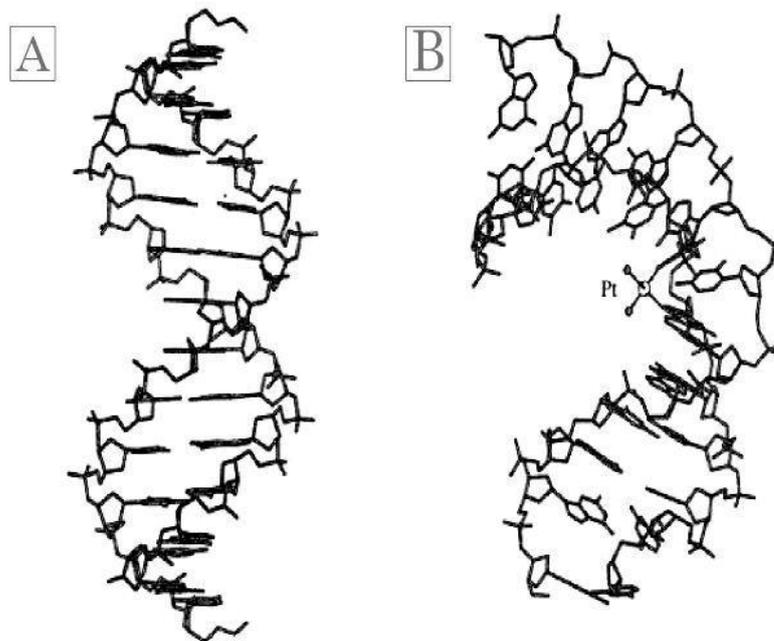


Abbildung 2.19 A) Die große Furche einer intakten B-DNA B) 1,2-d(GpG)-Cisplatin Intrastrangbildung nach kovalenter Bindung von Cisplatin führt zu Beugung der DNA [entnommen aus Lippert, 1999]

werden, wie die Leber. Nephrotoxie ist einer der Haupt-Nebeneffekte der Cisplatin-Chemotherapie [Staritz, 2003]. Cisplatin ist im Tierversuch kanzerogen und mutagen, was zu einer Reihe zusätzlicher Nebenwirkungen im Rahmen der Chemotherapie führen kann, wie die Induktion von Sekundärtumoren [Lippert, 1999]. Weitere Nebeneffekte sind die Schädigung der Nieren- und Nervenzellen. Um dies zu umgehen wird an der Entwicklung von Analoga des Wirkstoffs die weniger toxisch sind geforscht. Was jedoch keine unproblematische Aufgabenstellung darstellt, da sich innerhalb von 30 Jahren Forschung lediglich 30 Verbindungen als pharmakologisch vorteilhafter als Cisplatin erwiesen und nur 4 davon eine klinische Anwendung gefunden haben. Dazu gehört Carboplatin, es ist weniger nephro- und neurotoxisch als sein Vorgänger, selbiges gilt für Oxaliplatin, das jedoch andere Nebenwirkungen zur Folge hat, wie Tubulusnekrose [Missailidis, 2008].

Pt ist auch in Form anderer löslicher Chloridverbindungen als die erwähnten Pt-Zytostatika toxisch. Wasserstoff Hexachloroplatinat(IV) ($\text{H}_2[\text{PtCl}_6]$) führte in Hasen und Ratten zu Gewichtsabnahme, kardiovaskulären Effekten, Peritonitis (Entzündung des Bauchfells), biochemischen Veränderungen und zum Tod. Für Natrium Hexachloroplatinat(IV) ($\text{Na}_2[\text{PtCl}_6]$) wurde ein LD_{50} von 25 ppm – 50 ppm in Ratten festgestellt [Colombo *et al.*, 2008].

Die längerfristige Exposition mit Platinsalzen kann auf die Lunge sensibilisierend wirken und zu allergischem Asthma, sog. Platin-Asthma, Rhinitis und Dermatitis führen [Kusaka, 1993; Malo, 2005; Ban *et al.*, 2010]. 23 % der in einer Platinraffinerie seit durchschnittlich 10,8 Jahren beschäftigten ArbeiterInnen zeigten allergische Symptome gegenüber dem Platinsalz Kalium Hexachloroplatinat(IV) ($K_2[PtCl_6]$), 52,4 % davon betrafen jene, die der Platinverbindung während ihrer Tätigkeit am stärksten ausgesetzt waren [Bolm-Audorff *et al.*, 1992].

2.6.5. Toxizität von nanopartikulärem Platin

Platin wird hauptsächlich über Autoabgaskatalysatoren in die Umwelt eingetragen, zu einem Teil in nanopartikulärer Form. Bedingt durch die geringe Größe der NP lösen sich diese in Biomatrizes gut, was die Bioverfügbarkeit intratracheal verabreichten Platins von bis zu 30 % in Ratten erklärt, die Artelt *et al.* 1999 gemessen haben [Artelt *et al.*, 1999a].

Pt-NP können zu einem Großteil durch Einatmung des Autokatalysatorabriebs in den menschlichen Körper gelangen (siehe Abschnitt 2.6.3), weshalb sich einige Forschungsgruppen mit deren Auswirkung auf die Lunge beschäftigt haben [Elder *et al.*, 2007; Asharani *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010]. *In vivo* wurde nach intratrachealer Verabreichung von Pt-NP ($\varnothing = 21$ nm) bei Mäusen durch erhöhte IL-1, TNF- α und IL-6 Werte in den Lungenepithelzellen proinflammatorische Prozesse nachgewiesen, die parallel zur Zeitspanne nach der Exposition (d = 1, 7, 14, 28) stiegen. Bereits am ersten Tag nach Verabreichung wurde eine um das 8,7-fache erhöhte IL-6-Konzentration als für die Negativkontrollgruppe festgestellt [Park *et al.*, 2010]. Elder *et al.* untersuchten die Induktion von ROS bei Anwesenheit von Pt-NP ($\varnothing = 11 - 35$ nm) in Lungenepithelzellen. Es wurde eine Partikelform-abhängige ROS-Generierung nachgewiesen. Die Menge des Entzündungsindikators IL-6 veränderte sich bei Pt-Dosen von 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bis 132 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nicht wesentlich [Elder *et al.*, 2007]. Asharani *et al.* konnten einen genotoxischen Schädigungsmechanismus in Glioblastom- und Lungenfibroblasten, ausgelöst durch Pt-NP ($\varnothing = 5$ nm - 8 nm), anhand der erhöhten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors p53, sowie einer Schädigung der DNA durch den Anstieg der Schweifintensität im Comet Assay zeigen. Die Zellen wiesen nach Pt-NP-Exposition veränderte Morphologien auf [Asharani *et al.*, 2010].

Pt-NP gelangen durch Schlucken von in Lebensmitteln zugesetzten Nanoinhaltsstoffen oder nach Verzehr belasteter Lebensmittel in den GIT. Sie können nach Einatmen ebenso

durch den mukoziliären Aufzug und anschließendes Verschlucken in den Magen-Darmtrakt transportiert werden [Oberdörster, 2005]. Intratracheal verabreichte Platin-NP wurden in Ratten durch diesen Mechanismus zu 79 % – 88 % aus dem Lungenraum entfernt und über den mukoziliären Aufzug den GIT transportiert [Elder *et al.*, 2007]. Oral verabreichte Pt-NP ($\varnothing = 1 \text{ nm} - 6 \text{ nm}$, 10 mM in wässriger Dispersion) führen in Ratten in 12 Organen zu veränderten Expressionsmustern in 18 Genen. Vor allem jene Gene, die für den Entzündungsprozess eine Rolle spielen liegen im Magengewebe, das den Partikeln direkt ausgesetzt ist, verändert vor [Katao *et al.*, 2011].

Neben den toxikologischen Effekten nanopartikulären Platins wurden einige Studien zu ihrer Fähigkeit als Antioxidativa zu wirken durchgeführt [Kajita *et al.*, 2007; Hamasaki *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Clark *et al.*, 2011]. Pt-NP wirken aufgrund ihrer reduzierenden Eigenschaften als $\text{O}_2^{\bullet -}$ - und H_2O_2 -Quencher antioxidativ [Kajita *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008]. Dadurch erwiesen sich Pt-NP in Untersuchungen an Brust-Fibrosarkomzellen als Schutz vor durch oxidative Schädigung ausgelöster Apoptose [Clark *et al.*, 2011]. Sie erhöhen auch die Viabilität diverser Humanzelllinien in Gegenwart prooxidativer Reagenzien [Hamasaki *et al.*, 2008]. Mit Apoferritin verkapselte Pt-NP werden von Caco-2-Zellen über den Ferritinrezeptor aufgenommen und erhöhen im Anschluss in der Zelle dosisabhängig die Aktivität der SOD, so vermindern diese Konzentration von H_2O_2 und dadurch induzierte ROS [Zhang *et al.*, 2010].

Diese positiven, antioxidativen Eigenschaften nanostrukturierter Pt-Partikel bilden einen Gegensatz zu den sonst herrschenden Paradigmen der Nanotoxikologie, wonach NP aufgrund von ROS/RNS-Induktion schädigende Effekte auf Zellen ausüben. Aufgrund dieser These wurde die Fähigkeit zur ROS-Induktion von nanopartikulären Platin in Zellen bereits in Arbeiten, die der vorliegenden vorausgehen, untersucht. Pelka *et al.* zeigten demnach, dass Pt-NP von Kolonkarzinomzellen DNA-Strangbrüchen verursachen. Die Ergebnisse verdeutlichten einen Zusammenhang zwischen der Größe der NP und deren Fähigkeit, Strangbrüche zu induzieren. Bei den Pt-NP, die kleinsten Durchmesser ($< 20 \text{ nm}$) hatten, wurden die größten Effekte nachgewiesen. Die Brüche konnten jedoch nicht auf eine NP-verschuldete Induktion von ROS zurückgeführt werden. [Pelka *et al.*, 2009]. Gehrke *et al.* stellten daraus schlussfolgernd die Vermutung an, dass lösliche Platinspezies für die DNA-Schädigung verantwortlich sein könnten, da dies vom Mechanismus Platin-basierter Chemotherapeutika bekannt ist, wo die Platinkomplexe kovalent an die DNA-Basen binden und so zu Strangbrüchen führen (siehe Abbildung 2.19), in Übereinstimmung

mit dieser Theorie wurde von Gehrke *et al.* 2011 platinierete DNA gemessen [Gehrke *et al.*, 2011].

2.7. Charakterisierung der Nanopartikel

Die verwendeten Pt-NP wurden mit der in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen überkritischen Reaktivabscheidung, SFRD, am Institut für technische Thermodynamik und Kältetechnik synthetisiert. Metallisches Platin wird im Zuge dieser Reaktion auf mesoporösem β -CD abgeschieden, je nach Variation der Bedingungen kann die Größe der NP beeinflusst werden. Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Chargen von Pt-NP verwendet, Pt-CD2 und Pt-CD3, wobei CD sich auf das Trägermaterial β -CD bezog. Die Charakterisierung der Partikel erfolgte im Anschluss an deren Synthese durch die Gruppe von Prof. Gerthsen vom Laboratorium für Elektronenmikroskopie des KIT.

Die mittlere Größenverteilung (PSD – ‚Particlesize Distribution‘) der Pt-NP wurde mittels Bildanalyse (ImageJ Version 1,38) von SEM- und TEM-Aufnahmen statistisch ausgewertet. Der errechnete durchschnittliche Durchmesser wurde u. a. mit d_{50} angegeben, was jenem Durchmesser entspricht, den 50 % der NP über- und 50 % unterschreiten. Im Fall des d_{10} -Durchmessers haben 10 % aller Partikel einen größeren Durchmesser als den angegeben, die restlichen 90 % einen kleineren. Genau umgekehrt verhält es sich für die d_{90} -Definition. Pro PSD-Berechnung wurden 600 NP herangezogen. Δ ist ein Maß für die Polydispersität der Partikelproben und wurde definiert als

$$\Delta = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}}$$

In Tabelle 2.2 sind die drei Durchmesser für die beiden verwendeten NP angegeben:

Tabelle 2.2 Partikeldurchmesserverteilung der Pt-NP. Erstellt von MitarbeiterInnen der AG Prof. Gerthsen am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

Partikelpräparation	d_{10} (nm)	d_{50} (nm)	d_{90} (nm)	Δ
Pt-CD2	4,7	7,7	12,2	1,0
Pt-CD3	88,4	155	210	0,8

Abbildung 2.20 zeigt eine Auftragung der Partikeldurchmesser beider Präparationen gegen die auf 1 normierte Summenverteilung Q_1 . Dieser Graph veranschaulicht in Kombination mit den Werten aus Tabelle 2.2, dass die Durchmesser der Pt-NP aus Probe Pt-CD2 20 nm nicht übersteigt, die Partikeldurchmesser der Probe Pt-CD3 liegen mehrheitlich über 100 nm.

Im Folgenden wird auf die Interpretationen der aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen gewonnenen Daten beider Partikelpräparationen detaillierter eingegangen.

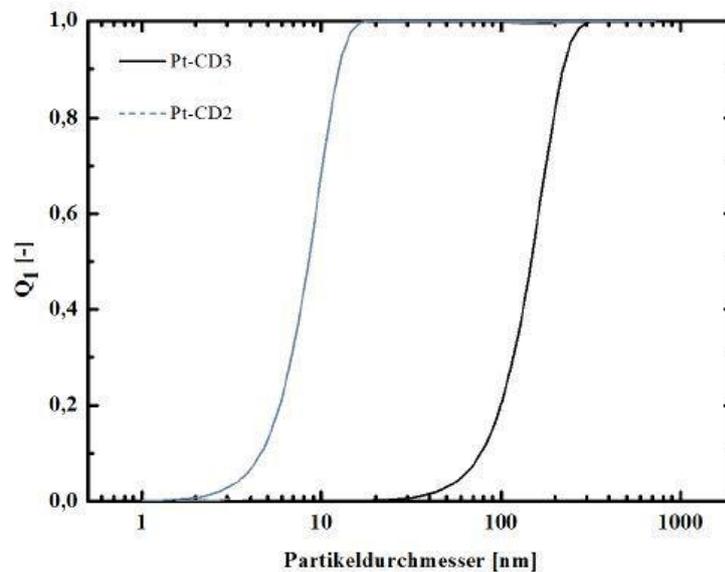


Abbildung 2.20

Die Pt-NP der Chargen Pt-CD2 und Pt-CD3 als Summverteilungen Q_1 , aufgetragen gegen den Partikeldurchmesser. Daten erstellt von MitarbeiterInnen der AG Prof. Gerthsen am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie [modifiziert nach Pelka, 2010]

► Pt-CD2

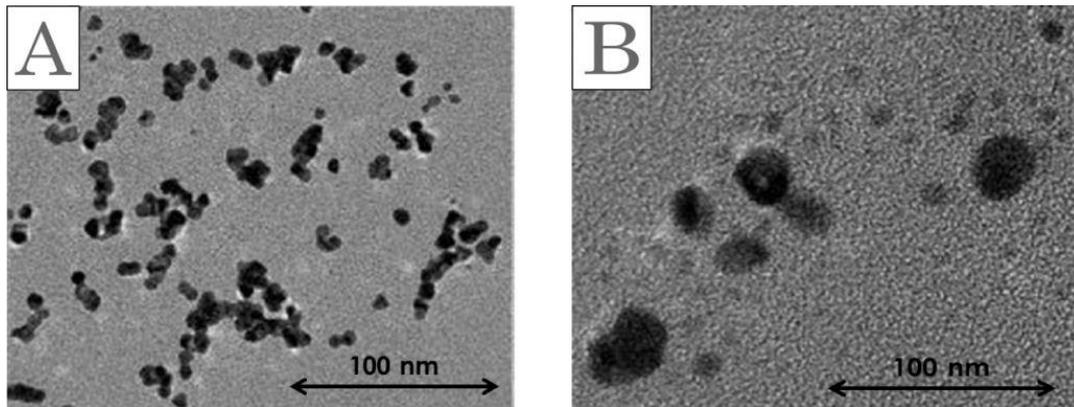


Abbildung 2.21 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Partikel-Präparation Pt-CD2 A) TEM B) HRTEM („High Resolution Transmission Electronmicroscopy“) Aufnahmen erstellt von MitarbeiterInnen der AG Prof. Gerthsen am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Elektronenmikroskopie [entnommen aus Pelka *et al.*, 2009]

Zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen der Präparation Pt-CD2 sind in Abbildung 2.21 A (TEM) und B (HRTEM – „High Resolution Transmission Electronmicroscopy“) abgebildet. Im Rahmen der hochauflösenden Transmissions-elektronenmikroskopie (HRTEM) werden die Abbildungen mithilfe der Phasendifferenzen der an der Probe gestreuten Elektronenstrahlen erstellt [Karkare, 2008]. Anhand der beiden Aufnahmen ist ersichtlich, dass die Partikel hauptsächlich einzeln und nicht agglomeriert vorlagen. In Abbildung 2.21 B ist weiters zu erkennen, dass die NP eine sphärische Form aufweisen. Die Daten in Tabelle 2.2 zeigen, dass die Partikel der Pt-CD2 eine enge Durchmesser-Verteilung ($\Delta = 1$) und somit eine homogene Dispersität aufwiesen. Da 90 % der NP einen Durchmesser von 12,2 nm hatten (d_{90}), werden die NP der Präparation Pt-CD2 im Folgenden mit „Pt-NP < 20 nm“ bezeichnet.

► Pt-CD3

Abbildung 2.22 A zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme (SEM) eines einzelnen Partikels der Präparation Pt-CD3. Auf dem Bild ist dessen kuboktaedrische Form zu erkennen. Der Großteil der Pt-NP der Probe Pt-CD3 lag in agglomerierter Form vor. In Abbildung 2.22 B ist ein Agglomerat mit einem Durchmesser von ca. 500 nm dargestellt.

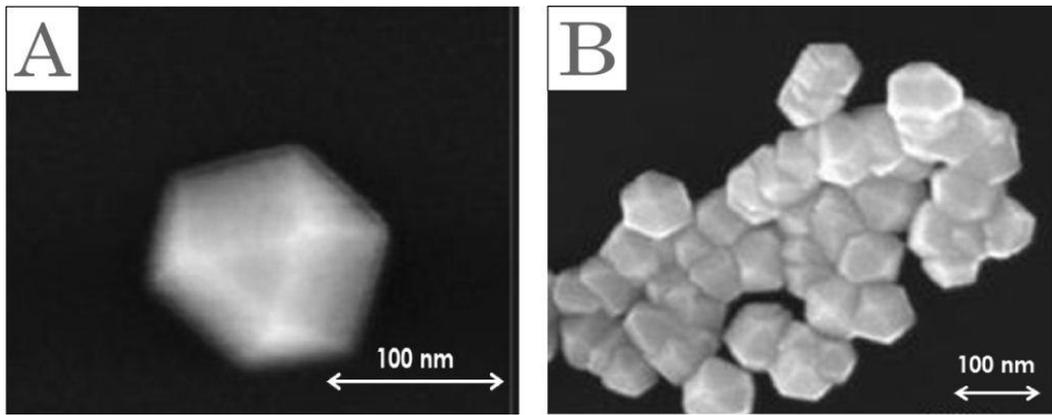


Abbildung 2.22 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Partikel-Präparation Pt-CD3 A) SEM-Aufnahme („Scanning Electronmicroscopy“) eines einzelnen Partikels B) SEM-Aufnahme eines Partikel-Agglomerats. Aufnahmen erstellt von MitarbeiterInnen der von Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie [entnommen aus Pelka *et al.*, 2009].

Wie aus Tabelle 2.2 ersichtlich, hatten die NP der Probe Pt-CD3 eine Durchmesser-Verteilung von 88,4 nm – 210 nm, die relative Streuung der Partikelgrößen ist jedoch mit $\Delta = 0,8$ gering. Der d_{90} -Durchmesser beträgt 210 nm. Die Partikel der Präparation Pt-CD3 werden daher im Folgenden mit „Pt > 100 nm“ bezeichnet.

Stabilität der Pt-NP im Zellkulturmedium

Für die Analyse der Partikel in serumhaltigem Medium, das aufgrund seiner Inhaltsstoffe wie Salze und Proteine eine problematische Matrix für elektronenmikroskopische Aufnahmen darstellt, SEM-Aufnahmen erstellt. Diese werteten entweder die

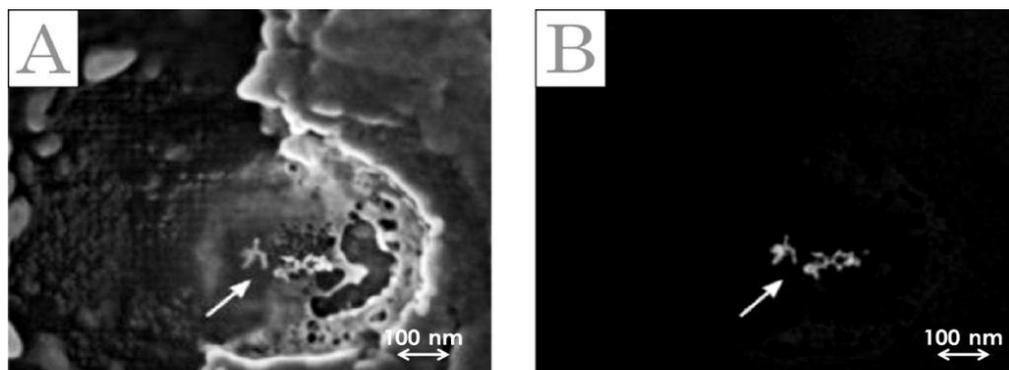


Abbildung 2.23 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Pt-NP < 20 nm in Medium ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 % FKS-haltiges DMEM) A) SE-SEM („Secondary Electron Scanning Electronmicroscopy“) B) BSE-SEM („Backscattered Secondary Electron Scanning Electronmicroscopy“). Aufnahmen wurden von MitarbeiterInnen von Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie erstellt [entnommen aus Pelka *et al.*, 2009]

Sekundärelektronen (SE-SEM – ‚Secondary Electron Scanning Electronmicroscopy‘) oder die rückgestreuten Sekundärelektronen aus (BSE-SEM – ‚Backscattered Electron Scanning Electronmicroscopy‘). Im Vergleich zur SE-SEM, wo die Sekundärelektronen hauptsächlich von der Topographie der Probe abhängen, wird die Zahl der rückgestreuten Elektronen in der BSE-SEM-Technik stark von der Atomzahl des untersuchten Elements beeinflusst. So erscheinen Elemente höherer Atomzahl heller, was im Fall von Pt mit 78 Protonen für die Visualisierung von Vorteil war. Die Pt-NP konnten so mit stärkerem Kontrast aus der Medium-Matrix hervorgehoben werden als mit SE-SEM möglich. Der Unterschied der beiden Methoden wird durch die vergleichende Darstellung in Abbildung 2.23 A) (SE-SEM) und Abbildung 2.23 B) (BSE-SEM) verdeutlicht.

Um eine Übersicht über das Vorhandensein möglicher Partikelagglomerationen in Zellkulturmedium zu erhalten, wurden für die die Pt-NP < 20 nm in 10 % FKS-haltigem Medium die Feret-Durchmesser von 196 Pt-NP mittels BSE-SEM gemessen. Der Feret-Durchmesser beschreibt den Abstand zweier paralleler Tangenten eines zufällig orientierten Partikels an gegenüberliegenden Seiten und liefert eine Aussage über das Agglomerationsverhalten [Merkus, 2009]. Die Auswertung erfolgte zunächst nach 1 h

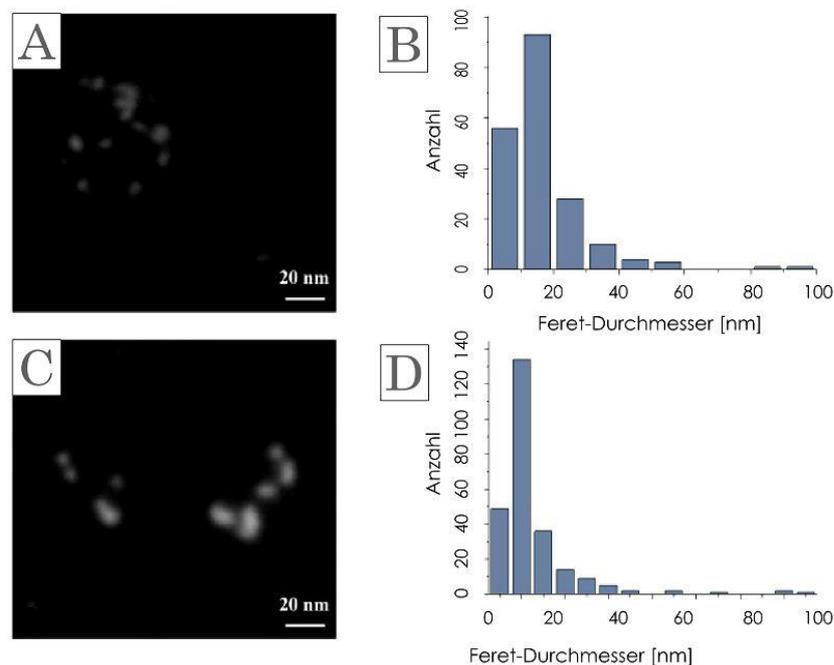


Abbildung 2.24 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Pt-NP < 20 nm in Medium (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 % FKS- haltiges DMEM) in HT29-Zellen und die jeweilige Verteilung der Feret-Durchmesser nach unterschiedlichen Expositionsdauern A) BSE-SEM-Aufnahme (‚Backscattered Secondary Electron Scanning Electronmicroscopy‘) nach 1h Medium-Inkubation und B) die zugehörige Verteilung der Feret-Durchmesser C) BSE-SEM-Aufnahme nach 24h Medium-Inkubation und D) die zugehörige Verteilung der Feret-Durchmesser. Aufnahmen erstellt von MitarbeiterInnen der AG Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Intituts für Technologie [entnommen aus Pelka, 2010].

Medium-Inkubation (Abbildung 2.24 A). In Abbildung 2.24 B ist die zugehörige Feret-Durchmesser-Verteilung graphisch dargestellt. Wie ersichtlich, hat nach einstündiger Medium-Exposition ein Großteil der NP den Durchmesser von < 20 nm beibehalten. Es wurden auch Messungen nach 24-stündiger Medium-Exposition durchgeführt. In Abbildung 2.24 C ist die elektronenmikroskopische Aufnahme der Pt-NP < 20 nm nach 24 h Inkubation mit 10 % FKS-haltigem DMEM zu sehen. Für die Ermittlung der Feret-Durchmesser wurden 255 NP ausgezählt, die Verteilung ist in Abbildung 2.24 D ersichtlich. Auch nach 24-stündiger Exposition war keine Verschiebung des Maximums des Partikeldurchmessers festzustellen, woraus geschlossen wurde, dass die Pt-NP < 20 nm nicht bzw. nur geringfügig zu zeitabhängigen Agglomerationseffekten in Zellkulturmedium neigten.

3. Zielsetzung

Platin wird in nanopartikulärer Form als Kontaminante in die Umwelt eingetragen, beispielweise als Folge des Abriebs von Autoabgaskatalysatoren [Rauch *et al.*, 2005]. Die Nanopartikel gelangen entweder nach dem Einatmen durch Verschlucken des partikelhaltigen Mukus oder direkt durch orale Aufnahme infolge einer Kontamination von Nahrungsmitteln in den Gastrointestinaltrakt. Die Erfassung des toxikologischen Potentials nanopartikulären Platins in humanen Darmepithelzellen ist daher von zunehmender Relevanz. In vorangegangenen Untersuchungen des Arbeitskreises zum genotoxischen Potential nanostrukturierter Platinpartikel konnte gezeigt werden, dass die Platinspezies DNA-Strangbrüche in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 induzierten. Diese konnten nicht auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies zurückgeführt werden [Pelka *et al.*, 2009], sondern hängen möglicherweise mit der Bildung löslicher Platinspezies zusammen [Gehrke *et al.*, 2011].

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die zelluläre Aufnahme des nanostrukturierten Platins, sowie die Wirkweise, die dessen genotoxischem Potential zu Grunde liegt, gewonnen werden. In Kooperation mit dem Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie sollten elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt werden, die Aufschluss über den zellulären Aufnahmemechanismus sowie die Abhängigkeit internalisierter Nanopartikel von Expositionszeit und -dosis liefern sollten. Um zu untersuchen, ob die Nanopartikel im Anschluss an die Zellaufnahme lösliche Platinspezies, die mit der nukleären DNA wechselwirken, bilden, sollte die Assoziation von Platin an die Kern-DNA herangezogen werden. Diese sollte mittels induktiv gekoppelter Plasmamassenspektrometrie in Zusammenarbeit mit dem anorganisch-chemischen Institut der Universität Wien bestimmt werden. Inwieweit die verursachten DNA-Läsionen auf Einzel- oder Doppelstrangbrüche zurückzuführen sind, sollte durch Detektion des im Fall eines vorhandenen Doppelstrangbruchs phosphorylierten Histons H2AX mittels Western Blot Analyse ermittelt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Charakterisierung der Nanopartikel

4.1.1. Partikelgrößenverteilung mittels DLS

Die PSD der Pt-NP in Suspension wurde mit dem Malvern ZetaSizer ermittelt (siehe Abschnitt 2.5.4). Das Prinzip dahinter ist die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel durch Messung des gestreuten Laserlichts.

Die NP wurden in H_2O_{bd} gemessen, da eine Messung in Zellkulturmedium nicht durchgeführt werden konnte, weil die enthaltenen Proteine und Mineralstoffe zur Korrosion der Metallelektroden in der Spezialküvette des ZetaSizer führten. Es wurden wässrige Suspensionen der beiden Partikelpräparationen Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm im Konzentrationsbereich $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2 - 50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\triangleq 7,6 \text{ mg Pt/l} - 0,38 \text{ g Pt/l}$ bzw. $0,04 \text{ mM Pt} - 13,8 \text{ mM Pt}$) gemessen. Die Konzentrationsangaben bezogen sich auf die Fläche der Zellkulturschalen, welche für die Western Blot-Versuche verwendet wurden ($\varnothing = 150 \text{ mm}$, $A = 152 \text{ cm}^2$). Die Messungen erfolgten bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Von den Suspensionen wurden mehrere Messungen mit unterschiedlichen Partikeldichten durchgeführt, die zugehörigen Ergebnisse sind in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** aufgelistet:

Tabelle 4.1 Durchmesser der DLS-Messungen („Dynamic Light Scattering“) der Partikelproben Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm in H_2O_{bd} mit unterschiedlichen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei Wiederholungsmessungen.

	Pt < 20 nm		Pt > 100 nm		
Partikeldichte [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	1	50	1	10	50
Durchmesser [nm]	118,4	137,5	151,9	111,0	135,9

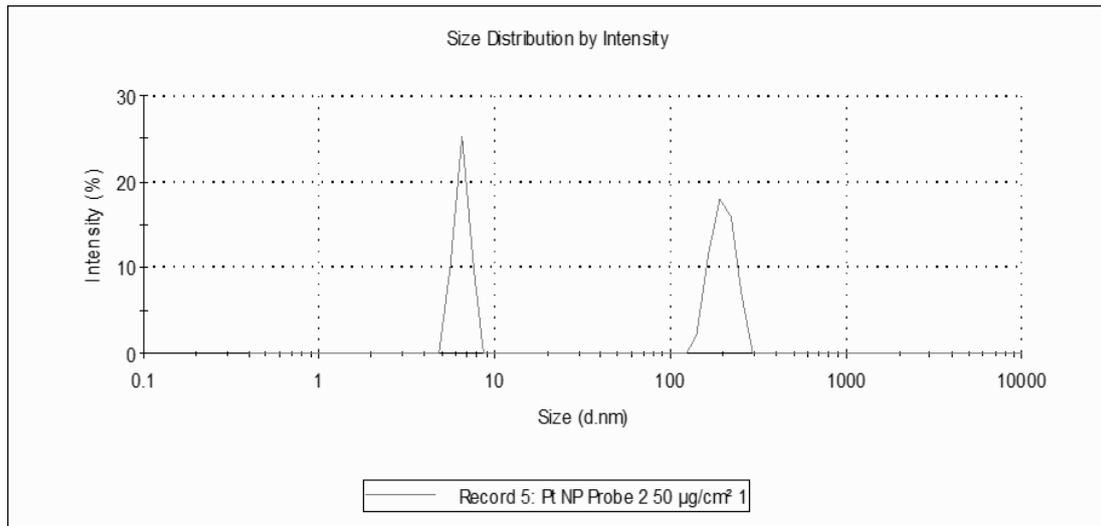


Abbildung 4.1 Messung des Zeta-Potentials der Pt-NP < 20 nm in wässriger Suspension ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\triangleq 15,6 \text{ g/l}$ β -CD). Der Peak entspricht einem Zeta-Potential von $-29,4 \text{ mV}$, der Mittelwert aus drei Wiederholungsmessungen.

Abbildung 4.1 zeigt die durch DLS-Messung ermittelte Größenverteilung einer Suspension der Pt-NP < 20 nm mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, aufgetragen gegen die Intensität des Streulichts. Es sind zwei Peaks ersichtlich, wovon einer einem Durchmesser von 6,5 nm zuzuordnen ist. Der Zweite entspricht einem Durchmesser von 200 nm.

Verglichen mit den Berechnungen der Feret-Durchmesser, die sich aus den STEM-Messungen ergaben (siehe Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), zeigten sich Unterschiede zu den Partikeldurchmessern, die mit den DLS-Messungen bestimmt wurden. Laut den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie hatten 90 % der Pt-NP der Präparation Pt-NP < 20 nm Durchmesser von 12,2 nm (d_{90} -Durchmesser). In diesen Bereich würde der Peak in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** mit der Größe 6,5 nm fallen. Der zweite Peak, der einen Durchmesser von 200 nm misst, könnte auf das Vorhandensein von agglomeriertem/aggregiertem β -CD hinweisen.

In Abbildung 4.2 ist die DLS-Messung einer reinen β -CD-Lösung ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \triangleq 6,24 \text{ g/l}$ bzw. $5,5 \text{ mmol/l}$) abgebildet. Der geringste Peak misst 96,6 nm, der größte 5413 nm. Laut Coleman *et al.* bildet β -CD in wässrigen Lösungen mit Konzentrationen zwischen 5 g/l und

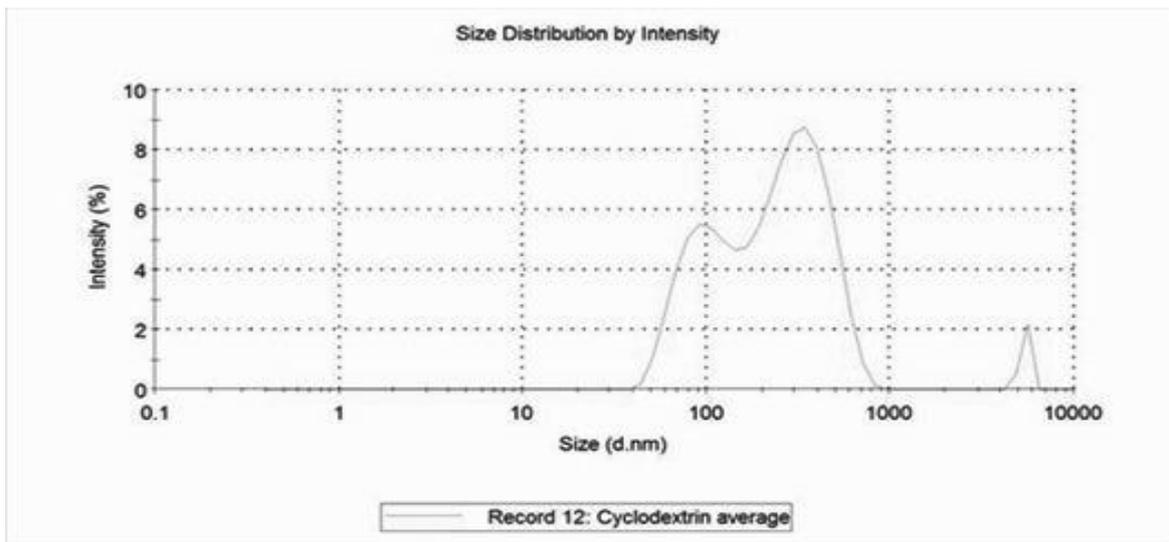


Abbildung 4.2 DLS-Messung („Dynamic Light Scattering“) von β -CD in wässriger Suspension ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$) mit einer Konzentration von $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\triangleq 6,24 \text{ g/l}$). Der Durchmesser der Partikel ist gegen die Intensität des Streulichts aufgetragen. Der erste Peak beim kleinsten Wert entspricht einem Durchmesser von 96,6 nm, der Zweite 322,2 nm und der Größte 5413 nm

auflösen [Coleman *et al.*, 1992]. González-Gaitano *et al.*, [2002]. maßen, ebenso mit DLS, in wässriger β -CD-Lösung Agglomerate von 174 nm [Gonzalez-Gaitano *et al.*, 2002]. Mittels TEM wurde agglomeriertes β -CD mit Durchmessern zwischen 120 nm und 130 nm gefunden, die bei steigenden Konzentrationen Durchmesser bis in den μm -Bereich maßen [He *et al.*, 2008]. Werte um die 100 nm – 300 nm entsprechen jenen, die in den Spektren der Suspensionen der Pt-NP < 20 nm beider Konzentrationen ersichtlich sind, ebenso wurden Durchmesser > 500 nm beobachtet. Vermutlich beeinflusste das Trägermaterial β -CD durch die Bildung von Agglomeraten die Streuung des Laserlichts, sodass die Ergebnisse dem Trägermaterial und nicht den NP zuzuordnen sind. Peaks mit Durchmessern < 20 nm traten im Zuge mehrerer Messungen, abgesehen von jener in Abbildung 4.1, nicht auf.

In Abbildung 4.3 ist das Ergebnis der DLS-Messung der $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Suspension von Pt > 100 nm in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ graphisch dargestellt. Der Peak bei kleineren Abszissen-Werten entspricht einem Durchmesser von 135,9 nm, der zweite einem Durchmesser von > 1000 nm. Aufgrund der für die Suspension der Pt-NP < 20 nm vermuteten β -CD-Agglomerate in wässriger Lösung, die die PSD-Messung dominierten, müssen die DLS-Ergebnisse für die Suspensionen der Pt > 100 nm ebenfalls unter diesem Aspekt interpretiert werden. Da die Pt-Partikeldurchmesser mehrheitlich über 100 nm liegt, mit einem d_{90} -Durchmesser von 210 nm, wären die Werte der PSD-Messungen mit den Ergebnissen aus den elektronenmikroskopischen Versuchen vereinbar. Die DLS-Ergebnisse

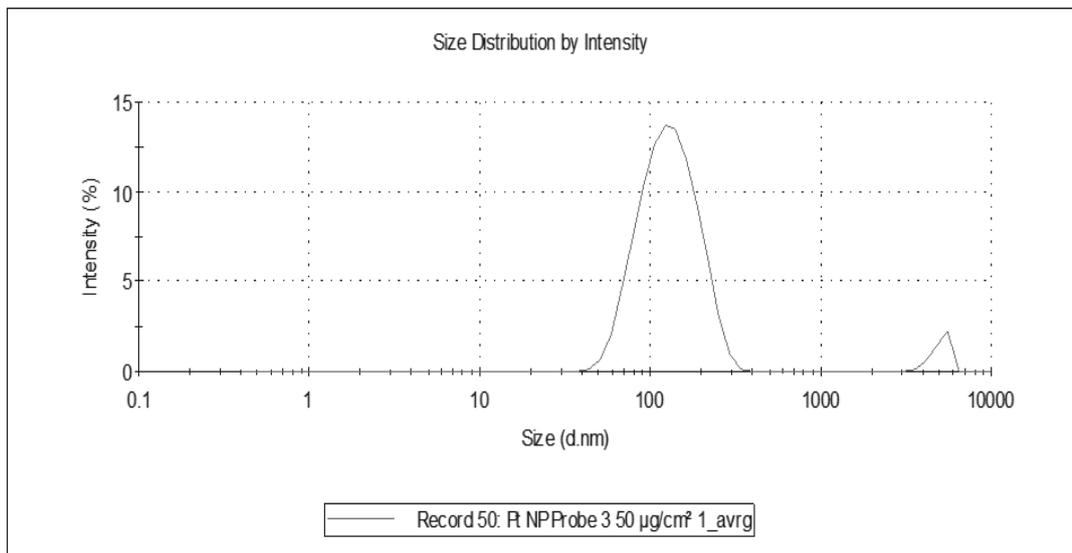


Abbildung 4.3 DLS-Messung („Dynamic Light Scattering) der Pt > 100 nm in wässriger Suspension ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\triangleq 15,6 \text{ g/l}$ β -CD). Die Intensität des Streulichtes ist gegen den Durchmesser der Partikel aufgetragen. Der Peak bei kleinerem Durchmesser entspricht 135,9 nm, der größere einem Durchmesser von > 1000 nm.

waren vermutlich den Agglomeraten des Trägermaterials zuzuordnen und spiegelten nicht die PSD der Pt-NP wieder.

