

***In vitro* Studien zur Internalisierung von
Eisenoxidnanopartikeln durch Tumorzellen und
den zugrundeliegenden Aufnahmemechanismen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Nils Bohmer

aus Berlin

2013

Bearbeitungszeitraum: 06/2009 bis 10/2013

Betreuer: Dr. rer. nat. Andreas Jordan

Ort: Charité Campus Virchow Klinikum,
Klinik für Radioonkologie und Strahlentherapie,
Projekt Biomedizinische Nanotechnologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke

2. Gutachter: Prof. Dr. Eckart Rühl

Disputation am 25.03.2014

„In jeder Wissenschaft geht der Irrtum der Wahrheit voraus,
aber es ist besser, er geht voran als hinterher.“

Horace Walpole, brit. Staatsmann und Autor

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Jordan bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe meine Dissertation anzufertigen. Eng damit verbunden ist auch der Dank an das gesamte Team der Firma MagForce, deren Knowhow die Durchführung der Versuche erst ermöglicht hat. Besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. Monika Fischer und ihrem Team für die Bereitstellung der Nanopartikel.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Volker Haucke für die bereitwillige Übernahme meiner universitären Betreuung und die damit verbundenen konstruktiven Gespräche sowie die Möglichkeit, Teile der Versuche in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. In diesem Zuge auch vielen Dank an alle Mitglieder der AG Haucke für die herzliche Aufnahme, wann immer ich Gast sein durfte. Besonders hervorheben möchte ich dabei Irene Schütz für die Unterstützung und die konstruktiven Diskussionen.

Bei Herrn Dr. Christian Säger bedanke ich mich besonders für die sehr engagierte und konstruktive Korrektur meiner Arbeit.

Vielen Dank Herrn Prof. Dr. Eckart Rühl und Frau Prof. Dr. Christina Graf sowie allen Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppen für die gute Zusammenarbeit im Rahmen unseres Verbundprojektes SPP1313.

Großer Dank gebührt auch Frau Petra Schrade für die Einbettung der Proben als auch für die nette und fachkundige Anleitung während der elektronenmikroskopischen Arbeiten in der Multiuser-Einheit des Campus Virchow Klinikum.

Ebenso möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung meiner Arbeit bedanken. Auch der fachliche Austausch im Rahmen diverser Workshops und Konferenzen mit Wissenschaftlern unterschiedlichster Disziplinen wurde durch die Einbindung in das Schwerpunktprogramm 1313 erst ermöglicht.

Obwohl es noch so viele andere gibt, die hier erwähnt werden müssten, so möchte ich doch vor allem Tobias Deigner, Catrin Schmidt und Stephan Zornow für die gemeinsame Zeit danken, in der wir manche Höhen und Tiefen mit Engagement und Humor gemeistert haben.

Privat bedanke ich mich bei meiner Familie, ohne deren Unterstützung mein Studium und die Promotion nicht denkbar gewesen wären. Nicht genug danken kann ich dabei meiner Frau für ihre Liebe, Geduld und ihre moralische Unterstützung, die mich manchen Frust nach glücklosen Momenten im Labor wieder vergessen ließ. Dankbar bin ich zudem für die Geburt unserer kleinen Tochter, die mir das Schreiben der Arbeit versüßt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	14
1.1	Nanotechnologie	14
1.1.1	Begriffsdefinition	14
1.1.2	Anwendungsbereiche und wirtschaftliche Bedeutung	14
1.1.3	Gesellschaftliche Bedeutung	15
1.2	Nanomedizin	17
1.2.1	Definition und Historie	17
1.2.2	Anwendungsgebiete	17
1.2.3	Nanomedizin in Deutschland	19
1.3	Eisenoxidnanopartikel in der Nanomedizin	20
1.3.1	Eisenoxide und ihr früh entdecktes Potential	20
1.3.2	Derzeitige und künftige medizinische Anwendungsmöglichkeiten	20
1.4	Problem- und Fragestellungen	24
1.4.1	Zelluläre Aufnahme von Eisenoxidnanopartikeln durch Tumorzellen- Wie beeinflusst die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel die Internalisierung?	24
1.4.2	Die Frage des Aufnahmemechanismus: Wie gelangen $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel in Tumorzellen?	26
1.4.3	Potentielle Toxizität von $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln	29
2	MATERIAL UND METHODEN	31
2.1	Nanopartikel	31
2.1.1	$\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$	31
2.1.2	Polystyrolsulfonat- beschichtete Goldstäbchen	33
2.1.3	Goldsphären mit SiO_2 - Schale und eingelagertem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	34
2.1.4	Goldsphären mit PMA oder PEG	34
2.2	Zellkultur	35
2.2.1	Zelllinien	35

2.2.2	Kulturmedien	36
2.2.3	Zellpassage	36
2.2.4	Mykoplasmentest mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	37
2.3	Exposition der Zellen mit Nanopartikeln.....	39
2.3.1	Vorkultur	39
2.3.2	Exposition.....	39
2.3.3	Aufarbeitung der Zellen für analytische Nachweismethoden	39
2.3.4	Kontrollkulturen bei 4°C.....	40
2.4	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	40
2.5	Analytische Nachweismethoden	41
2.5.1	Photometrische Eisenbestimmung.....	41
2.5.2	Eisen- und Goldbestimmung mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)	43
2.6	Transfektion der Zellen mit siRNA.....	44
2.6.1	Methodik.....	44
2.6.2	Transfektion mit der Lipofectamine™ 2000 Technologie	44
2.6.3	Transfektion mit der Dharmacon SMARTpool® Technologie	47
2.7	Herstellung eines Zelllysats mit Bestimmung des Proteingehalts.....	49
2.7.1	Ziel der Aufarbeitung	49
2.7.2	Herstellung des Zelllysats	49
2.8	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	51
2.8.1	Methodik.....	51
2.8.2	Geräte und Chemikalien.....	51
2.8.3	Durchführung.....	52
2.9	Western Blot und Chemolumineszenz	53
2.9.1	Methodik.....	53
2.9.2	Materialien und Chemikalien	54
2.9.3	Puffer und Lösungen	56

2.9.4	Durchführung.....	56
2.10	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	58
2.10.1	Mikroskopietechnik.....	58
2.10.2	Quantitative Nanopartikelaufnahme- Zellversuche	58
2.10.3	Untersuchungen zur Autophagieinduktion	59
3	<u>ERGEBNISSE</u>.....	61
3.1	Qualitative Untersuchungen der intrazellulären SiO₂-Fe₂O₃ Nanopartikelaufnahme	62
3.1.1	Intrazelluläre Nanopartikelakkumulation am Beispiel der Zelllinie C3H RS1	62
3.1.2	Nachweis der intrazellulären Nanopartikelaufnahme durch C3H RS1 Zellen	63
3.1.3	Nachweis der intrazellulären Nanopartikelaufnahme durch BT20 Zellen.....	65
3.2	Intrazelluläre Aufnahme anisotroper und sphärischer Partikel mit abweichendem Durchmesser zu den SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln	67
3.2.1	Intrazelluläre Aufnahme von Goldstäbchen durch C3H RS1 Zellen	67
3.2.2	Intrazelluläre Aufnahme von 160 nm großen Silicapartikel mit Goldkern durch C3H RS1	68
3.2.3	Intrazelluläre Aufnahme von Goldstäbchen durch BT20 Zellen	69
3.2.4	Intrazelluläre Aufnahme von Goldstäbchen durch HeLa Zellen	70
3.2.5	Intrazelluläre Aufnahme monodisperser sphärischer Goldpartikel durch BT20 und HeLa Zellen.....	71
3.3	Quantitative Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächenmodifikation von SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln auf die Menge und die Kinetik der Nanopartikelaufnahme.....	74
3.3.1	Untersuchungen an der murinen Mammakarzinomzelllinie C3H RS1	74
3.3.2	Untersuchungen an der humanen Mammakarzinomzelllinie BT20.....	79
3.3.3	Vergleich der Partikelbindung (intra- sowie extrazellulär) durch BT20 und C3H RS1 Zellen	83
3.4	Studien zum Aufnahmemechanismus modifizierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel durch Tumorzellen	87
3.4.1	Einfluss des Knockdowns von Flotillin-1, Caveolin-1, Clathrin und Dynamin2 in HeLa Zellen auf die intrazelluläre Aufnahme modifizierter SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikel	88

3.4.2	Einfluss des Knockdowns von PIP5K α , GRAF1, CtBP1 und CDC42 in HeLa Zellen auf die intrazelluläre Aufnahme PEGylierter SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikel	94
3.4.3	Einfluss des Knockdowns von PIP5K α , Caveolin-1 und CDC42 in BT20 Zellen auf die intrazelluläre Aufnahme PEGylierter SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikel	98
3.5	Autophagieinduktion durch die Aufnahme und Speicherung PEGylierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel durch HeLa Zellen.....	101
4	<u>DISKUSSION</u>	105
4.1	Erkenntnisse der qualitativen Betrachtung der intrazellulären Aufnahme von Nanopartikeln	105
4.1.1	Die Bedeutung des Nachweises der intrazellulären Aufnahme als Voraussetzung für weiterführende Experimente	105
4.1.2	Zeitliche Dimension der intrazellulären Nanopartikel-Akkumulation	105
4.1.3	Intrazelluläre Kompartimentierung lässt auf energieabhängigen Aufnahmemechanismus schließen	106
4.1.4	Unterschiede innerhalb der Zellpopulation.....	108
4.1.5	Intrazelluläre Aufnahme großer, kleiner und anisotroper Partikel	108
4.2	Erkenntnisse aus der quantitativen Bestimmung der intrazellulär aufgenommenen SiO₂-Fe₂O₃ Partikel	110
4.2.1	Beeinflussung der intrazellulären Aufnahmemenge durch Oberflächenmodifikation der Partikel	110
4.2.2	Einfluss der Oberflächenmodifikation auf die Aufnahmekinetik	115
4.2.3	Die Schwierigkeiten der Nanopartikelanwendung <i>in vitro</i>	116
4.2.4	Inhibition der energieabhängigen Endocytose als Kontrolle	118
4.2.5	Beobachtungen zur potentiellen Toxizität der SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikel	119
4.2.6	Konsequenzen und Perspektiven für anwendungsbezogene Nanopartikelentwicklung 120	
4.3	Entwicklung eines Aufnahmemodells am Beispiel von HeLa Zellen	122
4.3.1	Die Beteiligung von Flotillin-1, Caveolin-1, Clathrin und Dynamin2	123
4.3.2	Die Beteiligung von PIP5K α , GRAF1, CtBP1 und CDC42	124
4.3.3	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Zelllinien am Beispiel von BT20	126

4.3.4	Aufnahmemodell für $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel in HeLa Zellen sowie daraus ableitbare Tendenzen	127
4.4	Autophagieinduktion als Auswirkung der Nanopartikelaufnahme bei HeLa Zellen	129
5	ZUSAMMENFASSUNG	131
5.1	Deutsche Zusammenfassung	131
5.2	Abstract.....	133
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Abschätzung des Weltmarktes nanotechnologischer Produkte im Jahr 2011, Angaben in Mrd. \$ [1]	15
Abbildung 1.2: medizinische Anwendungen der Nanotechnologie (übernommen aus [12])..	17
Abbildung 1.3: Nano-Akteure im Bereich Medizin/Pharma in Deutschland (Stand 08/2013, Quelle: www.nano-map.de)	19
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Partikeleinbringung bei der NanoTherm® Therapie (Quelle: www.magforce.de)	21
Abbildung 1.5: Strategie zur Untersuchung des Einflusses von Oberflächenmodifikationen auf die intrazelluläre Aufnahme	26
Abbildung 1.6: energieabhängige Endocytosewege nach Conner und Schmid (Nature 2003) [51].....	26
Abbildung 1.7: Endocytosewege aus Wieffer et al. (Cell, 2009) [52]	27
Abbildung 1.8: Strategie der Inhibition durch siRNAs (übernommen und modifiziert aus Wieffer et al. [52].....	29
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Partikel-Grundstruktur mit detaillierter chemischer Struktur der äußeren Silicaschicht	31
Abbildung 2.2: TEM-Aufnahme silicatisierter Eisenoxidpartikel	32
Abbildung 2.3: TEM- Aufnahme von PSS-beschichteten Goldstäbchen der ersten Generation	33
Abbildung 2.4: TEM- Aufnahme von CTAB/Au-Nanorods vor der Beschichtung mit PSS.....	33
Abbildung 2.5: TEM- Aufnahme von Au-Nanospheres mit SiO ₂ - Schale	34
Abbildung 2.6: Konfluenten Zellrasen von C3H RS1 Zellen	35
Abbildung 2.7: zwei Kolonien von BT20 Zellen	35
Abbildung 2.8: negativer Mykoplasmentest bei BT20	38
Abbildung 2.9: Versuchsschritte zur Transfektion der verwendeten Zelllinien mit der Lipofectamine™ 2000 Technologie	44
Abbildung 2.10: Banden des Prestained Protein Marker (New England BioLabs, Art.Nr.P7708 S)	52

Abbildung 2.11: Schematische Darstellung des Prinzips der Chemolumineszenz mit Primär- und Sekundärantikörper	53
Abbildung 3.1: Akkumulation von PEGylierten FeOx- Partikeln durch einzelne C3H RS1 Zellen	62
Abbildung 3.2: Aufnahme PEGylierter Partikel durch C3H RS1	63
Abbildung 3.3: Aufnahme NH ₂ - und NH ₂ /PEG- funktionalisierter Partikel durch C3H RS1....	64
Abbildung 3.4: Aufnahme NH ₂ - funktionalisierter Partikel durch BT20	65
Abbildung 3.5: Aufnahme carboxylierter Partikel durch BT20.....	66
Abbildung 3.6: TEM-Aufnahmen einer Zelle mit NP in der Übersicht (a) und intrazellulär vorliegender Partikel (b).....	67
Abbildung 3.7: TEM-Aufnahmen einer Zelle mit inkorporierten Silicapartikeln in der Übersicht (a) und mit den intrazellulär aufgenommenen Partikeln in der Nahaufnahme (b)	68
Abbildung 3.8: TEM Aufnahmen intrazellulär vorliegender Goldstäbchen in einer BT20 Zelle nach 4 h Inkubation mit geringerer (a) und starker Vergrößerung (b)	69
Abbildung 3.9: TEM Aufnahmen intrazellulär vorliegender Goldstäbchen in HeLa Zellen nach 4 h Inkubation	70
Abbildung 3.10: TEM-Aufnahmen einer HeLa-Zelle mit Au-PMA-Partikeln in einem Vesikel in der Übersicht (a) und in stärkerer Vergrößerung (b)	71
Abbildung 3.11: Goldgehalt je HeLa Zelle nach 24 h Inkubation mit PMA-funktionalisierten und PEGylierten Nanopartikeln	72
Abbildung 3.12: Wachstumskurven von C3H RS1 Kulturen mit und ohne Zugabe von NP (600 µg Fe/ml)	74
Abbildung 3.13: Inkubation von C3H RS1 Zellen mit PEGylierten NP	75
Abbildung 3.14: Aufnahme carboxylierter und thiolisierter Partikel durch C3H RS1.....	76
Abbildung 3.15: Aufnahme PEGylierter und epoxylierter Partikel durch C3H RS1.....	76
Abbildung 3.16: Aufnahme von Amino- und Amino/PEG-Partikel durch C3H RS1	77
Abbildung 3.17: Aufnahme silicatisierter Partikel durch BT20	79
Abbildung 3.18: Aufnahme thiolisierter Partikel durch BT20.....	80
Abbildung 3.19: Aufnahme epoxylierter Partikel durch BT20.....	80
Abbildung 3.20: Aufnahme PEGylierter Partikel durch BT20.....	81

Abbildung 3.21: Aufnahme aminofunktionalisierter Partikel durch BT20	81
Abbildung 3.22: Aufnahme silicatisierter Partikel durch C3H RS1 und BT20	83
Abbildung 3.23: Aufnahme thiolisierter Partikel durch C3H RS1 und BT20.....	84
Abbildung 3.24: Aufnahme epoxylierter Partikel durch C3H RS1 und BT20	84
Abbildung 3.25: Aufnahme PEGylierter Partikel durch C3H RS1 und BT20.....	85
Abbildung 3.26: Aufnahme aminofunktionalisierter Partikel durch C3H RS1 und BT20	85
Abbildung 3.27: Eisenwert in HeLa und BT20 Zellen nach 48 h Inkubation mit PEGylierten FeOx-NP.....	87
Abbildung 3.28: repräsentative Röntgenfilmausschnitte der Western-Blot-Membranen mit transfizierten Zelllysaten von HeLa Zellen, Targets: Flotillin-1, Caveolin-1, Clathrin, Dynamin2.....	88
Abbildung 3.29: Eisengehalte pro Zelle in transfizierten HeLa Zellen nach 24 h Inkubation mit PEGylierten SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikeln.....	89
Abbildung 3.30: Eisengehalte pro Zelle in transfizierten HeLa Zellen nach 24 h Inkubation mit carboxylierten SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikeln	90
Abbildung 3.31: Eisengehalte pro Zelle in transfizierten HeLa Zellen nach 24 h Inkubation mit unmodifizierten SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikeln	91
Abbildung 3.32: Fluoreszenzbilder von Kontrollzellen, die mit Ausnahme der siRNA-Gabe identisch zu Versuchszellen behandelt wurden (a), und Versuchszellen, die mit siRNA gegen Caveolin-1 behandelt wurden (b), nach 4 h Inkubation mit Alexa555-markierten SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikeln.....	92
Abbildung 3.33: Fluoreszenzintensität der Wellenlänge 568 pro Zelle in transfizierten HeLa Zellen nach 4 h Inkubation mit fluoreszierenden SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikeln	93
Abbildung 3.34: repräsentative Röntgenfilmausschnitte der Western-Blot-Membranen mit transfizierten Zelllysaten von HeLa Zellen, Targets: PIP5K α , GRAF1, CtBP1, CDC42.....	94
Abbildung 3.35: Eisengehalte pro Zelle in transfizierten HeLa Zellen nach 24 h Inkubation mit PEGylierten SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikeln.....	95
Abbildung 3.36: repräsentative Röntgenfilmausschnitte der Western-Blot-Membranen mit transfizierten Zelllysaten von HeLa Zellen, Targets: Caveolin-1, CDC42.....	96
Abbildung 3.37: Gesamtfluoreszenz von Alexa Fluor® 555 markierten SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikeln pro HeLa-Zelle nach 24 h Inkubation.....	97

Abbildung 3.38: repräsentative Röntgenfilmausschnitte der Western-Blot-Membranen mit transfizierten Zelllysaten von BT20 Zellen, Targets: PIP5K α , CDC42, Caveolin-1	98
Abbildung 3.39: Eisengehalte pro Zelle in transfizierten BT20 Zellen nach 24 h Inkubation mit PEGylierten SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikeln.....	99
Abbildung 3.40: Fluoreszenz- (obere Reihe) und Durchlichtaufnahmen (untere Reihe) von HeLa Zellen, die mit PEGylierten SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikeln inkubiert wurden	102
Abbildung 3.41: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung von LC3B in HeLa Zellen.....	103
Abbildung 4.1: TEM Aufnahmen intrazellulär vorliegender SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikel in einer BT20 Zelle nach 24 h Inkubation mit geringerer (a) und starker Vergrößerung (b)	107
Abbildung 4.2: TEM-Aufnahmen von Zellmembranen mit proteinreichen Einstülpungen vor der Vesikelabschnürung (hoher Kontrast, rote Pfeile)	113
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Nanopartikelexposition <i>in vitro</i>	116
Abbildung 4.4: Übersicht über die Endocytosewege.....	123
Abbildung 4.5: Aufnahmemodell für getestete SiO ₂ -Fe ₂ O ₃ Partikel in HeLa Zellen, beteiligte Proteine sind farblich hervorgehoben und die Aufnahmemenge anhand der Pfeilstärke gewichtet.....	127
Abbildung 4.6: Mechanismus der durch Nanopartikel verursachten Toxizität durch Behinderung der Autophagie (übernommen aus [60]).....	130

1 Einleitung

1.1 Nanotechnologie

1.1.1 Begriffsdefinition

Der nano.DE-Report von 2011 des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) enthält für den Begriff Nanotechnologie folgende Definition:

Die Nanotechnologie befasst sich mit der kontrollierten Herstellung, Analyse und Nutzung von Materialien und Komponenten mit funktionsrelevanten Strukturgrößen zwischen ca. 1 und 100 Nanometern in mindestens einer Richtungsdimension. Dabei resultieren aus der Nanoskaligkeit neue Funktionalitäten und Eigenschaften, die zur Verbesserung bestehender oder zur Entwicklung neuer Produkte und Anwendungen beitragen können. [1]

In diesem Bericht wird weiterhin darauf hingewiesen, dass die Begriffsdefinition national wie international Gegenstand ständiger Diskussion und Überarbeitung ist. Da immer mehr Menschen in immer mehr Lebensbereichen mit der Nanotechnologie aufgrund ihrer vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten konfrontiert werden, ist der Bedarf gesetzlicher Regelungen und Definitionen groß. Die „International Organization for Standardization“ (ISO) hat unter dem Kürzel „ISO/TC 229 Nanotechnologies“ bisher 35 Definitionen und Klassifikationen unterschiedlicher Teilbereiche der Nanotechnologie veröffentlicht, an denen 34 Länder beteiligt sind (Stand 08/2013, <http://www.iso.org>). Die Komplexität der technischen Möglichkeiten erschwert bisher eine genauere Definition und es wird oftmals dem Hersteller des jeweiligen Produktes überlassen, ob er ihm das Prädikat „Nano“ verleiht oder nicht.

1.1.2 Anwendungsbereiche und wirtschaftliche Bedeutung

Die Anwendungsbereiche der Nanotechnologie sind weit gefächert. So werden Nanomaterialien in der Chemie, bei der Herstellung von Metall- und Keramikwerkstoffen, in der Optik und Photonik, in der Energiebranche, in der Umwelttechnik, im Maschinenbau, im Baugewerbe, in der Automobilbranche, in der Informations- und Kommunikationstechnik, bei der Verpackung, in der Textilbranche, in der Sicherheitstechnik, in der Sensorik- und Messtechnik sowie in der Medizin und Pharmaindustrie entwickelt und genutzt. Einzelheiten dazu können dem nano.DE-Report von 2011 des BMBF entnommen werden [1].

Die wirtschaftliche Bedeutung der Nanotechnologie nimmt stetig zu. Ein Schlüssel dazu war die Möglichkeit, mit bildgebenden Verfahren Vorgänge im nanoskaligen Bereich sichtbar zu machen. Seit 1981 das Rastertunnelmikroskop (STM) entwickelt wurde, nahm das Interesse an der Nanotechnologiefortwährend zu, so dass in Deutschland bereits Anfang der 90er Jah-

re öffentliche Förderprogramme ins Leben gerufen wurden [2]. 2011 wurde der Weltmarkt nanotechnologischer Produkte auf 93 Milliarden \$ geschätzt (Abbildung 1.1). Durch die stetig ansteigende Zahl von Innovationen und Produkten, die die Marktreife erreichen, erwarten viele Experten bis 2015 eine Steigerung dieses Wertes auf 1 Billion €. Allein in Deutschland befassten sich 2011 rund 1800 Institutionen mit dem Einsatz von Nanotechnologie.

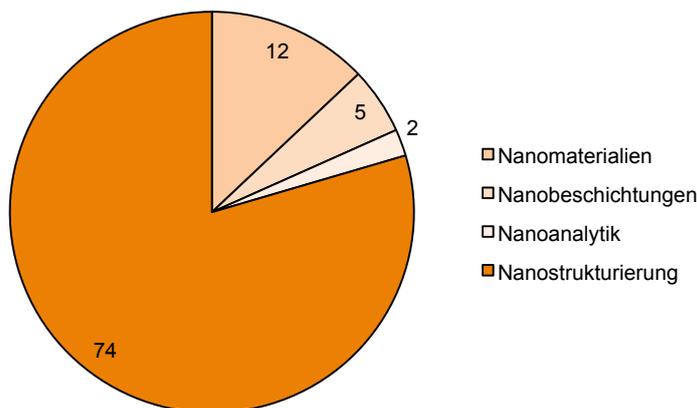


Abbildung 1.1: Abschätzung des Weltmarktes nanotechnologischer Produkte im Jahr 2011, Angaben in Mrd. \$ [1]

1.1.3 Gesellschaftliche Bedeutung

Nanopartikel sind in vielen Produkten des täglichen Lebens bereits enthalten. Eines der bekanntesten Beispiele sind Titandioxidpartikel, die in einigen Sonnencremes zur Abwehr der UV-Strahlung enthalten sind. Die gesellschaftliche Relevanz der Nanotechnologie steigt daher in dem Maße an, in dem auch neue Innovationen auf den Markt drängen. Die öffentliche Wahrnehmung der Nanotechnologie war bis zur Mitte des vergangenen Jahrzehnts überwiegend positiv. Es wurden vor allem die Entwicklungspotentiale und die wirtschaftliche Zugkraft der relativ jungen Technologie gesehen ohne dabei die potentiellen Risiken mit einzubeziehen. Dies wird bereits 2003 in dem TAB-Arbeitsbericht 092 des Büros für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag bemängelt, wo es heißt: „Der Stand der Forschung über die potenziellen Umwelt- und Gesundheitswirkungen der Herstellung und Anwendung nanotechnologischer Verfahren und Produkte ist unbefriedigend.“ (TAB-Arbeitsbericht Nr. 092. Berlin 2003, <http://www.tab-beim-bundestag.de/de/publikationen/berichte/ab092.html>) Dort wird auch darauf hingewiesen, dass zu diesem Thema verstärkte Forschungsansätze verfolgt werden sollten. In der Folge wurden öffentlich geförderte, von der Industrie unabhängige Forschungsprojekte ins Leben gerufen, die sich exklusiv mit den möglichen Risiken der Nanotechnologie in biologischen Systemen befassen sollten. Ein Beispiel dafür ist das

2008 gestartete Schwerpunktprogramm 1313 (SPP1313) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), in dem interdisziplinäre Forschergruppen aus ganz Deutschland und der Schweiz in engen Verbundprojekten zusammen arbeiten (www.spp1313.de). Die Erkenntnisse verstärkter Erforschung der Risikoabschätzung sowie die gestiegene öffentliche Wahrnehmung der Nanotechnologie führten in der Folge zu einer deutlich kritischeren Berichterstattung in den Medien. So titelte unter anderem der Spiegel am 21.10.2009: „Gesundheitsrisiko: Umweltbundesamt warnt vor Nanotechnologie“. Gefordert wird unter anderem eine Kennzeichnungspflicht für Produkte, die Nanopartikel enthalten. Das Bundesamt für Risikobewertung (BfR) weist auf seiner Homepage unter „Fragen und Antworten zur Nanotechnologie“ in der Fassung vom 28.08.2012 darauf hin, dass diese Kennzeichnung erst Sinn mache, wenn man die Nachweismethoden entwickelt hat, um Nanopartikel in Produkten nachweisen zu können (www.bfr.bund.de).

Die Berichterstattung sowie die Haltung der Behörden in Deutschland verdeutlichen, dass Nanotechnologie mittlerweile gesellschaftlich differenzierter betrachtet wird und sich ein verstärktes Problembewusstsein entwickelt hat. Dabei geht es allerdings nicht um Vorbehalte aufgrund akut zu beobachtender toxischer Phänomene sondern um den geringen Kenntnisstand der Forschung bei gleichzeitig rasant beschleunigter industrieller Entwicklung. Diese Probleme sind aber durch gezielte Untersuchungen lösbar und werden bereits in einigen Arbeiten adressiert [3-6]. Zahlreiche Autoren verweisen neben den möglichen Vorteilen nanomedizinischer Anwendungen ausdrücklich auf die Notwendigkeit von Kurz- und Langzeitstudien in der präklinischen Erforschung neuer Therapieansätze [7].

1.2 Nanomedizin

1.2.1 Definition und Historie

Der spätere Nobelpreisträger Richard P. Feynman sprach 1959 erstmals von den Möglichkeiten der Nanotechnologie und ihrer Anwendung in der Medizin [8]. Damals waren diese Visionen noch eher theoretischer Natur. Robert A. Freitas definierte 2005 Nanomedizin mit der Diagnose, Behandlung sowie Vorbeugung von Krankheiten durch Erhalt und Verbesserung der menschlichen Gesundheit durch die Verwendung molekularer Hilfsmittel und die Kenntnis des menschlichen Körpers auf molekularer Ebene [9]. Diese etwas sperrige Definition lässt sich kurz damit zusammenfassen, dass der Begriff Nanomedizin die Anwendung der Nanotechnologie auf die Medizin bezeichnet. Anfängliche Überlegungen zielten auf die Herstellung nanochirurgischer Werkzeuge, sogenannter Nanoroboter, ab, mit deren Hilfe man direkt am Ort des Geschehens innerhalb des Körpers operieren könnte [10].

Die Nanomedizin ist ein stark interdisziplinäres Forschungsfeld, an dem Experten aus der Biologie, Medizin, Physik, Chemie, Mathematik, den Ingenieurwissenschaften und der Informatik beteiligt sind. All diese Teildisziplinen müssen ihr Knowhow und ihre Erkenntnisse bündeln, um die Prozesse verstehen und gezielt beeinflussen zu können, die bei der Interaktion von künstlich erzeugten Nanopartikeln mit biologischen Systemen eine Rolle spielen. Die Entwicklung marktfähiger Produkte für die klinische Anwendung begann daher auch erst Ende des 20. Jahrhunderts, wobei bis zum heutigen Zeitpunkt nur wenige Kandidaten den Weg zum Patienten erfolgreich absolviert haben [11].

1.2.2 Anwendungsgebiete

Nanomedizin lässt sich in mehrere Teildisziplinen unterteilen, in denen mit unterschiedlichsten Konzepten Partikelsysteme entwickelt werden, um Krankheiten frühzeitig erkennen, erkranktes Gewebe sichtbar und bereits manifestierte Krankheiten heilen zu können (Abbildung 1.2).

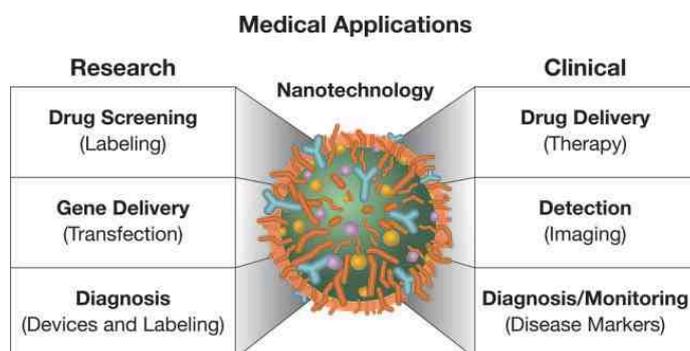


Abbildung 1.2: medizinische Anwendungen der Nanotechnologie (übernommen aus [12])

Neben vielfältigen Anwendungsbereichen in der Forschung sind besonders die Techniken der klinischen Anwendung von besonderem Interesse. Dabei gibt es als therapeutischen Ansatz das sogenannte „Drug delivery“, bei dem ein Wirkstoff an den Nanopartikel gekoppelt wird und so aktiv oder passiv an die Zielregion des Körpers „geliefert“ wird [13,14]. Beim aktiven Targeting trägt der Nanopartikel an seiner Oberfläche ein spezifisches Label. Dies sorgt dafür, dass die Partikel möglichst exklusiv an die Zielregion binden und dort ihre Wirkung entfalten können [15]. Beim passiven Targeting werden Nanopartikel systemisch injiziert. Diese werden dann durch besondere Strukturen der Zielregion dort angereichert, wo sie wirken sollen. Besonders in der Tumorthherapie versucht man den sogenannten „Enhanced permeability and retention“-Effekt (EPR-Effekt) zu nutzen [16]. Dabei macht man sich zunutze, dass die Endothelzellen der Blutgefäße, die den Tumor durchziehen, häufig größere Abstände untereinander aufweisen als Endothelien gesunder Organe. Durch diese größeren Lücken können Nanopartikel leichter in den Tumor gelangen als durch reguläre Endothelien.

Therapeutische Ansätze können allerdings auch ohne Drug delivery durch die direkte Einbringung der Partikel in die Zielregion erfolgen. Beispielsweise wurde von der Firma Mag-Force ein Verfahren entwickelt, bei dem Eisenoxidnanopartikel direkt in einen Gehirntumor eingespritzt und dort für die Thermotherapie des Tumors verwendet werden können [17].

Bei der Detektion und Diagnose von Krankheiten werden Nanopartikel entwickelt, die durch spezifische Eigenschaften das erkrankte Gewebe im Körper erreichen. Sie besitzen zudem eine Eigenschaft, die sie von außen sichtbar machen. Das kann zum Beispiel ein Fluoreszenzfarbstoff oder ein magnetischer Kern sein. Magnetische Nanopartikel werden seit längerem in der Magnetresonanztomographie als Kontrastmittel verwendet, um Tumore sichtbar zu machen [18]. Bekannte Produkte sind Endorem™ der Firma Guerbet und Resovist® der Firma Bayer Healthcare.

Werden beide Modalitäten, Therapie und Diagnose, in einem Nanopartikel verbunden, so spricht man von „Theranostik“. Dabei besitzen die Partikel sowohl eine Targetingfunktion für die betroffene Region als auch eine gekoppelte Therapiefunktion [19,20]. Denn neben effizienten Therapien für eine große Masse von Patienten wird zukünftig auch in Bereichen der Nanomedizin das Konzept der personalisierten Lösungen angestrebt. Dabei sollen durch Anpassungen der Wirkstoffformulierungen und der Therapiedurchführung individuelle Lösungen für kleinere Patientengruppen entwickelt werden [21].

Obwohl ein breiter Konsens über die vielfältigen Möglichkeiten nanomedizinischer Anwendungen existiert, fehlen nach wie vor grundlegende Erkenntnisse dazu, wie Nanopartikel mit Zellen und ganzen Organismen interagieren. Nur das Verständnis der zugrundeliegenden

Phänomene wird es ermöglichen, das volle Potential dieser recht jungen medizinischen Teildisziplin auszuschöpfen.

1.2.3 Nanomedizin in Deutschland

In Deutschland sind derzeit (Stand 08/2013) rund 400 Nanoakteure in der Medizin und Pharmakologie aktiv (Abbildung 1.3). Laut BMBF waren es 2011 nur 300 [1]. Dies zeigt, dass dieser Bereich in Deutschland einem starken Wachstum unterliegt. Allein die Anzahl der kleinen und mittleren Unternehmen (KMU) sowie der Großunternehmen ist im Vergleich zu 2011 um rund 20% gestiegen. Der Anteil der Großunternehmen an der Gesamtzahl ist mit unter 7% aber eher gering. Mit zusammen über 40 % machen Forschungsinstitute und Hochschulforschung einen großen Anteil der Einrichtungen aus, die derzeit an nanomedizinischen Inhalten arbeiten. Dies macht den großen Wissensbedarf deutlich, der in der Nanomedizin in Deutschland herrscht.

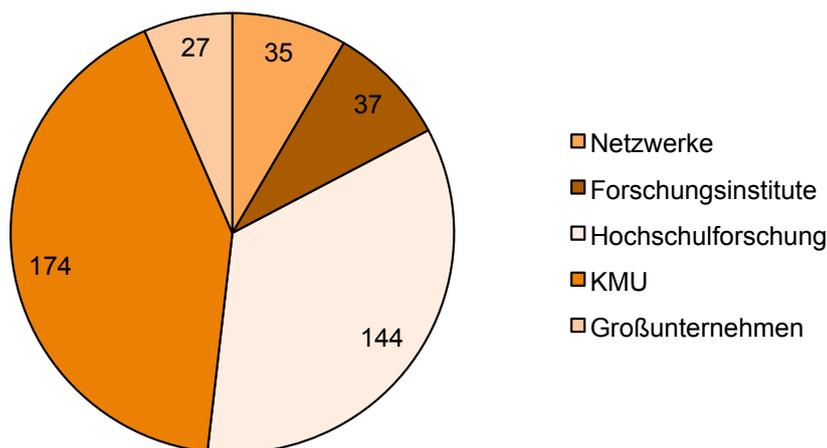


Abbildung 1.3: Nano-Akteure im Bereich Medizin/Pharma in Deutschland (Stand 08/2013, Quelle: www.nano-map.de)

1.3 Eisenoxidnanopartikel in der Nanomedizin

1.3.1 Eisenoxide und ihr früh entdecktes Potential

Eisen bildet in Verbindung mit Sauerstoff und Wasser das geläufigste Erscheinungsbild von Eisenoxiden in der Umwelt: Rost. Für die Herstellung von Nanopartikeln wird Eisen(III)-oxid mit der Summenformel Fe_2O_3 und Eisen(II,III)-oxid mit der Summenformel Fe_3O_4 verwendet. Als natürlich vorkommende Mineralien sind sie auch unter den Namen Hämatit oder Maghemit sowie als Magnetit bekannt. Die Namensgebung deutet bereits auf die wichtigste Eigenschaft der Eisenoxide für die Medizin hin: Sie sind magnetisch. Eine der ersten medizinischen Anwendungen, die sich diese Eigenschaft zunutze machte, war die Hyperthermie. Die magnetischen Partikel werden dabei einem Magnetwechselfeld ausgesetzt, wodurch Wärme entsteht. Schon 1957 verwendeten Gilchrist et al. Magnetit zur gezielten Erwärmung von Lymphknoten bei Hunden [22]. Die Partikel waren allerdings noch mehrere Mikrometer groß. In den folgenden Jahrzehnten wurden die Partikel immer kleiner und mit verschiedenen Hüllschichten versehen, die die biologische Verträglichkeit und physikalisch-chemischen Eigenschaften positiv beeinflussen sollten. Im Folgenden werden diese Entwicklungen im Bezug auf die Anwendung der Partikel genauer beleuchtet.

1.3.2 Derzeitige und künftige medizinische Anwendungsmöglichkeiten

1.3.2.1 Thermotherapie von Tumoren

Wie im vorherigen Absatz bereits erwähnt wurde, hat man das Potential von magnetischen Partikeln für die Thermotherapie von Tumoren früh erkannt. Je nach erreichter Temperatur und Therapiedauer werden die Krebszellen entweder geschwächt und somit anfälliger für eine ergänzende Chemo-/ Strahlentherapie, oder sie werden direkt abgetötet. Wird das Gewebe über 40°C erwärmt, spricht man von Hyperthermie. Temperaturen über 46°C sind zytotoxisch, so dass man dies als Thermoablation bezeichnet [23]. Um die entsprechende Temperatur im Gewebe zu erreichen, wurden verschiedene Techniken wie z.B. Ultraschall verwendet. Diese hatten den Nachteil, das auch gesundes Gewebe zu stark erwärmt wurde oder dass die Temperaturverteilung im Tumor nicht homogen genug war, um den gewünschten Therapieerfolg zu gewährleisten [23]. Magnetische Nanopartikel in wässriger Suspension, die direkt in die Zielregion injiziert werden können, versprachen eine selektive Erwärmung des Zielgewebes kombiniert mit einer homogenen Temperaturverteilung durch die gleichmäßige Abdeckung mit Nanopartikelflüssigkeit. Dieses Konzept wurde von vielen Forschergruppen weltweit *in vitro* und *in vivo* erforscht [24-30]. Dabei wurden immer bessere Nanopartikel entwickelt, die stärkere Temperaturentwicklungen ermöglichten. Jordan et al.

identifizierten als maßgebliche Parameter für die Verbesserung von Magnetflüssigkeiten die Beschaffenheit der Hülle, die den Eisenkern umgibt, die Größenverteilung der Partikel sowie die Zusammensetzung und Magnetisierung der Partikelsuspension [31]. Die Firma MagForce entwickelte eine Therapie, die auf der Einbringung von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln mit einer Aminosilanhülle in Hirntumore und die Erwärmung in einem hochfrequenten Magnetwechselfeld basiert [17,32-34] (Abbildung 1.4). Das Unternehmen erhielt dafür 2010 die weltweit erste europäische Zulassung für ein Medizinprodukt mit Nanopartikeln (www.magforce.de). Bislang kann aber auch diese Therapie nicht als Monotherapie sondern nur in Kombination mit herkömmlichen Therapiekonzepten verwendet werden.

Thermotherapie von unterschiedlichen Tumoridentitäten mit Hilfe von magnetischen Nanopartikeln wird daher weiterhin Gegenstand vieler Forschungsanstrengungen sein, die schlussendlich zu Verbesserungen des Therapieerfolges führen werden. Allerdings bedarf es weiterer Erkenntnisse darüber, wie künstlich erzeugte Nanopartikel mit unterschiedlichen Gewebstypen interagieren, welche Risiken dabei zu erwarten sind und wie durch die Veränderung der Partikeleigenschaften ein maximaler Therapieerfolg zu erreichen ist.

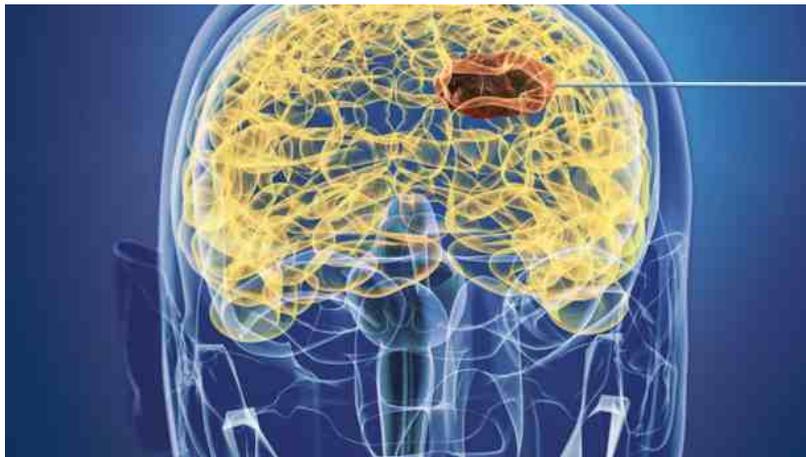


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Partikeleinbringung bei der NanoTherm® Therapie (Quelle: www.magforce.de)

1.3.2.2 Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie ist eine nichtinvasive, bildgebende Methode, die Informationen über physiologische und pathologische Vorgänge in lebendem Gewebe liefert, indem die Relaxationszeiten von Wasserprotonen gemessen werden [35]. Magnetische Nanopartikel ermöglichen dabei an dem Ort, an dem sie akkumulieren, einen höheren Kontrast als unmarkiertes Gewebe und können so eine Diagnose erleichtern. Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit wurden magnetische Nanopartikel schon früh für die Verwendung als Kontrastmittel erforscht. Chouly et al. testeten beispielsweise 1996 zwölf unterschiedliche

superparamagnetische Magnetit-Dextran-Nanopartikel auf ihre Verwendbarkeit in der MRT unter Berücksichtigung ihrer Größe, ihrer Oberflächenbeschaffenheit und ihrer Ladung [18]. 2001 erhielt die Bayer Schering Pharma AG in Schweden die erste Marktzulassung für ihr Kontrastmittel Resovist® auf Eisenoxidnanopartikelbasis, das zur Erkennung von Lebertumoren angewendet wurde (www.pressrelations.de). Mittlerweile sind weitere kommerzielle Kontrastmittel ähnlicher Zusammensetzung in der klinischen Anwendung. Trotzdem diese Technik bereits in der Praxis angewendet wird, wird weiterhin an der Verbesserung der Materialeigenschaften und daraus resultierenden spezifischen Anwendungsmöglichkeiten geforscht [35,36]. Weiterhin sind viel Fragen unbeantwortet, die die Toxizität, die Langzeitstabilität und die Pharmakokinetik von magnetischen Nanopartikelsuspensionen betreffen [36].

1.3.2.3 Drug delivery und Theranostik

Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits deutlich wurde, haben magnetische Nanopartikel allein durch den Magnetismus bereits das Potential, sowohl in Diagnostik (Bildgebung) als auch der Therapie (Erwärmung im Magnetwechselfeld) eingesetzt zu werden. Dies macht sie zu idealen Kandidaten für Theranostik. Zusätzliche Funktionen sind denkbar, wenn die Eisenkerne mit einer reaktiven Hüllschicht umgeben sind, an die weitere Moleküle gekoppelt werden können. So können zusätzliche Targetingsignale für bestimmte Zielzellen und/ oder Wirkstoffe an die Partikel angehängt werden. Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten wurden (und werden) in den letzten zwei Jahrzehnten viele Projekte durchgeführt, die Eisenoxidnanopartikel für verschiedene Anwendungen weiter entwickeln sollten. Im Gegensatz zur Thermotherapie oder zur Verwendung als Kontrastmittel befinden sich Projekte zu Drug delivery und Theranostik noch in der Erforschung auf zellulärer Ebene oder im Tierversuch. Einige Entwicklungen versprechen aber die baldige Umsetzung der Forschungsergebnisse in klinischen Studien. Im Folgenden werden einige Arbeiten exemplarisch genannt.

In einer neuen Arbeit von 2013 stellen Zhu et al. Eisenoxidnanopartikel vor, die sowohl in der MRT sichtbar sind als auch mit Doxorubicin einen Wirkstoff gekoppelt haben, der nach zellulärer Aufnahme durch Tumorzellen durch einen pH-sensitiven Linker in den Endosomen abgelöst wird und dadurch wirksam wird [37]. Mit einem permanenten Magnetfeld wurden diese Partikel *in vitro* auf Tumorzellen gelenkt und inhibierten deren Wachstum erfolgreich. Im Tierversuch zeigte sich die Eignung der Partikel für MRT-Untersuchungen.

Yokoyama et al. berichteten 2011 von Magnetnanopartikeln, die mit einer Targetfunktion gegen den Epidermal growth factor receptor (EGFR) versehen wurden [15]. Dieser Rezeptor ist in 80% der Non-small cell lung cancer cells (NSCLC) überexprimiert. Die Partikel wurden

in diese Zellen *in vitro* vermehrt aufgenommen und verursachten dort Autophagie und Apoptose.

Huang et al. entwickelten superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel, die mit einer Targetfunktion gegen den Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) versehen sind [38]. Dieser Rezeptor wird von Hepatocyten exprimiert. *In vitro* Versuche zeigten die Wirksamkeit gegenüber HepG2 Zellen.

Es gibt noch viele solcher Beispiele in der Literatur und dies zeigt das Potential von Eisenoxidnanopartikeln. Allen Ansätzen gemeinsam ist aber, dass die möglichen Risiken einer Exposition mit den entwickelten Nanopartikelspezies in präklinischen Studien untersucht werden muss und dass die Therapien eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber konventionellen Therapien in klinischen Studien aufweisen müssen. Auch hier fehlen noch Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung, um die Projekte zum Erfolg zu führen. Für weitere Einschätzungen zu diesem Thema gibt es entsprechende Übersichtsartikel in der Literatur [11,39-42].

1.4 Problem- und Fragestellungen

1.4.1 Zelluläre Aufnahme von Eisenoxidnanopartikeln durch Tumorzellen- Wie beeinflusst die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel die Internalisierung?

