

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger: Leibniz-Institut für Neue Materialien gGmbH
Förderkennzeichen: 03X0063
Vorhabenbezeichnung: Mechanismen der Nanotoxizität durch Nutzung modernster mikroskopischer Methoden (MeNatox)
Laufzeit des Vorhabens: 01.09.2008 – 31.08.2011
Berichtszeitraum: 01.09.2008 – 31.08.2011

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
1 Kurzdarstellung des Vorhabens	4
1.1 Aufgabenstellung.....	4
1.2 Voraussetzungen.....	5
1.3 Planung und Ablauf.....	5
1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand	5
2 Ergebnisse	6
2.1 Herstellung und Charakterisierung der eingesetzten Nanopartikel	6
a) unmarkierte Silika-Nanopartikel - Etablierung der Syntheseroute	6
b) fluoreszenzmarkierte Silika-Nanopartikel	9
c) Silber-Nanopartikel.....	21
d) Charakterisierungsmethoden und verwendete Geräte.....	24
2.2 Toxizität der eingesetzten Silika-Nanopartikel	25
2.2.1 Auswirkungen von Silika-Nanopartikeln auf A549-Zellen.....	25
a) Lichtmikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie	25
b) Prüfung der Lebensfähigkeit (Live/Dead Färbung)	27
c) Analyse der Membranintegrität (LDH-Assay).....	29
d) Bestimmung der Stoffwechselaktivität (WST-1-Assay).....	33
e) Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenz) in Vollmedium und Medium ohne FBS	34
f) Caspase-Aktivierung.....	35
2.2.2 Auswirkungen von Silika-Nanopartikeln auf Caco-2 Zellen.....	37
a) Bestimmung der Stoffwechselaktivität (WST-1-Assay)	37
b) Viabilitätsbestimmung (ATP-Gehalt).....	38
c) Bestimmung der DNA-Integrität (Comet-Assay)	39
2.3 Toxizität von Silber-Nanopartikeln	41
2.3.1 Auswirkungen der Silber-Nanopartikel auf A549-Zellen.....	41
a) Bestimmung der Lebensfähigkeit (WST-1-Assay) und Vitalzellzahl, lichtmikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie.....	41
b) Einfluss von Silberionen auf enzymatische Reaktionen	43
2.3.2 Auswirkungen von Silber-Nanopartikeln auf Caco-2 Zellen	44
2.4 STED-Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	46
a) Prinzip der STED-Mikroskopie und STED-Aufbau	46
b) Bestimmung der Geräteparameter.....	47
c) Eigenschaften der verwendeten Einbettmedien	49
d) STED-Mikroskopie an verschiedenen Typen von Nanopartikeln	52

e)	<i>Bildbearbeitung und Bildauswertung</i>	56
2.5	Aufnahme und Lokalisation fluoreszenzmarkierter Nanopartikel	60
a)	<i>Mechanismus der Partikelaufnahme bei A549-Zellen</i>	60
b)	<i>Agglomeration von Silika-Nanopartikeln in A549-Zellen</i>	63
c)	<i>Agglomeration von Silika-Nanopartikeln in Caco-2-Zellen</i>	65
d)	<i>Lokalisation von Silika-Nanopartikeln im Zellkern von Caco-2-Zellen</i>	68
e)	<i>Lokalisation von Silika-Nanopartikeln in Caco-2-Zellen</i>	71
f)	<i>Lokalisation von Silika-Nanopartikeln in lebenden A549-Zellen</i>	72
g)	<i>Aufnahme von Silber-Nanopartikeln und Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett</i> 76	
h)	<i>Lokalisation von Silber-Nanopartikeln in A549-Zellen</i>	80
3	Zusammenfassung.....	82
4	Literatur.....	84
5	erfolgte und geplante Veröffentlichung der Ergebnisse.....	89
6	Danksagung.....	92

1 Kurzdarstellung des Vorhabens

1.1 Aufgabenstellung

Die Auswirkungen technisch relevanter Nanopartikel auf die Gesundheit des Menschen stellen eine Thematik von hoher gesellschaftlicher aber auch wissenschaftlicher Relevanz dar. Ziel des Vorhabens war es, durch Kombination chemischer, physikalischer und biologischer Kenntnisse und Techniken, Wechselwirkungen zwischen Zellen und Nanopartikeln zu analysieren und Mechanismen aufzuklären, welche eine möglicherweise toxische Wirkung von Nanopartikeln gegenüber menschlichen Zellen herbeiführen. Dieses Ziel sollte durch Einsatz moderner lichtmikroskopischer Techniken, vor allem der neu entwickelten **STimulated Emission Depletion (STED-)** Mikroskopie, einer hochauflösenden Variante der Konfokalmikroskopie erreicht werden. Mit Hilfe der STED-Technik können fluoreszenzmarkierte Nanopartikel und nanoskalige zelluläre Komponenten ortsaufgelöst sichtbar gemacht werden. Ziel war es, die Lokalisation und den Status der Partikel innerhalb der Zellen detailgenau zu analysieren. Neben der Partikellokalisierung sollten die Auswirkungen der eingesetzten Partikel auf die Zellen anhand morphologischer Untersuchungen und biochemischer Tests erfasst werden. Um die Lokalisation der Partikel mit der biochemischen Antwort der Zellen, aber auch mit den Partikeleigenschaften zu korrelieren (Abbildung 1), war der Einsatz wohl definierter Nanopartikel erforderlich.

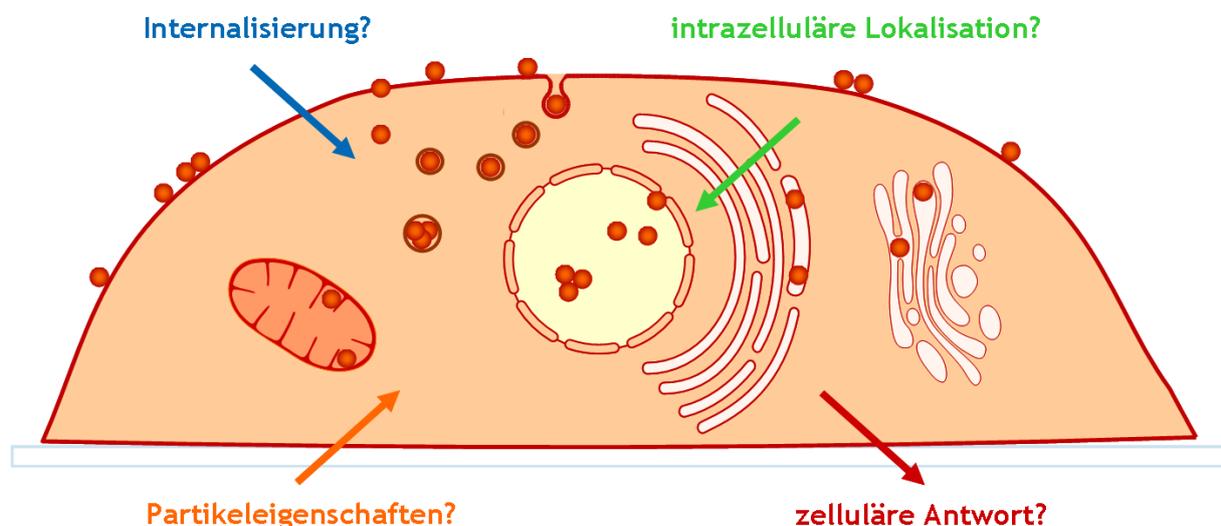


Abbildung 1: Analyse der Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Zellen menschlicher Herkunft unter Verwendung der STED-Mikroskopie zur ortsgenaue Lokalisation fluoreszenzmarkierter Nanopartikel.

Ein wesentlicher Aspekt des Vorhabens lag daher auch in der Herstellung und Kennzeichnung der relevanten Eigenschaften fluoreszenzmarkierter Nanopartikel, die für die STED-Mikroskopie geeignet sind. Als wichtigste Modellmaterialien wurden SiO_2 -Partikel verschiedener Größe sowie Silber-Nanopartikel hergestellt und eingesetzt. Beide Materialtypen sind von großer Relevanz sowohl für technische als auch für biomedizinische Anwendungen. Die Untersuchungen wurden an menschlichen Zellen (Zell-Linien) relevanter Zielorgane durchgeführt. Diese stellen Modelle alveolärer Typ-II-Lungenepithelzellen (A549) und Darmepithelzellen (Caco-2) dar.

1.2 Voraussetzungen

Arbeitsziel der Gruppe „Nano Zell Interaktionen“ am INM-Leibniz-Institut für Neue Materialien ist es, die Wechselwirkungen zwischen menschlichen Zellen und nanoskaligen Materialien, unter dem Aspekt einer potenziellen Toxizität dieser Materialien, aufzuklären. Die Erfassung der Auswirkungen von Nanopartikeln auf lebende Systeme stellt ein fächerübergreifendes Arbeitsgebiet dar. Ein solches fächerübergreifendes Arbeitsumfeld ist am INM in idealer Weise gegeben. Darüber hinaus gehören die Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von Nanostrukturen sowie ihre Verarbeitung zu funktionellen Systemen zu den Kernkompetenzen des INM.

1.3 Planung und Ablauf

Das Vorhaben wurde in enger Zusammenarbeit von Wissenschaftlern und technischem Personal der Fachrichtungen Chemie (Synthese und Charakterisierung der Nanopartikel), Biologie (Kultivierung, Exposition und Präparation der Zellen, biochemische Assays) und Physik (Etablierung und Optimierung der STED-Technik, Bildbearbeitung und -auswertung) durchgeführt. Zu Beginn des Vorhabens wurde am INM ein kommerzielles STED-System installiert. Die STED-Technik wurde im Laufe des Vorhabens für nanotoxikologische Fragestellungen etabliert und angewendet. Im Rahmen des Vorhabens wurden verschiedene Partikeltypen hergestellt und mit einer geeigneten Fluoreszenzmarkierung ausgestattet. Die Partikel wurden anhand verschiedener Endpunkte auf ihre Zytotoxizität getestet. Anhand mikroskopischer Analysen wurde die Aufnahme, Lokalisation und der Agglomerationsstatus verschiedener Partikeltypen eingehend dargestellt.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Der Anwendung von Nanomaterialien und Nanoobjekten wird ein großes Potenzial in so unterschiedlichen Bereichen wie Energie, Umwelt und Gesundheit zugeordnet (nano.DE-Report 2011). Eine nachhaltige und sichere Nutzung dieser Materialien erfordert jedoch eine Abschätzung und Bewertung ihrer Auswirkungen auf Mensch und Umwelt (Verantwortlicher Umgang mit Nanotechnologien, NanoKommission, 2008 und 2011). In den letzten Jahren sind toxikologische Effekte von Nanoobjekten weltweit zu einem großen Forschungsthema geworden [1-4]. Die Fragen nach *a) den relevanten Materialeigenschaften wie Größe, chemische Zusammensetzung, Oberflächen- und Morphologieeffekte, b) dem Transport und der Lokalisation von Nanoobjekten in Zellen und c) der Durchführung aussagekräftiger in vitro-Tests jeweils unter Beachtung der Partikeleigenschaften* sind grundlegend für ein tiefgehendes Verständnis nanotoxikologischer Effekte und zentral um Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten, bisher aber nur zum Teil umfassend oder systematisch beschrieben (10 Jahre Forschung zu Risikobewertung, Human- und Ökotoxikologie von Nanomaterialien, DECHEMA/VCI, 2011, Vorsorgestrategien für Nanomaterialien, SRU, 2011). Hinsichtlich der Analyse der Partikelaufnahme und -lokalisierung wird gerade in letzter Zeit das Potenzial neuartiger mikroskopischer Techniken diskutiert [5-7], mit denen strukturelle Effekte und der Status zellassoziierter Nanoobjekte erfasst werden kann. Die hochauflösende STED-Mikroskopie [8-10] wurde im Rahmen dieses Vorhabens erstmals für nanotoxikologische Fragestellungen eingesetzt.

2 Ergebnisse

2.1 Herstellung und Charakterisierung der eingesetzten Nanopartikel

Die Analyse von Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und menschlichen Zellen und nanotoxikologischer Mechanismen, stellt besondere Anforderungen an die eingesetzten Partikel. Zur Untersuchung nanotoxikologischer Effekte unter Anwendung fluoreszenzmikroskopischer Techniken sollten die Nanopartikel die folgenden Anforderungen erfüllen:

- Abbildbarkeit im STED-Mikroskop (spezifische Fluoreszenzmarkierung)
- geringe Dispersität
- Modifizierbarkeit
- Stabilität in biologischer Umgebung
- Matrixmaterial mit technischer Relevanz

Zur Anwendung der STED-Mikroskopie muss das Material eine Fluoreszenzmarkierung erlauben. Darüber hinaus müssen die Partikel zur korrekten Bewertung biologischer und mikroskopischer Ergebnisse eine möglichst geringe Dispersität besitzen. Bei zu hoher Dispersität können größenabhängige Effekte nur unzureichend untersucht werden. Im Falle einer größenabhängigen Aufnahme in Zellen ist es bei hochdispersen Systemen z. B. nicht möglich, eine obere Größe zu bestimmen, ab welcher die Partikel nicht mehr aufgenommen werden. Darüber hinaus müssen die Partikel so modifizierbar sein, dass bei einheitlicher Größe verschiedene Modifikationen aufgebracht werden können, um oberflächenabhängige Effekte wie Ladung / Polarität der Partikel auf die Aufnahme zu untersuchen. Schließlich muss darüber hinaus in Suspension sowohl im wässrigen, als auch im zellulären Medium eine ausreichende Stabilität gewährleistet sein. Instabile Suspensionen erlauben keine Untersuchungen zur Aufnahme einzelner Partikel, sondern lediglich die Untersuchung der kollektiven Wechselwirkung von Partikelagglomeraten oder -aggregaten mit Zellen.

Aufgrund des umfassenden Anforderungskatalogs wurden zunächst amorphe Silika-Partikel als Modellsystem ausgewählt. Diese lassen sich außerdem relativ gut und in ausreichender Menge herstellen [11-14]. Die Auswahl von Silika-Nanopartikeln als Modellpartikelsystem erfolgte darüber hinaus unter Berücksichtigung, dass nanostrukturiertes SiO₂ großtechnisch hergestellt wird und auch SiO₂-Dispersionen ein großes Anwendungspotenzial besitzen. Für die Fluoreszenzmarkierung ist relevant, dass SiO₂ eine geringe Eigenabsorption im für die STED-Mikroskopie relevanten Bereich von 600-800 nm zeigen.

a) *unmarkierte Silika-Nanopartikel - Etablierung der Syntheseroute*

Im ersten Projektabschnitt wurde die Synthese von Silika-Partikeln zunächst ohne Fluoreszenzfarbstoff etabliert. Dabei wurden zwei nasschemische Verfahren ausgewählt und diese hinsichtlich Dispersität und Größe der erhaltenen Partikel verglichen. Zunächst galt es eine Synthese zu finden, welche die Herstellung funktioneller anorganisch-organischer Nanopartikel mit Durchmessern im Größenbereich zwischen 25 nm und 150 nm erlaubt. Aus

Gründen der Suspensionsstabilität wurden nur nasschemische Routen gewählt, da im wässrigen Medium synthetisierte kolloidale Silika-Nanopartikel eine geringere Agglomerationsneigung besitzen und sich durch eine bessere Funktionalisierbarkeit auszeichnen.

- Synthese nach Stöber (STÖBER-Prozess)

Die wässrige Synthese monodisperser kolloidaler Silika-Partikel wurde bereits 1968 von Stöber und Mitarbeitern beschrieben [15]. Durch Ammoniak-katalysierte Hydrolyse von TEOS in wässrig-alkoholischer Lösung können damit sphärische amorphe SiO_2 -Partikel bis zu wenigen μm Größe und einer Monodispersität von 3-10 % erfolgreich hergestellt werden. Typischerweise werden in einer Stöber-Synthese Alkohol und eine wässrige Ammoniaklösung vorgelegt und abhängig von der einzustellenden Endpartikelgröße eine bestimmte Menge an TEOS zugesetzt. Die Stöber-Synthese stellt ein typisches Sol-Gel-Verfahren dar. Die Hydrolyse des Alkoxids erfolgt basenkatalysiert, gefolgt von der Kondensationsreaktion unter Ausbildung eines Si-O-Netzwerkes. Durch gezielte Kontrolle der Reaktionsbedingungen im Stöber-Prozess können anstatt wasserreicher Gele wohldefinierte monodisperse Partikel erhalten werden. Zur Abschätzung der Endpartikelgröße stehen empirische Formeln zur Verfügung, welche die Vorhersage der Endpartikelgröße mit einer Genauigkeit von $\pm 10\%$ erlauben. Die größte Limitierung des beschriebenen Verfahrens liegt dabei in der Herstellung kleiner Nanopartikel. Mittels des Stöber-Prozesses erhaltene kolloidale Dispersionen weisen häufig eine sehr große Polydispersität auf, welche umso größer wird, je geringer die einzustellende Partikelgröße ist (Abbildung 2).

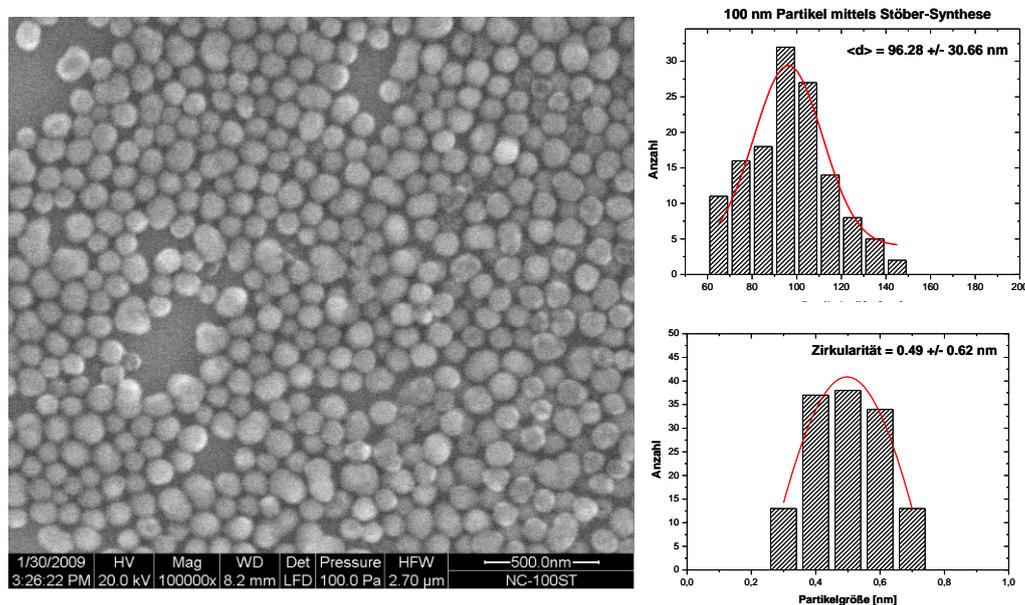


Abbildung 2: REM-Aufnahme von $96 \pm 30 \text{ nm}$ Silika-Nanopartikeln, die mittels der Stöber-Methode synthetisiert wurden. Rechts sind die Histogramme zur statistischen Auswertung von Partikelgröße (oben) und Zirkularität (unten) gezeigt. Die Dispersität liegt bei mehr als 30 %. Die Morphologie der Partikel ist dementsprechend relativ unregelmäßig mit einer mittleren Zirkularität von 0.49 ± 0.62 .

- Synthese nach Hartlen (ARGININ-Prozess)

Aus diesem Grund wurde die 2008 von Hartlen et. al. beschriebene Argininmethode [16] zur Herstellung von Silika-Nanopartikeln ausgewählt. Hartlen beschreibt die Synthese monodisperser Silika-Nanopartikel im Größenbereich von 15 bis 200 nm bei gleichzeitig geringer Dispersität der Partikel.

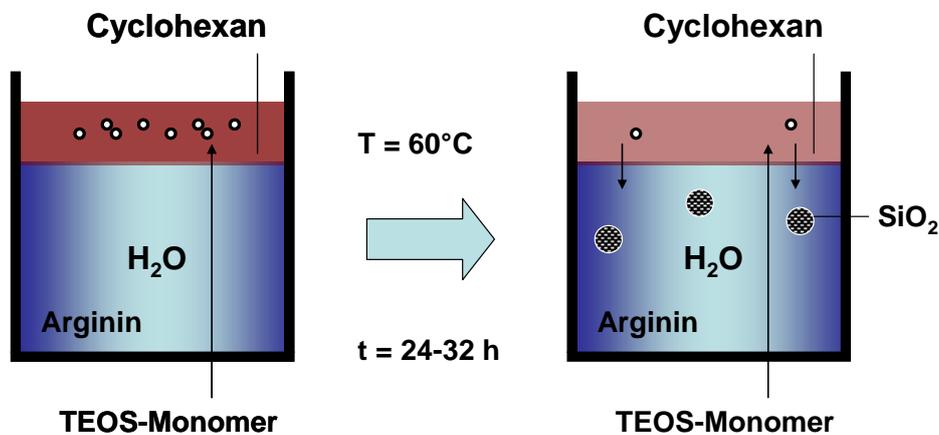


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Arginin-Methode: Im biphasigen System wird TEOS in der organischen Phase vorgelegt. Durch Arginin-katalysierte Hydrolyse erfolgt ein konstanter Phasentransfer des Monomers in die wässrige Phase und schließlich die Bildung monodisperser Silika-Nanopartikel.

Die TEOS-Vorstufe wird dabei langsam, katalysiert durch Arginin, im biphasigen Wasser / Cyclohexan-System hydrolysiert (Abbildung 3). Aufgrund der geringen Löslichkeit von TEOS in Wasser liegt die Vorstufe zunächst ausschließlich in der Cyclohexanphase vor, geht aber bei fortschreitender Hydrolyse in die wässrige Phase über. Geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist die Hydrolyse der Vorstufe – durch diese lässt sich die Menge und Rate an Monomer variieren, welches in der wässrigen Phase zur Bildung von SiO_2 -Partikeln führt.

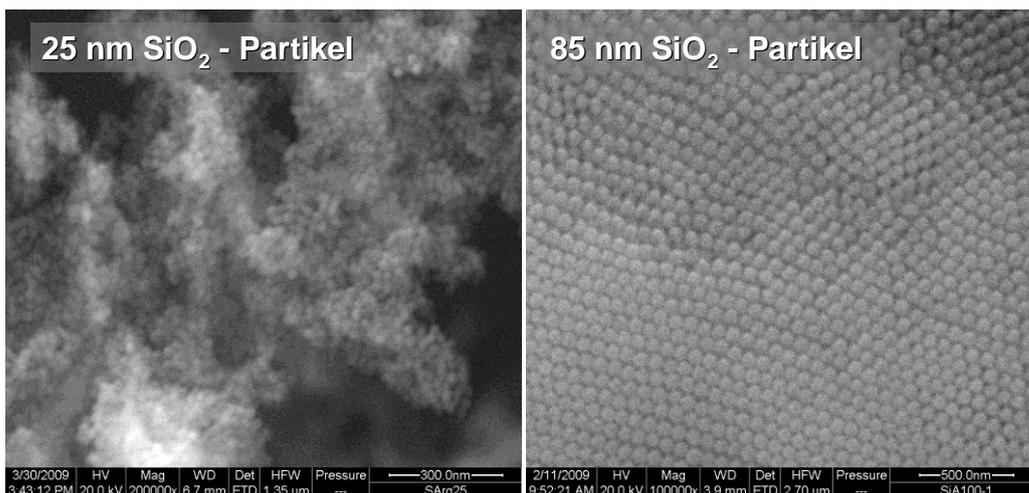


Abbildung 4: REM-Aufnahmen von SiO_2 -Partikeln, welche über die Arginin-Methode erhalten wurden. Nach einem Wachstumsschritt werden ca. 25 nm große Partikel mit geringer Dispersität erhalten, während nach zwei weiteren Wachstumsschritten Silika-Partikel mit einer mittleren Größe von ca. 85 nm erhalten wurden.

Um Stöber-Partikel mit aus der Arginin-Methode erhaltenen Partikeln vergleichen zu können, wurden 85 und 96 nm große Partikel mittels beider Synthesewege hergestellt und die

erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen. Darüber hinaus wurden im Falle des L-Arginin katalysierten Syntheseweges auch kleinere Partikel hergestellt (Abbildung 4).

Beide Syntheserouten unterscheiden sich deutlich voneinander. Während die Stöber-synthese (Abbildung 2) bei Raumtemperatur im monphasigen H₂O/Ethanol/Ammoniak System durchgeführt werden kann, findet die Arginin-Synthese im biphasigen System bei Temperaturen von ca. 60°C statt (Abbildung 4). Selbst die kleinen Partikel sind monodispers und von einheitlicher sphärischer Morphologie. Erwartungsgemäß verringert sich die Dispersität mit steigender Partikelgröße weiter, so dass sich bei 85 nm im REM selbst-organisierte Strukturen erkennen lassen, welche auf die geringe Größendispersion der Silika-Partikel hinweisen.

b) fluoreszenzmarkierte Silika-Nanopartikel

Zur Herstellung fluoreszenzmarkierter Silika-Nanopartikel wurde die in Abbildung 5 gezeigte Strategie verfolgt. Zunächst wurde der für STED geeignete Farbstoff Atto647N über einen Silan-Linker an die Oberfläche von Silika-Nanopartikeln gekoppelt. Durch wiederholtes Aufwachsen von SiO₂-Schalen mittels L-Arginin-Katalyse und Anbindung von Atto647N wurden Kern-Schale Systeme (Core-Shell) hergestellt, die einen nicht-fluoreszierenden Kern und eine fluoreszierende dünne Atto647N-Schicht enthalten (siehe Abschnitt Kern-Schale Systeme).

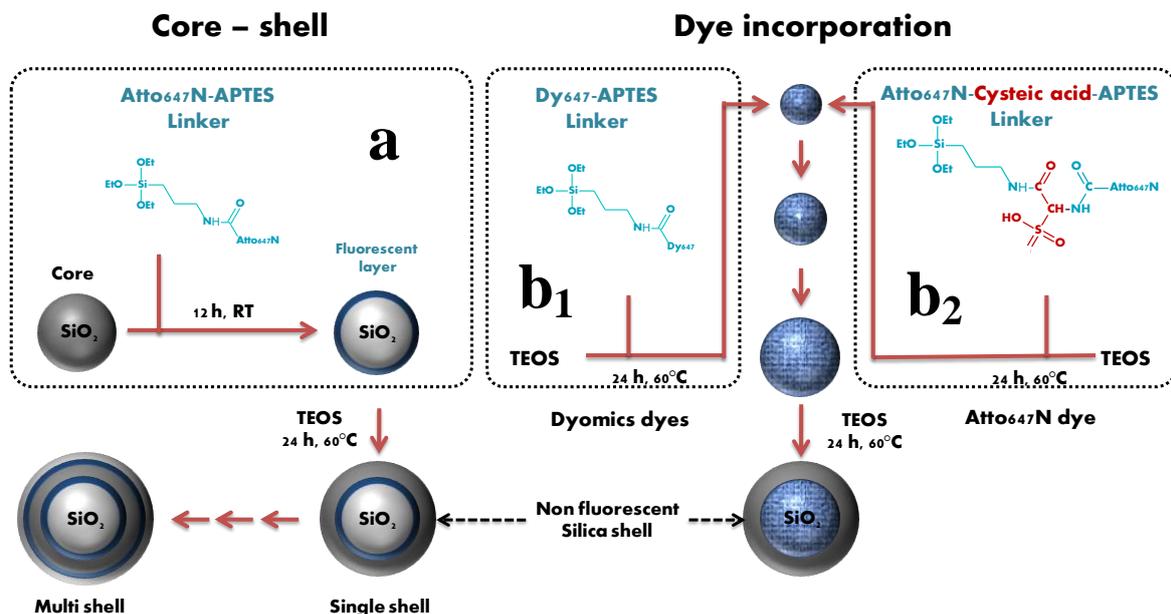


Abbildung 5: Synthesestrategie zur Herstellung fluoreszenzmarkierter Silika-Partikel im Größenbereich zwischen 30 und 130 nm. Alle Wachstumsschritte wurden mittels L-Arginin katalysierter Hydrolyse von Tetraethoxysilan (TEOS) in einem biphasigen Wasser/Cyclohexan-System bei 60°C durchgeführt. Die Herstellung von Kern-Schale Partikeln ist in (a) gezeigt. Der Fluoreszenzfarbstoff wird über einen Silan-Linker an die Partikeloberfläche angebracht. Danach können im Wechsel weitere Silika und Farbstoffschichten aufgebracht werden. Die *in situ*-Farbstoffeinbindung in die Partikelmatrix erfolgt bei Verwendung von Dyomics Farbstoffen (b₁) über APTES beziehungsweise im Fall von Atto647N Farbstoffen durch Anbindung des Farbstoffes an einen Cysteinsäure-APTES-Linker und direkte Zugabe des Farbstoffes während der Partikelsynthese.

Um die Menge an gebundenem Fluoreszenzfarbstoff und damit die Fluoreszenzintensität der Partikel zu erhöhen, wurden darüber hinaus verschiedene Farbstoffe mit Silan-Linkern

versehen und diese direkt während der Synthese kovalent in die Partikelmatrix eingebracht (Dye incorporation). Auf diese Weise wurden mit Farbstoff beladene Partikel erhalten, welche im STED Mikroskop eine bessere Abbildbarkeit besitzen (siehe dazu Abschnitt Matrix-gefärbte Systeme).

- Kern-Schale Systeme

Aufgrund der deutlich geringeren Dispersität der über den Arginin-Prozess hergestellten Partikel wurde die Stöber-Synthese zur Herstellung markierter Partikel nicht mehr weiterverfolgt. Eine Fluoreszenzmarkierung der Partikel mit einem STED-Farbstoff wurde über den Arginin-Prozess realisiert (Abbildung 6). Als Farbstoff wurde Atto647N verwendet, welcher bei $\lambda_{\text{Ex}} = 647 \text{ nm}$ angeregt und bei $\lambda_{\text{Em}} = 660 \text{ nm}$ detektiert werden kann. Der Farbstoff verfügt über eine nur geringe sogenannte „excited state“-Absorption und verfügt über eine ausgezeichnete STED Effizienz [17].

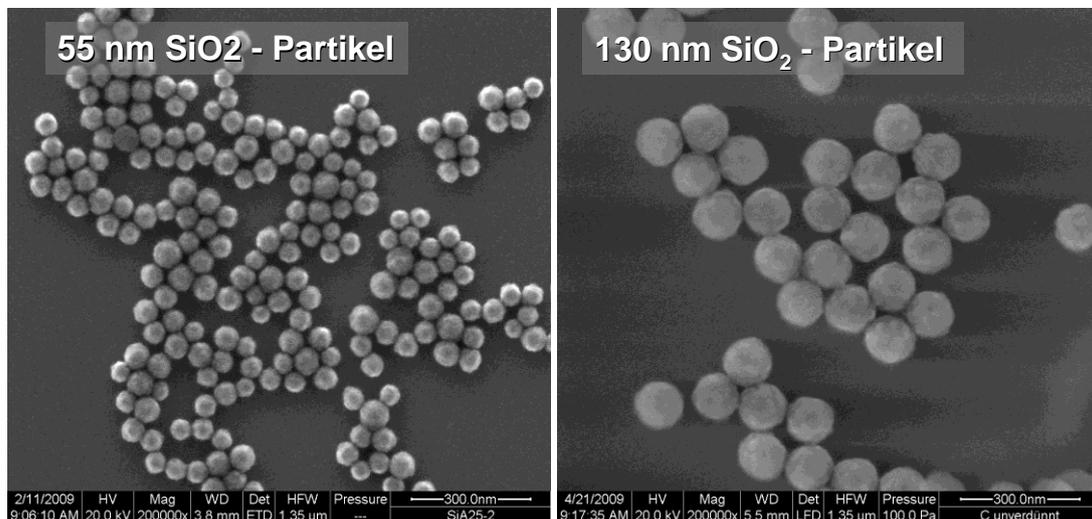


Abbildung 6: REM-Aufnahmen von SiO₂-Partikeln, welche über die Arginin-Methode erhalten wurden. Bei beiden 55 und 130 nm großen Partikeltypen handelt es sich um Kern-Schale Systeme mit nicht fluoreszierendem Kern, einer dünnen fluoreszierenden Schale und einer ca. 10–30 nm umfassenden abschließenden unmarkierten Hülle.

- Farbstoffmodifikation zur Anbindung an Silika-Oberflächen von Kern-Schale Partikeln

Zur kovalenten Anbindung wurde der aktive NHS-Ester des Farbstoffes mit einem dreifachen Überschuss an APTES (Aminopropyltriethoxysilan) in DMSO umgesetzt (Abbildung 7). Das dabei entstandene hydrolysebeständige Amid kann im Folgenden über die hydrolysierbaren Ethoxygruppen des Silans auf die Silika-Partikel aufgebracht werden, wobei für über die Stöber-Methode hergestellte Partikel ein Stoffmengenverhältnis Fluorophor zu TEOS von $1 : 5 \cdot 10^5$ eingesetzt wurde (Abbildung 7 und 8). Da der Farbstoff Atto647N kostenintensiv ist (1 mg / 144 €), wurde für die mittels Arginin-Methode hergestellten Partikel die aufgebrachte Farbstoffmenge im Vergleich zu fluoreszierenden Stöber Partikeln (10 % für die 55 nm Partikel, 20 % für die 130 nm Partikel) reduziert. Die Fluoreszenzspektren der Dispersionen wurden zum Vergleich bei gleichem SiO₂-Gehalt gemessen. Sie zeigen, dass die Partikel bei geringerer eingesetzter Farbstoffmenge auch weniger intensiv fluoreszieren (Abbildung 9).

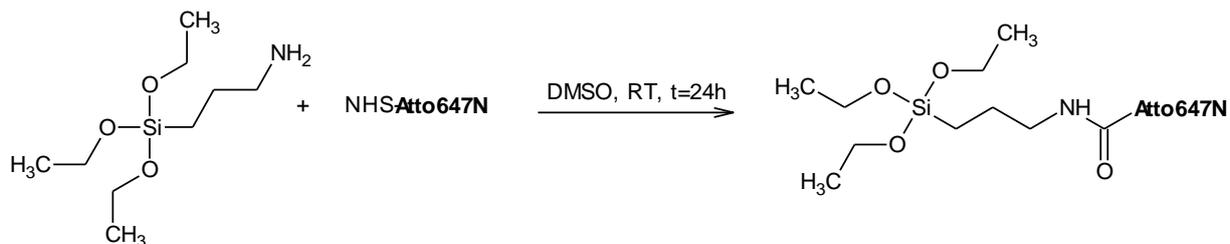


Abbildung 7: Kopplung des aktiven NHS-Atto 647N Esters an die Aminfunktionalität von APTES (Aminopropyltriethoxysilan).

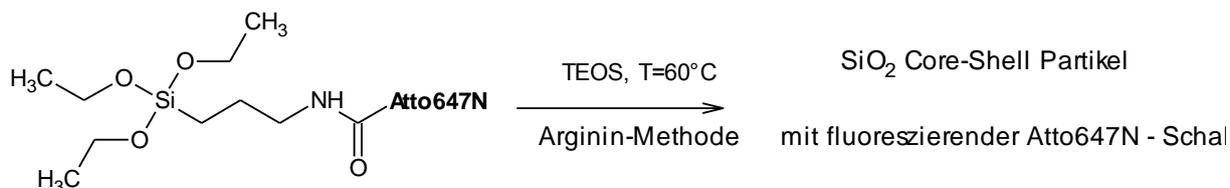


Abbildung 8: Anbindung des Fluorophors Atto647N durch Silanisierung von SiO_2 -Oberflächen mittels der Arginin-Methode.

Bei entsprechenden STED-Untersuchungen zeigte sich, dass die Partikel nach Reduktion des Fluoreszenzmarker-Gehaltes um den Faktor 10 mit unzureichender Intensität fluoreszieren. Zusätzlich schien der Farbstoff unter diesen Bedingungen deutlich stärker auszubleichen. Eine Verdopplung der Farbstoffmenge bewirkte eine deutliche Verbesserung der Detektierbarkeit mittels STED-Mikroskopie. Im Falle 130 nm großer Kern-Schale Nanopartikel resultiert dies in einem deutlich stärkeren Emissionssignal der einzelnen Partikel. Durch den Vergleich REM-STED (siehe Abschnitt 2.4 d) wurde sogar bestätigt, dass jeder einzelne Partikel ausreichend fluoreszenzmarkiert ist. Diese Partikel wurden deshalb für die Untersuchungen zum Auflösungsvermögen der STED-Mikroskopie im Vergleich zur Elektronenmikroskopie (ESEM), beziehungsweise der herkömmlichen Konfokalmikroskopie herangezogen.

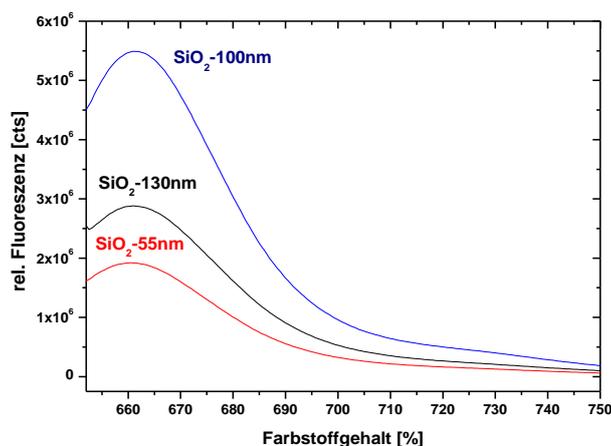


Abbildung 9: Fluoreszenzspektren Atto647N markierter SiO_2 -Nanopartikel. 100 nm Partikel (blaue Kurve) wurden nach der Stöber-Methode, mit einem Fluorophor : TEOS -Verhältnis von $1 : 5 \cdot 10^5$ hergestellt. Die rote und die schwarze Kurve entsprechen 55 und 130 nm großen Partikeln, welche nach der Argininmethode hergestellt wurden. Das Fluorophor : TEOS-Verhältnis lag bei $1 : 5 \cdot 10^6$ (rot) bzw. $1 : 10^6$ (schwarz).

Für eine effiziente Markierung der Silikapartikel geht anhand des in Abbildung 9 gezeigten Verlaufes eine Mindestdotierung der Partikel im Bereich zwischen 0.0408 und 0.204 mg Atto647N pro Gramm TEOS hervor. Für nachfolgende STED-Untersuchungen sowie biologische Tests wurden weiterhin zwei verschiedenen große Partikeltypen (45 nm und 130 nm) eingesetzt. Deshalb wird nachfolgend deren Synthese und Charakterisierung eingehender beschrieben.

Für diese Partikel wurden Kerne mit 28 und 100 nm Durchmesser hergestellt, fluoreszenzmarkiert, sowie mit einer zusätzlichen Silika-Hülle versehen. Um die Größenverteilung der SiO₂-Partikel zu ermitteln, wurden REM-Aufnahmen (Abbildung 10) der beiden Partikeltypen angefertigt. Anhand der Histogramme wurde eine Endpartikelgröße von etwa 45 nm bzw. 130 nm ermittelt (Abbildung 11). Im Anschluss an die elektronenmikroskopische Charakterisierung wurden Fluoreszenzmessungen an verdünnten Partikelsuspensionen durchgeführt (Abbildung 12). Außerdem waren diese Partikel erfolgreich mittels STED-Mikroskopie nachweisbar (Abschnitt 2.5).

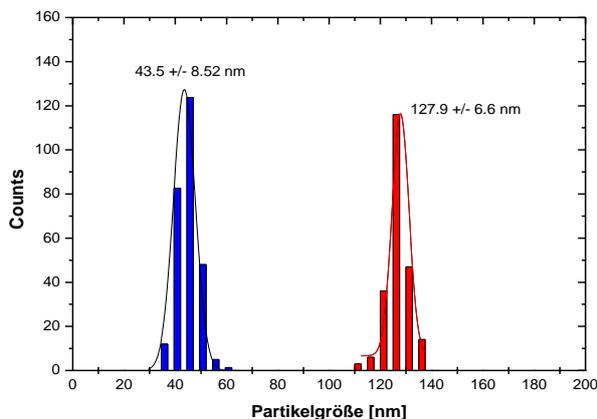
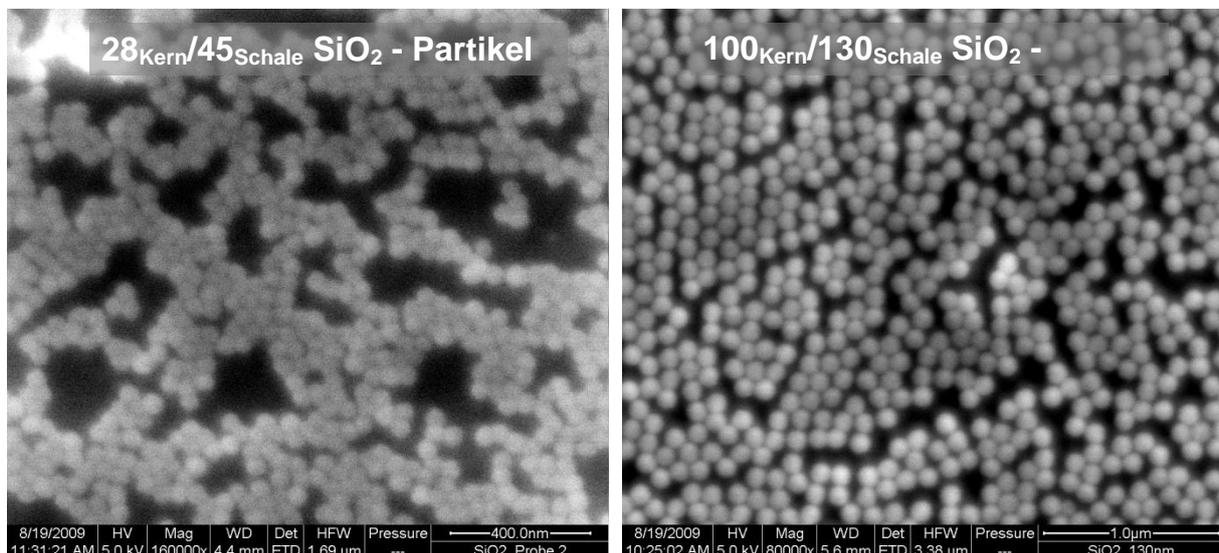


Abbildung 10: REM-Aufnahmen von SiO₂-Partikeln, welche über die Arginin-Methode erhalten wurden. Auf 28 beziehungsweise 100 nm SiO₂-Partikel wurde der Farbstoff aufgebracht und die Partikel mit einer weiteren Schale versehen.

Abbildung 11: Anhand der REM-Abbildungen durch statistische Auswertung erhaltene Partikelgrößenverteilung der 45 und 130 nm Partikel.

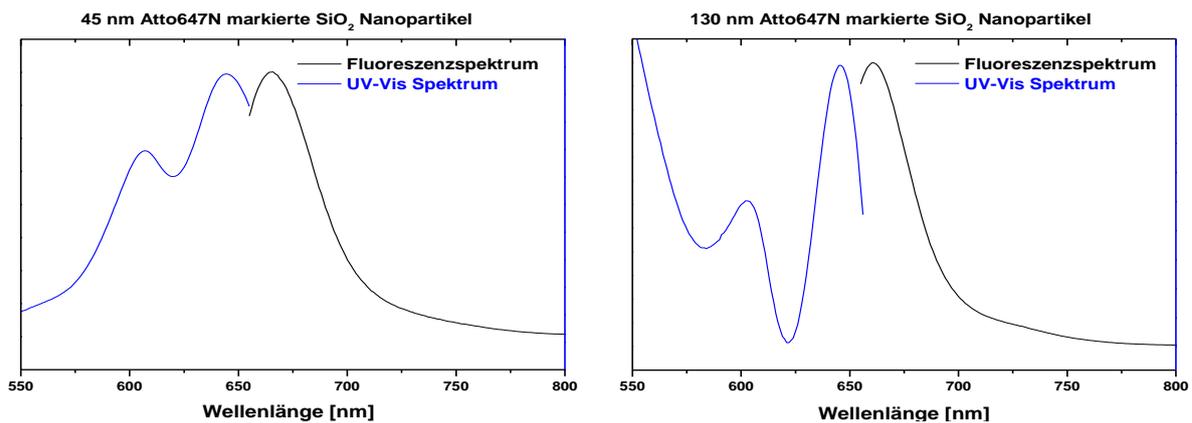


Abbildung 12: UV-Vis- und Fluoreszenzspektren der 45 nm und 130 nm großen SiO₂-Nanopartikel.