4.1.2. Zeta-Potential

Suspensionen der Pt-NP < 20 nm in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ mit den Konzentrationen $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ wurden hergestellt, von Pt > 100 nm $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die Suspensionen der Konzentrationen $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ wurden nicht durch Verdünnung hergestellt, sondern jeweils frisch eingewogen, um Agglomerationseffekten weitgehend vorzubeugen. Nach Auffüllen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ wurden die Dispersionen mit dem Ultraschallstab behandelt. Die Messung des Zeta-Potentials erfolgte mit dem ZetaSizer Nano, dieser maß jede Probe dreimal, der Mittelwert der Messungen wurde berechnet. Die Messungen erfolgten bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

In Tabelle 4.2 sind die Zeta-Potentiale der Pt-NP < 20 nm in wässriger Suspension mit den Partikeldichten $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dargestellt. Die graphische Darstellung des Zeta-Potentials für die Suspension mit der Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist in Abbildung 4.4 zu sehen. Die Suspensionen der Pt-NP < 20 nm hatten ein Zeta-Potential von $-10,1 \text{ mV}$ bei einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $-25,3 \text{ mV}$ für $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Tabelle 4.2

Zeta-Potentiale der Partikelprobe Pt-NP < 20 nm in H₂O_{bd} mit unterschiedlichen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Wiederholungsmessungen.

Pt-NP < 20 nm		
Partikeldichte [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	1	50
Zeta-Potential [mV]	-10,1	-25,3

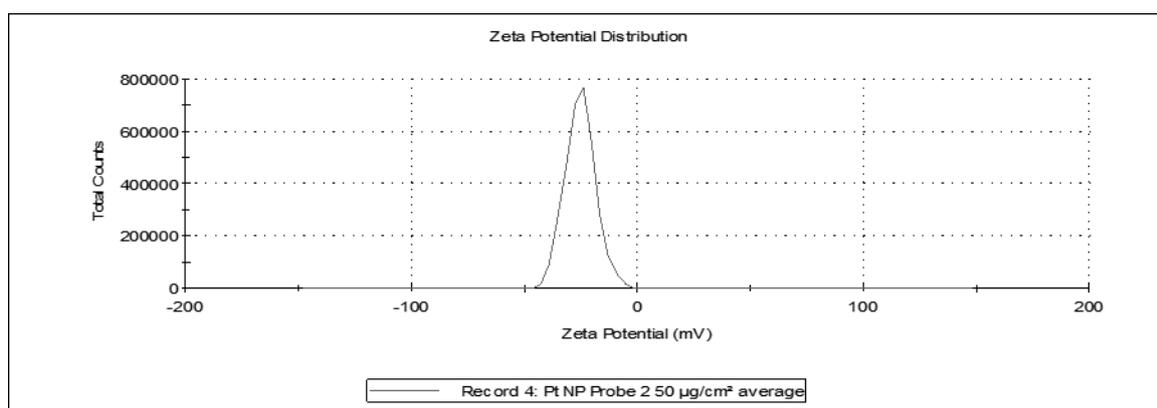
Die Zeta-Potentiale der Pt > 100 nm in wässriger Suspension (H₂O_{bd}) mit den Partikeldichten 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sind in Tabelle 4.3 gegeben:

Tabelle 4.3

Zeta-Potentiale der Partikelprobe Pt > 100 nm in H₂O_{bd} mit unterschiedlichen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Wiederholungsmessungen.

Pt > 100 nm			
Partikeldichte [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	1	10	50
Zeta-Potential [mV]	-20,5	-31,3	-29,4

Die zugehörige graphische Darstellung der Suspension mit einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist in Abbildung 4.4 ersichtlich. Die Pt-NP der Präparation Pt > 100 nm ergaben

**Abbildung 4.4**

Messung des Zeta-Potentials der Pt-NP < 20 nm in wässriger Suspension (H₂O_{bd}) mit einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (\triangleq 15,6 g/l β -CD). Der Peak entspricht einem Zeta-Potential von -29,4 mV, der Mittelwert aus drei Wiederholungsmessungen.

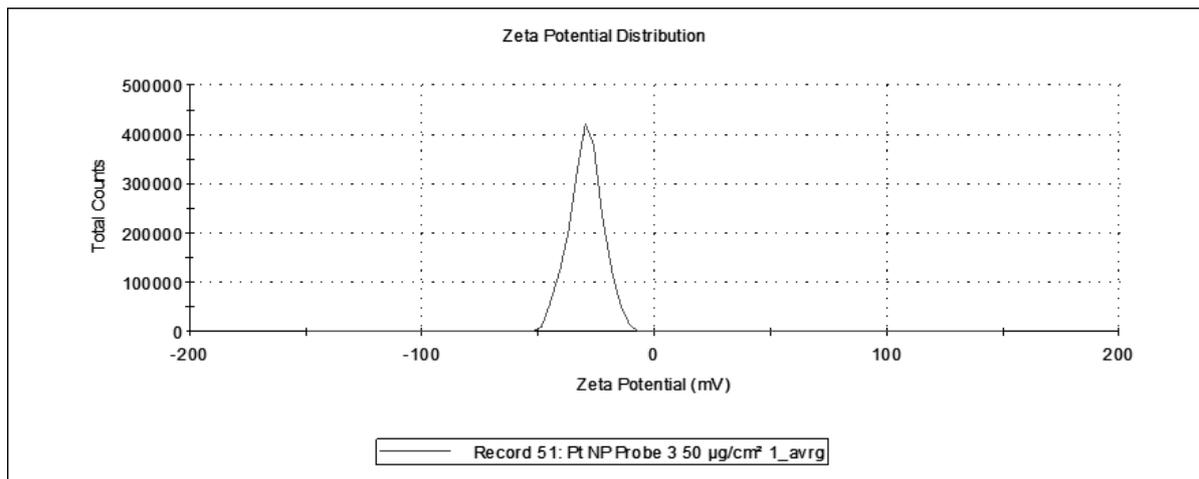


Abbildung 4.5 Messung des Zeta-Potentials der Pt-NP > 100 nm in wässriger Suspension ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\triangleq 15,6 \text{ g/l } \beta\text{-CD}$). Der Peak entspricht einem Zeta-Potential von $-25,3 \text{ mV}$, der Mittelwert aus drei Wiederholungsmessungen.

in wässriger Suspension Zeta-Potentiale von $-20,5 \text{ mV}$, $-31,3 \text{ mV}$ und $-29,4 \text{ mV}$ für $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Metallische NP haben aufgrund der präferierten Adsorption von Anionen an der Oberfläche in Suspension tendenziell negative Zeta-Potentiale [Hunter, 1981], was auch in diesem Fall zutrifft. Eine Verschiebung des Zeta-Potentials in Richtung positiver Werte zeigt das Vorhandensein agglomerierter Partikel an. Ein Wert von $\pm 30 \text{ mV}$ gilt als Grenzwert für eine stabile Suspension, d. h. ohne eine erhebliche Anzahl an Agglomeraten [Malvern Instrument Ltd., 2009]. Die Werte für $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Pt > 100 nm befanden sich mit $-29,4 \text{ mV}$ und $-31,3 \text{ mV}$ in diesem Bereich. Das Zeta-Potential der Pt-NP < 20 nm mit der Konzentration $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ lag bei $-25,3 \text{ mV}$ und war demnach etwas positiver als der angegebene Grenzwert stabiler Kolloide von -30 mV . Die Pt-NP beider Präparationen besaßen in Suspensionen mit Partikeldichten von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aufgrund ihres Zeta-Potentials ausreichende elektrostatische Abstoßung, sodass keine spontane Agglomeration auftrat.

Für beide NP-Präparationen war das Zeta-Potential der Konzentration $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ positiver als für die höheren Partikelkonzentrationen. Die Suspension der Pt-NP < 20 nm lag für $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei $-10,1 \text{ mV}$, jene der Pt > 100 nm bei $-20,5 \text{ mV}$. Der Auftritt von zeitabhängigen Agglomerationseffekten ist auszuschließen, da die Dispersionen aus diesem Grund nicht durch Verdünnung, sondern, ebenso wie die konzentrierteren Proben, frisch hergestellt wurden. Die positiveren Werte weniger konzentrierter Suspensionen könnten von einer zu

geringen Partikeldichte rühren. Bei $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sind $0,31 \text{ g } \beta\text{-CD}/\text{l}$ ($\hat{=} 0,28 \text{ mmol}/\text{l}$) und $0,008 \text{ g Pt}/\text{l}$ ($\hat{=} 0,04 \text{ mmol}/\text{l}$) enthalten. Die geringen Mengen des Substrats bzw. der NP könnten nicht ausreichend sein, um eine adäquate Streuung des eingestrahnten Lichts zu ermöglichen.

4.1.3. Zusammenfassung der Partikelcharakterisierung

Unter Berücksichtigung der elektronenmikroskopischen Charakterisierung sowie der Messung des Zeta-Potentials und der PSD mittels DLS-Messungen ließen sich folgende Resumés über die Pt-NP-Präparationen Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm erstellen:

► Pt-CD2 bzw. Pt-NP < 20 nm

Pt-NP der Präparation Pt-CD2 hatten einen d_{10} -Durchmesser von 4,7 nm, einen d_{50} -Durchmesser von 7,7 nm und einen d_{90} -Durchmesser von 12,2 nm, wie aus der elektronenmikroskopischen Bestimmung des Feret-Durchmessers ersichtlich war (siehe Tabelle 2.2). Daher wurden die NP dieser Präparation als **Pt-NP < 20 nm** bezeichnet. Die enge Durchmesser-Verteilung, ausgedrückt durch eine Polydispersität $\Delta = 1$, zeigte, dass die Präparation Pt-NP < 20 nm monodispers war. Das Agglomerationsverhalten im Medium war gering, wie aus den SEM-Aufnahmen ersichtlich. Die Partikelgrößenverteilung konnte mittels DLS-Messung aufgrund von Agglomeraten des Substrats $\beta\text{-CD}$ nicht bestimmt werden. Das Zeta-Potential konnte für die Partikel in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ gemessen werden und lag für die Partikelkonzentration von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei $-25,3 \text{ mV}$, was auf eine stabile Suspension schließen ließ.

► Pt-CD 3 bzw. Pt > 100 nm

Die Präparation Pt-CD3 wies eine größere Breite der Größenverteilung auf. Der d_{10} -Durchmesser betrug 88,4 nm, der d_{50} -Durchmesser 155 nm und der d_{90} -Durchmesser 210 nm (Tabelle 2.2). Die Dispersität $\Delta = 0,8$ wies auf eine monodisperse Probe hin. Die Partikel der Pt-CD3 wurden als **Pt > 100 nm** bezeichnet. Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen lagen die NP stärker in Form von Agglomeraten vor als jene der Pt-NP < 20 nm. Die Partikelgrößenverteilung konnte aufgrund von Agglomeraten des Substrats $\beta\text{-CD}$ nicht mittels DLS bestimmt werden. Das Zeta-Potential konnte für die Partikel in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ gemessen werden und lag für die Partikelkonzentration von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei $-29,4 \text{ mV}$, was auf eine stabile Suspension schließen ließ.

4.2. Zelluläre Aufnahme von nanopartikulärem Platin

Die zelluläre Aufnahme von Pt-NP < 20 nm in HT29-Zellen wurde mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen untersucht. Dazu wurden von MitarbeiterInnen der AG Prof. Gerthsen am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des KIT Hellfeld STEM (BF STEM – ‚Bright Field Scanning Transmission Electronmicroscopy‘) - Aufnahmen der Proben erstellt. Um eine zeitabhängige Aufnahme zu untersuchen wurden einerseits zwei Zeitserien mit unterschiedlichen Partikeldichten vermessen. Andererseits wurde der Mechanismus der Partikelaufnahme durch Inkubationen bei 4 °C und 37 °C, um Auskunft über das Vorhandensein energieabhängiger Internalisierungsprozesse zu erhalten, bestimmt.

4.2.1. Zeitabhängige Aufnahme

Untersuchungen zur zeitabhängigen Aufnahme von Pt-NP < 20 nm wurden mit den Partikeldichten 20 µg/cm² und 50 µg/cm² bei 37 °C an HT29-Kolonkarinzomzellen durchgeführt. Die Erstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen sowie die Auswertung erfolgten durch MitarbeiterInnen der Gruppe von Prof. Gerthsen am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des KIT. Die statistische Auswertung der zellulären Pt-Partikel wurde mithilfe der ImageJ-Software durchgeführt, diese berechnete die Anzahl an interzellulären Pt-NP sowie deren Fläche. Im Folgenden soll kurz auf allgemeine Charakteristika der aufgenommenen Pt-Partikel eingegangen werden, im Anschluss werden die beiden Zeitserien sowie die Temperaturversuche detailliert besprochen.

Bezugnehmend auf generelle Eigenschaften internalisierter Pt-NP < 20 nm war festzustellen, dass diese in sämtlichen elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu einem Teil assoziiert an die Zelloberfläche vorlagen, dort größtenteils adsorbiert an die Mikrovilli. Das sind an der apikalen äußeren Membran der Enterozyten befindliche 1-2 µm lange, hauptsächlich vom Protein Villin zu Bündeln zusammengefasste Aktinfilamente [Fath *et al.*, 1995]. In Abbildung 4.6 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer HT29-Zelle nach 24-stündiger Inkubation mit Pt-NP < 20 nm der Konzentration 50 µg/cm² zu sehen. Die Pt-NP sind als helle Flecke innerhalb der Zelle und an ihrer Oberfläche ersichtlich. Hervorgehoben sind die Mikrovilli an der Außenseite der Zellmembran, sowie die daran assoziierten Pt-NP. Die Mikrovilli der Darmzellen haben den Zweck der Absorption von Nährstoffen und Ionen [Pardee, 2010]. Demnach hatte die Adsorption der Pt-NP an die

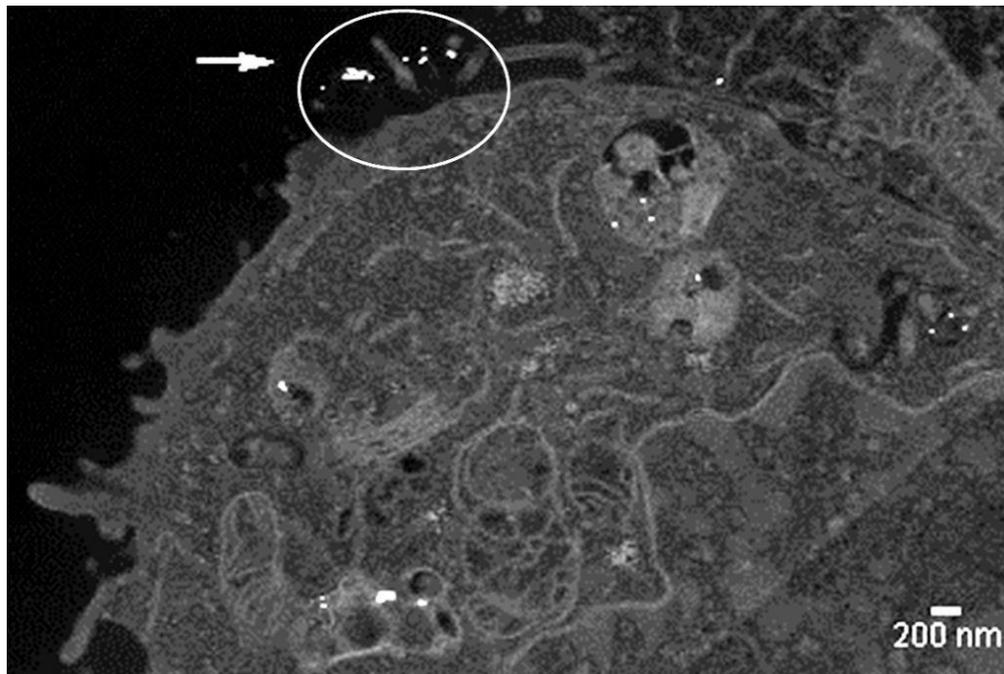


Abbildung 4.6 Hellfeld-Rastertransmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (BF-STEM - ‚Bright Field Scanning Electron Microscopy‘) einer HT29-Zelle nach 24-stündiger Inkubation mit Pt < 20 nm (50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 % FKS-haltiges DMEM, 37 °C). Pt-NP sind als helle Flecke zu erkennen, an der Zelloberfläche sind die Partikel an Mikrovilli adsorbiert (siehe Pfeil). Aufnahmen erstellt von MitarbeiterInnen der Gruppe von Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

Mikrovilli der HT29-Zellen vermutlich im weiteren Verlauf einen Transport der NP in das Zellinnere zur Folge.

Die aufgenommenen Pt-NP wurden auf ihre Lokalisation im Zellinneren untersucht. Abbildung 4.6 zeigt eine HT29-Zelle nach 24-stündiger Inkubation mit Pt-NP < 20 nm der Konzentration 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Der Zellkern (Nuc) ist durch die Kernmembran vom Zytosol abgegrenzt, das dunklere Innenleben ist ersichtlich. In Kern oder Mitochondrien wurden, unabhängig von Partikeldichte und Inkubationszeit, keine NP gefunden. Diese waren einerseits in membranumschlossenen Vesikeln erkennbar, andererseits frei im Zytosol. In Abbildung 4.7 sind die NP in der Nähe des Nukleus in einem membranumschlossenen Vesikel erkennbar, gekennzeichnet durch einen Pfeil. Der Vesikel aus Abbildung 4.7 ist in Abbildung 4.8 vergrößert dargestellt. Auf der Aufnahme sind bis zu 200 nm große Agglomerate innerhalb des Vesikels zu sehen (weißer Pfeil). Im Folgenden wird das Aufnahmeverhalten der Zellen bei Inkubation mit den Pt-NP < 20 nm in den Konzentrationen 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (bezeichnet als **Zeitserie 1**) und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (bezeichnet als **Zeitserie 2**) in Abhängigkeit der Inkubationszeiten diskutiert.

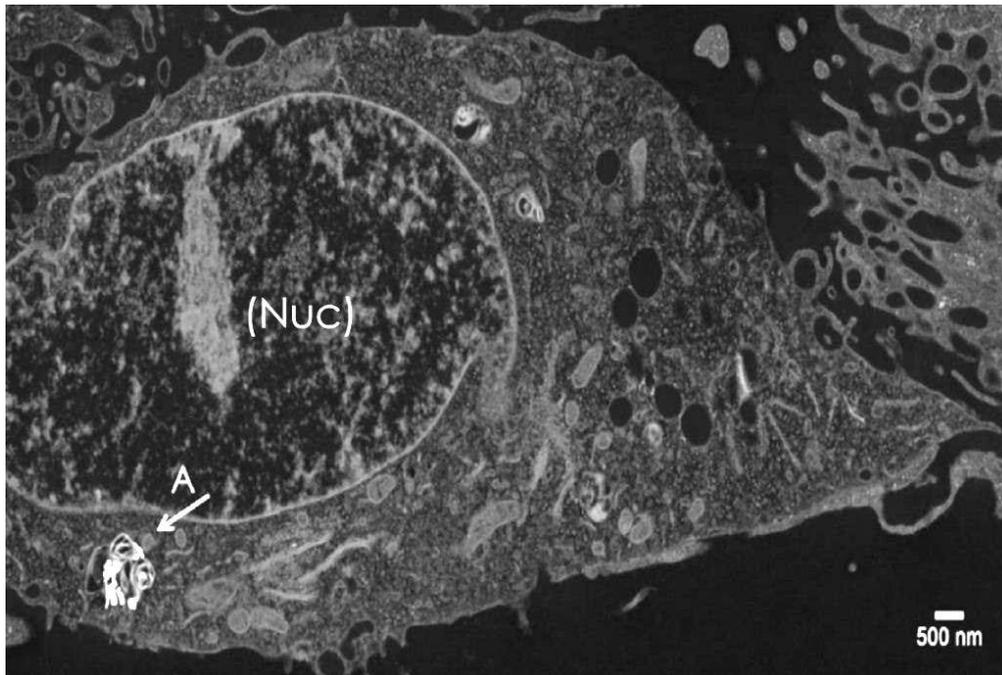


Abbildung 4.7 Hellfeld-Rastertransmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (BF-STEM – ,Bright Field Scanning Electron Microscopy') einer HT29-Zelle nach 24-stündiger Inkubation mit Pt-NP < 20 nm (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 % FKS-haltiges DMEM, 37 °C). Pt-NP sind als helle Flecken im Zytosol in einem membran-umschlossenen Vesikel zu erkennen (siehe Pfeil). Weiters ist der Zellkern (Nuc) ersichtlich. Aufnahmen erstellt von MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe von Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie

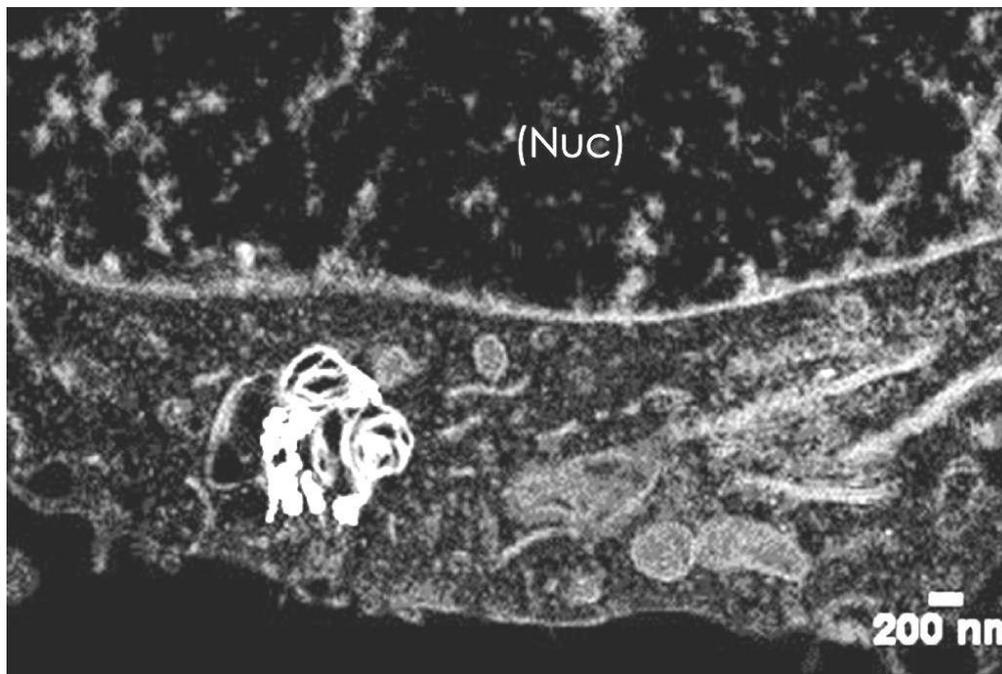


Abbildung 4.8 Hellfeld-Rastertransmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (BF-STEM – ,Bright Field Scanning Electron Microscopy') einer HT29-Zelle nach 24-stündiger Inkubation mit Pt-NP < 20 nm (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 % FKS-haltiges DMEM, 37 °C). Pt-NP sind als helle Flecken im Zytosol in einem membranumschlossenen Vesikel zu erkennen (siehe Pfeil). Weiters ist der Zellkern (Nuc) ersichtlich. Abbildung ist eine vergrößerte Darstellung des membranumschlossenen Vesikels aus Abbildung 4.12. Aufnahmen erstellt von MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe von Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

► Zeitserie 1

HT29-Zellen wurden für 1 h, 6 h, 24 h und 48 h mit der Partikelsuspension Pt-NP < 20 nm mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (85,5 mg/l bzw. 0,44 mM) bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Für die Inkubationszeit von 1 h war die aufgenommene Partikelmenge so gering, dass die Daten nicht für eine statistische Erhebung ausreichten.

In Abbildung 4.9 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme zwei benachbarter HT29-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Pt-NP < 20 nm der Konzentration 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dargestellt. Im Inneren der Zellkerne (Nuc) sind keine Pt-NP ersichtlich. Diese sind entweder in membranumschlossenen Vesikeln (Pfeile A, B und C) oder frei im Zytosol

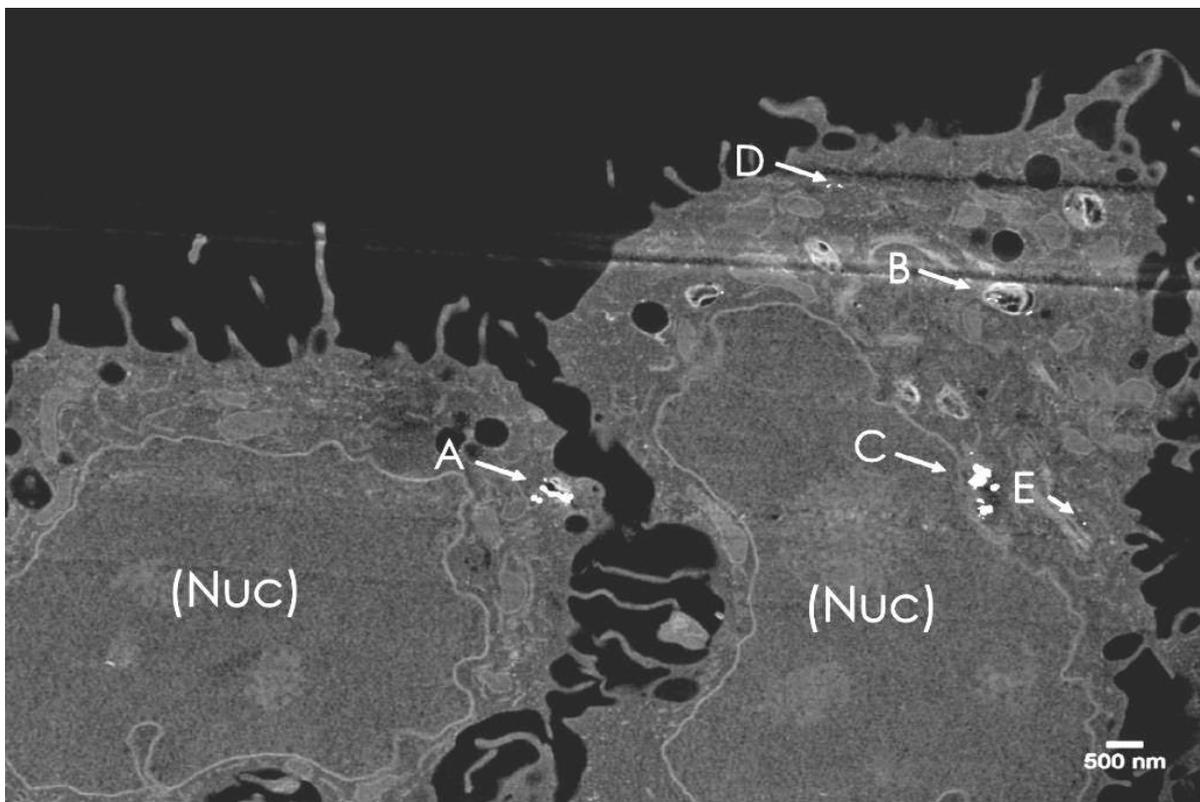


Abbildung 4.9 Hellfeld-Rastertransmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (BF-STEM – ‚Bright Field Scanning Electron Microscopy‘) einer HT29-Zelle nach 24-stündiger Inkubation mit Pt-NP < 20 nm (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 % FKS-haltiges DMEM, 37 °C). Pt-NP sind als helle Flecken im Zytosol in membranumschlossenen Vesikeln (Pfeile A, B und C) oder frei vorliegend (Pfeile D und E) zu erkennen. Weiters ist der Zellkern (Nuc) ersichtlich. Aufnahmen erstellt von MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe von Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

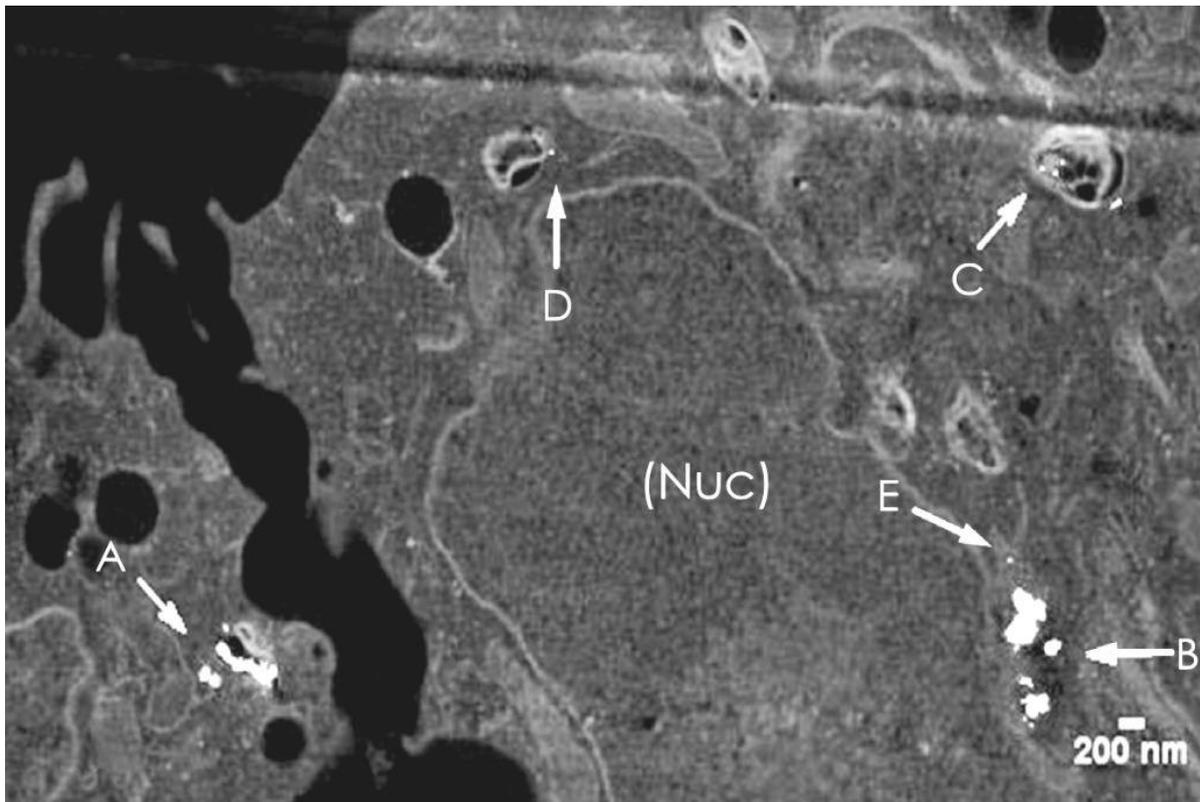


Abbildung 4.10 Hellfeld-Rastertransmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (BF-STEM – ‚Bright Field Scanning Electron Microscopy‘) einer HT29-Zelle nach 48-stündiger Inkubation mit Pt-NP < 20 nm ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in 10 % FKS-haltigem DMEM, 37°C). Abgebildet ist eine Vergrößerung eines Ausschnitts aus Abbildung 4.14. Pt-NP sind als helle Flecken im Zytosol in membranumschlossenen Vesikeln (Pfeile A, B, C und D). In den Vesikeln können die Pt-NP in Agglomeraten vorliegen (Pfeile A und B) oder vereinzelt (Pfeile C und D). Pt-NP können auch frei im Zytosol vorliegen (Pfeil E). Weiters ist der Zellkern (Nuc) ersichtlich. Aufnahmen erstellt von MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe von Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronen mikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie

(Pfeile D und E) erkennbar. In Abbildung 4.10 ist ein Bereich Abbildung 4.9 vergrößert dargestellt. Innerhalb der membranumschlossenen Vesikel liegen die Pt-NP agglomeriert (Pfeile A und B) oder vereinzelt vor (Pfeil C und D). Die im Zytosol befindlichen Pt-NP sind in Form einzelner NP zu erkennen (Pfeil E).

In Abbildung 4.12 ist eine elektronenmikroskopische Darstellung eines membranumschlossenen Vesikels in einer HT29-Zelle nach 48-stündiger Exposition mit Pt-NP < 20 nm der Konzentration $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu sehen. Mehrere längliche Pt-Partikel, die jeweils ca. $1 \mu\text{m}$ lang sind, reihen sich auf der Aufnahme aneinander und bilden eine ca. $4 \mu\text{m}$ lange „Kette“ aus Partikeln. Diese „großen“ Partikel werden im Folgenden als „> 400 nm“ bezeichnet.

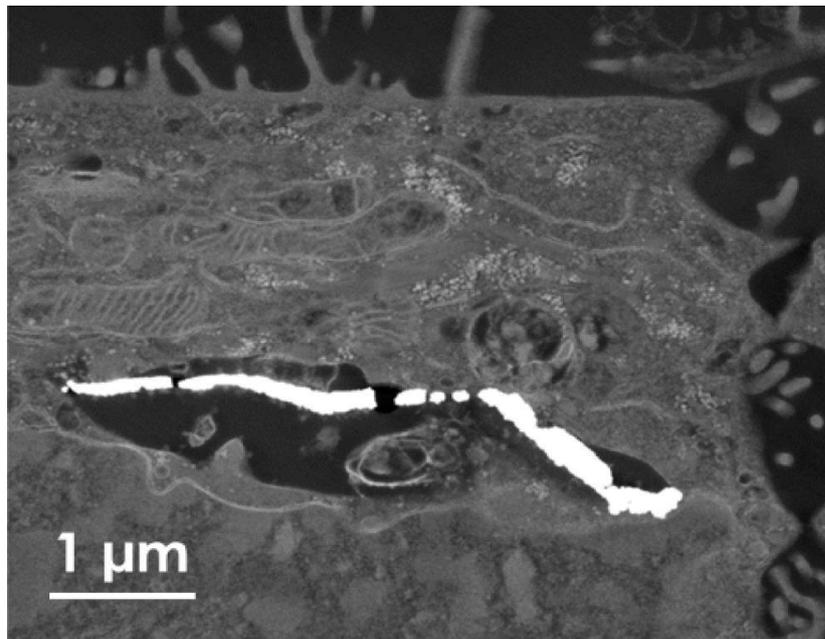


Abbildung 4.11 Hellfeld-Rastertransmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (BF-STEM – ‚Bright Field Scanning Electron Microscopy‘) einer HT29-Zelle nach 48-stündiger Inkubation mit Pt < 20 nm (50 µg/cm² in 10 % FKS-haltigem DMEM, 37 °C). Pt-Partikel sind als helle Flecken im Zytosol in einem membranumschlossenen Vesikel zu erkennen. Aufnahmen erstellt von MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe von Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronen mikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie

In Tabelle 4.4 sind Anzahl und die Fläche, die internalisierte Pt-Partikel nach 6-, 24- und 48-stündiger Inkubation ausmachten, jeweils bezogen auf die Zellfläche, angegeben:

Tabelle 4.4 Anzahl und Fläche innerzellulärer Pt-NP < 20 nm in HT29-Zellen im Rahmen der Zeitserie 1. 5 x 10⁶ Zellen ausgestreut, die Inkubationszeiten betragen 6 h, 24 h und 48 h. Angegeben sind die Ergebnisse sämtlicher internalisierter Partikel und exklusive jener mit Feret-Durchmessern > 400 nm. Daten ermittelt von MitarbeiterInnen der AG Prof. D. Gerthsen, am Institut für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

Inkubationszeit	6 h	24 h	48 h
Anzahl Pt-NP/µm ² Zellfläche	0,0089	0,0285	0,1926
Anzahl Pt-NP/µm ² Zellfläche, ohne > 400 nm	0,0063	0,0275	0,1913
Fläche Pt-NP/µm ² Zellfläche [nm ²]	514	199	434
Fläche Pt-NP/µm ² Zellfläche, ohne > 400 nm [nm ²]	34	77	351

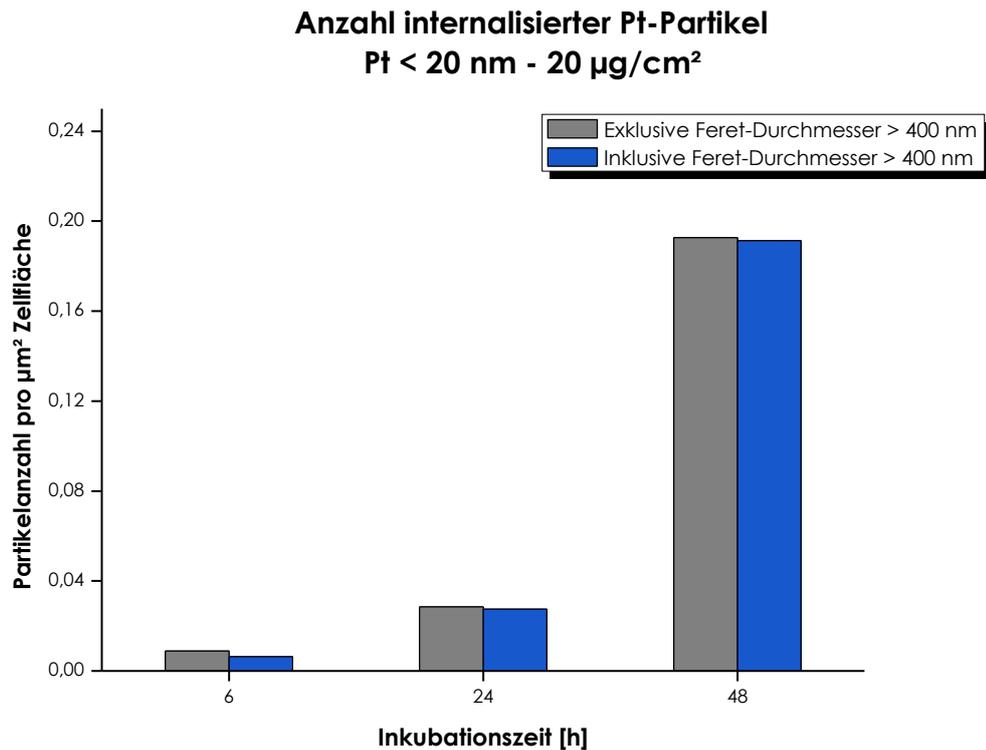


Abbildung 4.12

Graphische Darstellung der innerzellulären Pt-Partikelanzahl pro µm² Zell-fläche in HT29-Zellen nach Inkubation mit Pt-NP < 20 nm (20µg/cm², 10 % FKS-haltiges DMEM, 37 °C, 5 x 10⁶ Zellen). Aufgetragen gegen die Inkubationszeiten 6 h, 24 h und 48 h. Auswertung erfolgte inklusive und exklusive den Partikeln mit Feret-Durchmessern > 400 nm. Daten erstellt von der Gruppe von Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

In Abbildung 4.12 ist die Zunahme in Abhängigkeit der Zeit graphisch dargestellt. Aufgetragen ist die Partikelanzahl pro Zellfläche nach entsprechender Expositions-dauer. Wie ersichtlich, korreliert die steigende Anzahl der interzellulären Partikel mit dem größer werdenden Inkubationszeitraum. Nach 24 h werden pro Zellfläche um 68,7 % mehr Pt-Partikel aufgenommen als nach 6 h. Zwischen 24- und 48-stündiger Exposition erhöht sich die innerzelluläre Menge um weitere 85,2 %.

Fläche internalisierter Pt-Partikel Zeitreihe 1

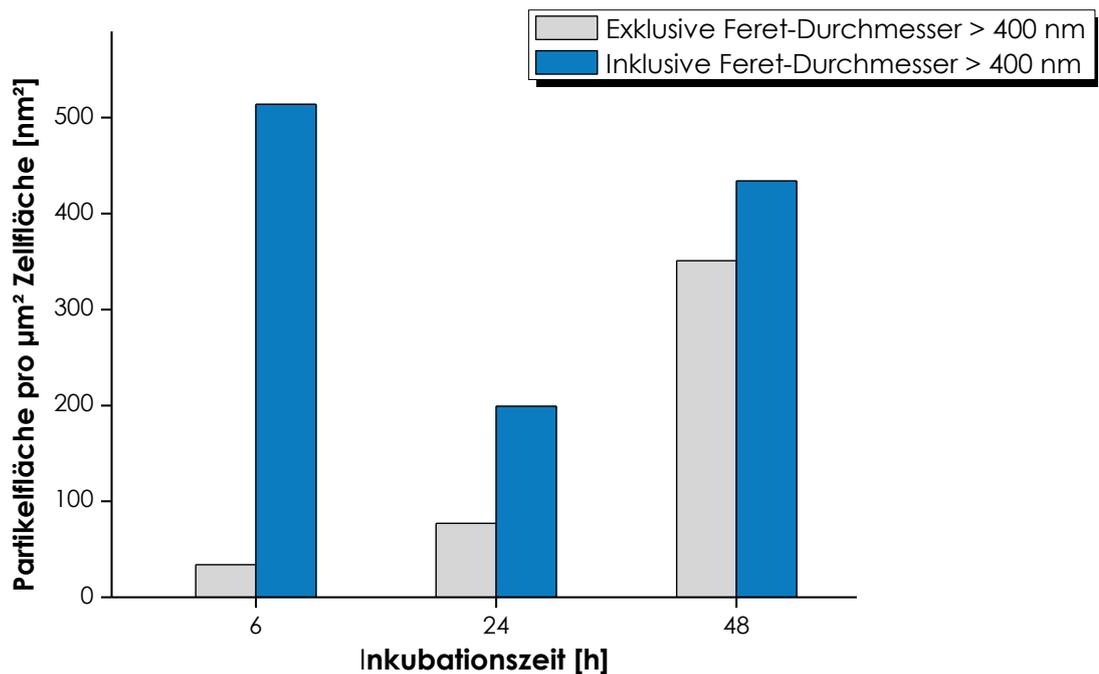


Abbildung 4.13

Graphische Darstellung der Partikelfläche pro μm^2 Zellfläche in HT29- Zellen nach Inkubation mit Pt-NP < 20 nm ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 % FKS-haltiges DMEM, 37°C , 5×10^6 Zellen) für unterschiedliche Inkubationszeiten. Die Auswertung erfolgte inklusive und exklusive den Partikeln mit Feret-Durchmessern > 400 nm. Daten erstellt von MitarbeiterInnen von Prof. Gerthsen, am Labroatorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

Eine Abhängigkeit zwischen der Zunahme internalisierter Pt-NP < 20 nm in HT29-Zellen und der Expositionsdauer war demnach zu erkennen. Anders verhielt es sich für die zugehörigen Flächen der aufgenommenen Partikel. Diese sind in Abbildung 4.13 ebenfalls bezogen auf die Zellfläche, für die entsprechenden Inkubationszeiten dargestellt. Unter Miteinbeziehung jener Partikel mit Durchmessern > 400 nm (blaue Balken) wird nach 6-stündiger Exposition interzellulär eine um 61,3 % größere Partikelfläche pro Zellfläche gemessen als nach 24 h, bei zunehmender Partikelzahl (27 Partikel nach 6 h bzw. 134 Partikel nach 24 h). Zwischen 24 h und 48 h ist eine Zunahme der Fläche um 54,1 % zu erkennen.

