

Untersuchung der biologischen Aktivität von
Metalloxid-Partikeln in Säugerzellen mittels
Hochdurchsatzmethoden

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologe Marco Al-Rawi

aus

Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. M. Bastmeyer
Referent: PD Dr. C. Weiss
Korreferentin: Prof. Dr. A. Hartwig
Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2012

Erklärung der Urheberschaft

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht sind und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Karlsruhe, den 07. November 2012

Marco Al-Rawi

Zusammenfassung

Synthetisch hergestellte Nanoobjekte finden Anwendungen in elektronischen Materialien, Batterien, Farben, Lacken, Plastik, Klebern sowie auch Pharmazeutika, kosmetischen Produkten, Zahnpasta und als Nahrungsmittelzusatz. Darüber hinaus sind neue Metalloxid-Komposite (basierend auf Eisenoxid, Siliziumdioxid) vielversprechende Werkzeuge, die in Zukunft helfen, in bio-medizinischen Anwendungen Therapie und Diagnose zu verbinden und damit zu verbessern. Nicht desto trotz müssen durch die steigende Produktion an Nanoobjekten auch die toxikologischen Untersuchungen ausgeweitet werden. Leider interferieren Nanoobjekte häufig mit den etablierten Standardverfahren, weshalb neue verlässliche Methoden entwickelt werden müssen, um die Toxizität von Nanoobjekten richtig beurteilen zu können.

Deshalb wurde eine Mikroskopie-basierte automatisierte Hochdurchsatzmethode (AHM) entwickelt, um Zellzahl und Zelltod (Apoptose, Nekrose) nach der Exposition von murinen Makrophagen (RAW264.7) mit magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (γ -Fe₂O₃-NP) sowie Silika-Partikeln zu quantifizieren. Die Ergebnisse wurden danach mit konventionellen Toxizitätsmessmethoden verglichen. Parallel wurde mit Hilfe der Spektrometrie die zelluläre Dosis von Nanoobjekten bestimmt. Zusätzlich wurde die Aufnahme und Lokalisation von Nanoobjekten in Zellen mittels Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass γ -Fe₂O₃-NPs mit dem kolorimetrischen LDH-Test, aufgrund der ähnlichen optischen Absorption der γ -Fe₂O₃-NPs und des entstehenden Farbstoffs interferieren und dies damit zu einem falsch-positiven Ergebnis führt. Darüber hinaus widerspricht die Zunahme der metabolischen Aktivität (WST-1 Assay) in Makrophagen nach Behandlung mit Metalloxid-Partikeln der reduzierten Zellzahl die mittels AHM oder klassischer Zellzählung erfolgte. Weiterhin unterschätzt die Standardmethode zur Detektion nekrotischer bzw. apoptotischer Zellen (Annexin-V/PI Färbung) im Vergleich zum LDH-Assay und der AHM den Anteil nekrotischer Zellen. Somit sind alle drei Standardtests ungeeignet um die Toxizität von Nanoobjekten zu bestimmen und die AHM eine verlässlichere Hochdurchsatzmethode. Der Vergleich der im Expositionsmedium eingesetzten Dosis und der zellulären Dosis zeigt auf, dass unterschiedliche Sedimentationsraten der verschieden großen Partikel einen entscheidenden Einfluss auf das

Ergebnis der Toxizitätsmessung haben. Hieraus war es möglich die Toxizität verschieden großer SiO₂-Partikel mit der spezifischen Oberfläche der internalisierten Partikel zu korrelieren, d.h. Mikropartikel sind toxischer als Nanopartikel. Im Gegensatz dazu ist die Aufnahme von Nano- und Mikropartikeln qualitativ unterschiedlich. Nur Silika-Nanopartikel benötigen die Adsorption von Serumproteinen wie Albumin, um über Endozytose internalisiert zu werden, während Mikropartikel serumunabhängig endozytiert werden. In Abwesenheit von Serum diffundieren Silika-Nanopartikel über die Zellmembran. Somit handelt es sich bei dem völlig unterschiedlichen Aufnahmeverhalten der Nanopartikel um einen echten „Nanoeffekt“. Die Toxizität, Proteinadsorption und Aufnahme der Nanopartikel wird durch die Eigenschaften der Silikatoberfläche bestimmt. Die Funktionalisierung der Silika-Nanopartikel mit Carboxyl- bzw. Aminogruppen unterdrückt nicht nur die Toxizität und Proteinbindung, sondern erlaubt ähnlich der Mikropartikel eine serumunabhängige Endozytose.

Das in dieser Arbeit entwickelte Hochdurchsatzverfahren (AHM) eignet sich als robuste neue Methode zur schnellen Testung von Nanoobjekten und ist den konventionellen Teststrategien überlegen. Mittels der AHM konnte, wie auch schon für viele andere Nanoobjekte zuvor, ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Oberfläche und ihrer Toxizität bestimmt werden. Ein tatsächlicher „Nanoeffekt“ wurde erstmals für die Aufnahme in Makrophagen gezeigt und erklärt evtl. auch ihren im Vergleich zu Mikropartikeln unterschiedlichen toxischen Wirkmechanismus.

Abstract

Engineered nanoobjects are used in a wide range of different applications like electronics, batteries, dyes, varnishes, plastics and glue, as well as in pharmaceuticals, cosmetics, tooth paste and as food additive. Furthermore novel metal oxide composites (based on iron oxide, silicon dioxide) are promising multifunctional devices which combine and improve therapy and diagnostics in future bio-medical applications. Nevertheless, with the increase of production of nanoobjects toxicological investigations need to be further extended. Unfortunately, nanoobjects interfere often with established standardized methods which leads to the development of new reliable test systems to assess toxicological data of nanoobjects.

Hence, an automated high-throughput method based on microscopy (AHM) was developed to quantify cell counts as well as cell death (apoptosis, necrosis) after exposure of murine macrophages (RAW264.7) to magnetic iron oxide nanoparticles (γ -Fe₂O₃-NP) and silica particles (SiO₂ particles). The data was then compared to conventional toxicity assays. In parallel, spectrometry was used determine the cellular dose of nanoobjects. Additionally, uptake and localization of nanoobjects in cells was examined by fluorescence and transmission electron microscopy.

It was shown that γ -Fe₂O₃-NP interfere with the colorimetric LDH assay due to the similar optical absorbance of γ -Fe₂O₃-NP and the catalysed dye resulting in a false-positive outcome. In addition, increase of metabolic activity (WST-1) in macrophages contradicts reduced viable cell counts detected by AHM and classical cell counting. Furthermore, the standardized method to detect necrotic and apoptotic cells (annexin-V/PI staining) underestimates necrotic cell death, which was detected by LDH and AHM. Therefore, all three standardized test systems are not suitable to detect toxicity of nanoobjects whereas AHM is a more reliable high-throughput method.

Comparison of the applied dose in culture medium and the effective dose of nanoobjects reveals that different rates of sedimentation of particles have a decisive influence on the outcome of the measurement of toxicity. It was also possible to correlate toxicity of different sized SiO₂ particles to the specific surface area of internalized particles, which concludes a surface effect for the toxicity of SiO₂ particles. In contrast to that uptake of nano- and microsized SiO₂ particles differs. Only SiO₂ nanoparticles depend on the adsorption of serum

proteins, like albumin, to be internalized by endocytosis, whereas SiO₂ microparticles can be endocytosed under serum free conditions. In the absence of serum SiO₂ nanoparticles diffuse through the plasma membrane. Therefore, the different way of uptake of SiO₂ nanoparticles into cells can be seen as a real “nano effect”. Toxicity, protein adsorption and uptake of nanoparticles are determined by the properties of the silica surface. Functionalization of the silica surface with amino- and carboxyl groups suppress toxicity as well as protein binding and induce endocytosis under serum free conditions like microparticles.

In conclusion, the introduced automated high-throughput method (AHM) is a robust new technique to screen nanoobjects. Additionally, AHM is superior to conventional testing strategies. By using AHM, it was possible like for many other nanoobjects before to correlate between surface area and toxicity. A real “nano effect” was shown for the first time for the uptake of nanoparticles in macrophages, which could explain the difference in toxicity in comparison to microparticles.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition und Anwendungsbereiche der Nanotechnologie	1
1.2 Biomedizinische Bedeutung der Nanotechnologie	1
1.2.1 Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel	3
1.2.2 Amorphe Siliziumdioxid-Nanopartikel	4
1.3 Mögliche Risiken durch die Nanotechnologie	6
1.3.1 MEONP-assoziierte Toxizität	6
1.3.2 SiO ₂ -Nanopartikel-assoziierte Toxizität	8
1.4 Probleme der Nanotoxikologie	9
1.4.1 Interferenz von Nanoobjekten mit Toxizitätstests	9
1.4.2 Agglomeration und Aggregation von Nanoobjekten	11
1.4.3 Interaktion von Proteinen mit Nanoobjekten	12
1.5 Aufnahmewege in die Zelle	13
1.5.1 Phagozytose	14
1.5.2 Makropinozytose	15
1.5.3 Clathrin-vermittelte Endozytose	15
1.5.4 Caveolin-abhängige Endozytose	16
1.5.5 Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose	16
1.5.6 Das endosomale Membransystem und Lysosomen	16
1.6 Formen des Zelltods	17
1.6.1 Apoptose	17
1.6.2 Autophagie	20
1.6.3 Nekrose	21
1.7 Die Bedeutung von Hochdurchsatzmethoden für die Toxikologie	22
1.8 Fragestellung und Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Material und Chemikalien	25
2.2 Laborgeräte und Softwareprogramme	27
2.3 Puffer und Lösungen	28
2.4 Verwendete Metalloxid-Partikel	30
2.4.1 Herkunft und Synthese von verschiedenen beschichteten γ -Fe ₂ O ₃ -NP	30
2.4.2 Herkunft von Siliziumdioxid-Partikel	31
2.4.3 Ansetzen der Partikelverdünnungen	31
2.5 Physikalische Charakterisierung von Partikeln	32
2.5.1 Bestimmung der Größe und Morphologie von FITC-SiO ₂ -Partikeln mittels TEM	32
2.5.2 Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und der Agglomeratbildung von FITC-SiO ₂ -Partikeln mittels DLS	32
2.5.3 Bestimmung der Oberflächenladung von FITC-SiO ₂ -Partikeln mittels Laser-Doppler-Anemometrie	33
2.6 Zellkultur	34
2.6.1 Verwendete Zelllinien	34
2.6.2 Langzeitkultivierung und Auftauen von Zellen	35
2.6.3 Passagieren von Zelllinien und Bestimmung der Zellzahl	36
2.6.4 Partikelexposition von Kulturzellen	37
2.7 Mikroskopische Analyse der Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen	37
2.7.1 Untersuchung der Aufnahme von FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen mittels Epifluoreszenzmikroskopie	37
2.7.2 Untersuchung der Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie	38

2.8	Messmethoden zur Bestimmung der Zytotoxizität von Metalloxid-Partikeln <i>in-vitro</i>	39
2.8.1	Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Stromausschlussverfahrens.....	39
2.8.2	Bestimmung der Zytotoxizität durch Messung freigesetzter LDH	40
2.8.3	Bestimmung der Zellvitalität/Zellzahl mittels WST-1	40
2.8.4	Bestimmung der Lebendzellzahl und des Zelltods mittels automatisierter Hochdurchsatzmikroskopie (AHM)	41
2.8.5	Bestimmung des Zelltods mittels FITC-Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie	43
2.9	Quantifizierung von Partikeln in Zellen und Medien	44
2.9.1	Spektrometrische Quantifizierung von γ -Fe ₂ O ₃ -NP	44
2.9.2	Quantifizierung von FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen mittels Fluoreszenzspektrometrie	45
2.9.3	Quantifizierung von FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen mittels Hochdurchsatz-Epifluoreszenzmikroskopie	45
2.10	Quantifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies nach Partikelexposition mit Hilfe der DCF-Methode	47
2.11	Untersuchung der Proteinbindung an die Partikeloberfläche	48
2.11.1	Quantifizierung der gebundenen Proteine mittels BCA-Tests	48
2.11.2	Untersuchung der Proteinbindung mittels SDS-PAGE	48
3.	Ergebnisse	51
3.1	Charakterisierung der verwendeten magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel	52
3.2	Charakterisierung der verwendeten SiO ₂ -Partikel	53
3.2.1	Größe und Morphologie im TEM	54
3.2.2	Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers mittels dynamischer Lichtstreuung	55
3.3	Untersuchung der Toxizität und Quantifizierung von verschieden beschichteten magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln in RAW264.7 Zellen	61
3.3.1	Bestimmung der Zytotoxizität von verschieden beschichteten γ -Fe ₂ O ₃ -NP mit Hilfe des LDH-Tests	61
3.3.2	Bestimmung der Zellvitalität nach Inkubation mit verschieden beschichteten magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln anhand der metabolischen Aktivität	63
3.3.3	Etablierung der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie (AHM) zur Bestimmung von Zellzahl und Zelltod	64
3.3.4	Bestimmung der Zellzahl und des Zelltods nach Inkubation mit verschieden beschichteten magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln mittels AHM	69
3.3.5	Quantifizierung der zellulären Dosis von verschieden beschichteten γ -Fe ₂ O ₃ -NP mit Hilfe der optischer Spektrometrie	72
3.3.6	Korrelation zwischen Lebendzellzahl und der zellulären Dosis verschieden beschichteter magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel	74
3.4	Untersuchung der Toxizität und Quantifizierung von FITC-Siliziumdioxid-Partikeln in RAW264.7 Zellen	76
3.4.1	Lebendzellzahlbestimmung nach Exposition von RAW264.7-Zellen mit verschieden großen FITC-SiO ₂ -Partikeln	76
3.4.2	Bestimmung der Zytotoxizität anhand freigesetzter Laktatdehydrogenase	77
3.4.3	Bestimmung der Zellvitalität anhand der metabolischen Aktivität	78
3.4.4	Bestimmung der Zellzahl nach Inkubation mit verschieden großen FITC-SiO ₂ -Partikeln mit Hilfe automatisierter Hochdurchsatzmikroskopie	79
3.4.5	Vergleichende Analyse des Zelltods nach Inkubation mit verschieden großen SiO ₂ -Partikeln mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie	81
3.4.6	Zytotoxizität von verschieden großen FITC-SiO ₂ -Partikeln in Abhängigkeit von Partikelmasse, spezifischen Oberfläche und Partikelzahl im Expositionsmedium	86
3.4.7	Quantifizierung der zellulären Dosis von verschieden großen FITC-SiO ₂ -Partikeln mittels Fluoreszenzspektrometrie	87
3.4.8	Quantifizierung der zellulären Dosis von verschieden großen FITC-SiO ₂ -Partikeln mittels automatisierter Hochdurchsatzmikroskopie	89
3.4.9	Korrelation der Zytotoxizität und zellulärer Dosis von verschieden großen FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen	90
3.4.10	Untersuchung der Toxizität von oberflächenmodifizierten FITC-SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen	92
3.5	Charakterisierung der Aufnahme und Lokalisation von verschieden großen und oberflächenmodifizierten FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen	95
3.5.1	Untersuchungen zur Aufnahme und Lokalisation von verschieden großen FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen in Abhängigkeit von Serumproteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie	95
3.5.2	Untersuchung zur Aufnahme und Lokalisation von verschieden großen FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen in Abhängigkeit von Serumproteinen mittels Transmissionselektronenmikroskopie	97

3.5.3	Untersuchung zur Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen in Abhängigkeit von spezifischen Serumproteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	101
3.5.4	Untersuchung des Aufnahmewegs von FITC-SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	104
3.5.5	Untersuchung zur Aufnahme und Lokalisation von oberflächenmodifizierten FITC-SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen in Abhängigkeit von Serumproteinen.....	106
3.5.6	Quantifizierung der gebundenen Menge von Serumproteinen sowie BSA an die Oberfläche von unterschiedlich großen FITC-SiO ₂ -Partikeln	108
3.5.7	Quantifizierung von gebundenen Serumproteinen an unterschiedlich oberflächenmodifizierte FITC-SiO ₂ -NP	113
4.	Diskussion	119
4.1	Die physikochemischen Eigenschaften der verwendeten Metalloxid-Nanopartikel haben Einfluss auf die Stabilität der Partikeldispersionen	121
4.2	Die optische Absorption von γ -Fe ₂ O ₃ -NP interferiert mit dem kolorimetrischen LDH-Test	122
4.3	γ -Fe ₂ O ₃ -NP und SiO ₂ -Partikel verursachen in RAW264.7-Zellen die Erhöhung der WST-1 Reduktion.....	124
4.4	Die automatisierte Hochdurchsatzmikroskopie (AHM) ist sensitiver als konventionelle Hochdurchsatzmethoden, um Änderungen in der Zellzahl und Apoptose/Nekrose zu detektieren	127
4.5	Die Toxizität von γ -Fe ₂ O ₃ -NP in RAW264.7-Zellen ist allein abhängig von der zellulären Dosis	128
4.6	Die Toxizität von unterschiedlich großen SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen ist abhängig von der sich in Zellen befindlichen spezifischen Oberfläche der Partikel	129
4.7	SiO ₂ -NP akkumulieren intrazellulär in Endosomen/Lysosomen in RAW264.7-Zellen	131
4.8	An der Partikeloberfläche adsorbiertes Albumin kann die Aufnahme von SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen vermitteln, wobei dies nicht über Scavenger-Rezeptoren stattfindet.	132
4.9	SiO ₂ -NP werden nach Aufnahme in Endosomen/Lysosomen ins Zytosol freigesetzt, was auf lysosomale Membranpermeabilisierung (LMP) schließen lässt.....	134
4.10	SiO ₂ -NP akkumulieren unter serumfreien Bedingungen nicht intrazellulär, sondern liegen ohne Membran im Zytosol vor	138
4.11	Frei im Zytosol liegende SiO ₂ -NP lösen in RAW264.7-Zellen Autophagie aus	138
4.12	Die Toxizität von SiO ₂ -NP ist abhängig von der Oberflächenmodifikation	139
4.13	Modell der SiO ₂ -NP induzierten Toxizität in RAW264.7-Zellen	141
5.	Referenzen.....	143
6.	Abbildungsverzeichnis	159
7.	Tabellenverzeichnis.....	161
8.	Appendix	163

1. Einleitung

1.1 Definition und Anwendungsbereiche der Nanotechnologie

Die Nanotechnologie beschäftigt sich im Allgemeinen mit der Entwicklung, Produktion und Anwendung von Materialien, die in mindestens einer Dimension kleiner als 100 nm sind. Diese sogenannten Nanoobjekte werden nach der Definition des Europäischen Komitees für Normierung (CES) in Nanoplättchen (eine Dimension kleiner als 100 nm), Nanofasern (zwei Dimensionen kleiner als 100 nm) und die Nanopartikel (drei Dimensionen kleiner als 100 nm) klassifiziert (European Committee for Standardization, 2008) und besitzen oft neue Eigenschaften im Vergleich zu makroskalierten Materialien, wie z.B. Lichtabsorption, Härte, Magnetismus, elektrische Leitfähigkeit oder Lumineszenz. Die chemische Zusammensetzung von synthetisch hergestellten Nanoobjekten ist sehr vielfältig und reicht von anorganischen kohlenstoffbasierten Materialien (Fullerene, Kohlenstoff-Nanoröhrchen, Industrieruß), Metallen und Metallkompositen (Gold, Silber, Quantum Dots), Metalloxiden (Titan- und Siliziumdioxid, Zinkoxid, Aluminiumoxid, Eisenoxid) bis zu organischen Polymeren (Polystyrol, DNA- oder Zucker-Dendrimere). Die Anwendungsgebiete sind sehr vielfältig und reichen von der Halbleitertechnik in Computerchips und Photovoltaik über die Automobilbranche (Elektronik, Batterien, Reifen) zu Farben und Lacken, sowie Druckertonern (Brumfiel, 2006; Sohn, 1998). Sie finden sich aber auch in Produkten wieder, die mit dem Menschen direkt in Kontakt kommen, z.B. in Pharmazeutika, Kosmetika, aber auch Nahrungsmitteln (Dekkers et al., 2012; Dekkers et al., 2010; FAO/WHO, 2010).

1.2 Biomedizinische Bedeutung der Nanotechnologie

Neben dem Bedarf einer effizienteren Energienutzung und der Verbesserung, bzw. der Haltbarkeit von Produkten werden darüber hinaus Nanoobjekte entwickelt, die für biomedizinische Zwecke eingesetzt werden können. In Zukunft sollen diese multifunktionalen Werkzeuge als Vehikel zur zielgerichteten Verabreichung von Medikamenten in der Krebstherapie und gleichzeitiger bildgebender Diagnostik die Medizin revolutionieren (Ahmed et al., 2012; Liu et al., 2007). Diese neue Disziplin wird unter dem Begriff Theranostik (Kombination aus Therapie und Diagnostik) zusammengefasst, die versucht u.a. Krebstherapien individuell an den Patienten anzupassen, da der Erfolg bei den meisten konventionellen Behandlungen durch die genomische Heterogenität von Tumoren häufig ausbleibt (Del Vecchio et al., 2007; Nie et al., 2007). Hinzu kommt, dass durch eine

zielgerichtete Erkennung von Krebszellen mit Hilfe von auf Nanoobjekten basierenden Therapien, die gebundenen Wirkstoffe spezifisch im Krebsgewebe akkumulieren und unerwünschte Nebeneffekte minimiert werden (Cai und Chen, 2008). Voraussetzung hierfür ist die Identifizierung von Biomarkern, speziellen Molekülen, die vornehmlich auf der Oberfläche der Krebszelle vorkommen. Mögliche Interaktionspartner (z.B. natürliche Liganden, Antikörper) sollen auf der Oberfläche des Nanoobjekts konjugiert werden und damit eine lokale Behandlung im Körper gewährleisten. Weitergehend können Nanoobjekte zusätzlich durch ihren verringerten Durchmesser besser in Krebsgewebe eindringen und dort verweilen. Grund zum Einem sind ca. 60-80 nm große Poren (Fenestrae, *lat.* Fenster) in den von Krebszellen induzierten neugebildeten Blutgefäßen, die die Durchlässigkeit (Permeabilität) erhöhen und zum Anderen der schlechtere Abtransport von Flüssigkeit aus Tumorgewebe durch das lymphatische System, was zum Zurückhalten von Stoffen führt (Retention). Dieses Phänomen wird als EPR (erhöhte Permeabilität und Retention) bezeichnet (Greish, 2010). In Kombination mit der Möglichkeit der lokalen Detektion der Nanoobjekte im Körper mit ausreichender Auflösung in Geweben soll es dann auch möglich sein, nicht wie bisher nur vor oder nach einer Behandlungsreihe den Status der Krankheit festzustellen, sondern schon währenddessen. Ein entscheidender Aspekt der Theranostik ist aber, dass durch Biomarker auch eine frühzeitige Detektion von Krebszellen möglich ist, um schon in frühen Stadien der Krebserkrankung medizinisch behandeln zu können (Choi et al., 2012).

Um ein Bio-Konjugat aus einem biologischen Molekül und einem Nanoobjekt herzustellen, können verschiedene Methoden eingesetzt werden. Der Vorgang an sich wird als Bio-Konjugation bezeichnet. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Kupplung von chemisch funktionellen Gruppen (Carboxyl-, Amino-, Thiolgruppen) auf der Oberfläche des Nanoobjekts, über ein Linkermolekül an das biologische Molekül bzw. Medikament. Gegebenenfalls kann auch die Oberfläche des Nanoobjekts chemisch funktionalisiert werden. Eine andere Möglichkeit ist, durch elektrostatische Interaktion der unterschiedlich geladenen Interaktionspartner eine Bindung zu schaffen. Außerdem ist es möglich, Interaktionspartner mit dem wasserlöslichen Vitamin B₇ (Biotin) zu versehen und beide durch das tetramere Protein Streptavidin oder Avidin zu koppeln. Weitere Methoden sind die Kupplung mittels Click-Chemie, die durch die Reduktion von Kupfer(I)-Ionen stattfindet, die Adsorption in mesoporösen Nanostrukturen und das Einarbeiten von bioaktiven Molekülen mit Nanoobjekten in Polymer-Protein-Matrizen (Yu et al., 2012).

Unter den verschiedenen chemischen Zusammensetzungen werden hauptsächlich folgende anorganische Nanoobjekte als vielversprechend für theranostische Anwendungen angesehen:

- 1) magnetische Eisenoxid-Nanopartikel
- 2) Siliziumdioxid-Nanopartikel
- 3) Quantum Dots
- 4) Gold-Nanopartikel
- 5) Kohlenstoff-Nanoröhrchen

Da in der vorliegenden Arbeit Eisenoxid- und Siliziumdioxid-Nanopartikel untersucht werden, wird im weiteren Verlauf auf diese fokussiert.

1.2.1 Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel

Eisenoxide kommen in der Natur wegen der unterschiedlichen Oxidationsstufen des Eisens (Fe^{I} , Fe^{II}) in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen mit Sauerstoff (Fe_2O_3 , Fe_3O_4) vor. Aufgrund dieser Tatsache können Eisenoxide verschiedene Farben (schwarz, rot, gelb) besitzen und werden daher als Pigmente in Werkstoffen eingesetzt (z.B. Beton, Kacheln, Ziegel). Darüber hinaus wird Eisenoxid als E172 Nahrungsmitteln (z.B. Käserinde, Oliven) zugesetzt, für das Einfärben von Dragees, Kosmetika und Arzneimittel oder zur Trinkwasseraufbereitung verwendet (Weitschies et al., 2005; Zhong et al., 2006).

Generell bestehen magnetische Eisenoxid-Nanopartikel aus den Mineralien Magnetit ($\text{Fe}^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{III}}]_2\text{O}_4 = \text{Fe}_3\text{O}_4$) oder Maghemit (Fe_2O_3) (Cole et al., 2011). Durch das Vorhandensein von ungepaarten Elektronen, die eine Drehbewegung um ihre eigene Achse durchführen (*spin*), können sich diese in einem externen Magnetfeld wie ein kleiner Stabmagnet parallel ausrichten. Nach dem Entfernen des Magnetfeldes verlieren sie ihre erzwungene Ausrichtung, wobei dieser Prozess als Relaxation (Brown- und Néel-Relaxation) bezeichnet wird und zur Wärmebildung beiträgt. Dies bedeutet, dass magnetische Eisenoxid-Nanopartikel (MEONP) nur magnetisch sind, solange sie sich in einem Magnetfeld befinden. Durch die Verringerung des Durchmessers unter 20 nm reduziert sich in MEONP die Zahl der magnetisierbaren Domänen (Weiss-Bezirke) auf eine Domäne und das Material wird als superparamagnetisch bezeichnet (Akbarzadeh et al., 2012).

Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel werden klassischerweise nasschemisch durch Präzipitation von Eisen(II)- und Eisen(III)-Lösungen hergestellt (Lu et al., 2007a). MEONP, die durch Pyrolyse entstehen, besitzen den Nachteil, dass sie während der Produktion miteinander verschmelzen (Versinterung) oder in unpolaren Lösungsmitteln hergestellt werden und hydrophob sind, was für eine bio-medizinische Anwendung von Nachteil ist. Um die Kolloidität der Partikelsuspension zu gewährleisten, werden MEONP meist mit hydrophilen Polymeren (z.B. Dextran, Polyethylenglykol, Polyvinylpyrrolidon oder Polyanilin) beschichtet, was zur besseren Verträglichkeit im menschlichen und tierischen Körper (Biokompatibilität) beiträgt (Gupta und Gupta, 2005). Durch ihre magnetische Eigenschaft, einfache und kostengünstige Produktion, sowie Biokompatibilität haben sich nasschemisch produzierte MEONP für eine bio-medizinische Anwendung, z.B. als Kontrastmittel für verschiedene Gewebe (Leber, Milz) für die Magnetresonanztomographie (MRT), durchgesetzt (Tran und Webster, 2010). Die magnetische Separation MEONP-markierter Zellen und der DNA-Transport in Zellen sind weitere relevante Funktionen (McBain et al., 2008; Molday und Mackenzie, 1982)

Neben der Detektion von MEONP in Geweben kann auch die während der Relaxation entstehende Energie genutzt werden. Hierbei wird sie in einem magnetischen Wechselfeld als Wärme an die Umgebung abgegeben. Hieraus hat sich die MEONP-basierte Form der Hyperthermie entwickelt, die darauf abzielt durch lokales Erhitzen von Krebszellen auf über 40°C vornehmlich Apoptose auszulösen (Balivada et al., 2010; Shellman et al., 2008). Sie wird heute klinisch bei schwer erreichbaren, bzw. normalerweise inoperablen Tumoren, z.B. im Hirngewebe, eingesetzt. Hierbei werden die MEONP direkt in den Tumor injiziert und in einem Wechselfeld angeregt (Johannsen et al., 2010; Thiesen und Jordan, 2008).

1.2.2 Amorphe Siliziumdioxid-Nanopartikel

Siliziumdioxid (SiO_2) oder auch Silika kommt in seiner natürlichen Weise in zwei unterschiedlichen Strukturen vor, kristallin und amorph. Amorphes SiO_2 ist der Hauptbestandteil von Sand und findet sich biogen in Skeletten von Kieselalgen (Diatomeen) und Strahlentierchen (Radiolarien), als Opal oder Silikaglas. Darüberhinaus können beide Formen porös und nicht-porös vorkommen. Im Vergleich zur kristallinen Form (Donaldson und Borm, 1998; Dutta und Moudgil, 2007; Warheit et al., 1995) wird angenommen, dass amorphes SiO_2 generell nicht-toxisch ist. Es wird daher auch im nanoskaligen Bereich in

einer Vielzahl von Anwendungen, wie in Lacken, Druckertonern, Reifen, aber auch kosmetischen und pharmazeutischen Produkten, sowie als Zusatzstoff E551 in Lebensmitteln zur verbesserten Rieselfähigkeit und zum Binden von Feuchtigkeit (Hygroskopie) eingesetzt (Napierska et al., 2010; OECD, 2005).

Allgemein werden amorphe SiO_2 -Partikel mit Hilfe der Stöbersynthese (Stöber et al., 1968) nasschemisch hergestellt. Sie zeichnen sich durch ihre Monodispersität und sphärisch glatte Morphologie aus. Hierfür wird in einem Reaktionsansatz Tetraethylorthosilikat (TEOS, $\text{Si}[\text{OEt}]_4$) mit Ethanol, Wasser und Ammoniak (Katalysator) im ersten Schritt zu Orthokieselsäure ($\text{Si}[\text{OH}]_4$) hydrolysiert. Im anschließenden Prozess der Keimbildung kondensiert $\text{Si}(\text{OH})_4$ zu Siliziumdioxid. Durch die hohe Konzentration an $\text{Si}(\text{OH})_4$ führt dies schließlich zum Anwachsen der SiO_2 -Partikel. Änderungen der Verhältnisse von Ammoniak, Wasser und TEOS führen zu unterschiedlichen Durchmessern von wenigen Nanometern bis hin zu $1,2 \mu\text{m}$. Die SiO_2 -Oberfläche exponiert Silanol-Gruppen ($\text{Si}-\text{OH}$), die unter neutralem pH-Wert deprotonieren, d.h. als $\text{Si}-\text{O}^-$, vorliegen. Dies führt zum Einem zur elektrostatischen Abstoßung der Partikel, zum Anderen kann die Silanolgruppe genutzt werden, um SiO_2 -Partikel biologisch zu funktionalisieren.

Durch den bisherigen, u.a. pharmazeutischen Einsatz sollen amorphe SiO_2 -Nanopartikel zunehmend auch als Trägerstoff für die zielgerichtete Krebstherapie eingesetzt werden (Lu et al., 2007b; Slowing et al., 2008). Des Weiteren wird untersucht, ob SiO_2 -Nanopartikel als Transporter in DNA-Transfektionen (Gemeinhart et al., 2005; Slowing et al., 2008) sowie für die Markierung von Stammzellen (Huang et al., 2005) und Lysosomen (Shi et al., 2010) geeignet sind. Um diese in Zellen bzw. in Geweben einfach detektieren zu können, werden normalerweise organische Farbstoffe entweder während der Produktion in das amorphe Gerüst eingebaut (Chen et al., 2012) oder mit Linker an die Oberfläche gekuppelt. Weiterhin können auch einfach hydrophobe Nanopartikel (Quantum Dots, Silber, Gold und Eisenoxid) durch Verschalung mit SiO_2 hydrophil gemacht werden, die mit MRT bzw. Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden können (Jana et al., 2007). Anderen Forschern ist es auch gelungen, lumineszente SiO_2 -Nanopartikel herzustellen (Park et al., 2009a).

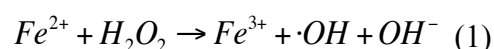
1.3 Mögliche Risiken durch die Nanotechnologie

Trotz der Vorteile der Nanotechnologie, wie z.B. in der Medizin, müssen auch negative Aspekte in Betracht gezogen werden, um eventuelle toxische Effekte schon früh zu erkennen. Daher muss eine kritische Risikoabschätzung der Nanotechnologie für den Menschen und die Umwelt erfolgen (Maynard et al., 2006).

Neben synthetischen Nanoobjekten ist der Mensch bereits einer Reihe von Umweltpartikeln ausgesetzt, die z.B. durch Reifenabrieb, Waldrodung oder Verbrennung von fossilen Brennstoffen im privaten Haushalt, durch Verbrennungsmotoren oder der Industrie (Kohle, Öl, Diesel) entstehen (Donaldson et al., 2005). Aus epidemiologischen Studien ist seit langem bekannt, dass mit der steigenden Luftverschmutzung und der damit verbundenen Belastung an inhalierbaren Fein- und ultrafeinen Partikeln in urbanen Zonen die Zahl der Menschen zunimmt, bei denen kardiovaskuläre Erkrankungen (Herzinfarkt, Arrhythmien, Thrombosen, Schlaganfall) auftreten oder sich respiratorische Krankheiten (Asthma, Bronchiolitis, chronisch obstruktive Lungenerkrankung) verschlimmern (Brook et al., 2004; Pope, 2003). Da ultrafeine Partikel im gleichen Größenbereich wie synthetische Nanoobjekte liegen (< 100 nm), könnten ähnliche toxische Effekte von synthetischen Nanoobjekten erwartet werden (Oberdörster et al., 2005b; Xia et al., 2009)

1.3.1 MEONP-assozierte Toxizität

Trotz der großen Vorteile für die medizinische Diagnostik und zukünftige Therapieansätze ist die potentielle toxische Wirkung von Eisenoxiden nicht auszuschließen (Singh et al., 2010). Neben der Freisetzung von Eisenionen auf den Partikeln, was zu einer Störung der Homöostase führt, kann dies auch Zytotoxizität, DNA-Schäden, oxidativen Stress, Entzündungsreaktionen und epigenetische Veränderungen auslösen. Ein Grund hierfür können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sein, die entweder an der Oberfläche des Partikels oder durch freigesetzte Eisenionen in den Mitochondrien über die Fenton-Reaktion (1) katalysiert werden (D'Autréaux und Toledano, 2007; Nel et al., 2006).



Der Anstieg der intrazellulären ROS führt generell in der Zelle zur antioxidativen Antwort, wobei antioxidativ-wirkende und entgiftende Enzyme aktiviert werden. Eine wichtige

Bedeutung hat der Transkriptionsfaktor Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2-related factor 2), der unter normalen Bedingungen mit dem Protein Keap-1 (Kelch-like erythroid CNC homologue ECH-associated protein 1) im Zytoplasma interagiert und über das Proteasom abgebaut wird. Durch die Zunahme von ROS kommt es durch Konformationsänderungen in Keap-1 zur Dissoziation der beiden Proteine, wobei Nrf2 in den Zellkern transloziert und dort mit anderen Transkriptionsfaktoren komplexiert (small MAF-Proteine, c-jun, c-Fos, Fra-1). Die Bindung von Nrf2 an das ARE (antioxidative response element) führt schließlich zur Expression von Zielgenen, wobei es sich hauptsächlich um Phase-II Entgiftungsenzyme und antioxidativ-wirkende Proteine (Hämoxygenase-1, NADPH-Quinon-Oxidoreduktase und γ -Glutamat-Cystein-Ligase) handelt (Bataille und Manautou, 2012).

Durch die erhöhte spezifische Oberfläche von Eisenoxid-Nanopartikeln gegenüber makroskaligem Material wird angenommen, dass eine verstärkte Generierung von ROS stattfindet, die zu einer erhöhten Zytotoxizität führt. Brunner und Kollegen haben berechnet, dass die EC_{50} von nackten Eisenoxid-Nanopartikeln in humanen Mesotheliom-Zellen (MSTO-221H) 40-fach geringer ist, als in einer anderen Studie in der die EC_{50} freier Eisenionen in murinen Alveolarepithelzellen gemessen wurde (Okeson et al., 2004). Daraus wurde geschlossen, dass die Aufnahme und damit die lokale, intrazelluläre Freisetzung von Eisenionen aus MEONP in endozytischen Organellen (Endosom, Lysosom) zur verstärkten Toxizität beiträgt (Brunner et al., 2006). In der gleichen Studie wird aber auch die zelltyp-abhängige Toxizität in MSO-221H und murinen 3T3-Fibroblasten gezeigt, die durch unterschiedliche Proliferationsraten erklärt wurde (Brunner et al., 2006). Andere Studien zeigen, dass Zelltod in A549-Zellen erst bei sehr hohen, in zellkultur-üblichen Konzentrationen (ab 250 $\mu\text{g/ml}$) auftritt (Choi et al., 2009). Dies entspricht ungefähr der 10-fachen intravaskulären Serumkonzentration an Eisen, die bei intravenöser Injektion des Kontrastmittels Combidex (2,6 mg/kg) bei einem 70 kg schweren Menschen mit 5 l Blut angenommen wird (Shaw et al., 2008). Da MEONP nach intravenöser Injektion in Leber und Milz in Makrophagen aufgenommen werden, beschäftigt sich eine Vielzahl von *in vitro* Studien mit der Aufnahme und Toxizität von Eisenoxid-Nanopartikeln in Makrophagen (Beduneau et al., 2009; Moore et al., 1997; Müller et al., 2007). In *in vivo* Tumormodellen finden sich nach Injektion von Dextran-beschichteten MEONP nur geringe Mengen (ca. 0,1 %) im Tumor, wobei 50 % in Tumorzellen und ca. 20 % in Tumor-assoziierten Makrophagen detektiert werden konnten. Trotz der geringen akkumulierten Menge an MEONP konnte der Tumor mit MRT detektiert werden (Moore et al., 2000). Lunov und

Kollegen zeigten kürzlich, dass biokompatible, mit carboxyliertem Dextran ummantelte MEONP in Kupfferzellen (in der Leber vorhandene Makrophagen) Apoptose auslösen. In der gleichen Studie konnte *in vitro* gezeigt werden, dass in Makrophagen via ROS die Aktivierung der stress-induzierten Proteinkinase JNK ausgelöst wird. Chemische Inhibition der JNK oder die Behandlung mit verschiedenen ROS-Scavengern führt *in vitro* zur Reduktion des Zelltods. Eine mögliche Erklärung für die auftretende Toxizität wäre die Degradation der Polymerhülle des MEONP-Kerns in endozytischen Organellen und die damit exponierte MEONP-Oberfläche, aus der Eisenionen freigesetzt werden. Dies zeigt, dass die Stabilität der Polymerbeschichtung entscheidend für die MEONP-Toxizität sein kann (Lunov et al., 2010a; Lunov et al., 2010b)

1.3.2 SiO₂-Nanopartikel-assoziierte Toxizität

Die entzündungsauslösende Wirkung von amorphen Silikaten wurde schon sehr früh, zu Beginn des 20. Jahrhunderts, bei der Erforschung als mögliches Therapeutikum von Arteriosklerose (Kühn, 1921; Scheffler et al., 1920) oder pulmonaler Tuberkulose (Roth, 1921) beobachtet. Die subkutane Verabreichung von kolloidalem Silika (1 nm – 1000 nm) führt bei Mäusen zur Einwanderung von Leukozyten und zur Schwellung im Bereich der Injektion. Die intravenöse Injektion von sub-lethalen Konzentrationen in Mäusen führt zur Schädigung der Nieren (Nekrose), lethale Konzentrationen führen in wenigen Minuten zum Tod, wobei intravaskuläre Koagulation zu beobachten war (Gye und Purdy, 1922). Die hämolytische Aktivität konnte später nachgewiesen werden (Harley und Margolis, 1961) Aktuellere *in vitro* und *in vivo* Studien bestätigen frühere Arbeiten: Intraperitoneale und intratracheale Verabreichung von SiO₂-Nanopartikeln führt in beiden Fällen zu einer Endzündungsreaktion (Cho et al., 2007; Park und Park, 2009; Wahrheit et al., 1995). Nach der intravenösen Injektion einer nicht-lethalen Konzentration von SiO₂-NP enden sie, hauptsächlich in Makrophagen lokalisiert, in der Leber und Milz (Cho et al., 2007; Park und Park, 2009; Xie et al., 2010). Zellkulturexperimente mit zahlreichen humanen Krebszelllinien, die aus verschiedenen Geweben (Endothel, Lungenepithel, Fibroblasten, Keratinozyten) gewonnen werden, zeigen größenabhängige Toxizität (Lin et al., 2006; Napierska et al., 2009) (Chang et al., 2007; Lison et al., 2008; Yang et al., 2010). Oxidativer Stress wird nach Exposition mit SiO₂-NP in der humanen Bronchialepithelzelllinie Beas-2B (Eom und Choi, 2009) und der Alveolarepithelzelllinie A549 (Lin et al., 2006) detektiert. Die Toxizität wird dabei nicht nur in humanen, sondern auch in murinen Zelllinien beobachtet, wobei dies unabhängig vom Zelltyp (Keratinozyten, Makrophagen) ist (Dutta et al., 2007; Lison et al.,

2008; Park und Park, 2009; Yu et al., 2009). Des Weiteren können SiO₂-NP auch die Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen verhindern (Park et al., 2009b). Interessant ist, dass die Expression bestimmter Gene und die Toxizität in Zellen, die mit verschiedenen großen SiO₂-Partikeln inkubiert werden, eher mit der spezifischen Oberfläche als mit der Größe korreliert (Waters et al., 2008). Da die biologische Aktivität wahrscheinlich von der Aufnahme und subzellulären Lokalisation von SiO₂-NP abhängt, wird auch dies in Studien untersucht. Dabei zeigt sich, dass generell in verschiedenen epithelialen Zelllinien (HeLa, A549, HEL-30) SiO₂-NP in Endolysosomen aufgenommen werden (Al-Rawi et al., 2011; Jin et al., 2007; Stayton et al., 2009; Yu et al., 2009). Eine Studie konnte hingegen zeigen, dass SiO₂-NP in den Zellkern von HEp-2-Zellen (humane Larynxkarzinomzelllinie) translozieren und dort zelluläre Funktionen stören (Chen und von Mikecz, 2005).

1.4 Probleme der Nanotoxikologie

1.4.1 Interferenz von Nanoobjekten mit Toxizitätstests

In vitro und *in vivo* Untersuchungen von Nanoobjekten konnten bisher verschiedene Parameter identifizieren, die einen Einfluss auf die Toxizität von Nanoobjekten besitzen. Dabei wurde die durchmesserabhängige Toxizität von Nanoobjekten im Vergleich zu größeren Partikeln beobachtet (Duffin et al., 2007; Landsiedel et al., 2010; Oberdörster et al., 2005b). Des Weiteren lassen sich Effekte anhand der unterschiedlichen Kristallstruktur, sowie des Agglomerationsverhaltens, der Porosität, Form und Oberflächenbeschichtung von Nanoobjekten feststellen (Grassian et al., 2007; Pan et al., 2009; Rabolli et al., 2010; Rothen-Rutishauser et al., 2010; Sayes et al., 2006). Aus diesen Beobachtungen leitet sich ab, dass die Gesamtheit aller physiko-chemischen Eigenschaften eines Nanoobjekts die biologische Aktivität definiert und sich damit eine Vorhersage der Toxizität bisher als schwierig erweist.

Mit der Zunahme der Entwicklung industrieller und potentieller biomedizinischer Nanoobjekte werden zur Zeit schon Methoden zur Evaluierung ihrer Toxizität eingesetzt, die im Hochdurchsatz angewendet werden können. Um die Toxizität von Chemikalien oder Nanoobjekten zu untersuchen, wird meist die Zellvitalität anhand verschiedener Endpunkte untersucht. In der Toxikologie werden häufig folgende zwei Messmethoden angewendet, um die Zytotoxizität bzw. Zellvitalität zu quantifizieren (Kroll et al., 2009; Stone et al., 2009):

Die erste Methode ist die Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH), die bei Zellen mit geschädigter Plasmamembran in den Überstand abgegeben wird (Korzeniewski und Callewaert, 1983). Der Nachweis der Aktivität wird über die Umsetzung eines schwach gelben Tetrazoliumsalzes (z.B. INT) zu einem roten Formazan durchgeführt. Hierbei setzt die LDH in einer Redoxreaktion Laktat zu Pyruvat (Oxidation) und NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Reduktion) um (Nachlas et al., 1960). In der zweiten Reaktion wird durch den Katalysator Diaphorase $\text{NADH} + \text{H}^+$ wieder zu NAD^+ umgewandelt bei gleichzeitiger Reduktion des Tetrazoliumsalzes zum roten Formazan. Die Intensität des Farbstoffs ist proportional zur Menge der freigesetzten LDH und damit der Membranschädigung. Die zweite Methode zur Messung der Zellvitalität ist die Reduktion von Tetrazoliumsalzen (MTT, WST-1, MTS, XTT) zu einem wasserlöslichen gelben Formazansalz durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase in vitalen und damit stoffwechselaktiven Zellen. Die Intensität des Farbstoffs ist proportional zur Stoffwechselaktivität, die als Maß für die Zellvitalität dient (Berridge et al., 2005).

Da in beiden Fällen die Analyse der Zytotoxizität mit Hilfe der Umsetzung von Farbstoffen indirekt bestimmt wird, ist eine Interferenz zwischen Nanoobjekten und kolorimetrischen Messmethoden nicht ausgeschlossen. Schon recht früh wurde beobachtet, dass einwandige Kohlenstoff-Nanofasern in A549 Zellen mit dem Farbstoff MTT wechselwirken und somit scheinbar toxisch wirken (Wörle-Knirsch et al. 2007). Parallele Experimente mit anderen löslichen Tetrazoliumsalzen wie WST-1, XTT und INT konnten dieses Ergebnis nicht bestätigen. Weitere Studien konnten zeigen, dass ebenso MEONP durch Interferenz mit dem Formazan MTS die Messung der Zytotoxizität verfälschen können (Doak et al., 2009). Han und Kollegen zeigten 2011, dass LDH an TiO_2 -NP bindet, was zur Folge haben kann, dass adsorbiertes LDH nicht für die Messung bereit steht (Han et al., 2011). Des Weiteren können Nanoobjekte auch mit anderen Messmethoden, z.B. dem ELISA-Test (*enzyme-linked immunosorbent assay*) interferieren. Dieser wird in der Toxikologie eingesetzt, um z.B. die Sezernierung von pro-inflammatorischen Mediatoren (Zytokine) aus Zellen zu bestimmen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Metalloxide TiO_2 und SiO_2 die Zytokine IL-6 und IL-8 binden und damit mit der Detektion interferieren können (Kocbach, et al., 2008; Brown et al., 2010; Veranth et al., 2007).

1.4.2 Agglomeration und Aggregation von Nanoobjekten

Weitere Eigenschaften von Partikeln, die einen Einfluss auf die Toxizität haben können, sind Agglomeration und Aggregation (Oberdörster, 2010). Agglomeration ist als Anlagerung von einzelnen Primärpartikeln durch Van-der-Waals und zwischen-molekulare Kräfte zu größeren Sekundärpartikeln definiert, wobei die Kräfte zwischen den Partikeln relativ schwach sind und sich auch wieder lösen können. Die erste Möglichkeit dies zu vermeiden, ist, die Ladungsdichte der Partikeloberfläche zu erhöhen, wodurch die elektrostatische Abstoßung von Partikeln verstärkt wird. Klassischerweise wird dies mit dem Anbringen negativ geladener Polymere erreicht. Die zweite Möglichkeit ist, die Partikelkonzentration zu verringern, um die Wahrscheinlichkeit der Kollision zu minimieren. Aggregation ist die chemische Bindung (Verschmelzung) von Primärpartikeln. Dieser Vorgang wird meist bei der Flammensynthese (Pyrolyse) von Partikeln beobachtet, wobei Primärpartikel bei hohen Temperaturen aggregieren (Versinterung). Sie besitzen zwar eine hohe Oberfläche, durch die Versinterung aber nimmt die Sekundärpartikelgröße zu. Da die Sekundärpartikel durch eine chemische Bindung zusammengehalten werden, muss Energie (z.B. in Form von Beschallung) aufgewendet werden, um diese wieder in Primärpartikel zu dissoziieren (Bihari et al., 2008). Um dies zu verhindern, sollte wenn möglich, auf eine nasschemische Synthese ausgewichen werden. Da *in vitro* Experimente meist unter Submersbedingungen durchgeführt werden, d.h. die Partikel werden in Kulturmedium auf eine Zellschicht gegeben, muss festgestellt werden, ob das zu untersuchende Partikel im Kulturmedium als Primärpartikel vorliegt oder durch Agglomeration bzw. Aggregation Sekundärpartikel bildet. Mit der Vergrößerung des Durchmessers nimmt die Sedimentation der Partikel in wässrigen Suspensionen zu und die Diffusion der Partikel ab. Nach dem Stokesschen Gesetz (2) besitzen zwei verschieden große Partikel in der gleichen Flüssigkeit unterschiedliche Sinkgeschwindigkeiten, wenn sie sich im Durchmesser unterscheiden (Carvalho et al., 2011).

$$v_p = \frac{(\rho_p - \rho_f) \cdot d^2 \cdot g}{18 \cdot \eta} \quad (2)$$

v_p : Sedimentationsgeschwindigkeit eines Partikels, ρ_p : Dichte des Partikels,
 ρ_f : Dichte der Flüssigkeit, d : Partikeldurchmesser, g : Erdbeschleunigung,
 η : dynamische Viskosität der Flüssigkeit

Aus (1) wird ersichtlich, dass durch Erhöhung des Partikelradius die Sinkgeschwindigkeit exponentiell zunimmt, was in der Zunahme der Sedimentation resultiert. Dadurch kann sich die zelluläre Dosis von der eingesetzten Dosis unterscheiden (Cho et al., 2011; Teeguarden et al., 2007). Somit erweist sich bei gleicher Konzentration der direkte Vergleich verschieden großer Partikel hinsichtlich der Toxizität als schwierig, da die tatsächliche zelluläre Dosis sich stark unterscheiden kann. Dies ist ein Problem vieler Toxizitätsstudien, in denen die gemessene Toxizität ausschließlich auf die eingesetzte Konzentration im Expositionsmedium bezogen wird. Daher setzt eine toxikologische Untersuchung eine gründliche physiko-chemische Charakterisierung der Form, Agglomeration/Aggregation und der Oberflächenladung von Partikeln voraus.

1.4.3 Interaktion von Proteinen mit Nanoobjekten

Partikel interagieren nicht nur untereinander, sondern kommen in biologischen Systemen, sei es *in vitro* oder *in vivo*, auch in Kontakt mit biologischen Molekülen. Diese können je nach chemischer Zusammensetzung, Ladung, Form, Größe und Hydrophobizität an die Oberfläche adsorbieren und die Wirkungen auf Zellen verändern (Cedervall et al., 2007; Lynch und Dawson, 2008; Nel et al., 2009). Im Fall einer bio-medizinischen Anwendung oder bei Zellkulturexperimenten sind es Serumproteine, die je nach Bindungsaffinität und Dissoziation eine Proteinhülle um das Partikel bilden, die als *corona* bezeichnet wird. Sie können in stabil adsorbierte Proteine (*hard corona*) und lose gebundene Proteine (*soft corona*) unterteilt werden (Casals et al., 2010; Lundqvist et al., 2008). Die dadurch entstandene Grenzfläche kann einen Einfluss auf die biologische Aktivität (Aufnahme, Toxizität, Proliferation, Inflammation) haben. Angenommen wird, dass Zellen die auf der Oberfläche befindlichen Proteine durch spezifische Rezeptoren erkennen und aufnehmen. Darüber hinaus haben Proteine auch die Fähigkeit, die Agglomeration von Partikeln zu beeinflussen, die wiederum Einfluss auf die Sedimentation der Partikel hat.

In Zellkulturexperimenten wird dem Kulturmedium klassischerweise bovines Serum zugesetzt, um das Wachstum von Zellen zu fördern. Blutserum ist der nicht-zelluläre, flüssige Teil des Blutes ohne Fibrinogen, der hauptsächlich aus Proteinen besteht. Der Großteil der Proteinmenge besteht aus Albumin (35-55 %), ein aus 583 Aminosäuren aufgebautes 67 kDa großes globuläres Protein, das in seiner Struktur mit den Abmessungen 14 nm x 4 nm x 4 nm einem Prisma ähnelt (Hirayama et al., 1990; Wright und Thompson, 1975). Albumin besitzt drei Domänen, wovon zwei Domänen hydrophobe Taschen besitzen, die positivgeladene

Aminosäurereste besitzen. Dadurch können viele hydrophobe Stoffe (z.B. Fettsäuren, Steroidhormone, Cholesterin, Bilirubin) und Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) sowie Medikamente gebunden und transportiert werden (Brodersen et al., 1988; Jacobsen und Brodersen, 1983; Kratz, 2008). Außerdem ist es für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks zuständig (Reed, 1981) und stellt im Blut die Proteinreserve dar (Schaller et al., 2008). Der zweitgrößte Anteil des Serums sind Globuline (α_1 -, α_2 -, β -, γ -Globuline). Neben der Funktion als Enzyme, Transporter und der pH-Regulierung liegt die Hauptaufgabe in der Immunabwehr (Schroeder und Cavacini, 2010). Unter ihnen sind es die γ -Globuline IgG und IgM, die als Teil der humoralen Immunantwort von Plasmazellen produziert werden, und über ihre Antigen-bindende Domäne (Fab-Fragment) Fremdstoffe binden und markieren (Opsonisierung). Durch die spezifische Bindung des konstanten Teils der Immunglobuline (F_c) an den F_c -Rezeptor in Fresszellen, können diese Zellen dann Fremdstoffe entsorgen. Darüber hinaus kann eine Opsonisierung auch durch andere Proteine des Immunsystems vermittelt werden, dazu gehören Komplement-Proteine (u.a. C3b und C4b), die über Komplement-Rezeptoren in Phagozyten erkannt werden (Aderem und Underhill, 1999).

1.5 Aufnahmewege in die Zelle

Die Plasmamembran einer Zelle stellt eine physische, aber auch dynamische Barriere zwischen dem extrazellulären Raum und dem Zellinneren, dem Zytosol, dar. Sie besteht aus einer Doppelschicht von amphipatischen Phospholipiden, die aus einer polaren Kopfgruppe (Phosphatgruppe und Cholin oder Serin) und einer unpolaren langkettigen Schwanzgruppe (Glycerin und zwei Fettsäuren) aufgebaut ist. Die hydrophilen Kopfgruppen sind in den extrazellulären Raum, bzw. in das Zytosol, die hydrophoben Fettsäuren in den Innenraum der Plasmamembran orientiert. Zusätzlich sind in der Plasmamembran das Steroid Cholesterin und Glykolipide eingefasst, die ebenfalls polar sind. Neben dem Lipidanteil (ca. 50 %) kommen zum größten Teil Proteine in der Plasmamembran vor, die komplexe Aufgaben als Transporter, Anker, Rezeptoren oder Enzyme besitzen, ohne welche die Zelle nicht mit dem extrazellulären Raum bzw. anderen Zellen kommunizieren kann.

Um Stoffe aktiv, d.h. unter ATP-Verbrauch, aus dem extrazellulären Raum in das Zytosol zu transportieren, besitzt die Zelle verschiedene Möglichkeiten, die unter dem Begriff Endozytose zusammengefasst werden. Hierbei unterscheidet man Phagozytose (*griech.* phagein = fressen) von Molekülen, Mikroorganismen oder Partikeln, die zwischen 0,1 μm und 10 μm groß sind und Pinozytose (*griech.* trinken), d.h. die Aufnahme von gelösten

Stoffen und extrazellulärer Flüssigkeit. Das Ergebnis ist ein mit einer Doppellipidschicht ummanteltes Kompartiment, das je nach Aufnahmeweg als Phagosom, bzw. als Endosom bezeichnet wird. Darüberhinaus lassen sich unter dem Begriff Pinozytose vier Aufnahmewege zusammenfassen, die sich in der Endosomgröße und im Vorgang der Vesikelbildung unterscheiden (Conner und Schmid, 2003):

- 1) Makropinozytose (bis 1 μm)
- 2) Clathrin-vermittelte Endozytose (100 nm – 150 nm)
- 3) Caveolin-abhängige Endozytose (50 nm- 80 nm)
- 4) Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose (\sim 100 nm)

Alle bekannten aktiven Aufnahmewege sind in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst (Abb. 1).

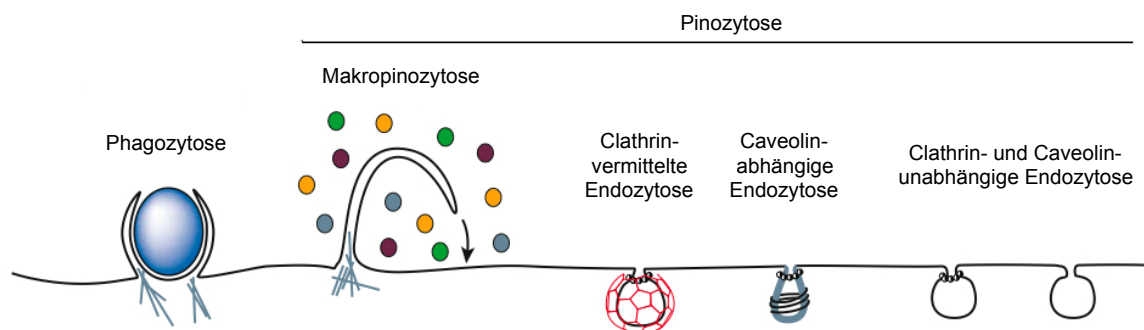


Abbildung 1: Aktive Aufnahmewege in Säugerzellen. Adaptiert von Conner und Schmid, 2003

Neben den aktiven Aufnahmewegen ist auch die passive Aufnahme von Molekülen, d.h. ohne Aufwand von Energie, entlang eines Konzentrationsgefälles durch Transporter oder Kanäle in der Plasmamembran möglich. Im Folgenden werden die aktiven Aufnahmewege genauer beschrieben.

1.5.1 Phagozytose

Die Phagozytose wird hauptsächlich von spezialisierten Zellen, sogenannten Phagozyten durchgeführt. Zu ihnen zählen die während der Hämatopoese aus myeloiden Progenitorzellen entstandenen neutrophilen Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen und Makrophagen. Hierbei werden große Stoffe, wie Mikroorganismen, Hefen, Debris toter Zellen oder nicht-

lösliche Partikel von Plasmamembranausstülpungen der Phagozyten umschlossen. Als auslösende Signale können Glykoproteine, sowie die als Opsonine wirkenden Proteine des Komplementsystems (C3, C5) und Immunglobuline (z.B. IgG) fungieren. Durch die spezifische Bindung an Mannose- (MR), Komplement- (CR) oder Immunglobulin-Rezeptoren wird die Verlagerung des Aktinzytoskeletts mit Hilfe kleiner GTPasen der Rho-Familie (Rac, Arf, Cdc42) bewerkstelligt (Aderem und Underhill, 1999; Chimini und Chavrier, 2000). Nach der Abschnürung des Phagosoms fusioniert dies mit einem Lysosom, einem mit verschiedenen Hydrolasen gefüllten Kompartiment, zu einem Phagolysosom. Dies führt zum enzymatischen Abbau des im Lumen befindlichen Materials (Haas, 2007).

1.5.2 Makropinozytose

Im Gegensatz zur Phagozytose führt die Bindung von Wachstumsfaktoren wie EGF (*epithelial growth factor*) an Membranrezeptoren durch Umlagerung des Aktinzytoskeletts mittels monomerer GTPasen zur Membranausstülpung. Generell wird dieser Weg induziert, um Nährstoffe aus dem extrazellulären Raum aufzunehmen. Eine weitere Funktion ist das Abschalten von aktiven Wachstumsfaktorrezeptoren, da der Inhalt des gebildeten Makropinosoms durch die Fusion mit einem Lysosom abgebaut wird oder durch einen Recyclingprozess der Zellmembran zurückgeführt wird. Darüberhinaus nutzen Viren diesen Aufnahmeweg, um in das Zellinnere zu gelangen (Conner und Schmid, 2003).

1.5.3 Clathrin-vermittelte Endozytose

Die Clathrin-vermittelte Aufnahme gehört zur Rezeptor-vermittelten Endozytose, die durch die Bildung von runden, Clathrin-ummantelten Membranabschnürungen (*coated pits*) charakterisiert ist. Clathrin, ein aus drei schweren und drei leichten Aminosäureketten bestehendes Protein, diverse Adapterproteine (AP) und die große GTPase Dynamin vermitteln hierbei die Membraneinstülpung und Abschnürung zum *coated pit*. Auf diesem Weg werden z.B. das Cholesterin-bindende Lipoprotein und das Eisen-bindende Transferrin in das Zellinnere aufgenommen (Brodsky et al., 2001). Weitere wichtige Funktionen sind das Abschalten von membranständigen Rezeptoren, die Erneuerung synaptischer Vesikelmembranen nach Neurotransmitterausschüttung, sowie die Internalisierung von Membranpumpen und spannungsgesteuerten Ionenkanälen (Conner und Schmid, 2003).

1.5.4 Caveolin-abhängige Endozytose

Im Gegensatz zur Clathrin-vermittelten Endozytose entstehen bei diesem Aufnahmeweg in Abhängigkeit des dimeren Proteins Caveolin kolbenförmige Einstülpungen (Caveolae) der Plasmamembran, in denen u.a. Cholesterin oder das Phospholipid Sphingomyelin lokalisiert sind (Anderson, 1998). Die auf der inneren Seite der Phospholipiddoppelschicht lokalisierten Caveoline binden Cholesterin, wodurch es zur Vernetzung und Stabilisierung der Caveolae kommt. Für die Internalisierung ist weitergehend das Aktinzytoskelett von Nöten. Nach der Abschnürung fusionieren Caveolae entweder mit einem Endosom, das spätergehend zum Lysosom maturiert (siehe Kapitel 1.5.6) oder zu einem Caveosom, wobei Abschnürungen mit dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum (ER) verschmelzen. Auf diesem Weg wird z.B. in endothelialen Zellen das Protein Albumin aus dem Blut in das Innere der Zelle aufgenommen und anschließend durch Transzytose in das Interstitium, den Raum zwischen Geweben, abgegeben (Pelkmans und Helenius, 2002).

1.5.5 Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose

Neben den bisher beschriebenen Aufnahmewegen ist auch ein Clathrin- und Caveolin-unabhängiger Aufnahmeweg bekannt, der aber weniger gut verstanden ist. Hierbei tritt die Internalisierung in speziellen Mikrodomänen in der Plasmamembran, den *lipid rafts*, auf, die reich an Cholesterin- und Sphingomyelin sind. Angenommen wird, dass Sphingomyeline auf diesem zusätzlichen Weg ins Zellinnere transportiert werden können (Conner und Schmid, 2003).

1.5.6 Das endosomale Membransystem und Lysosomen

Die während der Clathrin-vermittelten und Clathrin-unabhängigen Endozytose entstandenen Vesikel fusionieren zu größeren Kompartimenten, dem Endosom. Diese werden je nach zellulärer Lokalisation, Vorkommen von spezifischen Proteinen, Morphologie und pH-Wert unterschieden. Die Gesamtheit wird als endosomales Membransystem bezeichnet, wobei die zeitlich frühen Endosomen über multivesikuläre Körperchen (*multi-vesicular bodies*) zu späten Endosomen und letztlich zu Lysosomen heranreifen. Während des Prozesses der Maturierung wird das Lumen des frühen Endosoms (pH 6,5) durch den Transport von Protonen durch die vakuoläre H⁺-ATPase (V-ATPase) angesäuert, wobei der pH-Wert im späten Endosom auf pH 5,5 und weitergehend im Lysosom auf pH 3,8-5,0 sinkt (Luzio et al.,

2007; Saftig und Klumperman, 2009). Durch das saure Milieu im Lysosom werden über 50 Hydrolasen (Proteasen, Lipasen und Nukleasen) aktiv, darunter eine Familie von Cystein-Proteasen, die Cathepsine (Turk et al., 2002). Daneben gibt es auch die Möglichkeit, dass der Inhalt zurück zur Plasmamembran transportiert wird, wobei dieser als Exosomen sezerniert oder über ein Recycling-Endosom in die Plasmamembran eingebaut wird. Welcher Inhalt wohin transportiert wird, ist durch monomere GTPasen der Rab-Familie (*ras-related in brain*) reguliert, die über 70 Proteine umfasst (Stenmark, 2009). Sie sind durch eine post-translationale Modifikation (Isoprenylierung) in der Endosomenmembran verankert und zum Zytosol gerichtet. Hierbei lassen sich z.B. frühe Endosome durch das Vorhandensein von Rab5, das auch für die Fusion zwischen Endosomen verantwortlich ist, von späten Endosomen, die Rab7 in ihrer Membran tragen und für die Entwicklung zum Lysosom wichtig ist, unterscheiden. Darüber hinaus verfügen Lysosomen über spezifische Membranproteine, LAMP (*lysosomal membrane-associated proteins*), die wichtig für die Erkennung und Fusion mit anderen Kompartimenten sind (Eskelinen et al., 2003). Um diese gerichtete Motilität des endosomalen Membransystems zu gewährleisten, wird der Transport mittels Zytoskelett (Aktinfilamente und Mikrotubuli) sowie Motorproteinen (Myosine, Kinesine, Dyneine) durchgeführt. Neben dem Abbau von extrazellulärem Material besitzen Lysosomen auch die Aufgabe zelleigenes Material, z.B. während des Zelltodes (Kapitel 1.6) zu verdauen.