1.4.1.1 Stand der Forschung

Die Bedeutung und das Potential der Eisenoxidnanopartikel für medizinische Anwendungen wurden im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Trotzdem Partikel mit einem Eisenoxidkern bereits in klinischen Anwendungen eingesetzt werden, sind immer noch viele Punkte ungeklärt, die deren Verhalten in biologischen Umgebungen betreffen. Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass Tumorzellen teils beträchtliche Mengen silanisierte Eisenoxidpartikel intrazellulär aufnehmen können [43], ist es weitgehend unbekannt, welche Faktoren in welcher Weise die zelluläre Aufnahme beeinflussen. Dazu gehören sowohl Materialeigenschaften der Partikel selbst als auch Milieueigenschaften der biologischen Umgebung. Bekannte Parameter für die zelluläre Aufnahme sind die Oberflächenladung [44,45], die Größe [46,47] und die Form [47] der Partikel. Ein weiterer wichtiger Faktor ist zudem die Beschaffenheit der Partikeloberfläche, die zum einen chemisch modifiziert werden kann [48] und zum anderen Veränderungen unterliegt, die beim Kontakt der Partikel mit biologischen Umgebungen stattfinden [49]. Diese Veränderungen betreffen vor allem die Adsorption von unterschiedlichsten Proteinen aus dem Zellkulturmedium oder aus Körperflüssigkeiten, welche die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Partikel stark verändern. Die Komplexität dieser Faktoren, die sich zum Teil gegenseitig beeinflussen, machte es bisher sehr schwierig, allgemeine Tendenzen abzuleiten, welcher Faktor welche Konsequenzen auf Verhalten von Nanopartikeln bei der Interaktion mit Einzelzellen und Gewebsverbänden hat. Vergleiche von Arbeiten verschiedener Forscher sind auch deswegen problematisch, weil bereits kleine experimentelle Varianzen bei den Inkubationsbedingungen der Partikel, bei der Wahl der Zelllinie oder des Tiermodells sowie bei den verwendeten Nachweismethoden einen großen Einfluss auf das Ergebnis haben. Ebenfalls problematisch ist die oft schlechte Reproduzierbarkeit der Nanopartikelsynthese sowie die mangelhafte Charakterisierung der Nanopartikelsuspensionen, so dass z.B. Eisenpartikel mit Silicaschale verschiedener Chargen und erst recht verschiedener Hersteller abweichende Eigenschaften aufweisen können. Verma et al. kritisierten diesen Zustand 2010 ebenfalls in einem Übersichtsartikel zur Rolle der Oberflächenbeschaffenheit von Nanopartikeln bei der Interaktion mit Zellen [50]. Sowohl bei der Synthese als auch bei der Erfassung biologischer Phänomene von Nanopartikelsystemen fehlen noch Erkenntnisse, die das grundlegende Verständnis verbessern. Dieses würde in der Folge zu einer zielstrebigeren und effizienteren Entwicklung therapeutischer Ansätze in der Nanomedizin führen.

1.4.1.2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie die unterschiedliche Oberflächenmodifikation von Eisenoxidnanopartikeln mit Silicaschale ($\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$) die zelluläre Aufnahme in Tumorzellen *in vitro* beeinflusst. In enger Zusammenarbeit mit der Entwicklungsabteilung der Firma MagForce sollten in einem kontrollierten Setup Nanopartikel an Tumorzelllinien getestet werden, die sich nur durch ihre Endgruppen auf der Oberfläche unterscheiden sollten. Durch die Veränderung eines Parameters und experimenteller Kontrolle der Variablen sollten Erkenntnisse gewonnen werden, die sich zweifelsfrei auf die Veränderung der Partikeloberfläche zurückführen lassen. Die Firma MagForce besitzt bereits eine europaweite Zulassung für die Therapie von Gehirntumoren mit aminofunktionalisierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln und ist in der Lage, große Mengen Partikel nach Industriestandard in einer Charge herzustellen. Alle $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Kerne der getesteten Partikel sollten dadurch aus einer Charge stammen und Varianzen des Materials minimieren. Folgende Aspekte sollten durch die Experimente bearbeitet werden:

1. Kann eine intrazelluläre Aufnahme der verwendeten Partikel nachgewiesen werden?
2. Lassen sich Hinweise auf die intrazelluläre Kompartimentierung der Partikel ableiten?
3. Welche Zeitachse liegt der intrazellulären Akkumulation zugrunde?
4. Welche Unterschiede ergeben sich durch die verschiedenen Oberflächenmodifikationen hinsichtlich der **Aufnahmekinetik** in die Zellen?
5. Welche Unterschiede ergeben sich durch die verschiedenen Oberflächenmodifikationen hinsichtlich der **Aufnahmemenge** in die Zellen?
6. Lassen sich durch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien allgemeine Tendenzen ableiten?

Je nach Verfügbarkeit sollten Vergleichspartikel betrachtet werden, die sich in weiteren Parametern wie Form und Größe von den Referenzpartikeln unterscheiden.

Erkenntnisse aus der Beantwortung der Fragen sollen sowohl Ergebnisse für die Grundlagenforschung zur Interaktion von $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln mit Tumorzellen als auch Informationen für die praktische Anwendung liefern. Das Verhalten der Partikel in der Zellkultur ermöglicht erste Erkenntnisse darüber, welche Partikel sich für weiterführende Versuche *in vivo* eignen würden. So können Partikel identifiziert werden, die besonders gut von den Zielzellen internalisiert werden oder die über eine besonders gute Stabilität in Zellkulturmedium verfügen. Dies wiederum ist die Grundlage für die Entwicklung von $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln, die sich für Drug delivery und intravenöse Applikationen eignen.

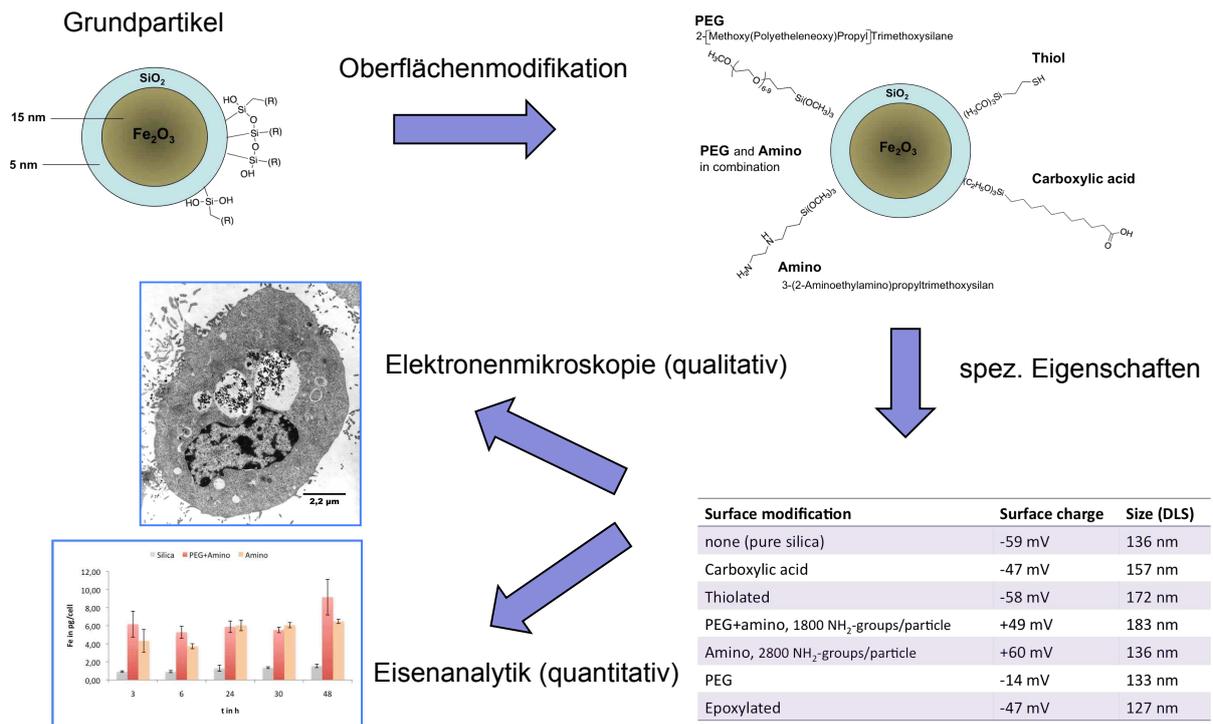


Abbildung 1.5: Strategie zur Untersuchung des Einflusses von Oberflächenmodifikationen auf die intrazelluläre Aufnahme

1.4.2 Die Frage des Aufnahmemechanismus: Wie gelangen SiO₂-Fe₂O₃ Partikel in Tumorzellen?

1.4.2.1 Stand der Forschung

In Conner und Schmid's berühmten Nature-Paper von 2003 werden bis dahin erforschte Wege der energieabhängigen Aufnahme von Makromolekülen und Partikeln über die Plasmamembran durch Zellen beschrieben [51] (Abbildung 1.6).

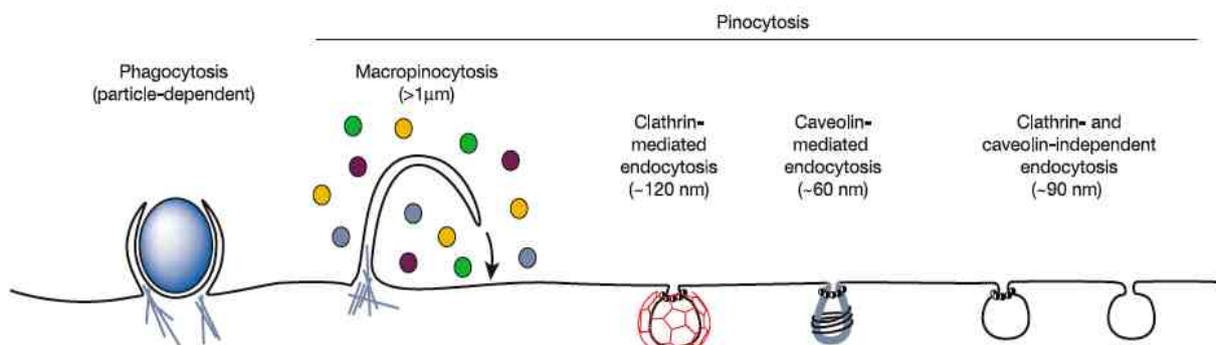


Abbildung 1.6: energieabhängige Endocytosewege nach Conner und Schmid (Nature 2003) [51]

Diese Endocytosewege wurden im darauf folgenden Jahrzehnt weiter untersucht und um weitere Signalwege und daran beteiligte Proteine erweitert. Wieffer et al. veröffentlichten 2009 in der Fachzeitschrift Cell eine aktualisierte Übersicht [52] (Abbildung 1.7).

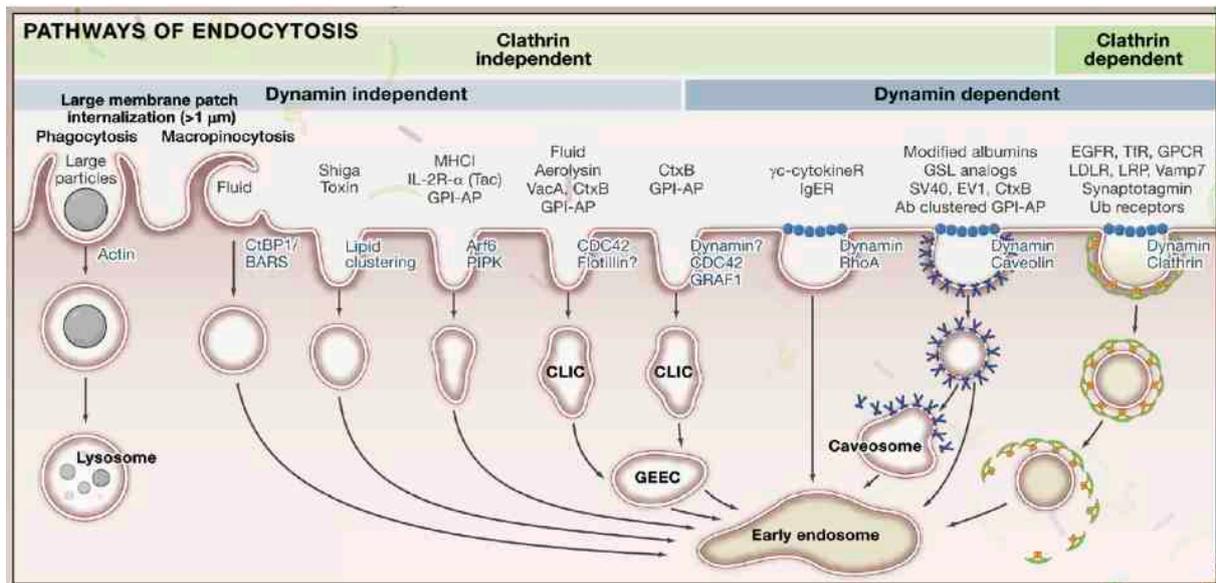


Abbildung 1.7: Endocytosewege aus Wieffer et al. (Cell, 2009) [52]

Die Erforschung von Endocytosewegen ist nach wie vor ein aktuelles Forschungsgebiet, dessen Erkenntnisse das heutige Bild energieabhängiger Aufnahme weiter verfeinern werden. Der heutige Wissensstand bereitet aber auch der Nanomedizin eine sehr gute Basis, um zu erforschen, wie Nanopartikel in die Zellen gelangen. Dass Tumorzellen teils große Mengen Eisenoxidnanopartikel aufnehmen können, wurde bereits erwähnt (Abschnitt 1.4.1.1). Dennoch ist sehr wenig darüber bekannt, wie sie dies bewerkstelligen. Häufig geben Nebenbeobachtungen bei elektronenmikroskopischen Studien Hinweise auf einen energieabhängigen Aufnahmeprozess, wenn die Partikel an entsprechenden Membranstrukturen oder in membranumhüllten Organellen innerhalb des Cytosols detektiert werden können [43]. Ebenso lässt sich relativ einfach unterscheiden, ob die Partikel passiv oder aktiv aufgenommen werden, indem aktive Aufnahmeprozesse komplett blockiert werden [53]. Publikationen neueren Datums verwenden die pharmakologisch/chemische Inhibition von Endocytosewegen, um die Internalisierung von Partikeln genauer zu betrachten. Dabei werden Moleküle verwendet, die temporär und selektiv die Signalkaskade eines bestimmten Signalweges unterbrechen sollen. Dadurch fanden Gratton et al. 2008 heraus, dass Hydrogelpartikel durch HeLa Zellen abhängig von Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Partikel über verschiedene energieabhängige Endocytosewege aufgenommen werden [47]. Zhu et al. entdeckten 2013, dass Silicapartikel mit einem Durchmesser zwischen 55 und 300 nm von HeLa Zellen durch Clathrin aufgenommen werden [54]. Bei Partikeldurchmessern von 55-168 nm waren

auch Caveolin und passive Aufnahmewege beteiligt. Luther et al. berichteten 2013 von Eisenoxidpartikeln, die von Mikrogliazellen der Ratte durch Makropinocytose und Clathrin aufgenommen werden [55].

Eine weitere Art der Inhibition ist das spezifische „Ausschalten“ bzw. der „Knockdown“ von Proteinen durch sogenannte „small interfering RNAs“ (siRNAs), denen eine Schlüsselrolle in der Ausführung eines Aufnahmeweges zukommt. Dies sind kurze Nukleotidsequenzen, die durch einen endogenen Mechanismus der Zelle die Expression des kodierten Zielproteins verhindern [56,57]. Kasper et al. fanden so 2012 heraus, dass Silicapartikel bis 300 nm in humane Lungenzellen unter Beteiligung von Flotillin-1 und -2 aufgenommen werden.

Trotz dieser Arbeiten sind die Kenntnisse über spezifische Aufnahmemechanismen von Nanopartikeln durch Zellen *in vitro* und *in vivo* lückenhaft. Zu den in der vorliegenden Arbeit betrachteten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln fehlten sie bisher sogar vollständig. Das Wissen um die zugrundeliegenden Phänomene hätte einen wesentlichen Vorteil für die gezielte Entwicklung dieser Partikel für die Tumorthherapie.

In einer *post mortem* Studie von Tumorpatienten, die in einer Phase-II-Studie eine Thermo-therapie mit aminofunktionalisierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln erhalten hatten, konnte ermittelt werden, dass die Partikel hauptsächlich von Zellen des Immunsystems (Makrophagen) und nicht von den Tumorzellen selber aufgenommen wurden [58]. Das war für den Erfolg der beschriebenen Anwendung auch nicht erforderlich. Denkt man allerdings an weitere Anwendungsmöglichkeiten wie das Beladen der Partikel mit Wirkstoffen und intravenöse Applikation, so wäre das Verständnis der zellulären Aufnahme von Nanopartikeln sehr wertvoll. Denn dadurch könnten gezielt Partikel entwickelt werden, die von Zielzellen in besonderem Maße aufgenommen werden, was wiederum Nebenwirkungen minimieren und therapeutische Erfolge maximieren würde.

1.4.2.2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel *in vitro* durch Tumorzellen aufgenommen werden. Anhand bekannter molekularer Mechanismen aus der Literatur sollte dazu ein Aufnahmmodell entwickelt werden. Es sollten die Partikel verwendet werden, die sich bei der Bearbeitung der Fragestellung aus Abschnitt 1.4.1.2 als besonders interessant und geeignet für mechanistische Studien herausgestellt hatten. Folgende Fragestellungen bildeten die Motivation für die Experimente:

1. Wie werden $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel durch Tumorzellen internalisiert, **welche Aufnahmewege** sind daran beteiligt?
2. Lassen sich durch den Vergleich mehrerer Zelllinien **allgemeine Tendenzen** ableiten?

Zur Beantwortung der Frage sollte so viele Zielproteine durch spezifische siRNAs ausgeschaltet werden, wie möglich bzw. nötig war (Abbildung 1.8). Denn in der Literatur wird darauf hingewiesen, dass einige erhältliche Hemmstoffe mehr als einen Aufnahmeweg blockieren können und so die Ergebnisse verfälscht werden würden [59]. Die Depletion von Zielproteinen durch siRNAs hat also gegenüber der chemischen Inhibition die Vorteile, dass die Spezifität der Hemmung größer ist und dass Beobachtungen über einen längeren Zeitraum gemacht werden können. Die Etablierung dieser Technik sollte zudem eine Testplattform für zukünftige Untersuchungen zur Aufnahme neu entwickelter Nanopartikelspezies in verschiedenste Tumorzellen bilden.

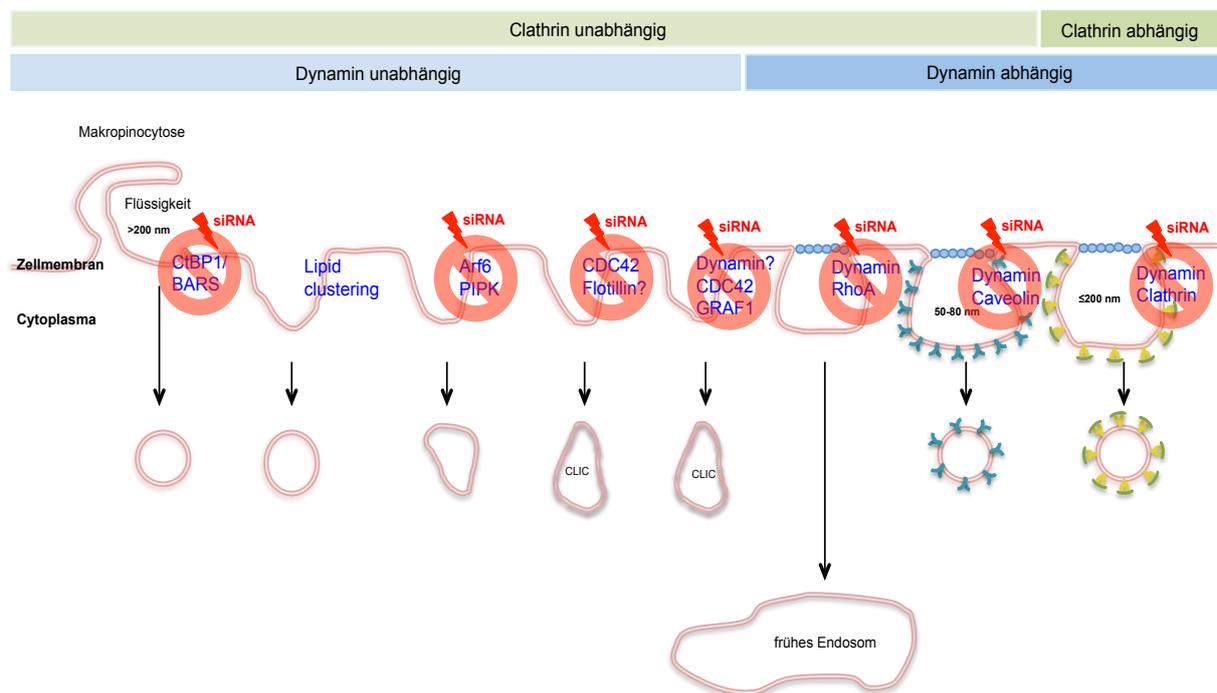


Abbildung 1.8: Strategie der Inhibition durch siRNAs (übernommen und modifiziert aus Wieffer et al. [52])

1.4.3 Potentielle Toxizität von SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln

Aufgrund der Komplexität des Themas konnte die im Rahmen der Arbeit nur kurz behandelt werden. Beobachtungen, die bei der Durchführung der Routineexperimente gemacht werden konnten, werden unter Abschnitt 4.2.5 der Diskussion beleuchtet. Da Eisenoxidpartikel für die MRT und die Thermotherapie seit längerem klinisch genutzt werden, werden sie als weitgehend unbedenklich eingestuft. Studien zur Herstellung neuer Partikelspezies bestätigen dies immer wieder. Allerdings werden dabei entweder nur sehr gravierende Anzeichen, wie Apoptose und Nekrose der Zellen, betrachtet oder es wird nur ein sehr kurzer Zeitraum nach der Nanopartikelexposition erfasst. Studien zur Langzeittoxizität von SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln nach massiver intrazellulärer Aufnahme fehlen noch weitgehend.

Ein Verdacht, den die starke Anreicherung von Nanopartikeln im endosomalen System der Zellen hervorruft, ist, dass durch die Speicherung großer Mengen Partikel die Funktion der Endo- und Lysosomen beeinträchtigt sein könnte. Dies könnte einen Vorgang induzieren, den man Autophagie nennt. Als solcher wird ein Stoffwechselfvorgang bezeichnet, bei dem die Zellen beispielsweise in Mangelsituationen eigene Organellen abbauen, um Bausteine für wichtige Synthesevorgänge zu generieren. Die Rolle von Nanopartikeln bei der Autophagieinduktion ist weitgehend unerforscht und steht unter anderem im Verdacht, neurodegenerative Erkrankungen auszulösen [60,61]. Bei der spezifischen Behandlung von Tumoren könnten toxische Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Tumorzellen allerdings auch einen positiven Effekt für den Therapieerfolg haben.

Durch die Verwendung von geeigneten Markern für Autophagie in der Fluoreszenzmikroskopie sollte die Frage beantwortet werden, ob die Akkumulation von $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln zur Autophagieinduktion bei Tumorzellen führt.

2 Material und Methoden

2.1 Nanopartikel

2.1.1 $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$

2.1.1.1 Small Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION)

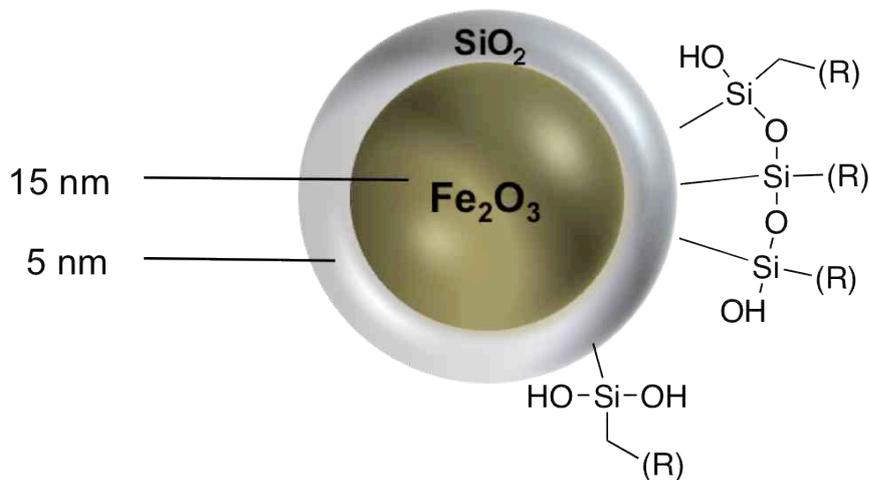


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Partikel-Grundstruktur mit detaillierter chemischer Struktur der äußeren Silicaschicht

Die in dieser Arbeit verwendeten SPIONs wurden von der Entwicklungsabteilung der Mag-Force AG hergestellt. In einem Nasssynthetischen Verfahren wurden Eisenkerne von 15 nm Größe erzeugt und mit einer 5 nm dicken Silicaschale versehen (Abbildung 2.1), so dass ein Primärpartikel mit ca. 25 nm Durchmesser entstand. Die Größenbestimmung erfolgte über die Vermessung elektronenmikroskopischer Bilder (Abbildung 2.2). Die außen liegenden Hydroxylgruppen der Silicaschale wurden in der Folge dazu genutzt, Oberflächenmodifikationen kovalent als ein Ethoxy- oder vielmehr Methoxysilan zu koppeln. Dies führte dazu, dass sich die physikalischen Eigenschaften der Partikel änderten. Ein Überblick dazu liefert Tabelle 2.1. Die Partikel wurden hitzesterilisiert und mit einer Eisenkonzentration von 0,498 mol/L bei 4°C in Reinstwasser gelagert. Die Lagerstabilität betrug unter diesen Bedingungen minimal 12 Monate. Dies entsprach den Erfahrungen bei den klinisch verwendeten Partikeln mit Aminofunktionalisierung. Dennoch wurden die Partikel vor jedem Versuch auf sichtbare Sedimentation untersucht und mittels Ultraschall vorbehandelt, um reversible Agglomerationszustände aufzulösen.

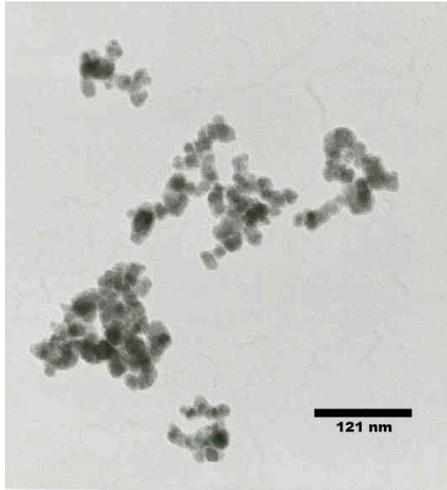


Abbildung 2.2: TEM-Aufnahme silicatisierter Eisenoxidpartikel

Tabelle 2.1: Oberflächenmodifikationen des Grundpartikels und daraus resultierende Partikeleigenschaften (in Wasser bei Raumtemperatur und pH 7, DLS = Dynamische Lichtstreuung)

Oberflächenmodifikation	Struktur des Linkers	Oberflächenladung	Durchmesser (DLS)
keine (pures Silica)	-	- 59 mV	136 nm
Carboxylsäure	$(C_2H_5O)_3Si-CH_2(CH_2)_7COOH$	- 47 mV	157 nm
Thiol	$(H_3CO)_3Si-CH_2CH_2CH_2SH$	- 58 mV	172 nm
Amino, 2800 NH ₂ -groups/particle	$H_2N-CH_2CH_2-NH-CH_2CH_2CH_2-Si(OCH_3)_3$	+ 60 mV	136 nm
PEG	$H_3CO-(CH_2CH_2O)_{6-9}-CH_2CH_2-Si(OCH_3)_3$	- 14 mV	133 nm
Epoxy	-	- 47 mV	127 nm
PEG+Amino, 1800 NH ₂ -groups/particle	-	+ 49 mV	183 nm

2.1.1.2 Silica-coated iron oxide nanoparticles (SCION)

Die Partikel wurden vom National Institute of Health in Maryland (USA) zur Verfügung gestellt. Sie waren ca. 17 nm groß und hatten ein Zetapotential zwischen -55 und -45 mV. In ihre Schale war der Farbstoff Alexa Fluor® 555 eingelagert, was die Partikel für die Verwendung in der Fluoreszenzmikroskopie ideal machte. Weitere Informationen zur Synthese und der Eigenschaften der Partikel lassen sich aus den Publikationen der Arbeitsgruppe entnehmen [62,63].

2.1.2 Polystyrolsulfonat- beschichtete Goldstäbchen

Die Goldstäbchen wurden von Mitgliedern der AG Rühl (Freie Universität Berlin) hergestellt. In der vorliegenden Arbeit kamen mit großem zeitlichem Abstand zwei Syntheseansätze dieser Partikel zum Einsatz. Diese wiesen daher unterschiedliche Eigenschaften auf.

2.1.2.1 1. Generation

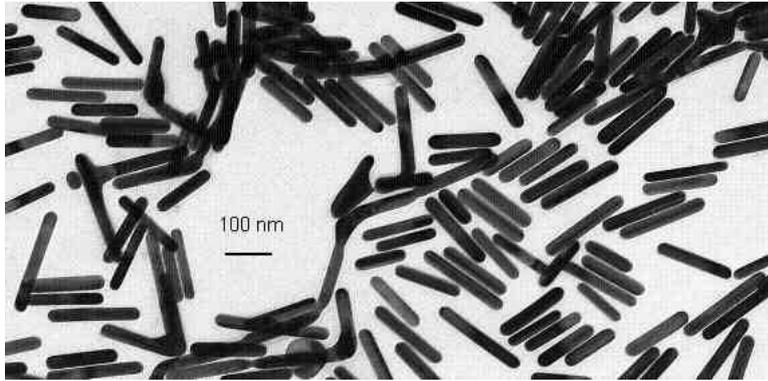


Abbildung 2.3: TEM- Aufnahme von PSS-beschichteten Goldstäbchen der ersten Generation

Die Stäbchen waren 120 ± 10 nm lang und 16 ± 3 nm breit. Sie lagen in deionisiertem Wasser in einer Konzentration von 5,84 mg/L vor.

2.1.2.2 2. Generation

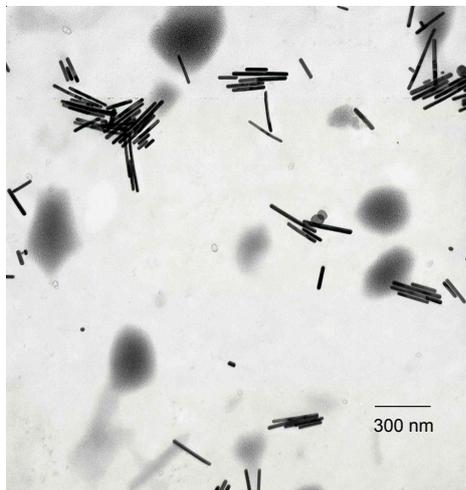


Abbildung 2.4: TEM- Aufnahme von CTAB/Au-Nanorods vor der Beschichtung mit PSS

Die Partikel waren 156 ± 69 nm lang und 15 ± 4 nm breit. Das Zeta-Potential betrug nach der Beschichtung mit PSS -37 ± 3 mV. Die Partikel lagen in einer Konzentration von $3,14 \pm 0,17$ g/L in Reinstwasser vor und wurden zeitnah verwendet.

2.1.3 Goldsphären mit SiO₂- Schale und eingelagertem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

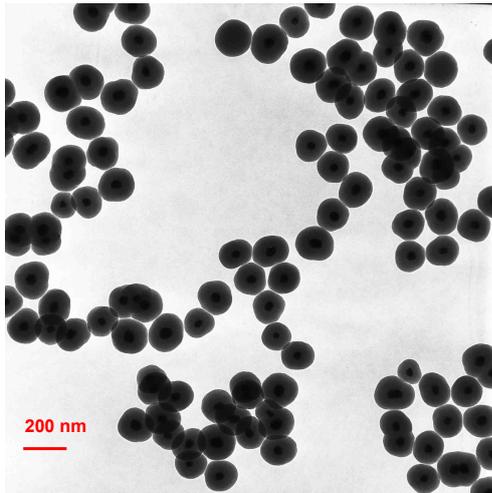


Abbildung 2.5: TEM- Aufnahme von Au-Nanospheres mit SiO₂- Schale

Die Partikel wurden von Mitarbeitern der AG Rühl (Freie Universität Berlin) hergestellt und waren 161 ± 13 nm groß. In die Silicaschale war der Farbstoff FITC eingelagert. Die Partikel lagen in einer Konzentration von 1 g/L in Reinstwasser vor.

2.1.4 Goldsphären mit PMA oder PEG

Die Partikel wurden von der AG Parak (Universität Marburg) hergestellt. Die synthetisierten Goldkerne waren 4 nm groß und waren entweder mit PMA (ein amphiphiles Polymer) oder mit einem langkettigen 10K PEG beschichtet. Waren die Partikel mit PMA beschichtet, so waren sie in der dynamischen Lichtstreuung (DLS) ca. 13 nm groß. Bestand die Beschichtung aus PEG, so betrug ihr Durchmesser ca. 30 nm. Beide Partikelsorten wurden mit 0,71 mg Au/ml ($1,83 \mu\text{M}$) in Reinstwasser bereit gestellt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

2.2.1.1 C3H RS1 (murines Mammakarzinom)

1994 wurden bei einer C3H Inzuchtmaus Mamma-Spontantumore herauspräpariert und mehrere Subkulturen daraus gebildet. Die daraus entstandenen Zelllinien wurden C3H RS1-RS3 genannt. Externe pathohistologische Untersuchungen des Tumorgewebes bestätigten Tumorart und Malignitätsgrad des Tumormodells. Die Zellen sind hypertetraploid ($4n+$) und die Chromosomenzahl variiert von 88 bis 94. Die Zelllinie wird von der Arbeitsgruppe bei der Durchführung von *in vivo* Experimenten zur Erzeugung von Tumoren bei C3H- Mäusen genutzt.

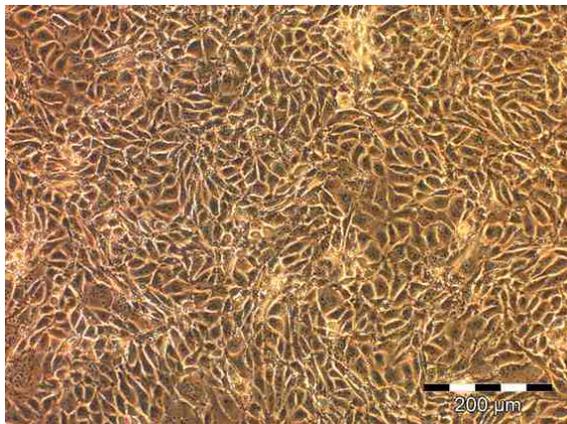


Abbildung 2.6: Konfluenten Zellrasen von C3H RS1 Zellen

2.2.1.2 BT20 (humanes Mammakarzinom)

Diese Zelllinie wurde 1958 von E.Y. Lasfargues und L. Ozzello aus Zellen etabliert, die beim Schneiden eines Tumors herausgespült wurden. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Klon wurde von der ATTC® mit der Nummer HTB-19™ bezogen. Weitere Informationen befinden sich im dazugehörigen Datenblatt.



Abbildung 2.7: zwei Kolonien von BT20 Zellen

2.2.1.3 HeLa (humanes Cervixkarzinom)

Der verwendete Klon dieser Zelllinie war eine Schenkung der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Haucke (Freie Universität Berlin). Die Tumorzelllinie wurde ursprünglich 1951 aus mutierten Gebärmutterhalszellen einer 31-jährigen Patientin isoliert und findet seitdem weltweit häufige Verwendung in der Zellforschung.

2.2.2 Kulturmedien

Tabelle 2.2: Auflistung der Zellkulturmedien und verwendeten Additive

Inhaltsstoff	Firma	Katalognummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen	31885-049
RPMI 1640 Medium + L-Glutamin Gib	Invitrogen	21875-034
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma-Aldrich	M2279
Fetal Bovine Serum (FBS), inaktiviert	Invitrogen	10270106
L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM	Biochrom	K0302
MEM-Vitamine (100x)	Biochrom	K0373
Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom	L0473
Non-Essential Amino Acids 100x (NEAA)	Biochrom	K 0293
HEPES (1 M)	Sigma-Aldrich	83264-100ML-F

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der jeweiligen Zellkulturmedien

C3H RS1	BT20	HeLa
500 ml RPMI 1640	500 ml MEM	500 ml DMEM
+ 10% FBS	+10% FBS	+10% FBS
+ 1% MEM-Vitamine	+ 1% Natriumpyruvat	
+ 0,3% Natriumpyruvat	+ 1% L-Alanyl-L-Glutamin	
	+ 1% NEAA	
	+ 2% HEPES	

Die Kultivierung der Zellen erfolgte grundsätzlich ohne die Zugabe von Antibiotika.

2.2.3 Zellpassage

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 25 ml Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Alle drei Zelllinien wurden im Rhythmus Montag, Freitag zweimal pro Woche passagiert. Mittwoch erfolgte ein Mediumwechsel. Bei der Passage wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit je 5 ml vorgewärmten Trypsin/EDTA (Biochrom, Katalognummer L2143) gespült und mit ca. 500 µl verbliebenen Trypsin/EDTA 7 bis 15 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen abgelöst hatten. Die

Zellen wurden danach in 10 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen, gezählt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Der Aussaattiter wurde so gewählt, dass die Zellen zum Passagezeitpunkt einen subkonfluenten Zellrasen gebildet hatten.

Tabelle 2.4: Individuelle Behandlung der Zelllinien während der Passage

	C3H RS1	BT20	HeLa
Einwirkzeit Trypsin/EDTA	15 min	14 min	7 min
Einsaattiter	5×10^5	$1,5 \times 10^6$	5×10^5

2.2.4 Mykoplasmentest mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Die Zelllinien wurden in unregelmäßigen Abständen auf eine mögliche Mykoplasmenkontamination überprüft.

2.2.4.1 Reagenzien

DAPI-Stammlösung: 1mg/mL 4',6-Diamidin-2-phenylindol wurde in Reinstwasser gelöst, steril filtriert und in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

Carnoy's Reagenz: Carnoy's Reagenz musste jeden Tag frisch angesetzt und die Menge arbeitstäglich selbst bestimmt werden. 100%ige Essigsäure (Eisessig) und Methanol wurden dazu im Verhältnis 1:2 gemischt.

Mounting Solution: kommerziell erhältlich von Sigma-Aldrich, Katalognummer M1289

Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,4: kommerziell erhältlich von Invitrogen, Katalognummer 10010-056

DAPI-Eindeckmedium: DAPI-Stammlösung 1:200 verdünnt mit Mounting Solution (Endkonzentration DAPI 5 µg/ml)

2.2.4.2 Arbeitsschritte

1. Aussaat der Zellen in einer 12-Well-Zellkulturplatte auf runden (Ø 18 mm), autoklavierten Deckgläsern, so dass nach 24 h ca. 50% des Wells mit Zellen bewachsen sind
2. Fixierung der Zellen mit Carnoy's Reagenz (1mL/Well für 10 min)
3. Waschen der Zellen mit 1mL PBS/Well, Platte leicht schwenken
4. Sauberen Objektträger beschriften (Zelllinie, Passagenummer, Mykoplasmentest, Datum)

5. Raum so weit wie möglich abdunkeln
6. 2 separate Tropfen des DAPI-Eindeckmediums auf Objektträger geben
7. Deckglas „upside-down“ luftblasenfrei auflegen und leicht andrücken
8. Abgedunkelt bei 4°C im Kühlschrank trocknen lassen
9. Nach ca. 24h Auswertung der Slides unter dem Fluoreszenzmikroskop

2.2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Slides wurden unter dem Mikroskop IX50 von Olympus betrachtet. Bei einem negativen Befund durften nur die Zellkerne blau leuchten. Bei einem positiven Befund wäre im Cytoplasma um den Zellkern eine milchig blaue Färbung erkennbar gewesen, die von dem Erbgut der Mykoplasmen verursacht worden wäre.

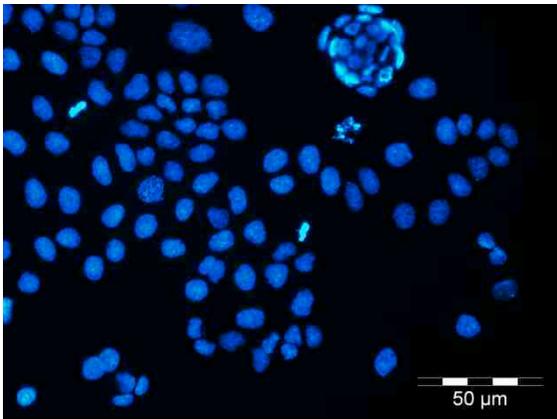


Abbildung 2.8: negativer Mykoplasmentest bei BT20
Blau = Zellkerne (DAPI)

2.3 Exposition der Zellen mit Nanopartikeln

2.3.1 Vorkultur

Die Zellen wurden 24 h vor der geplanten Nanopartikelexposition so in sterile 6-Well-Platten eingebracht, dass sie zum Expositionszeitpunkt 70-80% der Kulturfläche bedeckten. So war gewährleistet, dass sich die Zellen noch in der exponentiellen Vermehrungsphase befanden und gleichzeitig nur wenig Oberfläche für unspezifische Anhaftungen der Nanopartikel zur Verfügung stand.

Tabelle 2.5: Vorkulturbedingungen der verschiedenen Zelllinien

	C3H RS1	BT20	HeLa
Aussaattiter (Zellzahl)	2,5x10 ⁵	2x10 ⁵	1,5x10 ⁵
Mediumvolumen	2 ml	2,5 ml	2 ml

2.3.2 Exposition

Alle Partikel wurden bei 4°C gelagert und mussten daher vor dem Experiment auf 37°C erwärmt werden. SiO₂-Fe₂O₃- Nanopartikel wurden zudem vor jeder Anwendung 10 min im Ultraschallbad behandelt, um sedimentierte und agglomerierte Partikel homogen im Lösungsmittel zu verteilen. Alle Partikelsorten wurden vor der Entnahme aus dem Vorratsbehälter sorgfältig durch Schütteln und Pipettieren homogenisiert. Danach wurde die gewünschte Menge Partikel in das 37°C warme Zellkulturmedium gegeben, homogenisiert und auf die Zellen gegeben. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Art der Nanopartikel und der gewählten Analysemethode der Zellen. Sie betrug daher zwischen 4 und 48 h. Die Zellen durften währenddessen nicht bewegt werden, um keine unkontrollierte Agglomeration oder Verlagerung der Partikel zu provozieren.

2.3.3 Aufarbeitung der Zellen für analytische Nachweismethoden

1. Medium absaugen und 2 x Spülen der Zellen mit 3 ml warmem Medium
2. 2 x 1,5 ml vorgewärmtes Trypsin für 35s
3. Inkubation bei 37°C mit den zweiten 1,5 ml Trypsin für 15 min
4. Zellen in 5 ml Medium aufnehmen,
5. bei 180 g 5 min zentrifugieren und Pellet in 2 ml Medium aufnehmen
6. Zellen zählen
7. Zellen für 5 min bei 180 g zentrifugieren
8. Pellet in 1ml konzentrierter HCl für die Eisenbestimmung resuspendieren
9. 10min im Ultraschallbad aufschließen

2.3.4 Kontrollkulturen bei 4°C

2.3.4.1 Motivation

Um eine Abschätzung zu erheben, wie viele der analytisch bestimmten Nanopartikel trotz der Waschschriffe extrazellulär anhafteten, wurden Zellkulturen bei 4°C mit Nanopartikeln durchgeführt. Die Zellen wurden dabei genauso behandelt wie Zellen, die bei 37° weiter kultiviert wurden. Die Inkubation bei 4°C sollte verhindern, dass die Zellen weiterhin Partikel über ihre energieabhängigen Endocytosemechanismen aufnehmen können. Die physikalische und chemische Interaktion der Partikel im Zellkulturmedium mit der Zellmembran war so weiterhin gewährleistet.

2.3.4.2 Arbeitsschritte

1. Zellen 10min auf Eis, Medium auf Eis
2. NPs aus 4°C direkt zum Medium
3. kaltes Medium + NP zu den Zellen
4. 4 h Inkubation bei 4°C ohne CO₂-Versorgung
5. weitere Aufarbeitung der Zellen entsprach den Arbeitsschritten unter 2.3.3

2.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Bei der TEM wird das Objekt mithilfe von Elektronenstrahlen abgebildet, die das Objekt durchdringen. Das Objekt muss dafür sehr dünn sein. Da schnelle Elektronen eine deutlich kürzere Wellenlänge als Licht aufweisen, können mit Elektronenmikroskopen sehr viel höhere Auflösungen erreicht werden als mit konventionellen Lichtmikroskopen.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden mit Nanopartikeln inkubierte Zellen pelletiert und das Pellet in vorgewärmtem Fixativ (20-24°C) resuspendiert. Gelagert wurden die so fixierten Zellen bei 4°C, bis sie zum Eindecken abgegeben wurden. Das Eindecken und das Anfertigen der Semi- sowie Ultradünnschnitte wurden von Frau Petra Schrade von der Multi-User Abteilung für Elektronenmikroskopie der Charité durchgeführt (AG Prof. Dr. Sebastian Bachmann). Das Fixativ wurde ebenso von ihr zur Verfügung gestellt. Die Ultradünnschnitte waren 70 nm dick. Mikroskopiert wurde am Elektronenmikroskop EM906 von Zeiss.

2.5 Analytische Nachweismethoden

2.5.1 Photometrische Eisenbestimmung

2.5.1.1 Materialien

Tabelle 2.6: Auflistung der benötigten Geräte und Chemikalien für die photometrische Eisenbestimmung

Material	Firma	Katalognummer
Cary 50 Bio Spectrophotometer	Varian	-
Cary-WinUV-Software	Varian	-
pH-Meter 766	Knick	766
Einmal-Küvetten	Brand	759015
Spectroquant® Eisen Test	Merck	1147610001
Eisen-Standard für AAS, 1000mg/L	Fluka	16596
Eppendorf Multipette® plus	Eppendorf	
Salzsäure rauchend 37%	Merck	1003171000
Citronensäure, C ₆ H ₆ O ₇ *H ₂ O	Merck	1002441000
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Merck	1065801000
12ml Greiner centrifuge tubes (polystyrene)	Sigma-Aldrich	Z617792-1000EA

2.5.1.2 Pufferzusammensetzung

Für jede Verdünnung der Proben musste ein eigenes Puffergemisch mit einem geeigneten pH-Wert angesetzt werden, so dass die Messlösung (Probe + Puffer) später einen pH-Wert zwischen 3,2 - 4,5 hatte. Nur so konnte der Test wie vorgeschrieben funktionieren und lieferte aussagekräftige Ergebnisse. Um die sehr saure Probe aufgrund des geringen Eisengehalts nur gering verdünnen zu müssen, musste der Puffer eine hohe Kapazität besitzen.