Die Abnahme der Flächen interzellulärer Pt-Partikel zwischen der 6- und 24-stündigen Expositionsdauer lässt sich durch Betrachtung der Verteilung der Feret-Durchmesser in Abbildung 4.14 erklären. Der kleinste ausgewertete Feret-Durchmesser beträgt 20 nm,

Verteilung der Feret-Durchmesser Zeitserie 1

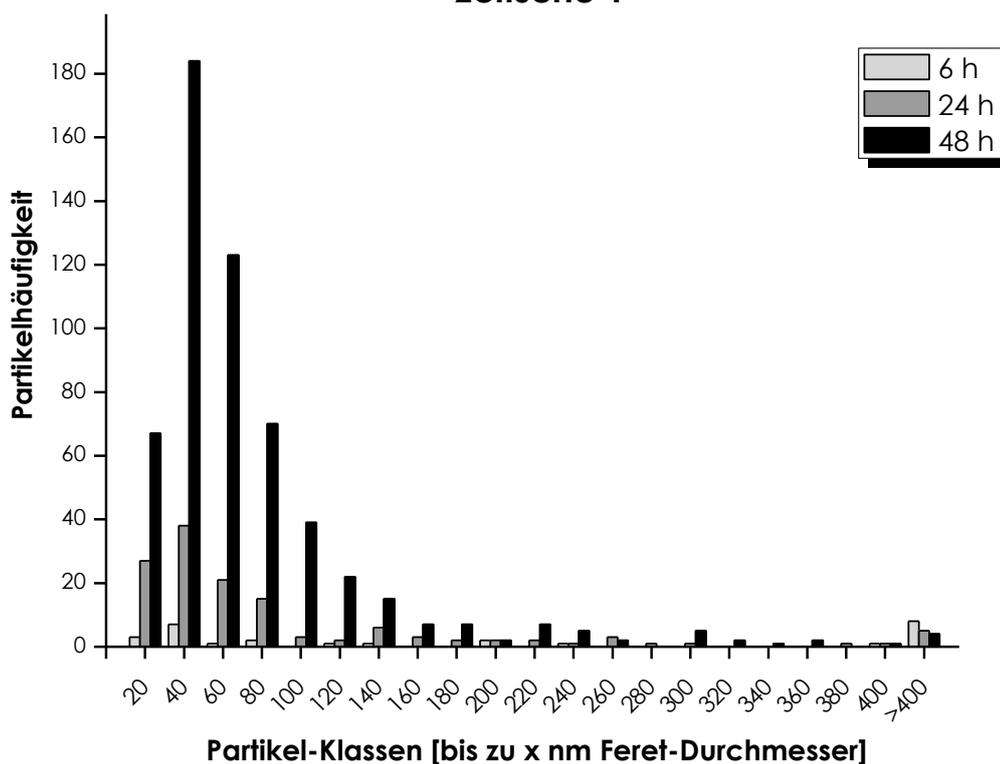


Abbildung 4.14 Verteilung der Feret-Durchmesser von Pt-NP < 20 nm in HT29-Zellen (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 % FKS-haltiges DMEM, 37 °C, 5×10^6 Zellen). Inkubationszeiten betragen 6h, 24 h und 48 h. Daten erstellt von MitarbeiterInnen der AG Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

die in Abbildung 4.11 dargestellten „großen“ Partikel sind unter > 400 nm zusammengefasst. Die meisten der nach 6 h vorgefundenen Partikel im Zellinneren haben einen Feret-Durchmesser von > 400 nm (8 Stück bzw. 29,6 % der Gesamtmenge), erst an zweiter Stelle werden Pt-NP mit einem Feret-Durchmesser von 40 nm (7 Stück bzw. 25,9 %) gemessen. Wie aus der Graphik in Abbildung 4.14 ersichtlich, verschiebt sich dieses Gleichgewicht mit zunehmender Inkubationsdauer von > 400 nm in Richtung kleinerer Feret-Durchmesser. Die Mehrzahl der nach 24 h internalisierten Pt-NP hat einen Feret-Durchmesser von 40 nm (28,4 % der Gesamtmenge an aufgenommenen Partikeln), gefolgt von 20 nm (20,1 %) und 60 nm (15,7 %). Lediglich 3,7 % der Partikel haben Feret-Durchmesser von > 400 nm. Nach 48 h Expositionsdauer wird ebenso ein Feret-Durchmesser von 40 nm am häufigsten gemessen (32,6 % der gesamten aufgenommenen Partikel), gefolgt von 60 nm (21,8 %) und 80 nm (12,4 %). Feret-Durchmesser von > 400 nm haben nach 48 h lediglich 0,7 % der internalisierten Partikel.

In Abbildung 4.12 ist zu erkennen, dass sich die Anzahl internalisierter Partikel pro Zellfläche kaum ändert, unabhängig, ob jene Partikel mit > 400 nm mit eingerechnet (blaue Balken) oder außer Acht gelassen werden (graue Balken). Aufgrund der höheren Menge an internalisierten > 400 nm-Partikel im Fall der 6-stündigen Exposition, im Gegensatz zu der 24- und der 48-stündigen, ergibt sich die in Abbildung 4.13 dargestellte Flächenverteilung (hellgraue Balken), wonach zwischen der 6- und 24-stündigen eine Abnahme ersichtlich ist. Unter Ausschluss jener Pt-Partikel mit Feret-Durchmessern > 400 nm ergibt sich der in Abbildung 4.13 dargestellte Verlauf (blaue Balken). Demnach ist zwischen der 6- und der 24-stündigen Exposition eine Zunahme der interzellulären Partikelfläche um 38,7 % ersichtlich und nach 48 h um weitere 80,1 %.

► Zeitserie 2

Die Zellen wurden mit einer Pt-NP < 20 nm-Suspension mit der Partikeldichte 50 µg/cm² (213,7 mg/l bzw. 1,1 mM) inkubiert. Die Expositionszeiträume umfassten 1 h, 10 h, 24 h und 48 h. Aufgrund von Materiallimitierung wurde zwischen den Versuchen von 6 (Wachstumsfläche 4,67cm²) - auf 24 (Wachstumsfläche 1,12 cm²) - Loch-Platten umgestellt. Da in den 6-Loch-Platten im Zuge dieser Arbeit Inkubationen mit 50 µg/cm² Partikeldichte nur für 24 h und 48 h Inkubation durchgeführt wurden, wurden die Daten für 1 h und 10 h von H. Gehrke, die unter denselben Bedingungen stattfanden, zusätzlich zur gemeinsamen Auswertung herangezogen. Die statistischen Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 dargestellt:

Tabelle 4.5

Anzahl und Fläche interzellulärer Pt-NP < 20 nm in HT29-Zellen (50 µg/cm² in 10 % FKS-haltigem DMEM, 37 °C). Die Inkubationszeiten betragen 1 h, 10 h, 24 h und 48 h. Angegeben sind die Ergebnisse sämtlicher internalisierter Partikel und exklusive derer mit Feret-Durchmessern > 400 nm. Daten ermittelt von MitarbeiterInnen der AG Prof. D. Gerthsen, am Institut für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

Inkubationszeiten	1 h	10 h	24 h	48 h
Anzahl Pt-NP/µm ² Zellfläche	0,0123	0,0312	0,0753	0,1071
Fläche Pt-NP/µm ² Zellfläche [nm ²]	341	120	129	563
Anzahl Pt-NP/µm ² Zellfläche ohne NP > 400 nm	0,0107	0,0300	0,0753	0,1051
Fläche Pt-NP/µm ² Zellfläche ohne NP > 400 nm [nm ²]	21	52	129	230

Anzahl internalisierter Pt-Partikel Zeitserie 2

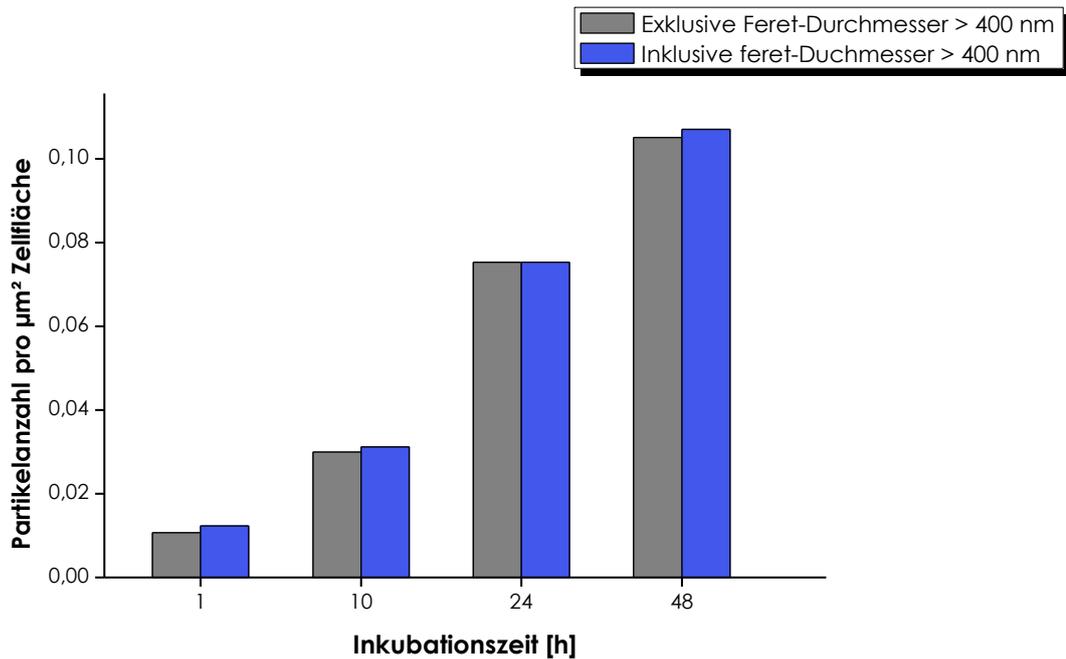


Abbildung 4.15 Graphische Darstellung der Partikelanzahl pro μm^2 Zellfläche in HT29-Zellen nach Inkubation mit Pt-NP < 20 nm ($50\mu\text{g}/\text{cm}^2$, $37\text{ }^\circ\text{C}$, 10 % FKS-haltiges DMEM, $0,5 \times 10^6$ Zellen). Aufgetragen gegen die Inkubationszeiten 1 h, 10 h, 24 h und 48 h. Auswertung inklusive und exklusive Partikeln mit Durchmessern > 400 nm. Daten erstellt von der Gruppe von Prof. Gerthsen, am Labroatorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

Nach Inkubation mit Pt-NP < 20 nm mit einer Konzentration von $50\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nahm die Anzahl der aufgenommenen Pt-Partikel pro Zellfläche mit der Expositionsdauer zu. Dies ist in Abbildung 4.15 graphisch dargestellt. Nach 1 h werden interzellulär 39 Pt-Partikel gemessen und nach 10 h 101 Partikel, was, bezogen auf die Zellfläche, einer Zunahme um 60,6 % entspricht. Zwischen 10 h und 24 h (165 Pt-Partikel) findet eine Erhöhung um 58,6 % statt. Von 24 h auf 48 h (361 Pt-Partikel) beträgt diese 29,7 %.

Die Betrachtung der zugehörigen Partikelflächen folgte, unter Einbeziehung sämtlicher aufgenommenener Pt-Partikel, in Abhängigkeit der Inkubationszeit nur teilweise einem Anstieg. Wie in Abbildung 4.16 ersichtlich, liegt nach 1 h eine höhere zelluläre Partikelfläche vor als nach 10 h oder 24 h. Zwischen 1 h und 10 ist eine Abnahme um 184,2 % zu beobachten, von 10 h auf 24 h findet eine Erhöhung um 7,0 % statt. Zwischen

Fläche internalisierter Pt-Partikel Zeitserie 2

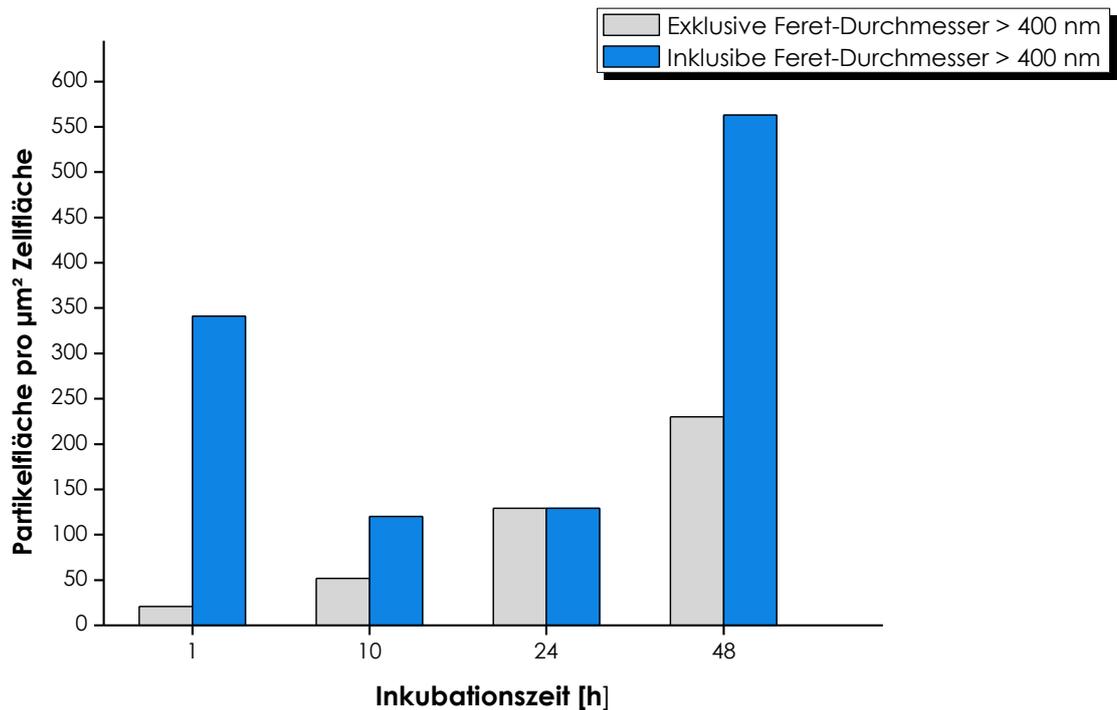


Abbildung 4.16 Graphische Darstellung der Partikelfläche pro μm^2 Zellfläche in HT29- Zellen nach Inkubation mit Pt-NP < 20 nm ($50\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 37°C , 10 % FKS-haltiges DMEM, $0,5 \times 10^6$ Zellen) für unterschiedliche Inkubationszeiten. Auswertung inklusive und exklusive Partikeln mit Durchmessern > 400 nm. Daten erstellt von der Gruppe von Prof. Gerthsen, am Labroatorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

24 h und 48 h findet eine Zunahme der interzellulären Partikelfläche um 77,1 % pro Zellfläche statt.

Die Abnahme der Fläche der internalisierten Partikel zwischen der 1- und der 10-stündigen Exposition war durch die Aufnahme eines hohen Anteils an Partikeln mit Feret-Durchmessern von > 400 nm nach 1 h begründet. In Abbildung 4.17 sind die Verteilungen der Feret-Durchmesser für die vier Expositionszeiten graphisch veranschaulicht. Feret-Durchmesser von 20 nm, 40 nm und 60 nm werden zu allen vier Expositionsdauern am häufigsten gemessen. Der Anteil an > 400 nm-Partikeln ist für die Inkubationszeiten 24 h und 48 h gering (0 % nach 24 h und 1,9 % nach 48 h), für die 1- und 10-stündigen Expositionen beträgt dieser jedoch 12,8 % bzw. 4,0 %. Durch den verhältnismäßig höheren

Verteilung der Feret-Durchmesser Zeitserie 2

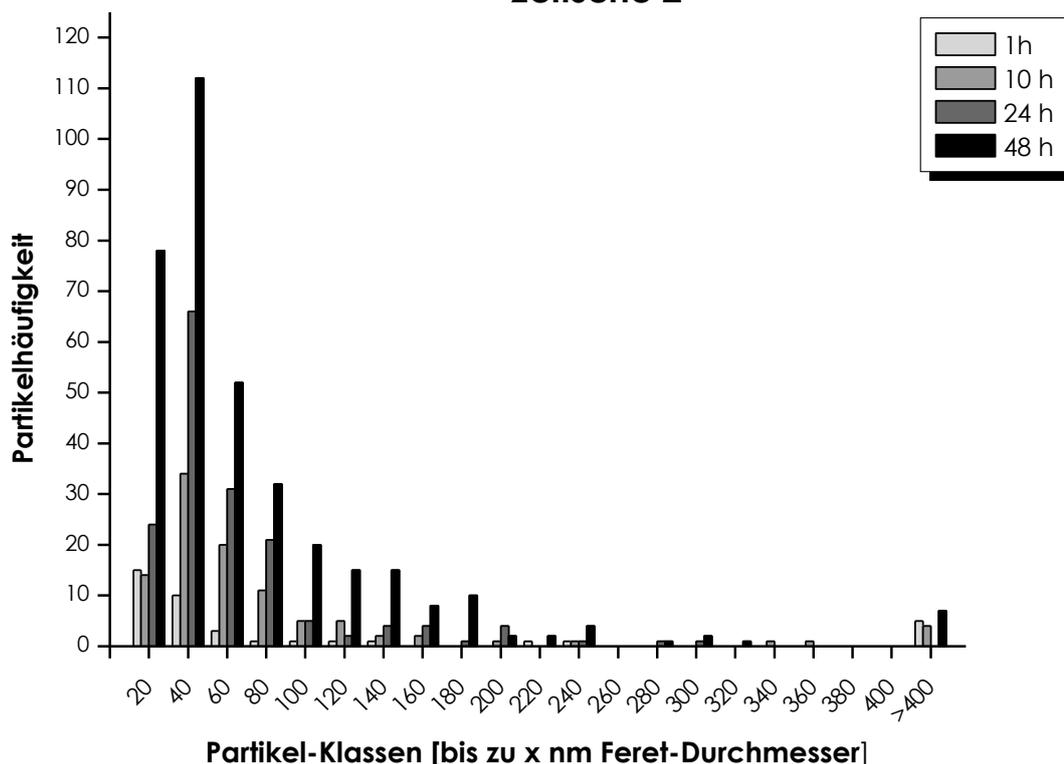


Abbildung 4.17 Verteilung der Feret-Durchmesser von Pt-NP < 20 nm in HT29-Zellen (50 µg/cm², 10 % FKS-haltiges DMEM, 37 °C, 0,5 × 10⁶ Zellen). Inkubationszeiten betragen 1 h, 10 h, 24 h und 48 h. Daten erstellt von MitarbeiterInnen der AG Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

Anteil dieser großen Pt-Partikel an der Gesamtmenge der aufgenommenen Partikel kommt es zu der in (graue Balken) ersichtlichen Abnahme der Fläche des interzellulären Platins zwischen 1 h und 10 h bzw. des nur sehr leichten Anstiegs (um 7,2 % pro Zellfläche) zwischen 10 h und 24 h. Werden die Partikel mit Feret-Durchmessern > 400 nm ausgeschlossen, ergibt sich der in Abbildung 4.16 ersichtliche Verlauf, wonach eine Zunahme der interzellulären Partikelfläche mit der Zeit zu sehen ist (hellgraue Balken). Die Fläche der Partikel nimmt von 1 h auf 10 h um 60,6 % pro Zellfläche zu, zwischen 10 h und 24 h Exposition erfolgte eine weitere Zunahme um 58,6 %. Zuletzt stieg die innerzellulärer Partikelfläche um 29,7 %, zwischen 24 h und 48 h.

► Vergleich zwischen Zeitserie 1 und Zeitserie 2

Der Vergleich der elektronenmikroskopischen Daten aus den beiden Zeitversuchen zeigte, dass Pt-NP < 20 nm nach Inkubation in den Konzentrationen 20 µg/cm² (Zeitserie 1) und

50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Zeitserie 2) innerhalb eines Zeitraumes von 1 h bis 48 h von HT29-Zellen nicht in den Zellkern oder die Mitochondrien aufgenommen wurden. Die NP wurden sowohl in Vesikeln (vermutlich Endosome) als auch im Zytoplasma lokalisiert. Die Zahl der aufgenommenen Pt-Partikel nahm mit steigender Expositionsdauer zu. Ebenso war eine Konzentrationsabhängigkeit ersichtlich. Bei Inkubation mit 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ konnten nach 1 h nicht genügend interzelluläre Partikel gemessen werden, um eine statistische Auswertung zu bewerkstelligen, bei einer Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ war dies möglich. Nach 24 h wurden im Fall der Suspension mit 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ um 62 % weniger NP in den Zellen gemessen als für 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, nach 48 h betrug der Unterschied 47 %. Im Fall beider Partikeldichten war für die kürzeren Expositionszeiten (6 h für 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. 1 h und 10 h für 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) der Anteil von Pt-Partikeln mit Feret-Durchmessern > 400 nm so groß, dass die Relation zwischen steigender Partikelfläche mit zunehmender Inkubationszeit nicht gegeben war, obwohl die Zahl der internalisierten Partikel mit der Expositionsdauer stieg. Dies wurde berücksichtigt, indem die großen Partikel mit Feret-Durchmessern > 400 nm bei der Auswertung nicht miteinbezogen wurden, wodurch für beide Konzentrationen eine Zunahme der Fläche aufgenommener Pt-Partikel mit der Zeit ersichtlich war. HT29-Zellen nahmen bevorzugt Pt-NP mit Feret-Durchmessern < 100 nm auf, dies war gleichermaßen für beide Suspensionen festzustellen.

4.2.2. Untersuchung des zellulären Aufnahmemechanismus

In Abschnitt 2.5.8 wurden die endozytotischen Aufnahmemechanismen der Pinozytose erläutert, die für Partikel < 200 nm vermutlich den primären Aufnahmeweg darstellt. Im Rahmen der Endozytose werden die Partikel durch Einstülpung der Zellmembran internalisiert und liegen anschließend in Vesikeln vor. Laut mehreren Untersuchungen liegt die Größe nanostrukturierter Materialien, bei der diese mit maximaler Effizienz endozytotisch aufgenommen werden, in einer Größenordnung von 50 nm [Osaki *et al.*, 2004; Chithrani *et al.*, 2006].

Da es sich beim endozytotischen Prozess um einen aktiven Transport handelt, benötigt die Zelle Energie, um diesen zu bewerkstelligen. Der Zellmetabolismus diese stellt durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zur Verfügung. Das geschieht entweder durch direkte Wechselwirkung mit dem Transportprotein oder indirekt durch Antrieb des Natriumkanals bzw. Generierung einer elektrischen Potentialdifferenz. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit aktiver Prozesse wurde eine Untersuchung der Partikelinternalisierung bei 4 °C herangezogen, um Informationen über den Aufnahme-

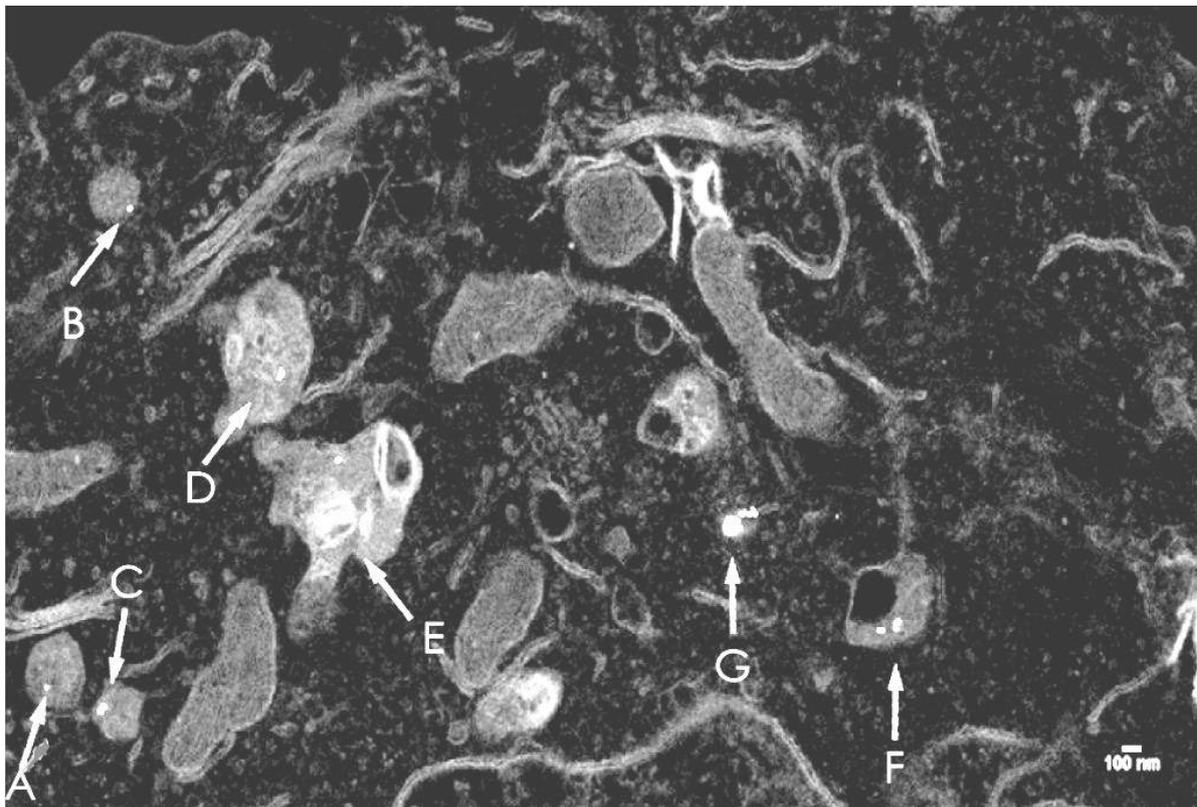


Abbildung 4.18 Hellfeld-Rastertransmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (BF-STEM – ‚Bright Field Scanning Electron Microscopy‘) einer HT29-Zelle nach 48-stündiger Inkubation mit Pt < 20 nm ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in 10 % FKS-haltigem DMEM, 37°C , 0 % CO_2). Die Pt-Partikel sind als helle Flecke im Zytosol in membranumschlossenen Vesikeln zu erkennen. In den Vesikeln liegen die NP vereinzelt (Pfeile A und B), sowie agglomeriert (Pfeile C, D, E und F) vor. Einige Pt-NP sind auch frei im Zytosol erkennbar (Pfeil G). Aufnahmen erstellt von MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe von Prof. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

mechanismus zu erhalten [Qiu, 2009]. Zu diesem Zweck wurden HT29-Zellen mit je $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ einer Suspension der Pt-NP < 20 nm bei 1 h und 4 h bei 4°C inkubiert. Als Referenz wurden Zellen bei 37°C für denselben Zeitraum denselben Substanzen exponiert. Um die CO_2 -Konzentration in der Atmosphäre von 0,039 % [US Environmental Protection Agency, 2011] zu berücksichtigen, der die 4°C -Proben ausgesetzt waren, wurde für den 37°C -Versuch ein CO_2 -Volumen von 0 % eingestellt.

In Abbildung 4.18 ist ein Ausschnitt einer HT29-Zelle nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C dargestellt. Anhand der Abbildung ist ersichtlich, dass, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Zeitserien, die Pt-NP in membranumschlossenen Vesikeln oder im Zytosol lokalisiert sind. Auch hier kommen die intervesikulären NP in vereinzelter (Pfeile A und B)

oder agglomerierter Form (Pfeile C, D, E und F) vor. Ein frei im Zytosol vorliegendes Agglomerat mit einem Durchmesser von ca. 100 nm ist ebenfalls zu sehen (Pfeil G).

Nach 1 h Inkubation konnten weder für 4 °C noch für 37 °C ausreichend Pt-NP interzellulär bestimmt werden, um eine statistische Auswertung durchführen zu können. Nach 4 h lag im Fall beider Temperaturen eine ausreichende Anzahl an Pt-NP, die von den Zellen aufgenommen wurden, vor. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst:

Tabelle 4.6 Anzahl und Fläche interzellulärer Pt-NP < 20 nm (20 µg/cm², 10 % FKS-haltiges DMEM, 0,5 × 10⁶ Zellen) in HT29-Zellen. Die Inkubationszeit betrug 4 h, die Versuche wurden bei 4 °C und bei 37 °C durchgeführt. Daten ermittelt von MitarbeiterInnen der Gruppe von Prof. D. Gerthsen, am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Karlsruher Instituts für Technologie.

Temperatur	4 °C	37 °C
Anzahl Pt-NP/µm ²	0,0005	0,0312
Fläche Pt-NP/µm ² [nm ²]	0,3	27

Nach 4-stündiger Inkubation bei 4 °C mit der Pt-NP-Suspension mit einer Partikeldichte von 20 µg/cm² wurden 2 Partikel gemessen, was 0,0005 Partikeln pro Zellfläche entspricht. Wurde die Inkubation mit der Suspension derselben Konzentration bei 37 °C durchgeführt, lag die interzellulär bestimmte NP-Menge bei 32 Stück (0,0312 NP pro Zellfläche), das 16-fache der aufgenommenen Partikelanzahl bei 4 °C.

Bei Betrachtung der Flächen der internalisierten Pt-Partikel zeigte sich, dass die nach 4 h bei 4 °C aufgenommenen Pt-Partikel eine um 98,9 % geringere Partikelfläche pro Zellfläche als bei 37 °C betragen. Die 2 internalisierten Pt-NP im Fall der 4 °C-Inkubation hatten Feret-Durchmesser von 40 nm. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Feret-Durchmesser-Verteilung im Zuge der Zeitversuche wiesen die internalisierten Partikel mehrheitlich Feret-Durchmesser < 100 nm auf (20 nm, 40 nm und 60 nm).

Die geringe Zahl der interzellulären Pt-NP im Fall der 4-stündigen Inkubation bei 4 °C, verglichen mit jener bei 37 °C, lässt den Rückschluss zu, dass die Aufnahme der NP in die Zelle durch einen aktiven Transport stattfindet. Bei einer Inkubation bei 4 °C wurden nach einer Inkubationszeit von 4 h lediglich 2 Pt-NP innerhalb einer Zellfläche von 3,9 mm² gefunden. Wurde die Inkubation bei 37 °C durchgeführt, ergab die gemessene Zahl 32 Stück in 1,03 mm² Zellfläche.

4.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aufnahme der Pt - NP

Pt-NP der Präparation Pt-NP < 20 nm lagen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Internalisierung in HT29-Zellen in membranumschlossenen Vesikeln, einzeln bzw. in Agglomeraten, oder frei im Zytosol vor. Im Zellkern oder den Mitochondrien konnten keine Partikel nachgewiesen werden. Pt-NP mit Feret-Durchmessern < 100 nm wurden bevorzugt aufgenommen. Die Anzahl der von den Zellen aufgenommenen Pt-NP ist konzentrationsabhängig, bei höherer Partikeldichte der Suspension stieg auch der Gehalt interzellulär vorliegender Pt-Partikel. Weiters wurde ein zeitabhängiger Aufnahmeverlauf festgestellt, die Zahl der Pt-NP innerhalb der Zellen nahm mit steigender Inkubationszeit zu.

Die Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus nanopartikulären Platins ergaben, dass bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C kaum Partikel innerhalb der Zellen vorlagen, bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C hingegen lagen um 98,9 % mehr Pt-NP innerzellulär vor. Eine Temperatur von 4 °C inhibiert einen aktiven Aufnahmemechanismus der Zellen, die geringe Anzahl internalisierten nanopartikulären Platins nach Niedrig-Temperatur-Inkubation ließ demnach auf einen aktiven Aufnahmemechanismus schließen. Für Nanomaterialien sind die pinozytotischen Prozesse Clathrin-vermittelte Endozytose, Calveolin-vermittelte Endozytose und Clathrin- und Calveolin-unabhängige Endozytose die wichtigsten Aufnahmerouten [Conner *et al.*, 2003]. Da im Rahmen der Zeitserien bei den kürzeren Expositionen (1 h, 6 h und 10 h) mit sinkender Inkubationszeit die vermehrte Aufnahme von Partikeln mit Feret-Durchmessern > 400 nm nachgewiesen werden konnte, wird neben endozytotischen Prozessen auch ein phagozytotischer Aufnahmemechanismus vermutet.

Literaturvergleiche zeigten, dass Caco-2-Zellen, eine Kolorektalkarzinomzelllinie, Polystyrol-Partikel mit Durchmessern von 50 nm bis 1 µm aufnehmen, die maximale Aufnahmegeschwindigkeit lag für die NP mit 100 nm Durchmessern vor [Yin Win *et al.*, 2005]. Dies deckte sich nicht mit den Ergebnissen aus den Versuchen dieser Arbeit, da die HT29-Zellen am häufigsten Pt-Partikel mit Feret-Durchmessern zwischen 20 nm und 60 nm internalisierten. In der Untersuchung von Wi *et al.* 2005 wurden ebenfalls Partikel mit Durchmessern > 400 nm innerhalb der Zellen gefunden, was sich mit den Pt-Partikel > 400 nm deckte, die in den HT29-Zellen gemessen wurden. Auch Wi *et al.* legten für diese Partikel einen phagozytotischen Aufnahmemechanismus zugrunde. Desai *et al.* untersuchten 1997 das Aufnahmeverhalten der Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 bei

Inkubation mit nano- und mikroskaligen Poly-Milchsäure-Poly-Glycolsäure Co-Polymer-Partikeln. Partikel mit Durchmessern von 0,1 und 1 μm wurden innerhalb der Zellen ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert, zum Großteil in Endosomen. Mikropartikel eines Durchmessers von 10 μm wurden weniger effektiv aufgenommen und lagen zu einem Großteil an die Zelloberfläche adsorbiert vor. Die Aufnahme nahm in den Caco-2-Zellen ebenfalls bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C ab [Desai *et al.*, 1997]. Wi *et al.* 2005 nahmen hingegen für Partikel mit Durchmessern bis 100 nm - 200 nm endozytotische Prozesse als Verantwortlich für die Internalisierung an. Im Fall endozytotischer Aufnahmemechanismen handelt es sich bei den beobachteten Vesikeln um Endosome, die im Laufe der Endozytose durch Einstülpung der Zellmembran und Internalisierung der jeweiligen Substanzen in derselben gebildet werden. In Endosomen herrscht ein niedriger pH (pH = 6 in frühen, pH = 5 in späten Endosomen) und eine schwache saure Hydrolase-Aktivität [Schultz, 1996].

In Zusammenhang mit den Versuchen bei 4 °C stellte sich das theoretische Problem, inwieweit die Temperatur das Sedimentationsprofil der Partikel in den Suspensionen beeinflussen könnte, bedingt durch veränderte Diffusionsprozesse, da das Inkubationsmedium bei dieser Temperatur eine höhere Viskosität aufweist als bei 37 °C. Laut Teegarden *et al.* wird die Kinetik in Suspension befindlicher Partikel < 100 nm von drei Faktoren beeinflusst: der Diffusionsgeschwindigkeit, der gravitationsbedingten Sedimentation und der Agglomeration. Erstere beide würden nach einer Berechnung von Teegarden *et al.* für den Fall eines NP mit einem Durchmesser von 10 nm einen erheblichen Zeitraum bedingen. Bei 25 °C benötigt ein solcher NP demnach für das Zurücklegen einer Strecke von einem Zentimeter im Zellkulturmedium rein durch Diffusionsprozesse $1,7 \times 10^4$ Minuten, was 59 Tagen entspräche. Die durch die Gravitation verursachte Sedimentationsrate beträgt für einen Au-NP mit demselben Durchmesser für eine Wegstrecke von einem Zentimeter theoretisch $1,5 \times 10^5$ Minuten, was 104 Tagen entspräche [Teegarden *et al.*, 2006]. Laut eigenen Berechnungen beträgt die Füllhöhe bei den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Versuchen in einer 12-Transwellplatte bei einem Volumen von 1,5 ml pro Vertiefung 0,32 cm bzw. 0,23 cm im Falle einer 6-Transwellplatte mit einem Volumen von 0,262 μl . Den Berechnungen von Teegarden *et al.* folgend, müsste ein 10 nm Pt-NP, um Wegstrecken dieser Dimensionen zurückzulegen und die Zellen erreichen zu können, eine wochenlange Inkubation voraussetzen, wobei die erhöhte Viskosität des Mediums bei 4 °C noch nicht berücksichtigt wäre. Um diese Vermutungen zu entkräften, wurde die optische Beobachtung angestellt, dass sowohl im Fall der 37 °C-,

als auch für die 4 °C-Inkubationen bereits bei der kürzesten Inkubationszeit von 1 h am Boden der Transwelleinsätze graue, von den Pt-NP herrührende Schleier beobachtet wurden. Diese Beobachtungen trafen in beiden Transwellsystemen auf sämtliche Temperatur- und Zeitexperimente zu. Daher ist davon auszugehen, dass die verminderte interzelluläre Partikelzahl bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C auf die inhibierte Internalisierung durch die Zellen zurückzuführen ist und nicht auf die Beeinflussung des Sedimentationsverhaltens der NP durch physikalische Effekte.

4.3. Zytotoxizität von Platin-Nanopartikeln

In vorangegangenen Arbeiten im Zuge der Dissertation von J. Pelka wurden die Pt-NP in einem Konzentrationsbereich von 0,0001 – 1000 ng/cm² hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften untersucht [Pelka *et al.*, 2009]. Da für die vorliegende Arbeit aufgrund der geringen Partikelanzahl für das Erstellen elektronenmikroskopischer Bilder höhere Partikelkonzentrationen nötig wurden, mussten diese ebenfalls auf mögliche Zytotoxizität untersucht werden. Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse von J. Pelka vorgestellt, anschließend die im Rahmen dieser Arbeit erstellten.

4.3.1. Bisherige Ergebnisse

Untersuchungen zur zellschädigenden Wirkung der Pt < 20 nm wurden bereits von J. Pelka im Zuge ihrer Dissertation durchgeführt [Pelka, 2010]. Dazu zählten drei Methoden, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der Zytotoxizität herangezogen wurden. Im Zuge des Sulforhodamin B (SRB)-Test wird die Beeinflussung des Zellwachstums nach Behandlung mit der Probesubstanz bestimmt. Der Lactatdehydrogenase (LDH)-Test liefert ein Maß für die Membranintegrität der inkubierten Zellen. Mit Hilfe des WST (‘Watersoluble Tetrazolium’)-Tests wird die mitochondriale Aktivität ermittelt. Alle drei Versuche ergaben für die von Pelka verwendeten Partikelkonzentrationen keine zytotoxischen Schädigungen der HT29-Zellen.

Der von J. Pelka eingesetzte Konzentrationsbereich der Pt < 20 nm von 0,0001 ng/cm² – 1000 ng/cm² erwies sich als zu gering, um interzellulär ausreichend nanopartikuläres Pt mit Hilfe elektronenmikroskopischer Messungen bestimmen zu können. Daher wurden die Partikeldichten für diese Arbeit erhöht, auf 20 µg/cm² und 50 µg/cm². Da diese neu gewählten Konzentrationen die Maximalkonzentrationen in den vorangegangenen

Zytotoxizitätsmessungen um das 20- bzw. 50-fache überschreiten, wurden diese mit den neuen Partikeldichten ergänzt.

4.3.2. Untersuchung des Zellwachstums

Der Sulforhodamin B (SRB) - Test ist eine kolorimetrische Methode zur Messung der Beeinflussung des Zellwachstums durch die jeweilige Testsubstanz. Der Versuch beruht auf der Anfärbung von Lebendproteinen in Zellkulturen mit dem Farbstoff Sulforhodamin B (2-(3-Diethylamino-6-diethylazaniumyliden-Xanthen-9-yl)-5-Sulfo-Benzensulfonat). Der Farbstoff bindet bei dem richtigen pH an basische Aminosäuren und kann photometrisch quantifiziert werden. Das Absorptionsmaximum liegt bei 565 nm. Der SRB-Test wurde mit Pt-NP < 20 nm in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für 24 h, 48 h und 72 h in 96-Lochplatten ($A = 0,32 \text{ cm}^2$) durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde β -CD in der höchsten Pt-NP-Konzentration sowie Medium mitgeführt, Cisplatin (10 μM) diente als Positivkontrolle.

