

Entwicklung und Validierung eines miniaturisierten *in vitro* Systems zur Erfassung nanopartikulärer und viraler Effekte auf zellulärer Ebene

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Yvonne Kohl

Saarbrücken
August 2011

Tag des Kolloquiums:

06. Dezember 2011

Dekan:

Prof. Dr. Wilhelm F. Maier

Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter Fuhr
Jun.-Prof. Dr. Marc Schneider

Vorsitz:

Prof. Dr. Volkhard Helms

Akademischer Mitarbeiter:

Dr. Jessica Hoppstädter

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen August 2007 und August 2011 am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) in den Abteilungen Biohybride Systeme sowie Zellbiologie & Angewandte Virologie.

Meinen Eltern

Discovery consists of looking at the same thing as everyone else and thinking something different.
(Albert von Szent-Györgyi, 1893-1986)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	IV
Summary	V
1 Einleitung	1
1.1 REACH-Verordnung	1
1.2 Nanomaterialien	2
1.3 Vorkommen und Anwendungen von Nanomaterialien	3
1.4 Nanotoxikologie	5
1.5 Standardisierte Techniken zur Nanotoxizitätsuntersuchung	11
1.6 Viren	14
1.7 Entzündungsreaktionen	17
1.8 Grün fluoreszierendes Protein GFP	19
1.9 Stammzellen	21
1.10 Standardisierte Techniken zur Untersuchung einzelner Zellen	23
2 Problemstellung	26
3 Zielsetzung	28
4 Material und Methoden	30
4.1 Material	30
4.2 Methoden	37
4.2.1 Herstellung des Mikrokapillärenchips	37
4.2.2 Zellbiologische Methoden	43
4.2.3 Partikelcharakterisierung	48
4.2.4 Zytotoxikologische Methoden	50
4.2.5 Virologische Methoden	58
4.2.6 Langzeitmikroskopie	58
4.2.7 Multiphotonenbasierte Rasterlasermikroskopie	59
4.2.8 Rasterelektronenmikroskopie	60
4.2.9 Transmissionselektronenmikroskopie	62
4.2.10 Oil Red O-Färbung	63
4.2.11 Statistische Auswertung	63
4.2.12 Softwareunterstützte Auswertung	63
4.2.13 Bildbearbeitung	64

5	Ergebnisse	65
5.1	Entwicklung eines miniaturisierten <i>in vitro</i> Systems	65
5.1.1	Entwicklung eines miniaturisierten Zellkulturgefäßes	65
5.1.2	Biokompatibilität des miniaturisierten Zellkulturgefäßes	68
5.1.3	Optische Eigenschaften der Mikrokapazität	73
5.1.4	Einfluss der Miniaturisierung auf das Zellverhalten	76
5.2	Physikochemische und zytotoxikologische Partikelcharakterisierung	77
5.2.1	Physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel	77
5.2.2	Zytotoxikologische Charakterisierung der Nanopartikel	80
5.2.3	Einfluss der Nanopartikel auf die adipogene Differenzierung	88
5.2.4	Zelluläre Internalisierung der Nanopartikel	95
5.3	Validierung des miniaturisierten <i>in vitro</i> Systems	102
5.3.1	Validierung des pIL8-GFP A549-basierten <i>in vitro</i> Systems	102
5.3.2	Evaluierung des stammzellbasierten <i>in vitro</i> Systems	115
5.3.3	Korrelation von Zellreaktionen und Nanopartikellokalisierung	117
6	Diskussion	120
6.1	Entwicklung eines miniaturisierten <i>in vitro</i> Systems	121
6.2	Physikochemische und zytotoxikologische Partikelcharakterisierung	126
6.3	Validierung des miniaturisierten <i>in vitro</i> Systems	135
7	Ausblick	141
8	Literatur	143
9	Anhang	159

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2-D	Zweidimensional
3-D	Dreidimensional
A549	Zellen des humanen Lungenkarzinoms
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
Ag	Silber
ANT	Adenine nucleotide translocator
ASTM	American Society for Testing and Materials
α-TIF	Alpha-trans-inducing factor
Au	Gold
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSI	British Standards Institution
Ca	Calcium
CdTe/CdSe	Cadmiumtellurid/Cadmiumselenid
C/EBP	Cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine-enhancer-binding proteins
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CPD	Critical point drying
CPE	Cytopathic effect
CuO	Kupferoxid
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DD	Death domain
DLS	Dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EC ₅₀	Half maximal effective concentration
ECHA	European Chemicals Agency
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPA	Environmental Protection Agency
EU	Europäische Union
FADD	Fas-associated death domain
FDA	Food and Drug Administration
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fe ₂ O ₃	Eisenoxid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G418	Geneticin
GATA	An die DNA-Sequenz GATA (Guanin-Adenin-Thymidin-Adenin) bindender Transkriptionsfaktor
GC	Gold colloid
GFP	Green fluorescent protein
GLUT	Glukosetransporter
Gly	Glyzin
HIV	Human immunodeficiency virus
hMSC	Human mesenchymal stem cell
HSPG	Heparansulfat-Proteoglycan
HSV	Herpes-simplex-Virus
HTS	High throughput screening
HVEP	Herpes virus entry protein
IBMX	Isobutyl-1-methylxanthin