Der verwendete Puffer war der „McIlvaine-Puffer“ (Quelle: Küster, Kapitel 4, Seite 238ff.) mit einem pH-Bereich zwischen 2,2 - 8,0. Die dort angegebenen Konzentrationen für die Stammlösungen A und B wurden um den Faktor 10 erhöht, um dem Puffer eine größere Kapazität zu geben.

Stammlösung A: Citronensäure 1 Mol/L

Stammlösung B: Na₂HPO₄*2H₂O 2 Mol/L

Zusammensetzung des Puffers (250 ml): x ml A + (250 – x) ml B

x ist nachzuschlagen im Küster S. 241 + 242 und richtet sich nach dem gewünschten pH-Wert des Puffers

Beispiel für den Ansatz von 250 ml Puffer (Verdünnung der Proben 1:20):

111 ml A + 139 ml B → Puffer pH 5,2-5,3 → Messlösung pH ≈ 3,8

2.5.1.3 Durchführung

Der Test beruht auf dem photometrischen Nachweis von Eisen(III)-Ionen durch Bildung eines rotvioletten Komplexes (Spectroquant® Eisen Test, Merck).

Testparameter:

Nachweisgrenze in der 10 mm Küvette: 0,05-5,00 mg/l Fe (0,05-5,00 µg/ml)

Messung in der Küvette: bis 2 µg/ml Fe (Genauigkeit der Extinktionsmessung)

pH-Wert der Messlösung (Probe + Puffer): 3,2-4,5

Ansatz der Referenz:

Der Eisen-Standard hatte eine Konzentration von 1000µg/ml Fe und muss auf 0,5µg/ml verdünnt werden (1:2000).

1. 100µl AAS Eisenstandard + 1900µl reinst H₂O (1:20) → Lösung1
2. 200µl Lösung1 + 1800µl HCl (konz., 37%ig) (1:10) → Lösung2
3. 500µl Lösung2 + 4500µl Puffer pH 6,25 (1:10) → Referenz 0,5µg/ml Fe

Verdünnung der Proben:

1:10 → 300µl Probe + 2700µl Puffer pH 6,2-6,3

1:20 → 150µl Probe + 2850µl Puffer pH 5,2-5,3

Messvorgang:

1ml je Messlösung wurde in Küvetten mit 50 µl Reagenz Fe-1 (Marker) versetzt. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Direkt danach wurden die Proben mit dem Marker homogenisiert. Nach 20 min waren die Eisenionen in der Probe komplexiert und somit der Farbumschlag erfolgt. Die photometrische Messung wurde bei einer Wellenlänge von 565 nm durchgeführt. Die Eisenkonzentrationen der Messlösungen wurden daraufhin anhand einer zuvor erstellten Eichgerade bestimmt.

2.5.2 Eisen- und Goldbestimmung mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Bei der ICP-MS werden die Proben bei 5000 bis 10000°C ionisiert, durch ein elektrisches Feld beschleunigt und durch den Analysator des Massenspektrometers erfasst. Das verwendete Gerät war das Thermo Scientific iCAP 6000.

2.5.2.1 Eisennachweis aus einem Zellpellet

Wie auch bei der Vorbereitung des photometrischen Eisennachweises wurde das Pellet in 1ml konzentrierter HCl resuspendiert und 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Da die Nachweisgrenze des ICP-MS deutlich niedriger ist als die des photometrischen Testverfahrens, wurde ein Teil der Probe 1:20 mit Reinstwasser verdünnt. Dies stellte die Messlösung dar.

Kalibriert wurde das Gerät mittels einer Dreipunktkalibration mit kommerzieller Eisen-ICP-Standardlösung (1000 mg/L, Roth, Art.Nr. 24.12.1). Die jeweiligen Standardlösungen werden mit 2500 µl konzentrierter HCl angesäuert und mit Reinstwasser auf 50 ml aufgefüllt. Um Matrixeffekte zu verhindern wurden sowohl für die Bereitstellung der Mess- als auch der Kalibrierlösungen dieselben Chemikalien derselben Charge genutzt.

2.5.2.2 Goldnachweis aus einem Zellpellet

Das Zellpellet wurde mit 500 µl frischem Königswasser versetzt. Nach 1,5 h Reaktionszeit wurden die Proben 1:10 mit Reinstwasser verdünnt. Dies stellte die Messlösung dar.

Kalibriert wurde mittels einer Dreipunktkalibration mit kommerzieller Gold-ICP-Standardlösung (1000 mg/L, Roth, Art.Nr. 2420.1). Die jeweiligen Standardlösungen wurden mit 5000 µl frischem Königswasser versetzt und nach 1,5 h Reaktionszeit mit Reinstwasser auf 50 ml aufgefüllt. Um Matrixeffekte zu verhindern wurden sowohl für die Bereitstellung der Mess- als auch der Kalibrierlösungen dieselben Chemikalien derselben Charge genutzt.

2.6 Transfektion der Zellen mit siRNA

2.6.1 Methodik

Bei der Transfektion mit siRNA macht man sich einen zelleigenen Mechanismus zunutze, der durch die Einschleusung genspezifischer RNA-Sequenzen von 19 bis 21 Nukleotiden Länge im besten Fall zur Auslöschung der Ziel-mRNA führt und so auch zum Stopp der jeweiligen Proteinherstellung. Der Knockdown bleibt über mehrere Tage in den Zellen stabil und wird bei der Zellteilung auf die Tochterzellen übertragen. Die grundlegenden Arbeiten dazu schrieben Fire et al. 1998 und Elbashir et al. 2001 [56,57]. Durch Beobachtung der Zellen, denen das Zielprotein fehlt, lassen sich Rückschlüsse auf dessen Funktion ziehen. In der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erhältliche Transfektionssysteme benutzt, die auf einer liposomalen Technik beruhen.

2.6.2 Transfektion mit der Lipofectamine™ 2000 Technologie

2.6.2.1 Versuchsablauf

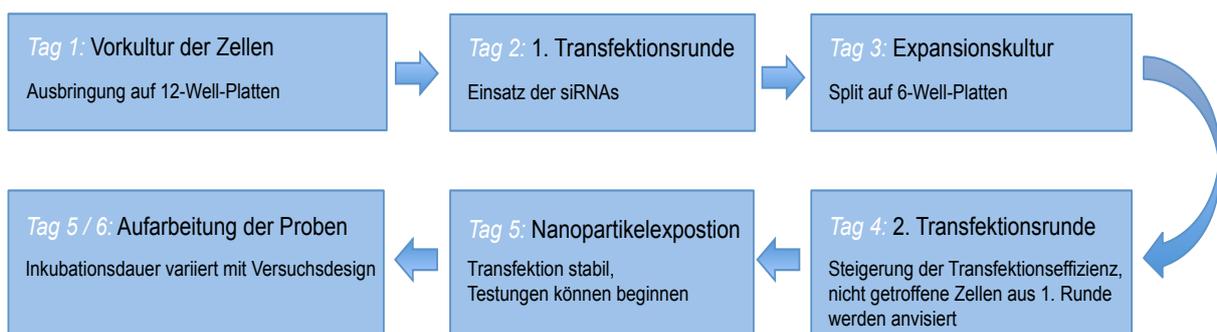


Abbildung 2.9: Versuchsschritte zur Transfektion der verwendeten Zelllinien mit der Lipofectamine™ 2000 Technologie

Abbildung 2.9 zeigt einen schematischen Überblick der Versuchsschritte, welche zu einer stabilen Transfektion der verwendeten Zelllinien nötig waren. Im Folgenden werden diese einzeln detailliert beschrieben.

2.6.2.2 Verwendete siRNAs

Tabelle 2.7: Name und Nukleotidsequenz der Sense-Stränge der verwendeten siRNAs

Oligo name	Oligo details (desalted)
Flotillin-1siRNA1b (Flot) [64]	5'-CACACUGACCCUCA AUGUC-3'
Caveolin-1siRNA1a (Cav)	5'-CCUGAUUGAGAUUCAGUGC-3'
Clathrin heavy chain (CHC)	5'-AUCCAAUUCGAAGACCAAUTT-3'
Dynamin2 (Dyn)	5'-GCAACUGACCAACCACAUC-3'
μ2-adaptin, scrambled (μ2)	5'-GUAACUGUCGGCUCGUGGUTT-3'

Die siRNAs wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bestellt. Die siRNA wurde als entsalztes, getrocknetes Pellet geliefert und mit dem mitgelieferten si-MAX Universal Buffer (30 mM HEPES, 100 mM KCL, 1 mM MgCl₂; pH = 7,3; steril) auf eine Konzentration von 100 pmol/μl verdünnt. So konnten die siRNAs bei -20°C in Aliquots gelagert werden. Die Sequenzen waren zuvor von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Haucke (FU Berlin) auf ihre Effektivität hin geprüft worden. Die Sequenz für Flotillin-1 wurde einer Publikation von Glebov et al. entnommen [64].

2.6.2.3 Vorkultur (Tag 1)

Die Zellen wurden so in sterile 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät, dass sie nach 24 h 80-90% der Zellkulturfläche bedeckten.

BT20: 1,3x10⁵ Zellen/Well; 1,5 ml Medium

HeLa: 1x10⁵ Zellen/Well; 1 ml Medium

2.6.2.4 1. Transfektionsrunde (Tag 2)

Pro Ansatz wurden Duplikate angesetzt. Als Kontrolle zu den Ziel-siRNAs wurde eine siRNA eingesetzt, die kein intrazelluläres Ziel hatte (μ2-adaptin, scrambled), um einen unspezifischen Einfluss der siRNA selbst auszuschließen. Zudem wurde eine Mock-Kontrolle durchgeführt, bei der die Zellen keiner siRNA ausgesetzt wurden. Die restliche Behandlung stimmte aber mit den Versuchskulturen überein. Zum Einsatz kamen neben den Zellen mit Standardmedium und den siRNAs auch Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, Art.Nr. 11668-019) und Opti-MEM® Reduced-Serum-Medium (Invitrogen, Art.Nr. 31985-062). Das Vorbereiten des Transfektionsmixes erfolgte in 5 ml Röhren aus Polystyrol (VWR, Art.Nr. 211-0063).

Arbeitsschritte pro Ansatz:

1. 2 µl Lipofectamine + 10 µl Opti-MEM
2. 5 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT)
3. 1 µl siRNA (100µM) + 85 µl Opti-MEM
4. Mix, 15 min bei RT
5. Waschen der Zellen mit 1 ml PBS
6. 400 µl Opti-MEM + 95 µl RNA/Lipofectamine-Mix zu den Zellen
7. 4 h Inkubation bei 37°C, 5% CO₂
8. Austausch des Transfektionsmixes durch frisches Medium

2.6.2.5 Umsetzen der Zellen auf eine 6-Well-Platte (Tag 3)

An Tag 3 waren die Zellen konfluent in der 12-Well-Platte. Daher mussten sie für die weitere Expansion und Transfektion auf eine 6-Well-Platte umgesetzt werden, so dass sie an Tag 4 für die zweite Transfektionsrunde wieder über 50% Konfluenz aufwiesen. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeiten wurden HeLa Zellen 1:3 und BT20 Zellen 1:1 gesplittet.

2.6.2.6 2. Transfektionsrunde (Tag 4)

Arbeitsschritte pro Ansatz:

1. 6 µl Lipofectamine + 44 µl Opti-MEM
2. 2 µl siRNA + 175 µl Opti-MEM
3. 5 min Inkubation bei RT
4. Mix, 15 min bei RT
5. Waschen der Zellen mit 1 ml PBS
6. 800 µl Opti-MEM + 200 µl Transfektionsmix zu den Zellen
7. 4 h Inkubation bei 37°C, 5% CO₂
8. Austausch des Transfektionsmixes durch frisches Medium

2.6.2.7 weiteres Vorgehen

Die Zellen waren nach zwei Transfektionsrunden stabil transfiziert, so dass Testungen an den Zellen durchgeführt werden konnten. Der Transfektionserfolg wurde bei jedem Versuch über die Bestimmung der Menge des jeweiligen Zielproteins im Vergleich zu Kontrollzellen

ermittelt (Abschnitt 2.7). Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte somit je nach Versuchsziel an Tag 5 oder 6 nach der ersten Aussaat.

2.6.3 Transfektion mit der Dharmacon SMARTpool® Technologie

Der Vorteil der Dharmacon SMARTpool® Technologie ist es, dass die siRNAs als Mix von mehreren siRNAs angeboten werden, die zuvor auf ihre Effektivität an einer Vielzahl von Zelllinien getestet wurden. Die Transfektionseffizienz ist sehr hoch und wird bereits nach einer Transfektionsrunde erreicht.

2.6.3.1 Verwendete siRNAs

Tabelle 2.8: Verwendete Dharmacon SMARTpool® siRNA-Mixe der Firma Thermo Fisher Scientific, fett gedruckt = Zielproteine

SMARTpool®	Artikelnummer
ON-TARGETplus SMARTpool-Human PIP5K2α	L-006778-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool-Human ARHGAP26	L-008426-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool-Human CtBP1	L-008609-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool-Human CDC42,	L-005057-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool - Human Cav1	L-003467-00-005

Zur Lagerung wurden die siRNAs nach dem Protokoll von Thermo Fisher Scientific „Basic siRNA Resuspension“ mit Hilfe des 5x siRNA Buffers (Thermo Fisher Scientific, Art.Nr. B-002000-UB-100) auf eine Konzentration von 20µM verdünnt und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

2.6.3.2 Vorkultur

Die Zellen wurden so in sterile Zellkulturplatten ausgesät, dass sie nach 24 h 60-70% der Zellkulturfläche bedeckten.

BT20: 6-Well; $3,5 \times 10^5$ Zellen/Well; 2,5 ml Medium

HeLa: 12-Well; 6×10^4 Zellen/Well; 1 ml Medium

2.6.3.3 Transfektion

Die optimalen Transfektionsbedingungen für die jeweilige Zelllinie wurden mit Hilfe des Protokolls „Thermo Scientific DharmaFECT Transfection Reagents- siRNA Transfection Protocol“ evaluiert. Als Transfektionslösung wurde DharmaFECT 1 siRNA Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Art.Nr. T-2001-01) verwendet.

Tabelle 2.9: Arbeitsschritte bei der Transfektion von HeLa und BT20 mit der Dharmacon SMARTpool® Technologie

	HeLa	BT20
Tube 1	5 µl siRNA (5µM) + 95 µl Opti-MEM	20 µl siRNA (5µM) + 380 µl Opti-MEM
Tube 2	1 µl DharmaFECT + 99 µl Opti-MEM	8 µl DharmaFECT + 392 µl Opti-MEM
T-Mix (1+2)	20 min bei RT	20 min bei RT
je Well	200 µl T-Mix + 800 µl Medium	400 µl T-Mix + 1600 µl Medium
nach 24 h	Split auf 6-Well (1:2)	Mediumwechsel

48 h nach der Transfektion der Zellen war der Knockdown effektiv, so dass die Zellen für weitere Tests genutzt werden konnten. Die Zellen wurden je nach Versuchsdesign an Tag 4 oder 5 nach dem Aussähen analysiert.

2.7 Herstellung eines Zelllysats mit Bestimmung des Proteingehalts

2.7.1 Ziel der Aufarbeitung

Bei jedem Transfektionsversuch wurden Duplikate eines Ansatzes mitgeführt. Ein Ansatz diente zur Inkubation der Zellen mit Nanopartikeln und somit der quantitativen Analyse des intrazellulären Nanopartikelgehaltes (Feststoffanalyse oder Fluoreszenzmikroskopie). Die Zellen des anderen Ansatzes wurden nicht mit Partikeln inkubiert sondern zum gleichen Zeitpunkt wie die Versuchszellen zu einem Zelllysats aufgearbeitet. Die darin enthaltenen Proteine wurden nachfolgend dazu genutzt, über elektrophoretische Auftrennung und Western Blots den Transfektionserfolg in jedem Einzelexperiment zu überprüfen.

2.7.2 Herstellung des Zelllysats

2.7.2.1 Lysepuffer

Zusammensetzung:

Reaktionspuffer (100 mM Kaliumchlorid KCl; 2 mM Magnesiumchlorid MgCl₂; 20 mM HEPES pH 7,4)

+ 1% TritonX-100 (20%ig, Sigma-Aldrich, Art.Nr. X100)

+ 1% Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 100mM, Carl Roth, Art.Nr. 6367.1)

+ 0,3% Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC, Sigma-Aldrich, Art.Nr. P8340)

2.7.2.2 Aufarbeitung der Zellen

Ab der Zugabe des gekühlten Lysepuffers erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis.

Arbeitsschritte (je Well einer 6-Well-Platte):

1. Waschen des Zellrasens mit 1 ml PBS
2. 12 min Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37°C
3. Aufnahme der Zellen mit 2 ml PBS
4. 5 min Pelletieren bei 180 g
5. Zugabe von 250 µl Lysepuffer
6. Inkubation für 12 min auf Eis (invertieren)
7. 10 min Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (Zentrifuge Heraeus Fresco 21, Thermo Scientific, Art.Nr. 75002416)
8. Überführung von 220 µl des Überstandes
9. Durchführung eines Bradford-Tests (Proteinkonzentrationsbestimmung)

2.7.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Test basiert auf der Bindung von dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau an in Lösung befindliche Proteine. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs ändert sich durch die Bindung von 465 nm zu 595 nm. Durch die Messung der Absorption bei 595 nm lässt sich in Verbindung mit einer geeigneten Standardkurve der Proteingehalt einer Lösung quantitativ bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Protein Assay von Bio-Rad verwendet, der auf der Proteinbestimmung nach Bradford basiert. Zur Erstellung der Standardkurve wurde der Protein Standard I (Bio-Rad, Art.Nr. 500-0005) verwendet. Die Standardkurve umfasste 5 Messpunkte und reichte von 0 bis 500 µg Protein/ml. Die Bindung des Farbstoffes an die Proteine wurde mittels des Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Art.Nr. 500-0006) erreicht. Die Durchführung erfolgte nach Kapitel 2.4 „Microtiter Plate Protocols“ des Protokolls „Bio-Rad Protein Assay“. Die Messung erfolgte demnach in 96-Well-Platten im Fluoreszenzreader Infinite® M200 der Firma Tecan. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden alle Proben eines Experimentes so mit Lysepuffer und 5x Lämmli-Puffer verdünnt, dass sie die gleiche Endkonzentration Gesamtprotein aufwiesen. Die verdünnten Proben wurden 5 min bei 95°C erhitzt und bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung des 5x Lämmli-Puffers (Lagerung in 5 ml Aliquots bei -20°C)

Chemikalie	Mengen-Anteil	Firma	Artikelnummer
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	25,0 ml	Carl Roth	4855
Glycerol	12,5 ml	Carl Roth	3783
β-Mercaptoethanol	5,0 ml	Carl Roth	4227
SDS	2,5 g	Carl Roth	2326
Bromphenolblau	0,05 g	Carl Roth	T116
Reinstwasser	7,5 ml		

2.8 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

2.8.1 Methodik

Diese Technik wird verwendet, um ein Proteingemisch nach Größe elektrophoretisch aufzutrennen. Die dafür genutzten Gele bestehen aus Polyacrylamid, das quer vernetzt wird. Die dadurch entstehende Porengröße bestimmt die größenabhängige Wanderung der Proteine durch das Gel in einem elektrischen Feld. Die Proteine wurden zuvor denaturiert und durch die Bindung an SDS negativ geladen. Dadurch wandern die kleinen Proteine am weitesten durch das Gel während die größten weiter oben zu finden sind. Durch die Verwendung eines standardisierten Proteinmarkers kann der ungefähre Aufenthaltsort eines Proteins mit bekannter Größe gefunden oder aber die Größe eines unbekanntes Proteins bestimmt werden.

2.8.2 Geräte und Chemikalien

Tabelle 2.11: Verwendete Geräte und Chemikalien zur Durchführung der SDS-PAGE

Material	Firma	Artikelnummer
Mini-PROTEAN Tetra Cell, Mini-Trans-Blot Module, PowerPac HC Power Supply	BioRad	165-8035
Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad	170-3930
Serie 700 MICROLITER®-Spritze	Roth	X035.1705 N
Prestained Protein Marker	New England BioLabs	P7708 S
Ammoniumpersulfat APS 50g	Roth	9592.3
TEMED 25ml	Roth	2367.3
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)- Lösung	Roth	3029.1
TRIS	Roth	4855.1
SDS ultra pure	Roth	2326.1
Glycin	Roth	3908.2

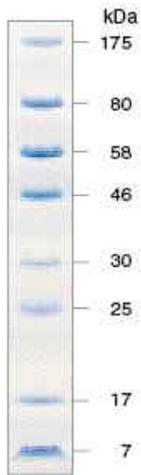


Abbildung 2.10: Banden des Prestained Protein Marker (New England BioLabs, Art.Nr.P7708 S)

2.8.3 Durchführung

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele, Menge für zwei Gele

Komponente	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
Reinstwasser	4,15 ml	3,025 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	1,2 ml
30% Acrylamid-Bisacrylamid	3,3 ml	0,7 ml
20% SDS	50 µl	25 µl
TEMED (kurz vorher)	5 µl	5 µl
10% APS (kurz vorher)	50 µl	25 µl

Zusammensetzung des Laufpuffers:

30,2 g TRIS

+ 144 g Glycin

+ 10 g SDS

→ Auffüllen mit Reinstwasser auf 1 L

Die Proben wurden aufgetaut und bei 95°C für 5 min erhitzt. Mit Hilfe einer graduierten Spritze wurden 35 µl je Probe in die Geltaschen eingefüllt. Vom Prestained Protein Marker wurden 12 µl pro Gel verwendet. Die Proben wurden nun bei einer Spannung von 100 V durch das Sammelgel geführt und danach bei 150 V im Trenngel aufgetrennt. Dieser Vorgang dauerte ca. 75 min.

2.9 Western Blot und Chemolumineszenz

2.9.1 Methodik

Beim Western Blot werden die Proteine aus einem SDS-Gel auf eine Membran übertragen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine im Nassblottverfahren auf eine Nitrocellulosemembran gebunden. Dadurch war es im Folgenden möglich, die zuvor aufgetrennten Proteine mit Hilfe spezifischer Primär- und Sekundärantikörper sichtbar zu machen (Abbildung 2.11). Der Sekundärantikörper trug dabei ein Enzym (Horse Radish Peroxidase, HRP), das in Verbindung mit einer Entwicklungslösung ein chemolumineszentes Signal erzeugt.

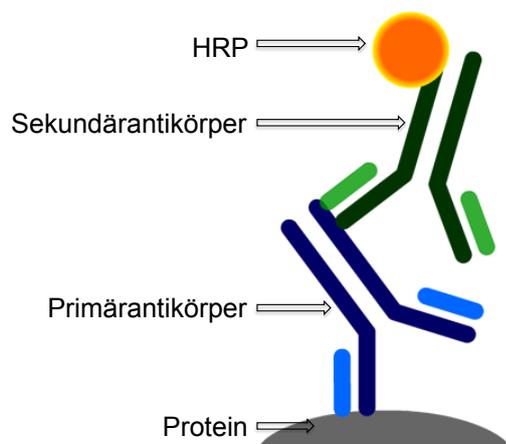


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung des Prinzips der Chemolumineszenz mit Primär- und Sekundärantikörper

2.9.2 Materialien und Chemikalien

Tabelle 2.13: Verwendete Geräte und Chemikalien zur Durchführung des Western Blots, der Antikörperinkubation und der Entwicklung des Röntgenfilms

Material	Firma	Artikelnummer
Mini-PROTEAN Tetra Cell, Mini-Trans-Blot Module, PowerPac HC Power Supply	BioRad	165-8035
Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad	170-3930
Kleinschüttler KM 2 Akku (4°C)	Carl Roth	H696.1
Nitrocellulose-Membranen 0.45µm	BioRad	162-0114
Western Färbeschalen MIDI	Carl Roth	CL08.1
Milchpulver 250g	Carl Roth	T145.1
Abumin, IgG-frei	Carl Roth	3737.1
Natriumazid	-	-
Methanol	Carl Roth	8388.5
NaCl	-	-
Ponceau S 10g	Carl Roth	59.38.2
Amersham Hyperfilm ECL, 50 Blatt	VWR	28-9068-36
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare	RPN2106
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore	WBKIS0500
Kodak® Processing Chemicals Fixer	Sigma-Aldrich	P8307
Polymax RT developer/replensier	Sigma-Aldrich	P8432

Tabelle 2.14: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Firma	Artikelnummer	Verdünnung	Spezifität
Antibody Caveolin-1 (N20)	Santa Cruz Biotechnology	sc-894	1:400	ja
Antibody Purified Mouse Flotillin-1	BD Transduction	610820	1:100	ja
Cdc42 Polyclonal Antibody	Thermo Scientific	PA5-17544	1:1000	ja
PIP5K2 Alpha Polyclonal Antibody	Thermo Scientific	PA5-15285	1:500	nein
Monoclonal Anti-PIP5K2A	Sigma-Aldrich	WH0005305 M1-100UG	1:350	ja
CTBP1 Polyclonal Antibody	Thermo Scientific	PA5-21383	1:1000 1:500	nein
Anti-CTBP1	Sigma-Aldrich	SAB1410257-100UG	1:1000	nein
Polyclonal Anti-ARHGAP26	Sigma-Aldrich	SAB1400439-50UG	1:100	nein
GRAF Polyclonal Antibody	Thermo Scientific	PA5-15351	1:250 1:100	nein
Monoclonal Anti-β-Actin antibody	Sigma-Aldrich	A5441-2ML	1:5000	ja
Anti-Dynamin II Polyclonal Antibody	Thermo Scientific	PA1-661	1:1000	ja
Antibody Clathrin	Der Antikörper war eine Schenkung der AG Haucke. Infos zur Herkunft und Hersteller waren nicht mehr verfügbar.		1:500	ja
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Europe	111-035-003	1:10000	ja
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Europe	115-035-003	1:10000	ja

2.9.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.15: Zusammensetzung des Transferpuffers

10x Transferpuffer	58,2 g TRIS
	29,4 g Glycin
	3,75 g SDS
	→ mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen
1x Transferpuffer	100 ml 10x Transferpuffer
	200 ml Methanol
	→ mit Reinstwasser auf 1L auffüllen

Tabelle 2.16: Zusammensetzung 10x TBS

24 g TRIS
80 g NaCl
800 ml Reinstwasser
→ pH 7,4 mit konz. HCl einstellen
→ mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen

Tabelle 2.17: Zusammensetzung der Antikörperlösung

10 ml 1x TBS
50 µl Tween20 (20%)
0,3 g Albumin
Spatelspitze Natriumazid

2.9.4 Durchführung

2.9.4.1 Western Blot

Die Proteine aus den Gelen der SDS-PAGE wurden im Nassverfahren auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell von Bio-Rad wurde nach Anleitung zusammengesetzt. Der Transferpuffer war dazu auf 4°C vorgekühlt. Die Gele wurden nach der SDS-PAGE 20 min in kaltem Transferpuffer equilibriert. Der Transfer erfolgte bei 100 V und maximal 350 mA für 80 min.

2.9.4.2 Antikörpermarkierung der Zielproteine auf der Membran

1. Färben der Membran mit Ponceau S (0,3 % in 1 % Essigsäure) für 5 min (Sichtbarmachung der Proteine)
2. Einscannen der gefärbten Membran
3. Entfärbung der Membran mit 1 %iger Essigsäure
4. Blocken der Membran mit 3 % Milchpulver in TBS für 1 h
5. 2x 5 min Waschen der Membran in TBS
6. Inkubation mit primärem Antikörper bei 4°C über Nacht
7. 3x 10 min Waschen in TBS
8. Inkubation für 75 min mit sekundärem Antikörper
9. 3x 10 min Waschen in TBS

Der sekundäre Antikörper trug eine Horse Radish Peroxidase (HRP), die in Verbindung mit der Entwicklungslösung für ein chemilumineszentes Signal sorgen sollte.

2.9.4.3 Entwicklung des Röntgenfilms (Chemilumineszenz)

Die Membran wurde in einer Dunkelkammer mit ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) benetzt. Darauf wurde ein Röntgenfilm gelegt. Dadurch wurden die Stellen geschwärzt, an denen die ECL-Lösung mit der HRP des Sekundärantikörpers reagierte. So wurden die Proteinbanden, sichtbar gemacht, an die zuvor der spezifische Primärantikörper gebunden hatte.

2.10 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

2.10.1 Mikroskopietechnik

Im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie wird bei der Konfokalmikroskopie nur ein Punkt einer Ebene des Objekts mit einem fokussierten Laserstrahl beleuchtet. Für jeden Fluoreszenzfarbstoff muss ein Laser verwendet werden, der Licht in der entsprechenden Wellenlänge auf das Objekt treffen lässt, um den Fluoreszenzfarbstoff anzuregen. Die dadurch erzeugte Fluoreszenz wurde bei dem gewählten Aufbau von einer gekühlten CCD Kamera erfasst.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der „Spinning Disk Confocal Microscopy“ genutzt. Dabei rotiert eine sogenannte Nipkow-Scheibe über dem Präparat, die viele Lochblenden enthält. Dadurch wird das Objekt mithilfe des Laserstrahls sehr schnell abgetastet und es entsteht in kurzer Zeit ein Bild. Im Vergleich zu Mikroskopietechniken, bei denen das gesamte Objekt während der Aufnahme belichtet wird, verursacht diese Technik wenig Photo-toxizität und verlängert die Lebenszeit der Fluoreszenzfarbstoffe.

Das verwendete System war das Zeiss Axiovert 200M-based Spinning Disc Confocal Microscope (PerkinElmer Life Sciences Inc., MA, USA). Die Durchführung der Mikroskopie und die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Volocity Software (Improvision Inc.).

2.10.2 Quantitative Nanopartikelaufnahme- Zellversuche

2.10.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden nach der Transfektion und vor der Inkubation mit Nanopartikeln in 12-Well-Platten auf Coverslips kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 60% wurden die Zellen mit Nanopartikeln inkubiert (wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben), die einen Fluoreszenzfarbstoff trugen (SCIONs, Abschnitt 2.1.1.2).

2.10.2.2 Transferrin-Aufnahme

Die Zellen wurden vor der Fixierung mit Transferrin inkubiert (Transferrin From Human Serum, Alexa Fluor® 488 Conjugate, Invitrogen, Art.Nr. T-13342), das mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war. Dieser Farbstoff emittiert nach Laseranregung ein grünes Fluoreszenzsignal. Die Partikel waren mit einem Farbstoff markiert, der ein orange-rotes Signal emittierte, wodurch eine Unterscheidung von Transferrin und Nanopartikeln möglich war. Dieses markierte Transferrin sollte von den Zellen schnell und in großer Menge aufgenommen werden, um dadurch das Cytoplasma jeder Einzelzelle optisch gegen die Umgebung abzugrenzen. Dies machte es möglich, bei der Analyse der Bilder nur die Zellareale einzubeziehen und die Kulturoberfläche mit starkem Hintergrundsignal auszuschließen.

Arbeitsschritte:

1. Transferrin488 mit 20 µg/ml in OptiMEM ansetzen
2. 40 µl pro Coverslip auf Parafilm auftragen
3. Coverslips mit der Oberseite nach unten auf den Tropfen auflegen und abdecken
4. 15 min Inkubation bei Raumtemperatur
5. Fixierung und Einbettung der Zellen

2.10.2.3 Fixierung

Fixiert wurden die Zellen 10 min mit 4% Paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Art.Nr. P6148) und mit DAPI-haltigem Eindeckmedium eingebettet wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben.

2.10.2.4 Quantitative Auswertung

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal in Duplikaten durchgeführt. Für jeden Messwert wurden mindestens 140 Einzelzellen analysiert. Dafür wurde zuerst die Empfindlichkeit des Kanals, der die Fluoreszenz der Nanopartikel aufgenommen hatte, so eingestellt, dass die Hintergrundfluoreszenz aus den Bildern eliminiert wurde. Daraufhin wurden die Einzelzellen (Regions of Interest = ROIs) mit Hilfe der Transferrinfluoreszenz markiert und so Flächen mit unspezifischen Nanopartikelanhaftungen aus der Analyse ausgeschlossen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean Intensity) jeder Einzelzelle wurde daraufhin von dem Programm angegeben und mit der Fläche (Area in µm²) der untersuchten Region multipliziert. Die Gesamtfluoreszenz der Nanopartikel pro Einzelzelle konnte dadurch ermittelt werden. So konnten eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität und deren Standardabweichung für eine Zellpopulation bestimmt werden.

2.10.3 Untersuchungen zur Autophagieinduktion

2.10.3.1 Zellkultur mit Nanopartikelexposition und Kontrollen

Die Zellen wurden nach der Transfektion und vor der Inkubation mit Nanopartikeln in 12-Well-Platten auf Coverslips kultiviert. Die verwendeten Nanopartikel waren die in Abschnitt 2.1.1.1 beschriebenen PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃- Partikel. Die Versuche wurden einmal mit und einmal ohne Bafilomycin A1 durchgeführt. Bafilomycin A1 verhindert den Abbau der Autophagosomen, so dass diese sich unter Stressbedingungen in der Zelle anreichern ohne von dieser weiter prozessiert werden zu können. Dadurch konnte die Bildung der Autophagosomen als Reaktion auf den verursachten Stimulus beobachtet und gewertet werden. Der Marker für diese Anreicherung war das Protein LC3B, welches an die frühen Autophagosomen bindet. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen, Art.Nr. 14025-050). Die Kultivierung in HBSS setzte die Zellen einer Mangelsituation aus, was die Bildung von Autophagosomen stimulieren sollte. Dieser natürliche Effekt konnte

dann mit einem möglichen Effekt der Nanopartikelexposition verglichen werden. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Nanopartikel und ohne ergänzende Substanzen in normalem Zellkulturmedium kultiviert.

Arbeitsschritte:

1. Zellen 3x waschen mit PBS
2. Inkubation der Zellen mit Nanopartikeln für 24 h (20 µg/ml, 100 µg/ml Fe)
3. nach 21 h Zugabe von 100 nm Bafilomycin A1 (Sigma-Aldrich, Art.Nr. B1793) bei der Inhibition des Autophagosomenabbaus, 3 h Inkubationszeit
4. nach 21 h Austausch des Zellkulturmediums durch HBSS bei der Stresskontrolle durch Hunger, 3 h Inkubationszeit
5. 3x Waschen der Zellen mit warmem Zellkulturmedium, 2 x Waschen mit PBS (4°C)
6. Fixierung mit 4% PFA für 10 min bei Raumtemperatur

2.10.3.2 Immunfluoreszenz mit dem LC3B-Antikörper

1. 3x Waschen der Zellen mit PBS
2. Permeabilisieren der Zellmembranen mit Digitonin (100 µg/µl) für 10 min bei RT
3. 3x 5 min sorgfältiges Waschen mit PBS
4. Inkubation mit primärem Antikörper gegen LC3B (MBL, Art.Nr. 152-3), 20µg/ml (1:100) in PBS, 1 h in Feuchtekammer
5. 3x 10 min sorgfältiges Waschen mit PBS
6. Inkubation mit sekundärem Antikörper Goat-anti-Mouse-568 in PBS, 1 h in Feuchtekammer
7. 3x 10 min sorgfältiges Waschen mit PBS
8. Slides in destilliertem Wasser reinigen und mit Mounting Medium + DAPI eindecken
9. Lagerung bei 4°C

2.10.3.3 Quantitative Auswertung

Zuerst wurde die Empfindlichkeit des Kanals, der die Fluoreszenz des LC3B aufgenommen hatte, so eingestellt, dass die Hintergrundfluoreszenz aus den Bildern eliminiert wurde. Daraufhin wurde die Gesamtfläche der Fluoreszenz von LC3B gemessen (Sum of Area in µm²) und durch die Anzahl der auf dem Bild befindlichen Zellen geteilt. Pro Ansatz wurden mindestens 140 Einzelzellen für die Analyse heran gezogen. So konnten eine durchschnittliche Fläche der LC3B-Fluoreszenz und deren Standardabweichung für eine Zellpopulation bestimmt werden. Für die graphische Darstellung wurde diese Fläche in „LC3B positive area / µm² angegeben“.

3 Ergebnisse

Im ersten Teil der Experimente sollte der Einfluss der Oberflächenmodifikation von $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Nanopartikeln auf die zelluläre Aufnahme durch verschiedene Tumorzelllinien untersucht werden. Mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskopie sollte zuerst der qualitative Nachweis der zellulären Aufnahme erbracht werden. Zudem sollten Erkenntnisse darüber erzielt werden, welcher Zeitraum der zellulären Aufnahme zugrunde liegt und wie die Partikel kompartimentiert werden. Auch erste Hinweise auf den möglichen Aufnahmemechanismus sollten durch die Beurteilung der Schnitte gesammelt werden. Anisotrope Partikel und sphärische Partikel mit abweichendem Durchmesser sollten vergleichsweise betrachtet werden.

Nach dem qualitativen Nachweis sollte der Einfluss der Oberflächenmodifikation auf die zelluläre Aufnahmemenge quantitativ bestimmt werden. Dazu sollten Zellpellets nach Nanopartikelexposition auf ihren Eisengehalt hin untersucht werden. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über die Aufnahmemenge und die zugrundeliegende Kinetik geben.

Im zweiten Teil der Experimente sollte der Aufnahmemechanismus der $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel auf molekularer Ebene bestimmt werden. Durch den spezifischen Knockdown von Proteinen aus der Endocytosemaschinerie sollte deren Einfluss auf die zelluläre Aufnahme der Partikel untersucht werden. Auf Grundlage bekannter Mechanismen aus der Literatur sollte die Expression daran beteiligter Proteine mittels siRNAs inhibiert werden. Durch quantitative Bestimmung der aufgenommenen Partikelmenge in zwei Tumorzelllinien sollten Rückschlüsse auf die Rolle der entsprechenden Proteine bei der Endocytose der verwendeten Partikel gezogen werden.

Abschließend sollte gezeigt werden, ob die Akkumulierung von Nanopartikeln bei den verwendeten Zellen zur Beeinflussung der Funktion von Endo- und Lysosomen führt. Durch die qualitative und quantitative Bestimmung fluoreszenzmarkierter LC3B-Proteine sollte in Abhängigkeit zur Partikelkonzentration untersucht werden, ob durch die intrazelluläre Partikelakkumulation der Gehalt des Autophagie-Markers LC3B in den betroffenen Zellen ansteigt.

3.1 Qualitative Untersuchungen der intrazellulären $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Nanopartikelaufnahme

Durch elektronenmikroskopische Studien sollte zuallererst die Kinetik der Partikel Aufnahme untersucht sowie der qualitative Nachweis erbracht werden, dass die verwendeten Nanopartikel intrazellulär aufgenommen werden. Zudem sollten die Aufnahmen erste Hinweise auf die Kompartimentierung der Partikel innerhalb der Zelle geben. Auf Grundlage der dadurch gewonnenen Erkenntnisse wurden die Nanopartikelsuspensionen ausgewählt, die sich für weiterführende quantitative Bestimmungsmethoden sowie für Untersuchungen der zellulären Aufnahmewege eignen.

3.1.1 Intrazelluläre Nanopartikelakkumulation am Beispiel der Zelllinie C3H RS1

Zu Beginn der Studien sollte festgestellt werden, ab welchem Zeitpunkt nach der Partikelexposition die intrazelluläre Aufnahme beginnt, welchem zeitlichen Verlauf die Akkumulation folgt und wann das ungefähre Maximum erreicht wird. Dazu wurden subkonfluente C3H RS1 Zellen mit PEGylierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Nanopartikeln (Tabelle 2.1) über einen Zeitraum von längstens 24 Stunden inkubiert. Die erste Probennahme erfolgte nach 10 Minuten.

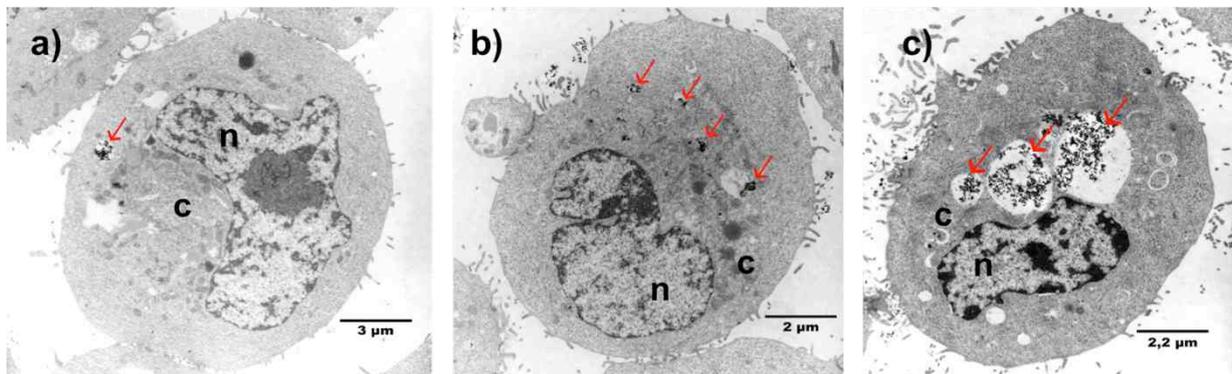


Abbildung 3.1: Akkumulation von PEGylierten FeOx -Partikeln durch einzelne C3H RS1 Zellen
a) 10 min Exposition; b) 30 min; c) 24 h; rote Pfeile = Regionen mit Nanopartikeln; n= Nukleus, c= Cytosol

Die Betrachtung mehrerer Schnittebenen im TEM ergab, dass bereits nach 10 min einzelne Zellen Nanopartikel aufgenommen hatten (Abbildung 3.1a). Allerdings enthielten mehr als 90% der Zellen zu diesem Zeitpunkt keine sichtbaren Partikelmengen. Nach 30 min hatten sich sowohl die Zahl der Zellen mit Partikeln als auch die individuelle Partikelmenge pro Zelle etwas erhöht. Der Anteil der Zellen mit internalisierten Partikeln steigerte sich innerhalb von 2 und 6 h weiter. Nach 24 h enthielten nahezu 100% der Zellen Partikel in Teils beträchtlicher Menge (Abbildung 3.1c). Die Partikel befanden sich dabei stets in vesikulären Strukturen unterschiedlicher Größe innerhalb des Cytosols der Zellen. Einzelne freie Partikel im Cytosol, innerhalb des Zellkerns oder anderer Organellen wurden nicht beobachtet.

3.1.2 Nachweis der intrazellulären Nanopartikelaufnahme durch C3H RS1 Zellen

Dass Eisenoxidnanopartikel mit ähnlichen Charakteristika von verschiedenen Tumorzelllinien intrazellulär aufgenommen werden, konnte in der Arbeitsgruppe bereits zuvor gezeigt werden [43]. Für die in dieser Studie verwendeten Varianten musste dies erst mit Hilfe der TEM nachgewiesen werden. Die gezeigten Abbildungen wurden willkürlich aus einer Vielzahl betrachteter Zellen ausgewählt und sollen vor allem zeigen, dass die Partikel intrazellulär aufgenommen werden und wo sie lokalisiert sind. Dabei sind die Abbildungen nicht zwingend repräsentativ für die gesamte Zellpopulation sondern zeigen vor allem Einzelzellen, die über gut sichtbare Partikelansammlungen verfügen. Auf sichtbare Unterschiede innerhalb der Zellpopulation wird in der Beschreibung eingegangen. Für vergleichende Betrachtungen zwischen verschiedenen Experimenten wird immer der Zeitpunkt 24 h nach Partikelexposition berücksichtigt.

3.1.2.1 PEGylierte $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel

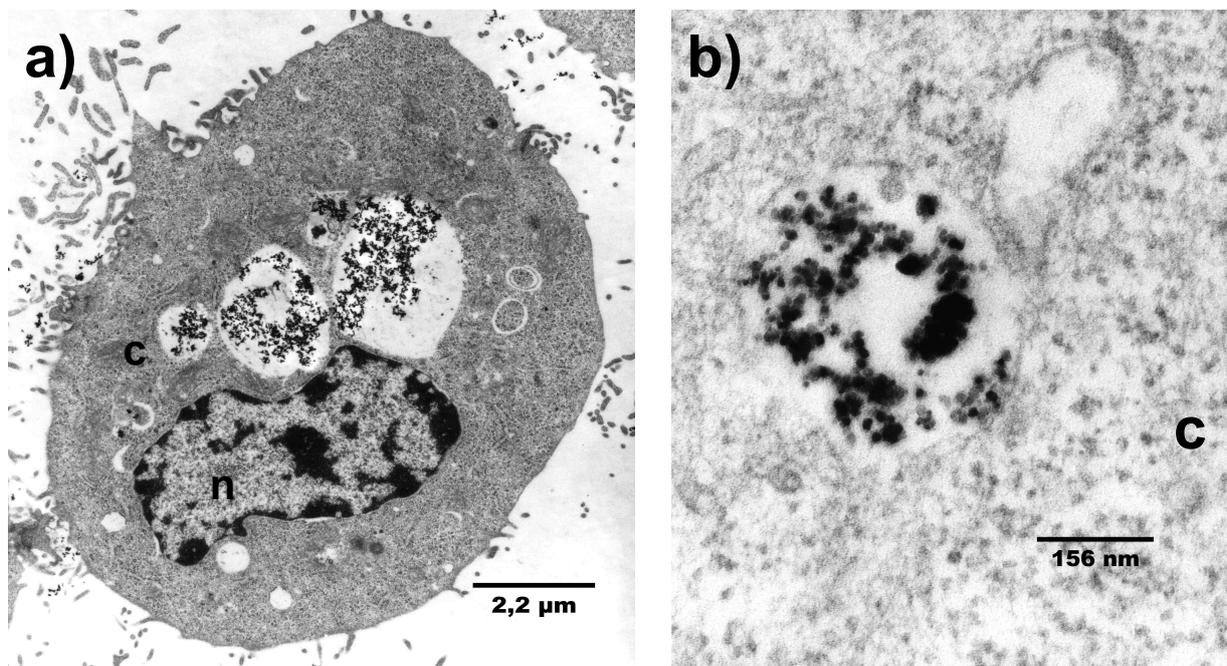


Abbildung 3.2: Aufnahme PEGylierter Partikel durch C3H RS1

a) Zelle nach 24 h Exposition mit internalisierten NP; b) Vesikel mit NP nach 30 min Inkubation; n= Nucleus, c= Cytoplasma

Die PEGylierten Partikel wurden intrazellulär aufgenommen und befanden sich dabei in agglomerierter Form in vesikulären Strukturen innerhalb des Cytoplasmas. Der Partikelgehalt pro Zelle schwankte innerhalb der Population. Abbildung 3.2 a) zeigt eine Zelle, die nach 24 h mehrere große Vesikel mit internalisierten NP enthält.