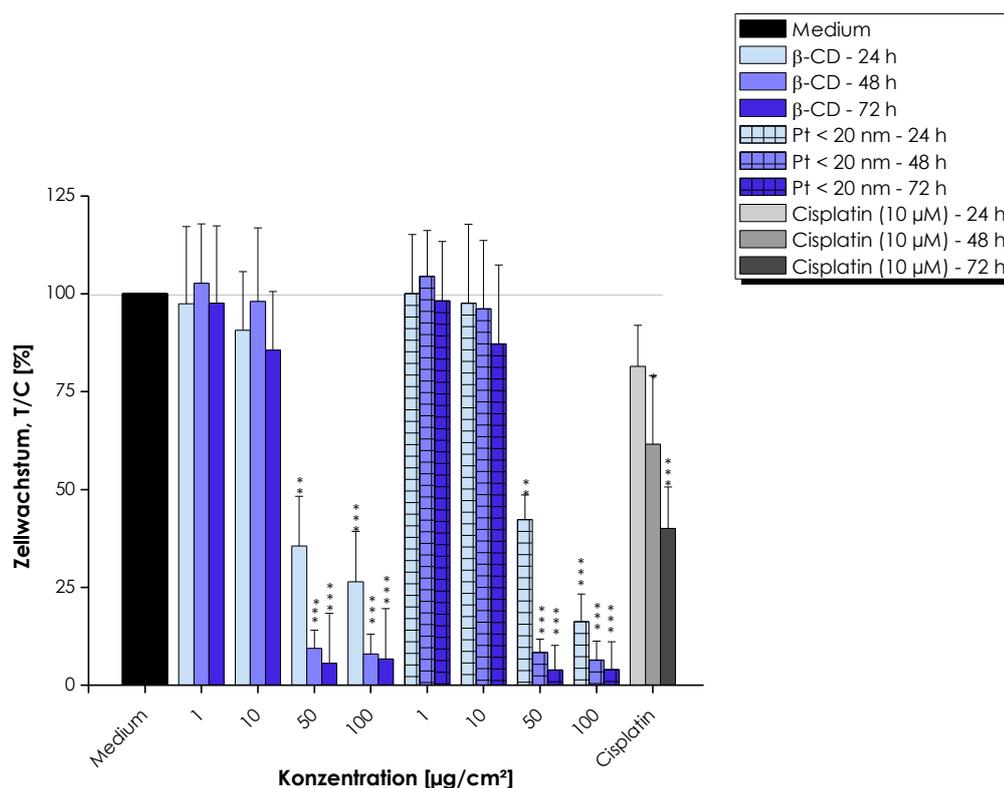


Abbildung 4.19

Einfluss von Pt-NP < 20 nm auf das Wachstum von HT29-Zellen nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition (37 °C, 10 % FKS-haltiges DMEM), bestimmt mittels SRB-Test. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. drei unabhängigen Versuchen in einer Vielfachbestimmung nach Ausreißertest (Nalimov) im Vergleich zur Mediumskontrolle (Wachstum = 100 %). Cisplatin (10 μM , 3 mg/l) wurde als Positivkontrolle verwendet. Signifikanzen wurden mittels t-test errechnet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

In Abbildung 4.19 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse des SRB-Tests ersichtlich. Das Wachstum der HT29-Zellen bei Inkubation mit 10 % FKS-haltigem Medium wurde als Control gewählt ($\hat{=}$ 100 %), als Positivkontrolle der wachstumshemmenden Wirkung wurde Cisplatin (3 mg/l bzw. 10 μ M) verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die zugehörige Standardabweichung (SD – ‚Standard Deviation‘).

In den Konzentrationen 1 μ g/cm² ($\hat{=}$ 13,3 mg Pt/l bzw. 0,07 mM und 175,4 mg β -CD/l bzw. 0,15 mM) und 10 μ g/cm² ($\hat{=}$ 133,3 mg Pt/l bzw. 0,7 M und 1,8 mg β -CD/l bzw. 1,5m M) zeigen sowohl Pt-NP < 20 nm als auch β -CD wenig Einfluss auf die Wachstumsrate. Im Fall von 1 μ g/cm² sinkt die Proliferation durch keine der beiden Substanzen auf unter 97 %. Eine Konzentration von 10 μ g/cm² führte im Fall der Pt-NP-Exposition nach 72 h zu einem verminderten Wachstum von 87,2 %, 10 μ g/cm² von β -CD haben 87,2 % Zellwachstum zur Folge. Die Positivkontrolle Cisplatin senkte die Proliferation der HT29-Zellen nach 24 h Exposition auf 81,4 %, nach 48 h auf 61,5 % und nach einer Inkubationsdauer von 72 h auf 40,1 %. Sowohl β -CD als auch Pt-NP < 20 nm wirkten sich in den Konzentrationen 50 μ g/cm² und 100 μ g/cm² vergleichbar bzw. stärker vermindern auf die Proliferation der Zellen aus. Pt-NP < 20 nm hat mit einer Partikeldichte von 50 μ g/cm² ($\hat{=}$ 0,7 g/l bzw. 3,4 mM) für 24 h bereits ein vermindertes Zellwachstum von 42,4 % zur Folge, dieses lag 1,3 % über der maximal wachstumshemmenden Wirkung von Cisplatin (40,1 % nach 72 h). β -CD mit derselben Konzentration von 50 μ g/cm² ($\hat{=}$ 8,8 g/l bzw. 7,7 mM) weist nach 24 h ein Zellwachstum von 35,5 % auf, dieses liegt 4,6 % unter jenem durch Cisplatin nach 72 h. 100 μ g/cm² der Pt-NP < 20 nm-Suspension ($\hat{=}$ 1,3 g/l bzw. 6,8 mM) reduzieren die Proliferation nach 24 h auf 16,3 %, nach 48 h auf 6,5 % und nach 72 h Exposition auf 4,0 %. Eine Inkubation mit 100 μ g/cm² des β -CD ($\hat{=}$ 17,5 g/l bzw. 15,4 mM) hatte eine ähnliche Wachstumsminderung zur Folge, die Proliferation wurde nach 24 h auf 26,4 %, nach 48 h auf 7,9 % und nach 72 h auf 6,7 % gesenkt.

Aufgrund der durch β -CD und Pt-NP < 20 nm in denselben Konzentrationen ähnlich verminderten zellulären Wachstumsraten wurde angenommen, dass β -CD, das in den Pt-NP < 20 nm-Proben in beinahe denselben Konzentrationen vorkommt, wie im Fall der reinen β -CD-Lösungen, verantwortlich ist. β -CD erwies sich in den Konzentrationen 50

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für alle drei Inkubationszeiten als vergleichbar bzw. stärker proliferationshemmend als die Positivkontrolle Cisplatin. Selbiges galt für Pt-NP < 20 nm.

Vermutlich schädigte β -CD die Zellen in hohen Konzentrationen aufgrund der Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts in der Zellumgebung und beeinflusste so deren Osmoregulation [Zannou *et al.*, 2001]. Die Poligosaccharid-Moleküle erhöhen die Polarität des Mediums, was einen erhöhten osmotischen Druck zur Folge hat, die Zellen wechseln vom isoosmotischen in den hyperosmotischen Zustand. Um dies auszugleichen sind die Zellen gezwungen, H_2O ausströmen zu lassen. Der osmotische Stress kann zur Unterdrückung des Wachstums und zu Apoptose führen [Shen, 2008]. Z. B. hat eine Exposition mit 100 mM (18,22 g/l) des Zuckeralkohols Mannitol in HT29 nach 4 h zur Exprimierung des Nuklearfaktors κB (NF- κB), der eine Rolle in der Zellproliferation spielt, begleitet von einem Schrumpfen der Zellen [Nemeth *et al.*, 2002]. Da es sich bei β -CD um eine Verbindung handelt, die aus sieben glykosidisch verknüpften Glucose-Einheiten aufgebaut ist, die deren polare Hydroxygruppen an der Oberfläche trägt, könnte eine zu hohe Konzentration des Stoffes den Eintritt eines hyperosmolaren Schädigungsmechanismus zur Folge haben.

Um festzustellen, wo die Grenze lag, ab der die Konzentration des Trägersubstrats β -CD eine Hemmung des Zellwachstums zur Folge hatte, wurde eine orientierende Messung ($n = 1$) durchgeführt. Um Synergieeffekte zwischen der Wachstumshemmung des β -CD und der Inkubationstemperatur von $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Zuge der Versuche zur Art des Aufnahmemechanismus zu untersuchen (siehe Abschnitt 4.2.2), wurde die orientierende Messung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die ermittelte Konzentration sollte auch für $37 \text{ }^\circ\text{C}$ – Versuche herangezogen werden. Die Konzentrationen $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ β -CD wurden dabei in HT29 mit dem SRB-Test untersucht. Als Inkubationszeiten wurden 1 h und 4 h gewählt, entsprechend jener Dauer, der die Zellen bei der Erstellung der elektronenmikroskopischen Proben ausgesetzt sind.

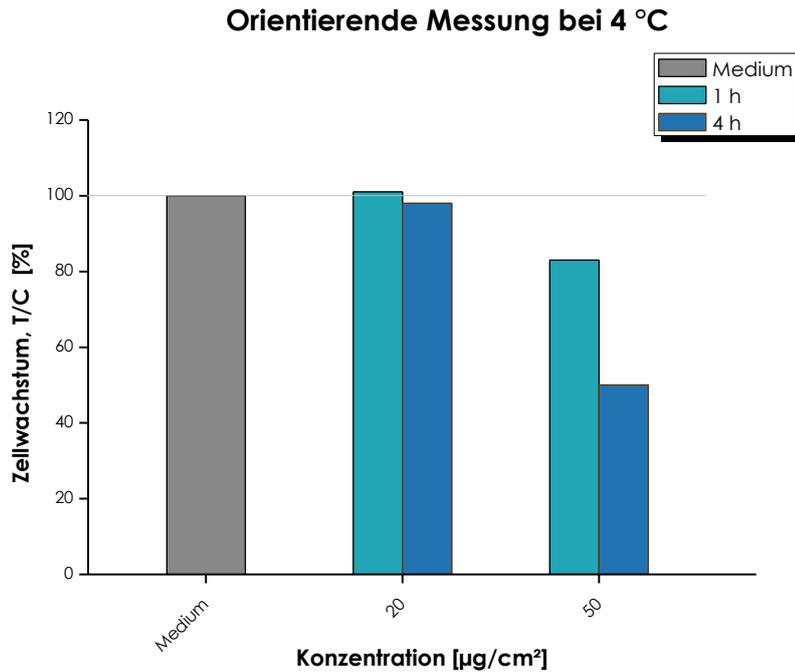


Abbildung 4.20

Orientierende Messung (n=1). Einfluss von β -CD auf das Wachstum von HT29-Zellen nach 1- und 4-stündiger Inkubation (4 °C, 10 % FKS-haltiges DMEM), bestimmt mittels SRB-Test. Dargestellt ist das Ergebnis eines Versuchs in Relation zur Mediumskontrolle (Wachstum = 100 %).

Wie in Abbildung 4.20 ersichtlich erwies sich die Konzentration 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ des β -CD bei 4 °C für HT29-Zellen tolerierbar, sowohl nach 1 h als auch nach 4 h Inkubation. Sind die Zellen 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ des Trägersubstrats ausgesetzt, ist die Proliferationsrate nach 1 h bei 4 °C bei 83 %, nach 4 h sinkt sie jedoch auf 50 % ab. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde für die weiteren elektronenmikroskopischen Versuche eine Pt-NP < 20 nm Partikeldichte von 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ gewählt.

4.3.3. Beeinflussung der Membranintegrität

Da die Ergebnisse des SRB-Tests ergaben, dass β -CD in den Konzentrationen 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ wachstumshemmend in HT29-Zellen wirkte, wurde untersucht, ob dies durch einen zytotoxischen Mechanismus begründet war. Dies wurde u. a. mittels LDH-Test durchgeführt. LDH ist eine Oxidoreduktase, die im Zytosol vorkommt und für die Redoxreaktion von Pyruvat zu Lactat bzw. vice versa verantwortlich ist. Formazan, ein wasserlöslicher rötlicher Farbstoff, kann photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 500 nm gemessen werden. Die Zunahme der Intensität des Farbstoffs bzw. des

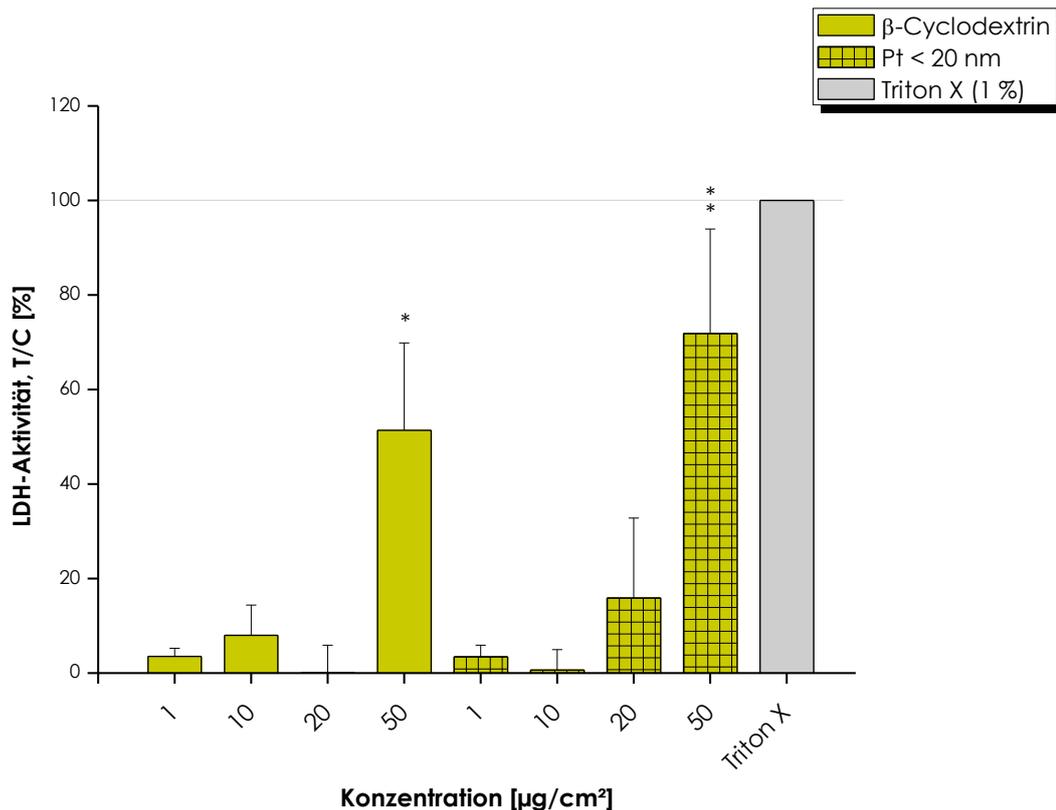


Abbildung 4.21

Einfluss von Pt-NP < 20 nm und β -Cyclodextrin auf die Integrität der Zellmembran in HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation, bestimmt mittels LDH-Test (37 °C, 10 % FKS-haltiges DMEM). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von 2-3 unabhängigen Versuchen in einer Sechsfachbestimmung nach Ausreißerbereinigung (Nalimov) in Relation zur Positivkontrolle Triton X (1 %, LDH-Aktivität = 100 %). Signifikanzen wurden mittels t-test errechnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

gebildeten Farbstoffs ist proportional zur LDH-Konzentration [Roche, 2011]. Diese ist umso höher, je permeabler die Zellmembran, da dadurch der Gehalt an LDH im Mediumsüberstand zunimmt. Triton X-100⁴, ein nichtionisches Detergenz, das zu einer Permeabilisierung der Zellmembran führt, wurde als Positiv-, Zellkulturmedium (10 % FKS-haltiges DMEM) als Negativkontrolle genommen.

In Abbildung 4.21 sind die Ergebnisse des LDH-Assay graphisch dargestellt. Die Extinktionswerte sind in Relation zur Positivkontrolle Triton X (1 %) gesetzt, das einer LDH-Aktivität von 100 % entspricht, Medium stellt eine Aktivität des Enzyms von 0 % dar.

⁴ 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-Polyethylen Glycol

Die LDH-Aktivität in HT29-Zellen beträgt nach Inkubation mit β -CD in den Konzentrationen $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 4,2 %, 2,5 % und 1,0 %. Bei Exposition mit Pt-NP < 20 nm der Konzentrationen $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ liegt die Aktivität des Enzyms bei 3,6 % bzw. 0,9 %. Demnach sind diese Dosen zu gering, um membranschädigend zu wirken. Pt-NP < 20 nm der Konzentration $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ steigert den LDH-Gehalt auf 15,9 %, die SD beträgt jedoch 16,9 %. Da der SRB-Test gezeigt hat, dass zellschädigende Effekte der Partikelpräparation auf die Trägersubstanz β -CD zurückgeführt werden konnten und der Wert für β -CD derselben Konzentration bei $0,1 \pm 5,8 \%$ lag, fällt vermutlich auch der durch Pt-NP < 20 nm verursachte LDH-Gehalt geringer aus. Bei Inkubation mit $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ von β -CD steigt die LDH-Aktivität auf $51,4 \pm 18,5 \%$, nach Exposition mit Pt-NP < 20 nm in derselben Konzentration betrug die Aktivität $71,8 \pm 22,1 \%$ des Wertes, der durch die Negativkontrolle verursacht wurde.

Der LDH-Test ergab, dass der Konzentrations-Grenzwert für membranschädigende Effekte durch β -CD bzw. Pt-NP < 20 nm bei $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ liegt, da bei dieser Menge keine Membranschädigung eintritt. Eine Dosis von $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ beider Substanzen führt zu einem Anstieg der LDH-Aktivität über 50 % und weist somit zytotoxische Schädigungsmechanismen auf.

4.3.4. Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität

Der WST-Test ist eine kolorimetrische Methode, die unter anderem der Erfassung der Zytotoxizität einer Substanz im *in vitro* Zellkulturmodell dient. Der Farbstoff, das farblose WST-1⁵, wird bei intakter Atmungskette durch die daran beteiligten mitochondrialen Enzyme lebender Zellen zu Formazan reduziert, das photometrisch gemessen wird.

In Abbildung 4.22 ist eine graphische Darstellung der mitochondrialen Aktivität gegen die Konzentration der jeweiligen Inkubationsmedien aufgetragen. Medium (10 % FKS-haltiges DMEM) diente als Negativkontrolle und wurde auf eine Mitochondrienaktivität von 100 % normiert. Wie ersichtlich betragen sämtliche mitochondrialen Aktivitäten der HT29-Zellen, unter Berücksichtigung der SDs, um die 100 %. Die Positivkontrolle Triton X (1 %) wirkt mit einer Enzymaktivität von $87,3 \pm 8,5 \%$ sehr schwach schädigend. Sowohl β -CD als auch Pt-NP < 20 nm haben in den Konzentrationen $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sowie $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

⁵ 2,3,5-Triphenyltetrazolimidchlorid

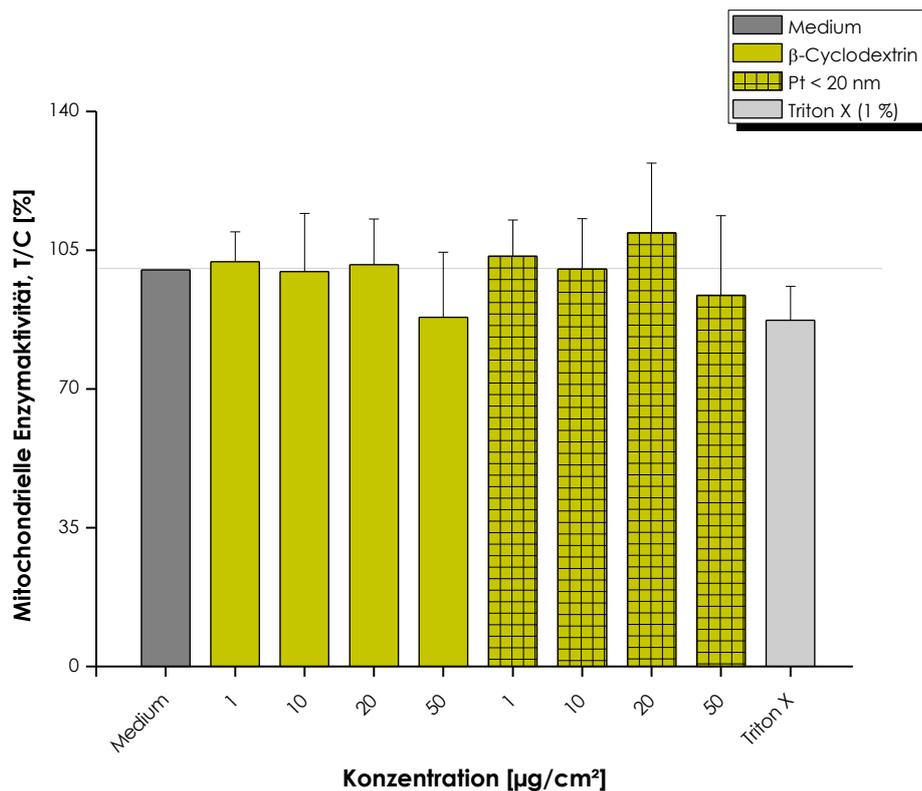


Abbildung 4.22

Bestimmung der mitochondrialen Enzymaktivität in HT29 mittels WST-1 Assay. Die Zellen wurden mit β -Cyclodextrin und Pt-NP (< 20 nm) in Konzentrationen zwischen 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ inkubiert, die Extinktionswerte wurden auf die Negativkontrolle Medium (\triangleq 100 %) bezogen, als Positivkontrolle diente Triton X (1 %), n=3-4. Die Signifikanzen wurden mittels t-test errechnet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

keine Senkung der Aktivität zur Folge, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des SRB-Tests (siehe Abschnitt 4.3.2) und des LDH-Tests (siehe Abschnitt 4.3.3) ist. Eine Inkubation mit Pt-NP < 20 nm der Partikeldichte 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ hatte eine mitochondriale Aktivität von $93,6 \pm 20,1$ % zur Folge, β -CD derselben Konzentration $88,1 \pm 16,4$ %.

Der WST-Assay lieferte keine mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen übereinstimmende Aussage bezüglich einer Senkung der mitochondrialen Aktivität durch β -CD bzw. Pt-NP < 20 nm. Ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zeigten sowohl der SRB als auch der LDH-Test zytotoxische Auswirkungen beider Substanzen. Da das verwendete WST-Reagenz bereits seit längerem in bereits gebrauchtem Zustand tiefgefroren gelagert wurde, könnte eine verminderte Aktivität der Grund für die Ergebnisse sein. Dafür spräche die geringe Auswirkung auf die mitochondriale Aktivität, die die Positivkontrolle Triton X hatte

4.4. Charakterisierung des genotoxischen Potentials

4.4.1. Comet Assay

Joanna Pelka untersuchte im Rahmen ihrer Dissertation die strangbrechende Wirkung der Pt <20 nm und der Pt > 100 nm in HT29-Zellen mit dem Comet Assay. Dieser wurde zwecks Ergänzung auch unter alkalischen Bedingungen mit Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG)-Behandlung durchgeführt, um oxidative DNA-Schäden oder sog. FPG-sensitive Stellen zu erfassen. Das Reperaturenzym FPG erkennt oxidierte Purine und überführt diese in DNA-Strangbrüche, die anschließend erfasst werden. Die Rate der Strangbrüche der DNA wurde mittels der prozentualen Schweifintensität ausgewertet. Die

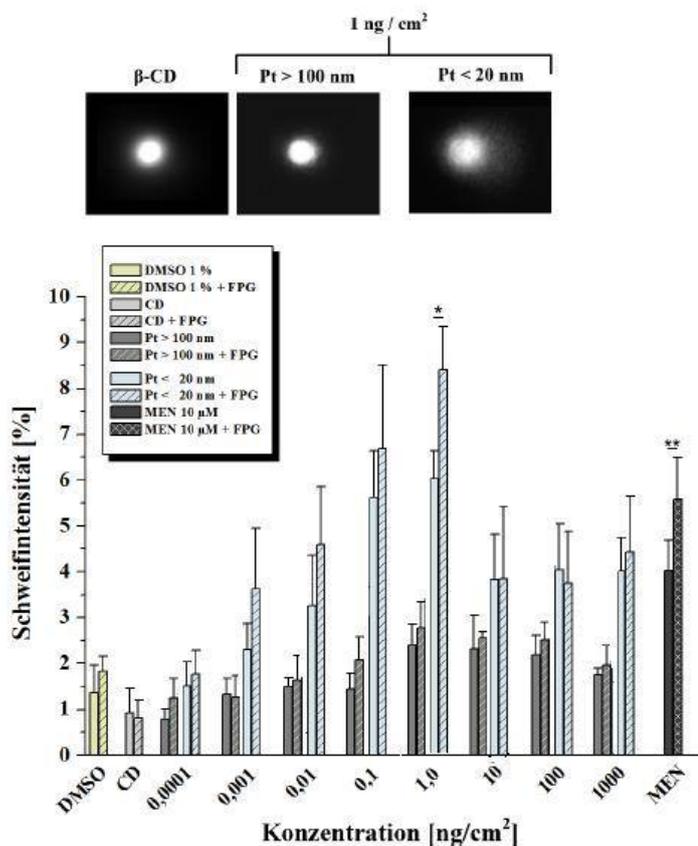


Abbildung 4.23

Strangbrechende Wirkung von Pt-NP zwei verschiedener Größen nach 24-stündiger Inkubation von HT29 mittels Comet Assay unter alkalischen Bedingungen. Oxidativ modifizierte Basen wurden durch Zugabe von Formamidopyrimidin-DNAglykosylase (FPG) bestimmt. Als Negativkontrollen dienen β-CD (CD) und 1 % DMSO, Positivkontrolle stellt der Redoxcyclus Menadion dar. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwert ± SD nach Ausreißerbereinigung (Nalimov) von mind. vier unabhängigen Versuchen [entnommen aus Pelka *et al.*, 2009].

Inkubationszeiten betragen 3 h und 24 h, als Positivkontrolle diente der Redoxcyclus Menadion (10 μM). Die Pt-NP der Präparationen Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,0001 ng/cm² – 10000 ng/cm² untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.23 dargestellt. Für Pt > 100 nm waren bei 3h Inkubation bei keiner der Konzentrationen signifikante Strangbrüche festzustellen, während Pt-NP < 20 nm nach 3 h bereits bei einer Konzentration von 0,001 ng/cm² zu einer signifikant höheren Schweifintensität als jene von β -CD führte. Der Verlauf der Strangbrüche war sowohl im Fall der Pt > 100 nm, als auch der Pt-NP < 20 nm glockenförmig, wobei diese für Letztere ausgeprägter verläuft, mit einem Maximum bei 1 ng/cm² (3,6 %).

Dieselbe Konzentrationsabhängigkeit trat für Pt > 100 nm auf, wenn diese 24 h inkubiert wurden, das Maximum lag auch hier bei 1 ng/cm². Die Schweifintensitäten waren bei allen Konzentrationen geringer als für Pt-NP < 20 nm und nur im Bereich zwischen 1 und 100 ng/cm² signifikant. Wird zu den Pt > 100 nm FPG hinzugefügt, das sensitiv auf oxidativ modifizierte Basen ist, kam es zu einer leichten Erhöhung der Schweifintensität, verglichen mit jenen der β -CD-Kontrolle und den FPG-freien Proben. Bei beiden Partikelproben kam es nur bei einer Partikeldichte von 1 ng/cm² zu einem signifikanten Unterschied zwischen FPG-freier Inkubation und Inkubation mit FPG, ansonst entsprachen die Schweifintensitäten ohne FPG ungefähr jenen mit Zugabe des Enzyms.

Die Ergebnisse aus der Untersuchung der DNA-Strangbrüche mittels klassischem Comet-Test und der Ergänzung desselben durch FPG-Behandlung ergaben zusammengefasst, dass für die NP der Pt > 100 nm und der Pt-NP < 20 nm eine Zunahme der strangbrechenden Wirkung in HT29-Zellen mit abnehmendem Durchmesser festzustellen war. Die Konzentrationsabhängigkeit verlief für beide Präparationen glockenförmig, mit einem Maximum bei 1,0 ng/cm². Da keine großen Unterschiede zwischen den Comet-Daten und den Daten mit Behandlung durch FPG bestanden, war davon auszugehen, dass die Brüche der DNA-Stränge nicht auf einen oxidativen Schädigungsmechanismus zurückzuführen waren.

4.4.2. Untersuchung der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

Mittels Comet Assay wurde nachgewiesen, dass Pt-NP der Präparation Pt-NP < 20 nm zu Induktion von DNA-Strangbrüchen in HT29-Zellen führten. Mittels Western Blot Analyse wurde untersucht, ob der Einzel- oder Doppelstrang betroffen war.

Die Induktion von DSB kann, wie in Abschnitt 2.5.11 erläutert, durch die Phosphorylierung des Histons H2AX nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung des Histons wurde mit Hilfe des Western Blot untersucht. In Analogie zum Comet-Assay wurde eine Expositionszeit der Zellen mit den Partikeln von 24 h gewählt. Um zu berücksichtigen, dass es sich bei der Phosphorylierung von H2AX als Antwort auf DSB um früheres Ereignis in der Signalkette handelt, wurden ergänzend die Expositionszeiten 3 h und 12 h gewählt. Als Negativkontrolle diente Kulturmedium (10 % FKS, DMEM, \triangleq 100%).

Als Positivkontrollen standen zwei mögliche Behandlungsmethoden zur Option. Einerseits das Zytostatikum Etoposid, andererseits Bestrahlung mit UV-B-Licht. In Abbildung 4.24 ist die durch die jeweilige Positivkontrolle induzierte Phosphorylierung von H2AX als T/C in % der Negativkontrolle Medium gegen die Konzentrationen bzw Bestrahlungsdauern aufgetragen. Etoposid hat in der schwächsten Konzentration von 50 μ M (\triangleq 29,4 mg/l) nach 3 h einen γ -H2AX-Konzentration von $334,2 \pm 112,5$ % zur Folge, nach 12 h $389,1 \pm 182,6$ % und nach 24 h 1201 ± 90 %. Nach Exposition mit Etoposid in einer Konzentration von 150 μ M (\triangleq 88,3 mg/l) werden nach einer Dauer von 3 h $723,8$ % des phosphorylierten Histons gemessen, was einer Erhöhung um das 2,2-Fachedes Wertes nach 3-stündiger Inkubation mit 50 μ M der Substanz entspricht. 12 h des 150 μ M Etoposid ergibt einen Gehalt an γ -H2AX von $1772,7 \pm 666,6$ %. Die 24-stündige Inkubation mit dem Reagenz führt schließlich zu einer beinahe gleich großen γ -H2AX-Konzentration ($3255,5 \pm 1213,0$ %) wie eine zweiminütige Bestrahlung mit UV-B-Licht und anschließender Mediumsinkubation (10 % FKS-haltiges DMEM) für 12 h ($3344,3 \pm 359,0$ %). 24-stündige Mediuminkubation im Anschluss an die UV-Behandlung ergibt beinahe eine Verdoppelung des γ -H2AX-Gehalts, auf $6060,8 \pm 589,4$ %. Die stärkste Phosphorylierung von H2AX wird durch fünfminütige UV-B-Bestrahlung mit anschließend 24-stündiger Mediumexposition ausgelöst - dies führte zu einer γ -H2AX-Konzentration von $14164 \pm 1048,0$ %. Da Etoposid in er Konzentration 50 μ M eine zuverlässige Positivkontrolle darstellte, wurde diese für die Platinexperimente gewählt. Die Zellen wurden dabei mit Pt-NP < 20 nm über einen Konzentrationsbereich von 0,1 ng/cm² -1000 ng/cm² (\triangleq 0,428 μ g/l - 4,28 mg/l bzw. 0,002 μ m – 0,02 mM) inkubiert. Als Negativkontrolle diente Zellkulturmedium (10 % FKS-haltiges DMEM) und β -CD entsprechend der höchsten NP-Konzentration. Als Positivkontrolle wurde das Zytostatikum Etoposid (50 μ M) eingesetzt.

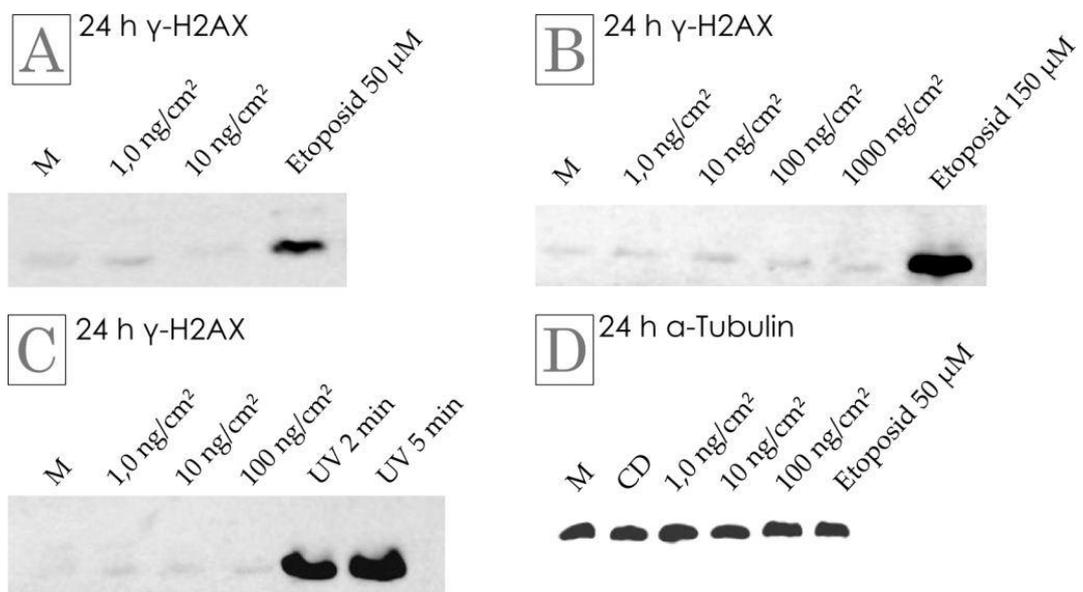
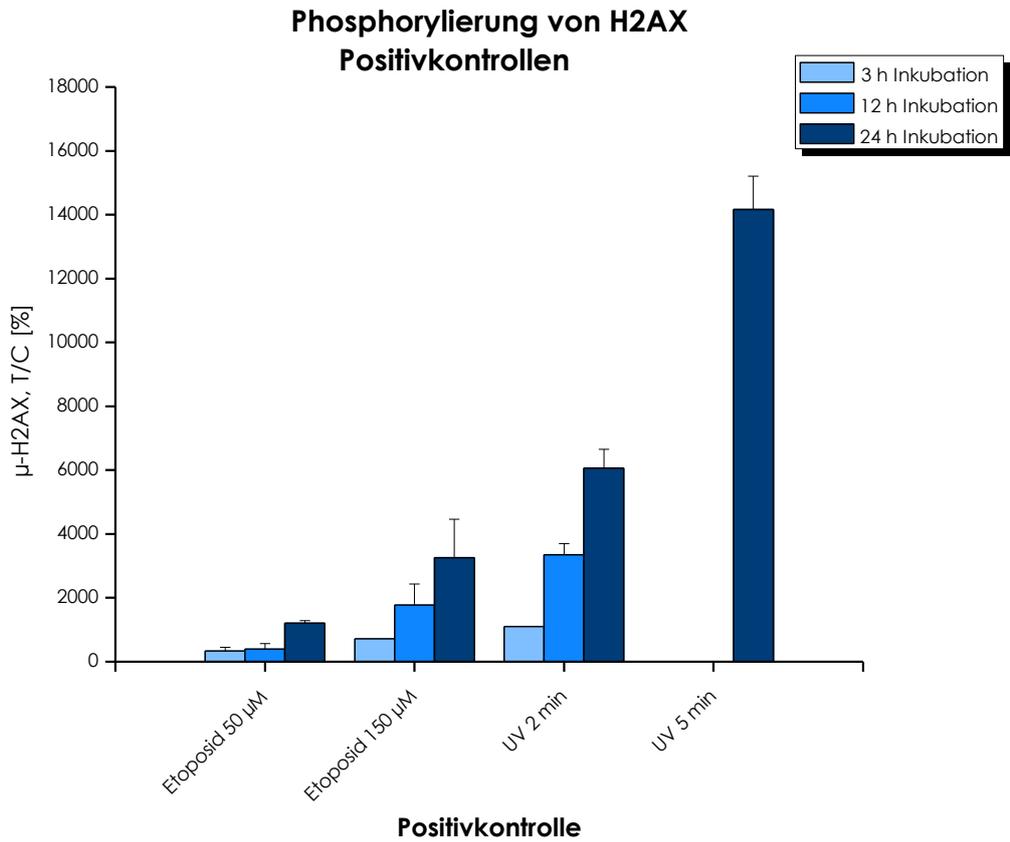


Abbildung 4.24

Verwendete Positivkontrollen in HT29-Zellen im Western Blot und ihre Fähigkeit zur Induktion von DSB, ausgedrückt anhand der Menge von γ -H2AX. Inkubationszeiten betragen 3 h, 12 h und 24 h. Neben Etoposid mit der Konzentration 50 μM wurde das Zytostatikum in der Konzentration 150 μM , sowie UV-B Strahlung für 2 Minuten und für 5 Minuten verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD bzw. Einzelwerte bezogen auf die Negativkontrolle (10 % FKS-haltiges DMEM). Die zugehörigen Western Blot Membranen sind nach je 24 h Inkubation für **A)** 24 h Etoposid 50 μM **B)** Etoposid 150 μM , **C)** UV 2 min und UV 5 min und **D)** α -Tubulin dargestellt. n = 1-5

Phosphorylierung von H2AX Pt < 20 nm

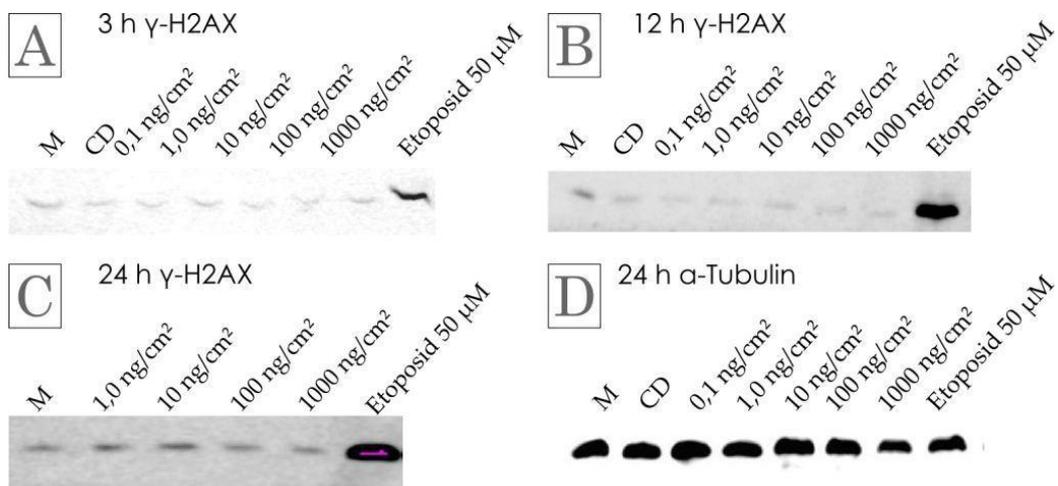
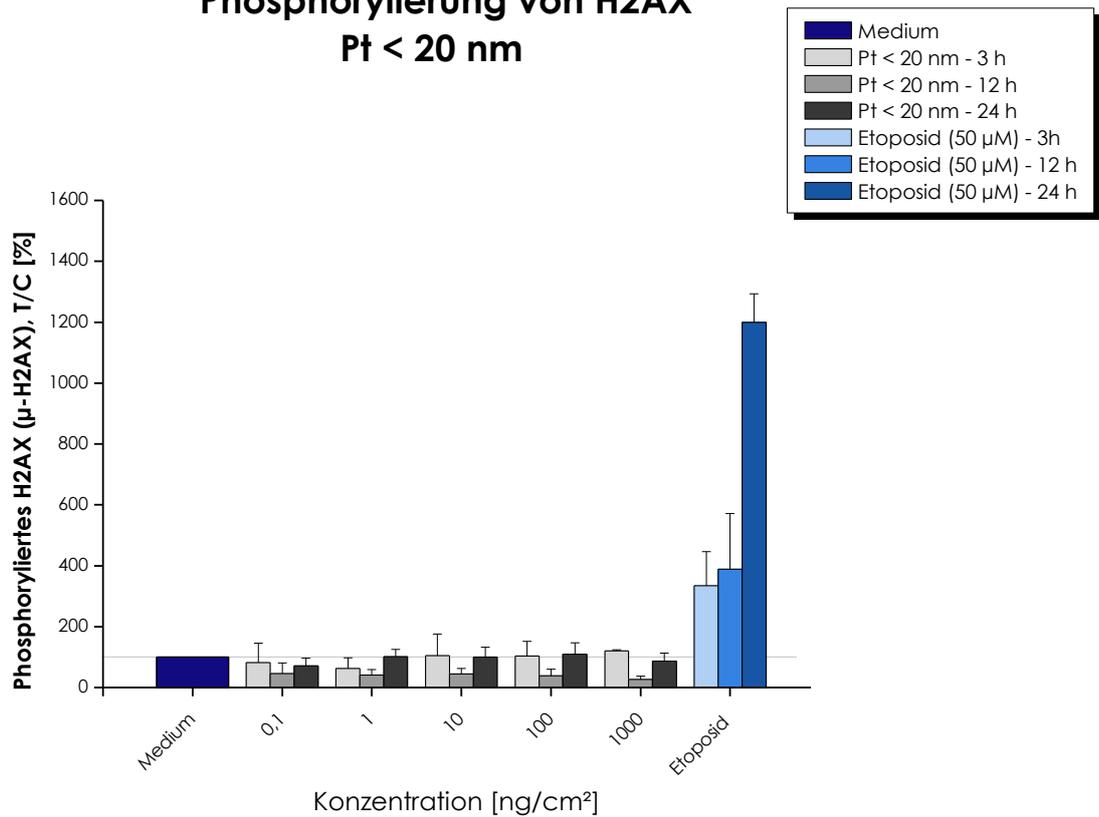


Abbildung 4.25 Untersuchung von Doppelstrangbrüchen in HT29-Zellen mittels Western Blot. Dargestellt sind die Konzentrationen in (% γ H2AX), bezogen auf die Negativkontrolle (10 % FKS-haltiges DMEM; \pm 100 %, 5×10^6 Zellen). Die Inkubationszeiten betragen 3 h, 12 h und 24 h. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD und repräsentative Blotbilder aus drei unabhängigen Messungen. γ -H2AX wurde detektiert nach Inkubation mit Medium (M), β -CD (CD) sowie Pt < 20 nm in Konzentrationen zwischen 0,1 ng/cm² und 1000 ng/cm², Etoposid (50 μ M) diente als Positivkontrolle. Inkubationszeiten betragen **A)** 3 h **B)** 12 h **C)** 24 h. **D)** zeigt α -Tubulin nach 12. n = 3-7

In Abbildung 4.25 ist die Phosphorylierung des Histons H2AX in Form von γ -H2AX als T/C in % der Negativkontrolle Medium (\triangleq 100 %) gegen die Konzentrationen aufgetragen. Wie ersichtlich führt keine der gewählten Konzentrationen zu einer erhöhten Phosphorylierung von H2AX. Sämtliche Werte der Pt-NP bewegen sich im Bereich des Mediums. Die Positivkontrolle Etoposid hatte eine zeitabhängige Phosphorylierung des Histons zur Folge. Nach 3-stündiger Exposition liegen $334,2 \pm 112,5$ % des phosphorylierten Proteins vor, nach 12 h $389,3 \pm 182,3$ % und nach 24-stündiger Inkubation $1201,8 \pm 90,7$ %.