ISO	International Organization for Standardization
I κ B	I-kappa B Kinase
IL	Interleukin
KOH	Kaliumhydroxid
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnetic activated cell sorting
MC	Magnetite colloid
MCC	Micro cavity chip
MDH	Mitochondriale Dehydrogenase
MEMS	Microelectromechanical system
MKC	Mikrokavitätenchip
MOI	Multiplicity of infection
MP-LSM	Multiphoton-based Laser Scanning Microscopy
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCNT	Multiwalled carbon nanotubes
MWNT	Multiwalled nanotubes
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADIS	Nanodispensing System
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NIST	National Institute of Standards and Technology
NNI	National Nanotechnology Initiative
NP	Nanopartikel
NSTC	National Science and Technology Council
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PBS	Phosphate buffered saline
PC-12	Zellen des Nebennierenphäochromozytoms der Ratte
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Populationsverdopplung
PDI	Polydispersitätsindex
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE-CVD	Plasma enhanced chemical vapour deposition
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
pIL8-GFP A549	pIL8-GFP-transfizierte Zellen des humanen Lungenkarzinoms
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIE	Reactive ion etching
RIP	Receptor interacting protein
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SC	Silver colloidal
SD	Standard deviation
Ser	Serin
Si	Silizium
Si ₂ O	Siliziumoxid
Si _x N _y	Siliziumnitrid
SOI	Silicon on insulator
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
STRS	Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System
SWNT	Singlewalled nanotubes

TACE	TNF-alpha converting enzyme
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	TNFR-associated death domain
TRAF	TNFR-associated factor
TRAILR	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor
Tyr	Tyrosin
U	Unit
V	Vervielfachung
Vero	Nierenzellen des Chlorocebus
VO	Verordnung
v/v	Volume/Volume
WHO	World Health Organisation
wnt	Wingless-type mouse mammary tumour virus integration site family
WST	Watersoluble tetrazolium salt
w/v	Weight/Volume
YFP	Yellow fluorescent protein
Zn	Zink
ZnO	Zinkoxid

Zusammenfassung

Ein Schwerpunkt der EU-Chemikalienverordnung *REACH* ist die Förderung alternativer Testmethoden zur Risikobewertung chemischer Stoffe. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung und Validierung eines miniaturisierten *in vitro* Systems zur Untersuchung nanopartikulärer und viraler Effekte auf zellulärer Ebene als neue Screeningmethode zur Bewertung des toxischen Potenzials nanoskaliger Materialien. Dazu wurde ein Arraysystem mit miniaturisierten Zellkulturgefäßen entwickelt, in denen eine kleine, aber statistisch signifikante Zellzahl kultiviert und zelluläre Reaktionen erfolgreich *in vitro* charakterisiert werden konnten.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Miniaturisierung nicht negativ auf das Zellverhalten auswirkt. Somit wurde das neue *in vitro* System erfolgreich als System zur nanotoxikologischen nichtinvasiven Echtzeitanalyse individueller adhärenter Zellen einer definierten Population evaluiert. Nachdem die Sensitivität des entwickelten mikrokavitätenchip (MKC)-basierten *in vitro* Systems gegenüber den bisher angewendeten Methoden bewiesen werden konnte, wurde zur weiteren Systemevaluierung der Effekt der Miniaturisierung auf summarische Prozesse wie die Stammzelldifferenzierung untersucht.

Die Anwendung des MKC-basierten Systems zur Untersuchung nanopartikulärer und viraler Effekte auf die Differenzierung und die Inflammation individueller Zellen konnte erfolgreich gezeigt werden. Das neue System eignet sich daher zur Risikobewertung im Rahmen von *REACH*.

Summary

One main focus of the European Regulation of chemical substances *REACH* is the support of alternative test methods for the risk assessment of chemical substances. Hence, the goal of this dissertation was the establishment and evaluation of a miniaturized *in vitro* system for investigating nanoparticulate and viral effects on the cellular level as new screening method for assessing the toxic potential of nanoscaled materials. Therefore, an array system with miniaturized cell culture chambers has been established, in which a small but statistically significant cell number could be cultured and cellular reactions could be successfully characterized *in vitro*.