Um auszuschließen, dass ein Ausbluten des Farbstoffes aus der Partikelmatrix die Ergebnisse der biologischen Experimente beeinflusst, wurden die hergestellten Partikelsuspensionen, nach bis zu dreimonatiger Lagerzeit in wässriger Suspension, durch eine Größenausschlussmembran (30 kDa) zentrifugiert. Dabei wurden die Partikel vom Medium abgetrennt und der Überstand mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessen. In keinem der Überstände wurde Fluoreszenz nachgewiesen, was dafür spricht, dass der Farbstoff fest an die Partikel gebunden vorliegt. Als Nachteil des Herstellungsverweges erwies sich jedoch, dass diese Partikel nur mit einer geringen Farbstoffmenge beladen werden konnten, da der Einsatz größerer Mengen des positiv geladenen Farbstoffes bei der Synthese zur Agglomeration der Partikel führte. Mit entsprechend geringen Farbstoffmengen beladene kleinere Nanopartikel (< 40 nm) ließen sich zwar mittels STED-Mikroskopie abbilden, blieben aber bei mehrmaligem Abrastern im STED-Modus aus. Ziel war es deshalb, Partikel herzustellen, die ein mehrmaliges Abbilden im STED-Modus und damit die Aufnahme von dreidimensionalen Bildstapeln zulassen. Im Folgenden wurde daher die Partikelsynthese hinsichtlich einer verbesserten Bleichstabilität optimiert.

- Matrix-gefärbte Systeme

Dy-Farbstoffe

Zur Partikelsynthese wurden der bereits für die STED-Mikroskopie etablierte Farbstoff Atto647N (ATTO-TEC GmbH, Siegen) sowie drei Farbstoffe (Dy647, Dy648, Dy649) der Firma Dyomics GmbH (Jena) eingesetzt, welche sich in ihrer Ladung von Atto647N unterscheiden (Tabelle 1). Diese drei Farbstoffe besitzen dem Atto647N-Farbstoff vergleichbare Emission- und Absorptionsmaxima und schienen daher prinzipiell für die STED-Mikroskopie geeignet. Die Anbindung der Farbstoffe erfolgte durch Umsetzung der aktiven NHS-Ester mit APTES. Die so erhaltenen wasserlöslichen Farbstoffderivate wurden dann genutzt, um den Farbstoff *in situ* in die Partikelmatrix einzubauen (Abbildung 5).

Farbstoff	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]	Fluoreszenz- Lebensdauer [ns]	Ladung nach Kopplung	Absorptionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]
Atto647N	644	669	3,4	+1	150.000
Dy647	653*	672*	nicht bekannt	-1	250.000
Dy648	653*	674*	nicht bekannt	-2	250.000
Dy649	655*	676*	nicht bekannt	-3	250.000

Tabelle 1: Relevante Eigenschaften der Farbstoffe Atto647N, Dy647, Dy648 und Dy649 (Herstellerangaben). *in Ethanol. Die Ladungszahl bezieht sich auf die Ladung des Farbstoffs nach Kopplung an ein Substrat.

Über Syntheschema b₁ (Abbildung 5) wurden mit den Dyomics-Farbstoffen markierte Silika-Nanopartikel im Größenbereich zwischen 25 und 80 nm Durchmesser mit geringer Dispersität erhalten. Prinzipiell erfolgte die Partikelsynthese nach der im ersten Projektabschnitt beschriebenen Vorgehensweise. Die Herstellung von 29-40 nm SiO₂-Partikeln erfolgt im Cyclohexan/Wasser-System bei einer L-Arginin Konzentration von 7.5 mM (Abbildung 13).

Dabei erhaltene Silika-Partikel dienen als Keime, um bei einer L-Arginin Konzentrationen von 0,5 mM größere Partikel zu erhalten. Im Vergleich dazu gelang bei gleicher Vorgehensweise eine *in situ*-Einbindung des positiv geladenen Farbstoffs Atto647N nicht. Bei den gewählten Bedingungen kam es zur Abscheidung viskoser farbstoffhaltiger Gele am Kolbenrand. Die Isolierung wohldefinierter Partikel gelang unter diesen Bedingungen nicht. Bei Einsatz der Dyomics Farbstoffe führten gleiche Synthesebedingungen jeweils zu Partikeln ähnlicher Größe und Dispersität, was darauf schließen lässt, dass der APTES-gekoppelte Farbstoff nur einen geringen Einfluss auf die SiO₂-Phasenbildung ausübt. Bei analogen Synthesebedingungen kann dies vornehmlich auf Ladung und Hydrolyseverhalten des eingesetzten Farbstoffes zurückgeführt werden.

Da das System gerade bei geringen Partikelgrößen (< 50 nm) empfindlich auf den Zusatz des Farbstoffderivates reagieren kann, zum Beispiel durch Sekundärkeimbildung aufgrund einer höheren Hydrolysegeschwindigkeit des APTES-Farbstoff Edukts, wurden zunächst alle Dyomics-Farbstoffe zur Herstellung kleiner SiO₂-Nanopartikel im Größenbereich zwischen 30-40 nm genutzt, welche sich bei Erhalt der geringen Dispersität durch Wiederholung der Wachstumsschritte bis auf etwa 83 nm vergrößern ließen (Abbildung 5).

Die Einstellung der Partikelgröße erfolgte auf Basis der Daten, welche vorher für die Synthese reiner SiO₂-Partikel erhalten wurden. Hier zeigte sich vor allem bei der mittleren Partikelgröße mit 60 nm eine deutliche Abweichung vom erwarteten Wert (45 nm). Die mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmten hydrodynamischen Durchmesser von 32 +/- 8 nm, 48 +/- 4 nm und 77 +/- 11 nm zeigten hierbei eine bessere Korrelation mit den theoretisch zu erwartenden Werten von 25, 45 und 80 nm. Zusätzlich wurde das Zeta-Potenzial der hergestellten Partikel bestimmt. Wie die unmarkierten SiO₂-Partikel wiesen die fluoreszenzmarkierten Partikel eine negative Ladung (29 nm: -33 mV, 60 nm: -36 mV, 83 nm: -40 mV) auf, welche betragsmäßig der Ladung reiner SiO₂-Partikel in Wasser entspricht.

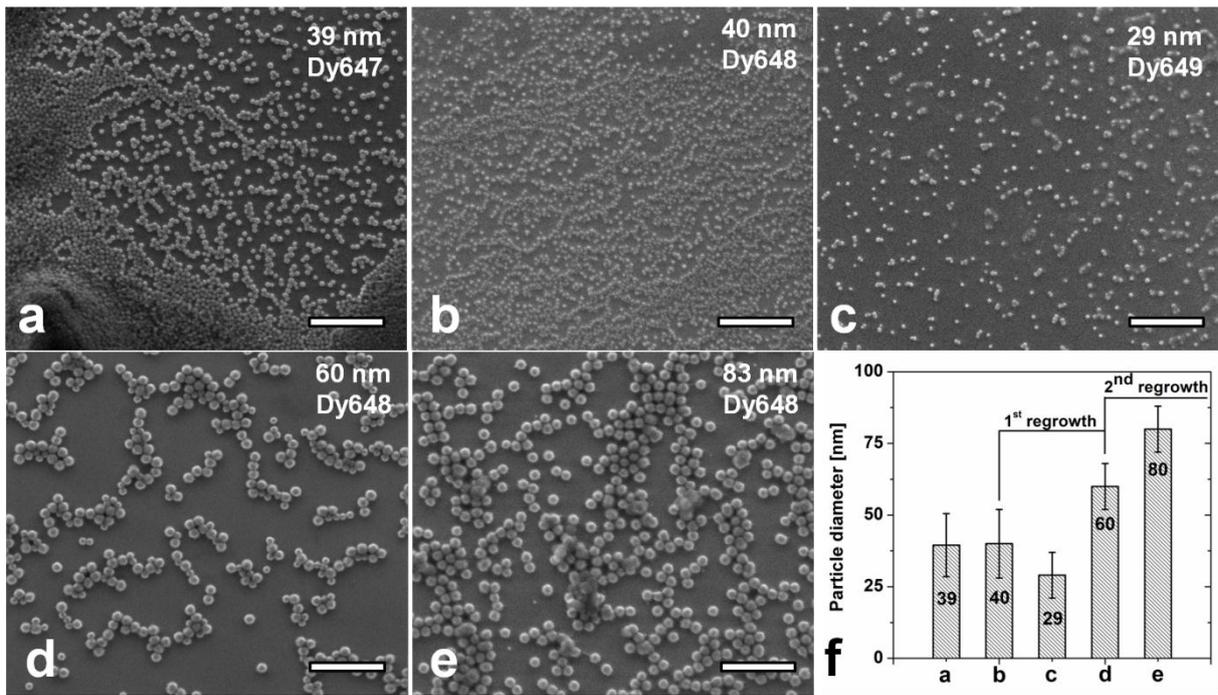


Abbildung 13: REM-Aufnahmen von (a) 39 ± 11 nm (Dy647), (b) 40 ± 12 nm (Dy648), und (c) 29 ± 8 nm (Dy649) Silika-Nanopartikeln, die nach Einbau von Dy647/648 oder Dy649 Farbstoff in die Partikelmatrix erhalten wurden. Dy647 und Dy648 haltige Partikel zeigt ähnliche Größe und Dispersität, während unter Verwendung von Dy649 zunächst kleinere Partikel (c) erhalten wurden. Nach einem weiteren Wachstumsschritt wurden aus (b) ca 60 ± 8 nm Partikel (d) erhalten, deren Größe mit nach nochmaligem Wachstum auf 80 ± 8 nm (e) erhöht werden konnte. In (f) sind die mittleren Partikelgrößen für die einzelnen Chargen (a-e) gezeigt, welche mittels Bildauswertung und LogNormal-Fit der Histogrammdata erhalten wurden. Maßstabsbalken = 300 nm.

Um die maximale in die Matrix eingebrachte Farbstoffmenge zu bestimmen und mit den zunächst hergestellten Atto647N markierten Kern-Schale-Partikeln zu vergleichen, wurden Fluoreszenzspektren bei gleicher Partikelkonzentration ($\rho(\text{SiO}_2) = 80 \mu\text{g ml}^{-1}$, eingesetzter Farbstoffkonzentration: $c = 3.4 \mu\text{M}$) und -verdünnung aufgenommen (Abbildung 14). Auf beide Partikelsorten wurde eine etwa 20 nm dicke SiO_2 -Hülle aufgebracht. Die Fluoreszenzintensität der durchgefärbten Dy648-Partikel lag um den Faktor 10 höher als die der Partikel mit Atto647N in einer dünnen Schicht.

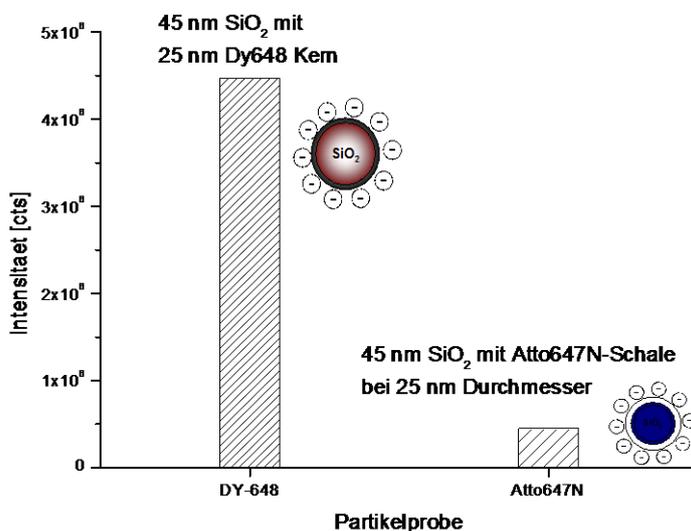


Abbildung 14: Fluoreszenzintensität von 45 nm SiO_2 -Nanopartikeln. Der Fluoreszenzfarbstoff ist in die Matrix des 25 nm Kerns eingebunden (Dy648) oder in einer dünnen Schicht auf der Oberfläche des Kerns gebunden (Atto647N).

Dieses Resultat ist aus folgenden Gründen nur qualitativ zu betrachten: Der Absorptionskoeffizient des Farbstoffs Atto647N ist geringer (60 %) als der von Dy648 (100 %, Tabelle 1). Für den Dyomics-Farbstoff sind weder Fluoreszenzquantenausbeute und -lebensdauer bekannt, so dass hierzu keine abschließende Aussage möglich ist. Qualitativ betrachtet erlaubt der Einbau von Farbstoff über die gesamte Partikelmatrix aber anscheinend eine höhere Beladungsdichte als bei Kern-Schale Partikeln mit fluoreszierender innerer Schale erreicht werden kann. Der Anteil an Farbstoff in der Schale konnte für Atto647N nicht erhöht werden, da höhere Farbstoffdichten selbst bei 25 nm Partikeln zu einer Agglomeration führten.

Die mit Dyomics-Farbstoffen markierten Partikel verschiedener Größe konnten mittels STED-Mikroskopie abgebildet werden. Daher wurde im Folgenden versucht die mittels der Dyomics-Farbstoffe erhaltenen Resultate zu nutzen, um schließlich durchgefärbte Atto647N markierte SiO₂-Nanopartikel herzustellen. Prinzipiell wurde der Herstellung von Atto647N gefärbten Partikeln eine hohe Priorität eingeräumt, da der Farbstoff aufgrund seiner aromatischen Struktur eine höhere Bleichstabilität besitzen sollte, als die entsprechenden Dyomics – Farbstoffe, welche konjugierte Doppelbindungen enthalten, die während der Aufnahme im STED- oder Konfokalmikroskop leichter oxidativ angegriffen werden können.

Atto647N als Farbstoff

Da die Gesamt-, bzw. Nettoladung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes bei der Synthese von Silika-Partikeln mit geringer Dispersität, einen wichtigen Faktor darstellt, sollten an dem Linker-Arm des Farbstoffes negativ geladene Gruppen angebracht werden, um dementsprechend ein neutrales beziehungsweise negativ geladenes Molekül zu erhalten. Dies wurde mit Hilfe peptidchemischer Ansätze verfolgt. Dabei wurde der aktive Atto647N-NHS Ester in DMSO mit Cysteinsäure zur Reaktion gebracht.

Das erhaltene Zwischenprodukt wurde nachfolgend mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl-)carbodiimid/ N-Hydroxysuccinimidylester (EDC/NHS) aktiviert, woraus nach Umsetzung mit APTES ein ungeladener Atto647N-Aminosilanlinker erhalten wurde, welcher zur kovalenten Bindung des Farbstoffes in die Partikelmatrix genutzt wurde.

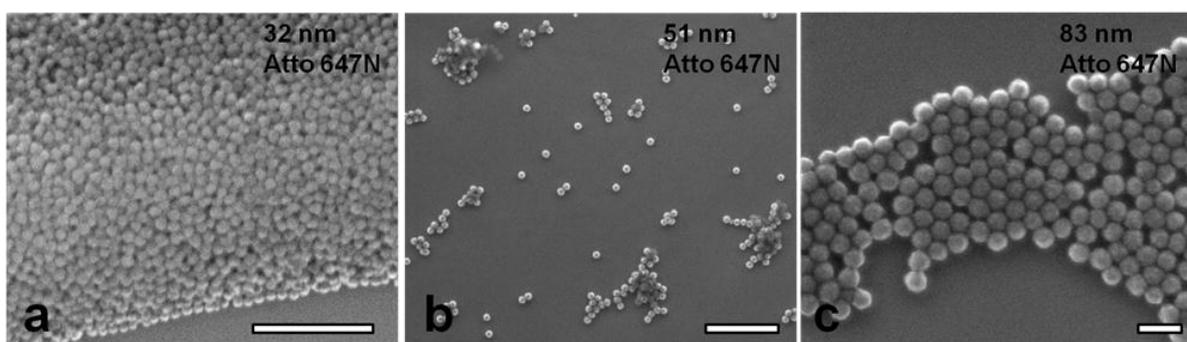


Abbildung 15: REM Abbildung 32 ± 6.3 nm, 51 ± 6.7 nm und 82.7 ± 11.8 nm Silika-Partikel, in deren Matrix Atto647N kovalent eingebunden wurde. Die Partikel besitzen eine geringe Dispersität zwischen 13 % (51 nm) und 20 % (83). Maßstabsbalken = 500 nm.

Wie bereits erwähnt, konnten bei Verwendung eines reinen APTES-Atto647N Amides keine definierten Partikel über die Synthese nach Hartlen erhalten werden (bei Einbringen in die Partikelmatrix). Durch zusätzliche Ankopplung von Cysteinsäure, deren Sulfonsäuregruppe eine negative Ladung trägt, wurden durchgefärbte Silika-Partikel, basierend auf dem oben dargestellten Syntheseprotokoll (Abbildung 5 und 15), erhalten.

Die Größeneinstellung verglichen mit der Herstellung reiner Silika-Nanopartikel gelang für die gewählten Synthesebedingungen in allen Fällen (Abbildung 15). Alle Partikel besaßen nur eine geringe Dispersität (~10-20 %) und zeigten analog zu den Dy-markierten Partikeln keine signifikante Agglomeration in Wasser. Die hydrodynamischen Durchmesser lagen für die gemessenen Proben bei 39,6 +/- 5,3 nm (FD30, $d_{SEM} = 32$ nm), 47,2 +/- 2,7 nm (FD50, $d_{SEM} = 51$ nm), sowie 71 +/- 9,8 nm (FD80, $d_{SEM} = 83$ nm). Durch Einbau von Cysteinsäure in die Seitenkette des Atto-Farbstoffes konnte sowohl die Hydrophilie des Farbstoffes gesteigert werden als auch eine Agglomeration der Partikel während der Synthese verhindert werden.

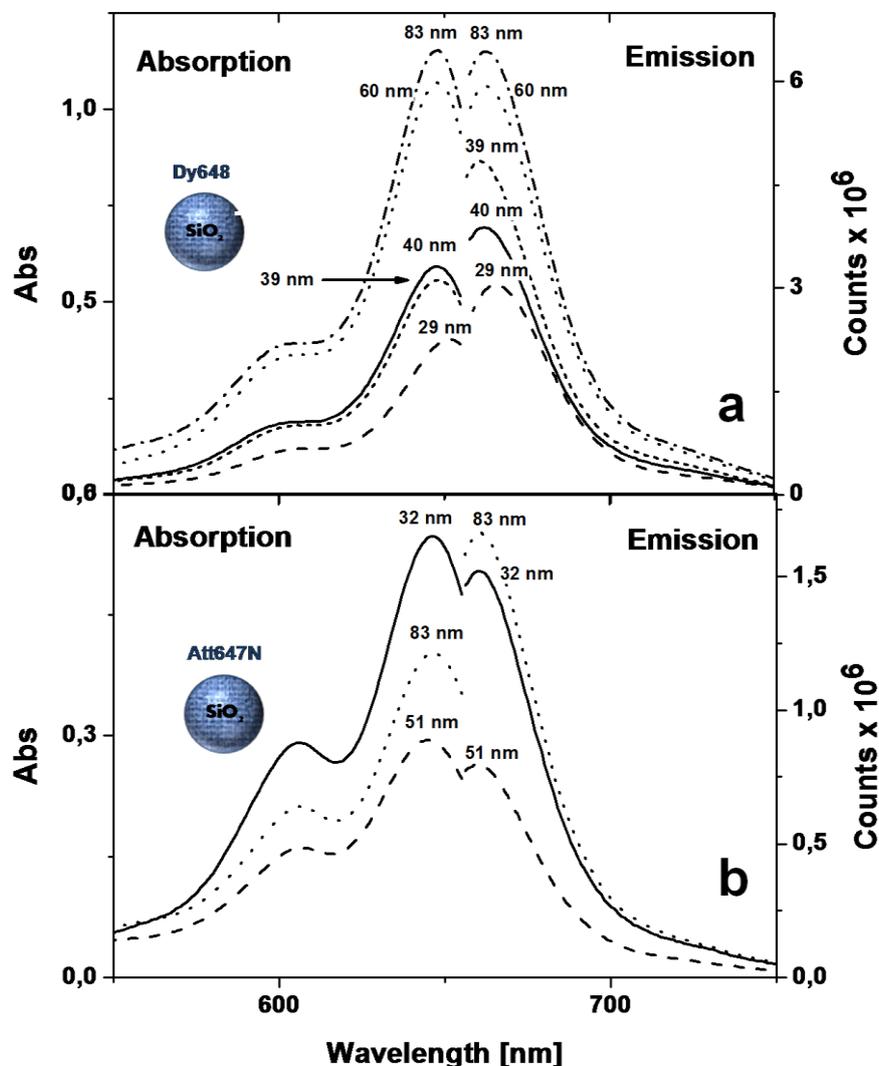


Abbildung 16: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) der Silika-Partikel nach Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe Dy648 (oben) und Atto647N (unten) in die Partikelmatrix. Die Absorptionsmaxima liegen zwischen 647-648 nm während die Emissionsmaxima im Bereich von 660-670 nm liegen, ideal für das vorhandene STED-System. Zahlen geben jeweils die Größen der verwendeten Partikel an.

Abbildung 16 zeigt eine Zusammenstellung der UV-Vis und Fluoreszenzspektren verschiedener im Projektrahmen hergestellter matrix-gefärbter Partikel. Dabei wurden als Farbstoffe sowohl Dy648 als auch Atto647N eingesetzt (Abbildung 5 b). Atto647N wurde unter Verwendung eines Cysteinsäure-APTES Linkers kovalent eingebunden.

- Stabilität der verwendeten Silika-Partikel in biologischen Medien

Die Stabilität der in biologische Experimente eingesetzten Partikelsuspensionen wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) in Wasser als Referenz sowie in den für die biologischen Experimente verwendeten Medien bestimmt. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung der Charakterisierungsdaten von Partikeln, mit denen biologische Experimente durchgeführt wurden. In der Regel ist der gemessene hydrodynamische Durchmesser der Partikel in serumhaltigem Medium durch Ausbildung einer Proteinkorona an der Partikeloberfläche gegenüber dem REM-Durchmesser bzw. dem Durchmesser in Wasser etwas erhöht.

Farbstoff	d _{SEM}	Agglomeratanteil	
		[%]	
	[nm]	H ₂ O	Medium
Dy648	40 (30)	0	0.2
Dy648	60 (13.3)	1.7	1.4
Dy648	83 (10)	0	2.5
Atto647N	32 (19.7)	0.1	0.1
Atto647N	51 (13.1)	1.2	2
Atto647N	83 (14.3)	0	0.1

Tabelle 2: Agglomerationsverhalten Atto647N und Dy648 gefärbter Partikel in MilliQ Wasser und ME-Medium mit 20 % FCS. Die Partikel wurden für 24 h inkubiert, bevor mittels DLS der massengewichtete Anteil an Agglomeraten bestimmt wurden. Zahlen in Klammern geben die prozentuale Dispersität der Partikel an.

Probe	Art	Zeta-Potential [mV]	Spektroskopie		Hydrodynamischer Durchmesser			d _{SEM} [nm]
			UV-Vis	Fluoreszenz	[nm]			
			λ _{Ex} [nm]	λ _{Em} [mV]	Wasser	MEM/FCS	DMEM/FCS	
130 nm SiO ₂	Kern-Schale	-40	645	660	214.0	200	148.0	128 (5.4)
45 nm SiO ₂	Kern-Schale	-31	647	660	46.0	38.0	74.0	43.5 (19.5)
32 nm SiO ₂	Matrix	-20.7	646	660	27.8	46.0		32.0 (19.7)
88 nm SiO ₂	Matrix	-32.8	647	661	71.0	125.6		87.7 (12.3)
83 nm SiO ₂	Matrix	-47.4	647	661	79.0	84.7		82.7 (14.3)

Tabelle 3: Charakterisierungsdaten Atto647N-gefärbter Silika-Partikel in Wasser oder Zellkulturmedium (FCS-Anteil in MEM = 20 %, in DMEM = 10 %). Werte in Klammern geben die prozentuale Dispersität der Partikel an. Spektroskopische Daten geben die Wellenlänge des Intensitätsmaximums wider. Die dynamische Lichtstreuung wurde nach 24 h Inkubation in den verschiedenen Medien gemessen.

Das Agglomerationsverhalten verschieden markierter Partikel unterschiedlicher Größen wurde in ME-Medium mit 20 % FCS untersucht (Tabelle 3). Alle Partikel zeigen eine hohe Stabilität sowohl in Wasser als auch in Medium. Daher wird davon ausgegangen, dass im gewählten Zeitfenster von 24 h eine Inkubation von Zellen mit Partikeln ohne nennenswerte Verluste an freien Primärpartikeln erfolgen kann. Weiterhin wurde das Agglomerationsverhalten reiner Silika-Suspensionen getestet (Tabelle 4).

Partikeltyp	25 nm SiO ₂ (Me25e)	80 nm SiO ₂ (Me80)
Durchmesser (Dispersität)	28,1 nm (12,1)	79,5 nm (8,5)
Zetapotenzial in Wasser [mV]	-39,5	
DLS-Durchmesser (Wasser)	27,8 nm (6,5)	83,4 nm (14,6)
42 nm SiO₂ (IRMM 304)		
Durchmesser (Dispersität)	42 nm	
Zetapotenzial in Wasser	-51,4 mV	
DLS-Durchmesser (Wasser)	42,8 nm (7%)	
DLS-Durchmesser (MEM+20%FCS)	129 nm (10%)	

Tabelle 4: Eigenschaften der verwendeten unmarkierten (Me25, Me80, IRMM 304 (kommerzielles Material)-Silika-Nanopartikel. Zahlen in Klammern geben die prozentuale Dispersität der Partikel an.

- Kennzahlen der Silika-Nanopartikel (Größe, Oberfläche, Anzahl)

Je kleiner Nanopartikel sind, umso größer wird das Verhältnis Oberfläche zu Volumen und umso größer wird die Oberfläche und Partikelzahl bezogen auf einen festen Gehalt. Dementsprechend können biologische Experimente auf verschiedene dieser Größen bezogen werden. Für vergleichende Untersuchungen bedeutet dies, dass bei gleichem Gehalt aber unterschiedlicher Partikelgröße viel mehr kleine Partikel als große in ein Experiment eingesetzt werden.

Partikelgröße [nm]	BET-Oberfläche [m ² /g]	Partikelanzahl [nM] bei SiO ₂ - Gehalt von 1000 mg/l	theor. Oberfläche [m ² /g] bei SiO ₂ - Gehalt von 1000 mg/l
23	108,8	145	145
35	90,3	41,1	95
72	34,91	4,7	46
130	n.b.	0,8	26

Tabelle 5: Zusammenstellung der Kennzahlen unmarkierter Silika-Partikel. Ein Vergleich zwischen 23 nm und 72 nm Partikeln zeigt beispielsweise: Bei gleichem Gehalt liegen 30x mehr 23 nm Partikel vor, die Oberfläche der 23 nm Partikel ist 3x größer.

Im Rahmen dieses Vorhabens wurde die eingesetzte Menge der Partikelsuspensionen auf den SiO₂-Gehalt ($\mu\text{g ml}^{-1}$) bezogen. Dies erlaubt eine Vergleichbarkeit mit anderen Materialtypen und Literaturdaten. Die geringe Dispersität und die sphärische Struktur der Partikel ermöglicht darüber hinaus eine Berechnung der Partikelzahl und der theoretischen

Partikeloberfläche über den experimentell bestimmten Partikeldurchmesser. Somit ist es möglich, Betrachtungen zur Partikelzahl und Oberfläche in die Interpretation der Daten mit einfließen zu lassen, bzw. die Experimentdaten auf die entsprechenden Größen zu beziehen. Zusätzlich wurde die BET-Oberfläche verschiedener Partikel gemessen (Tabelle 5).

- Endotoxingehalt der Silika-Partikel

Der Endotoxingehalt von SiO₂-Nanopartikeln kann die hervorgerufene Zytotoxizität und Reaktionen vor allem immunkompetenter Zellen beeinflussen [18]. Der Endotoxingehalt repräsentativer Partikelsuspensionen wurde mittels Limulus Amebozyten Lysat (LAL) Gel Clot Assay (Pyrogen™ Plus, Lonza) bestimmt. Er betrug für Suspensionen mit einem Gehalt von 1 mg SiO₂ ml⁻¹ und einem Partikeldurchmesser von

25 nm: 2,82 EU ml⁻¹

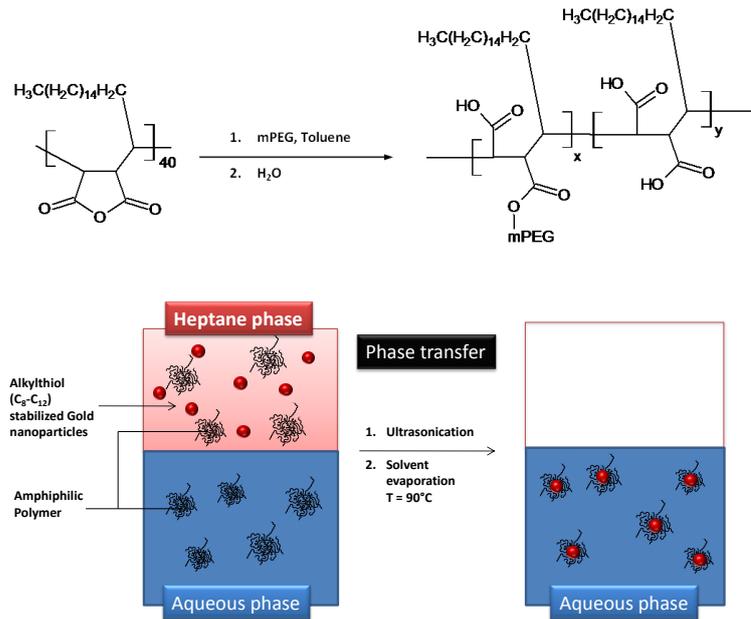
80 nm: 0,06 EU ml⁻¹

130 nm: 0,06 EU ml⁻¹

Es ist davon auszugehen, dass die verwendeten Zelltypen keine signifikante und anhand der eingesetzten Endpunkte messbare Reaktion auf die im Experiment vorhandenen Endotoxingehalte (< 0,564 EU ml⁻¹, < 0,01 EU ml⁻¹) zeigen [19].

c) Silber-Nanopartikel

Im Rahmen des Projektes sollte eine weitere fluoreszierende Partikelsorte hergestellt werden. Neben Gold wurden hierzu Silberpartikel ausgewählt, da diese einerseits für technische Anwendungen relevant sind, andererseits aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung Anwendung finden. Silber Nanopartikel wurden durch thermische Zersetzung von Silberoleat in Anwesenheit von Oleylamin als Stabilisator hergestellt.



Hierbei wurden hydrophobe Partikel mit einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von $d = 5 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ (vor Phasentransfer) erhalten.

Der Phasentransfer in die wässrige Phase sowie die Stabilisierung wurde durch Modifikation der Partikel mit einem amphiphilen Polymer [Poly(maleinsäure anhydrid)-alt-1-octadecen, PMAO, Abbildung 17] erreicht. Durch Umsetzung der Anhydridgruppen mit Hydroxyl- oder aminhaltigen organischen Verbindungen kann nachfolgend eine gezielte Einstellung der Polymerfunktionalität und damit der Partikeleigenschaften erfolgen.

Abbildung 17: Struktur des verwendeten Polymers (PMAO, oben) und Schema des Phasentransfers. Hierbei wurde Ultraschall eingesetzt. Die Partikel wurden dadurch mit hoher Ausbeute (>80%) in die wässrige Phase überführt.

Im Projektzeitraum wurden zwei unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen der Silbernanopartikel realisiert. Zur Darstellung mittels STED-Mikroskopie wurde das monofunktionelle Aminoderivat des Farbstoffs Atto647N eingesetzt. Die kovalente Kopplung erfolgte durch Aktivierung der Carboxylatgruppen der Partikel mittels EDC/NHS (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid/ N-Hydroxysuccinimidylester) in wässriger Lösung und Umsetzung mit dem Farbstoff.

Ein analoges Vorgehen wurde zur Ankopplung Farbstoffes Atto488 ($\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 521 \text{ nm}$) gewählt. Dieser Farbstoff eignet sich für die Abbildung der Partikel mittels herkömmlicher Konfokalmikroskopie. Die Herstellung Atto488-markierter Partikel wurde realisiert, um den STED-Kanal zur Abbildung zellulärer Strukturen nutzen zu können. TEM Aufnahmen und Fluoreszenzspektren der markierten Partikel sind in Abbildung 18 gezeigt. Die Partikel zeigen nur geringe Agglomeration und sind in biologischen Medien weitgehend stabil.

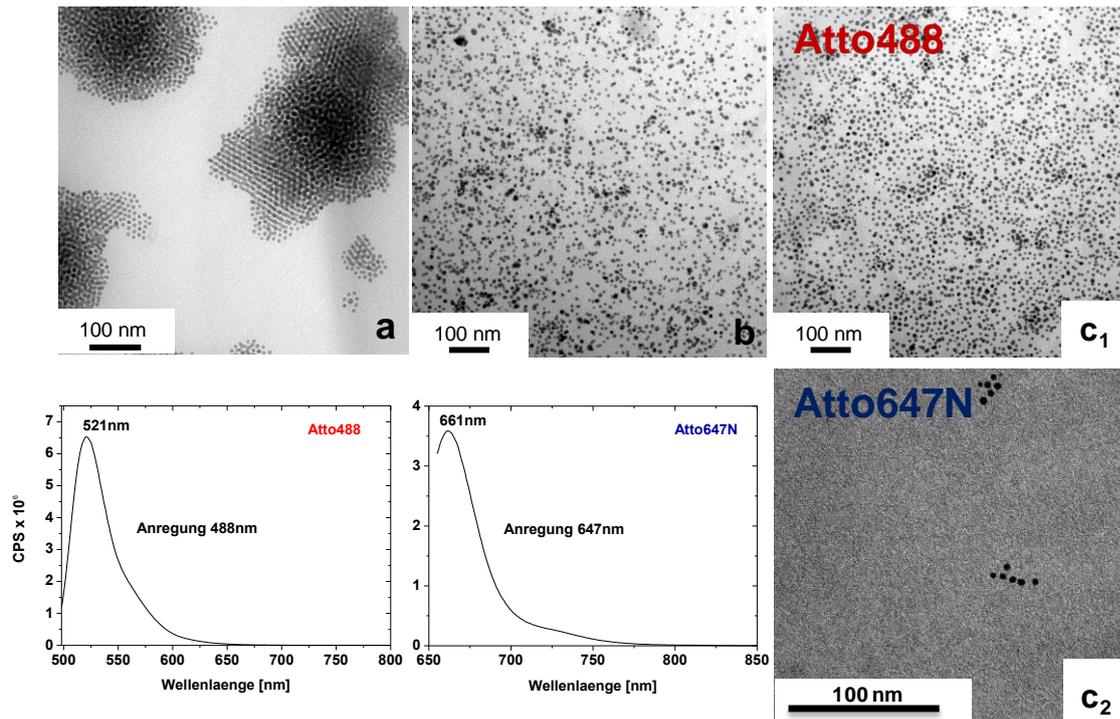


Abbildung 18: TEM-Aufnahmen der Silberpartikel nach Synthese dispergiert in Cyclohexan (a), nach Phasentransfer in Wasser (b), nach Ankopplung von Atto488 (c₁) und Atto647N (c₂). Die Emissionsspektren der fluoreszenzmarkierten Partikel wurden für Atto488 bei 488 nm Anregungswellenlänge bzw. für Atto647N bei 647 nm aufgenommen und zeigen eine ausreichende Fluoreszenz der markierten Partikel zur Abbildung mittels STED und Konfokalmikroskopie.

- **Stabilität fluoreszenzmarkierter Silber-Partikel in biologischer Umgebung**

Beide Partikelsorten wurden für biologische Experimente eingesetzt (Abschnitt 2.5). Daher wurde die Stabilität der Partikel mittels dynamischer Lichtstreuung in Wasser sowie Zellkulturmedien bestimmt (Tabelle 6). Die Partikel zeigen in Wasser eine geringe Agglomerationsneigung (5 %). In beiden serumhaltigen Medien erhöht sich sowohl der hydrodynamische Durchmesser der Partikel als auch der Agglomerate. Aufgrund der hohen Proteinkonzentration verringert sich der Anteil an Agglomeraten auf 0.1 %. Dies deutet auf eine stabilisierende Wirkung der Serumproteine hin. Ungefärbte Partikel zeigten in Suspension ein ähnliches Verhalten.

Probe	TEM - Durchmesser [nm]	DLS-Durchmesser		
		H ₂ O	DMEM/ FBS 10%	MEM/ FBS 20%
Ag-Atto647N	9,7 ± 1.58	22,2 ± 1,4 (95%)	31,3 ± 4,9 (3,4%)	30,0 ± 9,6 (2,1%)
		113 ± 10 (5%)	227 ± 58 (0,1%)	182 ± 38 (<0.1%)
			7,4 ± 1,0	7,6 ± 1,4
			(96,4%, Protein)	(96,7% Protein)
		Zetapotential [mV]		
		-40,4 [unverd.]	-10,2	-0,937
		-24,7 [1:10 verd.]		
Ag-Atto488	8,9 ± 1.65	11,4 ± 0,4 (99,1%)		
		90,0 ± 1,2 (0,9%)		
		Zetapotential [mV]		
		-65,4		
Ag Pol	8,3 ± 1,44	12,4 ± 1,64 (100%)		

Tabelle 6: Partikelstabilität fluoreszenzmarkierter (Ag-Atto647N und Ag-Atto488) und unmarkierter polymerstabilisierter (AgPol) Silber-Nanopartikel in Wasser, DMEM/FBS (10%) oder MEM/FBS (20%) nach 24 h Inkubation. In Medium lassen sich keine Agglomerate in signifikanter Menge detektieren. Unmarkierte Dextran-stabilisierte Partikel wiesen eine multimodale Verteilung (TEM, 2-30 nm) auf.

d) *Charakterisierungsmethoden und verwendete Geräte*

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen wurden an einem FEI Quanta 400 ESEM FEG im Hochvakuum und Low-Vakuum bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV durchgeführt. Zur Probenpräparation wurden 5 µl Probenvolumen auf einen Silizium-Wafer aufgetragen und an Luft oder unter Vakuum getrocknet.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

TEM Aufnahmen wurden mit einem CM 200 (200keV) Mikroskop der Firma Philips aufgenommen. Die Präparation der Proben erfolgte durch Aufbringen von 10-100 µl Suspension auf ein kohlenstoffbeschichtetes Kupfernetz und anschließendes Trocknen der Proben an Luft.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Durchführung der Lichtstreuexperimente erfolgte an einem DynaPro Titan der Firma Wyatt Technology (Deutschland) bei einer Laserwellenlänge von 831 nm. Zur Messung wurde eine Quarz-Mikroküvette verwendet (minimales Probenvolumen 600 µl).

Zetapotenzial

Die Messung des Zetapotenzials wurde an einem Zetasizer Nano Z der Firma Malvern (Deutschland) mit einem Probenvolumen von 1 ml bei Raumtemperatur durchgeführt.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoreszenzspektrometer der Firma Horiba Jobin Yvon bei einer Verdünnung von 1:20 (Probe:Wasser) durchgeführt. Die Anregung der Dy- und Atto-Farbstoffe erfolgte bei den mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmten Absorptionsmaxima der Proben.

UV-Vis-Spektroskopie

UV-Vis-Spektren wurden mit einem Varian Cary 300 Scan UV im Wellenlängenbereich zwischen 300 und 800 nm aufgenommen.

Gehaltsbestimmung

Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels ICP an einem ICP OES Ultima 2 Gerät der Firma Horiba Jobin Yvon. Die dialysierten Partikelproben wurden dazu 1:100 verdünnt und gegen eine Si-Standardlösung gemessen.

Partikelgröße und Dispersität

Die Bestimmung der Partikelgröße und -verteilung erfolgte durch Bildauswertung von REM-Aufnahmen mittels der Software ImageJ (Rasband, 1997-2012).

BET-Oberfläche

Die Bestimmung der BET-Oberfläche gefriergetrockneter Partikelproben erfolgte an Autosorb-6B BET Gerät der Firma Quantachrom Partikelmesstechnik.

2.2 Toxizität der eingesetzten Silika-Nanopartikel

Da Nanopartikel gegenwärtig in vielen Bereichen und Produkten Anwendung finden, ist die Untersuchung ihrer Toxizität wichtig, um mögliche negative Effekte nach Partikelexposition auf Mensch und Umwelt abschätzen zu können. In zahlreichen Zellkulturmodellen konnten nach Inkubation mit Silika-Nanopartikeln z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen oder ein Einfluss auf die Membranintegrität der Zellen beobachtet werden [20-22]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität von Silika-Nanopartikeln, abhängig ist vom Proteingehalt des Mediums [23, 24]. Um zu untersuchen, ob die Silika- und Silberpartikel, die in diesem Projekt hergestellt wurden, ebenfalls toxische Effekte in Zellen induzieren, wurden verschiedene Endpunkte wie Apoptose, ROS-Produktion oder Vitalität nach Partikelexposition gemessen. Die toxikologischen Untersuchungen erfolgten an humanen Epithelzellen der Lunge (A549 Lungenkarzinom, DSM ACC 107) [25] und des Darms (Caco-2 Adenokarzinom, DSM ACC 169) [26], da beide Organe zu den potenziellen Zielorten von Nanopartikeln gehören [2, 4].

2.2.1 Auswirkungen von Silika-Nanopartikeln auf A549-Zellen

A549-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) und 4 mM L-Glutamin, bei 37 °C und 9 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden für die Experimente in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 96-well Mikrotiterplatten (Wachstumsfläche: 0,32 cm²) ausgesät und nach 24 h mit den entsprechenden Partikelsuspensionen versetzt. Dazu wurde das Medium entfernt, anschließend wurden jeweils 100 µl einer Partikelsuspension mit 10 µg SiO₂ ml⁻¹ bis 200 µg SiO₂ ml⁻¹ (Abschnitt 2.1) zu den Zellen pipettiert und über einen Zeitraum von 5 min bis 72 h inkubiert. Die Partikelsuspensionen wurden entweder in DMEM mit 10 % FBS (Vollmedium), in DMEM mit 0,5 % FBS oder in DMEM ohne FBS angesetzt. Als Partikel wurden markierte und unmarkierte Silika-Nanopartikel unterschiedlicher Größe getestet.

Zur Überprüfung der Zytotoxizität wurden verschiedene Assays eingesetzt, wobei die Membranintegrität, die Vitalität, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Induktion von DNA-Schäden und die Caspase-Aktivierung untersucht wurden. Zusätzlich dazu erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen nach Inkubation mit Partikeln, um mögliche morphologische Änderungen zu identifizieren.

a) Lichtmikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie

Im Lichtmikroskop zeigten sich in Medium ohne FBS für 30 nm und 80 nm große Silikapartikel bei einer Konzentration von 200 µg ml⁻¹ sehr viele tote Zellen (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu sieht man in Vollmedium bei dieser Konzentration keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 20). Bei der niedrigen Konzentration von 10 µg ml⁻¹ erkennt man sowohl in Vollmedium als auch in Medium ohne FBS keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle.