1.6 Formen des Zelltods

1.6.1 Apoptose

Unter dem Begriff der Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, der durch eine streng regulierte Abfolge von Prozessen durchgeführt wird. Dieser hat die physiologische Aufgabe in einem multizellulären Organismus ungewollte oder entartete Zellen zu beseitigen und damit das zelluläre Gleichgewicht zu halten. Während der Apoptose werden unter Verbrauch von Energie in Form von ATP zelluläre Bestandteile enzymatisch abgebaut, wobei die begrenzende Zellmembran unbeschädigt bleibt. Dies verhindert den Kontakt von zellulären Komponenten mit dem umliegenden Gewebe, was zu Entzündungsreaktionen führen würde. Für den programmierten Zelltod sind folgende morphologische Kennzeichen beschrieben (Taylor et al., 2008):

- 1) Verlust der Adhäsion
- 2) Schrumpfen der Zelle und des Zellkerns (*pyknosis*)
- 3) Kondensation des Chromatins
- 4) Ausstülpungen der Membran (*blebbing*)
- 5) Fragmentierung des Chromatins (*karyorrhexis*)
- 6) Verpackung der zellulären Bestandteile in Vesikel (apoptotische Körperchen)
- 7) Entsorgung durch Makrophagen *in vivo* (Phagozytose)

Die Initiation der Apoptose kann entweder extrinsisch (Typ I) oder intrinsisch (Typ II) gestartet werden. Beim extrinsischen Signalweg führt die Bindung von Liganden an den extrazellulären Teil der Rezeptoren der TNF-Superfamilie (z.B. TNF α , Fas, TRAIL) zur Trimerisierung der transmembranen Rezeptoreinheiten und damit zum Zusammenführen der im intrazellulären Teil des Rezeptors befindlichen Todesdomäne. Diese dient als Plattform für weitere Proteine, die entweder nur eine Todesdomäne (z.B. TRADD) oder zusätzlich noch eine Todeseffektordomäne (z.B. FADD) besitzen. Um die Signalkaskade intrazellulär weiterleiten zu können werden hierarchisch Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, sogenannte Caspasen (*cysteine-dependent aspartyl-specific proteases*) aktiviert. Diese liegen als Pro-Formen im Zytosol vor und werden in Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-8 und 9), die am Anfang der Signalkette aktiviert werden und Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3 und 7), die für den proteolytischen Abbau von Enzymen und Strukturproteinen in der Zelle verantwortlich sind, unterteilt. Darüber hinaus können weitere Caspasen (z.B. Caspase-1 und -12) Entzündungsreaktionen vermitteln. Im Verlauf der Rezeptor-vermittelten Apoptose bindet zunächst die inaktive Pro-Form der Caspase-8 (Pro-Caspase-8) an die Todeseffektordomäne. Durch autokatalytische Spaltung kann die nun aktive Caspase-8 Effektorcaspasen durch proteolytische Spaltung aktivieren und damit die Caspasekaskade auslösen, wobei dieser unumkehrbare Vorgang zum Zelltod führt. Am Ende der Signalkette stehen Nukleasen, die den Abbau, bzw. Fragmentierung der nukleären DNA auf ca. 200 bp lange Stücke durchführen. Weitere extrinsische Auslöser des programmierten Zelltods sind der Entzug von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, sowie die Inhibition von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten (Taylor et al., 2008)

Neben dem extrinsischen Signalweg wird die Apoptose intrinsisch durch die Zunahme von Stress ausgelöst. Ursachen können ein erhöhtes Vorkommen von DNA-Schäden (genomischer Stress) oder Sauerstoffradikalen (oxidativer Stress), Ausbleiben von

Nährstoffen (Nährstoffstress) und Sauerstoff (Hypoxie), sowie Hitzedenaturierung von Proteinen (Temperaturstress) sein. Während dieses Vorgangs werden die Signale zu den Mitochondrien weitergeleitet, die durch Proteine der Bcl-2 Familie reguliert werden. Unter nicht-apoptotischen Bedingungen verhindern anti-apoptotische Bcl-2 Proteine (Bcl-2, Bcl-X_L), dass pro-apoptotische Bcl-2 Proteine (Bax, Bak) durch Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran diese permeabilisieren. Beim Auslösen des intrinsischen Wegs werden BH3-only Proteine aktiv, die auf der einen Seite anti-apoptotische Bcl-2 Proteine inhibieren und auf der anderen Seite die pro-apoptotischen BAX und BAK aktivieren. Damit wird die oben beschriebene MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*) ausgelöst. Dies hat den Verlust der Integrität der Mitochondrien zur Folge, wobei pro-apoptotisch wirkende mitochondriale Faktoren (u.a. Cytochrom c) ins Zytosol freigesetzt werden. Durch die Bildung des Apoptosoms bestehend aus Cytochrom c, APAF-1 (*apoptosis protease activating factor*) und der inaktiven Pro-Caspase-9 wird diese aktiv, wobei schließlich die Caspase-Kaskade und der Abbau intrazellulärer Bestandteile ausgelöst wird. Zusätzlich ist auch der *cross-talk* zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg möglich, wobei die aktive Caspase-8 das pro-apoptotische Protein Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) aktiviert, das nach der Spaltung als verkürztes Protein tBid (*truncated Bid*) in das Mitochondrium transloziert und Caspasen (u.a. Caspase-9) aktiviert (Taylor et al., 2008; Youle und Strasser, 2008).

Im Zusammenhang mit der Apoptose leisten Lysosomen nur einen kleinen Beitrag, wobei bestimmte Stimuli, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), membranschädigende Materialien oder Krebsmedikamente die Permeabilisierung der Lysosomenmembran forcieren und ein Efflux von lysosomalen Hydrolasen ins Zytosol stattfindet (Boya und Kroemer, 2008). Dieser Vorgang wird als lysosomale Membranpermeabilisierung, kurz LMP, bezeichnet. Der anschließende Prozess und die Auswirkungen sind weniger gut verstanden. Durch den Übertritt in die intrazelluläre Flüssigkeit, die ca. einen pH-Wert von 7,4 besitzt reduziert sich die proteolytische Aktivität der Cathepsine, wobei Cystein-Cathepsine ihre Proteinstruktur verlieren und Aspartat-Cathepsine im katalytischen Zentrum deprotoniert werden (Turk et al., 1995). Hinzu kommt, dass Substrate bei neutralem pH-Wert nicht frei vorliegen, in Proteinkomplexen oder der Membran assoziiert sind und damit schlechter zugänglich für den proteolytischen Abbau sind. Dagegen kann teilweise aber die Ansäuerung des Zytosols während der Apoptose wirken (Nilsson et al., 2006). Als Substrate der Cathepsine wurden bisher das pro-apoptotische Protein Bid und die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie

Bcl-2, Bcl-X_L und Mcl-1, sowie das anti-apoptotische Proteine XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), das normalerweise die Effektorcaspasen-3, -7, -9 bindet und inhibiert, beschrieben (Droga-Mazovec et al., 2008). Der Abbau dieser Proteine führt zur zusätzlichen Progression der intrinsischen Apoptose. Da die zeitliche Einordnung der LMP in manchen Fällen nach der MOMP beobachtet worden ist, steht sie nicht als alleiniger Initiator der Apoptose da.

1.6.2 Autophagie

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, das Zellüberleben zu steuern, stellt der Verdau von zytosolischen Bestandteilen der Zelle dar, um das Überleben und die Homöostase zu sichern. Auslösende Faktoren können veränderte äußere Bedingungen (z.B. Nährstoffmangel), geschädigte Organellen, infiltrierte Erreger (Bakterien, Viren oder Parasiten), Proteinaggregate oder Partikel sein. Der zentrale Spielmacher der Autophagie ist die Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), die unter normalen Bedingungen das Auslösen der Autophagie durch die Phosphorylierung von Atg13 (*autophagy gene*) verhindert. Unter Stressbedingungen hingegen, wird mTOR inhibiert, wodurch Atg-13 einen Komplex mit Atg-1 und Atg-17 eingehen kann, der zur Initialisierung der Autophagie führt. Im zweiten Schritt bildet sich ein Multiproteinkomplex bestehend aus der aktivierten PI3-Kinase, Vps34, Beclin-1, UVRAG (*UV irradiation resistance-associated tumor suppressor gene*) und der myristoylierten Kinase Vps15 an isolierten Membranen. Um das abzubauen Material einzuschließen, findet dann schrittweise eine Elongation der isolierten Membran (Phagophore) statt. Entscheidend für den dritten Schritt sind zwei Prozesse. Zum Einen findet eine mehrstufige Akkumulation von Atg-Proteinen (Atg12, Atg5, Atg16) statt, die zur Krümmung der Phagophore führt. Auf der anderen Seite wird das Lipid Phosphatidylethanolamin (PE) auf die lösliche Form des Proteins LC3 (LC3-I) übertragen, das durch den obengenannten Multiproteinkomplex aus Atg-12, Atg-5 und Atg-16 in die Membran der Phagophore eingebaut wird und als LC3-II bezeichnet wird. Durch das Schließen der Membran bildet sich ein neues Kompartiment mit einer doppelten Membran, das Autophagosom. Im letzten Schritt verschmilzt das Autophagosom mit einem Lysosom, wodurch sich ein Autophagolysosom bildet. Durch die Fusion vermischen sich beide Lumen, wobei lysosomale Proteasen den Inhalt des Autophagolysosoms abbauen. Dies führt normalerweise zur vollständigen Wiedergewinnung der einzelnen Bestandteile wie Aminosäuren, die für andere Stoffwechselforgänge genutzt werden können (Maiuri et al., 2007). Unter bestimmten Bedingungen kann Autophagie schädlich für Zellen sein.

Blockierung von Autophagie verhindert jedoch den Prozess des Zelltods nicht vollständig, sondern verlangsamt ihn nur (Klionsky et al., 2008; Maiuri et al., 2007).

1.6.3 Nekrose

Die Nekrose stellt im Gegensatz zur Apoptose eine andere Form des Zelltods dar. Sie wird u.a. durch extreme Temperaturschwankungen, Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff, energiereiche Strahlung oder toxische Substanzen ausgelöst. Die pathologische Bedeutung der Nekrose findet sich in unterschiedlichen Krankheitsbildern, wie Schlaganfall, Ischämie oder neurodegenerativen Krankheiten, wieder (Golstein und Kroemer, 2007). Morphologische Merkmale dieses Zelltods sind folgende:

- 1) Anschwellen der Zelle (Onkose)
- 2) Anschwellen von zytoplasmatischen Organellen
- 3) moderate Kondensation des Chromatins
- 4) Ruptur der Plasmamembran

Die Nekrose unterscheidet sich durch den Verlust der Membranintegrität grundlegend von der Apoptose. Durch das Austreten von zytoplasmatischen Komponenten in den extrazellulären Raum kommen diese *in vivo* in Kontakt mit benachbarten Zellen, was zur Folge hat, dass Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe ausgelöst werden.

Bislang wurde angenommen, dass die Nekrose eine nicht-kontrollierte Form des Zelltods darstellt. Neuere Studien zeigen aber, dass u.a. Todesdomänenrezeptoren (TNFR1, Fas, /CD95 TRAIL-R) und Toll-like Rezeptoren (TLR3 und TLR4) den nekrotischen Phänotyp induzieren, wenn der apoptotische Signalweg, z.B. durch Caspase-Inhibitoren verhindert wird. Dies wird als programmierte Nekrose oder Nekroptose bezeichnet. Eine zentrale Funktion in der Nekroptose stellt hierbei die Kinase RIP1 (*receptor interacting serine/threonine-protein kinase-1*) dar (Holler et al., 2000). Neben den oben genannten Merkmalen treten auch weitere nicht in kausalen Zusammenhang zu bringende Phänomene auf. Dazu gehören Änderungen im Mitochondrium (u.a. Entkopplung der Atmungskette, Generierung von ROS und MOMP) und des Chromatins, eine starke Aktivierung von PARP-1, sowie der Abbau von Lipiden. Ein weiteres Kennzeichen ist der sehr rasche unkontrollierte Verlust der lysosomalen Membranintegrität, die sich in ihrer Intensität von der LMP in der Apoptose unterscheidet, und damit maßgeblich zur Nekrose führt. Studien im Fadenwurm

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) deuten an, dass in neuronalen Zellen durch die Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die kalzium-abhängigen Proteasen Calpaine aktiviert werden (Syntichaki et al., 2002). Die daraus resultierende LMP und die Entlassung der Cathepsine ins Zytosol lösen den nekrotischen Zelltod aus. Im Gegensatz zur LMP, die während der Apoptose auftritt, können Cathepsin-Inhibitoren den nekrotischen Zelltod in *C. elegans* verhindern (Luke et al., 2007). Dies lässt auf eine zentrale Funktion der LMP in der Nekrose schließen.

1.7 Die Bedeutung von Hochdurchsatzmethoden für die Toxikologie

Aufgrund der beobachteten Interferenzen mit den zur Zeit verwendeten Messmethoden hat die Entwicklung neuer Testsysteme, die es ermöglicht toxikologische Daten im Hochdurchsatz zu generieren, eine hohe Priorität (Kroll et al., 2009; Stone et al., 2009). Darüber hinaus hat die Toxikologie das Ziel Wirkungsweisen und Signalwege (*toxicity pathway*) von Chemikalien und Nanoobjekten in Zellen aufzuklären (Bhattacharya et al., 2011; Walker und Bucher, 2009). Ein möglicher Ansatz hierfür können automatisierte Mikroskopiesysteme sein, die in jüngster Zeit in der Biologie vermehrt Einsatz finden (Moffat und Sabatini, 2006; Pelkmans et al., 2005; Pepperkok und Ellenberg, 2006; Quent et al., 2010; Starkuviene und Pepperkok, 2007) und die gleichzeitige Analyse von verschiedenen Parametern (Zellzahl, Proliferation, Zelltod) erlauben.

Trotz der intensiven Untersuchung *in vitro* und *in vivo* ist der Parameter, der den toxischen Effekt von Nanoobjekten erklärt (Masse, Oberfläche, Partikelzahl) noch nicht bekannt. Daher sind vergleichende toxikologische Studien z.B. von verschiedenen großen Nanoobjekten mit einfacher Form, ein Weg, um eine Korrelation zwischen Masse, Oberfläche und Partikelzahl aufstellen zu können. Dies führt aber dazu, dass eine große Zahl an Proben analysiert werden muss, die nur durch *in vitro* Hochdurchsatzmethoden bewerkstelligt werden kann.

Ein weiteres Problem in der Nanotoxikologie bleibt aber die Dosis-Wirkungs-Beziehung. Im Vergleich zu Chemikalien wird die toxikologische Beurteilung von Nanoobjekten durch das Verhalten in Zellkulturmedien erschwert. Dabei spielt die Sedimentation eine große Rolle, die durch die Herstellungsart und die physikochemischen Eigenschaften der Partikel beeinflusst wird (Teeguarden et al., 2007). Durch unterschiedliche Sedimentationsraten von Partikeln in Zellkulturexperimenten verändert sich daher auch die Menge an Partikeln, die mit Zellen in Kontakt kommt, was zur Folge hat, dass sich die zelluläre Dosis der Partikel ändert. Dies ist

im Besonderen in Studien wichtig, in denen z.B. verschieden große oder oberflächenmodifizierte Partikel miteinander verglichen werden. Daher muss eine Quantifizierung der zellulären Dosis durchgeführt werden, um die Toxizität von Partikeln abschätzen zu können.

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Mit zunehmender Entwicklung der Nanotechnologie müssen neuartige Nanoobjekte, besonders für bio-medizinische Anwendungen, toxikologischen Untersuchungen unterzogen werden. Dabei sollen verlässliche *in vitro* Messmethoden verwendet werden, die die Untersuchung einer Vielzahl von Proben erlaubt. Heutige Hochdurchsatz-Messmethoden zeigen vermehrt Interferenzen mit den zu untersuchenden Nanoobjekten, was zur Entwicklung von neuen verlässlichen Methoden für die Nanotoxikologie führen muss. Hinzu kommt, dass physiko-chemische Eigenschaften (z.B. Größe, Oberflächenladung) sowie Proteine Einfluss auf das Diffusions- bzw. Sedimentationsverhalten von Partikeln in Kulturmedien haben, wodurch sich die effektive, zelluläre Dosis entscheidend ändern kann. Daher muss neben einer Korrelation zwischen der eingesetzten extrazellulären Konzentration und der gemessenen Toxizität auch eine Quantifizierung der tatsächlichen in/an den Zellen befindlichen Nanopartikel (zelluläre Dosis) durchgeführt werden, um eine verlässliche Dosis-Wirkungs-Beziehung aufzustellen. Darüber hinaus ist noch nicht geklärt, welcher Parameter (Masse, Oberfläche oder Partikelzahl) die Toxizität von Nanoobjekten bestimmt. Hierfür müssen *in vitro* Studien durchgeführt werden, in denen verschieden große Partikel in Bezug auf Aufnahme, subzelluläre Lokalisation und Toxizität miteinander verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit steht die Entwicklung einer auf Fluoreszenzmikroskopie-basierten *in vitro* Hochdurchsatzmethode im Vordergrund. Hierbei sollen verschiedene toxikologisch relevante Endpunkte (Zellzahl, Proliferationsrate, Zelltod) parallel nach Partikelexposition untersucht und mit konventionellen *in vitro* Messmethoden (LDH, WST-1, Annexin-V/PI-Färbung am Durchflusszytometer) verglichen werden. In der vorliegenden Arbeit werden unterschiedliche Metalloxid-Partikel (Eisenoxid, Siliziumdioxid) auf ihre Toxizität und Aufnahme in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW264.7 untersucht. Hierbei soll durch die Verwendung von verschieden großen sphärischen fluoreszenz-markierten SiO₂-Partikeln (70 nm, 200 nm, 500 nm) geklärt werden, welcher physikalische Parameter (Masse, Oberfläche oder Partikelzahl) mit der Toxizität korreliert. Da die physiko-chemischen Eigenschaften von Partikeln das Verhalten in Kulturmedium ändern, wird mit Hilfe von

kolorimetrischen und Fluoreszenz-basierten Spektrometriemethoden die zelluläre Dosis bestimmt. Der Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen Toxizität und der applizierten Dosis im Expositionsmedium bzw. der zellulären Dosis soll Aufschluss über Abschätzung der Toxizität in RAW264.7-Zellen geben. Des Weiteren soll die Aufnahme von unterschiedlich großen FITC-SiO₂-Partikeln mittels Fluoreszenz- und Transmissions-elektronenmikroskopie charakterisiert werden. Hierbei soll festgestellt werden, ob Proteine aus dem Serum einen Einfluss auf die Aufnahme und Lokalisation in RAW264.7-Zellen haben, wobei auch die Adsorption an die Partikeloberfläche von FITC-SiO₂-Partikeln untersucht wird. Um zu untersuchen, ob die Oberfläche von Partikeln einen Einfluss auf die Toxizität und Aufnahme hat, werden zusätzlich FITC-SiO₂-Nanopartikel verwendet, deren Oberflächen chemisch mit Amino- und Carboxylgruppen verändert wurden.

2. Material und Methoden

2.1 Material und Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Materialien, Antikörper und Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Material und Bezugsquellen

Material	Hersteller bzw. Bezugsquellen
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD204 (Klon 2F8)	AbD Serotec, Düsseldorf
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bis-benzimid (Hoechst33342)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin, pH 7,0	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
CASY@ton	Innovatis, Reutlingen
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics, Mannheim
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Glasobjekträger	Nalge Nunc International, Wiesbaden
Deckgläser (Ø 18 mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) für Fluoreszenzmikroskopie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H ₂ DCF-DA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dodecanylsuccinatanhydrid	Serva GmbH, Heidelberg
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's phosphate-buffered saline, ohne CaCl ₂ , ohne MgCl ₂ (1x) (DPBS ^{-/-})	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Einbettmedium (Shandon Immu-mount™)	Thermo Scientific, Dreieich
Eisenoxid-Nanopartikel	Jean-François Berret, CNRS, Paris (F)
Eisessig	Merck, Darmstadt

Material und Methoden

EPON 812 (Glycidether 100)	Serva GmbH, Heidelberg
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Safe	BD Biosciences, Heidelberg
Formvar	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Glutaraldehyd	Serva GmbH, Heidelberg
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Größenmarker für Proteingele	Fermentas, St. Leon-Rot
Immersionsöl	Zeiss, Offenbach
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Merck, Heidelberg
Kontrollantikörper (LEAF TM Purified Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody)	BioLegend GmbH, Fell
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt, Nürnbrecht
Zellkulturplatten	Greiner Labortechnik, Nürtingen
Kupfergrids	Plano, Wetzlar
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylnodicanhydrat	Serva GmbH, Heidelberg
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylat	Serva GmbH, Heidelberg
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Objektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Osmiumtetroxid	Polysciences Europe, Eppelheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
PIPES	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Pipettenspitzen	Corning Life Sciences, USA
Polystyrol-Kügelchen (1 μ m)	Polysciences Europe, Eppelheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Propylenoxid	Serva GmbH, Heidelberg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Labortechnik, Nürtingen

Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI medium 1640)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Siliziumdioxid-Nanopartikel	Postnova Analytics, Landsberg am Lech
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TMR-Weizenkeimagglutinin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Transwell®-Kultursystem	Corning Life Sciences, USA
2-,4-,6-Triphenol (DMP-30)	Polysciences Europe, Eppelheim
Tris-HCl, Tris-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TritonX-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Zellschaber (24 cm)	Techno Plastic Products, Trasadingen (CH)
Zeta-Küvette (DTS1061)	Malvern Instruments Ltd., Herrenberg

2.2 Laborgeräte und Softwareprogramme

Im Folgenden sind in Tabelle 2 die verwendeten Laborgeräte und Softwareprogramme aufgelistet.

Tabelle 2: Laborgeräte und Softwareprogramme

Geräte/Software	Vertrieb
Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero (B5061)	Heraeus Christ, Fellbach
CASY®1, Model TT	Schärfe System, Reutlingen
CellQuest Pro x.x	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer (FACS LSR II)	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophorese Power Pac Basic	Bio-Rad, München
Epifluoreszenzmikroskop DM-IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar
Epifluoreszenzmikroskop IX-81	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Heidolph Polymax 1040 Schüttler	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd
Image J 1.46m [32-bit]	National Institute of Health, Bethesda (USA) http://rsb.info.nih.gov/ij

Konfokales Laser-Raster-Mikroskop (LSM 510)	Carl Zeiss AG, Jena
Mikrotiterplatten-Zentrifuge	Hettrich GmbH, Tuttlingen
Minifuge RF	Heraeus Christ, Fellbach
Mini-Protean®3-System	Bio-Rad, München
Odyssey® Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg v.d. Höhe
Scan^R Aquisition/Analysis Software	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
SOFTmax Pro 3.0	VersaMax, Molecular Devices, Ismaning
Sterilbank Lamin Air® HB 2460	Heraeus Christ, Fellbach
Thermoblock Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschall Multiporator, Branson Sonifier 250	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd
Volocity 5.5	PerkinElmer, Rodgau
Vortex-Genie 2	Roth, Karlsruhe
Wasserbäder	GFL 1083, Grossburgwedel
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd., Herrenberg
Zetasizer Software v6.34	Malvern Instruments Ltd., Herrenberg

2.3 Puffer und Lösungen

2x Laemmli-Puffer (100 ml)

12,5 ml 1 M TRIS pH 6,8

20 ml Glycerin

67,5 ml H₂O

4 g SDS

25 mg Bromphenolblau

→ vor Gebrauch β-Mercaptoethanol hinzugefügt, Endkonzentration 10 %

Laufpuffer nach Laemmli

25 mM TRIS

192 mM Glycin

0,1 % SDS

5 % Sammelgel (für 10 ml)

7,475 ml H₂O
1,7 ml 30 %-ige Acrylamidlösung
0,625 ml 2 M TRIS pH 6,8
0,1 ml 10 % SDS
0,1 ml APS
0,015 ml TEMED

10 % Trenngel (für 10 ml)

4 ml H₂O
3,3 ml 30 %-ige Acrylamidlösung
2,5 ml 1,5 M TRIS pH 8,8
0,05 ml 20 % SDS
0,1 ml APS
0,001 ml TEMED

Coomassie-Färbelösung

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
10 % Eisessig
45 % Methanol
45 % H₂O

Entfärbelösung

10 % Eisessig
45 % Methanol
45 % H₂O

Lysepuffer

0,5 % Triton X-100
0,2 M NaOH

2.4 Verwendete Metalloxid-Partikel

2.4.1 Herkunft und Synthese von verschieden beschichteten γ -Fe₂O₃-NP

Die verwendeten bio-kompatiblen magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel werden vom Kooperationspartner Dr. Jean-François Berret am CNRS (Le centre national de la recherche scientifique) in Paris hergestellt. Sie bestehen aus einem Kern aus magnetischem Fe₂O₃ (γ -Fe₂O₃), der mit organischen Molekülen beschichtet wird. Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel entstehen zunächst durch die Polykondensation von Metallsalzen aus Eisen(II) und Eisen(III) in wässrigen alkalischen Lösungen, wobei zunächst Magnetit-Nanopartikel (Fe₃O₄-NP) entstehen, die durch spätere Oxidation zu Maghemit-Nanopartikeln (γ -Fe₂O₃-NP) umgewandelt werden. Um eine enge Größenverteilung zu erlangen, werden γ -Fe₂O₃-NP durch verschiedene Techniken (elektrolytisch-induzierte Phasenseparation und magnetische Sedimentation) größenabhängig aufgereinigt. Die hier verwendeten γ -Fe₂O₃-NP haben einen Durchmesser von 8,3 nm, bzw. 10,7 nm. Um γ -Fe₂O₃-NP in Lösung zu halten, werden sie mit einer organischen Schicht aus dem polyfunktionalen Polymer Polyacrylsäure (PAA) oder dem schwachen Triacid Citrat (Cit) versehen. Für die PAA-Beschichtung werden die gelösten Natriumsalze der Polyacrylsäure mit den Molekulargewichten 2 g/mol (PAA2K) und 5 g/mol (PAA5K) mit γ -Fe₂O₃-NP gemischt. Durch die elektrostatische Adsorption des negativgeladenen Polymers an die Nanopartikeloberfläche präzipitieren die entstandenen Polyacrylsäure-beschichteten γ -Fe₂O₃-NP dann bei saurem pH-Wert. Nach der Aufreinigung mittels Zentrifugation und der anschließenden Erhöhung des pH-Werts mittels Ammoniumhydroxid gehen die Polyacrylsäure-beschichteten γ -Fe₂O₃-NP wieder stabil in Lösung (pH 7-8). Die Polyacrylsäure-Schicht vergrößert den Durchmesser je nach Molekulargewicht um 4-5 nm (PAA2K), bzw. 8 nm (PAA5K), was mittels DLS gemessen wurde. Für die Herstellung von Citrat-ummantelten γ -Fe₂O₃-NP lässt man das negativgeladene Molekül bei pH 8 adsorbieren. Die Schichtdicke von unter 1 nm trägt nur minimal zum Durchmesser des Eisenkerns bei. Zusammenfassend werden in Tabelle 3 die verwendeten unterschiedlich beschichteten γ -Fe₂O₃-NP aufgelistet.

Tabelle 3: Charakterisierung der in der Arbeit verwendeten γ -Fe₂O₃-NP

Bezeichnung	Durchmesser Eisenkern	Beschichtung
10.7nm-PAA2K	10,7 nm	Polyacrylsäure (PAA, M _w = 2 g/mol)
10.7nm-PAA5K	10,7 nm	Polyacrylsäure (PAA, M _w = 5 g/mol)
8.3nm-Cit	8,3 nm	Citrat
10.7nm-Cit	10,7 nm	Citrat

2.4.2 Herkunft von Siliziumdioxid-Partikel

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten nicht-porösen, amorphen Siliziumdioxidpartikel (SiO_2 -Partikel) werden von der Firma Postnova Analytics in drei Größen (70 nm SiO_2 -NP, 200 nm und 500 nm SiO_2 -MP) bezogen. Des Weiteren werden 70 nm SiO_2 -NP verwendet, deren Oberfläche durch Aminogruppen, bzw. Carboxylgruppen funktionalisiert sind (SiO_2 -NP- NH_2 , bzw. SiO_2 -NP-COOH). Alle SiO_2 -Partikel werden mit Hilfe der Stöber-Synthese hergestellt und mittels Asymmetrischer-Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4) der Größe nach aufgetrennt und der Partikeldurchmesser mittels DLS-Messung überprüft. Eine genaue Beschreibung des Prozesses der Oberflächenfunktionalisierung der SiO_2 -NP- NH_2 , bzw. SiO_2 -NP-COOH wird vom Hersteller nicht angegeben. Die Aminogruppen, bzw. Carboxylgruppen sind kovalent über einen Linker an die SiO_2 -Oberfläche gebunden ($\text{Si}-[\text{CH}_2]_4\text{-N}[(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2]_2$, bzw. $\text{Si}-\text{(CH}_2)_3\text{-COOH}$).

Da ein Nachweis von Nanopartikeln in biologischen Proben durch elektronenmikroskopische Methoden präparativ sehr aufwendig ist, werden in dieser Arbeit hauptsächlich SiO_2 -Partikel verwendet, in deren Silikatmasse der grün fluoreszierende Farbstoff FITC (Fluorescein-5-Isothiocyanat) eingearbeitet wurde. Dadurch lässt sich eine Detektion, u.a. mit lichtmikroskopischen Methoden über die Fluoreszenz ermöglichen. Um fluoreszierende und nicht-markierte Partikel zu unterscheiden, wird den Partikeln jeweils der Präfix „FITC“ oder „nicht-markiert“ vorangestellt.

2.4.3 Ansetzen der Partikelverdünnungen

Für die Experimente mit SiO_2 -Partikeln werden die vom Hersteller gelieferten wässrigen Stammsuspensionen mit 70 nm SiO_2 -NP, sowie SiO_2 -NP - NH_2 und -COOH (25 mg/ml), sowie 200 nm und 500 nm SiO_2 -MP (50 mg/ml) zunächst in Wasser zu 1 mg/ml verdünnt. Die Endkonzentrationen für die physikalische Analyse werden in Wasser, für die jeweiligen biologischen Experimente in DMEM mit oder ohne FCS angesetzt. Die in wässriger Lösung bereitgestellten unterschiedlich beschichteten $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NP werden direkt in DMEM mit FCS auf 1 mg/ml verdünnt. Daraus werden die benötigten Endkonzentrationen für die biologischen Experimente in DMEM mit FCS angesetzt. Um eine Kontamination zu vermeiden, werden alle Stammsuspensionen und Verdünnungen nur steril geöffnet und bei Raumtemperatur lichtgeschützt (SiO_2 -Partikel), bzw. bei 4°C ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -NP) gelagert.

2.5 Physikalische Charakterisierung von Partikeln

Da die physikalischen Eigenschaften der Partikel, wie Größe, Form oder Oberflächenladung, einen Einfluss auf das Verhalten in Kulturmedien und damit auf Kulturzellen haben können, müssen diese charakterisiert werden.

2.5.1 Bestimmung der Größe und Morphologie von FITC-SiO₂-Partikeln mittels TEM

Eine etablierte Methode, um Größe und Form von Partikeln zu bestimmen, ist die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Für die elektronenmikroskopische Analyse werden 10 µl der 1 mg/ml Verdünnung der FITC-SiO₂-Partikel in Wasser auf ein mit Formvar beschichtetes Kupfernetzchen gegeben. Nach dem Trocknen der Partikel bei Raumtemperatur werden mit einem Zeiss EM109 elektronenmikroskopische Bilder der Proben angefertigt. Da SiO₂-Partikel elektronendicht sind, d.h. der Elektronenstrahl des Mikroskops dringt nicht durch das Partikelmaterial, erscheinen diese als schwarze Objekte. Um die Partikelgrößen und eine Größenverteilung zu bestimmen, werden die Bilder mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Image J 1.46m (Makro: Particle Size Analyzer) verarbeitet und analysiert. Hierfür wird im ersten Schritt der Hintergrund mit Hilfe des Gaußschen Weichzeichners entfernt. Um die Kanten der Partikel zu markieren wird danach manuell ein Schwellenwert gesetzt und zu nah aneinander liegende Partikel mittels Watershed-Funktion getrennt. Der Partikeldurchmesser wird dann über die gemessene Fläche unter Annahme einer sphärischen Morphologie der Partikel ermittelt. Berechnet wird das arithmetische Mittel der Partikel mit Standardabweichung. Für die statistische Analyse werden mindestens 700 Partikel ausgewertet.

2.5.2 Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und der Agglomeratbildung von FITC-SiO₂-Partikeln mittels DLS

Mit Hilfe der Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS), z.B. der dynamischen Lichtstreuung (DLS), lässt sich der hydrodynamische Durchmesser von Partikeln in Fluiden bestimmen (Berne und Pecora, 2000). Im Vergleich zur Elektronenmikroskopie kann man hiermit auch die Agglomeration und Aggregation von Partikeln untersuchen. Das Prinzip basiert darauf, dass ein einfallender Laserstrahl durch ein Partikel in alle Richtungen gestreut wird. Da ein Partikel aber nicht statisch in einem Fluid vorliegt, sondern durch die zufällige Kollision von Lösungsmittelmolekülen in Dynamik versetzt wird (Brownsche Bewegung),

entsteht eine Überlagerung (Interferenz) der zeitlich versetzten, gestreuten Lichtwellen. Je geringer der Partikeldurchmesser und damit die Masse, desto höher ist die Bewegungskraft eines Partikels. Die dadurch erhöhte Fluktuation in der Intensität wird von einem Detektor wahrgenommen, wobei der sogenannte Diffusionskoeffizient D mittels Autokorrelationsfunktion berechnet wird. Durch Umformen und Einsetzen in die Stokes-Einstein-Gleichung (3) wird der hydrodynamische Durchmesser eines sphärischen Partikels bestimmt.

$$R = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (3)$$

R = Partikelradius, k = Boltzmannkonstante, T = absolute Temperatur
 η = dynamische Viskosität des Fluids, D = Diffusionskoeffizient

Für die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers von FITC-SiO₂-Partikeln in verschiedenen Medien (H₂O, DMEM, DMEM mit FCS, bzw. BSA) wird ein Zetasizer Nano ZS verwendet. Das Gerät kann Partikelgrößen im Bereich zwischen 0,3 nm und 10 µm messen. Zusätzlich wird das Zeta-Potential der Partikel in H₂O bestimmt. Im ersten Schritt wird eine Zellkultur-relevante Verdünnung (50 µg/ml) in den oben genannten Medien angesetzt. Die Proben werden entweder direkt analysiert oder vor der Messung für 24 h unter Zellkulturbedingungen bei 37°C inkubiert. Die Partikelproben werden in eine Zeta-Küvette überführt und bei 25°C gemessen.

2.5.3 Bestimmung der Oberflächenladung von FITC-SiO₂-Partikeln mittels Laser-Doppler-Anemometrie

Partikeloberflächen können je nach Herkunft Ladungen tragen, die mit Gegenionen (z.B. H⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻) der Flüssigkeit interagieren können. Durch Anlagerung dieser Ionen an der Oberfläche entsteht eine elektrische Doppelschicht bestehend aus einer an der Partikeloberfläche liegenden starren, festgebundenen und einer daran anschließenden diffusen, losen Ionenschicht. Durch Bewegung des Partikels löst sich die äußere Schicht ab, so dass nur die innere Schicht verbleibt. Das elektrokinetische Potenzial ζ (kurz: Zeta-Potenzial) beschreibt das Potenzial zwischen der Partikeloberfläche mit ihren adsorbierenden Gegenionen und der diffusen Ionenschicht (Kirby und Hasselbrink, 2004).

Zur Bestimmung des Zeta-Potentials wird die Laser-Doppler-Anemometrie verwendet. Sie ist eine Art Elektrophorese, wobei ein Partikel durch Anlegen von Spannung an zwei Elektroden in einem Stromfluss durch die Flüssigkeit wandert. Die Richtung und Geschwindigkeit ist jeweils von der Polarität und der Höhe der Ladung abhängig. Bei der Messung passiert das Partikel einen Laserstrahl, der dadurch auf einen Detektor abgelenkt wird. Als Referenz dient ein zweiter durch die Proben gehender Laserstrahl. Die Geschwindigkeit eines Partikels wird als elektrophoretische Mobilität bezeichnet, wobei das Zeta-Potenzial durch Umformen und Einsetzen in die Henry Gleichung (4) bestimmt wird.

$$\mu = \frac{2\varepsilon \cdot \zeta \cdot f(\kappa r)}{3\eta} \quad (4)$$

μ = elektrophoretische Mobilität, ε = Dielektrizitätspermeabilität des Lösungsmittels

ζ = Zeta-Potenzial, η = dynamische Viskosität des Lösungsmittels

$f(\kappa r)$ = Autokorrelationsfunktion (abhängig von Ionenstärke κ und Partikelradius r)

Für die Bestimmung des Zeta-Potentials von FITC-SiO₂-Partikeln in H₂O wird eine Zellkultur-relevante Verdünnung (50 µg/ml) mit dem Zetasizer Nano ZS untersucht. Die Proben werden entweder direkt analysiert oder vor der Messung für 24 h unter Zellkulturbedingungen bei 37°C inkubiert. Die Partikelproben werden in eine Zeta-Küvette überführt und bei 25°C gemessen.

2.6 Zellkultur

2.6.1 Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit werden Zelllinien, die aus verschiedenen Spezies und unterschiedlichen Organen stammen, verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Kulturmedium	Ursprung	Literatur
DU145	Mensch, Prostata, Karzinom,	RPMI, 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin	ATCC, Rockville, USA	Stone et al., 1978
Hepa-1C1C7	Maus, Leber, Karzinom	DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin	ATCC, Rockville, USA	Bernhard et al., 1973
RAW264.7	Maus, Makrophagen-ähnlich	DMEM, 10% FCS, 0.5% Penicillin/ Streptomycin	ATCC, Rockville, USA	Raschke et al., 1978

2.6.2 Langzeitkultivierung und Auftauen von Zellen

Um Zellen, die nicht in Kultur gehalten werden, langfristig zu lagern, werden sie bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierfür werden die Zellen im jeweiligen Kulturmedium mit 10% DMSO in ein Kryogefäß ($3\text{-}5 \times 10^6$ pro ml) überführt und in einem vorgekühlten mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer Cryo 1°C Freezing Container (Relags GmbH, Tunterhausen) auf -80°C heruntergefroren, wobei sich die Temperatur langsam (1°C pro Minute) verringert. Nach Erreichen der Temperatur werden die Zellen in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt und gelagert.

Zum Auftauen wird zunächst ein Kryogefäß schnell bei 37°C aufgetaut. Danach wird die Zellsuspension (1 ml) mittels Pasteurpipette tropfenweise in 10 ml auf 4°C gekühltes Kulturmedium gegeben und bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 5 min bei RT in einer Minifuge ($r = 15 \text{ cm}$) pelletiert, um das im Einfriermedium befindliche DMSO zu entfernen. Die pelletierten Zellen werden in 10 ml Kulturmedium, das auf Raumtemperatur erwärmt wurde, aufgenommen und in eine Kulturflasche (Wachstumsfläche = 75 cm^2) übertragen, die 10 ml auf 37°C vorgewärmtes Medium enthält. Die Zellen werden generell bei 37°C , 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO_2 kultiviert und das Kulturmedium nach 2 Tagen gewechselt. Je nach Wachstum werden die Zellen bis zu einer Dichte von 80-90 % kultiviert, danach wie nachfolgend beschrieben passagiert. Nach zweiwöchiger Kultivierung stehen die Zellen für Versuche zur Verfügung.

2.6.3 Passagieren von Zelllinien und Bestimmung der Zellzahl

Die oben beschriebenen Zelllinien werden auf ihre Konfluenz (80-90 %) am Mikroskop untersucht, gezählt und passagiert. Das Passagieren der epithelialen Zelllinien wird wie folgt durchgeführt. Das über den Zellen befindliche Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellen mit 5 ml warmem DPBS^{-/-} gewaschen. Danach werden die adhärenen Zellen mit 2 ml warmem Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C inkubiert, um ein Ablösen der Zellen zu erreichen. Trypsin ist ein Verdauungsenzym, das Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen löst; EDTA bildet einen Chelatkomplex mit Ionen, wie Kalzium und Magnesium, die Trypsin inhibieren können. Die Trypsin-Aktivität wird durch 8 ml Kulturmedium abgestoppt, die restlichen anhaftenden Zellen werden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Glaspipette vereinzelt und die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Passagieren der adhärenen, makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW264.7 wird wie nachstehend beschrieben durchgeführt. Das Kulturmedium wird abgesaugt und 10 ml frisches Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber werden die Zellen in das Medium abgelöst, mit einer 10 ml Pipette vereinzelt und in ein 15 ml Reaktionsgefäß transferiert.

Um die Zellzahl zu bestimmen, wird eine 1:1000 Verdünnung der Zellsuspension mit CASY[®]ton (isotone Salzlösung) mit einem vollautomatisierten Zytometer (CASY[®]1 Cell Counter Model TT) mittels Stromausschlussverfahrens gemessen. Dabei werden die Zellen durch eine Kapillare eingesogen und eine Spannung angelegt. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran leiten den Strom nicht und wirken als elektrische Isolatoren. Zellen mit geschädigter Zellmembran hingegen leiten den Strom durch die Leitfähigkeit des Zytoplasmas. Vitale Zellen werden mit ihrer tatsächlichen Größe gemessen, während von toten Zellen die Größe des Zellkerns gemessen wird. Über die Cursorposition werden lebende von toten Zellen und Debris unterschieden und gezählt. Zum Kultivieren der epithelialen Zelllinien werden 2×10^5 Zellen und für die Makrophagen-ähnliche Zelllinie RAW264.7 $1-2 \times 10^6$ Zellen in eine neue Kulturflasche (75 cm²) mit 20 ml frischem Kulturmedium überführt. Für die Zellkultur-Experimente werden die Zellen je nach Kulturgefäß in verschiedenen Zellzahlen ausgesät.

2.6.4 Partikelexposition von Kulturzellen

Zur Untersuchung der biologischen Effekte von Partikeln werden die oben beschriebenen Kulturzellen in *in-vitro*-Experimenten unter proliferierenden oder sub-konfluenten Bedingungen mit Partikeln exponiert. Hierfür werden Zellen entweder auf Kulturplatten (6-well, 96-well), auf spezielle Membraneneinsätze (Transwell®-Einsätze) für 6-well Platten oder auf Deckgläsern in Medium ausgesät und bei 37°C über Nacht ruhen gelassen. Am darauffolgenden Tag wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit Partikeln in Medium mit oder ohne FCS inkubiert. Je nach Kulturoberfläche werden die Inkubationsvolumina angepasst, um das Verhältnis von Kulturfläche zu Volumen in den verschiedenen Experimenten konstant zu halten. Nach Ablauf der Inkubation werden die Zellen für die jeweilige Analyse weiterprozessiert.

2.7 Mikroskopische Analyse der Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen

Um die zelluläre Aufnahme und subzelluläre Lokalisation von verschieden großen und oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen zu untersuchen, werden die Epifluoreszenzmikroskopie und die Transmissionselektronenmikroskopie verwendet.

2.7.1 Untersuchung der Aufnahme von FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Für die Bestimmung der zellulären Aufnahme von verschieden großen und oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-Partikel (Anregungs-/Emissionsmaximum 490 nm/525 nm) im Epifluoreszenzmikroskop, werden die RAW264.7-Zellen nach der Exposition für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt. Nach Bestrahlung mit UV-Licht (~350 nm) emittiert der Farbstoff im blauen Bereich (~460 nm). Dadurch lassen sich die Zellkerne detektieren und die Lokalisation und Anordnung der FITC-SiO₂-Partikeln in, bzw. auf den Zellen bestimmen.

Für die Epifluoreszenzmikroskopie werden 400.000 RAW264.7-Zellen auf Deckgläsern (12 mm) in einer 24-well Platte (2,0 cm²) in 800 µl Medium mit FCS ausgesät und über Nacht bei 37°C ruhen gelassen. Am nächsten Tag wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 50 µg/ml der 70 nm, 200 nm und 500 nm FITC-SiO₂-Partikel in 625 µl Medium mit verschiedenen Zusätzen für 5 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium

abgenommen und die Zellen direkt in 4 % PFA/DPBS^{-/-} für 10 min bei RT fixiert. Nach zweimaligen Waschen mit DPBS^{-/-} werden die Zellkerne mit 800 nM DAPI/DPBS^{-/-} für 10 min bei 37°C gefärbt. Die Zellen werden zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen und dann mit Shannon Immu-mount auf einem Objektträger eingebettet. Die manuelle Bildakquisition der ausgehärteten Proben findet an einem Epifluoreszenzmikroskop Leica DM-IRE2 mit Hilfe der Software Volocity v5.5 statt.

2.7.2 Untersuchung der Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Bestimmung der zellulären Aufnahme und subzellulären Lokalisation von verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln werden Zellen auf Polycarbonatmembraneinsätze (Transwell® Systems, Corning Life Sciences, USA) mit 0,4 µm Porendurchmesser in 6-well Platten in 2 ml Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C ruhen gelassen. Am nächsten Tag werden die Zellen mit DPBS^{-/-} gewaschen und mit 50 µg/ml verschieden großen FITC-SiO₂-Partikeln in Medium inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Membran zweimal mit 1 ml PIPES (0,1 M, pH 7) gewaschen. Die nachfolgende Erstfixierung findet über Nacht bei 4°C statt. Hierfür werden mit Hilfe eines Biopsie-Stempels Proben aus der Membran gestochen und in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß mit 0,1 M PIPES (pH 7), 1,25 % Glutaraldehyd, 2 % Paraformaldehyd und 0,1 % NaN₃ transferiert. Die Proben werden am nächsten Tag zweimal mit 0,1 M PIPES für 10 min gewaschen bevor sie für die Zweitfixierung und Membrankontrastierung mit 0,1 M PIPES, 0,5 % Osmiumtetroxid (OsO₄), 0,8 % Kaliumhexacyanidoferrat(III) (K₃[Fe{CN}₆]) für 1 h bei 4°C behandelt werden. Danach werden die Proben wieder zweimal mit 0,1 M PIPES für 10 min und mit dest. H₂O für 15 min gewaschen. Es folgt die Blockfärbung, wobei die Proben mit 2 % Uranylacetat in 25 % Ethanol bei 4°C über Nacht inkubiert werden. Anschließend werden die Proben schrittweise jeweils zweimal mit steigenden Konzentrationen an Ethanol (50 %, 70 %, 95 %, 100 %) für jeweils 10 min entwässert. Nach der Entwässerungsreihe werden die Membranen in mehreren Schritten in das Einbettungsharz EPON bei RT überführt und während der Inkubationen in einem Überkopfschüttler bewegt. Zunächst werden die Membranen in das Intermedium Propylenoxid (getrocknet) transferiert und dann in ein Gemisch aus EPON (56,8 % EPON 812, 24,4 % MNA, 21,8 % DDSA, 1,8 % DMP-30) und Propylenoxid im Volumenverhältnis 30:70 für 60 min gegeben. Anschließend werden die Proben über Nacht in ein Gemisch aus EPON und Propylenoxid im Volumenverhältnis 70:30 inkubiert. Am nachfolgenden Tag werden die Proben nun für 6 h in 100 % EPON überführt, bevor sie in

vorgefertigten Blockformen in 100 % EPON eingebettet werden. Das EPON härtet danach für 3 Tage bei 65°C im Wärmeschrank aus. Mit Hilfe eines Ultramikrotom (Leica EM UC6k, Solms) werden mit einem Diamantmesser 50 nm dicke Schnitte angefertigt und diese auf ein mit Formvar-beschichtetes Kupfergrid positioniert. Die Ultradünnschnitte werden in einem mit Kieselgel gefüllten Exsikkator getrocknet und aufbewahrt, bevor sie an einem Zeiss EM 109T bei 80 kV untersucht werden.

2.8 Messmethoden zur Bestimmung der Zytotoxizität von Metalloxid-Partikeln *in-vitro*

2.8.1 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Stromausschlussverfahrens

Ein Endpunkt zur Bestimmung der Vitalität von Zellen nach Partikelexposition ist die Anzahl von noch lebenden Zellen. Mit Hilfe des Stromausschlussverfahrens lassen sich lebende und tote Zellen ohne Verwendung eines Farbstoffs unterscheiden (Wahl et al., 2008).

Am Tag vor der Behandlung werden 300.000 RAW264.7-Zellen in 2 ml Kulturmedium auf 6-well Platten ausgesät und über Nacht ruhen gelassen. Am nächsten Tag werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Partikeln in 3 ml Gesamtvolumen für 24 h im Triplikat inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit werden die Zellen auf Eis geerntet, wobei zunächst das überstehende Medium in 15 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen mit 1 ml DPBS^{-/-} gewaschen werden. Um die adhärennten Zellen abzulösen werden jeweils 500 µl Accutase hinzugegeben, für 5 min bei 37°C inkubiert und mit insgesamt 2 ml DPBS^{-/-} von der Plattenoberfläche abgespült. Die Zellen werden zusammen mit dem überstehenden Medium gesammelt. Für die Bestimmung der Lebendzellzahl werden je nach Zelldichte 1:10, 1:100 oder 1:1000 Verdünnungen in CASY®ton angesetzt und mit dem CASY®1 gemessen. Zum Unterscheiden von lebenden und toten Zellen durch ihre Größe werden einmalig 100 µl Zellsuspension zunächst mit 900 µl Ethanol versetzt, dann mit 9 ml CASY®ton aufgefüllt und mit dem CASY®1 die Größe der Zellkerne gemessen. Die Größenuntergrenze für lebende RAW264.7-Zellen wird mit dieser Methode auf 7,5 µm festgelegt.

2.8.2 Bestimmung der Zytotoxizität durch Messung freigesetzter LDH

Die Untersuchung der Membranschädigung wird mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit Plus (Roche Diagnostics, Penzberg) auf 96-well Platten durchgeführt. Hierfür werden nach der Partikelexposition im Quadruplikat 50 µl des überstehenden Mediums in eine 96-well Mikrotiterplatte mit flachem Boden übertragen und mit 50 µl DPBS^{-/-} verdünnt. Nach Zugabe des Katalysators und der Farbstofflösung (100 µl) wird bis zum Farbumschlag im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird mit 50 µl einer 1 N HCl-Lösung abgestoppt und die Absorption des Farbstoffs mit einem Plattenspektrometer bei 450 nm gemessen. Als Positivkontrolle dienen Zellen, die 30 min vor der Messung mit 1 % Triton X-100 lysiert werden. Berechnet wird die Membranschädigung nach folgender Formel (5).

$$LDH \text{ Freisetzung (\%)} = \frac{\text{Probe}}{\text{Positivkontrolle}} \times 100 \quad (5)$$

Dargestellt wird der Mittelwert aus der Anzahl der Messwerte aus unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler.

2.8.3 Bestimmung der Zellvitalität/Zellzahl mittels WST-1

Zur Bestimmung der Zellvitalität wird das Proliferations-Reagenz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) eingesetzt (Ishiyama et al., 1993), das im Verhältnis 1:20 in HBSS mit 7,5 g/l NaHCO₃ verdünnt wird. Nach Partikelexposition im Quadruplikat wird der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 200 µl WST-1-Lösung für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 150 µl des Überstands in eine 96-well Mikrotiterplatte mit flachem Boden überführt und die Absorption bei 450 nm mit einem Plattenspektrometer gemessen. Als Positivkontrolle dienen nicht-behandelte oder mit Lösungsmittel behandelte Zellen. Berechnet wird die WST-1 Reduktion mit nachfolgender Formel (6).

$$WST-1 \text{ Reduktion (\%)} = \frac{\text{Probe}}{\text{Positivkontrolle}} \times 100 \quad (6)$$

Dargestellt wird der Mittelwert aus der Anzahl der Messwerte aus unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler.

2.8.4 Bestimmung der Lebendzellzahl und des Zelltods mittels automatisierter Hochdurchsatzmikroskopie (AHM)

Eine Alternative zu den indirekten kolorimetrischen Toxizitätsnachweisverfahren stellt die automatisierte Hochdurchsatzmikroskopie (AHM) dar. Mit dieser Methode lässt sich auch in kurzer Zeit eine hohe Zahl an Proben untersuchen. Der große Vorteil besteht aber darin, dass damit Informationen von einzelnen Zellen, bzw. Subpopulationen, erhalten werden können, die man durch Analyse der Gesamtzellpopulation (LDH-, WST-1-Test) nicht erhält.

Um lebende Zellen von apoptotischen Zellen im Fluoreszenzmikroskop unterscheiden zu können, wird der membran-permeable und DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 (Bis-benzimid) eingesetzt (Latt und Wohlleb, 1975). Die fluoreszenzmarkierten Zellkerne geben Auskunft über die Gesamtzahl der Zellen und durch die Intensität der Fluoreszenz können Aussagen über die Kompaktheit der DNA getroffen werden. Da während der Apoptose das Chromatin (DNA und Histone) kondensiert und fragmentiert (Zhivotosky und Orrenius, 2001), wird im Fluoreszenzmikroskop eine Zunahme der Intensität der DNA-Färbung beobachtet (Abb. 2).

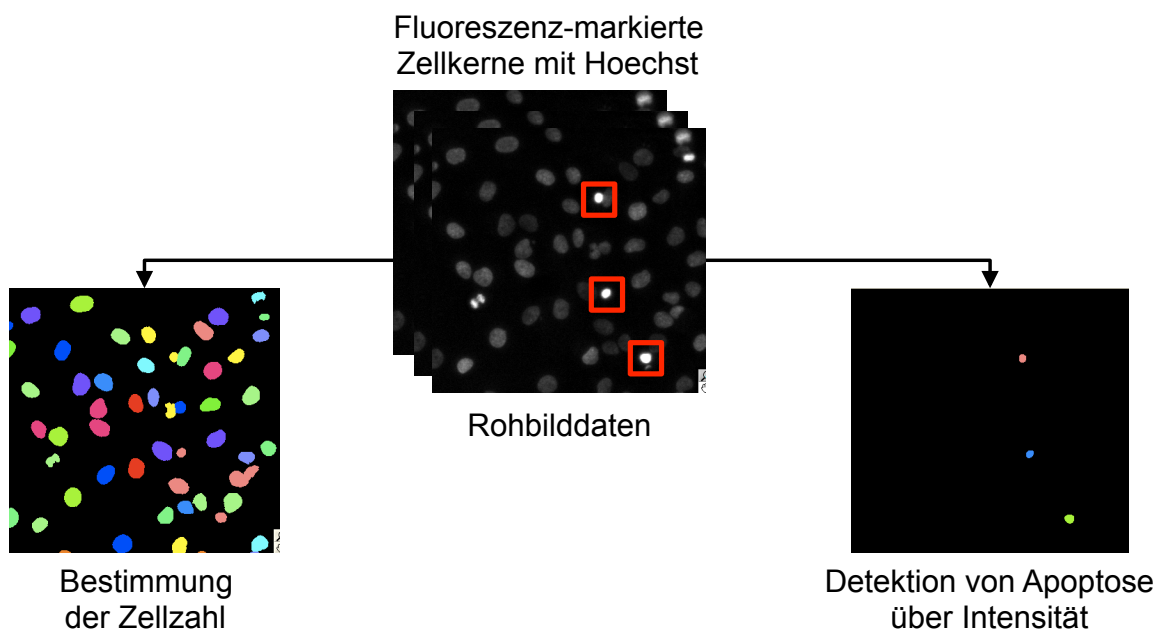


Abbildung 2: Detektion von Zellzahl und Apoptose mit Hilfe des Lebendfarbstoffs Hoechst33342. Aus Rohbilddaten mit Hoechst33342-gefärbten Zellkernen (Mitte) lassen sich durch die Scan[^]R Analysis Software von Olympus anhand der Erkennung der Objektkanten die Zellzahlen bestimmen (links). Gleichzeitig wird die Intensität des DNA-Farbstoffs für jedes Objekt ermittelt. Da die Fluoreszenzintensität des DNA-Farbstoffs mit der in der Apoptose auftretenden DNA-Kondensation korreliert, lassen sich dadurch lebende von apoptotischen Zellen unterscheiden (rechts).

Durch die zusätzliche Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumiodid (PI) lassen sich darüber hinaus früh- und spät-apoptotische Zellen unterscheiden (Crompton et al., 1992). Wegen der verringerten Membranintegrität bei spät-apoptotischen Zellen kann PI eindringen und zusätzlich in die DNA interkalieren. Des Weiteren lassen sich nekrotische Zellen durch die erhöhte Membranpermeabilität neben Hoechst33342 auch mit PI anfärben. Lebende Zellen sind hingegen negativ für PI. Die Lebendzellzahl sowie die Zahl früh- und spät-apoptotischer, sowie nekrotischer Zellen kann anhand der unterschiedlichen Intensitäten quantifiziert werden (Abb. 3).

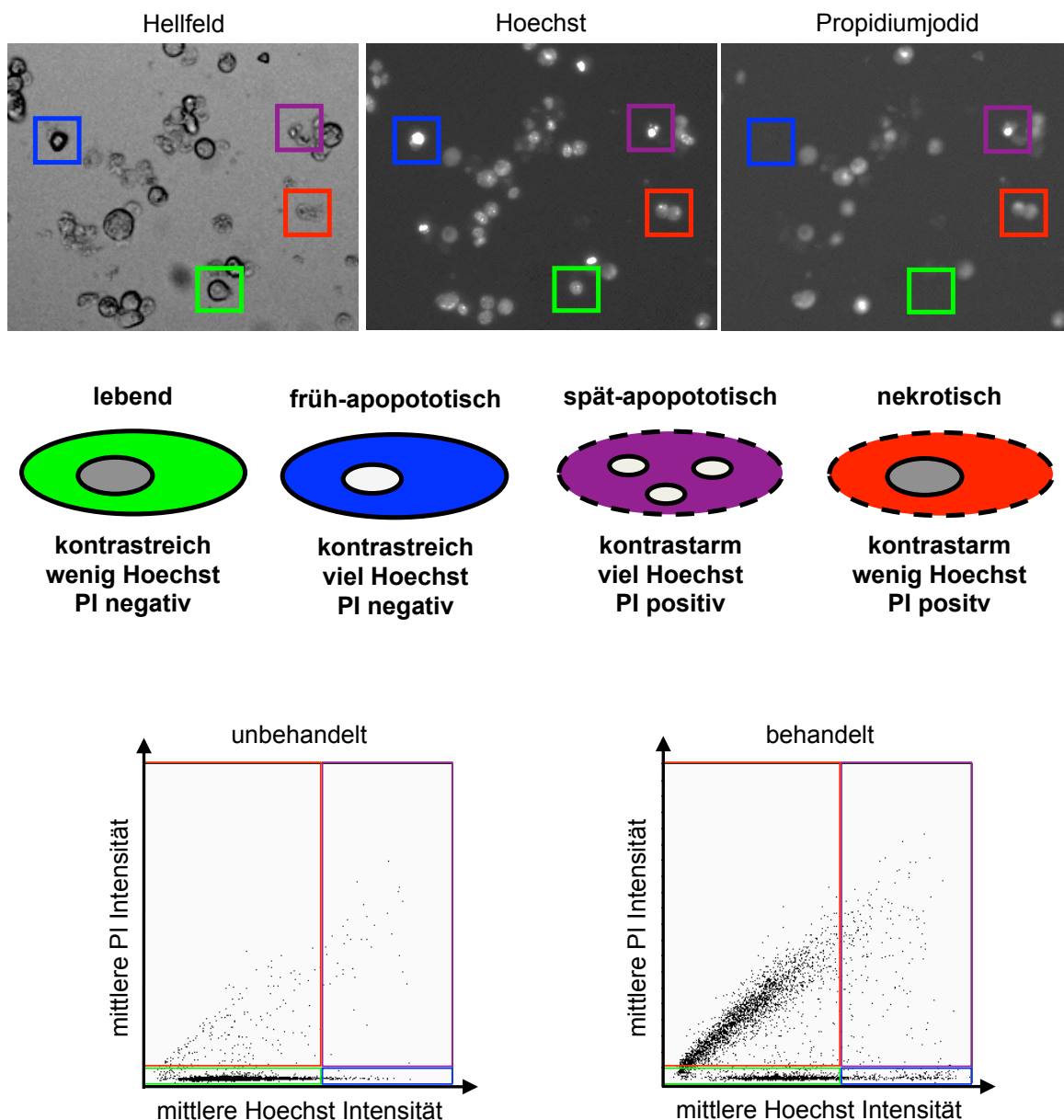


Abbildung 3: Charakterisierung des Zelltods anhand der Fluoreszenzfärbung mit Hoechst33342 und Propidiumiodid. Im Hellfeld (links) und unter Verwendung der zwei Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst33342 (Mitte) und PI (rechts) lassen sich lebende Zellen (grün) von früh-apoptotischen Zellen (blau) und spät-apoptotischen Zellen (violett), sowie nekrotischen Zellen (rot) unterscheiden durch den Kontrast im Hellfeld und ihrer Intensität in der Fluoreszenz. Oben: RAW264.7-Zellen, die mit 50 µg/ml FITC-SiO₂-NP für 24 h inkubiert und danach mit Hoechst33342

und PI gefärbt werden. Anschließend wird jeweils ein Hellfeld- und zwei Fluoreszenzbilder an einem Epifluoreszenzmikroskop IX-81 von Olympus aufgenommen. Unten: Vergleich von einer unbehandelten Kontrolle (unten links) mit einer behandelten Probe (unten rechts). Die behandelte Probe zeigt eine Zunahme der mittleren Intensität für PI bei konstanter mittlerer Intensität für Hoechst im Vergleich zur Kontrolle, was ein Indiz für nekrotischen Zelltod ist.

Für die Quantifizierung der Lebendzellzahl und des Zelltodes werden Kulturzellen nach Behandlung mit Partikeln im Quadruplikat auf 96-well Platten für 30 min bei 37°C mit 150 ng/ml Hoechst33342 und 125 ng/ml PI in DMEM mit FCS gefärbt. Danach werden von jeder Probe mit einem 10x Objektiv an einem automatisierten Epifluoreszenzmikroskop Olympus IX-81 (Scan[^]R Acquisition Software) von sechs vordefinierten Positionen jeweils ein Hellfeldbild und ein Bild für jeden Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen. Nach der Bildakquisition werden mit Hilfe der Scan[^]R Analysis Software von Olympus die Zellkerne quantifiziert und anhand der Färbung in lebende Zellen, früh- und spät-apoptotische, sowie nekrotische Zellen wie oben beschrieben eingeteilt. Dargestellt wird der Mittelwert aus vier Messwerten mit jeweiliger Standardabweichung.

2.8.5 Bestimmung des Zelltods mittels FITC-Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie

Um spezifisch den Zelltod nach Partikelexposition zu bestimmen zu können, werden die FITC-Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie eingesetzt (Vermees et al., 1995). Die Färbung nutzt die Tatsache, dass während der Apoptose das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren Seite der Zellmembran nach außen transloziert. Dort kann das fluoreszenz-markierte Protein FITC-Annexin-V (36 kDa) in kalziumabhängiger Weise an das Phospholipid binden und die Zelle somit grün markieren. Da die Externalisierung von PS in den frühen Stufen der Apoptose stattfindet, wird zusätzlich der rot-fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) eingesetzt. Dieser interkaliert nur in die DNA von Zellen, deren Membranintegrität herabgesetzt ist. Dies ist der Fall während der späten Apoptose und der Nekrose. Durch die Kombination der Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich lebende Zellen (FITC-Annexin-V/PI⁻) von früh-apoptotischen Zellen (FITC-Annexin-V⁺/PI⁻) und spät-apoptotischen, sowie nekrotischen Zellen (FITC-Annexin-V⁺/PI⁺) trennen.

Für die Detektion des Zelltods wird das FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I eingesetzt. Hierfür werden die Überstände von Zellen auf 6-well Platten nach der Partikelexposition in ein 15 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Zellen werden mit 1 ml DPBS^{-/-} gewaschen und mit 500 µl Accutase für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden

mit 2 ml DPBS^{-/-} von der Oberfläche abgelöst und zusammen mit dem Überstand gesammelt. Nach dem Zentrifugieren bei 1500 rpm in einer Minifuge für 5 min wird der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl kalziumhaltigen Bindepuffer resuspendiert. Die Zellen werden mit 5 µl FITC-Annexin-V und 5 µl PI-Lösung für 15 min bei RT inkubiert, bevor die Proben an einem FACS LSR II gemessen werden. Um ein Durchscheinen der Fluoreszenz in den jeweiligen anderen Fluoreszenzkanal zu korrigieren, wird eine Kompensation der Detektoren am Durchflusszytometer durchgeführt. Für die Quantifizierung werden 10.000 Ereignisse ausgewertet, wobei Zelldebris für die Auswertung ausgeschlossen wird.