4.4.3. DNA-Platinierung

Die Translokation von Platinspezies in den Zellkern und die weitere Assoziation an die DNA sollte untersucht werden. Dazu wurden HT29 mit Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm inkubiert und die DNA nach Isolation mittels induktiv-gekoppelter Plasma Massenspektrometrie (ICP-MS – ‚Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry‘) auf das Vorhandensein von assoziiertem Platin untersucht. Diese Methode ist aufgrund ihrer Nachweisgrenze im unteren ppt-Bereich und der Möglichkeit, im ppm-Bereich zu quantifizieren, ein Verfahren zur Bestimmung von Schwermetallen in sehr geringen Konzentrationen. Zur Erstellung einer Standardgeraden wurden im Zuge der Untersuchungen Platin-Standardlösungen im Konzentrationsbereich zwischen 0,05 ppb und 20 ppb mitgeführt. Das Gerät rechnet anschließend über die Intensität des Platins in der Probe auf dessen Konzentration zurück [Thomas, 2004]. Als interne Standards wurden In (0,5 ppb) und Re (1 ppb) zugegeben.

Die Zellen wurden mit Partikeldichten zwischen $1,0$ ng/cm² - 1000 ng/cm² (\triangleq $7,60$ µg/l – $7,6$ mg/l bzw. bzw. $0,04$ µM – $0,04$ mM für 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde eine 10 µM Cisplatinlösung (\triangleq $3,0$ mg/l) verwendet, ein in der Chemotherapie häufig eingesetztes Zytostatikum, das durch Bindung an die Purinbasen der DNA proliferationshemmend wirkt (siehe Abschnitt 2.6.4). Die Isolation und Aufreinigung der DNA ist Abschnitt 6.10 zu entnehmen.

In Abbildung 4.31 ist eine graphische Darstellung der gemessenen Pt-Menge bezogen auf die DNA-Konzentration zu sehen. Abgebildet ist die Menge der platinieren DNA in Form von fmol Pt pro µg DNA, aufgetragen gegen die jeweilige applizierte Partikeldichte in ng/cm² sowie die dazugehörige Partikelpräparation.

Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass bei einer Inkubation mit 100 ng/cm² der Pt-NP < 20 nm ein Platingehalt der DNA von 221,4 fmol Pt/μg DNA resultiert, wobei die Standardabweichung 214,3 fmol Pt/μg DNA beträgt. Auch im Fall der nächst höheren Inkubationsmenge von 1000 ng/cm² der Pt-NP < 20 nm ergibt sich ein Gehalt an platinierter DNA von 687,4 fmol Pt/μg, die Standardabweichung beträgt 679,2 fmol Pt/μg DNA.

Die hohen Standardabweichungen nehmen auch für die Exposition mit Pt-NP > 100 nm nicht ab. 1 ng/cm² dieser Partikelpräparation ergibt mit 71,7 fmol Pt/μg DNA beinahe denselben Wert wie 100 ng/cm² (71,0 fmol Pt/μg DNA), wobei die Standardabweichungen bei 136,5 fmol Pt/μg DNA (für 1 ng/cm²) bzw. 60,9 fmol Pt/μg DNA (für 100 ng/cm²) liegen. Die Inkubation mit 1000 ng/cm² ergeben mit 2516,2 fmol Pt/μg DNA den höchsten gemessenen Pt-Gehalt, weisen mit 2305,0 fmol Pt/μg DNA jedoch ebenfalls eine beinahe genauso hohe Standardabweichung auf. Die Interpretation der Daten gestaltete sich aufgrund verschiedener Einflüsse als schwierig.

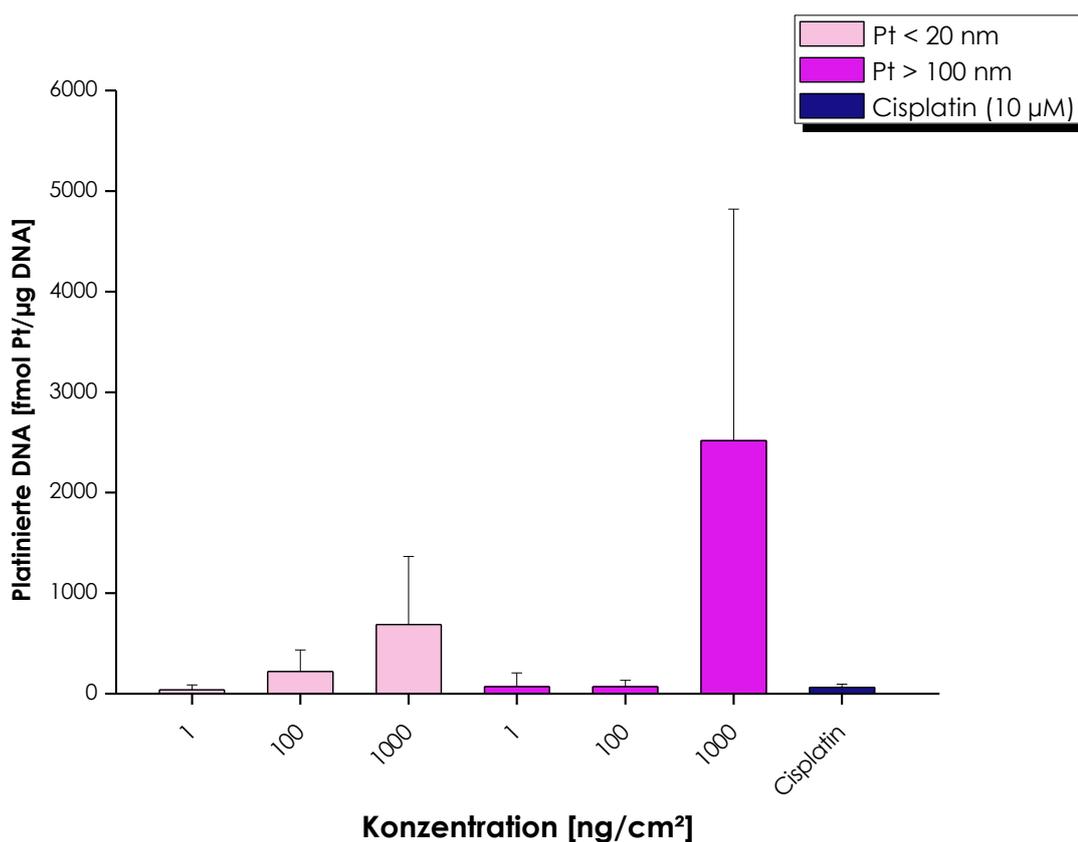


Abbildung 4.26

DNA-assoziiertes Pt nach Inkubation von HT29-Zellen mit Pt-NP der Präparationen Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm für 24 h in 10 % FKS-haltigem DMEM bei 37 °C, gemessen mittels ICP-MS. Cisplatin (10 μM) wurde als Positivkontrolle verwendet. Ergebnisse sind dargestellt als fmol Pt assoziiert an 1 μg DNA in Form des Mittelwerts ± SD, Ausreißertest wurde nach Malinov durchgeführt. n = 5-8

Die erheblichen Standardabweichungen ergaben sich durch die stark variierenden Messergebnisse der Pt-Bestimmungen durch die ICP-MS. Beispielsweise wurde für die DNA-Probe der mit 1000 ng/cm² der Pt > 100 nm inkubierten HT29-Zellen einmal 4982,5 fmol Pt/μg DNA gemessen, ein anderes Mal ergab dieselbe Partikelmenge 718,4 fmol Pt/μg nukleäre DNA.

Während der ICP-MS wurde die relative Standardabweichung einer Probe erfasst (RSD - ‚Relative Standard Deviation‘). Diese lag nach Inkubation mit den Pt-NP der Präparationen Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm durchwegs im Bereich der zugehörigen Mittelwerte lagen, war eine statistische Aussage zur Quantifizierung platinierter DNA in Abhängigkeit der Pt-Partikelgröße oder -dichte nicht möglich. Im Fall der Negativkontrollen (Medium und β-CD), deren Inkubationsmedien keine Pt-NP enthielten, konnte keine platierte DNA festgestellt werden konnte ($7,6 \pm 4,4$ fmol Pt/μg für Medium und $-0,2 \pm 2,1$ fmol Pt/μg DNA für β-CD). Darüber hinaus war ersichtlich, dass die Inkubation mit Cisplatin ein erhöhtes Vorhandensein platinierter DNA zur Folge hatte ($62,5 \pm 32,6$ fmol Pt/μg DNA), das signifikant unterschiedlich zur Mediumkontrolle war. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die DNA-Platinierung mit ICP-MS erfassbar ist und der Versuch prinzipiell funktioniert.

Variation der Elutions- und Veraschungsbedingungen

Für ein und dieselbe Partikelprobe kam es während der ICP-MS-Messung häufig zu großen RSDs, da die pro Sekunde gemessenen Detektorsignale (CPS – ‚Counts per Second‘) einer während der Messung nicht konstant blieben. Die Proben wiesen zu einem großen Teil RSDs von > 10 % auf und überschritten demnach die allgemein gültige Grenze für eine saubere analytische Erfassung. Aufgrund dieser hohen RSDs der nach nass-chemischer Veraschung gemessenen Proben wurden die Bedingungen des Elutionsschrittes der DNA-Isolierung und jene des darauf folgenden DNA-Aufschlusses variiert. So sollte festgestellt werden, inwieweit störende Matrixeffekte, wie beispielweise die im Puffer enthaltenen Salze, Einfluss auf die ICP-MS-Messungen hatten. In Tabelle 4.7 sind die variierten Parameter zusammengefasst:

Tabelle 4.7

Variierende Elutionsmedien im Zuge der DNA-Gewinnung durch DNeasy. Verwendet wurde der Elutionspuffer AE sowie H₂O_{bd}. Ebenso wurden die Arten des anschließend erfolgten DNA-Aufschlusses vor der ICP-MS variiert. Dem nass-chemischen Aufschluss (Erwärmen auf 45 °C, Zugabe der Oxidationsreagenzien H₂O₂/HNO₃ und Erwärmen auf 80 °C) wurde ein Mikrowellenaufschluss mit vorhergehender Wärmebehandlung bei 45 °C bzw. Zugabe von H₂O₂/HNO₃ gegenübergestellt.

DNA-Elutionsbedingungen	DNA-Aufschluss
H₂O_{bd} RNase frei	45 °C – Mikrowelle
	45 °C – H ₂ O ₂ / HNO ₃ (1:1) – 80 °C
	H ₂ O ₂ / HNO ₃ (1:1) – Mikrowelle
Elutionspuffer	45 °C – Mikrowelle
	45 °C – H ₂ O ₂ / HNO ₃ (1:1) – 80 °C
	H ₂ O ₂ /HNO ₃ (1:1) – Mikrowelle

Die DNA aus drei Zellproben wurde mit einem kommerziellen Puffer (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH = 9), der dem DNeasy Kit beilag, eluiert. Drei weitere DNA-Proben wurden mit reinem H₂O_{bd} eluiert, da möglicherweise die im Elutionspuffer enthaltenen Salze die Bestimmung des Pt-Gehalts mittels ICP-MS störten. Anschließend wurden die mit unterschiedlichen Elutionsmittel isolierten DNA-Proben verschieden aufgearbeitet. Aus je einer wurden die wässrigen Komponenten bei 45 °C entfernt und anschließend ein Aufschluss mittels Mikrowelle durchgeführt. Eine zweite Probe wurde mit den Oxidationsreagenzien H₂O₂/HNO₃ versetzt und danach ebenfalls in der Mikrowelle behandelt. Die dritte Probe wurde, wie zuvor durchgeführt, nass-chemisch aufgeschlossen.

Für die gewählten sechs unterschiedlichen Elutions- und Aufschlussbedingungen konnten keine Verbesserungen der Messgenauigkeit festgestellt werden. Im Fall der nass-chemischen Veraschung nach wässriger Elution lag die RSD der ICP-MS-Messung bei 24,5 % bzw. bei 32,0 % bei Verwendung des Elutionspuffer. Wurden die DNA-Proben nach Verdampfung der wässrigen Komponenten mit der Mikrowelle aufgeschlossen, betrug die RSD 54,0 % (Elution mit H₂O_{bd}) und 96,6 % (Elution mit Puffer). Bei vorhergehender Zugabe von H₂O₂/HNO₃ und anschließender Mikrowellenbehandlung lag die RSD bei 35,2 % (Elution mit H₂O_{bd}) bzw. 25,3 % (Elutionspuffer). Aufgrund dieser Ergebnisse war

ersichtlich, dass ein Mikrowellenaufschluss im Anschluss an eine Verdampfung bei 45 °C die größte RSD zur Folge hatte. Ein nass-chemischer Aufschluss und direkte Mikrowellenbehandlung des DNA-Eluats ergaben RSDs in denselben Größenordnungen. Die Daten ließen keine Aussage bezüglich des Elutionsmittels zu, da keine Unterschiede festgestellt werden konnten.

4.5. Gesamtdiskussion

Das toxikologische Verhalten nanopartikulären Platins in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, wobei der Fokus insbesondere auf Untersuchungen zum genotoxischen und zytotoxischen Potential sowie die zelluläre Partikelaufnahme gelegt wurde.

Die verwendeten Pt-NP wurden mittels SFRD am Institut für technische Thermodynamik und Kältetechnik des KIT synthetisiert, als Substrat wurde β -CD verwendet. Hergestellt wurden zwei Präparationen unterschiedlicher Durchmesser, bezeichnet als Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm.

Die beiden Partikelpräparationen wurden im Zuge dieser Arbeit auf ihre Stabilität in wässriger Suspension mittels DLS-Messung untersucht. Beide Proben wiesen ähnliche Partikelgrößenverteilungen mit Durchmessern > 100 nm auf. Da die Messungen der β -CD-Lösung dieselben Ergebnisse lieferten wie die Partikelsuspensionen, wurde vermutet, dass die PSDs dem Substrat β -CD zugehörig waren, auf dem die Pt-Partikel abgeschieden waren. Die Substanz bildet in wässriger Lösung Agglomerate, die in der Größenordnung jener Durchmesser lagen, die mit dem ZetaSizer für die Partikelsuspensionen bestimmt wurden [Coleman *et al.*, 1992]. Aufgrund des störenden Einflusses von β -CD konnten die DLS-Messungen nicht zur Charakterisierung der Durchmesser-Verteilung der Pt-Partikel herangezogen werden.

Die Stabilität der Partikel in wässriger Suspension wurde durch die Messung des Zeta-Potentials bestimmt. Dieses lag für beide Präparationen bei hohen Konzentrationen von 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zwischen -25,3 mV (Pt-NP < 20 nm) und -31,3 mV (Pt > 100 nm), was stabilen, nicht agglomerierten Suspensionen entsprach [Malvern Instrument Ltd., 2009]. Bei einer geringeren Partikeldichte von 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ lagen die Zeta-Potentiale bei positiveren Werten (-10,1 mV für Pt-NP < 20 nm und -20,5 mV für Pt > 100 nm). Die scheinbare Abnahme der Partikelstabilität bei geringerer Konzentration, ausgedrückt durch das positivere Zeta-Potential, war vermutlich durch die geringe Menge

an Pt-NP bedingt und nicht aufgrund tatsächlicher Zunahme von Agglomerationseffekten in weniger konzentrierten Suspensionen.

Die Pt-NP < 20 nm wurden im Anschluss an die Charakterisierung zur Untersuchung zellulärer Aufnahmemechanismen herangezogen. Die Untersuchungen erfolgten mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen, die in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Gerthsen am Laboratorium für Elektronenmikroskopie des KIT erstellt wurden. Im Rahmen der Versuche wurde keine Aufnahme der Pt-NP < 20 nm in den Zellkern oder die Mitochondrien festgestellt. Dies stimmte mit den Ergebnissen von Gehrke *et al.*, [2011] überein, wonach nach einer Exposition von 24 h ebenfalls keine Aufnahme in den Zellkern oder die Mitochondrien gemessen wurde. Elder *et al.*, [2007] wiesen in Endothelzellen der Nabelschnurvene nach 24-stündiger Exposition mit Pt-NP ($\varnothing = 20$ nm und 35 nm) vergleichbarer Konzentration ebenfalls keine Aufnahme in den Zellkern nach. Auch in humanen Lungenkarzinomzellen und Keratinozyten konnte keine Passage der Kernmembran durch Pt-NP ($\varnothing = 2-5$ nm) nachgewiesen werden [Horie *et al.*, 2011]. Auch im Fall anderer metallischer NP, wie Au-NP ($\varnothing = 14$ nm), wurde keine Aufnahme in den Nukleus von Cervixkarzinomzellen ermittelt [Chithrani *et al.*, 2006]. Dass NP dieser Größenordnung nicht kerngängig sind, ließe sich darauf zurückführen, dass der maximale Durchmesser, bis zu dem NP die Kernmembran passieren, bei ungefähr 10 nm liegt [Peters, 2006].

Die Pt-NP wurden nach zellulärer Aufnahme hauptsächlich in membranumschlossenen Vesikeln und zu einem geringen Teil frei im Zytosol akkumuliert. Auch in humanen Keratinozyten und Lungenkarzinomzellen wurden die internalisierten Pt-NP ($\varnothing = 2-5$ nm) in vesikulären Strukturen nachgewiesen [Horie *et al.*, 2011]. Auch Au-NP ($\varnothing = 16$ nm) lagen in Cervixkarzinomzellen nach Aufnahme interzellulär in Vesikeln vor [Nativo *et al.*, 2008]. Au-NP ($\varnothing = 1 - 100$ nm) konnten ebenso in Brustadenokarzinomzellen nach Internalisierung in multivesikulären Strukturen bestimmt werden [Jiang *et al.*, 2008b].

Im Anschluss an den Mechanismus wurde die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der zellulären Aufnahme nanostrukturierter Platinpartikel für Pt-NP < 20 nm bestimmt. Die Menge der internalisierten NP war im Fall der Inkubation mit $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ höher als nach Exposition mit $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Für beide Konzentrationen ergab sich eine zeitabhängige Zunahme der Anzahl aufgenommener Pt-NP.

Zusätzlich zur Menge der internalisierten Pt-Partikel wurde deren Gesamtoberfläche bestimmt. Diese wurde in Bezug zur Fläche der ausgewerteten Zellen ermittelt. Die Fläche

interzellulärer Partikel zeigte keine von der Expositionsdauer abhängige Zunahme. Aufgrund der Internalisierung einiger weniger Pt-Mikropartikel mit Durchmessern $> 1 \mu\text{m}$ war die Korrelation zwischen Partikelfläche und Inkubationszeit nicht gegeben. Nach Abzug der Mikropartikel in den Berechnungen zeigte sich, dass unter diesen speziellen Voraussetzungen eine Zunahme der Fläche internalisierter Partikel mit steigender Expositionsdauer festzustellen war.

Die Feret-Durchmesser-Verteilung der interzellulären Partikel wies eine Verschiebung in Richtung größerer Feret-Durchmesser auf, verglichen mit der Durchmesserverteilung, die ursprünglich für die Pt-NP $< 20 \text{ nm}$ anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmt wurde (siehe Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Der häufigste gemessene Feret-Durchmesser betrug 40 nm , der d_{90} -Durchmesser der NP sollte jedoch bei $12,2 \text{ nm}$ liegen. Diese Diskrepanz ließe sich dadurch erklären, dass die verwendeten Pt-NP $< 20 \text{ nm}$ einer anderen Charge zugehörig waren als jene, die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen charakterisiert und von Gehrke *et al.*, [2011] und Pelka *et al.*, [2009] verwendet wurden. Die PSD der für die in dieser Arbeit herangezogenen „neuen“ Partikelcharge war möglicherweise nicht identisch mit jener der „alten“ Charge, wodurch der d_{90} -Durchmesser gleichfalls nicht mehr korrekt wäre. Andererseits könnten die größeren Feret-Durchmesser durch Agglomerate verursacht worden sein. Während der Lagerung des Pulvers könnten, bedingt durch die erhöhte Oberflächenreaktivität nanostrukturierter Spezies, Agglomerationseffekte aufgetreten sein [Lin, 2007; Lu, 2013]. Die Bildung von Agglomeraten hätte alternativ bereits im Zuge der Synthese der neuen Partikelcharge eintreten können [Jiang *et al.*, 2008a]. Das Zeta-Potential der Suspensionen lag bei etwas positiveren Werten als -30 mV , was als Grenzwert für eine stabile Suspension gilt [Malvern Instrument Ltd., 2009]. Die Bildung von Agglomeraten nach Dispersion in Zellkulturmedium könnte daher eingetreten sein, zumal das Zeta-Potential in entionisiertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ bestimmt wurde. Agglomerationseffekte werden durch hohe Ionenstärke, wie für FKS-hältiges DMEM der Fall, begünstigt [Garside *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2009]. Behandlung der Mediumssuspension mit Ultraschall verringert zwar das Auftreten von Agglomeraten, verhindert dieses jedoch nicht gänzlich [Skebo *et al.*, 2007].

Die Auswertung der Feret-Durchmesser ergab jedenfalls, dass bevorzugt NP mit Durchmessern unter 100 nm von den Zellen aufgenommen wurden. Dieses Ergebnis war mit Literaturdaten vergleichbar. Desai *et al.*, [1996] zeigten anhand von Ratten, dass NP aus einem PLGA Copolymer mit 100 nm Durchmesser effektiver von Zellen des GIT aufgenommen werden als Partikel mit Durchmessern von 500 nm oder 1000 nm . Sonavane

et al., [2008] wiesen nach, dass Au-NP mit 15 nm Durchmessern eine erhöhte Aufnahme in Zellen des Rattendarms aufwiesen als jene Partikel mit 102 nm und 198 nm Durchmessern.

Die Art der zellulären Aufnahme wurde anhand eines Vergleichs der Menge internalisierter Pt-NP bei 37 °C und 4 °C untersucht. Die stark verminderte Menge interzellulärer Pt-NP im Fall der Inkubationstemperatur von 4 °C ließ auf einen aktiven endozytotischen Aufnahmemechanismus schließen. Für die Größenordnung nanostrukturierter Materialien kämen verschiedene endozytotische Prozesse in Frage, wie Calveolae- und Clathrin-vermittelte Endozytose, Makropinozytose oder eine Kombination dieser Mechanismen [Rosen *et al.*, 2012]. Die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ersichtlichen Vesikel wären im Fall dieser Prozesse als Endosome bzw. Lysosome zu definieren. Horie *et al.*, [2011] bezeichneten die durch Endozytose internalisierten Pt-NP ($\varnothing = 5 - 10$ nm) in humanen Keratinozyten und Lungenkarzinomzellen als Phagosom-ähnliche Vesikel. SiO₂-NP ($\varnothing = 50$ nm) werden, ebenfalls von Keratinozyten, endozytotisch aufgenommen und in Endosomen akkumuliert [Kim *et al.*, 2006b]. Die mikroskaligen Partikel, die ebenfalls in Vesikeln abgeschnúrt wurden, wo sie Akkumulate mit bis zu 4 μ m Durchmesser bildeten, könnten mittels Makropinozytose aufgenommen worden sein, da Makropinosome Durchmesser von bis zu 5 μ m betragen können [Swanson *et al.*, 1995].

Da sich die für elektronenmikroskopischen Untersuchungen gewählten Partikeldichten von Gehrke *et al.*, [2011] wegen der geringen Menge internalisierten NP als zu niedrig erwiesen, wurden für die vorliegende Arbeit höhere Konzentrationen gewählt, deren zytotoxische Potentiale untersucht wurden. Dies wurde anhand des Zellwachstums im Zuge des SRB-Assays, der Permeabilität der Zellmembran mithilfe des LDH-Assays, sowie durch die Aktivität der mitochondrialen Enzyme anhand des WST-Assays durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass im gewählten Konzentrationsbereich von 1 μ g/cm² - 100 μ g/cm² das Substrat β -CD ab einer Konzentration von 50 μ g/cm², vermutlich aufgrund einer Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts, zu zytotoxischen Effekten führte. Die elektronenmikroskopischen Versuche zur zeitabhängigen Aufnahme wurden mit Pt-NP < 20 nm der Konzentration 20 μ g/cm² und 50 μ g/cm² durchgeführt. Im Fall der höheren Partikeldichte war jedoch keine morphologische Veränderung der Zellen, verursacht durch in den Untersuchungen des zytotoxischen Potentials als schädigend identifizierte Konzentration, ersichtlich.

Pelka *et al.*, [2009] hatten nachgewiesen, dass Pt-NP < 20 nm nach zellulärer Aufnahme DNA-Strangbrüche induzierten, die nicht auf die Generierung von ROS zurückgeführt werden konnten. Da elektronenmikroskopische Untersuchungen keinen Hinweis auf die Aufnahme des nanopartikulären Platins in den Zellkern lieferten, wurden Untersuchungen zum Vorliegen platinierter nukleärer DNA, bedingt durch lösliche Platinspezies, die die Zellkernmembran passieren konnten, durchgeführt. Die interzelluläre Freisetzung löslicher Metallionen wurde beispielsweise als Grund für die Zytotoxizität von CuO- und NiO-NP vermutet [Karlsson *et al.*, 2008; Horie *et al.*, 2009].

Im Anschluss an die Isolierung der nukleären DNA der mit Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm exponierten Zellen wurde der Pt-Gehalt mithilfe von ICP-MS bestimmt, in Zusammenarbeit mit der Gruppe von C. Hartinger am anorganisch-chemischen Institut der Universität Wien. Die Bestimmung erwies sich als problematisch, da die Platin-Gehalte der DNA-Proben nicht reproduzierbar bestimmt werden konnten, was hohe Standardabweichungen der Daten zur Folge hatte. Aufgrund der hohen SDs konnte keine Aussage betreffend der konzentrations- oder zeitabhängigen Platinierung der nukleären DNA getroffen werden. Die 24-stündige Inkubation mit der Positivkontrolle Cisplatin (3 mg/l bzw 10 µM) lieferte hingegen verwertbare Daten, die Menge an platinierter DNA ließ sich mit jener vergleichen, die Gehrke *et al.*, [2011] nach 24-stündiger Exposition mit dem Zytostatikum derselben Konzentration gemessen hatten. Dies zeigte, dass die Messung des Platingehalts mittels ICP-MS grundsätzlich funktionierte. Die ICP-MS-Messungen von Gehrke *et al.*, [2011] ergaben jedoch für die Inkubation mit Pt-NP < 20 nm eine konzentrationsabhängige Platinierung der nukleären DNA.

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der ICP-MS-Messung nach Exposition der Zellen mit Pt-NP < 20 nm der vorliegenden Arbeit und jenen von Gehrke *et al.*, [2011] war möglicherweise darauf zurückzuführen, dass zwei unterschiedliche Chargen der Präparation Pt-NP < 20 nm verwendet wurden. Diese wurden durch dasselbe Verfahren unter gleichen Bedingungen synthetisiert, könnten jedoch unterschiedliche Verhaltensweisen auf zellulärer Ebene aufweisen. Wechselwirkungen nanoskaliger Materialien mit zellulären Strukturen werden u.a. von der Oberflächenbeschaffenheit, der Reinheit, der Form sowie der Größe des Materials beeinflusst [Verma *et al.*, 2010], Faktoren, die von Charge zu Charge variieren könnten. Aufgrund derselben Synthesebedingungen beider Partikelchargen wurde angenommen, dass die elektronenmikroskopische Charakterisierung für beide identisch wäre. Für die Zukunft

würde sich daher anbieten, jede Partikelcharge nach Herstellung einer separaten Charakterisierung zu unterziehen.

Im Fall der Pt > 100 nm könnten die Daten aufgrund der hohen SDs, die vergleichbar mit den Mittelwerten der Messwerte selbst waren, dahingehend interpretiert werden, dass kein DNA-assoziiertes Platin vorlag. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die zelluläre Aufnahmeeffizienz nano-/mikroskaliger Partikel mit zunehmendem Durchmesser abnimmt [Fadeel *et al.*, 2012] und die Partikel dieser Präparation möglicherweise nicht bzw. nur in geringem Maße von den Zellen internalisiert wurden.

Die hohen SDs der ICP-MS-Daten ließen sich im Fall der Pt-NP < 20 nm einerseits in die Richtung interpretieren, dass prinzipiell keine platinierter DNA vorlag. Die SDs der ICP-MS-Daten ließen andererseits die Interpretationsmöglichkeit zu, dass nach Inkubation mit Pt-NP < 20 nm eine Platinierung der DNA erfolgte, die neue Partikelcharge jedoch die Messgenauigkeit, respektive die SDs, negativ beeinflusste, sodass dies nicht verifiziert werden konnte. Dafür sprächen die Ergebnisse von Gehrke *et al.*, [2011], wonach Pt-NP < 20 nm der alten Charge zu DNA-Platinierung führten.

Gehrke *et al.*, [2011] hatten im Vorfeld nachgewiesen, dass die Inkubation mit Pt-NP < 20 nm der alten Charge zur Platinierung nukleärer DNA führte. Da Cisplatin aufgrund seiner Eigenschaft als Zytostatikum nach Interkalation der DNA zur Behinderung des Replikationsmechanismus und Brüchen des DNA-Strangs führt [Lippert, 1999], wurde ein ähnlicher Mechanismus für Pt-NP vermutet. Pelka *et al.*, [2009] hatten mithilfe des Comet Assay gezeigt, dass Pt-NP < 20 nm Strangbrüche der nukleären DNA zur Folge hatten [Pelka, 2010]. Durch den Assay konnte keine Aussage getroffen werden, ob die Brüche den Einzel- oder Doppelstrang betrafen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion von DSB durch Pt-NP < 20 nm anhand der Phosphorylierung von H2AX untersucht. H2AX wird im Rahmen des Reparaturmechanismus vorhandener DSB phosphoryliert (in phosphorylierter Form bezeichnet als γ -H2AX) und wurde mittels Western Blot detektiert. Die Untersuchungen zeigten, dass zu keiner der gewählten Zeitpunkte (3 h, 12 h und 24 h) eine signifikante Phosphorylierung von H2AX zu erkennen war.

Die Ergebnisse des Western Blot waren, unter Berücksichtigung der ICP-MS-Untersuchungen, differenziert zu betrachten. Wie bereits erwähnt fiel der Nachweis platinierter DNA durch Pt-NP < 20 nm in dieser Arbeit anders aus als durch Gehrke *et al.*, [2011], vermutlich bedingt durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Chargen.

Möglicherweise fand, aufgrund einer andersartigen Verhaltensweise der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten neuen Charge, keine Bildung und Aufnahme löslicher Platinspezies in den Zellkern statt, weshalb diese NP generell keine DNA-Strangbrüche verursachten, weder ESB noch DSB. Diese Theorie müsste durch einen erneuten Comet-Assay mit den Pt-NP < 20 nm der neuen Charge verifiziert werden.

Würden jedoch die Ergebnisse des Comet-Assay von Pelka *et al.*, [2009], der mit den Pt-NP der alten Charge durchgeführt wurde, in Kombination mit den Ergebnissen des Western Blot der neuen Charge betrachtet, ergäbe sich ein alternativer Diskussionsansatz, bei dem jedoch mögliche Unterschiede zwischen den Chargen außer Acht zu lassen sind. In Anbetracht der Daten des Comet-Assay von Pelka *et al.*, [2009], wonach Pt-NP < 20 nm DNA-Strangbrüche induzierten und dem negativen Nachweis von DSB durch den Western Blot, könnte darauf geschlossen werden, dass Pt-NP < 20 nm der überwiegende Teil der DNA-Strangbrüche vermutlich den Einzel- und nicht den Doppelstrang betraf. In diesem Fall könnte DNA-assoziiertes Platin, wie durch Gehrke *et al.*, [2011] gemessen, auftreten, das jedoch keine Induktion von DSB zur Folge hätte. Die von den Pt-NP interzellulär gebildeten Platinspezies hätten in diesem Fall aufgrund ihrer chemischen Reaktivität primär Brüche des DNA-Einzelstrangs zur Folge.

Als Beispiel für durch die chemische Struktur bedingte Unterschiede des genotoxischen Potentials von Platinverbindungen dienen Cis- und Transplatin. Letzteres unterscheidet sich lediglich in der stereochemischen Anordnung der Liganden von seinem Isomer Cisplatin, was jedoch Auswirkungen auf die Pt/DNA-Wechselwirkungen hat. So bildet Transplatin andere DNA- bzw. Protein-Crosslinks und verursacht andersartige DNA-Läsionen, wodurch der Replikationsmechanismus von Tumorzellen weniger effizient gehemmt wird, im Gegensatz zum klinisch aktiven Cisplatin [Buzaneva *et al.*, 2004]. Die Pt-DNA-Addukte, die Transplatin bildet, werden effektiver vom zellulären Reparaturmechanismus entfernt [Cicarelli *et al.*, 1985] bzw. behindern die Aktivität der Polymerase in einem geringeren Ausmaß [Comess *et al.*, 1992]. An diesem Beispiel ist ersichtlich, dass die Wechselwirkungen mit DNA je nach Platinspezies variieren und sich diese daher unterschiedlich auf die Genotoxizität auswirken können. Möglicherweise könnten durch Pt-NP < 20 nm interzellulär gebildete Pt-Spezies nur an eine DNA-Base assoziiert vorliegen, wie etwa die von Platin-Chemotherapeutika bevorzugte N⁷-Position des Guanins [Schwab, 2012], wodurch die Wahrscheinlichkeit der Bildung von DSB herabgesetzt würde. Zur Aufklärung des strangbrechenden Potenzials der Pt-NP müssen

daher zum einen potenziell gebildete Pt-Spezies bestimmt werden, andererseits ihre Bindung an die DNA in weitergehenden Untersuchungen eingehender betrachtet werden.

5. Zusammenfassung & Ausblick

Platin findet in nanopartikulärer Form in zunehmendem Ausmaß Anwendung als Katalysator in industriellen Prozessen und Autoabgasfiltern, wo die metallischen Nanopartikel durch Abriebprozesse in die Umwelt eingetragen wird [Somorjai *et al.*, 2010; Boysen *et al.*, 2011]. Die Nanopartikel gelangen im Anschluss über den Verzehr belasteter Lebensmittel bzw. nach Einatmen kontaminierter Luft und Verschlucken des partikelhaltigen Mucus in den Gastrointestinaltrakt des Menschen [Schierl, 2000; Gómez *et al.*, 2002]. Daher ist der Fokus auf das toxikologische Potential von Platin Nanopartikeln im menschlichen Darm von wissenschaftlicher Relevanz. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die genotoxischen und zytotoxischen Auswirkungen von nanopartikulärem Platin sowie dessen zelluläre Aufnahme anhand einer humanen Kolonkarzinomzelllinie untersucht.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Platin Nanopartikel von den Zellen in dosis- und zeitabhängiger Weise aufgenommen wurden, mit der größten beobachteten Menge internalisierten Materials bei der längsten Expositionsdauer von 48 Stunden. Da die Passagezeit des Chymus im Kolon bis zu 4 Tagen betragen kann [Block, 2006], ist dieses Ergebnis in Zusammenhang mit der potenziell gegebenen humanen Exposition nanostrukturierten Platins relevant. Untersuchungen zum genotoxischem Potential des nanoskaligen Platins im Vorfeld hatten ergeben, dass eine Schädigung der nukleären DNA in größen- und konzentrationsabhängiger Weise eintrat [Pelka *et al.*, 2009], ein Transport der interzellulären Partikel in den Nukleus oder die Mitochondrien konnte jedoch nicht festgestellt werden. Da Gehrke *et al.*, [2011] in exponierten Zellen platinierter DNA nachgewiesen hatten, wurde die These postuliert, dass die gemessenen genotoxischen Effekte möglicherweise auf der interzellulären Bildung löslicher Platinspezies beruht. Der Nachweis, dass sich die induzierten DNA-Strangbrüche hauptsächlich auf den Einzelstrang beschränken und nicht den Doppelstrang betreffen, war insofern von Bedeutung, als dass sich die beiden Brucharten in der Schwere der genotoxischen Schädigung unterscheiden. Doppelstrangbrüche stellen eine größere Herausforderung an das Reparatursystem der Zelle dar und bilden ein erhöhtes Risiko chromosomaler Umstrukturierungen [Elliott *et al.*, 2002; Schulz, 2005].

Da der Bedarf an nanostrukturiertem Platin der Industrie und im Einsatz in Fahrzeugkatalysatoren steigt [Johnson Matthey, 2012], wächst auch die Wichtigkeit dessen

toxikologischer Charakterisierung. Die Daten zu diesem Thema sind bis dato in ihrer Anzahl nicht ausgeprägt. Durch die vorliegende Arbeit wurde ein wichtiger Beitrag erbracht, um das toxikologische Wissen und Verständnis von Platin Nanopartikeln im Gastrointestinaltrakt des Menschen zu erweitern.

6. Material & Methoden

6.1. Chemikalien & Kits

Antikörper

Name	Firma
Anti- α -Tubulin	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-rabbit antibody, HRP-linked IgG	Santa Cruz, Heidelberg
γ -H2AX, Rabbit	Life Sciences

Chemikalien

Name	Firma
2-[4-(2-Sulfoethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure Karlsruhe (PIPES)	Carl Roth GmbH & Co. KG,
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)-Standard	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
n-Butanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Coomassie brilliant Blue G250	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Essigsäure (HAc) 100 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethanol (EtOH), p.a.	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Etoposid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutaraldehyd 50 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ladepuffer 1 x SDS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Luminol-Lösung 20 x (LumiGlo)	Roche Applied Science
Menadion	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

β-Mercaptoethanol	Fluka, München
Methanol (MeOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe	
Natriumazid (NaN ₃)	Riedel de Haen, Honeywell, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Osmiumtetroxid > 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe	
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe Quercetin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Salpetersäure (HNO ₃), p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Salzsäure (HCl) 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe	
SeeBlue Plus2 Pre-stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe	
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe	
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe	
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe	
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), suprapurum	Merck KGaA, Darmstadt

Kits

Verwendungszweck	Firma
LDH-Assay	Cytotoxicity detection Kit, Roche
WST-1-Assay	Cell Proliferation WST-1, Roche
DNA-Isolierung	Dneasy Blood & Tissue Kit, Qiagen

Testsubstanzen

Sustanz	Hersteller
β -Cyclodextrin	Prof. M. Türk, KIT (Deutschland)
Pt-NP	Prof. S. Bräse, Prof. M. Türk, KIT, Deutschland

Zellkultur

Name	Firma
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Humane Kolonkarzinomzelllinie HT29	DSMZ, Braunschweig
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin (Rinderpankreas 3,6 U / mg)	Serva GmbH, Heidelberg

Reagenzien

Name	Zusammensetzung	Konzentration
10 x PBS („Phosphate buffered Saline“):	NaCl	1,71 M
	Na ₂ HPO ₄	0,1 M
	KCl	34 mM
	KH ₂ PO ₄	18 mM

In H₂O_{bd} lösen, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, mit H₂O_{bd} auffüllen und auf 1 x PBS verdünnte Lösung autoklavieren. Lagerung bei 4 °C.