No negative effect of miniaturization on the cell behavior could be indicated. Therefore the new *in vitro* system was successfully evaluated as system for noninvasive nanotoxicological real time analysis of individual adherent cells in a defined population.

After verifying the sensitivity of the established micro cavity chip (MCC)-based system compared to previously applied methods the effect of miniaturization on summary processes like the stem cell differentiation had been investigated for further validation of the system. The application of the MCC-based system for investigating nanoparticulate and viral effects on the differentiation and the inflammation of individual cells could be shown successfully. Thus the new system is suitable for risk assessment in the framework of *REACH*.

1 Einleitung

Im Zusammenhang mit der Chemikalienverordnung *REACH* (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) besteht der Bedarf nach neuen *in vitro* Methoden zur Analyse des toxischen Potenzials chemischer Stoffe und neu synthetisierter Materialien wie Nanopartikel.

Standardisierte toxikologische *in vitro* Verfahren basieren meist auf der Analyse von Zellpopulationen, bestehend aus mehreren tausend Zellen. Diese Verfahren liefern nur einen Durchschnittswert der individuellen Zellreaktionen und können zu Fehlinterpretationen führen, da sie individuelle Variationen der einzelnen Zellreaktionen verdecken. Die markante Individualität der Zellen *in vitro* geht unter Anwendung derartiger Toxizitätstests verloren. Daher besteht die Nachfrage nach neuen *in vitro* Systemen zur sensitiven nichtinvasiven Langzeitcharakterisierung individueller Reaktionen auf zellulärer Ebene. Die in Anwendung befindlichen molekularbiologischen oder proteinchemischen Technologien zur Charakterisierung von Einzelzellen stellen invasive und zeitintensive Methoden dar, die einzelne Zellen außerhalb des Zellverbands analysieren. Zur nichtinvasiven Detektion individueller Zellreaktionen innerhalb einer Zellkultur werden optische Detektionsmethoden wie die Mikroskopie genutzt. Diese weist jedoch unter Verwendung von Standardzellkulturgefäßen viele Nachteile auf: Neben Randeffekten, Eigenfluoreszenz des Materials und einem großen Arbeitsabstand, erfordert das Dokumentieren aller Zellen auf der gesamten Zellkulturfläche einen hohen Zeitaufwand.

Mit diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung und Validierung eines miniaturisierten *in vitro* Systems zur Zellkultivierung und Charakterisierung spezifischer zellulärer Reaktionen *in vitro*, um diese Nachteile zu korrigieren und als Testsystem im Rahmen von *REACH* anzuwenden.

1.1 REACH-Verordnung

REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) steht für eine Verordnung des europäischen Parlaments zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe ¹. Durch die im Juni 2007 in Kraft getretene Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 soll schrittweise das Chemikalienrecht in allen EU-Mitgliedsstaaten vereinheitlicht werden ¹. Ein Hauptziel der *REACH*-Verordnung ist der Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt vor möglichen Risiken beim Umgang mit Chemikalien.

Hintergrund der *REACH*-Verordnung ist die Herstellung und Vermarktung einer Vielzahl neuer Materialien mit unzureichender Information bezüglich ihrer Risiken. Es besteht ein großer Bedarf diese Informationslücke zu schließen, um zu gewährleisten, dass die von

den Chemikalien oder chemischen Produkten ausgehende Gefährdung vor der Markteinführung geklärt und zum Schutz des Menschen ausführlich gekennzeichnet ist. Deshalb verpflichtet *REACH* den Hersteller oder Importeur zur Ermittlung der gefährlichen Eigenschaften wie z. B. Toxizität, Kanzerogenität, Mutagenität, Teratogenität von chemischen Stoffen. Zur Risikobewertung von Chemikalien im Rahmen von *REACH* werden nach *OECD*-Richtlinien international festgelegte Testmethoden (*OECD guidelines for the testing of chemicals*) angewendet ².

Künftig müssen alle chemischen Stoffe, abhängig von der jährlich in der EU hergestellten oder in die EU importierte Menge (> 1 Tonne Jahresproduktion) evaluiert und bei der Europäischen Chemikalienagentur (*ECHA*) registriert werden. Nach Berechnung der EU-Kommission sind etwa 30 000 Substanzen betroffen, über deren Auswirkungen auf die Gesundheit unzureichende Informationen vorliegen. Bis 2018 müssen alle diese Stoffe registriert und deren Risikopotenzial detailliert analysiert und bewertet werden. Während der Umsetzung der *REACH*-Verordnung kommt es zwangsläufig zu einem deutlichen Anstieg an Tierversuchen. Um die Anzahl der *in vivo* Versuche zu minimieren zielt *REACH* auch auf die Förderung alternativer Testmethoden auf Zellbasis zur Beurteilung der Risiken.