2.9 Quantifizierung von Partikeln in Zellen und Medien

2.9.1 Spektrometrische Quantifizierung von γ -Fe₂O₃-NP

Um die Eisenoxid-Menge im Überstand und in der zellulären Fraktion zu bestimmen, wird eine spektrometrische Methode verwendet, die von Galimard und Kollegen beschrieben wird (Galimard et al., 2012). Hierfür werden die rotbräunlichen γ -Fe₂O₃-NP in konzentrierter HCl aufgelöst, wobei das entstehende Tetrachlorferrat (FeCl₄⁻) die Lösung gelb färbt. Das Maximum der Absorption von FeCl₄⁻ liegt im UV-Bereich bis 400 nm. Anhand definierter Mengen an γ -Fe₂O₃-NP gelöst in konzentrierter HCl und deren Absorption bei 400 nm lässt sich eine Eichkurve erstellen, mit der die Mengen an γ -Fe₂O₃-NP im Überstand und in der zellulären Fraktion berechnet werden können.

Für die Quantifizierung werden 10.000 RAW264.7-Zellen auf eine 96-well Platte in 200 µl DMEM mit FCS ausgesät und bei 37°C bei 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit über Nacht ruhen gelassen. Am nachfolgenden Tag wird das Medium abgenommen und steigende Konzentrationen (5, 25, 100 und 300 µg/ml) der vier verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-Nanopartikel (10.7nm-PAA2K, 10.7nm-PAA5K, 8.3nm-Cit, 10.7nm-Cit) mit den Zellen in 100 µl DMEM mit FCS im Quadruplikat für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Überstand abpipettiert. Die Zellen und der Überstand werden getrennt mit 100 µl konzentrierter HCl behandelt. Die Absorption der Proben wird an einem Plattenspektrometer bei 400 nm gemessen und mit der aufgestellten Eichkurve die absoluten Mengen γ -Fe₂O₃-NP berechnet. Dargestellt wird der Mittelwert aus den Messwerten der unabhängigen Experimente mit dem jeweiligen Standardfehler.

2.9.2 Quantifizierung von FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen mittels Fluoreszenzspektrometrie

Um die Aufnahme von verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen zu quantifizieren und zu vergleichen wird die Masse der FITC-SiO₂-Partikel in, bzw. auf den Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzspektrometrie untersucht.

Für die Durchführung werden 10.000 RAW264.7-Zellen auf eine 96-well Platte in 200 µl DMEM mit FCS ausgesät und bei 37°C bei 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchtigkeit über Nacht ruhen gelassen. Am nachfolgenden Tag wird das Medium abgenommen und steigende Konzentrationen (25, 50 und 100 µg/ml) der verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikel (70 nm, 200 nm, 500 nm) mit den Zellen in 100 µl DMEM mit FCS im Quadruplikat für 1, 2,5 und 5 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten werden die Überstände auf Eis abgenommen und die Zellen drei Mal mit 200 µl eiskaltem DPBS^{-/-} vorsichtig gewaschen. Danach werden die Zellen mit 100 µl Lysepuffer (0,5 % Triton X-100, 0,2 M NaOH) für 30 min auf Eis behandelt. Parallel wird eine Eichgerade mit lysierten Zellen und definierten Mengen an verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln hergestellt. Danach wird die FITC-Fluoreszenz bei einer Anregung von 485/10 und einer Emission von 530/13 mit einem Mikroplatten-Fluoreszenzspektrometer (Lambda Fluor 320, Molecular Devices) mit der Software Lambda KC4 v2.7 bestimmt. Dargestellt wird der Mittelwert für die Zell-gebundene Partikelmasse in Abhängigkeit von der verabreichten Partikelmasse (2,5, 5 und 10 µg) pro well. Die Partikelzahl und Partikeloberfläche werden zusätzlich aus der gemessenen Partikelmasse berechnet.

2.9.3 Quantifizierung von FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen mittels Hochdurchsatz-Epifluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Hochdurchsatz-Epifluoreszenzmikroskopie lässt sich in kürzerer Zeit eine hohe Zahl an Proben auswerten. Um die Fluoreszenz der FITC-SiO₂-Partikel in RAW264.7-Zellen quantifizieren zu können müssen die Zellgrenzen im Epifluoreszenzmikroskop detektierbar sein. Zusätzlich zur DNA-Färbung wird das orangerot-fluoreszierende Tetramethylrhodamin-Weizenkeimagglutinin (TMR-WGA) eingesetzt. Das zu der Gruppe der Lektine gehörende WGA-Protein, das aus zwei 18 kDa großen Untereinheiten besteht, enthält vier Kohlenhydrat-Bindedomänen. Diese können u.a. an glykosylierte Oberflächenproteine, die N-Acetylglucosamin oder Sialinsäure enthalten, binden und damit die Zellmembran markieren

(Raub et al., 1990). Das Anregungsmaximum von TMR liegt bei 550 nm, das Emissionsmaximum bei 580 nm.

Für die Durchführung werden 10.000 RAW264.7-Zellen auf eine 96-well Platte in 200 μ l DMEM mit FCS ausgesät und bei 37°C bei 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchtigkeit über Nacht ruhen gelassen. Am nachfolgenden Tag wird das Medium abgenommen und steigende Konzentrationen (25, 50 und 100 μ g/ml) der verschieden großen FITC-SiO₂-Partikel (70, 200 und 500 nm) mit den Zellen in 100 μ l DMEM mit FCS im Triplikat für 1 h, 2,5 h und 5 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium abgenommen und die Zellen direkt in 4 % PFA/DPBS^{-/-} für 10 min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS^{-/-} werden die Zellmembranen mit 1 μ g/ml TMR-WGA/DPBS^{-/-} und die Zellkerne mit 800 nM DAPI/DPBS^{-/-} für 10 min bei 37°C gefärbt. Die Zellen werden zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen, bevor für jede Probe von sechs vordefinierten Positionen jeweils ein Bild für die Fluoreszenzfarbstoffe DAPI, TMR-WGA und FITC mit einem automatisierten Epifluoreszenzmikroskop Olympus IX-81 mit einem 10x Objektiv aufgenommen wird. Nach der Bildakquisition werden mit Hilfe der Scan[^]R Analysis Software von Olympus die Zellkerne erkannt (Abb. 4).

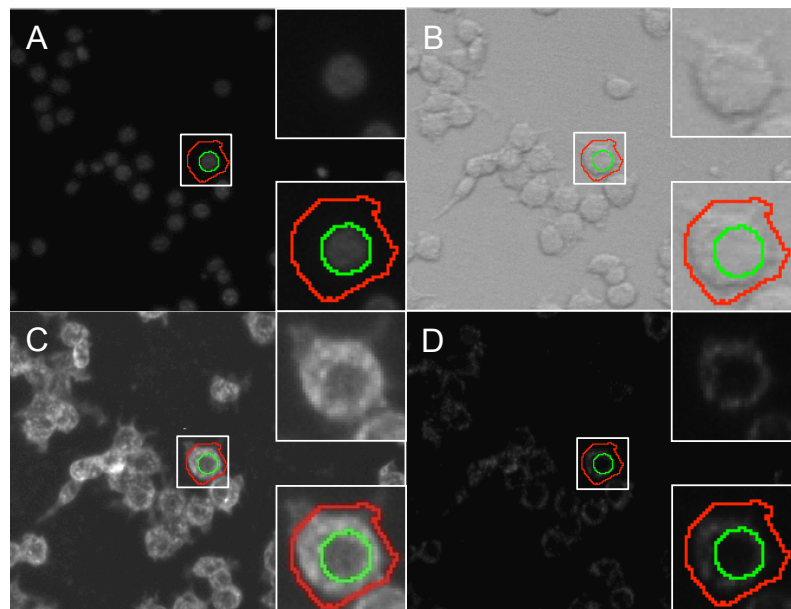


Abbildung 4: Prinzip der Hochdurchsatz-Detektion und Quantifizierung von FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen. Mit Hilfe der DNA-Färbung mit DAPI (A) lässt sich anhand der Erkennung des Zellkerns (grün) eine Maske schaffen, in der die Zellgrenze (rot), limitiert durch den Membranmarker TMR-WGA (C), liegt. Das in der roten Markierung befindliche Fluoreszenzsignal der FITC-SiO₂-Partikel (D) wird detektiert und quantifiziert. Außerhalb der roten Markierung vorhandenes FITC-Signal wird nicht berücksichtigt. Die korrekte Erkennung der Zellgrenzen wird durch den Abgleich mit dem Hellfeldbild (B) kontrolliert.

Anhand der mit DAPI-gefärbten Zellkerne (grüne Markierung) lassen sich mit Hilfe einer Maske die Zellgrenzen durch den Membranmarker TMR-WGA (rote Markierung) detektieren. Das innerhalb der Zellgrenze befindliche Fluoreszenzsignal der FITC-SiO₂-Partikel wird quantifiziert und auf die Fläche der detektierten Zellfläche in μm^2 normiert. Dargestellt wird der Mittelwert die FITC-Fluoreszenz pro Zellfläche in μm^2 aus drei Messwerten (n=3) mit der jeweiligen Standardabweichung.

2.10 Quantifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies nach Partikelexposition mit Hilfe der DCF-Methode

Eine mögliche Ursache der Toxizität von Nanopartikeln stellt die intrazelluläre Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an der Partikeloberfläche oder durch Stoffwechselprozesse dar. Mit Hilfe der DCF-Methode lassen sich eine Vielzahl von ROS, wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Hydroxylradikal (HO•), Stickstoffmonoxid (NO), Peroxidradikal (ROO•), oder Peroxynitritanion (ONOO⁻) quantitativ fluorimetrisch bestimmen (Possel et al., 1997). Das nicht-fluoreszierende und ungeladene 2',7'-Dichlordihydrofluorescein Diacetat (H₂DCF-DA) diffundiert gut in die Zelle und wird intrazellulär durch unspezifische Esterasen zu 2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein (H₂DCF) deacetyliert und damit intrazellulär gefangen. Durch die Anwesenheit von ROS wird H₂DCF zu Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert, das im grünen Bereich (~520 nm) fluoresziert.

Für die Bestimmung von ROS im 96-well-Massstab werden 10.000 RAW264.7-Zellen vor der Partikelexposition mit 200 μl Phenolrot-freiem DMEM mit FCS gewaschen, um mögliche Fluoreszenz des pH-Indikators zu verhindern. Danach wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 50 μM H₂DCF-DA in 100 μl Phenolrot-freiem DMEM mit FCS für 40 min bei 37°C inkubiert. Der Überstand wird nach Ablauf der Inkubationszeit abgesaugt und die Zellen mit 200 μl frischem Phenolrot-freiem Medium gewaschen. Nachfolgend werden die Zellen zunächst mit 50 μl Phenolrot-freiem Medium beschichtet und nicht-markierte Partikel im Quadruplikat in 100 μl Gesamtvolumen mit den Zellen inkubiert. Die Messung erfolgt nach verschiedenen Zeitpunkten mit einem Mikroplatten-Fluoreszenzspektrometer. Der Fluorophor wird bei ~490 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz bei 530 nm gemessen.

2.11 Untersuchung der Proteinbindung an die Partikeloberfläche

2.11.1 Quantifizierung der gebundenen Proteine mittels BCA-Tests

Mit Hilfe des BCA-Tests lassen sich Proteine photometrisch quantifizieren (Smith et al., 1985). Er beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Kupfer(II)-Ionen durch die Peptidbindung der Proteine zu Kupfer(I)-Ionen quantitativ reduziert werden. Danach komplexiert ein Kupfer(I)-Ion mit zwei Bicinchoninsäure-Molekülen zu einem violetten Farbstoff, der bei 562 nm absorbiert.

Zunächst werden 1 mg FITC-SiO₂-Partikel in einem 1 ml DMEM mit und ohne FCS bzw. BSA für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach werden die Partikellösungen dreimal für 30 min bei 20.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Partikel in 1 ml dest. H₂O gewaschen. Danach werden die Partikel in 200 µl dest. H₂O aufgenommen (5 mg Partikel pro ml). Für die Bestimmung der Proteinmenge im 96-well Maßstab werden, 50 µg FITC-SiO₂-Partikel (10 µl) mit 200 µl BSA-Reagenz (50 Teile BCA Grundlösung und 1 Teil 4 % CuSO₄) im Triplikat für 1 h bei RT inkubiert. Parallel wird eine Eichgerade mit definierten BSA-Mengen erstellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Absorption bei 562 nm gemessen und die Proteinmenge anhand der Eichkurve berechnet.

2.11.2 Untersuchung der Proteinbindung mittels SDS-PAGE

Um die Proteininteraktion mit SiO₂-Partikeln in Abhängigkeit von der Größe und der Oberflächenmodifikation zu untersuchen, werden SiO₂-Partikel in DMEM mit FCS, bzw. BSA inkubiert, über Zentrifugation aufgereinigt und die Proteine durch die eindimensionale diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli der Größe nach aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Hierfür werden 50 µg verschieden großer, bzw. verschieden oberflächenmodifizierter FITC-SiO₂-NP in 1 ml DMEM ohne FCS, bzw. mit FCS oder mit BSA gegeben. Nach der Inkubation für 1 h bei 37°C werden die FITC-SiO₂-Partikel bei 20.000 rpm in einer Eppifuge für 10 min abzentrifugiert. Das Medium wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Pellet in 1 ml Wasser aufgenommen. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten mit jeweils 1 ml Wasser, werden die Pellets (ca. 10 µl) in 10 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Als Kontrolle für die Reinheit werden jeweils 2,5 µl des Inputs (Mediums mit

FCS, bzw. BSA) sowie 10 µl des Überstands des letzten Zentrifugationsschritts mit äquivalenten Volumina 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proben werden für 5 min auf 95°C erhitzt und nochmals kurz abzentrifugiert. Danach werden 0,5 µl Input, 15 µl des Überstands und 15 µl der Partikelprobe auf ein denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel (5 % Sammelgel und 10 % Trenngel) geladen und die Proteine bei 170 mV für 1 h elektrophoretisch bei RT aufgetrennt. Anschließend werden die Gele zweimal mit Wasser für 10 min auf einem Schüttler gewaschen, bevor die Proteine mit der Coomassie-Färbelösung für 3 h auf einem Schüttler inkubiert werden. Nach Ablauf der Färbezeit werden die Gele zunächst zweimal mit Wasser gewaschen und für 1 h mit Entfärbelösung inkubiert. Danach werden die Gele nochmals zweimal mit Wasser gewaschen und mit Hilfe eines Odyssey® Imaging System bei 700 nm digitalisiert. Die Quantifizierung der Banden wird mit Hilfe der Bildauswertungssoftware Image J 1.46m [32-bit] durchgeführt, wobei zunächst die gesamten Proteinbanden der einzelnen Proben analysiert werden. Danach werden die einzelnen gut zu identifizierenden Banden quantitativ bestimmt und in Relation zur Gesamtmenge gestellt.



3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden anorganische Partikel auf unerwünschte biologische Wirkungen untersucht, um mögliche Nebenwirkungen ihrer Anwendung in einer biomedizinischen Anwendung zu erkennen. Hierfür wird die biologische Aktivität in *in vitro* Experimenten in Makrophagen untersucht, da diese auf der einen Seite als Teil der angeborenen Immunabwehr Pathogene und Fremdpartikel aufnehmen und zum anderen Entzündungsreaktionen auslösen können. Daher wurde die in der Partikelforschung weitverbreitete Makrophagen-ähnliche Zelllinie RAW264.7 verwendet.

Zum Einem werden magnetische Eisenoxid-Nanopartikel (γ -Fe₂O₃-NP), welche mit zwei verschiedenen bio-kompatiblen Beschichtungen, Polyacrylsäure und Citrat, ummantelt sind, auf ihre Toxizität getestet. Zum anderen wird die Zytotoxizität von verschiedenen großen Siliziumdioxid-Partikeln (SiO₂-Partikeln) analysiert, wobei diese mit der zellulären Aufnahme der Partikel korreliert werden soll. Zusätzlich wird untersucht, ob eine chemische Funktionalisierung der Oberfläche von SiO₂-Nanopartikeln (SiO₂-NP) mit Amino- und Carboxylgruppen eine Auswirkung auf die Zytotoxizität und Aufnahme hat. Darüber hinaus wird geprüft, in wie weit Faktoren des Serums einen Einfluss auf die Stabilität der Partikel und ihre zelluläre Aufnahme haben.

Weitergehend wird untersucht, ob die für Chemikalien etablierten Verfahren zur Bestimmung der Zytotoxizität auch für die hier verwendeten Partikel geeignet sind und ob diese durch neue Mikroskopie-basierte Systeme ersetzt werden können. Hierfür wird die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH-Test), sowie die metabolischen Aktivität über die Reduktion des Farbstoffs WST-1 (WST-1-Test) nach Partikelexposition bestimmt. Die Ergebnisse werden mit der Bestimmung der Zellzahl bzw. Zelltodrate verglichen, die durch die automatisierte Hochdurchsatzmikroskopie (AHM) ermittelt werden.

Da die physikochemische Eigenschaften von Partikeln, wie z.B. Größe, Form, Ladung, Agglomeration sowie die Synthese von Nanoobjekten, Auswirkung auf die Interaktionen mit Zellen *in vivo* und *in vitro* verändern können (Drescher et al., 2011; Gratton et al., 2008; Oberdörster et al., 2005a), wurden die verwendeten Metalloxid-Partikel physikochemisch charakterisiert.

3.1 Charakterisierung der verwendeten magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel

In der vorliegenden Arbeit wurden vier verschiedenen beschichtete magnetische Eisenoxid-Nanopartikel (γ -Fe₂O₃-NP) verwendet. Sie besitzen eine bio-kompatible Beschichtung, die entweder aus dem Polymer der Acrylsäure (C₂H₃-COOH) mit einem Molekulargewicht von 2000 g/mol (PAA2K) bzw. 5000 g/mol (PAA5K) oder der Zitronensäure (C₃H₄OH[COOH]₃, hier mit dem Suffix „Cit“ bezeichnet) besteht. In beiden Fällen liegen die Carboxylgruppen der Carbonsäuren deprotoniert vor, was zum Einbringen negativer Ladung auf der Oberfläche der Partikel führt. Dadurch erhöht sich zum Einem die Stabilität der Partikel in Suspensionen durch elektrostatische Abstoßung, zum Anderen können über die Carboxylgruppen der Partikel weitere biologische Moleküle, wie z.B. Antikörper, gebunden werden.

Des Weiteren unterscheiden sich die Nanopartikel in ihrer Größe, wobei der magnetische Eisenoxidkern einen Durchmesser von 8,3 nm bzw. 10,7 nm hat. Die Größe wird jeweils in der Bezeichnung vor die Beschichtung gestellt, d.h. „10.7nm-PAA2K“, „10.7nm-PAA5K“, „8.3nm-Cit“ und „10.7nm-Cit“. Da die verwendeten γ -Fe₂O₃-Nanopartikel vom Kooperationspartner Dr. Jean-François Berret (CNRS, Paris) weitreichend beschrieben sind (Tab. 5), beschränkt sich die zusätzliche Charakterisierung auf die morphologische Analyse mittels TEM (Abb. 5).

Tabelle 5: Bestimmung des Durchmessers des γ -Fe₂O₃-Kerns, sowie des hydrodynamischen Durchmessers von PAA- bzw. Citrat-ummantelten γ -Fe₂O₃-Nanopartikel

γ -Fe ₂ O ₃ -Kern	VSM [nm]		TEM [nm]		DLS [nm]		
	mittlerer D	PDI	mittlerer D	PDI	Citrat M _w =192 g/mol	PAA2K M _w =2000 g/mol	PAA5K M _w =5000 g/mol
10.7nm	10,7	0,33	13,2	0,23	27	35	51,6
8.3nm	8,3	0,26	9,3	0,18	24,4	-	-

Angegebener Datensatz wurde aus Galimard et al., 2012 entnommen. VSM: Vibrationsmagnetometrie, TEM: Transmissionselektronenmikroskopie, DLS: dynamische Lichtstreuung in H₂O, D: Durchmesser, PDI: Polydispersitätsindex, M_w: Molekulargewicht

Die verwendeten γ -Fe₂O₃-Kerne zeichnen sich durch eine enge Größenverteilung (PDI < 0,5) aus, wobei der hydrodynamische Durchmesser der PAA- bzw. Citratummantelten γ -Fe₂O₃-Nanopartikel in Abhängigkeit vom Molekulargewicht zunimmt. Des Weiteren führt das

Beschichten von γ -Fe₂O₃-Kernen mit negativ-geladenen Molekülen generell zu einem negativen Zetapotential (Galimard et al., 2012).

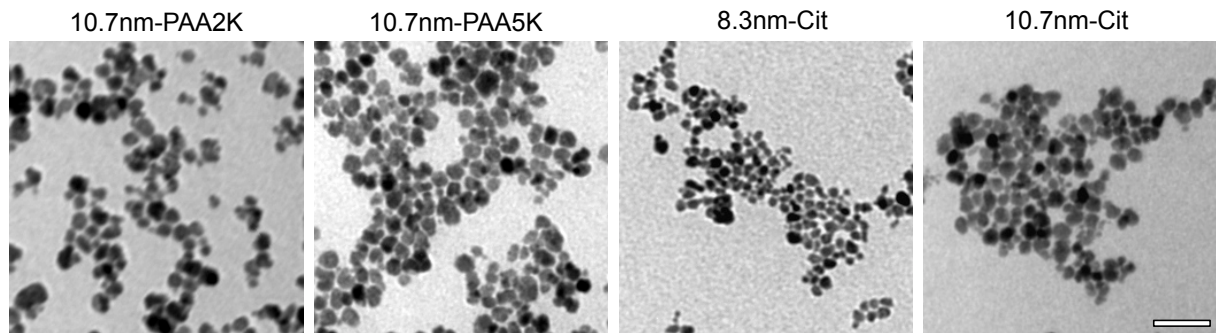


Abbildung 5: TEM-Aufnahmen von verschiedenen γ -Fe₂O₃-Nanopartikeln mit Polyacrylsäure bzw. Citrat-Beschichtung. Gezeigt sind einzelne und monodisperse γ -Fe₂O₃-Nanopartikel, wobei nur der Eisenkern zu erkennen ist, die zusätzliche Polyacrylsäure- bzw. Citrat-Ummantelung ist nicht sichtbar. Maßstab: 100 nm

In den TEM-Aufnahmen in Abb. 1 sind die verschiedenen γ -Fe₂O₃-Nanopartikel als sphärische Partikel erkennbar, wobei ihre Größe einer monodispersen Verteilung folgt. Die vom Kooperationspartner angegebene durchschnittliche Größe (Tab. 1) stimmt mit den hier gezeigten Aufnahmen überein.

3.2 Charakterisierung der verwendeten SiO₂-Partikel

Um die biologische Aktivität von verschiedenen großen und oberflächenmodifizierten Siliziumdioxid-Partikeln (SiO₂-Partikel) zu untersuchen, wurden die von der Firma Postnova Analytics bezogenen SiO₂-Partikel mit den Durchmessern 70 nm, 200 nm und 500 nm physiko-chemische charakterisiert. Um einen Einfluss von Oberflächenmodifikationen auf die Toxizität und Aufnahme zu prüfen, kamen zusätzlich oberflächenmodifizierte 70 nm SiO₂-Nanopartikel zum Einsatz, deren Oberfläche mit Amino- bzw. Carboxylgruppen funktionalisiert wurden. Um einen eventuellen Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffs auf die biologische Aktivität ausschließen zu können, wurden zusätzlich nicht-markierte SiO₂-Partikel analysiert.

3.2.1 Größe und Morphologie im TEM

Zur Untersuchung der Größe und der Form wurden die verwendeten SiO₂-Partikel mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert. Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann eine Größenverteilung der Partikel aufgestellt werden. Es werden exemplarisch jeweils ein Bildausschnitt und die Auswertung von verschieden großen und oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-Partikeln gezeigt (Abb. 6).

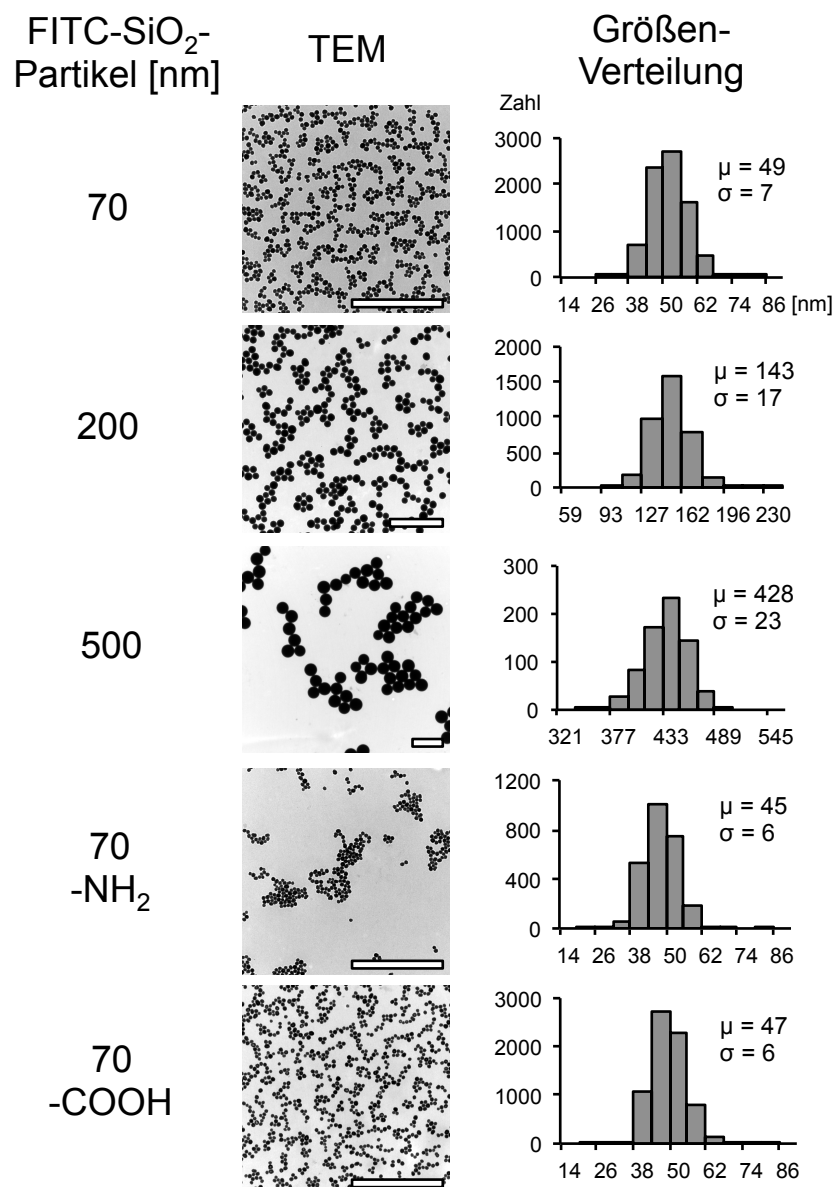


Abbildung 6: FITC-SiO₂-Partikel zeigen eine monodisperse Größenverteilung. Links: FITC-SiO₂-Partikel wurden auf ein Kupfernetzchen gegeben und bei RT getrocknet. Danach wurden von den Proben an einem Zeiss EM109 Aufnahmen von verschiedenen Positionen angefertigt, hier exemplarisch dargestellt. Maßstab: 1 μ m. Rechts: Anhand der TEM-Aufnahmen wurde die Größe mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Image J 1.6m (Makro: Particle Size Analyzer) analysiert und in Größenintervalle eingeteilt. Dargestellt sind die Verteilungen als Histogramm, wobei mindestens 700

Partikel ausgewertet wurden (y-Achse: Partikelzahl, x-Achse: Größe in nm). μ : Mittelwert, σ : Standardabweichung in x-Richtung.

In den TEM-Aufnahmen in Abb. 2 sind die FITC-SiO₂-Partikel als sphärische und glatte Primärpartikel zu erkennen. Die quantitative Bildauswertung zeigt, dass die Primärpartikelgrößen eine enge Normalverteilung mit einem einheitlichen Durchmesser aufweisen. Darüberhinaus ist zu beobachten, dass sich die vom Hersteller angegebenen Größen von der hier durchgeführten bildgebenden Messmethode unterscheiden. Das liegt an der Tatsache, dass sich die nominale Angabe der Größendurchmesser auf den hydrodynamischen Durchmesser bezieht, wobei der Modalwert verwendet wurde. Des Weiteren sind keine größeren Aggregate bzw. Agglomerate vorhanden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für nicht-fluoreszenzmarkierte SiO₂-Partikel gemacht, deren Ergebnisse in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Die qualitative und quantitative Untersuchung der Merkmale der FITC-SiO₂-Partikel belegen eine sphärische Morphologie und Monodispersität. Da mit Hilfe der TEM keine Aussage über Stabilität, d.h. Aggregation und/oder Agglomeration der verwendeten FITC-SiO₂-Partikel in wässrigen Medien getroffen werden kann, wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) herangezogen.

3.2.2 Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers mittels dynamischer Lichtstreuung

Um zu untersuchen, ob die verwendeten FITC-SiO₂-Partikel in Wasser in Agglomerate vorliegen, wurde der hydrodynamische Durchmesser der SiO₂-Partikel mittels DLS bestimmt. Weitergehend wurde untersucht, ob eine eventuelle Agglomeratbildung in Kulturmedium mit Proteinen, fötales Kälberserum (FCS) und bovines Serumalbumin (BSA) über die Zeit (24 h) stattfindet. Da hohe Partikelkonzentrationen einen Einfluss auf die Agglomeratbildung haben können, wurde eine Verdünnung (50 µg/ml) verwendet, die auch in Zellkulturexperimenten zum Einsatz kommt. Gezeigt werden zunächst die Partikelgrößenverteilungen in Wasser und in DMEM mit FCS bei RT (Abb. 7).

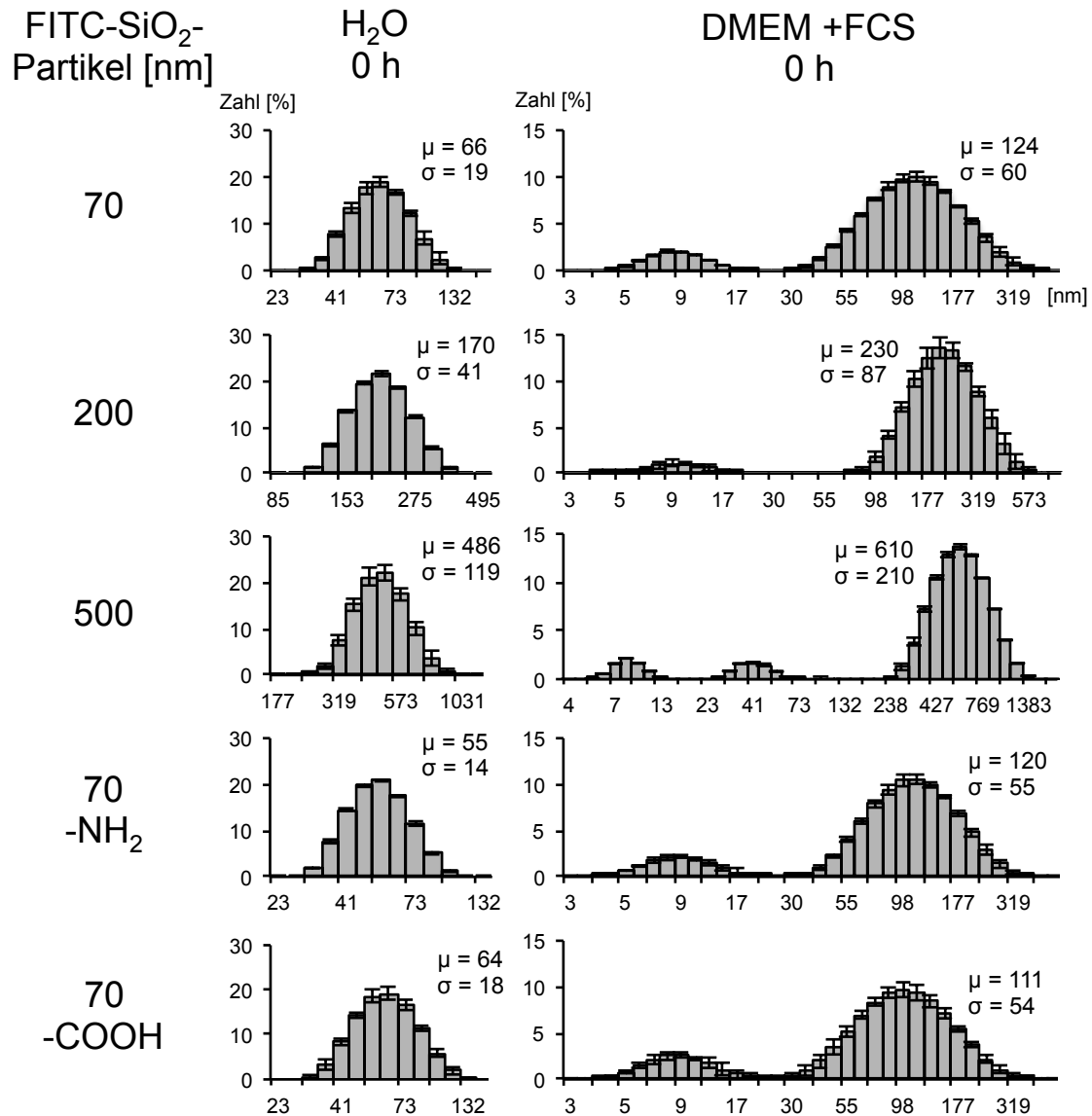


Abbildung 7: Größenverteilung von FITC-SiO₂-Partikeln in Wasser und DMEM mit FCS. FITC-SiO₂-Partikel (50 µg/ml) wurden in Wasser (links) oder in DMEM mit FCS (rechts) angesetzt und jeweils drei Messungen an einem Malvern Zetasizer Nano ZS durchgeführt. Dargestellt sind die Verteilungen als Histogramm, wobei Mittelwert \pm Standardabweichung für jedes Intervall angegeben ist. (y-Achse: prozentualer Anteil der Partikel, x-Achse: Größe in nm). μ : Mittelwert, σ : Standardabweichung in x-Richtung.

Die Untersuchung des Durchmessers der FITC-SiO₂-Partikel in Wasser zeigt, dass größere mittlere Durchmesser mit DLS detektiert werden als mit Hilfe der TEM-Analyse. Im Gegensatz zur Untersuchung mittels TEM, mit dem der physikalische Partikeldurchmesser bestimmt wird, wird mit DLS der hydrodynamische Durchmesser eines Partikels bestimmt. Partikel bewegen sich in Dispersionsmedien durch die Brownsche Molekularbewegung. Hierdurch bewegt sich nicht nur das Partikel, sondern auch die auf der Oberfläche des Partikels befindliche Schicht an Lösungsmittelmolekülen, wodurch ein größerer Durchmesser des Partikels gemessen wird. Hinzu kommt, dass Partikel in Flüssigkeiten auch rotieren,

wobei nicht perfekt sphärische Partikel oder einzelne Agglomerate als größere Objekte detektiert werden (Xu, 2002).

In DMEM mit FCS zeigen die FITC-SiO₂-Partikel stabile Größenverteilungen, wobei zusätzlich Signale bei 10 nm und 50 nm in geringeren Mengen detektiert werden (Abb. 3, rechte Spalte). Hierbei handelt es sich um Serumproteine (Orts-Gil et al., 2011). Des Weiteren ist zu beobachten, dass der Größendurchmesser durch das Vorhandensein von Serumproteinen zunimmt. Diese Beobachtung lässt sich nur zum Teil durch Anlagerung von Proteinen auf der Partikeloberfläche erklären ((Röcker et al., 2009)), da eine einschichtige Ummantelung von Serumproteinen auf der Partikeloberfläche nur wenige Nanometer ausmacht. Eine wahrscheinlichere Erklärung ist die Agglomeratbildung. Höhere Konzentrationen an 70 nm SiO₂-NP (1 mg/ml) in DMEM mit FCS führen zum sichtbaren Sedimentieren innerhalb einer Stunde bei 37°C, während dies in DMEM ohne FCS nicht zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete ebenfalls die konzentrationsabhängige Agglomeration von amorphem Silika (Ludox TM50) in DMEM mit FCS (Drescher et al., 2011). Daher ist anzunehmen, dass bei einer Partikelkonzentration von 50 µg/ml nur eine geringere Partikelagglomeration aus 2 Primärpartikeln stattfindet, wobei die genaue Partikelzahl pro Agglomerat nicht eindeutig mit Hilfe der DLS-Messung geklärt werden kann.

Um die generelle Stabilität der SiO₂-Partikel unter Zellkulturbedingungen weitergehend zu untersuchen, wurden die Partikel in DMEM mit FCS für 24 h bei 37°C inkubiert und der hydrodynamische Durchmesser bestimmt. Zusätzlich wurde geprüft, ob die im Medium befindlichen Serumproteine einen Einfluss auf die Agglomeration der SiO₂-Partikel haben. Hierfür wurden SiO₂-Partikel (50 µg/ml) in DMEM ± FCS für 0 h und 24 h vor der Messung inkubiert und die Ergebnisse in Tabelle 2 zusammengefasst. Neben dem hydrodynamischen Durchmesser wurde auch die Oberflächenladung der verschiedenen großen SiO₂-Partikel als Zeta-Potential bestimmt (Tabelle 6 und 7).

Tabelle 6: Zusammenfassung der physikalischen Charakterisierung der SiO₂-Partikel

SiO ₂ -Partikel [nm]		TEM [nm]	DLS [nm]						
			H ₂ O		DMEM		DMEM + FCS		DMEM + BSA
			0 h RT	24 h 37°C	0 h RT	24 h 37°C	0 h, RT	24 h 37°C	24 h 37°C
70	nicht-markiert	55±7	74±22	72 ±20	72±19	65±30 2178±1373	112±43	105±45	516±236
	FITC	49±7	66±19	100±30	104±59	57±27 1381±865	124±60	118±59	629±687
200	nicht-markiert	190±20	214±57	226±66	232±56	195±47	268±98	253±87	219±65
	FITC	143±17	170±41	165±39	173±43	146 ±48	230±87	207±67	162±51
500	nicht-markiert	433±25	490±110	478±106	521±123	499±117	549±239	577±251	515±150
	FITC	428±23	486±119	548±156	574±168	538 ±161	610±210	650±321	562±236
70 -NH ₂	nicht-markiert	55±7	71±17	76±24	76±35	81±51 2356±1453	113±47	105±43	998±943
	FITC	45±6	55±14	123±55	108±47	83±31 2716±1469	120±55	131±65	1098±559
70 -COOH	nicht-markiert	64±7	78±19	79±19	89±33	129±117 5051±749	125±60	143±65	985±496
	FITC	47±6	64±18	73±29	98±47	280±108 5182±655	111±54	128±75	511±219

TEM: Transmissionselektronenmikroskopie, DLS: dynamische Lichtstreuung, FCS: fötales Kälberserum, BSA: bovines Serumalbumin. Angegeben sind die mittleren Durchmesser und Standardabweichung der ermittelten Hauptpeaks

Die zusammenfassende Tabelle 6 zeigt wie auch unter 3.2.2 beschrieben, dass nicht-markierte und FITC-SiO₂-Partikel in der TEM kleinere Durchmesser als bei der DLS besitzen, wobei nicht-markierte SiO₂-Partikel generell größer sind. In der DLS-Messung zeigt sich, dass alle SiO₂-Partikel in Wasser und in Kulturmedium mit FCS über einen Zeitraum von 24 h bei 37°C eine stabile Größenverteilung behalten. Außerdem sind die Durchmesser der Partikel in DMEM mit FCS größer, wie unter 3.2.2 erläutert. Partikel in DMEM zeigen im Vergleich (0 h) einen nicht so ausgeprägten Effekt.

In Kulturmedium ohne Serum zeigen 200 und 500 nm SiO₂-MP ebenfalls nach 24 h bei 37°C stabile Verteilungen. Im Gegensatz dazu wurden nach 24-stündiger Inkubation von 70 nm SiO₂-NP in Kulturmedium ohne Serum unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung Agglomerate detektiert. Dies zeigt sich im Vorhandensein eines zweiten Größenpeaks. Ein

ähnlicher Effekt von SiO₂-Nanopartikeln wurde ebenso von Dutta und Kollegen unter serumfreien Bedingungen beobachtet, wobei Surfactant-Proteine die Agglomeration verhinderten (Dutta et al., 2007). Grund könnte die veränderte Oberflächenladung in DMEM sein, da in H₂O keine Agglomeration zu beobachten war. Größere Partikel bleiben auch in DMEM stabil, was aufgrund der geringeren spezifischen Oberfläche erklärt werden kann. Somit ist dies ein klarer Nanopartikeleffekt, wobei das Problem der Agglomeration auch bei der Interpretation toxischer Wirkungen zu berücksichtigen ist.

Um die stabilisierende Wirkung des Serums auf SiO₂-NP näher zu untersuchen, wurde das am häufigsten vorkommende Serumalbumin (35-50 g/l Serum) mit SiO₂-NP in DMEM inkubiert. Hierbei wurden die Mengen an BSA entsprechend einer 10 % FCS-Lösung angepasst (5,0 g/l Medium). Interessanterweise reicht das alleinige Vorhandensein von Albumin nicht aus, um SiO₂-NP über 24 h stabil in Medium zu halten. Dies könnte auf die Komplexität der im Serum vorkommenden Proteine (ca. 3000, (Ruh et al., 2012) zurückgeführt werden. Durch die Summe der unterschiedlichen Eigenschaften (hydrophobe und ionische Wechselwirkung) der verschiedenen Proteine könnte eine stärkere Abstoßung der Partikel stattfinden und somit der Stabilisierung der Partikeldispersion führen. Eine andere Erklärung könnte die quantitativ unterschiedliche Bindung an Serumproteinen und Serumalbumin sein. In 10% FCS-Lösung ist im Vergleich zur verwendeten BSA-Lösung ca. doppelt soviel Gesamtprotein vorhanden. Somit könnten die Mengen an gebundenem BSA evtl. nicht ausreichen um die Partikel zu stabilisieren. Weitere Untersuchungen zur quantitativen Proteinadsorption in Anwesenheit von Serum bzw. BSA sowie die Identifikation der unterschiedlich an SiO₂-Partikel adsorbierenden Serumproteine könnten Aufschluss darüber geben. Somit nimmt mit steigender spezifischer Oberfläche die Tendenz zur Agglomeration in Abwesenheit von Serum zu.

Nach der Größenbestimmung wurde die relative Oberflächenladung der verschieden großen bzw. oberflächenmodifizierten SiO₂-Partikel bestimmt. Hierzu wurden die Partikel (50 µg/ml) zunächst in H₂O analysiert. Alle Partikel besitzen unabhängig von ihrer Größe wie erwartet ein negatives Zeta-Potential (Zhuravlev, 2000). Für amino-modifizierte SiO₂-NP ist das Zeta-Potential etwas positiver als für nicht-modifizierte bzw. carboxy-modifizierte SiO₂-NP. Jedoch ist kaum ein Unterschied zwischen nicht-modifizierten und carboxy-modifizierten SiO₂-NP zu erkennen. Da das Zeta-Potential u.a. vom pH-Wert und Ionen abhängig ist, sind Studien in DMEM mit und ohne FCS relevanter als in Wasser. Leider war keine Messung in

DMEM möglich, da die Ionenstärke des Kulturmediums zu hoch ist (Murdock et al., 2008); Gerätehersteller). Dies war auch für höhere Partikelkonzentrationen (500 µg/ml) zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Um dennoch Aussage unter eher physiologischen pH und Salzbedingungen machen zu können wurde eine salzhaltige Lösung (0,5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄) für die Bestimmung des Zeta-Potentials verwendet. Es zeigt sich, dass carboxy-modifizierte SiO₂-NP deutlich negativer und Amino-modifizierte SiO₂-NP deutlich positiver als nicht-modifizierte SiO₂-NP sind. Das heißt, dass die chemische Modifikation der SiO₂-NP zu unterschiedlicher Oberflächenladung führt. Die Untersuchung der Oberflächenladung von verschiedenen modifizierten mesoporösen Silika-Nanopartikel (MSN) zeigt ähnliche Trends, wobei Carboxylgruppen-tragende MSN ein stärker negatives und Aminogruppen-tragende MSN ein schwächer negatives Zeta-Potential haben als nicht-modifizierte MSN (Chang et al., 2010). Es zeigt sich des Weiteren, dass sich das Zeta-Potential der SiO₂-Partikel in salzhaltiger Lösung im Vergleich zu H₂O verringert, was aber auch für andere Nanopartikel (Eisenoxid- und Zinkoxid) in PBS beschrieben wurde (Wells et al.).

Tabelle 7: Oberflächenladungen der verwendeten SiO₂-Partikel

SiO ₂ -Partikel [nm]		Zeta-Potential ± Standardabweichung [mV]		
		H ₂ O		salzhaltiger Lösung
		0h	24 h	24h, 37°C
70	nicht-markiert	-45±3	-37±1	nicht bestimmt
	FITC	-32±1	-31±1	-10±1
200	nicht-markiert	-48±1	-40±0	nicht bestimmt
	FITC	-35±0	-29±1	-22±1
500	nicht-markiert	-51±0	-37±0	nicht bestimmt
	FITC	-41±0	-35±2	-40±1
70 -NH ₂	nicht-markiert	-31±1	-25±2	nicht bestimmt
	FITC	-24±2	-15±1	-4±1
70 -COOH	nicht-markiert	-39±0	-41±1	nicht bestimmt
	FITC	-37±4	-37±1	-18±2

Abschließend ist hiermit zu sagen, dass die Stabilität der untersuchten FITC-SiO₂-NP von Serumproteinen abhängt und unabhängig von ihrer Oberflächenladung ist. Die gemessenen

Größen der FITC-SiO₂-Partikel in Kulturmedium erleichtert die spätere Interpretation von Zellkulturexperimenten.

Im Folgenden werden nun die oben beschriebenen Metalloxid-Partikel in *in vitro* Experimenten auf ihre Toxizität untersucht. Da Fresszellen (Makrophagen) in fast allen Organen (z.B. Lunge, Leber, Darm und Gehirn) vorkommen, um das Gewebe durch die Erkennung und Aufnahme von Fremdpartikeln, wie Mikroorganismen oder unlösliche Partikel zu schützen, wird in dieser Arbeit als Modell die murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie RAW264.7 verwendet. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie ähnliche Reaktionen (z.B. Entzündungsreaktionen) gegenüber Partikeln aus Umweltstäuben zeigen wie primäre humane Makrophagen, die aus humanem Spenderblut gewonnen werden (Fritsch-Decker et al., 2011). Des Weiteren ist ihre weitverbreitete Verwendung im Bereich der Partikelforschung für vergleichende Untersuchungen vorteilhaft (Giovine et al., 2002; Morishige et al., 2012; Niwa und Iwai, 2007; Panas et al., 2012; Xia et al., 2008).

3.3 Untersuchung der Toxizität und Quantifizierung von verschiedenen beschichteten magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln in RAW264.7 Zellen

In der Toxikologie werden verschiedene Messmethoden verwendet, um den Einfluss von Chemikalien und Partikeln auf die Vitalität in *in vitro* Experimenten zu untersuchen. Hierfür werden häufig die Zytotoxizität mit der Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH), sowie die Vitalität über Reduktion des Farbstoffs WST-1 in metabolisch aktiven Zellen bestimmt. Deshalb werden zunächst die oben beschriebenen Metalloxid-Partikel in RAW264.7 Zellen auf diese Endpunkte hin untersucht. Weitergehend werden diese Ergebnisse miteinander und mit der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie (AHM) verglichen.

Im Folgenden werden zunächst die unterschiedlich beschichteten γ -Fe₂O₃-NP in RAW264.7-Zellen auf ihre Toxizität hin untersucht.

3.3.1 Bestimmung der Zytotoxizität von verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP mit Hilfe des LDH-Tests

Für die Quantifizierung der Zytotoxizität wurden RAW264.7 Zellen auf 96-well Platten mit steigenden Konzentrationen an verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP in Medium mit Serum inkubiert. Nach Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit, wurde aus dem Überstand die

freigesetzte LDH über ihre katalytische Aktivität mit Hilfe einer kolorimetrischen Messung bei 450 nm quantifiziert (Abb. 8).

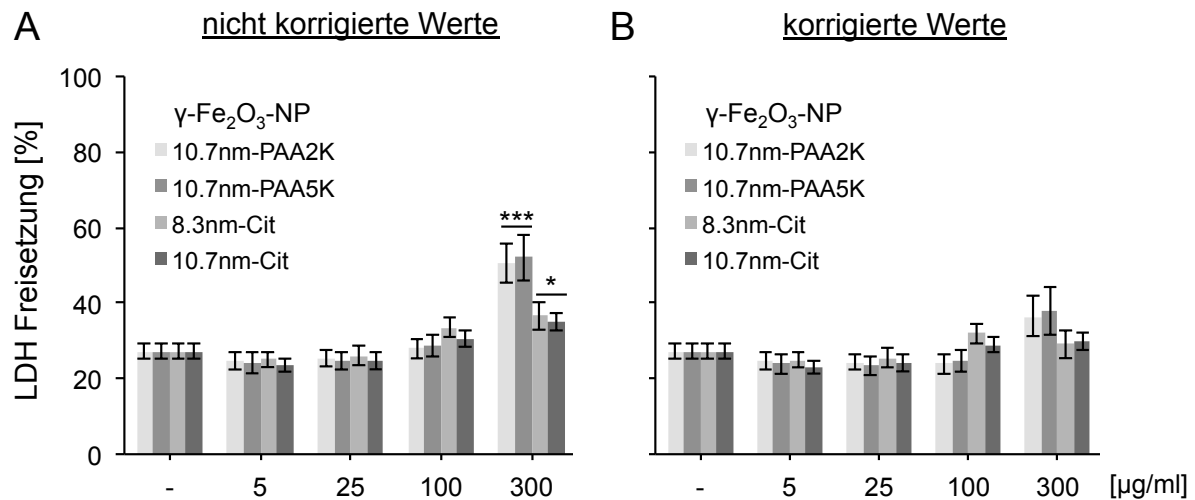


Abbildung 8: Falsch-positive Messung der Freisetzung der Laktatdehydrogenase nach Inkubation von RAW264.7-Zellen mit verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten ($A=0,32 \text{ cm}^2$) mit steigenden Konzentrationen der vier verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP in 100 μl DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 μl des Überstands für die Analyse verwendet. Als Positivkontrolle wurden unbehandelte Zellen mit 1% Triton X-100 lysiert, um die maximale Freisetzung der Laktatdehydrogenase zu erhalten. In A) ist die gemessene Freisetzung der LDH dargestellt, wobei die Absorption des umgesetzten Farbstoffs und die zusätzliche Absorption der γ -Fe₂O₃-NP bei 450 nm gezeigt wird. In B) ist die tatsächliche Freisetzung der LDH ohne die Absorption der γ -Fe₂O₃-NP dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen LDH Freisetzung aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Parallelproben ($n=9$) mit dem jeweiligen Standardfehler. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Bei der Messung der LDH im Überstand zeigt sich, dass bei der höchsten eingesetzten Konzentration für die beiden Polyacrylsäure-ummantelten γ -Fe₂O₃-NP scheinbar eine signifikante Zunahme der LDH im Medium zu detektieren ist (Abb. 8A). Für die Citrat-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel zeigt sich bei der gleichen Konzentration eine im Vergleich schwächere aber trotzdem deutliche Zunahme der LDH im Überstand. Daraus kann geschlossen werden, dass bei hohen Konzentrationen (300 $\mu\text{g/ml}$) an Eisenoxid-Nanopartikeln Zelltod in RAW264.7 auftritt. Ähnliche Beobachtungen wurden in epithelialen Zelllinien, murinen Hepatomzellen (Hepa-1C1C7) und humanen Prostatakarzinomzellen (DU145), gemacht (siehe Appendix), wobei Polyacrylsäure-beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel toxischer als Citrat-ummantelte Eisenoxid-Nanopartikel zu sein scheinen. Entgegen dieser Annahme zeigt sich aber, dass γ -Fe₂O₃-NP im Zellkulturmedium konzentrationsabhängig bei 450 nm Licht absorbieren (siehe Appendix) und dadurch das Ergebnis des LDH-Test verfälschen. Daher wurde die Absorption der γ -Fe₂O₃-NP von den

gemessenen Werten abgezogen und die korrigierten Werte in Abb. 8B dargestellt. Hieraus wird klar, dass keine signifikante Toxizität durch γ -Fe₂O₃-NP detektiert wird.

Da die Bestimmung der Zytotoxizität mit Hilfe des LDH-Tests durch die Interferenz der γ -Fe₂O₃-NP mit der Messtechnik fehlerhafte Ergebnisse liefert, wurde eine weitere Methode herangezogen. Im Weiteren wird deshalb die Zellvitalität durch die Messung der metabolischen Aktivität mit Hilfe des WST-1 Tests nach Behandlung mit γ -Fe₂O₃-NP in RAW264.7-Zellen untersucht.

3.3.2 Bestimmung der Zellvitalität nach Inkubation mit verschiedenen beschichteten magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln anhand der metabolischen Aktivität

Für die Bestimmung der Zellvitalität wurden RAW264.7 Zellen auf 96-well Platten mit steigenden Konzentrationen an verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP in Medium mit Serum für 24 h inkubiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden die Zellen mit dem WST-1 Reagenz in HBSS bis zu 2 h bei 37°C inkubiert. Die metabolische Umsetzung (Reduktion) des farblosen Tetrazoliumsalses zu einem gelblichen Formazan wurde bei 450 nm an einem Plattenspektrometer quantifiziert (Abb. 9)

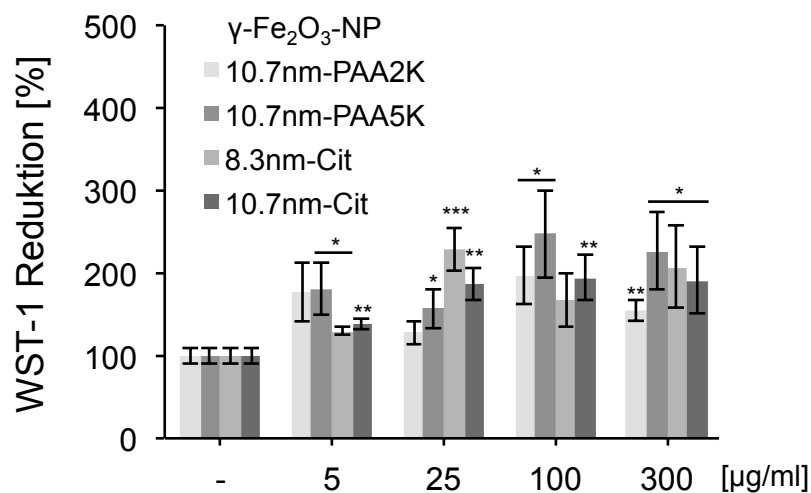


Abbildung 9: γ -Fe₂O₃-NP führen zur verstärkten WST-1 Reduktion in RAW264.7-Zellen. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen der vier verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP in 100 µl DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand mit Nanopartikeln abgesaugt und die Zellen mit 200 µl WST-1 Reagenz in HBSS für bis zu 2 h inkubiert. Die Absorption des Überstands (150 µl) wurde bei 450 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen WST-1 Reduktion aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Parallelproben (n=9) mit dem jeweiligen Standardfehler. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Die Untersuchung der metabolischen Aktivität anhand der WST-1 Reduktion zeigt, dass alle γ -Fe₂O₃-NP unabhängig von ihrer Beschichtung die metabolische Aktivität nicht verringern. Im Gegenteil, es wird sogar das bis zu 2,5-fache der Absorptionen der unbehandelten Kontrolle gemessen. Da die relative WST-1 Reduktion häufig als indirekte Messung für die Zellzahl benutzt wird, würde dies bedeuten, dass γ -Fe₂O₃-NP die Proliferation von RAW264.7-Zellen induziert. Möglicherweise erhöhen jedoch die γ -Fe₂O₃-NP die WST-1 Reduktion unspezifisch und interferieren mit der Toxizitätsmessung wie auch schon zuvor für den LDH-Test gezeigt.

Eine Interferenz durch Absorption der γ -Fe₂O₃-NP bei 450 nm, wie bereits unter 3.3.1 beschrieben ist eher unwahrscheinlich, da das Kulturmedium mit den Nanopartikeln komplett entfernt wurde bevor die Färbung erfolgte. Tatsächlich konnte eine direkte Reduktion des Farbstoffs WST-1 durch γ -Fe₂O₃-NP ausgeschlossen werden, da die Behandlung von Hepa-1C1C7 und DU145-Zellen mit γ -Fe₂O₃-NP zu keiner Erhöhung der WST-1 Reduktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle führte (siehe Appendix). Dies schließt darauf, dass die Erhöhung der WST-1 Reduktion nur in RAW264.7-Zellen zu beobachten ist.

Um nun zu klären, ob γ -Fe₂O₃-NP in RAW264.7-Zellen die Proliferation erhöht, wurde die Zellzahl nach Partikelinkubation bestimmt.

3.3.3 Etablierung der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie (AHM) zur Bestimmung von Zellzahl und Zelltod

Mit Hilfe der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie (AHM) lassen sich verschiedene Endpunkte in einer Probe auf zellulärer Ebene untersuchen (Crompton et al., 1992; Latt und Wohlleb, 1975; Zhivotosky und Orrenius, 2001). Hierfür werden die DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst33342 und Propidiumiodid (PI) nach der Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen an unterschiedlich beschichteten γ -Fe₂O₃-NP zu den Zellen gegeben, um diese zu markieren. Durch die unterschiedliche Durchlässigkeit der Plasmamembran für beide Farbstoffe lassen sich lebende Zellen (Hoechst⁺/PI⁻), von früh- (Hoechst⁺⁺/PI⁻) und spät-apoptotischen (Hoechst⁺⁺/PI⁺), sowie nekrotischen Zellen (Hoechst⁺/PI⁺) unterscheiden und mit Hilfe der Scan[^]R Analysis Software quantifizieren.

Um die AHM für den apoptotischen und nekrotischen Zelltod zu validieren wurde die Apoptose-induzierende Chemikalie Etoposid (Hande, 1998) sowie das membranpermeabilisierende und damit Nekrose-induzierende Detergenz Triton X-100 verwendet. Parallel wurde die Zellvitalität mittels WST-1 Reduktion und Zellzahlbestimmung, die Induktion der Apoptose mittels Annexin-V/PI-Färbung am Durchflusszytometer und die Zytotoxizität mittels LDH bestimmt (Abb. 10-13).

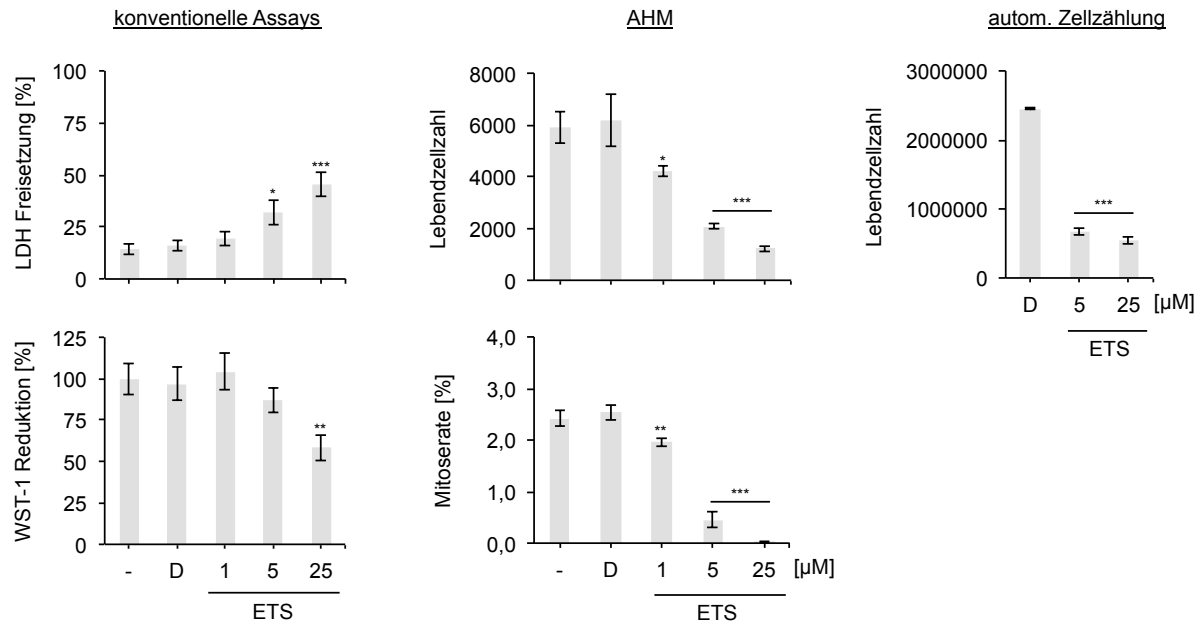


Abbildung 10: Die Reduktion der Zellzahl/Mitoserate korreliert mit LDH-Freisetzung und WST-Reduktion in RAW264.7-Zellen nach Inkubation mit Etoposid. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen an Etoposid (ETS) in 100 μl DMEM mit FCS entweder im Triplikat (konventionelle Assays) bzw. Quadruplikat (AHM) für 24 h inkubiert. Parallel wurden für die automatische Zellzählung 300.000 RAW264.7-Zellen in 6-well Platten (A=9,6 cm²) ausgesät und im Duplikat mit ETS in 3 ml DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die LDH Freisetzung und WST-1 Reduktion bestimmt, sowie die Zellzahl an einem CASY®1 bestimmt. Für die AHM wurden die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 μl DMEM mit FCS für 30 min angefärbt. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt. Für die konventionellen Assays werden Mittelwerte der relativen Werte aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Parallelproben (n=9) mit dem jeweiligen Standardfehler angegeben. Für die AHM ist ein repräsentatives Experiment (aus n=3) gezeigt, wobei Mittelwerte der Lebendzellzahlen aus vier 4 Parallelproben (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind. Für die automatische Zellzählung werden Mittelwerte aus 4 Parallelproben (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. * p < 0,05 , ** p < 0,01, *** p < 0,001. D: DMSO (Dimethylsulfoxid)

Mit steigenden Konzentrationen an Etoposid zeigt sich in der AHM, dass sich die Zellzahl und die Mitoserate verringert, was mit einer Abnahme in der automatischen Zellzählung und der WST-1 Reduktion korreliert, wobei das neue Verfahren gegenüber dem WST-1 Assay empfindlicher ist. Ebenfalls erhöht sich mit steigender Konzentration an Etoposid auch die LDH-Freisetzung.

Um nun genauer den Zelltod zu bestimmen wurde zusätzlich der Anteil apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen mit der Annexin-V/PI-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 11).