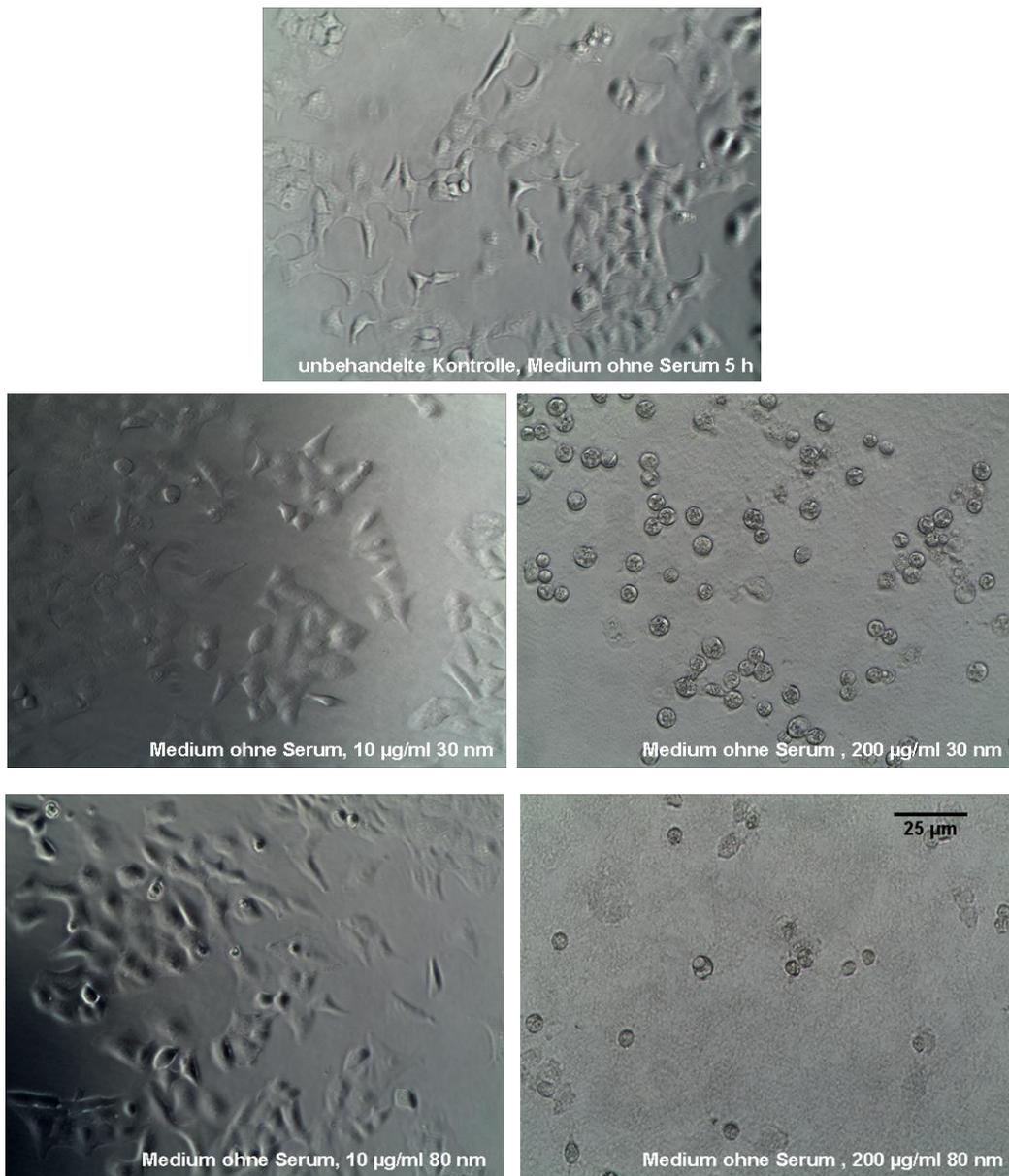


Abbildung 19: A549 Zellen wurden für 5 h mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Silika-Nanopartikeln (30 nm und 80 nm) in Medium ohne FBS inkubiert. Die Durchlichtaufnahmen erfolgten mit dem Zeiss Mikroskop Axiovert 25.

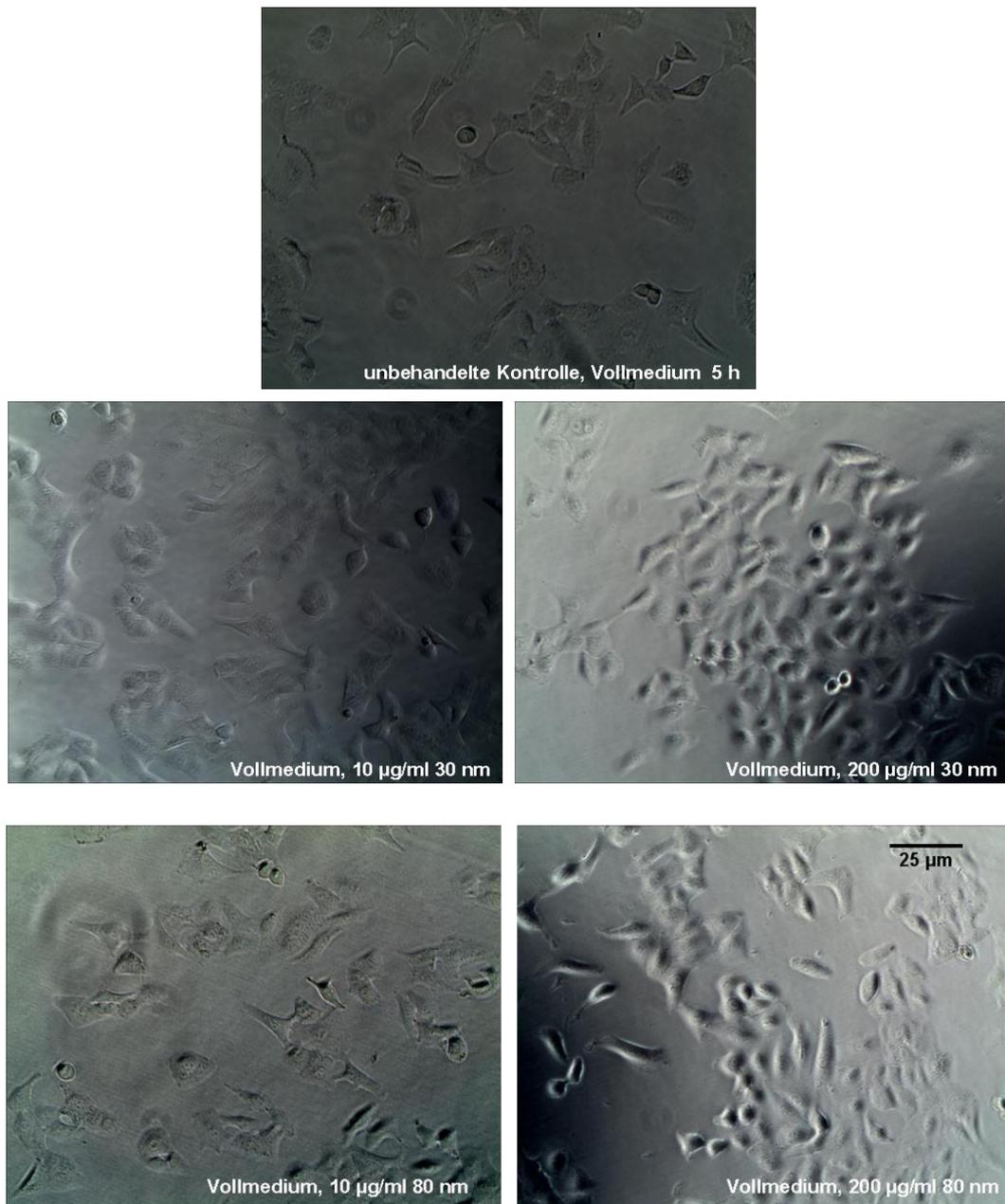


Abbildung 20: A549 Zellen wurden für 5 h mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Silika-Nanopartikeln (30 nm und 80 nm) in Medium ohne Serum (FBS) inkubiert. Die Durchlichtaufnahmen erfolgten mit dem Zeiss Mikroskop Axiovert 25.

b) Prüfung der Lebensfähigkeit (Live/Dead Färbung)

Zur Bestimmung der Anteile lebender und toter Zellen nach Behandlung mit 30 nm und 80 nm großen Silika-Nanopartikeln in den unterschiedlichen Medien wurde eine simultane Färbung mit Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) durchgeführt. Propidiumiodid färbt nur tote Zellen mit nicht intakter Zellmembran rot an. Fluoresceindiacetat kann nur von lebenden Zellen in ein grün fluoreszierendes Produkt umgesetzt werden.

Das Medium von A549-Zellen wurde nach 5 h Behandlung mit den oben genannten Konzentrationen an Silika-Nanopartikeln abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen für

5 min mit 10 μM PI und 0,2 μM FDA in DPBS inkubiert. Als Positivkontrolle diente eine Behandlung mit 9 % Triton-X-100.

Es zeigte sich, dass nach Behandlung der Zellen mit 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ der 30 nm Partikel in Medium ohne FBS 70-80 % der Zellen abgerundet und tot waren (Abbildung 21). Bei gleicher Konzentration zeigten sich bei den 80 nm Partikeln abgerundete, aber wenig tote Zellen. Dies deutet auf eine Induktion von Apoptose hin. Nach Inkubation beider Partikelgrößen in Vollmedium konnte keine Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden (Abbildung 22).

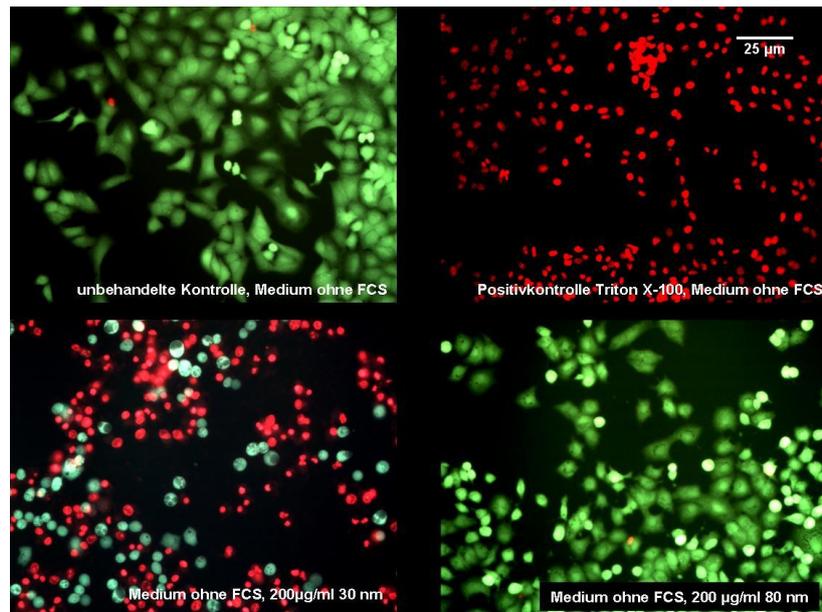


Abbildung 21: A549 Zellen wurden für 5 h mit Silika-Nanopartikeln (30 nm und 80 nm) in Medium ohne FBS inkubiert und anschließend mit PI und FDA gefärbt, um den Anteil an lebenden und toten Zellen zu bestimmen. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Zeiss Mikroskop Axiovert 25.

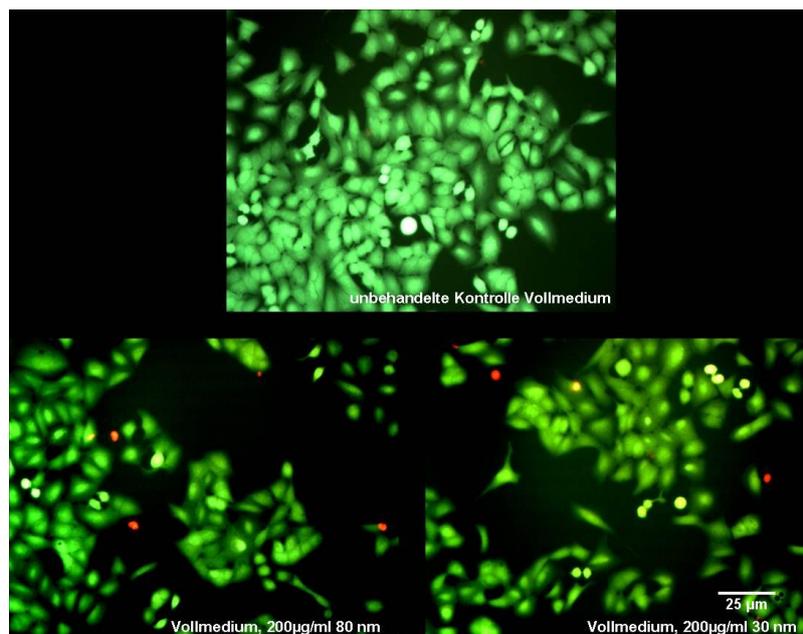


Abbildung 22: A549 Zellen wurden für 5 h mit Silika-Nanopartikeln (30 nm und 80 nm) in Vollmedium inkubiert und anschließend mit PI und FDA gefärbt, um den Anteil an lebenden und toten Zellen zu bestimmen. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Zeiss Mikroskop Axiovert 25.

c) *Analyse der Membranintegrität (LDH-Assay)*

- Partikelexposition in Vollmedium mit 10 % Serum

Zur Bestimmung der Auswirkung unmarkierter Silika-Nanopartikel auf die Membranintegrität wurde die Aktivität des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) im Kulturmedium mit dem Kit „CytoToxONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay“ (Promega) untersucht. Das zytosolische Enzym LDH katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, welche an die Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ gekoppelt ist. Bei Verlust der Membranintegrität wird LDH aus dem Zytoplasma ins Medium freigesetzt. Durch Zugabe eines Substrat-Gemisches aus Lactat, NAD^+ und Resazurin in Anwesenheit von Diaphorase kann die freigesetzte LDH bestimmt werden: Das durch die LDH-Reaktion gebildete $\text{NADH}+\text{H}^+$ setzt mittels Diaphorase den Farbstoff Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin um. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur LDH-Aktivität.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden jeweils 50 μl Medium in eine schwarze 96-well Mikrotiterplatte überführt. Als Positivkontrolle für eine maximale LDH-Freisetzung wurden Zellen kurz vor der Substratzugabe mit 2 μl 9 %-igem Triton-X-100 lysiert. Zum Medium wurden 50 μl des Substrat-Gemisches pipettiert und der Ansatz für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 25 μl Stopplösung wurde die Reaktion beendet und anschließend die Fluoreszenz gemessen ($\lambda_{\text{Ex}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 590 \text{ nm}$). Eine Assay-Interferenz durch die Anwesenheit der Partikel wurde nicht beobachtet. Die 48 h Werte werden als Minimalwerte betrachtet, da die Halbwertszeit der LDH etwa 8 h beträgt. Aus den gemessenen Fluoreszenzwerten wurde die Zytotoxizität nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{\text{Partikelbehandlung} - \text{Hintergrund Kulturmedium}}{\text{max. LDH Aktivität} - \text{Hintergrund Kulturmedium}} \times 100$$

Zusätzlich zu 30 nm und 80 nm großen Silikapartikeln wurden kommerziell erwerbliche 42 nm große Silika-Nanopartikel (*IRMM-304*) getestet.

Eine Behandlung der A549-Zellen mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ unmarkierten Silikapartikeln für 5 min, 1 h, 5 h und 48 h zeigte im LDH-Test keine signifikante Zytotoxizität (Abbildung 23). Im Vergleich zur Positivkontrolle wurde für die mit Partikeln inkubierten Zellen keine Erhöhung der LDH-Aktivität beobachtet.

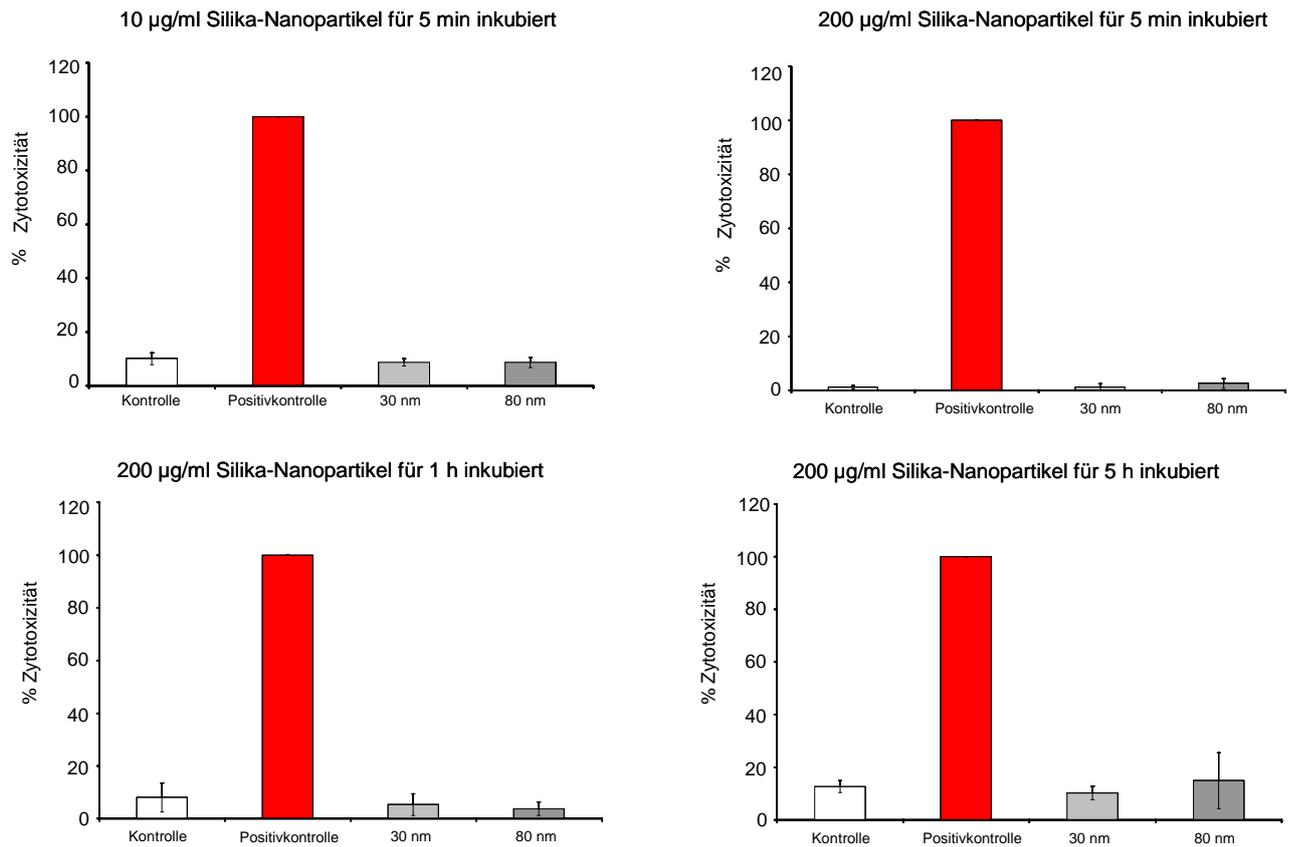


Abbildung 23: Zytotoxizität unmarkierter 30 nm und 80 nm Silika-Nanopartikel. A549-Zellen wurden für 5 min, 1 h und 5 h mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Partikelsuspension inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der LDH im Kulturmedium mittels des Assays „CytoToxONE™“ (Promega) untersucht. Es sind jeweils Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche gezeigt.

Um zu untersuchen, ob käuflich erworbene Silika-Nanopartikel bei gleicher Partikelkonzentration im LDH-Assay eine Zytotoxizität zeigen, wurden A549-Zellen mit Silika-Nanopartikeln (IRMM-304) vom *Institute for Reference Material and Measurements* inkubiert. Diese sind im Gegensatz zu den 30 nm und 80 nm Partikeln eigener Herstellung mit 0,02% (g/g) NaOH stabilisiert. Nach Inkubation mit $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ IRMM 304 für 5 min, 1 h und 48 h zeigte sich keine Zytotoxizität (Abbildung 24). Nach 5 h Inkubation sieht man eine leichte Zunahme der LDH-Aktivität in Medium.

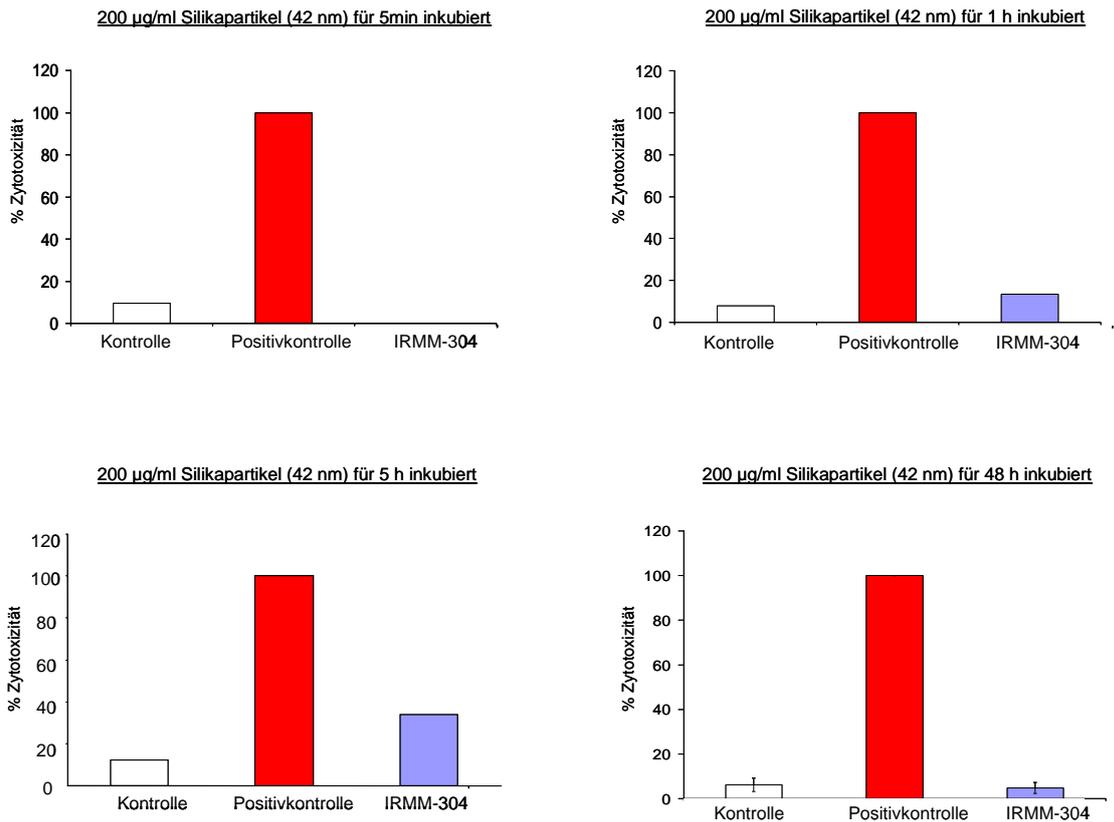


Abbildung 24: Zytotoxizität von 42 nm Silikapartikeln IRMM-304. A549-Zellen wurden für 5 min, 1 h, 5 h und 48 h mit $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Partikelsuspension inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der LDH im Kulturmedium mittels des Assays „CytoToxONE™“ (Promega) untersucht. Das Ergebnis eines Versuches ist gezeigt.

- Partikelexposition in Medium mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen

Bei Inkubation der 30 nm und 80 nm großen Silikapartikel in Vollmedium zeigten sich im LDH-Test auch bei $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ SiO_2 keine Membranschäden (Abbildung 23). Werden die Zellen mit $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ 30 nm Silika-Partikel in Medium ohne FBS inkubiert, können zytotoxische Effekte detektiert werden (Abbildung 25). Die 80 nm Partikel induzieren bei gleicher Konzentration (Tabelle 5) wie auch in Vollmedium keine Membranschäden. Bei der niedrigen Konzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ zeigt sich für beide Partikelgrößen in Medium ohne FBS keine Zytotoxizität im LDH Test.

Nach Inkubation in Gegenwart steigender Konzentrationen ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $200 \mu\text{g ml}^{-1}$) von 30 nm Partikeln konnte nur bei $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ in Medium ohne FBS eine Erhöhung der LDH-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 29). Sobald 0,5% FBS im Medium enthalten sind, erkennt man bei gleicher Partikelkonzentration eine signifikante Verringerung der Zytotoxizität der 30 nm Partikel auf Kontrolllevel.

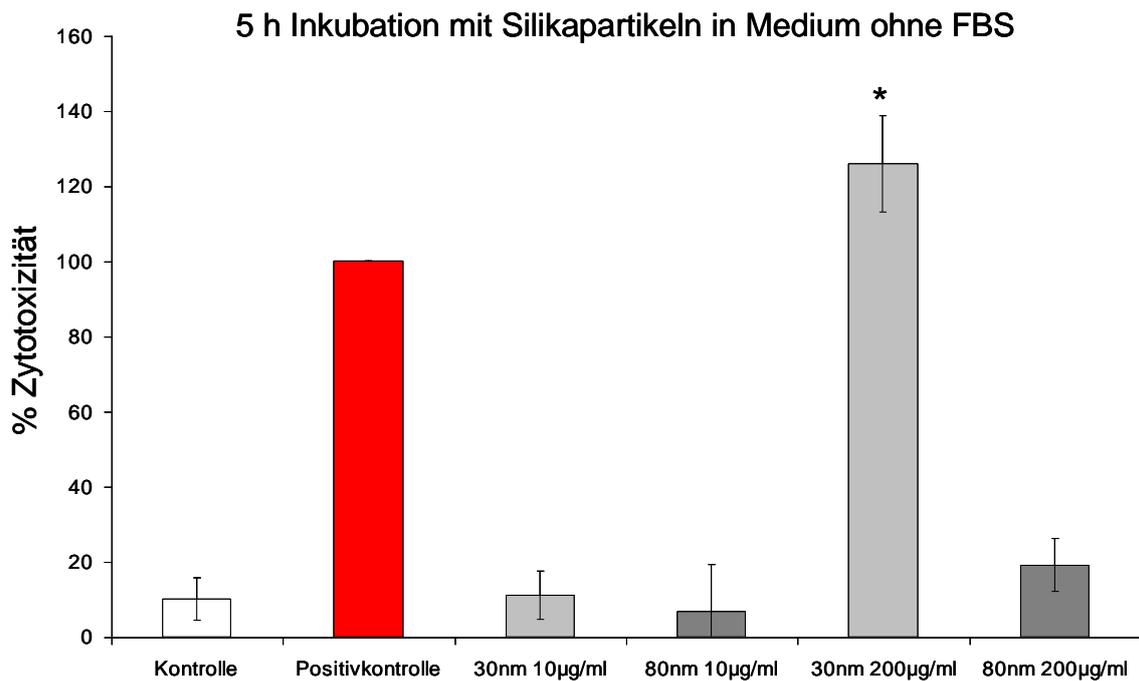


Abbildung 25: Zytotoxizität unmarkierter 30 nm und 80 nm Silikapartikel in Medium ohne Serum. A549-Zellen wurden für 5 h mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Partikelsuspension inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der LDH im Kulturmedium mittels des Assays „CytoToxONE™“ (Promega) untersucht. Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche sind gezeigt. * signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$, t-Test).

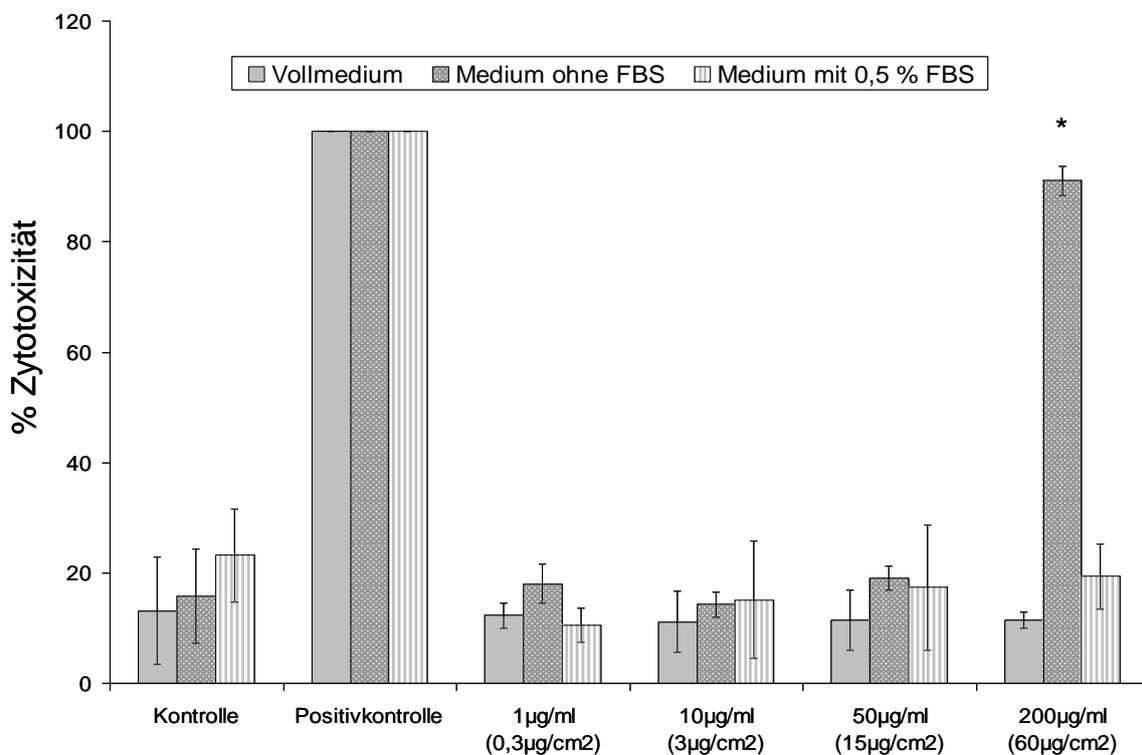


Abbildung 26: Zytotoxizität unmarkierter 30 nm Silikapartikel in verschiedenen Medien. A549-Zellen wurden für 5 h mit 1 , 10 , 50 und $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Partikelsuspension inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der LDH im Kulturmedium mittels des Assays „CytoToxONE™“ (Promega) untersucht. Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche sind gezeigt. * signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$, t-Test).

- Verringerung der Zytotoxizität bei Exposition in Gegenwart von Serumbestandteilen

Um zu zeigen, welchen Einfluss einzelne Proteine des Serums auf die Zytotoxizität von 30 nm Silikapartikeln haben, wurden Partikelsuspensionen in DMEM ohne FBS angesetzt, die mit Serum Albumin (BSA) und Immunglobulin G (IgG) supplementiert waren. Die eingesetzten Konzentrationen beider Proteine wurden so gewählt, dass sie der Konzentration von Albumin und Immunglobulin in Medium mit 0,5 % FBS entsprachen. Beide Proteine wurden hier getestet, da sie auch in der Proteinkorona um Silika-Nanopartikel gefunden wurden.

In Abbildung 27 erkennt man eine signifikante Verringerung der Zytotoxizität der 30 nm Partikel bei Koinkubation mit BSA. Das Protein IgG hat alleine keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von 30 nm Partikeln in Medium ohne FBS. Die Kombination beider Proteine zeigt ebenfalls eine Verringerung der Zytotoxizität.

Insgesamt zeigen die Versuche, dass der Proteingehalt und besonders das Vorhandensein einzelner Proteine wie BSA, entscheidend sind für die Ergebnisse nanotoxikologischer Assays. Generell ist *in vivo* eine andere Proteinkonzentration zu finden, als üblicherweise in Zellkulturmedien vorhanden ist. In verschiedenen Körperflüssigkeiten sind die Konzentrationen einzelner Proteine wie z.B. die von Albumin deutlich höher. Daneben fällt die hier gewählte hohe Konzentration ($200 \mu\text{g ml}^{-1} \text{SiO}_2$) bereits in den *overload* Bereich. Bei der Bewertung toxikologischer Assays ist dies zu berücksichtigen.

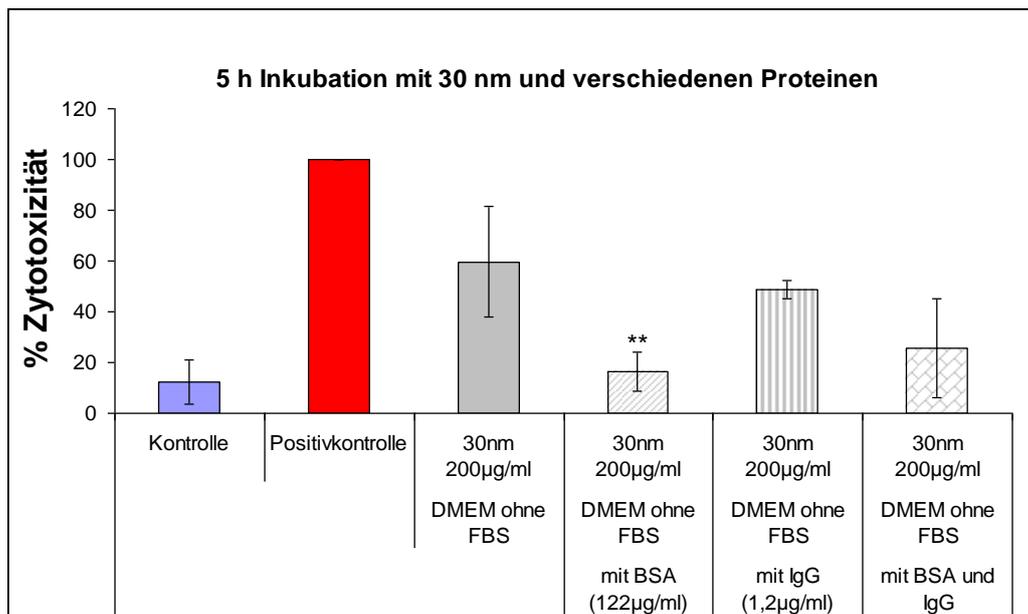


Abbildung 27: Zytotoxizität von unmarkierten 30 nm Silikapartikeln nach Zugabe von unterschiedlichen Proteinen. A549-Zellen wurden für 5 h mit $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Partikelsuspension inkubiert, der entweder $122 \mu\text{g ml}^{-1}$ BSA, $1,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ IgG oder beide Proteine zusammen zugesetzt wurden. Anschließend wurde die Aktivität der LDH im Kulturmedium mittels des Assays „CytoToxONE™“ (Promega) untersucht. Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche sind gezeigt. * signifikant unterschiedlich zur Inkubation der Partikel in DMEM ohne FBS ($p < 0,01$, t-Test).

d) Bestimmung der Stoffwechselaktivität (WST-1-Assay)

Als Testsystem zur Untersuchung der Stoffwechselaktivität, bzw. der Lebensfähigkeit der Zellen wurde das WST-1-Testsystem (Roche Diagnostics GmbH) eingesetzt. Der Test beruht auf der Reduktion des Substrates WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat), eines Tetrazolium-Salzes, zu einem wasserlöslichen

Formazan (Abbildung 28), welches photometrisch detektiert wird. Die Reaktion wird durch zelluläre Enzyme vermittelt [27]. Die Messwellenlänge betrug 450 nm, die Referenzwellenlänge 750 nm. Eine optische Interferenz der Silikapartikel wurde in Vorversuchen ausgeschlossen[28-31]. Unbehandelte Zellen in DMEM ohne Partikel dienten als Kontrolle.

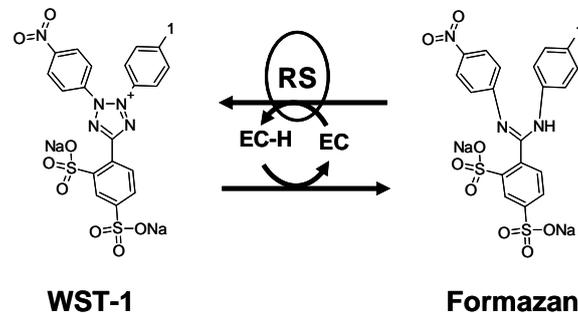


Abbildung 28: Reduktion von WST-1 zu einem photometrisch detektierbaren Formazan (Roche Diagnostics GmbH).

Die unter Einsatz verschieden großer Silika-Nanopartikel durchgeführten Tests zeigen keinen signifikanten Effekt der Partikel auf die Stoffwechselaktivität von A549 Zellen. Für die Tests wurden alle Partikelsorten in der gleichen Konzentration (SiO_2 -Gehalt) eingesetzt. In Anwesenheit der kleineren Partikel waren die Zellen dementsprechend einer deutlich höheren Partikelanzahl (Tabelle 5) ausgesetzt (Abbildung 29).

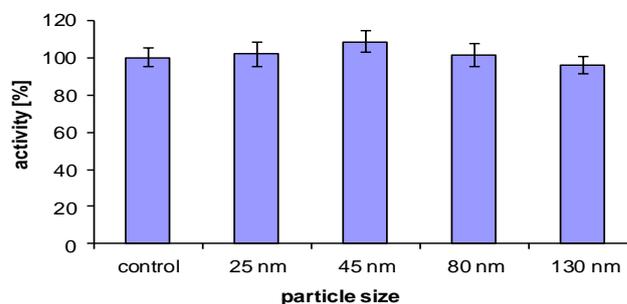


Abbildung 29: Stoffwechselaktivität (WST-1-Assay) von A549-Zellen nach 24 h Inkubation mit verschieden großen (25, 45, 80, 130 nm) Silika-Partikeln in Vollmedium. Die Partikel wurden in einer Konzentration von $125 \mu\text{g SiO}_2 \text{ ml}^{-1}$ eingesetzt.

e) *Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenz) in Vollmedium und Medium ohne FBS*

Als ein Mechanismus der Toxizität von Nanopartikeln wird die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert [32, 33]. Um die partikelinduzierte Bildung von ROS in A549-Zellen fluorimetrisch zu überprüfen, wurde als Sonde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) verwendet. $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ist zellpermeabel und wird intrazellulär von Esterasen zum nicht-fluoreszierenden DCFH umgesetzt und kann die Zellmembran danach nicht mehr passieren, da es hydrophiler ist. DCFH wird durch ROS (vorwiegend H_2O_2) zum stark fluoreszierenden DCF oxidiert. Die Fluoreszenz von DCF wird bei 530 nm detektiert ($\lambda_{\text{EX}} = 492 \text{ nm}$).

Die Zellen wurden mit 100 µl warmem DPBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 100 µl einer 100 µM H₂DCF-DA-Lösung, welche in DMEM-Medium ohne Phenolrot und ohne Serum angesetzt wurde. Die Zellen wurden in dieser Lösung für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und mit 100 µl DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Partikelsuspensionen und der Positivkontrolle (200 µM H₂O₂ oder 10 µM SIN-1). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach 24 h.

In den folgenden Versuchen wurde überprüft, ob durch die Interaktion der 30 nm großen Silikapartikel mit den A549-Zellen ROS entstehen, wobei auch ein Vergleich zwischen Vollmedium und Medium ohne FBS erfolgte. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse einer 24-stündigen Inkubation mit Partikeln dargestellt. Man erkennt, dass in Vollmedium keine ROS detektiert werden konnten. In Medium ohne FBS ist allerdings ein geringfügiger Anstieg der DCF-Fluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu messen.

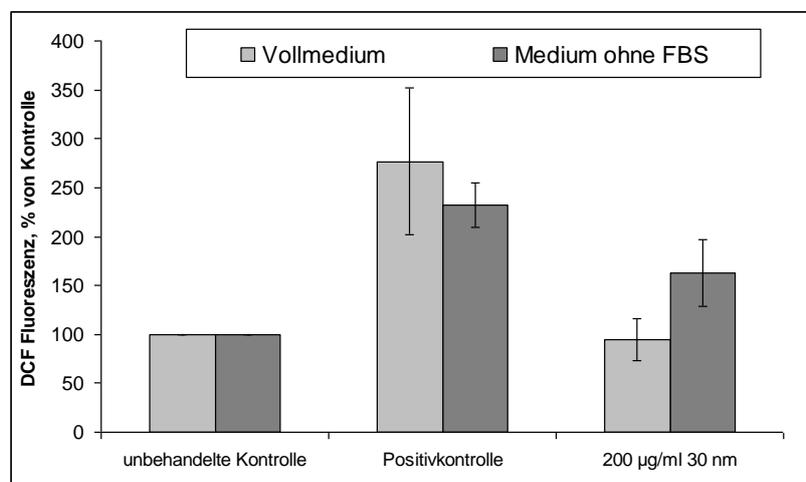


Abbildung 30: Bildung von ROS nach Inkubation von A549-Zellen in Gegenwart von 200 µg ml⁻¹ Silikapartikeln. Dargestellt ist jeweils die DCF-Fluoreszenz in % von der unbehandelten Kontrolle. Als Positivkontrolle diente hier 200 µM H₂O₂. Die Inkubation mit den Partikelsuspensionen erfolgte für 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente.

f) Caspase-Aktivierung

Das Potenzial der Nanopartikel, eine Aktivierung zellulärer Caspasen und damit Apoptose zu induzieren, wurde anhand des luminometrischen Caspase-Glo® Assays (Firma Promega) untersucht. Das Testsystem beruht auf der Spaltung des Caspase 3/7-Substrates, einem Tetrapeptid mit der Aminosäureabfolge Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat (DEVD, Abbildung 31). Die Spaltung des Tetrapeptids führt zur Freisetzung des Luciferase-Substrates Amino-Luciferin, dessen Umsetzung durch die Luciferase zur Entstehung des Lumineszenzsignales führt. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

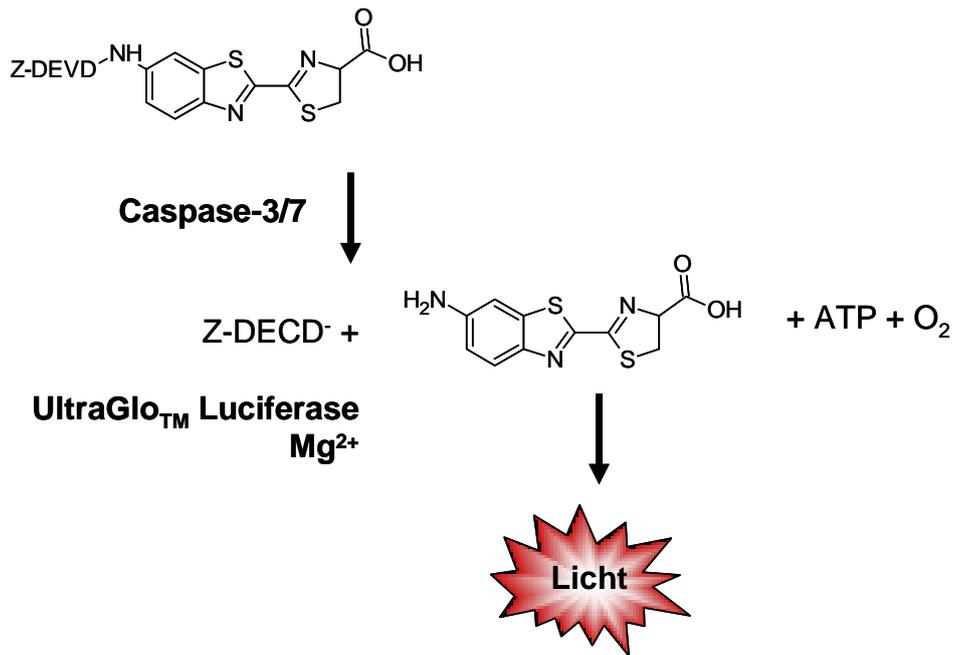


Abbildung 31: Caspase-3/7-Spaltung des Test-Substrates [Promega].

Nach 4 h (nicht gezeigt) und 24 h Inkubation mit gefärbten und ungefärbten Silika-Nanopartikeln wurde keine Aktivierung zellulärer Caspasen festgestellt (Abbildung 32).