3.1.2.2 NH₂- funktionalisierte und NH₂/PEG- funktionalisierte SiO₂-Fe₂O₃ Partikel

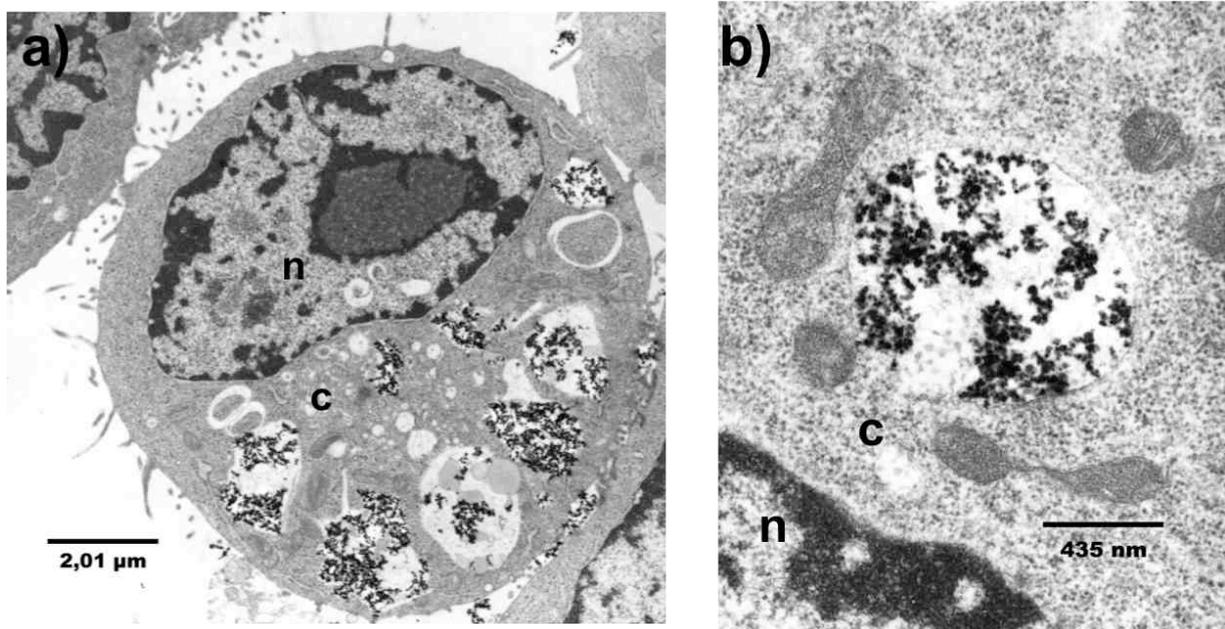


Abbildung 3.3: Aufnahme NH₂- und NH₂/PEG- funktionalisierter Partikel durch C3H RS1

a) Zelle mit internalisierten NH₂-funktionalisierten NP nach 24 h Exposition; b) Vesikel mit agglomerierten NH₂/PEG- funktionalisierten Partikeln; n= Nukleus, c= Cytosol

Sowohl NH₂- als auch NH₂/PEG- funktionalisierte Partikel wurden von den Zellen intrazellulär aufgenommen, wobei sowohl in der Art der Kompartimentierung als auch in der aufgenommenen Menge kein Unterschied zwischen den beiden Präparationen zu erkennen war. Im Vergleich zu den Zellen mit PEGylierten Partikeln befanden sich nach 24 h Inkubation allerdings mehr extrazellulär anhaftende NP in der Präparation. Abbildung 3.3 a) zeigt eine Einzelzelle, die nach 24 h in der betrachteten Schnittebene mehrere große Vesikel mit internalisierten Partikeln aufweist.

3.1.3 Nachweis der intrazellulären Nanopartikelaufnahme durch BT20 Zellen

Zum Vergleich beider Zelllinien wurden sowohl die PEGylierten als auch die NH_2 -funktionalisierten Partikel mit BT20 Zellen getestet. Zusätzlich wurden mit carboxylierten und thiolisierten zwei neu synthetisierte Partikelvariationen verwendet, die in Vorversuchen ein gutes Verhalten in Zellkulturmedium gezeigt hatten. Sie waren während eines Versuchszeitraumes von 24 h in Zellkulturmedium nicht ausgefallen und waren durch die etablierte Aufarbeitungsmethode (Abschnitt 2.3.3) von Zellen und Zellkulturmaterial gut abzulösen.

3.1.3.1 PEGylierte und NH_2 -funktionalisierte $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel

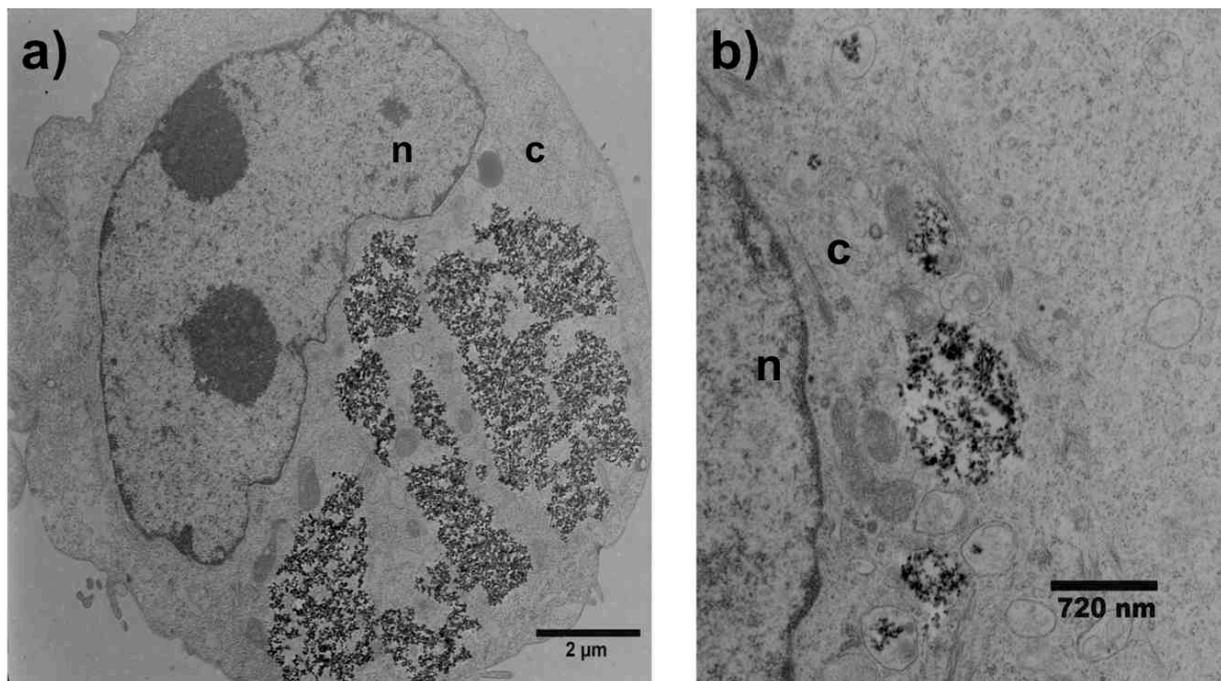


Abbildung 3.4: Aufnahme NH_2 -funktionalisierter Partikel durch BT20

a) Zelle nach 24 h Exposition, große Areale mit NP, b) Vesikel mit NP; n= Nukleus, c= Cytosol

Beide Partikelarten wurden intrazellulär aufgenommen und befanden sich dabei in agglomerierter Form in vesikulären Strukturen innerhalb des Cytosols. Der Partikelgehalt pro Zelle schwankte innerhalb der Population deutlich. Einige wenige Zellen enthielten sehr viele Partikel, wohingegen die meisten Zellen einer Schnittebene keine oder nur wenige Partikel enthielten (Abbildung 3.5a). Grundsätzlich war in der Art der Kompartimentierung kein Unterschied zu C3H RS1 Zellen zu erkennen. Die Zellen behielten trotz aufgenommener Partikel ihre Teilungsfähigkeit (Abbildung 3.5b). Auch bei C3H RS1 fanden sich immer wieder mit Partikeln beladene Zellen, die sich in unterschiedlichen Mitosestadien befanden.

3.1.3.2 Carboxylierte und thiolisierte $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ - Partikel

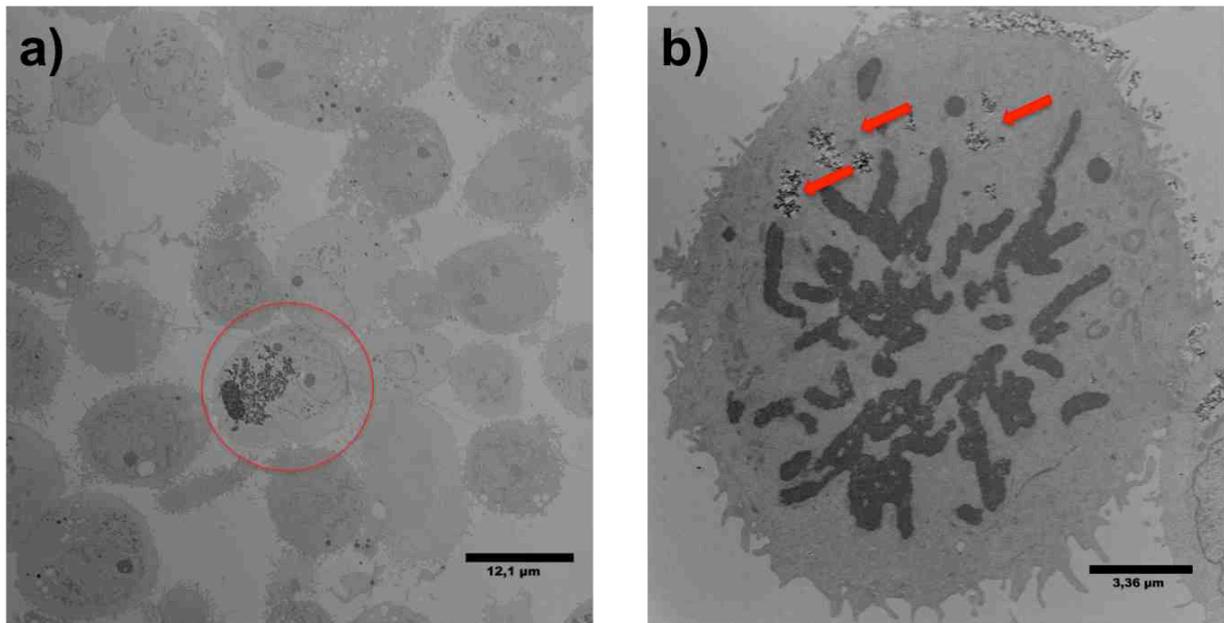


Abbildung 3.5: Aufnahme carboxylierter Partikel durch BT20

a) heterogene Verteilung der Partikel innerhalb der Zellpopulation (stark beladene Zelle rot markiert),
b) BT20 Zelle mit Partikeln in der Metaphase, kondensierte Chromosomen (dunkelgrau) ordnen sich in der Äquatorialebene an, rote Pfeile deuten auf Regionen mit Partikeln

Auch carboxylierte und thiolisierte Partikel wurden von den Zellen intrazellulär aufgenommen, ohne dass sich Unterschiede zu den vorangegangenen Synthesen zeigten. Abbildung 3.5 zeigt die intrazelluläre Aufnahme der carboxylierten Partikel. Diese Bilder wurden ausgewählt, weil sie die Heterogenität der Partikelaufnahme durch BT20 Zellen und die weiterhin vorhandene Teilungsfähigkeit der partikeltragenden Zellen zeigen. Die Aufnahme thiolisierter Partikel wird nicht im Bild gezeigt, weil die Aufnahmen keinen Mehrwert zu den vorangegangenen Darstellungen beinhalten.

Auf Grundlage des qualitativen Nachweises der intrazellulären Partikelaufnahme eigneten sich alle getesteten Partikelarten für weiterführende quantitative und mechanistische Studien.

3.2 Intrazelluläre Aufnahme anisotroper und sphärischer Partikel mit abweichendem Durchmesser zu den $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln

3.2.1 Intrazelluläre Aufnahme von Goldstäbchen durch C3H RS1 Zellen

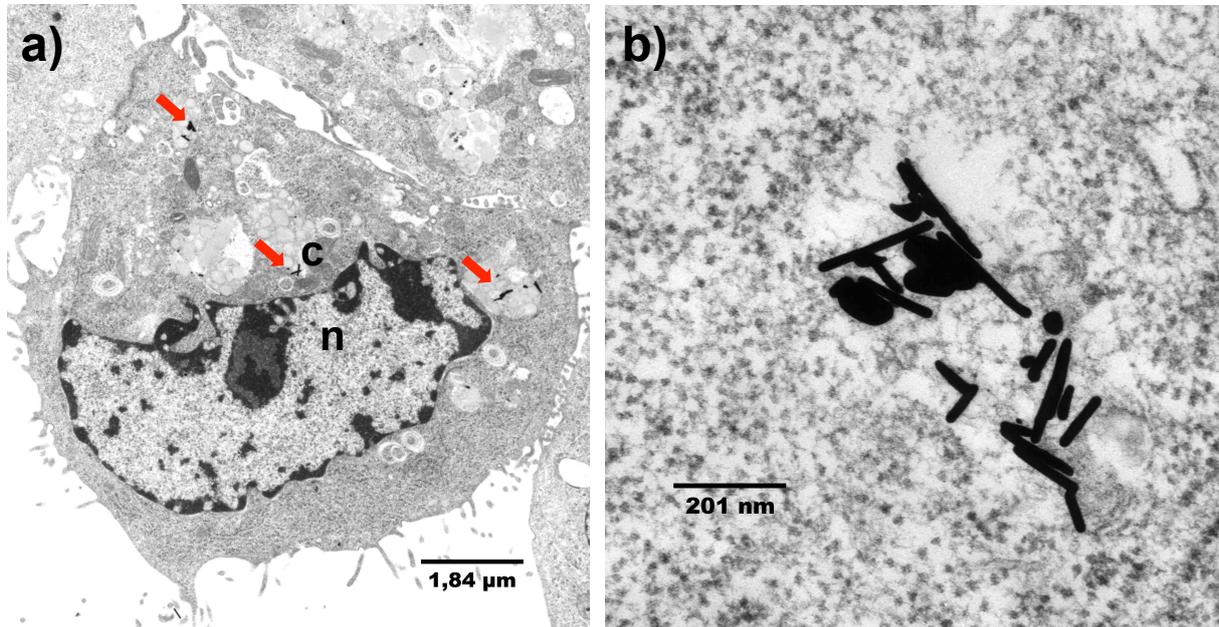


Abbildung 3.6: TEM-Aufnahmen einer Zelle mit NP in der Übersicht (a) und intrazellulär vorliegender Partikel (b)

Rote Pfeile deuten auf intrazellulär vorliegende Goldstäbchen; n= Nucleus, c= Cytosol

Die Goldstäbchen waren mit Polystyrolsulfonat (PSS) beschichtet und 120 ± 10 nm lang sowie 16 ± 3 nm breit. Aufgrund der kleinen Menge, die zur Verfügung stand, wurden weniger Nanopartikel als in den vorangegangenen Versuchen eingesetzt. Dennoch fanden sich nach 24 h Inkubation einige Zellen, die Goldstäbchen internalisiert hatten (Abbildung 3.6 a). Wie bei den kleineren $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln werden die Stäbchen in Agglomeraten kompartimentiert. Einige Fotos zeigen, dass die Stäbchen häufig in räumlicher Nähe mit Lipidtröpfchen intrazellulär abgespeichert werden. Dies ist auch in Abbildung 3.6 a sichtbar.

Abbildung 3.6 b zeigt eine Ansammlung der Goldstäbchen in Nahaufnahme, die intrazellulär vorliegen. Hier kann man allerdings keine eindeutige Zuordnung der Partikel zu einem Zellorganell treffen. Die unterschiedlichen Formen sind dadurch zu erklären, dass die Partikel in einer Schnittebene unterschiedlich im dreidimensionalen Raum des Zelllumens angeordnet sind. Da die Herstellung dieser Partikel nicht in größerer Menge reproduzierbar durchführbar war, konnten damit keine mechanistischen Studien durchgeführt werden.

3.2.2 Intrazelluläre Aufnahme von 160 nm großen Silicapartikel mit Goldkern durch C3H RS1

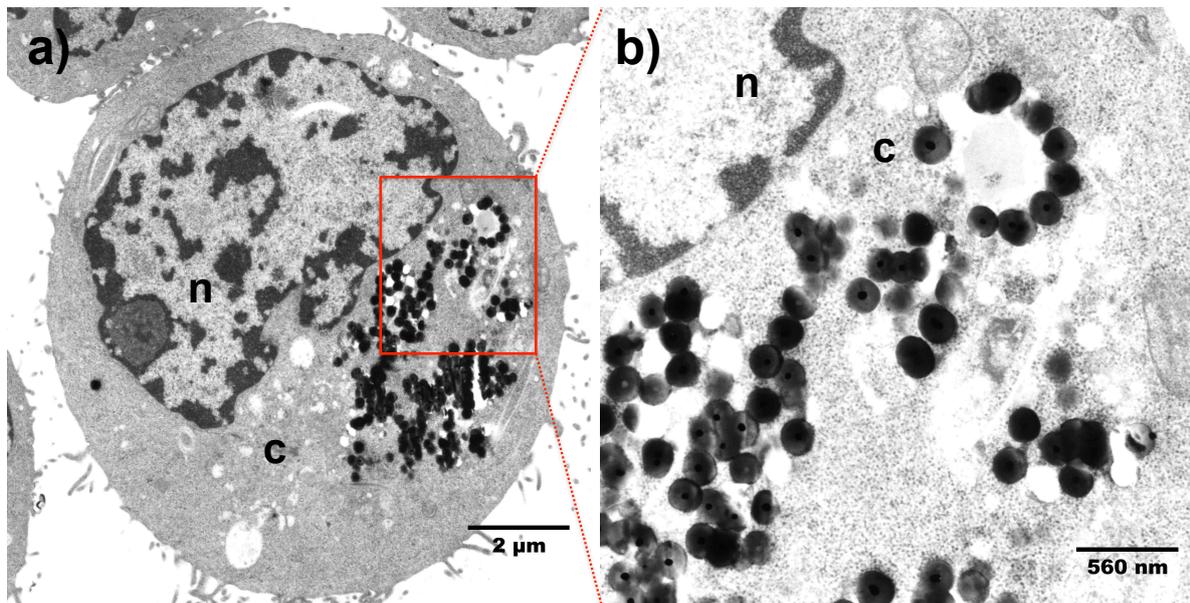


Abbildung 3.7: TEM-Aufnahmen einer Zelle mit inkorporierten Silicapartikeln in der Übersicht (a) und mit den intrazellulär aufgenommenen Partikeln in der Nahaufnahme (b)
Der rot umrandete Bereich in (a) zeigt den Ausschnitt, der in (b) mit stärkerer Vergrößerung dargestellt ist; n = Nukleus, c = Cytosol

Die Partikel waren 161 ± 13 nm groß und bestanden aus einem kleinen Goldkern und einer relativ dicken Silicaschale, in die der Farbstoff FITC eingelagert war.

Abbildung 3.7 zeigt, dass C3H RS1 Zellen diese Partikel in teils großer Zahl intrazellulär aufnehmen konnten. Die Partikel befanden sich dabei in agglomerierter Form in vesikulären Strukturen im Cytosol der Zellen. In Abbildung 3.7 b ist gut der Aufbau der Partikel zu erkennen - mit dem dunklen Goldkern in der Mitte und der helleren Silicaschale drum herum. Die Zellen zeigten über den Versuchszeitraum keine morphologischen Auffälligkeiten oder Beeinträchtigungen ihrer Teilungsfähigkeit. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit konnten diese Partikel nicht in weiterführende Studien eingeschlossen werden.

3.2.3 Intrazelluläre Aufnahme von Goldstäbchen durch BT20 Zellen

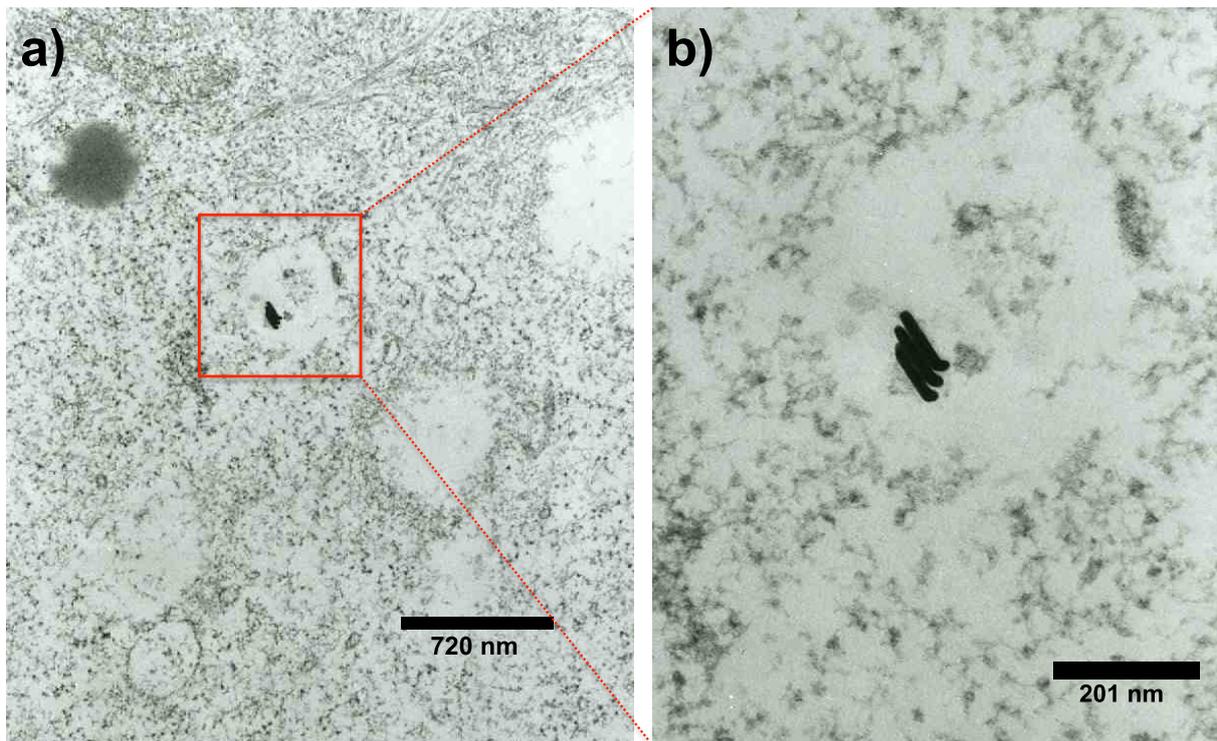


Abbildung 3.8: TEM Aufnahmen intrazellulär vorliegender Goldstäbchen in einer BT20 Zelle nach 4 h Inkubation mit geringerer (a) und starker Vergrößerung (b)
Der rot umrandete Bereich in (a) zeigt den Ausschnitt, der in (b) mit stärkerer Vergrößerung dargestellt ist.

Die verwendeten Partikel entsprechen syntheseseitig den in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen. Allerdings sind diese 156 ± 69 nm lang und 15 ± 4 nm breit gewesen. Aufgrund nur geringer zur Verfügung stehender Mengen wurden zwei Wells einer 6-Well-Platte mit je $25 \mu\text{g}$ Partikel über 4 h inkubiert.

Auffällig war, dass die Partikel nach 4 h im Zellkulturmedium nicht sichtbar ausgefallen waren. Bei Betrachtung der Zellen im Elektronenmikroskop konnten dann nur sehr wenige Zellen gefunden werden, die Partikel internalisiert hatten. Meistens lagen diese intrazellulär einzeln oder in sehr kleinen Gruppen vor, wie Abbildung 3.8 zeigt. Hier sind drei Stäbchen erkennbar, die sich mit den Längsseiten aneinander angelagert haben und in einer vesikelartigen Struktur im Cytosol der Zelle liegen. Die Umgrenzung der Struktur erscheint allerdings etwas diffus.

3.2.4 Intrazelluläre Aufnahme von Goldstäbchen durch HeLa Zellen

Vorversuche hatten gezeigt, dass HeLa Zellen deutlich mehr PEGylierte $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel aufnehmen als BT20 (Abbildung 3.27). Gerade bei Partikeln, die aufgrund ihrer physikalisch/chemischen Eigenschaften nur in geringer Menge von anderen Zelllinien internalisiert wurden, boten HeLa Zellen die Möglichkeit eines sehr guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Daher wurden HeLa Zellen zu diesem Zeitpunkt der Experimente zur Testung der qualitativen Partikelaufnahme eingeschlossen.

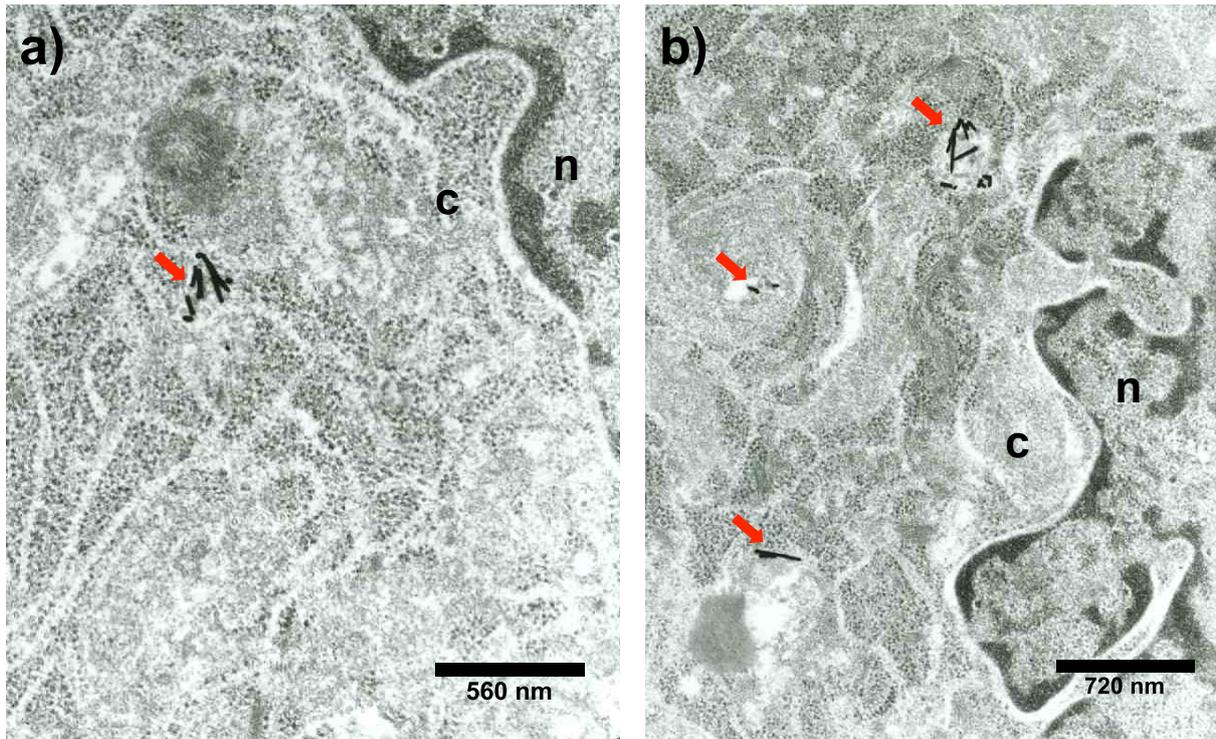


Abbildung 3.9: TEM Aufnahmen intrazellulär vorliegender Goldstäbchen in HeLa Zellen nach 4 h Inkubation

Rote Pfeile deuten auf intrazellulär vorliegende Goldstäbchen; n= Nukleus, c= Cytosol

Die Partikel entsprachen exakt denen, die in Abschnitt 3.2.3 verwendet wurden, da sie aus dem gleichen Synthesansatz stammten und zeitgleich im Zellversuch verwendet wurden. Auch die weitere Durchführung entsprach den Versuchen mit BT20 Zellen. Die Partikel waren nach der Inkubationszeit von 4 h auch hier nicht sichtbar ausgefallen oder agglomeriert. Im Vergleich zu BT20 hatten aber nach 4 h viel mehr Zellen die Stäbchen intrazellulär aufgenommen. Nahezu in jeder Zelle einer Schnittebene fanden sich Partikel einzeln oder in kleinen Agglomeraten, wie in Abbildung 3.9 dargestellt ist. Anders als bei den sphärischen Nanopartikeln, deren intrazelluläre Aufnahme bereits in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt wurde, lässt sich hier keine eindeutige Zuordnung der Partikel zu membranumgrenzten Vesikeln treffen. Teile der NP scheinen frei im Cytosol der Zellen zu liegen.

3.2.5 Intrazelluläre Aufnahme monodisperser sphärischer Goldpartikel durch BT20 und HeLa Zellen

Die hier verwendeten Partikel hatten den Vorteil, dass sie stabil in Wasser und Zellkulturmedium waren. Dadurch waren sie im Gegensatz zu allen bisher getesteten Partikelvarianten monodispers verteilt. Eine Partikelsorte war mit dem amphiphilen Linker PMA funktionalisiert und hatte einen hydrodynamischen Durchmesser von 13 nm. Die zweite Partikelsorte war über der PMA-Schicht mit einer langkettigen PEGylierung versehen worden, wodurch der hydrodynamische Durchmesser auf 30 nm anstieg. Dies entsprach in etwa der Primärgröße der sphärischen $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel aus den vorangegangenen Abschnitten.

3.2.5.1 Qualitativer Nachweis der intrazellulären Aufnahme durch TEM

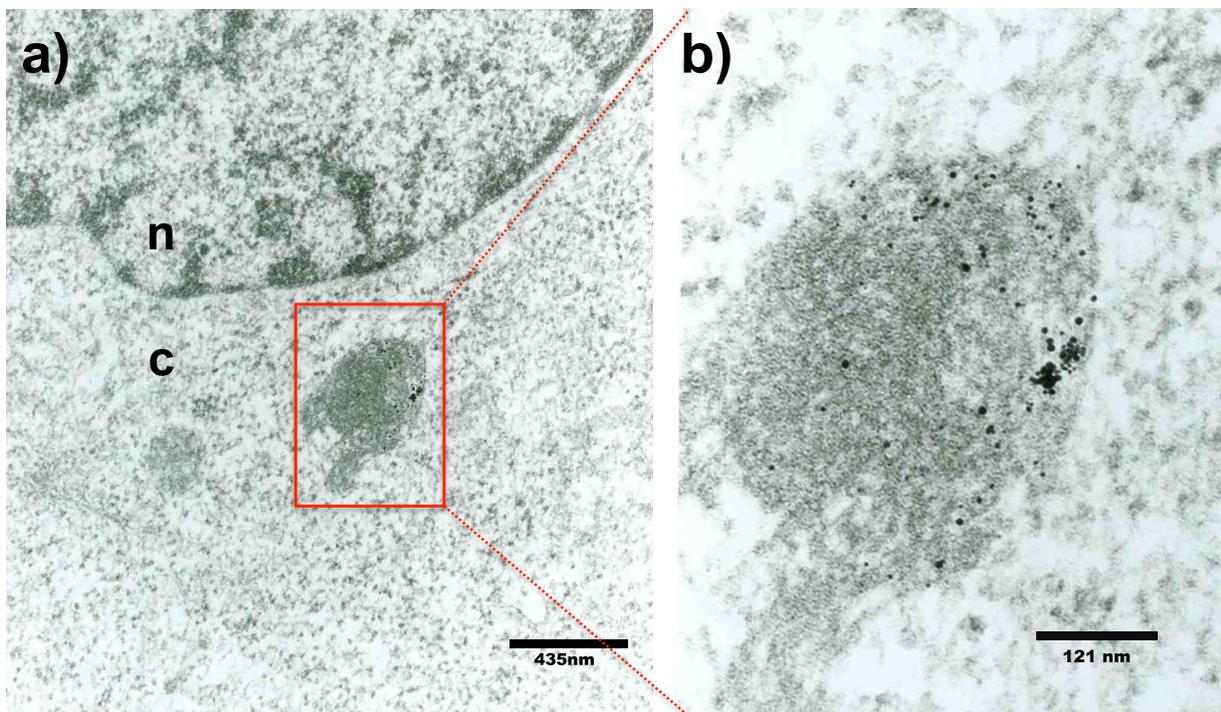


Abbildung 3.10: TEM-Aufnahmen einer HeLa-Zelle mit Au-PMA-Partikeln in einem Vesikel in der Übersicht (a) und in stärkerer Vergrößerung (b)

Schwarze Punkte innerhalb des Vesikels sind Nanopartikel; n= Nukleus, c= Cytosol

Sowohl BT20 als auch HeLa Zellen wurden 24 h mit Partikeln inkubiert, die in einer Konzentration von $5 \mu\text{g Au/ml}$ vorlagen. Dies entsprach näherungsweise der Partikelanzahl, die auch in den Versuchen mit den $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln verwendet wurde.

Die PEGylierten Partikel waren sowohl bei BT20 als auch bei HeLa Zellen nicht intrazellulär nachweisbar. Die Partikel, die auf der Oberfläche mit PMA funktionalisiert wurden, konnten nur in HeLa Zellen lokalisiert werden (Abbildung 3.10). Diese vermehrte intrazelluläre Aufnahme der PMA-funktionalisierten Partikel in HeLa Zellen im Vergleich zu den PEGylierten wirkte sich direkt auf die Vitalität der Zellen aus. Innerhalb des Versuchszeitraums von 24 h

lösten sich 50 % der Zellen von der Kulturoberfläche, wohingegen die Inkubation mit PEGylierten Partikeln in derselben Konzentration keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte. Die verbliebenen Zellen zeigten zudem morphologische Veränderungen wie Einschnürung und vermehrte Vakuolenbildung, was auf einen erhöhten Stresslevel hindeutet.

Wie in Abbildung 3.10 zu erkennen ist, werden die Au-PMA-Partikel in HeLa Zellen in kleineren Gruppen in vesikulären Strukturen kompartimentiert. Neben kleinen Agglomeraten sind vermehrt einzeln liegende Partikel erkennbar. Im Gegensatz zu den $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln finden sich innerhalb einer Schnittebene nur wenige Partikel in den überlebenden Zellen.

3.2.5.2 Quantitative Analyse der intrazellulären Aufnahme durch ICP

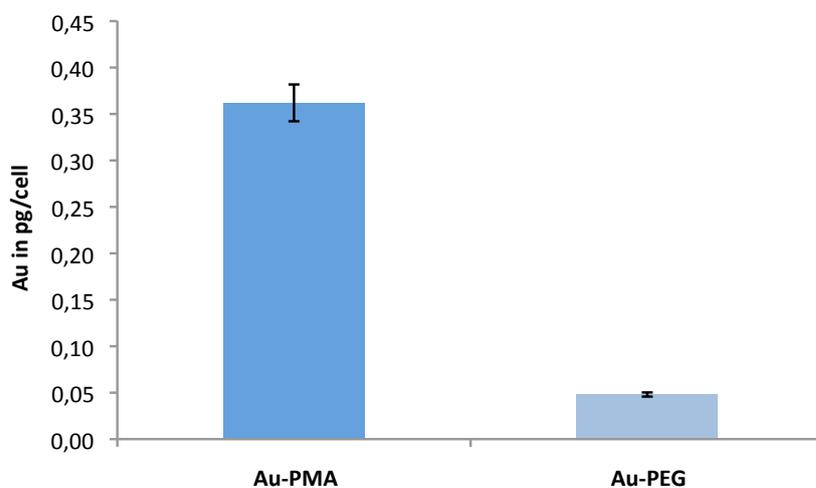


Abbildung 3.11: Goldgehalt je HeLa Zelle nach 24 h Inkubation mit PMA-funktionalisierten und PEGylierten Nanopartikeln

Für die quantitative Bestimmung des intrazellulären Goldgehaltes wurden BT20 und HeLa Zellen 24 h mit den beiden Partikelsorten inkubiert. Der Goldgehalt des Zellpellets wurde danach mittels ICP bestimmt.

Bei BT20 Zellen konnte für beide Partikelmodifikationen kein Goldgehalt gemessen werden. Die Werte bewegten sich alle unter der Nachweisgrenze des ICPs. Die Partikel werden daher von BT20 gar nicht oder in sehr geringer Menge aufgenommen.

In HeLa Zellen dagegen waren $0,362 \pm 0,02$ pg Au/Zelle der PMA-funktionalisierten Partikel und $0,048 \pm 0,002$ pg Au/Zelle der PEGylierten Partikel messbar (Abbildung 3.11). Damit enthält eine Zelle nach 24 h Inkubation 7,5fach mehr PMA-funktionalisierte als PEGylierte Partikel. Da jeweils $10 \mu\text{g}$ Gold pro Ansatz verwendet wurden, entspricht selbst diese relativ hohe Goldmenge im Zellpellet nur 1,7% der eingesetzten Gesamtmasse. Im Falle der PEGylierten Partikel waren knapp 0,5% der Gesamtmasse nachweisbar. Die Inkubation mit PMA-

funktionalisierten Partikeln wirkt zudem toxisch auf die Zellen. Zu Beginn der Experimente werden die Partikel auf Zellpopulationen gegeben, die zuvor identischen Wachstumsbedingungen unterlagen und dadurch vergleichbare Zelldichten aufwiesen. Nach Inkubation mit PEGylierten Partikeln befanden sich durchschnittlich 9×10^5 Zellen in einem 6-Well, wohingegen sich viele Zellen ablösten, die PMA-funktionalisierten Partikeln ausgesetzt waren. Dort befanden sich durchschnittlich nur $4,7 \times 10^5$ Zellen in einem 6-Well.

3.3 Quantitative Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächenmodifikation von $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln auf die Menge und die Kinetik der Nanopartikelaufnahme

Mit diesen Studien sollte untersucht werden, ob und in welcher Weise eine Veränderung der Oberflächenchemie von $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln die Menge der aufgenommenen Partikel beeinflusst. Ein Vorteil der Versuche war, dass andere beeinflussende Faktoren wie z.B. die Größe der Partikel ausgeschlossen werden konnten, da die Oberflächenveränderungen an einem Grundpartikel aus einer Synthese durchgeführt werden konnten. Verglichen wurden die Erkenntnisse anhand zweier Zelllinien. Dabei wurde mit murinen C3H RS1 Zellen begonnen, da die Ergebnisse Vorerkenntnisse im Hinblick auf mögliche in vivo Versuche liefern sollten. Als humanes Pendant wurden BT20 Zellen gewählt.

3.3.1 Untersuchungen an der murinen Mammakarzinomzelllinie C3H RS1

3.3.1.1 Dosisfindung und Setup für die spezifische Eisenquantifizierung

Die ersten Versuchsreihen dienten dazu, einen geeigneten Versuchsaufbau zu finden, der zu einer möglichst genauen Quantifizierung der intrazellulär aufgenommenen Partikel führt. Dazu musste die Dosis Nanopartikel bestimmt werden, die hoch genug für die Eisenanalytik aber andererseits gut verträglich für die Zellen ist. Zudem musste weitgehend ausgeschlossen werden, dass extrazellulär anhaftendes Material fälschlicherweise in den analytischen Eisennachweis gelangt. Es stellte sich heraus, dass ein Eisengehalt ab $600 \mu\text{g/ml}$ bei silica-tisierten Partikeln zu einer Wachstumshemmung bei C3H RS1 Zellen führt (Abbildung 3.12)

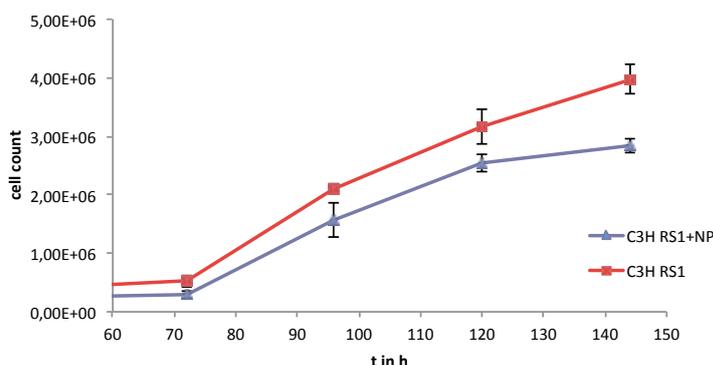


Abbildung 3.12: Wachstumskurven von C3H RS1 Kulturen mit und ohne Zugabe von NP ($600 \mu\text{g Fe/ml}$)

Zu Beginn wurden die Zellen in 25 cm^2 Kulturflaschen kultiviert. Ein subkonfluenter Zellrasen, der mit Nanopartikeln ($50 \mu\text{g Fe/ml}$) inkubiert wurde, lieferte dadurch ein großes Zellpellet mit viel Eisen für die analytische Bestimmung. Die Schwierigkeit war, die an dem Kulturmaterial und Zellmembranen anhaftenden Partikel vollständig zu entfernen. Bereits lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass nach dem Spülen und Trypsinieren der Zellen große Parti-

kelagglomerate an den Zellmembranen hängen blieben und so die Eisenanalytik massiv verfälschten (Abbildung 3.13).

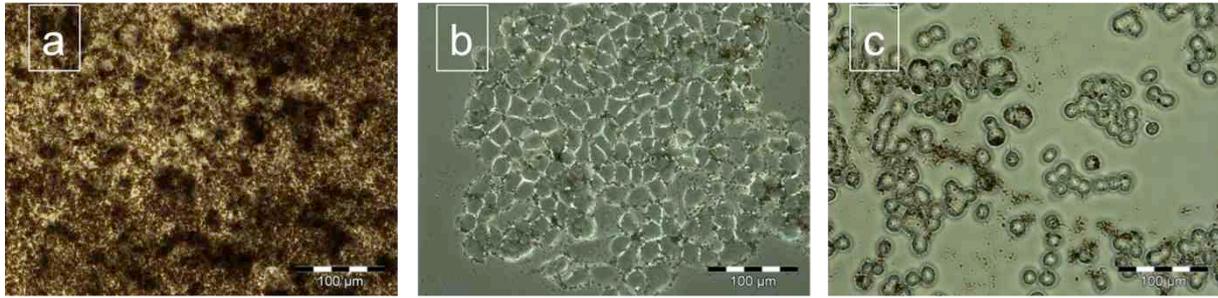


Abbildung 3.13: Inkubation von C3H RS1 Zellen mit PEGylierten NP

a) Zellrasen mit Medium + NP, b) Zellen nach Spülen -NP, c) trypsinisierte Zellen mit nicht abspülbaren NP nach Ablösung aus 25 cm² Kulturflaschen

Versuche, die Zellen mit Oxalsäure oder Natriumoxalat von den extrazellulären Nanopartikeln zu befreien, schlugen fehl. Zwar war konzentrierte Oxalsäure in der Lage, den Eisenkern der Partikel zu komplexieren, jedoch konnte keine Bedingung gefunden werden, unter der die Zellen dabei intakt blieben. Die Lösung dieser Probleme war, die Zellen in einem 6-Well Format zu kultivieren. Dadurch konnte man die Zellen von oben komplett erreichen und so effektiv spülen, dass keine extrazellulären Partikel im Lichtmikroskop erkennbar waren. Als dazu am besten geeignet erwies sich auf 37°C vorgewärmtes Zellkulturmedium mit allen Additiven. Ein möglichst dichter Zellrasen verringerte zudem den Anteil von Partikeln, die an der Plastikoberfläche der Kulturmateriale kleben konnten. Nach Anpassung der Eisenanalytik an geringere Eisenmengen konnte die eingesetzte Konzentration auf 50 µg Fe/ml gesenkt werden. Partikel waren weiterhin im Überschuss vorhanden, wohingegen die Hintergrundadsorption reduziert werden konnte. In einem 6-Well-Ansatz wurden zum Zeitpunkt der Nanopartikelexposition 100 µg Fe auf einem subkonfluenten Zellrasen eingesetzt, wobei dies im Falle von C3H RS1 durchschnittlich etwa 7×10^5 und bei BT20 ca. 2×10^5 Zellen entsprach. Das Kulturmedium war dabei deutlich braun verfärbt.

Getestet wurden folgende Oberflächenmodifikationen: Carboxylierung, Thiolisierung, PEGylierung, Epoxylierung, Amino sowie PEG/Amino in Kombination. Als Referenz dienen Partikel ohne weitere Modifikationen auf der Silicaschale. Zur Vereinfachung der Darstellung werden in den folgenden Teilabschnitten die Partikel gemeinsam betrachtet, die ein vergleichbares Verhalten in der Zellkultur zeigten.

3.3.1.2 Aufnahmekinetik carboxylierter und thiolisierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel (50 µg Fe/ml)

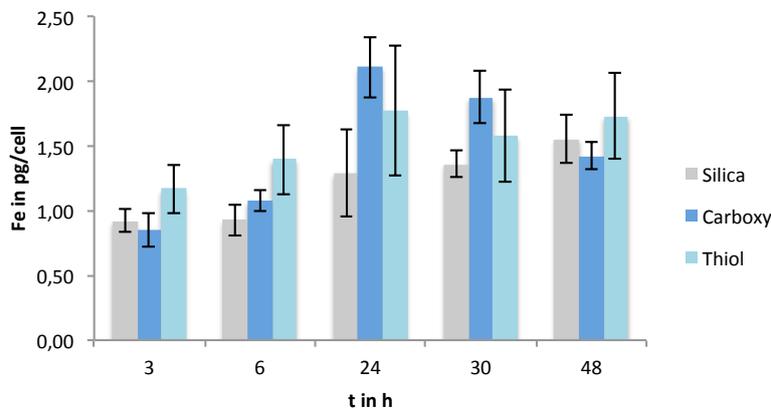


Abbildung 3.14: Aufnahme carboxylierter und thiolisierter Partikel durch C3H RS1

Der Gehalt silicatisierter Partikel beträgt nach 3 h $0,92 \pm 0,09$ pg Fe/Zelle und erreicht nach 48 h das Maximum bei $1,55 \pm 0,19$ pg Fe/Zelle. Carboxylierte Partikel erreichen ihr Maximum nach 24 h mit $2,11 \pm 0,24$ pg Fe/Zelle und fallen bei 48 h wieder auf $1,42 \pm 0,11$ pg Fe/Zelle ab. Thiolisierte Partikel liegen nach 3 h mit einem vergleichsweise etwas höheren Wert von $1,17 \pm 0,19$ pg Fe/Zelle zellassoziiert vor und erreichen nach 24 h mit $1,77 \pm 0,50$ pg Fe/Zelle ihr Maximum, das im Rahmen der Standardabweichungen auf stabilem Niveau bis 48 h Inkubationsdauer verbleibt.