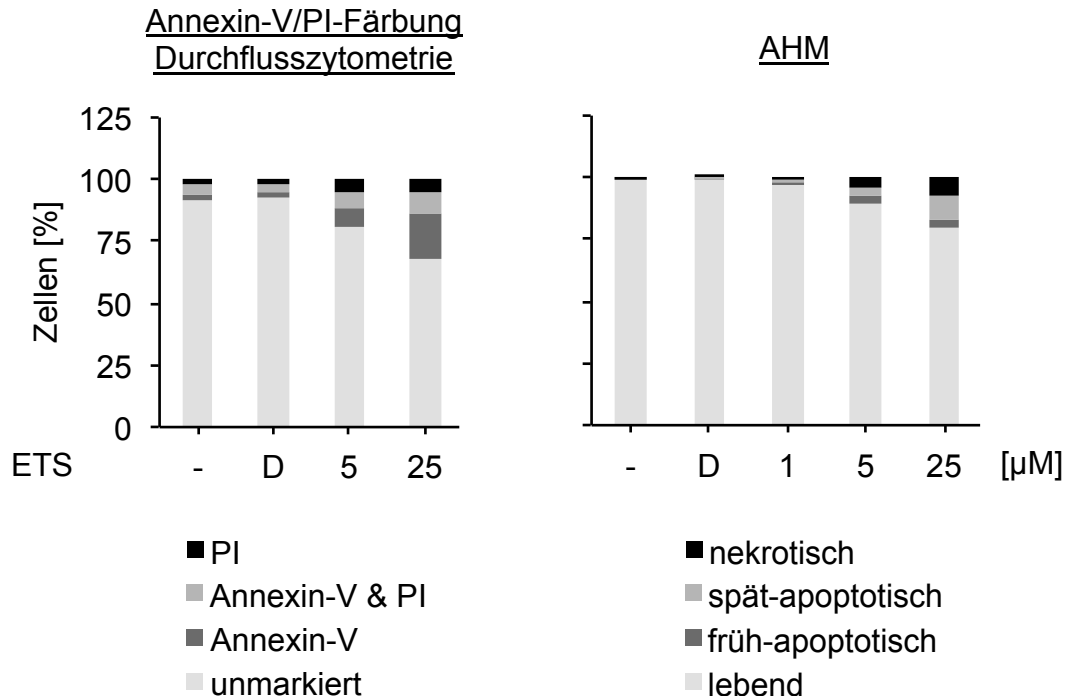


Abbildung 11: Vergleich der Detektion des Zelltods im Durchflusszytometer und AHM nach Inkubation von RAW264.7-Zellen mit Etoposid. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten ($A=0,32 \text{ cm}^2$) mit steigenden Konzentrationen an Etoposid (ETS) in 100 µl DMEM mit FCS im Quadruplikat (AHM) für 24 h inkubiert. Parallel wurden für die Detektion des Zelltods am Durchflusszytometer 300.000 RAW264.7-Zellen in 6-well Platten ($A=9,6 \text{ cm}^2$) ausgesät und mit ETS in 3 ml DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden in der AHM die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 µl DMEM mit FCS für 30 min angefärbt und danach für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen. Danach wurden die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt (rechts). Für die Bestimmung des Zelltods am Durchflusszytometer wurden die adhären Zellen mittels Accutase von der Kulturplatte abgelöst und nach einem Zentrifugationsschritt in einem kalziumhaltigen Puffer überführt, bevor sie bei RT für 15 min mit 5 µl Annexin-V- und 5 µl PI-Lösung angefärbt und einem FACS LSR II ausgewertet wurden. Dargestellt wird jeweils der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen von der Gesamtpopulation. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus 2 (Durchflusszytometrie) bzw. aus 3 unabhängigen Experimenten (AHM). D: DMSO (Dimethylsulfoxid)

Es zeigt sich, dass in der Durchflusszytometrie eine erhöhte basale Toxizität (ca. 10 %) detektiert wird. Im Gegensatz dazu wird in der AHM nur wenig Zelltod gemessen (1 %). Diese Diskrepanz kann durch das Ablösen der Zellen vom Zellkulturgefäß erklärt werden, wobei Kulturzellen durch Verlust des Kontakts zum Untergrund Apoptose auslösen können (Frisch und Francis, 1994). Ein weiterer Grund können auch die präparativen Schritte (enzymatisches Ablösen der Zellen, Zentrifugation und Resuspendierung) sein, wodurch die Zellen geschädigt werden. Da die Zellen bei der AHM nicht geerntet, sondern nur mit den

beiden Farbstoffen Hoechst33342 und PI inkubiert werden, wird nur eine geringe basale Toxizität gemessen. Dies führt zum Schluss, dass mit der Annexin-V/PI-Färbung am Durchflusszytometer ein hoher Anteil toter Zellen (Netto 9 %) durch die Präparation entsteht und damit ein Artefakt ist.

Darüber hinaus entsprechen die im Durchflusszytometer gemessenen PI-positiven und Annexin-V/PI-positiven Zellen, den nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen in der AHM. Somit kommen beide Verfahren zu ähnlichen Anteilen an nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen. Im Gegensatz dazu wurde ein höherer Prozentsatz an Annexin-V-positiven und somit früh-apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer detektiert, der nicht mit dem durch die AHM ermittelten Anteil der früh-apoptotischen Zellpopulation übereinstimmt. Da die Umlagerung von Phosphatidylserin zur Außenseite der Plasmamembran zeitlich noch vor der DNA-Kondensation stattfindet (Viorritto et al., 2007), werden in der Durchflusszytometrie Annexin-V-positive Zellen, mit als auch ohne kondensiertes Chromatin, als früh-apoptotische Zellen deklariert. In der AHM hingegen werden Annexin-V positive Zellen, deren Chromatin noch nicht kondensiert ist, nicht als früh-apoptotisch sondern als lebend erfasst. Dadurch verringert sich in der AHM der Anteil der früh-apoptotischen Zellen. Da die Rate der Spät-Apoptosen in beiden Fällen relativ gering ausfällt, wurden die RAW264.7-Zellen mittels Lebendzellmikroskopie über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Es zeigt sich, dass spät-apoptotische Zellen von noch lebenden Makrophagen phagozytiert werden und sich damit der Analyse entziehen (Daten nicht gezeigt).

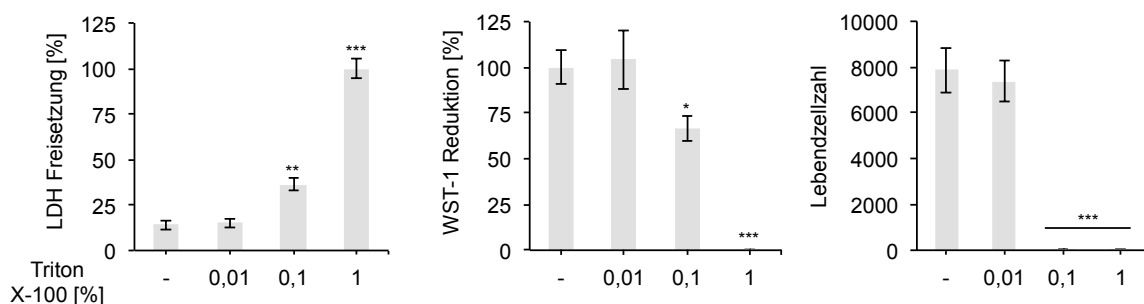


Abbildung 12: AHM ist bei der Detektion von Nekrosen sensitiver als konventionelle Messmethoden. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten ($A=0,32 \text{ cm}^2$) mit steigenden Konzentrationen an Triton X-100 in 100 μl DMEM mit FCS entweder im Triplikat (konventionelle Assays) bzw. Quadruplikat (AHM) für 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die LDH Freisetzung und WST-1 Reduktion bestimmt. Für die AHM wurden die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 μl DMEM mit FCS für 30 min angefärbt. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt. Für die konventionellen Assays werden Mittelwerte der relativen Werte aus 3 unabhängigen Experimenten mit

jeweils 3 Parallelproben (n=9) mit dem jeweiligen Standardfehler angegeben. Für die AHM ist ein repräsentatives Experiment (aus n=3) gezeigt, wobei Mittelwerte der Lebendzellzahlen aus 4 Parallelproben (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind. * p < 0,05 , ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Nach Behandlung mit Triton X-100 geht die Lebendzellzahl wie erwartet dramatisch zurück, wobei die AHM schon bei 0,1 % Triton keine lebenden Zellen mehr detektiert. Im Gegensatz dazu werden mit den konventionellen Messmethoden bei der gleichen Konzentration noch ca. 70 % lebende Zellen gemessen. Dies kann man darauf zurückführen, dass die Schädigung der Plasmamembran bei 0,1 % Triton ausreicht, damit ein kleines Molekül wie PI in die Zelle diffundiert, aber Proteine, wie die LDH (140 kDa), noch nicht austreten können (Fink und Cookson, 2005). Darüber hinaus, scheint die Plasmamembranschädigung nur teilweise die Mitochondrien zu beeinflussen, da die enzymatische Umsetzung von WST-1 noch zu 75 % stattfinden kann.

Zur Validierung, dass Zellen nach Behandlung mit Triton X-100 ausschließlich nekrotisch werden, wurde zusätzlich der Anteil apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen mit der Annexin-V/PI-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt und mit der Messung der AHM verglichen (Abb. 13).

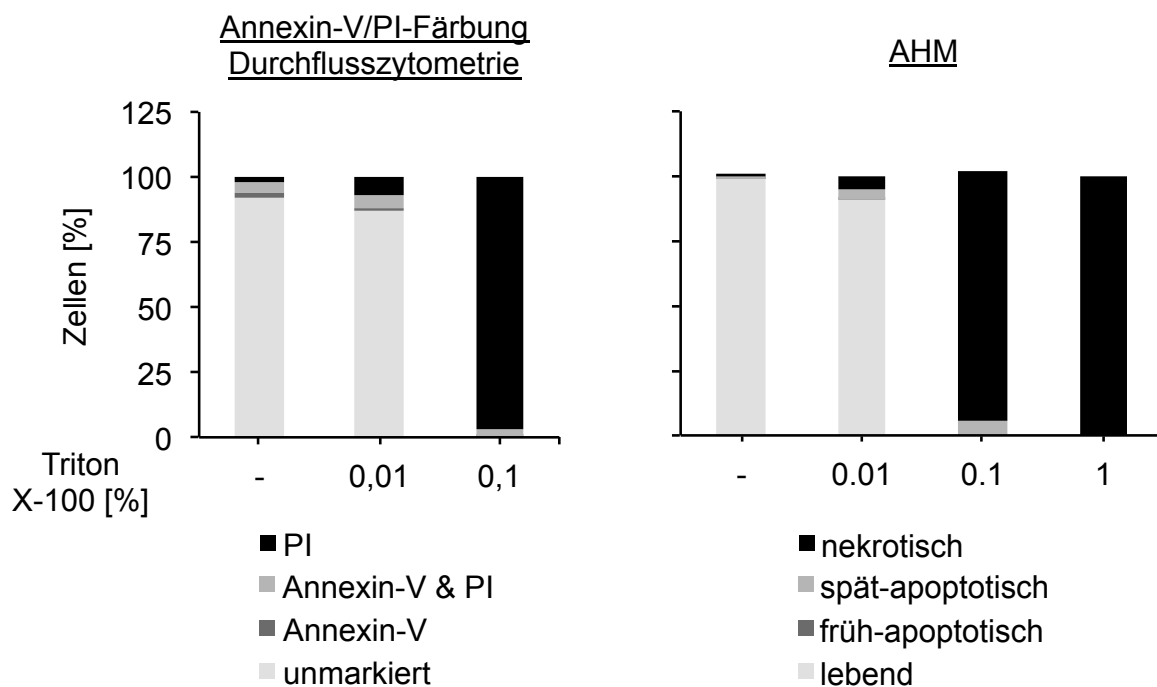


Abbildung 13: Vergleich der Detektion des Zelltods im Durchflusszytometer und AHM nach Inkubation von RAW264.7-Zellen mit Triton X-100. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen an Triton X-100 in 100 µl DMEM mit FCS im Quadruplikat (AHM) für 30 min inkubiert. Parallel wurden für die Detektion des Zelltods am Durchflusszytometer 300.000 RAW264.7-Zellen in 6-well Platten (A=9,6 cm²) ausgesät und mit Triton X-100 in 3 ml DMEM mit FCS für 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden in

der AHM die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 μ l DMEM mit FCS für 30 min angefärbt und danach für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen. Danach werden die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt (rechts). Für die Bestimmung des Zelltods am Durchflusszytometer werden die adhärennten Zellen mittels Accutase von der Kulturplatte abgelöst und nach einem Zentrifugationsschritt in einem kalziumhaltigen Puffer überführt, bevor sie bei RT für 15 min mit 5 μ l Annexin-V- und 5 μ l PI-Lösung angefärbt und einem FACS LSR II ausgewertet wurden (links). Dargestellt wird jeweils der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen von der Gesamtpopulation. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus 2 (Durchflusszytometrie) bzw. aus 3 unabhängigen Experimenten (AHM).

Es zeigt sich, dass der relative Anteil nekrotischer Zellen sowohl bei der AHM als auch der Durchflusszytometrie übereinstimmen. Da die Validierung der AHM hinsichtlich der Erfassung der Lebendzellzahl, Nekrose und Apoptose erfolgreich war, ist diese Methode geeignet im folgenden die unterschiedlich beschichteten γ -Fe₂O₃-NP zu untersuchen.

3.3.4 Bestimmung der Zellzahl und des Zelltods nach Inkubation mit verschiedenen beschichteten magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln mittels AHM

Im Folgenden wurden RAW264.7-Zellen nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von γ -Fe₂O₃-NP mit Hilfe der AHM untersucht (Abb. 14).

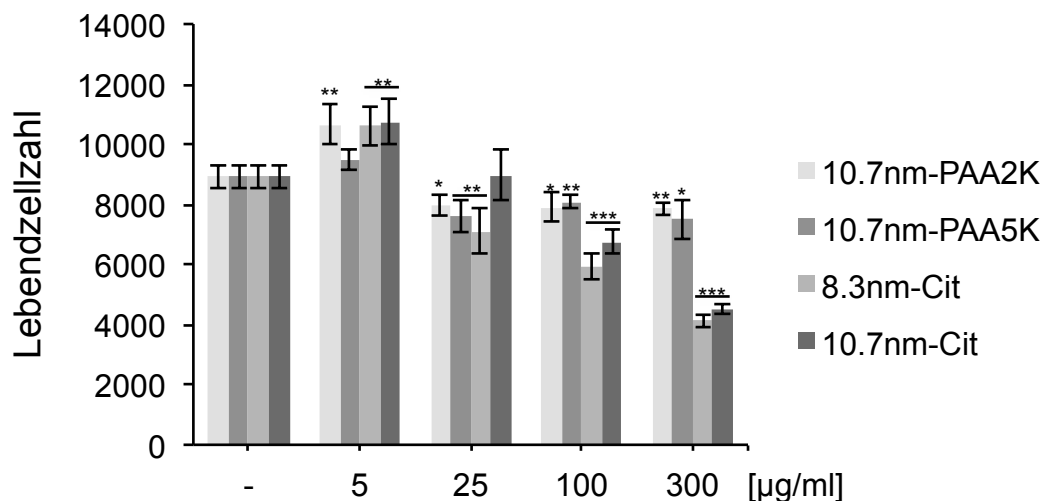


Abbildung 14: Die Reduktion der RAW264.7-Zellzahl durch γ -Fe₂O₃-NP ist konzentrations- und beschichtungsabhängig. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten ($A=0,32 \text{ cm}^2$) mit steigenden Konzentrationen der vier verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP in 100 μ l DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Für die AHM wurden die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 μ l DMEM mit FCS für 30 min angefärbt. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (aus $n=3$), wobei Mittelwerte aus vier 4 Parallelproben ($n=4$) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

In Abhängigkeit der Partikelkonzentration ist eine Abnahme der Lebendzellzahl zu beobachten, wobei jedoch bei der niedrigsten Konzentration eine leichte Zunahme der lebenden Zellen zu detektieren ist. Bei 300 µg/ml fällt die Zahl der lebenden Zellen für die Polyacrylsäure-beschichteten γ -Fe₂O₃-NP leicht ab (88 % für 10.7-PAA2K und 84 % für 10.7nm-PAA5K). Für die Citrat-ummantelten γ -Fe₂O₃-NP ist die Abnahme deutlich. (46 % für 8.3nm-Cit und 51 % für 10.7nm-Cit).

Dieses Ergebnis steht im klaren Widerspruch zur Zunahme der WST-1 Reduktion in RAW264.7-Zellen (Abb. 5), die häufig mit der Zellzahl gleichgesetzt wird. Somit korreliert die Zunahme der WST-1 Reduktion nicht mit der verringerten Zellzahl. Im Gegensatz dazu korreliert die Abnahme der WST-1 Reduktion in der Zelllinie DU145 nach der Behandlung mit verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP mit der verringerten Lebendzellzahl (siehe Appendix), wobei der WST-1 Assay hier etwas sensitiver zu sein scheint. Für Hepa-1C1C7 hingegen korreliert die WST-1 Reduktion nur nach der Behandlung mit Polyacrylsäure-beschichteten γ -Fe₂O₃-NP mit der Lebendzahlmessung. Die Behandlung mit Citrat-ummantelten γ -Fe₂O₃-NP bewirkt einen drastischen Rückgang der WST-1 Reduktion, zeigt aber keinen Effekt auf die Lebendzellzahl (siehe Appendix).

Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Zellzahlen in Makrophagen und epithelialen Zellen könnte sein, dass Makrophagen generell eine höhere Aufnahme von Partikeln zeigen als Epithelzellen (dos Santos et al., 2011; Lai et al., 2008). Die erhöhte intrazelluläre Dosis in Makrophagen könnte damit die stärkere Sensitivität erklären. Ob tatsächlich die intrazelluläre Menge in Makrophagen größer als in Epithelzellen ist, kann nicht mit den hier verwendeten Methoden geklärt werden, da diese keinen Unterschied zwischen intrazellulären und auf der Zellmembran assoziierten Partikeln machen. Daher muss auf andere Techniken, wie die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), zurückgegriffen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Veränderung der WST-1 Reduktion nach Behandlung mit Nanopartikeln nicht zwangsläufig mit der Lebendzellzahl korreliert. Es wird des Weiteren ersichtlich, dass verschiedene Zelllinien auf γ -Fe₂O₃-NP unterschiedlich hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität reagieren können, wobei es in RAW264.7-Zellen zu einer Zunahme der WST-1 Reduktion, jedoch in Hepa-1C1C7- und DU145-Zellen zu einer Abnahme der WST-1 Reduktion nach Exposition mit Citrat-beschichteten γ -Fe₂O₃-NP kommt. In einer toxikologischen Studie von Stepnik und Kollegen, die den WST-1 Assay verwendeten, zeigte

die murine Fibroblastenzelllinie 3T3-L1 nach Behandlung mit SiO₂-NP konzentrationsabhängig eine starke Zunahme der WST-1 Reduktion über 200 % gegenüber der Kontrolle. Gleichzeitig stieg ihre Zellzahl nur bis auf 150 % gegenüber der Kontrolle (Stepnik et al., 2012). Dies bedeutet, dass die WST-1 Reduktion zwar in diesen Zellen tendenziell, aber nicht absolut mit der Zellzahl korreliert. Gleichzeitig wird in der Studie gezeigt, dass bei der humanen Fibroblastenzelllinie WI-38 keine Erhöhung der WST-1 Reduktion nach Partikelexposition zu beobachten war. In der Studie von Albrecht und Kollegen zeigt sich ebenfalls eine Erhöhung der WST-1 Reduktion auf über 120 % nach Partikelexposition (Hydroxyapatit) in den murinen Makrophagen NR8383, wobei eine geringe Freisetzung der LDH (bis 10 %) gemessen wurde (Albrecht et al., 2009). Somit belegen auch andere Studien eine zelltypspezifische Erhöhung der WST-1 Reduktion nach Partikelexposition die nicht unbedingt mit der Lebendzellzahl korreliert.

Um nun zu klären, ob die Reduktion der Lebendzellzahl von RAW264.7-Zellen auf eintretenden Zelltod oder durch einen Arrest der Proliferation zurückzuführen ist, wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Populationen (lebend, früh-apoptotisch, spät-apoptotisch, nekrotisch) für alle vier γ -Fe₂O₃-NP bestimmt und dargestellt (Abb. 15).

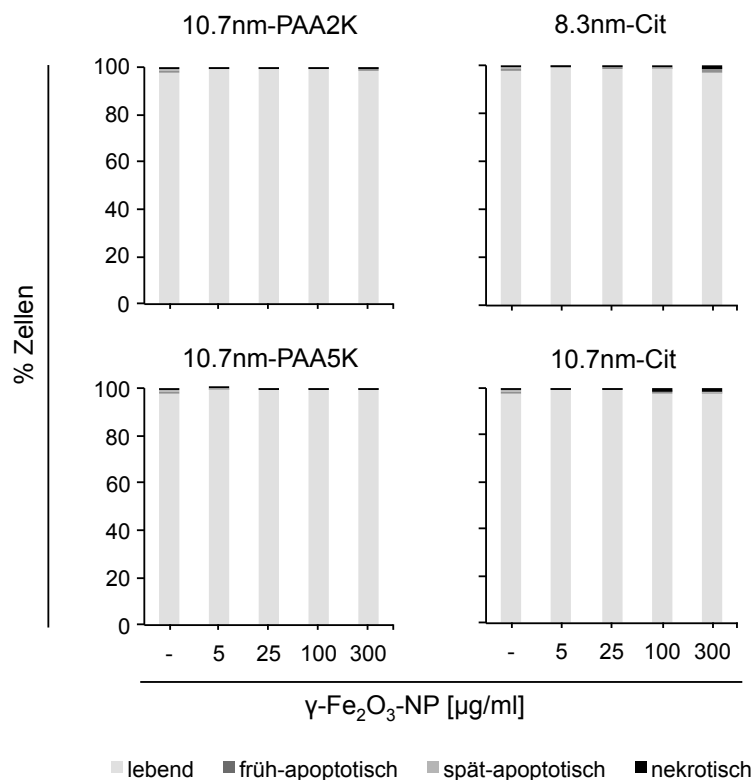


Abbildung 15: Verschieden beschichtete γ -Fe₂O₃-NP verursachen keine Toxizität in RAW264.7-Zellen. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen der vier verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP in 100 μ l DMEM mit FCS für 24 h

inkubiert. Für die AHM wurden die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 µl DMEM mit FCS für 30 min angefärbt. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=3), wobei Mittelwerte aus vier 4 Parallelproben (n=4) zur Bestimmung der prozentualen Verteilung verwendet wurde.

Nach der Behandlung von RAW264.7-Zellen mit verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP ist keine Erhöhung der Zytotoxizität zu beobachten. Der Anteil der toten Zellen nimmt weniger als 5 % der Gesamtpopulation ein.

Daher lässt sich resümieren, dass die Behandlung von RAW264.7 mit Eisenoxid-Nanopartikeln nur zu einer verringerten Proliferation der Zellen führt, die für Citrat-ummantelte Eisenoxid-Nanopartikel stärker ausfällt als für Polyacrylsäure-beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel.

Wegen der unterschiedlichen Stabilität der verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP im Kulturmedium (siehe Appendix, Safi et al., 2012) könnte sich die Nanopartikelkonzentration auf den Zellen unterscheiden und damit die unterschiedliche toxische Wirkung der Polyacrylsäure- bzw. Citrat-ummantelten γ -Fe₂O₃-NP erklären. Deshalb soll nachfolgend die Eisenmenge im Überstand, sowie auf bzw. in den Zellen quantifiziert und mit der Toxizität korreliert werden.

3.3.5 Quantifizierung der zellulären Dosis von verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP mit Hilfe der optischer Spektrometrie

Da die hier verwendeten γ -Fe₂O₃-NP keine Markierung (z.B. Fluoreszenzfarbstoff) zur Detektion besitzen, wurde die Menge an Nanopartikeln im Überstand und auf bzw. in den Zellen (zelluläre Fraktion) indirekt über den Gehalt an Eisen bestimmt. Die γ -Fe₂O₃-NP lassen sich durch konzentrierte HCl vollständig lösen, wobei sich Tetrachloroferrat (FeCl₄⁻) bildet, dessen Absorption im Bereich unter 400 nm gemessen werden kann. Da mit dieser Methode nicht unterschieden wird, ob die Partikel intrazellulär oder auf den Zellen lokalisiert sind, wird im Folgenden die gemessene Dosis als „zellulär“ bezeichnet. Für die Messung wurden im 96-well Maßstab RAW264.7-Zellen mit steigenden Konzentrationen an γ -Fe₂O₃-NP für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden γ -Fe₂O₃-NP im Überstand und in der zellulären Fraktion getrennt und mit konzentrierter Salzsäure bis zur vollständigen Lyse der Partikel bei RT inkubiert. Parallel wurde jeweils eine Eichgerade für

die zelluläre Fraktion und den Überstand durch Lyse definierter Mengen an γ -Fe₂O₃-NP mit und ohne Zellen mit konzentrierter Salzsäure erstellt. Der Gehalt an γ -Fe₂O₃-NP im Überstand und in der zellulären Fraktion wurde anhand der Eichgerade berechnet (Abb. 16).

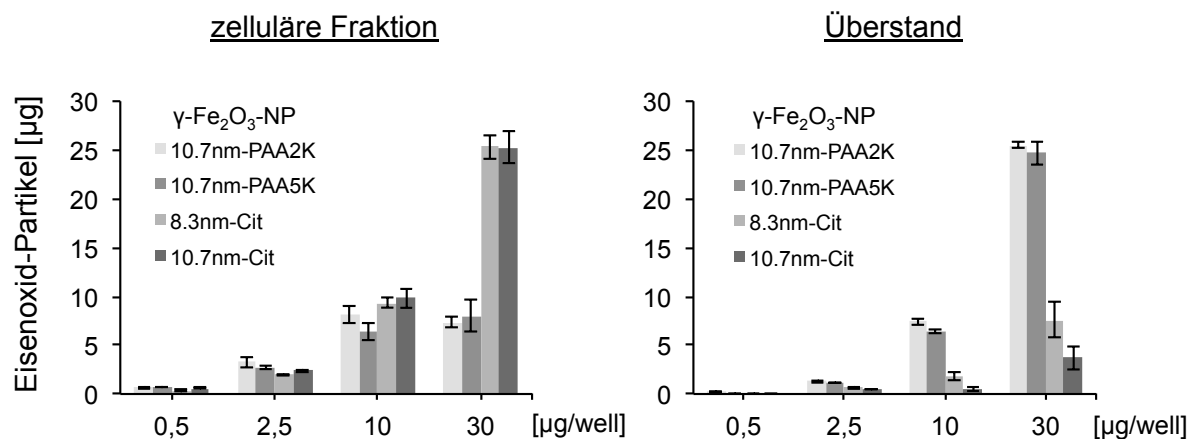


Abbildung 16: Konzentrations- und beschichtungsabhängige Verteilung verschiedener γ -Fe₂O₃-NP in der zellulären Fraktion und im Überstand. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen der vier verschiedenen beschichteten γ -Fe₂O₃-NP in 100 µl DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und dieser mit 100 µl konz. HCl und die Zellen mit 200 µl HCl bei RT behandelt. Nach der vollständigen Lyse der Partikel wurde die Absorption bei 400 nm gemessen. Parallel wurden zwei Eichgeraden aufgestellt, wobei definierte Mengen an γ -Fe₂O₃-NP in 100 µl Zellkulturmedium mit und ohne Zellen (10.000 Zellen) inkubiert und mit 100 µl konz.HCl lysiert wurden. Die Absorption wurde ebenfalls bei 400 nm gemessen und die absoluten Mengen an γ -Fe₂O₃-NP in zellulärer Fraktion und Überstand bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Messwerten (n=8) mit dem jeweiligen Standardfehler.

Die Quantifizierung der Nanopartikelmasse aus der zellulären Fraktion (Abb. 16, links) und dem Überstand (Abb. 16, rechts) zeigt, dass Polyacrylsäure-beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel in niedrigen Konzentrationen bis 2,5 µg/well etwa in vergleichbaren Mengen in der zellulären Fraktion und dem Überstand zu finden sind. Mit steigender Konzentration (ab 10 µg/well) erhöht sich der relative Anteil der Polyacrylsäure-beschichteten γ -Fe₂O₃-NP im Überstand und reduziert sich in der zellulären Fraktion. Bei 30 µg/well sind mehr als 80 % der Polyacrylsäure-beschichteten γ -Fe₂O₃-NP im Überstand. Des Weiteren nimmt der zelluläre Anteil von Polyacrylsäure-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel von 10 µg/well nach 30 µg/well nicht weiter zu. Die Citrat-ummantelten Eisenoxid-Nanopartikel zeigen hingegen schon ab 2,5 µg/well einen deutlich höheren relativen Anteil in der zellulären Fraktion, der mit steigender Konzentration weiter zunimmt. Bei der höchsten Konzentration (300 µg/ml) zeigt sich, dass mehr als 80 % der Eisenoxid-Nanopartikel in der zellulären Fraktion wiedergefunden werden. Aufgrund der Instabilität der Citrat-ummantelten γ -Fe₂O₃-NP im Zellkulturmedium sedimentieren diese fast vollständig und finden sich somit in der zellulären Fraktion (siehe Appendix bzw. Safi et al., 2011).

Mit Hilfe der Quantifizierung der Nanopartikelmasse in der zellulären Fraktion lässt sich nun die Toxizität mit der zellulären Dosis an $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ korrelieren.

3.3.6 Korrelation zwischen Lebendzellzahl und der zellulären Dosis verschieden beschichteter magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel

Für die Korrelation der effektiven Masse an Nanopartikeln mit der Zytotoxizität wird der Datensatz zur Bestimmung der Lebendzellzahl aus Kapitel 3.3.4 herangezogen (Abb. 17).

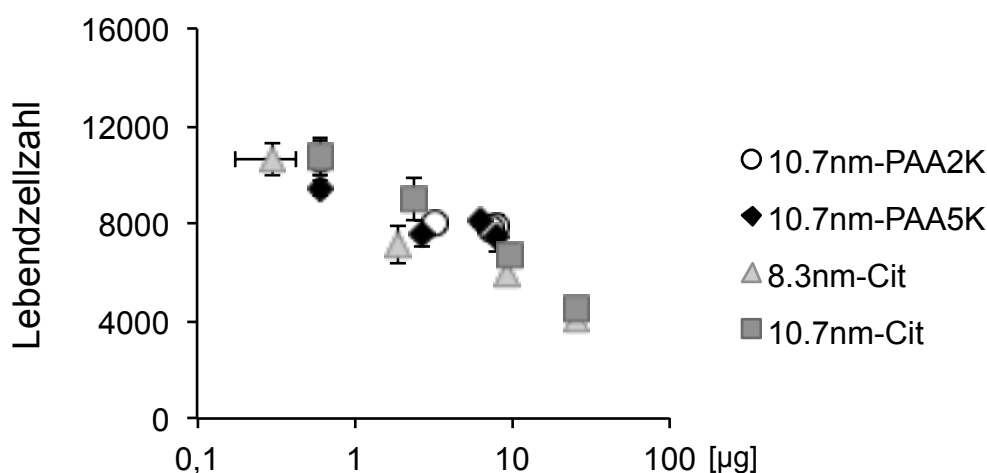


Abbildung 17: Konzentrationsabhängige Zellzahlreduktion nach Exposition von RAW264.7-Zellen mit unterschiedlich beschichteten $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$. Die Lebendzellzahl (Abb. 14) wird mit der Masse an $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ in der zellulären Dosis (Abb. 16) korreliert. Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl der lebenden Zellen aus vier Messwerten ($n=4$) mit der jeweiligen Standardabweichung in y -Richtung, Standardabweichung in x -Richtung entspricht der Standardabweichung der Eisenbestimmung.

Bis zur einer Partikelmasse von 5 μg reduziert sich die Lebendzellzahl für alle $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ gleichmäßig reduziert. Somit korreliert die Toxizität mit der zellulären Dosis der $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ unabhängig von der ihrer Beschichtung. Die scheinbar höhere Toxizität der Citrat-ummantelten $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ bei 100 und 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aus Abb. 10 ergibt sich durch ihre verstärkte Sedimentation und somit der höheren zellulären Dosis.

Damit lässt sich für unterschiedlich beschichtete $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ folgendes zusammenfassen:

1) Es wird in RAW264.7-Zellen eine Erhöhung der WST-1 Reduktion detektiert, wobei in epithelialen Zellen Citrat-ummantelte $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ zur einer Verringerung der WST-1 Reduktion führen.

2) Es wird keine Zytotoxizität anhand der Freisetzung von LDH detektiert. γ -Fe₂O₃-NP interferieren falsch-positiv mit dem LDH-Assay.

3) Das mikroskopische Verfahren ist sehr gut geeignet, um die Reduktion der Lebendzellzahl bzw. Zytotoxizität zu detektieren. Es wird zwar eine Reduktion der Lebendzellzahl von RAW264.7-Zellen gemessen, aber keine Zytotoxizität. Andere Zelllinien (Hepa-1C1C7 und DU145) zeigen keine Reduktion der Lebendzellzahl. Damit ist dies ein zelltyp-spezifischer Effekt.

4) Die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen ist wichtig, um scheinbare Unterschiede in der Toxizität verschiedener γ -Fe₂O₃-NP zu überprüfen, da die Sedimentation von agglomerierten Nanopartikeln die zelluläre Dosis und somit die Toxizität beeinflusst. Es wurden nach der Normierung keine Unterschiede in der Toxizität zwischen Polyacrylsäure- und Citrat-beschichteten γ -Fe₂O₃-NP beobachtet. Zusammenfassend ist zu sagen, dass wie aus der Literatur bekannt keine akute Toxizität von γ -Fe₂O₃-NP in Epithelzellen, aber in Makrophagen eine Reduktion der Zellzahl auftritt.

3.4 Untersuchung der Toxizität und Quantifizierung von FITC-Siliziumdioxid-Partikeln in RAW264.7 Zellen

Um die Zytotoxizität von verschiedenen großen SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen zu bestimmen wurden zunächst die klassischen Verfahren zur Bestimmung der Toxizität verwendet: Lebendzellzählung, LDH-Freisetzung, WST-1 Reduktion und Annexin-V/PI-Färbung am Durchflusszytometer. Danach wurden diese mit der AHM verglichen.

3.4.1 Lebendzellzahlbestimmung nach Exposition von RAW264.7-Zellen mit verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln

Um zu untersuchen, ob SiO₂-Partikel eine größen- und konzentrationsabhängige Auswirkung auf die Lebendzellzahl von RAW264.7-Zellen haben, wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von 70 nm, 200 nm und 500 nm FITC-SiO₂-Partikeln für 24 h behandelt. Nach dem Ernten der Zellen wird die Lebendzellzahl mit Hilfe der automatisierten Lebendzellzählung an einem CASY®1 Gerät bestimmt (Abb. 18).

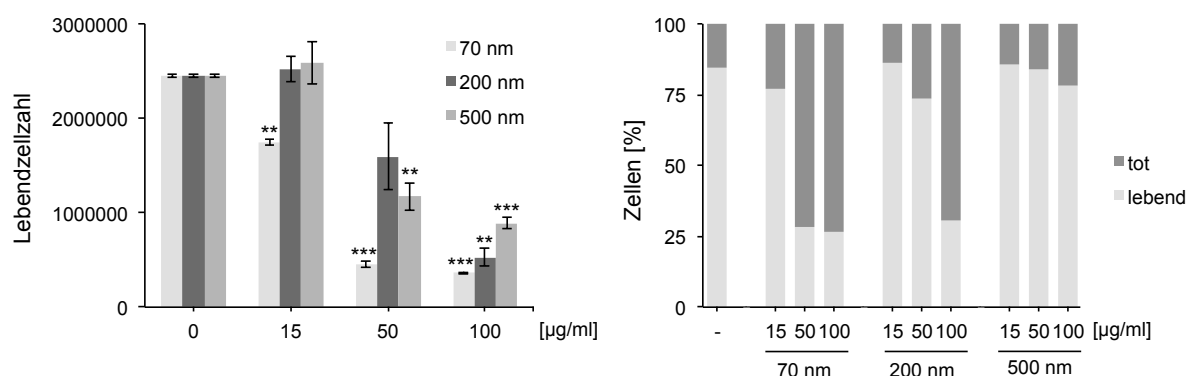


Abbildung 18: SiO₂-Partikel führen zur größen- und konzentrationsabhängigen Reduktion der Lebendzellzahl und Zelltod in RAW264.7-Zellen. 300.000 RAW264.7-Zellen werden in 6-well Platten (A=9,6 cm²) mit steigenden Konzentrationen an unterschiedlich großen FITC-SiO₂-Partikeln in 3 ml DMEM mit FCS im Duplikat für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen gewaschen, mit Accutase abgelöst und danach an einem CASY®1 bestimmt. Abhängig von der Größe werden Zellen, die größer bzw. kleiner als 7,5 µm sind als lebend bzw. als tot gewertet, wobei Lebendzellzahl (links) und der relative Anteil an toten und lebenden Zellen aufgetragen wird (rechts). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=2). Die Lebendzellzahl als Mittelwerte aus 2 Parallelproben (n=2) mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt. * p < 0,05 , ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Bei Behandlung mit 15 µg/ml ist nur für die 70 nm FITC-SiO₂-Nanopartikel (SiO₂-NP) die Lebendzellzahl signifikant reduziert. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle, dass die Lebendzellzahl nach Inkubation mit 70 nm FITC-SiO₂-NP sehr deutlich reduziert ist und die Zahl der toten Zellen stark zunimmt. Bei gleicher Konzentration zeigt sich eine leichte Reduktion der Lebendzellzahl, sowie eine leichte

Zunahme der toten Zellen durch 200 nm FITC-SiO₂-Mikropartikel (SiO₂-MP). Die Inkubation mit 500 nm FITC-SiO₂-MP führt bei 50 µg/ml zu einer signifikanten Reduktion der Lebendzellzahl, wobei keine Zunahme an toten Zellen zu detektieren ist. Nach Inkubation mit 100 µg/ml ist bei allen drei FITC-SiO₂-Partikelgrößen die Lebendzellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verringert, wobei 500 nm SiO₂-MP im Gegensatz zu den kleineren SiO₂-Partikeln nur wenig tote Zellen verursachen. Vergleichende Toxizitätsmessungen mit nicht-markierten SiO₂-NP zeigen, dass der in der Silikatmasse eingebaute Fluoreszenzfarbstoff keinen Einfluss auf die Toxizität hat. (siehe Appendix).

Zusammenfassend ist damit zu sagen, dass bei 50 µg/ml 70 nm FITC-SiO₂-NP toxischer als 200 nm und 500 nm FITC-SiO₂-MP sind. Bei geringeren Konzentrationen tritt zunächst eine Reduktion der Zellzahl auf, die voraussichtlich durch einen Proliferationsblock ausgelöst wird, bei höheren Konzentrationen hingegen wird Zelltod ausgelöst. Um nun die Toxizität der FITC-SiO₂-Partikel in RAW264.7-Zellen weiter zu untersuchen, werden weitere Testmethoden herangezogen.

3.4.2 Bestimmung der Zytotoxizität anhand freigesetzter Laktatdehydrogenase

Für die Bestimmung der Zytotoxizität wurden RAW264.7-Zellen mit steigenden Konzentrationen verschieden großer FITC-SiO₂-Partikel für 24 h inkubiert. Danach wurde aus dem Überstand die Menge an LDH anhand ihrer Aktivität bestimmt und prozentual aufgetragen (Abb. 19).

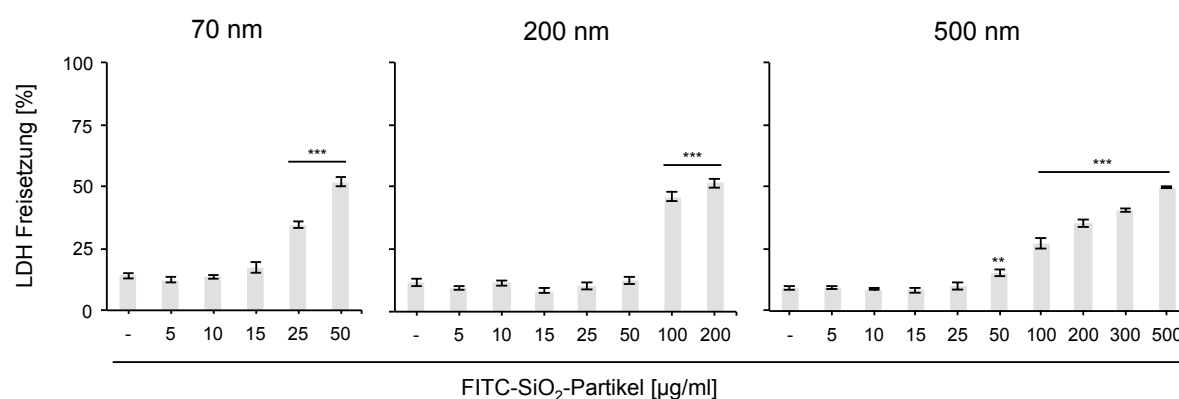


Abbildung 19: Konzentrations- und größenabhängige Freisetzung der LDH aus RAW264.7-Zellen nach Inkubation mit SiO₂-Partikeln. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen der verschieden großen SiO₂-Partikel in 100 µl DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 50 µl des Überstands für die Analyse verwendet. Als Positivkontrolle werden unbehandelte Zellen mit 1 % Triton X-100 lysiert, um die maximale Freisetzung der Laktatdehydrogenase zu erhalten. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen LDH Freisetzung aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Parallelproben (n=9) mit dem jeweiligen Standardfehler. * p < 0,05 , ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Mit steigenden Konzentrationen an FITC-SiO₂-Partikeln nimmt die Freisetzung der LDH aus den Zellen und damit die Membranpermeabilität zu. Eine deutliche Zunahme der LDH im Überstand lässt sich für die 70 nm FITC-SiO₂-NP bereits ab 25 µg/ml detektieren (von 14 % basal auf 35 %). Die LDH-Freisetzung steigt nach Behandlung mit 50 µg/ml auf 52 %. Für 200 nm FITC-SiO₂-MP zeigt sich erst bei 100 µg/ml eine sehr deutliche Zunahme der LDH im Überstand (46 %), die bei 200 µg/ml auf 52 % ansteigt. Im Vergleich dazu sind deutlich höhere Konzentrationen an 500 nm SiO₂-MP nötig, um vergleichbare Toxizität wie 70 und 200 nm SiO₂-Partikel zu erhalten. 70 nm FITC-SiO₂-NP erreichen bei geringeren Konzentrationen (50 µg/ml) eine halbmaximale Toxizität, wohingegen für 200 nm bzw. 500 nm FITC-SiO₂-MP eine höhere Partikelmasse eingesetzt werden muss (200 µg/ml bzw. 500 µg/ml). Damit korreliert die LDH-Freisetzung nach Partikelexposition mit der Messung der Lebendzellzahl und Zytotoxizität (Abb. 19).

3.4.3 Bestimmung der Zellvitalität anhand der metabolischen Aktivität

Für die Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden die Zellen wie schon in Kapitel 3.4.3 beschrieben nach Partikelexposition für bis zu 2 h mit dem farblosen Reagenz WST-1, dass in stoffwechselaktiven Zellen, d.h. lebendigen Zellen, zu einem roten Formazanfarbstoff umgesetzt wird, inkubiert (Abb. 20).

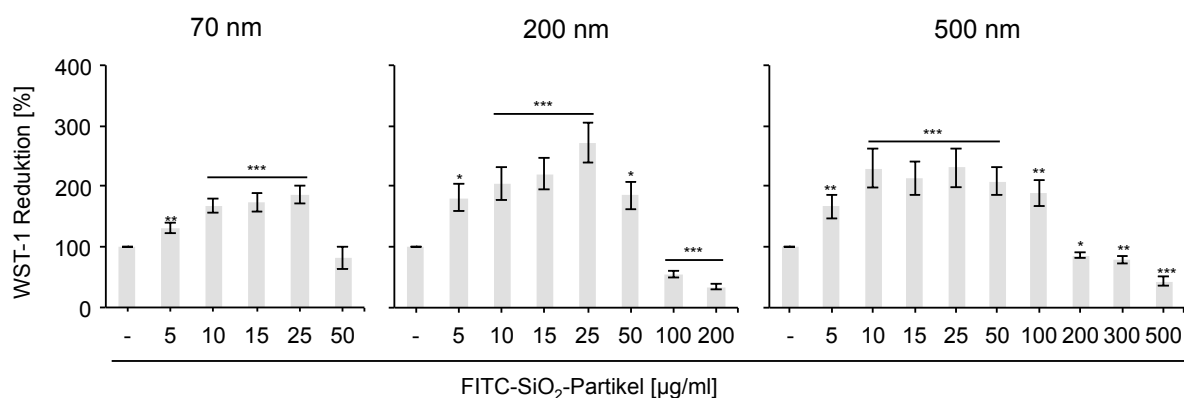


Abbildung 20: SiO₂-Partikel führen zur verstärkten WST-1 Reduktion in RAW264.7-Zellen. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen der verschieden großen SiO₂-Partikel in 100 µl DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Überstand mit Nanopartikeln abgesaugt und die Zellen mit 200 µl WST-1 in HBSS für bis zu 2 h inkubiert. Die Absorption des Überstands (150 µl) wird bei 450 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen WST-1 Reduktion aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Parallelproben (n=9) mit dem jeweiligen Standardfehler. * p < 0,05 , ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Die metabolische Aktivität nimmt nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen an verschieden großen FITC-SiO₂-Partikeln zunächst zu, wobei ein Maximum bei 25 µg/ml für

70 nm FITC-SiO₂-NP zu erkennen ist (186 %). Für 200 bzw. 500 nm FITC-SiO₂-MP ist das Maximum ebenfalls bei 25 µg/ml erreicht (272 % bzw. 231 %). Bei Konzentrationen von FITC-SiO₂-Partikeln über 25 µg/ml fällt die metabolische Aktivität wieder ab. Für die 70 nm FITC-SiO₂-NP fällt sie auf 82 % und ist damit vergleichbar mit der Kontrolle. Bei den 200 nm bzw. 500 nm FITC-SiO₂-MP verringert sich die WST-1 Reduktion erst ab 100 bzw. 200 µg/ml unter die der unbehandelten Kontrolle (56 % bzw. 87 %).

Der WST-1-Test zeigt im Vergleich zur direkten Bestimmung der Zellzahl bzw. der LDH-Freisetzung für 70 nm FITC-SiO₂-NP bei 50 µg/ml bzw. für 500 nm FITC-SiO₂-MP bei 100 µg/ml keine signifikante Toxizität. Eine Interferenz mit dem WST-1 Assay durch den Farbstoff FITC ist auszuschließen, da nicht-markierte SiO₂-Partikel auch zur Zunahme der WST-1 Reduktion in RAW264.7-Zellen führen (Daten nicht gezeigt). In Versuchen mit epithelialen HeLa-Zellen zeigt sich, dass 70 nm FITC-SiO₂-NP ebenfalls zu einer Erhöhung der WST-1 Reduktion führen, wohingegen keine Toxizität mit Hilfe des LDH-Tests gemessen wird (siehe Appendix). Daraus lässt sich schließen, dass die Erhöhung der WST-1 Reduktion durch FITC-SiO₂-NP nicht zelltypspezifisch ist. Damit ist auch diese Messmethode für die Bestimmung der Toxizität von SiO₂-Partikeln, wie für Eisenoxid-Nanopartikeln oben gezeigt (3.3.4), ungeeignet. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte WST-1 Reduktion in Makrophagen könnte die Generierung von ROS sein, die ebenfalls mit dem WST-1 Test gemessen werden können (Berridge und Tan, 1998), wobei dies im weiteren Verlauf der Arbeit aufgegriffen wird.

3.4.4 Bestimmung der Zellzahl nach Inkubation mit verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln mit Hilfe automatisierter Hochdurchsatzmikroskopie

Wie zuvor für Eisenoxid-Nanopartikel soll im Folgenden die Reduktion der Zellzahl bzw. Art des Zelltods mit Hilfe der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie ermittelt werden. Die Ergebnisse werden zusätzlich mit den Standardverfahren LDH, WST-1 und der Annexin-V/PI-Färbung verglichen. Mit Hilfe der AHM wurde zunächst die Anzahl von lebenden RAW264.7-Zellen nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln nach 24 h untersucht (Abb. 21).

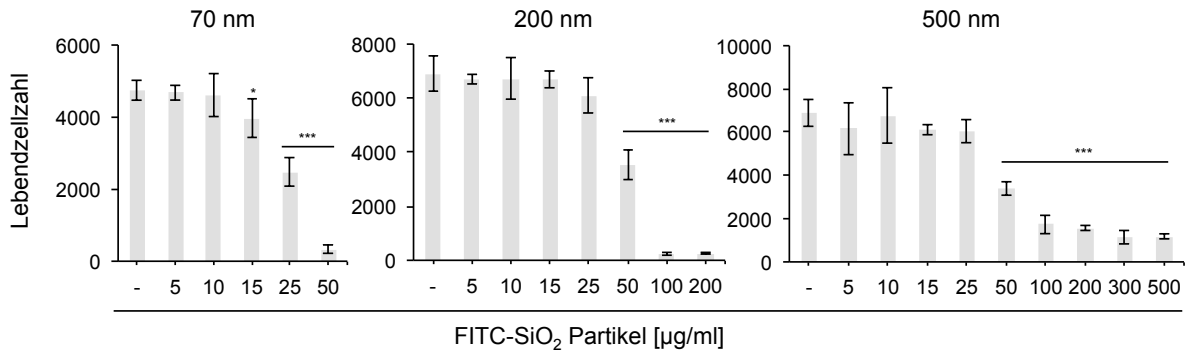


Abbildung 21: Konzentrations- und größenabhängige Reduktion der Lebendzellzahl von RAW264.7-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen verschieden großer FITC-SiO₂-Partikel in 100 µl DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Für die AHM wurden die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 µl DMEM mit FCS für 30 min angefärbt. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=3), wobei Mittelwerte der Lebendzellzahlen aus vier 4 Parallelproben (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind. * p < 0,05 , ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Die Behandlung von RAW264.7-Zellen mit verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln zeigt, dass eine konzentrationsabhängige Toxizität für alle drei Partikelgrößen zu detektieren ist. Die Lebendzellzahl reduziert sich nach Behandlung mit 70 nm FITC-SiO₂-NP ab 15 µg/ml. 200 bzw. 500 nm FITC-SiO₂-MP zeigen ab 50 µg/ml eine signifikante Reduktion der Zellzahl, die am stärksten bei 100 µg/ml bzw. 300 µg/ml ist. Es zeigt sich, dass bei 50 µg/ml für 70 nm FITC-SiO₂-NP eine geringere Lebendzellzahl detektiert wird als für 200 und 500 nm FITC-SiO₂-MP. Dies korreliert mit den Ergebnissen der automatisierten Lebendzellzahlbestimmung (Abb. 14). Im Vergleich zum LDH-Assay zeigt sich eine gute Korrelation mit der Lebendzellzahlbestimmung durch die automatisierte Hochdurchsatzmikroskopie für alle SiO₂-Partikel.

Im Vergleich zur Bestimmung der metabolischen Aktivität zeigt sich, dass die Lebendzellzahl zunächst für geringe Konzentrationen bis 25 µg/ml für alle Partikel nicht ansteigt. Die Änderung der WST-1 Reduktion in RAW264.7-Zellen durch FITC-SiO₂-Partikel korreliert somit nicht mit der Zellzahl.

Ob die Reduktion der Lebendzellzahl nach 24 h Inkubationszeit durch das Auftreten von Zelltod zu erklären ist, wurde zunächst durch die FITC-Annexin-V/PI-Färbung im Durchflusszytometer untersucht.

3.4.5 Vergleichende Analyse des Zelltods nach Inkubation mit verschiedenen großen SiO₂-Partikeln mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie

Eine klassische Methode, um spezifisch den Zelltod zu bestimmen, ist die FITC-Annexin-V/PI-Färbung im Durchflusszytometer. Hierfür wurden RAW264.7-Zellen mit 50 µg/ml nicht-markierten 70 nm, 200 nm und 500 nm SiO₂-Partikeln für 24 h inkubiert. Zum Vergleich wurden Zellen, wie schon unter Kapitel 3.3.3 beschrieben, mit der Apoptose-induzierenden Substanz Etoposid (25 nM) für 24 h behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen auf Eis gerettet. Danach wurden die Proben mit FITC-Annexin-V/PI gefärbt und direkt an einem Durchflusszytometer gemessen (Abb. 22).

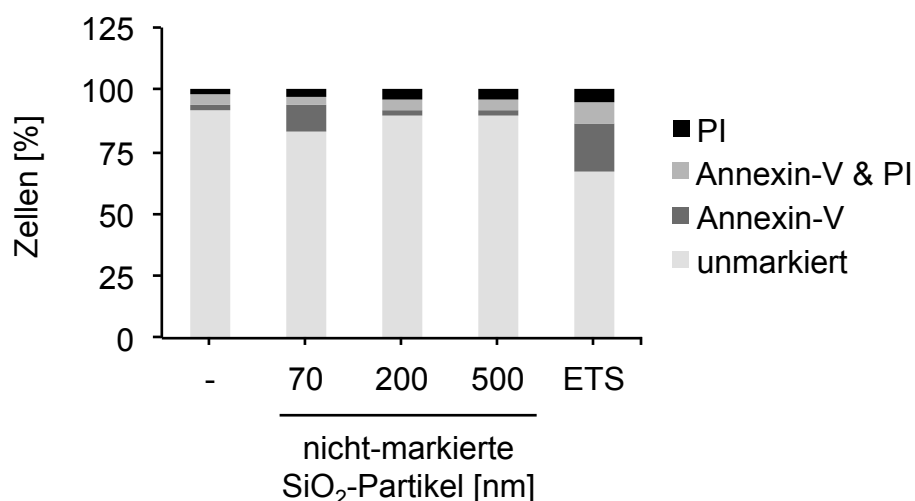


Abbildung 22: Größenabhängige Zunahme der Annexin-V-positiven Zellen in RAW264.7-Zellen nach Exposition mit SiO₂-Partikeln. 300.000 RAW264.7-Zellen werden in 6-well Platten (A=9,6 cm²) mit 50 µg/ml verschieden großer nicht-markierter SiO₂-Partikel in 3 ml DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Für die Bestimmung des Zelltods am Durchflusszytometer werden die adhärenenten Zellen mittels Accutase von der Kulturplatte abgelöst und nach einem Zentrifugationsschritt in einem kalziumhaltigen Puffer überführt, bevor sie bei RT für 15 min mit 5 µl Annexin-V- und 5 µl PI-Lösung angefärbt werden und einem FACS LSR II ausgewertet. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=2) Dargestellt wird jeweils der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen von der Gesamtpopulation.

Nach Behandlung mit 50 µg/ml 70 nm SiO₂-NP ist eine verstärkte Zunahme von FITC-Annexin-V-positiven Zellen zu detektieren (1,86 % in der Kontrolle auf 11,25 %). Bei gleicher Konzentration zeigen 200 und 500 nm SiO₂-MP geringere Zunahmen der FITC-Annexin-V-positiven Population (4,01 % bzw. 4,05 %). SiO₂-Partikel scheinen damit in RAW264.7-Zellen größenabhängig Apoptose auszulösen. Etoposid steigert wie erwartet die Fraktion der FITC-Annexin-V-positiven Zellen auf 18,64 %.

Im Folgenden wird das Ergebnis der Durchflusszytometrie mit der Zelltod-Analyse mittels der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie verglichen, wobei die verschiedenen Populationen der lebenden Zellen, früh- und spät-apoptotischen Zellen, sowie nekrotischen Zellen prozentual aufgetragen werden (Abb. 23).

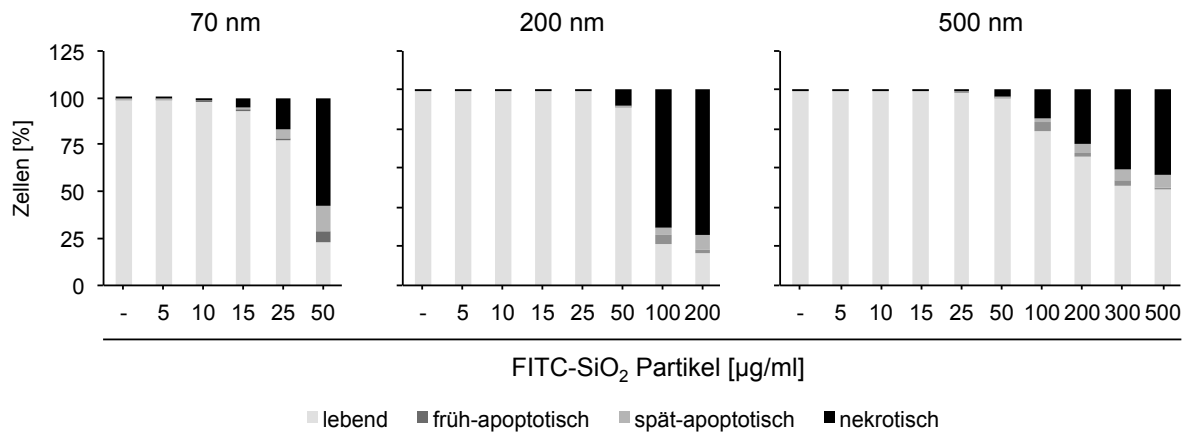


Abbildung 23: Konzentrations- und größenabhängige Zunahme der Nekrose in RAW264.7-Zellen nach Exposition mit FITC-SiO₂-Partikeln. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen der verschieden großen FITC-SiO₂-Partikel in 100 µl DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Für die AHM wurden die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 µl DMEM mit FCS für 30 min angefärbt. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellen mittels Olympus Scan[^]R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=3), wobei Mittelwerte aus vier 4 Parallelproben (n=4) zur Bestimmung der prozentualen Verteilungen verwendet wurden.

Im Gegensatz zur Detektion mittels der Durchflusszytometrie zeigt sich, dass die FITC-SiO₂-Partikel hauptsächlich Nekrose induzieren. Die Behandlung mit 70 nm FITC-SiO₂-NP führt schon ab 25 µg/ml zur Nekrose, während 200 und 500 nm FITC-SiO₂-MP erst ab einer Konzentration von 100 µg/ml nekrotisch werden. 200 nm FITC-SiO₂-MP bewirken eine höhere Nekroserate als 500 nm FITC-SiO₂-Partikel. Während mit der Durchflusszytometrie bei 50 µg/ml für die 70 nm SiO₂-NP der Anteil toter Zellen bei 20 % und hauptsächlich früh-apoptotisch und nicht nekrotisch ist, liegt der Anteil für die automatisierte Hochdurchsatzmikroskopie bei 77 % ist vorwiegend nekrotisch. Aufgrund der geringeren Toxizität sind für 200 und 500 nm die Anteile toter Zellen eher vergleichbar (9 % und 5 %). Der starke Anstieg der Nekrose für die verschieden großen SiO₂-Partikel passt jedoch zum Anstieg der LDH im Überstand. Somit unterschätzt die Durchflusszytometrie den nekrotischen Anteil nach Partikelexposition. Da die Nekrose- bzw. Apoptoserate nach Triton X-100 bzw. Etoposid für beide Verfahren (Durchflusszytometrie, AHM) vergleichbar war, scheint spezifisch für Partikel die Durchflusszytometrie den nekrotischen Anteil nicht richtig zu erfassen. Eventuell führt die Prozessierung der Zellen in Gegenwart von Partikeln

zum Verlust stark geschädigter Zellen (spät-apoptotisch sowie nekrotisch), was weiter untersucht werden muss.

Da die AHM und die Durchflusszytometrie Charakteristika apoptotischer Zellen nach Partikelexposition detektierten (Kondensation des Chromatins, Annexin-V-Färbung), wurde untersucht, ob der hohe Anteil der Nekrose eventuell durch sekundäre Nekrose der zuvor apoptotischen Zellen erklärt werden kann (Abb 24).

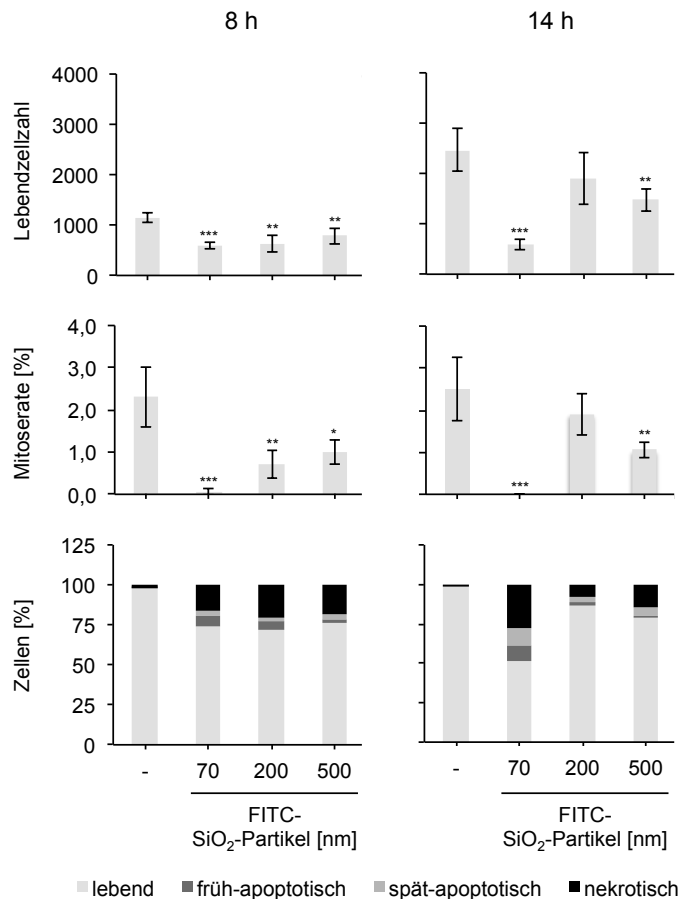


Abbildung 24: Konzentrations- und größenabhängige Zunahme der Nekrose in RAW264.7-Zellen nach Exposition mit FITC-SiO₂-Partikel. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit 50 µg/ml der verschieden großen FITC-SiO₂-Partikeln in 100 µl DMEM mit FCS für 8 und 14 h inkubiert. Für die AHM wurden die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 µl DMEM mit FCS für 30 min angefärbt. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt. Für die Bestimmung der Mitoserate wurden Metaphase-Zellen anhand der DNA-Färbung in den 6 Bildausschnitten manuell gezählt und durch die Gesamtzellzahl im jeweiligen Bildausschnitt geteilt. Oben: Lebendzellzahl, Mitte: Mitoserate. Unten: Prozentuale Verteilung von lebenden, früh- und spät-apoptotischen sowie nekrotischen Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=2), wobei Mittelwerte aus vier 4 Parallelproben (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung für die Lebendzellzahl und Mitoserate angegeben sind.

Nach 8 h zeigen alle SiO₂-Partikel eine Reduktion der Zellzahl, wobei die Messung der Mitoserate anzeigt, dass ein Proliferationsstopp abhängig von der Größe der Partikel stattfindet. Gleichzeitig wird auch Zelltod gemessen. Da schon zu diesem frühen Zeitpunkt mehr Nekrosen als Apoptosen detektiert werden, ist davon auszugehen, dass entweder beide Prozessen zeitgleich ablaufen oder die zuvor apoptotischen Zellen schon innerhalb der 8 h nekrotisch werden. Nach 14 h erholen sich interessanterweise die Zellkulturen, die mit 200 und 500 nm SiO₂-MP behandelt wurden, was sich auch in der im Vergleich zum 8 h-Wert erhöhten Mitoserate widerspiegelt. 70 nm SiO₂-NP behandelte Zellen hingegen proliferieren nicht mehr und zeigen vermehrt Zelltod in Form von Nekrose und Apoptose.

Um zu klären ob SiO₂-NP zunächst Apoptose induzieren, die innerhalb von wenigen Stunden zur sekundären Nekrose führt, wurde der Verlauf des Zelltods auf Einzelzellebene (Lebendzellmikroskopie) untersucht und eine Serie von Hellfeldbildern (4-20 h) von Zellen, die mit 70 nm SiO₂-NP behandelt wurden, aufgenommen (Abb. 25).

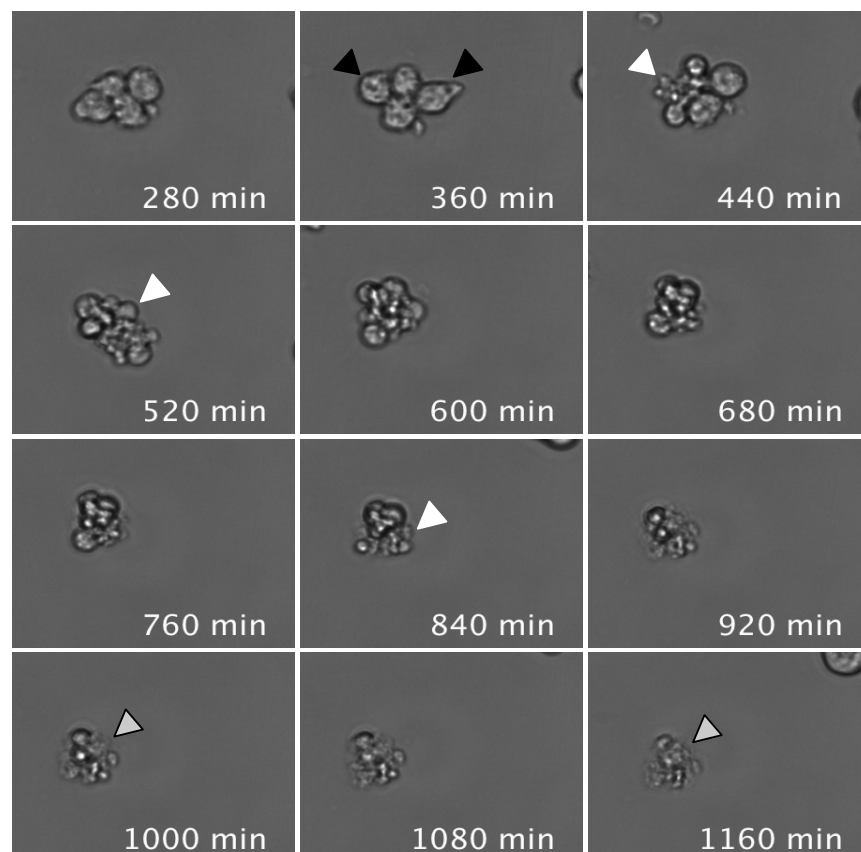


Abbildung 25: Zeitliche Hellfeldbilderserie von RAW264.7-Zellen zeigt apoptotische und nekrotische Merkmale nach Exposition mit 70 nm FITC-SiO₂-NP. 120.000 RAW264.7-Zellen wurden in 12-well Platten (A=0,32 cm²) mit 50 µg/ml 70 nm FITC-SiO₂-Partikel in 1,2 ml DMEM mit FCS inkubiert. Ca. 4,5 h nach Beginn der Inkubation wurde bis ca. 20 h alle 80 min ein Hellfeldbild aufgenommen. Schwarzer Pfeil: Vakuolen, weißer Pfeil: Blebbing, grauer Pfeil: Kontrastverlust

Nach ca. 360 Minuten zeigen sich erste morphologische zelluläre Änderungen in Form von intrazellulären Vesikeln (schwarzer Pfeil). Nach 440 min zeigt sich erstes Blebben von Zellen (weisser Pfeil), wobei dies nach etwa 600 min zum Stillstand kommt und keine Zellbewegung mehr zu erkennen ist. Im weiteren Verlauf zeigt sich des Weiteren ein Verlust des Kontrasts der Zellen im Hellfeld (grauer Pfeil), was darauf schließen lässt, dass die Zellmembran kollabiert und damit die Membranintegrität nicht mehr gegeben ist. Dies deutet darauf hin, dass zunächst Apoptose eingeleitet wird, dann die Zellen aber in Nekrose gehen. Die Beobachtungen der apoptotischen Merkmale stehen im Einklang mit der Annexin-V/PI-Färbung im Durchflusszytometer, der Verlust des Kontrasts bzw. Membranintegrität korreliert mit der Zunahme der LDH im Überstand, sowie mit dem PI-Influx in der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie. Die Analyse durch die Lebenszellmikroskopie zeigt, dass tatsächlich zunächst Apoptose dann aber Nekrose induziert wird.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass SiO₂-Nanopartikel Zelltod mit Merkmalen der Apoptose und Nekrose in RAW264.7-Zellen auslösen. Eine Hypothese, die von Nel aufgestellt wurde, beschreibt die Toxizität von Nanopartikeln in Abhängigkeit vom oxidativen Stress, der durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen ausgelöst wird (Nel et al., 2006). Daher wurde die intrazelluläre Generierung von ROS nach Exposition mit 70 nm SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen untersucht (Abb. 26).