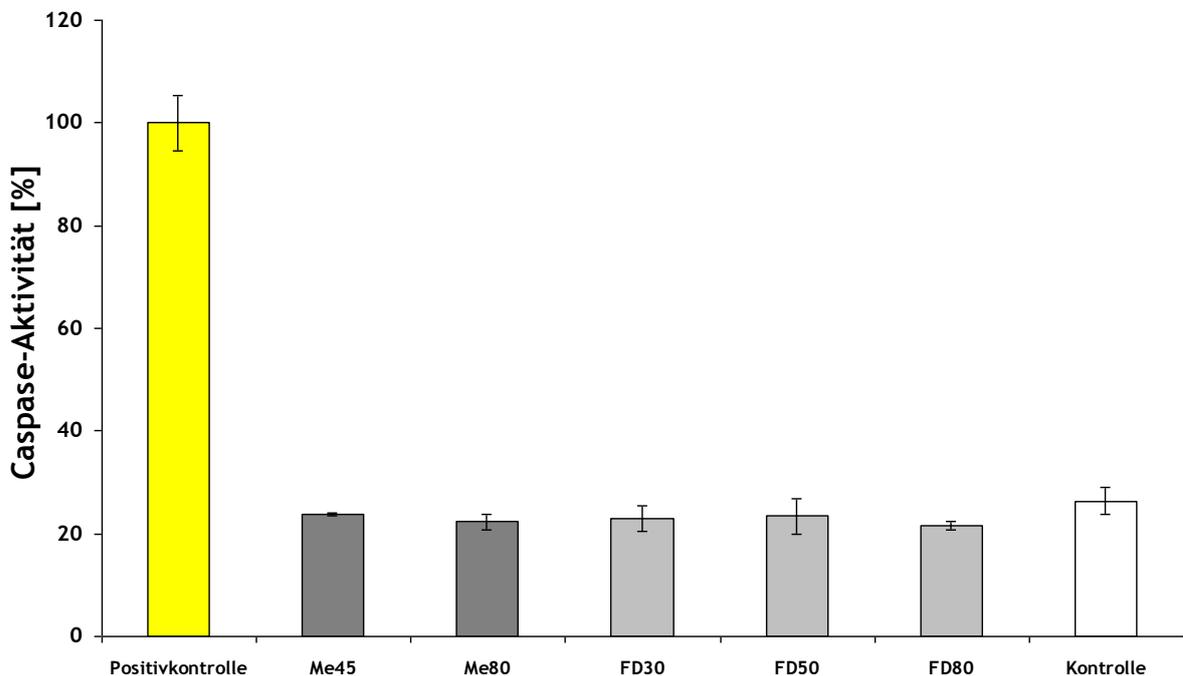


Abbildung 32: Caspase-Aktivierung bei A549-Zellen nach Inkubation mit verschiedenartigen Silika-Nanopartikeln (ungefärbte Partikel Me45 (45 nm), Me80 (80 nm) und durchgefärbte Partikel (FD 30-80 nm). Staurosporin (100 μ M) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die SiO₂-Partikel wurden in einer Konzentration von 100 μ g SiO₂ ml⁻¹ eingesetzt und für 24 h mit den Zellen inkubiert.

2.2.2 Auswirkungen von Silika-Nanopartikeln auf Caco-2 Zellen

Die Zelllinie Caco-2 (Adenokarzinom, DSM ACC 169) wurde als Modell für Darmepithel eingesetzt und in ME-Medium supplementiert mit 20 % FBS bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden -wie oben für A549-Zellen beschrieben- für die Experimente in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und mit den entsprechenden Partikelsuspensionen behandelt. Die Zellen wurden in Anwesenheit der Partikel für 24-72 h inkubiert.

a) Bestimmung der Stoffwechselaktivität (WST-1-Assay)

Folgende Partikelsorten wurden eingesetzt:

- unmarkierte Silikapartikel verschiedener Größen (25, 45, 80, 130 nm),
- Atto647N-markierte Kern-Schale-Partikel (45nm; 130nm),
- Atto647N-markierte durchgefärbte Partikel (FD, 25, 30, 40, 50, 80 nm)

Die unter Einsatz unmarkierter Partikel durchgeführten Tests zeigen keinen signifikanten Effekt der Partikel auf die Stoffwechselaktivität der Caco-2 Zellen an (Abbildung 33).

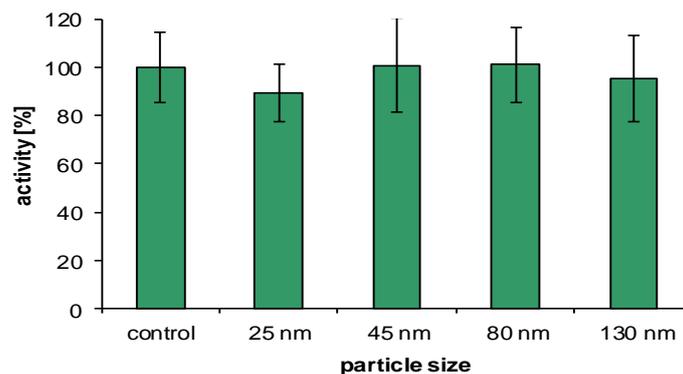


Abbildung 33: Stoffwechselaktivität (WST-1-Assay) von Caco-2 nach 24 h Inkubation mit verschiedenen großen (25, 45, 80, 130 nm) Silika-Partikeln. Die Partikel wurden in einer Konzentration von 125 µg SiO₂ ml⁻¹ eingesetzt.

WST-1-Assays wurden auch an Zellen durchgeführt, die mit Atto647N-markierten Silika-Partikeln inkubiert wurden. Dabei wurden sowohl Kern-Schale Partikel (45 nm, 130 nm) als auch durchgefärbte Partikel (30 nm) verwendet, deren äußere Hülle nicht zusätzlich mit einer unmarkierten SiO₂-Schale umhüllt war. Nach Inkubation (24 h) mit den 45 nm und 130 nm großen Partikeln, die jeweils in einer Konzentration von 125 µg SiO₂ ml⁻¹ eingesetzt wurden, war keine signifikante Verringerung der Stoffwechselaktivität zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Die Reaktion von Caco-2 auf die Anwesenheit der durchgefärbten 30 nm Partikel wurde auch über einen längeren Zeitraum (bis 72 h) verfolgt. Hier zeigte sich lediglich bei Zugabe der höheren Konzentration (200 µg SiO₂ ml⁻¹) und 72 h Inkubation eine Abnahme der Stoffwechselaktivität (auf 75 %) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 34).

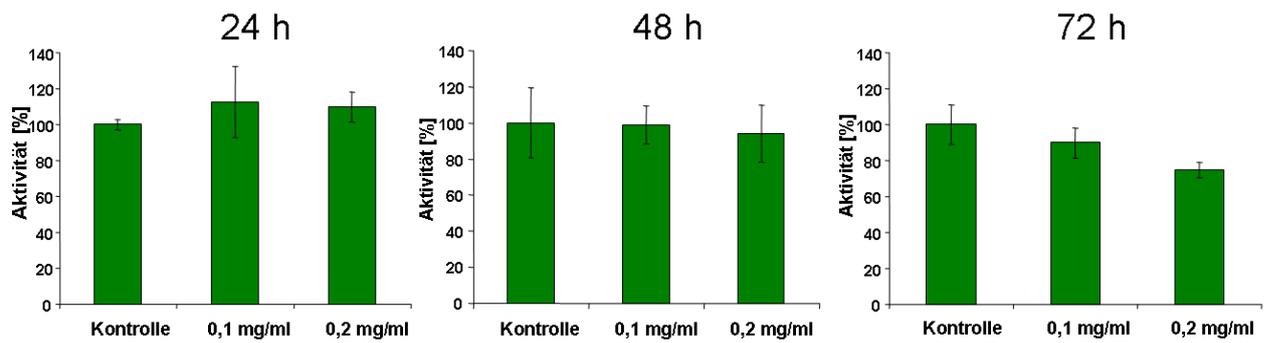


Abbildung 34: Stoffwechselaktivität (WST-1-Assay) von Caco-2 nach 24, 48 und 72 h Inkubation mit 30 nm Silika-Partikeln. Angegeben ist die eingesetzte SiO₂-Endkonzentration (mg/ml). (Schübbe et al., 2012)

b) Viabilitätsbestimmung (ATP-Gehalt)

Die Auswirkungen der Silika-Nanopartikel auf die Lebensfähigkeit von Caco-2 wurden auch anhand des zellulären ATP-Gehaltes untersucht. Für die Untersuchungen wurde das Testsystem „CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay“ der Firma Promega eingesetzt. Der Test beruht auf der Mono-Oxygenierung des Substrates Luciferin durch das Enzym Luciferase in Anwesenheit von Mg²⁺ und molekularem Sauerstoff, der sogenannten Luciferase-Reaktion (Abbildung 35). Da diese Reaktion unter ATP-Verbrauch abläuft, kann sie zur quantitativen Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes herangezogen werden. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung des Lumineszenzsignals. Der Test wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

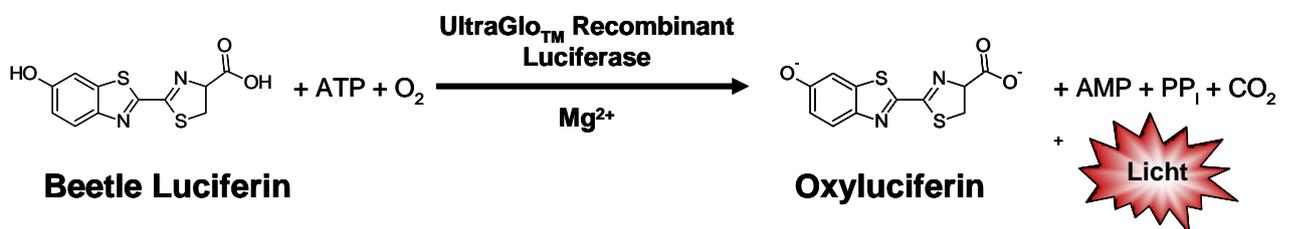


Abbildung 35: Luciferase-Reaktion [Promega].

Im Vergleich zu Kontrollzellen führte die Anwesenheit der durchgefärbten Partikel zu einer geringfügigen Verringerung der Viabilität, die Anwesenheit der Kern-Schale-Partikel über einen Zeitraum von 24 h zu einer etwas stärkeren Verringerung der Viabilität (80 %). Die Signifikanz dieser Daten ist allerdings durch weitere Messungen zu überprüfen (Abbildung 36).

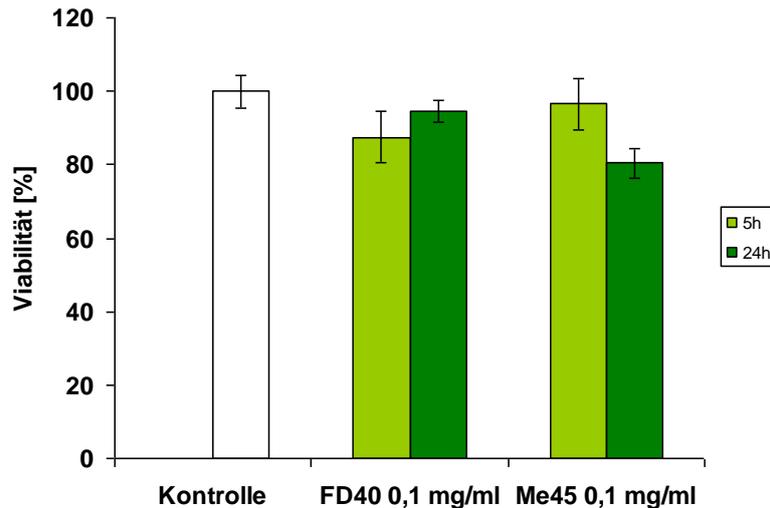


Abbildung 36: Stoffwechselaktivität (ATP-Gehalt) von Caco-2 nach 24 h Inkubation mit 45 nm großen Kern-Schale Partikeln (Me45) und durchgefärbten Partikeln (FD40) vergleichbarer Größe. Die SiO₂-Partikel wurden in einer Konzentration von 100 µg SiO₂ ml⁻¹ eingesetzt.

c) *Bestimmung der DNA-Integrität (Comet-Assay)*

Der Comet-Assay dient der Detektion von DNA-Strangbrüchen [34]. Bei dem hier durchgeführten alkalischen Assay (OxiSelect Comet Assay Kit, Cell Biolabs) äußern sich solche Strangbrüche nach der Gelelektrophorese im Auftreten kleinerer DNA-Fragmente in Form sogenannter Kometenschweife („Tails“). Der Test wurde hier eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Anwesenheit der 32 nm großen Silika-Nanopartikel, die auch im Zellkern detektiert werden konnten, eine Schädigung der DNA induziert.

Hierzu wurden Caco-2-Zellen (Aussaat-Konzentration $2,4 \times 10^5$ Zellen ml⁻¹) nach der Inkubation (48 h und 72 h) in Gegenwart oder Abwesenheit von 32 nm großen Silika-Nanopartikeln ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder 20 mM Wasserstoffperoxid (5 min bei 4°C) als Positivkontrolle durch Trypsinieren abgelöst, in Zellkulturmedium suspendiert und für 3 min bei 200 x g zentrifugiert. Die Zellen (1×10^5 Zellen ml⁻¹) wurden in eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert und dann in einem Verhältnis von 1:10 mit Comet-Agarose gemischt. Nach Erstarren der Agarose erfolgte die Lyse und anschließende Auftrennung in einer horizontalen Elektrophorese-Kammer (20 min, 1 V cm⁻¹, 300 mA). Die Färbung der DNA erfolgte durch Zugabe von Vista Green DNA-Farbstofflösung. Die Analyse wurde mit einem Leica SP2-Mikroskop durchgeführt. Pro Experiment wurden 100 Zellen auf zwei Probenträgern untersucht, jedes Experiment wurde zweimal wiederholt. Die Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung des sogenannten „Olive Tail Moments“ (OTM) und des prozentualen Anteils der DNA im Schweif.

Nach Inkubation in Anwesenheit der Nanopartikel wurden keine DNA-Strangbrüche identifiziert. Weder das OTM noch der prozentuale Anteil der Schweif-DNA zeigte einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-DNA, während eine Inkubation der Zellen in H₂O₂ das Auftreten von DNA-Strangbrüchen zur Folge hatte (Abbildung 37).

sample	DNA in tail (%)				olive tail moment OTM			
	48h		72h		48h		72h	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
32 nm SiNP 200µg/ml	1,825	2,2	1,89	2,5	0,286	0,395	0,32	0,43
negative control	1,98	2,8	3,02	3,32	0,34	0,5	0,48	0,5
0.02M H ₂ O ₂	33,3	8,7	32,3	7,96	9,6	3,7	8,1	2,6

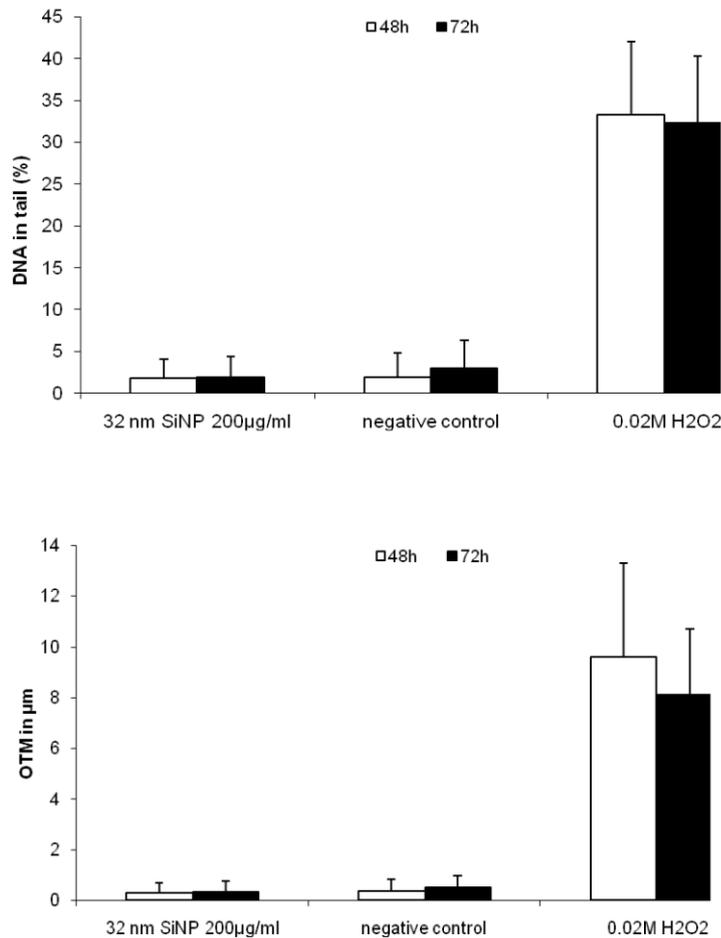


Abbildung 37: Auswertung des Comet-Assays an Caco-2-Zellen nach 48 h und 72 h Inkubation mit 32 nm großen SiO₂-Nanopartikeln. Als Positivkontrolle wurde Wasserstoffperoxid eingesetzt, Kontrollzellen wurden nicht behandelt. (Schübbe et al., 2012)

- Zusammenfassung Toxizität Silika-Nanopartikel

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zytotoxische Effekte in beiden untersuchten Zelllinien nur bei sehr hohen eingesetzten Konzentrationen (200 µg ml⁻¹) an Silika-Nanopartikeln beobachtet werden, wenn die Partikelsuspensionen in Medium ohne FBS angesetzt wurden. Sobald Proteine im Medium vorhanden sind, kann eine Verringerung der Zytotoxizität (siehe LDH-Test und ROS-Messung) beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse bezüglich des Proteingehalts des Mediums sind auch in der Literatur beschrieben [23, 24]. Wie diese Unterschiede bezüglich der Toxizität zustande kommen und welche Rolle die Proteinkorona dabei spielt, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

2.3 Toxizität von Silber-Nanopartikeln

2.3.1 Auswirkungen der Silber-Nanopartikel auf A549-Zellen

a) *Bestimmung der Lebensfähigkeit (WST-1-Assay) und Vitalzellzahl, lichtmikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie*

- WST-1-Assay

Die Zytotoxizität von fluoreszenzmarkierten Silber-Nanopartikel wurde im Vergleich zu unmarkierten Partikeln und Silbernitrat an A-549 Zellen untersucht. Zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität der Zellen wurde das WST-1 Testsystem (Roche Diagnostics GmbH, siehe oben) verwendet.

Nach der Aussaat (5×10^4 Zellen ml^{-1}) wurden die Zellen zunächst für 24 h inkubiert, bevor die Nanopartikel in zwei verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurden. Nach Partikelzugabe wurden die Zellen für weitere 24 bzw. 48 h inkubiert, bevor das WST-1-Reagenz (10 μl zu 100 μl Probenvolumen) zugegeben wurde. Zur Bestimmung der Werte in Anwesenheit von Silber-Nanopartikeln, die bei der Messwellenlänge eine signifikante Eigenabsorption aufweisen, wurde vor Reagenzzugabe ein Leerwert bestimmt, der der Eigenabsorption der Proben entspricht, und nach der Messung abgezogen. Ohne Abzug dieses Wertes tritt je nach eingesetzter Konzentration an Silber-Nanopartikeln eine signifikante Überbestimmung der Lebensfähigkeit auf.

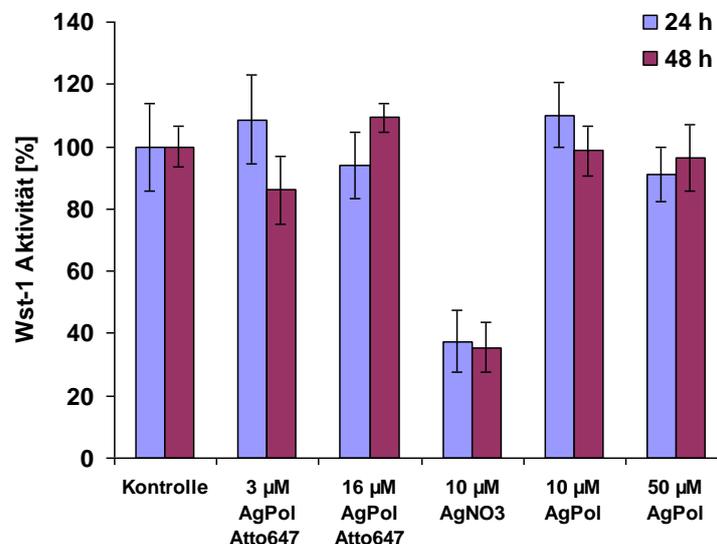


Abbildung 38: Lebensfähigkeit von A549 nach 24 h und 48 h Inkubation in Gegenwart von Silber-Nanopartikeln (AgPol = unmarkierte Partikel, AgPolAtto647 = fluoreszenz-markierte Partikel) und Silbernitrat (AgNO₃). Die markierten und unmarkierten Partikel wurden nicht in identischen Konzentrationen eingesetzt.

Neben den fluoreszenzmarkierten Silber-Nanopartikeln (AgPolAtto647, 3 und 16 μM) wurden auch unmarkierte Silber-Nanopartikel (AgPol, 10 und 50 μM) sowie zum Vergleich Silbernitrat (10 und 50 μM) in das Experiment eingesetzt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde am deutlichsten durch die Anwesenheit des Silbernitrats beeinflusst, das schon in geringen Konzentrationen (10 μM) zytotoxisch wirkte. Die Lebensfähigkeit der A549-Zellen

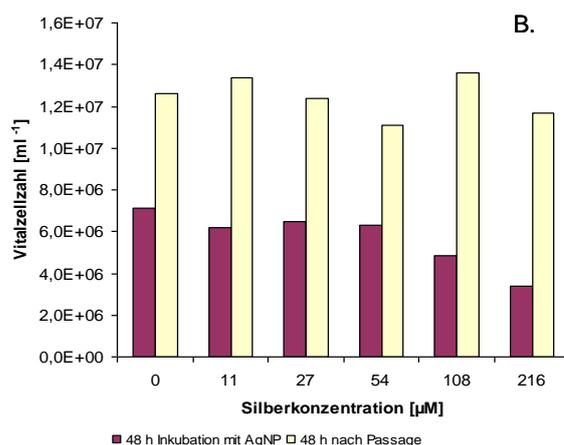
wurde durch die Anwesenheit der Silber-Nanopartikel nicht signifikant beeinträchtigt (Abbildung 38).

- Vitalzellzahl

Die Auswirkungen von Silber-Nanopartikeln auf die Lebensfähigkeit von A549-Zellen wurden auch anhand einer Vitalzellzahlbestimmung im Vergleich zu Silbernitrat bestimmt. Für die Experimente wurden A549-Zellen ($1,5 \times 10^6$) in T-75 Flaschen ausgesät und für 24 h inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden unmarkierte Ag-Nanopartikel, bzw. Silbernitrat in Konzentrationen von 0-200 μM Ag in DME-Medium mit 10 % Serum zugesetzt. Nach 48 h Inkubation (Ag-Nanopartikel), bzw. 24 h Inkubation (AgNO_3) wurde der Überstand entfernt. Die Zellen wurden mikroskopiert und anschließend durch Trypsinieren abgelöst. 20 μl der Zellsuspension wurden zur Zellzählung (Casy TT) verwendet. Jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden in frischem DMEM neu ausgesät. Nach weiteren 48 h Inkubation (Ag-Nanopartikel), bzw. 72 h Inkubation (AgNO_3) erfolgte eine abschließende Zellzahlbestimmung.

Während die Inkubation mit Silber-Nanopartikeln erst bei Konzentrationen über 100 μM Ag eine Verringerung der Vitalzellzahl verursachte, resultierte die Inkubation in Anwesenheit von AgNO_3 in einer signifikanten Verringerung der Lebendzellzahl bereits bei mehr als 20 μM AgNO_3 . Nach Überführen in frisches Zellkulturmedium ohne Silberzusatz erholten sich die Zellen, die in Anwesenheit von Nanopartikeln inkubiert worden waren und zeigten wie die Kontrollzellen eine hohe Teilungsaktivität. Zellen, die in Anwesenheit von mehr als 20 μM AgNO_3 inkubiert worden waren, wiesen jedoch eine dauerhafte Beeinträchtigung der Teilungsfähigkeit auf. Nach Inkubation bei mehr als 50 μM AgNO_3 verloren die Zellen ihre Teilungsfähigkeit (Abbildung 39).

A.



B.

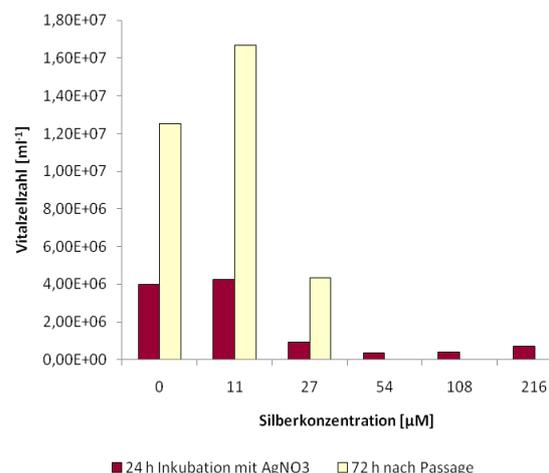


Abbildung 39: Vitalzellzahl von A549-Zellen nach Inkubation mit Silber-Nanopartikeln (A) und Silbernitrat (B). Die Vitalzellzahl wurde nach dem elektrischen Stromausschluss-Prinzip mit einem CasyTT Zellzählgerät bestimmt. Die Bestimmung erfolgte unmittelbar nach der Inkubation in Gegenwart von Silber sowie nach Überführung und Inkubation in frischem Zellkulturmedium ohne Silber.

Das Ergebnis unterstützt die bisherigen Untersuchungen zur Stoffwechselaktivität der Zellen, bei denen ebenfalls Silberionen einen stärker toxischen Effekt zeigen. Nach Inkubation mit den Zellen wurde die Silberkonzentration in den Medienüberständen

gemessen. Die Werte entsprachen der zugesetzten Silberkonzentration. Es konnte keine signifikante Verringerung der Silberkonzentration im Medium verzeichnet werden. Zusätzlich wurde die Morphologie der A549-Zellen nach Inkubation in Gegenwart von AgNO_3 bestimmt (Abbildung 40). Bei Konzentrationen von mehr als $20 \mu\text{M}$ AgNO_3 treten zunehmend morphologische Veränderungen der Zellen auf. Die Zellen schrumpfen, kugeln sich ab und lösen sich von dem Substrat ab. Auffällig ist die Bildung blasenartiger Strukturen. Bei höheren AgNO_3 -Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) wird außerhalb der Zellen zunehmend ausgefallenes Silber sichtbar.

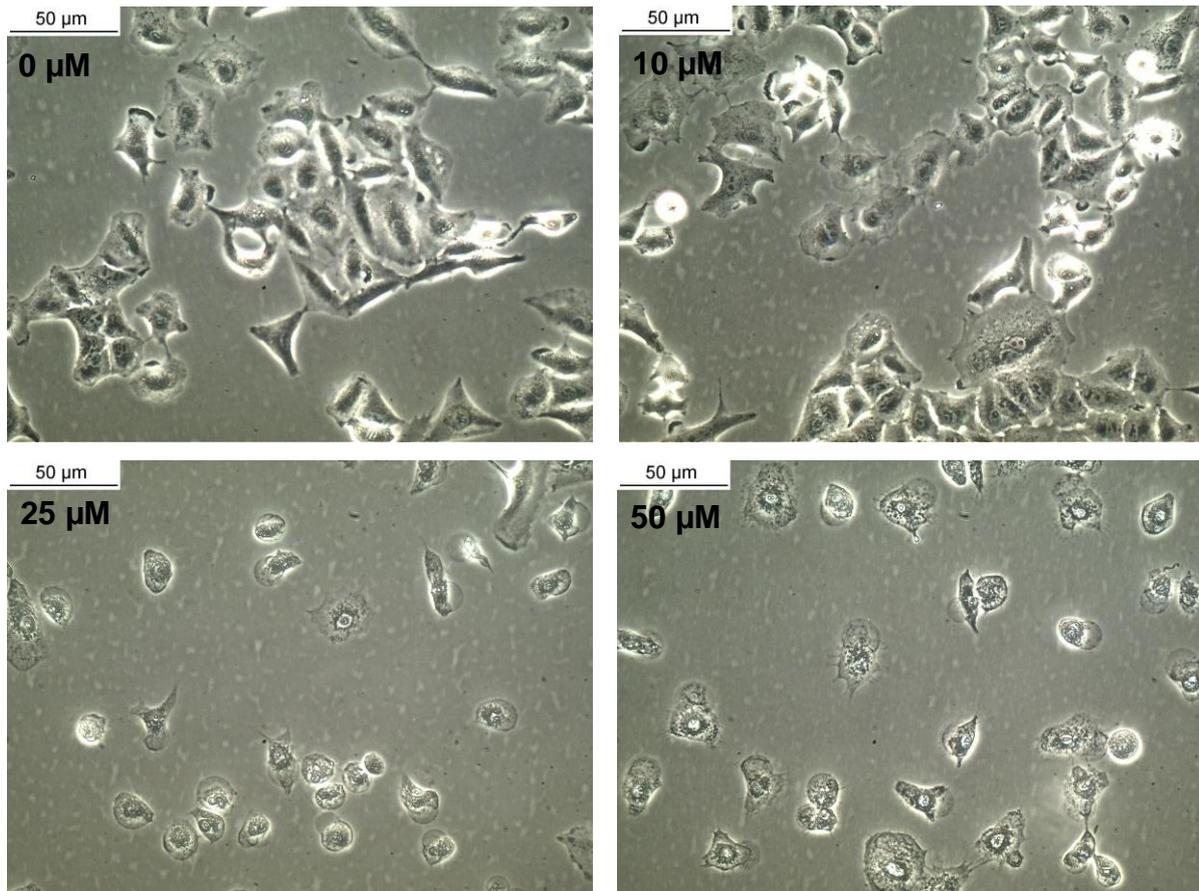


Abbildung 40: Morphologie von A549-Zellen nach Inkubation in Gegenwart von Silbernitrat.

b) *Einfluss von Silberionen auf enzymatische Reaktionen*

Die morphologischen Veränderungen, vor allem das Abkugeln der Zellen nach Inkubation mit Silbernitrat, deuten darauf hin, dass die Zellen apoptotisch werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Caspase-Aktivität mittels des Caspase-Glo® Assays (Firma Promega, siehe oben) in Anwesenheit von Silbernitrat und Silber-Nanopartikeln bestimmt.

Dazu wurden A549-Zellen in einer Konzentration von 5×10^3 Zellen in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und für 24 h mit Silbernitrat (AgNO_3) sowie Silber-Nanopartikeln, die mit Dextran oder Polymer stabilisiert waren (NP Dex und NP Pol) inkubiert. Abbildung 41 A zeigt, dass Silbernitrat und Silber-Nanopartikel sowohl bei $10 \mu\text{M}$ als auch bei $200 \mu\text{M}$ keine Aktivierung zellulärer Caspasen im Vergleich zur Positivkontrolle induzieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass Silberionen die Aktivität von Enzymen hemmen [35] und mit hoher

Affinität an Thiolgruppen binden. Um zu überprüfen, ob Silberionen die enzymatische Reaktion, die dem Caspase-Glo® Assay zugrunde liegt, hemmen, wurde die Caspase-Aktivität in An- und Abwesenheit von Silberionen untersucht. Dazu erfolgte eine Koinkubation von Staurosporin (100 μM) zusammen mit Silbernitrat bzw. Silber-Nanopartikeln (10 μM und 200 μM) für 24 h. In Abbildung 41 B ist zu erkennen, dass die Detektion der durch Staurosporin induzierten Caspase-Aktivität durch die Anwesenheit von Silberionen beeinflusst ist. Ein vergleichbarer Effekt tritt auf, wenn erst nach erfolgter Induktion der Apoptose durch Staurosporin kurz vor Zugabe des Assay-Reagenz Silbernitrat bzw. Silber-Nanopartikel zu den Zellen gegeben werden. Auch hier ist die Caspase-Aktivität deutlich niedriger als in der Positivkontrolle (Abbildung 41), die keine Silber-Spezies enthält.

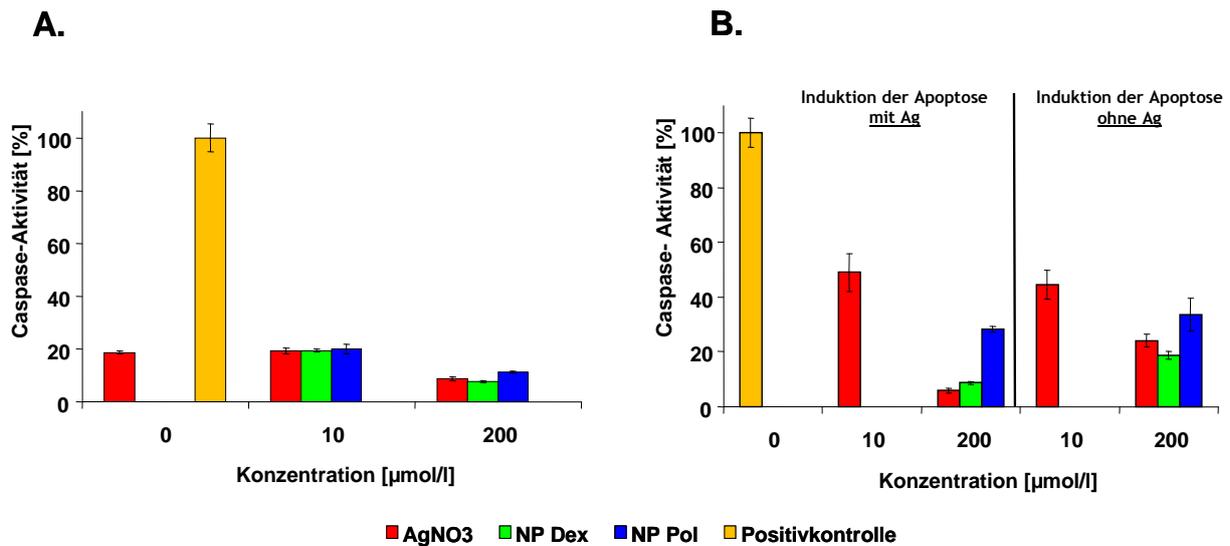


Abbildung 41: Caspase-Aktivität in A549-Zellen, die 24 h in Anwesenheit von AgNO_3 bzw. Silber-Nanopartikeln (NP Dex /NP Pol) inkubiert wurden (A). Zudem ist die Induktion der Apoptose in An- und Abwesenheit von Silberionen und Silber Nanopartikeln gezeigt (B). Als Positivkontrolle diente eine Inkubation mit Staurosporin für 24 h (100 μM).

2.3.2 Auswirkungen von Silber-Nanopartikeln auf Caco-2 Zellen

Die Zytotoxizität der fluoreszenzmarkierten Silber-Nanopartikel wurde im Vergleich zu unmarkierten Partikeln und Silbernitrat auch an Caco-2 Zellen untersucht.

Neben den fluoreszenzmarkierten Silber Nanopartikeln (AgPolAtto647, 3 und 16 μM) wurden unmarkierte Silbernanopartikel (AgPol, 10 und 50 μM) sowie zum Vergleich Silbernitrat (10 und 50 μM) in das Experiment eingesetzt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde am deutlichsten durch die Anwesenheit des Silbernitrats beeinflusst, das schon in geringen Konzentrationen (10 μM) zytotoxisch wirkte. Während die Lebensfähigkeit der A549-Zellen durch die Anwesenheit der Silber-Nanopartikel nicht signifikant beeinträchtigt wurde, reagierten die Caco-2 Zellen deutlich empfindlicher auf die Anwesenheit der Partikel. (Abbildung 42).

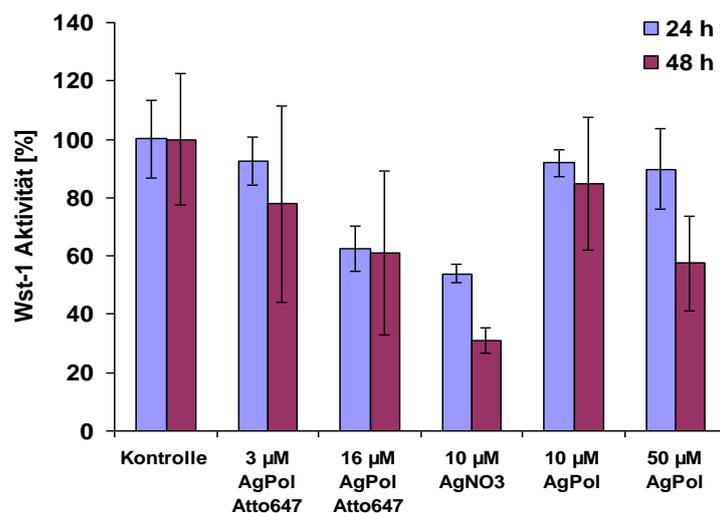


Abbildung 42: Lebensfähigkeit von Caco-2 nach 24 h und 48 h Inkubation in Gegenwart von Silber-Nanopartikeln (AgPol = unmarkierte Partikel, AgPolAtto647 = fluoreszenz-markierte Partikel) und Silbernitrat (AgNO₃). Die markierten und unmarkierten Partikel wurden nicht in identischen Konzentrationen eingesetzt.

- Zusammenfassung Toxizität Silberpartikel

Die hier eingesetzten Silber-Nanopartikel zeigen in A549 im Vergleich zu Silbernitrat in den toxikologischen Untersuchungen nur bei sehr hohen eingesetzten Konzentrationen (100 µM) negative Effekte auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Caco-2 Zellen scheinen etwas empfindlicher zu reagieren. Unsere Untersuchungen deuten insgesamt darauf hin, dass eine zytotoxische Wirkung von Silber-Nanopartikeln im Wesentlichen durch den Effekt von Silberionen vermittelt wird [36, 37]. Die größere Empfindlichkeit von Caco-2 gegenüber den Silber-Nanopartikeln wird möglicherweise auch durch die unterschiedliche Medienzusammensetzung verursacht [38]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Silberionen das Ergebnis enzymbasierter Assays beeinflussen. Dieser Umstand ist bei der toxikologischen Testung von Silberpartikeln zu berücksichtigen. Zu empfehlen sind hierfür Assays denen keine enzymatische Reaktion zugrunde liegt. Außerdem kann sich die Eigenabsorption der Partikel auf bestimmte Assays auswirken.

2.4 STED-Mikroskopie und Bildbearbeitung

a) Prinzip der STED-Mikroskopie und STED-Aufbau

Die STED-Mikroskopie ist wie die konfokale Mikroskopie eine rasternde Abbildungstechnik (Abbildung 43). Der Anregungslaser überführt die Fluorophore an einem Punkt der Probe in den angeregten S_1 -Zustand. Mithilfe des Abregungslasers größerer Wellenlänge wird die Rückkehr der Fluorophore in den elektronischen Grundzustand bewirkt, dabei kommt es zur Emission von Photonen der Wellenlänge des Abregungslasers (stimulierte Emission, Abbildung 44). Zur Verbesserung der Auflösung wird mittels einer Phasenplatte ein ringförmiges Profil des Abregungslasers erzeugt, in der Mitte weist dieses eine Nullstelle auf. Durch zeitliche und räumliche Überlagerung von An- und Abregungslaser werden die Fluorophore im Randbereich des Probenpunktes ausgeschaltet. Es resultiert ein schärferes Signal, das lediglich aus dem Zentrum des angeregten Fluoreszenzpunktes stammt und damit eine erhöhte Auflösung unterhalb des Beugungslimits [39, 40].

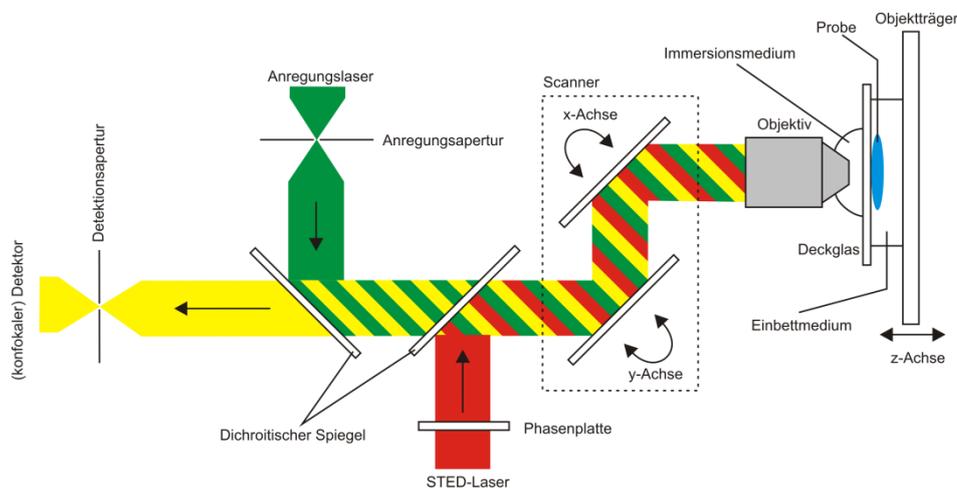


Abbildung 43: Strahlengang und Lage der Probe im STED-Mikroskop: Ein Scanner rastert die Probe zunächst in xy -Richtung lateral ab, die Fokusebene lässt sich durch Veränderung des Abstandes zwischen Probe und Objektiv (axial entlang der z -Achse) variieren.

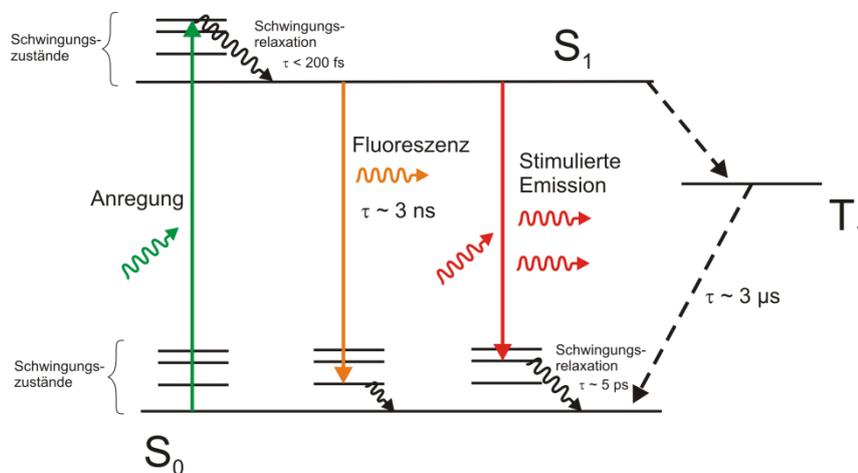


Abbildung 44: Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung der Zustände und Übergänge von Fluorophoren bei Anregung (grüner Pfeil), Fluoreszenz (gelber Pfeil) und stimulierter Emission (roter Pfeil). S_0 = Grundzustand, S_1 = angeregter Zustand, T_1 = Triplet-Zustand.