3.3.1.3 Aufnahmekinetik PEGylierter und epoxylierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel (50 µg Fe/ml)

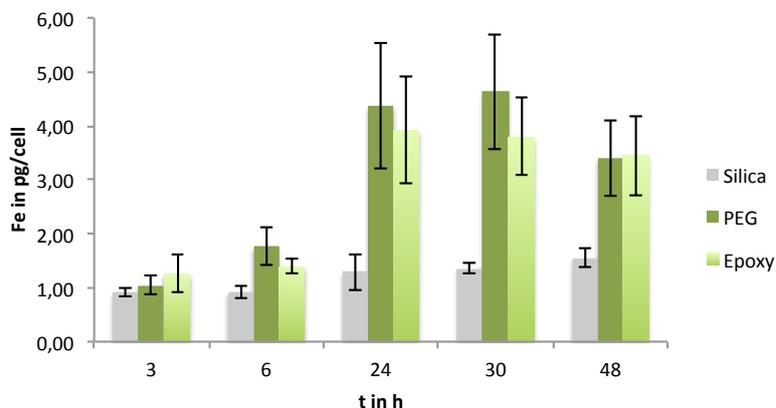


Abbildung 3.15: Aufnahme PEGylierter und epoxylierter Partikel durch C3H RS1

Die Werte der silicatisierten Partikel sind denen aus Abbildung 3.14 identisch und dienen als Referenz. Die Aufnahme der PEGylierten Partikel beginnt nach 3 h auf dem Niveau der Referenzpartikel und erreicht nach 30 h das Maximum bei $4,63 \pm 1,06$ pg Fe/Zelle. Bis 48 h sinkt der Gehalt wieder auf $3,38 \pm 0,70$ pg Fe/Zelle. Die epoxylierten Partikel erreichen ihr absolutes Maximum nach 24 h mit $3,91 \pm 0,99$ pg Fe/Zelle. Ihr Gehalt sinkt bis 48 h wieder leicht auf das Niveau der PEGylierten ab.

3.3.1.4 Aufnahmekinetik von Amino- und Amino/PEG- $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel (50 μg Fe/ml)

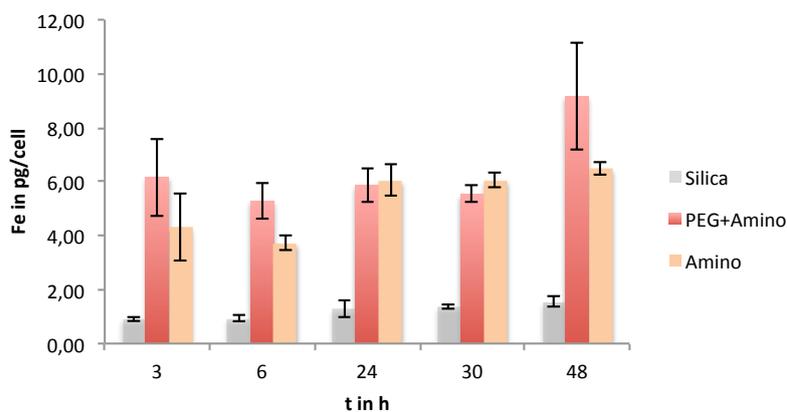


Abbildung 3.16: Aufnahme von Amino- und Amino/PEG-Partikel durch C3H RS1

Die aminofunktionalisierten Partikel liegen nach 3 h bereits mit $4,32 \pm 1,26$ pg Fe/Zelle vor. Das Maximum beträgt $6,48 \pm 0,23$ pg Fe/Zelle nach 48 h. Der Gehalt von den mischfunktionalisierten Amino/PEG-Partikel bleibt zwischen 3 und 30 h im Rahmen der Standardabweichungen konstant mit maximal $6,17 \pm 1,44$ pg Fe/Zelle. Es erfolgt ein Anstieg auf $9,16 \pm 1,97$ pg Fe/Zelle nach 48 h.

3.3.1.5 Zusammenfassung

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Auswirkungen von Oberflächenmodifikationen auf die zelluläre Aufnahme von SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln in C3H RS1 Zellen *in vitro*

Partikeloberfläche	Maximale Eisenmenge in pg /Zelle innerhalb 48 h	Unterschied zu Silica in pg/Zelle	Maximale Eisenmenge im Zellpellet in % der applizierten Gesamtmenge
Silica	1,55 ± 0,19	/	5 %
Thiolisierung	1,77 ± 0,5	+ 0,22	5 %
Carboxylierung	2,11 ± 0,24	+ 0,56	6 %
PEGylierung	4,63 ± 1,06	+ 3,08	12 %
Epoxylierung	3,91 ± 0,99	+ 2,36	12 %
Aminogruppen	6,48 ± 0,23	+ 4,93	24 %
Amino/PEG	9,16 ± 1,97	+ 7,61	31 %

Eisenoxidnanopartikel mit Silicaschale, deren Oberfläche nicht modifiziert wurde, wurden von C3H RS1 Zellen im geringsten Umfang aufgenommen. Von den applizierten 100 µg Eisen fanden sich maximal 4,63±1,06 µg Fe und somit nur knapp 5 % der eingesetzten Menge im Zellpellet wieder.

Carboxylierung und Thiolisierung der Silicaschale haben bei dieser Zelllinie im Rahmen der Standardabweichung nur einen geringen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme im Vergleich zu den Referenzpartikeln. Auch hier finden sich maximal 5-6 % der Eisenmenge im Pellet wieder (4,80±0,61 µg bzw. 5,83±0,69 µg). Die Aufnahmekinetiken unterscheiden sich allerdings teilweise. So liegen nach 24 h durchschnittlich 64 % mehr carboxylierte Partikel zellulär vor als bei den Referenzpartikeln, wobei die Standardabweichungen recht hoch sind. Nach 48 h ist dieser Unterschied durch einen Abfall des zellulären Anteils carboxylierter Partikel allerdings nicht mehr existent (Abbildung 3.14).

Epoxylierung und PEGylierung der Oberfläche erhöhen die aufgenommene Partikelmenge im Vergleich zu silicatisierten Partikeln um 2,4 bzw. 3,1 pg Fe/Zelle, was wiederum einer Steigerung von rund 150 bzw. 200 % entspricht. Beide Partikelsorten finden sich zu ca. 12 % der eingesetzten Menge im Zellpellet (11,9±2,82 µg bzw. 12,00±2,58 µg).

Funktionalisierungen mit Aminosilan oder mit einer Mischung aus Amino- und PEG-Gruppen haben den größten Einfluss. Aminogruppen alleine führen zu einer gemessenen Maximalmenge von 23,57±0,64 µg Fe im Zellpellet. Die Mischfunktionalisierung aus Amino- und

PEG-Gruppen lässt den Anteil der Nanopartikel, der nach 48 h zellassoziiert vorliegt, auf 31 % der applizierten Gesamtmenge ansteigen ($31,07 \pm 4,93 \mu\text{g Fe}$).

3.3.2 Untersuchungen an der humanen Mammakarzinomzelllinie BT20

Zur besseren Abschätzung, wie viele der gemessenen Partikel extrazellulär vorlagen, wurden bei der Quantifizierung mit BT20 Zellen 4°C Kontrollen durchgeführt. Die um diesen Wert korrigierten Messwerte werden in den Graphiken neben den unkorrigierten Werten aufgetragen.

Durch die Absenkung der Temperatur wird der energieabhängige Stoffwechsel der Zellen und somit die Endocytose der Partikel unterbunden. Die Partikel können dadurch nur an die Zellmembran binden. Aufgrund der toxischen Auswirkungen für die Zellen konnte diese Kontrolle nur über einen Zeitraum von 4 h durchgeführt werden. Der dabei ermittelte Messwert wurde dann von allen Messwerten der fünf Probenpunkte abgezogen. Vor- und Nachteile dieses Ansatzes werden in Abschnitt 4.2.4 der Diskussion näher betrachtet.

Die Partikeldosis wurde mit $100 \mu\text{g Fe/Ansatz}$ im Vergleich zu C3H RS1 beibehalten.

3.3.2.1 Aufnahmekinetik silicatisierter $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel (unmodifiziert)

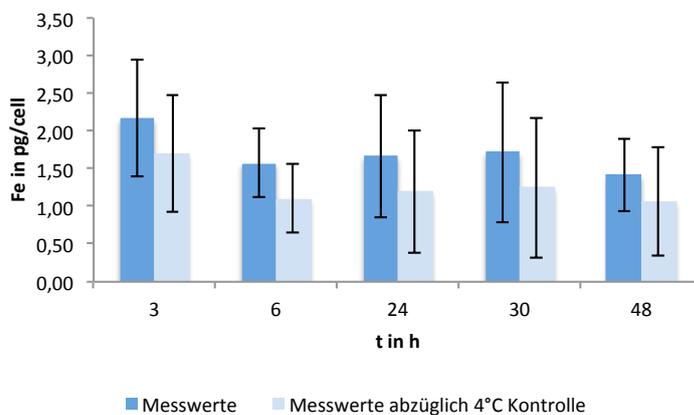


Abbildung 3.17: Aufnahme silicatisierter Partikel durch BT20

Die Aufnahme silicatisierter Partikel folgt keiner klaren Dynamik. Vielmehr bleibt der gemessene Eisenwert über 48 h im Rahmen der Standardabweichungen konstant. Der höchste Messwert beträgt ohne 4°C Kontrolle $2,17 \pm 0,78 \text{ pg Fe/Zelle}$ nach 3 h Inkubation. Der niedrigste wird mit $1,42 \pm 0,48 \text{ pg Fe/Zelle}$ nach 48 h erreicht. Der Messwert der 4°C Kontrolle beträgt $0,47 \pm 0,12 \text{ pg Fe/Zelle}$.

3.3.2.2 Aufnahmekinetik thiolisierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel

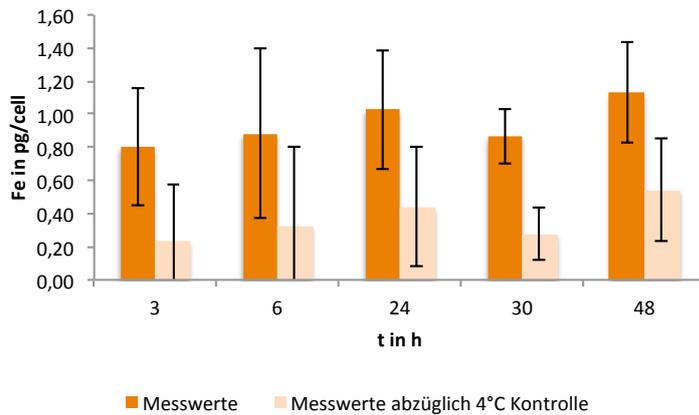


Abbildung 3.18: Aufnahme thiolisierter Partikel durch BT20

Auch die Aufnahme thiolisierter Partikel durch BT20 unterliegt innerhalb des Beobachtungszeitraumes keiner ausgeprägten Dynamik. Im Rahmen der Standardabweichungen bleibt der Eisengehalt konstant. Der höchste Messwert beträgt nach 48 h $1,13 \pm 0,31$ pg Fe/Zelle bzw. $0,54 \pm 0,31$ pg Fe/Zelle abzüglich der 4°C Kontrolle. Der bei der Kontrolle ermittelte Wert beläuft sich somit auf $0,59 \pm 0,23$ pg Fe/Zelle.

3.3.2.3 Aufnahmekinetik epoxylierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel

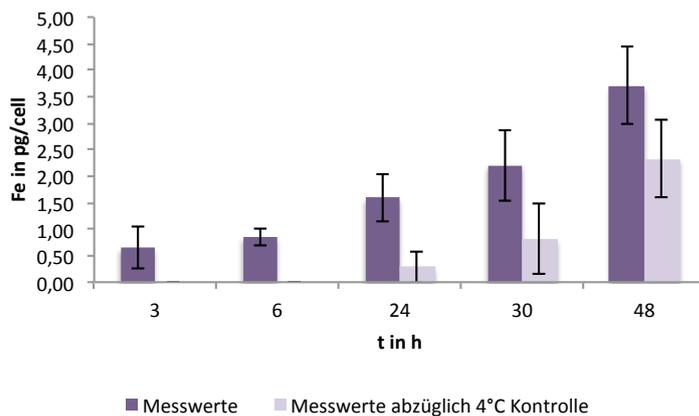


Abbildung 3.19: Aufnahme epoxylierter Partikel durch BT20

BT20 Zellen akkumulieren die epoxylierten Partikel über 48 h stetig. Nach 3 h beträgt der Eisengehalt $0,64 \pm 0,39$ pg Fe/Zelle und steigt binnen 48 h auf $3,71 \pm 0,74$ pg Fe/Zelle an. Zieht man den Eisenwert ab, der unter 4°C Bedingungen ermittelt wurde, ist in den ersten 6 h der Inkubationszeit kein intrazellulärer Eisenwert messbar. Der korrigierte Wert steigt bei 48 h auf $2,33 \pm 0,74$ pg Fe/Zelle an. Der Wert der 4°C Kontrolle beträgt $1,38 \pm 0,37$ pg Fe/Zelle.

3.3.2.4 Aufnahmekinetik PEGylierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel

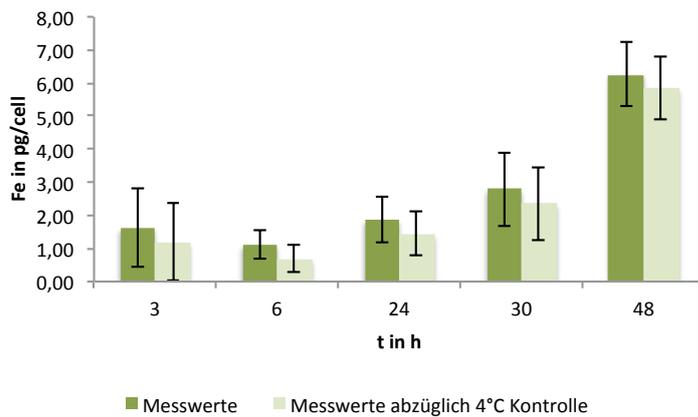


Abbildung 3.20: Aufnahme PEGylierter Partikel durch BT20

Wie bei den epoxylierten Partikeln so folgt auch die Aufnahme PEGylierter Partikel einer Dynamik, wobei die Werte bis 24 h auf einem ähnlichen Niveau verbleiben. Nach 3 h beträgt der Eisenwert $1,63 \pm 1,18$ pg Fe/Zelle. Der höchste Anstieg erfolgt zwischen 30 und 48 h auf $6,26 \pm 0,95$ pg Fe/Zelle. Der Anteil der 4°C Kontrolle am Messwert ist mit $0,46 \pm 0,12$ pg Fe/Zelle vergleichsweise gering.

3.3.2.5 Aufnahme aminofunktionalisierter Partikel durch BT20

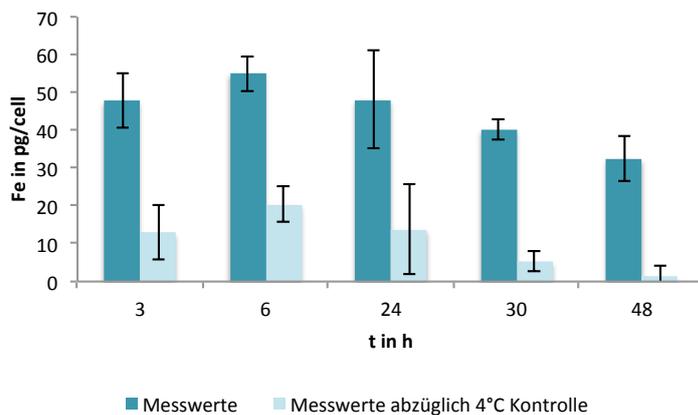


Abbildung 3.21: Aufnahme aminofunktionalisierter Partikel durch BT20

Verglichen mit den weiteren getesteten Modifikationen liegen aminofunktionalisierte Partikel bereits nach 3 h in hoher Zahl zellassoziiert vor. Das Maximum wird nach 6 h mit $55 \pm 4,7$ pg Fe/Zelle erreicht. Danach sinkt der gemessene Eisenwert stetig ab und erreicht nach 48 h $32 \pm 5,9$ pg Fe/Zelle. Der Wert der 4°C Kontrolle ist sehr hoch und beträgt $34,81 \pm 5,23$ pg

Fe/Zelle. Dadurch beträgt der korrigierte Eisenwert nach 48 h nur noch $1,25 \pm 3,07$ pg Fe/Zelle.

3.3.2.6 Zusammenfassung

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Auswirkungen von Oberflächenmodifikationen auf die zelluläre Aufnahme von $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln in BT20 Zellen *in vitro*

Partikeloberfläche	Maximale Eisenmenge in pg/Zelle	Unterschied zu Silica in pg/Zelle	4°C Kontrolle in pg/Zelle	Maximale Eisenmenge im Zellpellet in % der applizierten Gesamtmenge
Silica	$2,17 \pm 0,78$	-	$0,47 \pm 0,12$	1 %
Thiolisierung	$1,13 \pm 0,31$	- 1,04	$0,59 \pm 0,23$	1 %
Epoxylierung	$3,71 \pm 0,74$	+ 1,54	$1,38 \pm 0,37$	2 %
PEGylierung	$6,26 \pm 1,18$	+ 4,09	$0,46 \pm 0,12$	4 %
Aminogruppen	$55 \pm 4,7$	+ 52,83	$34,81 \pm 5,23$	16 %

Eisenoxidnanopartikel mit Silicaschale, deren Oberfläche nicht weiter modifiziert wurde, wurden von BT20 Zellen im geringsten Umfang aufgenommen oder waren zumindest fest mit der Zellmembran assoziiert. Die maximal im Zellpellet befindliche Eisenmenge beläuft sich auf $0,91 \pm 0,54$ µg Fe und entspricht so ca. 1 % der applizierten Menge von 100 µg pro Kultur.

Auf demselben Niveau befinden sich thiolisierte Partikel mit maximal $0,95 \pm 0,15$ µg Fe. Epoxylierte Partikel werden zwar in größerer Zahl im Zellpellet nachgewiesen, ihr Anteil an der Gesamtmenge ist mit ca. 2 % ($2,22 \pm 0,38$ µg Fe) jedoch ebenfalls gering. Im Vergleich zu Silicatisierung und Thiolisierung entspricht dies dennoch einer Verdopplung.

Eine Steigerung ähnlicher Größenordnung hat eine PEGylierung des Grundpartikels zur Folge. Hier finden sich nach 48 h $4,15 \pm 1,08$ µg Fe pro Zellkultur.

Den größten Einfluss hat die Funktionalisierung mit Aminosilan. Dies sorgt dafür, dass ca. 16 % ($15,81 \pm 2,16$ µg Fe) der Partikelmenge nach 48 h zellgebunden vorliegen.

Die korrigierten Messwerte zeigen, dass im Falle der aminosilanisierten Partikel der Großteil extrazellulär vorliegt (Abbildung 3.21). Der Anteil ist bei den anderen Partikelsorten deutlich geringer. Den geringsten Anteil extrazellulär anhaftender Partikel weisen die PEGylierten Partikel auf (Abbildung 3.20).

3.3.3 Vergleich der Partikelbindung (intra- sowie extrazellulär) durch BT20 und C3H RS1 Zellen

Da bei den Versuchen mit C3H RS1 noch keine 4°C- Kontrollen durchgeführt wurden (Abschnitt 3.3.1) oder schwierig zu interpretieren waren (Abschnitt 4.2.4), können hier nur unkorrigierte Werte miteinander verglichen werden. Die Formulierung „Partikelaufnahme“ bezeichnet im folgenden Abschnitt daher sowohl extra- als auch intrazellulär vorliegende Anteile, da zwischen ihnen nicht sauber unterschieden werden kann. Die ermittelten Werte der 4°C- Kontrollen bei BT20 (Tabelle 3.2) haben gezeigt, dass bei negativ geladenen Partikeln der überwiegende Teil der gemessenen Eisenmenge intrazellulär vorliegt. Hingegen werden positiv geladene Partikel offenbar in großer Menge extrazellulär gebunden und durch die Waschschriffe nicht erfolgreich entfernt. Aussagekraft sowie Vor- und Nachteile der 4°C- Kontrolle werden im Abschnitt 4.2.4 noch diskutiert.

3.3.3.1 Silicapartikel (unmodifiziert)

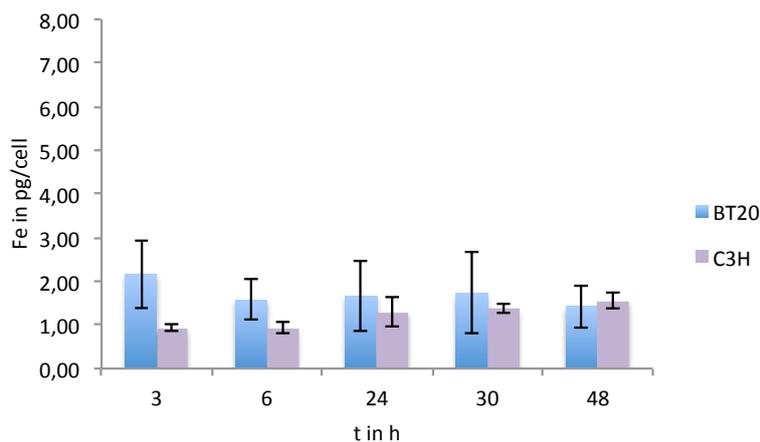


Abbildung 3.22: Aufnahme silicatisierter Partikel durch C3H RS1 und BT20

Die Y-Achse in Abbildung 3.22 und den weiteren Graphiken dieses Abschnittes ist auf maximal 8 pg Fe/Zelle normiert, um zusätzlich zum Verhalten der Zelllinien den Vergleich der Partikelsorten untereinander zu illustrieren. Deutlich wird, dass BT20 Zellen nach 3 h etwa doppelt so viele Partikel aufgenommen haben wie C3H RS1 Zellen. Allerdings ist dabei die Standardabweichung deutlich höher. Die Aufnahme durch BT20 Zellen folgt keiner Dynamik sondern bleibt über den Versuchszeitraum im Rahmen der Standardabweichungen konstant. Nach 48 h haben beide Zelllinien mit $1,42 \pm 0,48$ bzw. $1,55 \pm 0,19$ pg Fe/Zelle etwa gleich viele Partikel aufgenommen.

3.3.3.2 Thiolisierte Partikel

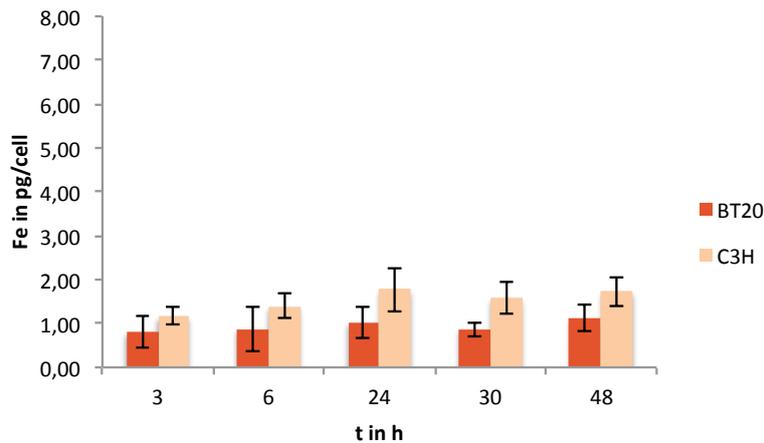


Abbildung 3.23: Aufnahme thiolisierter Partikel durch C3H RS1 und BT20

Thiolisierte Partikel werden von beiden Zelllinien auf vergleichbarem Niveau gebunden, ohne dabei einer starken Dynamik zu folgen. C3H RS1 Zellen nehmen etwas mehr Partikel auf als BT20. Nach 48 h betragen die Werte $1,13 \pm 0,31$ für BT20 und $1,73 \pm 0,33$ pg Fe/Zelle für C3H RS1. Damit befinden sich die Werte im Bereich der unmodifizierten Partikel.

3.3.3.3 Epoxylierte Partikel

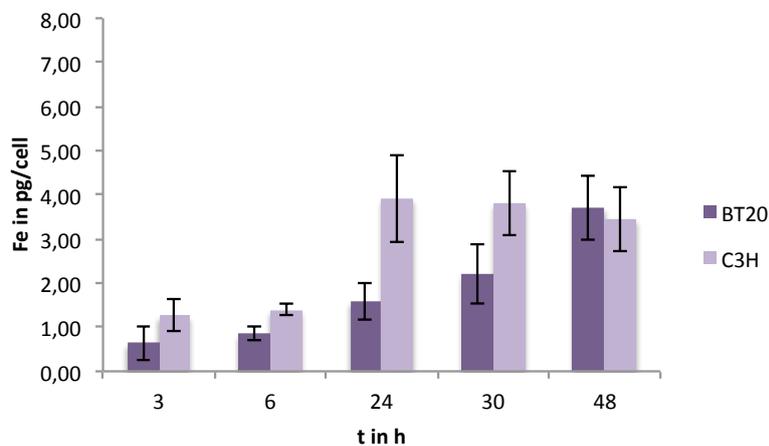


Abbildung 3.24: Aufnahme epoxylierter Partikel durch C3H RS1 und BT20

Epoxylierte Partikel werden von beiden Zelllinien mit unterschiedlicher Dynamik internalisiert. Bewegen sich die Werte nach 3 und 6 h noch auf vergleichbarem Niveau, so betragen diese nach 24 h $1,59 \pm 0,44$ für BT20 und $3,45 \pm 0,74$ pg Fe/Zelle für C3H RS1. Während dieser Wert bei C3H RS1 bis 48 h konstant bleibt, akkumulieren BT20 bis zu $3,71 \pm 0,74$ pg Fe/Zelle. Die absoluten Maxima liegen damit deutlich über den silicatisierten und thiolisierten Partikeln.

3.3.3.4 PEGylierte Partikel

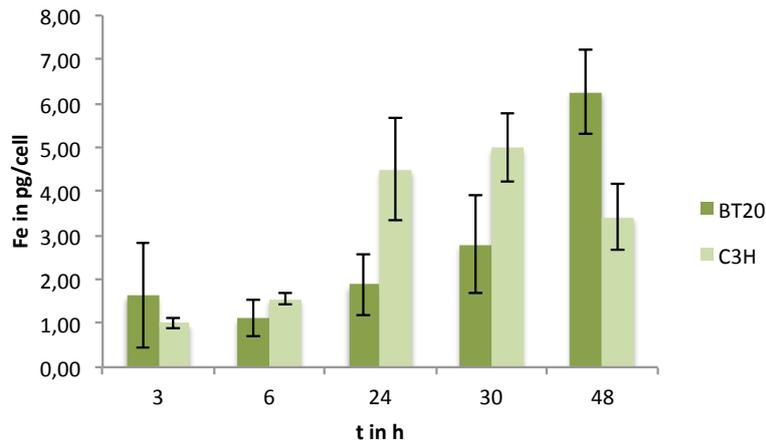


Abbildung 3.25: Aufnahme PEGylierter Partikel durch C3H RS1 und BT20

Die Aufnahme PEGylierter Partikel entwickelt sich wie bei epoxylierten Partikeln innerhalb der ersten 6 h bei beiden Zelllinien auf niedrigem Niveau. Nach 24 h beträgt die Eisenmenge bei BT20 Zellen $1,87 \pm 0,69$ pg Fe/Zelle wohingegen C3H RS1 Zellen bereits $4,49 \pm 1,17$ pg Fe/Zelle enthalten. C3H RS1 erreichen nach 30 h das absolute Maximum, der Eisengehalt sinkt bis 48 h sogar wieder ab. Im Gegensatz dazu akkumulieren BT20 über den Versuchszeitraum deutlich langsamer, erreichen aber nach 48 h das Maximum mit $6,26 \pm 0,95$ pg Fe/Zelle.

3.3.3.5 Aminofunktionalisierte Partikel

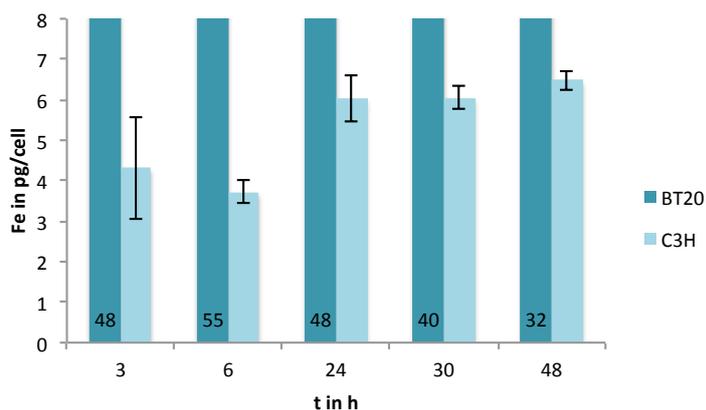


Abbildung 3.26: Aufnahme aminofunktionalisierter Partikel durch C3H RS1 und BT20

Aminofunktionalisierte Partikel werden von beiden Zelllinien in unterschiedlicher Menge aufgenommen. Dabei liegt der Eisengehalt verglichen mit den bisher getesteten Modifikationen

bereits nach 3 h Inkubationszeit sehr hoch ($4,32 \pm 1,26$ pg Fe/Zelle für C3H RS1 und $48 \pm 7,34$ pg Fe/Zelle für BT20). Bei beiden Zelllinien bleibt der Eisengehalt danach relativ konstant und schwankt im Rahmen der Standardabweichungen nur moderat. Allerdings liegen bei BT20 Zellen verglichen zu C3H RS1 ca. 10x mehr Partikel pro Zelle zellgebunden vor.

3.3.3.6 Zusammenfassung

Das Aufnahmeverhalten der beiden Zelllinien ähnelt sich im Falle von vier der fünf getesteten Partikelsorten. Der maximale Eisenwert pro Zelle befindet sich bei silicatisierten, thiolisierten, epoxylierten und PEGylierten Partikeln auf vergleichbarem Niveau. Epoxylierte und PEGylierte Partikel werden von C3H RS1 Zellen schneller aufgenommen, bei silicatisierten und thiolisierten NP gibt es keinen signifikanten Unterschied der Aufnahmekinetik. Die Aufnahme aminofunktionalisierter Partikel folgt zwar bei beiden Zelllinien keiner ausgeprägten Dynamik, jedoch enthalten BT20 Zellen im Vergleich zu C3H RS1 maximal zehnfach soviel Eisen und somit Partikel pro Zelle.

3.4 Studien zum Aufnahmemechanismus modifizierter $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel durch Tumorzellen

Durch die gezielte Depletion einzelner Proteine aus der Endocytosemaschinerie sollten Rückschlüsse auf den Aufnahmemechanismus der verwendeten Nanopartikel in Tumorzellen gezogen werden. Dazu wurde mit Hilfe künstlich synthetisierter RNAs, sogenannter „short interfering RNA“ (siRNA), die Translation des entsprechenden Zielproteins unterbunden und die Auswirkung auf die Nanopartikelaufnahme beobachtet. Als Modelzelllinie wurde die humane Cervixkarzinomzelllinie HeLa gewählt, da diese im Vergleich zu BT20 mehr als viermal so viele Partikel pro Zelle aufnahm (Abbildung 3.27). Dadurch bot sich ein sehr günstiges Signal-Rausch-Verhältnis, da gemessen am hohen intrazellulären Eisenanteil prozentual nur sehr geringe extrazelluläre Verunreinigungen vorhanden waren. Im Falle der PEGylierten Partikel betrug bei den HeLa Zellen der Messwert der 4°C Kontrolle $0,82 \pm 0,12$ pg Eisen/Zelle gegenüber einem Messwert nach Inkubation mit Partikeln bei 37°C von über 20 pg Fe/Zelle .

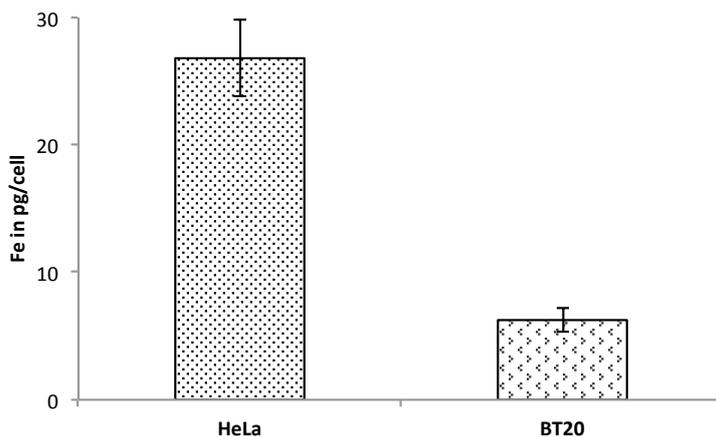


Abbildung 3.27: Eisenwert in HeLa und BT20 Zellen nach 48 h Inkubation mit PEGylierten FeOx-NP

3.4.1 Einfluss des Knockdowns von Flotillin-1, Caveolin-1, Clathrin und Dynamin2 in HeLa Zellen auf die intrazelluläre Aufnahme modifizierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel

Die Transfektion der Zellen erfolgte mittels der Lipofectamine™ Technologie (Abschnitt 2.6.2). Die verwendeten Partikel entsprechen den in Abschnitt 2 und 3.3 beschriebenen.

3.4.1.1 Nachweis des effektiven Knockdowns von Flotillin-1, Caveolin-1, Clathrin und Dynamin2

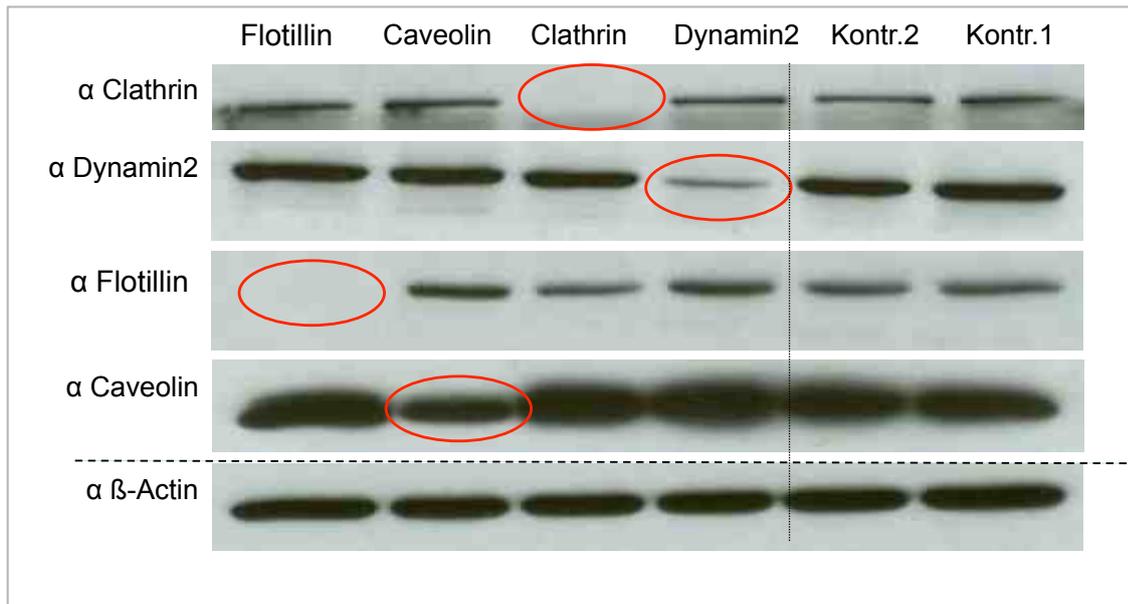


Abbildung 3.28: repräsentative Röntgenfilmausschnitte der Western-Blot-Membranen mit transfizierten Zelllysaten von HeLa Zellen, Targets: Flotillin-1, Caveolin-1, Clathrin, Dynamin2

In der Horizontalen sind die Target-Proteine gelistet, die in dem entsprechenden darunter aufgetragenen Zelllysate durch die entsprechende siRNA ausgeschaltet werden sollten. In der Vertikalen sind die Primärantikörper (α) gelistet, die in dem entsprechenden horizontalen Ausschnitt das Zielprotein detektieren. Kontrolle 2 entspricht der „Nonsense“ siRNA (ohne intrazelluläres Target), Kontrolle 1 entspricht der Mock-Kontrolle (Zellen mit Transfektionsreagenz aber ohne siRNA behandelt). Die roten Kreise heben die Regionen hervor, in der durch Fehlen oder Abschwächung der Bande ein Einfluss der verwendeten siRNA erkennbar ist.

Wie der Röntgenfilmausschnitt zeigt, war der Knockdown von Clathrin effektiv. In dem oberen Ausschnitt in

Abbildung 3.28 wird in der Spur, in der die Zellen mit spezifischer siRNA gegen Clathrin behandelt wurden, kein Signal durch die Antikörper detektiert. Bei allen anderen Zelllysaten wird dagegen ein Signal in vergleichbarer Stärke angezeigt.

Auch die Translation von Dynamin2 wurde effektiv verhindert, wobei der Antikörper ein Restsignal detektiert. Die beobachtete Bande hat verglichen mit den Kontrollbanden der anderen Spuren eine geschätzte Intensität von 10 bis 20 %. Der Knockdown war also nicht vollständig aber ausreichend, um einen Effekt beobachten zu können.

Flotillin-1 wurde ebenfalls effektiv depletiert. Der mittlere Ausschnitt in Abbildung 3.28 zeigt, dass in dem rot markierten Bereich kein Signal zu erkennen ist. Alle weiteren Proben und Kontrollen enthalten aber Flotillin-1 in vergleichbarer Menge.

Der Knockdown von Caveolin-1 war unvollständig. Nach Austestung mehrerer siRNAs war die hier verwendete die effektivste. Aus den semiquantitativen Western-Blot-Entwicklungen konnte zwar nur eine Effektivität von circa 60% abgeschätzt werden, jedoch reichte dies aus, um einen Effekt auf die Endocytose der NP zu beobachten.

Die letzte Spur zeigt den Gehalt von β -Actin in den Zelllysaten. Die Banden sind bei allen Proben vergleichbar. Dies zeigt, dass in allen Spuren die gleiche Menge Gesamtprotein aufgetragen wurde.

3.4.1.2 Auswirkungen des Knockdowns von Flotillin-1, Caveolin-1 und Clathrin auf die intrazelluläre Aufnahme PEGylierter $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel

Die Depletion von Dynamin2 wurde erst im weiteren Verlauf der Experimente etabliert und die Auswirkung quantitativ in Abschnitt 3.4.1.5 im Zusammenhang mit fluoreszierenden Partikeln betrachtet.

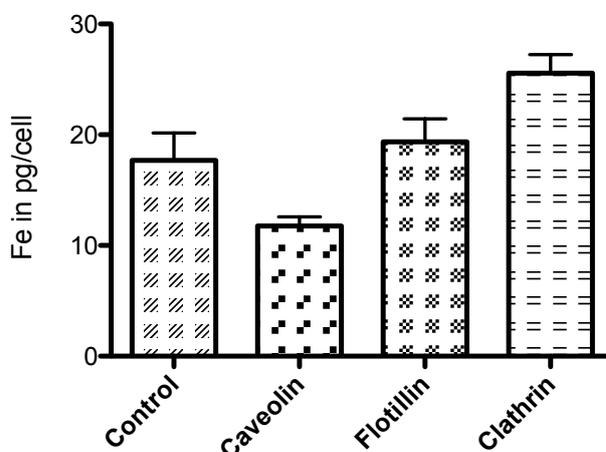


Abbildung 3.29: Eisengehalte pro Zelle in transfizierten HeLa Zellen nach 24 h Inkubation mit PEGylierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln

Control = Mock-Kontrolle; übrige Bezeichnungen benennen das depletierte Ziel-Protein im Zelllysate; n=3

Im Vergleich zur Kontrolle (17.68 ± 2.49 pg Fe/Zelle) fanden sich in Zellen mit reduziertem Caveolin-1 33% weniger Partikel (11.77 ± 0.82 pg Fe/Zelle). Durch einen ungepaarten, zweiseitigen t-Test ($\gamma = 95\%$) konnte aber keine Signifikanz nachgewiesen werden ($p = 0,087$).

Der Knockdown von Flotillin-1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Eisengehalt der Zellen (19.36 ± 2.07 pg Fe/Zelle).

Zellen, in denen Clathrin depletiert wurde, enthielten mit 25.56 ± 1.69 pg Fe/Zelle 45% mehr Partikel als die Kontrollzellen. Allerdings konnte auch hier ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test ($\gamma = 95\%$) keine Signifikanz nachweisen ($p = 0,0589$).

Die fehlenden Signifikanzen lassen sich mit der relativ hohen Standardabweichung der Kontrolle in Verbindung mit der geringen Versuchsanzahl mit $n=3$ begründen. Die Versuchsbedingungen konnten durch gewonnen Routine in den folgenden Experimente besser kontrolliert werden, wodurch die Variabilität des Systems weiter verringert wurde.

3.4.1.3 Auswirkungen des Knockdowns von Flotillin-1, Caveolin-1 und Clathrin auf die intrazelluläre Aufnahme carboxylierter $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel

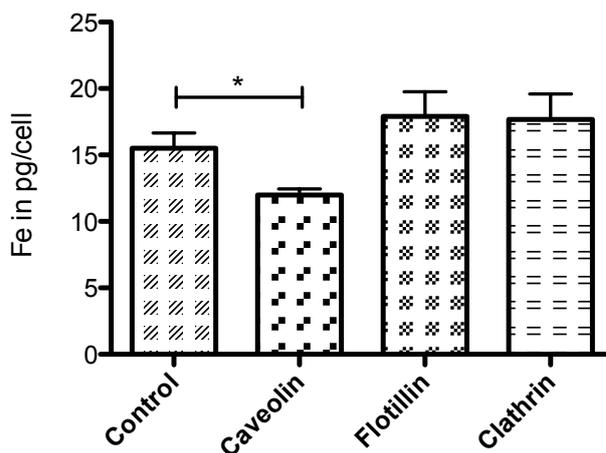


Abbildung 3.30: Eisengehalte pro Zelle in transfizierten HeLa Zellen nach 24 h Inkubation mit carboxylierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln

Control = Mock-Kontrolle; übrige Bezeichnungen benennen das depletierte Ziel-Protein im Zelllysate; $n=3$

HeLa Zellen, die einen geringeren Caveolin-1-Gehalt aufwiesen als unbehandelte Kontrollzellen, nahmen 23% weniger carboxylierte Partikel auf. Der Eisenwert der Kontrollzellen betrug 15.51 ± 1.15 pg Fe/Zelle, wohingegen Zellen mit depletiertem Caveolin-1 nur 11.98 ± 0.46 pg Fe/Zelle enthielten. Ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test ($\gamma = 95\%$) zeigte, dass der gemessene Unterschied signifikant ist ($p = 0,0466$).

Der Knockdown von Flotillin-1 hatte keinen messbaren, statistisch signifikanten Einfluss auf die Partikelaufnahme. Der Eisengehalt von 17.90 ± 1.870 pg Fe/Zelle ist mit dem der Kontrollzellen vergleichbar.

Auch die Regulierung von Clathrin führte zu keiner signifikanten Veränderung des Aufnahmeverhaltens. Die Zellen enthielten mit 17.68 ± 1.911 pg Fe/Zelle nur wenig mehr Eisen als untransfizierte Kontrollzellen.

3.4.1.4 Auswirkungen des Knockdowns von Flotillin-1, Caveolin-1 und Clathrin auf die intrazelluläre Aufnahme unmodifizierter $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel

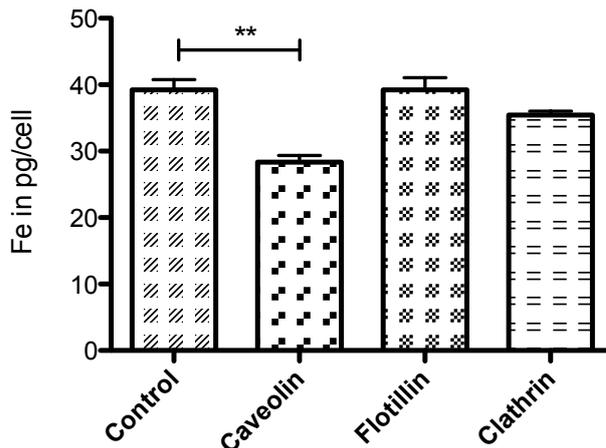


Abbildung 3.31: Eisengehalte pro Zelle in transfizierten HeLa Zellen nach 24 h Inkubation mit unmodifizierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln

Control = Mock-Kontrolle; übrige Bezeichnungen benennen das depletierte Ziel-Protein im Zelllysate; n=3

War die Translation von Caveolin-1 inhibiert, wurden unmodifizierte Partikel mit einem Eisengehalt von 28.35 ± 1.00 pg Fe/Zelle von HeLa Zellen aufgenommen. Die Kontrollzellen enthielten 39.22 ± 1.54 pg Fe/Zelle. Zellen mit reduziertem Caveolin-1-Gehalt enthielten demzufolge 27% weniger Eisen als die Kontrolle. Die statistische Signifikanz dieses Unterschiedes konnte die Durchführung eines ungepaarten, zweiseitigen t-Tests ($\gamma = 95\%$) zeigen ($p = 0,0041$).

Inhibition von Flotillin-1 hatte keinen Einfluss auf die Endocytose der Partikel. Die Werte waren mit 39.22 ± 1.84 pg Fe/Zelle bei Flotillin-1 und 39.22 ± 1.54 pg Fe/Zelle bei den Kontrollzellen nahezu identisch.

Der Knockdown von Clathrin hatte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Einfluss. Der Eisenwert beträgt 35.44 ± 0.57 pg Fe/Zelle und liegt damit knapp unterhalb der Kontrolle.

Erstmals durchgeführt wurde hier der Knockdown von Dynamin2. Allerdings wurden hier nur zwei Versuchsdurchgänge absolviert, weswegen die Daten nicht in Abbildung 3.31 aufgeführt sind. Der gemessene Eisenwert betrug $41,59 \pm 2,98$ pg Fe/Zelle und war somit ver-

gleichbar zu dem der Kontrolle. Dynamin2 hatte folglich keinen Einfluss auf die Partikelaufnahme. Statistisch relevante Daten dazu werden im folgenden Teilabschnitt erhoben.

3.4.1.5 Quantifizierung des Einflusses von Flotillin-1, Caveolin-1, Clathrin und Dynamin2 auf die intrazelluläre Aufnahme mittels fluoreszierender $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Partikel und Konfokalmikroskopie

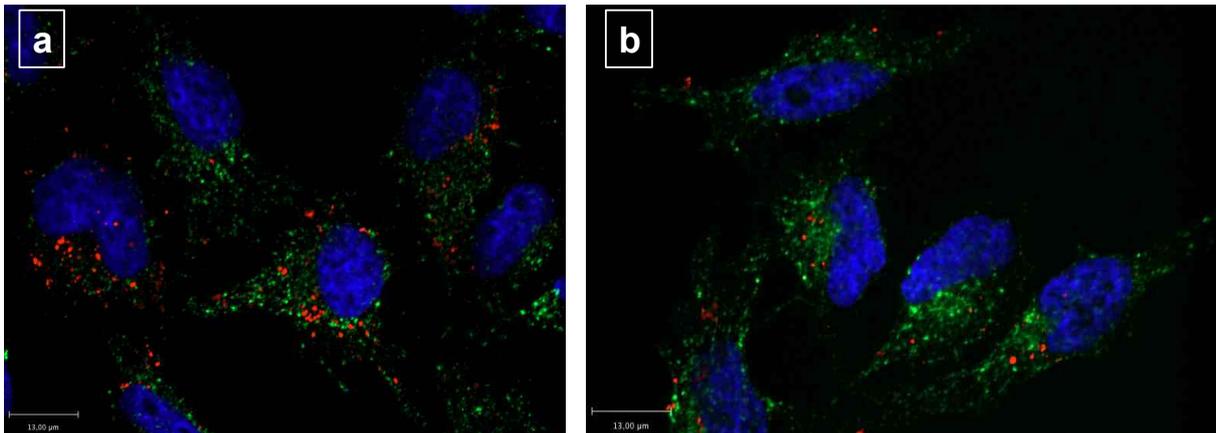


Abbildung 3.32: Fluoreszenzbilder von Kontrollzellen, die mit Ausnahme der siRNA-Gabe identisch zu Versuchszellen behandelt wurden (a), und Versuchszellen, die mit siRNA gegen Caveolin-1 behandelt wurden (b), nach 4 h Inkubation mit Alexa555-markierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln (rot = $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel mit Alexa555; grün = Transferrin488 (Zellmorphologie); blau = DAPI (Zellkern))

Die in diesem Abschnitt verwendeten Partikel waren in ihrer Primärgröße und Oberflächenladung vergleichbar zu den bisherigen (Abschnitt 2.1.1). Durch den, in der Schale inkorporierten, Farbstoff Alexa Fluor® 555 wurden die Partikel durch Laseranregung im Konfokalmikroskop sichtbar. Aufgrund der sensitiven Nachweismethode konnten im Vergleich zu vorherigen Experimenten sowohl die verwendete Nanopartikelkonzentration als auch die Inkubationszeit deutlich verringert werden (Abschnitt 2.10.2). Die Zellen wurden fotografiert (Abbildung 3.32), der Hintergrund abgezogen und die Gesamtfluoreszenzintensität der Partikel pro Zelle quantifiziert. Die Methode wird in Abschnitt 2.10.2.4 genauer beschrieben.