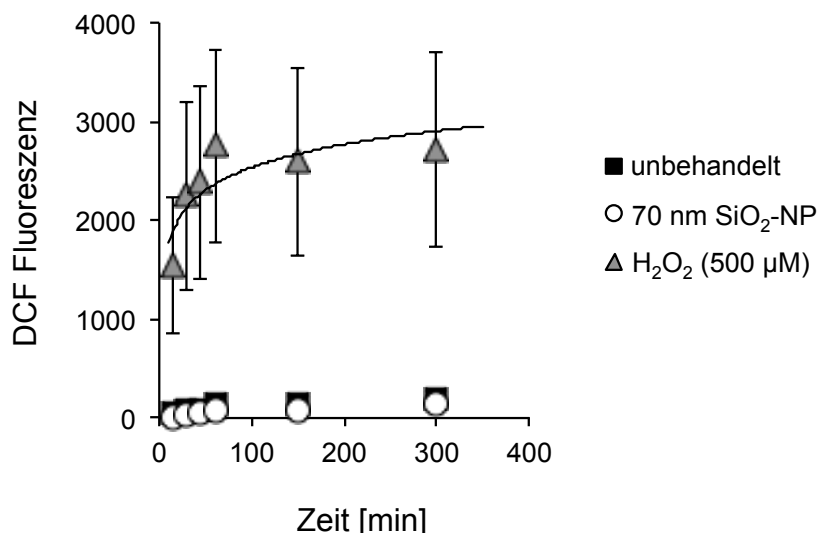


Abbildung 26: SiO₂-NP verursachen keine intrazelluläre Generierung von ROS. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit 50 µM H₂DCF-HA für 40 min in phenolrotfreiem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit Phenolrotfreiem Medium gewaschen und mit 50 µg/ml 70 nm SiO₂-NP oder 500 µM H₂O₂ in 100 µl phenolrotfreiem Medium über 5 h inkubiert und die Fluoreszenz nach den verschiedenen Zeitpunkten (15, 30, 45, 60, 150, 300 min) an einem Mikroplatten-Fluoreszenzspektrometer bei 530/13 nm gemessen. Gezeigt ist ein

repräsentatives Experiment (aus n=2), wobei Mittelwerte aus vier 4 Parallelproben (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind.

Es zeigt sich, dass 70 nm SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen keine reaktive Sauerstoffspezies generieren, was ausschließt, dass ROS an der Toxizität von SiO₂-NP beteiligt sind. Als weitere Ursache für die Nanopartikel-induzierte Zytotoxizität auch die lysosomale Ruptur (LMP) diskutiert (Boya und Kroemer, 2008; Nel et al., 2009; Xia et al., 2008), auf die zu einem späterem Zeitpunkt in der Diskussion eingegangen wird.

3.4.6 Zytotoxizität von verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln in Abhängigkeit von Partikelmasse, spezifischen Oberfläche und Partikelzahl im Expositionsmedium

Welcher Parameter die Toxizität von Nanopartikeln in Vergleich zu Mikropartikeln am Besten beschreibt (Masse, spezifische Oberfläche oder Partikelzahl) ist bisher umstritten (Oberdörster et al., 2005a). Daher wird die in Abb. 21 gemessene Lebendzellzahl nach Behandlung mit SiO₂-Partikeln mit der berechneten Massen-, Oberflächen- und Partikelkonzentration korreliert (siehe Appendix).

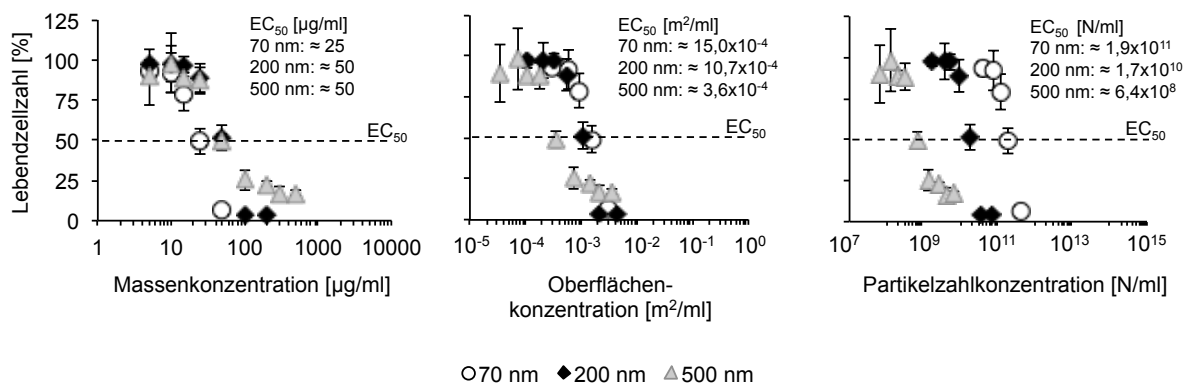


Abbildung 27: Korrelation der Toxizität mit der eingesetzten Masse, Oberfläche, sowie Partikelzahl verschieden großer FITC-SiO₂-Partikeln im Expositionsmedium. Der Datensatz zur Bestimmung der Toxizität stammt aus Abb. 21. Die halbmaximalen effektiven Konzentrationen (EC₅₀) wurden jeweils aus den Graphen abgelesen.

Durch den Vergleich der Toxizität in Abhängigkeit von der eingesetzten Masse bzw. Oberfläche, sowie Partikelzahl der verschieden großen FITC-SiO₂-Partikeln lassen sich verschiedene Aussagen treffen (Abb. 27). Bezogen auf die eingesetzte Masse zeigen 70 nm FITC-SiO₂-NP im Vergleich zu 200 nm und 500 nm FITC-SiO₂-MP bei geringeren Konzentrationen eine Zellzahlreduktion. Hiermit liegt die EC₅₀, d.h. die Konzentration bei der die halbmaximale Toxizität auftritt, zwischen 25 µg/ml (= 2,5 µg pro 10.000 Zellen) wohingegen 200 nm und 500 nm FITC-SiO₂-MP eine EC₅₀ von ca. 50 µg/ml (= 5 µg pro

10.000 Zellen) besitzen. Wenn die Partikeloberfläche als Parameter für die Toxizität eingesetzt wird, besitzen 500 nm FITC-SiO₂-MP eine niedrigere EC₅₀ ($3,6 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{ml} = 3,6 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ pro 10.000 Zellen) als 200 nm ($10,7 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{ml} = 10,7 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ pro 10.000 Zellen) und 70 nm ($15,0 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{ml} = 15,0 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ pro 10.000 Zellen) SiO₂-Partikel. Wird die Toxizität auf die Partikelzahl normiert, so haben 500 nm FITC-SiO₂-MP ebenfalls eine niedrigere EC₅₀ ($6,4 \times 10^8$ Partikel/ml = $6,4 \times 10^7$ Partikel pro 10.000 Zellen) als 200 nm ($1,7 \times 10^{10}$ Partikel/ml = $1,7 \times 10^9$ Partikel pro 10.000 Zellen) und 70 nm ($1,9 \times 10^{11}$ Partikel/ml = $1,9 \times 10^{10}$ Partikel pro 10.000 Zellen) SiO₂-Partikel. Somit ist in der üblichen Darstellung bezogen auf die eingesetzte Masse ein Nanoeffekt zu erkennen, da 70 nm FITC-SiO₂-NP toxischer sind als 200 und 500 nm FITC-SiO₂-MP. Bezieht man die Toxizität aber auf die Oberfläche oder Partikelzahl, so sind 500 nm FITC-SiO₂-MP wesentlich toxischer als 200 und 70 nm FITC-SiO₂-Partikel. Im Gegensatz zu Chemikalien ist die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Partikel schwieriger, da Sedimentation und Diffusion der Partikel abhängig von den physikochemischen Eigenschaften (z.B. Größe, Dichte, Masse) die zelluläre Dosis stark beeinflusst. Dies führt dazu, dass größere Partikel schneller sedimentieren als kleinere Partikel und somit schneller auf Zellen treffen. Deshalb sind Dosis-Wirkungs-Beziehungen, welche die eingesetzte Konzentration im Zellmedium heranziehen, offensichtlich fehlerhaft. Somit muss die zelluläre Dosis oder effektive Dosis bestimmt werden, um quantitative Aussagen zur Partikeltoxikologie treffen zu können.

3.4.7 Quantifizierung der zellulären Dosis von verschieden großen FITC-SiO₂-Partikeln mittels Fluoreszenzspektrometrie

Zur Bestimmung der zellulären Dosis an FITC-SiO₂-Partikeln wurden RAW264.7-Zellen im 96-well Maßstab mit verschiedenen Konzentrationen an FITC-SiO₂-Partikeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mit einem Lysepuffer behandelt. Die Fluoreszenz der FITC-SiO₂-Partikel in den Zelllysaten wurde mit einem Mikroplatten-Fluoreszenzspektrometer quantifiziert (Abb. 28).

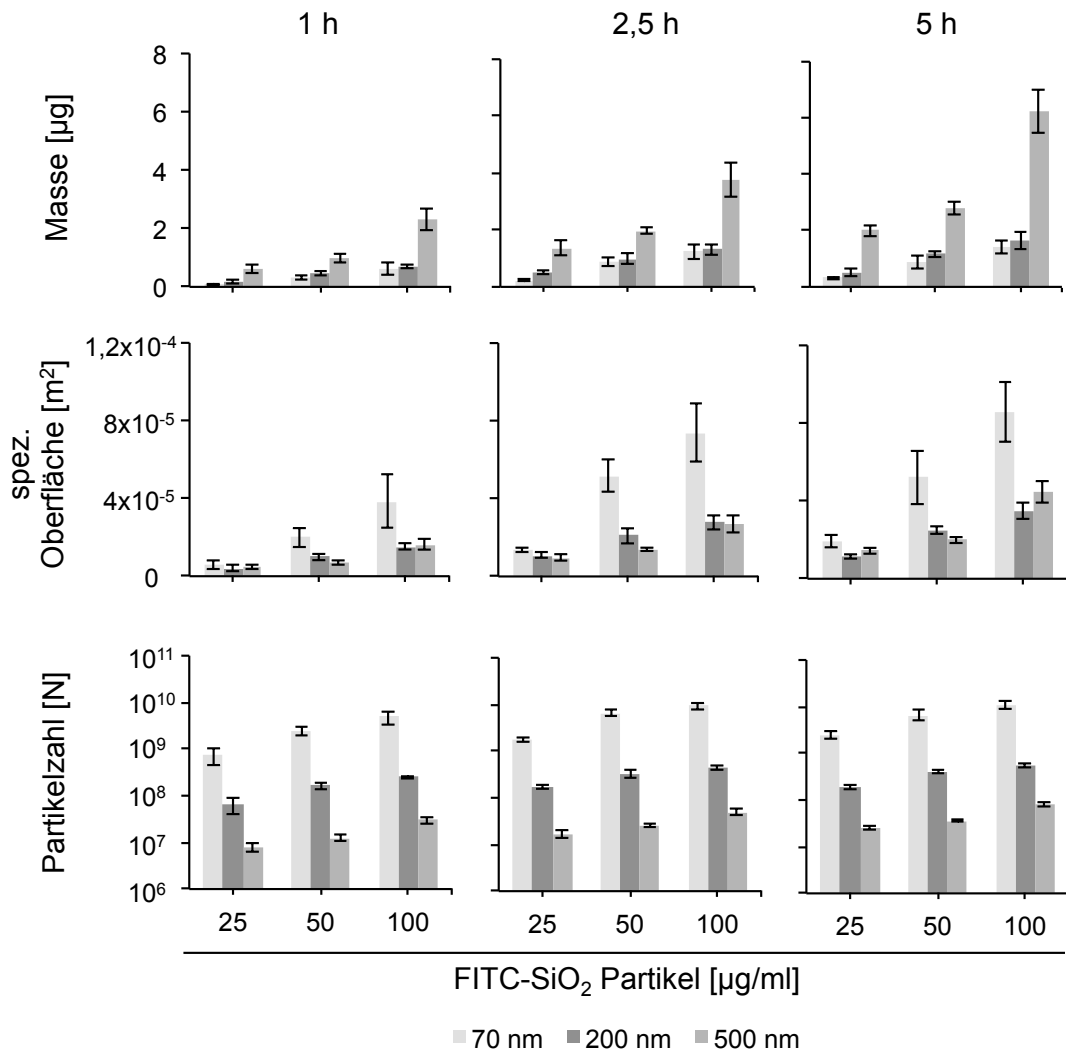


Abbildung 28: Quantifizierung der zellulären Masse, Oberfläche und Partikelzahl von verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen nach 1, 2,5 und 5 h mittels Fluoreszenzspektrometrie. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit verschiedenen Konzentrationen an FITC-SiO₂-Partikeln in 100 µl DMEM mit FCS für 1, 2,5 und 5 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen 2x mit DPBS^{-/-} gewaschen und mit 200 µl Lysepuffer (0,5 % Triton X-100, 0,2 M NaOH) auf 4°C für 30 min behandelt. Parallel wurden definierte Mengen an FITC-SiO₂-Partikel zusammen mit jeweils 10.000 Zellen lysiert und somit eine Fluoreszenzgerade (Anregung: 485/10 nm, Emission: 530/13 nm) erstellt und dadurch die absoluten Massen an FITC-SiO₂-Partikeln in der zellulären Fraktion bestimmt. Aus der Masse wurden dann die Oberfläche und Partikelzahl berechnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=2), wobei der Mittelwert aus 4 Messwerten (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt wird.

Da mit der Fluoreszenzspektrometrie nicht unterschieden wird, ob die Partikel intrazellulär oder auf der Zelle lokalisiert sind, wird im Folgenden die gemessene Dosis als „zellulär“ bezeichnet. Die zell-assoziierte Masse der verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikel nimmt mit der Zeit, Konzentration aber auch mit der Größe zu. Durch Zunahme der Partikelmasse sedimentieren 500 nm FITC-SiO₂-MP schneller als 200 und 70 nm SiO₂-Partikel, weshalb eine höhere zelluläre Dosis detektiert wird. Nach 5 h sind jedoch nur ein Teil der eingesetzten Partikelmasse mit den Zellen assoziiert. Z.B. sind bei 100 µg/ml, dies entspricht 10 µg SiO₂-

Partikel in 100 µl Medium, nur 60 % der 500 nm SiO₂-MP (ca. 6 µg) bzw. unter 20 % für 200 und 70 nm SiO₂-Partikel (ca. 2 µg) in der zellulären Fraktion zu detektieren. Das heißt, dass die zelluläre Dosis deutlich geringer ist als die Dosis im Expositionsmedium. Durch das Umrechnen der Partikelmasse in die Partikeloberfläche wird jedoch sichtbar, dass 70 nm FITC-SiO₂-NP die größte spezifische Oberfläche in der zellulären Fraktion besitzen. Im Vergleich dazu nehmen die 200 und 500 nm FITC-SiO₂-MP eine geringere Oberfläche in der zellulären Fraktion ein. Bei der Berechnung der Partikelzahl ergibt sich weiterhin, dass die mit den Zellen assoziierte Zahl an 70 nm FITC-SiO₂-NP deutlich größer ist als die der 200 und 500 nm FITC-SiO₂-MP.

3.4.8 Quantifizierung der zellulären Dosis von verschieden großen FITC-SiO₂-Partikeln mittels automatisierter Hochdurchsatzmikroskopie

Die fluoreszenzspektrometrische Methode erlaubt die Bestimmung von absoluten Werten in der zellulären Fraktion anhand einer Eichgerade. Jedoch ist diese Methode destruktiv und es kann keine Aussage über die Lokalisation der Partikel in oder an Zellen oder gar neben Zellen gemacht werden. Außerdem könnte die Fluoreszenz heterogen verteilt sein, d.h. einzelne Zellen haben mehr, andere Zellen haben weniger FITC-SiO₂-Partikel aufgenommen. Da das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie zur Detektion der Toxizität von Nanopartikeln auf Einzelzellebene ist, sollte auch die zellassozierte Dosis auf Einzelzellebene mittels Mikroskopie etabliert werden. Um dies zu erreichen, müssen zunächst die Zellgrenzen in der Fluoreszenzmikroskopie detektierbar sein. Hierfür wurde die Plasmamembran nach einer Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd mit dem rotfluoreszierenden Membranmarker TMR-WGA (Tetramethylrhodamin-Weizenkeim-Agglutinin) markiert und der Zellkern mit dem DNA-Farbstoff DAPI gefärbt. Die Quantifizierung der zellulären Partikeldosis erfolgte indirekt über die Detektion der FITC-Fluoreszenz und wurde mit Hilfe der Scan^R Analysis Software durchgeführt (Abb. 29).

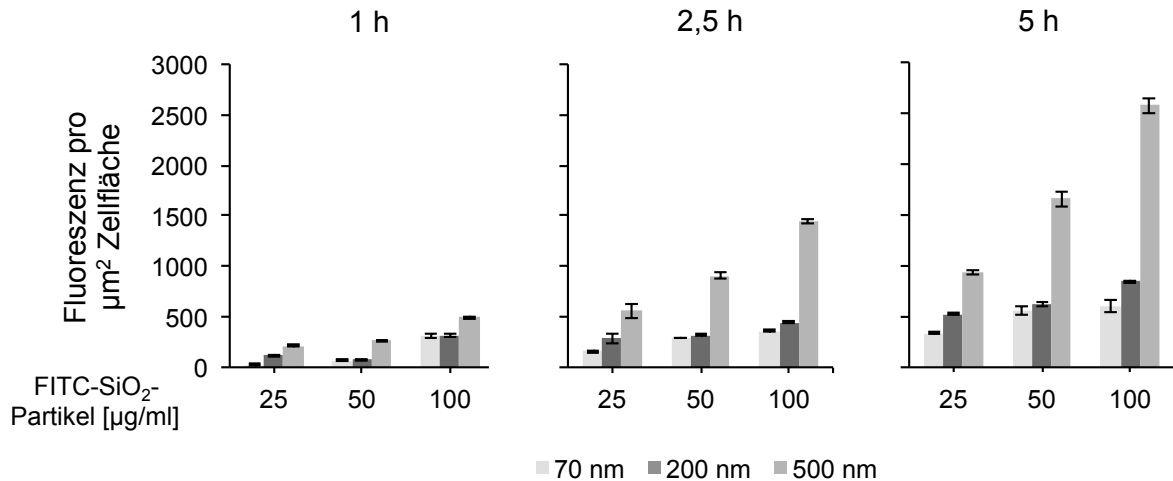


Abbildung 29: Quantifizierung der zell-assoziierten relativen FITC-Intensität nach Behandlung von RAW264.7-Zellen mit verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln nach 1, 2,5 und 5 h mittels Hochdurchsatzmikroskopie. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit verschiedenen Konzentrationen an FITC-SiO₂-Partikeln in 100 µl DMEM mit FCS für 1, 2,5 und 5 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 4 % PFA für 10 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS⁻ gewaschen, danach mit 1 µg/ml TMR-WGA und 800 nM DAPI gefärbt und zweimal mit DPBS⁻ gewaschen. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, DAPI- und TMR-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellmembranen um Zellkerne mittels Olympus Scan^R Analysis Software erkannt. Die gemessene zelluläre Fluoreszenz der FITC-SiO₂-Partikel wird auf die Zellfläche normiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=3), wobei Mittelwerte der FITC-Fluoreszenzen aus vier 4 Parallelproben (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind.

Die Fluoreszenzintensität steigt mit zunehmender Konzentration und Inkubationszeit für alle FITC-SiO₂-Partikel. Wie zuvor mit Hilfe der Fluoreszenzspektrometrie gezeigt, wird eine höhere Fluoreszenzintensität nach der Exposition mit 500 nm FITC-SiO₂-MP gemessen, als für 200 nm und 70 nm FITC-SiO₂-Partikeln. Somit entspricht die relative Quantifizierung der zellulären Partikeldosis mittels automatisierter Hochdurchsatzmikroskopie sehr gut den durch die Fluoreszenzspektroskopie gewonnenen absoluten Werten. In Zukunft ist somit die Bestimmung der zellulären Dosis parallel zur Effektmessung auf Einzelzellebene möglich.

3.4.9 Korrelation der Zytotoxizität und zellulärer Dosis von verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen

Da nach 24 h der Großteil der Zellen geschädigt bzw. nekrotisch ist, kann zu diesem Zeitpunkt keine verlässliche zelluläre Dosis mehr bestimmt werden. Um die Dosis-Wirkungs-Beziehung zu ermitteln, wurde deshalb die zelluläre Dosis nach 5 h (Abb. 28) verwendet und mit der Zytotoxizität nach 24 h korreliert (Abb. 21).

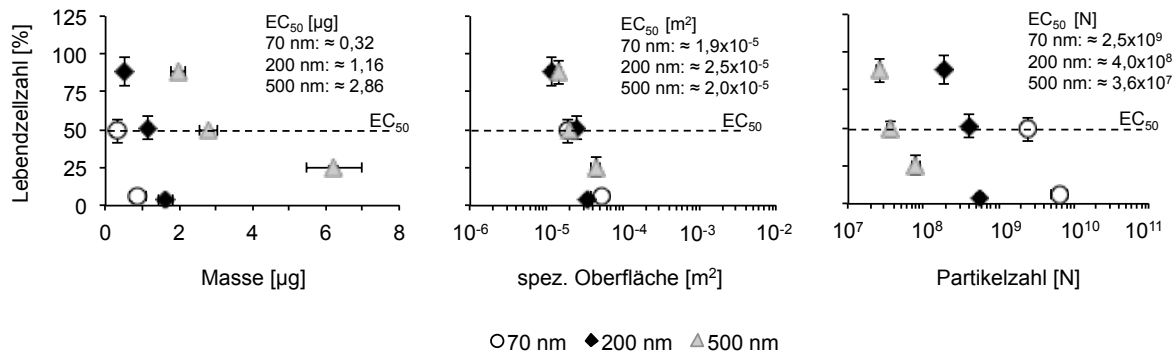


Abbildung 30: Oberflächenabhängige Reduktion der Lebendzellzahl von RAW264.7-Zellen nach Exposition mit FITC-SiO₂-Partikel. Die aus Abb. 24 bestimmte Lebendzellzahl wird über die zelluläre Dosis (5 h, Abb. 28) an FITC-SiO₂-Partikel aufgetragen. Dargestellt ist der Mittelwert der Lebendzellzahl aus vier Messwerten (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung in y-Richtung, Standardabweichung in x-Richtung entspricht der Standardabweichung der FITC-Fluoreszenz.

Die Reduktion der Lebendzellzahl in Abhängigkeit von der zellulären Partikelmasse zeigt, dass 70 nm FITC-SiO₂-NP eine geringere EC₅₀ (0,32 μg pro 10.000 Zellen) besitzen und damit toxischer sind als 200 und 500 nm FITC-SiO₂-MP (EC₅₀ für 200 nm: 1,16 μg pro 10.000 Zellen bzw. für 500 nm: 2,86 μg pro 10.000 Zellen). Die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Lebendzellzahl und der Oberfläche zeigt jedoch keine Unterschiede in den EC₅₀-Werten nach Exposition mit 70 nm (1,9 x 10⁻⁵ m² pro 10.000 Zellen), 200 nm (2,5 x 10⁻⁵ m²/10.000 Zellen) und 500 nm (2,0 x 10⁻⁵ m² pro 10.000 Zellen) FITC-SiO₂-Partikeln. Dies entspricht früheren toxikologischen Studien, die zeigen, dass die Toxizität *in vivo* und *in vitro* von der Oberfläche von Nanoobjekten abhängig ist (Oberdörster et al., 2005b; Waters et al., 2008).

Wird die Toxizität auf die zell-assoziierte Partikelzahl korreliert, ist die EC₅₀ für 500 nm (3,6 x 10⁷ Partikel pro 10.000 Zellen) aufgrund ihrer größeren Oberfläche deutlich geringer als die für die 200 und 70 nm FITC-SiO₂-Partikel ermittelte EC₅₀ (200 nm: 4,0 x 10⁸ Partikel pro 10.000 Zellen bzw. 70 nm: 2,5 x 10⁹ Partikel pro 10.000 Zellen). Der Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen unter Verwendung der Partikeldosis im Expositionsmedium, wie bei den meisten Studien verwendet, und der zellulären Dosis zeigt, dass deutlich geringere Mengen an SiO₂-Partikeln ausreichen, um die Toxizität in RAW264.7-Zellen auszulösen (Tab. 8). Unter Bezug auf die Partikelzahl im Expositionsmedium werden pro 500 nm SiO₂-MP 27-mal mehr 200 nm und 300-mal mehr 70 nm SiO₂-Partikel gebraucht um den gleichen EC₅₀-Wert zu erhalten (Abb. 27 rechts). Das heißt, dass kleine SiO₂-Partikel scheinbar viel weniger toxisch sind als große SiO₂-Partikel. Da größere Partikel jedoch sedimentieren, ist die zelluläre Dosis größer, d.h. nach der Normierung wird der Unterschied

zwischen großen und kleinen SiO₂-Partikeln geringer, wobei pro 500 nm SiO₂-MP nur noch 10-mal mehr 200 nm und 70-mal mehr 70 nm SiO₂-Partikel gebraucht werden, um den gleichen EC₅₀-Wert zu erhalten (Abb. 30 rechts). Des Weiteren assoziiert lediglich ein Teil der SiO₂-Partikel mit Zellen (siehe oben 3.4.7), wodurch die relative Toxizität pro Partikel größer bzw. die EC₅₀-Werte für die zelluläre Dosis im Vergleich zur Dosis im Expositionsmedium geringer ist.

Tabelle 8: Vergleich der EC₅₀-Werte bezogen auf 10.000 Zellen für verschieden große FITC-SiO₂-Partikel

FITC-SiO ₂ -Partikel [nm]	Dosis im Expositionsmedium			zelluläre Dosis		
	Masse [µg]	Oberfläche [m ²]	Partikel	Masse [µg]	Oberfläche [m ²]	Partikel
70	2,5	15,0 x 10 ⁻⁵	1,9 x 10 ¹⁰	0,32	1,9 x 10 ⁻⁵	2,5 x 10 ⁹
200	5	10,7 x 10 ⁻⁵	1,7 x 10 ⁹	1,16	2,5 x 10 ⁻⁵	4,0 x 10 ⁸
500	5	3,6 x 10 ⁻⁵	6,4 x 10 ⁷	2,86	2,0 x 10 ⁻⁵	3,6 x 10 ⁷

Da, wie oben gezeigt, die Oberfläche entscheidend für die Toxizität von SiO₂-Partikeln ist, wird im Folgenden untersucht, wie chemische Oberflächenmodifikationen die Toxizität beeinflussen. Hierfür werden 70 nm FITC-SiO₂-NP untersucht, deren Oberflächen vom Hersteller über einen Linker mit Carboxyl- bzw. Aminogruppen (FITC-SiO₂-NP-COOH, FITC-SiO₂-NP-NH₂) funktionalisiert wurden. Die physikochemische Untersuchung zeigt, dass der mittlere Durchmesser der funktionalisierten und nicht-modifizierten FITC-SiO₂-NP im TEM und DLS (Tabelle 2) vergleichbar ist. Wie zu erwarten, ist das Zeta-Potential der FITC-SiO₂-NP-NH₂ weniger negativ bzw. FITC-SiO₂-NP-COOH mehr negativ als das der nicht-modifizierten FITC-SiO₂-NP (Tabelle 7).

3.4.10 Untersuchung der Toxizität von oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen.

Um die Toxizität der FITC-SiO₂-NP-NH₂ und FITC-SiO₂-NP-COOH in RAW264.7-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst die Freisetzung der LDH, die WST-1 Reduktion und die Lebendzellzahl bestimmt und mit der Toxizität von FITC-SiO₂-NP verglichen (Abb. 31 und 32).

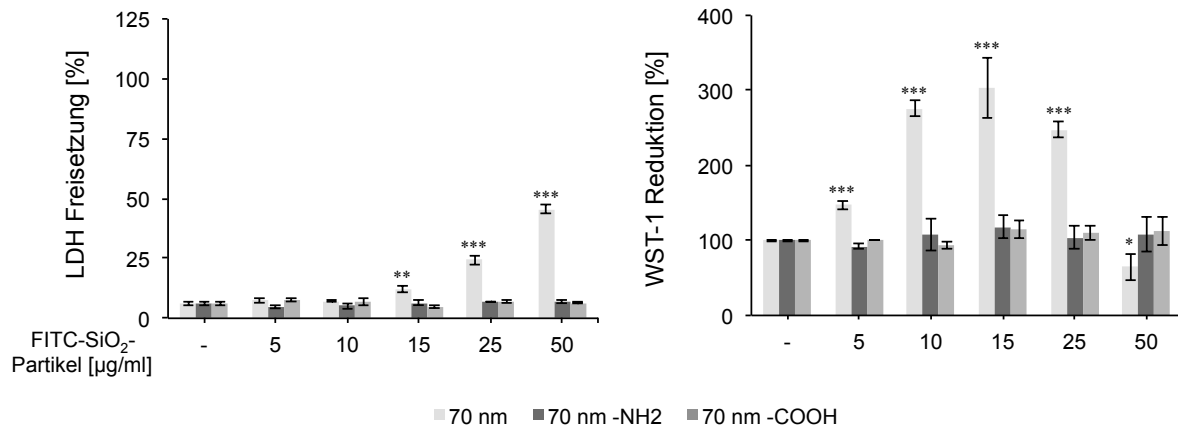


Abbildung 31: Oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP verursachen keine Toxizität in RAW264.7-Zellen. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen der verschiedenen großen SiO₂-Partikel in 100 µl DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 50 µl des Überstands für die Analyse verwendet. Als Positivkontrolle werden unbehandelte Zellen mit 1 % Triton X-100 lysiert, um die maximale Freisetzung der Laktatdehydrogenase zu erhalten. Danach wird der Überstand mit Nanopartikeln abgesaugt und die Zellen mit 200 µl WST-1 in HBSS für bis zu 2 h inkubiert. Die Absorption des Überstands (150 µl) wird bei 450 nm gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=2), wobei die Mittelwerte der relativen Werte aus 3 Parallelproben (n=3) mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt werden. * p < 0,05 , ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Im Vergleich zu nicht-modifizierten Partikeln induzieren die oberflächenmodifizierten Partikel weder eine Freisetzung der Laktatdehydrogenase ins Medium, noch eine Erhöhung der WST-1 Reduktion.

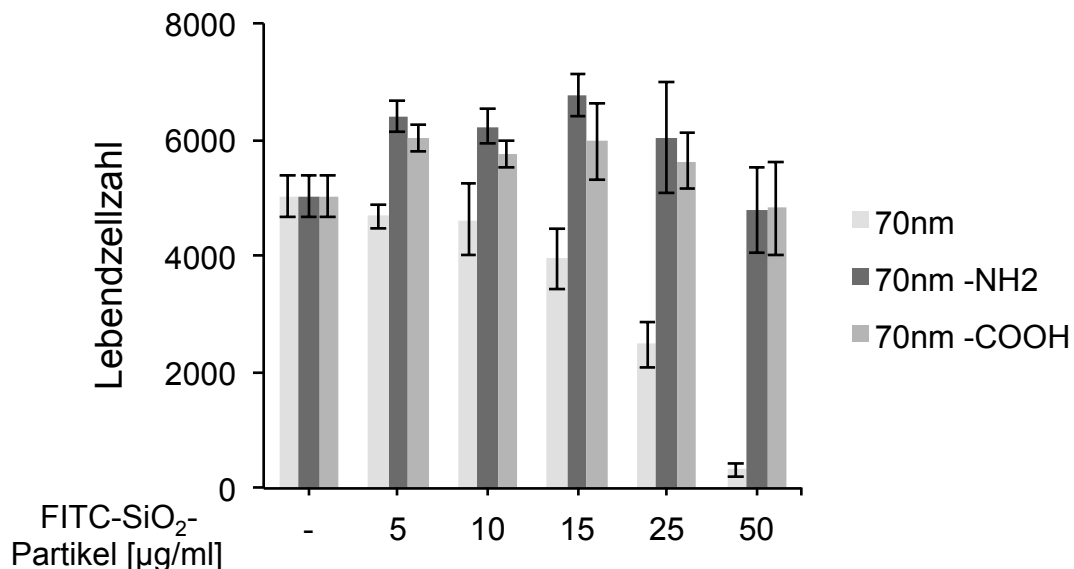


Abbildung 32: Oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP verursachen keine Reduktion der Zellzahl in RAW264.7-Zellen. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit steigenden Konzentrationen verschieden modifizierter FITC-SiO₂-Partikel in 100 µl DMEM mit FCS für 24 h inkubiert. Für die AHM wurden die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 µl DMEM mit FCS für 30 min angefärbt. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=3),

wobei Mittelwerte aus vier 4 Parallelproben (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind.

Die Behandlung mit oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP verringert im Vergleich zu nicht-modifizierten FITC-SiO₂-NP die Lebendzellzahl nicht. Die chemische Funktionalisierung unterbindet die toxische Wirkung der SiO₂-Partikel.

Da für unterschiedlich große FITC-SiO₂-NP verschiedene zelluläre Dosen zu beobachten waren (Abb. 28), wurde untersucht, ob die ausbleibende Toxizität der oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP durch eine verminderte zelluläre Dosis erklärt werden kann. Hierfür wurde wie unter 3.4.8 beschrieben die zelluläre Dosis nach Exposition von RAW264.7-Zellen mit nicht-modifizierten und oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP nach 5 h mittels Fluoreszenzspektrometrie und AHM bestimmt (Abb. 33)

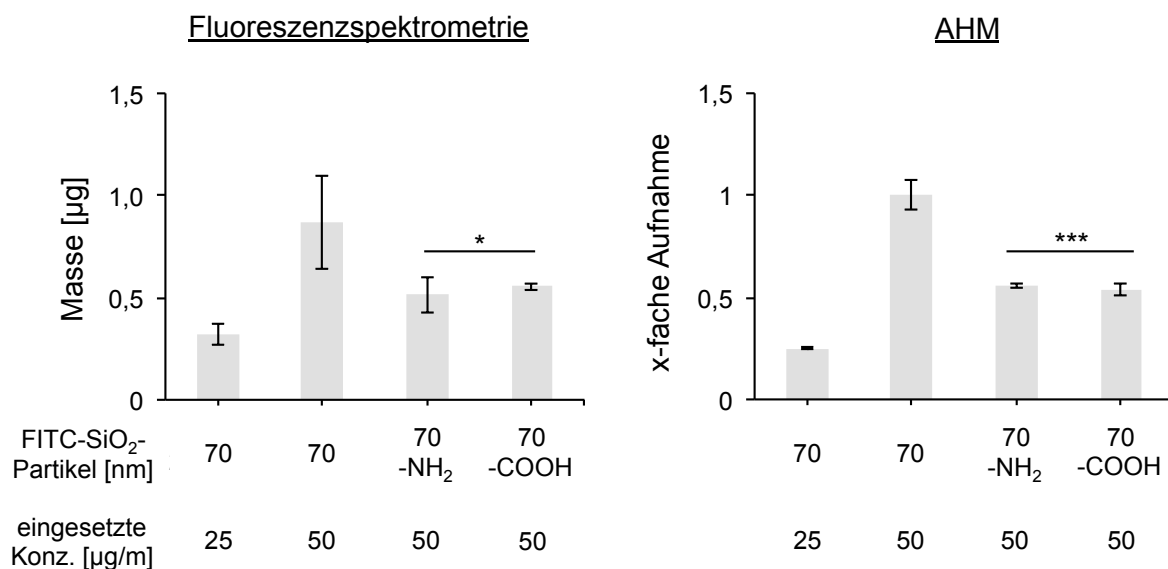


Abbildung 33: Quantifizierung der Aufnahme von oberflächenmodifizierten und nicht-modifizierten FITC-SiO₂-NP mittels Fluoreszenzspektrometrie und automatisierter Hochdurchsatzmikroskopie. 10.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten (A=0,32 cm²) mit verschiedenen Konzentrationen an FITC-SiO₂-Partikeln in 100 µl DMEM mit FCS für 5 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden für die Fluoreszenzspektrometrie die Zellen 2x mit DPBS/-gewaschen und mit 200 µl Lysepuffer (0,5 % Triton X-100, 0,2 M NaOH) auf 4°C für 30 min behandelt. Parallel wurden definierte Mengen an FITC-SiO₂-NP zusammen mit jeweils 10.000 Zellen lysiert und eine Fluoreszenzgerade (Anregung: 485/10 nm, Emission: 530/13 nm) erstellt und die absoluten Massen an FITC-SiO₂-Partikel in der zellulären Fraktion bestimmt. Die aufgenommene Masse an nicht-modifizierten FITC-SiO₂-Partikeln wurde auf 1 normiert und die relativen Mengen für die oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-Partikel angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment (aus n=2), wobei der Mittelwert aus 4 Messwerten (n=4) mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt wird. Für die AHM wurden nach der Inkubation die Zellen mit 4 % PFA für 10 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS⁻ gewaschen, mit 1 µg/ml TMR-WGA und 800 nM DAPI gefärbt und zweimal mit DPBS⁻ gewaschen. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, DAPI- und TMR-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellmembranen um Zellkerne mittels Olympus Scan^R Analysis Software erkannt. Die gemessene zelluläre Fluoreszenz der FITC-SiO₂-Partikel wird auf die Zellfläche normiert. Um die Unterschiede der Fluoreszenzintensität der FITC-SiO₂-NP auszugleichen, wurden die absolute

Fluoreszenz durch die Fluoreszenzgerade (siehe Appendix) angepasst. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (aus $n=3$), wobei Mittelwerte der FITC-Fluoreszenzen aus vier 4 Parallelproben ($n=4$) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Quantifizierungen zeigen, dass bei gleichen Konzentrationen an SiO₂-NP (50 µg/ml) ca. 50 % weniger oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP als nicht-modifizierte FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen aufgenommen werden. Da in Abb. 27 gezeigt wurde, dass die EC₅₀ von nicht-modifizierten FITC-SiO₂-NP 25 µg/ml ist und für oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP bis 50 µg/ml keine Reduktion der Zellzahl beobachtet wurde, kann die reduzierte Toxizität nicht nur durch die geringeren intrazellulären Mengen erklärt werden.

In wie weit die Größe bzw. die chemische Modifikation die Aufnahme in Zellen bzw. Lokalisation verändert und dadurch Unterschiede in der Toxizität erklärt werden können, wurde im Folgenden untersucht. Zusätzlich wurde die Größenabhängigkeit hinsichtlich der Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO₂-Partikeln betrachtet. Hierfür wurde die Fluoreszenzmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzt. Außerdem wurde der Einfluss der Proteincorona auf die Aufnahme bzw. Aufnahmewege analysiert.

3.5 Charakterisierung der Aufnahme und Lokalisation von verschiedenen großen und oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen

3.5.1 Untersuchungen zur Aufnahme und Lokalisation von verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen in Abhängigkeit von Serumproteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um die aufwendige Präparation der Elektronenmikroskopie zu umgehen und eine schnellere Auswertung der Aufnahmestudien zu erreichen, wurden die Zellen nach der Exposition mit FITC-SiO₂-Partikeln fixiert und im Epifluoreszenzmikroskop untersucht. Da Partikel mit Serumproteinen interagieren können (Cedervall et al., 2007; Lynch und Dawson, 2008; Ruh et al., 2012) und dadurch auch die Interaktion mit Zellen beeinflusst wird (Clift et al., 2008; Kittler et al., 2009; Lesniak et al., 2010; Panas et al., 2012; Shi et al., 2012), wurde der Einfluss von Proteinen im Medium auf die Aufnahme von FITC-SiO₂-Partikeln untersucht (Abb. 34).

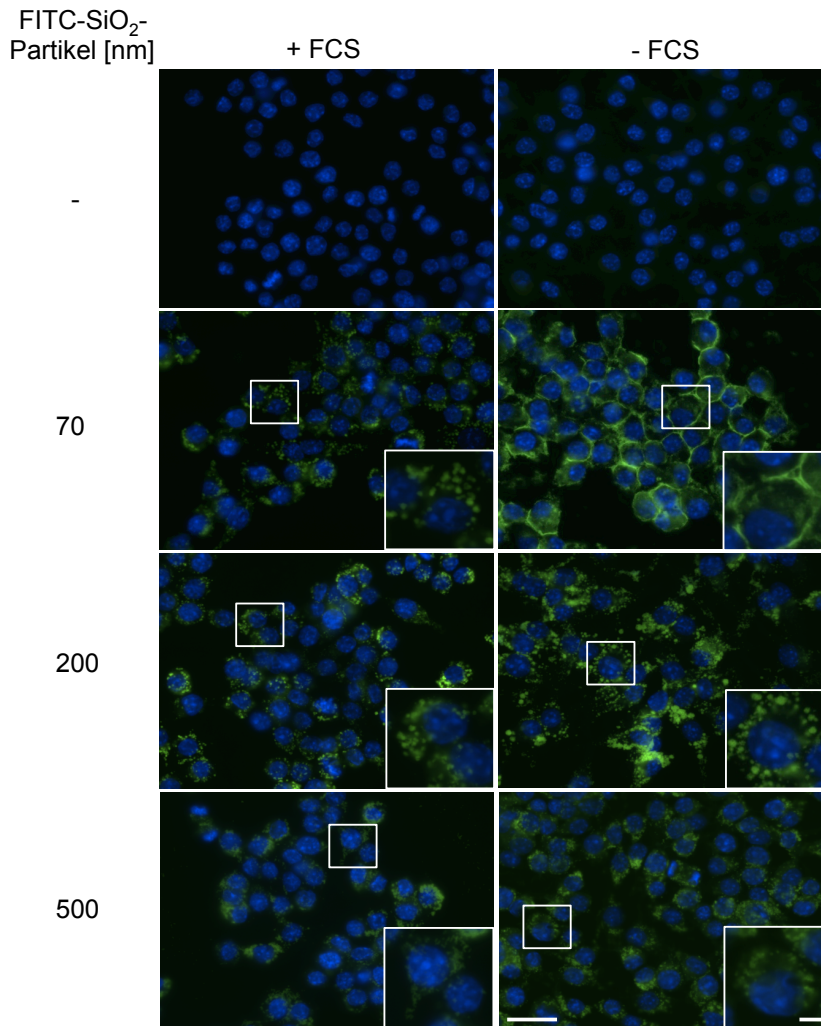


Abbildung 34: Nachweis der serumabhängigen Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen mittels Epifluoreszenzmikroskopie. 500.000 RAW264.7-Zellen wurden in 24-well Platten (A=2,0 cm²) auf Deckgläsern mit 50 µg/ml der verschieden großen FITC-SiO₂-Partikel in 625 µl DMEM mit und ohne FCS für 5 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden der Überstand abgenommen und die Zellen in 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert, danach zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen und die Zellkerne mit 800 nM DAPI/DPBS^{-/-} 10 min bei 37°C gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen, mit Immu-Mount® auf einen Objektträger eingebettet und an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM-IRE, 63x Objektiv, Öl) untersucht. Maßstab: 20 µm, Maßstab in der Vergrößerung: 5 µm

Das Fluoreszenzsignal der drei verschieden großen FITC-SiO₂-Partikel akkumuliert in sphärischen Strukturen um den Zellkern, die einen Durchmesser zwischen 500 nm bis 2 µm haben. Einzelne 70 nm und 200 nm SiO₂-Partikel sind mit dieser Methode nicht zu detektieren, wohingegen einzelne 500 nm FITC-SiO₂-MP noch zu erkennen sind. Ob diese Akkumulate intra- oder extrazellulär sind, wurde mit Hilfe der hochauflösenden TEM untersucht (Abb. 35).

In serumfreiem Medium sind 70 nm FITC-SiO₂-NP als wabenförmige Struktur um den Zellkern angeordnet, wahrscheinlich im Bereich der Zellmembran. 200 und 500 nm FITC-SiO₂-MP reichern sich auch ohne Serum in vergleichbaren sphärischen Strukturen, wie unter Serumbedingungen, an. Größere SiO₂-MP werden im Vergleich zu kleineren FITC-SiO₂-NP unabhängig vom Serum in RAW264.7-Zellen aufgenommen. Während in allen bisherigen Experimenten zur Toxizität kein Unterschied im Verhalten von Nanopartikeln im Vergleich zu Mikropartikeln gezeigt werden konnte und die toxischen Effekte mit der spezifischen Oberfläche korrelierten ist die Serumabhängigkeit der Aufnahme für Nanopartikel ein erster nanospezifischer Effekt der für Mikropartikel nicht zu beobachten ist. Bisher gibt es nur wenige Beispiele, die zeigen, dass sich Nanopartikel qualitativ anders verhalten als Mikropartikel. Oberdörster und Kollegen haben z.B. gezeigt, dass radioaktiv-markierte ultrafeine Partikel (UFP, <100 nm) nach Inhalation im Gehirn von Ratten detektiert wurden, wobei UFP nach der Aufnahme in Riechnerven (*Nervi olfactorii*) bis zum Riechkolben (*Bulbus olfactorius*) wandern (Oberdörster et al., 2004).

3.5.2 Untersuchung zur Aufnahme und Lokalisation von verschieden großen FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen in Abhängigkeit von Serumproteinen mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Mit Hilfe der TEM lassen sich subzelluläre Strukturen auflösen, die mit lichtmikroskopischen Methoden nicht sichtbar sind. Für die Untersuchung wurden die Zellen mit 70 nm, 200 nm und 500 nm großen FITC-SiO₂-Partikeln für 5 h in Medium mit und ohne FCS inkubiert (Abb. 35).

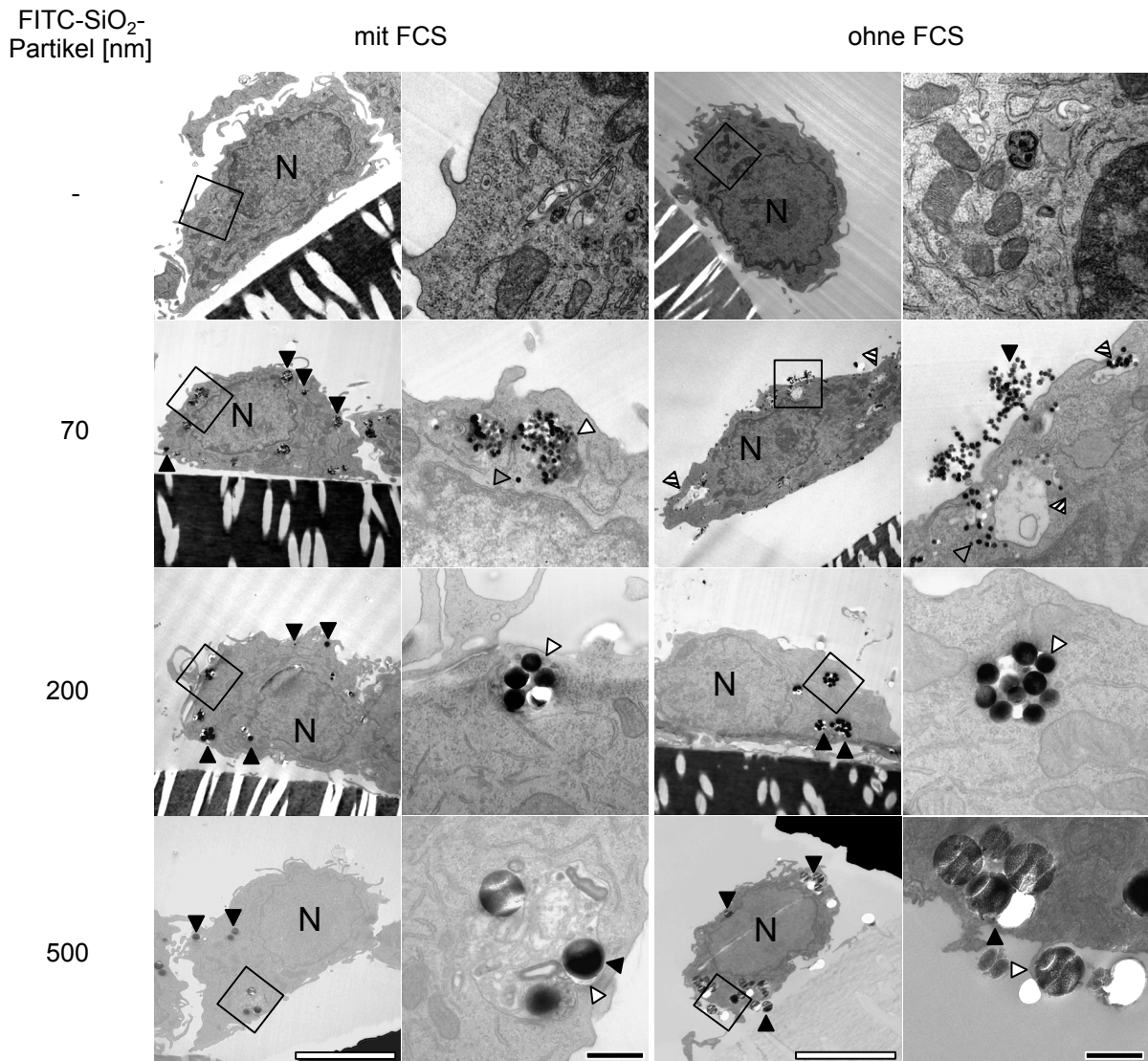


Abbildung 35: Nachweis der serumabhängigen Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie. $1,2 \times 10^6$ RAW264.7-Zellen wurden in 6-well Platten auf Transwell-Einsätzen ($A=4,7 \text{ cm}^2$) mit $50 \mu\text{g/ml}$ der verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikel in $1,47 \text{ ml}$ DMEM mit und ohne FCS für 5 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen wie in *Material und Methoden* beschrieben für die TEM prozessiert und an einem EM 109T bei 80kV analysiert. Schwarzer Pfeil: intrazelluläre Partikel, weißer Pfeil: Membran, grauer Pfeil: membranlose Partikel, schraffierter Pfeil: Autophago(lyso)som, N: Nukleus, weißer Maßstab: $5 \mu\text{m}$, schwarzer Maßstab: 500 nm

Die FITC-SiO₂-Partikel aller drei Größen liegen im Zytosol peripher als auch perinukleär vor. In der höheren Vergrößerung lassen sich 70 nm FITC-SiO₂-NP sowohl einzeln als auch in kleineren Gruppen (2 Partikel) und größeren Akkulaten (\varnothing ca. 500 nm) in membranumschlossenen Kompartimenten finden. Im Vergleich zu den kleineren 70 nm FITC-SiO₂-NP ist eine geringere Zahl an 200 nm und 500 nm FITC-SiO₂-MP intrazellulär zu erkennen, wobei alle in membranumhüllten Vesikeln, hauptsächlich einzeln, eingeschlossen sind. Die Anzahl der Partikel pro Vesikel korreliert invers mit der Größe der Partikel. Da alle Partikel, auch einzelne, membranumschlossen sind, werden diese aktiv durch Endozytose aufgenommen. Des Weiteren sind keine Partikel im Zellkern oder den Mitochondrien

lokalisiert, was von anderen Arbeitsgruppen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie für SiO₂-Partikel in HEp-2 und mittels Transmissionselektronenmikroskopie für ultrafeine Umweltpartikel in RAW264.7-Zellen beobachtet wurde (Chen und von Mikecz, 2005; Li et al., 2003). Darüber hinaus lassen sich einzelne nicht-membranumschlossene 70 nm FITC-SiO₂-NP im Zytosol detektieren, was möglicherweise auf eine erhöhte Permeabilität von Endosomen/Lysosomen (lysosomalen Ruptur) schließen lässt. Dies wurde z.B. für kristalline SiO₂-Partikel beobachtet (Hornung et al., 2008; Thibodeau et al., 2004). Die intrazelluläre Lyse von SiO₂-Partikel wird ebenfalls diskutiert, wobei die Lyse in humanen dermalen Fibroblasten nach längeren Zeitpunkten (Wochen) durch die Messung von gelöstem SiO₂ im Überstand beobachtet wurde (Quignard et al., 2012). Nach 5 h findet offensichtlich keine Lyse der SiO₂-Partikel statt, da die Größe der internalisierten Partikel dem gemessenen Durchmesser im TEM entspricht.

In serumfreiem Medium ist der Großteil der 70 nm FITC-SiO₂-NP auf der Zelloberfläche lokalisiert, wobei diese in größeren Ansammlungen zu finden sind. Dies stimmt mit der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 34) überein und wird durch die DLS-Messung gestützt, die zeigt, dass FITC-SiO₂-NP in serumfreiem Medium agglomerieren, in serumhaltigem Medium hingegen stabile Dispersionen bilden. Es lassen sich daneben kleine Akkumulate in membranumschlossenen Kompartimenten, sowie einzelne Partikel im Zytosol detektieren, wobei Einzelpartikel scheinbar ohne Membranhülle im Zytosol vorliegen, die in der Nähe von Vesikeln liegen. Diese unterscheiden sich von Lysosomen im TEM deutlich durch ihre Doppelmembranstrukturen. Dies ist ein klassischer Marker für Autophagie, die normalerweise in Zellen durch veränderte Umweltbedingungen (Klionsky et al., 2008; Maiuri et al., 2007) oder Infektionen (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*) ausgelöst wird (Gutierrez et al., 2004). Autophagosomen fusionieren später mit Lysosomen zu Autophagolysosomen wobei der Inhalt durch Hydrolasen abgebaut wird. Größere 200 nm und 500 nm FITC-SiO₂-MP zeigen im Vergleich zu Experimenten unter Serumbedingungen keine veränderte Verteilung, d.h. sie akkumulieren intrazellulär in membranumschlossenen Vesikeln.

Wie kann der Befund erklärt werden, dass Nanopartikel ohne Serum als einzelne Nanopartikel in der Zelle lokalisiert sind? Entweder translozieren einzelne NP über passive Diffusion in die Zellen und sind somit nicht membranumschlossen oder sie gelangen sekundär aus Endosomen/Lysosomen ins Zytoplasma. Deshalb wurden frühere Zeitpunkte mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht (Abb. 36).

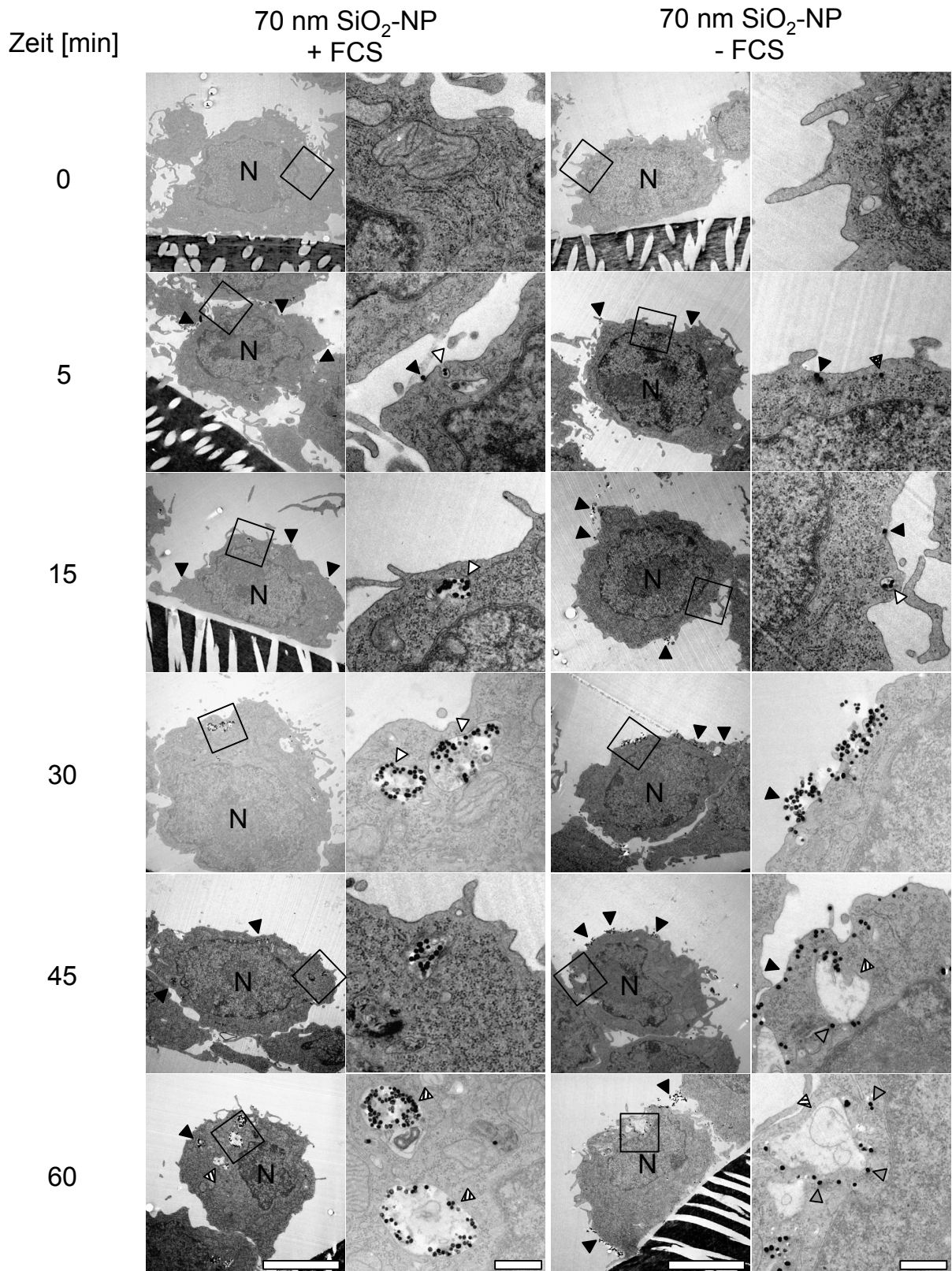


Abbildung 36: Zeit- und serumabhängige Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen. $1,2 \times 10^6$ RAW264.7-Zellen wurden in 6-well Platten auf Transwell-Einsätzen ($A=4,7 \text{ cm}^2$) mit $50 \mu\text{g/ml}$ 70 nm FITC-SiO₂-Partikel in 1,47 ml DMEM mit und ohne FCS für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen wie in *Material und Methoden* beschrieben für die TEM prozessiert und an einem EM 109T bei 80kV analysiert. Schwarzer Pfeil: Partikel, weißer Pfeil: membranumschlossene Partikel, grauer Pfeil: membranlose Partikel, schraffierter Pfeil: Autophago(lyso)som. N: Nukleus, weißer Maßstab: 5 μm , schwarzer Maßstab: 500 nm

Unter Serumbedingungen werden einzelne FITC-SiO₂-NP über Endozytose (5 min, weißer Pfeil) aufgenommen, weitergehend akkumulieren sie über die Zeit intrazellulär in Endosomen oder Lysosomen (weiße Pfeile) und befinden sich nach 60 min in Autophago(lyso)somen (schraffierter Pfeil), aber auch wie nach 5 h einzeln frei im Zytosol (grauer Pfeil), was auf eine Freisetzung der Partikel aus den Endosomen/Lysosomen schließen lässt (lysosomale Ruptur). Im Gegensatz dazu sind in Abwesenheit von Serum hauptsächlich einzelne FITC-SiO₂-NP intrazellulär an der Plasmamembran zu erkennen, wobei keine Membranstruktur um die Partikel sichtbar ist (30 min). Dies lässt auf eine passive Aufnahme der 70 nm FITC-SiO₂-NP in die Zelle schließen. Weitergehend akkumulieren die Partikel nicht in größeren Vesikeln (45 min), sondern liegen frei im Zytosol vor (grauer Pfeil). Ebenfalls lassen sich Autophago(lyso)somen detektieren, wobei die Partikel außerhalb liegen.

Welche Proteine vermitteln die Endozytose von FITC-SiO₂-Partikeln? Serum besteht aus ca. 3.000 Proteinen (Ruh et al., 2012), wobei Albumin (35-50 g/l Serum) und γ -Globuline (13-17 g/l Serum) den Hauptteil des Serums ausmachen. Da bekannt ist, dass diese Proteine häufig mit der Partikeloberfläche interagieren, können diese als Opsonine wirken, die eine rezeptorvermittelte Aufnahme bewirken. Auch Proteine des Komplementsystems können als Opsonine wirken (Dobrovolskaia et al., 2009; Dobrovolskaia und Mcneil, 2007). Deshalb wurde im Folgenden die Aufnahme von FITC-SiO₂-Partikeln in Abhängigkeit von diesen Proteinen untersucht.

3.5.3 Untersuchung zur Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen in Abhängigkeit von spezifischen Serumproteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Für die Untersuchung der Albumin-abhängigen Aufnahme von FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen (Abb. 37) wurde die Menge an bovinem Serumalbumin (BSA) ausgehend von der physiologischen Albuminkonzentration im Serum an die Zellkulturbedingungen (10% FCS) angepasst (5 g BSA/l Medium). Parallel wurden FITC-SiO₂-NP in Medium mit angepassten Konzentrationen an murinen Immunglobulinen der Klasse G inkubiert (1,7 g/l Medium). Um eine spezifische Bindung des Antikörpers über das Fab-Fragment an die Zelle bzw. noch vorhandene Serumproteine auszuschließen, wurde ein Antikörper ausgewählt, der sich gegen das Protein GFP (*green fluorescent protein*) richtet, das weder im Serum noch in Zellen vorkommt (anti-GFP-IgG). Um die Auswirkung von Komplement-Proteinen auf die

Aufnahme zu untersuchen, wurde das fötale Kälberserum für 30 min auf 56°C erhitzt, um das Komplementsystem zu inaktivieren (Moore et al., 2000).