6.2. Materialien & Geräte

Name	Firma
Costar, 96-Loche, steril	Corning, N.Y., USA
Deckgläser	Menzel-Gläser
Eppendorfreaktionsgefäße (1,0 und 2,0 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Glaspipetten	VWR
Kulturflaschen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Multipipettenaufsätze (1, 5 und 10 ml)	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co KG,
Karlsruhe	
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co KG,
	Karlsruhe
Petrischalen, d = 5, 10 cm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen (5 ml)	VWR
Pipettenspitzen (blau, gelb, klar)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
13, 15 und 50 ml Röhre	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
6er Transwell-Platte mit 24 mm Insert	Corning, N.Y., USA
Polyestermembran, steril	
1,5 mm Whatman Paper	Whatman und Schleicher & Schuell
Zellschaber, steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Geräte

Name	Firma
Autoklav	Systec D-150, systec GmbH,
Weitenberg	
Blotter	PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter, Peqlab, Sandford, UK; Trans-Blot Cell, 49 BR 3584, Bio-Rad
Brutschrank	WTB-Binder CO ₂ -Brutschrank CB210, Binder, Tuttlingen; Heracell 240 i, CO ₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific
Eismaschine	Combi Line, Wessamat; MF 46,
Scotsman	Frimont

Elektrophorese-Kammer	Perfect-Blue, Vertical Electrophorse System, Peqlab
Geldokumentationsgerät	LAS-3000 Fujifilm intelligent dark box, 00001851, Software: Image Reader LAS 3000 V2.1; AIDA V 3.52.046;
Handhomogenisator (Whaton	Homogenisator „tight Pistill“ Glashomogeisator)
Kühl-/Gefrierschränke/-80 °C Ultratiefkühlschränke	Liebherr premium und >Comfort (4 °C , - 20 °C), Liebherr Ultra low temperature freezer, Modell U725-86, EU Biofreezer, New Brunswick IKA RH basic 2, IKA-Werke, Staufen
Mikroskopie	Inversmikroskop Axiovert 40C, Zeiss Objektive: A-Plan, 5 x/ 0,12 Ph0, CP-A Chromat 10 x/ 0,25 Ph1 Okular: PL 10 x 18; Durchlicht/ Fluoreszenzmikroskop Axioskop, Zeiss, Objektiv: Plan-Neo_ux 100 x/ 1,3 (Öl) 440480, Okular: Pl 10 x/ 20, Filter: 365 FT 395, LP 420; UV: BP 450-490, FT 510, LP 520
Mikrotiterplattengeräte	Victor ³ V 1240 Multilable Counter, Perkin Elmer GENios (Tecan, Crailsheim) mit Auswerte-Software XFluor4
Mikrowellenaufschlussgerät	MLS-Ethos 1600, Leutkirsch, Deutschland
pH-Meter	pH 211 Microprocessor pH Meter, Elektrode: 1420-040, HANNA Instruments, Messkette: Mettler Toledo, Inlab 408/120 CG 817 mit Elektrode BlueLine 12 (Schott AG, Mainz); Mettler Toledo Seven Easy, Mettler Toledo

Pipetten, Multipetten, Pipettus	Multipette Plus, Eppendorf Research P 2,5 – P 5000, Eppendorf Pipettus Akku, Hirschmann Laborgeräte
Pumpen	Vakuumsaugpumpe Laboport, IBS
Integra	Biosciences
Schüttler	Überkopfschüttler Roto-Shake-Genie, Peqlab Biotechnologies, Erlangen
Spektralfotometer	Nanodrop 2000c Spectrofotometer, Peqlab Biotechnology GmbH
Sterilbank	Hera Safe KS 18, Thermo Fischer Scientific
Trockenschrank	Binder, ATP line ED (E2), Binder GmbH
Ultraschallstab	Branson Sonifier 450, Branson
Ultraschallbad	Ultraconic Cleaner, VWR
UV-B-Bestrahlungsgerät	BLX-312, Peqlab
Vortex	Bio Vortex V1, Peqlab Biotechnologies; Vortex genie 2, Scientific Industries
Waagen	Analysewaage: CP124 S, Sartorius AG, Göppingen Grobwaage: 1574 MP8-2, Sartorius AG, Göppingen
Wasserbad	SW-2004, V
Zentrifugen	5415 Eppendorf AG, Hamburg;
Mikro	220R, Hettich Zentrifugen Rotina 420 R

6.3. Synthese der Pt-NP mittels SFRD

Die Pt-NP wurden, wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, mittels überkritischer Reaktivabscheidung (SFRD) vom Institut für technische Thermodynamik und Kältetechnik des KIT hergestellt.

Durchführung

Zuerst wird der Vorläuferkomplex Pt(COD)Me₂ mit β -CD vermischt und für 20 h bei 31 °C und 15,4 MPa mit sc-CO₂ versetzt. Anschließend wird die 30-fache Menge an H₂ in den Reaktionsbehälter eingelassen und der Platinkomplex durch Hydrogenolyse gespalten. Die Komplexliganden sowie das Lösungsmittel werden durch Druckerniedrigung entfernt. Eine Analyse mit SXRD zeigt, dass der überwiegende Anteil (ca. 90 %) der so synthetisierten Pt-NP innerhalb der Poren des Trägermaterials abgeschieden wird [Türk *et al.*, 2005]. Durch Variation der Versuchsbedingungen wurden Pt-NP verschiedener Größen hergestellt. Im Fall von Pt-NP mit Durchmessern < 20 nm werden Trägermaterial und Vorläuferkomplex während der Abscheidung in denselben Behälter gefüllt, sollte der Durchmesser > 100 nm betragen, mussten beide Reaktanden in separate Behältnisse.

6.4. Berechnungen

Da die Pt-NP im Zuge des SFRD-Verfahrens auf β -Cyclodextrin abgeschieden wurden, muss auf diesen Umstand bei der Berechnung der NP-Einwaage Rücksicht genommen werden. Der tatsächliche Platingehalt wird daher vor jeder Messung extra berechnet. Für die beiden Präparationen Pt-CD2 und Pt-CD3 gilt gleichermaßen:

1 μ g Pt entspricht 41,1 μ g der Pt- β -CD-Mischung

Als Einheit für die verschiedenen Methoden und damit variierenden Zellwachstumsplatten wurde Masse pro Fläche gewählt. Das Inkubationsmedium, dies die jeweilige Konzentration an Pt-NP enthält, wird auf das von Joanna Pelka verwendete Volumen im Comet Assay bezogen [Pelka, 2010] und für die jeweilige Fläche der Kulturschalen berechnet, um einen Zusammenhang zwischen der Arbeit von J. Pelka und dieser zu etablieren.

Tabelle 6.1 Medien zur Kultivierung von Zellen und deren Wachstumsoberfläche, die einzusetzende Einwaage des Pt-NP/ β -CD-Gemisches, um 1 μ g Pt/cm² zu erhalten, sowie das zu verwendende Inkubationsvolumen

Kulturmedium	Wachstums- oberfläche [cm ²]	Einwaage 1 μ g Pt/cm ² [mg]	Inkubationsvolumen [ml]
96-Lochplatte	0,32	0,013	0,075
12-Loch-Transwellplatte	1,12	0,046	0,262
6-Loch-Transwellplatte	4,67	0,192	1,5

Kulturschale (Ø = 100 mm)	58	2,384	13,55
Kulturschale (Ø = 150 mm)	152	6,247	20

6.5. Zellkultur

6.5.1. Zelllinie

Die Zelllinie HT29 ist einem humanen Adenokarzinom, die dem Kolon einer 44 jährigen Frau kaukasischen Typs entstammt. Sie wurde 1964 von Fogh und Trempe durch direkte Entnahme als Kulturmodell etabliert. Die Zellen weisen Verdopplungszeiten von 40-60 h auf und bilden bei Standardbedingungen undifferenzierte Monoschicht aus, die die physiologischen Eigenschaften eines transportierenden Epithels haben [von Kleist *et al.*, 1975; Lindl *et al.*, 2008].

6.5.2. Kultivierung

HT29-Zellen werden, nachdem sie im Anschluss an das Auftauen ausreichendes Wachstum aufweisen (siehe Abschnitt 6.5.7) in großen Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche = 175 cm²) kultiviert. Diese werden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Um die Zellen mit den für ihr Überleben wichtigen Stoffen zu versorgen, wird Dulbecco's Modified Eagly Medium (DMEM) zugegeben. Dieses enthält anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, Glucose, sowie Phenolrot, ein Indikator. Letzterer ist enthalten, damit eine Übersäuerung des Nährmediums bedingt durch erhöhtes Vorhandensein von Stoffwechselprodukten des Zellmetabolismus durch Farbumschlag des roten Mediums nach gelb visuell ersichtlich wird. Die Zellen werden in den Flaschen mit 40 ml DMEM, das zusätzlich mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), das Wachstumsfaktoren beisteuert, und 1% einer Penicillin/Streptomycin (P/S - 10000 Einheiten/100000 µg/ml)-Lösung, zur Vermeidung von Pilz- und Bakterienwachstum, versetzt ist, bedeckt. Die Flaschen werden im Inkubator bei 37 °C und 95 %-iger Luftfeuchtigkeit mit 5 % (v/v) CO₂ aufbewahrt. Mit den Zellen gearbeitet wird ausschließlich in einer Sterilbank, um das Risiko der Kontamination gering zu halten.

6.5.3. Mediumwechsel und Ultraschallbehandlung der Pt-NP-Suspension

Der Mediumwechsel erfolgt im Fall frisch aufgetauter Zellen alle 24 h, da diese durch den Stress-induzierenden Prozess des Auftauens Proliferationsniveau erreichen müssen, bevor eine Verwendung der Zellen zu Versuchszwecken möglich ist. Deshalb soll darauf geachtet werden, dass das Medium zu jeder Zeit ausreichend Nährstoffe enthält [Lindl *et al.*, 2008]. Das verbrauchte Medium wird mittels Pasteurpipette abgesaugt, 40 ml auf 37 °C vorgewärmtes frisches DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) zugegeben.

Werden die Zellen Pt-NP exponiert, wird die Partikel-Suspension vor Inkubation mit dem Ultraschallstab behandelt, um die Bildung von Agglomeraten zu minimieren. Die im Kulturröhrchen befindliche Suspension aus Pt-NP in Medium wird dabei für 10 Sekunden sonifiziert, anschließend wird eine 10 sekündige Pause eingelegt, damit es nicht zu einer Überhitzung kommt. Das Prozedere wird 10-mal wiederholt. Die Einstellungen sind t = hold, Duty Cycle = const, Output Control = 1,5.

6.5.4. Subkultivierung

Sind die Zellen 100% konfluent in Form einer Monolayer, müssen sie subkultiviert werden, da sie sonst in Polylyayern weiter wachsen, woraufhin die Zellen absterben und sich ablösen. Vor der Subkultivierung werden benötigte Reagenzien in das 37 °C warme Wasserbad gestellt. Dazu zählt neben dem Medium und Trypsin die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS – ‚Phosphate Buffered Saline‘), eine isotone Pufferlösung, die Phosphat und NaCl bzw. KCl enthält [Boxberger, 2007]. Die Endopeptidase Trypsin wird verwendet, um die adhärenen Zellen von der Kulturflaschenoberfläche zu lösen.

Durchführung

- Das Nährmedium wird mithilfe einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt.
- Der Zellrasen wird mit 5 ml PBS gewaschen, dies anschließend ebenfalls abgesaugt wird.
- 2,5 ml Trypsin werden an den Seitenrand der Flasche pipettiert und durch Schieflegen der Flasche über den Zellrasen gegossen.
- Die Zellen werden für 2 min bei 37°C inkubiert.
- Durch anschließende Verdünnung mit 10 ml DMEM (10% FKS, 1% P/S) wird die Trypsinaktivität gestoppt.

- Die Zellen werden mit der Pipette durch mehrmaliges Auf- und Abziehen vereinzelt und die Suspension, je nach Weiterverwendung, in eine neue Kulturflasche oder -schale überführt. Je nach benötigter Zellzahl wird Medium hinzugefügt. Für Kultivieren in derselben oder einer neuen Flasche reicht 1 ml einer zuvor 80 % konfluenten Zellsuspension, der mit 40 ml DMEM (10% FKS, 1% P/S) versetzt und in der Kulturflasche gleichmäßig verteilt wird. In einer Zellkulturflasche sollten maximal zwei Subkultivierungen durchgeführt werden, anschließend wird die Flasche gewechselt.

6.5.5. Zellzahl und Viabilität

Um im Zuge der Subkultivierung die entsprechende Anzahl an Zellen auszuwählen, müssen diese gezählt und auf ihre Viabilität getestet werden. Nach Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche mittels Trypsin wird deren Menge mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Diese ist zusammen gebaut aus einer Glasplatte, aus der vier Stege unterschiedlichen Umfangs herausgefräst sind. Darauf befinden sich Netzstrukturen, die ein großes Quadrat, das durch kreuzförmige Netzlinien in insgesamt neun kleine Quadrate unterteilt ist, bilden (siehe Abbildung 6.1). Vier dieser Quadrate werden zum Auszählen herangezogen und der Mittelwert daraus gebildet. Die ausgezählte Zellmenge bezieht sich auf 0,1 µl Zellsuspension.

Tote Zellen werden mit Trypanblau (3,3'-Dimethyl-4,4'-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-disulfonaphtyl-3-azo)-[1,1'-biphenyl]), angefärbt. Der anionische Azofarbstoff passiert die Membran toter Zellen und bindet an deren Zellproteine.

Durchführung

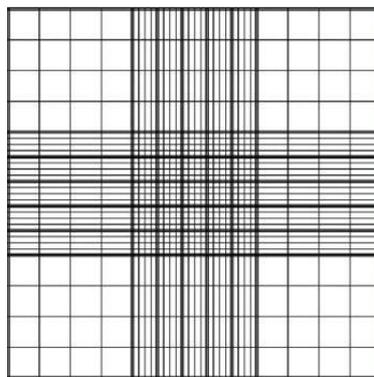


Abbildung 6.1

Zählfläche einer Neubauer Zählkammer [entnommen aus Zaehlkammer.de]

- Es werden 20 µl der Zellsuspension in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit 180 µl Trypanblaulösung durchmischt.
- 10 µl dieses Zell-Farbstoff-Gemisches werden zwischen Deckglas und Mittelsteg der Neubauerzellkammer pipettiert.
- Unter dem Mikroskop wird die Kammer ausgezählt. Die Zellen auf jedem der vier „Auszählquadrate“ werden gezählt und anschließend der Mittelwert gebildet. Dabei wird, mit dem Quadranten links oben beginnend, zuerst waagrecht, dann senkrecht eine Reihe herab rutschend, bis nach unten links gezählt. Pro Auszählquadrat werden zwei Seitenränder gewählt, für die die darauf liegenden Zellen nicht gezählt werden (z.B. links und oben).
- Jene Zellen, die eine runde Form sowie dunkelblaue Färbung aufweisen, werden als tot gewertet. Die Viabilität wird prozentual nach folgender Formel ermittelt:

$$Viabilität [\%] = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Gesamtzahl aller Zellen}} \times 100$$

- Zur Ermittlung der Zellzahl pro ml wird der Mittelwert lebender Zellen aus den vier Auszählquadraten, der sich auf 0,1 µl bezieht, mit 10000 und dem Verdünnungsfaktor, in diesem Fall 10, multipliziert.
- Für weitere Verwendungszwecke benötigtes Volumen mit einer definierten Zellmenge errechnet sich wie folgt:

$$Volumen mit gewünschter Zellzahl [ml] = \frac{\text{Gewünschte Zellzahl}}{\text{Berechnete Zellzahl [ml}^{-1}\text{]}}$$

6.5.6. Einfrieren

Um im Zuge des Einfrierens potentiellen mechanischen Schaden durch Eis sowie zu hohe lokale Salzkonzentrationen zu vermeiden, wird Dinethylsulfoxid (DMSO), ein Kryoprotektikum, das den Gefrierpunkt von Wasser herabsetzt, den Zellen zugesetzt.

Durchführung

- Es werden 500 µl einer 3:7 Mischung aus FKS/DMSO in einem Kryoröhrchen vorgelegt.
- Zu den 500 µl wird 1 ml Zellsuspension mit einer Zellzahl zwischen 1 und 3 × 10⁶ hinzugefügt.
- Das Kryoröhrchen wird für 24 h bei -20°C eingefroren.

- Anschließend wird es bei -80°C (Biofreezer) oder -196°C (N_2 , flüssig) gelagert.

6.5.7. Auftauen

Die Passagezahl kultivierter Zellen sollte 40 nicht übersteigen, da Mutationen und Selektion vermehrt eintreten können. Daher müssen regelmäßig neue Zellbestände geringerer Passagen in Kultur genommen, d. h. aufgetaut, werden. Da sich die gefrorenen Zellen in einer Suspension aus 70% DMSO, einem Zellgift, befinden, müssen die einzelnen Schritte des Auftauens zügig erfolgen, da zu langes Verweilen in flüssigem DMSO zum Zelltod führen kann.

Durchführung

- Das gefrorene Kyroröhrchen wird per Hand bzw. durch kurzes Eintauchen in 37°C warmes Wasserbad langsam erwärmt.
- Sobald die Zellsuspension flüssig genug ist, wird der gesamte Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml 20% FKS-haltigem DMEM überführt.
- Es erfolgt eine Zentrifugation (Rotina 420R, Hettich) bei 130 g für 5 min bei RT, um DMSO-haltiges Medium abzutrennen.
- Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 5 ml 37°C warmem DMEM (20 % FKS) resuspendiert.
- Die Zellsuspension wird in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm^2 Wachstumsfläche) überführt, 5 ml DMEM (20 % FKS, 37°C) werden hinzugegeben.
- Die Zellen sollen nun im Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 anwachsen und proliferieren. Bei einer Zelldichte von ca. 80 % kann erstmals passagiert und mit 10 % FKS- und 1 % P/S-hältigem DMEM weiter kultiviert werden. Nach zwei bis drei Passagen können die Zellen schrittweise in die nächst größere Kulturflasche (75 cm^2) und schließlich in die größte (175 cm^2) überführt werden.

6.6. Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels Western Blot

Der Einfluss von Pt-NP $< 20\text{ nm}$ auf den Phosphorylierungsstatus des Histons H2AX wurde mithilfe des Western Blots in HT29-Zellen untersucht.

Das Western Blot-Verfahren dient sowohl zur Qualifizierung als auch zur Quantifizierung von Proteinen. Zunächst wird die zu analysierende Probe im Zuge der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE – ‚Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gelelectrophoresis‘) in einem Acrylamid-Gel mit entsprechendem Vernetzungsgrad durch Anlegen einer Spannung nach Proteingröße getrennt. Die Proteine werden zuvor mit Natriumdodecylsulfat (SDS – ‚Sodiumdodecylsulfate‘, siehe Abbildung 6.2) denaturiert. Das Detergenz besteht aus einer unverzweigten Kohlenstoffkette mit 12 Atomen und einer terminalen Natriumsulfatgruppe. Der lipophile Kohlenstoffteil des SDS lagert sich durch Wechselwirkung mit hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren an das Protein an. Dieses verliert durch den Vorgang seine Tertiärstruktur und liegt als längliches Molekül vor. Die endständige Sulfatgruppe des SDS verleiht den Proteinen zusätzlich bei entsprechendem pH-Wert eine negative Nettoladung. Da größere Moleküle mehr SDS-Anionen binden als kleinere, haben sämtliche Proteine ein annähernd gleiches Ladung/Masse-Verhältnis. Die negativ geladenen, denaturierten Proteine wandern nun bei Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung Anode. Die elektrothoretische Mobilität und damit die Wanderungsgeschwindigkeit durch das Gel verhält sich dabei invers proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts [Garrett *et al.*, 2005]. Die vernetzten Strukturen des Polyacrylamidgels werden von kleineren Proteinen schneller passiert, weshalb diese rascher vorankommen und eine Trennung nach Größe erfolgt.

Um eine bessere Trennschärfe zu erzielen wird mit der diskontinuierlichen Gelelektrophorese gearbeitet. Hierbei werden zwei aufeinanderfolgende Gele mit unterschiedlichen Porengrößen und pH-Werten zur Trennung herangezogen. Zuerst durchwandern die Proteine das weitporige Sammelgel, das einen niedrigeren pH hat. Wegen der großen Poren kommt es kaum zu Trennungseffekten aufgrund der unterschiedlichen Proteingrößen. Der Konzentrierungseffekt wird durch die pH-bedingte Protonierung von Glycinat, das im Puffer enthalten ist, erreicht. Sobald dieses in das Sammelgel eindringt, liegt es aufgrund des dort herrschenden pH als Zwitterion vor,

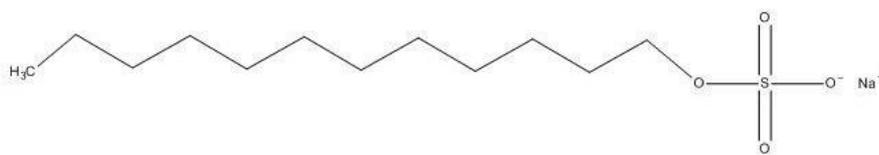


Abbildung 6.2 Strukturformel von Natriumdodecylsulfat (SDS – ‚Sodium dodecylsulfate‘)

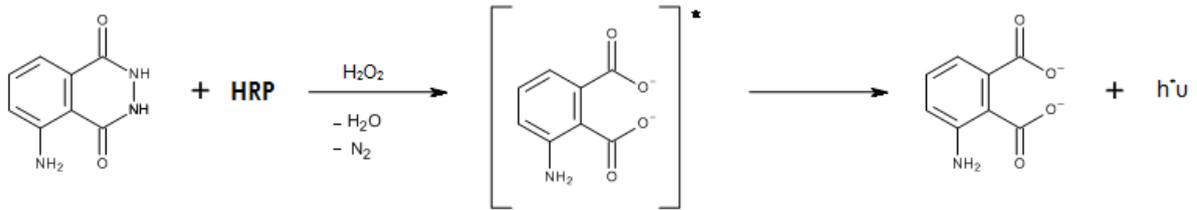


Abbildung 6.3 Reaktion des Enzyms ‚Horseradish Peroxidase‘ (HRP) mit Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion).

wodurch die Mobilität des nun neutralen Moleküls im elektrischen Feld stark abnimmt (Folgeion). Das im Sammelgel enthaltene Chlorid übernimmt nun den Ladungstransport und wandert am schnellsten (Leitton). Die anionischen Proteine werden von dem Leitton „hinterher gezogen“ und vom Folgeion „angeschoben“, wodurch die Probemoleküle gemäß ihrer elektrophoretischen Mobilität zwischen beiden Ionenfronten fokussiert werden. Sind die Proteine anschließend an der Grenze zum engporigen Trenngel angelangt, werden sie verlangsamt, was eine Bandenkonzentrierung zur Folge hat. Die Proteinfractionen werden im Anschluss an die Fokussierung zwischen den beiden Gelen im darauffolgenden Trenngel nach ihrer Größe getrennt. Der höhere pH trägt zur Dissoziation des Glycins bei, dessen Wanderungsgeschwindigkeit aufgrund der nun vorhandenen Ladung zunimmt und jene der Proteine übersteigt. Bei Ausschalten des Stromfeldes werden Proteine mit dem gleichen Molekulargewicht an denselben Stellen im Gel fokussiert. Ein Standard mit Proteinen bekannter Masse wird als Referenz mitgeführt, um die Proteinprobe anhand des Molekulargewichts zu identifizieren.

Anschließend erfolgt der Protein-Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran, auf der die zuvor aufgetrennten Proteine mithilfe einer Fluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Die Membran wird im Zuge des sog. Blottens zwischen Gel und Anode eingebracht, nach Anlegen eines Spannungsfeldes wandern die negativ geladenen Proteine vom Gel in Richtung Anode auf die Membran. Im Anschluss werden die Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert. Ein primärer Antikörper, der gegen das gewünschte Protein gerichtet und an dieses bindet, wird von einem sekundären Antikörper erkannt und ebenfalls gebunden. An den sekundären Antikörper ist das Enzym ‚Horseradish Peroxidase‘ (HRP) gekoppelt. Die Membran wird anschließend mit LumiGLO-Lösung versetzt. Diese enthält Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion), das Substrat für die Reaktion der HRP (siehe Abbildung 6.3). Die Verbindung wird im Verlauf derselben

zum Dicarboxylat-Dianion und Stickstoff umgesetzt, Wasserstoffperoxid wird dabei zu Wasser reduziert. Das Dianion liegt im angeregten Zustand vor, beim anschließenden Übergang in den Grundzustand kommt es zur Emission von detektierbare Lumineszenz. Über die Intensitäten kann ein Rückschluss auf die Quantität des Proteins gezogen werden.

Durchführung

Ausstreuen und Inkubieren der Zellen

- Das Aussäen der HT29-Zellen erfolgt in Zellkulturschalen mit einer Wachstumsfläche von 58 cm². 2 x 10⁶ Zellen werden in 10 ml DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) ausgestreut und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ wachsen gelassen.
- Die Inkubationen erfolgen stets mit einem Volumen von 13,55 ml. Pt-NP < 20 nm wird in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 ng/cm² und 1000 ng/cm² in DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) eingesetzt. Als Negativkontrolle dient DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) und β-CD mit einer Einwaage, die der für Pt-NP < 20 nm mit der Partikeldichte 1000 ng/cm² entspricht. Positivkontrollen sind Etoposid mit einer Konzentration von 50 μM bzw. 150 μM, sowie Behandlung der Zellen mit UV-Strahlung für 2 Minuten bzw. 5 Minuten und anschließender Inkubation für 1 h oder 24 h.
- Die NP-Inkubationssuspensionen werden vor Verwendung mit dem Ultraschallstab laut SOP behandelt.
- Die Inkubationszeiten betragen 3 h, 12 h und 24 h.

Erstellen der Elektrophoresegele

- Die Glasplatten werden mit 70% Ethanol entfettet und die Elektrophoresekammern zusammengesetzt.
- Zusätzlich zu den beiden für die Detektion von H2AX und γH2AX nötigen Gelen wird ein drittes zur Detektion des „Housekeeping“ Proteins α-Tubulin erstellt. α-Tubulin ist ein 55 kDa schweres Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das durch die Inkubationssubstanz nicht beeinflusst wird und so als Kontrolle für eine gleichmäßige Aufarbeitung des Zelllysats im Zuge des Verfahrens dient.
- Anschließend wird das Trenngel gegossen. Die Zusammensetzung des 12- bzw. 15-prozentigen Trenngels ist der Tabelle 6.2 zu entnehmen.
- Zwecks Luftausschluss und Begradigung wird das Gel mit n-Butanol überschichtet.

- Nach mindestens 60 Minuten wird das Butanol über dem ausgehärteten Gel entfernt, die Glasplatte darüber mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen und getrocknet.

Tabelle 6.2 Zusammensetzung des Sammelgels und des Trenngels (12 % und 15 %).

Sammelgel		Trenngel		
Reagenz	Volumen	Reagenz	Volumen	
			12 %	15 %
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$	0,86 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$	0,86 ml	1,075 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	0,36 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)	0,36 ml	0,45 ml
Acrylamid (30 %)	0,18 ml	Acrylamid (30 %)	0,18 ml	0,225 ml
SDS (10 %)	14,4 μl	SDS (10 %)	14,4 μl	18 μl
APS (10 %)	14,4 μl	APS (10 %)	14,4 μl	18 μl
TEMED	1,4 μl	TEMED	1,4 μl	1,75 μl

- Daraufhin wird das Sammelgel zusammen pipettiert. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 6.22 aufgezählt.
- In das frisch eingegossene Sammelgel werden die Kämme eingesetzt, die die Taschen zur Probenauftragung formen.
- Das Sammelgel wird mindestens 45 Minuten oder über Nacht zur Polymerisierung stehen gelassen.
- Nach Aushärtung werden die Kämme vorsichtig entfernt und eventuell vorhandene Luftblasen in den Geltaschen mittels Kanüle abgesaugt.
- Die Glasplatten mit den Gelen werden in die Elektrophoresekammern eingebracht.

Aufarbeitung der Zellen

Die folgenden Aufarbeitungsschritte werden auf Eis durchgeführt.

- Der Überstand wird abgegossen und die Reste mit der Pipette abgenommen.
- Der Zellrasen wird zweimal mit je 5 ml eiskaltem PBS gewaschen, die Reste werden anschließend ebenfalls mit der Pipette abgenommen.
- 2 ml des Lyse-Puffer RIPA („Radioimmunoprecipitation Assay“) werden mit 40 μl PIM („Protease-Inhibitor-Mix“) und 20 μl PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid), ein

Serinprotease-Inhibitor, versetzt. Zuletzt werden 20 µl Na-Orthovanadat, das diverse Phosphatasen inhibiert, zugegeben und die Lösung sorgfältig gemischt.

- 200 µl des zubereiteten Lyse-Puffers werden gleichmäßig verteilt auf den Zellrasen pipettiert.
- Die lysierten Zellen werden unmittelbar darauf mit dem Schaber abgekratzt und in den Potter überführt.
- Danach werden die Zellen durch 40 kräftige Stoß-Umdrehungen mit dem Glasstab mechanisch lysiert.
- Die Zellsuspension wird anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen.
- Es erfolgt nun eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1400 rpm und 4°C.
- Der Überstand des Zellpellet kann nach Zentrifugation verworfen werden.

Proteinbestimmung nach Bradford

Mittels Bradford-Bestimmung wird der Proteingehalt der Proben ermittelt. Diese beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue (siehe Abbildung 6.4) an Proteine. Der Aminotriarylmethan-Farbstoff bindet in anionischer Form unspezifisch an Aminosäuren, bevorzugt Arginin. Durch Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes einer Wellenlänge von 465 nm zu von 595 nm. Mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes wird die Extinktion der Probe und jene der mitgeführten Proteinstandards bekannter Konzentrationen errechnet. Mit Hilfe letzterer wird durch Erstellen einer Kalibriergerade die Proteinmenge der Probe quantifiziert [Walker, 2009].

- Es werden 10 µl Zellysat mit 90 µl H₂O_{bd} verdünnt und gut gemischt.
- Als Proteinstandard dient BSA in den Konzentrationen 0,2 mg/ml, 04 mg/ml,

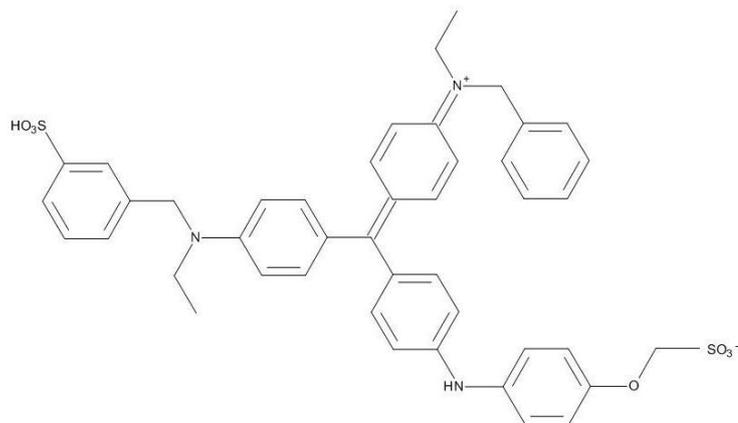


Abbildung 6.4 Strukturformel von Coomassie Brilliant Blue, zur Anfärbung von Proteinen

0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,6 mg/ml.

- Von den Probe-, BSA- und Lyse-Puffer-Lösungen, sowie $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, werden je 10 μl zu 1 ml Bradford-Reagenz pipettiert und gut gemischt.
- Es werden je 200 μl Lösung pro Loch in 96-Loch-Mikrotiterplatten gegeben und mit dem Photometer ($\lambda = 595 \text{ nm}$) in Form einer Dreifach-Bestimmung vermessen.
- Die Extinktionswerte der $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ -Probe sowie des reinen Lyse-Puffers werden von jenen der Zellprotein-Proben extrahiert. Mit Hilfe der BSA-Standardreihe wird eine Gerade erstellt, deren Fehlerquadrat ein Maß darstellt, inwieweit die gewählte Regressionsgerade zu den Messwerten passt.

Gelelektrophorese

- Die Proben werden so mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ verdünnt, dass sich Konzentrationen von 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ergeben.
- Die Probelösungen werden mit 40 μl SDS-Puffer vermischt und bei 95 °C und 1000 rpm für 8 Minuten denaturiert
- Pro Geltasche werden 20 μl Protein-SDS-Puffer-Lösung aufgetragen. In eine Tasche wird zusätzlich ein Proteinstandard pipettiert. Anschließend werden sie vorsichtig mit Laufpuffer überschichtet.
- Die Elektrophorese zunächst mit 100 V für 30 min betreiben, anschließend 120 V für ebenfalls 30 min und zuletzt 90 Minuten bei 140 V.

Blotting und Detektion

- Es wird pro Gel eine Nitrozellulose-Membran und 2 Whatman-Paper ausgeschnitten und mit Blottig-Puffer gesättigt.
- Anschließend wird auf jedes Whatman-Paper eine Membran und darauf ein Gel gelegt, die Luftblasen werden mit einer Walze heraus gedrückt.
- Die „Sandwich“-Konstrukte werden auf diese Weise zwischen Anode und Kathode in den Blotting-Apparat eingesetzt, dass die Laufrichtung der negativ geladenen Proteine im Gel in Richtung Membran erfolgt.
- Das Blotten erfolgt bei 1000 mA, 150 W und 150 V für 75 min.
- Die Membran wird anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für die Immun-Detektion eine Stunde in 20 ml 5 % Milchpulver in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ geschüttelt.

- Anschließend wird der primäre Antikörper („Rabbit“, aus Kaninchen gewonnen) in einer 1:500 Verdünnung in 3,5 ml Milchpulver (5 % in H₂O_{dest}) zugegeben. Die Membran wird über Nacht bei 4 °C mit dem Antikörper inkubiert.
- Am darauffolgenden Tag wird die Membran dreimal mit je 10 ml Waschpuffer für je 15 Minuten gewaschen.
- Die Inkubation mit dem an HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper („Anti-Rabbit“, gegen den primären Kaninchen-Antikörper gerichtet) erfolgt in einer Verdünnung von 1:1000 in 3,5 ml Milchpulver (5 % in H₂O_{dest}) für eine Stunde.
- Die Membran wird anschließend dreimal zu je 15 Minuten mit Waschpuffer gewaschen.
- Die Membran wird schließlich mit 5 ml der LumiGLO-Lösung für 60 Sekunden inkubiert.
- Im Anschluss erfolgt die Detektion der Chemolumineszenz mittels LAS-3000.

Verwendete Reagenzien

Reagenz	Chemikalien	Konzentration
RIPA-Puffer	TRIS/HCl	50 mM
	NaCl	250 mM
	EDTA	1 mM
	NaF	1 mM
	Igepal CA-630	1 % (v/v)
Primärantikörper	γ-H2AX-Antikörper (Rabbit, Santa Cruz)	1:200 in Milchpulver
	α-Tubulin-Antikörper (mouse, Santa Cruz)	1:5000 in Milchpulver
Sekundärantikörper	Goat Anti-Rabbit IgG HRP-Antikörper (Santa Cruz)	1:5000 in Milchpulver

6.7. Bestimmung der Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der verwendeten Pt-NP wurde anhand dreier Methoden untersucht.

6.7.1. Untersuchung des Zellwachstum

Mithilfe des Sulforhodamin B-Versuchs soll untersucht werden, ob die Pt-NP < 20 nm in unterschiedlichen Partikeldichten proliferationshemmende Eigenschaften in HT29-Zellen aufweisen.

Die Methode wurde 1990 von Skehan *et al.* etabliert und ist heute wegen des günstigen, schnellen und leicht zu handhabenden Ablaufs ein Standardverfahren zur Messung der Auswirkung einer Testsubstanz auf die Proliferation von *in Vitro* Zellsystemen [Skehan *et al.*, 1990].

Zellkultivierung und Inkubation

- Es werden, je nach gewünschter Expositionsdauer, 1000 Zellen (72 h Inkubation), 2000 Zellen (48 h) und 4000 Zellen (24 h) HT29-Zellen in je 100 µl DMEM (10%FKS, 1% P/S) in drei 96-Loch-Mikroplatten ausgestreut. Anwachszeit sind 48 h (37°C, 5% (v/v) CO₂). Pro Inkubationssubstanz werden sechs Löcher benutzt, die äußersten Ränder waagrecht und senkrecht bleiben aufgrund des Wärmegefälles und den daraus resultierenden unterschiedlichen Wachstumseigenschaften frei.
- Die Substanzinkubation erfolgt mit 75 µl β-CD bzw. Pt-NP < 20 nm jeweils in den Konzentrationen 100 µg/cm², 50 µg/cm², 20 µg/cm², 10 µg/cm² und 1 µg/cm². Als Negativkontrolle dient DMEM (10% FKS, 1% P/S), als Positivkontrolle 50 µM Cisplatin.
- Es sollen bei Wiederholung des Versuchs für dieselben Inkubationszeiten unterschiedliche Zellpassagen sowie Substanz-Einwaagen verwendet werden.

Durchführung

- Die Substanzinkubation wird durch Zugabe von 7,5 µl 50-prozentiger Trichloressigsäure (TCA – ,Trichloroacetic acid') gestoppt.
- Anschließend wird die 96-Loch-Platte bei 4 °C für 1 h ruhen gelassen, wodurch lebende Zellen am Plattenboden fixiert werden.
- Die Vertiefungen werden viermal mit H₂O gewaschen, um Reste der TCA und abgestorbener Zellen zu entfernen. Anschließend erfolgt die Trocknung der Platte über Nacht an der Luft.
- Die Anfärbung der fixierten Zellen wird mit 50 µl des 0,4-prozentigen (w/v) SRB-Reagenz durchgeführt.

- Nach Hinzufügen des SRB-Farbstoffes wird die 96-Loch-Platte bei RT für 1 h im Dunkeln verwahrt.
- Darauffolgend wird der überschüssige, nicht gebundene Farbstoff durch viermaliges waschen mit einprozentiger (v/v) Essigsäure entfernen. Anschließend Trocknung an Luft im Dunkeln.
- Durch die anschließende Zugabe von 40 µl TRIS-Base werden die durch SRB fixierten Proteine gelöst.
- Die Fotometrische Bestimmung wird im Mikroliterplattenlesegerät bei einer Absorptionswellenlänge von 570 nm durchgeführt. Der Blindwert der TRIS-Base wird von von Probenwerten abgezogen.

Verwendete Chemikalien

Reagenz	Konzentration	Firma
Trichloressigsäure (≥ 99 %)	50 % (w/v) in H ₂ O _{bd}	Roth
Essigsäure (≥ 96 %)	1 % (v/v) in H ₂ O _{bd}	Roth
SRB-Reagenz	0,4 % (w/v) in AA	Sigma Aldrich
Tris-Base (≥ 99,9 %, pH 10,5)	10 mM in H ₂ O _{bd}	Roth

6.7.2. Untersuchung der Integrität der Zellmembran

Die Permeabilität der Membran von HT29-Zellen nach Exposition mit β-CD und Pt-NP < 20 nm in unterschiedlichen Konzentrationen soll anhand des zellulären Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand bestimmt werden.

Der LDH-Test stellt ein kolorimetrisches Verfahren zur Messung der Zellmembranintegrität, verursacht durch die Testsubstanz, dar. Der Versuch wird mithilfe des ‚Cytotoxicity Detection Kit‘ von Roche durchgeführt, der zwei enzymtatische Reaktionen miteinander koppelt. Gemessen wird das rote Formazan-Salz, das durch Reduktion mithilfe eines als Katalysator wirksamen Enzyms, die Diaphorase, eine NADH-Dehydrogenase, aus gelbem Tetrazolium-Salz entsteht (siehe Abbildung 6.5.). Die für diese benötigten Reduktions-äquivalente werden aus der Reduktion von NAD⁺ zu NADH+H⁺

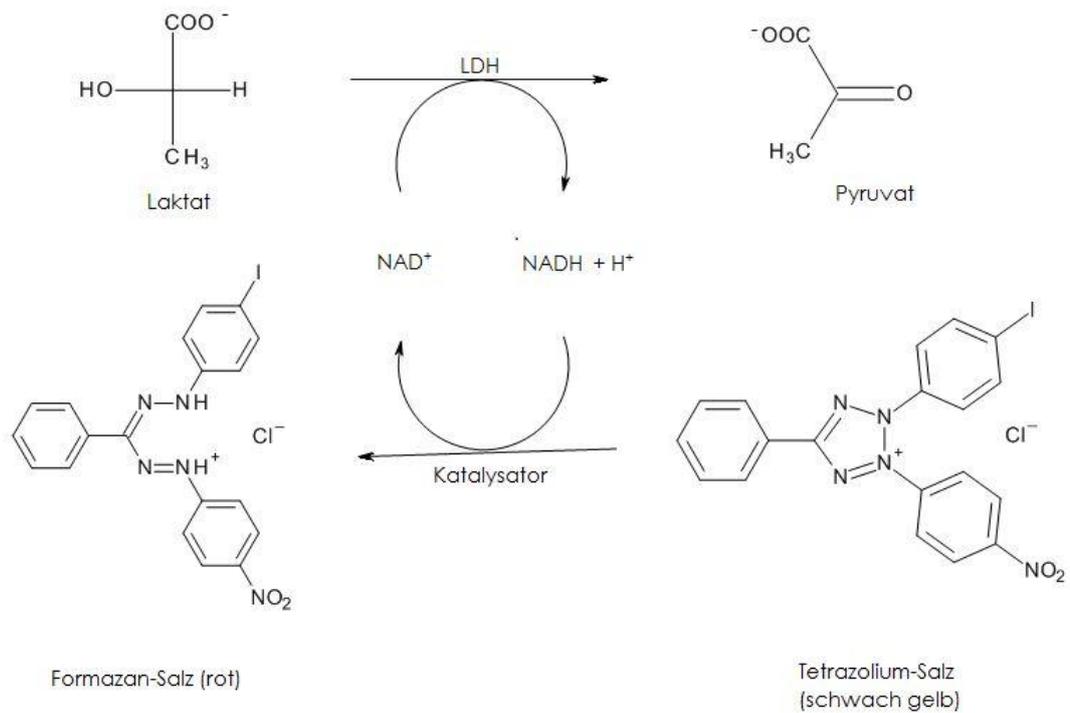


Abbildung 6.5 Reaktionsmechanismus des Tetrazolium-Salz zu Formazan im Rahmen des LDH-Assay. Laktat wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand zu Pyruvat oxidiert, die Elektronen werden auf den Cofaktor NAD⁺ übertragen, der zu NADH reduziert wird. Ein Katalysator, beispielweise die NADH-Dehydrogenase, überträgt anschließend 2 [H⁺+e⁻] auf das Tetrazolium-Salz und reduziert dieses zu Formazan, das photometrisch gemessen wird.

durch die LDH, die bei beschädigter Membran im Mediumsüberstand vorhanden ist, geliefert.