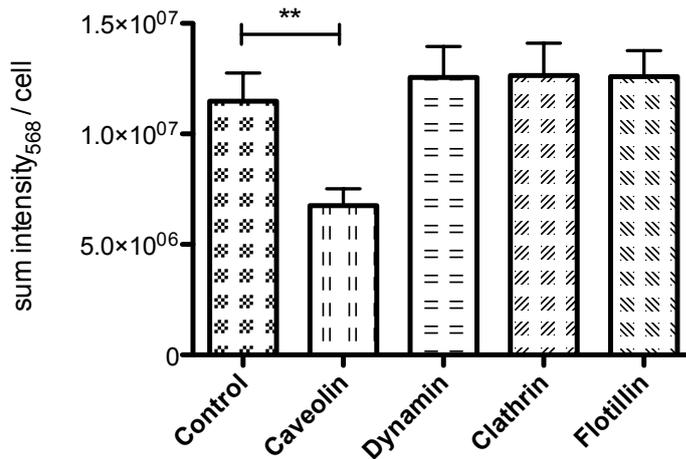


Abbildung 3.33: Fluoreszenzintensität der Wellenlänge 568 pro Zelle in transfizierten HeLa Zellen nach 4 h Inkubation mit fluoreszierenden SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln

Control = Mock-Kontrolle; übrige Bezeichnungen benennen das depletierte Ziel-Protein im Zelllysat; n=4

Wie Abbildung 3.33 zeigt, wurde in Zellen mit depletiertem Caveolin-1 weniger Fluoreszenz detektiert als in Kontrollzellen. In Kontrollzellen wurde $1.149 \cdot 10^7 \pm 1.269 \cdot 10^6$ Sum-of-Sum-Intensity gemessen. Dazu wurden insgesamt 60 Einzelzellen analysiert. Zellen mit reduziertem Caveolin-1 enthielten dagegen nur $6.759 \cdot 10^6 \pm 7.545 \cdot 10^5$ Sum-of-Sum-Intensity. Dafür wurden insgesamt 59 Einzelzellen analysiert. Der Unterschied zu Kontrollzellen beträgt somit 41%, dessen Signifikanz durch einen ungepaarten, zweiseitigen t-Test ($\gamma = 95\%$) bestätigt werden konnte ($p = 0,0019$).

Die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen Dynamin2, Clathrin und Flotillin-1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die gemessene Gesamtintensität pro Zelle. Zwar war der absolute Messwert im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht, jedoch ist dieser Unterschied im Rahmen der Standardabweichung vernachlässigbar.

3.4.1.6 Fazit

Die Ergebnisse des Abschnittes 3.4.1 zeigen, dass die Aufnahme von SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln mit negativem Zetapotential immer dann verringert war, wenn ein Knockdown von Caveolin-1 vorlag. Die Differenz zu den Kontrollzellen betrug je nach Oberflächenmodifikation der Partikel und Experimentdesign zwischen 23 und 41%.

Wurden Dynamin2, Clathrin oder Flotillin-1 depletiert, hatte dies keine oder nur sehr geringe Auswirkungen. Mit Ausnahme einer nicht signifikanten Erhöhung bei der Aufnahme von

PEGylierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln durch HeLa Zellen ohne Clathrin gab es keine nennenswerten Beobachtungen.

Die Ergebnisse zeigten, dass noch weitere bisher nicht identifizierte Faktoren für die Aufnahme der Partikel verantwortlich sein müssen. Dies machte den Knockdown weiterer Proteine aus der Endocytosemaschinerie nötig.

3.4.2 Einfluss des Knockdowns von PIP5K α , GRAF1, CtBP1 und CDC42 in HeLa Zellen auf die intrazelluläre Aufnahme PEGylierter $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel

Die Transfektion der Zellen erfolgte mittels der Dharmacon SMARTpool® Technologie (Abschnitt 2.6.3). Verwendet wurden die zuvor mehrfach beschriebenen PEGylierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel (Abschnitt 2.1.1.1).

3.4.2.1 Nachweis des effektiven Knockdowns von PIP5K α und CDC42

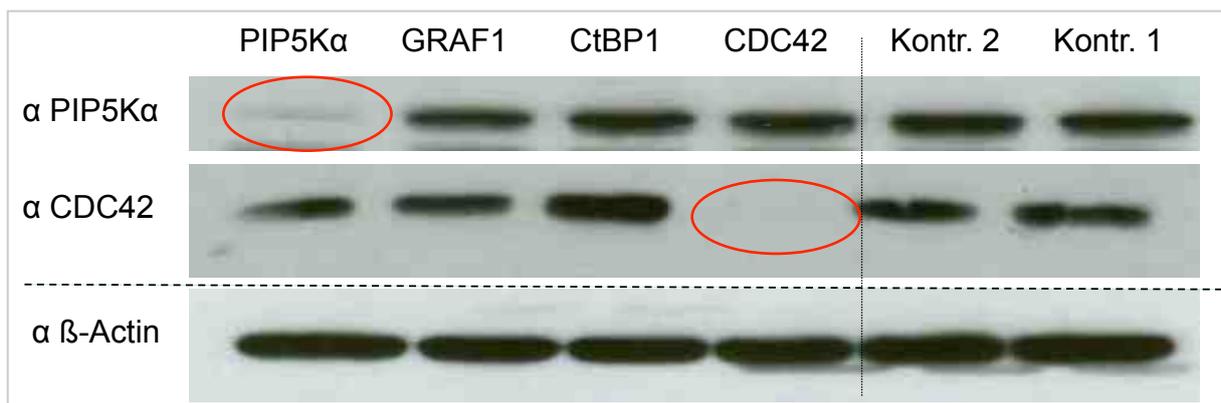


Abbildung 3.34: repräsentative Röntgenfilmausschnitte der Western-Blot-Membranen mit transfizierten Zelllysaten von HeLa Zellen, Targets: PIP5K α , GRAF1, CtBP1, CDC42

In der Horizontalen sind die Target-Proteine gelistet, die in dem entsprechenden darunter aufgetragenen Zelllysate durch siRNA ausgeschaltet werden sollten. In der Vertikalen sind die Primärantikörper (α) gelistet, die in dem entsprechenden horizontalen Ausschnitt das Zielprotein detektieren. Kontrolle 2 entspricht der „Nonsense“ siRNA (ohne intrazelluläres Target), Kontrolle 1 entspricht der Mock-Kontrolle (Zellen mit Transfektionsreagenz aber ohne siRNA behandelt). Die roten Kreise heben die Regionen hervor, in der durch Fehlen oder Abschwächung der Bande ein Einfluss der verwendeten siRNA erkennbar ist.

Die Röntgenfilmausschnitte zeigen, dass das Protein PIP5K α erfolgreich depletiert werden konnte. Im rot markierten Bereich der ersten Zeile ist kein Signal erkennbar, wohingegen in allen Vergleichs- und Kontrollspuren eine Bande detektiert werden konnte.

Ebenfalls effektiv war der Knockdown von CDC42. Auch hier sind nur die Vergleichs- und Kontrollbanden der weiteren Proben sichtbar.

Der Gehalt des Kontrollproteins β -Actin ist in allen Proben detektierbar. Die Stärke der Banden zeigt zudem an, dass in allen Spuren eine vergleichbar große Menge Zelllysate aufgetragen wurde. Dadurch ist eine semiquantitative Unterscheidung der Proteingehalte in den verschiedenen Spuren möglich.

Der Nachweis des Knockdowns von CtBP1 und GRAF1 war nicht möglich. Mit allen, unter Abschnitt 2.9.2 aufgeführten, Antikörpern ließ sich im Versuchszeitraum kein spezifisches Signal detektieren.

3.4.2.2 Auswirkungen des Knockdowns von PIP5K α , GRAF1, CtBP1 und CDC42 auf die intrazelluläre Aufnahme PEGylierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel

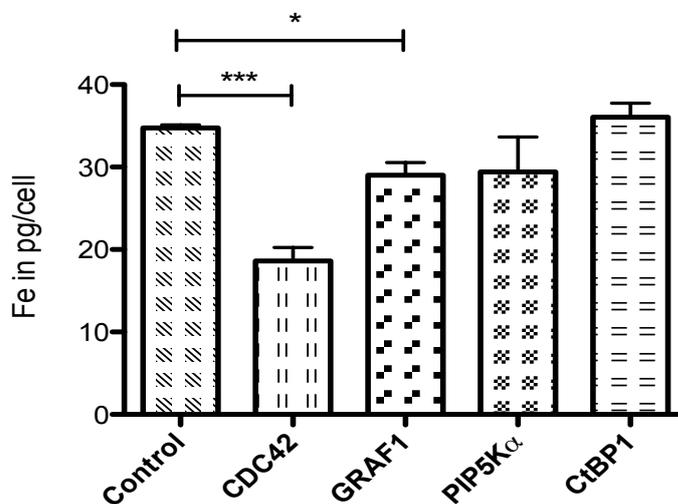


Abbildung 3.35: Eisengehalte pro Zelle in transfizierten HeLa Zellen nach 24 h Inkubation mit PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln

Control = Mock-Kontrolle; übrige Bezeichnungen benennen das depletierte Ziel-Protein im Zelllysate; n=3

Den Messwerten wurde der durchschnittliche Eisenwert abgezogen, der bei der Durchführung von Kontrollversuchen bei 4°C ermittelt werden konnte, um unspezifische Anhaftungen von Nanopartikeln zu berücksichtigen. Der Wert belief sich auf 0.82±0.12 pg Fe/Zelle.

War CDC42 herunter reguliert, enthielten die Zellen 18.62±1.63 pg Fe/Zelle. Der Messwert der Kontrollzellen hingegen betrug 34.75±0.37 pg Fe/Zelle. HeLa Zellen ohne CDC42 konnten demzufolge 46% weniger Partikel als die Kontrollzellen internalisieren. Dieser Unterschied ist hochsignifikant, wie die Durchführung eines ungepaarten, zweiseitigen t-Tests ($\gamma = 95\%$) zeigen konnte ($p = 0,0006$).

Auch bei Zellen, bei denen GRAF1 depletiert sein sollte, ließ sich ein Effekt beobachten. Es konnten 29.03 ± 1.54 pg Fe/Zelle gemessen werden, was 16% weniger sind als bei der Kontrolle. Der Effekt ist signifikant ($p = 0,0225$), wobei zu beachten ist, dass der Nachweis des erfolgreichen Knockdowns von GRAF1 nicht möglich war (siehe Abschnitt 3.4.2.1).

Zellen ohne PIP5K α nahmen 29.43 ± 4.22 pg Fe/Zelle auf, was einem Rückgang von 15% gegenüber den Kontrollzellen entspricht. Aufgrund der hohen Standardabweichung ist dieser Unterschied allerdings nicht signifikant ($p = 0,2773$).

Waren die Zellen mit siRNA gegen CtBP1 behandelt worden, so enthielten diese 36.05 ± 1.689 pg Fe/Zelle. Dieser Wert befindet sich im Rahmen der Standardabweichungen auf dem Niveau der Kontrollzellen.

3.4.2.3 Quantifizierung des Einflusses von CDC42 und Caveolin-1 auf die intrazelluläre Aufnahme mittels fluoreszierender SiO₂-Fe₂O₃ Partikel und Konfokalmikroskopie

Die Versuche wurden analog zu Abschnitt 3.4.1.5 durchgeführt, wobei die Inkubationszeit mit den Nanopartikeln 24 h betrug. Es wurden die beiden Proteine depletiert, die in den vorangegangenen Versuchen die größten Auswirkungen auf die Internalisierung der verwendeten Partikel zeigten (Abschnitt 3.4.1.6 und 3.4.3.3). Da die Dharmacon SMARTpool® Technologie im Vergleich zu Lipofectamine™ einen effektiveren Knockdown von Caveolin-1 ermöglichte (Abbildung 3.36), wurde Caveolin-1 nach Abschnitt 3.4.1.5 nochmals in die Experimente eingeschlossen.

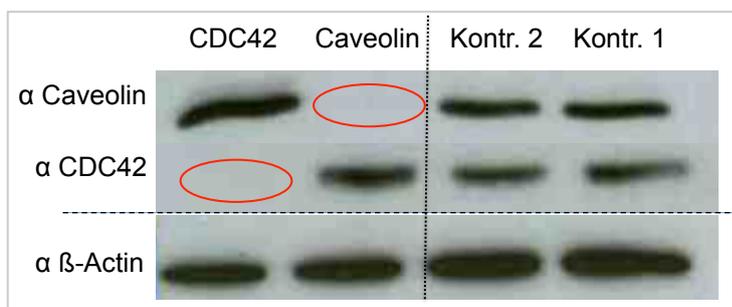


Abbildung 3.36: repräsentative Röntgenfilmausschnitte der Western-Blot-Membranen mit transfizierten Zelllysaten von HeLa Zellen, Targets: Caveolin-1, CDC42

In der Horizontalen sind die Target-Proteine gelistet, die in dem entsprechenden darunter aufgetragenen Zelllysate durch siRNA ausgeschaltet werden sollten. In der Vertikalen sind die Primärantikörper (α) gelistet, die in dem entsprechenden horizontalen Ausschnitt das Zielprotein detektieren. Kontrolle 2 entspricht der „Nonsense“ siRNA (ohne intrazelluläres Target), Kontrolle 1 entspricht der Mock-Kontrolle (Zellen mit Transfektionsreagenz aber ohne siRNA behandelt). Die roten Kreise heben die Regionen hervor, in der durch Fehlen oder Abschwächung der Bande ein Einfluss der verwendeten siRNA erkennbar ist.

Voraussetzung für die Interpretation der Daten war der gelungene Knockdown der Targetproteine CDC42 und Caveolin-1. Wie Abbildung 3.36 zeigt, konnte an den entsprechenden Stellen (rot markiert) kein Signal detektiert werden. Der Knockdown war also bei beiden Proteinen effektiv.

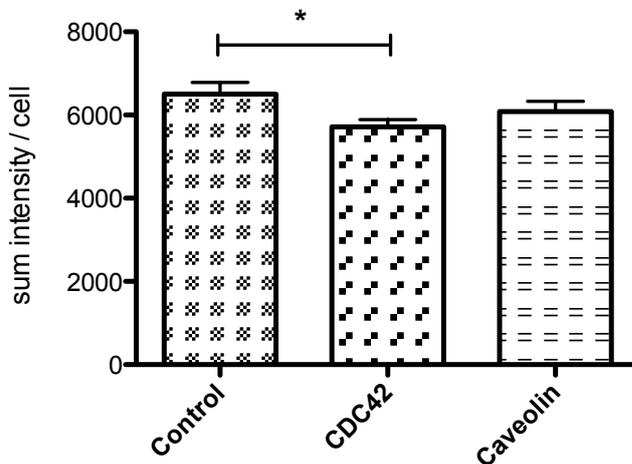


Abbildung 3.37: Gesamtfluoreszenz von Alexa Fluor® 555 markierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln pro HeLa-Zelle nach 24 h Inkubation

Control = Mock-Kontrolle; übrige Bezeichnungen benennen das depletierte Ziel-Protein im Zelllysat

Abbildung 3.37 zeigt, dass in Kontrollzellen durchschnittlich 6504±282 Sum-of-Sum-Intensity detektiert werden konnte. Dafür wurden insgesamt 160 Einzelzellen analysiert. Zellen ohne CDC42 enthielten 5714±178 Sum-of-Sum-Intensity (n=137) und somit 12% weniger Partikel als die Kontrollzellen. Ein ungepaarter, zweiseitiger t-Tests ($\gamma = 95\%$) zeigte, dass dieser Unterschied signifikant ist ($p = 0,0231$).

Der Knockdown von Caveolin-1 führte zu einer gemessenen Gesamtfluoreszenz von 6080±253 Sum-of-Sum-Intensity (n=143). Dies ist 6,5% weniger als in Kontrollzellen, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant ist ($p = 0,268$).

Insgesamt bleibt festzustellen, dass der Einfluss des Knockdowns von Caveolin-1 und CDC42 unter diesen Bedingungen deutlich geringer ist als in Abschnitt 3.4.1 und Abschnitt 3.4.2.2 zuvor beschrieben. Mögliche Gründe dafür werden im Abschnitt 4.3.2.2 der Diskussion erörtert.

3.4.3 Einfluss des Knockdowns von PIP5K α , Caveolin-1 und CDC42 in BT20 Zellen auf die intrazelluläre Aufnahme PEGylierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Knockdown-Versuche an HeLa Zellen auch auf andere Zelllinien übertragbar sind, wurden analoge Experimente an BT20 Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Proteine als Ziele definiert, die bereits bei HeLa Zellen Einfluss auf die Partikelaufnahme hatten. Dabei handelte es sich um Caveolin-1, CDC42 und, aufgrund der hohen Standardabweichung bei HeLa, PIP5K α . Bis auf zelllinienspezifische Anpassungen der Transfektionsroutine wurden die Experimente analog zu HeLa durchgeführt. Die verwendeten Partikel waren die zuvor beschriebenen PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikel (Abschnitt 2.1.1.1).

3.4.3.1 Nachweis des effektiven Knockdowns von PIP5K α , CDC42 und Caveolin-1

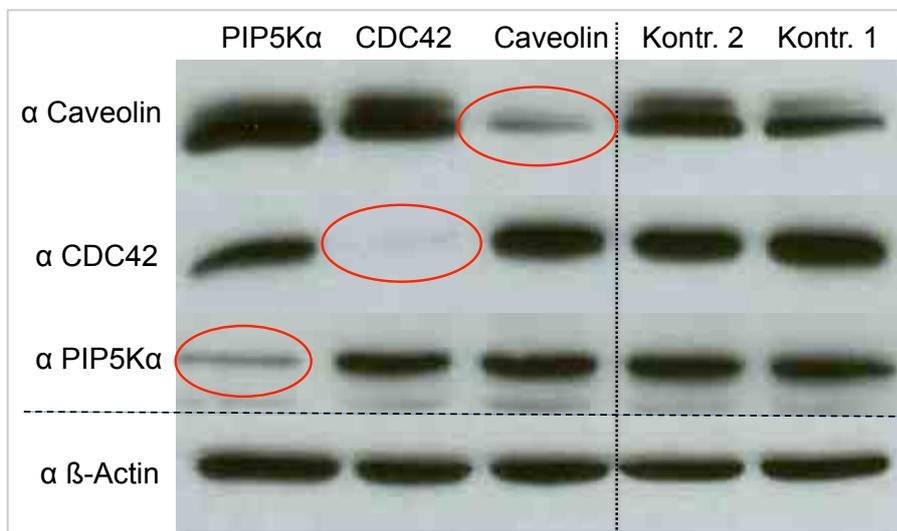


Abbildung 3.38: repräsentative Röntgenfilmausschnitte der Western-Blot-Membranen mit transfizierten Zelllysaten von BT20 Zellen, Targets: PIP5K α , CDC42, Caveolin-1

In der Horizontalen sind die Target-Proteine gelistet, die in dem entsprechenden darunter aufgetragenen Zelllysate durch siRNA ausgeschaltet werden sollten. In der Vertikalen sind die Primärantikörper (α) gelistet, die in dem entsprechenden horizontalen Ausschnitt das Zielprotein detektieren. Kontrolle 2 entspricht der „Nonsense“ siRNA (ohne intrazelluläres Target), Kontrolle 1 entspricht der Mock-Kontrolle (Zellen mit Transfektionsreagenz aber ohne siRNA behandelt). Die roten Kreise heben die Regionen hervor, in der durch Fehlen oder Abschwächung der Bande ein Einfluss der verwendeten siRNA erkennbar ist.

Wie in Abbildung 3.38 in der oberen Reihe zu erkennen ist, war der Knockdown von Caveolin-1 effektiv. Es ist zwar eine geringe Restmenge des Proteins zu detektieren, jedoch sind die Banden auch etwas überbelichtet.

Auch CDC42 konnte erfolgreich depletiert werden. Neben starken Signalbanden in den Vergleichsspuren ist kein Signal zu erkennen.

Der Knockdown von PIP5K α war ebenfalls effektiv, wie in der entsprechenden Spur zu erkennen ist. Eine geringe Menge des Proteins ist noch detektierbar, was ein mögliches Signal in den quantitativen Experimenten höchstwahrscheinlich nicht maßgeblich beeinflussen würde.

Die Kontrollbanden von β -Actin zeigen, dass in allen Spuren vergleichbare Mengen des Zelllysats verwendet wurden.

3.4.3.2 Auswirkungen des Knockdowns von PIP5K α , CDC42 und Caveolin-1 auf die intrazelluläre Aufnahme PEGylierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel

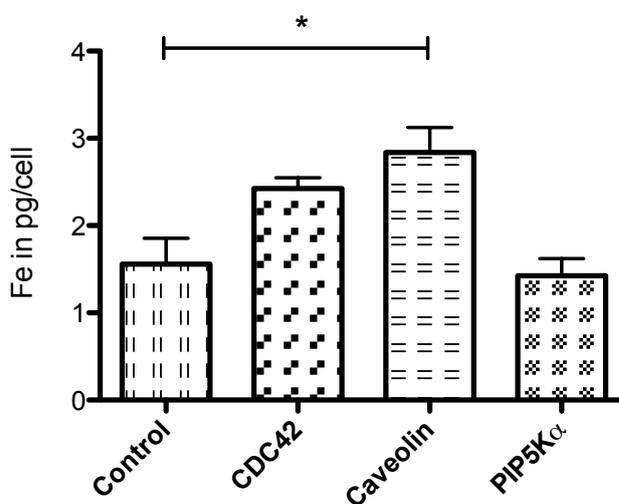


Abbildung 3.39: Eisengehalte pro Zelle in transfizierten BT20 Zellen nach 24 h Inkubation mit PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln

Control = Mock-Kontrolle; übrige Bezeichnungen benennen das depletierte Ziel-Protein im Zelllysats; n=3

Den Messwerten wurde der durchschnittliche Eisenwert abgezogen, der bei der Durchführung von Kontrollversuchen bei 4°C ermittelt werden konnte, um unspezifische Anhaftungen von Nanopartikeln zu berücksichtigen. Der Wert belief sich auf 0.2±0.3 pg Fe/Zelle (n=10).

Nach 24 h Inkubation mit den Partikeln waren in den Kontrollzellen durchschnittlich 1.56±0.3 pg Fe/Zelle nachweisbar. Dies entspricht circa 5-10% dessen, was bei ähnlich behandelten HeLa Zellen gemessen wurde (Abschnitte 3.4.1.2 und 3.4.2.2). Das deutlich niedrigere Aufnahmeverhalten der BT20 Zellen entsprach nach den Ergebnissen der quantitativen Aufnahmemenge PEGylierter Partikel den Erwartungen (Abbildung 3.27).

Der einzige statistisch signifikante Unterschied zur Kontrolle zeigte sich bei Zellen, bei denen Caveolin-1 depletiert wurde. Dort konnten 2.84±0.29 pg Fe/Zelle gemessen werden, was

82% mehr als in den Kontrollzellen entspricht. Ein ungepaarter, zweiseitiger t-Tests ($\gamma = 95\%$) zeigte die Signifikanz dieses Befundes ($p = 0,0362$).

Zellen ohne CDC42 enthielten 2.42 ± 0.12 pg Fe/Zelle, was 55% mehr ist als bei den Kontrollzellen. Jedoch kann hier keine statistische Signifikanz berechnet werden ($p = 0,0555$), da in Verbindung mit der niedrigen Anzahl an Experimenten ($n=3$) eine recht hohe Standardabweichung der Kontrolle zu verzeichnen war.

Der Knockdown von PIP5K α resultierte in einem durchschnittlichen Eisenwert von 1.43 ± 0.19 pg Fe/Zelle. Dies stellt keinen nennenswerten Unterschied zu der Kontrolle dar.

3.4.3.3 Fazit

Die Ergebnisse aus den Knockdown-Versuchen mit HeLa Zellen sind nicht auf BT20 Zellen übertragbar. Abgesehen von dem deutlich geringeren Aufnahmevermögen der BT20 Zellen führt die Depletion von Caveolin-1 und CDC42 im Gegensatz zu HeLa zur Erhöhung der aufgenommenen Partikelmenge. Im Fall von Caveolin-1 entspricht dies sogar einer Steigerung um über 80%.

3.5 Autophagieinduktion durch die Aufnahme und Speicherung PEGylierter SiO₂-Fe₂O₃ Partikel durch HeLa Zellen

Dass PEGylierte SiO₂-Fe₂O₃ Partikel mit einem Primärdurchmesser von 30 nm durch HeLa Zellen in einem beträchtlichen Umfang intrazellulär aufgenommen werden, konnte in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt werden. Ebenso wurden die Endocytosewege charakterisiert. Von Interesse war es nun, Hinweise zu erhalten, welche Konsequenzen diese starke Akkumulation von Fremdkörpern auf den Zellstoffwechsel haben könnte. Während der Inkubationszeiten der Partikel bis maximal 48 h konnten bisher keine mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Morphologie oder Vitalität der Zellen beobachtet werden. Doch war es denkbar, dass auf der molekularen Ebene Veränderungen im Zellstoffwechsel stattfinden. Eine dieser möglichen Reaktionen wäre eine verstärkte Bildung von Faktoren, die an der Bildung von Autophagosomen beteiligt sind. Diese dienen dazu, Zellbestandteile oder Fremdsubstanzen im Zellinneren weiter zu prozessieren. Einer dieser Faktoren ist das Protein LC3B, das in den folgenden Experimenten als Markerprotein in der konfokalen Mikroskopie betrachtet wurde.

3.5.1.1 Qualitative Beurteilung der Expression von LC3B in Abhängigkeit zur eingesetzten Partikelkonzentration

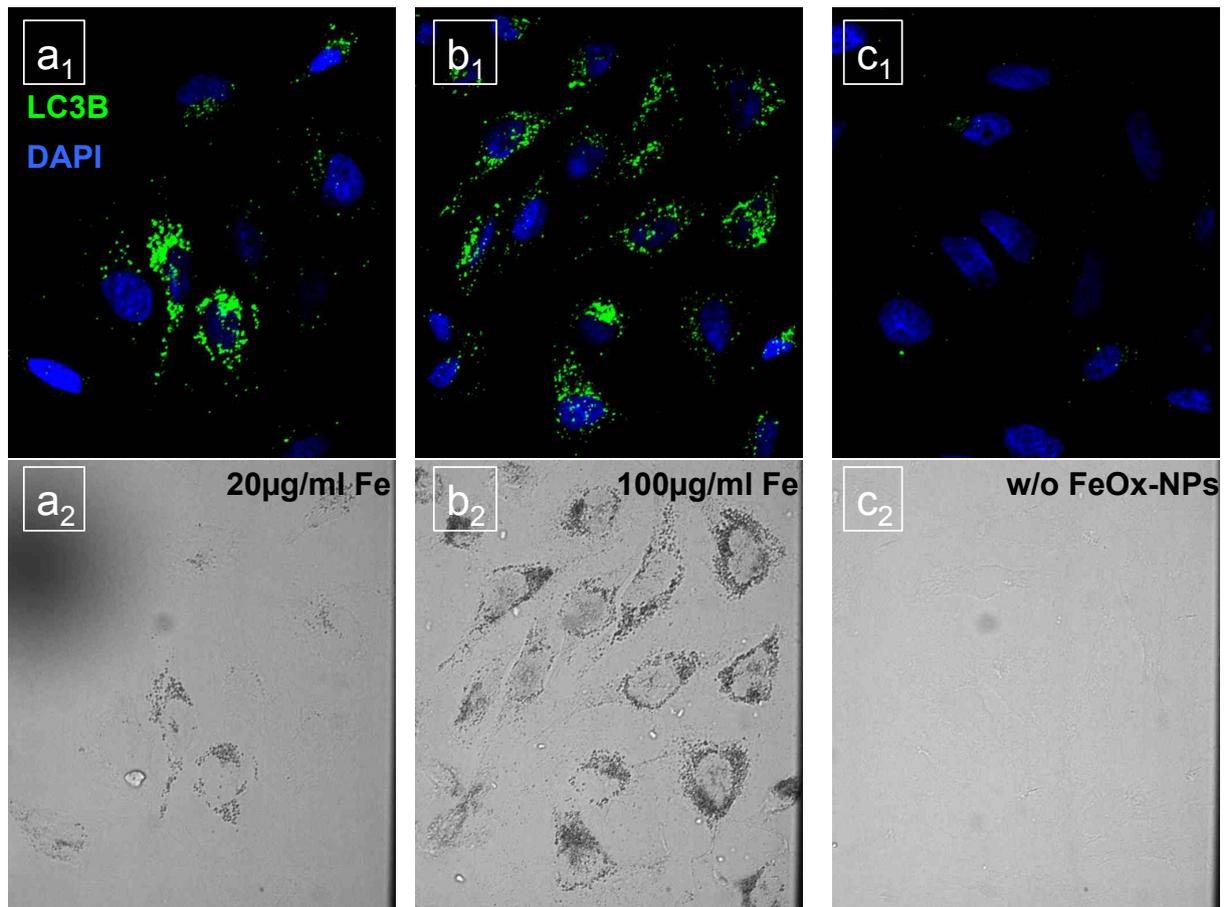


Abbildung 3.40: Fluoreszenz- (obere Reihe) und Durchlichtaufnahmen (untere Reihe) von HeLa Zellen, die mit PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln inkubiert wurden

Zellen im Fluoreszenzbild sind identisch zu denen im darunter liegenden Durchlichtbild; NP-Konzentrationen: 20 µg Fe/ml (a₁+a₂), 100 µg Fe/ml (b₁+b₂), Kontrollzellen ohne NP (c₁+c₂); a₁-c₁: grün = LC3B, blau = DAPI (Zellkern); a₂-c₂: dunkelgraue Regionen = NP im Cytoplasma der Zellen

Es wurden HeLa Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln inkubiert, fixiert und LC3B mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers sichtbar gemacht. Abbildung 3.40 zeigt, dass die Zellen mit steigender NP-Konzentration mehr Partikel internalisiert haben (a₂ und b₂). Bei einer Konzentration von 100 µg Fe/ml hat jede Zelle große Mengen Partikel intrazellulär aufgenommen, was durch die dunkle Färbung der Zellen mit Aussparung des Zellkernes verdeutlicht wird (Abbildung 3.40 b₂). Die Kontrollzellen in c₂ zeigen diese nicht. Korrespondierend dazu beinhalten Zellen mit einer hohen Aufnahmemenge auch deutlich mehr LC3B. Dass dies exklusiv die Zellen betrifft, die nicht nur mit Partikeln inkubiert wurden, sondern diese auch in großer Menge aufgenommen haben, verdeutlichen die Teilbilder a₁ und a₂. Nur bei den beiden Zellen, die viel NP aufgenommen haben, ist exklusiv ein hoher LC3B-Gehalt zu detektieren. Bei Zellen, die direkt daneben

liegen aber weniger Partikel internalisiert haben, ist auch weniger LC3B exprimiert. Die Kontrollzellen enthalten verglichen dazu nur sehr wenig dieses Proteins (Abbildung 3.40 c₁).

3.5.1.2 Quantitative Bestimmung der LC3B-Expression in Abhängigkeit zur eingesetzten Partikelkonzentration

In diesen Experimenten wurde die Fläche der Fluoreszenzbilder, in der LC3B detektiert werden konnte, quantifiziert. Die Behandlung mit Bafilomycin A1 diente als Positivkontrolle, da dieses als Inhibitor des Abbaus von Autophagosomen fungiert. In der Folge müsste sich bei der vermehrten Bildung von Autophagosomen in Anwesenheit des Abbauinthibitors Bafilomycin A1 das Protein LC3B in den Zellen anreichern.

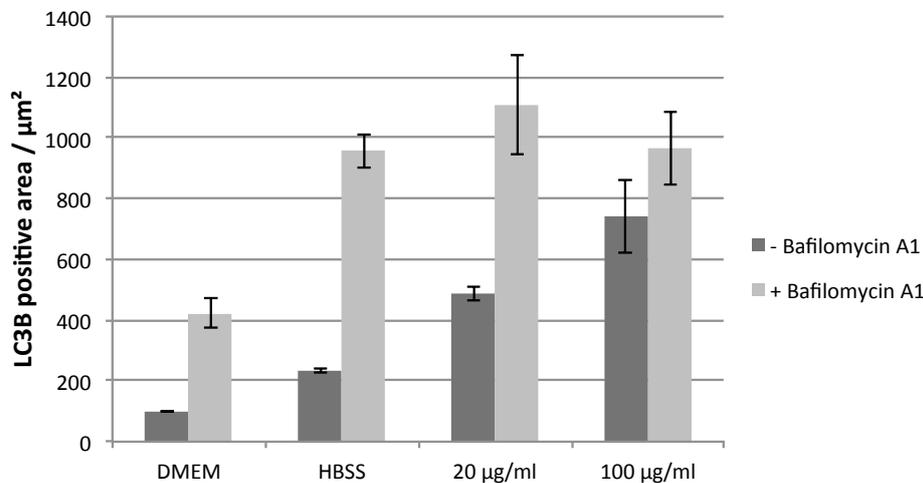


Abbildung 3.41: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung von LC3B in HeLa Zellen

Die Zellen wurden in DMEM, HBSS oder in DMEM mit PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln kultiviert (20 und 100 μg Fe/ml); Behandlung der Zellen erfolgte mit oder ohne den Autophagie-Blocker Bafilomycin A1; n=2

Abbildung 3.41 zeigt, dass in Kontrollzellen, die in reinem Zellkulturmedium DMEM kultiviert wurden, ein relativ niedriger LC3B-Gehalt gemessen wurde. Die gleiche Kontrolle mit dem Inhibitor Bafilomycin A1 führt zu einem erhöhten LC3B-Level in den Zellen, da dessen Abbau wirksam blockiert wird. Mussten die Zellen in der Salzlösung HBSS ohne Nährstoffe leben, führte dies zu einem ca. doppelt so hohem LC3B-Gehalt ohne und mit dem Inhibitor. Dies zeigt, dass sowohl die Induktion der Autophagie durch die Kulturbedingungen als auch die Inhibition des LC3B-Abbaus durch Bafilomycin A1 funktionierte.

Wurden die Zellen mit 20 μg Fe/ml PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln inkubiert führte dies zu einer Erhöhung der LC3B-Expression um ca. das Vierfache der Kontrollzellen. Wurde zusätzlich Bafilomycin A1 verwendet, betrug die Steigerung ca. das Dreifache des Wertes in Zellkulturmedium. Bei 100 μg Fe/ml stieg das LC3B-Level der Zellen nochmals an und be-

trug ca. das 7,5-fache der Mediumkontrolle. Die Verwendung des Inhibitors steigerte die Akkumulierung nicht so stark, wie es bei einer Eisenkonzentration von 20 µg/ml beobachtet werden konnte. Bei Anwesenheit des Inhibitors und 100 µg Fe/ml steigt die Menge von LC3B auf das Niveau, das unter Nährstoffmangel in HBSS gemessen werden konnte.

3.5.1.3 Fazit

Werden HeLa Zellen mit PEGylierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln im Konzentrationsbereich zwischen 20 und 100 µg Fe/ml inkubiert, so reagieren sie mit einer verstärkten Expression von LC3B, was auf eine vermehrte Bildung von Autophagosomen hindeutet. Dieser Effekt steht in direktem Zusammenhang zu der eingesetzten Nanopartikelkonzentration. Bafilomycin A1 verhindert die Prozessierung dieser Autophagosomen und somit die Degradierung von LC3B. Aber auch die Anwesenheit der Partikel alleine bewirkt diesen Effekt, da Zellen mit Partikeln ohne den Inhibitor mehr LC3B enthalten als Zellen unter Nährstoffmangel. In diesen ist zwar Autophagie induziert, der Abbau von LC3B dagegen wird nicht behindert.

4 Diskussion

4.1 Erkenntnisse der qualitativen Betrachtung der intrazellulären Aufnahme von Nanopartikeln

4.1.1 Die Bedeutung des Nachweises der intrazellulären Aufnahme als Voraussetzung für weiterführende Experimente

Im Abschnitt 3.1 wird der qualitative Nachweis der intrazellulären Nanopartikelaufnahme erbracht, indem mit der Transmissionselektronenmikroskopie ein geeignetes bildgebendes Verfahren gewählt wurde. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie konnte hier eine Vergrößerung erreicht werden, die eine eindeutige Aussage darüber erlaubt, ob sich Nanopartikel im Inneren der Zelle oder nur außen an der Zellmembran befinden. Zudem konnten Erkenntnisse zur Lokalisierung der Partikel nach der intrazellulären Aufnahme gewonnen werden.

Dass Partikel mit ähnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften *in vitro* von Zellen aufgenommen werden, konnte bereits in einigen Arbeiten gezeigt werden [43,65-67]. Jedoch handelte es sich bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Partikeln um frisch synthetisierte Spezies, die zuvor nicht *in vitro* getestet wurden. Die bloße Ähnlichkeit zu bereits beschriebenen Varianten reichte daher nicht aus, um eine Vorhersage zu deren Verhalten in der Zellkultur zu treffen. Der durch die TEM erbrachte Nachweis der intrazellulären Aufnahme war demzufolge essentiell, um die Partikel in weitere quantitative und mechanistische Experimente einzuschließen.

4.1.2 Zeitliche Dimension der intrazellulären Nanopartikel-Akkumulation

Ein Initialexperiment mit PEGylierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln an einer murinen Tumorzelllinie hatte gezeigt, dass die Partikelakkumulation bereits nach wenigen Minuten einsetzt (Abschnitt 3.1.1). Jedoch zeigten die TEM-Aufnahmen, dass die Zellen im Verlauf der ersten 24 h nach Exposition immer mehr Partikel aufnahmen. Im Verlauf der quantitativen Tests konnte dieses Verhalten mit weiteren Zelllinien bestätigt werden. Das Maximum war in Abhängigkeit von der Zelllinie und der Oberflächenmodifikation der Partikel nach 24 bis 48 h erreicht. Anders als bei vielen metabolischen *in vitro* Studien, in denen die Zellen das angebotene Substrat häufig innerhalb weniger Minuten oder sogar Sekunden internalisieren, musste hier ein längerer Zeitraum betrachtet werden, um die Aufnahmekinetiken zu untersuchen. Dies wurde bei den Experimenten zur quantitativen Bestimmung (Abschnitt 3.3) berücksichtigt. Auch im Hinblick auf die Nachweismethoden und der damit verbundenen Robustheit der quantitativ ermittelten Eisenwerte war eine möglichst hohe Beladung der Zellen mit Nanopartikeln wichtig.

Wenn in der Zukunft solche Partikel therapeutisch genutzt werden sollen, sind Kenntnisse über den Zeitraum der Partikelakkumulation ebenfalls sehr wertvoll. Soll beispielsweise ein gekoppelter Wirkstoff durch einen externen Impuls intrazellulär abgelöst oder die Partikel im Zuge einer Thermotherapie erwärmt werden, so wäre es wichtig zu wissen, wann die entsprechenden Zellen nach der Injektion der Partikel die maximale Menge aufgenommen haben, um eine effektive Behandlung zu gewährleisten.

4.1.3 Intrazelluläre Kompartimentierung lässt auf energieabhängigen Aufnahmemechanismus schließen

Innerhalb der Studien wurden verschieden modifizierte sphärische Eisenoxidpartikel mit Silicaschale betrachtet, die in bis zu drei verschiedenen Zelllinien hinsichtlich der intrazellulären Aufnahme getestet wurden. Dabei war auffällig, dass alle verwendeten Varianten von den Zellen aufgenommen werden konnten und auch in vergleichbarer Weise innerhalb der Zelle kompartimentiert wurden. In Abhängigkeit zur Inkubationszeit befanden sich die Partikel in unterschiedlich großen vesikulären Strukturen im Cytosol der Zellen. Dieses Verhalten stimmt mit ähnlichen Systemen überein, die in der Literatur beschrieben werden [24,53,68,69]. Nach kurzer Inkubation waren die Vesikel noch klein wohingegen nach 24 h und mehr teils großflächige Areale mit großen Partikelmengen zu finden waren. Die Partikel lagen dabei in Gruppen in agglomerierter Form vor (Abbildung 4.1). Inwieweit diese Agglomeration bereits zum Zeitpunkt der Aufnahme vorlag oder erst nachträglich innerhalb des Vesikels stattfand, ließ sich dabei nicht bestimmen. Allerdings legt das exklusive Vorliegen der Partikel im endosomalen System der Zellen nahe, dass sie über einen energieabhängigen Prozess aktiv von den Zellen aufgenommen wurden. Experimente zur Charakterisierung der Endocytosewege wurden in Abschnitt 3.4 beschrieben und werden im weiteren Verlauf noch diskutiert. Freie Partikel im Cytosol oder im Zellkern konnten nicht gefunden werden, was auf einen passiven Transport der Partikel durch die Zellmembran hindeutet hätte.

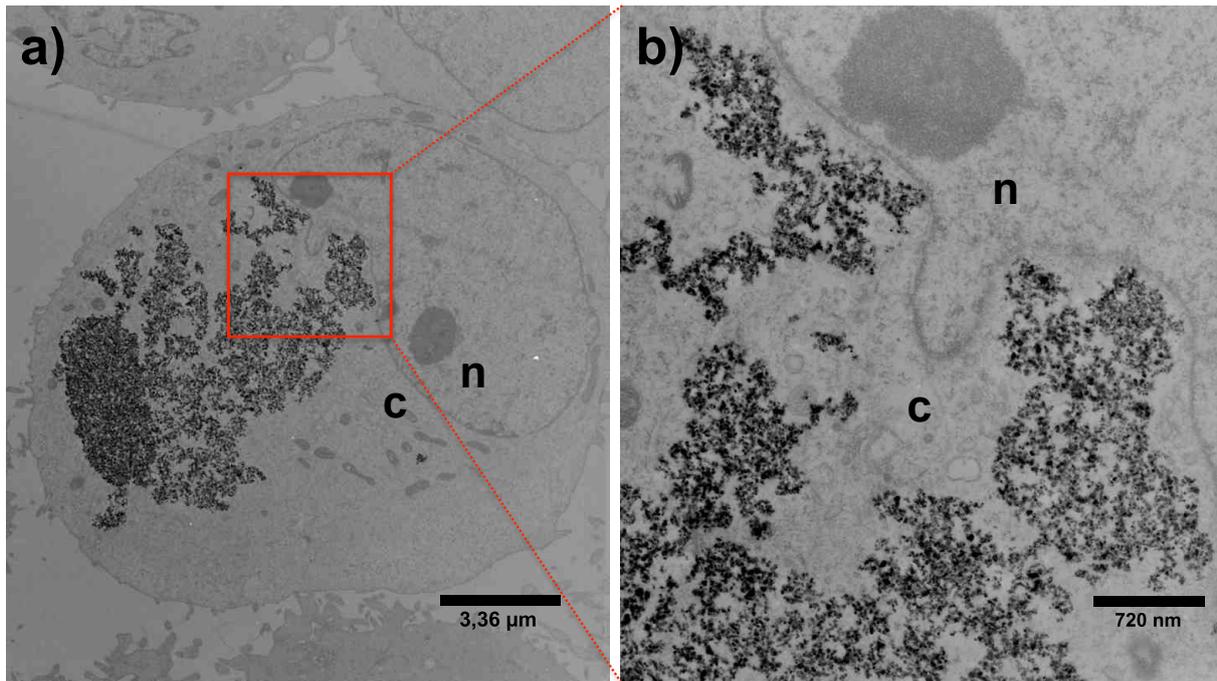


Abbildung 4.1: TEM Aufnahmen intrazellulär vorliegender $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel in einer BT20 Zelle nach 24 h Inkubation mit geringerer (a) und starker Vergrößerung (b)
 Der rot umrandete Bereich in (a) zeigt den Ausschnitt, der in (b) mit stärkerer Vergrößerung dargestellt ist; n= Nukleus, c= Cytosol.

Es wäre nun interessant, zu erfahren, welche genaue Identität die Vesikel besitzen, in denen sich die Partikel zu den unterschiedlichen Phasen nach der intrazellulären Aufnahme befinden. Dazu wären weiterführende Studien nötig, in denen man beispielsweise Zellorganellen wie Endosomen und Lysosomen mit spezifischen, goldmarkierten Antikörpern im TEM markieren könnte. Kenntnisse über den genauen Aufenthaltsort der Partikel und die dort herrschenden physikalischen Bedingungen wären unter anderem nützlich, um Partikel dieser Art für die Kopplung mit pharmakologisch wirksamen Substanzen für sogenannte „Drug Delivery“- Systeme weiter entwickeln zu können.

Auffällig war weiterhin, dass die Vesikel mit Partikeln nach kurzer Inkubationszeit bis zu sechs Stunden recht klein waren. Nach 24 Stunden und mehr beinhalteten die Zellen häufig riesige Vesikel mit Partikeln (Abbildung 4.1). Diese könnten durch die Verschmelzung kleiner Vesikel entstanden sein. Ein ähnlicher Vorgang wurde auch in einer anderen *in vitro* Studie mit Silicapartikeln beobachtet [68].

4.1.4 Unterschiede innerhalb der Zellpopulation

Bei der intrazellulären Partikel Aufnahme war besonders bei BT20 Zellen zu beobachten, dass einzelne Zellen überdurchschnittlich viele Partikel inkorporiert hatten (Abbildung 3.5). Die Ursache für diese Heterogenität ist derzeit noch unbekannt. Eine Möglichkeit ist, dass einzelne Zellen innerhalb der Population eine andere genetische Ausstattung als die umliegenden Zellen aufweisen und dadurch z.B. bestimmte Transportvorgänge anders reguliert werden. Möglich ist auch, dass der Zellzyklus eine entscheidende Bedeutung für die Aufnahme von Nanopartikeln hat. Das heißt, dass Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus besonders leicht Partikel internalisieren und dass nicht alle Zellen im Versuchszeitraum von 24 h diese Phase durchlaufen. Eine andere Ursache könnte schlichtweg das Sedimentationsverhalten der Partikel sein. Beim Sedimentieren könnten einige Zellen mehr Partikel an die Zellmembran binden und aufnehmen als ihre Nachbarn, da die Größenverteilung der Agglomerate passender ist. Die Nachbarzellen könnten währenddessen von Agglomeraten bedeckt sein, die sie nicht aufnehmen können.