Die *REACH*-Verordnung trifft nicht nur alle Chemikalien zu, sondern auch auf alle chemischen Erzeugnisse und neu synthetisierten Materialien. Im Jahr 2008 ist eine Zusatzvereinbarung in Kraft getreten die vorschreibt, dass Nanomaterialien unter die Bestimmungen von *REACH* fallen ³. Derzeit mangelt es an geeigneten technologisch herstellbaren Systemen und *in vitro* Methoden zur Erfassung des Risikopotenzials von Nanomaterialien.

1.2 Nanomaterialien

Der Begriff Nanomaterial umfasst ultrafeine Teilchen im Größenbereich zwischen 1 und 100 nm ⁴. Als nanoskalig werden Strukturen bezeichnet, die aus mehreren Atomen bestehen und in wenigstens einer Dimension (Höhe, Breite oder Länge) kleiner 100 nm messen (*ISO/TS 27687, 2008*) ⁴. Diese Definition ist allerdings umstritten, da Partikel bis zu einer Größe von einigen 100 nm nanospezifische Eigenschaften aufweisen können. In Tabelle 1-1 sind die zurzeit weltweit verwendeten Definitionen des Begriffs Nanoobjekt aufgezeigt. Die *Internationale Organisation für Normierung (ISO)* und die *ASTM International* (ursprünglich *American Society for Testing and Materials*) haben sich bislang auf keine einheitliche Definition von Nanomaterialien verständigen können. Allerdings erarbeiten sie derzeit Grundlagen für eine vereinheitlichte Nomenklatur und Normierung von nanoskaligen Objekten. In der Regulierung der Europäischen Kommis-

sion fallen Nanomaterialien unter die Bestimmungen von *REACH* (EU-Chemikalienverordnung EG 1907/2006) ¹. Wird ein chemischer Stoff neu als Nanoform eingeführt, ist gemäß *REACH* eine Aktualisierung des Registrierungsdossiers notwendig, worin auch Risikomanagementmaßnahmen gefordert sind ³.

Tabelle 1-1 Geltende Definitionen des Begriffs Nanoobjekt.

ISO: International Organization for Standardization; NSTC: National Science and Technology Council; NNI: U.S. National Nanotechnology Initiative; BSI: British Standards Institution; FDA: Food and Drug Administration; REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals.

Institution	Nanoskalige Dimensionen	Größe [nm]	Eigenschaften
ISO	≥ 1	1-100	
NSTC	≥ 1	<100	Beeinflusstes Verhalten und Materialeigenschaften
NNI	≥ 1	<100	Beeinflusstes Verhalten und Materialeigenschaften
BSI		<200	
FDA		<1000	Einzigartige Eigenschaften
REACH	≥ 1	<100	Aus funktionellen Einzelteilen zusammengesetzt

Strukturen, die in allen drei Raumrichtungen nanoskalig auftreten, definiert man als Nanopartikel ^{4, 5}. In dieser Größenordnung führt der atomare Aufbau im Vergleich zu Partikeln desselben Stoffes im Mikro- oder Makroformat zu neuartigen Eigenschaften, die Nanopartikel somit interessant für die Entwicklung neuer Produkte machen ⁶⁻⁸.

Die neuen physikalischen und chemischen Eigenschaften nanoskaliger Materialien resultieren aus der vergrößerten relativen Oberfläche der Partikel und der darin begründeten Dominanz von quantenmechanischen Effekten ^{9, 10}. Das im Vergleich zu Makropartikeln gleicher chemischer Zusammensetzung große Verhältnis von Oberflächenatomen zu Volumenatomen führt zu einer erhöhten Reaktivität der Nanopartikel. Man spricht in diesem Zusammenhang von größeninduzierter Funktionalität. Neben der erhöhten elektrischen, magnetischen sowie optischen und chemischen Funktionalität nanoskaliger Materialien verstärkt sich auch die biologische Aktivität der Nanomaterialien ¹¹⁻¹³.

Neben den funktionellen Vorteilen der Nanomaterialien birgt die starke biologische Aktivität der Nanopartikel eine höhere Gefahr der Toxizität im Vergleich zu größeren Partikeln der gleichen Stoffzusammensetzung ¹⁴⁻²⁵.