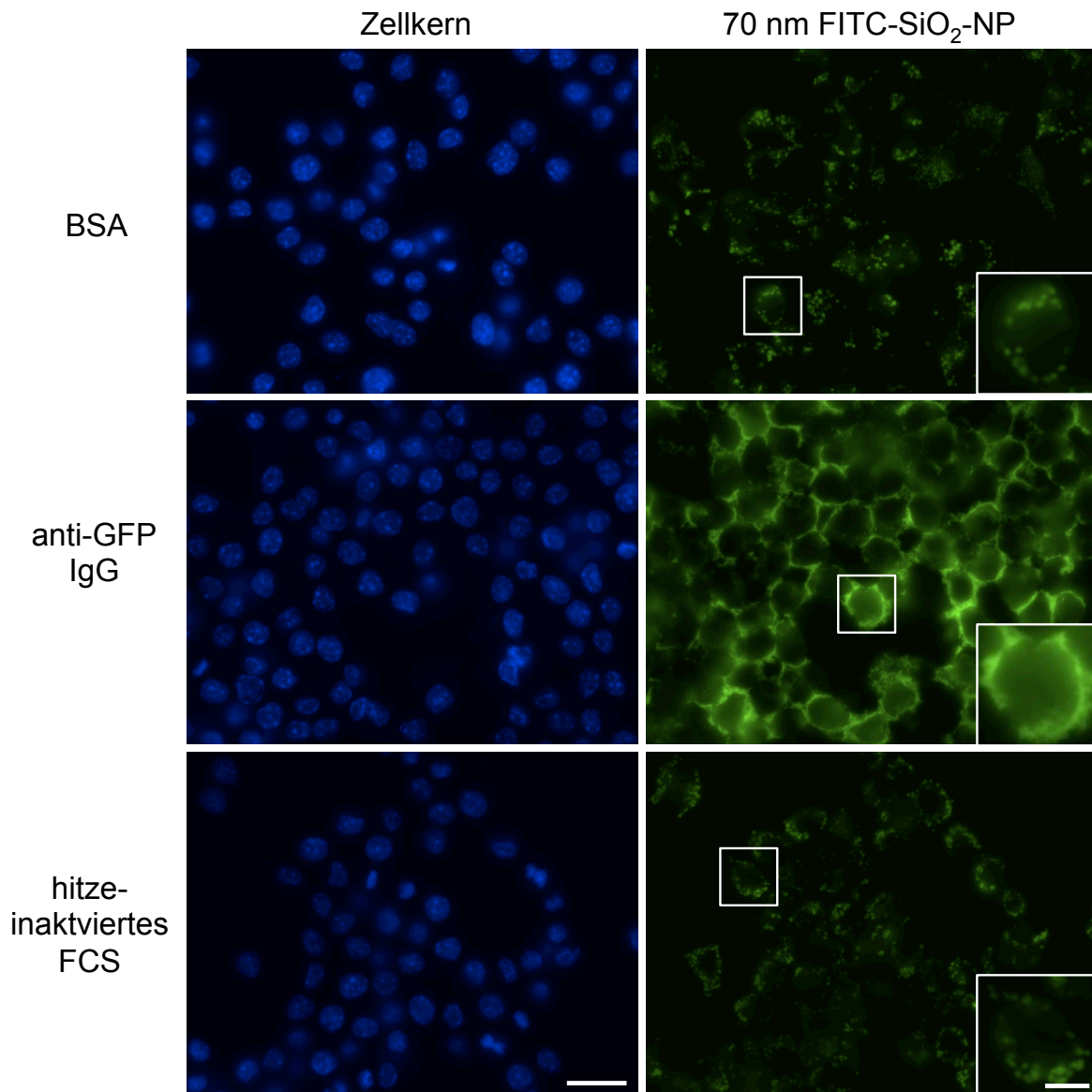


Abbildung 37: Albumin-vermittelte Aufnahme von 70 nm FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen. 500.000 RAW264.7-Zellen wurden in 24-well Platten (A=2,0 cm²) auf Deckgläsern mit 50 µg/ml der verschieden großen FITC-SiO₂-Partikel in 625 µl DMEM mit BSA (5 mg/ml; oben), anti-GFP-IgG (1,7 mg/ml, Mitte) und hitze-inaktiviertem FCS (unten) für 5 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden der Überstand abgenommen und die Zellen in 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert, danach zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen und die Zellkerne mit 800 nM DAPI/DPBS^{-/-} 10 min bei 37°C gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen, mit Immu-Mount® auf einen Objektträger eingebettet und an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM-IRE, 63x Objektiv, Öl) untersucht. Maßstab: 20 µm, Maßstab in der Vergrößerung: 5 µm

Albumin kann die Aufnahme von 70 nm FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen vermitteln. Diese lassen sich im Fluoreszenzmikroskop als sphärische Strukturen (ca. 500 nm bis 2 µm) um den Zellkern detektieren. Die Behandlung mit Immunglobulinen kann hingegen die Aufnahme nicht vermitteln. Die Inaktivierung des Komplementsystems wiederum verhindert nicht die intrazelluläre Akkumulation der Partikel. Die Agglomeration der 70 nm SiO₂-

Partikel in Medium ohne Serum scheint somit nicht der Grund für die ausbleibende Aufnahme zu sein, da in Medium mit BSA trotz vergleichbarer Agglomeration die Partikel (Tab. 6) aufgenommen werden. Somit vermitteln Serumproteine wie Albumin die spezifische Aufnahme der FITC-SiO₂-NP. Mögliche Rezeptoren, die eine Aufnahme von opsonisierten Nanopartikeln vermitteln können, sind die Klasse A Scavenger Rezeptoren (SR-A), die u.a. Albumin und acetyliertes LDL (*low density lipoprotein*) binden können (Kanno et al., 2007; Orr et al., 2010; Zhu et al., 2011). Daher wird als nächstes dieser Aufnahmeweg untersucht (Abb. 38).

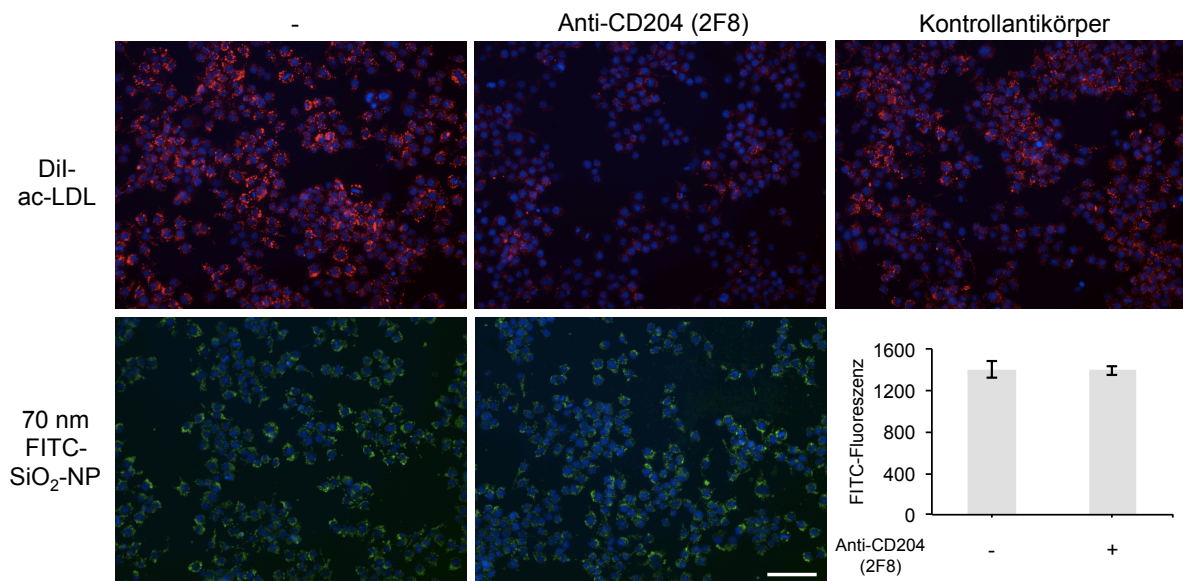


Abbildung 38: Klasse A Scavenger Rezeptoren vermitteln nicht die Aufnahme von FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen. 50.000 RAW264.7-Zellen wurden in 96-well Platten ($A=0,32 \text{ cm}^2$) für 30 min mit 20 $\mu\text{g/ml}$ eines SR-A blockierenden Antikörper (anti-CD204, Klon 2F8) oder eines unspezifischen Kontrollantikörper (LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody) in 50 μl DMEM mit BSA bei 37°C inkubiert. Danach wurden entweder 5 $\mu\text{g/ml}$ fluoreszenzmarkiertes acetyliertes LDL (DiI-acLDL) oder 50 $\mu\text{g/ml}$ 50 nm FITC-SiO₂-NP für 2 h zu den Zellen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit 4 % PFA fixiert und zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen bevor die Zellen mit 800 nM DAPI gefärbt werden. Die Auswertung wurde an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM-IRE, 20x Objektiv, Öl) durchgeführt. Für die Quantifizierung wurde die FITC-Fluoreszenz in vier Bildausschnitten durch die Anzahl der Zellkerne geteilt und die erhaltenen Mittelwerte mit Standardabweichung sind unten rechts dargestellt. Maßstab: 50 μm

Die Präinkubation mit einem blockierenden SR-A-Antikörper verhindert nicht die Aufnahme der 70 nm FITC-SiO₂-NP, wohingegen die Anreicherung von Fluoreszenz-markiertem acetyliertem LDL (DiI-ac-LDL) in den Zellen reduziert wird. Ein Kontrollantikörper bestätigt die Spezifität des Blockierantikörpers. Daher wird eine Beteiligung der SR-A in der Aufnahme von 70 nm FITC-SiO₂-NP ausgeschlossen.

3.5.4 Untersuchung des Aufnahmewegs von FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um zu untersuchen, ob FITC-SiO₂-NP über aktinabhängige Prozesse (Phagozytose/Makropinozytose) in RAW264.7-Zellen aufgenommen werden, wurde der Inhibitor Cytochalasin D (Cyto D) eingesetzt, der die Aktinpolymerisation und damit die Phagozytose/Makropinozytose verhindert (Elliott und Winn, 1986; Geiser et al., 2005).

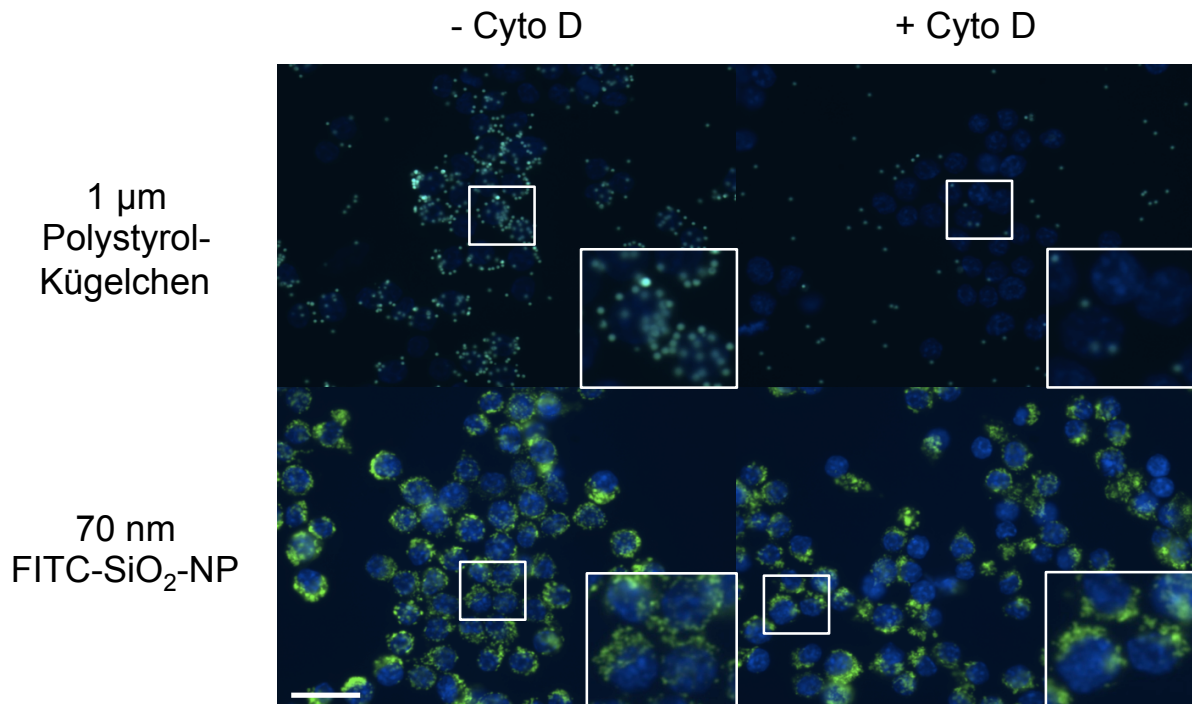


Abbildung 39: FITC-SiO₂-NP werden nicht durch Phagozytose/Makropinozytose in RAW264.7-Zellen aufgenommen. 500.000 RAW264.7-Zellen wurden in 24-well Platten (A=2,0 cm²) auf Deckgläsern mit 2 µM Cytochalasin D für 30 min in 312,5 µl DMEM mit FCS bei 37°C vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit 50 µg/ml 70 nm FITC-SiO₂-NP oder 1 µm großen Polystyrolkügelchen in 625 µl DMEM mit FCS für 5 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden der Überstand abgenommen und die Zellen in 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert, danach zweimal mit DPBS/- gewaschen und die Zellkerne mit 800 nM DAPI/DPBS/- 10 min bei 37°C gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS/- gewaschen, mit Immu-Mount® auf einen Objektträger eingebettet und an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM-IRE, 63x Objektiv, Öl) untersucht. Maßstab: 20 µm

Durch die Präinkubation mit Cytochalasin D wird die Aufnahme von 1 µm Polystyrolkügelchen wie erwartet (Geiser et al., 2005) in RAW264.7-Zellen reduziert, wohingegen Cytochalasin D die Aufnahme von 70 nm FITC-SiO₂-NP nicht verhindert (Abb. 39). Dies lässt darauf schließen, dass keine Aktinzytoskelettlagerung stattfinden muss, damit 70 nm FITC-SiO₂-NP aufgenommen werden können. Daher werden Phagozytose und Makropinozytose als Aufnahmewege ausgeschlossen.

Um zu untersuchen, ob FITC-SiO₂-NP generell aktiv aufgenommen werden, wurden Zellen bei 4°C und 37°C mit 70 nm FITC-SiO₂-NP inkubiert (Abb. 35).

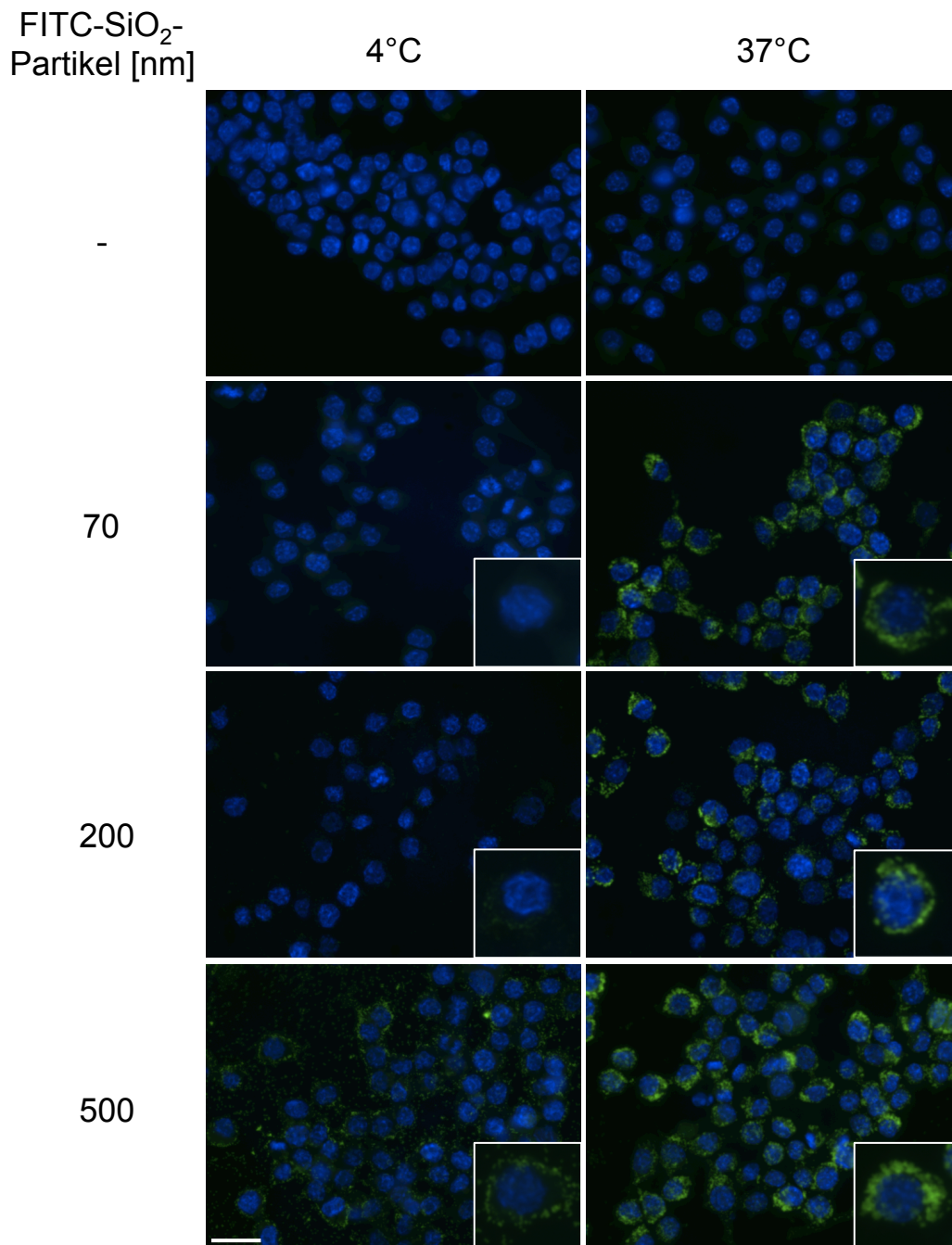


Abbildung 40: Temperaturabhängige Aufnahme von FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen. 500.000 RAW264.7-Zellen wurden in 24-well Platten (A=2,0 cm²) auf Deckgläsern mit 50 µg/ml der verschieden großen FITC-SiO₂-Partikel in 625 µl DMEM mit FCS für 5 h bei 4°C und 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden der Überstand abgenommen und die Zellen in 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert, danach zweimal mit DPBS/- gewaschen und die Zellkerne mit 800 nM DAPI/DPBS/- 10 min bei 37°C gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS/- gewaschen, mit Immu-Mount® auf einen Objektträger eingebettet und an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM-IRE, 63x Objektiv, Öl) untersucht. Maßstab: 20 µm

Die Verringerung der Temperatur von 37°C auf 4°C verhindert die Aufnahme aller drei Partikelgrößen, was sich in der reduzierten Fluoreszenz pro Zelle im Epifluoreszenzmikroskop zeigt (Abb. 40). Damit wurde der aktive Transport der FITC-SiO₂-Partikel in RAW264.7-Zellen gezeigt, der wie mittels der Transmissionselektronenmikroskopiestudien (Abb. 35 und 36) über Endozytose stattfindet, wobei der Clathrin-vermittelte, Caveolin-abhängige oder Clathrin- und Caveolin-unabhängige Aufnahmeweg möglich sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies aber nicht weiter verfolgt.

3.5.5 Untersuchung zur Aufnahme und Lokalisation von oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen in Abhängigkeit von Serumproteinen

Da die Zytotoxizität von SiO₂-NP in RAW264.7 gezeigt werden konnte und oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP-NH₂ und FITC-SiO₂-NP-COOH keine Toxizität aufweisen (Abb. 31 und 32), stellt sich die Frage, ob die Modifikation der Partikel eventuell deren Aufnahme verhindert oder verändert (Abb. 41).

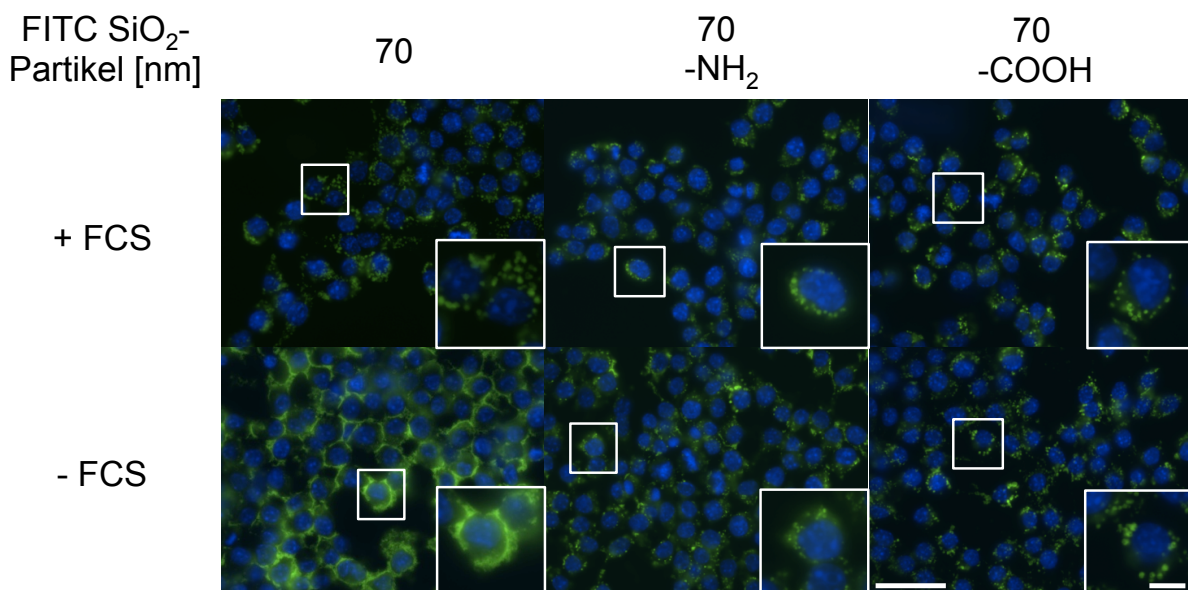


Abbildung 41: Serumunabhängige Aufnahme von oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen 500.000 RAW264.7-Zellen wurden in 24-well Platten (A=2,0 cm²) auf Deckgläsern mit 50 µg/ml der verschiedenen oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP in 625 µl DMEM mit oder ohne FCS für 5 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden der Überstand abgenommen und die Zellen in 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert, danach zweimal mit DPBS⁻ gewaschen und die Zellkerne mit 800 nM DAPI/DPBS⁻ 10 min bei 37°C gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS⁻ gewaschen, mit Immu-Mount® auf einen Objektträger eingebettet und an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM-IRE, 63x Objektiv, Öl) untersucht. Maßstab: 20 µm, Maßstab in der Vergrößerung: 5 µm

Es zeigt sich, dass oberflächenmodifizierte 70 nm FITC-SiO₂-NP im Gegensatz zu nicht-modifizierten 70 nm FITC-SiO₂-NP unabhängig von Serumproteinen in RAW264.7-Zellen aufgenommen werden und um den Zellkern in sphärischen Strukturen akkumulieren. Obwohl auch oberflächenmodifizierte SiO₂-NP in Abwesenheit von Serum Agglomerate bilden (Tab. 6) scheint dies die Aufnahme nicht zu behindern, wie es auch für BSA und nicht-modifizierte SiO₂-NP beobachtet wurde (Abb 37). Somit scheint die Beschaffenheit der Oberfläche entweder mit BSA dekorierten SiO₂-NP oder die chemische Modifikation durch Amino- oder Carboxylgruppen viel entscheidender für Aufnahme zu sein.

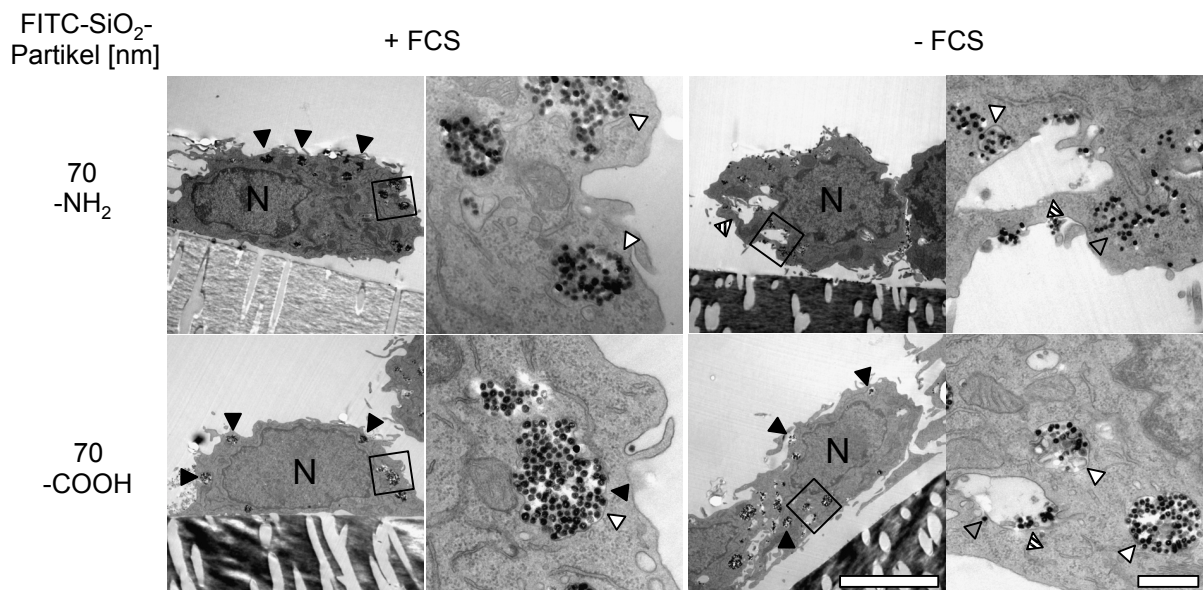


Abbildung 42: Nachweis der serumunabhängigen Aufnahme und Lokalisation von oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen im Transmissionselektronenmikroskop. $1,2 \times 10^6$ RAW264.7-Zellen wurden in 6-well Platten auf Transwell-Einsätze ($A=4,7 \text{ cm}^2$) mit 50 mg/ml oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-Partikeln in 1,47 ml DMEM mit oder ohne FCS für 5 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen wie in *Material und Methoden* beschrieben für die TEM prozessiert und an einem EM 109T bei 80kV analysiert. Schwarzer Pfeil: Partikel, weißer Pfeil: membranumschlossene Partikel, grauer Pfeil: membranlose Partikel, schraffierter Pfeil: Autophago(lyso)som. N: Nukleus, Weißer Maßstab: 5 µm, schwarzer Maßstab: 500 nm

Auch mit der Transmissionselektronenmikroskopie zeigt sich, dass oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP unabhängig von Serumproteinen in RAW264.7-Zellen aufgenommen werden, wobei unter Serumbedingungen FITC-SiO₂-NP-NH₂ und FITC-SiO₂-NP-COOH in membranumschlossenen Akkumulaten zu finden sind und nicht als einzelne Partikel im Zytosol erscheinen (Abb. 42). Somit könnte die lysosomale Ruptur durch SiO₂-NP erkennbar an der Freisetzung einzelner Partikel die Toxizität erklären, die für oberflächenmodifizierten SiO₂-NP nicht zu beobachten ist. Unter serumfreien Bedingungen lassen sich für beide oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP zusätzlich auch einzelne Partikel finden, die frei im Zytosol vorliegen, daneben auch Autophagosome oder Autophagolysosome. Jedoch scheint

für Amino-modifizierte SiO₂-NP das Auftreten einzelner, nicht-membranumschlossener Partikel stärker ausgeprägt als für Carboxy-modifizierte SiO₂-NP zu sein. Dies ähnelt eher dem Muster der nicht-modifizierten SiO₂-NP (Abb. 35). Außerdem treten wie schon für nicht-modifizierte SiO₂-NP beschrieben (Abb. 36) speziell in Abwesenheit von Serum Autophago(lyso)some nach Behandlung mit oberflächenmodifizierten SiO₂-NP auf.

In der Literatur wird die Bindung von Proteinen an die Partikeloberfläche als Proteinkorona beschrieben, die die Interaktion von Partikeln und Zelle verändern kann (Clift et al., 2008; Kittler et al., 2009; Lesniak et al., 2010; Panas et al., 2012). Um die Frage zu beantworten, ob Serumproteine und Albumin an die Oberfläche von FITC-SiO₂-Partikel binden, wurden diese in Serumproteinen oder BSA inkubiert und durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte aufgereinigt.

3.5.6 Quantifizierung der gebundenen Menge von Serumproteinen sowie BSA an die Oberfläche von unterschiedlich großen FITC-SiO₂-Partikeln

Mit Hilfe des BCA-Tests lässt sich u.a. die an die Oberfläche von Nanopartikeln adsorbierte Proteinmenge photometrisch bestimmen (Smith et al., 1985). Er beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Kupfer(II)-Ionen durch die Peptidbindung der Proteine zu Kupfer(I)-Ionen quantitativ reduziert werden. Danach komplexiert ein Kupfer(I)-Ion mit zwei Bicinchoninsäure-Molekülen zu einem violetten Farbstoff, der bei 562 nm absorbiert (Abb.43).

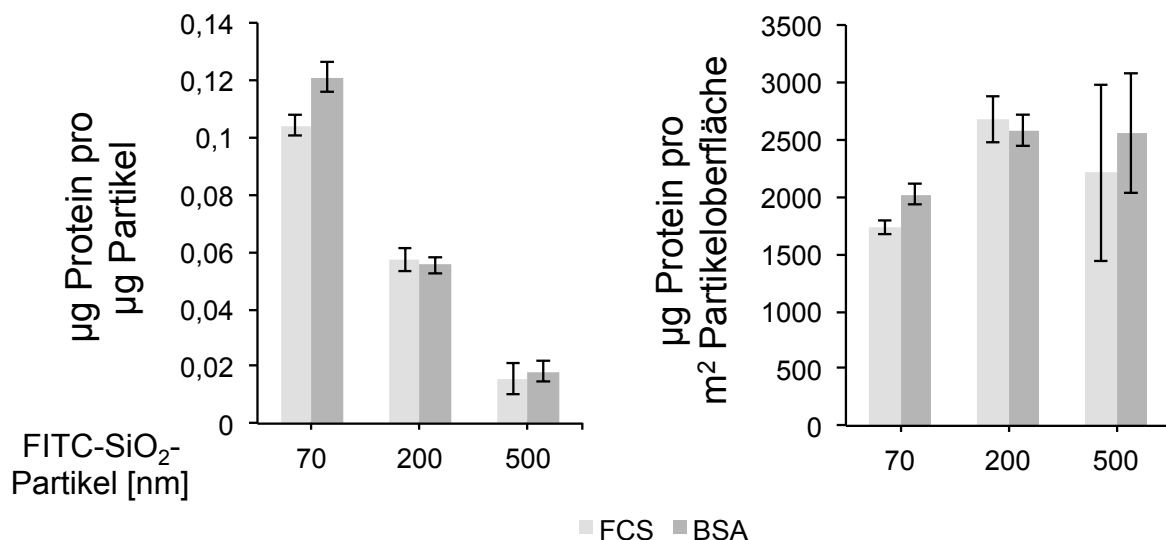


Abbildung 43: FITC-SiO₂-NP binden abhängig von der spezifischen Oberfläche Serumproteine bzw. BSA. 1 mg FITC-SiO₂-Partikel wurden in 1 ml DMEM mit und ohne FCS (10 %) bzw. BSA (5 mg/ml) für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Partikellösungen dreimal für 30 min bei

20.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Partikel in 1 ml dest. H₂O gewaschen. Danach werden die Partikel in 200 µl dest. H₂O aufgenommen (5 mg Partikel pro ml). Für die Bestimmung der gebundenen Proteinmenge im 96-well Maßstab werden 50 µg FITC-SiO₂-Partikel (10 µl) mit 200 µl BCA-Reagenz im Triplikat für 1 h bei RT inkubiert. Parallel wird eine Eichgerade mit definierten BSA-Mengen erstellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Absorption bei 562 nm gemessen und die Proteinmenge anhand der Eichkurve berechnet. Die gemessenen Werte von Partikeln in DMEM ohne FCS wurden von den Werten von Partikeln mit FCS abgezogen, um eine Interferenz der Partikel mit dem BCA-Test auszuschließen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (aus n=2), wobei der Mittelwert der Absorptionen der 3 Parallelproben (n=3) mit jeweiliger Standardabweichung dargestellt wird.

Der BCA-Test zeigt, dass mit abnehmender Größe der FITC-SiO₂-Partikel mehr Serumproteine bzw. BSA gebunden werden. Wird die Proteinmenge auf die spezifische Oberfläche normiert, so binden alle drei unterschiedlich großen Partikel ungefähr die gleichen Mengen an Serumproteinen bzw. BSA. Damit wird ersichtlich, dass Proteine in Abhängigkeit von der angebotenen Oberfläche an Partikel binden. Unter der Annahme, dass eine einzelne Schicht an BSA sich parallel an der Oberfläche anlagert, kann über die berechnete Fläche eines einzelnen BSA Moleküls die Oberflächenbelegung abgeschätzt werden (Röcker et al., 2009). Anhand der gebundenen BSA-Menge lässt sich auch bestimmen, wie viel Prozent der Partikeloberfläche mit Proteinen beladen ist. Ausgehend von der Größe von BSA (14 nm x 4 nm x 4 nm; Wright und Thompson, 1975), dem Molekulargewicht für BSA (66,5 kDa = 66,5 g/mol), der Avogadro-Konstante ($6,023 \times 10^{23}$ Teilchen pro Mol) und der angebotenen Partikeloberfläche lässt sich die mit BSA-beladene Oberfläche quantifizieren (Abb. 44).

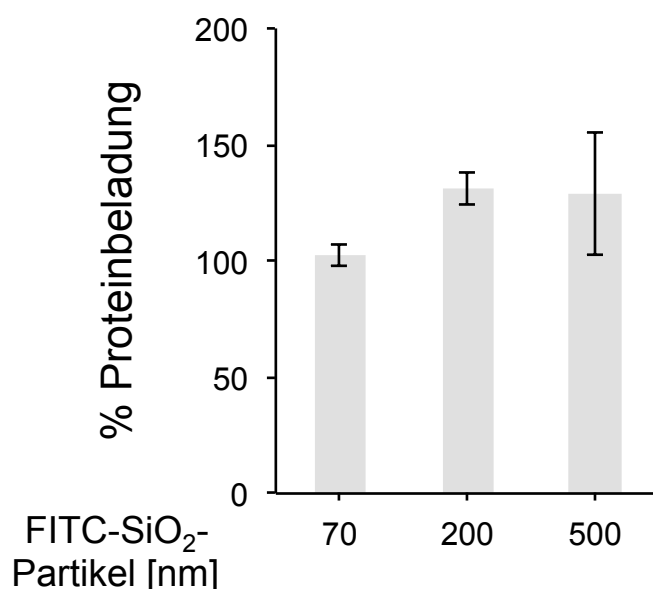


Abbildung 44: Quantifizierung der prozentualen Beladung der Oberfläche von FITC-SiO₂-Partikeln mit BSA. Zur Berechnung der Proteinbeladung der FITC-SiO₂-Partikel mit BSA wurden die Daten aus Abb. 43 verwendet. Weitere Erläuterung siehe Text.

Die Berechnung zeigt, dass die SiO₂-Partikeloberfläche vollständig mit BSA beladen ist. Ausgehend von der eingesetzten Partikelzahl kann auch die Zahl an BSA-Molekülen pro Partikel bestimmt werden. An einem 70 nm SiO₂-NP binden demnach ca. 150 BSA-Moleküle, an einem 200 nm SiO₂-MP adsorbieren ca. 1.500 BSA-Moleküle und an einem 500 nm SiO₂-MP sind ca. 13.000 BSA-Moleküle zu finden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Messungen von Röcker und Kollegen, die gezeigt haben, dass an FePt-Nanopartikel bzw. Quantum Dot (10-20 nm) ein Monolayer aus ca. 20 HSA (humanes Serumalbumin) bindet (Röcker et al., 2009). Es zeigt sich des Weiteren, dass in biologischen Experimenten Zellen nicht mit der SiO₂-Oberfläche, sondern eher mit der auf der Oberfläche befindlichen Proteincorona interagieren.

Welche Serumproteine binden an die SiO₂-Oberfläche? Hierzu wurden die an der SiO₂-Partikeloberfläche adsorbierten Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) der Größe nach aufgetrennt und quantifiziert (Abb. 45).

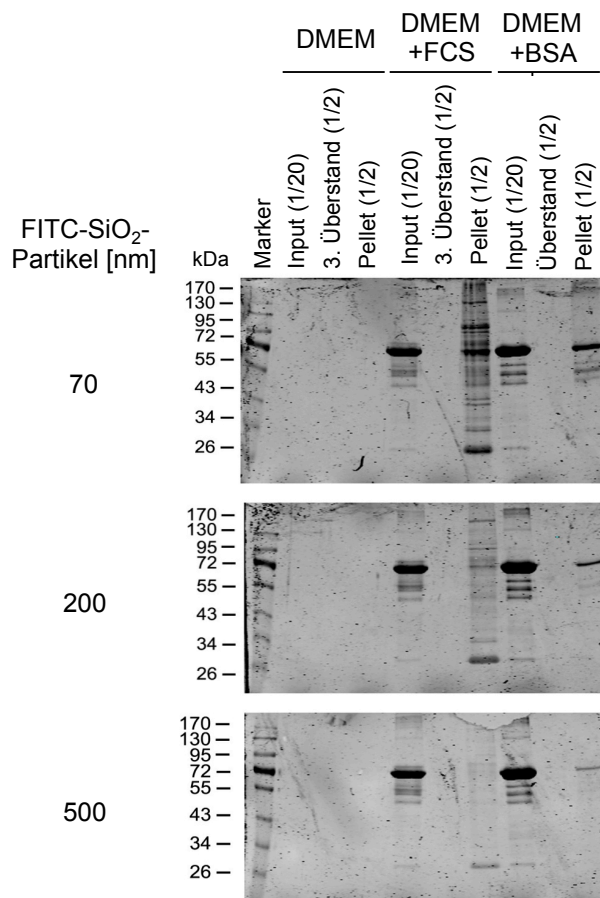


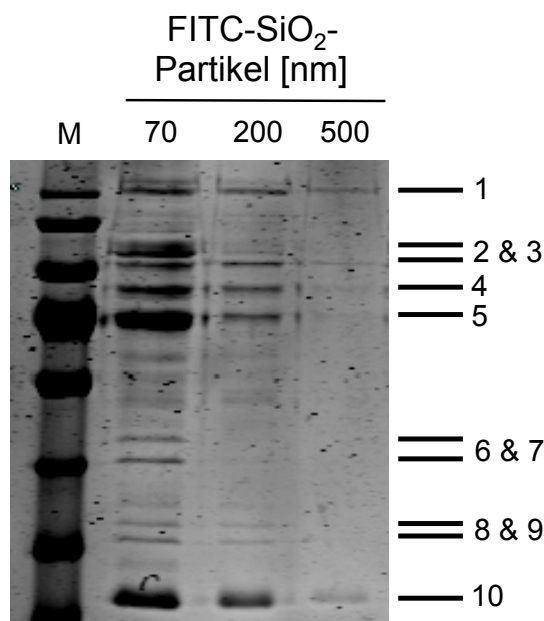
Abbildung 45: Größenabhängige Bindung von Serumproteinen und BSA an FITC-SiO₂-Partikel. 50 µg FITC-SiO₂-Partikel wurden in 1 ml DMEM mit und ohne FCS bzw. BSA für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Partikellösungen dreimal für 30 min bei 20.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen und die Partikel in 1 ml dest. H₂O gewaschen. Anschließend wurden die

pelletierten Partikel (10 μ l) in 10 μ l 2x Laemmlipuffer aufgenommen. Um die Reinheit zu prüfen, wurden 10 μ l des Überstands des finalen Waschschriffs mit 10 μ l 2x Laemmlipuffer gemischt. Der Input wurde 1/10 verdünnt und 1:1 mit 2x Laemmlipuffer vermengt. Es wurden jeweils 10 μ l auf ein 10 % Trenngel aufgetragen und bei 170 V für 1 h aufgetrennt. Danach wurden die Gele zweimal in dest. H₂O für 10 min gewaschen und danach 1 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele zweimal in dest. H₂O für 10 min gewaschen und danach 1 h in Entfärbelösung inkubiert. Zuletzt wurden die Gele zweimal in dest. H₂O für 10 min gewaschen, bevor sie an einem Odyssey Imaging System (LI-COR) aufgenommen und digitalisiert wurden.

Nach der Auftrennung und anschließenden Anfärbung der Proteine zeigt sich, dass der Input von DMEM+FCS eine dominante Bande (67 kDa) besitzt, die Albumin entspricht (Ruh et al., 2012). Wie zu erwarten ist ebenfalls für den Input DMEM+BSA zu beobachten. Des Weiteren zeigt sich, dass im letzten Überstand der Waschschriffe keine mehr Proteine zu detektieren sind, was bedeutet, dass die im Pellet vorhandenen Proteine fest an die SiO₂-Oberfläche gebunden haben. Es zeigt sich, dass 70 nm FITC-SiO₂-NP mehr Serumproteine binden als 200 und 500 nm FITC-SiO₂-MP, wobei eine Vielzahl unterschiedlich großer Serumproteine adsorbiert werden. Das bedeutet, dass nicht nur die Serumproteine binden, die am häufigsten vorkommen, wie z.B. Albumin (67 kDa), sondern auch andere, die im Input nur geringe Menge ausmachen. Ähnliches wurde auch für andere SiO₂-NP aus der Flamm synthese beschrieben, die außer Albumin auch weniger abundante Proteine wie Apolipoprotein A-1 (28 kDa) binden (Ruh et al., 2012). Da das Proteinbandenmuster, der mit 70 nm SiO₂-NP inkubierten Proben deutlich stärker ausgeprägt ist als bei denen mit 200 nm und 500 nm FITC-SiO₂-MP versetzten Proben, kann man daraus schließen, dass bei gleicher Partikelmasse mehr Protein an 70 nm FITC-SiO₂-NP als an 200 nm bzw. 500 nm FITC-SiO₂-Partikel adsorbieren. Dies stimmt auch mit den Untersuchungen zur Proteinbindung (BCA-Test, Abb. 43) überein.

Die Analyse der mit BSA-inkubierten FITC-SiO₂-Partikeln zeigt, dass BSA (67 kDa) in Abhängigkeit der Partikelgröße gebunden werden kann, wobei 70 nm FITC-SiO₂-NP mehr BSA binden als 200 und 500 nm FITC-SiO₂-MP. Dies entspricht ebenfalls dem Ergebnis des BCA-Tests (Abb. 43).

Für eine relative Quantifizierung der Gelbanden wurde die Bildverarbeitungssoftware Image J verwendet (Abb. 46).



FITC-SiO ₂ - Partikel	Gesamtprotein Anteil [%]	Protein [%]											R
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
70 nm	100	7,1	9,8	4,2	8,1	18,2	2,1	2,7	1,1	2,1	17,7	14,4	
200 nm	35	4,1	1,5	2,7	3,6	4,3	<1	<1	0,6	0,6	9,7	7,3	
500 nm	12	1,3	0,3	0,6	0,8	1,3	<1	<1	0,1	0,2	1,9	5	

Abbildung 46: Relative Quantifizierung der Banden der an die SiO₂-Oberfläche gebundenen Proteinen mittels ImageJ. Zunächst wurde ein rechteckiger Bereich über die gesamten Banden gelegt, dann anhand des Intensitätsspektrums der Hintergrund manuell abgezogen und einzelne Banden (peaks) quantifiziert, wobei die Gesamtproteinmenge an jedem Mikropartikel in Relation zu der Gesamtproteinmenge der 70 nm FITC-SiO₂-NP (100 %) angegeben ist. Die einzelnen Banden sind relativ zur Gesamtmenge der an die Partikel gebundenen Proteine angegeben. R: restliche Proteine

Die Quantifizierung der Proteinbanden zeigt, dass die Menge an gebundenen Proteinen an der Oberfläche von 70 nm SiO₂-NP größer (100 %) ist, als bei 200 nm (35 %) und 500 nm FITC-SiO₂-MP (12 %). Dies entspricht auch dem Ergebnis des BCA-Tests (Abb. 36). Die Proteinbindung korreliert mit dem Oberflächenverhältnis der drei unterschiedlichen großen Partikel. Das Oberflächenverhältnis der mittels Transmissionselektronenmikroskopie ermittelten unterschiedlich großen Partikel verhält sich wie 8,4 : 3 : 1 (Tab. 6). Um eine Identifikation der Proteinbanden durchzuführen, kann weitergehend MALDI-TOF verwendet werden, was aber nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Aus Arbeiten von Ruh und Kollegen entsprechen die Banden 5 bzw. 10 voraussichtlich BSA bzw. Apolipoprotein-A1.

3.5.7 Quantifizierung von gebundenen Serumproteinen an unterschiedlich oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP

Wie schon unter 3.5.6 für nicht-modifizierte FITC-SiO₂-Partikel beschrieben, wurde die Menge der adsorbierten Proteine an oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP mit Hilfe des BCA-Tests photometrisch bestimmt (Abb. 47).

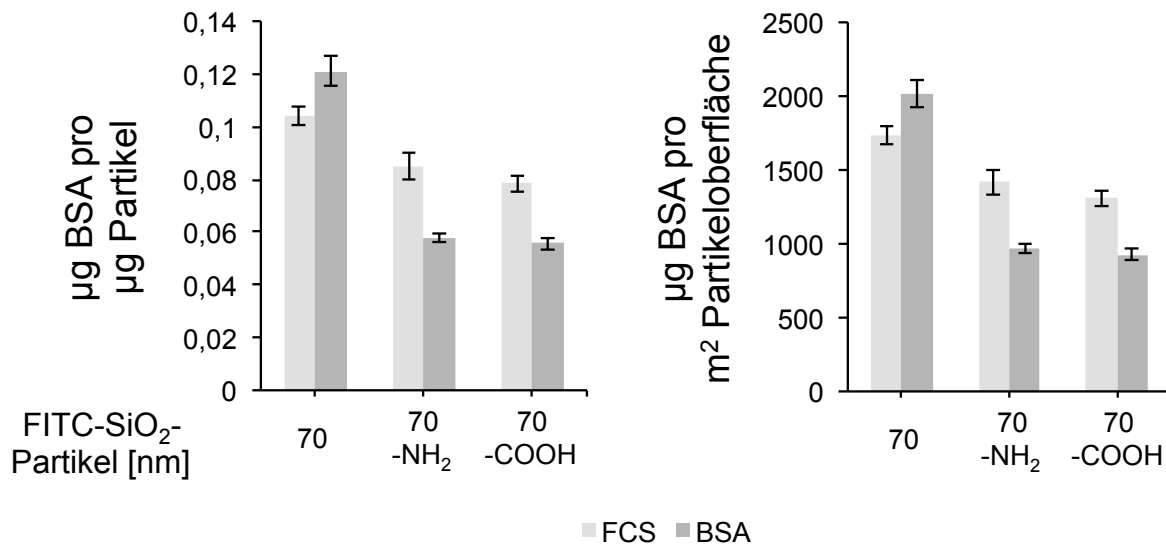


Abbildung 47: Nicht-modifizierte FITC-SiO₂-NP binden mehr Serumproteine bzw. BSA als modifizierte FITC-SiO₂-NP. 1 mg FITC-SiO₂-Partikel wurden in 1 ml DMEM mit und ohne FCS bzw. BSA für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Partikellösungen dreimal für 30 min bei 20.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen und die Partikel in 1 ml dest. H₂O gewaschen. Danach werden die Partikel in 200 µl dest. H₂O aufgenommen (5 mg Partikel pro ml). Für die Bestimmung der Proteinmenge im 96-well Maßstab werden, 50 µg FITC-SiO₂-Partikel (10 µl) mit 200 µl BCA-Reagenz im Triplikat für 1 h bei RT inkubiert. Parallel wird eine Eichgerade mit definierten BSA-Mengen erstellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Absorption bei 562 nm gemessen und die Proteinmenge anhand der Eichkurve berechnet. Die gemessenen Werte von Partikeln in DMEM ohne FCS wurden von den Werten von Partikeln mit FCS abgezogen, um eine Interferenz der Partikel mit dem BCA-Test auszuschließen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (aus n=2), wobei der Mittelwert der Absorptionen der 3 Parallelproben (n=3) mit jeweiliger Standardabweichung dargestellt wird.

Es zeigt sich, dass nicht-modifizierte FITC-SiO₂-NP mehr Serumproteine und BSA binden als oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP. Es könnte sein, dass die Silanolgruppen eine höhere Affinität für Proteine besitzen als Amino- und Carboxylgruppen. Möglich ist auch, dass die unterschiedliche Oberflächenladung der FITC-SiO₂-NP zu einer veränderten Proteininteraktion führt. Des Weiteren könnte das Anbringen von chemischen Modifikationen auf der SiO₂-Oberfläche, die freien Bindungsstellen für Proteine reduzieren oder Proteine sterisch hindern an die freie SiO₂-Oberfläche zu binden.

Wie unter Kapitel 3.5.6 beschrieben lässt sich auch hier die Beladung der oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP mit BSA berechnen (Abb. 48).

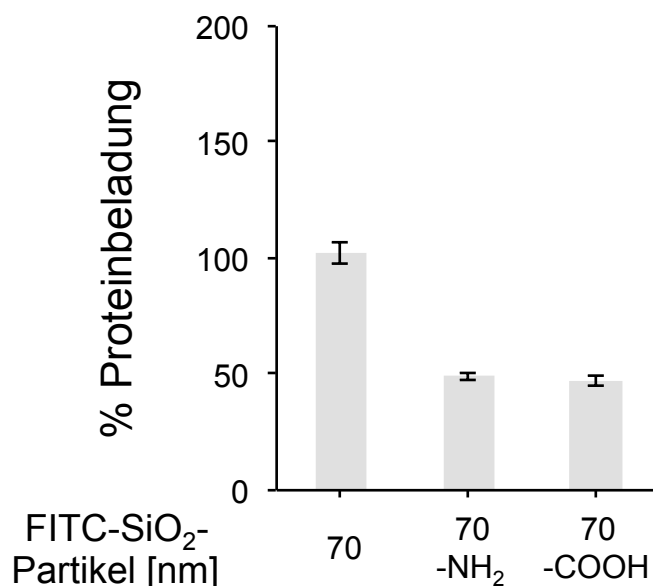


Abbildung 48: Quantifizierung der prozentualen Beladung von BSA an der Oberfläche von FITC-SiO₂-NP. Zur Berechnung der Proteinbeladung der FITC-SiO₂-Partikel mit BSA wurden die Daten aus Abb. 47 verwendet. Weitere Erläuterung siehe Text.

Die Berechnung zeigt, dass die Oberfläche von oberflächenmodifizierten FITC-SiO₂-NP nur zu etwa 50 % mit BSA beladen ist. Das kann bedeuten, dass in biologischen Experimenten Zellen mit weniger BSA-Molekülen interagieren, was vielleicht zu einer verlangsamt Aufnahme führen kann.

Weitergehend wurde untersucht, welche Proteine an die oberflächenmodifizierte SiO₂-Oberfläche binden und ob die quantitative Bindung sich in Abhängigkeit von der Modifikation ändern. Daher werden die adsorbierten Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und quantifiziert (Abb. 49-50).

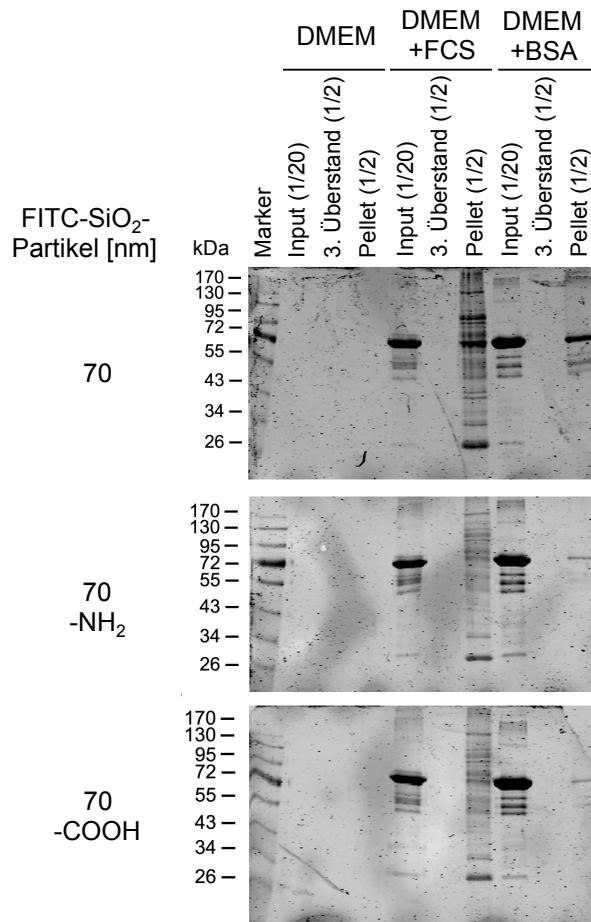
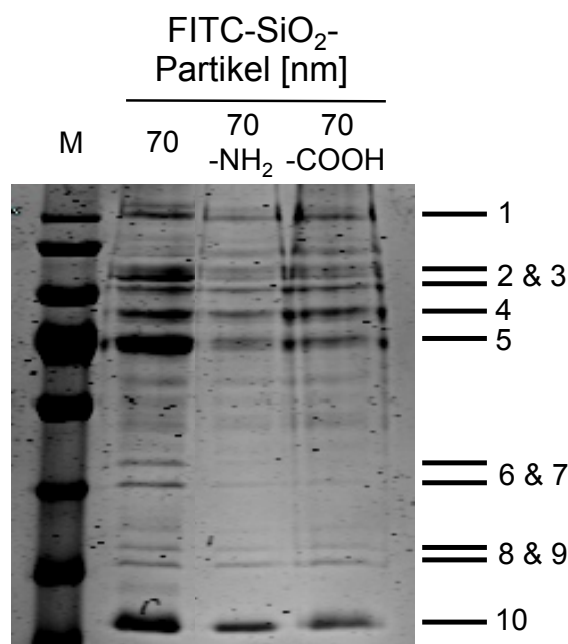


Abbildung 49: Oberflächenabhängige Bindung von Serumproteinen und BSA an FITC-SiO₂-Partikel. 50 µg FITC-SiO₂-NP wurden in 1 ml DMEM mit FCS bzw. BSA sowie in DMEM für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Partikellösungen dreimal für 30 min bei 20.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen und die Partikel in 1 ml dest. H₂O gewaschen. Anschließend wurden die pelletierten Partikel (10 µl) in 10 µl 2x Laemmli-puffer aufgenommen. Um die Reinheit zu prüfen, wurden 10 µl des Überstands des finalen Waschschritts mit 10 µl 2x Laemmli-puffer gemischt. Der Input wurde 1/10 verdünnt und 1:1 mit 2x Laemmli-puffer vermengt. Es wurden jeweils 10 µl auf ein 10 % Trenngel aufgetragen und bei 170 V für 1 h aufgetrennt. Danach wurden die Gele zweimal in dest. H₂O für 10 min gewaschen und danach 1 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele zweimal in dest. H₂O für 10 min gewaschen und danach 1 h in Entfärberlösung inkubiert. Zuletzt wurden die Gele zweimal in dest. H₂O für 10 min gewaschen, bevor sie an einem Odyssey Imaging System (LI-COR) aufgenommen und digitalisiert wurden.

Die Auswertung der Zusammensetzung der an die FITC-SiO₂-NP gebundenen Proteine zeigt, dass oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP weniger Serumproteine binden als nicht-modifizierte FITC-SiO₂-NP. Dies entspricht auch der Inkubation mit BSA. Wie unter Kapitel 3.5.6 beschrieben, werden auch hier die Bandenintensitäten quantifiziert (Ab. 49).



FITC-SiO ₂ - Partikel	Gesamtprotein Anteil [%]	Protein [%]										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	R
70 nm	100	7,1	9,8	4,2	8,1	18,2	2,1	2,7	1,1	2,1	17,7	14,4
70 nm -NH ₂	41	4,1	3,7	3,2	4,2	5	<1	<1	0,9	1,2	7,7	6,9
70 nm -COOH	58	5,8	4,7	3,6	6,9	5,8	<1	<1	0,7	1,6	9,4	9,5

Abbildung 50: Relative Quantifizierung der Banden der an die SiO₂-Oberfläche gebundenen Proteine mittels ImageJ. Zunächst wurde ein rechteckiger Bereiche über die gesamten Banden gelegt, dann anhand des Intensitätsspektrums der Hintergrund manuell abgezogen und einzelne Banden (peaks) quantifiziert, wobei die Gesamtproteinmenge an jedem oberflächenmodifiziertem FITC-SiO₂-NP in Relation zu der Gesamtproteinmenge der nicht-modifizierten 70 nm FITC-SiO₂-NP (100 %) angegeben ist. Die einzelnen Banden sind relativ zur Gesamtmenge der an die Partikel gebundenen Proteine angegeben. R: restliche Proteine

Der Vergleich der gebundenen Proteinmengen an FITC-SiO₂-NP zeigt, dass manche Proteine für alle drei Nanopartikel ähnlich sind (Protein 1, 3, 8, 9), andere Proteine zeigen für nicht-oberflächenmodifizierte FITC-SiO₂-NP ein verstärktes Vorhandensein (Protein 2, 4-7, 10). Daraus ergeben sich Unterschiede, die das Ausbleiben toxischer Wirkungen von nicht-modifizierten FITC-SiO₂-NP erklären könnten, da die intrazelluläre Lokalisation und die Prozessierung der FITC-SiO₂-NP durch die vorhandenen Proteine in der Corona möglicherweise beeinflusst wird (Clift et al., 2008; Kittler et al., 2009; Lesniak et al., 2010; Panas et al., 2012; Shi et al., 2012).

Damit lässt sich für die Untersuchung zur biologischen und toxischen Wirkung verschieden großer und oberflächenmodifizierter FITC-SiO₂-Partikel wie folgt zusammenfassen:

1) Die AHM, wie auch schon für MEONP gezeigt, eignet sich sehr gut, um die Toxizität von SiO₂-NP zu detektieren. Hierbei konnte die nach Exposition von SiO₂-Partikeln frühe

Apoptose (Kondensation des Chromatins in der AHM, Annexin-V im Durchflusszytometer, sowie Blebbing in Lebendzellmikroskopie) in RAW264.7-Zellen detektiert werden, die anschließend in Nekrose übergeht. Während der LDH Assay mit der verstärkten Nekrose übereinstimmt, unterschätzt die Annexin-V/PI-Färbung am Durchflusszytometer den Anteil an Nekrosen. Auch der WST-1 Assay korreliert nicht mit der reduzierten Zellzahl und dem verstärkten Zelltod, sondern im Gegenteil belegt einen Anstieg der metabolischen Aktivität. Somit ist AHM am besten geeignet, um die Toxizität verlässlich zu bestimmen.

2) Die meisten Arbeiten korrelieren die Dosis im Expositionsmedium (Masse/Volumen) mit der toxischen Wirkung und beschreiben eine erhöhte Toxizität von Nanopartikeln gegenüber Mikropartikeln. Auch in dieser Arbeit wurde dies beobachtet. Wird jedoch die Oberflächen bzw. Partikeldosis zur Erstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung herangezogen zeigt sich eine verstärkte Toxizität der größeren Partikel aufgrund ihrer größeren Oberfläche. Da größere Partikel aber schneller sedimentieren als kleinere Partikel ist auch die zelluläre Dosis erhöht. Aber auch nach der Normierung auf die zelluläre Dosis ist eindeutig eine höhere Toxizität für größere Partikel im Vergleich zu kleineren Partikel zu detektieren. Wird hingegen die Toxizität auf Oberfläche der verschieden großen Partikel bezogen, ergibt sich eine direkte Korrelation zwischen zellulärer Oberflächendosis und Toxizität.

3) In der Transmissionselektronenmikroskopie konnten einzelne, nicht membranumschlossene SiO₂-NP im Zytosol detektiert werden, die wahrscheinlich nach Ruptur von Endosomen/Lysosomen freigesetzt wurde. Lysosomale Membranpermeabilität (LMP) führt zur Freisetzung lysosomalen Proteasen, die Zelltod induzieren können. Tatsächlich verhindert die Hemmung dieser Proteasen die toxische Wirkung der SiO₂-NP (siehe Diskussion).

4) SiO₂-NP gelangen mittels aktivem Transport über Endozytose in Zellen. Hierbei scheint die Adsorption von Albumin die Aufnahme zu vermitteln. Interessanterweise benötigen nur SiO₂-NP nicht aber SiO₂-MP die Bindung von Serumproteine, um mittels Endozytose in die Zelle zu gelangen (Nanoeffekt). In Abwesenheit von Serum translozieren SiO₂-NP ohne Membranhüllung direkt - voraussichtlich über Diffusion - in die Zellen.

5) Die Beschaffenheit der Oberfläche ist entscheidend für die Toxizität von SiO₂-NP. Modifikation mit Amino- bzw Carboxylgruppen unterdrückt die Toxizität. Die reduzierte Aufnahme der oberflächenmodifizierten SiO₂-NP stimmt mit der verringerten Bindung von

Serumproteinen speziell von Albumin, das die Endozytose der nicht-modifizierten SiO₂-NP vermittelt, überein. Unerwarteterweise erlaubt die chemische Funktionalisierung mit Amino- bzw. Carboxylgruppen die Aufnahme der SiO₂-NP auch in Abwesenheit von Serum und zeigt einmal mehr die Relevanz der Oberflächeneigenschaften von Nanopartikeln für die Interaktion mit Zellen.

4. Diskussion

Synthetisch hergestellte Nanopartikel finden in vielen Bereichen des täglichen Lebens, wie zum Beispiel in der Computertechnik oder der Automobilbranche, aber auch in Kosmetika und in Nahrungsmitteln, Anwendung. Neben dem Bedarf der Verbesserung von Produkten oder der Energieeinsparung werden darüber hinaus Nanopartikel entwickelt, die in Zukunft für bio-medizinische Zwecke eingesetzt werden können. Da die Nanotechnologie stark voranschreitet und immer mehr Nanoobjekte generiert werden, müssen auch negative Aspekte für den Menschen und die Umwelt evaluiert werden. Um die Zahl der Tierversuche zu minimieren werden heutzutage *in vitro* Testsysteme verwendet, die eine schnelle Einordnung der Toxizität erlauben. Die heute gängigen kolorimetrischen enzymatischen Messmethoden wie LDH- und WST-1, zeigen aber in letzter Zeit vermehrt Interferenzen mit Nanoobjekten (Brown et al., 2010; Han et al., 2011; Kroll et al., 2009). Aufgrund der beobachteten Interferenzen hat die Entwicklung neuer Testsysteme eine hohe Priorität, um verlässlich toxikologische Daten zu erlangen und gleichzeitig die Wirkungsweise (*toxicity pathway*) von Chemikalien und Nanoobjekten in Zellen zu untersuchen (Bhattacharya et al., 2011; Walker und Bucher, 2009).

Um die Limitierung der bisher verwendeten Messmethoden zu überwinden, wurde hier eine automatisierte auf Mikroskopie-basierte Hochdurchsatzmethode (AHM) eingesetzt, die es mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (Hoechst33342 und Propidiumiodid) und anschließender Bildauswertung erlaubt, Zellzahl und Zelltod in Zellkulturexperimenten nach Exposition mit Nanopartikeln zu bestimmen. Anhand der Untersuchung bio-medizinisch relevanter Metalloxid-Partikel wurden mit Hilfe dieser Hochdurchsatzmethode u.a. folgende Fragestellungen beantwortet:

1) Zeigen die Standardtoxizitätstests (LDH und WST-1 Assay) Interferenzen mit den untersuchten Metalloxid-Partikeln (γ -Fe₂O₃-NP, SiO₂-Partikel) auf und wenn ja, ist dies von den physikalischen Eigenschaften der Metalloxid-Partikel abhängig? Ist die automatisierte Hochdurchsatzmikroskopie in diesem Bezug eine Alternative?

2) Lässt sich anhand von verschiedenen großen SiO₂-Partikeln (70 nm, 200 nm, 500 nm) die Toxizität mit der Partikelmasse, der spezifischen Oberfläche oder der Partikelzahl korrelieren?

3) Entspricht die eingesetzte Partikelmenge im Medium der zellulären Dosis? Hat dies einen Einfluss auf die Interpretation der Toxizität?

4) Ist die Aufnahme von FITC-SiO₂-Partikeln abhängig von Proteinen, wenn ja, adsorbieren diese an die Partikeloberfläche? Welche Proteine können eine Aufnahme in RAW264.7-Zellen vermitteln?

5) Ändern sich durch die chemische Funktionalisierung der Oberfläche von SiO₂-NP die Aufnahme und die Toxizität in RAW264.7-Zellen?

4.1 Die physikochemischen Eigenschaften der verwendeten Metalloxid-Nanopartikel haben Einfluss auf die Stabilität der Partikeldispersionen

Bei den verwendeten Eisenoxid-Nanopartikeln handelte es sich um magnetische Fe_2O_3 -Nanopartikel ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$), die vom Kooperationspartner Dr. Jean-François Berret (CNRS, Paris) nasschemisch hergestellt und durch verschiedene Techniken größenabhängig aufgereinigt wurden, um eine enge Größenverteilung zu erhalten. Die $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ wurden danach mit einem negativgeladenen organischen Molekül (Polyacrylsäure, Citrat) beschichtet. Die angebrachte Ladung auf der Partikeloberfläche führt zum Einen zur elektrostatischen Abstoßung, was die Stabilität der Dispersion erhöht, zum Anderen ermöglicht es weitere Funktionalisierung z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen und/oder Antikörpern für z.B. eine zielgerichtete Detektion von Krebszellen. Die unterschiedlich beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel wurden physikochemisch charakterisiert und die Charakterisierung ist mehrfach publiziert (Berret et al., 2007; Chanteau et al., 2009; Galimard et al., 2012; Safi et al., 2011; Safi et al., 2010). Um eventuelle durch den Transport verursachte Veränderungen der Partikel zu untersuchen, wurden die unterschiedlich beschichteten $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ vor Ort mittels TEM untersucht.

Es zeigte sich, dass die sphärischen Partikel kleiner als 10 nm waren, was mit den vom Kooperationspartner angegebenen Größen übereinstimmte. Polyacrylsäure-beschichtete $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ bildeten in Kulturmedium (DMEM) stabile Dispersionen über einen Zeitraum bis 24 h. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation von Citrat-ummantelten $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ in Kulturmedium zur Agglomeration und Präzipitation der Partikel (siehe Appendix). Dies wurde auch vom Kooperationspartner in anderen Kulturmedien (RPMI) beobachtet, wobei die Präzipitation durch den Austausch des Citrats durch Magnesium- und Kalziumionen aus dem Medium erklärt wurde. Dieser Prozess war reversibel, da durch Zugabe von Citrat ins Kulturmedium die Agglomeration der $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ wieder abnahm (Safi et al., 2011).