Das STED-System ist in das Konfokalsystem TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH) integriert (Abbildung 45). Von besonderer Bedeutung für die STED-Mikroskopie sind die speziellen An- und Abregungslaser:

- Anregungslaser: gepulster Diodenlaser (PICOQUANT PDL 800-B mit Laserkopf LDH-P-C-640B) Wellenlänge: 638-639 nm, Wiederholungsfrequenz: 80 MHz, durchschnittliche variable Laserintensität: < 10 mW, minimale Pulsbreite: 68 ps (Ausgangssignal)
- Abregungslaser: gepulst (Spectra-Physics Breitband MaiTai Titan-Saphir Kompaktlaser-System mit Netzteil und Wasserkühlung) Wellenlänge: 710-990 nm, Wiederholungsfrequenz: 80 MHz, durchschnittliche Pulsintensität: < 1,8 W, Pulsbreite: 100 fs (Ausgangssignal)



Abbildung 45: STED-System am INM.

b) Bestimmung der Geräteparameter

Die Funktionsweise des Gerätes wurde durch Variation verschiedener Geräteparameter (Intensität von Anregungs- und STED-Laser, Verzögerungszeit zwischen An- und Abregungspuls) optimiert, dazu gehörte auch die Wahl der Abregungswellenlänge. Die einzusetzende Abregungswellenlänge wird entsprechend dem Absorptions- und Emissionsspektrum des zu detektierenden Fluorophors gewählt (Abbildung 46). Dabei führt eine Abregungswellenlänge zu dicht am Emissionsmaximum (< 750 nm) zur Anregung in höhere Energiezustände und zu einem hohen Bildhintergrund. Bei größeren Wellenlängen (> 800 nm) sinkt die Effizienz der Abregung und damit die Auflösungsverbesserung. Atto647N markierte Proben wurden in der Regel bei einer Wellenlänge von 750 nm optimal abregt. Vereinzelt kommt es bei dieser Wellenlänge in biologischen Proben allerdings zu einer Anregung des Fluorophors durch den Abregungslaser, der sogenannten Anti-Stokes Anregung [17]. In diesen Fällen wurde eine Abregungswellenlänge von 780 nm verwendet. Hier ist zwar die Effizienz der Abregung geringer, die Leistung des Lasers aber höher als bei 750 nm, was in der Summe ähnlich gute Ergebnisse bringt.

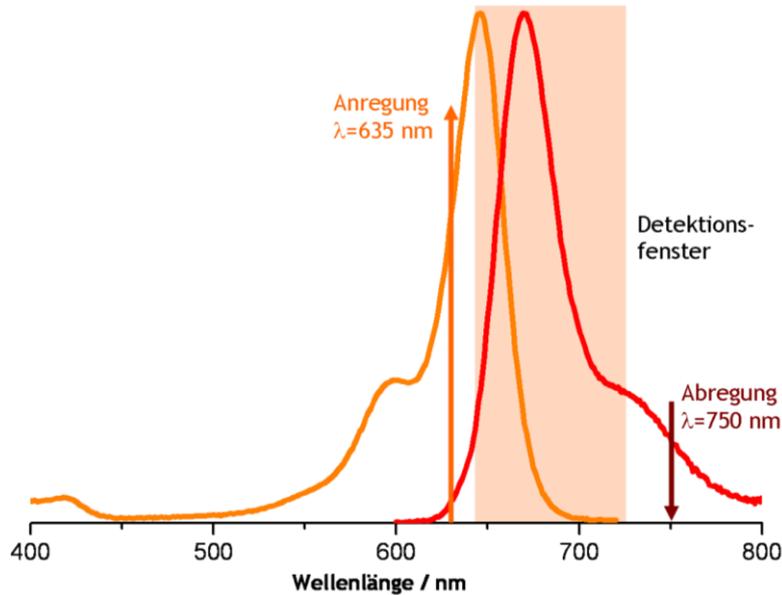


Abbildung 46: Anregungs- und Emissionsspektrum des Farbstoffs Atto647N, der für die STEDMikroskopie eingesetzt wird. Die Wellenlänge des Abregungslasers liegt so, dass sie nicht zur Anregung des Fluorophors führt.

Die laterale Auflösung wurde durch Bestimmung der Halbwertsbreite der Punktverschmierungsfunktion (PSF) in der Fokalebene bestimmt. An 25 nm fluoreszierenden Partikeln (Crimson Beads, Invitrogen, F8782) wurde eine laterale Auflösung von 92 nm gemessen (Abbildung 47).

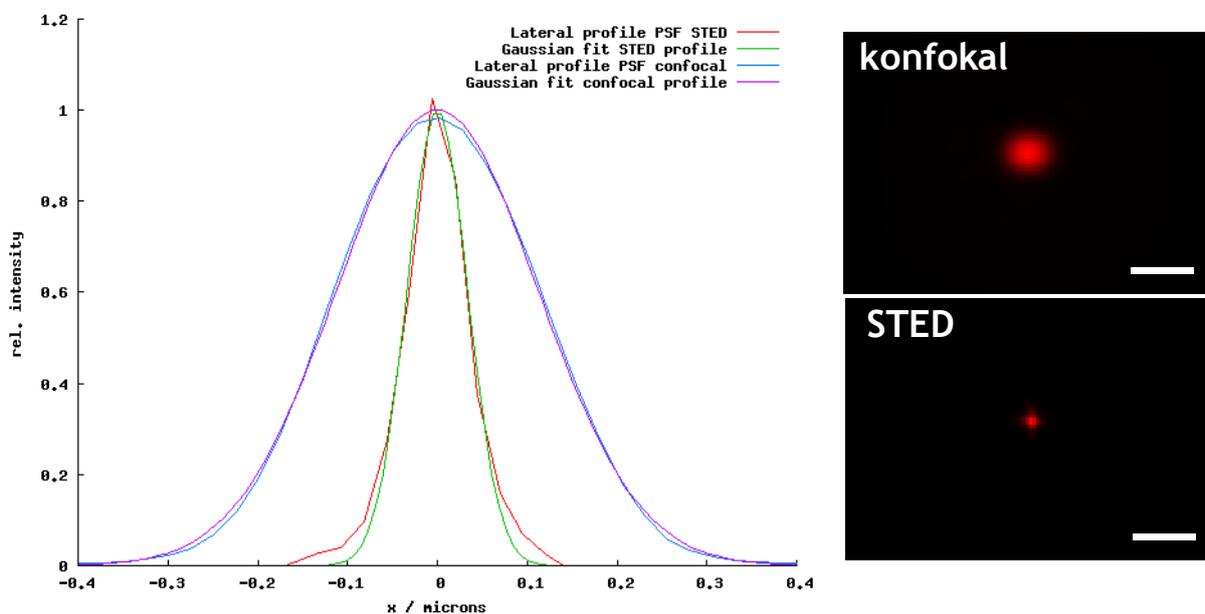


Abbildung 47: STED-Auflösung im Vergleich zur beugungsbegrenzten Konfokalmikroskopie. Als Probe wurden fluoreszierende 25 nm Partikel verwendet, Einbettmedium FluorSave. Maßstabsbalken = 500 nm.

c) *Eigenschaften der verwendeten Einbettmedien*

Die Probenvorbereitung für die STED-Mikroskopie erfordert im Prinzip die gleichen Schritte wie die Präparation für die herkömmliche Konfokalmikroskopie. Trotzdem erfordert die erhöhte Auflösung und auch die erhöhte Laserintensität eine Optimierung bestehender Protokolle [41]. Vor allem das verwendete Einbettmedium spielt für die Qualität der Abbildungen eine wesentliche Rolle. Mit Ausnahme von Lebendbeobachtungen werden Proben für die Lichtmikroskopie üblicherweise in einem Medium eingebettet, dessen Brechungsindex möglichst dem von Glas gleicht. Idealerweise bleibt so entlang des gesamten Lichtweges der Brechungsindex konstant. Bei Abweichungen führt die sogenannte Brechungsindexfehlpassung zu einer verminderten Auflösung und Lichtausbeute. Weitere Effekte sind eine Streckung oder Stauchung des Bildes entlang der optischen Achse („Fischtank-Effekt“) sowie sphärische Aberration, bei der Licht aus peripheren und zentralen Gebieten des Bildfeldes axial nicht auf den gleichen Punkt fokussiert wird.

Aus einer Vielzahl möglicher Einbettmedien wurden fünf ausgewählt, die in der Mikroskopie etabliert sind, davon Fluorsafe, Prolong Gold und Gel/Mount als kommerzielle Medien, sowie Mowiol (mit ROXS Bleichschutz [42], siehe unten) und TDE [43] als selbst hergestellte Alternativen. Alle Medien zeigen Unterschiede hinsichtlich ihres Brechungsindex und des Bleichverhaltens von fluoreszierenden Nanopartikeln sowie fluoreszenzmarkierter zellulärer Strukturen. Zusätzlich konservieren nicht alle Medien die dreidimensionale Struktur fixierter Zellen gleich gut und sind auch nicht gleich gut für alle Arten von Markierungen geeignet.

Zur Brechungsindexbestimmung wurden die Medien in Form eines dünnen Films auf Glasobjektträger aufgetragen, mindestens 24 h getrocknet und mittels Ellipsometrie (Spectroscopic Ellipsometer M-2000/A-SE, Woollam, USA) vermessen. In aufeinanderfolgenden Messungen zeigten sich große Schwankungen zwischen verschiedenen Präparationen und in Abhängigkeit von der Dauer des Trocknungsprozesses, was eine eindeutige Bestimmung belastbarer Werte nicht zuließ (Tabelle 7). Neben Mowiol wies FluorSave nach den Messungen den höchsten Brechungsindex auf, beide Einbettmedien wurden zur Herstellung von STED-Proben eingesetzt. Im Vergleich zu den aushärtenden Medien kann der Brechungsindex von TDE beliebig eingestellt werden und erreicht deutlich höhere Brechungsindizes (RI = 1,33-1,518). Diesbezüglich ist TDE von anderen Medien unerreicht. Nachteile von TDE sind, dass es bei Lagerung zur Degradation neigt und dass es nicht zur Einbettung eines mit Phalloidin markierten Aktinzytoskeletts geeignet ist [43].

	Probe 1 nach 24 h	Probe 2 nach ~3d	Probe 3 nach 25 d	Literaturwert
Mowiol	1,4725	1,4305	1,4661	1,49
FluorSave	1,4943	1,4245	1,4791	Keine Angabe
ProLong Gold	1,4725	1,4256	1,4656	1,46
Gel/Mount	1,4929	1,4246	1,4305	Keine Angabe

Tabelle 7: Brechungsindizes (RI) ausgehärteter Einbettmedien in drei unabhängigen Ansätzen, bestimmt mittels Ellipsometrie. Die Brechungsindizes der nicht-ausgehärteten Medien betragen: Mowiol RI = 1,3832, FluorSave RI = 1,3565.

Um den Einfluss der Einbettmedien auf das Auflösungsvermögen des Mikroskops festzustellen, wurden fluoreszenzmarkierte Nanopartikel (TetraSpeck, Invitrogen, T7279, $d = 100$ nm) entsprechend eingebettet und ihre Punktverschmierungsfunktionen (PSF) in verschiedenen Abbildungskanälen aufgenommen (Abbildung 48). Dabei zeigte sich, dass der als „dark red“ ($\lambda_{exc} = 660$ nm, $\lambda_{em} = 680$ nm) bezeichnete Farbstoff für STED-Abbildungen verwendet werden konnte. Anhand der Schnittprofile wird ersichtlich, dass die axiale Auflösung durch den höheren Brechungsindex des TDE [43] geringfügig verbessert ist. Im Vergleich dazu wurde an den hier verwendeten Objekten kein eindeutiger Einfluss des Einbettmediums auf die laterale Auflösung festgestellt.

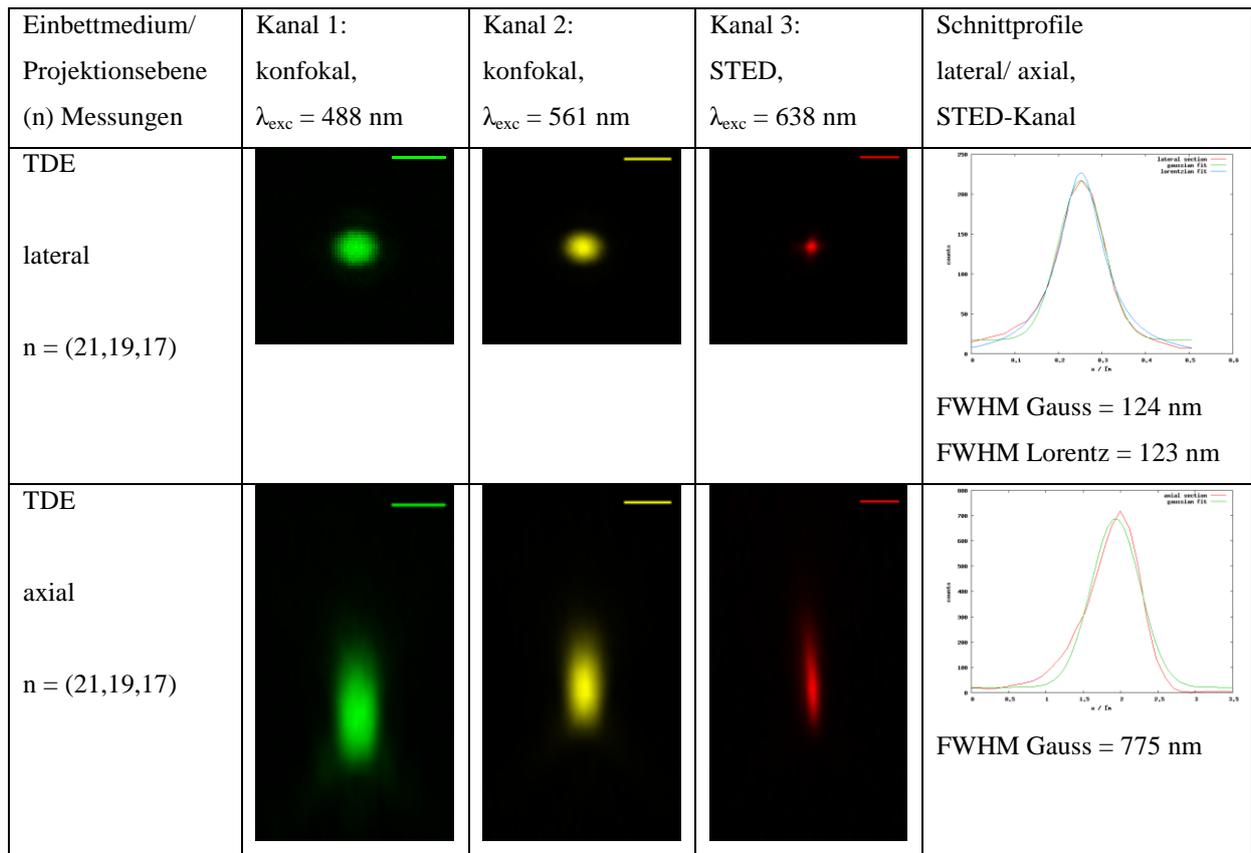


Abbildung 48: Laterale und axiale Schnitte durch die PSF, konfokal und im STED-Aufnahmemodus in TDE als Einbettmedium (97% 2-Thiodiethanol, flüssig, $n = 1,518$). Maßstabsbalken = 500 nm, n gibt die Anzahl der gemittelten Bilder für die einzelnen Kanäle (488nm, 561nm, STED) an. Für den STED-Kanal wurde jeweils ein Fit des Schnittprofils angefertigt: für den axialen Schnitte mit einem Gauss-Profil, für den lateralen Schnitte mit einem Gauss- und einem Lorentz-Profil, FWHM = Halbwertsbreite des Signals. Die Schnittlinie für die axialen Profile wurde entlang der Hauptachse der PSF gelegt.

- Einfluss von Einbettmedien auf das Bleichverhalten von Nanopartikeln

Für die STED-Mikroskopie ist die Optimierung der Bleichstabilität der Proben besonders wichtig, da zusätzlich zur Anregung noch das intensive Abregungslicht hinzukommt. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss verschiedener Einbettmedien auf das Bleichverhalten fluoreszenzmarkierter SiO_2 - und Silber-Nanopartikel untersucht. Auf das Bleichverhalten der SiO_2 -Partikel wirkte sich die Anwesenheit der verschiedenen Einbettmedien nicht in signifikantem Maße aus (Abbildung 49). Dieses Ergebnis ist naheliegend, da innerhalb von

Partikeln, die über ihr gesamtes Volumen Farbstoffmoleküle enthalten, nur die äußersten Fluorophore in Kontakt mit dem Einbettmedium treten, während der Rest durch die Partikelmatrix abgeschirmt wird. Bei den Silberpartikeln dagegen wurde die Fluoreszenzmarkierung an der Partikeloberfläche angebracht. In allen verwendeten Einbettmedien war ein schnelles Bleichen zu beobachten. Dieses kann durch Wirkung des STED-Lasers auf vorübergehend besetzte Triplet-Zustände beeinflusst werden [44]. Eine schnelle Entleerung der Triplet-Zustände kann von Reduktions- und Oxidations- (ROX) Systemen vermittelt werden [42]. Der Zusatz eines ROX-Systems (1 mM Methylviologen, 1 mM Ascorbinsäure) hatte vor allem in PBS mit geringer Viskosität eine deutliche Verlangsamung des Bleichens zur Folge (Abbildung 49).

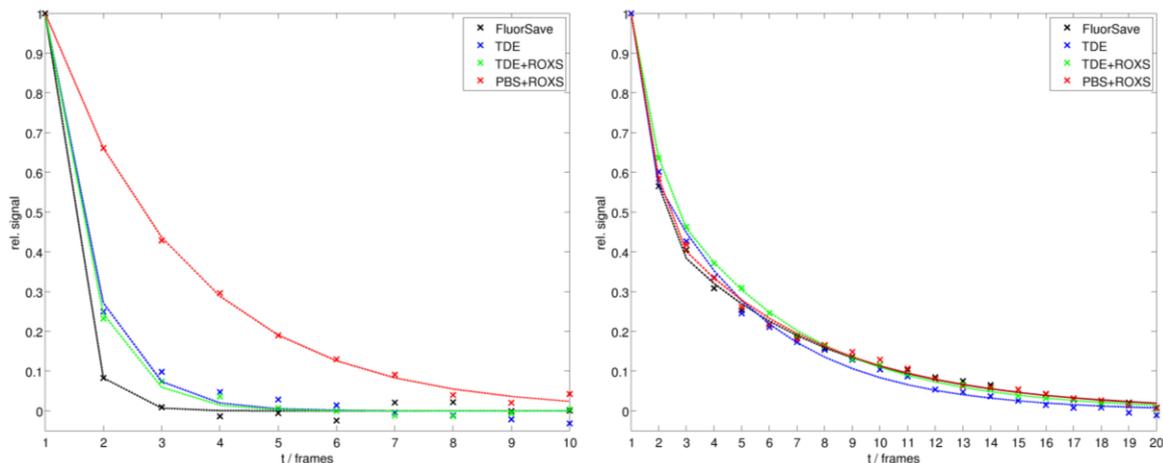


Abbildung 49: Bleichverhalten von fluoreszenzmarkierten 9 nm Silber-Nanopartikeln (links) und 80 nm SiO₂-Nanopartikeln (rechts) in unterschiedlichen Einbettmedien. Die Signale wurden zur Vergleichbarkeit normiert. Die Linien sind Anpassungen von monoexponentiellen Zerfallskurven (a), in (b) mit zusätzlichem abfallendem Gauß-Anteil.

- Einfluss von Einbettmedien auf das Bleichverhalten fluoreszierender biologischer Proben

Der Einfluss aushärtender Einbettmedien (Mowiol = Polyvinylalkohol mit DABCO (1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan) als Anti-Bleichmittel), FluorSave, ProLong Gold) auf das Bleichen biologischer Proben wurde am Beispiel GFP-markierter (Membranmarkierung pAcGFP1-Mem, Clontech) A549-Zellen untersucht. Jede Probe wurde über einen Zeitraum von 105 s abgerastert (jeder Probenpunkt dabei 100 x). Vor allem in FluorSave trat dabei ein schnelles Bleichen auf, während Mowiol und ProLong Gold etwa gleich gut vor Bleichen schützten (Abbildung 50). Daneben zeigte sich auch, dass Mowiol die dreidimensionale Struktur der fixierten Zelle besser konserviert als FluorSave, welches in einigen Fällen eine deutliche Kompaktierung der Zellen in axialer Richtung zur Folge hatte. Speziell für Untersuchungen der Lokalisation von Nanopartikeln im Verhältnis zu Zellorganellen erweist sich daher die Einbettung in Mowiol als empfehlenswert.

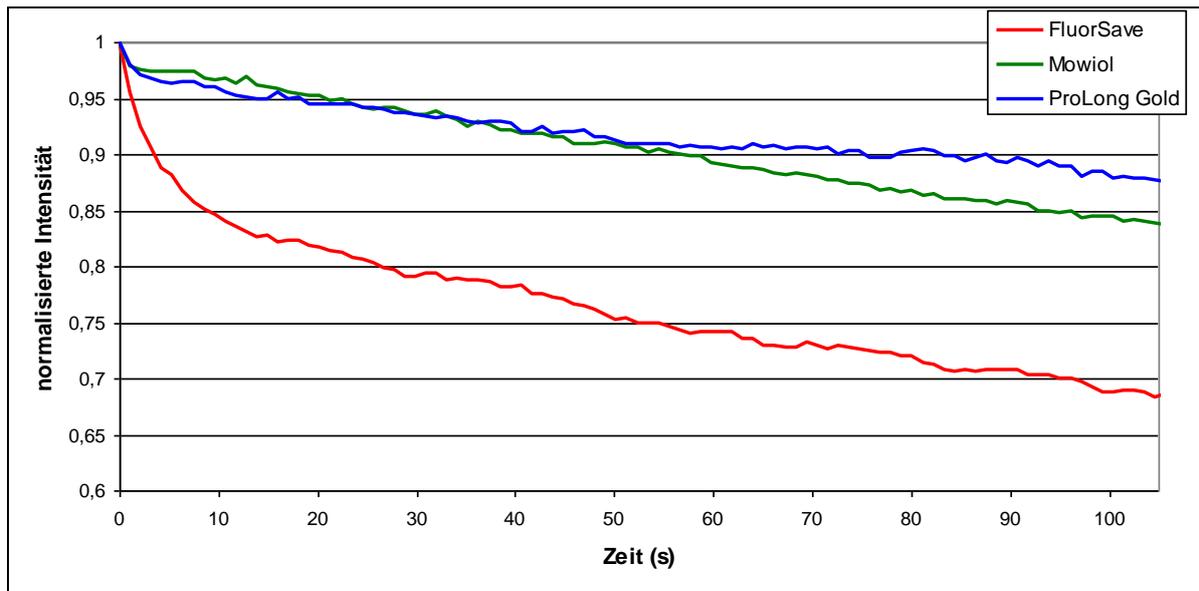


Abbildung 50: Einfluss verschiedener Einbettmedien auf das Bleichen von GFP in fixierten Zellen bei kontinuierlicher Beleuchtung (Anregungswellenlänge = 488 nm).

d) *STED-Mikroskopie an verschiedenen Typen von Nanopartikeln*

Im Rahmen des Vorhabens wurden STED-Aufnahmen an verschiedenen Typen von Partikeln erstellt, darunter

- Silika-Nanopartikel, die mit Atto647N (Atto-tec) und Dy648 (Dyomics) markiert wurden (durchgefärbte Partikel und Kern-Schale Partikel)
- Kommerzielle Polystyrol-Partikel (Crimson Beads, TetraSpeck). 25 nm Polystyrol-Partikel wurden standardmäßig zur Aufnahme der Punktverschmierungsfunktion eingesetzt.
- Silber-Nanopartikel
- Im Rahmen paralleler Vorhaben werden außerdem Gold-Nanopartikel für die STED-Mikroskopie eingesetzt, die mit dem Farbstoff Atto647N markiert sind, sowie $\text{Fe}_x\text{O}_y@SiO_2$ -Kern-Schale-Partikel, die mit Atto647N markiert sind.
- Kommerzielle Quantum Dots (Qdot® 655 ITK™ carboxyl quantum dots) sind für STED-Aufnahmen mit dem bestehenden System nicht geeignet [45].
- Konfokal-, STED-, Rasterelektronen-Mikroskopie an mit Atto647N markierten SiO_2 -Nanopartikeln

130 nm Kern-Schale-Partikel wurden zum Vergleich mit drei verschiedenen Mikroskopiertechniken (Konfokal, STED, Rasterelektronenmikroskopie, REM) abgebildet (Abbildung 51). Die REM-Auflösung ermöglicht eine exakte Größenbestimmung der einzelnen Partikel sowie die Sichtbarmachung einzelner Partikel innerhalb von Agglomeraten. Auch die STED-Mikroskopie ermöglichte eine hochauflösende Abbildung einzelner fluoreszierender Partikel und einzelner Partikel innerhalb von Agglomeraten. Mit diesem Vergleich konnte die Überlegenheit der STED-Technik gegenüber der herkömmlichen Konfokaltechnik an Silikapartikeln gezeigt werden. Darüber hinaus geht aus dem Vergleich hervor, dass jedes einzelne Partikel eine Fluoreszenzmarkierung trägt.

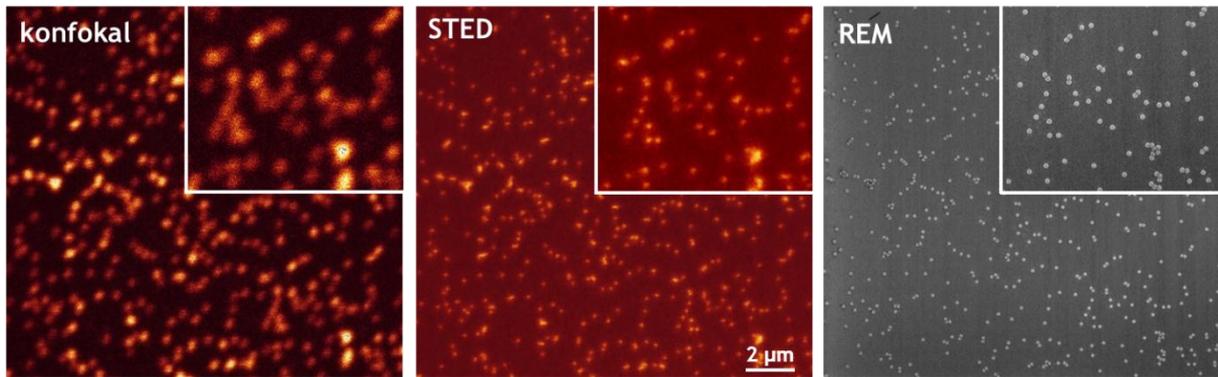


Abbildung 51: Kombinierte STED-, Konfokal- und Rasterelektronenmikroskopie an derselben Partikelprobe. Die verdünnte Partikelsuspension (Kern-Schale-Partikel, Verdünnung 1:100) wurde auf der Oberfläche eines Deckglases eingetrocknet. Die Konfokal- und STED-Abbildung wurden einer Bildbearbeitung unterzogen, um einen Teil des Rauschens zu unterdrücken. Die Bildbreite beträgt 16,2 µm. Die vergrößerten Bildausschnitte stammen jeweils aus dem unteren rechten Bildteil. (Schübbe et al., 2010)

- STED-Mikroskopie an mit Dy-Farbstoffen markierten SiO₂-Partikeln

Neben dem Farbstoff Atto647N wurden auch Dy-Farbstoffe (Dyomics) auf ihre Verwendbarkeit für die STED-Mikroskopie getestet (Abbildung 52). Die hergestellten Partikel verschiedener Größe ließen sich sowohl mittels Konfokal- als auch mittels STED-Mikroskopie abbilden. Die Dy648-markierten Partikel zeigten zwar eine ausreichende Stabilität zur Aufnahme von 2D Bildern, aufgrund des starken Bleichens konnten allerdings wiederholte Aufnahmen desselben Probenbereichs nicht durchgeführt werden. Zur Aufnahme drei-dimensionaler Bildstapel erwiesen sich die mit Dy648 markierten Partikel deshalb, anders als die mit Atto647N modifizierten Partikel, als nicht geeignet.

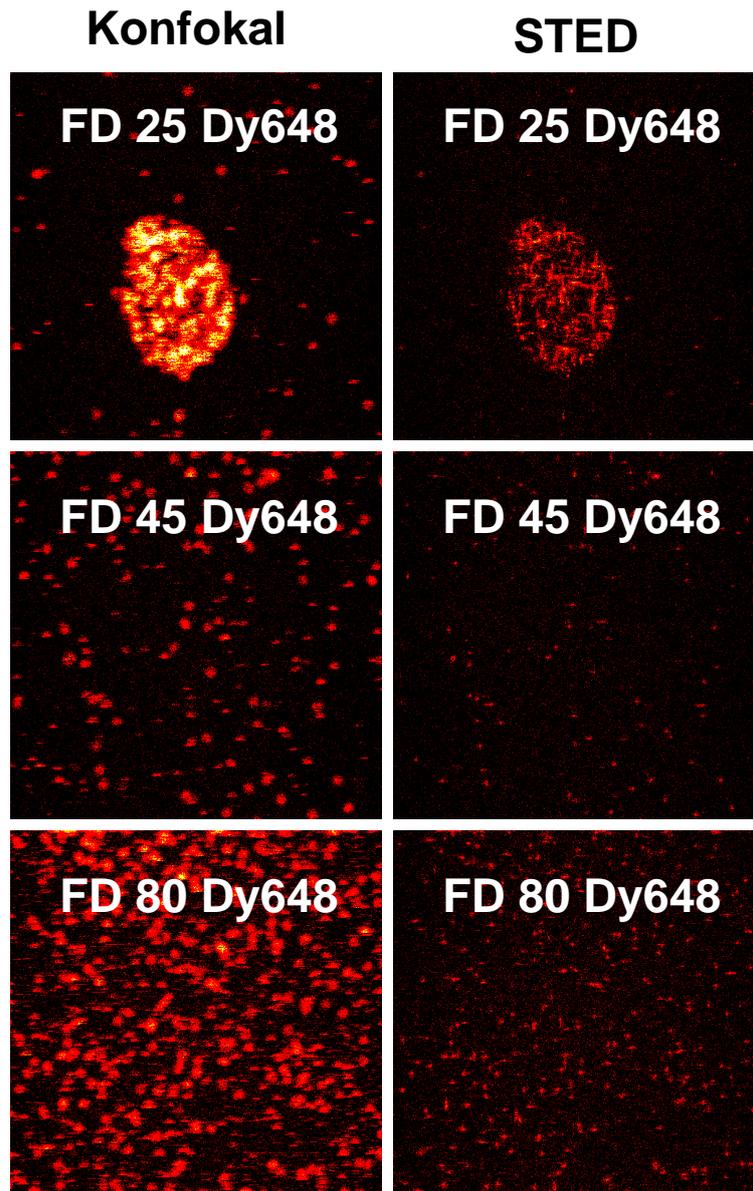


Abbildung 52: Konfokal und STED-Aufnahmen von 29 nm (FD 25 Dy648), 57 nm (FD 45 Dy648) und 77 nm (FD 80 Dy648) großen SiO₂-Nanopartikeln unter Verwendung von Dy648 als Fluoreszenzmarker.

- STED-Abbildung von Silber-Nanopartikeln

Für die Abbildung von 9 nm Silber-Nanopartikeln wurden diese mit poly-L-Lysin am Deckglas fixiert und anschließend mit einem ROXS-Bleichschutz eingebettet. Die erreichbare Abbildungsqualität und die Auflösungsverbesserung durch STED lassen sich in Abbildung 53 nachvollziehen. Fluoreszenzintensitätsprofile durch den in Abbildung 53b markierten Bereich sind in Abbildung 54 dargestellt.

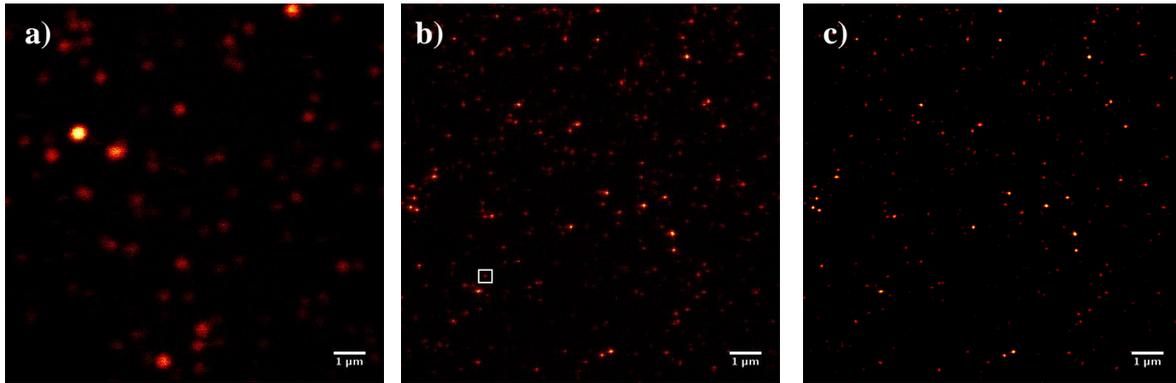


Abbildung 53: (a) Konfokalaufnahme von 9 nm Silber-Nanopartikeln. (b) STED-Abbildung von 9 nm Silber-Nanopartikeln. (c) Abbildung b nach linearer Entfaltung mit einer modellierten 2D-Lorenz-PSF, FWHM 75 nm.

Die laterale Auflösung (FWHM) konnte zu $\Delta x=79$ nm bestimmt werden. Verglichen mit der Größe der Partikel umfasst somit die Halbwertsbreite der Auflösung den zehnfachen Partikeldurchmesser, so dass es nicht möglich ist, ohne weitere Informationen separierte Signale einzeln vorliegenden Partikeln zuzuordnen.

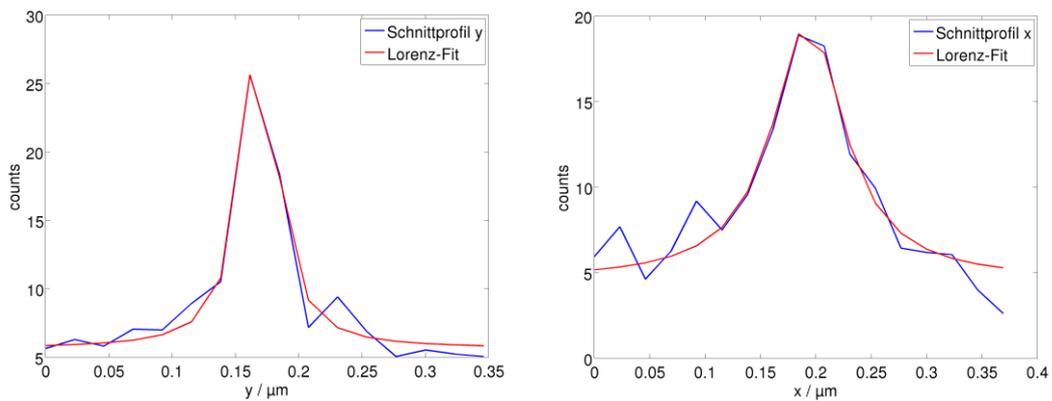


Abbildung 54: Fluoreszenzintensitätsprofile durch den in Abbildung 56 b) markierten Bereich mit Lorenz-Fitkurven.

Bei Aufnahmen der Silber-Nanopartikel in Zellen wurde eine STED-Auflösung von $\Delta x=80$ nm erreicht (Abbildung 55). Das ausgeprägte Bleichen der Silber-Nanopartikel schränkt ihre Anwendbarkeit zur Aufnahme von 3D-Bildstapeln in STED-Auflösung gegenüber Atto647N-markierten Silikapartikeln ein.

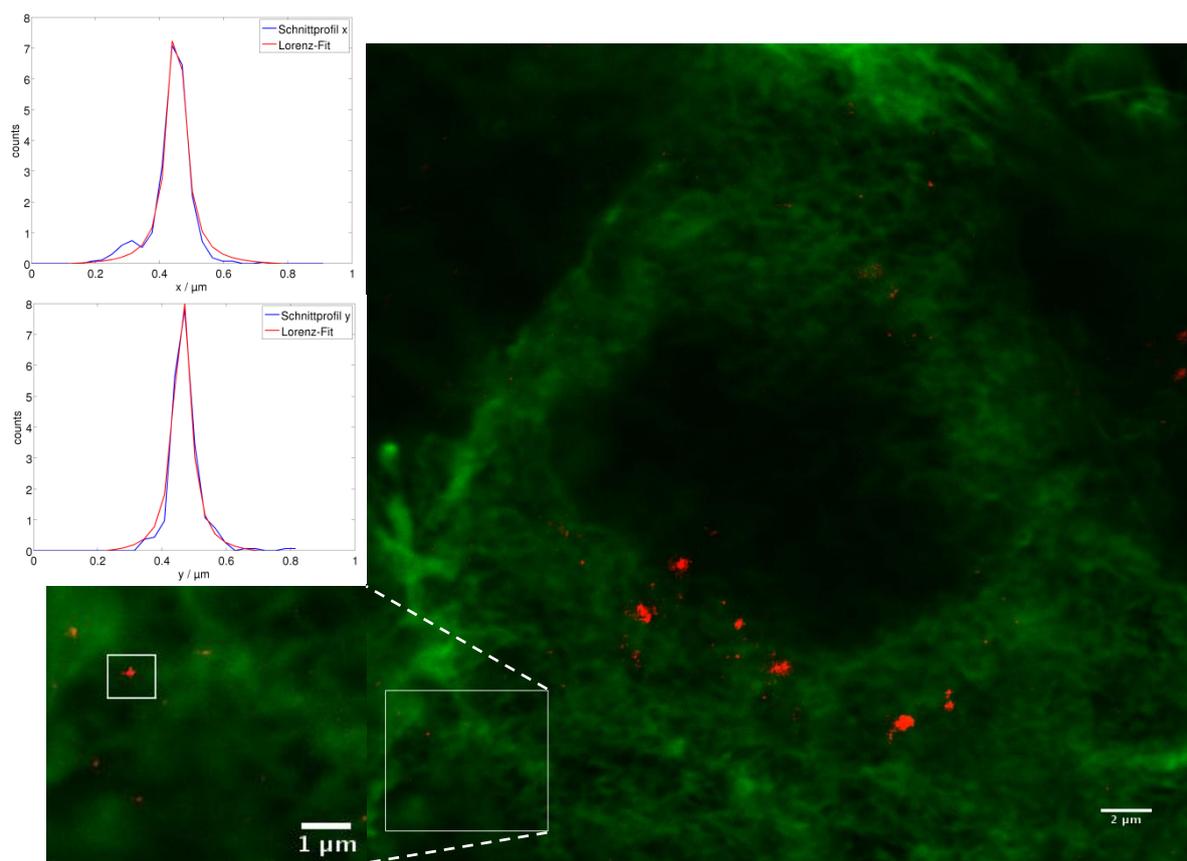


Abbildung 55: STED-Abbildung von 9 nm Silber-Nanopartikeln (rot, linear entfaltet und aufgehellte) nach Aufnahme durch eine Caco2-Zelle (Aktin-Zytoskelett grün markiert). Die Vergrößerung und die beiden Schnittprofile durch den markierten Bereich demonstrieren die Auflösungsgrenze des Abbildungsmodus.

e) *Bildbearbeitung und Bildauswertung*

Im Berichtszeitraum wurde die STED-Mikroskopie zur Abbildung von Nanopartikeln, sowohl separat als auch in zellulärer Umgebung, und biologischer Strukturen eingesetzt. Ein Schwerpunkt lag darin, geeignete Methoden zur Bearbeitung der STED-Daten zu etablieren und zur Bildauswertung einzusetzen.

- **Bildbearbeitung**

Mikroskopische Verfahren gleich welcher Art reproduzieren nicht das Objekt, das mit ihnen beobachtet wird, sondern erzeugen ein Abbild, das sich vom Objekt klar unterscheidet. Diese Abweichungen sind zum Teil auf physikalische Prinzipien zurückzuführen. So ist etwa die räumliche Auflösung jeglicher mikroskopischer Technik in Abhängigkeit vom Arbeitsprinzip der Methode mehr oder weniger stark begrenzt. Zudem weicht jedes reale optische Element eines Mikroskops in seinen Abbildungseigenschaften vom theoretisch beschreibbaren Idealzustand ab. Die Summe dieser Abweichungen beeinflusst den allgemeinen Abbildungsprozess und führt zu einem individuellen, charakteristischen „Fingerabdruck“ jedes Mikroskops, der sogenannten Punktverschmierungsfunktion (PSF, point spread function). Die PSF entspricht dem mikroskopischen Abbild eines idealen, punktförmigen Objektes, und ist in ihrer räumlichen Ausdehnung zugleich ein Maß für die optische Auflösung des Mikroskops. Diese ist im Konfokalmikroskop besonders in axialer

Richtung (der Strahlrichtung) gering, die PSF also recht ausgedehnt, was zur Folge hat, dass Objekte auch außerhalb ihrer Fokalebene zum detektierten Signal beitragen. Sehr kleine Objekte wie etwa Nanopartikel erscheinen daher axial stark gedehnt, was es erschwert, Aussagen über ihre genaue Position oder ihre Lagebeziehung zu anderen Objekten zu treffen. Abgesehen von stochastischen Methoden wie PALM [46] und STORM [47] nutzen viele hochauflösende Methoden, darunter die STED-Mikroskopie, SIM (structured illumination microscopy) [48] und 4Pi-Mikroskopie [49] verschiedene Mechanismen, um die Gestalt der PSF zu modulieren und ihr Volumen effektiv zu reduzieren. Im Falle des Leica TCS STED-Mikroskops betrifft diese Reduktion nur die laterale Bildebene, innerhalb derer die PSF eng begrenzt und somit die Auflösung stark erhöht ist. Die axiale Ausdehnung der PSF unterscheidet sich dagegen nicht von der des Konfokalmikroskops (Abbildung 56).

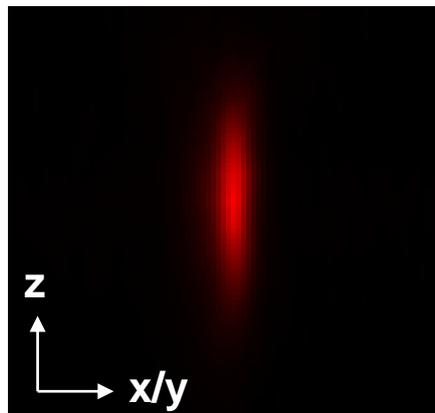


Abbildung 56: Axialer Schnitt der PSF des Leica SP5 TCS STED. Die deutlich höhere Auflösung in der x/y-Ebene gegenüber der z-Achse führt zu einer stark elongierten Gestalt der PSF.

Da man den Prozess der Bildgebung als Transformation eines Objektes zu einem – in seiner Auflösung begrenzten – Bild verstehen kann, einer sogenannten Faltung des Objektes mit der jeweiligen PSF, liegt es nahe, dies mathematisch rückgängig zu machen. Im Idealfall überführt diese Operation, die Entfaltung, das mit dem Mikroskop aufgenommene Bild zurück zu dem der Aufnahme zugrunde liegenden Objekt. Signalbeiträge aus nicht-fokalen Bereichen werden wieder dem räumlich begrenzten Objekt zugerechnet, dem sie entstammen. Auch das Verhältnis von Signal und Rauschen kann dabei erheblich verbessert werden. Mit nicht-linearen Entfaltungsalgorithmen können, innerhalb gewisser Grenzen, sogar Details unterhalb der Schwelle der optischen Auflösung rekonstruiert werden[50]. Insbesondere bei räumlich komplexen Strukturen erlaubt meist erst die Bildentfaltung eine klare Aussage über Lagebeziehungen [51, 52], beispielsweise zu von einer Zelle aufgenommenen Nanopartikeln.

Grundlage der mathematischen Entfaltung aller konfokalen und STED-Bilddaten aus biologischen Experimenten sind experimentell bestimmte PSFs. Es ist allerdings auch möglich, eine unbekannte PSF mittels spezieller Entfaltungsalgorithmen aus den Bilddaten selbst zu rekonstruieren. Fälle, in denen die PSFs unbekannt sein können, treten beispielsweise bei Abbildungen biologischer Systeme auf, die schlecht zur Messung von PSFs reproduzierbar sind, wie in Live-Cell-Anwendungen oder Gelmatrizes. Im Allgemeinen führt die Anwendung solcher Blind-Entfaltungen jedoch zusätzliche Unbekannte in das

mathematische Problem ein, so dass eine Entfaltung mit einer experimentell bestimmten PSF zuverlässigere und qualitativ hochwertigere Ergebnisse liefert.