Um die Ursache der heterogenen Nanopartikel Aufnahme heraus zu finden, müssten die Zellen isoliert werden, die auffallend mehr Partikel aufgenommen haben. Deren Expressionsmuster müsste auf Unterschiede zur Restpopulation untersucht werden. Der Einfluss des Zellzyklus ließe sich überprüfen, indem man den Zellzyklus einer Zellpopulation erst synchronisiert und danach beobachtet, ob die Zellen eine homogene Partikel Aufnahme zeigen. Grundsätzlich wären weitere Studien wünschenswert, die das Aufnahmeverhalten verschiedener Zelltypen untersuchen. Besonders ein möglicher Unterschied zwischen Tumor- und Normalzellen wäre für die gezielte Ansteuerung von Tumoren durch Nanopartikel interessant.

4.1.5 Intrazelluläre Aufnahme großer, kleiner und anisotroper Partikel

Die Verwendung von anisotropen Partikeln und somit die Untersuchung des Einflusses der Partikelform auf die intrazelluläre Nanopartikel Aufnahme war in der vorliegenden Arbeit limitiert, da auch die reproduzierbare Herstellung dieser Partikel noch in der Erforschung begriffen war. So konnten nur qualitative Aussagen gemacht werden. Prinzipiell wurde gezeigt, dass die Aufnahme stäbchenförmiger Partikel von ca. 160 nm Länge von allen verwendeten Zelllinien bewerkstelligt werden konnte (Abschnitt 3.2). Die Stäbchenform der Partikel verhinderte nicht deren Internalisierung und verursachte im verwendeten Konzentrationsbereich keine schwere, sichtbare Toxizität.

Auch große sphärische Silicapartikel mit einem Durchmesser von ca. 160 nm konnten von C3H RS1 Zellen in beträchtlicher Menge aufgenommen werden (Abbildung 3.7), so dass

diese Größe keine Limitierung darzustellen scheint. Auch hier wären weitere Experimente nötig, um weiterführende Aussagen treffen zu können.

Einen deutlichen Unterschied im Aufnahmeverhalten zu den anderen Konstrukten war bei kleineren sphärischen Partikeln zu beobachten, die überdies monodispers im Kulturmedium vorlagen (Abschnitt 3.2.5). Während sowohl PEGylierte als PMA-funktionalisierte Partikel bei BT20 Zellen gar nicht nachzuweisen waren, so wurden die PMA-funktionalisierten Partikel von HeLa Zellen internalisiert. Diese Partikel hatten einen Durchmesser von nur 13 nm und verursachten drastische Toxizität in Form von Wachstumsinhibition und Ablösung der Zellen. Hier wird deutlich, dass sowohl die Größe als auch die physikalisch/chemische Zusammensetzung der Hüllstruktur einen Einfluss haben.

Es wäre interessant zu untersuchen, ob die in diesen Studien hauptsächlich betrachteten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel ein anderes Aufnahmeverhalten aufweisen würden, wenn neben der Oberfläche auch deren Form und Größe variiert werden würde. Dass diese Parameter grundsätzlich einen Einfluss haben können, wurde in verschiedenen Studien bereits aufgezeigt [46,47,70,71].

4.2 Erkenntnisse aus der quantitativen Bestimmung der intrazellulär aufgenommenen SiO₂-Fe₂O₃ Partikel

4.2.1 Beeinflussung der intrazellulären Aufnahmemenge durch Oberflächenmodifikation der Partikel

Beim Vergleich von den Zelllinien C3H RS1 und BT20 (Abschnitt 3.3.3) zeigte sich, dass beide ähnlich auf die Veränderungen der Oberflächenbeschaffenheit der Partikel reagierten. Partikel mit purer Silicaschale oder Thiolgruppen an der Oberfläche wurden im Versuchszeitraum von 3 bis 48 h ohne erkennbare Dynamik aufgenommen. Der Eisengehalt blieb bei beiden Zelllinien konstant zwischen 1 bis 2 pg Fe/Zelle. Bei epoxylierten und PEGylierten Partikeln erfolgt in Abhängigkeit von der Zelllinie zwischen 6 und 48 h nach Exposition eine Zunahme des intrazellulären Eisengehaltes auf 4 bis 6 pg Fe/Zelle. Dort führt die Veränderung der Oberflächenchemie dazu, dass die Zellen mehr der angebotenen Partikel aufnehmen können. Aminofunktionalisierte Partikel liegen besonders bei BT20 Zellen in noch größerer Menge intrazellulär und membrangebunden vor. Verantwortlich dafür dürften mehrere Faktoren sein.

4.2.1.1 Die Rolle des Zetapotentials

Einer der Schlüsselfaktoren dabei ist die Oberflächenladung der Partikel, das sogenannte Zetapotential. Die Rolle dieses Parameters wurde bereits in vielen Studien als wichtiges Element der zellulären Nanopartikelaufnahme charakterisiert [44,47,50,72-74]. Bei den unmodifizierten und den thiolisierten Partikeln ist das Zetapotential stark negativ, wodurch die Partikel in wässriger Lösung bei pH 7 ladungsstabilisiert sind. Diese beiden Partikelarten wurden von den verwendeten Zelllinien im Versuchszeitraum von 48 h im geringsten Maße intrazellulär aufgenommen (Abschnitt 3.3.3.1 und 3.3.3.2). Da Zellmembranen ebenfalls überwiegend negativ geladen sind, werden die Partikel abgestoßen und somit der Erstkontakt mit der Zellmembran erschwert. Bei einer Funktionalisierung der Partikel mit Aminogruppen hingegen sind die Partikel stark positiv geladen, wodurch die Adsorption der Partikel an die Zellmembran unterstützt wird. In den Versuchen zeigte sich daher auch eine starke Erhöhung des zellassozierten Nanopartikelanteils (Abschnitt 3.3.3.5). Auf die Schwierigkeit einer klaren Unterscheidung zwischen extra- und intrazellulär vorliegenden Partikeln speziell bei positiv geladenen Partikeln wird später noch eingegangen. Dass positiv geladene Partikel gegenüber negativ geladenen bevorzugt von Zellen aufgenommen werden, ist bereits in verschiedenen Studien beschrieben worden [44,73].

Allerdings entsprechen die Daten, die nach der Synthese zur Charakterisierung der Partikel herangezogen werden, nur einer Momentaufnahme. Die Partikel werden für eine möglichst

lange Lagerstabilität meist unter für sie günstigsten Bedingungen charakterisiert. So präpariert werden sie in *in vitro* Versuchen eingesetzt. Bei Kontakt mit serumhaltigem Zellkulturmedium oder Körperflüssigkeiten von Versuchstieren ändern sich ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften je nach Beschaffenheit mehr oder weniger drastisch. So können je nach Partikelbeschaffenheit Proteine in serumhaltigem Medium an die Partikeloberfläche binden, dadurch deren Oberflächenladung maskieren und zur Aggregation der Partikel führen [75,76]. Auf diese Phänomene wird im Folgenden näher eingegangen.

4.2.1.2 Die Bedeutung der Proteincorona

Kommen die Partikel mit serumhaltigem Zellkulturmedium in Kontakt, so können sich je nach Beschaffenheit der Partikeloberfläche und der Reaktivität der darauf befindlichen funktionellen Gruppen Proteine an die Partikel anlagern. Es bildet sich die sogenannte Proteincorona. In einigen Studien wurde die Zusammensetzung dieser Hüllschicht untersucht [75,77-79]. Leider ist die Komposition extrem variabel und von sehr vielen Faktoren abhängig wie z.B. von dem Partikelsystem, der Zelllinie, dem Zellkulturmedium und der darin enthaltenen Proteine oder der Inkubationsdauer. Es ist davon auszugehen, dass sich die Zusammensetzung je nach Affinität der vorhandenen Proteine zur Partikeloberfläche und der Proteine in der Corona untereinander ändern kann. Man spricht dabei von der sogenannten „weichen“ oder „harten Corona“ [75,80]. Diese Bindungen haben weiterhin Einfluss auf die Stabilität der Partikel im Zellkulturmedium. Werden dadurch die Oberflächenladungen maskiert, so verliert der Partikel seine Ladungsstabilisierung. Ein zuvor monodispers im Medium diffundierender Partikel kann dadurch mit anderen agglomerieren und auf dem Zellrasen aussedimentieren. Zudem könnten die gebundenen Proteine an der Partikeloberfläche selbst ein natürlicher Bindungspartner für Transportproteine der Endocytosevorgänge sein. Die Zelle nimmt in dieser Situation nur das Protein wahr, das gebunden wird. Der Partikel käme so analog zum Inhalt eines Trojanischen Pferdes in die Zelle. Es gibt Studien, in denen man sich diesen Effekt gezielt zunutze macht, um einen bestimmten Rezeptor anzusteuern [15,81].

Auch bei den $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, spielen diese Prozesse eine Rolle. So verfügen epoxylierte Partikel in wässriger Lösung bei pH 7 über ein stark negatives Zetapotential, das vergleichbar mit den unmodifizierten und thiolisierten Partikeln ist. Während diese jedoch im Zellkulturmedium stabil bleiben und von den Zellen kaum aufgenommen werden, verdoppelt sich die Menge an aufgenommenen epoxylierten Partikeln nach 24 h im Fall von C3H RS1 und verdreifacht sich sogar bei BT20 nach 48 h im Vergleich zu frühen Messpunkten nach 3 und 6 h (Abbildung 3.24). Es müssen hier

also Effekte stattgefunden haben, die die Partikel erreichbar und kompatibler für die Zellen gemacht haben.

Die PEGylierten Partikel verfügen über andere Eigenschaften. Sie sind nicht ladungsstabilisiert, da sie nur leicht negativ geladen sind. Hier verhindert mit dem Polyethylenglykol (PEG) die funktionale Gruppe an der Partikeloberfläche, dass die Partikel verklumpen und ausfallen. PEG wird schon lange unter anderem in der pharmazeutischen Industrie zur Tablettenherstellung genutzt. Bei der Nanopartikelsynthese macht man sich zunutze, dass PEGs eine sehr geringe Affinität zu Proteinen haben [48]. PEG-beschichtete Partikel bleiben dadurch länger stabil, wenn sie mit biologischen Flüssigkeiten in Kontakt kommen. Auf der einen Seite kann dies *in vitro* die intrazelluläre Aufnahme der Partikel verhindern [20]. Auf der anderen Seite erreicht man durch die PEGylierung bei einer *in vivo* Anwendung verlängerte Zirkulationszeiten der Partikel in der Blutbahn [82]. In Abschnitt 3.3.3.4 wurden die PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikel von zwei Zelllinien allerdings deutlich stärker internalisiert als unmodifizierte und thiolisierte Partikel. Deutlich wird dieser Unterschied erst nach mehr als 24 h Inkubationszeit. Bis dahin unterscheiden sich PEGylierte Partikel nicht von den stark negativ geladenen Partikeln. PEG-Moleküle verfügen über sehr unterschiedliche Kettenlängen, die bei der Beschichtung von Nanopartikeln eine große Rolle spielen. Kurze Kettenlängen sorgen dafür, dass sich der hydrodynamische Durchmesser der Partikel nicht so stark erhöht während lange Ketten die Abschirmung gegen Proteinadsorption verbessern. Da die SiO₂-Fe₂O₃ Partikel in dieser Arbeit mit sehr kurzen PEG-Molekülen beschichtet worden waren, könnten diese kurzen Ketten nach gewisser Expositionszeit ihre abschirmende Wirkung verloren haben. Die Folge wäre eine Destabilisierung der Partikel im Zellkulturmedium, eine verstärkte Interaktion mit Serumproteinen und eine dadurch verstärkte Agglomeration und Sedimentation auf dem Zellrasen.

4.2.1.3 Die Größe der Partikel: Wie Agglomeration und Sedimentation der Partikel die zelluläre Aufnahme beeinflussen

Agglomeration bezeichnet in diesem Zusammenhang die reversible Zusammenlagerung mehrerer Nanopartikel. Diese kann bereits innerhalb des Syntheseweges, während der Lagerung oder bei der Durchführung des *in vitro* Versuches auftreten.

Für die Interpretation der Ergebnisse aus den quantitativen Internalisierungsstudien ist es wichtig, zu berücksichtigen, dass die verwendeten Nanopartikelsuspensionen in sich heterogene Größenverhältnisse aufweisen. Dies ist bedingt durch die Art der Synthese, bei der während der Silicatisierung häufig mehrere Partikel unkontrolliert und irreversibel zusammenwachsen. Die in Tabelle 2.1 angegebenen Durchmesser entsprechen dabei Durch-

schnittswerten, die bei der dynamischen Lichtstreuung ermittelt werden. Rund um diesen Wert sind die Größen der Partikelaggregate in der Suspension normalverteilt. Dass aber die Größe der Partikel bei der zellulären Aufnahme eine große Rolle spielt, veranschaulicht Abbildung 4.2. Im linken Teilbild (Abbildung 4.2 a) sind die Partikel zu sehen, die in den Experimenten zur Quantifizierung genutzt wurden. Deren kleinstmögliche Größeneinheit beträgt ca. 25 nm. Auf dem rechten Teilbild (Abbildung 4.2 b) dagegen sind Partikel mit dicker Silicaschale und Goldkern zu sehen (Abschnitt 2.1.3). Dort beträgt der Durchmesser eines einzelnen Partikels bereits ca. 160 nm. Die roten Pfeile weisen auf dunkel verfärbte Membranabschnitte, in denen dicht gepackte Membranproteine für einen höheren Kontrast sorgen. Diese dadurch entstandenen Taschen sind die Regionen, in denen Bestandteile aus der Umgebung der Zelle aufgenommen werden. Die dunkel verfärbten Taschen werden während der Endocytose als Vesikel von der Zellmembran abgeschnürt. Je nach Endocytoseroute verfügen diese Taschen über eine maximale Öffnungsweite [83]. Abbildung 4.2 zeigt, dass die Größe dieser Taschen bei der energieabhängigen Aufnahme der Partikel eine limitierende Größe darstellt.

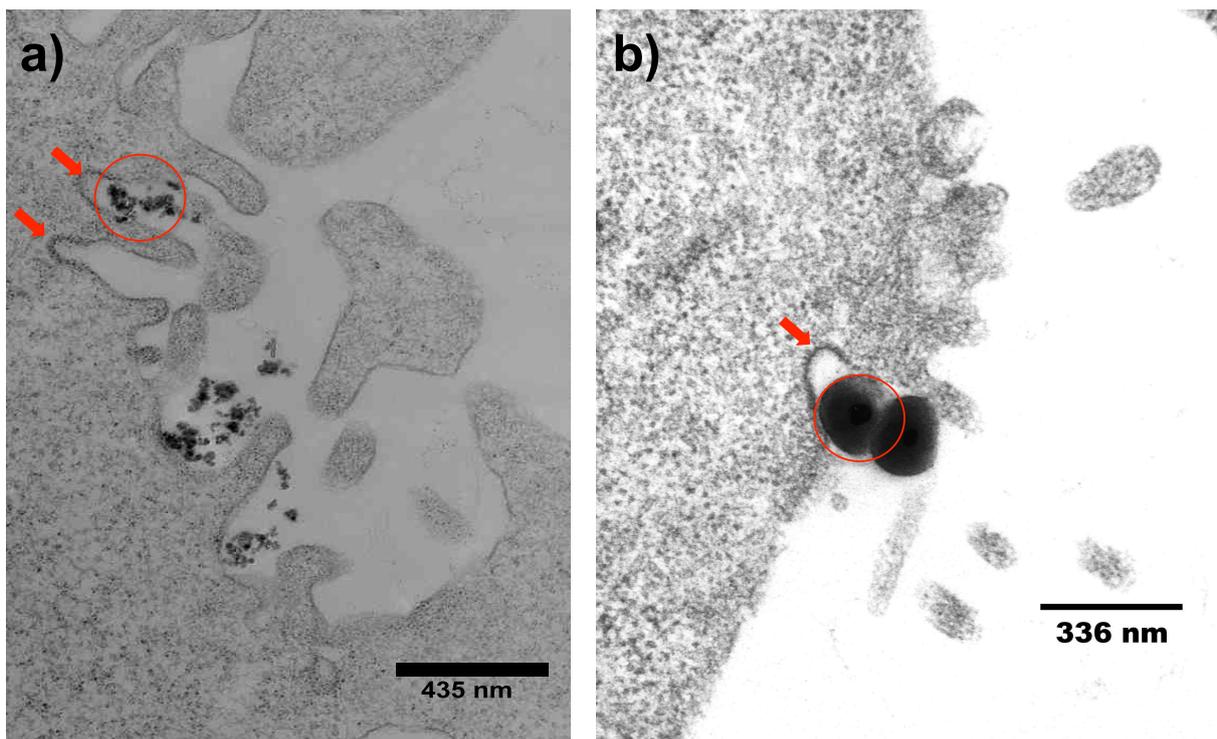


Abbildung 4.2: TEM-Aufnahmen von Zellmembranen mit proteinreichen Einstülpungen vor der Vesikelabschnürung (hoher Kontrast, rote Pfeile)
a) agglomerierte $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ - Partikel, Primärpartikel ~ 30 nm, b) $\text{SiO}_2\text{-Au}$ - Partikel, ~ 160 nm

Von den kleineren Partikeln können viele einzeln vorliegende innerhalb eines Vesikels aufgenommen werden. Bei größeren Aggregaten oder Agglomeraten wäre zu erwarten, dass diese nicht mehr für die intrazelluläre Aufnahme zur Verfügung stehen.

Bei den verwendeten Nanopartikelsuspensionen handelte es sich um heterogen zusammengesetzte Gemische, deren hydrodynamische Durchmesser vor der Zugabe in Zellkulturmedium etwa zwischen 130 und 180 nm lagen (Tabelle 2.1). Der Grundpartikel kam dabei aus einem einzigen Syntheseansatz, wodurch die Ausgangssituation vor der Modifikation vergleichbar war. Nach der Oberflächenmodifikation waren alle Partikel stabil in wässriger Lösung bei pH 7, bis sie im Versuch eingesetzt wurden. Die Unterschiede bezüglich der Größe waren dabei vernachlässigbar. In allen Suspensionen haben sich Partikel zwischen 25 nm bis zu mehr als 1 µm Durchmesser befunden. Es ist daher anzunehmen, dass von der Gesamtmasse der Partikel in der Suspension nur ein Teil die Eigenschaften besaßen, um von den Zellen überhaupt aufgenommen werden zu können. Die Partikel lagen bei diesen Experimenten im Überschuss vor. Wären weniger Partikel in der Suspension verfügbar gewesen, so hätte eine verstärkte Agglomeration die Größenverteilung so beeinflussen können, dass die Zellen weniger Partikel hätten aufnehmen können.

Gelangten diese Partikel nun in Kontakt mit dem Zellkulturmedium, so verhielten sie sich aufgrund der jeweiligen funktionalen Gruppen an ihrer Oberfläche unterschiedlich. Unmodifizierte und thiolisierte Partikel blieben auch dort vergleichsweise stabil. Im Lichtmikroskop konnte man erkennen, dass die Partikel über die gesamte Expositionszeit von 48 h beweglich blieben. Sie waren auch sehr leicht vom Zellrasen abwaschbar, was allenfalls auf einen lockeren Kontakt mit der Zellmembran schließen ließ. Diese Partikel wurden am wenigsten von den Zellen internalisiert. PEGylierte und epoxylierte Partikel fielen nach einigen Stunden im Zellkulturmedium auf dem Zellrasen aus und erschienen im Lichtmikroskop weniger beweglich. Sie wurden von Zellen in einem höheren Maße aufgenommen. Aminofunktionalisierte Partikel dagegen bildeten direkt nach Zugabe zum Medium größere Agglomerate, die auch ohne Mikroskop mit bloßem Auge sichtbar waren. Sie sanken sehr schnell auf den Zellrasen herunter, wo sie auf der Zellmembran immobilisiert vorlagen. Die Bindungen waren zum Teil so stark, dass sich die Partikel nur schwer abwaschen ließen. Allerdings wurden diese Partikel verstärkt internalisiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Agglomeration und eine dadurch hervorgerufene Sedimentation der Partikel auf dem Zellrasen *in vitro* die zelluläre Aufnahme begünstigt. Dieser Befund wird durch ähnliche Ergebnisse in der Literatur bestätigt [78].

Der Kontakt mit der Zellmembran alleine könnte bei Experimenten dieser Art für die Aufnahme der Partikel verantwortlich sein. Häufig werden hohe Konzentrationen von Partikeln eingesetzt, um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten [43,78]. Die Zellen sind dabei oft

großflächig mit Partikeln abgedeckt. Sind diese nicht toxisch, so könnten sie von den Zellen im *in vitro* Versuch quasi „versehentlich“ während der normalen Endocytosevorgänge aufgenommen werden. Die Zellen würden dabei die Partikel nicht als Substrat wahrnehmen, sondern diese lediglich als notwendiges Übel internalisieren. Gestützt wird diese These durch Versuche mit PEGylierten Goldpartikeln, die mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 30 nm vergleichbar mit den kleinsten Partikeln aus den standardgemäß verwendeten Suspensionen waren (Abschnitt 3.2.5). Diese Partikel waren mit langen PEG-Molekülen beschichtet und blieben dadurch über den gesamten Versuchszeitraum monodispers im Medium verteilt. Sie waren bei zwei Zelllinien weder durch Elektronenmikroskopie noch durch sensitive quantitative Bestimmungen intrazellulär nachweisbar (Abschnitt 3.2.5), wohingegen die PEGylierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel auf den Zellen sedimentierten und intrazellulär aufgenommen wurden (Abschnitt 3.1.3.1 und 3.3.3.4).

4.2.2 Einfluss der Oberflächenmodifikation auf die Aufnahmekinetik

Abschnitt 3.3.3 zeigt, dass die Oberflächenmodifikation des $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Grundpartikels bei C3H RS1 und BT20 Zellen die Aufnahmekinetik in vergleichbarer Weise verändert. Besonders interessant dabei ist das Verhalten der epoxylierten und PEGylierten Partikel. Während bei den anderen Modifikationen zwischen der ersten Probennahme nach 3 h und der letzten nach 48 h keine dramatischen Veränderungen des Eisengehaltes pro Zelle mehr auftreten, steigt dieser nach 24 h und mehr bei epoxylierten und PEGylierten Partikeln um ein Vielfaches des Ausgangswertes an (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25). Dies zeigt, dass je nach Beschaffenheit der Partikel eine mehrtägige Beobachtungsphase nötig sein kann, um das Potential der zellulären Aufnahme eines Nanopartikels zu bewerten. Eine längere Beobachtung der Zellen macht aber auch meist einen Mediumwechsel und somit einen Eingriff in das bestehende System nötig. Dennoch könnte man durch mehrmalige Gabe von Partikeln in frischem Medium erfahren, ob und wann eine Sättigung der Zellen mit Partikeln eintritt. Wenn nach 3 h bereits das Maximum der Partikelaufnahme erreicht wurde, könnte diese Sättigung bereits eingetreten sein. Obwohl die Zellen sich weiter teilen, bleibt dabei der Eisengehalt pro Zelle im Mittel konstant während er in der Gesamtpopulation ansteigt. Hier scheinen also neu entstandene Tochterzellen eine definierte Menge Partikel aus dem Überschussangebot der Umgebung aufzunehmen. Dies gilt allerdings nur für den Beobachtungszeitraum von 48 h. Ob später Veränderungen eintreten, bleibt unklar. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1.3 ausgeführt wurde, dürfte der maßgebliche Grund für die Unterschiede in der Aufnahmekinetik die kolloidale Stabilität der Partikel im Medium sein. Bleiben die Partikel in ihren Eigenschaften konstant, so bleibt auch das Aufnahmeverhalten in die Zellen vergleichbar.

4.2.3 Die Schwierigkeiten der Nanopartikelanwendung *in vitro*

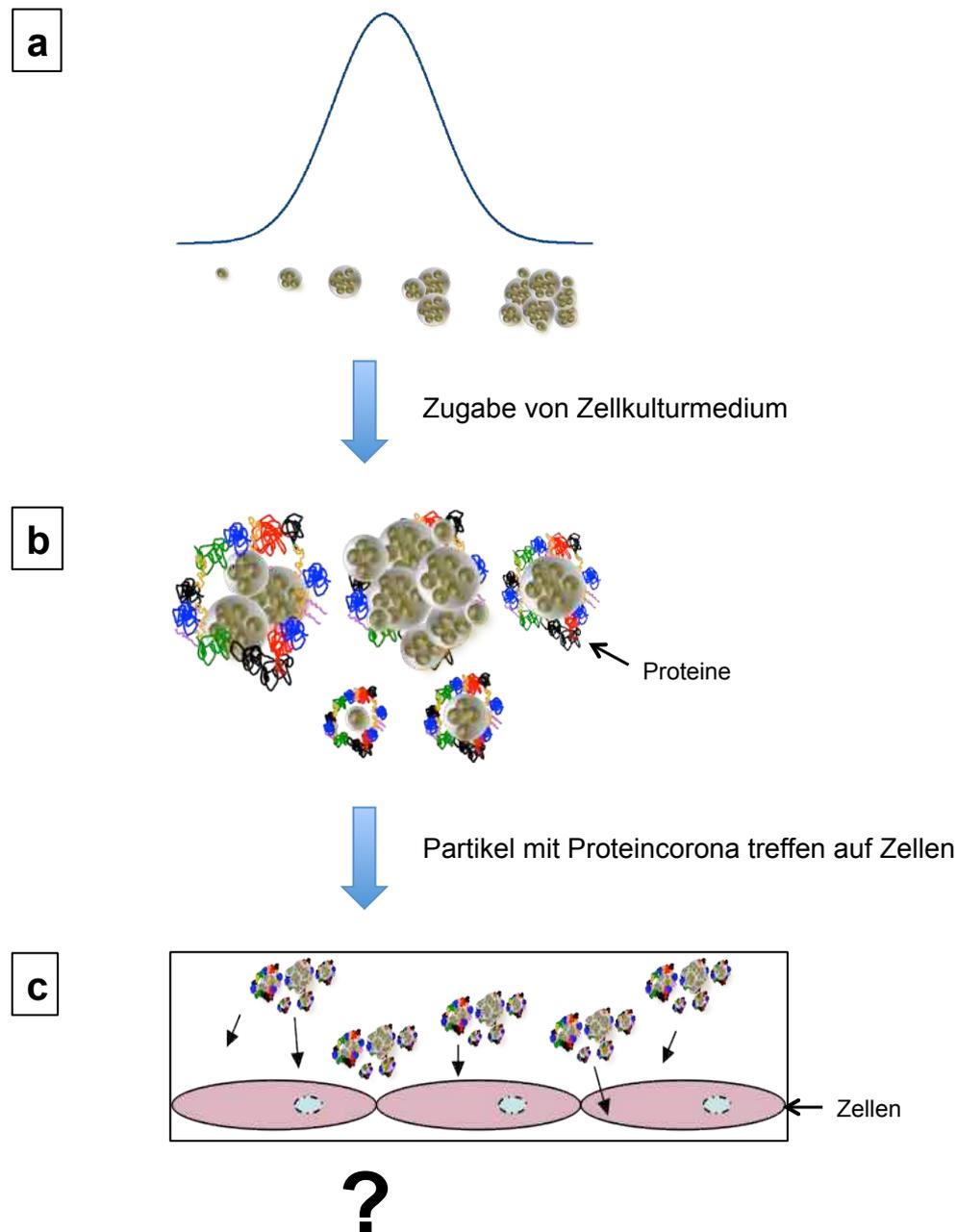


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Nanopartikelexposition *in vitro*

a) Partikel sind nach der Synthese polydispers im Lösemittel enthalten, die Partikelgröße ist dabei normalverteilt, physikalische und chemische Eigenschaften wurden bestmöglich bestimmt, b) bei Zugabe des Zellkulturmediums kommen die Partikel in Kontakt mit vielen unterschiedlichen Proteinen (bunte Strukturen), die Proteincorona bildet sich, c) Einzelpartikel und Agglomerate treffen auf die Zellmembran, physikalische und chemische Eigenschaften sind verändert

Wie in Abschnitt 4.2.1 bereits diskutiert wurde, spielen viele Faktoren eine Rolle dabei, wie sich Nanopartikel im *in vitro* Experiment verhalten. Die größte Schwierigkeit bei der Interpretation der Daten sind die Unsicherheiten in Bezug auf die Veränderungen des Ausgangsmaterials durch die Prozedur. Die Nanopartikel wurden mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und

dynamischer Lichtstreuung vermessen und deren Oberflächenladung bestimmt. Bedingt durch den Syntheseweg waren die Partikel polydispers, so dass der bei der dynamischen Lichtstreuung ermittelte Wert einem Durchschnittswert entsprach (Tabelle 2.1, Abbildung 4.3 a). Das Ausgangsmaterial war also schon vor der Anwendung heterogen zusammengesetzt, was allerdings auf den überwiegenden Teil der derzeit erhältlichen Nanopartikelsysteme zutrifft. Diese Partikel wurden dann aus der kontrollierten Lagersituation heraus mit serumhaltigem Zellkulturmedium versetzt, wobei sie in Kontakt mit Salzen und einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine kamen (Abbildung 4.3 b). Die nun daraus resultierenden Wechselwirkungen sowie die Veränderungen des Agglomerationsverhaltens und der Oberflächenladung der Nanopartikel waren nicht vorhersagbar aber auch nicht beobachtbar. Wie das Substrat, das die Zellen angeboten bekamen, tatsächlich beschaffen war, ließ sich nicht eindeutig feststellen (Abbildung 4.3 c). Untersuchungsmethoden zu entwickeln, die diese Vorgänge aufklären können, wäre äußerst wertvoll. Hirsch *et al.* beschreiben in einer ihrer Arbeiten, wie mit geeigneten Methoden Veränderungen entscheidender Parameter, wie der kolloidalen Stabilität, der Sedimentationsrate und der Proteinadsorption der Nanopartikel nach Kontakt mit biologischen Umgebungen, erfasst werden können [78]. Damit könnte von der Ursache, nämlich Veränderungen an der Synthese der Nanopartikel, direkt auf die Wirkung auf zellulärer Ebene geschlossen werden. Bei Untersuchungen der Zusammensetzung der Proteincorona auf Nanopartikeln in serumhaltigem Medium konnten 200-300 verschiedene Proteine identifiziert werden [75]. Durch schwache Bindungen der Proteine an die Partikeloberfläche und durch die Dynamik der Prozesse ist es allerdings schwierig, die Partikel in ihrem entsprechenden Status aus den biologischen Umgebungen zu isolieren, ohne dabei selbst wieder Veränderungen zu verursachen.

Da biologische Systeme in sich bereits eine gewisse Varianz aufweisen, war es von großer Bedeutung, die Experimente so kontrolliert wie möglich durchzuführen. Der große Vorteil der vorliegenden Studie war, dass alle Eisenkerne mit Silicaschale für die quantitativen Bestimmungen in Abschnitt 3.3 aus einem einzigen Syntheseansatz stammten. Dadurch wurde die Variabilität des Ausgangsmaterials in diesem Punkt erfolgreich vermieden. Obwohl das Material heterogen war, war es unter allen Ansätzen vergleichbar.

Für künftige *in vitro* Studien ist es wichtig, Nanopartikelsuspensionen mit enger Größenverteilung und besserer Charakterisierung ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften zu generieren. Nur so können die richtigen Schlüsse aus den erzielten Ergebnissen gezogen werden, um beispielsweise verbesserte Nanopartikelgenerationen für die medizinische Anwendung zu entwickeln.

4.2.4 Inhibition der energieabhängigen Endocytose als Kontrolle

Ein Problem bei der Interpretation quantitativer Daten ist die eindeutige Bestimmung, ob der gemessene Anteil tatsächlich intrazellulär vorliegt oder ob die Probe durch unspezifische Anhaftungen kontaminiert wurde. Werden die gesamten Zellen eines Ansatzes geerntet und analysiert, dürfen keine Anhaftungen an dem Kulturmaterial oder den Zellmembranen mit in die Analyse verschleppt werden. Ist dies nicht zu vermeiden, so muss man zumindest den Anteil der unspezifischen Anhaftungen bestimmen können und ihn von den anderen Messwerten als Hintergrund abziehen. Dafür müssen aktive Transportvorgänge unterbunden werden. Methoden hierfür sind die Inhibition des Zellstoffwechsels durch ATP-Depletion [84] oder durch Kultivierung der Zellen bei 4°C [85]. ATP-Depletion kam in dieser Studie nicht in Betracht, da diese nur in Kulturmedium ohne Serum durchzuführen ist. Da aber die Bedingungen der Kontrolle denen der weiteren Versuchsansätze gleichen muss und die Ausbildung einer Proteincorona dafür essentiell ist, schied diese Möglichkeit aus. Die Unterbindung energieabhängiger Stoffwechselvorgänge durch Absenkung der Temperatur auf 4°C war daher die bessere Möglichkeit.

Wie in Abschnitt 3.3.2 gezeigt werden konnte, hat die Oberflächenfunktionalisierung der Partikel einen großen Einfluss auf den Anteil extrazellulär anhaftender Partikel bei BT20 Zellen. Im Falle der aminofunktionalisierten und daher positiv geladenen Partikel wird nach der Nanopartikelexposition bei 4°C ein hoher Eisenwert detektiert. Bei Tests an C3H RS1 Zellen überstieg dieser sogar den maximalen Messwert, der bei 37°C gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Das zeigt zugleich die Schwäche dieser Kontrolle bei Nanopartikeltests *in vitro*. Da in diesem Fall eine Induktion der Aufnahme durch die 4°C-Bedingung unwahrscheinlich ist, scheint eher die Änderung der physikalischen Bedingungen für die erhöhte extrazelluläre Anhaftung der Partikel verantwortlich zu sein. Im Falle der aminofunktionalisierten Partikel ließ sich bereits bei der Zugabe der Partikel zum kalten Medium eine erhöhte Verklumpung beobachten. Nach der Inkubation waren die Partikel zudem deutlich schwerer von Zellen abzuwaschen. Das Medium wird zudem bei 4°C deutlich viskoser, was die Diffusion der Partikel im Vergleich zu 37°C verändert. Die 4°C-Kontrolle ist also in Abhängigkeit zu den Partikeleigenschaften nicht in allen Fällen geeignet. Bei den PEGylierten Partikeln ließ sich der geringste Messwert im Vergleich zu 37°C detektieren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Partikel zum einen sehr gut durch die Waschschriffe von der Zellmembran abgelöst werden können. Zum anderen zeigt dies, dass PEGylierte Partikel in die verwendeten Zelllinien über energieabhängige Prozesse aufgenommen werden. Diese Partikel wurden daher auch für weitere mechanistische Studien als Modelpartikel ausgewählt. Bei Partikeln mit hohem Messwert bei 4°C bleibt unklar, ob dies an den veränderten Kulturbedingungen im Vergleich zu 37°C liegt, oder ob sie über passive Transportwege in die Zelle

aufgenommen werden. Zu beachten bleibt dabei, dass Inhibition des Zellstoffwechsels immer nur über einen sehr begrenzten Zeitraum möglich ist, bevor die Zellen geschädigt werden und so nicht mehr als Kontrolle dienen können.

Für bessere Kontrollversuche wären veränderte Waschschriffe hilfreich, durch die man die extrazellulär anhaftenden Partikel zuverlässig von der Zellmembran lösen könnte. In einer Studie wurde eine elegante Methode beschrieben, in der Goldpartikel durch eine eigens entwickelte Ätzlösung so von der Zellmembran gelöst werden konnten, dass die Zellen dabei keinen Schaden nahmen [86]. Dieses Konzept sollte in der Studie durch die Verwendung einer Ätzlösung mit Oxalsäure adaptiert werden. Diese sollte durch die poröse Silicaschale dringen und den Eisenkern auflösen. Das Eisen wäre so aus der quantitativen Analyse entfernt worden. Oxalsäure 1 M war auch in der Lage, das Eisen aus den Partikeln innerhalb von 15 min heraus zu lösen. Allerdings konnten im Versuchszeitraum keine Bedingungen gefunden werden, unter denen zwar das Eisen durch die Säure aufgelöst wird, die Zellen aber keinen Schaden nehmen (Daten nicht gezeigt). Zukünftige Konzepte könnten sich eher daran orientieren, die Verbindungen der Partikel zur Zellmembran zu kappen. Dafür müssen weitere Studien durchgeführt werden, um die Natur dieser Bindungen zu charakterisieren.

4.2.5 Beobachtungen zur potentiellen Toxizität der $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel

Aufgrund der Ziele der durchgeführten Studien und dem damit verbundenen experimentellen Aufwand, konnten einige interessante Aspekte nur am Rande betrachtet werden.

Einer dieser Bereiche ist die potentielle Toxizität der Nanopartikel. Die Partikel wurden mit 50 $\mu\text{g Fe/ml}$ in einem Konzentrationsbereich eingesetzt, bei dem keine offensichtlichen toxischen Effekte die zelluläre Aufnahme beeinflusste und wenig Hintergrundadsorption stattfand. Dennoch waren Partikel immer noch im Überfluss vorhanden. Bei früheren Studien wurden bei *in vitro* Versuchen bereits bis zu 1 mg Fe/ml Zellkulturmedium eingesetzt [44,87]. Vortestungen zeigten, dass erst ab einer Konzentration von 0,6 mg Fe/ml eine Wachstumsinhibition von C3H RS1 Zellen auftrat, wenn sie mit unmodifizierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln inkubiert wurden (Abschnitt 3.3.1.1). Bei allen in Abschnitt 3.3 durchgeführten quantitativen Untersuchungen hatte die Inkubation mit Nanopartikeln über 48 h keinen Einfluss auf die Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen. Ein weiteres Indiz für die unverminderte Teilungsfähigkeit stellen elektronenmikroskopische Aufnahmen dar, die Zellen mit inkorporierten Partikeln bei der Mitose zeigen (Abbildung 3.5). Diese Beobachtungen zeigen aber nur, dass die Partikel im Inkubationszeitraum keine drastische Zytotoxizität in Form von Wachstumsinhibition oder Zelltod verursachen. Die Zellen könnten aber bereits unter Stress stehen, der erst nach längerer Zeit sichtbare Folgen haben würde. So wird berichtet, dass Eisenoxidna-

nanopartikel bei humanen Endothelzellen Schäden durch oxidativen Stress verursachen können [88]. Silicapartikel sollen das Potential besitzen, bei Makrophagen und Endothelzellen Autophagie sowie Nekrosen auszulösen [89]. Häufig wird auch die mitochondriale Aktivität oder die Ausschüttung des Enzyms Lactatdehydrogenase gemessen, um eine Stressinduktion durch Nanopartikel festzustellen. Eisenoxidnanopartikel wurden ebenfalls dahingehend untersucht und eine konzentrationsabhängige Toxizität festgestellt [90]. Die Ergebnisse all dieser Studien zeigen, dass auch im Falle der hier beschriebenen $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel gründliche Toxizitätsuntersuchungen nötig sind, um eine Risikoabschätzung der Partikel für die Anwendung *in vivo* zu erhalten. Ein Vergleich verschiedener Tumor- und Normalzellen wäre ebenfalls sinnvoll, um die Sensitivität verschiedener Zelltypen gegenüber den Partikeln zu erforschen.

4.2.6 Konsequenzen und Perspektiven für anwendungsbezogene Nanopartikelentwicklung

Künstlich erzeugte Nanopartikel werden meist mit einer klaren Intention hergestellt. Wie schon in der Einleitung dargestellt wurde, werden $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel bereits in der Thermo-therapie von humanen Tumoren verwendet, die den in dieser Arbeit verwendeten in vielen Eigenschaften ähneln [91,92]. Viele Forschungsansätze verfolgen die Strategie, solche Nanopartikel für eine breite Palette weiterer medizinischer Anwendungen zu entwickeln. Beispielsweise ist der Versuch sehr populär, Nanopartikel mit Eigenschaften zu versehen, die sie dazu befähigen, nach intravenöser Applikation gezielt bestimmte Zell- oder Gewebstypen anzusteuern [93,94]. Dafür ist es allerdings nötig, zu verstehen, welche Materialeigenschaften welche Auswirkungen auf das Verhalten der Nanopartikel in biologischen Umgebungen haben. Wenn man die Literatur studiert, stellt man fest, dass es eine große Menge unterschiedlichster Nanopartikelkonstrukte gibt, die unter den unterschiedlichsten Bedingungen auf ihr Verhalten getestet wurden. Die Vielzahl der dadurch auftretenden Einflussfaktoren macht die Ableitung allgemeiner Aussagen bisher sehr schwierig.

4.2.6.1 $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel in der Thermo-therapie

Nanopartikel mit einem Kern aus Eisenoxid werden bereits in der Thermo-therapie von Tumoren am Menschen angewandt [17,58,92,95,96] (<http://www.magforce.de>). Es gibt andere Studien, in denen das Potential von Partikeln für diese Anwendung beschrieben wird [24,26,28,29,97,98]. Bei der von der MagForce AG entwickelten NanoTherm® Therapie werden die Partikel direkt in den Gehirntumor eingebracht, wo sie durch gewollte Agglomeration ein festes Depot bilden [17]. Für andere Tumorentitäten oder metastasierende Tumore ist aber die intravenöse Verabreichung von Partikeln und somit die passive oder aktive Anrei-

cherung im Tumorgewebe erfolgversprechender, wobei die Partikel allerdings nicht verklumpen und in den Gefäßen oder Organen ausfallen dürften.

Bezogen auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie bedeutet dies, dass die Partikel mit aminofunktionalisierter Oberfläche in biologischer Umgebung stark agglomerieren und somit nur für die direkte Einbringung in die Zielregion geeignet wären. Für intravenöse Applikation sind die Partikel mit stark negativ geladener oder PEGylierter Oberfläche die erfolgversprechenderen Kandidaten. Allerdings werden diese von den Zellen auch am schlechtesten aufgenommen. Hier wäre es sinnvoll, zusätzlich eine spezifische Targetfunktion für die entsprechenden Zielzellen zu identifizieren, um damit die Partikel zu funktionalisieren. Weitere Studien müssten durchgeführt werden, um das Verständnis der Schlüsselfaktoren für eine zelluläre Aufnahme der Partikel durch Normal- und Tumorzellen zu verbessern. Das ultimative Ziel wäre eine Partikelgeneration, die exklusiv von den Zielzellen internalisiert würde. So könnten Wirkstoffe in geringer Konzentration lokal wirken.

4.3 Entwicklung eines Aufnahmemodells am Beispiel von HeLa Zellen

Die Interaktionen von Nanopartikeln mit Zellen werden in unterschiedlichster Weise untersucht, um ein Verständnis für deren Natur und die zugrundeliegenden Gesetzmäßigkeiten zu generieren. Nur wenn man diese versteht, kann man in den Prozess gezielt eingreifen und Partikel entwickeln, die für medizinische Anwendungen optimiert werden können. Ein wichtiger Aspekt dabei ist, wie die jeweiligen Nanopartikel in die Zellen gelangen. Bislang ist nur wenig im Detail darüber bekannt, wie Eisenoxidnanopartikel intrazellulär aufgenommen werden können. Hingegen wird in zahllosen Studien die zelluläre Aufnahme verschiedenster Nanopartikelkonstrukte in unterschiedlichsten Zelllinien belegt. Eine der detaillierteren Studien zum Aufnahmemechanismus beschreibt die Aufnahme von Silicapartikeln durch HeLa Zellen über Makropinocytose unter Beteiligung kleiner GTPasen wie Rac1 und CDC42 [99]. Andere Arbeiten zeigen die Caveolin-1abhängige Aufnahme von Nanokapseln durch Ovarialkarzinomzellen [100] oder von Goldpartikeln durch die humane Lungenkarzinomzelllinie A549 [100]. Clathrinvermittelte Endocytose von Eisenoxidnanopartikeln wurde ebenso beobachtet [55] wie die Aufnahme von Eisenoxid- und Calciumphosphatnanopartikeln durch Makropinocytose in Mikroglia und HeLa Zellen [55,101]. Bereits dieser kleine Auszug der durchgeführten Arbeiten zeigt, dass in Abhängigkeit von Nanopartikelsuspension, Zelllinie und Untersuchungsmethode unterschiedlichste Aufnahmewege eine Rolle zu spielen scheinen. Dabei sind passive Aufnahme und Ansätze mit bereits eingebauter Targetfunktion noch nicht berücksichtigt.

In dieser Arbeit sollte ein möglichst detailliertes Aufnahmemodell der verwendeten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel in Tumorzellen erarbeitet werden. Da die TEM-Aufnahmen gezeigt hatten, dass die Partikel im endosomalen System der Zellen auftauchen (Abschnitt 3.1) und bei 4°C die Partikelaufnahme inhibiert war (Abschnitt 4.2.4), konnte eine passive Aufnahme weitgehend ausgeschlossen werden. Die weiteren Experimente fokussierten sich demnach auf die Identifizierung der aktiven Aufnahmewege. Dafür wurde den Zellen gezielt jeweils ein Protein aus der Endocytosemaschinerie durch siRNA entfernt. Dies hatte gegenüber anderen Studien mit chemischer Inhibition den Vorteil einer erhöhten Selektivität für die jeweilige Endocytoseroute. Neben den in der grundlegenden Arbeit von Conner und Schmid [51] beschriebenen Endocytosewegen wurden in den letzten Jahren weitere Proteine identifiziert, die ein detaillierteres Bild der energieabhängigen Aufnahme zeichnen [52,83]. Die dort benannten Proteine bildeten die Grundlage für die Identifizierung der Aufnahmewege durch siRNAs (Abbildung 4.4).