Bei den von der Firma Postnova Analytics bezogenen nicht-markierten und FITC- SiO_2 -Partikeln handelt es sich um SiO_2 -Partikel, die mit Hilfe der Stöbersynthese (Stöber et al., 1968) nasschemisch hergestellt wurden. Mit dieser Methode lassen sich einheitlich sphärische Partikel mit verschieden großen Durchmessern synthetisieren. Die physikalische Analyse mit Hilfe der TEM und DLS bestätigte die einheitlichen Größen und die sphärische Morphologie. Alle SiO_2 -Partikel zeigten eine negative Oberflächenladung, was zur Stabilität der Partikeldispersion beiträgt (Zhuravlev, 2000). Mit Aminogruppen modifizierte $\text{SiO}_2\text{-NP}$

zeigten in physiologischer Salzlösung ein weniger negatives Zeta-Potential als nicht-modifizierte SiO₂-NP. Carboxylgruppen-tragende SiO₂-NP waren hingegen negativer als nicht-modifizierte SiO₂-NP.

Die DLS-Messung zeigte, dass alle SiO₂-Partikel unabhängig von der Größe als stabile Dispersionen in Wasser und in Kulturmedium mit FCS vorlagen. Im Gegensatz dazu agglomerierten unabhängig von der Oberflächenmodifikation die 70 nm SiO₂-NP. Proteine zeigen sich in diesem Bezug als wichtige Komponente, die Agglomeration verhindern können. Die Interaktion von Proteinen mit der Partikeloberfläche ist u.a. von der chemischen Zusammensetzung, der Oberflächenladung und der Größe abhängig. Kohlenstoff-Partikel z.B. besitzen eine hydrophobe Oberfläche, die eine starke Affinität für Proteine besitzt, SiO₂-Nanopartikel binden im Vergleich zu TiO₂-Nanopartikeln trotz ähnlicher Größe unterschiedliche Serumproteine (Fertsch-Gapp et al., 2011; Ruh et al., 2012). Des Weiteren haben pH-Wert und die Oberflächenladung Einfluss auf die Bindung von bovinem Serumalbumin an Polymer-Partikel (Baier et al., 2011). Die Abnahme des Partikeldurchmessers von Nanoobjekten hat weiter zur Folge, dass sich die Krümmung der Oberfläche ändert, was einen Einfluss auf die Struktur der adsorbierten Proteine hat (Lundqvist et al., 2008; Vertegel et al., 2004). Die Folge der Proteinadsorption an der Oberfläche ist generell, dass Zellen nicht mit dem Partikel sondern mit den adsorbierten Proteinen interagieren. Eine Konsequenz der veränderten Interaktion von Nanopartikeln mit Zellen kann deren veränderte Aufnahme oder Zytotoxizität sein (Dobrovolskaia et al., 2009; Dobrovolskaia und Mcneil, 2007; Nel et al., 2009).

Im Weiteren erfolgte die Untersuchung, ob die verwendeten Metalloxide mit den kolorimetrischen LDH- und WST-1 Tests kompatibel sind.

4.2 Die optische Absorption von γ -Fe₂O₃-NP interferiert mit dem kolorimetrischen LDH-Test

Der LDH-Test basiert auf der Tatsache, dass aus membrangeschädigten Zellen das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) heraus diffundiert, wobei das zugesetzte Substrat INT zu einem roten Formazan umgesetzt wird. Die Absorption des Farbstoffs wird dann bei 450 nm quantifiziert (Nachlas et al., 1960). In den hier durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass Eisenoxid-NP mit dem für Chemikalien-etablierten LDH-Test interferieren.

Es zeigte sich, dass mit zunehmender Konzentration von γ -Fe₂O₃-NP scheinbar eine verstärkte Freisetzung der LDH stattfand und damit die Zytotoxizität in RAW264.7, Hepa-1C1C7 und DU145 zunimmt. Die Untersuchung der optischen Absorption der Überstände vor der Zugabe des Substrats bei 450 nm zeigte aber, dass mit steigender Konzentration von γ -Fe₂O₃-NP diese zunahm. Daraus wurde ersichtlich, dass sich die gemessene Absorption im LDH-Test aus dem umgesetzten Farbstoff und den im Medium befindlichen Eisenoxid-Nanopartikeln zusammensetzten. Durch Abzug der γ -Fe₂O₃-NP Absorption war keine signifikante Zunahme und damit keine Zytotoxizität in RAW267.4-Zellen zu detektieren. Eine Zellschädigung wurde auch durch Bestimmung des Zelltods mittels AHM ausgeschlossen, wobei keine nekrotischen oder apoptotischen Zellen nach Partikelexposition detektiert wurden. Dies zeigt, dass die hierverwendeten γ -Fe₂O₃-NP im LDH-Test zu einem falsch-positiven Ergebnis führen und dieser damit für die Bestimmung der Toxizität nicht geeignet ist.

Nanoobjekte können aber auch durch direkte Hemmung der LDH mit dem Test interferieren. Han und Kollegen zeigten, dass Nanoobjekte mit unterschiedlicher chemischer Komposition die enzymatische Aktivität der LDH beeinflussen, wobei 35 nm Silber- und 40 nm Kupfer-Nanopartikel diese hemmen, größere 40 nm Silber- und 25 nm Titandioxid-Nanopartikel aber nicht. Als mögliche Erklärung wurde die hohe Löslichkeit der Kupferpartikel angegeben, wobei Kupfer(II)-Ionen die LDH hemmen. Dies wurde auch von Suska und Kollegen beobachtet (Suska et al., 2005). Bei vergleichenden Experimenten mit unterschiedlich hergestellten Silber-Nanopartikeln (35 nm und 40 nm) wurde beobachtet, dass nur die 35 nm Silber-Nanopartikel die LDH inhibierten. Es wurde vermutet, dass das Vorhandensein einer Kohlenstoffmatrix, die während der Synthese der 35 nm Silber-Nanopartikel eingesetzt wird, um die Aggregation der Partikel zu verhindern, die LDH adsorbiert und durch Konformationsänderung an der Oberfläche inhibiert wird. Titandioxid-Nanopartikel hingegen adsorbieren LDH, was dazu führen kann, dass diese für die Messung nicht mehr zu Verfügung steht (Han et al., 2011).

Neben der Stabilität der Dispersion von nasschemisch hergestellten Nanoobjekten für biomedizinische Anwendungen, werden auch industriell gefertigte Nanoobjekte, die hauptsächlich durch Flamm synthese generiert werden, toxikologischen Untersuchungen unterzogen. Die Dispergierung dieser Nanoobjekte in biologischen Medien hat einen entscheidenden Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten.

Schulze und Kollegen zeigten 2008, dass die Partikelvorbereitung, d.h. Überführung in biologische Medien und Beschallung, einen entscheidenden Einfluss auf die Dispergierung von Partikeln hat. Dabei zeigte sich, dass mit steigender Proteinkonzentration in biologischen Medien die Größe der aggregierten Nanopartikel (Titandioxid, Zirkoniumdioxid und Cerdioxid) abnimmt. Dies führt natürlich dazu, dass sich Partikel in ihrer Sedimentation unterscheiden (Schulze et al., 2008).

Anhand dieser Studien wird ersichtlich, dass die Standardprotokolle, die eigentlich für die Evaluierung der Toxizität von Chemikalien angepasst sind, nicht unvoreingenommen für die Untersuchung der Toxizität von Nanoobjekten angewendet werden können. Dies bedeutet, dass für Nanoobjekte veränderte Richtlinien, erarbeitet werden müssen (Stone et al., 2009). Durch die Interferenz werden daher Nanoobjekte oft durch Zentrifugation des Überstands vom Kulturmedium abgetrennt (Naqvi et al., 2010), wobei dies dazu führt, dass Nanoobjekte sich verstärkt auf Zellen absetzen. Die Konsequenz ist, dass sich die zelluläre Dosis erhöht, wobei sich die Ergebnisse anderer Endpunkte (Aufnahme, Lokalisation, Toxizität) ändern können. Daher wird auch der Überstand von den Zellen separat zentrifugiert und die LDH bestimmt (Schlorf et al., 2010). Durch Zentrifugationsschritte wird aber nicht ausgeschlossen, dass Nanoobjekte vollständig abgetrennt werden. Dies ist von der Stabilität der Partikeldispersion und der resultierenden Größe der Partikel abhängig. Mit abnehmendem Partikeldurchmesser sinkt auch die Sedimentation und es müssen höhere Umdrehungszahlen verwendet werden, um diese zu pelletieren. Damit steigert sich der Testaufwand, wobei eine Quantifizierung der Partikelmenge im Überstand und im Pellet durchgeführt werden muss, um sicherzustellen, dass keine Partikel im Überstand vorhanden sind, die die kolorimetrische Messung beeinflussen.

4.3 γ -Fe₂O₃-NP und SiO₂-Partikel verursachen in RAW264.7-Zellen die Erhöhung der WST-1 Reduktion

Neben der Interferenz mit dem LDH-Test wurde auch festgestellt, dass γ -Fe₂O₃-NP unabhängig von der Oberflächenbeschichtung und Konzentration eine Erhöhung der WST-1 Reduktion in RAW267.4-Zellen verursachten (Abb. 9). Dies korrelierte aber nicht mit dem Ergebnis der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie (AHM), da sich mit steigender Konzentration der γ -Fe₂O₃-NP die Zahl der lebenden Zellen reduzierte (Abb. 14 und 15). Dieser Effekt wurde in anderen epithelialen Zelllinien (Hepa-1C1C7, DU145) nicht beobachtet (siehe Appendix). Dieser für RAW264.7 spezifische Effekt kann möglicherweise

durch die unterschiedliche Menge an aufgenommenen Partikeln zustande kommen, da Makrophagen generell eine höhere Aufnahme rate besitzen als epitheliale Zellen (dos Santos et al., 2011; Lai et al., 2008).

Interferenzen von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Toxizitätsassays wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. Die Untersuchung von magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (100 nm) mit den bio-kompatiblen Beschichtungen PEG (Polyethylenglykol) und PEO (Polyethylenimin) zeigte, dass trotz der Verringerung der Lebendzellzahl mittels Trypan Blau Detektion, die Farbstoffe MTS und CellTiter Blue in RAW264.7-Zellen konzentrationsabhängig reduziert wurden. MTS und das Resazurin im CellTiter Blue Viability Assay werden ähnlich wie WST-1 durch die mitochondriale Aktivität in einen Farbstoff umgesetzt. Damit korrelierte die Zellzahl nach Partikelexposition nicht mit der Umsetzung des wasserlöslichen Formazans MTS und dem Resazurin zu Resofurin. Dies zeigt, dass die metabolische Aktivität der Mitochondrien nicht mit der Lebendzellzahl nach Partikelexposition gleichgesetzt werden kann (Hoskins et al., 2012).

Ebenfalls wurde die Induktion der WST-1 Reduktion in RAW264.7-Zellen durch nicht-modifizierte SiO₂-Partikel gezeigt, wobei diese in höheren Konzentrationen wieder abnahm (Abb. 20). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in der Studie von Wilhelmi und Kollegen für amorphes und kristallines SiO₂ sowie ZnO in RAW264.7-Zellen beobachtet. Dies wurde aber unkommentiert gelassen (Wilhelmi et al., 2012). Die hier gemessene Verringerung der WST-1 Reduktion bei höheren Konzentrationen korrelierte mit der konzentrationsabhängigen Zunahme der LDH-Freisetzung (Abb. 19), sowie der Reduktion der Lebendzellzahl und Induktion von Nekrose in der AHM (Abb. 21 und 23), was z.T. (LDH-Freisetzung, Nekrose) auch von Wilhelmi und Kollegen beobachtet wurde (Wilhelmi et al., 2012). Im Gegensatz zu den nicht-modifizierten SiO₂-NP zeigten oberflächenmodifizierte SiO₂-NP keine Erhöhung der WST-1 Reduktion (Abb. 31), wobei auch keine Zytotoxizität beobachtet wurde. Morishige und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass nach Exposition von RAW264.7-Zellen mit oberflächenmodifizierten carboxylierten SiO₂-NP ebenfalls keine Zytotoxizität auftrat (Morishige et al., 2012). Ob der Zelltod mit der verstärkten Reduktion des WST-1 korreliert, kann in Zukunft mit Inhibitoren, die den Zelltod verhindern, untersucht werden. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass dieser Effekt speziell in Makrophagen auftritt, nicht aber in epithelialen Zellen (siehe Appendix). Der Grund hierfür könnte in der Funktion der Makrophagen liegen, da nach Aufnahme von Pathogenen NADPH-Oxidasen aktiviert

werden, die ROS generieren und damit zum oxidativen Burst (Freisetzung von ROS) führt (Sanmun et al., 2009). Berridge und Tan konnten zeigen, dass über NADH- und NADPH-Oxidasen generierte Superoxidanionen ebenfalls das Tetrazoliumsalz WST-1 zum Formazan umwandeln können (Berridge und Tan, 1998). Daher kann der WST-1 Assay auch genutzt werden, um indirekt die Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) zu quantifizieren, die normalerweise Superoxidanionen zu H_2O_2 umwandelt. Das entstehende H_2O_2 wird dann schließlich durch das Enzym Katalase neutralisiert (Chelikani et al., 2004). Daher könnte mit den spezifischen Inhibitoren Apocynin und Diphenyliodonium (DPI) untersucht werden, ob die NADPH-Oxidase an der WST-1 Reduktion beteiligt ist (Bedard und Krause, 2007).

Bisherige *in vitro* Studien weisen darauf hin, dass nach Inkubation mit amorphen SiO_2 -Partikeln reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen generiert werden. Park und Park beobachteten in RAW264.7-Zellen 24 h nach der Exposition mit 12 nm SiO_2 -NP eine 1,4-fache Induktion von ROS, bei gleichzeitiger Reduktion des Spiegels an anti-oxidativem Glutathion (Park und Park, 2009). Humane Hepatozyten (HepaG2) zeigten 72 h nach Beginn der Inkubation mit steigenden Konzentrationen an 14 nm amorphen SiO_2 -NP ebenfalls die Zunahme an oxidativen Stress und Zytotoxizität (Ahmad et al., 2012). Nabeshi und Kollegen konnten zeigen, dass die konzentrationsabhängige Behandlung von humanen Keratinozyten mit 70 nm SiO_2 zur Induktion von intrazellulären ROS führt, wobei diese durch den NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin verhindert werden konnte. Eine direkte Korrelation zwischen ROS und der Zytotoxizität wurde aber nicht untersucht (Nabeshi et al., 2011b). In den hier durchgeführten Experimenten konnten mit dem DCF-Test in den ersten 5 h nach der Inkubation mit toxischen Konzentrationen an SiO_2 -NP (50 $\mu\text{g/ml}$) keine ROS detektiert werden. Da DCF nicht so sensitiv für Superoxidanionen ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese in den ersten Stunden nach Inkubation gebildet werden. Um dennoch die mögliche Beteiligung der NADPH-Oxidase zu untersuchen, müssten zu früheren Zeitpunkten (5 h) untersucht werden, ob RAW264.7-Zellen nach Partikelexposition WST-1 reduzieren. Da die Messung der metabolischen Aktivität aber nach 24 h durchgeführt wurde (Abb. 20), ist nicht auszuschließen, dass zu späteren Zeitpunkten, z.B. während des Zelltods, ROS generiert werden. Dass ROS generell an der Toxizität von SiO_2 -NP in RAW264.7-Zellen beteiligt sind, konnte durch die Koinkubation mit dem Breitband-Inhibitor N-Acetylcystein (NAC) ausgeschlossen werden (Zhang et al., 2011). Somit könnten zwar ROS generiert werden, diese aber nicht die toxische Wirkung besitzen.

4.4 Die automatisierte Hochdurchsatzmikroskopie (AHM) ist sensitiver als konventionelle Hochdurchsatzmethoden, um Änderungen in der Zellzahl und Apoptose/Nekrose zu detektieren

Automatisierte Hochdurchsatzmethoden finden seit kurzem auch Verwendung in Toxikologie (George et al., 2010; Mohamed et al., 2011). Selten aber werden die Ergebnisse mit den klassischen Toxizitätsassays LDH, WST-1, Annexin-V/PI-Färbung in der Durchflusszytometrie verglichen. Da in dieser Arbeit Interferenzen von γ -Fe₂O₃-NP und SiO₂-Partikeln mit den kolorimetrischen LDH- und WST-1 Tests festgestellt wurden, wurde die automatisierte Hochdurchsatzmikroskopie zur Detektion der Zytotoxizität verwendet.

Die Validierung der AHM erfolgte anhand Apoptose- und Nekrose-induzierender Chemikalien in RAW264.7-Zellen. Etoposid, ein Inhibitor der Topoisomerase II, führte konzentrationsabhängig zur Lebendzellzahlreduktion, wobei dies mit der Abnahme der Zahl der Mitosen korreliert. Gleichzeitig nahm auch die Zahl der frühen und späten Apoptosen, die durch Chromatin-Kondensation und integrale Plasmamembran bzw. DNA-Fragmentierung und erhöhte Membranpermeabilität definiert sind, zu. Dies entspricht den Erwartungen, da Etoposid generell, auch in RAW264.7-Zellen, Apoptose auslöst (von Knethen et al., 1998). Parallel wurden diese Ergebnisse mit den Aussagen aus dem LDH- und WST-1 Test, sowie der Annexin-V/PI-Färbung in der Durchflusszytometrie verglichen. Hier zeigte sich, dass die Freisetzung der LDH konzentrationsabhängig zunahm und die Reduktion des Formazans WST-1 abnahm, was mit dem Anstieg an spät-apoptotischen Zellen bzw. einer reduzierten Zellzahl übereinstimmt.

Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass die Annexin-V/PI-Färbung im Durchflusszytometer wie die AHM frühe Apoptosen nach Exposition mit SiO₂-NP detektiert. Unterschiede zeigen sich in dem Anteil, wobei die Durchflusszytometrie mehr frühe Apoptosen erkennt. Dies könnte an der Tatsache liegen, dass verschiedene Marker (Annexin-V-Bindung bzw. kondensiertes Chromatin) untersucht werden. Da die Apoptose eine kontrollierte Abfolge von bestimmten Prozessen ist und diese sich zeitlich unterscheiden, kann es sein, dass die Translokation des Phosphatidylserins (PS) auf die Außenseite der Plasmamembran früher als die Chromatin-Kondensation stattfindet (Viorritto et al., 2007). Dies führt dazu, dass frühe Apoptosen, die in der Durchflusszytometrie gemessen werden, in der AHM als lebende Zellen gewertet werden. PS dient generell als Signal für Makrophagen, um tote Zellen zu phagozytieren (Fadok et al., 2000). Dies wurde ebenfalls in RAW264.7-

Zellen mittels Lebendzellmikroskopie beobachtet, wobei tote Zellen von lebenden RAW264.7-Zellen gefressen wurden (Daten nicht gezeigt). Dies erklärt auch die relativ geringe Zelltodrate in der AHM und der Annexin-V/PI-Färbung (< 20% bzw. 30%).

Daneben können Detergenzien Plasmamembranproteine und Phospholipide solubilisieren und damit zur Lyse der Zellen führen (Jamur und Oliver, 2010). Eine Zunahme der Nekrosen in der AHM konnte nach der konzentrationsabhängigen Behandlung mit dem Detergenz Triton X-100 gezeigt werden. Parallel konnte ebenfalls die Freisetzung der LDH und die Verringerung der WST-1 Reduktion beobachtet werden, wobei die AHM bei niedrigeren Konzentrationen des Detergenz (0,1 %) schon Nekrose detektiert. Dies ist wahrscheinlich vom Grad der Membranschädigung abhängig. Bei geringer Membranschädigung können kleine Moleküle wie Propidiumiodid die Membran passieren, größere Proteine wie LDH hingegen nicht. Damit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der AHM für die Detektion von Apoptose und Nekrose in RAW264.7-Zellen geeignet ist, wobei sie sogar sensitiver als die hier verwendeten konventionellen kolorimetrischen Hochdurchsatzmethoden ist.

4.5 Die Toxizität von γ -Fe₂O₃-NP in RAW264.7-Zellen ist allein abhängig von der zellulären Dosis

In konzentrationsabhängigen Experimenten mit PAA- und Citrat-beschichteten γ -Fe₂O₃-NP zeigte sich zunächst, dass die Verringerung der Lebendzellzahl in RAW264.7-Zellen abhängig von der Oberflächenbeschichtung war. Citrat-ummantelte γ -Fe₂O₃-NP führten bei gleichen Konzentrationen im Expositionsmedium wie PAA-beschichtete γ -Fe₂O₃-NP zu einer verstärkten Abnahme der Lebendzellzahl. Daraus wurde zunächst geschlossen, dass für RAW264.7-Zellen Citrat-ummantelte γ -Fe₂O₃-NP toxischer sind als PAA-beschichtete γ -Fe₂O₃-NP. Diese vorläufige Annahme wurde aber durch die Quantifizierung der γ -Fe₂O₃-NP Dosis in der zellulären Fraktion und dem Überstand revidiert. Es zeigte sich, dass Citrat-ummantelte γ -Fe₂O₃-NP verstärkt in der zellulären Fraktion und PAA-beschichtete γ -Fe₂O₃-NP hauptsächlich im Überstand lokalisiert waren. Durch die Korrelation der absolut gemessenen Menge an γ -Fe₂O₃-NP in der zellulären Fraktion und der Lebendzellzahl konnte gezeigt werden, dass sich beide Partikelsorten in ihrer Toxizität gleichen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Korrelation zwischen Toxizität und der im Expositionsmedium eingesetzten Dosis zu einem falschen Schluss führt und in vergleichenden Studien verschiedener Nanopartikel die zelluläre Dosis mit der Toxizität verglichen werden muss.

Des Weiteren wurde ersichtlich, dass die Makrophagen-ähnliche Zelllinie RAW264.7 auf PAA- und Citratbeschichtete γ -Fe₂O₃-NP sensitiver reagierte als die untersuchten Epithelzelllinien Hepa-1C1C7 und DU145. Dies könnte in der unterschiedlichen Aufnahmerate von spezialisierten Phagozyten und epithelbildenden Zellen liegen. Andere Arbeitsgruppen sahen in Studien mit verschiedenen Zelllinien, dass Makrophagen (RAW264.7) im Vergleich zu anderen epithelialen Zelllinien mehr Nanopartikel aufnehmen (dos Santos et al., 2011; Lai et al., 2008). Diese Information ist für eine bio-medizinische Anwendung sehr wichtig, da Kontrastmittel, wie die supraparamagnetischen Eisenoxide ResovistTM und SupravistTM, nach intravenöser Injektion in der murinen Leber vornehmlich in Makrophagen (Kupfferzellen) aufgenommen werden (Lunov et al., 2010b). Akute Toxizität trat nach 24 h zunächst nicht auf. Nach 5 Tagen hingegen wurde in Makrophagen Apoptose ausgelöst. Als mögliche Ursache wurde der intralysosomale Abbau der Carboxy-Dextranschicht der magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel durch α -Glukosidasen ausgemacht. Aus der „nackten“ Eisenoxid-Oberfläche könnten sich Eisenionen lösen, die in den Mitochondrien über die Fenton-Reaktion ROS generieren, die zum Zelltod führen (Lunov et al., 2010a). Diese Ergebnisse haben große Bedeutung für Patienten, die mittels Magnet-Resonanz-Tomographie untersucht werden, da toxische Wirkungen erst Tage nach der Untersuchung auftreten können. Die hier verwendeten γ -Fe₂O₃-NP zeigten nach 24 h keine akute Zytotoxizität, sondern einen Proliferationsblock. Ursache hierfür könnten ebenfalls ROS sein, die zunächst, wie bei Lunov et al., 2010a, zu einem Zellzyklusblock führen könnten, später aber Zelltod auslösen.

4.6 Die Toxizität von unterschiedlich großen SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen ist abhängig von der sich in Zellen befindlichen spezifischen Oberfläche der Partikel

Die Behandlung von RAW264.7-Zellen mit steigenden Konzentrationen verschieden großer SiO₂-Partikel (70 nm, 200 nm, 500 nm) zeigte, dass bezogen auf die eingesetzte Masse im Expositionsmedium, 70 nm SiO₂-NP eine niedrigere EC₅₀ als 200 bzw. 500 nm SiO-MP besaßen und damit toxischer waren. Anhand dieser Experimente würde man davon ausgehen, dass hier ein Nanoeffekt vorliegt. Nel und Kollegen postulierten 2006, dass die Toxizität von Nanoobjekten durch die höhere spezifische Oberfläche erklärt werden kann, an der die Generierung von ROS stattfindet (Nel et al., 2006). Die hier gezeigten Ergebnisse würden diese Hypothese unterstützen. Die Korrelation zwischen spezifischer Oberfläche bzw. der Partikelzahl im Expositionsmedium mit der Zytotoxizität weist aber darauf hin, dass 500 nm

SiO₂-MP toxischer sind als 200 und 70 nm SiO₂-Partikel. Das führt zum Schluss, dass hier kein Nanoeffekt vorliegt.

Da nicht ausgeschlossen wurde, dass wie bei den γ -Fe₂O₃-NP die physikochemischen Eigenschaften der unterschiedlich großen SiO₂-Partikel einen Einfluss auf die Stabilität der Dispersionen haben, wurde ebenfalls die zelluläre Dosis bestimmt. Es stellt sich heraus, dass 70 und 200 nm SiO₂-MP konzentrationsunabhängig (25, 50, 100 µg/ml) in vergleichbaren Dosen in bzw. auf RAW264.7-Zellen lokalisiert waren. Im Gegensatz dazu wurden deutlich mehr 500 nm SiO₂-MP in der zellulären Fraktion detektiert (2,5-5x). Daraus kann geschlossen werden, dass die Sedimentation der 500 nm SiO₂-MP zu einer erhöhten zellulären Dosis führt, wobei dies die Dosis-Wirkungs-Beziehung verändert. Daher wurde die zelluläre Dosis mit der gemessenen Lebendzellzahl in Beziehung gesetzt. Hieraus wurde erkennbar, dass bezogen auf die Masse 70 nm SiO₂-NP und auf die Partikelzahl 500 nm SiO₂-MP am toxischsten waren. Die entscheidende Änderung aber war, dass sich die EC₅₀ der verschieden großen SiO₂-Partikel bezogen auf die spezifische Oberfläche angleichen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Toxizität von der spezifischen Oberfläche der SiO₂-Partikel abhängig ist.

Bereits 2005 konnten Oberdörster und Kollegen *in vivo* den Oberflächeneffekt von Partikeln auf die Toxizität in der Lunge zeigen. Hierbei wurden gleiche Massen von zwei verschieden großen TiO₂-Partikeln (25 und 250 nm) intratracheal instilliert und die Toxizität anhand der Entzündungsreaktion durch Infiltration von neutrophilen Granulozyten in der bronchioalveolaren Spüllösung gemessen. Es stellte sich heraus, dass bezogen auf die Masse 25 nm TiO₂-NP toxischer waren als 250 nm TiO₂-Partikel, bezogen auf die spezifische Oberfläche hingegen glichen sich die Toxizitäten (Oberdörster, 2005). Unabhängige Instillationsversuche mit verschiedenen Nanopartikeln (DEP, PrintexG, Printex90, SootL, SootH, ufCP) bestätigten die Korrelation zwischen der Oberfläche und der Menge der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β und MIP-2 (Stoeger et al., 2005). *In vitro* Untersuchungen, in denen A549 Zellen mit chemisch unterschiedlichen und verschieden großen Partikeln (Carbon Black, TiO₂, Nickel, Cobalt, BaSO₄, kristallines SiO₂) behandelt wurden, verursachten Partikel generell in Abhängigkeit von ihrer Oberfläche die Induktion des pro-inflammatorischen Cytokins Interleukin-8 und oxidativen Stress (Monteiller et al., 2007).

Auch für amorphe SiO₂-NP konnte die im Expositionsmedium befindliche spezifische Partikeloberfläche von verschiedenen großen Nanopartikeln (7-300 nm) mit der Zytotoxizität und der Induktion der Genexpression in Makrophagen (RAW264.7-Zellen) korreliert werden (Waters et al., 2008). Trotz der Inkubation in serum-freiem Kulturmedium bildeten die verwendeten SiO₂-Partikel (Polysciences Inc.) stabile Dispersionen. Da die Toxizität in diesem Fall mit der Dosis im Expositionsmedium korreliert werden konnte, ist davon auszugehen, dass 300 nm SiO₂-MP nicht so stark sedimentieren wie 500 nm SiO₂-MP in der vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus konnten die Entzündungsreaktionen in 16HBE-Zellen (humane bronchiale Epithelzelllinie) nach Exposition mit Carbon Black und TiO₂-NP nicht nur mit der Oberfläche, sondern auch mit der internalisierten Menge an Nanoobjekten korreliert werden (Hussain et al., 2009). Dies zeigt die wichtige Bedeutung der Quantifizierung der zellulären Dosis, besonders in Fällen, wo unterschiedliche Sedimentation von verschiedenen Partikeln und unterscheidbare Aufnahmeraten in Zellen zu beobachten sind (Teeguarden et al., 2007).

4.7 SiO₂-NP akkumulieren intrazellulär in Endosomen/Lysosomen in RAW264.7-Zellen

Die mikroskopische Analyse der Aufnahme zeigte, dass SiO₂-Partikel unter Serumbedingungen unabhängig von ihrer Größe in vesikulären Strukturen intrazellulär akkumulieren. Da die Vorinkubation mit Cytochalasin D, das die Aktinpolymerisation verhindert, die Aufnahme von SiO₂-NP nicht verhindert, scheint Phagozytose oder Makropinozytose als Aufnahmeweg nicht von Bedeutung zu sein. Ebenfalls konnte die aktive Aufnahme durch die Inkubation bei 4°C gezeigt werden, wobei die Aufnahme von allen drei SiO₂-Partikeln reduziert wurde. Des Weiteren zeigt sich im Transmissionselektronenmikroskop, dass SiO₂-Partikel in membranumschlossenen Kompartimenten in RAW264.7-Zellen aufgenommen werden. Diese Beobachtungen werden durch vorangegangene Fluoreszenzmikroskopieexperimente mit dem endosomalen Marker TMR-WGA (Tetramethylrhodamin-Weizenkeim-Agglutinin) gestützt. Das Glykoprotein WGA aus der Familie der Lektine, das nach der Bindung an Sialinsäure und N-Acetylglukosamin von glykosylierten Zelloberflächenmolekülen in Endosome aufgenommen wird (Raub et al., 1990), kolokalisierte mit allen drei unterschiedlich großen SiO₂-Partikeln (70, 200 und 500 nm) in HeLa und RAW264.7-Zellen (Al-Rawi, 2008).

4.8 An der Partikeloberfläche adsorbiertes Albumin kann die Aufnahme von SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen vermitteln, wobei dies nicht über Scavenger-Rezeptoren stattfindet.

Da Proteine einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Zellen und Partikeln haben (Dobrovolskaia und Mcneil, 2007; Moore et al., 1997) wurde eine mögliche Opsonisierung der SiO₂-Partikeloberfläche mit Proteinen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass weder Immunglobuline der Klasse G noch Komplement-Proteine die Aufnahme von nicht-modifizierten SiO₂-NP vermitteln. Hingegen zeigte sich, dass das am abundantesten im Serum vorkommende Protein Albumin die Aufnahme vermittelt. Albumin, das auch als Vehikel für Medikamente verwendet wird (Kratz, 2008), wird generell über die Caveolin-abhängige Endozytose aufgenommen. Es kann daraus geschlossen werden, dass Albumin-gebundene SiO₂-NP ebenfalls über diesen Weg in Zellen aufgenommen werden, wobei Studien mit blockierenden Chemikalien wie Filipin III, Genestein oder Nystatin (Lajoie und Nabi, 2010) noch ausstehen.

Zu den möglichen Rezeptoren, die eine Aufnahme von SiO₂ vermitteln können, gehören die Scavengerrezeptoren (SR). Diese auf der Zelloberfläche von Makrophagen vorkommenden Rezeptoren binden eine Vielzahl an Liganden, darunter Bakterien, modifiziertes LDL (low density lipoprotein) und nicht-opsonisierte Partikel (Murphy et al., 2005). Sie werden in 8 Klassen eingeteilt, wobei diese sich in ihrer Struktur und den Liganden ähneln. Zur Klasse A gehören die Splicevarianten SR-I, SR-II und SR-III, MARCO (macrophage receptor with collageneous structure), SCARA5 (scavenger receptor class a, member 5 [putative]) und SRCL (scavenger receptor C-type lectin).

Mit der Bindung von kristallinem SiO₂ an Alveolarmakrophagen wurden die Scavengerrezeptoren SR-AI und SR-AII und MARCO in Verbindung gebracht, wobei die Überexpression von SR-AII in CHO-Zellen (Chinese hamster ovary cells) die Toxizität (Apoptose) von kristallinem SiO₂ vermitteln konnte (Hamilton et al., 2000). Wichtig hierfür scheint die collagen-like Domäne der SR-A zu sein, die hoch konservierte Lysin-Cluster besitzt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Apoptose durch SR-A Inhibitoren nach Exposition mit kristallinem SiO₂ in humanen Alveolarmakrophagen verhindert wurde und ein SR-A-blockierender Antikörper (2F8) die erhöhte Caspaseaktivität in der murinen alveolaren Makrophagenzelllinie MH-S reduzierte (Chao, 2001; Iyer et al., 1996). Eine neuere Studie von Orr und Kollegen von 2010 zeigte ebenfalls, dass SR-A die

Clathrin-vermittelte Aufnahme von 100 nm großen amorphen SiO₂-NP in Makrophagen vermittelt, wobei die Internalisierung zur Expression von Zytokinen (TNF α , C-GSF) führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Knock-down von SR-AI die Bindung und Aufnahme von 100 nm großen amorphen SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen verhindern und die Überexpression des murinen Rezeptors in der humanen Zelllinie HEK (humane embryonale Nierenzellen) die Aufnahme von SiO₂-NP verstärkte. Da die Untersuchung der Aufnahme von 100 nm SiO₂-NP in Medium ohne Serum durchgeführt wurde, ist die direkte Interaktion zwischen der SiO₂-Oberfläche und dem SR-A möglich. Daneben wurde spekuliert, dass womöglich Restmengen an BSA die Aufnahme vermitteln.

Ausgehend von dieser Tatsache wurde untersucht, ob die Aufnahme von Protein-adsorbierten SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen ebenfalls durch Klasse A Scavengerrezeptoren vermittelt wird. Durch die Koinkubation mit einem blockierenden Antikörper (Klon 2F8) konnte eine verminderte Aufnahme von acetyliertem LDL (DiI-ac LDL) im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden, wobei die Spezifität des blockierenden Antikörpers mit einem Isotyp-Kontrollantikörper bestätigt wurde. Die Inkubation von RAW264.7-Zellen mit SiO₂-NP in BSA-haltigem Medium mit dem blockierenden anti-SR-A zeigte aber keine Verringerung der Aufnahme. Da keine Aufnahme von 70 nm SiO₂-NP in Medium ohne Serumproteine in RAW264.7-Zellen stattfindet, könnten vielleicht größere SiO₂-Partikel, wie die hier verwendeten 200 und 500 nm SiO₂-MP unter serumfreien Bedingungen über SR-A aufgenommen werden. Dies könnte bedeuten, dass die Größe ein wichtiger Faktor für die Aufnahme über den SR-A ist. Andere Arbeitsgruppen sehen die SR-A-abhängige Aufnahme auch für andere Nanoobjekten, wie z.B. Gold-NP. França und Kollegen konnten zeigen, dass negativ-geladene Gold-NP in RAW264.7-Zellen über SR-A aufgenommen werden (França et al., 2011). Patel und Kollegen zeigten in HeLa-Zellen, dass die Aufnahme von Oligonukleotid-funktionalisierten Gold-NP über SR-A negativ durch Serumproteine beeinflusst wurde. Es wurde postuliert, dass durch die Adsorption von Serumproteinen Bindungsstellen für die SR-A blockiert werden und dadurch die Aufnahme langsamer abläuft (Patel et al., 2010). Dies könnte in dem hier vorliegenden Fall bedeuten, dass die mit BSA dekorierten SiO₂-NP nicht von SR-A erkannt werden und damit einen anderen Aufnahmeweg in Makrophagen nehmen. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die RAW264.7-Zellen Agglomerate aus 70 nm SiO₂-NP nicht aufnehmen. Oberflächenmodifizierte SiO₂-NP werden hingegen in Medium ohne Serum, genauso wie BSA-dekorierte nicht-modifizierte SiO₂-NP trotz Agglomeration in RAW264.7-Zellen aufgenommen. Eine Erklärung hierfür könnte in

der Stärke der Agglomeration liegen. Hierbei könnten oberflächenmodifizierte SiO₂-NP durch die verwendeten Linker einen größeren Abstand zueinander besitzen, wodurch sie nicht so stark agglomerieren. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass BSA-adsorbierte SiO₂-NP im Vergleich zu nackten SiO₂-NP nicht durch Scavengerrezeptoren, sondern über einen noch nicht bekannten Rezeptor aufgenommen werden. Die Dekorierung mit Proteinen scheint aber nicht in allen Fällen die Aufnahme in Zellen zu vermitteln. Jiang und Kollegen konnten zeigen, dass durch die Zugabe von Transferrin und humanem Serumalbumin die Aufnahme von FePt-Nanopartikel in HeLa-Zellen vermindert wird (Jiang et al., 2009).

4.9 SiO₂-NP werden nach Aufnahme in Endosomen/Lysosomen ins Zytosol freigesetzt, was auf lysosomale Membranpermeabilisierung (LMP) schließen lässt

Die weitere Untersuchung in der Transmissionselektronenmikroskopie zeigte, dass neben in Endosomen vorkommenden Partikeln auch einzelne „nackte“ SiO₂-NP im Zytosol in räumlicher Nähe von Endosomen lagen. Da im zeitlichen Verlauf von 5-60 min hauptsächlich membranumschlossene SiO₂-NP intrazellulär zu finden waren, kann daraus geschlossen werden, dass SiO₂-NP in serumhaltigem Medium aktiv in Endosomen aufgenommen werden und später aus den Endosomen oder Lysosomen entweichen. Der Prozess wie Nanopartikel aus Endosomen/Lysosomen freigesetzt werden, ist bisher unklar (Albanese et al., 2012).

Generell wird als Ursache der Zytotoxizität von Nanopartikeln die Generierung von ROS angegeben. Eine Beteiligung von ROS konnte aber durch den DCF-Test ausgeschlossen werden. Dies wird zusätzlich durch Experimente bestätigt, in denen das Antioxidans N-Acetyl-Cystein (NAC) keinen Einfluss auf die Lebendzellzahl nach Inkubation von RAW264.7-Zellen mit SiO₂-Partikeln hatte (Hug, 2011). Hingegen bewirken Inhibitoren, die mit der Maturierung von Endosomen zu Lysosomen interferieren (Bafilomycin A1, Chloroquin) oder die im Lysosom aktive Endoprotease Cathepsin B (Ca-074-Me) hemmen, eine Erhöhung der Lebendzellzahl nach der Exposition von RAW264.7-Zellen mit FITC-SiO₂-Partikeln (Hug, 2011). Dies lässt darauf schließen, dass während der Aufnahme von FITC-SiO₂-Partikeln in RAW264.7-Zellen, die im Lysosom-befindlichen Proteine, z.B. durch Freisetzung ins Zytosol, den Zelltod auslösen. Ein Hinweis auf eine erhöhte Membranpermeabilität von Lysosomen ergibt sich durch den Vergleich der Kolo-kalisation des lysosomotrophen Fluoreszenzfarbstoffs LysoTracker® Red DND-99 mit verschiedenen großen FITC-SiO₂-Partikeln nach 5 h Inkubationszeit (Al-Rawi, 2008). Es wurde beobachtet, dass die Fluoreszenzsignale von 70 nm FITC-SiO₂-NP weniger mit den Signalen des

Lysosomenmarkers übereinstimmen. Größere 500 nm FITC-SiO₂-MP hingegen zeigen Kolokalisation mit LysoTracker® Red DND-99. Dies könnte bedeuten, dass der lysosomale Fluoreszenzfarbstoff durch eine Erhöhung der Membranpermeabilität der Lysosomen in das Zytosol diffundiert und nicht mehr mit den noch im Lysosom befindlichen 70 nm FITC-SiO₂-NP kolokalisieren kann.

Ähnliche Beobachtungen zur lysosomalen Membranpermeabilisierung (LMP) in murinen alveolaren Makrophagen (MH-S) wurden von Thibodeau und Kollegen nach Behandlung mit kristallinem SiO₂ (Min-U-Sil®5, 5 µm) gemacht. Die Freisetzung von lysosomalen Hydrolasen löste Apoptose aus. Die Inhibition der lysosomalen Hydrolasen Cathepsin D mit Hilfe von Pepstatin A bzw. Sphingomyelinase durch Despiramin verhinderte die Aktivierung der Effektorcaspase-3 und -9 und damit die Apoptose. Als Ursache der LMP wurde die Generierung von ROS durch den DCF-Test ausgeschlossen, wobei auch die Präinkubation mit Antioxidantien (N-Acetylcystein, Glutathion) die Aktivierung von Caspase-3 nicht verhindern konnte (Thibodeau, 2003; Thibodeau et al., 2004). Hornung und Kollegen konnten zeigen, dass durch die Behandlung mit kristallinem SiO₂ die LMP das NALP3 Inflammasom in Zellen aktiviert (Hornung et al., 2008). Xia und Kollegen konnten ebenfalls LMP nach Behandlung von RAW264.7-Zellen mit kationischen Polystyrol-NP beobachten, wobei vermutet wurde, dass die Aminogruppen auf den Partikeln, durch Bindung von Protonen der Protonenpumpe entgegenwirkt, wobei Lysosome anschwellen und permeabel werden (Xia et al., 2008). Dies scheint also ein allgemeiner Mechanismus für die Nanotoxikologie zu sein.

Im Einklang mit den Experimenten von Thibodeau wurde auch in murinen Makrophagen nach Exposition mit SiO₂-Partikeln nach 6-14 h zunächst Apoptose (Blebbing, kondensiertes Chromatin, apoptotische Körperchen,) beobachtet, wobei nach 24 h die Zellen aber Merkmale der Nekrose (keine DNA-Kondensation oder Fragmentierung, PI-Influx, Verlust des Kontrasts) zeigten. Eine Erklärung wäre, dass *in vitro* Zellen nach Durchlauf der Apoptose in die sogenannte sekundäre Nekrose übergehen, da sie nicht wie im Organismus durch Makrophagen entsorgt werden (Krysko et al., 2008). Die Beteiligung von Caspasen konnte durch die Koinkubation mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK, der den Zelltod durch SiO₂-Partikel nicht verhindern konnte, ausgeschlossen werden (Hug, 2011). Eine weitere Erklärung wäre, dass eine Mischform aus Apoptose und Nekrose, die sogenannte Nekroptose, in den mit SiO₂-Partikeln behandelten RAW264.7-Zellen ausgelöst wird und dies zur

Ausbildung der nekrotischen Phänotypen führt. Dies konnte aber ebenfalls durch die Inhibition der zentralen Kinase RIP-1 durch Necrostatin ausgeschlossen werden (Hug, 2011).

Neben der Caspase-abhängigen Apoptose kann der programmierte Zelltod aber auch unabhängig von Caspasen ablaufen (Kroemer und Martin, 2005). Hierbei können ausgelöst durch die LMP Cathepsine zum proteolytischen Abbau der Zelle führen, wobei parallel die äußere Membran der Mitochondrien permeabilisiert wird (MOMP) und es zum Efflux von AIF (apoptosis inducing factor), HtrA serin peptidase 2/Omi, Endonuklease G und damit zur Apoptose kommt (Kroemer und Martin, 2005). Damit könnten die apoptotischen Merkmale, wie DNA-Kondensation, Blebbing, Phosphatidylserin-Switch in der Plasmamembran, erklärt werden. Industriell gefertigte amorphe SiO₂-NP (Aerosil A12) zeigen in RAW264.7-Zellen ebenfalls Nekrose, wobei ebenfalls der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK keinen Effekt auf die Toxizität hat (Marquardt, 2011). Damit scheint es, dass unterschiedlich gefertigte SiO₂-NP (nasschemisch und pyrolytisch) auf die gleiche Weise Zelltod in RAW264.7-Zellen auslösen. Ähnliche Beobachtungen wurden von Wilhelmi und Kollegen gemacht, wobei nach Behandlung mit amorphen SiO₂-NP zu frühen Zeitpunkten (4 h) mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (CDDE) Kit die Zunahme an Mono- und Oligonucleosomen in adhären Zellen detektiert wurde. Zu späteren Zeitpunkten (24 h) hingegen wird mit dem gleichen Assay auch freie DNA im Überstand gemessen, was auf Nekrose hindeutet (Wilhelmi et al., 2012).

Die membranschädigende Aktivität von SiO₂-NPs scheint in diesem Zusammenhang auf die Interaktion mit Silanolgruppen zurückgeführt werden zu können (Harley und Margolis, 1961; Lin und Haynes, 2010; Pandurangi et al., 1990; Slowing et al., 2009). Ein mögliches Szenario für den Hergang der LMP könnte daher sein, dass die vollständig mit Protein ummantelten SiO₂-Partikel (Abb. 44) zunächst in Endosome aufgenommen werden. Mit zunehmender Ansäuerung des Lumens werden lysosomale Proteasen aktiv, die die Proteinkorona abbauen und damit die SiO₂-Oberfläche freisetzen. Erste Hinweise für diesen Prozess geben bisher unveröffentlichte Ergebnisse von Wang und Kollegen, die zeigen, dass BSA-adsorbierte Nanopartikel in Lysosomen ihre Proteinschicht verlieren. Damit könnten SiO₂-NP ebenfalls ihre Proteinhülle verlieren und die freie SiO₂-Oberfläche mit der positiven Kopfgruppe von Phosphatidylcholinen in der Lysosomenmembran interagieren. Der Kontakt der deprotonierten Silanolgruppen mit der Membran der Lysosomen könnte dazu führen, dass die Membran destabilisiert wird, was zur Permeabilisierung führen könnte (Zhang et al., 2012).

Um dies weiter zu untersuchen, müssen Untersuchungen auf Einzelzellebene mittels Lebendzellmikroskopie durchgeführt werden, in denen z.B. das Ablösen der Proteinschicht von der Oberfläche der SiO₂-NP mit der lysosomalen Ruptur korreliert werden kann. Ein protektiver Effekt von Proteinen auf die Toxizität von SiO₂-NP konnte in RAW264.7-Zellen (Panas et al., 2012) beobachtet werden und in HeLa-Zellen wurde keine Toxizität gemessen (Al-Rawi et al., 2011). Grund für die ausbleibende Toxizität könnte in der geringeren Dosis liegen, die von HeLa-Zellen in Endosomen bzw. Lysosomen aufgenommen werden. Ohne Serum hingegen waren SiO₂-NP ebenfalls für HeLa-Zellen toxisch, wobei vermutet wurde, dass die Interaktion der SiO₂-Oberfläche mit der Plasmamembran zur Membranschädigung führt.

Morishige und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass Entzündungsreaktionen in RAW264.7-Zellen nach Exposition mit 70 nm SiO₂-NP ausgelöst werden, wobei dies von der Aktivierung von MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) und der Generierung von ROS durch die Superoxid-Dismutase (SOD) abhängig war (Morishige et al., 2012). Ähnliche Effekte konnten nach der Exposition von RAW264.7-Zellen mit industriell gefertigten 12 nm SiO₂-NP (Aerosil A12, Evonik Degussa) beobachtet werden, wobei die MAP-Kinasen ERK (extracellular-signal regulated kinase), p38 und JNK (c-Jun-N-terminale Kinase) die Transkription verschiedener pro-inflammatorischer Gene wie TNF α , IL-1, IL-6, COX-2 und iNOS vermittelte (Marquardt, 2011). Nach der Exposition mit unterschiedlich großen SiO₂-Partikeln konnte ebenfalls die Aktivierung der MAP-Kinasen in RAW264.7-Zellen beobachtet werden, wobei nur 70 nm SiO₂-NP die Phosphorylierung von ERK, p38 und JNK verursachten (Marco Al-Rawi, Diplomarbeit, 2008). Vorläufige Experimente zeigen, dass die Inhibition der Maturierung der Endosomen zu Lysosomen durch Bafilomycin A1 oder die Inhibition der Protease Cathepsin B zu einer reduzierten Aktivierung der MAP-Kinasen ERK, p38 und JNK sowie deren Zielgen TNF α .

Dies lässt darauf schließen, dass die LMP nach Partikelexposition die MAP-Kinasen aktiviert, wobei diese eine Entzündungsreaktion auslösen. Da die Inhibition der MAP-Kinasen den Zelltod nicht verhindert (Hug, 2011; Marquardt, 2011), könnte dies bedeuten, dass MAP-Kinasen parallel zum Zelltod aktiviert werden. Da die Untersuchung der Aktivierung der MAPK normalerweise durch biochemische Methoden im Gesamtextrakt durchgeführt wird, ist nicht auszuschließen, dass MAP-Kinasen in Nachbarzellen als Konsequenz des Zelltods aktiviert werden (Hug, 2011). Um dies zu adressieren werden in Zukunft Einzelzell-Analysen

mit Hilfe der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie (AHM) und phospho-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

4.10 SiO₂-NP akkumulieren unter serumfreien Bedingungen nicht intrazellulär, sondern liegen ohne Membran im Zytosol vor

Unter serumfreien Bedingungen wurden nicht-modifizierte SiO₂-NP nicht in Endosomen aufgenommen, wobei die SiO₂-NP vornehmlich extra- und intrazellulär an der Plasmamembran zu finden waren. Erstaunlicherweise konnten keine Membranstrukturen um die Partikel erkannt werden, was darauf schließen lässt, dass SiO₂-NP durch die Plasmamembran diffundieren. Geiser und Kollegen beobachteten mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie, dass Erythrozyten 78 und 200 nm Polystyrolpartikel aufnehmen, die ohne eine umschließende Membran im Inneren vorliegen. Da Erythrozyten im Gegensatz zu anderen Zelltypen keinen aktiven Aufnahmetransport durchführen, wurde von Geiser geschlossen, dass die Partikel über Diffusion aufgenommen wurden (Geiser et al., 2005). Mu und Kollegen zeigten in A549-Zellen, dass ohne Serum 14 nm SiO₂-NP mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 500 nm auch bei 4°C aufgenommen wurden, wobei dies ebenfalls auf eine passive Aufnahme schließen lässt (Mu et al., 2012).

In dem hier vorliegenden Fall könnten daher „nackte“ SiO₂-Partikel mit der positiven Kopfgruppe von Phosphatidylcholinen in der Plasmamembran interagieren und durch Fluktuationen in der Membran aufgenommen werden. Oberflächenmodifizierte SiO₂-NP hingegen wurden unabhängig von Serum im Kulturmedium aufgenommen..

4.11 Frei im Zytosol liegende SiO₂-NP lösen in RAW264.7-Zellen Autophagie aus

Neben freier SiO₂-NP im Zytosol nach Behandlung mit und ohne Serum wurde nach 5 h Inkubationszeit die Bildung von intrazellulären Vakuolen in der Hellfeldmikroskopie und der Transmissionselektronenmikroskopie beobachtet, die auf die Akkumulation von Autophagolysosomen hindeuteten. Diese besitzen eine Doppelmembran, wobei diese nur im Transmissionselektronenmikroskop zu beobachten waren. Ein weiterer Marker hierfür ist die prozessierte Form des Proteins LC3 (LC3-II), das nach Auslösen der Autophagie in Zellen akkumuliert. Dies konnte in RAW264.7-Zellen nach ca. 5 h nach Behandlung sowohl mit den hier untersuchten 70 nm SiO₂-NP als auch mit industriell gefertigten 12 nm SiO₂-NP (Aerosil A12, Evonik Industries) beobachtet werden (Ali, 2011; Marquardt, 2011). Andere Studien

konnten bisher zeigen, dass auch andere Nanoobjekte, wie Gold-Nanopartikel und Quantum Dots, in humanen Lungenfibroblasten (MRC-5) bzw. Meerschweinchen Nierenzellen zur Akkumulation von LC3-II führen (Li et al., 2010; Stern et al., 2008). Im vorliegenden Fall würde die Zelle versuchen, mit Hilfe der Autophagie freie Nanopartikel einzufangen, wobei zunächst Autophagosomen gebildet werden, die weitergehend mit Lysosomen zu Autophagolysosomen fusionieren (Stern et al., 2008). Damit könnte Autophagie parallel zur Induktion des Zelltods durch die LMP ausgelöst werden.

4.12 Die Toxizität von SiO₂-NP ist abhängig von der Oberflächenmodifikation

In den Zytotoxizitätsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die mit Amino- und Carboxylgruppen funktionalisierten 70 nm SiO₂-NP nicht zu einer Verringerung der Lebendzellzahl führten. Ähnliche Studien von Nabeshi und Kollegen zeigten mit Hilfe des Einbaus von ³H-markiertem Thymidin in die DNA von proliferierenden RAW264.7-Zellen, dass nicht-modifizierte SiO₂-NP im Gegensatz zu oberflächenmodifizierten 70 nm SiO₂-NP zytotoxisch waren. Die qualitative Analyse der Aufnahme der oberflächenmodifizierten SiO₂-NP in der Fluoreszenzmikroskopie zeigte aber, dass aminomodifizierte SiO₂-NP hauptsächlich am Rand der Zellen, carboxymodifizierte SiO₂-NP intrazellulär lokalisiert waren (Nabeshi et al., 2011a). Diese Beobachtungen wurden in dieser Arbeit nicht gemacht. Eine mögliche Erklärung könnte der Alterungsprozess von SiO₂-NP sein, wobei diese agglomerieren und auf die Zellen präzipitieren (Al-Rawi, 2008). Eine quantitative Analyse der zellulären Menge an SiO₂-NP, um Unterschiede in der Toxizität mit der Aufnahme korrelieren zu können, wurden nicht durchgeführt (Nabeshi et al., 2011a). Die gleiche Gruppe konnte kürzlich auch die Zytotoxizität in weiteren Zelllinien beobachten, wobei nicht-modifizierte SiO₂-NP im Vergleich zu oberflächenmodifizierten SiO₂-NP in HaCaT (humane Keratinozyten) und TLR-1-Zellen ROS und DNA-Schäden auslösen (Yoshida et al., 2012). Andere Beobachtungen wurden von Xia und Kollegen gemacht, die zeigen dass kationische Polystyrol-NP toxisch sind, was bedeutet, dass nicht allein die eingebrachte Ladung die Toxizität auslöst (Xia et al., 2008).

Um mögliche Unterschiede in der Aufnahme von verschieden-modifizierten SiO₂-NP zu untersuchen, wurde daher eine Quantifizierung mit Hilfe der Fluoreszenzspektrometrie und der automatisierten Hochdurchsatzmikroskopie durchgeführt. Hier zeigte sich, dass bei der Administration von 50 µg/ml SiO₂-NP im Expositionsmedium oberflächenmodifizierte SiO₂-NP schlechter aufgenommen wurden als nicht-modifizierte SiO₂-NP (ca. 50 %). Da die

Agglomeration als Ursache für eine erhöhte zelluläre Dosis durch die DLS-Messung ausgeschlossen werden konnte, lässt dies auf eine unterschiedliche Aufnahmerate der verschiedenen modifizierten SiO₂-NP in RAW264.7-Zellen schließen. Das bedeutet, dass die Oberflächenchemie von SiO₂-NP einen entscheidenden Einfluss auf die Aufnahmerate in RAW264.7-Zellen hat. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte die Proteinkorona liefern, die die Aufnahme in Zellen vermitteln kann. Biochemische Analyseverfahren zeigten quantitative und qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Korona von unterschiedlich modifizierten SiO₂-NP.

Damit ist bei vergleichbaren Experimenten (50 µg/ml) die Dosis von oberflächenmodifizierten SiO₂-NP doppelt so hoch wie bei nicht-modifizierten SiO₂-NP. Geht man von dieser Annahme aus, so müsste sich die Lebendzellzahl nach Exposition mit oberflächenmodifizierten SiO₂-NP bei 50 µg/ml halbieren. Dies ist aber nicht der Fall. Die konzentrationsabhängige Inkubation mit oberflächenmodifizierten SiO₂-NP bis 50 µg/ml zeigt nach 24 h keine Lebendzahlreduktion. In der Diplomarbeit von Nadine Hüll von 2009 wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, wobei oberflächenmodifizierte SiO₂-NP zu späteren Zeitpunkten (48 und 72 h) in RAW264.7-Zellen zu einer Reduktion der Lebendzellzahl führten (Toxizität: nicht-modifiziert >> amino-modifiziert >> carboxy-modifiziert). Da sich nicht-modifizierte und carboxy-modifizierte SiO₂-NP stark in der Toxizität unterschieden, konnte hieraus geschlossen werden, dass nicht allein die negative Ladung als Erklärung für die Toxizität ausgemacht werden kann (Hüll, 2009). Hierfür kann es mehrere Erklärungsmöglichkeiten geben:

- 1) Endosomen mit oberflächenmodifizierten SiO₂-NP maturieren langsamer zum Lysosom, d.h. es braucht länger bis die LMP einsetzen kann.
- 2) Oberflächenmodifizierte SiO₂-NP werden nach der Aufnahme ebenso wieder ins Medium abgegeben, wobei sich ein Gleichgewicht einstellt und eine geringere intrazelluläre Dosis zu detektieren ist.
- 3) Oberflächenmodifizierte SiO₂-NP lösen die lysosomale Ruptur nicht aus, da die Interaktion von Silanolgruppen mit Proteinen und Lipiden durch die Oberflächenmodifikation verringert ist.

Um dies weitergehend zu untersuchen, müssen mittels Mikroskopie Kolokalisationsstudien mit endosomalen/lysosomalen Markern (z.B. Rab5, Rab7, LAMP) durchgeführt werden, die es ermöglichen, den genauen intrazellulären Ort der SiO₂-NP zu bestimmen.

4.13 Modell der SiO₂-NP induzierten Toxizität in RAW264.7-Zellen

Zusammengefasst könnte die SiO₂-NP induzierte Toxizität in RAW264.7, wie im folgenden Modell skizziert, ablaufen (Abb. 51).

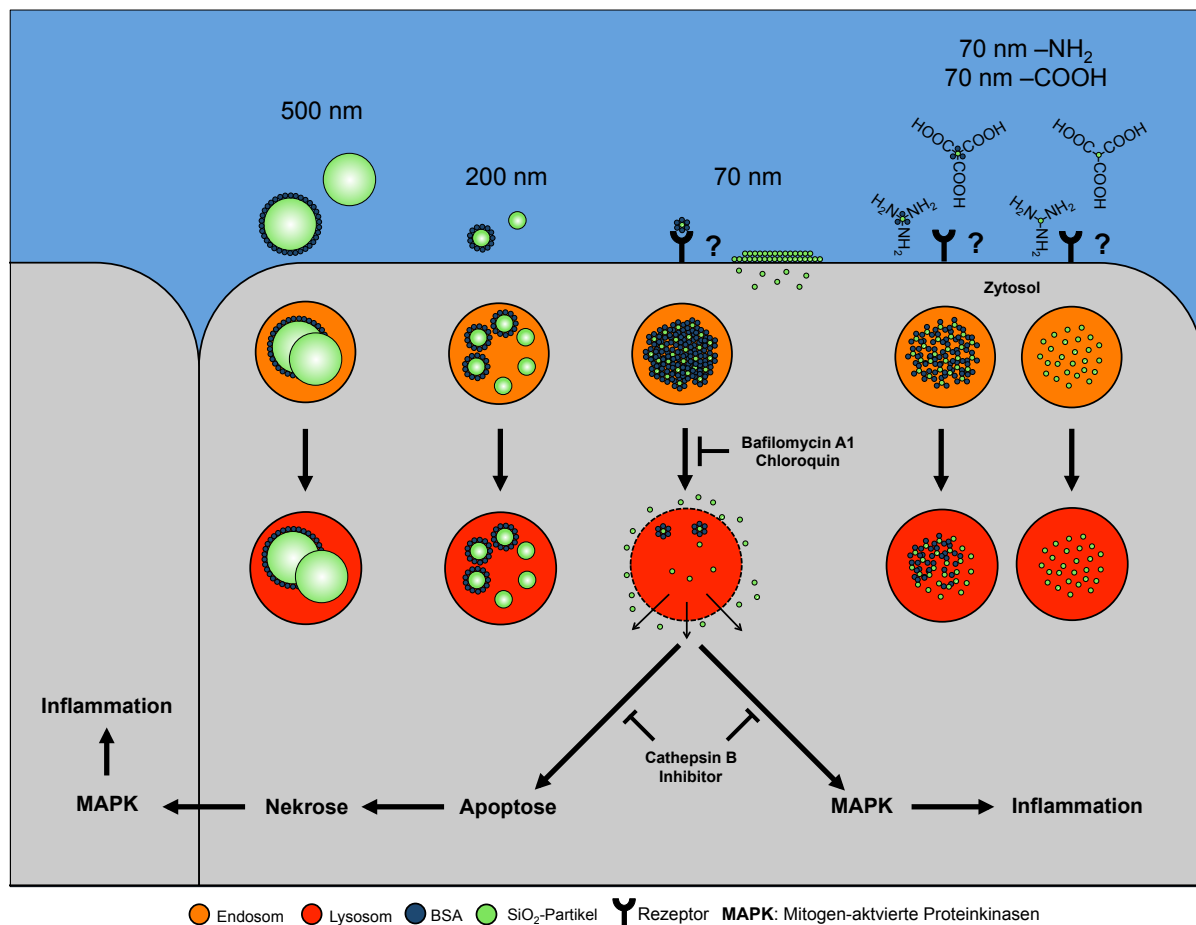


Abbildung 51: Modell der SiO₂-NP induzierten Toxizität in RAW264.7-Zellen.

Unter Serumbedingungen werden SiO₂-Partikel in Endosome aufgenommen, wobei 70 nm SiO₂-NP in Lysosome zur lysosomalen Membranpermeabilisierung (LMP) führen und damit die Apoptose aktiviert wird. Zu späteren Zeitpunkten werden die Zellen nekrotisch, wobei dies dazu führen kann, dass durch die Freisetzung von zytosolischen Bestandteile Entzündungsreaktionen in Nachbarzellen über den MAPK-Signalwege auslöst werden. Parallel kann die MAPK-Aktivierung durch LMP verursacht werden, wobei die Inhibition lysosomaler Proteine, wie Cathepsin B die MAPK-Aktivierung verhindert und damit die weitere Expression von Entzündungsmediatoren ausbleiben. Unter serumfreien Bedingungen

werden 200 und 500 nm SiO₂-MP ebenfalls in Endosome aufgenommen. 70 nm SiO₂-NP hingegen sind hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert, wobei einzelne nicht membranumschlossene Partikel frei im Zytosol vorliegen. Oberflächenmodifizierte SiO₂-NP sind unabhängig von Serumproteinen hauptsächlich in Endosomen lokalisiert.