Ausstreuen bzw. Inkubation der Zellen:

- 40000 HT29-Zellen in 100 µl DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) werden pro Loch einer 96-Loch-Mikroplatte ausgestreut, wobei die äußersten 6 Löcher horizontal und vertikal nicht miteinbezogen werden. Den Zellen werden anschließend für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ das Anwachsen ermöglicht.
- Die Inkubation erfolgt im Anschluss mit 75 µl β-CD bzw. Pt-NP < 20 nm, jeweils in den Konzentrationen 50 µg/cm², 20 µg/cm², 10 µg/cm² und 1 µg/cm².
- Triton X (1 % (v/v)) in DMEM (10 % FKS, 1 % P/S) wird als Positivkontrolle mitgeführt, reines DMEM (10% FKS, 1% P/S) als Negativkontrolle.
- Die Inkubationsdauer beträgt 24 h.

Durchführung

- In einer neuen 96-Loch-Mikroplatte werden pro Loch 50 µl warmes PBS vorgelegt.
- Zu jeder PBS-Lösung werden 50 µl des Mediumüberstandes aus der 96-Loch-Platte mit den Probeinkubationen zugegeben.
- Das LDH-Reagenz wird nach der Kit-Anleitung wie folgt zusammengestellt: 100 Anwendungen entsprechen 11,25 ml Farbstoff und 0,25 ml Katalysator-Lösung. Entsprechend werden die benötigten Mengen zusammen pipettiert.
- Anschließend werden mithilfe der Mehrkanalpipette 100 µl des frisch hergestellten LDH-Reagenz zu der PBS-Überstands-Lösung gegeben, eventuell vorhandene Blasen werden mit der Kanüle zerstoßen, um die anschließende photometrische Messung nicht zu beeinflussen.
- Die Messung der Extinktion des gebildeten Formazans wird bei 490 nm photometrisch im Mikroplattenlesegerät gemessen.

Verwendete Reagenzien

Reagenz	Konzentration	Firma
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	/	Roche
Phosphate Buffered Saline	siehe Abschnitt 6.1	

6.7.3. Untersuchung der mitochondrialen Aktivität

Die Intaktheit der mitochondrialen Atmungskette in HT29-Zellen nach Exposition von β -CD und Pt-NP < 20 nm unterschiedlicher Konzentrationen soll mithilfe des WST-Assays (Water-soluble Tetrazolium Salt) untersucht werden.

Im Rahmen des WST-Tests wird die Bildung des Farbstoffs Formazan durch lebende Zellen kolorimetrisch gemessen. Der Versuch wird mittels ‚Cell Proliferation Reagent WST-1‘-Kit von Roche durchgeführt. Die grundlegenden Reaktionsschritte sind in Abbildung 6.6 dargestellt. Das WST-1-Reagenz, ein Tetrazolium-Salz mit leicht roter Färbung, wird vom Succinat-Tetrazolium Reduktase-System (STR-H) der Zellen zu STR und dunkelrotem Formazan reduziert, das anschließend photometrisch gemessen wird. Das STR/STR-H ist ein Teil der mitochondrialen Atmungskette, daher liefert der gebildete Farbstoff ein Maß für die Intaktheit der mitochondrialen Zellaktivität. Oxidiertes STR sorgt über die

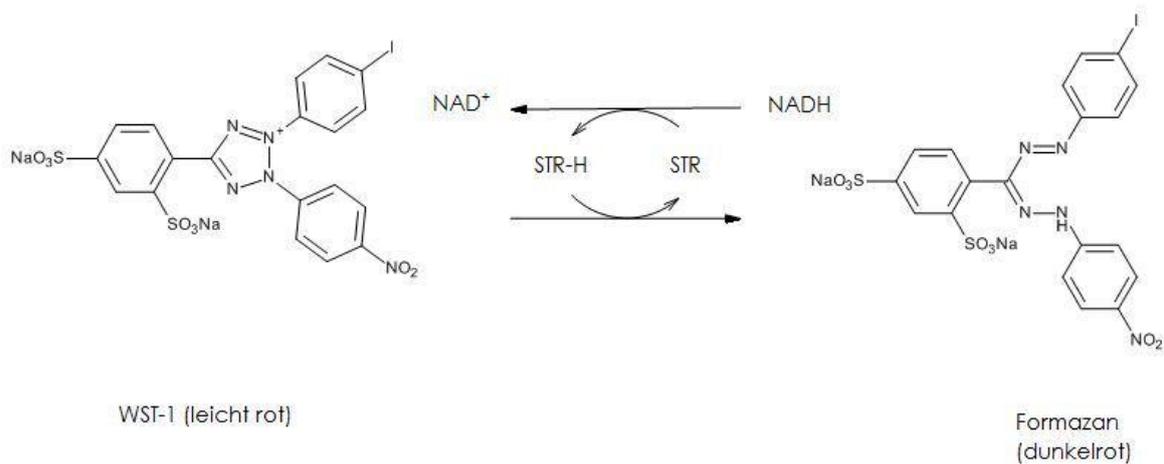


Abbildung 6.6 Reaktionsmechanismus des WST-Versuchs. Das leicht rote Tetrazolium-Salz „WST-1“ (Watersoluble Tetrazolium Salt) wird vom Succinat-Tetrazolium Reduktase-System (STR) zu dunkelrotem Formazan reduziert. NADH überträgt im Anschluss ein ($H^+ + 2e^-$) auf das oxidierte STR, sodass NAD^+ entsteht und die reduzierte Form des STR, STR-H.

Oxidation von $NADH/H^+$ zu NAD^+ für die benötigten Reduktionsäquivalente und die Regenerierung der reduzierten STR-H-Form, wodurch die Reaktion erneut ablaufen kann.

Ausstreuen und Inkubation der Zellen

Da der LDH-Test mit den Mediumüberständen der Zellen durchgeführt wird, können die in der 96-Well-Mikroplatte verbliebenen HT29 für den WST-Test herangezogen werden, nachdem diesen je 50 μ l Überstand für die LDH-Bestimmung entnommen wurde.

Durchführung

- Das verbliebene Medium wird abgesaugt und die Zellen zweimal mit 37 °C warmem PBS waschen.
- 100 μ l auf 37 °C temperiertes DMEM (10 % FKS, 1% P/S) wird auf die Zellen pipettiert.
- Anschließend werden 10 μ l des WST-1-Reagenz (Roche) mit der Multipette zum Zellrasen hinzugegeben.
- Die Mikroplatte wird dann für 15 Minuten im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.
- Zum Schluss erfolgt die photometrische Messung bei 450 nm bzw. 650 nm (Referenz) im Mikroplattenlesegerät.

Verwendete Reagenzien

Reagenz	Konzentration	Firma
Cell Proliferation Reagent WST-1	/	Roche
Phosphate Buffered Saline	siehe Abschnitt 6.1	

6.8. Messung des Zeta-Potentials und der Partikelgrößenverteilung

Die Partikelgrößenverteilung (PSD – ‚Particle Size Distribution‘) und das Zeta-Potential (ZP) von β -CD, Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm in Lösung/Suspension werden mit dem Malvern ZetaSizer Nano gemessen. Aufgrund von Problemen bei der DLS-Bestimmung in DMEM, da dessen Inhaltsstoffe zur Korrosion der Küvetten-Elektrode führen, wurden die Messungen in wässriger Lösung ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$) durchgeführt.

Durchführung

- Es werden von β -CD, Pt-NP < 20 nm und Pt > 100 nm je zwischen 1 und 5 ml mit den Partikeldichten (die Einwaage bezog sich auch für β -CD exakt auf jene der Pt-NP) 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, bezogen auf die im Western Blot verwendete Petrischalenfläche ($A = 152 \text{ cm}^2$), in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ erstellt und anschließend mit dem Ultraschallstab behandelt (siehe Abschnitt 6.5.3).
- Die Suspensionen werden in für die PSD-Bestimmung in Plastikkuvetten, zur Zeta-Potential-Messung in mit Elektroden versehenen Spezialkuvetten im Malvern Zetasizer mit den entsprechenden Programmen gemessen. Um eintretende Agglomerationseffekte möglichst von deren Beginn an zu berücksichtigen, werden die Suspensionen jeweils frisch hergestellt und zügig vermessen.

6.9. Raster-Transmissionselektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie-Aufnahmen der in dieser Arbeit verwendeten Pt-NP, sowie der Zellen, die mit diesen inkubiert wurden, wurden von Holger Blank, Mitarbeiter der Gruppe von D. Gerthsen am Institut für Elektronenmikroskopie des KIT, erstellt. Das verwendete Elektronenmikroskop ist eine Dualbeam Strata 400 S der Firma FEI, ein kombiniertes REM/FIB-Gerät, das im TEM, sowie im RTEM-Modus betrieben werden kann.

Ebenso ermöglicht es das Erstellen von Bildern mittels hochauflösender SEM (HSEM). Es enthält weiters die Hardware für eine Mikronalyse der in der Probe enthaltenen Elemente mittels energiedispersiver Röntgen-Spektroskopie (EDXS) [FEI Company]. Für die theoretische Funktionsweise dieser Techniken siehe Abschnitt 2.5.4.

Ausstreuen und Inkubation der Zellen

Im Zuge der Arbeit wurden sowohl die ausgestreute Zellzahl und die Konzentrationen der Inkubationssubstanzen, sowie die Zellkulturschalen variiert (siehe Tabelle 6.3). Erstere beide Punkte aus Gründen der Versuchsoptimierung, letzteres aufgrund von Materialbeschränkung.

Tabelle 6.3 Varianten 1 und 2 des Ausstreuens und Inkubierens von HT29-Zellen für elektronenmikroskopische Versuche

Variante	1	2
Transwellmembran	Polycarbonatmembran	Polycarbonatmembran
Wachstumsfläche [cm²]	4,67	1,12
Inkubationsvolumen [ml]	1,5	0,262
Volumen unteres Kompartiment [ml]	2,6	0,9
Ausgestreute Zellzahl pro Volumen [Z/ml]	300000/1,5	100000/0,5

Durchführung

- Die Zellinkubationen erfolgen mit Pt-NP < 20 nm und β -CD der Konzentration 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in DMEM (10% FKS, 1% P/S). Zusätzlich wird mit reinem Medium inkubiert.
- Es wird eine Zeitserie durchgeführt, um die zeitabhängige Aufnahme zu untersuchen (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Inkubationen erfolgen hierbei zeitversetzt, sodass sich zum Zeitpunkt der Aufarbeitung Expositionsdauern von 48 h, 24 h, 6 h und 1 h sowie 45 min ergeben. Inkubiert wird bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂.
- Es wird weiters ein Versuch zur Untersuchung des aktiven bzw. passiven Membrantransportes der Pt-NP bei 4 °C und 37 °C (0% CO₂) durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2.2). Die Zellen werden im Fall des 4 °C-Versuchs 30 Minuten davor mit den ebenso temperierten Lösungen/Suspensionen bei 4 °C aufbewahrt, um den Zellstoffwechsel rechtzeitig an die Temperaturumstellung zu gewöhnen.

Chemische Fixierung und Einbettung der Zellen

- Das Medium über den Zellen wird abgesaugt und die Zellen zweimal mit 0,1 M PIPES (Temperatur je nach Inkubationstemperatur 4 oder 37°C) gewaschen.
- Aus je einer Membran werden drei Stücke mit dem Biopsy-Puncher ausgestochen und in ein Eppendorf-Gefäß, das 500 µl der Erstfixierlösung enthält (je nach Versuch temperiert auf 4 °C bzw. 37°C), gegeben.
- Das Gefäß wird zuerst für 15 Minuten bei RT stehen gelassen und anschließend über Nacht bei 4°C verwahrt.
- Anschließend werden die ausgestochenen Folien dreimal für je 10 Minuten mit 0,1 M PIPES (4°C) gespült.
- Zur Zweitfixierung werden die Membranen für 1 h mit 500 µl Zweitfixierlösung auf Eis inkubiert.

Die folgenden Schritte erfolgen auf Eis, die Volumina betragen zwischen 300 und 500 µl, wichtig ist, dass die Membranen bedeckt sind.

- Die ausgestochenen Transwellmembranen werden zweimal mit 0,1 M PIPES (4°C) gespült.
- Zweimaliges Spülen mit H₂O_{bd} (4°C).
- Zur schrittweisen Steigerung des Ethanol-Gradienten werden die Membranen zweimal für je 10 Minuten mit 50% EtOH inkubiert.
- Anschließend erfolgt die zweimalige Inkubation für je 10 Minuten mit 70% EtOH.
- Die Membranen werden für zweimal 10 Minuten mit 95% EtOH inkubiert.
- Zuletzt erfolgt eine viermalige Inkubation zu je 15 Minuten mit 100% EtOH

Als Einbettungsharz wird LR White, ein aromatisches Polyhydroxy-Acryl Harz, verwendet. Der Gehalt desselben im Inkubationsmedium wird schrittweise erhöht.

- Die Membranen werden für 1 h mit einer Mischung aus LR White/EtOH im Verhältnis 1:2 inkubiert.
- Anschließend wird der Gehalt des Einbettungsharzes erhöht, eine einstündige Inkubation 1 h mit LR White/EtOH im Verhältnis 1:1 wird durchgeführt.
- Eine Inkubation für 1 h mit LR White/EtOH 2:1 folgt.
- Zuletzt werden die Membranen 1 h mit reinem LR White inkubiert.

- Die Membranen werden in Gelatinekapseln transferiert, diese werden mit LR White befüllt, sodass der Anteil von Luft innerhalb der Kapseln minimal. Die Aushärtung erfolgt für 48 h bei 60 °C.

Verwendete Reagenzien

Reagenz	Konzentration	Firma
Piperazin-N,N'-Bis(2-ethanolsulfonsäure)	/	Roth
LR White Einbettungsharz	/	Pelco

6.10. Bestimmung des Platingehalts in Zell-DNA mittels ICP-MS

Ausstreuen und Inkubation der Zellen

- $3,5 \times 10^6$ HT29 werden in 20 ml DMEM (10% FKS, 1% P/S) in großen Zellkulturschalen (152 cm²) ausgestreut, Anwachszeit beträgt 48 h bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂.
- Die Inkubation erfolgt mit Pt-CD 2 bzw. Pt-CD 3 in den Konzentrationen 1000, 100, 1 und 0,1 ng/cm² in DMEM (10% FKS, 1% P/S), Medium und β-CD (Einwaage wie jene von 1000ng/cm² Pt-CD) sind Negativkontrollen, 10 μM Cisplatin Positivkontrolle. Letzteres wird zuerst 100-fach konzentriert erstellt und anschließend verdünnt, da die Einwaage-Menge bei direkter Herstellung der einfachen Lösung zu gering wäre.
- Die Pt-CD-Suspensionen werden wie unter Abschnitt Xy erwähnt vor Gebrauch sonOberflächeiziert, die Cisplatin-Lösung 5 min ins Ultraschallbad gestellt.
- Die Inkubationszeiten betragen 1 und 24 h.

Aufarbeitung der Zellen

- Sämtliche Reagenzien sollen 37 °C warm sein und so weit möglich Pipetten mit Filterspitzen verwendet werden.
- Der Medium-Überstand wird abgekippt und Reste mit der Pipette abgenommen.
- Zellen 2-mal mit je 5 ml PBS waschen, Rest mit Pipette abnehmen.

- 2 ml Trypsin auf Zellrasen, Inkubation für 1 min bei 37 °C.
- Zellen sachte abklopfen, das Vereinzeln der Zellen erfolgt mittels 5 ml Pipette, anschließende wird die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt.
- Zur Zellzahlbestimmung werden 20 µl Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 180 µl Trypanblau gemischt und anschließende die Viabilität und Zellzahl nach Abschnitt 6.5.5 bestimmt. Die Viabilität sollte nicht weniger als 95% betragen.
- 5×10^6 Zellen werden in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß übertragen und für 10 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert.
- Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 1 ml PBS, vorsichtig umspült und resuspendiert.
- Es wird nochmals für 10 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und nochmals bei denselben Bedingungen zentrifugiert.
- Schließlich wird der PBS-Überstand abgenommen und das Zell-Pellet in 200 µl PBS resuspendiert.

DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA aus den Zellen erfolgt mittels QIAGEN DNeasy Blut und Gewebe Kit. Dessen Technik zur Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Zell- bzw. Gewebeproben beruht auf einer Silica-Membran-Technik im Kleinformat. Nach Lyse der Zellwände mittels Proteinase K wird das Zellgemisch in Mini-LC-Säulchen, sog. „Spin-Säulchen“, überführt. Diese können in 2 ml Reaktionsgefäßen befestigt werden, durch Zentrifugalkraft wird eine Retardierung der DNA auf der stationären Phase durchgeführt. Kurze Zentrifugationsschritte erlauben so die Bindung von auf dem Säulchen, diese wird im Anschluss in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert. Diese Methode ermöglicht eine rasche Isolation und effiziente Aufreinigung von DNA aus Zellproben [Qiagen]. Die Konzentration der Nukleinsäuren wird mittels NanoDrop (Peqlab Biotechnology) bestimmt, das Gerät misst die charakteristische DNA-Absorption bei 260 nm und 280 nm, wodurch auch auf die Reinheit der Probe geschlossen werden kann.

Die Isolierung der DNA erfolgt nach Anleitung des Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits [Qiagen].

- Zu den 200 µl Zell-PBS-Suspension werden 20 µl Proteinase K gegeben (4°C) und durchmischt

- 200 µl Puffer AE werden hinein pipettiert, homogenisiert und die Mischung wird für 10 min bei 56°C inkubiert.
- 200 µl EtOH (96%) werden hinzu pipettiert
- Die Mischung wird nun in ein Spin-Säulchen übertragen und für 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert
- Das Säulchen wird in eine neues 2 ml Sammelgefäß gesteckt und 500 µl des AW1 Puffers zugegeben. Nochmalige Zentrifugation für 1 min bei 9000 rpm
- Das Säulchen wird in ein neues 2 ml Sammelgefäß gesteckt und 500 µl des AW 2 Puffers zugegeben. Zentrifugation für 3 min bei 14000 rpm (20000g). Durch diesen Schritt wird die Membran getrocknet, weshalb nach anschließendem Kontakt zwischen Säulchen und Eluat eine nochmalige Zentrifugation für 1 min bei 14000 rpm (20000g) von Nöten ist.
- Spin-Säulchen in neues 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß einfügen und mit 200 µl des AE Puffers DNA eluieren. Dieser Schritt wird anschließend nochmals durchgeführt, sodass am Ende rund 400 µl DNA-hältiges Eluat vorliegen.

Bestimmung des DNA-Gehaltes mittels NanoDrop 2000

- Der NanoDrop ist ein UV-Vis-Photospectrometer, dies über die spezifische Absorption von Nukleinsäuren bei 280 nm deren Konzentration in Lösung berechnet [Thermo Scientific].
- Die Linse des Gerätes wird vor Messung mittels RNase freiem H₂O_{dest} gesäubert.
- Als Blindwert dient das Elutionsmedium (RNase freies H₂O_{dest} bzw. AE Puffer), dieses wird zuerst im Zuge der Blindwert-Bestimmung gemessen.
- Die Proben werden je 3-mal gemessen, um Fluktuationen innerhalb der DNA-Lösung auszuschließen. Es werden 1,5 µl aufgetragen.
- NanoDrop misst die Absorptionen bei 280 nm (DNA) und 260 nm (Proteine) und berechnet die DNA-Konzentration. Das 260/280-Verhältnis gibt Auskunft über die Reinheit des Eluats.

Optimierung der DNA-Isolierung

Da sich die Ausbeuten der DNA nach Isolierung mit Qiagen Kit unter Anweisung des Standardprotokolls in niedrigen Bereichen, teilweise bei unter 50 ng/µl, bewegen, werden ein paar Versuche zur Erhöhung der Konzentration durchgeführt. Hierbei werden einerseits die Zellzahlen, die zur Isolierung herangezogen wurden, andererseits die Elutionsbedingungen variiert (siehe Tabelle 6.4).

Tabelle 6.4 Optimierung der DNA-Ausbeute durch Variation von Zellzahl und Elutionsmedium. X bedeutet, dass für diese Zellzahl der entsprechende Elutionsschritt durchgeführt wurde.

Zellzahl [$\times 10^6$]	Elution mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ RNase frei	Elution mit Puffer AE
3		X
4		X
5	X	X
6		X

Veraschung

Um die bei der MS störenden organischen Komponenten im DNA-Eluat zu entfernen, werden diese mittels nass-chemischer Veraschung durch hochreine HNO_3 und H_2O_2 im Verhältnis 1:1 oxidiert, sodass Pt im Eppendorf-Gefäß verbleibt, der Rückstand wurde anschließend auf 3 ml mit 3,5 %-iger HNO_3 aufgefüllt und gemessen.

Es wurden auch Mikrowellenaufschlüsse durchgeführt, dabei wurden die Proben nach Isolierung mit 161,5 μl HNO_3 aufgefüllt für 5 Minuten bei 500 W und 200 °C erhitzt, anschließend wurde die Temperatur für 10 Minuten bei 200 °C (1000 W) gehalten, zum Schluss wurde für 10 Minuten abgekühlt und die Proben mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ auf 3 ml aufgefüllt ($\triangleq 3,5\%$ (v/v)).

Zu den 3 ml HNO_3 -Lösung wurden zuletzt jeweils die internen Standards In und Re hinzugegeben und die fertige Probe mittels ICP-MS vermessen.

ICP-MS

Die massenspektroskopischen Messungen wurden nach Ionisierung der Proben mittels induktiv gekoppeltem Plasma (ICP – ‚Inductively coupled Plasma‘) in einem Agilent 7500ce Massenspektrometer im ‚No Gas‘ Modus durchgeführt. Das Gerät verfügt über einen Zerstäuber mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit Nickel-Düse. Die Energie der Radiofrequenz zur Generierung des Plasmas betrug 1500 W, die Fließgeschwindigkeit des Trägergases 0,87 l/min und jene des Make-Up-Gases 0,24 l/min. Die Analyse wurde bei einer konstanten Sprühkammer-Temperatur von 2 °C durchgeführt. ^{194}Pt und ^{195}Pt wurden zusammen mit ^{115}In (0,5 ng/ml, CPI International, Santa Rosa, CA) und ^{187}Re gemessen, die

Integrationszeit betrug 0,3 s. Proben wurden mittels Autosampler (ASX-520, CETAC) in einer Laminar Flow Box von Spetec (FBS2 37) injiziert. Re (1 ng/ml CPI International, Santa Rosa, CA) wurde als interner Standard verwendet. Kalibriert wurde von 0,05 µg/ml bis 20 µg/ml. Die Platinstandards wurden durch Verdünnung einer 1000 (± 3 µg/ml) Ein-Element (?) Pt-Lösung hergestellt (5% HNO₃; CPI international, USA). Für Pt lag die Nachweisgrenze bei 8 ng/ml und die Quantifizierungsgrenze bei 28 ng/ml.

Verwendete Chemikalien

Reagenz	Firma
H ₂ O ₂ purum	Polycarbonatmembran
HNO ₃ purum	4,67
DNeasy Kit	Qiagen

6.11. Probenvorbereitung für Elektronenmikroskopie

Um Zellen für das Erstellen einer Elektronenmikroskopie-Aufnahme zu präparieren, müssen sie in ein Harz eingebettet werden, so wird die mechanische Behandlung möglich. Die Fixierung vorab dient der Konservierung der Zellstrukturen, ohne dass es zu Veränderungen der toten Zelle, verglichen mit dem Zustand der lebenden, kommt. Dies beinhaltet das Anhalten von destruktiven autokatalytischen Prozessen, sowie den Schutz vor mechanischen Schäden während der Aufarbeitung. Der verwendete Puffer sollte physiologischen pH (pH = 7,4) haben, da es sonst im Zuge der Erstfixierung, sollte diese bei falschem pH durchgeführt werden, zur Bildung von Artefakten kommt. Ebenso muss auf die entsprechende Osmolarität geachtet werden, da die Zelle sonst aufgrund osmotischer Effekte schrumpft oder anschwillt.

Folgende Schritte werden bei der Probenvorbereitung von Zellen für die Elektronenmikroskopie durchgeführt:

► Primärfixierung

Eine Mischung aus Glutardialdehyd und max. 4 % Formaldehyd wird verwendet. Glutardialdehyd wird aufgrund seiner Fähigkeit, die Aminosäuren von Proteinen durch Reaktion mit den beiden Aldehydfunktionen quervernetzen, eingesetzt.

► Waschen

► **Sekundärfixierung**

Osmiumtetroxid (OsO_4) ist ein starkes Oxidationsmittel, das mit Proteinen und Lipiden, speziell Phospholipiden mit Doppelbindungen, reagiert und diese quervernetzt. Dadurch stabilisiert es vor allem Membranen. Das reduzierte Schwermetall verleiht der fixierten Zelle durch seine dunkelgraue Färbung zusätzlich Kontrast für die Mikroskopie. Es wird in einer Endkonzentration von 1 - 2 % eingesetzt.

► **Dehydrierung**

Dehydrierung ist der Prozess, bei dem das Wasser innerhalb der Zellstrukturen mit einer Flüssigkeit ersetzt wird, die als Lösungsmittel im Übergang vom wässrigen Zellumfeld zum hydrophoben Einbettungsharz dient. Bevorzugt wird Ethanol verwendet.

► **Infiltration mit dem Übergangs-Lösungsmittel**

Das Wasser wird im Zuge der Dehydrierung schrittweise durch das Lösungsmittel ersetzt, bis sich die fixierten Zellen zuletzt in abs. EtOH (100 %) befinden und in das Polymerharz gegeben werden können.

► **Infiltration mit dem Einbettungsharz**

Die Ethanolmoleküle in den entwässerten Zellen werden von den Monomeren des Einbettungsharzes ersetzt.

► **Aushärten**

Dem Einbettungsharz in und um die Zellen wird die entsprechende Temperatur und Zeit gegeben, zu härten.

7. Literatur

- K. L. Aillon, Y. Xie, N. El-Gendy, C. J. Berkland and M. L. Forrest, Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity, *Journal*, 61, 2009, 457-466
- E. Alessio, *Bioinorganic medicinal chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH,
- K. Apel and H. Hirt, REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Journal*, 55, 2004, 373-399
- Aquanova, 17.8.2012, http://aquanova.de/media/public/pm2006/PM_AQUANOVA_30_08_06_d_final.pdf
- L. Araujo, R. Lobenberg and J. Kreuter, Influence of the surfactant concentration on the body distribution of nanoparticles, *Journal*, 6, 1999, 373-85
- J. K. Armstrong, R. B. Wenby, H. J. Meiselman and T. C. Fisher, The Hydrodynamic Radii of Macromolecules and Their Effect on Red Blood Cell Aggregation, *Journal*, 87, 2004, 4259-4270
- S. Artelt, O. Creutzenberg, H. Kock, K. Levsen, D. Nachtigall, U. Heinrich, T. Rühle and R. Schlögl, Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: a model study, *Journal*, 228, 1999a, 219-242
- S. Artelt, H. Kock, H. P. König, K. Levsen and G. Rosner, Engine dynamometer experiments:

platinum emissions from differently aged three-way catalytic converters, *Journal*, 33, 1999b, 3559-3567

P. V. Asharani, N. Xinyi, M. P. Hande and S. Valiyaveetil, DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles, *Journal*, 5, 2010, 51-64

M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G. V. Lowry, J.-P. Jolivet and M. R. Wiesner, Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, *Journal*, 4, 2009, 634-641

N. Bagchi, What makes silica toxic?, *Journal*, 49, 1992, 163-6

M. Ban, I. Langonne, M. Goutet, N. Huguet and E. Pepin, Simultaneous analysis of the local and systemic immune responses in mice to study the occupational asthma mechanisms induced by chromium and platinum, *Journal*, 277, 2010, 29-37

C. Barbante, A. Veyseyre, C. Ferrari, K. Van De Velde, C. Morel, G. Capodaglio, P. Cescon, G. Scarponi and C. Boutron, Greenland Snow Evidence of Large Scale Atmospheric Contamination for Platinum, Palladium, and Rhodium, *Journal*, 35, 2001, 835-839

M. Berger, Nano-society pushing the boundaries of technology, Royal Society of Chemistry, 2009B.

Bhushan, Springer handbook of nanotechnology, Springer, 2007

B. Block, POL-Leitsymptome Gastrointestinaltrakt: Leber, Pankreas und biliäres System, Georg Thieme Verlag, 2006

B. Bocca, A. Alimonti, A. Cristaudo, E. Cristallini, F. Petrucci and S. Caroli, Monitoring of the exposure to platinum-group elements for two Italian population groups through urine analysis, *Journal*, 512, 2004, 19-25

U. Bolm-Audorff, H. G. Bienfait, J. Burkhard, A. H. Bury, R. Merget, G. Pressel and G. Schultze-Werninghaus, Prevalence of respiratory allergy in a platinum refinery, *Journal*, 64, 1992, 257-60

A. M. D. Bonetti, Platinum and other heavy metal compounds in cancer chemotherapy : molecular mechanisms and clinical applications, Humana ; London : Springer [distributor], 2008

H. J. Boxberger, Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken, 2007

E. Boysen and N. Muir, Nanotechnology for dummies, Wiley ; Chichester : John Wiley [distributor], 2011

J. J. Bozzola, L. D. Russell and NetLibrary Inc., Electron microscopy principles and techniques for biologists, Jones and Bartlett, 2010

R. A. Bradshaw and E. A. Dennis, Regulation of organelle and cell compartment signaling, Elsevier/Academic Press

D. Brown, I. Kinloch, U. Bangert, A. Windle, D. Walter, G. Walker, C. Scotchford, K. Donaldson and V. Stone, An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis, *Journal*, 45, 2007, 1743-1756

BUND, 26.04. 2012, <http://www.fibl.org/fileadmin/documents/en/switzerland/organic-facts/bund-studie-nano-lebensmittel.pdf>

S. Burma, ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks, *Journal*, 276, 2001, 42462-42467

E. V. Buzaneva and P. Scharff, Frontiers of multifunctional integrated nanosystems, Kluwer Academic, 2004

G. Cao and J. Brinker, Annual Reviews of Nano Research, Band 2, 2008

C. Carlson, S. M. Hussain, A. M. Schrand, L. K. Braydich-Stolle, K. L. Hess, R. L. Jones and J. J. Schlager, Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species, *Journal*, 112, 2008, 13608-13619

T. Cedervall, I. Lynch, M. Foy, T. Berggard, S. C. Donnelly, G. Cagney, S. Linse and K. A. Dawson, Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles, *Journal*, 46, 2007, 5754-6

S. Chakravarthy, Y. Bao, V. A. Roberts, D. Tremethick and K. Luger, Structural characterization of histone H2A variants, *Journal*, 69, 2004, 227-34

J. A. Champion and S. Mitragotri, Role of target geometry in phagocytosis, *Journal*, 103, 2006, 4930-4

Q. Chaudhry, L. Castle and R. D. Watkins, Nanotechnologies in food, RSC, 2010

B. D. Chithrani, A. A. Ghazani and W. C. W. Chan, Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, *Journal*, 6, 2006, 662-668

K. Cho, J. Park, T. Osaka and S. Park, The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient, *Journal*, 51, 2005, 956-960

R. B. Ciccarelli, M. J. Solomon, A. Varshavsky and S. J. Lippard, In vivo effects of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) on SV40 chromosomes: differential repair, DNA-protein cross-linking, and inhibition of replication, *Journal*, 24, 1985, 7533-40

Cientifica, 26.04. 2012, <http://www.cientifica.com/research/market-reports/nanotech-funding-2011/>

A. Clark, A. Zhu, K. Sun and H. R. Petty, Cerium oxide and platinum nanoparticles protect cells from oxidant-mediated apoptosis, *Journal*, 13, 2011, 5547-5555

M. J. D. Clift, P. Gehr and B. Rothen-Rutishauser, Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative, *Journal*, 85, 2010, 723-731

A. W. Coleman, I. Nicolis, N. Keller and J. P. Dalbiez, Aggregation of Cyclodextrins - an Explanation of the Abnormal Solubility of Beta-Cyclodextrin, *Journal*, 13, 1992, 139-143

C. Colombo, A. J. Monhemius and J. A. Plant, Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung fluids, *Journal*, 71, 2008, 722-730

K. M. Comess, J. N. Burstyn, J. M. Essigmann and S. J. Lippard, Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site- specifically placed cis-diamminedichloroplatinum(II) DNA adducts, *Journal*, 31, 1992, 3975-3990

S. D. Conner and S. L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell, *Journal*, 422, 2003, 37-44

CosmeticsBusiness, 17.8.2012,
http://www.cosmeticsbusiness.com/technical/article_page/Nanotechnology__keeping_cosmetics_out_of_the_courtroom/60306

J. Cveticanin, G. Joksic, A. Leskovic, S. Petrovic, A. V. Sobot and O. Neskovic, Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells, *Journal*, 21, 2010, 015102

L. N. Daniel, Y. Mao, A. O. Williams and U. Saffiotti, Direct interaction between crystalline silica and DNA - a proposed model for silica carcinogenesis, *Journal*, 21 Suppl 2, 1995, 22-6

M. E. Davis and M. E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future, *Journal*, 3, 2004, 1023-1035

R. Davis, *International Assessment of Research and Development in Catalysis by nanostructured Materials*, Imperial College Press, 2011

K. A. Dawson, A. Salvati and I. Lynch, Nanotoxicology: Nanoparticles reconstruct lipids, *Journal*, 4, 2009, 84-85

M. P. Desai, V. Labhasetwar, G. L. Amidon and R. J. Levy, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size, *Journal*, 13, 1996, 1838-45

M. P. Desai, V. Labhasetwar, E. Walter, R. J. Levy and G. L. Amidon, The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent, *Journal*, 14, 1997, 1568-73

K. Donaldson, 14.06 2012, http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/documents/ev_20081002_co03_en.pdf

K. Donaldson, *Nanotoxicology*, *Journal*, 61, 2004, 727-728

K. Donaldson, D. Brown, A. Clouter, R. Duffin, W. MacNee, L. Renwick, L. Tran and V. Stone, The pulmonary toxicology of ultrafine particles, *Journal*, 15, 2002, 213-20

M. S. Ehrenberg, A. E. Friedman, J. N. Finkelstein, G. Oberdorster and J. L. McGrath, The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells, *Journal*, 30, 2009, 603-10

A. Elder, H. Yang, R. Gwiazda, X. Teng, S. Thurston, H. He and G. Oberdörster, Testing Nanomaterials of Unknown Toxicity: An Example Based on Platinum Nanoparticles of Different Shapes, *Journal*, 19, 2007, 3124-3129

J. H. Eldridge, C. J. Hammond, J. A. Meulbroek, J. K. Staas, R. M. Gilley and T. R. Tice, Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the peyer's patches, *Journal*, 11, 1990, 205-214

B. Elliott and M. Jasin, Double-strand breaks and translocations in cancer, *Journal*, 59, 2002, 373-85

Empfehlung Nr. 2011/696 der europäischen Kommission und des Rates, 2011

P. Enghag, *Encyclopedia of the elements : technical data, history, processing, applications*, Wiley-VCH, 2004

M. D. Evans and M. S. Cooke, *Oxidative damage to nucleic acids*, Landes Bioscience Springer Science+Business Media

B. Fadeel, A. Pietroiusti and A. A. Shvedova, *Adverse effects of engineered nanomaterials exposure, toxicology, and impact on human health*, Elsevier/Academic Press, 17.8. 2012
<http://www.columbia.edu/cgi-bin/cul/resolve?clio9694507>

K. R. Fath and D. R. Burgess, *Microvillus Assembly: Not actin alone*, *Journal*, 5, 1995, 591-593

F. Fay and C. J. Scott, *Antibody-targeted nanoparticles for cancer therapy*, *Journal*, 3, 2011, 381-394
 FEI Company, 17.8. 2012
http://www.fei.com/uploadedFiles/DocumentsPrivate/Content/2006_06_Strata400_STEM_pb.pdf

R. Feynman, *There's plenty of room at the bottom*, *Journal*, 1959

B. Fubini, G. Zanetti, S. Altilia, R. Tiozzo, D. Lison and U. Saffiotti, *Relationship between surface properties and cellular responses to crystalline silica: studies with heat-treated cristobalite*, *Journal*, 12, 1999, 737-45

R. Garrett and C. M. Grisham, *Biochemistry*, Thomson Brooks/Cole, 2005

J. Garside, A. Mersmann and J. Ny\ vlt, *Measurement of crystal growth and nucleation rates*, Institution of Chemical Engineers, 2002

H. Gehrke, J. Pelka, C. G. Hartinger, H. Blank, F. Bleimund, R. Schneider, D. Gerthsen, S. Bräse, M. Crone, M. Türk and D. Marko, *Platinum nanoparticles and their cellular uptake and DNA platination at non-cytotoxic concentrations*, *Journal*, 85, 2011, 799-812

L. A. Giannuzzi and F. A. Stevie, *Introduction to Focused Ion Beams Instrumentation, Theory, Techniques and Practice*, Springer, 2008

Global Information Inc., *Nanotechnology in Medical Applications: The Global Market*, *Journal*, 2012

B. Gómez, M. A. Palacios, M. Gómez, J. L. Sanchez, G. Morrison, S. Rauch, C. McLeod, R. Ma, S. Caroli, A. Alimonti, F. Petrucci, B. Bocca, P. Schramel, M. Zischka, C. Petterson and U. Wass, *Levels and risk assessment for humans and ecosystems of platinum-group elements in the airborne particles and road dust of some European cities*, *Journal*, 299, 2002, 1-19

G. Gonzalez-Gaitano, P. Rodriguez, J. R. Isasi, M. Fuentes, G. Tardajos and M. Sanchez, *The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy*, *Journal*, 44, 2002, 101-105

G. Greßler, *Nanotechnologie in Kosmetika*, *Journal*, Nr. 008, 2009

Z. Guo, L. Tan and Books24x7 Inc., *Fundamentals and applications of nanomaterials*, Artech House

J.-R. Gurr, A. S. S. Wang, C.-H. Chen and K.-Y. Jan, *Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells*, *Journal*, 213, 2005, 66-73

J. B. Hall, M. A. Dobrovolskaia, A. K. Patri and S. E. McNeil, *Characterization of nanoparticles for therapeutics*, *Journal*, 2, 2007, 789-803

T. Hamasaki, T. Kashiwagi, T. Imada, N. Nakamichi, S. Aramaki, K. Toh, S. Morisawa, H. Shimakoshi, Y. Hisaeda and S. Shirahata, *Kinetic analysis of superoxide anion radical-scavenging and hydroxyl radical-scavenging activities of platinum nanoparticles*, *Journal*, 24, 2008, 7354-64

D. L. Hartl and E. W. Jones, *Genetics : analysis of genes and genomes*, Jones and Bartlett Publishers, 2001

Y. He, P. Fu, X. Shen and H. Gao, *Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy*, *Journal*, 39, 2008, 495-516

A. Hillery, P. Jani and A. Florence, *Comparative, Quantitative Study of Lymphoid and Non-Lymphoid Uptake of 60 nm Polystyrene Particles*, *Journal*, 2, 1994, 151-156

J. F. Hillyer and R. M. Albrecht, *Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles*, *Journal*, 90, 2001, 1927-36

L. R. Hirsch, R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas and J. L. West, *Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance*, *Journal*, 100, 2003, 13549-54

HKC, *Study:Nanotechnology in Food and Food Processing Industry Worldwide*, *Journal*, 2010

P. S. Hooda, A. Miller and A. C. Edwards, The plant availability of auto-cast platinum group elements, *Journal*, 30, 2008, 135-139

K. Hoppstock, F. Alt, K. Cammann and G. Weber, Determination of Platinum in Biotic and Environmental Materials .2. A Sensitive Voltammetric Method, *Journal*, 335, 1989, 813-816

M. Horie, H. Kato, S. Endoh, K. Fujita, K. Nishio, L. K. Komaba, H. Fukui, A. Nakamura, A. Miyauchi, T. Nakazato, S. Kinugasa, Y. Yoshida, Y. Hagihara, Y. Morimoto and H. Iwahashi, Evaluation of cellular influences of platinum nanoparticles by stable medium dispersion, *Journal*, 3, 2011, 1244