Zu diesem Zweck wurde im Rahmen des Vorhabens eine Bibliothek mit PSFs der verschiedenen Abbildungsmodi (STED, konfokal, Multiphoton) des Leica TCS SP5 STED Mikroskops angelegt, wobei folgende Parameter variiert wurden: Die Anregungswellenlängen und Emissionsspektren der typischerweise verwendeten Fluorophore, die in Gebrauch befindlichen Einbettmedien, zwei verschiedene Größen der konfokalen Apertur und die zur Verfügung stehenden Objektive. Dazu wurden fluoreszenzmarkierte Nanopartikel mit Durchmessern von 20-40 nm unter den jeweiligen Abbildungsbedingungen dargestellt. In jeder PSF der Bibliothek sind etwa einhundert individuelle Aufnahmen einzelner Nanopartikel vereinigt, die unter gleichen Bedingungen angefertigt wurden. Diese Bibliothek wird ständig erweitert und überprüft, so dass die Entfaltung von Abbildungen, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen entstanden sind, auf Grundlage der reellen PSF des abbildenden Systems möglich ist.

Zur Begutachtung und routinemäßigen Entfaltung dreidimensionaler lichtmikroskopischer Aufnahmen wurde die kommerzielle Software *Huygens Professional* (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, Niederlande) eingesetzt. Das Programm ermöglicht eine schnelle und benutzerfreundliche Entfaltung einer großen Anzahl von Daten. Die Bestimmung des für die Qualität der Entfaltung äußerst wichtigen Regularisierungsparameters verläuft hier über die Angabe des Verhältnisses von Signal zu Rauschen (SNR, *signal-to-noise ratio*), welches aus den Bilddaten abgeschätzt werden kann. Bei schlechtem SNR wird automatisch eine starke Regularisierung gewählt, die während der Entfaltung wiederum eine starke Glättung der Strukturen erzwingt. Dies geht allerdings auf Kosten der Auflösung, weshalb bei gutem SNR eine schwächer regularisierte Entfaltung durchgeführt werden kann. Die Steuerung über den SNR-Parameter ist wichtig, da eine Entfaltung mit einer zu schwachen Regularisierung Artefakte erzeugen kann, indem beispielsweise kontinuierliche Strukturen fälschlicherweise unterbrochen werden. Aus diesem Grund wurden experimentell Bereiche des SNR-Parameters in konfokal- wie auch STED-Aufnahmen festgelegt, innerhalb derer die Regularisierung der Entfaltungsoperation mit der verbesserten Auflösung der STED-Abbildung kompatibel ist, und diese nicht durch Überregularisierung geglättet wird. Abbildung 57 zeigt anhand eines xy-Schnitts und einer Maximumprojektion den Vergleich von Rohdaten und Entfaltung bei einem konfokalen Bildstapel in drei Kanälen.

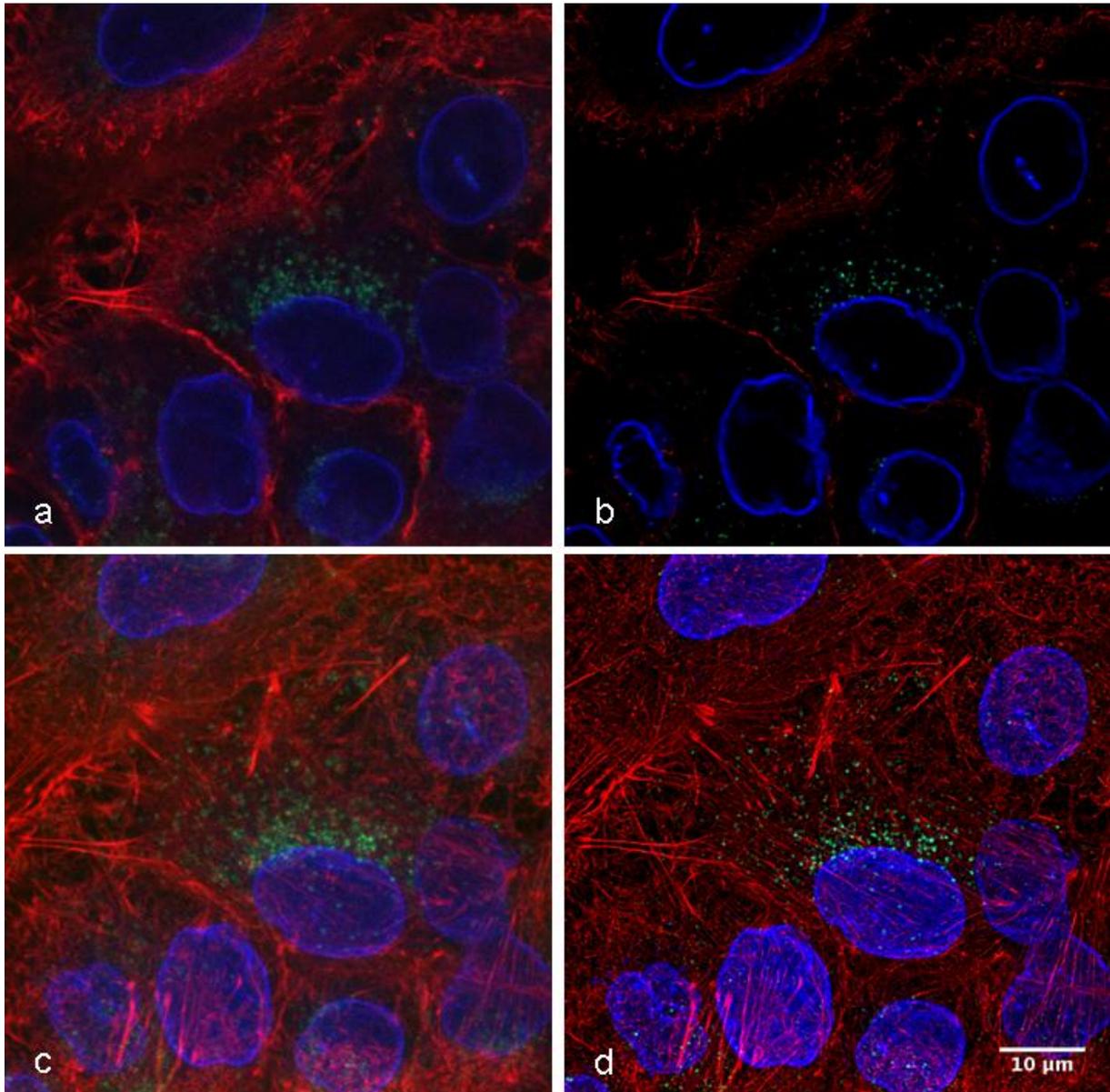


Abbildung 57: Konfokalaufnahme von A549-Zellen vor (a, c) und nach der Entfaltung mit Huygens Professional (b, d). Rot: Aktin-Zytoskelett, grün: 9 nm Silber-Nanopartikel (200 μM , 48 h Inkubation), blau: Lamin-B, Zellkernlamina. In den xy-Schnitten (a, b) ist deutlich zu erkennen, wie nach der Entfaltung Beiträge von Ebenen außerhalb des Fokus entfernt wurden (z.B. der Bereich innerhalb der Zellkerne). In der Maximumprojektion (c, d) sind vor allem die Aktin-Filamente sehr viel deutlicher zu erkennen. Die recht lichtschwachen Nanopartikel profitieren von der Rauschreduktion und können besser lokalisiert werden. Parameter: Entfaltung mittels Classical Maximum Likelihood Estimation (CMLE) mit experimenteller PSF; SNR = 30 (rot), 10 (grün), 15 (blau); 40 Iterationen.

- Bildauswertung

Zur quantitativen Auswertung von Bildinformationen wurden für biologische Experimente Zählalgorithmen für einzelne Objekte, basierend auf der Anwendung eines Schwellwerts genutzt, die im freien Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (National Institutes of Health) [53] zur Verfügung stehen. So konnte nach Inkubation von A549-Zellen in Anwesenheit von 130 nm SiO_2 -Partikeln die zeitabhängige Agglomeration der Partikel bestimmt werden. Die verbesserte Auflösung der STED-Methode erlaubt es dabei, einzelne, nicht agglomeriert vorliegende Nanopartikel als solche zu erkennen. Die Klassifizierung der detektierten

Agglomerate (mit Partikelanzahl $n \geq 1$, Berechnung des Agglomerat-Durchmessers basierend auf einem Kugel-Modell, Abbildung 65) wurde so zur Quantifizierung der Partikel-Agglomeration innerhalb der Zellen eingesetzt (Abschnitt 2.5 b, [54]). Nanopartikel-Agglomerate wurden in Fluoreszenzabbildungen mittels eines Wavelet-basierten Schemas detektiert. Der Abstand zwischen Nanopartikel-Agglomeraten und Zellkernen wurde mittels Segmentierungsalgorithmen bestimmt (Abschnitt 2.5 d) [55-57]. Des Weiteren wurden Kolokalisationsanalysen durchgeführt, bei denen mittels des Programms Huygens Professional Manders-Koeffizienten von Zweikanalaufnahmen bestimmt wurden (Abschnitt 2.5 a und 2.5 g). Für Untersuchungen von Interaktionen internalisierter Nanopartikel mit zellulären Komponenten wurde in Studien an lebenden Zellen das dynamische Verhalten von fluoreszenzmarkierten Partikeln und Vesikeln untersucht. Eine auf dem Programm Matlab basierte RICS-Analyse (Raster Image Correlation Spectroscopy) zeigte eine synchrone Bewegung in beiden Kanälen (Abschnitt 2.5 g [58]).

2.5 Aufnahme und Lokalisation fluoreszenzmarkierter Nanopartikel

a) Mechanismus der Partikelaufnahme bei A549-Zellen

Die Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen führt dazu, dass die Partikel in direkten Kontakt mit intrazellulären Komponenten wie Organellen, Strukturproteinen, Enzymen oder Signalmolekülen treten und beeinflusst somit deren mögliche Auswirkungen. Bereits der Mechanismus über den die Aufnahme vermittelt wird, bestimmt über den Zielort an den die Partikel innerhalb der Zelle gelangen [59]. Es wird davon ausgegangen, dass Nanoobjekte durch endozytische Prozesse [60-63] internalisiert werden, wodurch sie zunächst in membranumgrenzten Vesikeln vorliegen. Daneben gibt es auch Hinweise darauf, dass Partikel durch Penetration der Plasmamembran in Zellen gelangen können [64-66]. Diverse Aufnahmemechanismen wurden gerade in letzter Zeit für verschiedene Zell- und Materialtypen identifiziert [67-70]. Doch obwohl es Hinweise darauf gibt, dass z.B. Partikelgröße [71] und Oberflächenmodifikation [72] eine Rolle spielen, ist bisher ein genereller Zusammenhang zwischen Partikeleigenschaften und Art der Aufnahme nicht identifiziert worden. Im Rahmen dieses Projektes wurde untersucht, über welchen Mechanismus 80 nm große Silika-Partikel in A549-Zellen aufgenommen werden.

Zur Herstellung von Mikroskopieproben wurden die Zellen mit den Partikeln in Gegenwart von Serum inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, in 4 % Paraformaldehyd fixiert und durch Behandlung mit 0,2 % Triton-X-100 (15 min) permeabilisiert. Zur Markierung wurden die in den entsprechenden Abschnitten angegebenen Farbstoffe, Antikörper oder autofluoreszierenden Proteine eingesetzt.

- **Kolokalisation von Clathrin und Caveolin mit 80 nm SiO₂-Partikeln**

Für die Kolokalisationsanalysen wurden A549-Zellen für 30, 60, 90, 120 und 180 min mit 80 nm SiO₂-Partikeln (20 µg ml⁻¹) inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Proben mit Anti-Clathrin (heavy chain, Sigma C1860), bzw. Anti-Caveolin (Cav3, Sigma WH0000859M3, 65% Identität zu Cav1) Antikörper markiert. Von allen Proben wurden z-Serien (Partikel im STED-Kanal, Proteine im Konfokalkanal) aufgenommen und entfaltet. Die Kolokalisationsanalyse, die den räumlichen Überlapp der Signale aus zwei unterschiedlichen

Kanälen misst, wurde mit Huygens Professional durchgeführt und die Überlappkoeffizienten M_1 (Clathrin bzw. Caveolin) und M_2 (Silika Partikel) nach Manders [73] bestimmt. Dabei gibt M_1 den Grad der Kolokalisation des Clathrin-, bzw. Caveolinsignals mit dem der SiO_2 -Partikel an und M_2 (= SiNP, Abbildung 59 und 60) den Grad der Kolokalisation der Nanopartikel mit Clathrin. Für beide Kanäle wurden unterschiedliche Schwellwerte zur Diskriminierung von Signal und Hintergrund gesetzt (Abbildung 59 und 60).

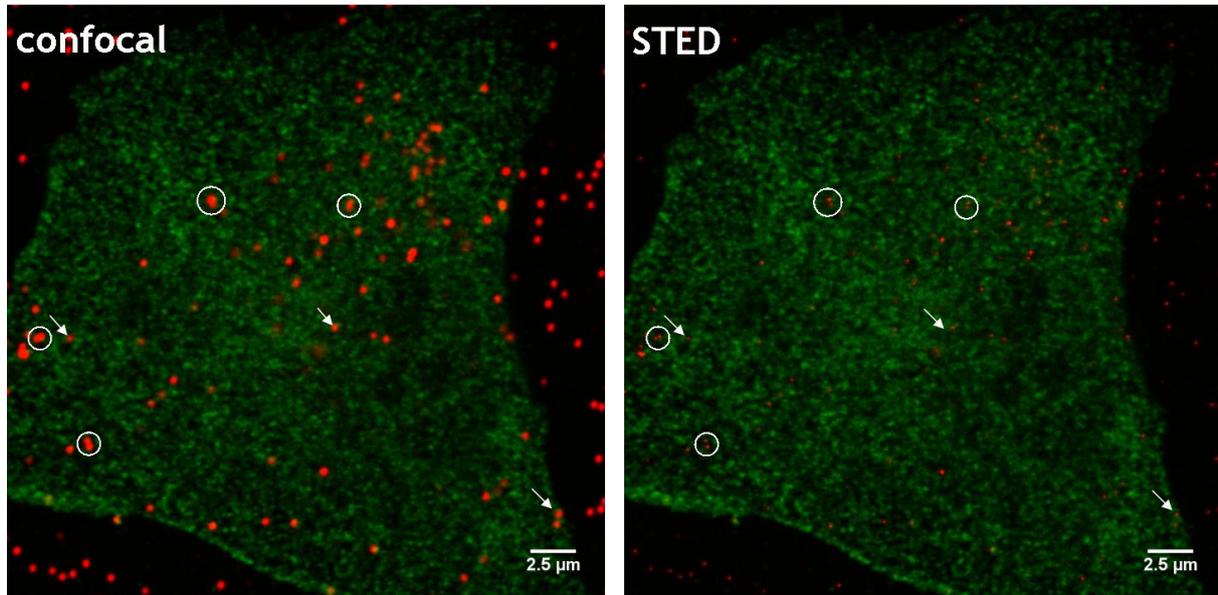


Abbildung 58: A549 Zellen (Caveolin, grün) nach 90 min Exposition gegenüber 80 nm SiO_2 Partikeln (rot), links im Konfokalmodus, rechts in STED-Auflösung. Kreise markieren Partikelanhäufungen, die nur in STED unterscheidbar sind. Pfeile deuten auf Partikel, die im Konfokalmodus scheinbar mit Caveolin kolokalisieren, aber in STED vom Caveolinsignal separierbar sind.

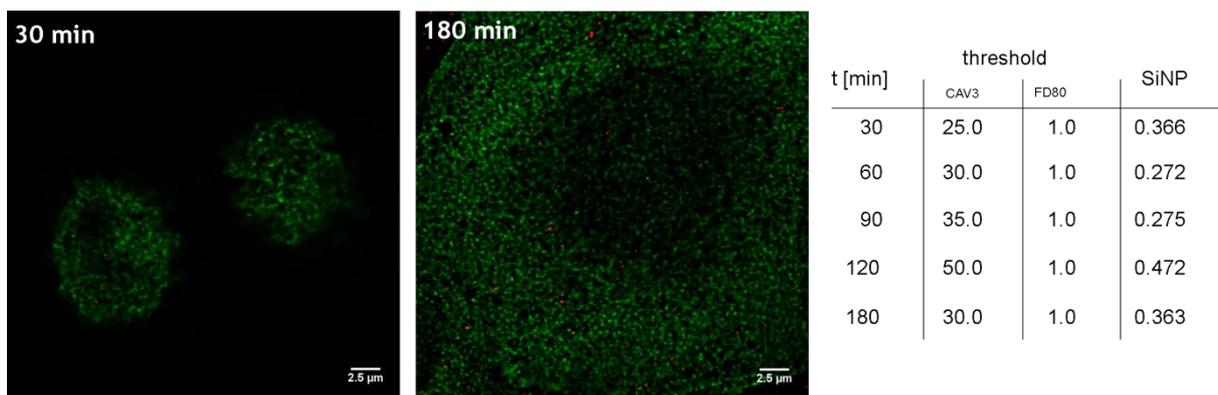


Abbildung 59: A549-Zellen (Caveolin, grün) nach 30 (links) und 180 min (rechts) Inkubation in Gegenwart von 80 nm SiO_2 -Partikel ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$, rot). Die Tabelle gibt die Schwellwerte und die Kolokalisationswerte (SiNP, siehe Text) an.

Im Verlauf von drei Stunden wurden zunehmend Partikel in die Zellen aufgenommen. Im Vergleich zu Clathrin wird Caveolin in A549 anscheinend stärker exprimiert und gibt ein sehr viel dichteres Signal (Abbildung 58). Die Messungen der Kolokalisation von SiO_2 Partikeln mit Caveolin (Abbildung 59) und Clathrin (Abbildung 60) zeigen, dass keine systematische Kolokalisation vorliegt. Jedoch ist hierbei zu berücksichtigen, dass die beiden Kanäle, STED und Konfokal, unterschiedliche Punktverschmierungs-Funktionen (PSFs) haben. Deshalb

müssen die Werte von M_2 als obere Abschätzungen betrachtet werden. Diese Nebenbedingungen haben auf die Validität der Ergebnisse hier jedoch keinen Einfluss.

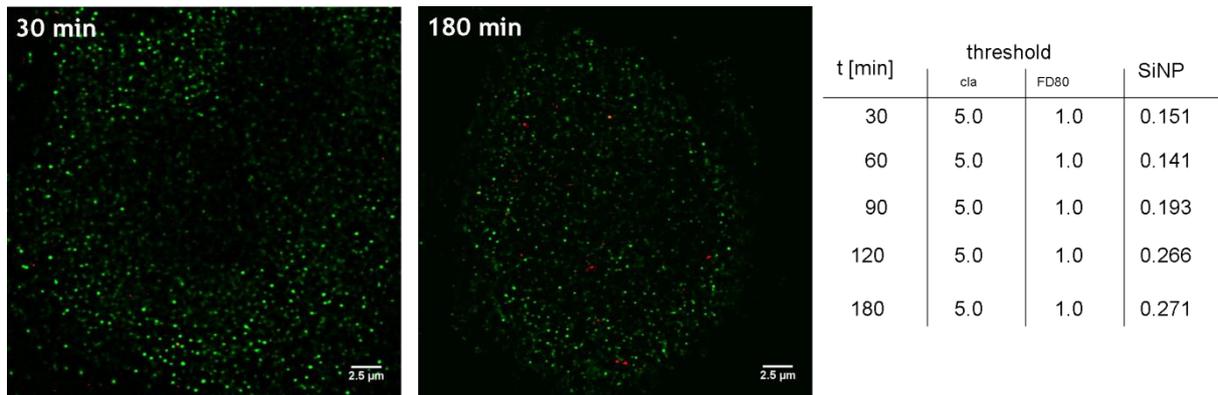


Abbildung 60: A549-Zellen (Clathrin, grün) nach 30 (links) und 180 min (rechts) Inkubation in Gegenwart von 80 nm SiO_2 -Partikel ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$, rot). Die Tabelle gibt die Schwellwerte und die Kolokalisationswerte (SiNP, siehe Text) an.

Eine Erklärung für das geringe Ausmaß an Kolokalisation der Partikel mit Clathrin liegt in der als statisches Experiment durchgeführten Analyse. Nach dem Ablösen Clathrin-umhüllter Vesikel von der Plasmamembran kommt es innerhalb kurzer Zeit (1-2 min) zum Abwerfen der Clathrinhülle [74]. Vermutlich führt der unter diesen Bedingungen gemessene Wert demnach zu einer Unterschätzung der Beteiligung von Clathrin an der Partikelaufnahme.

- Inhibition der Partikelaufnahme

In Ergänzung zur Kolokalisationsanalyse wurde eine Inhibitionsstudie durchgeführt. Die Clathrin vermittelte Endocytose kann durch ein hypertonisches Milieu (0,45 M Saccharose) gehemmt werden [75]. Hierfür wurden die Zellen zunächst 30 min mit 0,45 M Saccharose in DMEM vorinkubiert. Danach wurden die Zellen unter den zuvor eingestellten Bedingungen für drei Stunden den Partikeln ausgesetzt. Für die mikroskopische Analyse wurden die Plasmamembran (DiI, Invitrogen) und der Zellkern (Sytox Blue, Invitrogen) angefärbt (Abbildung 61).

Die Partikelaufnahme wird durch hypertonisches Milieu nicht beeinträchtigt. Ebenso wie bei der Kontrolle in DMEM ohne Saccharose wurden in den Proben Partikel im Cytoplasma detektiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Aufnahme von 80 nm Silika-Partikeln in A549-Zellen im Wesentlichen unabhängig von Clathrin erfolgt.

Um zu klären, ob die Partikelaufnahme prinzipiell über einen aktiven Prozess vermittelt wird, wurden aktive Prozesse durch Inkubation der Zellen bei niedriger Temperatur inhibiert. Dazu wurden die Zellen 30 min vor Zugabe der Nanopartikel zur Anpassung bei 4°C vorinkubiert und nach Zugabe der Partikel für weitere drei Stunden bei 4°C inkubiert. Für die mikroskopische Analyse wurden die Zellen, wie oben beschrieben, gefärbt.

Die Aufnahme der 80 nm SiO_2 -Partikel wurde durch Inkubation bei 4°C deutlich inhibiert. Lediglich einige wenige Nanopartikel konnten, anhaftend an die Plasmamembran, detektiert werden. Insgesamt kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Partikel über einen aktiven, Energie verbrauchenden Aufnahmeprozess in die Zellen gelangen.

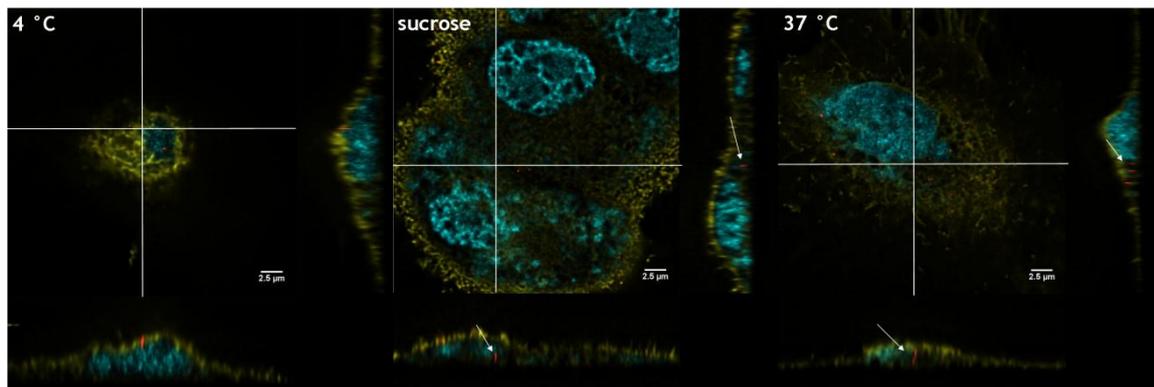


Abbildung 61: A549 Zellen wurden für drei Stunden bei 4°C (links), in Gegenwart von 0,45 M Saccharose (Mitte) und ohne Behandlung in DMEM bei 37°C (rechts) inkubiert. Eine Inhibition der Partikelaufnahme bei 4°C war deutlich zu detektieren. Lediglich wenige Partikel hafteten an die Plasmamembran. Hingegen konnte keine Aufnahmehemmung im hypertonischen Milieu festgestellt werden. Nanopartikel (rot), Zellkern (blau), Membran (gelb).

Um den Mechanismus der Partikelaufnahme abschließend zu klären, werden zurzeit weitere Untersuchungen durchgeführt. Eine Möglichkeit besteht im Einsatz pharmakologischer Hemmstoffe. Ein Nachteil dieses Ansatzes ist eine oft fehlende Spezifität der Hemmstoffe [76]. Eine verbesserte Spezifität könnte durch Strategien wie RNA-Interferenz erreicht werden.

b) *Agglomeration von Silika-Nanopartikeln in A549-Zellen*

Anhand zeitabhängiger Experimente und STED-Analyse der Proben wurde festgestellt, dass A549-Zellen bereits nach kurzer Expositionszeit SiO_2 -Nanopartikel aufnehmen und dass die Anzahl der aufgenommenen Partikel mit der Zeit zunimmt. Bereits nach 5 h wurden z.B. 45 nm SiO_2 -Partikel in A549-Zellen detektiert. Nach bis zu 96 h erhöhte sich deren Anzahl. Die Partikel liegen nach der Aufnahme einzeln oder in Form kleiner Agglomerate vor (Abbildung 62).

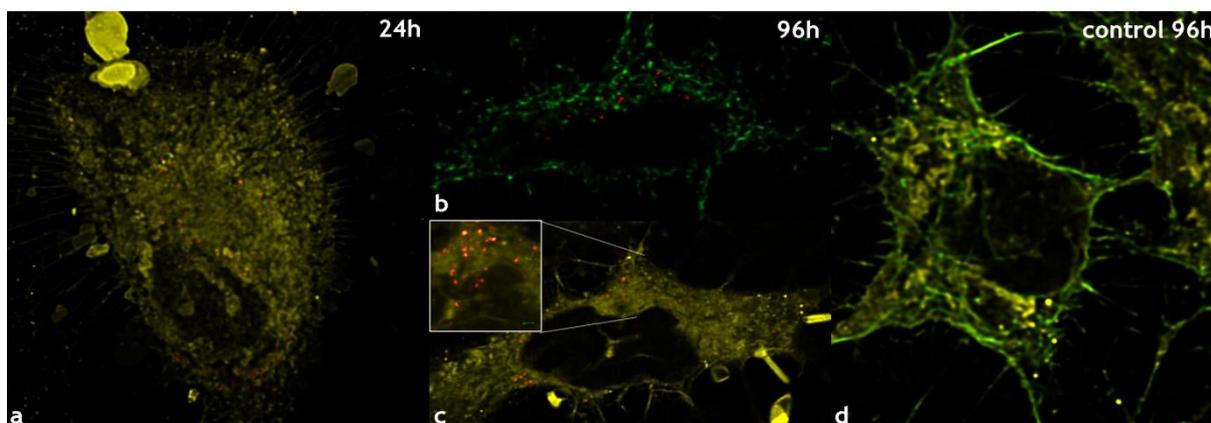


Abbildung 62: A549-Zellen nach Exposition gegenüber 45 nm SiO_2 -Nanopartikeln (Atto647N markiert, rot). Die Zellen wurden 24 h (a) und 96 h (b,c) den Partikeln ausgesetzt, unbehandelte Kontrolle (d). Das Inset in c stellt einen vergrößerten Bildausschnitt mit Partikeln und Agglomeraten dar (Maßstabsbalken 1 μm).

Für eine quantitative Analyse der Partikelaufnahme und –agglomeration in A549-Zellen wurden 130 nm SiO_2 -Partikel (SiO_2 -Gehalt: 8,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Partikelanzahl 8,3 nmol ml^{-1})

eingesetzt. A549-Zellen wurden den Partikeln für 5, 24 und 48 Stunden ausgesetzt. Ein Vergleich zwischen der für die Analyse eingesetzten hochauflösenden STED_Mikroskopie mit der herkömmlichen Konfokaltechnik verdeutlicht die verbesserte STED-Auflösung (Abbildung 63).

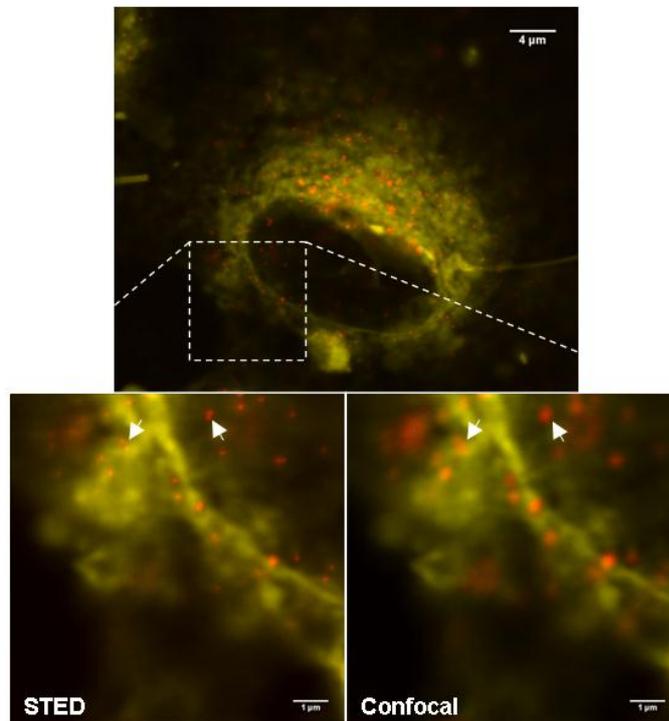


Abbildung 63: Konfokalaufnahme einer A549-Zelle nach 24 h Exposition gegenüber 130 nm SiO₂-Partikeln (Atto647N markiert, rot, Partikel in STED-Auflösung). Die Ausschnittvergrößerungen (unten) zeigen, dass im STED-Modus (unten links) nebeneinander vorliegende Silika-Partikel (Pfeile) voneinander separiert abgebildet werden können, während dies im Konfokalmodus (unten rechts) nicht möglich ist. Membranfärbung: Vybrant DiI (gelb). (Schübbe et al., 2010)

Zur Analyse der Proben wurden konfokale (STED) Bildstapel aufgenommen. Hieraus ergibt sich eine dreidimensionale Information, die zur Lokalisation der Partikel erforderlich ist, z.B. um zwischen intrazellulären und anhaftenden Partikeln zu unterscheiden. Aus der Analyse geht hervor, dass auch die 130 nm Partikel bereits nach 5 h aufgenommen werden. Allerdings lagen nach 5 h die meisten Partikel an der Zelloberfläche haftend und in Form einzelner Partikel vor (Abbildung 64). Auch nach 24 h lagen viele Partikel an der Zelloberfläche vor, die Zahl der internalisierten Partikel nahm zu. Im weiteren Verlauf wurde eine zunehmende Agglomeration der aufgenommenen Partikel festgestellt (Abbildung 64). Anhand der Bilddaten wurden die Anzahl der Partikel und Agglomerate in den Zellen sowie die Agglomeratgröße bestimmt. Die quantitativen Daten belegen, dass die Anzahl der Partikel in den Zellen mit der Zeit ansteigt. Dabei liegen zu jedem Zeitpunkt die meisten Partikel (75-80 %) in Form einzelner Partikel oder als Agglomerate aus 2-3 Partikeln vor. Mit zunehmender Inkubationszeit bilden sich sehr große Agglomerate mit 10-fachem Partikeldurchmesser (0,8-1,2 µm) (Abbildung 65) [54].

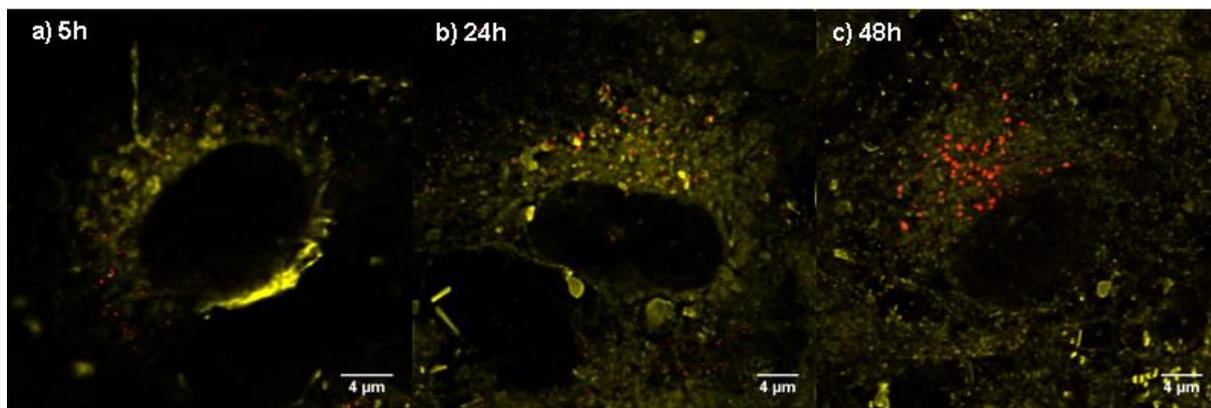


Abbildung 64: A549-Zellen (Membranfärbung: Vybrant DiI, gelb) nach Exposition gegenüber 130 nm SiO₂-Partikeln (Atto647N markiert, rot, Partikel in STED-Auflösung) für a) 5 h, b) 24 h und c) 48 h. Mit der Zeit agglomeriert ein Teil der innerhalb der Zellen vorliegenden Partikel. (Schübbe et al., 2010)

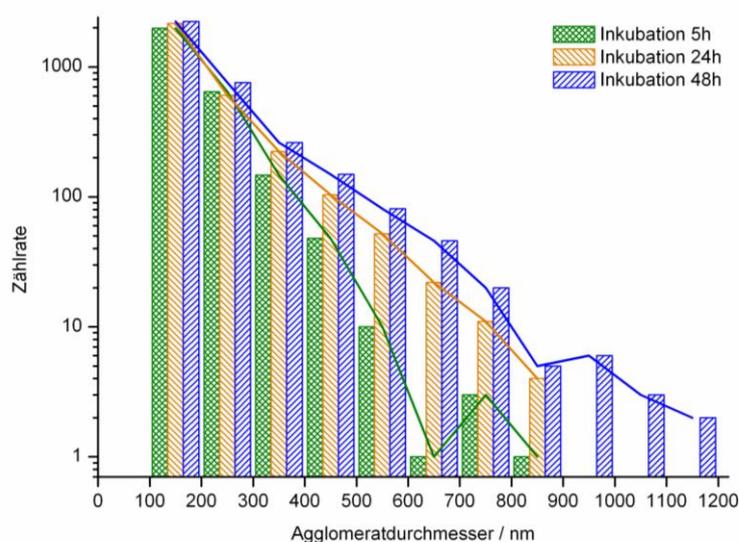


Abbildung 65: Zeitabhängige Agglomeration von 130 nm SiO₂-Partikeln in A549-Zellen. Zur Quantifizierung wurden für jeden Zeitpunkt jeweils sechs Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten mittels STED analysiert. Partikel in der Ebene 1 µm oberhalb des Deckglases wurden gezählt. Die meisten Agglomerate wurden innerhalb der Zellen gefunden. Die Auswertung basiert auf automatischer Zählung und Klassifikation der Partikel-Agglomerate. (Schübbe et al., 2010)

c) Agglomeration von Silika-Nanopartikeln in Caco-2-Zellen

Die Aufnahme und Agglomeration fluoreszenzmarkierter SiO₂-Partikel wurde auch an Caco-2-Zellen untersucht. Nach 5 h wurde im Vergleich zu A549-Zellen keine so ausgeprägte Anhaftung der Partikel an der Zelloberfläche festgestellt. Nach 48 h wurden internalisierte Partikel detektiert, die zum Teil in Form von Agglomeraten vorlagen (Abbildung 66).

Eine detaillierte Analyse der Partikellokalisierung und Partikelmigration wurde unter Verwendung von 32 und 83 nm Silika-Partikeln durchgeführt. Zur Generierung eines größeren Datenvolumens wurde eine Hochdurchsatzanalyse an fixierten Proben durchgeführt. Hierzu wurden für jeden Probenzeitpunkt (5, 24, 48 und 72 h) 2-5 konfokale Bildstapel mit jeweils 20-150 Zellen und 1000-8000 Partikel (-agglomeraten) aufgenommen und hinsichtlich des Abstandes der Partikel vom Zellkern und der Agglomeratgröße analysiert (Abbildung 67). Die Fluoreszenzintensität jedes Agglomerats wurde dabei als Maß für die Partikelhäufigkeit verwendet (Abbildung 68).

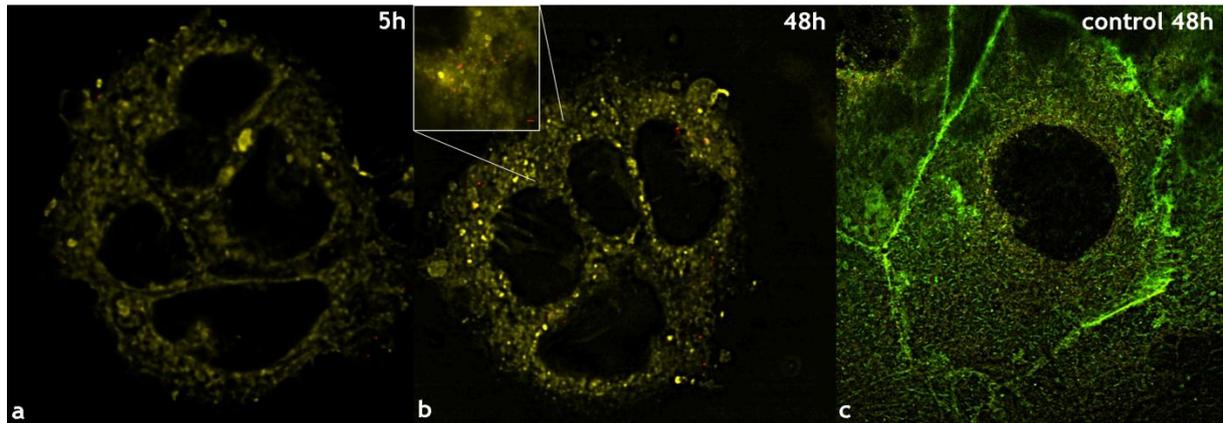


Abbildung 66: Caco-2-Zellen nach Exposition gegenüber 45 nm SiO₂-Nanopartikeln (Atto647N markiert, rot) für a) 5 h und b) 48 h, c) unbehandelte Kontrollzellen. Membranfärbung (Vybrant DiI (gelb, a,b), Aktinfilamente (Phalloidin-Alexa Fluor 488, grün, c). Das Inset in b stellt eine Ausschnittsvergrößerung dar, Maßstabsbalken 1 µm).

Nach Aufnahme in die Zellen gilt für beide Partikelgrößen hinsichtlich ihres Abstandes zum Zellkern der gleiche Trend: Beide wandern in Richtung des Zellkerns. Bereits nach 5 h liegen in Kernnähe einige Agglomerate der 32 nm Partikel vor, während zu diesem Zeitpunkt die 83 nm Partikel stärker verteilt in der Zelle vorliegen. Große Agglomerate liegen ausschließlich in der Nähe des Zellkerns vor und damit eindeutig im Zellinneren. Die meisten Partikel liegen vereinzelt und in geringem Abstand zum Zellkern vor (Abbildung 68) [55].

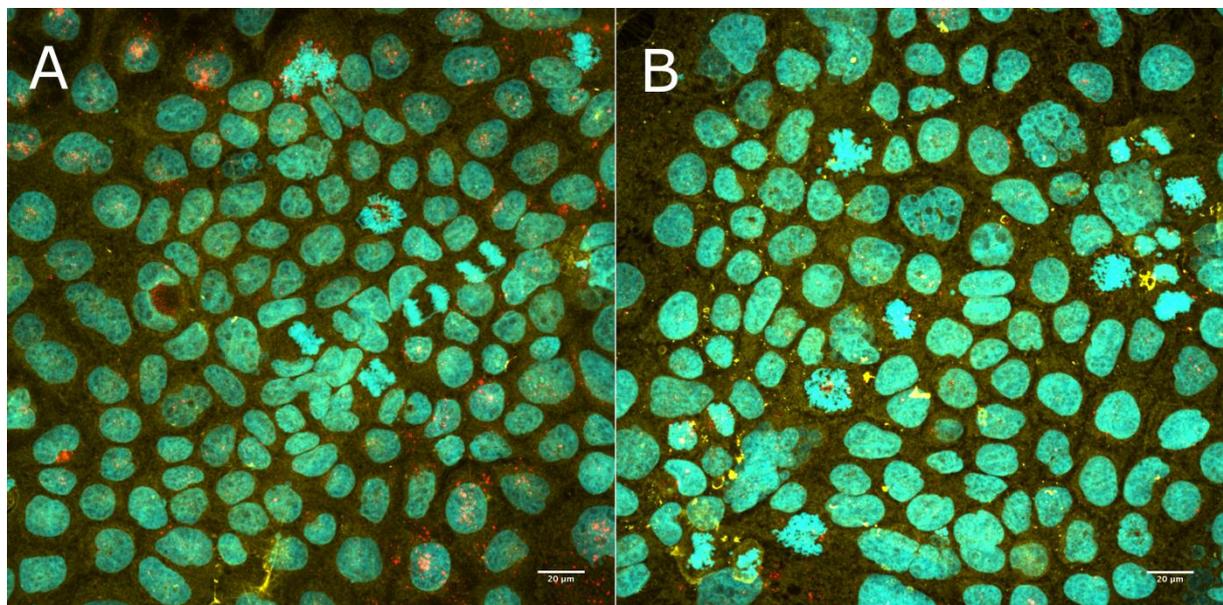


Abbildung 67: Konfokal-Abbildungen für die Hochdurchsatzanalyse: Caco-2-Zellen nach 48 h Exposition gegenüber 32 nm (A) und 83 nm (B) SiO₂-Nanopartikeln (Atto647N markiert, rot). Zellkerne (Hoechst 33342, blau), Zytoplasmamembran (SP-DiI, gelb). Für die Analyse wurde ein Leica HCX PLAN APO 40x/1.25 Ölimmersions Objektiv verwendet. Maßstabsbalken = 20 µm. (Schübbe et al., 2012)

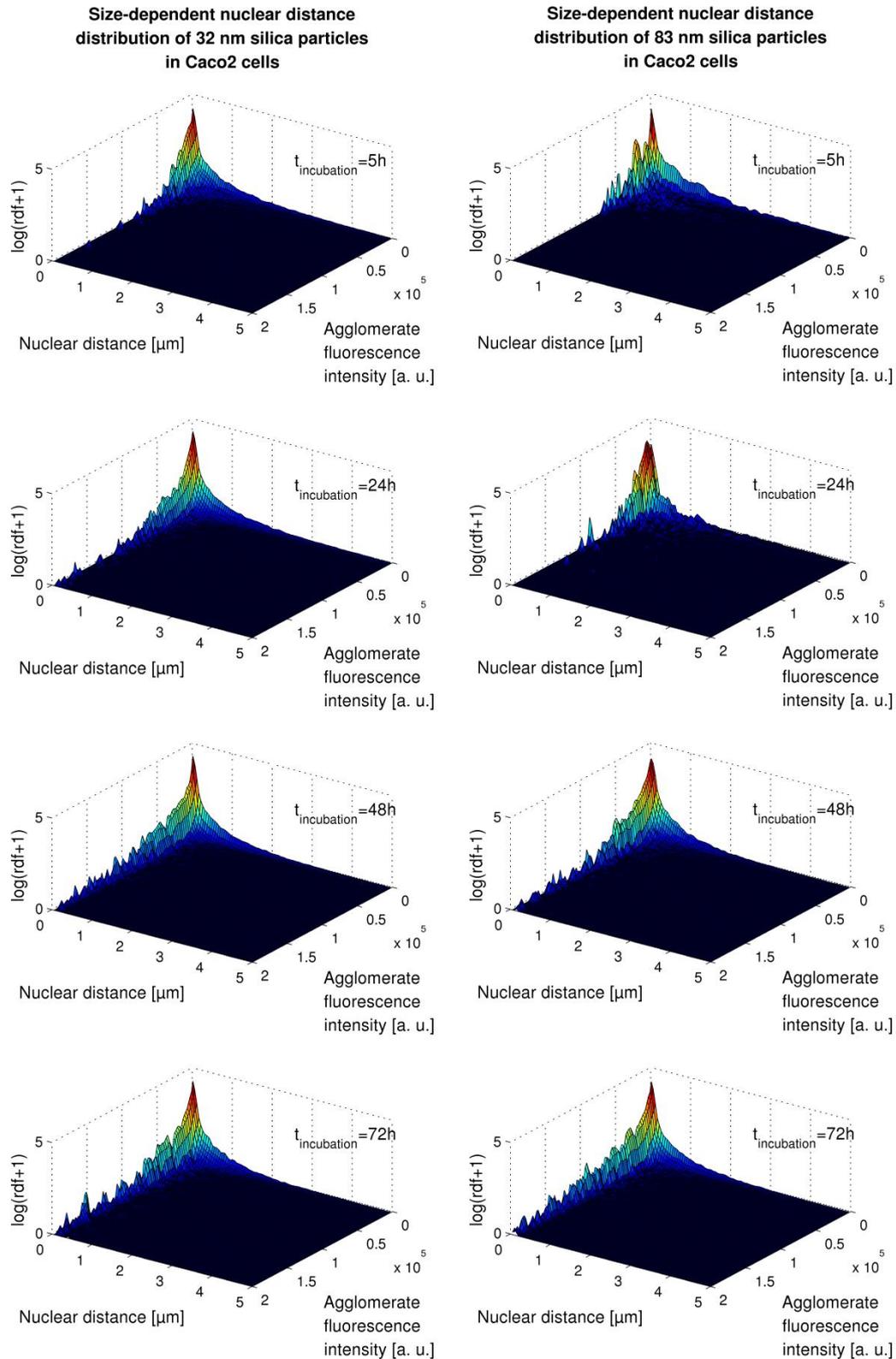


Abbildung 68: Histogramme der statistischen Partikelverteilung relativ zum Abstand vom Zellkern (nuclear distance [μm]). Die Fluoreszenzintensität (agglomerate fluorescence intensity [a.u.]) stellt ein relatives Maß für die Größe der Partikelagglomerate dar. 32 nm Partikel (links), 83 nm Partikel (rechts). Zur besseren Ansicht wurde $\log(1+\text{Partikelzahl})$ aufgetragen. Aufgrund der beugungsbegrenzten Auflösung umfasst der Abstand 0

zum Zellkern sowohl Partikel innerhalb des Zellkerns als auch Partikel, die an der Kernmembran anhaften. (Schübbe et al., 2012)

d) *Lokalisation von Silika-Nanopartikeln im Zellkern von Caco-2-Zellen*

Mittels Hochdurchsatzanalyse wurde festgestellt, dass eine große Zahl der aufgenommenen Nanopartikel in direkter Nähe zum Zellkern vorliegt. Eine Untersuchung mittels STED sollte deshalb Aufschluss darüber geben, ob die Nanopartikel in den Zellkern eindringen. Nach 24 h Exposition gegenüber 32 nm SiO₂-Partikeln wurden einzelne Partikel im Zellkern detektiert. Mit zunehmender Expositionszeit wurden auch im Zellkern Nanopartikel-Agglomerate mit einer Größe von bis zu 300 nm detektiert (Abbildung 69). Im Gegensatz dazu wurden keine 83 nm SiO₂-Partikel im Zellkern von Caco-2 Zellen detektiert (Abbildung 70).