5. Referenzen

- Aderem A und Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology* 17:593-623
- Ahmad J, Ahamed M, Akhtar MJ, Alrokayan SA, Siddiqui MA, Musarrat J, Al-Khedhairi AA (2012) Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicology and Applied Pharmacology* 259(2):160-168
- Ahmed N, Fessi H, Elaissari A (2012) Theranostic applications of nanoparticles in cancer. *Drug Discovery Today* 17(17-18):928-934
- Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S (2012) Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters* 7(1):144
- Al-Rawi M (2008) Aufnahme und Lokalisation von Siliziumdioxid-Nanopartikeln in Säugerzellen. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (TH)
- Al-Rawi M, Diabaté S, Weiss C (2011) Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells. *Archives of Toxicology* 85(7):813-26
- Albanese A, Tang PS, Chan WCW (2012) The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering* 14(1):1-16
- Albrecht C, Scherbart AM, Berlo Dv, Braunbarth CM, Schins RPF, Scheel J (2009) Evaluation of cytotoxic effects and oxidative stress with hydroxyapatite dispersions of different physicochemical properties in rat NR8383 cells and primary macrophages. *Toxicology in Vitro* 23(3):520-530
- Ali M (2011) Untersuchung von Siliziumdioxid-Nanopartikeln auf Toxizität und Aufnahme in Makrophagen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopie-basierten Screenings. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annual review of biochemistry* 67(1):199-225
- Baier G, Costa C, Zeller A, Baumann D, Sayer C, Araujo PHH, Mailänder V, et al. (2011) BSA Adsorption on Differently Charged Polystyrene Nanoparticles using Isothermal Titration Calorimetry and the Influence on Cellular Uptake. *Macromolecular Bioscience* 11(5):628-638
- Balivada S, Rachakatla RS, Wang H, Samarakoon TN, Dani RK, Pyle M, Kroh FO, et al. (2010) A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron(0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. 1-9
- Bataille AM und Manautou JE (2012) Nrf2: A Potential Target for New Therapeutics in Liver Disease. *Clin Pharmacol Ther* 92(3):340-348
- Bedard K und Krause K-H (2007) The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* 87(1):245-313
- Beduneau A, Ma Z, Grotepas CB, Kabanov A, Rabinow BE, Gong N, Mosley RL, et al. (2009) Facilitated monocyte-macrophage uptake and tissue distribution of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles. *PLoS ONE* 4(2):e4343
- Berne BJ und Pecora R (2000) Dynamic light scattering : with applications to chemistry, biology, and physics. Dover Publications, Mineola, N.Y.
- Bernhard HP, Darlington GJ, Ruddle FH (1973) Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells: Synthesis and secretion of serum albumin. *Developmental Biology* 35(1):83-96
- Berret J-F, Sandre O, Mauger A (2007) Size distribution of superparamagnetic particles determined by magnetic sedimentation. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 23(6):2993-2999

- Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: El-Gewely MR (ed) *Biotechnology Annual Review*. vol Volume 11. Elsevier, p 127-152
- Berridge MV und Tan AS (1998) Trans-plasma membrane electron transport: A cellular assay for NADH- and NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1. *Protoplasma* 205(1-4):74-82
- Bhattacharya S, Zhang Q, Carmichael PL, Boekelheide K, Andersen ME (2011) Toxicity Testing in the 21st Century: Defining New Risk Assessment Approaches Based on Perturbation of Intracellular Toxicity Pathways. *PLoS ONE* 6(6):e20887
- Bihari P, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga AG, Reichel CA, Coester C, et al. (2008) Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Particle and Fibre Toxicology* 5(1):14
- Boya P und Kroemer G (2008) Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27(50):6434-6451
- Brodersen R, Honoré B, Andersen S (1988) Palmitate binding to serum albumin, measured by rate of dialysis. *European Journal of Biochemistry* 174(1):45-50
- Brodsky FM, Chen C-Y, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE (2001) BIOLOGICAL BASKET WEAVING: Formation and Function of Clathrin-Coated Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17(1):517-568
- Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, et al. (2004) Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 109(21):2655-2671
- Brown DM, Dickson C, Duncan P, Al-Attili F, Stone V (2010) Interaction between nanoparticles and cytokine proteins: impact on protein and particle functionality. *Nanotechnology* 21(21):215104
- Brumfiel G (2006) Consumer products leap aboard the nano bandwagon. *Nature* 440(7082):262-262
- Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A, et al. (2006) In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental science & technology* 40(14):4374-4381
- Cai W und Chen X (2008) Multimodality Molecular Imaging of Tumor Angiogenesis. *Journal of Nuclear Medicine* 49(Suppl 2):113S-128S
- Carvalho TC, Peters JI, Williams III RO (2011) Influence of particle size on regional lung deposition - What evidence is there? *International journal of pharmaceutics* 406(1-2):1-10
- Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ, Puentes V (2010) Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano* 4(7):3623-3632
- Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård T, Thulin E, Nilsson H, Dawson K, et al. (2007) Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(7):2050
- Chang B, Guo J, Liu C, Qian J, Yang W (2010) Surface functionalization of magnetic mesoporous silica nanoparticles for controlled drug release. *Journal of Materials Chemistry* 20(44):9941-9947
- Chang J-S, Chang KLB, Hwang D-F, Kong Z-L (2007) In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environmental science & technology* 41(6):2064-2068
- Chanteau B, Fresnais J, Berret J-F (2009) Electrosteric Enhanced Stability of Functional Sub-10 nm Cerium and Iron Oxide Particles in Cell Culture Medium. *Langmuir* 25(16):9064-9070

- Chao S (2001) Cell Surface Regulation of Silica-Induced Apoptosis by the SR-A Scavenger Receptor in a Murine Lung Macrophage Cell Line (MH-S). *Toxicology and Applied Pharmacology* 174(1):10-16
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 61(2):192-208
- Chen M und von Mikecz A (2005) Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Experimental cell research* 305(1):51-62
- Chen Y-P, Chen H-A, Hung Y, Chien F-C, Chen P, Mou C-Y (2012) Surface charge effect in intracellular localization of mesoporous silica nanoparticles as probed by fluorescent ratiometric pH imaging. *RSC Advances* 2(3):968-973
- Chimini G und Chavrier P (2000) Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol* 2(10):E191-E196
- Cho EC, Zhang Q, Xia Y (2011) The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*
- Cho W-S, Choi M, Han BS, Cho M, Oh J, Park K, Kim SJ, et al. (2007) Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. *Toxicology Letters* 175(1-3):24-33
- Choi KY, Liu G, Lee S, Chen X (2012) Theranostic nanoplatforms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives. *Nanoscale* 4(2):330-342
- Choi S-J, Oh J-M, Choy J-H (2009) Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103(3):463-471
- Clift MJD, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R, Donaldson K, Proudfoot L, Guy K, et al. (2008) The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*:1-10
- Cole AJ, Yang VC, David AE (2011) Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology* 29(7):323-332
- Conner SD und Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927):37-44
- Crompton T, Peitsch MC, MacDonald HR, Tschopp J (1992) Propidium iodide staining correlates with the extent of DNA degradation in isolated nuclei. *Biochemical and biophysical research communications* 183(2):532-537
- D'Autréaux B und Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(10):813-824
- Dekkers S, Bouwmeester H, Bos PMJ, Peters RJB, Rietveld AG, Oomen AG (2012) Knowledge gaps in risk assessment of nanosilica in food: evaluation of the dissolution and toxicity of different forms of silica. *Nanotoxicology*:1-11
- Dekkers S, Krystek P, Peters RJB, Lankveld DXeLPK, Bokkers BGH, van Hoeven-Arentzen PH, Bouwmeester H, et al. (2010) Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology*
- Del Vecchio S, Zannetti A, Fonti R, Pace L, Salvatore M (2007) Nuclear imaging in cancer theranostics. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of* 51(2):152-163
- Dobrovolskaia MA, Germolec DR, Weaver JL (2009) Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. *Nature Nanotechnology* 4(7):411-414

- Dobrovolskaia MA und Mcneil SE (2007) Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology* 2(8):469-478
- Donaldson K und Borm PJ (1998) The quartz hazard: a variable entity. *The Annals of occupational hygiene* 42(5):287-294
- Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, Macnee W, et al. (2005) Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology* 2:10
- dos Santos T, Varela J, Lynch I, Salvati A, Dawson KA (2011) Quantitative Assessment of the Comparative Nanoparticle-Uptake Efficiency of a Range of Cell Lines. *Small* 7(23):3341-3349
- Drescher D, Orts-Gil G, Laube G, Natte K, Veh RW, Österle W, Kneipp J (2011) Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400(5):1367-1373
- Droga-Mazovec G, Bojič L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, Salvesen GS, et al. (2008) Cysteine Cathepsins Trigger Caspase-dependent Cell Death through Cleavage of Bid and Antiapoptotic Bcl-2 Homologues. *Journal of Biological Chemistry* 283(27):19140-19150
- Duffin R, Tran L, Brown D, Stone V, Donaldson K (2007) Proinflammogenic Effects of Low-Toxicity and Metal Nanoparticles In Vivo and In Vitro: Highlighting the Role of Particle Surface Area and Surface Reactivity. *Inhalation Toxicology* 19(10):849-856
- Dutta D und Moudgil BM (2007) Crystalline silica particles mediated lung injury. *KONA* 25:76
- Dutta D, Sundaram SK, Teeguarden JG, Riley BJ, Fifield LS, Jacobs JM, Addleman SR, et al. (2007) Adsorbed Proteins Influence the Biological Activity and Molecular Targeting of Nanomaterials. *Toxicological Sciences* 100(1):303-315
- Elliott JA und Winn WC (1986) Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity* 51(1):31-36
- Eom H-J und Choi J (2009) Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicology in Vitro* 23(7):1326-1332
- Eskelinen E-L, Tanaka Y, Saftig P (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends in cell biology* 13(3):137-145
- FAO/WHO (2010) FAO/WHO Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications - Meeting report. 1-134
- Fertsch-Gapp S, Semmler-Behnke M, Wenk A, Kreyling WG (2011) Binding of polystyrene and carbon black nanoparticles to blood serum proteins. *Inhalation Toxicology* 23(8):468-475
- Fink S und Cookson B (2005) Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and immunity* 73(4):1907
- França A, Aggarwal P, Barsov EV, Kozlov SV, Dobrovolskaia MA, González-Fernández Á (2011) Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages in vitro. *Nanomedicine* 6(7):1175-1188
- Frisch S und Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 124(4):619-626
- Galimard A, Safi M, Ould-Moussa N, Montero D, Conjeaud H, Berret J-F (2012) Thirty-femtogram detection of iron in Mammalian cells. *Small* 8(13):2036-2044
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Rankin N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, et al. (2005) Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Non-Phagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environmental Health Perspectives*:1-6

- Gemeinhart RA, Luo D, Saltzman WM (2005) Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. *Biotechnology progress* 21(2):532-537
- George S, Pokhrel S, Xia T, Gilbert B, Ji Z, Schowalter M, Rosenauer A, et al. (2010) Use of a rapid cytotoxicity screening approach to engineer a safer zinc oxide nanoparticle through iron doping - Supplements. *ACS Nano* 4(1):15-29
- Giovine M, Pozzolini M, Fenoglio I, Scarfi S, Ghiazza M, Benatti U, Fubini B (2002) Crystalline silica incubated in ascorbic acid acquires a higher cytotoxic potential. *Toxicology and Industrial Health* 18(5):249-255
- Golstein P und Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences* 32(1):37-43
- Grassian VH, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, O'Shaughnessy PI, Thorne PS (2007) Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles: Comparison of size effects through different exposure routes. *Nanotoxicology* 1(3):211-226
- Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(33):11613-11618
- Greish K (2010) Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting. In: Grobmyer SR, Moudgil BM (eds) *Cancer Nanotechnology. Methods in Molecular Biology*, vol 624. Humana Press, p 25-37
- Gupta AK und Gupta M (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26(18):3995-4021
- Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V (2004) Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis Survival in Infected Macrophages. *Cell* 119(6):753-766
- Gye W und Purdy W (1922) The Poisonous Properties of Colloidal Silica. I: The Effects of the Parenteral Administration of Large Doses. *British journal of experimental pathology* 3(2):75
- Haas A (2007) The Phagosome: Compartment with a License to Kill. *Traffic* 8(4):311-330
- Hamilton RF, de Villiers WJS, Holian A (2000) Class A Type II Scavenger Receptor Mediates Silica-Induced Apoptosis in Chinese Hamster Ovary Cell Line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 162(2):100-106
- Han X, Gelein R, Corson N, Wade-Mercer P, Jiang J, Biswas P, Finkelstein JN, et al. (2011) Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology* 287(1-3):99-104
- Hande KR (1998) Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 34(10):1514-1521
- Harley JD und Margolis J (1961) Haemolytic activity of colloidal silica. *Nature* 189:1010-1011
- Hirayama K, Akashi S, Furuya M, Fukuhara K-i (1990) Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS. *Biochemical and biophysical research communications* 173(2):639-646
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, et al. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology* 1(6):489-495
- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, et al. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology* 9(8):847-856

- Hoskins C, Wang L, Cheng W, Cuschieri A (2012) Dilemmas in the reliable estimation of the in-vitro cell viability in magnetic nanoparticle engineering: which tests and what protocols? *Nanoscale Research Letters* 7(1):77
- Huang D-M, Hung Y, Ko B-S, Hsu S-C, Chen W-H, Chien C-L, Tsai C-P, et al. (2005) Highly efficient cellular labeling of mesoporous nanoparticles in human mesenchymal stem cells: implication for stem cell tracking. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19(14):2014-2016
- Hug V (2011) Untersuchung der Toxizität von Siliziumdioxid-Nanopartikeln in murinen Makrophagen mittels mikroskopischer Hochdurchsatzverfahren. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
- Hüll N (2009) Biologische und toxische Wirkung von Nanopartikeln auf Makrophagen. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (TH)
- Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LCJ, Martens JA, Billon-Galland MA, et al. (2009) Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology* 260(1-3):142-149
- Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi M, He P-g (1993) A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 41(6):1118-1122
- Iyer R, Hamilton RF, Li L, Holian A (1996) Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology* 141(1):84-92
- Jacobsen J und Brodersen R (1983) Albumin-bilirubin binding mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 258(10):6319-26
- Jamur MC und Oliver C (2010) Permeabilization of Cell Membranes. In: Oliver C, Jamur MC (eds) *Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 588. Humana Press, p 63-66
- Jana NR, Earhart C, Ying JY (2007) Synthesis of Water-Soluble and Functionalized Nanoparticles by Silica Coating. *Chemistry of Materials* 19(21):5074-5082
- Jiang X, Weise S, Hafner M, Rucker C, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU (2009) Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *Journal of The Royal Society Interface*:1-9
- Jin Y, Kannan S, Wu M, Zhao JX (2007) Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells. *Chemical research in toxicology* 20(8):1126-1133
- Johannsen M, Thiesen B, Wust P, Jordan A (2010) Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *International Journal of Hyperthermia* 26(8):790-795
- Kanno S, Furuyama A, Hirano S (2007) A murine scavenger receptor MARCO recognizes polystyrene nanoparticles. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 97(2):398-406
- Kirby BJ und Hasselbrink EF (2004) Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *ELECTROPHORESIS* 25(2):187-202
- Kittler S, Greulich C, Gebauer JS, Diendorf J, Treuel L, Ruiz L, Gonzalez-Calbet JM, et al. (2009) The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 20(3):512
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, et al. (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4(2):151-175
- Korzeniewski C und Callewaert DM (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of immunological methods* 64(3):313-320

- Kratz F (2008) Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 132(3):171-183
- Kroemer G und Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11(7):725-730
- Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J (2009) Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72(2):370-377
- Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P (2008) Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods (San Diego, Calif)* 44(3):205-221
- Kühn A (1921) Über die Wirkung intravenöser Kieselsäureinjektionen bei Arteriosklerose, Stenokardie und verwandten Zuständen. *Münch med Wochenschr*
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685
- Lai Y, Chiang P-C, Blom J, Li N, Shevlin K, Brayman T, Hu Y, et al. (2008) Comparison of In vitro Nanoparticles Uptake in Various Cell Lines and In vivo Pulmonary Cellular Transport in Intratracheally Dosed Rat Model. *Nanoscale Research Letters* 3(9):321 - 329
- Lajoie P und Nabi IR (2010) Chapter 3 - Lipid Rafts, Caveolae, and Their Endocytosis. In: Kwang WJ (ed) *International Review of Cell and Molecular Biology*. vol Volume 282. Academic Press, p 135-163
- Landsiedel R, Ma-Hock L, Kroll A, Hahn D, Schnekenburger J, Wiench K, Wohlleben W (2010) Testing Metal-Oxide Nanomaterials for Human Safety. *Advanced Materials* 22(24):2601-2627
- Latt S und Wohlleb J (1975) Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 52(4):297-316
- Lesniak A, Campbell A, Monopoli MP, Lynch I, Salvati A, Dawson KA (2010) Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials* 31(36):9511-9518
- Li JJ, Hartono D, Ong C-N, Bay B-H, Yung L-YL (2010) Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials* 31(23):5996-6003
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, et al. (2003) Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environmental Health Perspectives* 111(4):455
- Lin W, Huang Y-W, Zhou X-D, Ma Y (2006) In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217(3):252-259
- Lin Y-S und Haynes CL (2010) Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *Journal of the American Chemical Society* 132(13):4834-4842
- Lison D, Thomassen LCJ, Rabolli V, Gonzalez L, Napierska D, Seo JW, Kirsch-Volders M, et al. (2008) Nominal and Effective Dosimetry of Silica Nanoparticles in Cytotoxicity Assays. *Toxicological Sciences* 104(1):155-162
- Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M (2007) Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *International Journal of Cancer* 120(12):2527-2537
- Lu A-H, Salabas EL, Schüth F (2007a) Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* 46(8):1222-1244
- Lu J, Liong M, Sherman S, Xia T, Kovochich M, Nel AE, Zink JI, et al. (2007b) Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy: Energy-Dependent Cellular Uptake and Delivery of Paclitaxel to Cancer Cells. *Nanobiotechnology : the journal at the*

- intersection of nanotechnology, molecular biology, and biomedical sciences 3(2):89-95
- Luke CJ, Pak SC, Askew YS, Naviglia TL, Askew DJ, Nobar SM, Vetica AC, et al. (2007) An Intracellular Serpin Regulates Necrosis by Inhibiting the Induction and Sequelae of Lysosomal Injury. *Cell* 130(6):1108-1119
- Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA (2008) Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(38):14265-14270
- Lunov O, Syrovets T, Buchele B, Jiang X, Röcker C, Tron K, Nienhaus GU, et al. (2010a) The effect of carboxydextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles on c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis in human macrophages. *Biomaterials*:1-9
- Lunov O, Syrovets T, Röcker C, Tron K, Ulrich Nienhaus G, Rasche V, Mailänder V, et al. (2010b) Lysosomal degradation of the carboxydextran shell of coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and the fate of professional phagocytes. *Biomaterials* 31(34):9015-9022
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(8):622-632
- Lynch I und Dawson K (2008) Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 3(1-2):40-47
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(9):741-752
- Marquardt C (2011) Regulation der anti-oxidativen, inflammatorischen und zytotoxischen Wirkung nach SiO₂ Nanopartikel Exposition in Makrophagen. Doktorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe. Doktorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
- Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdörster G, Philbert MA, et al. (2006) Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444(7117):267-269
- McBain SC, Yiu HHP, Dobson J (2008) Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International journal of nanomedicine* 3(2):169-180
- Moffat J und Sabatini DM (2006) Building mammalian signalling pathways with RNAi screens. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(3):177-187
- Mohamed BM, Verma NK, Prina-Mello A, Williams Y, Davies AM, Bakos G, Tormey L, et al. (2011) Activation of stress-related signalling pathway in human cells upon SiO₂ nanoparticles exposure as an early indicator of cytotoxicity. *Journal of nanobiotechnology* 9(1):29
- Molday RS und Mackenzie D (1982) Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *Journal of immunological methods* 52(3):353-367
- Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K (2007) The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occupational and environmental medicine* 64(9):609-615
- Moore A, Marecos E, Bogdanov A, Weissleder R (2000) Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology* 214(2):568-574
- Moore A, Weissleder R, Bogdanov A (1997) Uptake of dextran-coated monocrySTALLINE iron oxides in tumor cells and macrophages. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 7(6):1140-1145

- Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Narimatsu S, Yao X, Monobe Y, et al. (2012) Suppression of nanosilica particle-induced inflammation by surface modification of the particles. *Archives of Toxicology* 86(8):1297-1307
- Mu Q, Hondow NS, Krzemiński L, Brown AP, Jeuken LJ, Routledge MN (2012) Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology* 9(1):29
- Müller K, Skepper JN, Posfai M, Trivedi R, Howarth S, Corot C, Lancelot E, et al. (2007) Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. *Biomaterials* 28(9):1629-1642
- Murdock R, Braydich-Stolle L, Schrand A, Schlager J, Hussain S (2008) Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci* 101:239 - 253
- Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S (2005) Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* 182(1):1-15
- Nabeshi H, Yoshikawa T, Arimori A (2011a) Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale* ...
- Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Tochigi S, Kondoh S, Hirai T, et al. (2011b) Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Particle and Fibre Toxicology* 8:1
- Nachlas MM, Margulies SI, Goldberg JD, Seligman AM (1960) The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Analytical biochemistry* 1(4-5):317-326
- Napierska D, Thomassen LCJ, Lison D, Martens JA, Hoet PH (2010) The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and Fibre Toxicology* 7(1):39
- Napierska D, Thomassen LCJ, Rabolli V, Lison D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, Martens JA, et al. (2009) Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells. *Small* 5(7):846-853
- Naqvi S, Samim M, Abdin M (2010) Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine* 5(1):7
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311:622 - 627
- Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, et al. (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Publishing Group* 8(7):543-557
- Nie S, Xing Y, Kim GJ, Simons JW (2007) Nanotechnology Applications in Cancer. *Annual Review of Biomedical Engineering* 9(1):257-288
- Nilsson C, Johansson U, Johansson A-C, Kågedal K, Öllinger K (2006) Cytosolic acidification and lysosomal alkalization during TNF- α induced apoptosis in U937 cells. *Apoptosis* 11(7):1149-1159
- Niwa Y und Iwai N (2007) Nanomaterials induce oxidized low-density lipoprotein cellular uptake in macrophages and platelet aggregation. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 71(3):437-444
- Oberdörster G (2010) Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine* 267(1):89-105
- Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, et al. (2005a) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials- elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology* 2(1):8

- Oberdörster G, Oberdorster E, Oberdörster J (2005b) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 113(7):823-839
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004) Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhalation Toxicology* 16(6-7):437-445
- OECD (2005) Screening information data set (Synthetic amorphous silica and silicates, CAS-No.1344-00-9, CAS-No.1344-95-2, CAS-No.7631-86-9, CAS-No.112926-00-8, CAS-No.112945-52-5).1-254
- Okeson CD, Riley MR, Riley-Saxton E (2004) In vitro alveolar cytotoxicity of soluble components of airborne particulate matter: effects of serum on toxicity of transition metals. *Toxicology in Vitro* 18(5):673-680
- Orr GA, Chrisler WB, Cassens KJ, Tan R, Tarasevich BJ, Markillie LM, Zangar RC, et al. (2010) Cellular recognition and trafficking of amorphous silica nanoparticles by macrophage scavenger receptor A. *Nanotoxicology*
- Orts-Gil G, Natte K, Drescher D, Bresch H, Manton A, Kneipp J, Österle W (2011) Characterisation of silica nanoparticles prior to in vitro studies: from primary particles to agglomerates. *Journal of Nanoparticle Research* 13(4):1593-1604
- Pan Z, Lee W, Slutsky L, Clark RAF, Pernodet N, Rafailovich MH (2009) Adverse Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts and How to Protect Cells. *Small* 5(4):511-520
- Panas A, Marquardt C, Nalcaci O, Bockhorn H, Baumann W, Paur HR, Mülhopt S, et al. (2012) Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology*:1-15
- Pandurangi RS, Seehra MS, Razzaboni BL, Bolsaitis P (1990) Surface and bulk infrared modes of crystalline and amorphous silica particles: a study of the relation of surface structure to cytotoxicity of respirable silica. *Environmental Health Perspectives* 86:327
- Park E-J und Park K (2009) Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology Letters* 184(1):18-25
- Park J-H, Gu L, von Maltzahn G, Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ (2009a) Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. *Nat Mater* 8(4):331-336
- Park MVDZ, Annema W, Salvati A, Lesniak A, Elsaesser A, Barnes C, Mckerr G, et al. (2009b) In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 240(1):108-116
- Patel PC, Giljohann DA, Daniel WL, Zheng D, Prigodich AE, Mirkin CA (2010) Scavenger Receptors Mediate Cellular Uptake of Polyvalent Oligonucleotide-Functionalized Gold Nanoparticles. *Bioconjugate chemistry* 21(12):2250-2256
- Pelkmans L, Fava E, Grabner H, Hannus M, Habermann B, Krausz E, Zerial M (2005) Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436(7047):78-86
- Pelkmans L und Helenius A (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3(5):311-320
- Pepperkok R und Ellenberg J (2006) High-throughput fluorescence microscopy for systems biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(9):690-696
- Pope CA (2003) Cardiovascular Mortality and Long-Term Exposure to Particulate Air Pollution: Epidemiological Evidence of General Pathophysiological Pathways of Disease. *Circulation* 109(1):71-77

- Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G, Wolf G (1997) 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS letters* 416(2):175-178
- Quent VMC, Loessner D, Friis T, Reichert JC, Hutmacher DW (2010) Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14(4):1003-1013
- Quignard S, Mosser G, Boissière M, Coradin T (2012) Long-term fate of silica nanoparticles interacting with human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 33(17):4431-4442
- Rabolli V, Thomassen LCJ, Princen C, Napierska D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, Hoet PH, et al. (2010) Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types. *Nanotoxicology* 4(3):307-318
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I (1978) Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell* 15(1):261-267
- Raub TJ, Koroly MJ, Roberts RM (1990) Endocytosis of wheat germ agglutinin binding sites from the cell surface into a tubular endosomal network. *Journal of cellular physiology* 143(1):1-12
- Reed RK (1981) Albumin concentration and colloid osmotic pressure of interstitial fluid collected by wick technique from rat skeletal muscle. Evaluation of the method. *Acta Physiologica Scandinavica* 112(1):1-5
- Röcker C, Pötzl M, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU (2009) A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nature Nanotechnology* 4(9):577-580
- Roth M (1921) Zur Frage der Kieselsäurebehandlung bei Lungentuberkulose. *Therap d Gegenw* 62(369)
- Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Piallier-Boyles M, Kinloch IA, Windle AH, Gehr P, Stone V (2010) Relating the physicochemical characteristics and dispersion of multiwalled carbon nanotubes in different suspension media to their oxidative reactivity in vitro and inflammation in vivo. *Nanotoxicology* 4(3):331-342
- Ruh H, Kühl B, Brenner-Weiss G, Hopf C, Diabaté S, Weiss C (2012) Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials. *Toxicology Letters* 208(1):41-50
- Safi M, Courtois J, Seigneuret M, Conjeaud H, Berret J-F (2011) The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*:1-11
- Safi M, Sarrouj H, Sandre O, Mignet N, Berret J-F (2010) Interactions between sub-10-nm iron and cerium oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts: the role of the coating and aggregation state. *Nanotechnology* 21(14):145103
- Saftig P und Klumperman J (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(9):623-635
- Sanmun D, Witasap E, Jitkaew S, Tyurina YY, Kagan VE, Öhlin A, Palmblad J, et al. (2009) Involvement of a functional NADPH oxidase in neutrophils and macrophages during programmed cell clearance: implications for chronic granulomatous disease. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 297(3):C621-C631
- Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, et al. (2006) Correlating Nanoscale Titania Structure with Toxicity: A Cytotoxicity and Inflammatory Response Study with Human Dermal Fibroblasts and Human Lung Epithelial Cells. *Toxicological Sciences* 92(1):174-185
- Schaller J, Gerber S, Kaempfer U, Lejon S, Trachsel C (2008) *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*. John Wiley & Sons

- Scheffler L, Sartory A, Pellissier I (1920) Sur l'emploi du silicate de soude en injections intraveineuses; efets physiologiques; efets therapeutiques. *Comp rend Acad des Sci* 171(414)
- Schlorf T, Meincke M, Kossel E, Glöer C-C, Jansen O, Mentlein R (2010) Biological Properties of Iron Oxide Nanoparticles for Cellular and Molecular Magnetic Resonance Imaging. *International Journal of Molecular Sciences* 12(1):12-23
- Schroeder HW und Cavacini L (2010) Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125(2):S41-S52
- Schulze C, Schulze C, Kroll A, Schulze C, Kroll A, Lehr C-M, Schäfer UF, et al. (2008) Not ready to use – overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology* 2(2):51-61
- Shaw SY, Westly EC, Pittet MJ, Subramanian A, Schreiber SL, Weissleder R (2008) Perturbational profiling of nanomaterial biologic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(21):7387-7392
- Shellman YG, Howe WR, Miller LA, Goldstein NB, Pacheco TR, Mahajan RL, Larue SM, et al. (2008) Hyperthermia Induces Endoplasmic Reticulum-Mediated Apoptosis in Melanoma and Non-Melanoma Skin Cancer Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 128(4):949-956
- Shi H, He X, Yuan Y, Wang K, Liu D (2010) Nanoparticle-based biocompatible and long-life marker for lysosome labeling and tracking. *Analytical chemistry* 82(6):2213-2220
- Shi J, Karlsson HL, Johansson K, Gogvadze V, Xiao L, Li J, Burks T, et al. (2012) Microsomal Glutathione Transferase 1 Protects Against Toxicity Induced by Silica Nanoparticles but Not by Zinc Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* 6(3):1925-1938
- Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu C-W, Lin VS-Y (2008) Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced drug delivery reviews* 60(11):1278-1288
- Slowing II, Wu C-W, Vivero-Escoto JL, Lin VSY (2009) Mesoporous Silica Nanoparticles for Reducing Hemolytic Activity Towards Mammalian Red Blood Cells. *Small* 5(1):57-62
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150(1):76-85
- Sohn LL (1998) Nanotechnology: A quantum leap for electronics. *Nature* 394(6689):131-132
- Starkuviene V und Pepperkok R (2007) The potential of high-content high-throughput microscopy in drug discovery. *British Journal of Pharmacology* 152(1):62-71
- Stayton I, Winiarz J, Shannon K, Ma Y (2009) Study of uptake and loss of silica nanoparticles in living human lung epithelial cells at single cell level. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394(6):1595-1608
- Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(8):513-525
- Stępnik M, Arkusz J, Smok-Pieniżek A, Bratek-Skicki A, Salvati A, Lynch I, Dawson KA, et al. (2012) Cytotoxic effects in 3T3-L1 mouse and WI-38 human fibroblasts following 72-hour and 7-day exposures to commercial silica nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 263(1):89-101
- Stern ST, Zolnik BS, Mcleland CB, Clogston J, Zheng J, Mcneil SE (2008) Induction of Autophagy in Porcine Kidney Cells by Quantum Dots: A Common Cellular Response to Nanomaterials? *Toxicological Sciences* 106(1):140-152
- Stöber W, Fink A, Bohn E (1968) Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of colloid and interface science* 26(1):62-69
- Stoeger T, Reinhard C, Takenaka S, Schroepfel A, Karg E, Ritter B, Heyder J, et al. (2005) Instillation of Six Different Ultrafine Carbon Particles Indicates a Surface Area

- Threshold Dose for Acute Lung Inflammation in Mice. *Environmental Health Perspectives* 114(3):328-333
- Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer* 21(3):274-281
- Stone V, Johnston H, Schins RPF (2009) Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology* 39(7):613-626
- Suska F, Gretzer C, Esposito M, Tengvall P, Thomsen P (2005) Monocyte viability on titanium and copper coated titanium. *Biomaterials* 26(30):5942-5950
- Syntichaki P, Xu K, Driscoll M, Tavernarakis N (2002) Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 419(6910):939-944
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(3):231-241
- Teeguarden JG, Hinderliter PM, Orr G, Thrall BD, Pounds JG (2007) Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 95(2):300-312
- Thibodeau M (2003) Silica-Induced Caspase Activation in Mouse Alveolar Macrophages Is Dependent upon Mitochondrial Integrity and Aspartic Proteolysis. *Toxicological Sciences* 76(1):91-101
- Thibodeau MS, Giardina C, Knecht DA, Helble J, Hubbard AK (2004) Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 80(1):34-48
- Thiesen B und Jordan A (2008) Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia* 24(6):467-474
- Tran N und Webster TJ (2010) Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges. *Journal of Materials Chemistry* 20(40):8760-8767
- Turk B, Bieth Joseph G, Björk I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, Kos J, et al. (1995) Regulation of the Activity of Lysosomal Cysteine Proteinases by pH-Induced Inactivation and/or Endogenous Protein Inhibitors, Cystatins *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. vol 376, p 225
- Turk V, Turk B, Gunčar G, Turk D, Kos J (2002) Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Advances in Enzyme Regulation* 42(0):285-303
- Veranth J, Kaser E, Veranth M, Koch M, Yost G (2007) Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Particle and Fibre Toxicology* 4(1):2
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods* 184(1):39-51
- Vertegel AA, Siegel RW, Dordick JS (2004) Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 20(16):6800-6807
- Viorritto ICB, Nikolov NP, Siegel RM (2007) Autoimmunity versus tolerance: Can dying cells tip the balance? *Clinical Immunology* 122(2):125-134
- Wahl M, Lahni B, Guenther R, Kuch B, Yang L, Straehle U, Strack S, et al. (2008) A technical mixture of 2,2',4,4'-tetrabromo diphenyl ether (BDE47) and brominated furans triggers aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated gene expression and toxicity. *Chemosphere* 73(2):209-215
- Walker NJ und Bucher JR (2009) A 21st Century Paradigm for Evaluating the Health Hazards of Nanoscale Materials? *Toxicological Sciences* 110(2):251-254

- Warheit DB, McHugh TA, Hartsy MA (1995) Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts. *Scandinavian journal of work, environment & health* 21 Suppl 2:19-21
- Waters KM, Masiello LM, Zangar RC, Tarasevich BJ, Karin NJ, Quesenberry RD, Bandyopadhyay S, et al. (2008) Macrophage Responses to Silica Nanoparticles are Highly Conserved Across Particle Sizes. *Toxicological Sciences* 107(2):553-569
- Weitschies W, Wedemeyer R-S, Kosch O, Fach K, Nagel S, Söderlind E, Trahms L, et al. (2005) Impact of the intragastric location of extended release tablets on food interactions. *Journal of Controlled Release* 108(2–3):375-385
- Wells MA, Abid A, Kennedy IM, Barakat AI Serum proteins prevent aggregation of Fe₂O₃ and ZnO nanoparticles. *Nanotoxicology* 0(0):1-10
- Wilhelmi V, Fischer U, van Berlo D, Schulze-Osthoff K, Schins RPF, Albrecht C (2012) Evaluation of apoptosis induced by nanoparticles and fine particles in RAW 264.7 macrophages: Facts and artefacts. *Toxicology in Vitro* 26(2):323-334
- Wright AK und Thompson MR (1975) Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence. *Biophysical Journal* 15(2, Part 1):137-141
- Xia T, Kovoichich M, Liang M, Zink JJ, Nel AE (2008) Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS Nano* 2(1):85-96
- Xia T, Li N, Nel AE (2009) Potential Health Impact of Nanoparticles. *Annual review of public health* 30:137-150
- Xie G, Sun J, Zhong G, Shi L, Zhang D (2010) Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. *Archives of Toxicology* 84(3):183-190
- Yang X, Liu J, He H, Zhou L, Gong C, Wang X, Yang L, et al. (2010) SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. *Particle and Fibre Toxicology* 7:1
- Yoshida T, Yoshioka Y, Matsuyama K, Nakazato Y, Tochigi S, Hirai T, Kondoh S, et al. (2012) Surface modification of amorphous nanosilica particles suppresses nanosilica-induced cytotoxicity, ROS generation, and DNA damage in various mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 427(4):748-752
- Youle RJ und Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Publishing Group* 9(1):47-59
- Yu KO, Grabinski CM, Schrand AM, Murdock RC, Wang W, Gu B, Schlager JJ, et al. (2009) Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes. *Journal of Nanoparticle Research* 11(1):15-24
- Yu MK, Park J, Jon S (2012) Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics* 2(1):3-44
- Zhang F, Lau SS, Monks TJ (2011) The Cytoprotective Effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-Induced Cytotoxicity Is Independent of Its Ability to Enhance Glutathione Synthesis. *Toxicological Sciences* 120(1):87-97
- Zhang S, Nelson A, Beales PA (2012) Freezing or Wrapping: The Role of Particle Size in the Mechanism of Nanoparticle–Biomembrane Interaction. *Langmuir* 28(35):12831-12837
- Zhivotosky B und Orrenius S (2001) Assessment of Apoptosis and Necrosis by DNA Fragmentation and Morphological Criteria *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Zhong LS, Hu JS, Liang HP, Cao AM, Song WG, Wan LJ (2006) Self-Assembled 3D Flowerlike Iron Oxide Nanostructures and Their Application in Water Treatment. *Advanced Materials* 18(18):2426-2431

- Zhu X-D, Zhuang Y, Ben J-J, Qian L-L, Huang H-P, Bai H, Sha J-H, et al. (2011) Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 286(10):8231-8239
- Zhuravlev LT (2000) The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 173(1-3):1-38



6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aktive Aufnahmewege in Säugerzellen.....	14
Abbildung 2:	Detektion von Zellzahl und Apoptose mit Hilfe des Lebendfarbstoffs Hoechst33342.....	41
Abbildung 3:	Charakterisierung des Zelltods anhand der Fluoreszenzfärbung mit Hoechst33342 und Propidiumiodid.....	42
Abbildung 4:	Prinzip der Hochdurchsatz-Detektion und Quantifizierung von FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen.	46
Abbildung 5:	TEM-Aufnahmen von verschiedenen γ -Fe ₂ O ₃ -Nanopartikeln mit Polyacrylsäure bzw. Citrat-Beschichtung.....	53
Abbildung 6:	FITC-SiO ₂ -Partikel zeigen eine monodisperse Größenverteilung.....	54
Abbildung 7:	Größenverteilung von FITC-SiO ₂ -Partikeln in Wasser und DMEM mit FCS	56
Abbildung 8:	Falsch-positive Messung der Freisetzung der Laktatdehydrogenase nach Inkubation von RAW264.7-Zellen mit verschieden beschichteten γ -Fe ₂ O ₃ -NP.	62
Abbildung 9:	γ -Fe ₂ O ₃ -NP führen zur verstärkten WST-1 Reduktion in RAW264.7-Zellen.....	63
Abbildung 10:	Die Reduktion der Zellzahl/Mitoserate korreliert mit LDH-Freisetzung und WST-Reduktion in RAW264.7-Zellen nach Inkubation mit Etoposid.....	65
Abbildung 11:	Vergleich der Detektion des Zelltods im Durchflusszytometer und AHM nach Inkubation von RAW264.7-Zellen mit Etoposid.....	66
Abbildung 12:	AHM ist bei der Detektion von Nekrosen sensitiver als konventionelle Messmethoden.....	67
Abbildung 13:	Vergleich der Detektion des Zelltods im Durchflusszytometer und AHM nach Inkubation von RAW264.7-Zellen mit Triton X-100	68
Abbildung 14:	Die Reduktion der RAW264.7-Zellzahl durch γ -Fe ₂ O ₃ -NP ist konzentrations- und beschichtungsabhängig.	69
Abbildung 15:	Verschieden beschichtete γ -Fe ₂ O ₃ -NP verursachen keine Toxizität in RAW264.7-Zellen.....	71
Abbildung 16:	Konzentrations- und beschichtungsabhängige Verteilung verschiedener γ -Fe ₂ O ₃ -NP in der zellulären Fraktion und im Überstand	73
Abbildung 17:	Konzentrationsabhängige Zellzahlreduktion nach Exposition von RAW264.7-Zellen mit unterschiedlich beschichteten γ -Fe ₂ O ₃ -NP	74
Abbildung 18:	SiO ₂ -Partikel führen zur größen- und konzentrationsabhängigen Reduktion der Lebendzellzahl und Zelltod in RAW264.7-Zellen.....	76
Abbildung 19:	Konzentrations- und größenabhängige Freisetzung der LDH aus RAW264.7-Zellen nach Inkubation mit SiO ₂ -Partikeln	77
Abbildung 20:	SiO ₂ -Partikel führen zur verstärkten WST-1 Reduktion in RAW264.7-Zellen.....	78
Abbildung 21:	Konzentrations- und größenabhängige Reduktion der Lebendzellzahl von RAW264.7-Zellen nach Inkubation mit verschieden großen FITC-SiO ₂ -Partikeln.	80
Abbildung 22:	Größenabhängige Zunahme der Annexin-V-positiven Zellen in RAW264.7-Zellen nach Exposition mit SiO ₂ -Partikeln	81
Abbildung 23:	Konzentrations- und größenabhängige Zunahme der Nekrose in RAW264.7-Zellen nach Exposition mit FITC-SiO ₂ -Partikeln	82
Abbildung 24:	Konzentrations- und größenabhängige Zunahme der Nekrose in RAW264.7-Zellen nach Exposition mit FITC-SiO ₂ -Partikel	83
Abbildung 25:	Zeitliche Hellfeldbilderserie von RAW264.7-Zellen zeigt apoptotische und nekrotische Merkmale nach Exposition mit 70 nm FITC-SiO ₂ -NP.....	84
Abbildung 26:	SiO ₂ -NP verursachen keine intrazelluläre Generierung von ROS.....	85
Abbildung 27:	Korrelation der Toxizität mit der eingesetzten Masse, Oberfläche, sowie Partikelzahl verschieden großer FITC-SiO ₂ -Partikeln im Expositionsmedium....	86
Abbildung 28:	Quantifizierung der zellulären Masse, Oberfläche und Partikelzahl von verschieden großen fluoreszenzspektrometere FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen nach 1, 2,5 und 5 h mittels Fluoreszenzspektrometrie.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 29:	Quantifizierung der zell-assoziierten relativen FITC-Intensität nach Behandlung von RAW264.7-Zellen mit verschiedenen großen FITC-SiO ₂ -Partikeln nach 1, 2,5 und 5 h mittels Hochdurchsatzmikroskopie.....	90
Abbildung 30:	Oberflächenabhängige Reduktion der Lebendzellzahl von RAW264.7-Zellen nach Exposition mit FITC-SiO ₂ -Partikel.....	91
Abbildung 31:	Oberflächenmodifizierte FITC-SiO ₂ -NP verursachen keine Toxizität in RAW264.7-Zellen.....	93
Abbildung 32:	Oberflächenmodifizierte FITC-SiO ₂ -NP verursachen keine Reduktion der Zellzahl in RAW264.7-Zellen.....	93
Abbildung 33:	Quantifizierung der Aufnahme von oberflächenmodifizierten und nicht-modifizierten FITC-SiO ₂ -NP mittels Fluoreszenzspektrometrie und automatisierter Hochdurchsatzmikroskopie.....	94
Abbildung 34:	Nachweis der serumabhängigen Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen mittels Epifluoreszenzmikroskopie.....	96
Abbildung 35:	Nachweis der serumabhängigen Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie.....	98
Abbildung 36:	Zeit- und serumabhängige Aufnahme und Lokalisation von FITC-SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen.....	100
Abbildung 37:	Albumin-vermittelte Aufnahme von 70 nm FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen.....	102
Abbildung 38:	Klasse A Scavenger Rezeptoren vermitteln nicht die Aufnahme von FITC-SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen.....	103
Abbildung 39:	FITC-SiO ₂ -NP werden nicht durch Phagozytose/Makropinozytose in RAW264.7-Zellen aufgenommen.....	104
Abbildung 40:	Temperaturabhängige Aufnahme von FITC-SiO ₂ -Partikeln in RAW264.7-Zellen.....	105
Abbildung 41:	Serumunabhängige Aufnahme von oberflächenmodifizierten FITC-SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen.....	106
Abbildung 42:	Nachweis der serumunabhängigen Aufnahme und Lokalisation von oberflächenmodifizierten FITC-SiO ₂ -NP in RAW264.7-Zellen im Transmissionselektronenmikroskop.....	107
Abbildung 43:	FITC-SiO ₂ -NP binden abhängig von der spezifischen Oberfläche Serumproteine bzw. BSA.....	108
Abbildung 44:	Quantifizierung der prozentualen Beladung der Oberfläche von FITC-SiO ₂ -Partikeln mit BSA.....	109
Abbildung 45:	Größenabhängige Bindung von Serumproteinen und BSA an FITC-SiO ₂ -Partikel.....	110
Abbildung 46:	Relative Quantifizierung der Banden der an die SiO ₂ -Oberfläche gebundenen Proteinen mittels ImageJ.....	112
Abbildung 47:	Nicht-modifizierte FITC-SiO ₂ -NP binden mehr Serumproteine bzw. BSA als modifizierte FITC-SiO ₂ -NP.....	113
Abbildung 48:	Quantifizierung der prozentualen Beladung von BSA an der Oberfläche von FITC-SiO ₂ -NP. Zur Berechnung der Proteinbeladung der FITC-SiO ₂ -Partikel mit BSA.....	114
Abbildung 49:	Oberflächenabhängige Bindung von Serumproteinen und BSA an FITC-SiO ₂ -Partikel.....	116
Abbildung 51:	Modell der SiO ₂ -NP induzierten Toxizität in RAW264.7-Zellen.....	141

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Material und Bezugsquellen.....	25
Tabelle 2:	Laborgeräte und Softwareprogramme	27
Tabelle 3:	Charakterisierung der in der Arbeit verwendeten γ -Fe ₂ O ₃ -NP	30
Tabelle 4:	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien.....	35
Tabelle 5:	Bestimmung des Durchmessers des γ -Fe ₂ O ₃ -Kerns, sowie des hydrodynamischen Durchmessers von PAA- bzw. Citrat-ummantelten γ -Fe ₂ O ₃ -Nanopartikel.....	52
Tabelle 6:	Zusammenfassung der physikalischen Charakterisierung der SiO ₂ -Partikel.....	58
Tabelle 7:	Oberflächenladungen der verwendeten SiO ₂ -Partikel	60
Tabelle 8:	Vergleich der EC ₅₀ -Werte bezogen auf 10.000 Zellen für verschieden große FITC- SiO ₂ -Partikel	92



8. Appendix

Tabelle A1: Berechnung von Volumen, Masse und Oberfläche von einzelnen FITC-SiO₂-Partikeln mit verschiedenen Durchmessern

FITC-SiO ₂ -Partikel [nm] ⁽¹⁾	Durchmesser [m] ⁽²⁾	Dichte [g/m ³] ⁽³⁾	Volumen [m ³] ⁽⁴⁾	Masse [g] ⁽⁵⁾	Oberfläche [m ²] ⁽⁶⁾
70	5×10^{-8}	2×10^6	$6,5 \times 10^{-23}$	$1,3 \times 10^{-16}$	$7,9 \times 10^{-15}$
200	$1,4 \times 10^{-7}$	2×10^6	$1,4 \times 10^{-21}$	$2,9 \times 10^{-15}$	$6,2 \times 10^{-14}$
500	$4,2 \times 10^{-7}$	2×10^6	$3,9 \times 10^{-20}$	$7,8 \times 10^{-14}$	$5,5 \times 10^{-13}$

1: nomineller Durchmesser angegeben vom Hersteller, 2: gemessener Durchmesser im Transmissionselektronenmikroskop (TEM), 3: Dichte für amorphes SiO₂ angegeben vom Hersteller, 4: berechnetes Volumen, 5: berechnete Masse, 6: berechnete Oberfläche.

Tabelle A2: Berechnung der Partikelzahl und Partikeloberfläche pro Masse für verschieden große FITC-SiO₂-Partikel

FITC-SiO ₂ -Partikel [nm] ^(*)	Partikelzahl N pro Masse [#g]	Verhältnis Partikelzahl bei konstanter Masse	Partikeloberfläche A pro Masse [m ² /g]	Verhältnis Oberfläche bei konstanter Masse
70	$7,6 \times 10^{15}$	$N_{(70 \text{ nm})} : N_{(500 \text{ nm})} = 585$	60	$A_{(70 \text{ nm})} : A_{(500 \text{ nm})} = 8,3$
200	$3,5 \times 10^{14}$	$N_{(70 \text{ nm})} : N_{(200 \text{ nm})} = 22$	21,7	$A_{(70 \text{ nm})} : A_{(200 \text{ nm})} = 2,8$
500	$1,3 \times 10^{13}$	$N_{(200 \text{ nm})} : N_{(500 \text{ nm})} = 27$	7,2	$A_{(200 \text{ nm})} : A_{(500 \text{ nm})} = 3$

*: nomineller Durchmesser angegeben vom Hersteller. Alle Berechnungen wurden anhand der im TEM gemessenen Partikeldurchmesser durchgeführt (siehe Tab. A1).

Tabelle A3: Korrelation zwischen der Masse verschieden großer FITC-SiO₂-Partikel und der eingesetzten Partikeloberfläche und Partikelzahl bezogen auf ein Well einer 96-well Platte

FITC-SiO ₂ -Partikel [nm]	Masse [µg/100 µl Expositionsmedium]							
	1	2,5	5	10	20	30	50	
70	Oberfläche [m ²]	$6,0 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$
	Partikelzahl [N]	$7,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{10}$	$7,6 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^{11}$
200	Oberfläche [m ²]	$2,1 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^{-4}$	$6,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$
	Partikelzahl [N]	$3,5 \times 10^8$	$8,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$7,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$
500	Oberfläche [m ²]	$7,1 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-5}$	$7,1 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$
	Partikelzahl [N]	$1,3 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$

Die Kalkulation wurde anhand der berechneten Werte aus Tabelle A2 durchgeführt.

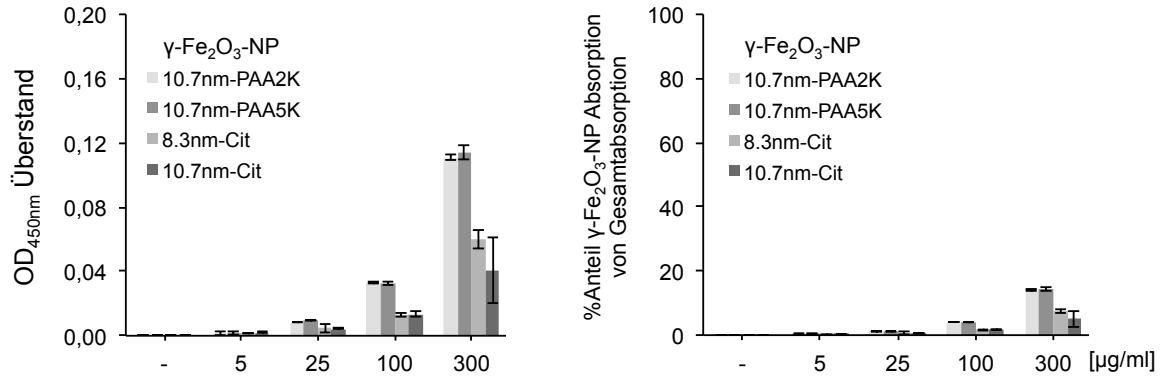


Abbildung A1: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ in Medium absorbieren Licht bei 450 nm Wellenlänge. Vor dem LDH-Assay wurde die Absorption der Überstände der mit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ behandelten Zellen bei 450 nm Wellenlänge gemessen (links). Prozentualer Anteil der $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ -Absorption von der Gesamtabsorption, die mittels LDH Assay bestimmt wurde.

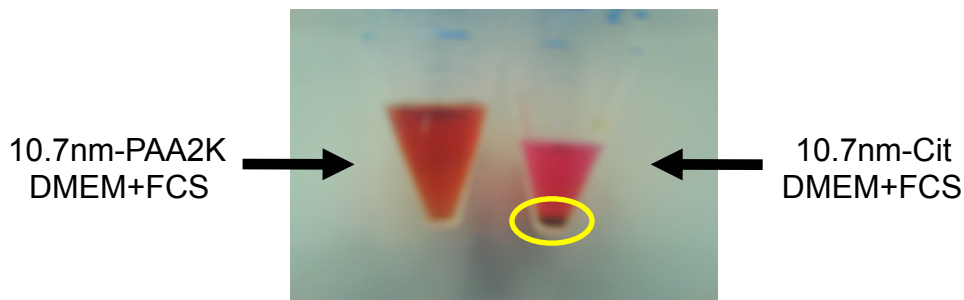


Abbildung A2: Sedimentation von Citrat-ummantelten $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ in Kulturmedium. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ mit Polyacrylsäure-Beschichtung (10.7nm-PAA2K, links) und Citrat-Ummantelung (10.7nm-Cit, rechts) wurden DMEM+FCS bei einer Konzentration von 300 $\mu\text{g/ml}$ für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit ist ein Sediment für Citrat-ummantelte $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ zu beobachten (gelber Kreis). PAA-beschichtete $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ hingegen sind gleichmäßig im Medium verteilt (braune Farbe).

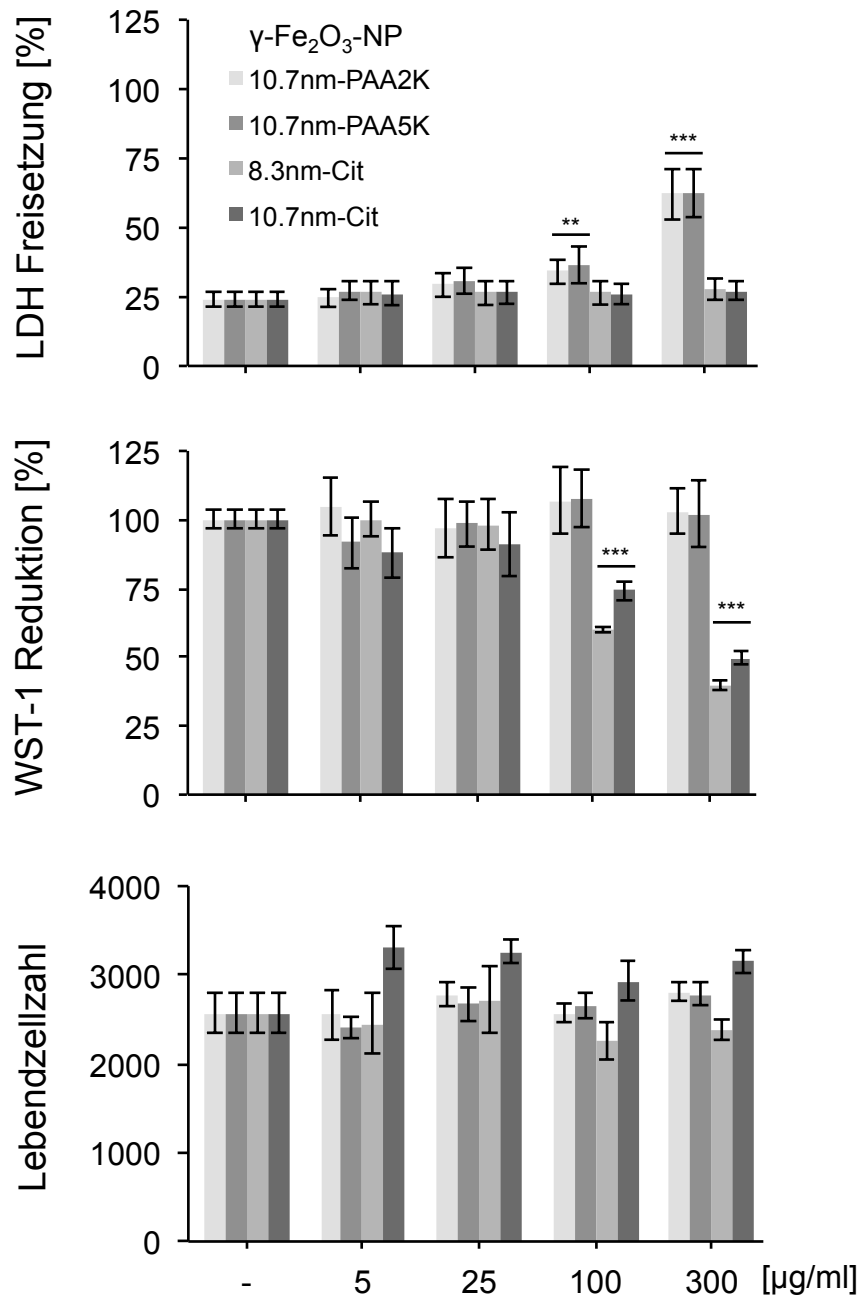


Abbildung A3: Untersuchung der Toxizität von $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ in Hepa-1C1C7-Zellen mittels konventioneller Assays und AHM. 5.000 Hepa-1C1C7-Zellen wurden in 96-well Platten ($A=0,32\text{ cm}^2$) mit steigenden Konzentrationen an $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ in 100 μl DMEM mit FCS entweder im Triplikate (konventionelle Assays) bzw. Quadruplikat (AHM) für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die LDH Freisetzung und WST-1 Reduktion bestimmt. Für die AHM wurden die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 (150 ng/ml) und Propidiumiodid (125 ng/ml) in 200 μl DMEM mit FCS für 30 min angefärbt. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt. Für die konventionellen Assays werden Mittelwerte der relativen Werte aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Parallelproben ($n=9$) mit dem jeweiligen Standardfehler angegeben. Für die AHM ist ein repräsentatives Experiment (aus $n=3$) gezeigt, wobei Mittelwerte der Lebendzellzahlen aus 4 Parallelproben ($n=4$) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

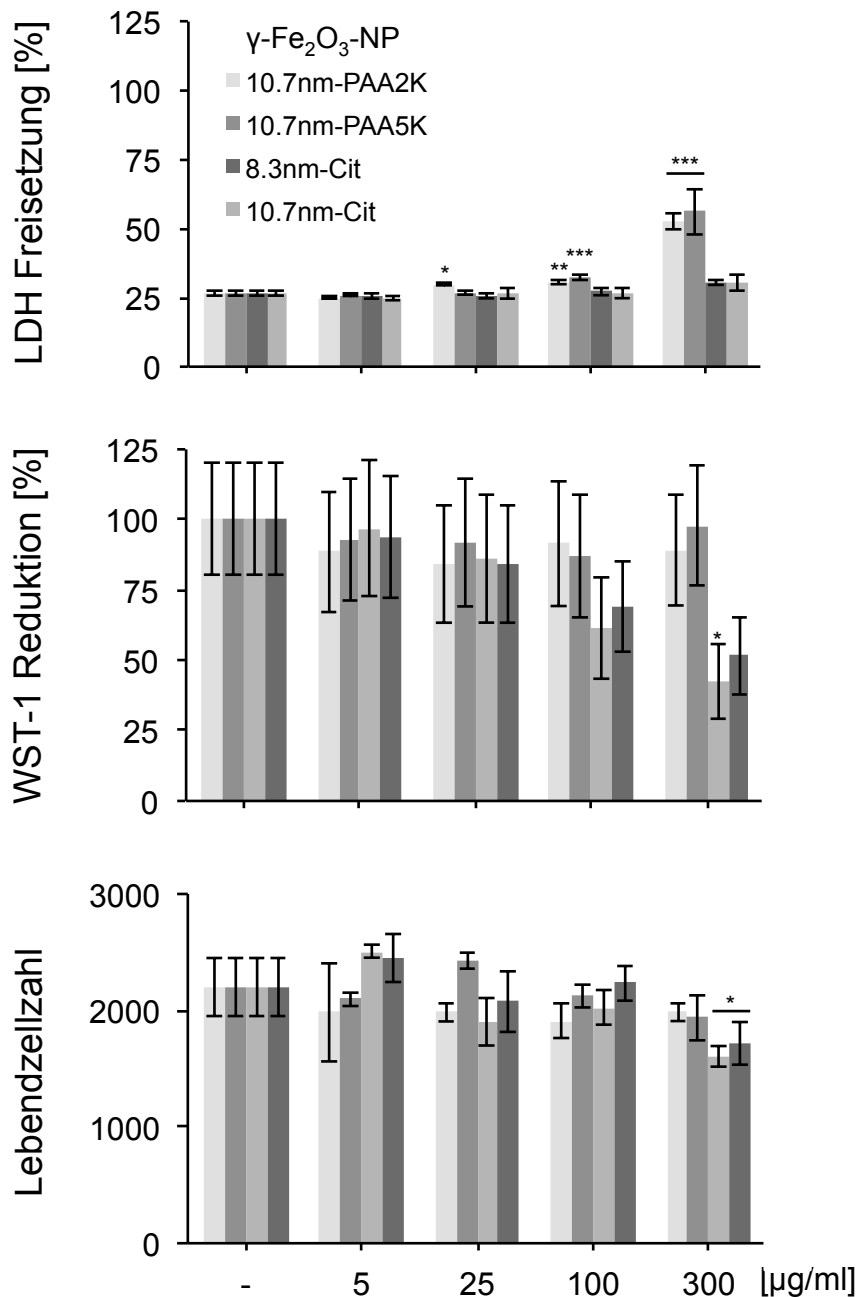


Abbildung A4: Untersuchung der Toxizität von $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ in DU145-Zellen mittels konventioneller Assays und AHM. 5.000 DU145-Zellen wurden in 96-well Platten ($A=0,32\text{ cm}^2$) mit steigenden Konzentrationen an $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-NP}$ in $100\ \mu\text{l}$ DMEM mit FCS entweder im Triplikate (konventionelle Assays) bzw. Quadruplikat (AHM) für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die LDH Freisetzung und WST-1 Reduktion bestimmt. Für die AHM wurden die Zellen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 ($150\ \text{ng/ml}$) und Propidiumiodid ($125\ \text{ng/ml}$) in $200\ \mu\text{l}$ DMEM mit FCS für 30 min angefärbt. Es wurden für jede Probe 6 Bildausschnitte jeweils im Hellfeld, Hoechst- und PI-Kanal an einem Olympus IX-81 aufgenommen und die Zellen mittels Olympus Scan^R Analysis Software in lebende, früh- und spät-apoptotische und nekrotische Zellen eingeteilt. Für die konventionellen Assays werden Mittelwerte der relativen Werte aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Parallelproben ($n=9$) mit dem jeweiligen Standardfehler angegeben. Für die AHM ist ein repräsentatives Experiment (aus $n=3$) gezeigt, wobei Mittelwerte der Lebendzellzahlen aus 4 Parallelproben ($n=4$) mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben sind. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

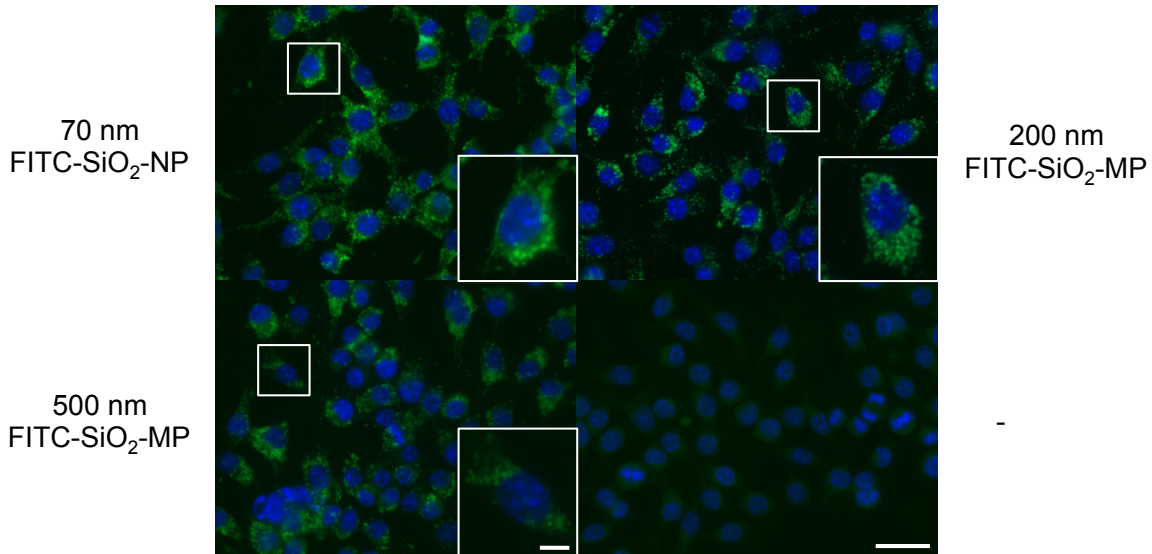
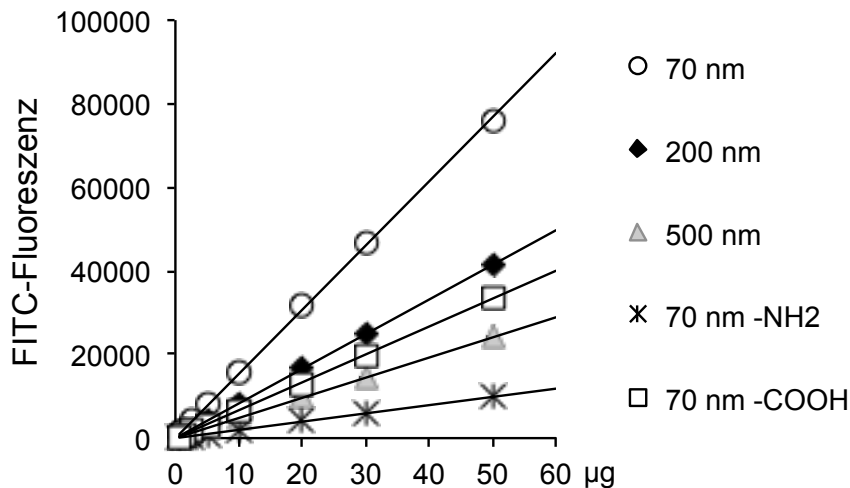


Abbildung A5: SiO₂-MP werden auch in Anwesenheit von Albumin in RAW264.7-Zellen aufgenommen. 500.000 RAW264.7-Zellen wurden in 24-well Platten (A=2,0 cm²) auf Deckgläsern mit 50 µg/ml der verschieden großen FITC-SiO₂-Partikel in 625 µl DMEM mit und ohne FCS für 5 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden der Überstand abgenommen und die Zellen in 4 % Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert, danach zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen und die Zellkerne mit 800 nM DAPI/DPBS^{-/-} 10 min bei 37°C gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen, mit Immu-Mount® auf einen Objektträger eingebettet und an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM-IRE, 63x Objektiv, Öl) untersucht. Maßstab: 20 µm, Maßstab in der Vergrößerung: 5 µm



FITC-SiO ₂ -Partikel [nm]	70	20	500	70 -NH ₂	70 -COOH
Regressionsgerade f(x)	y = 1535,6x	y = 828,86x	y = 481,76x	y = 197,26x	y = 667,33x
Bestimmunsmaß R ²	0,99915	0,99986	0,99989	0,99771	0,99982

Abbildung A6: Eichgeraden der Fluoreszenz von unterschiedlichen FITC-SiO₂-Partikel. Steigende Konzentrationen von FITC-SiO₂-Partikel wurden zusammen mit jeweils 10.000 Zellen lysiert in 200 µl Lysepuffer aufgenommen. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC wurde bei 485/10 nm angeregt, die entstehende Emission wurde bei 530/13 nm gemessen.