M. Horie, K. Nishio, K. Fujita, H. Kato, A. Nakamura, S. Kinugasa, S. Endoh, A. Miyauchi, K. Yamamoto, H. Murayama, E. Niki, H. Iwahashi, Y. Yoshida and J. Nakanishi, Ultrafine NiO Particles Induce Cytotoxicity in Vitro by Cellular Uptake and Subsequent Ni(II) Release, *Journal*, 22, 2009, 1415-1426

P. Houdy, M. Lahmani, F. Marano and SpringerLink (Online service), *Nanoethics and nanotoxicology*, Springer,, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-20177-6>

R. J. Hunter, *Zeta potential in colloid science : principles and applications*, Academic Press, 1981

ISO/TS27687:2008, 2008

P. U. Jani, D. E. McCarthy and A. T. Florence, Nanosphere and microsphere uptake via Peyer's patches: observation of the rate of uptake in the rat after a single oral dose, *Journal*, 86, 1992, 239-246

L. Jean-Soro, A. Oleron-Hamdous, B. Béchet and M. Legret, Evaluation of platinum distribution between different soil components, *Journal*, 2012

P. G. Jenkins, K. A. Howard, N. W. Blackball, N. W. Thomas, S. S. Davis and D. T. O'Hagan, Microparticulate absorption from the rat intestine, *Journal*, 29, 1994, 339-350

J. Jiang, G. Oberdörster and P. Biswas, Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *Journal*, 11, 2008a, 77-89

W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka and W. C. W. Chan, Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent, *Journal*, 3, 2008b, 145-150

Johnson Matthey, *Platinum 2011*, *Journal*, 2011

Johnson Matthey, "Platinum 2012", *Journal*, 56, 2012, 200-201

Joint Reserach Centre, *Nanomedicine: Drivers for development and possible impacts*, *Journal*, 2008

M. Kajita, K. Hikosaka, M. Iitsuka, A. Kanayama, N. Toshima and Y. Miyamoto, Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide, *Journal*, 41, 2007, 615-626

M. Karkare, *Nanotechnology: Fundamentals And Applications*, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2008

H. L. Karlsson, P. Cronholm, J. Gustafsson and L. Möller, Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes, *Journal*, 21, 2008, 1726-1732

K. Katao, R. Honma and S. Kato, Influence of Platinum Nanoparticles orally administered to rats evaluated by systematic gene expression profiling, *Journal*, 60, 2011, 33-45

J. Katra, 26.04.2012, http://www.janekatra.org/persistent_current.htm

K. K. Khanna and S. P. Jackson, DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, *Journal*, 27, 2001, 247-54

J. Kim, M. Takahashi, T. Shimizu, T. Shirasawa, M. Kajita, A. Kanayama and Y. Miyamoto, Effects of a potent antioxidant, platinum nanoparticle, on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*, *Journal*, 129, 2008, 322-31

J. S. Kim, T. J. Yoon, K. N. Yu, B. G. Kim, S. J. Park, H. W. Kim, K. H. Lee, S. B. Park, J. K. Lee and M. H. Cho, Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice, *Journal*, 89, 2006a, 338-47

J. S. Kim, T. J. Yoon, K. N. Yu, M. S. Noh, M. Woo, B. G. Kim, K. H. Lee, B. H. Sohn, S. B. Park, J. K. Lee and M. H. Cho, Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells, *Journal*, 7, 2006b, 321-6

R. Knippers, *Molekulare Genetik*, Georg Thieme Verlag, 2006

H. P. König, R. F. Hertel, W. Koch and G. Rosner, Determination of platinum emissions from a three-way catalyst-equipped gasoline engine, *Journal*, 26, 1992, 741-745

P. Kovacheva, Ion-exchange method for separation and concentration of platinum and palladium for analysis of environmental samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Journal*, 464, 2002, 7-13

K. Kümmerer and E. Helmers, Hospital effluents as a source for platinum in the environment, *Journal*, 193, 1996, 179-184

K. Kümmerer, E. Helmers, P. Hubner and M. Zwakenberg, European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources, *Journal*, 225, 1999, 155-165

Y. Kusaka, [Occupational diseases caused by exposure to sensitizing metals], *Journal*, 35, 1993, 75-87

A. Kuzminov, DNA replication meets genetic exchange: Chromosomal damage and its repair by homologous recombination, *Journal*, 98, 2001, 8461-8468

S. Lal, S. E. Clare and N. J. Halas, Nanoshell-Enabled Photothermal Cancer Therapy: Impending Clinical Impact, *Journal*, 41, 2008, 1842-1851

C. J. v. Leeuwen and T. Vermeire, Risk assessment of chemicals : an introduction, Springer, 2007

H. Li, X. Zhao, Y. Ma, G. Zhai, L. Li and H. Lou, Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles, *Journal*, 133, 2009, 238-244

Y. Li, Microelectronic Applications of Chemical Mechanical Planarization, Jon Wiley & Sons, Inc., 2008

M. Lichten, Rad50 connects by hook or by crook, *Journal*, 12, 2005, 392-3

M. R. Lieber, Pathological and Physiological Double-Strand Breaks, *Journal*, 153, 1998, 1323-1332

J. T. Lin, Enhancing the Through-thickness Thermal Conductivity of Carbon Fiber Polymer-Matrix Composites by Nanostructuring, State University of New York at Buffalo, Department of Mechanical and Aerospace Engineering, 2007

T. Lindl and G. Gstraunthaler, Zell- und Gewebekultur, Spektrum Akademischer Verlag, 2008

B. Lippert, Cisplatin : chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug, *Helvetica Chimica Acta ;Wiley-VCH*, 1999

Lloyd's, 26.04. 2012, <http://www.lloyds.com/~media/c6f557f00581437ea4b9325293731275.ashx>

K. Lu, Nanoparticulate Materials: Synthesis, Characterization and Processing, Wiley, 2013

Lux Research, 26.04.2012, <http://www.luxresearchinc.com/blog/2010/02/the-recessions-impact-on-nanotechnology/>

I. Lynch, Detecting Cryptic Epitopes Created by Nanoparticles, *Journal*, 2006, 2006, pe14-pe14

T. Y. Ma and J. M. Anderson, Tight junctions and the intestinal barrier. , 2006

S. C. Makrides, Gene transfer and expression in mammalian cells, Elsevier, 2003

J. L. Malo, Occupational rhinitis and asthma due to metal salts, *Journal*, 60, 2005, 138-139

Malvern Instrument Ltd. Zetasizer Nano User Manual MAN0317

F. Mathot, A. Schanck, F. Van Bambeke, A. Ariën, M. Noppe, M. Brewster and V. Pr at, Passive diffusion of polymeric surfactants across lipid bilayers, *Journal*, 120, 2007, 79-87

A. D. Maynard, D. B. Warheit and M. A. Philbert, The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond, *Journal*, 120 Suppl 1, 2011, S109-29

H. G. Merkus, Particle size measurement : fundamentals, practice, quality, Springer, 2009

MINChar Initiative, Minimum Information on Nanoparticle Characterization, *Journal*, 2009

S. Missailidis, Anticancer therapeutics, Wiley-Blackwell, 2008

L. Mu and S. S. Feng, Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol), *Journal*, 80, 2002, 129-44

H. Y. Nam, S. M. Kwon, H. Chung, S.-Y. Lee, S.-H. Kwon, H. Jeon, Y. Kim, J. H. Park, J. Kim, S. Her, Y.-K. Oh, I. C. Kwon, K. Kim and S. Y. Jeong, Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles, *Journal*, 135, 2009, 259-267

NanoScienceInstitute, *Journal*, 2008

Nanotechproject, 17.08.2012, http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/

D. Napierska, L. C. J. Thomassen, D. Lison, J. A. Martens and P. H. Hoet, The nanosilica hazard: another variable entity, *Journal*, 7, 2010, 39

National Nanotechnology Initiative, Report to the president and congress on the third assessment of the NNI, *Journal*, 2010

P. Nativo, I. A. Prior and M. Brust, Uptake and Intracellular Fate of Surface-Modified Gold Nanoparticles, *Journal*, 2, 2008, 1639-1644

A. Nel, T. Xia, L. Madler and N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel, *Journal*, 311, 2006, 622-7

Z. H. Nemeth, E. A. Deitch, C. Szabo and G. Hasko, Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells, *Journal*, 161, 2002, 987-96

F. Neugart, A. Zappe, F. Jelezko, C. Tietz, J. P. Boudou, A. Krueger and J. Wrachtrup, Dynamics of Diamond Nanoparticles in Solution and Cells, *Journal*, 7, 2007, 3588-3591
ÖAW, 26.04. 2012, <http://nanotrust.ac.at/>

G. Oberdörster, 12.06.2012, http://www.nanoagri2010.com/fao_mini_papers_extra_files.pdf

G. Oberdörster, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Journal*, 113, 2005, 823-39

G. Oberdörster, Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology, *Journal*, 267, 2010b, 89-105

G. Oberdörster, E. Oberdörster and J. Oberdörster, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Journal*, 113, 2005, 823-39

F. Osaki, T. Kanamori, S. Sando, T. Sera and Y. Aoyama, A Quantum Dot Conjugated Sugar Ball and Its Cellular Uptake. On the Size Effects of Endocytosis in the Subviral Region, *Journal*, 126, 2004, 6520-6521

J. D. Pardee, The actin cytoskeleton in cell motility, cancer, and infection, Morgan & Claypool Life Sciences, 2010

E.-J. Park, H. Kim, Y. Kim and K. Park, Intratracheal instillation of platinum nanoparticles may induce inflammatory responses in mice, *Journal*, 33, 2010, 727-735

J. Pelka, Dissertation - Biologische Wirkungen ausgewählter Nanostrukturen in Zellen des Gastrointestinaltrakts, *Journal*, 2010,

J. Pelka, H. Gehrke, M. Esselen, M. Turk, M. Crone, S. Brase, T. Müller, H. Blank, W. Send, V. Zibat, P. Brenner, R. Schneider, D. Gerthsen and D. Marko, Cellular uptake of platinum nanoparticles in human colon carcinoma cells and their impact on cellular redox systems and DNA integrity, *Journal*, 22, 2009, 649-59

D. Peters, M. Kastantin, V. R. Kotamraju, P. P. Karmali, K. Gujrati, M. Tirrell and E. Ruoslahti, Targeting atherosclerosis by using modular, multifunctional micelles, *Journal*, 106, 2009, 9815-9819

R. Peters, Introduction to Nucleocytoplasmic Transport, *Journal*, 322, 2006, 235-258

J. J. Powell, N. Faria, E. Thomas-McKay and L. C. Pele, Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract, *Journal*, 34, 2010, J226-J233

Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, 17.08.2012, <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/dneasytissuesystem/dneasybloodtissuekit.aspx#Tabs=t1>

Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit Handbook, 22.09.2012, www.qiagen.com/hb/dneasybloodtissuekit_en

Y. Qiu, Developing solid oral dosage forms : pharmaceutical theory and practice, Elsevier/Academic Press, 2009

S. Rauch, H. F. Hemond, C. Barbante, M. Owari, G. M. Morrison, B. Peucker-Ehrenbrink and U. Wass, Importance of Automobile Exhaust Catalyst Emissions for the Deposition of Platinum, Palladium, and Rhodium in the Northern Hemisphere, *Journal*, 39, 2005, 8156-8162

E. Riballo, M. Kühne, N. Rief, A. Doherty, G. C. M. Smith, M. a.-J. Recio, C. Reis, K. Dahm, A. Fricke, A. Krempler, A. R. Parker, S. P. Jackson, A. Gennery, P. A. Jeggo and M. Löbrich, A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to γ -H2AX Foci, *Journal*, 16, 2004, 715-724

E. Riedel and C. Janiak, Anorganische Chemie, 2011

A. d. Rieux, E. G. E. Ragnarsson, E. Gullberg, V. Pr at, Y.-J. Schneider and P. Artursson, Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium, *Journal*, 25, 2005, 455-465

Roche, Cytotoxicity Detection Kit Produktkatalog, 2011

E. P. Rogakou, DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139, *Journal*, 273, 1998, 5858-5868

E. P. Rogakou, Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo, *Journal*, 146, 1999, 905-916

E. P. Rogakou, C. Boon, C. Redon and W. M. Bonner, Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo, *Journal*, 146, 1999, 905-16

Y. Rosen and N. Elman, *Biomaterials Science An Integrated Clinical and Engineering Approach*, CRC Press Imprint

Taylor & Francis Group Distributor, 23.7. 2012, <http://www.columbia.edu/cgi-bin/cul/resolve?clio9675702>

S. Sapra, D. D. Sarma, S. Sanvito and N. A. Hill, Influence of Quantum Confinement on the Electronic and Magnetic Properties of (Ga,Mn)As Diluted Magnetic Semiconductor, *Journal*, 2, 2002, 605-608

K. D. Sattler and MATERIALSnetBASE., *Handbook of nanophysics. Nanomedicine and nanorobotics*, Taylor & Francis, 2011

Say People, 26.04.2012, <http://saypeople.com/2012/01/19/research-suggestions-of-nano-products-in-cancer-therapy/#axzz1t8PBbkZE>

SCENIHR, Scientific Basis for the Definition of the Term “nanomaterial”, *Journal*, 2010

R. Schierl, Environmental monitoring of platinum in air and urine, *Journal*, 67, 2000, 245-248

J. Schulte, *Nanotechnology*, 2005

S. G. Schultz, *Molecular biology of membrane transport disorders*, Plenum Press, 1996

W. A. Schulz, *Molecular biology of human cancers an advanced student's textbook*, Springer, 2005

M. Schwab, *Encyclopedia of cancer*, Springer, 2007

D. Shen, *Analysis of Hyperosmotic Response of Mammalian Cell Lines*, ProQuest LLC, UMI Microform 3346116,

L. J. Shen and F. L. Wu, Nanomedicines in renal transplant rejection--focus on sirolimus, *Journal*, 2, 2007, 25-32

M. Simkó, Are there any neurological effects and risks from nanoparticles to expect?, *Journal*, No. 021, 2011,

J. E. Skebo, C. M. Grabinski, A. M. Schrand, J. J. Schlager and S. M. Hussain, Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system, *Journal*, 26, 2007, 135-41

P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd, New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening, *Journal*, 82, 1990, 1107-1112

A. Smith, H. Duan, A. Mohs and S. Nie, Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging☆, *Journal*, 60, 2008, 1226-1240

G. A. Somorjai and Y. Li, *Introduction to surface chemistry and catalysis*, Wiley, 2010

G. Sonavane, K. Tomoda, A. Sano, H. Ohshima, H. Terada and K. Makino, In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size, *Journal*, 65, 2008, 1-10

M. Staritz, Side-effects of cancer chemotherapy on the gastrointestinal tract : pathophysiology, prophylaxis and therapy : Falk workshop, London : Kluwer Academic, 2003

W. H. Suh, K. S. Suslick, G. D. Stucky and Y.-H. Suh, *Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience*, *Journal*, 87, 2009, 133-170

J. A. Swanson and C. Watts, Macropinocytosis, *Journal*, 5, 1995, 424-428

J. G. Teeguarden, P. M. Hinderliter, G. Orr, B. D. Thrall and J. G. Pounds, Particokinetics In Vitro: Dosimetry Considerations for In Vitro Nanoparticle Toxicity Assessments, *Journal*, 95, 2006, 300-312

Thermo Scientific, 08.09.2012, <http://www.nanodrop.com/Productnd2000overview.aspx>

R. Thomas, *Practical guide to ICP-MS*, Marcel Dekker, 2004

V. Thoree, J. Skepper, H. Deere, L. C. Pele, R. P. H. Thompson and J. J. Powell, Phenotype of exogenous microparticle-containing pigment cells of the human Peyer's patch in inflamed and normal ileum, *Journal*, 57, 2008, 374-378

M. Türk, M. Crone and S. Müller, Preparation of supported metallic nanoparticles using supercritical fluids, *Journal*, 2012,

M. Türk, G. Upper, R. Maheswari, M. Schmidt and R. Gläser, Herstellung von mit Platin-Nanopartikeln beladenen porösen Modellträgern durch Reaktivabscheidung aus überkritischen Fluiden, *Journal*, 77, 2005, 1225-1225

University of British Columbia, 26.04.2012, http://www.zoology.ubc.ca/~bio463/lecture_3.htm

US Environmental Protection Agency, 21.04. 2011, <http://www.epa.gov/climatechange/science/recentac.html>

A. Verma and F. Stellacci, Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions, *Journal*, 6, 2010, 12-21

F. Vogel and A. G. Motulsky, *Human genetics : problems and approaches*, Springer, 1997

S. von Kleist, E. Chany, P. Burtin, M. King and J. Fogh, Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor, *Journal*, 55, 1975, 555-60

J. M. Walker, *The protein protocols handbook*, Humana Press, 17.5. 2012, <http://www.columbia.edu/cgi-bin/cul/resolve?clio8812893>

J. J. Watkins, J. M. Blackburn and T. J. McCarthy, Chemical Fluid Deposition: Reactive Deposition of Platinum Metal from Carbon Dioxide Solution, *Journal*, 11, 1999, 213-215

J. J. Watkins and T. McCarthy, Method of chemically depositing material onto a substrate, *Journal*, 1998,

H. Weber, *Nanotechnologie in der Lebensmittelindustrie*, B.Behr's Verlag, 2010

Wikipedia, 26.04. 2012, http://en.wikipedia.org/wiki/Potential_well

D. Wildhagen and V. Krivan, Determination of Platinum in Environmental and Geological Samples by Radiochemical Neutron-Activation Analysis, *Journal*, 274, 1993, 257-266

J. R. Williams and T. Clifford, *Supercritical fluid : methods and protocols*, Humana, 2000

T. Xia, M. Kovoichich, M. Liong, H. Meng, S. Kabehie, S. George, J. I. Zink and A. E. Nel, Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs, *Journal*, 3, 2009, 3273-3286

X. Xu, *Coherent Optical Spectroscopy of a Single Semiconductor Quantum Dot*, 2008

H. Yan, A. Nykanen, J. Ruokolainen, D. Farrar and A. F. Miller, Protein Fibrillar Hydrogels for three-Dimensional Tissue Engineering, *Journal*, 2009, 2009, 1-4

K. Yin Win and S.-S. Feng, Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Journal*, 26, 2005, 2713-2722

H. Yoshimoto, Y. M. Shin, H. Terai and J. P. Vacanti, A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering, *Journal*, 24, 2003, 2077-2082

Zaehlkammer.de, 12.5.2012, <http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>

E. A. Zannou, W. H. Streng and V. J. Stella, Osmotic properties of sulfobutylether and hydroxypropyl cyclodextrins, *Journal*, 18, 2001, 1226-31

Zentrale für Unterrichtsmedien, 18.4. 2012, <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/13/bs13-2.htm>

T. v. Zglinicki, *Aging at the molecular level*, Kluwer Academic Publishers, 2003

L. Zhang, L. Laug, W. Münchgesang, E. Pippel, U. Gösele, M. Brandsch and M. Knez, Reducing Stress on Cells with Apoferritin-Encapsulated Platinum Nanoparticles, *Journal*, 10, 2010, 219-223

Y. Zhang and C. Erkey, Preparation of supported metallic nanoparticles using supercritical fluids: A review, *Journal*, 38, 2006, 252-267

M. Zischka, P. Schramel, H. Muntau, A. Rehnert, M. Gomez Gomez, B. Stojanik, G. Wannemaker, R. Dams, P. Quevauviller and E. A. Maier, A new certified reference material for the quality control of palladium, platinum and rhodium in road dust, BCR-723, *Journal*, 21, 2002, 851-868

8. Anhang

Im Folgenden sind die gemessenen Daten zu den einzelnen Graphen in den Kapiteln bzw. nicht gezeigt Graphen aufgeführt.

A) Formeln

Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}): $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$

Standardabweichung (σ): $\sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$

Ausreißerberechnung nach Nalimov (r): $\frac{|x^* - \bar{x}|}{\sigma} \sqrt{\frac{n}{n-1}}$

Origin Pro8 berechnete die lineare Regression: $y = A + B \cdot x$ mit den Messpunkten (x/y):

y-Achsenabschnitt (A): $A = \frac{(\sum y_i)(\sum x_i^2) - (\sum x_i)(\sum x_i \cdot y_i)}{N}$

Fehler des y-Abschnitts (m_A): $m_A = \sqrt{\frac{S \sum x_i^2}{(n-2)N}}$

B) Daten

1. SRB-Assay

Tabelle 8.1 Absorption bei $\lambda = 570$ nm im SRB-Assay von HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit β -CD und Pt-NP < 20 nm. Darunter sind die Mittelwerte nach Ausreißer-Bereinigung als T/C in % dargestellt

HT29		β -CD [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]				Pt-NP < 20 nm [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]				Cisplatin
Passage	Medium	1	10	50	100	1	10	50	100	10 μM
18	1,7694				0,1152	1,7811	1,6609	0,7573	0,3652	0,0360
	1,7929				0,3898	1,8779	1,6781	1,0247	0,2823	1,2935
	1,8454				0,3880	1,8632	1,7596	0,7471	0,1032	1,4810
	1,8020				0,0567	1,9444	1,4804	0,6805	0,3074	1,6286
	1,8591				0,0821	1,7649	1,5896	0,7296	0,2862	1,4359
	1,3090				0,4062	1,6721	1,4098	0,7536	0,1537	1,3504
20	0,9938	0,8694	0,4560	0,4842	0,3047	0,7128	1,0469	0,3987	0,1722	0,5638
	1,1161	1,1270	1,1704	0,4356	0,3970	1,1581	1,2403	0,4293	0,0525	0,9108
	1,0270	1,2066	0,7716	0,5583	0,3948	0,8284	1,0401	0,5797	0,2527	0,8950
	1,2932	1,1937	1,1080		0,2503	1,0724	1,1782	0,0360	0,0921	0,7940
	1,1688	1,1470	1,0742		0,5321	1,2006	0,0350	0,0380	0,2864	0,7782
	1,0665	1,1591	1,1457		0,3864	1,0537	0,5253	0,9124	0,2739	0,8418
22	0,4428	0,6383	0,0370	0,2053	0,1205	0,7066	0,6971	0,2410	0,0664	1,0717
	0,7031	0,6466	0,0360	0,2764	0,1267	0,7890	0,6463	0,0607	0,1391	0,5678
	0,7058	1,4183	1,1076	0,3208	0,1870	0,6895	0,6319	0,2826	0,0273	0,4001
	0,8058	0,5767	0,6727	0,2539	0,3165	0,7651	0,8294	0,4022	0,0739	0,7551
	0,0907	0,6964	0,5619	0,1577	0,3126	0,8245	0,7177	0,2790	0,1682	0,5491
	0,8926	0,7318	0,5577	0,0801	0,1340	0,5783	0,0564	0,2988	0,0993	0,6941
25	0,3975	0,1477				0,4415	0,7607			
	0,4648	0,4879	0,4661			0,6096	0,5621			
	0,3986	0,5094	0,2778			0,4600	0,4554			
	0,4617	0,3872	0,4308			0,3844	0,4794			
	0,4250	0,4737	0,4038			0,5296	0,5585			
	0,4916	0,4251	0,3414			0,3552	0,4611			

MW (T/C) [%]	100,00	97,43	90,72	35,54	26,43	100,08	97,63	42,37	16,27	81,44
SD	11,90	19,74	14,99	12,75	12,88	15,11	20,20	6,28	7,05	10,53

Tabelle 8.2
 Absorption bei $\lambda = 570$ nm im SRB-Assay von HT29-Zellen nach 48-
 stündiger
 nach

Absorption bei $\lambda = 570$ nm im SRB-Assay von HT29-Zellen nach 48-
 stündiger Inkubation mit β -CD und Pt-NP < 20 nm. Darunter sind die Mittelwerte
 Ausreißer-Bereinigung als T/C in % dargestellt

HT29		β -CD [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]				Pt-NP < 20 nm [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]				Cisplatin
Passage	Medium	1	10	50	100	1	10	50	100	10 μM
20	0,2690	0,3594	0,3508	0,0327	0,0581	0,4638	0,2466	0,0981	0,0762	
	0,4752	0,3044	0,2234	0,0416	0,0739	0,1598	0,2457	0,0737	0,1196	
	0,4402	0,3749	0,4301	0,0611	0,0687	0,3762	0,2458	0,0577	0,0471	
	0,4378	0,3583	0,4884	0,0502	0,0533	0,3841	0,2838	0,0501	0,0438	
	0,3616	0,4992	0,4617	0,0529	0,0591	0,3818	0,2992	0,0475	0,0621	
	0,4077	0,3696	0,2759	0,0585	0,0293	0,3915	0,2781	0,0341	0,0284	
22	1,0398	1,2304	1,2397	0,0577	0,0486	1,2532	1,0896	0,0557	0,0353	0,5464
	0,9328	1,3399	1,1540	0,0786	0,0484	1,0614	1,1063	0,0549	0,0492	0,6926
	1,2295	1,2315	1,1258	0,0722	0,0512	1,2469	1,2496	0,0547	0,0543	0,8269
	1,2676	1,3144	1,2630	0,0685	0,0874	1,2651	1,2313	0,0842	0,0465	0,8604
	1,1873	1,3094	1,0342	0,0631	0,0853	1,2581	1,0985	0,0956	0,1076	0,7603
	1,0020	1,1565	0,6107	0,0499	0,1614	1,1042	0,8236	0,0735	0,0523	0,6433
25	0,8612	0,7933	0,7288	0,0802	0,0294	0,8361	0,8323	0,0699	0,0728	0,3998
	0,9004	0,9009	0,9772	0,1082	0,0432	0,9796	0,8695	0,0712	0,0187	0,3867
	0,8584	0,9554	0,9927	0,0117	0,0501	0,9913	0,9443	0,0602	0,0262	0,4116
	0,8854	0,9323	1,0809	0,1737	0,0199	1,0314	0,9458	0,0502	0,0341	0,5163
	0,7226	0,9494	0,8557	0,1026	0,0243	0,8881	0,8044	0,0607	0,0215	0,4757
	0,7716	0,5182	0,7768	0,0585	0,0339	0,7584	0,5093	0,0483	0,0250	0,2502

MW (T/C) [%]	100,00	102,70	98,08	9,40	7,92	104,50	96,22	8,41	6,48	61,53
SD	9,72	15,17	18,77	4,63	5,08	11,71	17,43	3,37	4,80	17,60

Tabelle 8.3
Absorption bei $\lambda = 570$ nm im SRB-Assay von HT29-Zellen nach 72-
stündiger
nach

Absorption bei $\lambda = 570$ nm im SRB-Assay von HT29-Zellen nach 72-
stündiger
Inkubation mit β -CD und Pt-NP < 20 nm. Darunter sind die Mittelwerte
Ausreißer-Bereinigung als T/C in % dargestellt

HT29		β -CD [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]				Pt-NP < 20 nm [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]				Cisplatin
Passage	Medium	1	10	50	100	1	10	50	100	10 μM
20	1,1075	0,0360	0,0380	0,0426	0,0442	0,5743	0,5530	0,0348	0,0343	0,2208
	1,1194	0,0380	1,0219	0,0380	0,0740	0,5038	0,1729	0,0410	0,0211	0,3632
	1,1557	0,6858	1,1541	0,0512	0,0269	0,8974	0,9616	0,0358	0,0372	0,3631
	0,9817	1,0317	0,9829	0,0575	0,0346	1,1153	0,8659	0,0326	0,0491	0,2358
	0,8818	0,9745	1,0528	0,0380	0,0434	0,9104	0,7091	0,0283	0,0327	0,3741
	0,8422	0,2026	0,2286	0,0581	0,0381		1,0928	0,0406	0,0310	0,1979
22	0,4489	0,5535	0,5064	0,0825	0,0511	0,5937	0,4622	0,5801	0,0239	0,1703
	0,7126	0,5559	0,3682	0,1038	0,1146	0,7678	0,5941	0,0883	0,0337	0,0625
	0,6422	0,7005	0,4707	0,0789	0,0663	0,7958	0,8058	0,0631	0,0422	0,2633
	0,4619	0,6686	0,4704	0,0490	0,1027	0,7719	0,6324	0,0165	0,0469	0,2250
	0,5518	0,7187	0,0409	0,0380	0,0593	0,5739	0,4515	0,0361	0,0282	0,2060
	0,5610	0,3905	0,1123	0,0399	0,0779	0,6329	0,5365	0,0257	0,0345	0,1867
25	0,5758	0,2865	0,0360			0,0370				
	0,5219	0,5872	0,2490			0,4479	0,3243			
	0,6124	0,5295	0,4371			0,3290	0,2429			
	0,7344	0,6685	0,4579			0,4803	0,4397			
	0,5251	0,5310	0,4710			0,5300	0,4623			
	0,5482	0,5688	0,3189			0,5990	0,4725			

MW (T/C) [%]	100,07	97,63	85,64	5,63	6,66	98,28	87,19	3,88	4,02	40,07
SD	13,71	28,28	18,20	1,67	6,16	24,43	21,99	2,25	1,91	13,65

2. LDH-Assay

Tabelle 8.4
stündiger
nach

Absorption bei $\lambda = 490$ nm im LDH-Assay von HT29-Zellen nach 24-
Inkubation mit β -CD und Pt-NP < 20 nm. Im Anschluss sind die Mittelwerte
Ausreißer-Bereinigung als T/C in % dargestellt.

HT29		β -CD [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]				Pt-NP < 20 nm [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]				Triton X
Passage	Medium	1	10	20	50	1	10	20	50	10%
26	0,2020	0,5385	0,5550		1,5961	0,2234	0,2289		1,0947	1,4768
	0,1068	0,2137	0,1990		1,7018	0,2174	0,2213		0,9874	1,2738
	0,1841	0,1934	0,3680		1,4362	0,1997	0,2148		0,4404	1,3016
	0,1700	0,1765	0,3226		1,4537	0,2124	0,2102		1,0366	1,2291
	0,1596	0,0445	0,3520		1,3464	0,2003	0,1864		0,8889	0,6865
	0,1633	0,1954	0,2185		1,3838	0,2576	0,1301		0,6988	1,3077
29	0,1737	0,3524	0,2878	0,2735	0,8271	0,5099	0,2997	0,6050	0,7307	1,0474
	0,2065	0,4085	0,2139	0,2311	0,5214	0,3665	0,2266	0,4195	0,6158	0,7394
	0,1897	0,1587	0,1682	0,1923	0,3008	0,2884	0,1729	0,2993	0,4332	0,5211
	0,2270	0,2179	0,1731	0,2039	0,4035	0,2689	0,2147	0,3857	0,5240	0,6536
	0,2455	0,2421	0,2049	0,2234	0,4507	0,2444	0,2251	0,3973	0,7059	0,7061
	0,3066	0,2568	0,2082	0,2350	0,6417	0,2511	0,2198	0,4825	0,9259	0,8747
14	0,2486	0,2391	0,2433	0,2603	0,7539	0,3660	0,1406	0,2584	0,8575	0,9351
	0,2644	0,2687	0,2495	0,2569	0,7999	0,2329	0,2430	0,2533	0,9015	1,6942
	0,2594	0,2811	0,2560	0,2573	0,8882	0,2422	0,2117	0,2358	0,9477	1,5305
	0,2862	0,2818	0,2761	0,2943	0,9529	0,2483	0,2154	0,2317	0,9990	1,4928
	0,2997	0,2299	0,2939	0,2910	0,9289	0,2703	0,2111	0,2811	0,9200	1,1918
	0,2464	0,2303	0,3316	0,2668	0,8920	0,2177	0,2687	0,2337	0,7554	1,1275

MW (T/C) [%]	0,00	3,50	7,98	0,10	51,38	3,44	0,64	15,90	71,83	100,00
SD	5,94	1,77	6,38	5,83	18,49	2,44	4,32	16,91	22,12	25,54

3. WST-Assay

Tabelle 8.5
Absorption bei $\lambda = 450$ nm im WST-Assay von HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit β -CD nach

Absorption bei $\lambda = 450$ nm im WST-Assay von HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit β -CD und Pt-NP < 20 nm. Im Anschluss sind die Mittelwerte Ausreißer-Bereinigung als T/C in % dargestellt.

HT29		β -CD [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]				Pt-NP < 20 nm [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]				Triton X
Passage	Medium	1	10	20	50	1	10	20	50	1%
26	0,1828	0,1830	0,1671		0,1768	0,1903	0,1733		0,1596	0,1814
	0,1702	0,1946	0,2081		0,1943	0,1876	0,1956		0,2002	-0,0677
	0,1979	0,2065	0,1779		0,1275	0,2045	0,1974		0,2219	0,1382
	0,2215	0,1941	0,1165		0,1666	0,0953	0,1797		0,1039	0,1026
	0,1820	0,1984	0,1851		0,1616	0,2564	0,1831		0,1839	0,1456
	0,1197	0,2069	0,2234		0,1629	0,1973	0,2259		0,2068	0,2296
28	0,1828	0,2188	0,2175	0,1962	0,1713	0,2117	0,2192	0,2202	0,2005	
	0,2236	0,2223	0,2221	0,2207	0,1744	0,2310	0,2270	0,2301	0,2077	
	0,1246	0,2240	0,2190	0,2355	0,2168	0,2133	0,2263	0,1759	0,1551	
	0,1786	0,2281	0,2286	0,2217	0,2023	0,2256	0,2406	0,2328	0,2569	
	0,2148	0,2237	0,2249	0,1831	0,2144	0,2322	0,2307	0,2311	0,2050	
	0,2162	0,2189	0,2247	0,2669	0,2112	0,2565	0,2357	0,2419	0,2123	
29	0,2161	0,2564	0,2651	0,2518	0,1304	0,2469	0,2545	0,2213	0,2254	0,2052
	0,2661	0,2624	0,1720	0,2525	0,1609	0,2545	0,2580	0,2100	0,2504	0,2342
	0,2564	0,2239	0,2130	0,2162	0,2048	0,1478	0,2625	0,2613	0,2817	0,2249
	0,2759	0,2817	0,2529	0,1800	0,2842	0,2297	0,2504	0,2659	0,1177	0,2335
	0,2730	0,2727	0,2622	0,2512	0,2354	0,2751	0,2039	0,2428	0,1974	0,2458
	0,2345	0,2359	0,2597	0,2551	0,2041	0,2747	0,2671	0,2258	0,1511	0,1838
14	0,2105	0,1784	0,1842	0,1643	0,2010	0,1459	0,1199	0,2459	0,1139	0,1998
	0,1966	0,1978	0,1148	0,2067	0,1692	0,1878	0,1408	0,2683	0,1992	0,1824
	0,1926	0,1742	0,1155	0,1902	0,1434	0,2035	0,1691	0,2546	0,2203	0,1397
	0,1573	0,1631	0,2007	0,1629	0,1111	0,1961	0,1864	0,1296	0,1940	0,1720
	0,1962	0,2059	0,1769	0,1760	0,0882	0,1742	0,1739	0,1906	0,2191	0,1490
	0,1758	0,1889	0,1950	0,1756	0,0418	0,2109	0,1843	0,1151	0,1812	0,0738

MW (T/C) [%]	100,00	102,11	99,64	101,36	88,10	103,49	100,29	109,43	93,61	87,33
SD [%]	9,21	7,56	14,64	11,55	16,39	9,11	12,71	17,55	20,06	8,51

4. Western Blot

Tabelle 8.6 Western Blot-Daten zur Bestimmung von γ -H2AX. Inkubation mit Pt-NP < 20 nm für 3 h. Angeben sind die gemessenen Intensitäten der Chemolumineszenz als T/C in %. Anschließend sind die Mittelwerte gebildet.

HT29	Pt-NP < 20 nm [ng/cm ²]					Etoposid [μM]	UV-B-Strahlung [min]	
β-CD	0,1	1	10	100	1000	50	2	5
92,2	126,6	87,1	92,2	84,0	117,6	219,8	723,8	1099,1
59,1	37,6	37,2	40,7	67,1	117,7	338,2		
	82,1		181,9	158,2	125,1	444,6		

MW (T/C) [%]	75,7	82,1	62,2	104,9	103,1	120,2	334,2	723,8	1099,1
SD	30,9	76,7	56,8	56,8	68,1	47,0	3,6	33,7	/

Tabelle 8.7 Western Blot-Daten zur Bestimmung von γ -H2AX. Inkubation mit Pt-NP < 20 nm für 12 h. Angeben sind die gemessenen Intensitäten der Chemolumineszenz als T/C in %. Anschließend sind die Mittelwerte gebildet.

HT29	Pt-NP < 20 nm [ng/cm ²]					Etoposid [μM]		UV-B-Strahlung [min]
β-CD	0,1	1	10	100	1000	50	150	2
95,0	28,3	57,3	49,1	54,8	34,4	260,4	2244,1 1301,4	3427,0
55,6	86,1	44,5	59,3	47,0	18,5	518,3		3654,8
154,5	21,7	21,7	25,0	13,5				
51,5								3344,3

MW (T/C) [%]	89,2	45,4	41,2	44,5	38,4	26,5	389,3	1772,7	3344,3
SD [%]	53,6	78,0	43,7	39,7	57,1	42,5	46,8	666,6	10,7

Tabelle 8.8

Western Blot-Daten zur Bestimmung von γ -H2AX. Inkubation mit Pt-NP < 20 nm für 24 h. Angegeben sind die gemessenen Intensitäten der Chemolumineszenz als T/C in %. Anschließend sind die Mittelwerte gebildet.

HT29	Pt-NP < 20 nm [ng/cm ²]					Etoposid [μ M]		UV-B-Strahlung [min]	
β -CD	0,1	1	10	100	1000	50	150	2	5
95,6	73,4	31,6			116,9	1174,4		5318,5	
83,8	76,0	92,5	139,2	122,0	88,8	1346,0			14164,5
44,6	120,5	85,4	64,3	63,3	46,3	1096,4		6760,3	
70,8	37,4	80,2		274,0		1190,1		6060,8	
97,4	62,6	111,0	111,4	151,0	95,5		2042,5		
	106,9	145,7	86,6	300,2			4468,5		
				103,9	88,2				

MW (T/C) [%]	78,00	79,50	91,1	100,40	169,00	87,10	1201,80	3255,50	6060,80	14164,00
SD [%]	24,80	34,60	34,3	27,90	51,90	26,30	7,50	37,30	9,70	/

C) Abstract

Platin gelangt in nanopartikulärer Form vor allem über den Abrieb aus Autoabgaskatalysatoren in die Umwelt, wo es nach Einatmung durch Verschlucken des Mucus in den Gastrointestinaltrakt des Menschen gelangen kann. Platin-Nanopartikel fanden in toxikologischen Untersuchungen des humanen Gastrointestinaltrakts bisher wenig Beachtung, wobei in Anbetracht des wachsenden kommerziellen Einsatzes nanostrukturierter Materialien und deren neuartiger Eigenschaften Aufklärung über mögliche nanotoxikologische Effekte von Relevanz ist. Die vorliegende Arbeit leistete einen Beitrag zur Untersuchung der Aufnahme sowie der Genotoxizität von Platin-Nanopartikeln in der Kolonkarzinomzelllinie HT29.

Im Rahmen der Arbeit wurde gezeigt, dass nanopartikuläres Platin von HT29-Zellen in zeit- und dosisabhängiger Form aufgenommen wurde. Der Mechanismus, der der Partikelinternalisierung zu Grunde lag, war energieabhängig, demnach konnte ein aktiver endozytotischer Transport für die verwendeten Platin-Nanopartikel angenommen werden.

Im Anschluss an die zelluläre Aufnahme wurde nanostrukturiertes Platin in membranumschlossenen Vesikeln sowie frei im Cytosol akkumuliert, ein Transport in den Zellkern konnte nicht gemessen werden. Untersuchungen zur Genotoxizität der Nanopartikel zeigten, dass durch das nanostrukturierte Platin verursachte DNA-Strangbrüche vermutlich nicht den Doppelstrang betrafen.

Da die nukleären Strangbrüche nicht auf die durch die Metall-Nanopartikel katalysierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt werden konnten, wurde vermutet, dass nach Zellaufnahme lösliche Platinspezies gebildet werden. Diese könnten nach Transport in den Nukleus an die DNA assoziiert vorliegen und so die beobachteten Strangbrüche auslösen. Zur Verifizierung dieser These wurde die isolierte Kern-DNA auf ihren Platingehalt untersucht. Aufgrund hoher Standardabweichungen bei den Messungen konnte keine eindeutige Aussage zur Platinierung der nukleären DNA getroffen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigten demnach, dass Platin in nanopartikulärer Form von Kolonkarzinomzellen aufgenommen wurde und innerzellulär ein genotoxisches Potential aufwies.

D) Lebenslauf

Persönliche Angaben

Vor- und Zuname: Katharina Jarolim
Anschrift: Perinetgasse 2/36, 1020 Wien
Telefon: 0043 650/5146399
Mail: a0526896@unet.univie.ac.at
Geburtsdatum und -ort: 30. Dezember 1986 in Wien
Familienstand: ledig
Staatsbürgerschaft: Österreich

Schulischer Werdegang

September 1993 – Juli 1997 Volksschule in Maria Enzersdorf
September 1997 – Juli 2001 Bundesgymnasium
Perchtoldsdorf, NÖ
September 2001 – Juni 2005 Vienna Bilingual School
Draschestraße, Wien
Matura mit „gutem Erfolg“

Studium

März 2006 - Beginn des Studium der Chemie an der
Universität Wien