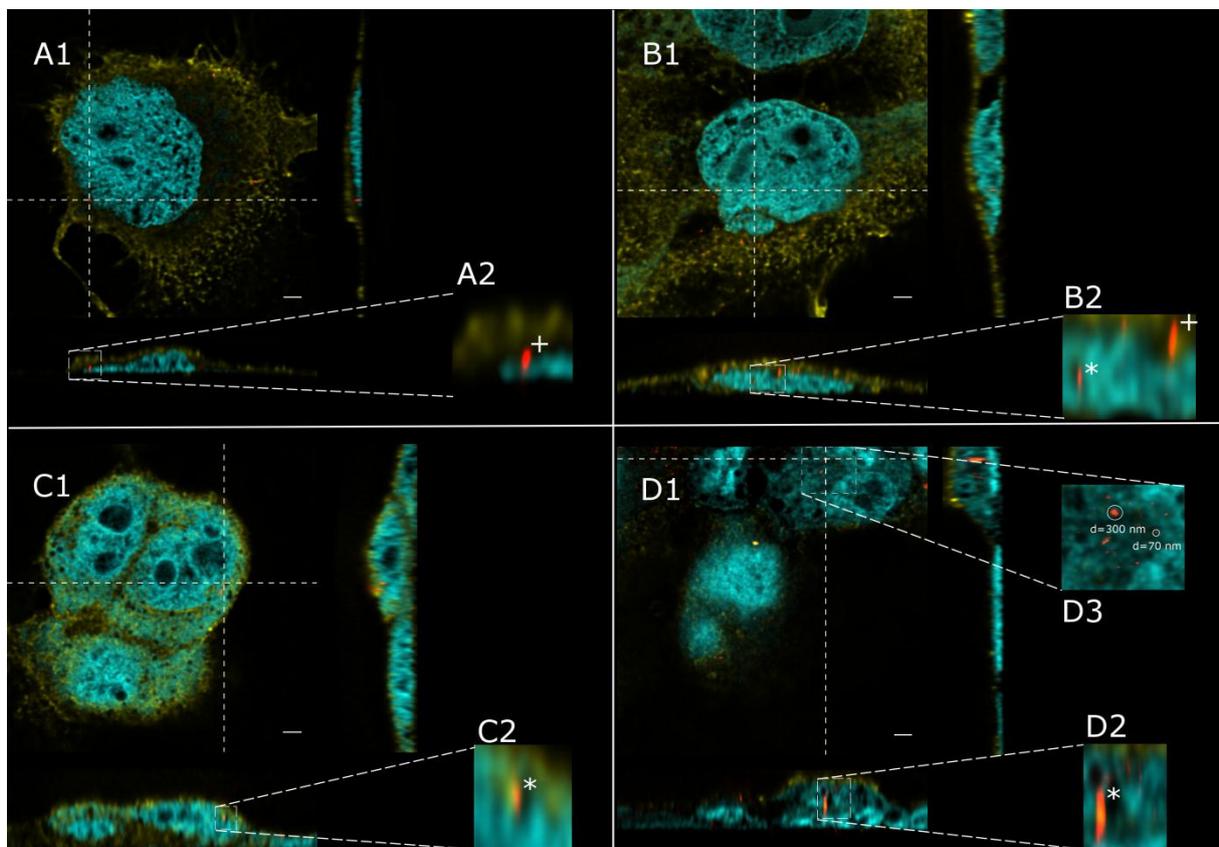


Abbildung 69: Caco-2-Zellen nach Exposition gegenüber 32 nm SiO₂-Nanopartikeln (1 µg ml⁻¹ SiO₂, markiert mit Atto647N markiert, rot) für 5 h (A), 24 h (B), 48 h (C) und 72 h (D). Für 3-dimensionale Information wurden z-Stapel aufgenommen, gezeigt wird jeweils eine xy-Ebene (A1-D1) sowie orthogonale Schnitte der yz-Ebene (rechts) und xz-Ebene (unten). A2-D2 stellen Vergrößerungen der xz-Schnitte dar. Partikel innerhalb des Zellkerns sind mit (*), außerhalb mit (+) gekennzeichnet. D3 ist eine Vergrößerung der Partikelagglomerate aus D1 (xy). Membranfärbung (SP-DiI, Invitrogen (gelb), Zellkern (Sytox blue, Invitrogen, blau). Maßstabsbalken = 2,5 µm. (Schübbe et al., 2012)

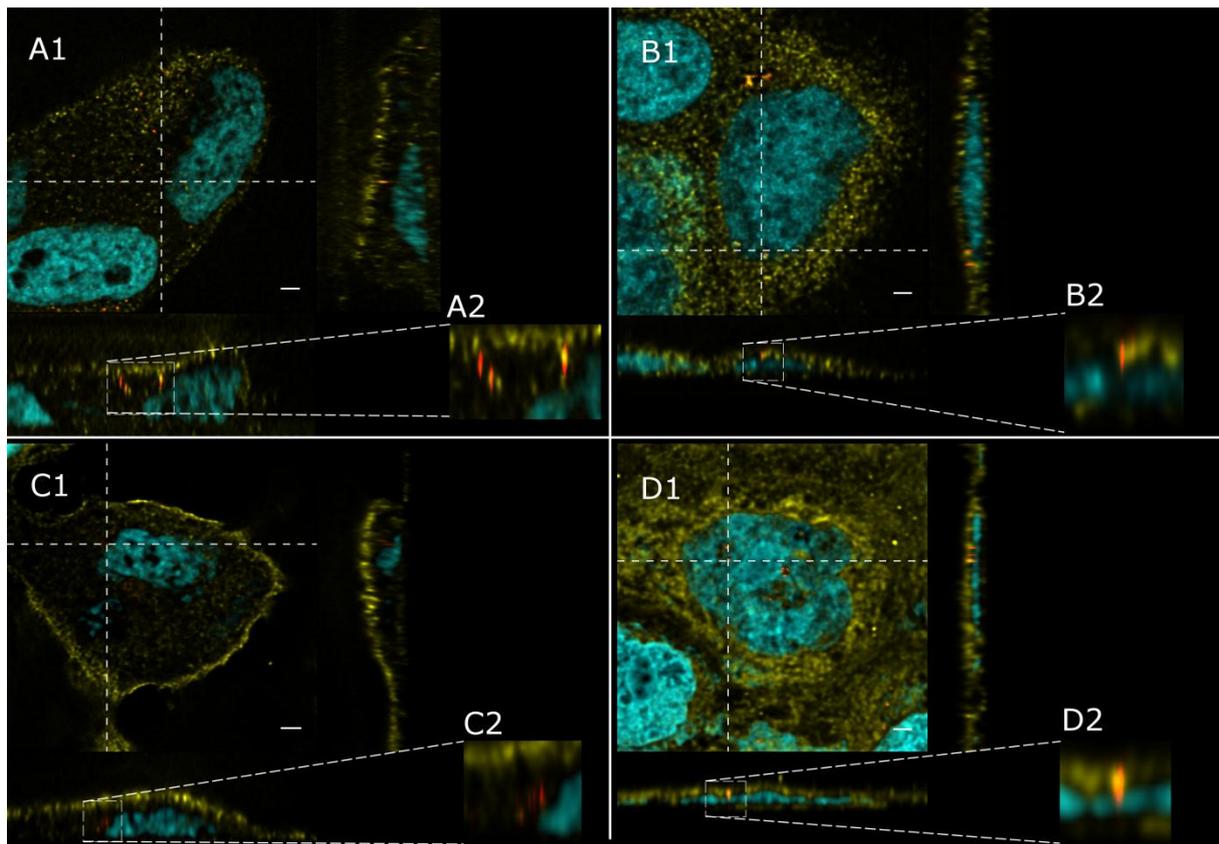


Abbildung 70: Caco-2-Zellen nach Exposition gegenüber 83 nm SiO₂-Nanopartikeln (1 µg ml⁻¹ SiO₂, markiert mit Atto647N markiert, rot) für 5 h (A), 24 h (B), 48 h (C) und 72 h (D). Für 3-dimensionale Information wurden z-Stapel aufgenommen, gezeigt wird jeweils eine xy-Ebene (A1-D1) sowie orthogonale Schnitte der yz-Ebene (rechts) und xz-Ebene (unten). A2-D2 stellen Vergrößerungen der xz-Schnitte dar. Alle Partikel liegen außerhalb des Zellkerns vor. Membranfärbung (SP-DiI, Invitrogen (gelb), Zellkern (Sytox blue, Invitrogen, blau). Maßstabsbalken = 2,5 µm. (Schübbe et al., 2012)

Die Frage, ob Nanopartikel in den Zellkern eindringen können, ist ein aktuelles Forschungsthema, das kontrovers diskutiert wird. Einerseits wird berichtet, dass Nanopartikel bis zu einer Größe von 39 nm nach künstlichem Einbringen in Zellen (über Mikroinjektion) in den Zellkern transportiert werden [77]. Andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass in Abhängigkeit von der Beladung der Oberfläche sogar noch größere Partikel (bis 90 nm) in den Zellkern permeabilisierter Zellen gelangen können [78]. Für Silika-Partikel <70 nm (mit einer Fraktion <40 nm) konnte eine Aufnahme in den Zellkern von Hep-2-Zellen gezeigt werden [79], während eine Aufnahme vergleichbarer Partikel in den Zellkern von HeLa-Zellen nicht gezeigt werden konnte [23]. Die hier durchgeführten Untersuchungen belegen, dass Partikel mit einer Größe von 32 nm in den Zellkern gelangen können und sprechen dafür, dass es sich hierbei um einen größenabhängigen Effekt handelt. Die Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass die Partikel durch die Kernporen [80] in den Zellkern transportiert werden. Vermutlich können die Partikel nur dann in den Zellkern transportiert werden, nachdem sie in das Zytosol übergetreten sind, z.B. durch Freisetzung aus den Endosomen [5]. Der Transfer könnte dann durch Assoziation mit zytosolischen Proteinen vermittelt werden, die eine Kernlokalisationssequenz tragen (Abbildung 71). Nukleäre Proteine tragen oftmals basische Aminosäuresequenzen oder weisen sogar einen isoelektrischen Punkt auf, der im basischen pH-Bereich liegt. Deshalb ist eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen diesen und negativ geladenen SiO₂-Partikeln wahrscheinlich.

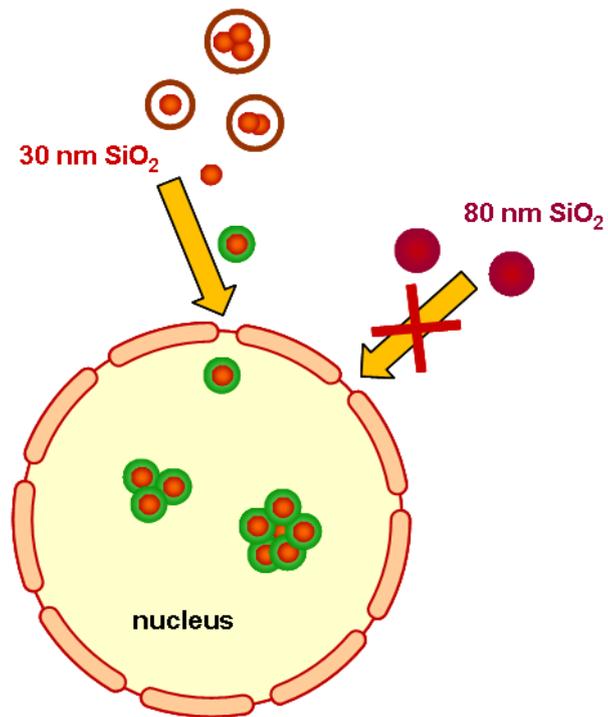


Abbildung 71: Modell des Aufnahmewegs von Silika-Nanopartikeln in den Zellkern. Nach endozytischer Aufnahme in membranumhüllte Vesikel (rote Kreise) treten die Partikel (rote Kugeln) ins Zytosol über. Nach Bindung von Proteinen mit einer Kernlokalisationssequenz (grüne Kreise) werden sie durch die Kernporen in den Zellkern transportiert. Dort bildet ein Teil der proteinumhüllten Partikel Agglomerate.

e) *Lokalisation von Silika-Nanopartikeln in Caco-2-Zellen*

Wie bereits oben dargestellt, wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass Nanopartikel über einen endozytotischen Prozess in Zellen aufgenommen werden und dadurch in membranumhüllten Vesikeln vorliegen [5, 81]. Hier wurde deshalb untersucht, ob entsprechende Silikapartikel (39 und 85 nm) nach der Internalisierung mit Markern für frühe Endosomen (EEA1) und Lysosomen (LAMP1) kolokalisieren. Dies konnte jedoch für verschiedene Zeitpunkte (5, 24, 48 und 72 h) nicht gezeigt werden (Abbildung 72 und 73). Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen an Hepatocyten überein, bei denen keine Kolokalisation von Polystyrol-Partikeln mit Lysosomen und Endosomen festgestellt wurde [82]. Im Gegensatz dazu wurde an der Zell-Linie J774.A1 (Maus, Makrophagen-ähnlich) eine Kolokalisation von Quantum Dots mit Lysosomen festgestellt [83].

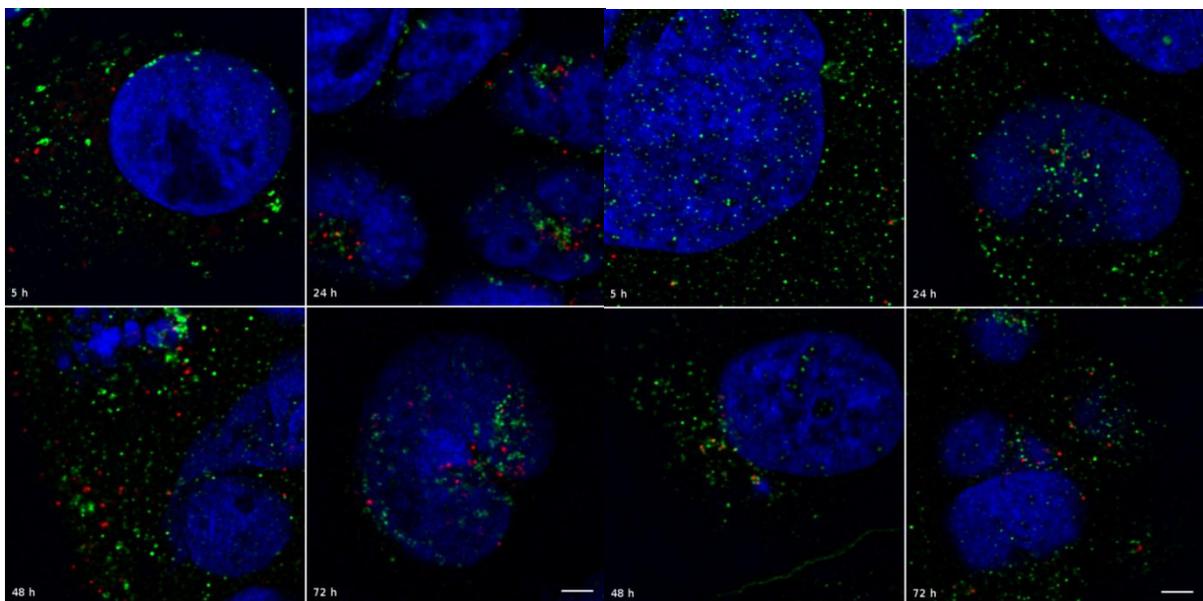


Abbildung 72: Caco2-Zellen nach 5, 24, 48 und 72 h Exposition gegenüber 39 nm SiO₂ Partikeln (rot). Links: EEA1 als Marker für frühe Endosomen grün, Rechts: LAMP1 als Marker für Lysosomen. Zellkerne: Hoechst 33342 blau. Maßstabsbalken = 3 µm (Schübbe et al., 2012)

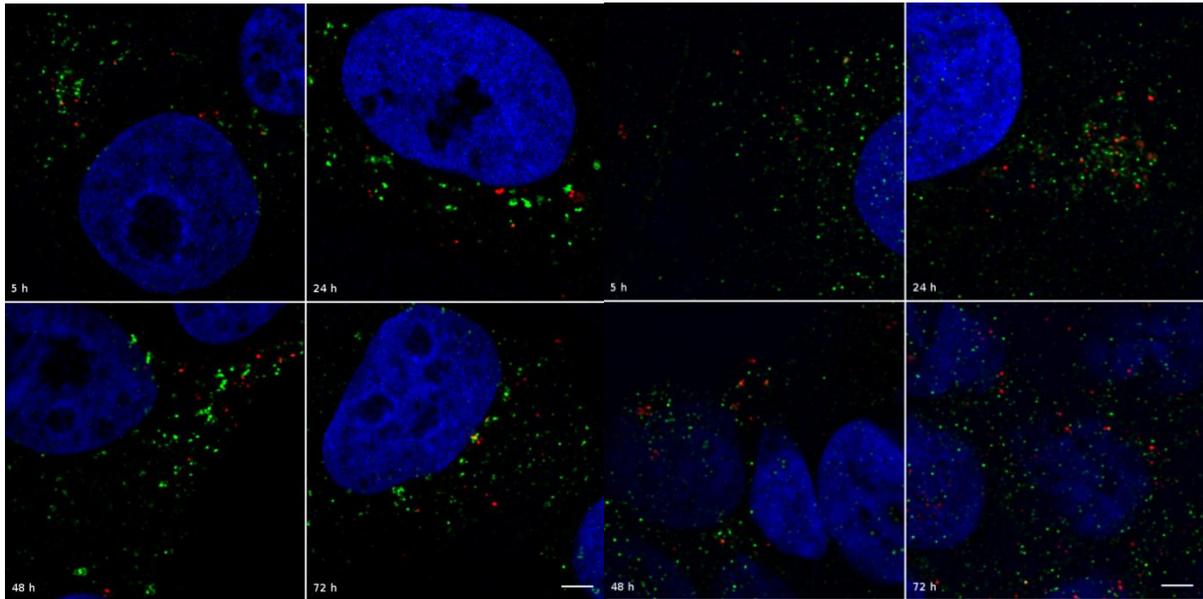


Abbildung 73: Caco2-Zellen nach 5, 24, 48 und 72 h Exposition gegenüber 85 nm SiO₂ Partikeln (rot). Links: EEA1 als Marker für frühe Endosomen grün, Rechts: LAMP1 als Marker für Lysosomen. Zellkerne: Hoechst 33342 blau. Maßstabsbalken = 3 µm. Schübbe et al., 2012)

f) *Lokalisation von Silika-Nanopartikeln in lebenden A549-Zellen*

Der Aufnahme von Nanopartikeln geht eine Bindung an die oder Wechselwirkung mit der Zelloberfläche voraus [84], deren Mechanismus bisher nicht umfassend geklärt ist. Durch dynamische Untersuchungen an lebenden Zellen (A549) konnte hier gezeigt werden, dass negativ geladene SiO₂-Partikel an der Zelloberfläche anhaften und dass sie vor der Aufnahme entlang der Zelloberfläche transportiert werden (Abbildung 74). Dies wurde bisher ausschließlich für positiv geladene Partikel beschrieben [85].

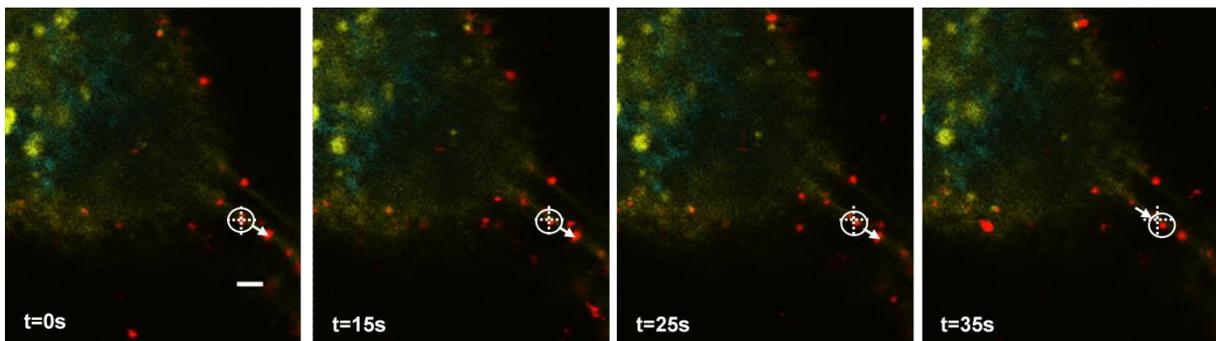


Abbildung 74: Live-Cell-Konfokalaufnahmen der Bewegung 130 nm SiO₂-Partikel (rot) entlang von Filopodien. A549-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Objektiv HCX PL APO 63.0x1.30 GLYC 37°C UV. Zytoplasmamembran (DiI), Maßstabsbalken = 2 µm, Fadenkreuze sind stationär.

Bezüglich der Partikellokalisierung nach der Partikelaufnahme liegen bisher ebenfalls keine umfassenden bzw. einheitlichen Ergebnisse vor: An A549-Zellen wurde gezeigt, dass TiO₂-Partikel in membranumgrenzten Vesikeln und in Lysosomen vorliegen [86]. Untersuchungen an anderen Zelltypen deuten darauf hin, dass die Partikel vorwiegend in membranumgrenzten Vesikeln, aber anscheinend auch in Mitochondrien transportiert werden [81-83].

Anhand von Untersuchungen an lebenden A549-Zellen wurde im Rahmen dieses Projektes die intrazelluläre Lokalisation von 32 und 88 nm Silikapartikeln dargestellt. Zur Markierung

der zellulären Kompartimente (Zytoplasmamembran und von der Membran abgeleitete endozytotische Vesikel, Endosomen/ Lamellarkörperchen) wurden GFP-Fusionsproteine verwendet. Dazu wurden die Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert, als Transfektionsreagenz wurde Attractene (Qiagen) verwendet, die Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgte in Gegenwart von 600 µg Geneticin ml⁻¹. Die Markierung von Lysosomen erfolgte mittels LysoTracker Yellow (Invitrogen, 100 nM, Zugabe 30 min vor der Analyse). Für die Mikroskopie wurden die Zellen auf CELLview Glasboden-Schalen (Greiner BioOne) ausgesät und in Medium ohne Phenolrot inkubiert. 3-8 h nach Partikelzugabe wurden die Zellen mikroskopiert. Es wurden konfokale Zeitserien über Zeiträume von 10-15 min (5122 Pixel, 0,5-10 s Verzögerungszeit) aufgenommen. Die Mikroskopiedaten wurden anhand bildbasierter Fluoreszenz-Korrelationsmethoden ausgewertet und quantifiziert [58, 87, 88].

Die Kolokalisation der Partikel mit endozytotischen Vesikeln (AcGFP1-Mem, Abbildung 75) wurde zunächst durch Bestimmung des Manders Kolokalisations-Koeffizienten M2 quantifiziert (Tabelle 8). In beiden Fällen deutet das hohe Ausmaß der Kolokalisation an, dass die Partikel innerhalb Membran-umgrenzter Vesikel vorliegen. Die Partikel werden demnach aktiv durch einen endozytotischen Prozess aufgenommen.

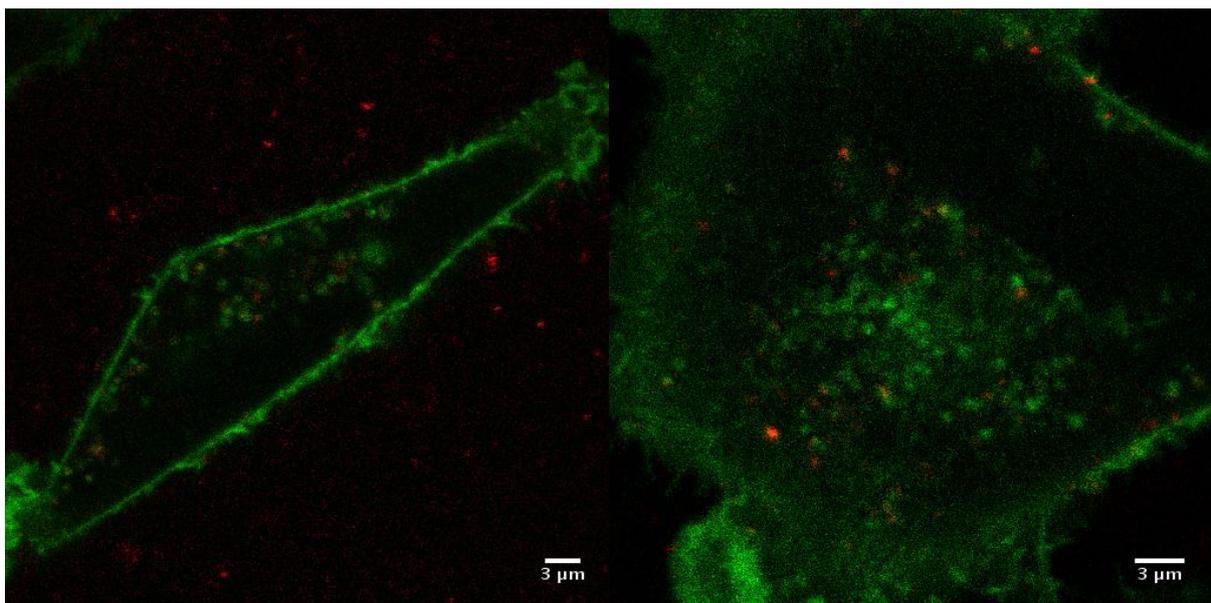


Abbildung 75: Konfokalaufnahmen von A549-Zellen nach Exposition gegenüber SiO₂-Nanopartikeln (rot). Links: 4,5 h Inkubation mit 32 nm Partikeln, rechts: 4 h Inkubation mit 88 nm Partikeln. Die Zytoplasmamembran und von der Membran abstammende Vesikel wurden mit AcGFP1-Mem (grün) markiert. A549 Zellen wurden stabil mit dem Plasmid pAcGFP-Mem (N-terminales Membran-Zielsteuerungssignal, Neuromodulin, Clontech) transfiziert. Die Abbildungen stellen Einzelaufnahmen aus Zeitserien dar. (Schumann et al., 2012)

Partikeltyp	Anzahl analysierter Zellen	Kolokalisationskoeffizient M2
32 nm SiO ₂	6	0,7 ± 0,3
88 nm SiO ₂	10	1,0 ± 0,3

Tabelle 8: Kolokalisation der Nanopartikel mit intrazellulären Membranen (M2).

Anhand zeitaufgelöster Autokorrelations- und Kreuzkorrelations-Analysen wurde festgestellt, dass sich Nanopartikel und markierte Vesikel zusammen bewegen, was für einen Transport der Partikel innerhalb der Vesikel spricht, bzw. den Einschluss der Partikel in den Vesikeln andeutet. Die weitere Analyse der Daten deutet darauf hin, dass ein rein diffusiver Transport der Partikel innerhalb der Zellen ausgeschlossen werden kann. Stattdessen wird von einem aktiven Transport der Partikel ausgegangen. Dabei weisen beide Partikeltypen unabhängig von ihrer Größe vergleichbare Diffusionskoeffizienten und Transportgeschwindigkeiten auf (Tabelle 9).

Partikeltyp	Anzahl analysierter Zellen	Diffusionskoeffizient D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	Transportgeschwindigkeit v [$\mu\text{m}/\text{s}$]
32 nm SiO_2	6	$0,16 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,08$
88 nm SiO_2	9	$0,15 \pm 0,09$	$0,12 \pm 0,04$

Tabelle 9: Diffusionskoeffizienten und Transportgeschwindigkeit von SiO_2 -Partikeln innerhalb von A549-Zellen.

Die aufgenommenen Transportgeschwindigkeiten stellen Mittelwerte der Geschwindigkeit aller Partikel dar, die während der Analyse erfasst wurden, unabhängig von der Richtung des Transportes. Durch Bestimmung der Richtung des Autokorrelationssignals wurde festgestellt, dass der Nettotransport in Richtung des Zellkerns erfolgt (Abbildung 76). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Partikel sich mit der Zeit im perinukleären Bereich der Zellen anhäufen. Dem Transport der Partikel in entgegengesetzte Richtung, also in Richtung der Zytoplasmamembran kann demnach eine vergleichbar geringere Rolle zugeordnet werden.

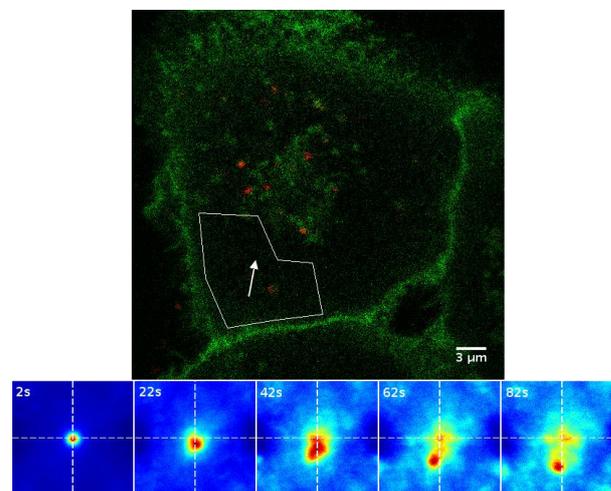


Abbildung 76: Bestimmung der Transportrichtung internalisierter 88 nm SiO_2 -Nanopartikel. Der Pfeil gibt die Richtung des Partikeltransportes innerhalb der angezeigten Region (weiße Linie) an. Die Bildreihe unten stellt einen Konturplot der zeit- und orts aufgelösten Autokorrelationsfunktion (AKF, Nanopartikel) zu den angegebenen Zeitpunkten dar. Die Transportrichtung ist der Richtung der AKF entgegengesetzt. (Schumann et al., 2012)

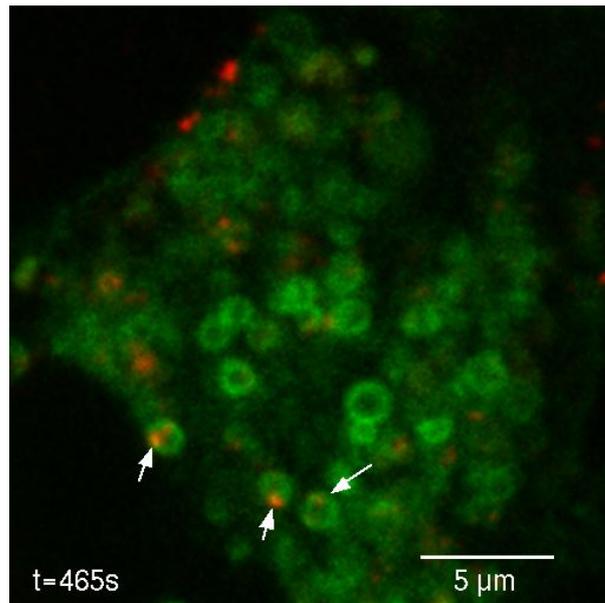


Abbildung 77: 88 nm SiO₂-Nanopartikel in Lamellarkörperchen lebender A549-Zellen (Pfeile). Lamellarkörperchen (grün) wurden mittels transients Transfektion (pAcGFP1-Endo, RhoB GTPase, Clontech) markiert. Die Abbildung stellt eine Einzelaufnahme aus einer Zeitserie dar. (Schumann et al., 2012)

Die Lokalisation der Partikel wurde durch Anfärbung von Vesikeln mittels pAcGFP1-Endo weitergehend analysiert. Die Zielsteuerungssequenz bewirkt eine Markierung früher endosomaler und prä-lysosomaler Kompartimente. Darüber hinaus werden in A549-Zellen enthaltene Lamellarkörperchen ebenfalls markiert. Beide Kompartimente stehen über Multivesikular-Körperchen miteinander in Verbindung, so dass ein Transfer von Partikeln durch Vesikeltransfer möglich zu sein scheint. Die mikroskopische Analyse zeigt, dass die Partikel innerhalb von Endosomen aber auch innerhalb der größeren Lamellarkörperchen lokalisiert sind (Abbildung 77). Diese Daten deuten darauf hin, dass es in A549-Zellen zu einem Export der Partikel kommen kann, die in Lamellarkörperchen vorliegen.

Abschließend wurde die Lokalisation von 88 nm großen SiO₂-Partikeln innerhalb des lysosomalen Kompartimentes untersucht [58]. Der Manders Kollokalisations-Koeffizienten M2 ($0,7 \pm 0,2$, bestimmt an 9 Zellen) bestätigt, dass die Partikel auch innerhalb dieses Kompartimentes vorliegen.

Insgesamt ergibt sich aus den vorliegenden Daten folgendes Modell für die intrazelluläre Lokalisation von SiO₂-Partikeln innerhalb membranumgrenzter Organellen von A549-Zellen:

- 1) Aufnahme über einen endozytotischen Prozess in membranumgrenzte Vesikel
- 2) Transport in Richtung der perinukleären Region
- 3) Transfer in das endosomale Kompartiment
- 4) Transfer in Lamellarkörperchen und darüber möglicherweise Exozytose
- 5) mit der Zeit: Agglomeration innerhalb von membranumgrenzten Vesikeln in der perinukleären Region

g) *Aufnahme von Silber-Nanopartikeln und Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett*

- Aufnahme von Silber-Nanopartikeln in Caco-2-Zellen

Neben den SiO₂-Nanopartikeln wurden auch fluoreszenzmarkierte Silber-Nanopartikel hergestellt und für mikroskopische Untersuchungen eingesetzt, zunächst für Aufnahmeexperimente an Caco-2 Zellen. Die Partikel wurden unter Einsatz der STED-Technik detektiert. Obwohl das Aktinzytoskelett nicht eindeutig die äußeren Zellgrenzen definiert, deuten sowohl das Verteilungsmuster der Partikel sowie axiale Schnitte durch Bildstapel darauf hin, dass zumindest ein Teil der Partikel intrazellulär vorliegt (Abbildung 78). Bereits nach 24 Stunden befanden sich ein großer Teil der Partikel und vor allem die Agglomerate in der Nähe der Zellmitte, bzw. des Zellkernbereichs. Mithilfe der STED-Technik ist es zwar nicht möglich, einzeln vorliegende Silber-Nanopartikel ($d < 10$ nm) orts aufgelöst abzubilden, trotzdem ist ersichtlich, dass ein Teil der Partikel in Form unterschiedlich großer Agglomerate vorliegt. Die größten Agglomerate (1-4,5 μ m) wurden bei der höchsten eingesetzten Silbernanopartikel-Konzentration detektiert. Außerdem schienen die Zellen bei erhöhter Partikelkonzentration auch mehr Partikel, bzw. Agglomerate aufgenommen zu haben.

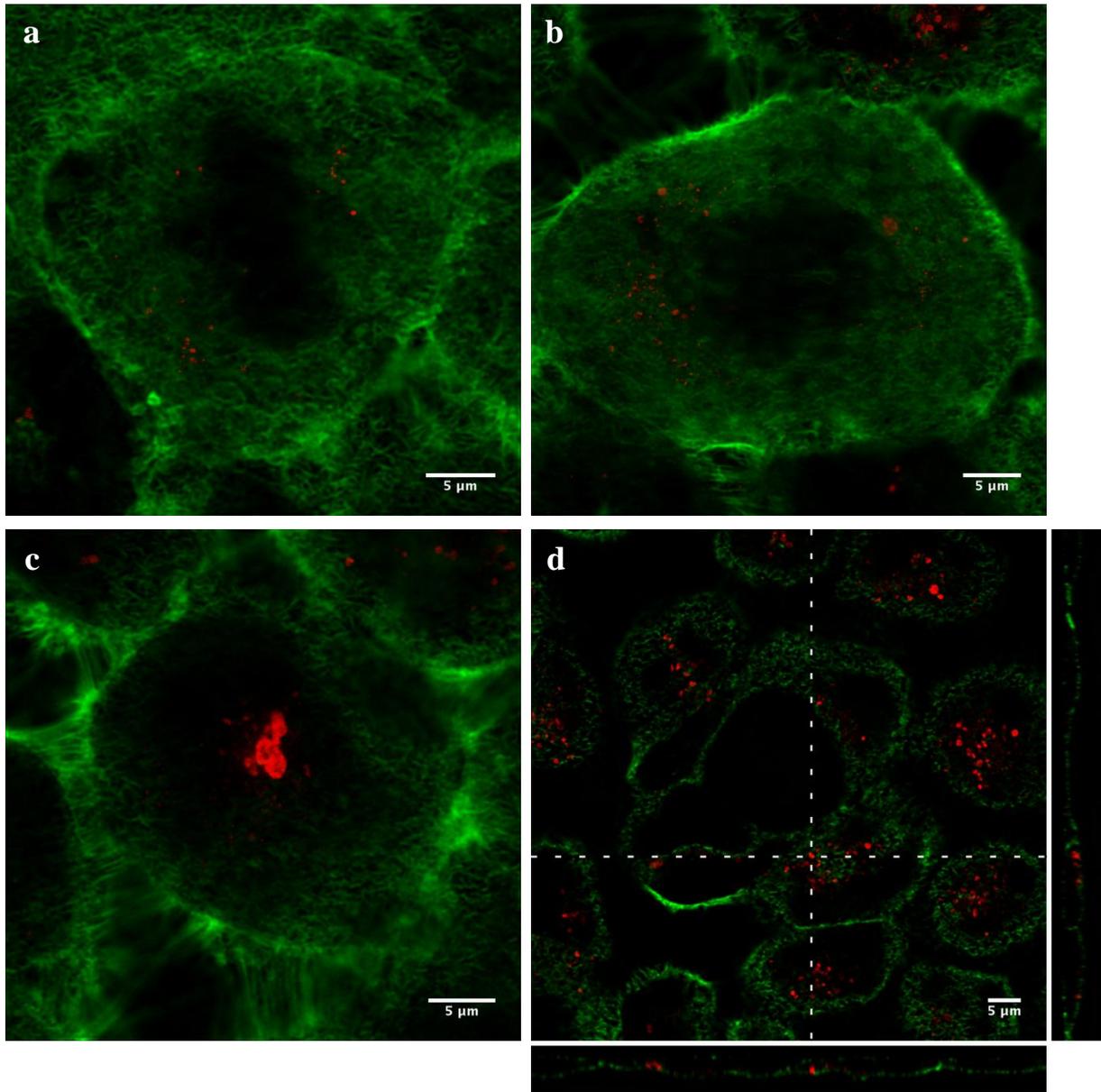


Abbildung 78: Caco-2 Zellen (Aktinzytoskelett grün, Phalloidin-Alexafluor 488) nach 24 h Inkubation mit Silber-Nanopartikeln (rot, Atto647N), a) 0,03 μM , b) 0,3 μM , c) 3 μM Ag, d) xy-Übersicht mehrerer Zellen mit xz- und yz-Schnittebenen. In a)-c) sind die Nanopartikel in STED-Auflösung abgebildet.

- Aufnahme von Silber Nanopartikeln in A549-Zellen

Die Aufnahme von Silber-Nanopartikeln wurde auch an A549-Zellen untersucht. Hierzu wurden Partikel ($d = 9 \text{ nm}$, 20 μM und 200 μM Ag^0) verwendet, die mit dem Farbstoff Atto488 markiert waren. Die Zellen wurden für 1 h, 24 h und 48 h mit den Partikeln inkubiert und dann mikroskopisch analysiert. Die Aufnahme der Nanopartikel scheint generell sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig zu erfolgen (Abbildung 79). Die Betrachtung einzelner Zellen zeigt aber, dass die Silbernanopartikel nicht von allen Zellen im gleichen Maß aufgenommen wurden (Abbildung 79). Bei der höheren Partikelkonzentration traten Zellen mit besonders starker Aufnahme zwar häufiger auf, aber auch bei einer Konzentration von 20 μM wiesen nach 24 h und 48 h vereinzelte Zellen eine erhebliche Zahl von Partikeln auf, die weit über dem Durchschnitt der anderen Zellen lag (Abbildung 79). Die Anzahl der Zellen

mit überdurchschnittlich hoher Partikelaufnahme nahm mit der Zeit nicht zu. Diese Zellen fielen häufig durch ihre Großflächigkeit und meist durch das Vorkommen zweier Kerne auf, was auf eine unvollständige Teilung hindeuten könnte (Abb. B c). Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob eine starke Aufnahme von Silbernanopartikeln, bzw. daraus freigesetzten Silberionen [38] zu strukturellen Defekten oder Störungen in der Zellteilung führt, oder ob umgekehrt diese eine verstärkte Aufnahme von Partikeln begünstigen.