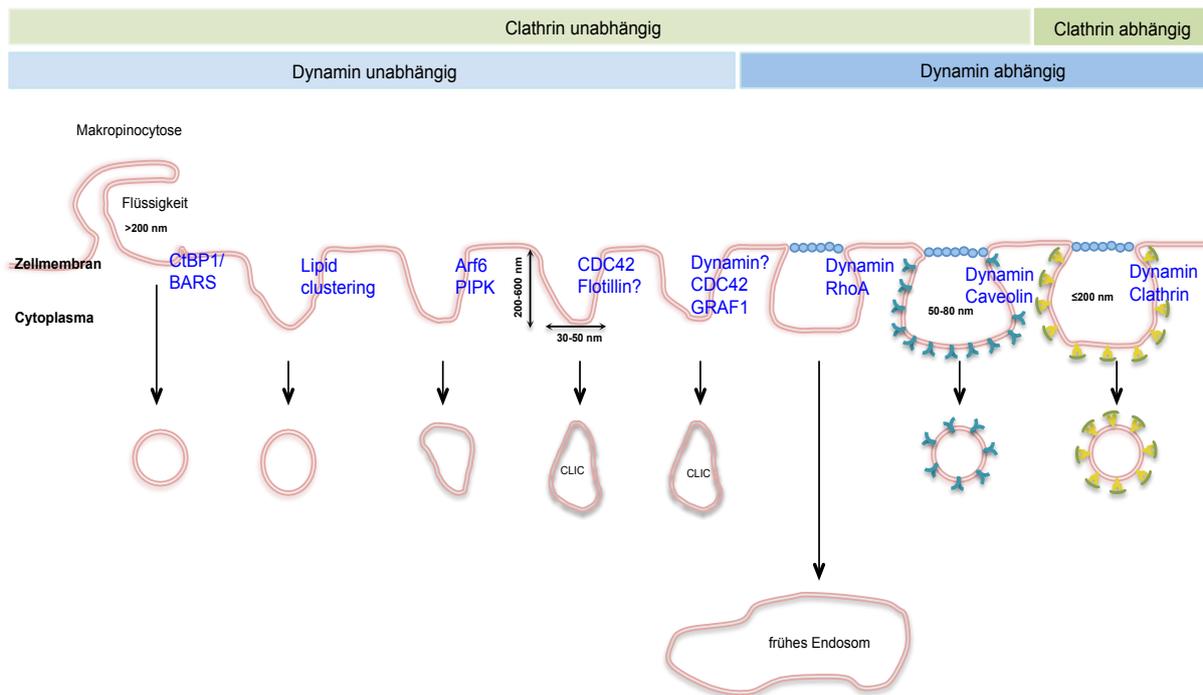


Abbildung 4.4: Übersicht über die Endocytosewege

Abbildung modifiziert aus Wieffer et al. [52], Größenangaben der Membranausstülpungen aus Canton et al. [83], beteiligte Proteine sind in blauer Schrift angegeben

4.3.1 Die Beteiligung von Flotillin-1, Caveolin-1, Clathrin und Dynamin2

In Abschnitt 3.4.1 wird anhand verschiedener Quantifizierungstechniken und Nanopartikelsuspensionen gezeigt, dass von den vier Proteinen nur Caveolin-1 eine Rolle bei der intrazellulären Aufnahme spielt. Caveoline sind Proteine, die in der Zellmembran verankert sind und den Caveolae ihre Struktur verleihen [83]. Es wurden je nach Partikel und Methode zwischen 23% und 41% weniger Partikel internalisiert als bei unbehandelten Kontrollzellen. Da der Knockdown von Caveolin-1 nicht vollständig war (Abbildung 3.28), könnte der Effekt bei vollständiger Depletion des Proteins noch deutlicher ausfallen.

Der größte Effekt mit 41 % Reduktion war bei der Inkubation mit fluoreszierenden $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln zu beobachten. Hier könnte die kürzere Inkubationszeit von 4 h gegenüber den 24 h bei der quantitativen Eisenbestimmung ausschlaggebend gewesen sein. Möglicherweise werden bei depletiertem Caveolin-1 mit längerer Inkubationszeit der Partikel alternative Transportwege zur Kompensation genutzt. Auch könnten die verbliebenen Caveolin-1-Proteine aufgrund des unvollständigen Knockdowns nach 24 h mehr Partikel in die Zelle transportiert haben und somit den Effekt teilweise maskieren.

Die Erhöhung des Eisenwertes gegenüber den Kontrollzellen bei Zellen ohne Clathrin, nach Inkubation mit PEGylierten $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln, ist aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant (Abbildung 3.30). Dennoch lässt sich diese Tendenz auch nach der

Inkubation mit carboxylierten Partikeln erkennen. Dort enthalten Zellen ohne Flotillin-1 mehr Eisen als Kontrollzellen, obwohl auch dieser Effekt nicht signifikant ist. Dennoch könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass HeLa Zellen in der Lage sind, beim Ausfall eines Transportweges andere Alternativen zu aktivieren. Dies könnte man herausfinden, indem man das Expressionslevel aller bekannten Transportproteine bei transfizierten Zellen bestimmt. Bei den untersuchten Proteinen konnte durch semiquantitative Western Blots keine verstärkte Expression beobachtet werden (Abbildung 3.28). Allerdings ist die Methode auch nicht sensitiv genug und es wurden zu wenige Proteine dabei erfasst, um eine Aussage machen zu können.

Der Knockdown von Dynamin2 hat interessanterweise keinen Einfluss auf die Internalisierung dieser Partikel in HeLa Zellen, obwohl dieses Protein an mehreren Endocytosewegen beteiligt ist (Abbildung 4.4) und eine wichtige Rolle bei der Abschnürung caveolinhaltiger Vesikel von der Zellmembran spielt [102]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein Transportweg existiert, der zwar caveolinabhängig aber dynaminunabhängig ist. Andererseits könnten sich die Partikel aber auch in den Caveolae anreichern, ohne dass die Vesikel von der Zellmembran abgeschnürt werden. Diese Partikel würden vor der quantitativen Analyse nicht entfernt werden und so einen Effekt von Dynamin2 auf die Aufnahme verdecken. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von transfizierten Zellen ohne Dynamin2 bei gleichzeitiger Markierung von Caveolin-1 könnte diese These überprüfen.

Alle experimentellen Befunde dieses Abschnittes beschränken sich auf $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel mit negativer Oberflächenladung. Ob eine Veränderung der Oberflächenparameter eine Verschiebung der Aufnahmeprozesse bewirken würde, wäre nur durch die Entwicklung und den Einsatz geeigneter Nanopartikelsuspensionen zu klären.

Die Befunde zeigen zudem, dass die Partikel nicht exklusiv durch eine spezifische Endocytoseroute in die Zellen gelangen. Dies war aufgrund der Heterogenität der Suspension auch nicht zu erwarten.

4.3.2 Die Beteiligung von PIP5K α , GRAF1, CtBP1 und CDC42

4.3.2.1 Analyse mittels Eisennachweis

Die quantitative Eisenbestimmung von HeLa Zellen, denen durch Transfektion mit siRNA die GTPase CDC42 ausgeknockt wurde, zeigt, dass CDC42 von den vier untersuchten Proteinen mit um 46% reduzierter Eisenaufnahme den größten Einfluss auf die Internalisierung der PEGylierten Partikel nach 24 h Inkubation hat (Abbildung 3.35). Dieser Effekt war sehr deutlich und bereits vor der Analyse des Zellpellets durch den geringeren Eisengehalt zu erken-

nen. CDC42 (Cell division cycle 42) ist eine GTPase, die durch Hydrolyse von GTP zu GDP Signalwege steuert, die unter anderem das Aktinskelett und die Stressverarbeitung der Zelle betreffen [83]).

Schwieriger zu beurteilen sind die kleineren Einflüsse von GRAF1 und PIP5K α . Während der detektierte Unterschied bei Zellen ohne GRAF1 zumindest statistisch signifikant ist, so konnte die Effektivität des Knockdowns ohne einen spezifischen Antikörper nicht nachgewiesen werden. Hier bleibt also eine Unsicherheit bestehen, obgleich die Vermutung nahe liegt, dass der Knockdown erfolgreich war. Es wurde ebenso verfahren wie bei allen anderen Zielproteinen, bei denen mit gleicher Technik und spezifischen Antikörpern ein effektiver Knockdown nachzuweisen war. Der Knockdown von PIP5K α war dagegen nachweisbar erfolgreich (Abbildung 3.34). Allerdings war der gemessene Unterschied statistisch nicht signifikant, so dass nur weitere Experimente den Sachverhalt eindeutig klären könnten.

4.3.2.2 Abweichender Befund nach Fluoreszenzmikroskopie

Aufgrund des experimentellen Aufwandes wurden abschließend nur die beiden Proteine betrachtet, die zuvor einen klaren Effekt auf die intrazelluläre Aufnahme der Partikel gezeigt hatten: Caveolin-1 und CDC42. Abweichend zu Abschnitt 3.4.1.5 wurden die Zellen jedoch 24 h anstatt 4 h mit den fluoreszierenden Partikeln inkubiert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu den vorhergehenden Versuchen herzustellen.

Es fällt auf, dass die Depletion beider Proteine unter diesen experimentellen Bedingungen nur einen geringen Effekt auf die intrazelluläre Aufnahme der Partikel hat (Abbildung 3.37). Dies ist überraschend, da in einem ähnlichen Experiment in Abschnitt 3.4.1.5 noch 41% Reduktion der Internalisierung bei depletiertem Caveolin-1 zu beobachten war. Ein Grund dafür könnte ein unterschiedliches Verhalten der Nanopartikel im Zellkulturmedium sein. Im Vergleich zur ersten Versuchsreihe musste auf eine zweite Charge zurückgegriffen werden. Bei der Synthese, der Lagerung oder dem Transport der Partikel könnten Veränderungen an der Beschaffenheit der Partikel aufgetreten sein, die beispielsweise das Agglomerations- und Sedimentationsverhalten beeinflusst haben. Die fluoreszenzmarkierten Partikel wurden aus den USA bezogen. Chargen- oder transportbedingte Varianzen konnten hier nachträglich nicht nachvollzogen werden. Eine weitere Einflussgröße ist das abweichende Versuchsdesign. Durch die verlängerte Inkubationszeit könnten die Zellen kompensatorische Transportwege aktiviert haben, durch die die Partikel in die Zellen gelangen konnten. So wird berichtet, dass die Depletion von Caveolin-1 in humanen Fibroblasten zur Aktivierung von CDC42 und somit zu einem verstärkten „Fluid Phase Uptake“ führt [103]. Durch diesen Mechanismus könnte der Effekt des Caveolin-1- Knockdowns egalisiert werden. Dies könnte im Vergleich

zu den anderen Experimenten dadurch verstärkt werden, dass der Knockdown von Caveolin-1 durch eine bessere Transfektionstechnik effizienter war als in Abschnitt 3.4.1.5. Der Einfluss von Caveolin-1 würde durch den vollständigen Knockdown nicht betont, sondern von der Kompensation durch verstärkte CDC42- abhängige Endocytose verdeckt werden.

4.3.3 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Zelllinien am Beispiel von BT20

Es zeigte sich, dass die Ergebnisse für HeLa Zellen nicht auf BT20 Zellen übertragbar sind (3.4.3). Im Fall von Caveolin-1 und CDC42 führt deren Depletion sogar zu einer verstärkten Partikelaufnahme (Abbildung 3.39). BT20 Zellen scheinen also noch besser als HeLa in der Lage zu sein, alternative Endocytoserouten zu aktivieren. Zu beachten ist dabei allerdings auch, dass BT20 Zellen im Vergleich zu HeLa nur 5-10% der Partikelmenge aufgenommen haben, obwohl sie identischen Konzentrationen ausgesetzt waren.

Bereits dieser Vergleich mit nur einer Zelllinie zeigt, dass die Internalisierung von ein und demselben Nanokonstrukt in verschiedene Tumorzellen vom Zelltyp abhängt. Bei der Beurteilung einer gewünschten gerichteten Nanopartikelaufnahme durch Zielzellen müssen in den *in vitro* Versuchen bereits Zellen ausgesucht werden, die der anvisierten Tumoridentität entsprechen. Besonders die Ausstattung der Zellen mit relevanten Transportproteinen spielt dabei eine entscheidende Rolle. So ist beispielsweise bekannt, dass Caveolin-1 in einigen Tumorzellen hochreguliert und in anderen herunterreguliert ist [103]. Die Kenntnis der Rezeptorausstattung gepaart mit der Kenntnis über die präferierte Endocytoseroute der synthetisierten Nanopartikel ist daher der Schlüssel für intrazelluläres Targeting.

4.3.4 Aufnahmemodell für SiO₂-Fe₂O₃ Partikel in HeLa Zellen sowie daraus ableitbare Tendenzen

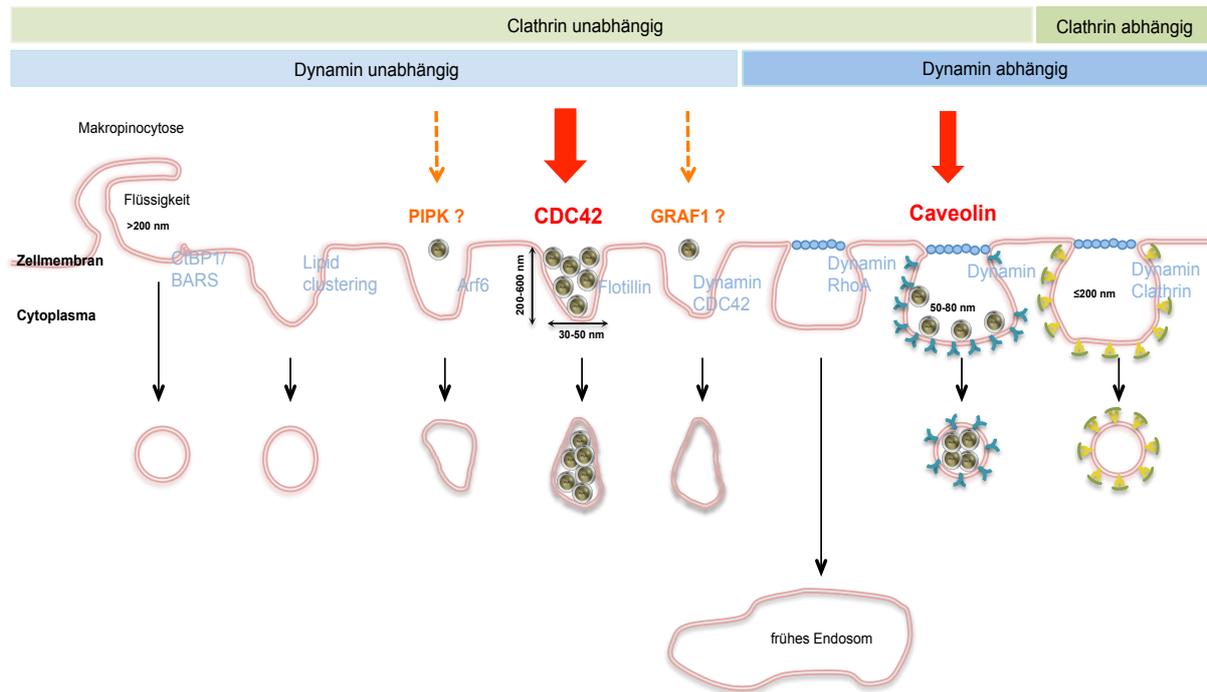


Abbildung 4.5: Aufnahmemodell für getestete SiO₂-Fe₂O₃ Partikel in HeLa Zellen, beteiligte Proteine sind farblich hervorgehoben und die Aufnahmemenge anhand der Pfeilstärke gewichtet

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass Caveolin-1 und CDC42 die Hauptfaktoren sind, die eine intrazelluläre Aufnahme von negativ geladenen SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln mit einem Durchmesser eines Primärpartikels von ca. 30 nm in HeLa Zellen ermöglichen (Abbildung 4.5). Je nach verwendetem Nanopartikel wurden in der Addition 69-87% der Gesamtpartikel durch Prozesse aufgenommen, die von Caveolin-1 und CDC42 abhängig sind. Die Rolle weiterer Proteine ist nicht vollständig geklärt. Bei kleineren Einflüssen von PIPK und GRAF1 bestehen noch Unsicherheiten, die nur durch die Durchführung weiterer Experimente zu klären sind.

Endocytosevorgänge, die von Caveolin-1 und CDC42 abhängig sind, zeichnen sich durch Vesikel aus, deren Öffnungsweite an der Zellmembran nur 30-80 nm beträgt [52,83]. Das ist insofern interessant, als dass der mittlere Durchmesser der Partikelagglomerate weit über diesem Wert liegt (Tabelle 2.1). Dies legt den Schluss nahe, dass nur kleine Agglomerate durch die Zellen aufgenommen werden können. Der größte Anteil der Partikel wäre demnach nicht für die Zellen verfügbar, was diese Art von Partikeln weniger geeignet für intrazelluläres Targeting macht. Die Ursache liegt hierbei in der heterogenen Größenverteilung der Partikelagglomerate innerhalb der Suspension. Durch das Fehlen spezifischer Substratstrukturen auf der Partikeloberfläche für rezeptorgesteuerte Endocytose sowie das uneinheitliche Er-

scheinungsbild der Agglomerate ist die Ansteuerung mehrerer Aufnahmewege nicht überraschend.

Obwohl Clathrin und GRAF1 zu etwa gleichen Teilen für die Aufnahme der größten Flüssigkeitsvolumina aus der Zellumgebung während der Endocytose in HeLa Zellen verantwortlich sein sollen [104], spielen sie bei der Aufnahme der untersuchten Nanopartikel keine oder nur eine untergeordnete Rolle. Die Partikel stellen somit also kein Substrat für diese Endocytosewege dar. Es wäre interessant zu erfahren, wie andere Tumorzelltypen und Normalzellen diese Partikel internalisieren. Mögliche Unterschiede könnten Aufschlüsse über das therapeutische Potential der Partikel und Hinweise auf eine gezielte Weiterentwicklung geben.

Monodisperse, vergleichbare Eisenoxidpartikel mit einer definierten Größe waren im Verlauf der Studien leider nicht erhältlich. Um aber die Endocytose von künstlich erzeugten Nanopartikeln zu verstehen sowie deren Verhalten in nanomedizinischen Ansätzen präzise steuern und vorhersagen zu können, ist die Entwicklung klar definierter und kontrollierter Nanopartikelsuspensionen essentiell.

4.4 Autophagieinduktion als Auswirkung der Nanopartikelaufnahme bei HeLa Zellen

Es wurde bisher gezeigt, dass C3H RS1, BT20 und HeLa Zellen beträchtliche Mengen $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel intrazellulär aufnehmen können. Es ist aber unbekannt, wie die Partikel prozessiert werden und welchen Einfluss diese Mengen von Fremdmaterial auf den Stoffwechsel der betroffenen Zellen haben. Es gibt Arbeiten, die beschreiben, dass Eisenoxidpartikel mit Aminosilanhülle von Tumorzellen über Generationen gespeichert werden [53]. Andere beobachteten die Exocytose von Silicapartikeln [68]. Bei der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich Zellen mit inkorporierten Partikeln weiter teilen können (Abbildung 3.5) und dass sie durch Endocytose im endo-lysosomalen System der Zellen angereichert werden. Da $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel aus Bestandteilen bestehen, die nur schwer bioverfügbar sind, können diese von den Zellen nicht ohne Weiteres degradiert werden. Besonders die Silicaschale schützt den Eisenkern vor Dissoziation. Es wäre also denkbar, dass durch die Anreicherung von Fremdmaterial die Funktion der Lysosomen gestört und Autophagie induziert wird [60,105].

Der Begriff Autophagie wurde zuerst 1963 von De Duve verwendet [106] und bezeichnet einen Mechanismus, durch den die Zellen Pathogene, beschädigte Organellen und Proteine abbauen können [107]. Die Abbauprodukte können dann wieder dem Zellstoffwechsel zugeführt werden. Einer Störung dieser Funktion wird bei der Entstehung unterschiedlicher Krankheiten eine Bedeutung zugemessen [61,108]. Die Rolle von Nanopartikeln bei der Induktion von Autophagie ist weitgehend unklar. Allerdings existieren mittlerweile einige Arbeiten, die diesen Sachverhalt untersuchen [60]. So konnte beispielsweise eine größenabhängige Autophagieinduktion durch Quantum Dots in mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden [109].

Die Störung der Funktion von Lysosomen und Autophagosomen kann für die betroffene Zelle schwerwiegende toxische Konsequenzen bis hin zur Apoptose haben [60] (Abbildung 4.6).

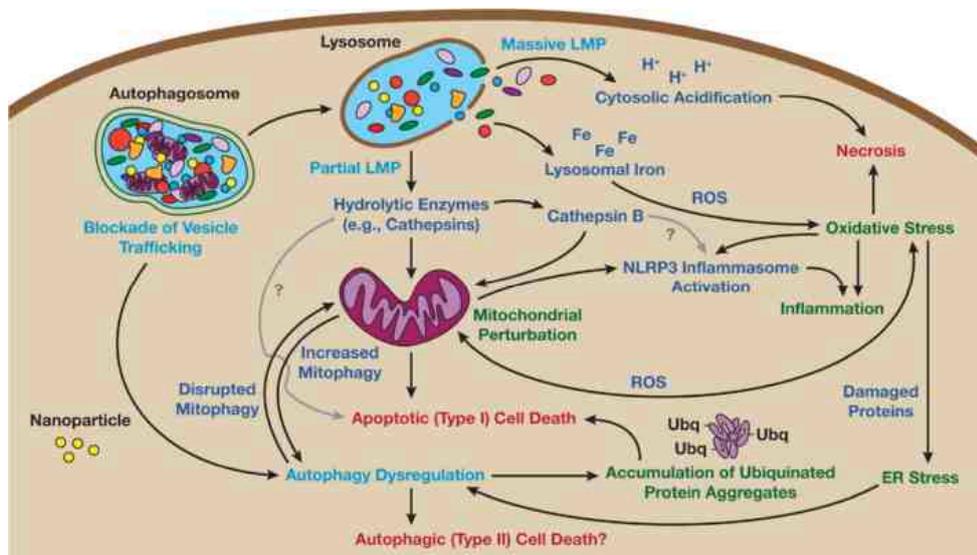


Abbildung 4.6: Mechanismus der durch Nanopartikel verursachten Toxizität durch Behinderung der Autophagie (übernommen aus [60])

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.5 zeigen, dass PEGylierte $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel in HeLa Zellen konzentrationsabhängig für eine verstärkte LC3B-Expression sorgen und somit zu einer Autophagieinduktion. Bei hohen Partikelkonzentrationen von $100 \mu\text{g Fe/ml}$ zeigt sich, dass der Inhibitor des LC3B-Abbaus nur noch unwesentlich den Gehalt von LC3B in den Zellen erhöht. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass viele Partikel den Abbau von LC3B verhindern. Dies ist wiederum ein Hinweis darauf, dass unter diesen Bedingungen die Prozessierung der Autophagosomen behindert ist. Da in den Experimenten bis dahin keine gravierenden toxischen Effekte der Nanopartikelaufnahme beobachtet werden konnten, ist dies der erste Hinweis darauf, dass die verwendeten Partikel langfristig Toxizität verursachen könnten.

Für die praktische Anwendung der Partikel können daraus positive und negative Folgen abgeleitet werden. Bei der Tumorthherapie könnte eine Störung der Lysosomenfunktion in den Zielzellen durchaus einen positiven Effekt haben. So gibt es bereits Ansätze, in denen Nanopartikel mit einer Targetfunktion so designt werden, dass sie bei Tumorzellen gezielt Autophagie auslösen [15,110]. Auf der anderen Seite könnten unerwünschte Nebenwirkungen auftreten, wenn gesunde Zellen die Partikel aufnehmen. Dies könnte auch geschehen, wenn Partikel mit Targetfunktion aus dem Tumor nach erfolgreicher Behandlung in das übrige System gelangen und dann für andere Zellen erreichbar werden. Dazu wäre es wichtig, zu ermitteln, welche Konzentrationsbereiche von welchen Zelltypen toleriert werden und welche Folgen sich aus längerer Exposition mit den Partikeln ergeben. Wie bereits in Abschnitt 4.2.5 thematisiert wurde, ist eine detaillierte Beurteilung der Toxizität grundlegend für die Anwendung *in vivo*.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Nanotechnologie befasst sich per Definition mit Materialien und Komponenten, die ca. zwischen 1 und 100 Nanometer groß sind. Die Nanomedizin besitzt dabei großes Potential bei der Entwicklung neuer Therapieformen und bei der Diagnostik verschiedenster Krankheitsbilder. Eisenoxidnanopartikel beispielsweise werden heute bereits als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie oder zur Thermotherapie von Gehirntumoren am Patienten verwendet. Trotz ihrer klinischen Anwendung und ihres Potentials für weiterführende Therapiekonzepte ist nur wenig darüber bekannt, welche Faktoren auf welche Weise die intrazelluläre Aufnahme von Eisenoxidnanopartikeln in Zellen beeinflussen und welche Internalisierungsrouten dazu genutzt werden. Erkenntnisse über die grundlegenden Phänomene der Interaktion von Nanopartikeln mit humanen Zellen könnten eine gezielte Entwicklung von klinisch anwendbaren Nanopartikeln für eine Vielzahl von Indikationen ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie Eisenoxidnanopartikel mit Silicaschale ($\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$) von Tumorzellen internalisiert werden. Dazu sollte zuerst qualitativ und quantitativ die intrazelluläre Aufnahme von $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln in Abhängigkeit ihrer Oberflächenbeschaffenheit in murine (C3H RS1) und humane (BT20, HeLa) Tumorzellen *in vitro* betrachtet werden. Es sollte sowohl der Nachweis der intrazellulären Aufnahme erbracht als auch die Auswirkungen unterschiedlicher Oberflächenmodifikationen auf die Aufnahmekinetik sowie die Aufnahmemenge der Nanopartikel in die verwendeten Zellen untersucht werden. In einem zweiten Schritt sollte gezeigt werden, welche Aufnahmemechanismen an der Internalisierung ausgewählter $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Nanopartikel beteiligt sind. Durch den Vergleich von mindestens zwei unterschiedlichen Zelllinien sollte die Ableitbarkeit allgemeiner Tendenzen für Tumorzellen geprüft werden. Im dritten Teil der Arbeit sollte die potentielle Toxizität der verwendeten Nanopartikel beleuchtet werden. Die Arbeitshypothese lautete, dass die verstärkte intrazelluläre Anreicherung von $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikeln die Funktion der Endo- bzw. Lysosomen beeinträchtigen und dadurch zur Induktion von Autophagie führen könnte.

Zur Untersuchung des Einflusses von Oberflächenmodifikationen wurden $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Partikel aus einer Charge verwendet, die entweder mit Thiol-, Carboxy-, Epoxy-, Amino-, PEG- oder Amino/PEG- Gruppen funktionalisiert worden waren. Die intrazelluläre Aufnahme in C3H RS1, BT20 und HeLa Zellen wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) qualitativ untersucht. Die quantitativen Daten wurden durch die analytische Bestimmung des intrazellulären Eisengehaltes mittels Photometrie oder Massenspektrometrie erhoben. Für die Experimente zum Aufnahmemechanismus wurden die Zellen mit spezifischen siRNAs transfiziert, um die Expression bekannter Proteine aus der Endocytosemaschinerie zu verhindern

(Caveolin-1, Clathrin, Flotillin-1, Dynamin2, PIP5K α , GRAF1, CtBP1, CDC42). Die Auswirkungen auf die Nanopartikel Aufnahme wurden entweder durch die erwähnte Eisenanalytik oder in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Partikeln mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Zur Untersuchung der Toxizität wurde die Expression des Markerproteins LC3B für Autophagosomen in HeLa Zellen bestimmt, welche unterschiedlichen Konzentrationen von SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln ausgesetzt waren.

Die TEM-Aufnahmen zeigten, dass alle getesteten Partikel in das endosomale System von C3H RS1, BT20 und HeLa Zellen aufgenommen wurden. Es konnten keine Nanopartikel beobachtet werden, die sich frei im Cytosol oder im Zellkern befunden hätten. Die quantitative Eisenanalytik zeigte, dass positiv geladene aminofunktionalisierte Partikel mit kombinierter PEGylierung bei C3H RS1 Zellen (9,16 \pm 1,97 pg Fe/Zelle) und positiv geladene aminofunktionalisierte Partikel bei BT20 Zellen (55 \pm 4,7 pg Fe/Zelle) am stärksten zellassoziiert vorlagen. Am geringsten war der intrazelluläre Eisengehalt jeweils bei den negativ geladenen unmodifizierten und thiolisierten Partikeln. Mit Ausnahme der aminofunktionalisierten Partikel war die maximale Aufnahmemenge der getesteten Modifikationen innerhalb 48 h Inkubationszeit in beiden Zelllinien vergleichbar. Der größte Einfluss auf die Partikel Aufnahme nach Transfektion mit spezifischen siRNAs konnte beobachtet werden, wenn die Proteine Caveolin-1 und CDC42 in HeLa Zellen depletiert waren. Im Falle von Caveolin-1 lag die intrazelluläre Eisenmenge je nach verwendeter Partikelart 23-41 % unter dem Wert der Kontrollzellen. Zellen ohne CDC42 nahmen 46 % weniger PEGylierte SiO₂-Fe₂O₃ Partikel intrazellulär auf. Die Internalisierung von PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln wird bei HeLa Zellen also zu einem großen Teil durch Caveolin-1 und CDC42 vermittelt. Die Ergebnisse konnten jedoch nicht auf BT20 Zellen übertragen werden. Die Quantifizierung von LC3B bei HeLa Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln zeigte eine konzentrationsabhängige Steigerung und somit eine vermehrte Bildung von Autophagosomen, die durch die Nanopartikel Exposition verursacht wurde.

Sowohl die intrazelluläre Lokalisierung der verwendeten Partikel als auch die ladungsabhängige Internalisierung bestätigen vergleichbare Befunde mit andersartigen Nanopartikeln aus der Literatur. Die Ergebnisse leisten dabei einen Beitrag zur Bewertung der Anwendbarkeit der getesteten Partikelspezies *in vivo*. Die Caveolin- und CDC42- abhängige Aufnahme von PEGylierten SiO₂-Fe₂O₃ Partikeln durch HeLa Zellen wird hier das erste Mal beschrieben. Die beobachtete Autophagieinduktion zeigt, dass Eisenoxidnanopartikel, anders als zumeist in der Literatur berichtet wird, Einfluss auf den Zellstoffwechsel nehmen können. Dieser Effekt könnte auch therapeutischen Nutzen haben. Um die gewonnenen Erkenntnisse zu vertiefen, müssten zukünftig Studien mit weiteren Zelllinien und Primärzellen unterschiedlicher Gewebsidentität sowie mit verbesserten Nanopartikelsuspensionen durchgeführt werden.

5.2 Abstract

Nanotechnology deals with materials and components, which are approximately between 1 and 100 nanometers in size. Nanomedicine has great potential for the developing of new forms of therapy and in the diagnosis of various diseases. Iron oxide nanoparticles, for example, are already being used as contrast agents in magnetic resonance imaging or thermal therapy of brain tumors in patients. Despite their clinical use and their potential for further therapy concepts, little is known about the factors that influence intracellular uptake of iron oxide nanoparticles into cells and which routes of cell entry are used. Insight of the basic phenomena of the interaction of nanoparticles with human cells could allow targeted development of clinically applicable nanoparticles for a variety of indications.

In the present work should be explored, how iron oxide nanoparticles with silica shell ($\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$) are internalized by tumor cells. First of all, the intracellular uptake of $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles should be measured qualitatively and quantitatively in murine (C3H RS1) and human (BT20, HeLa) tumor cells *in vitro* depending on their surface properties. The intracellular uptake of nanoparticles should be proven as well as the effects of different surface modifications on the uptake kinetics and the amount of nanoparticles inside the cells used. In a second step should be shown, which uptake mechanisms are involved in the internalization of selected $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles. By comparing at least two different cell lines, possible general trends should be deduced for tumor cells. In the third part, the potential toxicity of nanoparticles used should be investigated. It was hypothesized, that increased intracellular accumulation of $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles could impair the function of endo- or lysosomes, thereby leading to the induction of autophagy.

$\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles were used from the same batch to study the influence of surface modifications. Therefore, the particle surface had been functionalized with thiols, carboxy groups, epoxy groups, amino groups, PEGs, or a combination of amino/PEG. The intracellular uptake in C3H RS1, BT20, and HeLa cells was investigated qualitatively by transmission electron microscopy (TEM). The quantitative data were collected through the analytical determination of the intracellular iron content by photometry or spectrometry. To investigate the uptake mechanisms, the expression of known proteins from the endocytotic machinery was knocked down by use of specific siRNAs in transfected target cells. These proteins were caveolin-1, clathrin, Flotillin-1, Dynamin2, PIP5K α , GRAF1, CtBP1, and CDC42. The effects on particle uptake were quantified either by determination of the intracellular iron content or by confocal fluorescence microscopy in combination with fluorescence-labeled particles. To investigate the toxicity of $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles, the expression of the marker protein LC3B for autophagy was measured in HeLa cells, which were exposed to different concentrations of nanoparticles.

The TEM images showed that C3H RS1, BT20, and HeLa cells internalized all tested particles. They were located in vesicles of the endosomal system in the cytoplasm of the cells. No free nanoparticles could be observed in the cytosol or in the nucleus. Quantitative iron analysis demonstrated that positively charged amino-functionalized particles with combined PEGylation showed the best affinity to C3H RS1 cells (9.16 ± 1.97 pg Fe/cell). The positively charged amino-functionalized particles were associated with BT20 cells (55 ± 4.7 pg Fe/cell) to the highest level compared to all the other tested modifications. The lowest intracellular iron content was observed for negatively charged unmodified and thiolated particles in both cell lines. With the exception of the amino-functionalized particles, the maximum uptake level of the tested modifications in both cell lines was comparable within 48 h incubation. The biggest influence on particle uptake after transfection with specific siRNAs could be observed during the depletion of caveolin-1 and CDC42 in HeLa cells. Depending on the particle type used, knockdown of caveolin-1 decreases intracellular iron content about 23-41 % compared to control cells. Cells lacking CDC42 internalize 46% less PEGylated $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles. Hence the uptake of PEGylated $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles in HeLa cells is primarily mediated by caveolin-1 and CDC42. However, the results could not be transferred to BT20 cells. The quantification of LC3B in HeLa cells after incubation with different concentrations of PEGylated $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles showed a concentration-dependent increase and thus an increased formation of autophagosomes, which was caused by the exposure to nanoparticles.

Both the intracellular localization of the particles and the charge-dependent internalization confirm comparable results with different nanoparticles in the literature. The results of this study contribute to the evaluation of the tested particle species for applications *in vivo*. The caveolin-1- and CDC42-dependent uptake of PEGylated $\text{SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles by HeLa cells is described here for the first time. The observed induction of autophagy shows that iron oxide nanoparticles with silica shells could influence the cell metabolism, which is contrary to most findings reported in literature. This effect could be useful in therapy. To increase the knowledge gained in this study, future studies should be conducted with more cell lines and primary cells of different tissue origins as well as with nanoparticle suspensions, which offer improved properties.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Forschung BFBU 2011 1–97
- [2] BMBF 2004 1–45
- [3] Jones CF and Grainger DW 2009 *Advanced Drug Delivery Reviews* **61** 438–456
- [4] Grainger DW 2009 *Advanced Drug Delivery Reviews* **61** 419–421
- [5] Albrecht C, Borm PJA and Unfried K 2004 *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **553** 23–35
- [6] Lin J, Zhang H, Chen Z and Zheng Y 2010 *ACS Nano* **4** 5421–5429
- [7] Larocque J, Bharali DJ and Mousa SA 2009 *Mol. Biotechnol.* **42** 358–366
- [8] Feynman RP 1959 *Annual Meeting of the American Physical Society*
- [9] Freitas RA Jr 2005 *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **1** 2–9
- [10] Jordan A 2001 *Der Onkologe* **7** 1073–1081
- [11] Venditto VJ and Szoka FC Jr 2013 *Advanced Drug Delivery Reviews* **65** 80–88
- [12] Mcneil SE 2005 *Journal of Leukocyte Biology* **78** 585–594
- [13] McBain SC, Yiu HHP and Dobson J 2008 *Int J Nanomedicine* **3** 169–180
- [14] Chisholm EJ et al. 2009 *Cancer Res.* **69** 2655–2662
- [15] Yokoyama T et al. 2011 *PLoS ONE* **6** e25507
- [16] Hirsjärvi S, Passirani C and Benoit J-P 2011 *Curr Drug Discov Technol* **8** 188–196
- [17] Maier-Hauff K et al. 2007 *J. Neurooncol.* **81** 53–60
- [18] Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ and Jallet P 1996 *J Microencapsul* **13** 245–255
- [19] Shubayev VI, Pisanic TR II and Jin S 2009 *Advanced Drug Delivery Reviews* **61** 467–477
- [20] Wang M and Thanou M 2010 *Pharmacol. Res.* **62** 90–99
- [21] Lammers T, Rizzo LY, Storm G and Kiessling F 2012 *Clinical Cancer Research* **18** 4889–4894
- [22] Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC and Taylor CB 1957 *Ann. Surg.* **146** 596–606
- [23] Jordan AM-HKWPJM 2006 Kumar CSSR, editor. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim) p 242–258
- [24] Guardia P, Di Corato R, Lartigue L, Wilhelm C, Espinosa A, Garcia-Hernandez M,

- Gazeau F, Manna L and Pellegrino T 2012 *ACS Nano* **6** 3080–3091
- [25] Laurent S, Dutz S, Häfeli UO and Mahmoudi M 2011 *Advances in Colloid and Interface Science* 1–16
- [26] Ito A, Tanaka K, Kondo K, Shinkai M, Honda H, Matsumoto K, Saida T and Kobayashi T 2003 *Cancer Sci.* **94** 308–313
- [27] Kettering M, Winter J, Zeisberger M, Alexiou C, Bremer-Streck S, Bergemann C, Kaiser W and Hilger I 2006 *Fortschr Röntgenstr* **178** 1255–1260
- [28] Dennis CL, Jackson AJ, Borchers JA, Hoopes PJ, Strawbridge R, Foreman AR, van Lierop J, Grüttner C and Ivkov R 2009 *Nanotechnology* **20** 395103
- [29] Torres-Lugo M, Rodriguez HL, Latorre-Esteves M, Mendez J, Soto O, Rodriguez AR and Rinaldi C 2011 *IJN* 373
- [30] Jordan A, Scholz R, Wust P, Föhling H, Krause J, Wlodarczyk W, Sander B, Vogl T and Felix R 1997 *Int J Hyperthermia* **13** 587–605
- [31] Jordan A, Wust P, Föhling H, John W, Hinz A and Felix R 1993 *Int J Hyperthermia* **9** 51–68
- [32] Jordan A et al. 2001 *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **225** 118–126
- [33] Jordan A et al. 2006 *J. Neurooncol.* **78** 7–14
- [34] Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V and Jordan A 2011 *J. Neurooncol.* **103** 317–324
- [35] Hahn MA, Singh AK, Sharma P, Brown SC and Moudgil BM 2011 *Anal Bioanal Chem* **399** 3–27
- [36] Na HB, Song IC and Hyeon T 2009 *Adv. Mater.* **21** 2133–2148
- [37] Zhu L et al. 2013 *Journal of Controlled Release* **169** 228–238
- [38] Huang G, Diakur J, Xu Z and Wiebe LI 2008 *International Journal of Pharmaceutics* **360** 197–203
- [39] Weinstein JS, Varallyay CG, Dosa E, Gahramanov S, Hamilton B, Rooney WD, Muldoon LL and Neuwelt EA 2009 *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **30** 15–35
- [40] Santhosh PB and Ulrich NP 2013 *Cancer Letters* **336** 8–17
- [41] Kamal MA, Jabir NR N, Tabrez, Ashraf, Shakil and Damanhoury 2012 *IJN* 4391
- [42] McBain SC, Yiu HH and Dobson J 2008 *Int J Nanomedicine* **3** 169–180
- [43] Jordan A, Scholz R, Wust P, Schirra H, Schiestel T, Schmidt H and Felix R 1999 *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **194** 185–196
- [44] Osaka T, Nakanishi T, Shanmugam S, Takahama S and Zhang H 2009 *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **71** 325–330

- [45] Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC and Gazeau F 2003 *Biomaterials* **24** 1001–1011
- [46] Kong G, Braun RD and Dewhirst MW 2000 *Cancer Res.* **60** 4440–4445
- [47] Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME and DeSimone JM 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** 11613–11618
- [48] Gupta AK and Gupta M 2005 *Biomaterials* **26** 3995–4021
- [49] Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S and Dawson KA 2007 *Advances in Colloid and Interface Science* **134-135** 167–174
- [50] Verma A and Stellacci F 2010 *Small* **6** 12–21
- [51] Conner SD and Schmid SL 2003 *Nature* **422** 37–44
- [52] Wieffer M, Maritzen T and Haucke V 2009 *Cell* **137** 382.e1–382.e3
- [53] Ma YJ and Gu HC 2007 *J Mater Sci Mater Med* **18** 2145–2149
- [54] Zhu J, Liao L, Zhu L, Zhang P, Guo K, Kong J, Ji C and Liu B 2013 *Talanta* **107** 408–415
- [55] Luther EM, Petters C, Bulcke F, Kaltz A, Thiel K, Bickmeyer U and Dringen R 2013 *Acta Biomater* **9** 8454–8465
- [56] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T 2001 *Nature* **411** 494–498
- [57] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC 1998 *Nature* **391** 806–811
- [58] van Landeghem FK, Maier-Hauff K, Jordan A, Hoffmann KT, Gneveckow U, Scholz R, Thiesen B, Brück W and Deimling von A 2008 *Biomaterials*
- [59] Ivanov AI 2008 *Methods Mol. Biol.* **440** 15–33
- [60] Stern ST, Adiseshaiah PP and Crist RM 2012 *Particle and Fibre Toxicology* [Internet] **9** 1–1 Available from: <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/9/1/20>
- [61] Stern ST and Johnson DN 2008 *Autophagy* **4** 1097–1100
- [62] Bumb A, Regino CAS, Perkins MR, Bernardo M, Ogawa M, Fugger L, Choyke PL, Dobson PJ and Brechbiel MW 2010 *Nanotechnology* **21** 175704
- [63] Bumb A, Sarkar SK, Wu XS, Brechbiel MW and Neuman KC 2011 *BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS* **2** 2761–2769
- [64] Glebov OO, Bright NA and Nichols BJ 2005 *Nat Cell Biol* **8** 46–54
- [65] Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC and Gazeau F 2003 *Biomaterials* **24** 1001–1011
- [66] Zhu X-M et al. 2012 *IJN* **7** 953–964

- [67] Schweiger C, Hartmann R, Zhang F, Parak WJ, Kissel TH and Rivera Gil P 2012 *J Nanobiotechnology* **10** 28
- [68] Chu Z, Huang Y, Tao Q and Li Q 2011 *Nanoscale* **3** 3291–3299
- [69] Arbab AS, Wilson LB, Ashari P, Jordan EK, Lewis BK and Frank JA 2005 *NMR Biomed* **18** 383–389
- [70] Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB and Mcneil SE 2008 *Mol. Pharmaceutics*
- [71] Meng H et al. 2011 *ACS Nano* **5** 4434–4447
- [72] Mailänder V and Landfester K 2009 *Biomacromolecules*
- [73] Yu J, Zhao H, Ye L, Yang H, Ku S, Yang N and Xiao N 2009 *Journal of Materials Chemistry* **19** 1265–1270
- [74] Villanueva A, Cañete M, Roca AG, Calero M, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ, del Puerto Morales M and Miranda R 2009 *Nanotechnology* **20** 115103
- [75] Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli MP, Åberg C, Dawson KA and Salvati A 2012 *ACS Nano* **6** 5845–5857
- [76] Drescher D, Orts-Gil G, Laube G, Natte K, Veh RW, Österle W and Kneipp J 2011 *Anal Bioanal Chem* **400** 1367–1373
- [77] Cedervall T, Lynch I, Foy M, Berggard T, Donnelly SC, Cagney G, Linse S and Dawson KA 2007 *Angew. Chem. Int. Ed.* **46** 5754–5756
- [78] Hirsch V, Kinnear C, Moniatte M, Rothen-Rutishauser B, Clift MJD and Fink A 2013 *Nanoscale* **5** 3723–3732
- [79] Jedlovsky-Hajdú A, Bombelli FB, Monopoli MP, Tombácz E and Dawson KA 2012 *Langmuir* **28** 14983–14991
- [80] Milani S, Bombelli FB, Pitek AS, Dawson KA and Rädler J 2012 *ACS Nano* **6** 2532–2541
- [81] Zhang J, Dewilde AH, Chinn P, Foreman A, Barry S, Kanne D and Braunhut SJ 2011 *Int J Hyperthermia* **27** 682–697
- [82] Allard-Vannier E, Cohen-Jonathan S, Gautier J, Hervé-Aubert K, Munnier E, Soucé M, Legras P, Passirani C and Chourpa I 2012 *Eur J Pharm Biopharm* **81** 498–505
- [83] Canton I and Battaglia G 2012 *Chem. Soc. Rev.* **41** 2718
- [84] Saha K, Kim ST, Yan B, Miranda OR, Alfonso FS, Shlosman D and Rotello VM 2013 *Small* **9** 300–305
- [85] Rima W et al. 2013 *Biomaterials* **34** 181–195
- [86] Cho EC, Xie J, Wurm PA and Xia Y 2009 *Nano Letters* **9** 1080–1084
- [87] Jordan A, Wust P, Scholz R, Tesche B, Föhling H, Mitrovics T, Vogl T, Cervós-Navarro J and Felix R 1996 *Int J Hyperthermia* **12** 705–722

- [88] Apopa PL et al. 2009 *Part Fibre Toxicol* **6** 1
- [89] Herd HL, Malugin A and Ghandehari H 2011 *Journal of Controlled Release* 1–8
- [90] Hanini, Schmitt, Kacem, Chau, Ammar and Gavard J 2011 *IJN* 787
- [91] Johannsen M et al. 2007 *Eur. Urol.* **52** 1653–1661
- [92] Thiesen B and Jordan A 2008 *Int J Hyperthermia* **24** 467–474
- [93] Mok H and Zhang M 2013 *Expert Opin. Drug Deliv.* **10** 73–87
- [94] Fan C, Gao W, Chen Z, Fan H, Li M, Deng F and Chen Z 2010 *International Journal of Pharmaceutics* 1–12
- [95] Gneveckow U et al. 2004 *Med Phys* **31** 1444–1451
- [96] Johannsen M et al. 2005 *Int J Hyperthermia* **21** 637–647
- [97] Ciofani G, Riggio C, Raffa V, Menciassi A and Cuschieri A 2009 *Medical Hypotheses* **73** 80–82
- [98] Basel M et al. 2012 *IJN* 297
- [99] Kasper J, Hermanns MI, Bantz C, Koshkina O, Lang T, Maskos M, Pohl C, Unger RE and Kirkpatrick CJ 2013 *Arch. Toxicol.* **87** 1053–1065
- [100] Rothen-Rutishauser B et al. 2013 *Nanomedicine*
- [101] Sokolova V, Kozlova D, Knuschke T, Buer J, Westendorf AM and Eppler M 2013 *Acta Biomater* **9** 7527–7535
- [102] Hinshaw JE 2000 *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16** 483–519
- [103] Cheng Z-J, Singh RD, Holicky EL, Wheatley CL, Marks DL and Pagano RE 2010 *J. Biol. Chem.* **285** 15119–15125
- [104] Lundmark R, Doherty GJ, Howes MT, Cortese K, Vallis Y, Parton RG and McMahon HT 2008 *Curr. Biol.* **18** 1802–1808
- [105] Monick MM, Powers LS, Walters K, Lovan N, Zhang M, Gerke A, Hansdottir S and Hunninghake GW 2010 *The Journal of Immunology* **185** 5425–5435
- [106] DE DUVE C 1963 *Sci. Am.* **208** 64–72
- [107] Klionsky DJ 2007 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** 931–937
- [108] Ravikumar B et al. 2010 *Physiological Reviews* **90** 1383–1435
- [109] Seleverstov O et al. 2006 *Nano Letters* **6** 2826–2832
- [110] Li H, Li Y, Jiao J and Hu H-M 2011 *Nature Nanotechnology* **6** 645–650