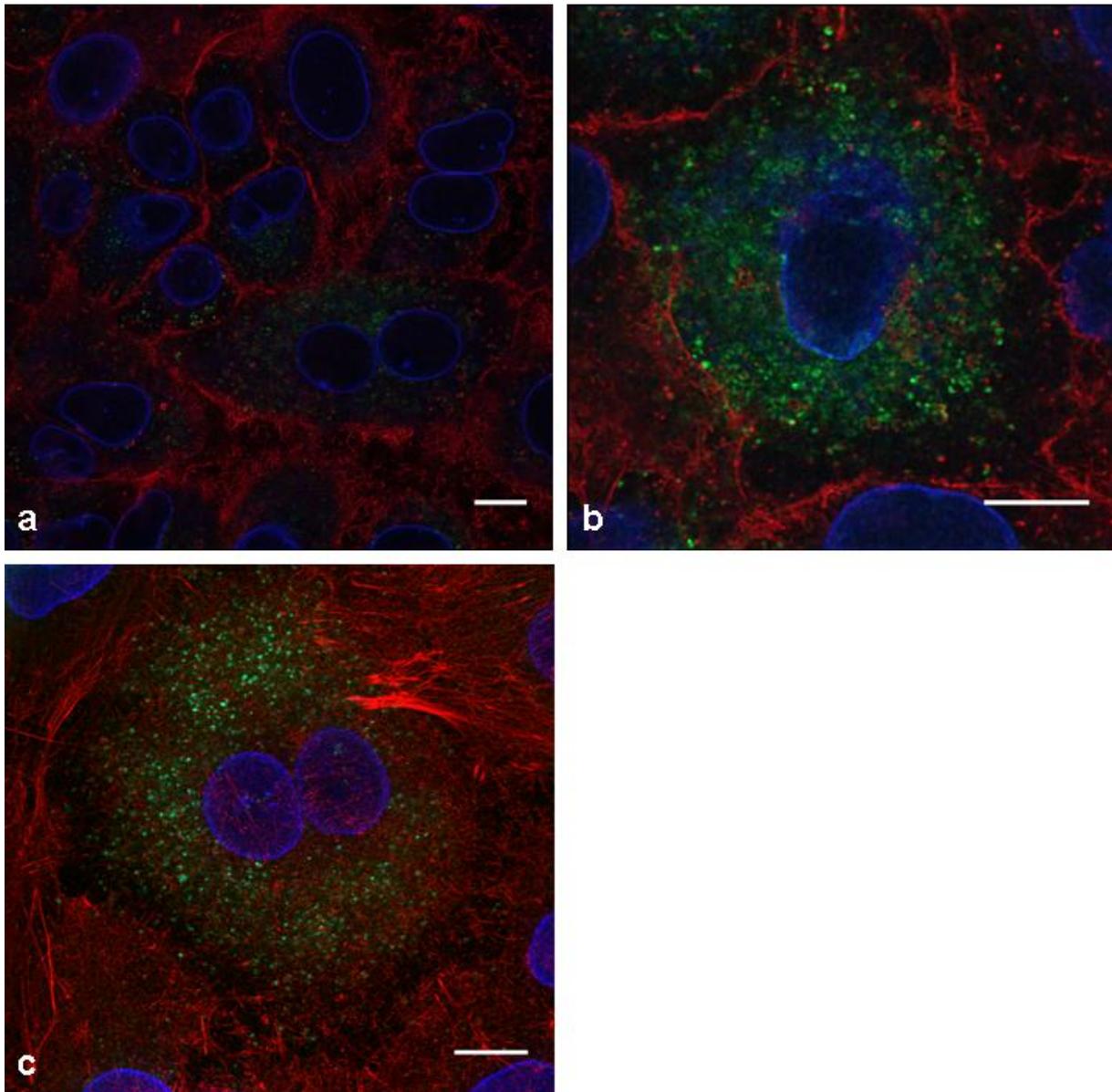


Abbildung 79: A549-Zellen (Aktinzytoskelett rot, Phalloidin Atto647N, Zellkern Lamin B Alexa 546, blau) nach 48 h Inkubation mit Silber-Nanopartikeln (grün), a,b) 20 μM , c) 200 μM Ag. Einbettmedium Mowiol. Die Aufnahme erfolgt von Zelle zu Zelle sehr unterschiedlich (a), vereinzelt extrem stark (b, c) mit dominant perinukleärer Lokalisation (b), besonders häufig bei großflächigen Zellen mit multiplen Kernen (c). Maßstabsbalken = 10 μm .

- Auswirkungen der Silber-Nanopartikel auf das Aktin-Zytoskelett von A549-Zellen

Nach Exposition von A549-Zellen gegenüber Silber-Nanopartikeln (1-48 h) wurden keine Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts nachgewiesen. An Kontrollen, bei denen die Zellen 20 μM AgNO_3 ausgesetzt wurden, zeigten sich ebenfalls keine erkennbaren Veränderungen der Morphologie oder Verteilung der Aktinfilamente (Abbildung 80, siehe Abschnitt 2.3). Ein Grund dafür könnte sein, dass in diesem Fall das Experiment mit einer höheren Zellzahl gestartet wurde.

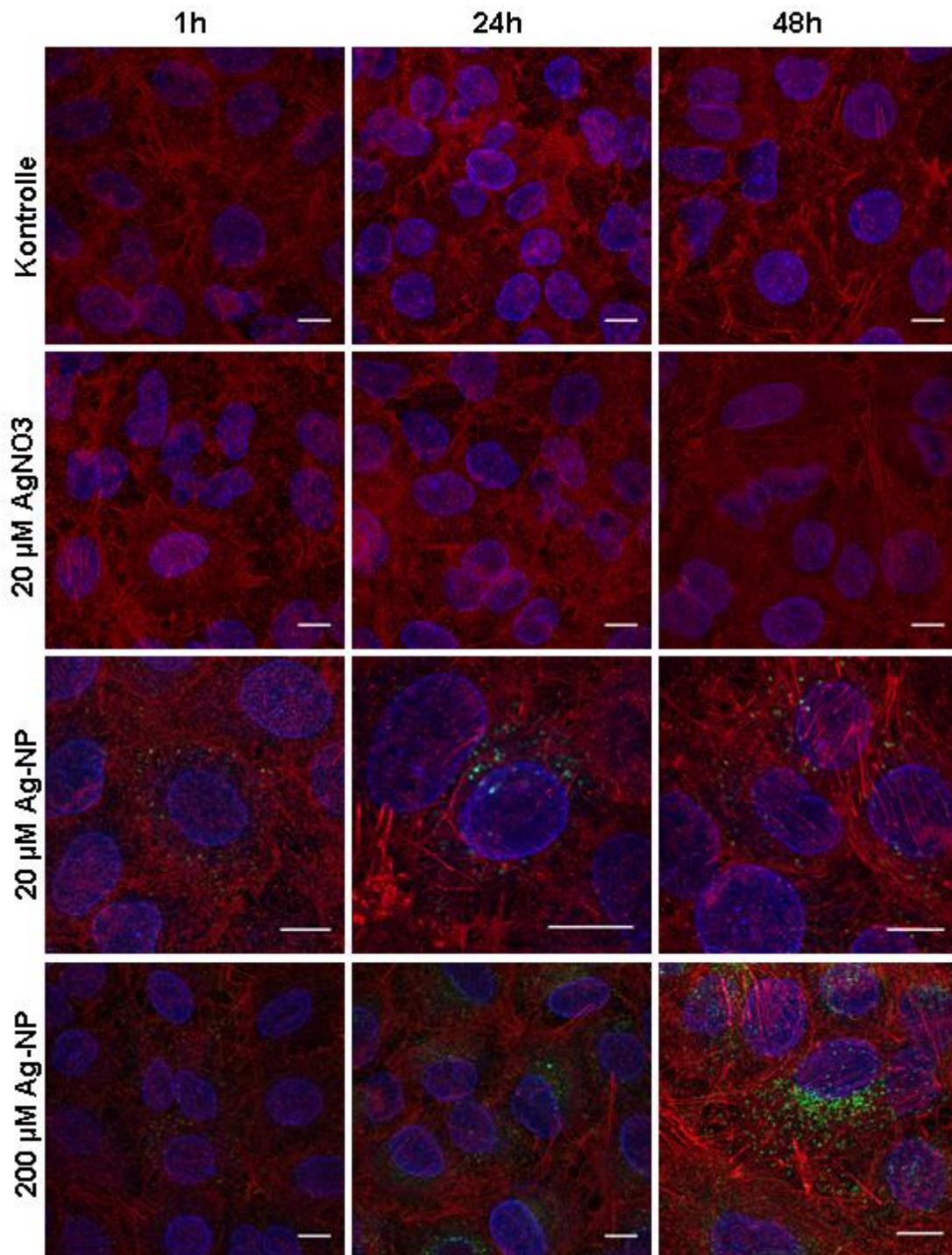


Abbildung 80: A549-Zellen nach Inkubation in Gegenwart von Silber-Nanopartikeln (grün, 20 μM , Reihe 3 und 200 μM Ag^0 , Reihe 4) und 20 μM AgNO_3 (Reihe 2) für 1 h, 24 h und 48 h; Kontrolle (Reihe 1). (Aktinzytoskelett, Phalloidin Atto647N, rot; Zellkern Lamin B Alexa 546, blau). Maßstabsbalken = 10 μm .

h) *Lokalisation von Silber-Nanopartikeln in A549-Zellen*

- *Assoziation von Silber-Nanopartikeln mit Aktin-Spots*

Das in den hier beschriebenen Experimenten verwendete Phalloidin bindet spezifisch f-Aktin, also Aktin, das in Form von Filamenten organisiert ist, im Gegensatz zum globulären g-Aktin-Pool. In A549-Zellen wurden daneben auch punktförmige „f-Aktin-Spots“ detektiert, unabhängig von der Zugabe von Silber-Nanopartikeln oder AgNO₃. Nach Exposition gegenüber Silber-Nanopartikeln wurde häufig eine Assoziation der Partikel mit Aktin-Spots beobachtet (Abbildung 81). Mit dem Begriff Assoziation ist hier zwar eine räumliche Beziehung zwischen beiden Signalen gemeint, eine Kolo-kalisation im Sinne einer Überlagerung beider Fluoreszenzsignale innerhalb eines Pixels wurde jedoch nicht beobachtet.

Aktin-Spots sind aus Fibroblasten bekannt [89, 90], treten aber auch in Epithelien wie den hoch spezialisierten Podocyten in der Niere auf [91]. Sie werden als hochgradig dynamische Zentren der Aktin-Polymerisierung gedeutet, die unter anderem bei raschen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts eine Rolle spielen, etwa bei endo- oder exozytotischen Prozessen. So konnte eine asymmetrische Assoziation von Endosomen mit beweglichen Aktin-Spots gezeigt werden [90] und in verschiedenen Modellsystemen konnte die zentrale Rolle sogenannter Aktin-„Kometenschweife“ (actin comet tails) bei der Bewegung endosomaler Vesikel nachgewiesen werden [92, 93]. Die hier gezeigten statischen Aufnahmen legen eine ähnliche Assoziation der Aktin-Spots auch mit Nanopartikeln nahe, aber erst weitere, dynamische Experimente können Aufschluss bringen, ob diese Assoziation auch für den Transport der Partikel eine Rolle spielt.

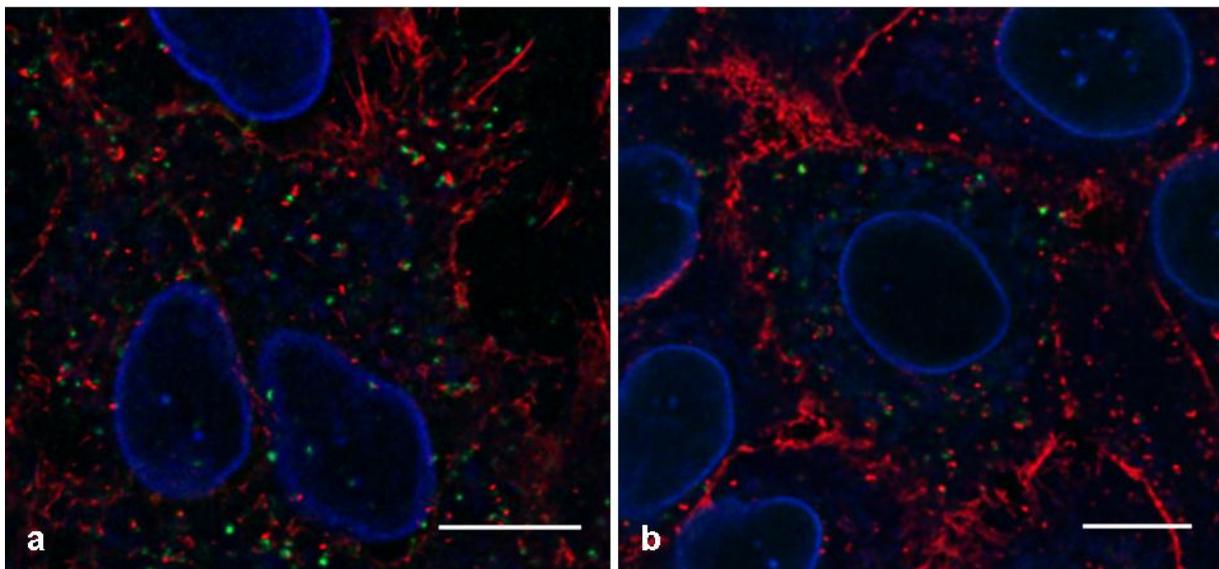


Abbildung 81: A549-Zellen nach Inkubation mit Silber-Nanopartikeln (grün). a) 20 μM , 24 h, b) 200 μM , 48 h. Aktinzytoskelett, Phalloidin Atto647N (rot), Zellkernlamina, Lamin-B (blau). Maßstabsbalken = 10 μm .

- Silber-Nanopartikel in Kanälen der Zellkernlamina

Zur Bestimmung der Lokalisation der Silber-Nanopartikel relativ zum Zellkern wurde eine Markierung der Kernlamina (Lamin B) durchgeführt. Die Kernlamina liegt unterhalb der inneren Zellkernmembran, sie übt unter anderem eine Stützfunktion aus. Der Vorteil dieser Markierung im Vergleich zur Markierung der Kernmatrix, wie sie beispielsweise bei einer Anfärbung der DNA erfolgt, ist, dass dadurch die äußere Begrenzung der Zellkerne sichtbar gemacht wird. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Kernmembran von A549-Zellen nicht glatt ist, sondern Einfaltungen, Taschen und durchgängige Kanäle aufweist. Dies spielt eine wesentliche Rolle bei Betrachtungen zur Aufnahme von Nanopartikeln in den Zellkern, denn bei einer Anfärbung der Kernmatrix sind Kanäle oder Einfaltungen der Kernmembran nicht sichtbar.

In Einzelfällen konnten Silber-Nanopartikel innerhalb solcher Taschen und Kanäle nachgewiesen werden (Abbildung 82). Es ist bekannt, dass Elemente des Zytoskeletts, insbesondere Aktin-Filamente, in das Lumen dieser Einfaltungen hineinragen können [94]. Dies lässt einen gerichteten Transport von Partikeln in diese Einfaltungen möglich erscheinen, insbesondere bei einer Anreicherung von Nanopartikeln in der Umgebung des Zellkerns.

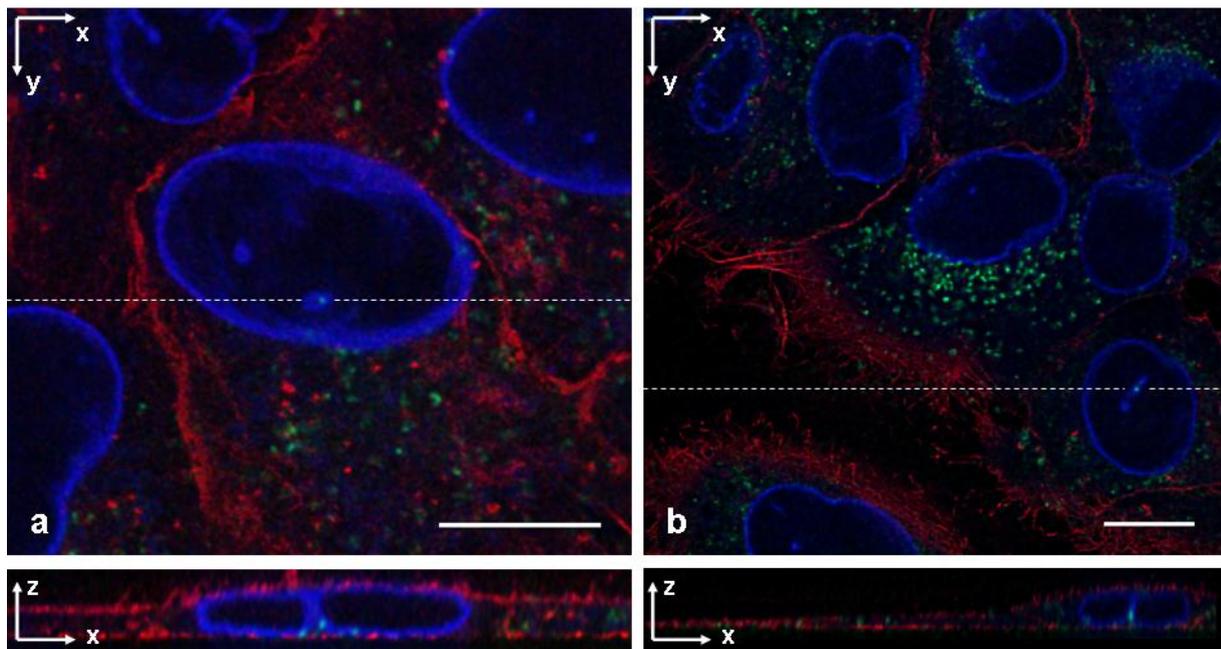


Abbildung 82: A549-Zellen (Aktinzytoskelett rot, Lamin-B Zellkernmembran blau) nach Inkubation mit Silber-Nanopartikeln (grün) von 9 nm Durchmesser, a) 20 μM für 24 h, b) 200 μM für 48 h. Untere Bildreihe: xz-Schnittebenen, entlang der gestrichelten Linien in den oberen Bildern. Vereinzelt können Nanopartikel im Lumen von Kanälen der Zellkernmembran nachgewiesen werden. Maßstabsbalken = 10 μm .

3 Zusammenfassung

Im Rahmen des Vorhabens wurden drei verschiedene Themenschwerpunkte bearbeitet:

- Herstellung und Charakterisierung fluoreszenzmarkierter und für STED geeigneter Nanopartikel als Modell technisch relevanter Partikeltypen
- Kultivierung relevanter Zelltypen, Exposition gegenüber Nanopartikeln, Erfassung der biochemischen Zellantwort und Präparation für die Mikroskopie
- Etablierung und Anwendung der STED-Mikroskopie und Einsatz konfokaler Mikroskopietechniken (Multiphotonenmikroskopie, Live-Cell-Imaging) zur Darstellung zell-assoziiierter Nanopartikel und Analyse ihrer Lokalisation, Bildbearbeitung (Entrauschen, Entfaltung) und Bildauswertung (Kokolisationsanalyse, Segmentierung, Quantifizierung der Bilddaten).

Als Modellpartikel wurden Silika- und Silbernanopartikel ausgewählt und in fluoreszenzmarkierter und unmarkierter Form hergestellt. Zur Herstellung der Silikapartikel wurde eine Syntheseroute etabliert und hinsichtlich verschiedener Parameter optimiert, die zu Partikeln mit geringer Dispersität im Größenbereich 15->100 nm führt. Die Fluorophore können darin wahlweise in die Partikelmatrix oder eine innere Hülle eingebunden werden. Relevante Eigenschaften der Partikel wurden bestimmt, darunter die Größe, der hydrodynamische Durchmesser, die Oberfläche und Partikelzahl, das Zetapotenzial und das Agglomerationsverhalten unter physiologisch relevanten Bedingungen.

Verschiedene Größen unmarkierter und markierter Partikel wurden in biologische Experimente an A549-Zellen (Modell für epitheliale Typ II-Pneumozyten) und Caco-2 (Modell intestinaler Epithelzellen) eingesetzt. Durch verschiedene Endpunkte wurde die Antwort der Zellen auf die Partikelanwesenheit bestimmt. In Anwesenheit von Serum wurde kein signifikanter Effekt der Silikapartikel auf die Stoffwechselaktivität, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die Membranintegrität, DNA-Integrität oder die Aktivierung von Apoptose festgestellt. Ein Teil der Untersuchungen wurde auch an kommerziellen Referenzpartikeln durchgeführt, gegenüber diesen wurde eine stärkere Zellantwort festgestellt. Die Zellantwort wird insgesamt wesentlich durch die Anwesenheit von Serum bestimmt. Im Vergleich zu Silbernitrat, das bei geringen Konzentrationen zytotoxisch wirkt, bewirkten die Silbernanopartikel keinen signifikanten Effekt. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Anwendung biochemischer Testsysteme und der Durchführung aussagekräftiger Experimente gewidmet, vor allem hinsichtlich möglicher Interferenzen der eingesetzten Materialien. Die entsprechenden Protokolle wurden optimiert.

Anhand der STED-Mikroskopie konnten die hergestellten Partikel abgebildet werden. Nach Exposition der Zellen wurde festgestellt, dass Partikel im Größenbereich 32-130 nm internalisiert werden. Im Zellinneren agglomerieren die Partikel, unter anderem aufgrund der Prozessierung intrazellulärer Vesikel. Mit der Zeit wandern die Partikel in Richtung Zellkern und reichern sich dort an. 32 nm Partikel wurden im Zellkern von Caco-2-Zellen detektiert, größere Partikel blieben aus diesem Kompartiment ausgeschlossen. Die Anwesenheit der

Partikel im Zellkern hatte keine Auswirkungen auf die angewendeten Endpunkte. In A549-Zellen wurden 30-80 nm große Partikel in membranumhüllten Vesikeln detektiert, nämlich in endozytotischen Vesikeln, Endosomen, Lysosomen und Lamellarkörperchen. Die Art des Aufnahmemechanismus konnte nicht abschließend geklärt werden, obwohl Kollokalisations- und Hemmstoffanalysen durchgeführt wurden.

Silber Nanopartikel wurden ebenfalls von den Zellen internalisiert, bewirkten aber dennoch keine signifikante Zytotoxizität. Die Partikel werden in der Zelle ebenfalls in Richtung Zellkern transportiert und wurden vereinzelt in Einfaltungen der Zellkernlamina detektiert.

4 Literatur

1. Oberdörster, G., E. Oberdörster, and J. Oberdörster, *Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles*. Environmental Health Perspectives, 2005. **113**(7): p. 823-839.
2. Oberdörster, G., *Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology*. Journal of Internal Medicine, 2010. **267**(1): p. 89-105.
3. Warheit, D.B., *Debunking Some Misconceptions about Nanotoxicology*. Nano Letters, 2010. **10**(12): p. 4777-4782.
4. Krug, H.F. and P. Wick, *Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(6): p. 1260-1278.
5. Nel, A.E., et al., *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. Nature Materials, 2009. **8**: p. 543-557.
6. Elsaesser, Taylor, and S.d. Yanés, *Quantification of nanoparticle uptake by cells using microscopical and analytical techniques*. Nanomedicine, 2010. **5**(9): p. 1447-1457.
7. Tantra, R. and A. Knight, *Cellular uptake and intracellular fate of engineered nanoparticles: A review on the application of imaging techniques*. Nanotoxicology, 2011. **5**(3): p. 381-392.
8. Klar, T.A., et al., *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*. PNAS, 2000. **97**(15): p. 8206-8210.
9. Hell, S.W., *Microscopy and its focal switch*. Nature Methods, 2009. **6**(1): p. 24-32.
10. Müller, T., C. Schumann, and A. Kraegeloh, *STED microscopy and its application: new insights into cellular processes on the nanoscale*. ChemPhysChem, 2012. DOI: 10.1002/cphc.201100986.
11. Flörke, O.W., *Silica*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007: p. 1-89.
12. Kumar, R., et al., *Covalently Dye-Linked, Surface- Controlled, and Bioconjugated Organically Modified Silica Nanoparticles as Targeted Probes for Optical Imaging*. ACS Nano, 2008. **2**(3): p. 449-456.
13. Graf, C., et al., *A General Method To Coat Colloidal Particles with Silica*. Langmuir, 2003. **19**(17): p. 6693-6700.
14. Fölling, J., et al., *Synthesis and Characterization of Photoswitchable Fluorescent Silica Nanoparticles*. Small, 2008. **4**(1): p. 134-142.
15. Stöber, W., A. Fink, and E. Bohn, *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*. Journal of Colloid and Interface Science, 1968. **26**(1): p. 62-69.
16. Hartlen, K.D., A.P.T. Athanasopoulos, and V. Kitaev, *Facile Preparation of Highly Monodisperse Small Silica Spheres (15 to >200 nm) Suitable for Colloidal Templating and Formation of Ordered Arrays*. Langmuir, 2008. **24**: p. 1714-1720.
17. Hotta, J.-i., et al., *Spectroscopic Rationale for Efficient Stimulated-Emission Depletion Microscopy Fluorophores*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**: p. 5021-5023.
18. Dobrovolskaia, M.A., D.R. Germolec, and J.L. Weaver, *Evaluation of nanoparticle immunotoxicity*. Nature Nanotechnology, 2009. **4**(7): p. 411-414.
19. Shi, Y., et al., *Endotoxin Promotes Adverse Effects of Amorphous Silica Nanoparticles on Lung Epithelial Cells in Vitro*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2010. **73**(11): p. 748-756.
20. Lin, W., et al., *In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006. **217**(3): p. 252-259.

-
21. Wang and G.F. F, Lan M, Yuan H, Huang Y, Liu J, *Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells*. *Toxicol In Vitro*, 2009. **23**(5): p. 808-15.
 22. Akhtar and A.M. MJ, Kumar S, Siddiqui H, Patil G, Ashquin M, Ahmad I., *Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells*. *Toxicology*, 2010. **276**(2): p. 95-102.
 23. Al-Rawi, M., S. Diabaté, and C. Weiss, *Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells*. *Archives of Toxicology*, 2011. **85**(7): p. 813-826.
 24. Gehrke, H., et al., *In vitro toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells*. *Nanotoxicology*, 2012. Early Online: p. 1–20.
 25. Lieber, M., et al., *A CONTINUOUS TUMOR-CELL LINE FROM A HUMAN LUNG CARCINOMA WITH PROPERTIES OF TYPE TI ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS*. *International Journal of Cancer*, 1976. **17**: p. 62-70.
 26. Fogh, J., W.C. Wright, and J.D. Loveless, *Absence of HeLa Cell Contamination in 169 Cell Lines Derived From Human Tumors*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1977. **58**(2): p. 209-214.
 27. Berridge, M.V., et al., *The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts*. *Biochemica*, 1996(4): p. 14-19.
 28. Monteiro-Riviere, N. and A. Inman, *Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin*. *Carbon*, 2006. **44**(6): p. 1070-1078.
 29. Wörle-Knirsch, J.M., K. Pulskamp, and H.F. Krug, *Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays*. *Nano Letters*, 2006. **6**(6): p. 1261-1268.
 30. Laaksonen, T., et al., *Failure of MTT as a Toxicity Testing Agent for Mesoporous Silicon Microparticles*. *Chemical Research in Toxicology*, 2007. **20**: p. 1913-1918.
 31. Kroll, A., et al., *Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009. **72**(2): p. 370-377.
 32. Xia, T., et al., *Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm*. *Nano Letters*, 2006. **6**(8): p. 1794-1807.
 33. Kovacic, P. and R. Somanathan, *Biomechanisms of Nanoparticles (Toxicants, Antioxidants and Therapeutics): Electron Transfer and Reactive Oxygen Species*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2010. **10**: p. 7919-7930.
 34. Singh, N.P., et al., *A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells*. *Experimental Cell Research*, 1988. **175**: p. 184-191.
 35. Morones, J.R., et al., *The bactericidal effect of silver nanoparticles*. *Nanotechnology*, 2005. **16**(10): p. 2346-2353.
 36. Wijnhoven, S.W.P., et al., *Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment*. *Nanotoxicology*, 2009. **3**(2): p. 109-138.
 37. Samberg, M.E., S.J. Oldenburg, and N.A. Monteiro-Riviere, *Evaluation of Silver Nanoparticle Toxicity in Skin in Vivo and Keratinocytes in Vitro*. *Environmental Health Perspectives*, 2010. **118**(3): p. 407-413.
 38. Koch, M., et al., *Use of a silver ion selective electrode to assess mechanisms responsible for biological effects of silver nanoparticles*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012. **14**(2).
 39. Hell, S.W., *Toward fluorescence nanoscopy*. *Nature Biotechnology*, 2003. **21**(11): p. 1347-1355.
-

-
40. Schumann, C. and A. Kraegeloh, *Scharfer Blick auf Nanopartikel*. Physik Journal, 2011. **10**(4): p. 27-32.
 41. Wurm, C.A., et al., *Sample preparation for STED microscopy*. Methods in molecular biology, 2010. **591**: p. 185-199.
 42. Vogelsang, J., et al., *A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes*. Angewandte Chemie International Edition, 2008. **47**(29): p. 5465-5469.
 43. Staudt, T., et al., *2,2'-Thiodiethanol: A new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy*. Microscopy Research and Technique, 2007. **70**(1): p. 1-9.
 44. Donnert, G., et al., *Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(31): p. 11440-11445.
 45. Irvine, S.E., et al., *Direct Light-Driven Modulation of Luminescence from Mn-Doped ZnSe Quantum Dots*. Angewandte Chemie International Edition, 2008. **47**(14): p. 2685-2688.
 46. Betzig, E., et al., *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1642-1645.
 47. Rust, M.J., M. Bates, and X. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nature Methods, 2006. **3**(10): p. 793-796.
 48. Gustafsson, M.G.L., *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. Journal of Microscopy, 2000. **198**(2): p. 82-87.
 49. Hell, S.W., et al., *Confocal microscopy with an increased detection aperture - type-B ⁴Pi confocal microscopy*. Opt. Lett., 1994. **19**(3): p. 222-224.
 50. Shaw, P.J. and D.J. Rawlins, *Three-dimensional fluorescence microscopy*. Progress in biophysics and molecular biology, 1991. **56**(3): p. 187.
 51. Rothen-Rutishauser, B.M., et al., *Deconvolution combined with digital colocalization analysis to study the spatial distribution of tight and adherens junction proteins*. Journal of Computer-Assisted Microscopy, 1998. **10**(3): p. 103-111.
 52. Landmann, L. and P. Marbet, *Colocalization analysis yields superior results after image restoration*. Microscopy research and technique, 2004. **64**(2): p. 103-112.
 53. Rasband, W.S., *ImageJ*, 1997-2009, U.S. National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>; Bethesda, Maryland, USA.
 54. Schübbe, S., et al., *STED Microscopy to Monitor Agglomeration of Silica Particles Inside A549 Cells*. Advanced Engineering Materials, 2010. **12**(5): p. 417-422.
 55. Schübbe, S., et al., *Size-Dependent Localization and Quantitative Evaluation of the Intracellular Migration of Silica Nanoparticles in Caco-2 Cells*. Chemistry of Materials, 2012. doi **10.1021/cm2018532**: p. 1-10.
 56. Olivo-Marin, J.-C., *Extraction of spots in biological images using multiscale products*. Pattern Recognition, 2002. **35**: p. 1989-1996.
 57. Lin, G., et al., *A hybrid 3D watershed algorithm incorporating gradient cues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks*. Cytometry, 2003. **56A**(1): p. 23-36.
 58. Schumann, C., et al., *A correlative approach at characterizing nanoparticle mobility and interactions after cellular uptake*. Journal of Biophotonics, 2012. **5**(2): p. 117-127.
 59. Pelkmans, L. and A. Helenius, *Endocytosis Via Caveolae*. Traffic, 2002. **3**: p. 311-320.
 60. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
-

-
61. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, *Mechanisms of Endocytosis*. Annual Review of Biochemistry, 2009. **78**(1): p. 857-902.
 62. Kerr, M.C. and R.D. Teasdale, *Defining Macropinocytosis*. Traffic, 2009. **10**(4): p. 364-371.
 63. Groves, E., et al., *Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(13): p. 1957-1976.
 64. Geiser, M., et al., *Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells*. Environmental Health Perspectives, 2005. **113**(11): p. 1555-1560.
 65. Verma, A., et al., *Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles*. Nature Materials, 2008. **7**(7): p. 588-595.
 66. Leroueil, P.R., et al., *Wide Varieties of Cationic Nanoparticles Induce Defects in Supported Lipid Bilayers*. Nano Letters, 2008. **8**(2): p. 420-424.
 67. Xing, X., X. He, and J. Peng, *Uptake of Silica-Coated Nanoparticles by HeLa Cells*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2005. **5**: p. 1688-1693.
 68. Greulich, C., et al., *Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(1): p. 347-354.
 69. Faklaris, O., et al., *Photoluminescent Diamond Nanoparticles for Cell Labeling: Study of the Uptake Mechanism in Mammalian Cells*. ACS Nano, 2009. **3**(12): p. 3955-3962.
 70. Jiang, X., *Endo- and Exocytosis of Zwitterionic Quantum Dot Nanoparticles by Live HeLa Cells*. ACS Nano, 2010: p. A-K.
 71. Rejman, J., et al., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis*. Biochemical Journal, 2004. **377**: p. 159-169.
 72. Zhang, L.W. and N.A. Monteiro-Riviere, *Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake*. Toxicological Sciences, 2009. **110**(1): p. 138-155.
 73. Manders, E.M.M., F.J. Verbeek, and J.A. Aten, *Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images*. Journal of Microscopy, 1993. **169**(3): p. 375-382.
 74. Merrifield, C.J., et al., *Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits*. Nature Cell Biology, 2002. **4**(9): p. 691-698.
 75. Heuser, J.E. and R.G. Anderson, *Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation*. J. Cell Biol., 1989. **108**(2): p. 389-400.
 76. Vercauteren, D., et al., *The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls*. Molecular Therapy, 2009. **18**(3): p. 561-569.
 77. Panté, N. and M. Kann, *Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm*. Molecular Biology of the Cell, 2002. **13**: p. 425-434.
 78. Nitin, N., et al., *Tat Peptide Is Capable of Importing Large Nanoparticles Across Nuclear Membrane in Digitonin Permeabilized Cells*. Annals of Biomedical Engineering, 2009. **37**(10): p. 2018-2027.
 79. Chen, M. and A. von Mikecz, *Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO nanoparticles*. Experimental Cell Research, 2005. **305**(1): p. 51-62.
 80. Beck, M., et al., *Nuclear Pore Complex Structure and Dynamics Revealed by Cryoelectron Tomography*. Science, 2004. **306**: p. 1387-1390.
 81. Brandenberger, C., et al., *Quantitative Evaluation of Cellular Uptake and Trafficking of Plain and Polyethylene Glycol-Coated Gold Nanoparticles*. Small, 2010. **6**(15): p. 1669-1678.
-

-
82. Johnston, H.J., et al., *Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010. **242**(1): p. 66-78.
 83. Clift, M.J.D., et al., *The uptake and intracellular fate of a series of different surface coated quantum dots in vitro*. Toxicology, 2011. **286**(1-3): p. 58-68.
 84. Zhang, S., et al., *Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles*. Advanced Materials, 2009. **21**(4): p. 419-424.
 85. Orr, G., et al., *Submicrometer and Nanoscale Inorganic Particles Exploit the Actin Machinery To Be Propelled along Microvilli-like Structures into Alveolar Cells*. ACS Nano, 2007. **1**(5): p. 463-475.
 86. Stearns, R.C., J.D. Paulauskis, and J.J. Godleski, *Endocytosis of Ultrafine Particles by A549 Cells*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2001. **24**: p. 108-115.
 87. Petersen, N.O., et al., *Quantitation of Membrane-Receptor Distributions by Image Correlation Spectroscopy - Concept and Application*. Biophysical Journal, 1993. **65**(3): p. 1135-1146.
 88. Wiseman, P.W., et al., *Two-photon image correlation spectroscopy and image cross-correlation spectroscopy*. Journal of Microscopy, 2000. **200**: p. 14-25.
 89. Schafer, D.A., et al., *Visualization and molecular analysis of actin assembly in living cells*. The Journal of cell biology, 1998. **143**(7): p. 1919-1930.
 90. Kaksonen, M., H.B. Peng, and H. Rauvala, *Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles*. Journal of cell science, 2000. **113**(24): p. 4421.
 91. Welsch, T., et al., *CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2001. **281**(4): p. F769-F777.
 92. Merrifield, C.J., et al., *Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells*. Nature Cell Biology, 1999. **1**: p. 72-74.
 93. Taunton, J., et al., *Actin-dependent Propulsion of Endosomes and Lysosomes by Recruitment of N-WASP*. The Journal of Cell Biology, 2000. **148**: p. 519-530.
 94. Fricker, M., et al., *Interphase Nuclei of Many Mammalian Cell Types Contain Deep, Dynamic, Tubular Membrane-bound Invaginations of the Nuclear Envelope*. The Journal of Cell Biology, 1997. **136**(3): p. 531-544.

5 erfolgte und geplante Veröffentlichung der Ergebnisse

- Artikel in Fachzeitschriften:

Christian Cavelius, Markus Koch, Christian Schumann, and Annette Kraegeloh
„Synthesis and Characterization of Silica Nanoparticles for High Resolution STED and Confocal Microscopy“, in Vorbereitung

Christian Schumann, Sabrina Schübbe, Christian Cavelius, and Annette Kraegeloh
„A correlative approach at characterizing nanoparticles mobility and interactions after cellular uptake“ *J Biophotonics* 2012, 5, (2), 117-127

Sabrina Schübbe, Christian Schumann, Christian Cavelius, Marcus Koch, Tobias Müller, and Annette Kraegeloh
„Size-Dependent Localization and Quantitative Evaluation of the Intracellular Migration of Silica Nanoparticles in Caco-2 Cells“ *Chem Mater* 2012, 24 (5) 914-923

Tobias Müller, Christian Schumann, and Annette Kraegeloh
„STED microscopy and its application: new insights into cellular processes on the nanoscale“
ChemPhysChem 2012, DOI: 10.1002/cphc.201100986, highlighted as very important paper

Christian Schumann and Annette Kraegeloh
„Scharfer Blick auf Nanopartikel“ *Physik-Journal* 2011, 10 (4), 27-32

Sabrina Schübbe, Christian Cavelius, Christian Schumann, Marcus Koch, and Annette Kraegeloh
„STED microscopy to monitor agglomeration of silica particles inside A549 cells“ *Adv Eng Mater* 2010, 12, (5), 417-422

- Poster:

Annette Kraegeloh, Silke Kiefer, Christian Cavelius, and Marcus Koch
“Analysis of cell-associated silver after exposition of cells to nanosilver” Biological Barriers 2012 - The 9th International Conference and Workshop on Biological Barriers, Saarland University, Saarbrücken, Germany, February 29 – March 9, 2012

Henrike Peuschel, Christian Cavelius, Aljosh Jochem, and Annette Kraegeloh
“Influence of proteins on cytotoxicity testing of silica nanoparticles *in vitro*” Biological Barriers 2012 - The 9th International Conference and Workshop on Biological Barriers, Saarland University, Saarbrücken, Germany, February 29 – March 9, 2012

Christian Cavelius, Christian Schumann, Sabrina Schübbe, Marcus Koch, Melanie Kucki, Aljosh Jochem, and Annette Kraegeloh
„Synthesis and modification of Atto647N-labelled monodisperse silver, gold and silica nanoparticles for high-resolution STED microscopy” NanoMed – 7th International Conference on Biomedical Applications of Nanotechnology, Berlin, Germany, December 2 - 3, 2010

Christian Schumann, Christian Cavelius, Sabrina Schübbe, and Annette Kraegeloh
“Applicability of image correlation methods to STED microscopy” Advanced Light
Microscopy Techniques and Their Applications 10th International ELMI Meeting, Heidelberg
2010

Sabrina Schübbe, Christian Schumann, Christian Cavelius, and Annette Kraegeloh
“Silica nanoparticle uptake in A549 cells: analysis by STED microscopy” Nanotoxicology,
Edinburgh, Scotland, June 2 – 4, 2010

Sabrina Schübbe, Christian Schumann, Christian Cavelius, and Annette Kraegeloh
“Intracellular localization of about 30 nm SiO₂ nanoparticles in Caco-2 cells” 8th
International Conference and Workshop on Biological Barriers –in vitro Tools,
Nanotoxicology, and Nanomedicine, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Germany,
March 21 – April 1st, 2010

Christian Schumann, Sabrina Schübbe, Christian Cavelius, Marcus Koch, and Annette
Kraegeloh “STED microscopy to monitor interactions of nanoparticles with human epithelial
cells” 4th CeBiTec Symposium: BioImaging, Universität Bielefeld, August 25 – 27, 2009

- Vorträge:

Annette Kraegeloh
“Nanoparticle interactions at the cellular scale: Application of STED microscopy”
LeibnizNano 2012, Berlin, Germany, January 30 - 31, 2012

Henrike Peuschel, Sabrina Schübbe, Christian Schumann, Tobias Müller, Christian Cavelius,
and Annette Kraegeloh
“Interactions of Silica Nanoparticles with lung epithelial cells: cytotoxicity and intracellular
uptake” International Conference on “Biological Responses to Nanoscale Particles”,
University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, September 11-15, 2011

Annette Kraegeloh, Sabrina Schübbe, Christian Schumann, Tobias Müller, Henrike Peuschel,
Marcus Koch, and Christian Cavelius
“Localization of nanoparticles inside cells: Application of high resolution fluorescence
microscopy” International Conference on “Biological Responses to Nanoscale Particles”,
University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, September 11-15, 2011

Annette Kraegeloh
“Interaction of nanoparticles with human cells: analysis by STED-microscopy”
Nanotechnologie-Tagung der nanotech-data.com, University Paul Verlaine, Metz, France,
November 25, 2010

Annette Kraegeloh, Sabrina Schübbe, Silke Kiefer, Christian Cavelius, Christian Schumann,
and Marcus Koch “Nanoparticle cell interactions: insights by microscopical and chemical

analyses” NanoMed – 7th International Conference on Biomedical Applications of Nanotechnology, Berlin, Germany, December 2 – 3, 2010

Annette Kraegeloh

“STED microscopy to monitor nano cell interactions” Saarland Microscopy Workshop, Saarland University, Homburg, Germany, March 10, 2010

6 Danksagung

Dieses Vorhaben ist durch den großen Einsatz des „MeNatox-Teams“ am INM ein Erfolg geworden.

Liebe „Nanotoxis“:

Christian Schumann
Sabrina Schübbe
Christian Cavellius
Silke Kiefer
Tobias Müller
Henrike Peuschel
Marcus Koch
Melanie Kucki
Sarah Schmidt
Katharina Narr
Aljosha Jochem
Jens Frindert
Anika Weber

Herzlichen Dank

für Euer Engagement und Eure Zusammenarbeit im Rahmen dieses Vorhabens!!

Dank gilt außerdem Prof. Eduard Arzt,
dem Team von Claudia Fink-Straube,
Prof. Alexandra K. Kiemer und Robert Zarbock,
unserer Verwaltung und
allen hier nicht namentlich genannten INMlern,
die mit verschiedenen großen und kleinen Beiträgen
an dem Vorhaben beteiligt waren.

Unser gemeinsamer Dank gilt dem BMBF und dem Projektträger Jülich für
die Förderung und Begleitung dieses Vorhabens.