1.3 Vorkommen und Anwendungen von Nanomaterialien

Im Allgemeinen kann man zwischen drei Typen nanoskaliger Partikel unterscheiden: (i) Natürlich vorkommende Partikel, (ii) anthropogene, z. B. bei Verbrennungsprozessen

entstehende ²⁶ und (iii) industriell synthetisierte Partikel ²⁷. In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf synthetischen metallischen Nanomaterialien.

Neben Anwendungsgebieten der Nanotechnologie in den Branchen Elektronik, Maschinenbau, Informationstechnik sowie der Automobilbranche kommen Nanomaterialien in vielen Gegenständen des täglichen Bedarfs zum Einsatz ^{7, 28-32}. Derzeit sind über 800 nanopartikelbasierte Verbraucherprodukte auf dem internationalen Markt verfügbar ^{28, 29}. Wie viele Nanoprodukte bereits auf dem deutschen Markt erhältlich sind, lässt sich aufgrund fehlender Kennzeichnungs- und Registrierungspflichten nicht genau ermitteln. Es existieren keine Statistiken, die die aktuelle Lage widerspiegeln. Allerdings schreiben Ergänzungen der Novel-Food-VO sowie der Kosmetik-VO eine Kennzeichnungspflicht aller Nanomaterialien ab 2013 vor ^{5, 33}.

Den Herstellerangaben zufolge ist Nanosilber derzeit in 260 Konsumprodukten enthalten (Abbildung 1-1) ²⁸. Nanopartikuläres Silber findet sich sowohl in Textilien, Kosmetika und Körperpflegeprodukten, als auch zur antimikrobiellen Beschichtung von Lebensmittelbehältern und Küchengeräten sowie in Farben und Waschmitteln ²⁹.

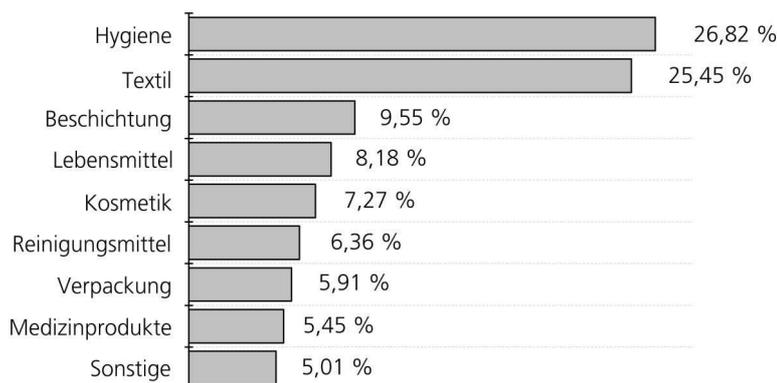


Abbildung 1-1 Prozentualer Anteil der Anwendungsgebiete in denen Silber-Nanopartikel eingesetzt werden ²⁸.

Aufgrund der bakteriziden Wirkung werden seit einigen Jahren Nanosilberbeschichtungen auf medizinischen Materialien wie Kathetern, Nahtmaterialien, orthopädischen Implantaten und Herzklappen erfolgreich verwendet ^{6, 34-37}. Nanosilber ist neben nanopartikulärem Titanoxid derzeit das am häufigsten eingesetzte Nanomaterial.

Nanotechnologische Anwendungen gewinnen heute neben dem Lebensmittel- und Textilsektor vor allem in den Bereichen Medizin, Pharmazie und Kosmetik zunehmend an Bedeutung ³⁸⁻⁴⁰. Große medizinische Relevanz kommt der Nanotechnologie bei

Systemen für den gezielten Wirkstofftransport und der gezielten Wirkstofffreisetzung - sogenannten Drug Delivery Systemen – zu ⁴¹. Der Fokus der Forschung liegt hierbei beispielsweise auf der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ⁴² zur Bekämpfung bestimmter Krankheiten wie Alzheimer ⁴³⁻⁴⁵, Hirntumoren ⁴⁶ oder degenerativen Nervenerkrankungen ^{47, 48}.

Paramagnetische Nanopartikel sind bereits zur Tumorthherapie mittels Hyperthermie zugelassen ⁴⁹⁻⁵¹. In der klinischen Diagnostik werden magnetische nanopartikuläre Kontrastmittel wie Eisenoxid-Nanopartikel zur molekularen Bildgebung genutzt ^{52, 53}. Biodegradierbare Polymerpartikel werden ebenfalls erfolgreich als Kontrastmittel eingesetzt ⁵². Weiterhin sind polymerbasierte Nanomaterialien als Implantatmaterial FDA-zugelassen und ermöglichen somit neuartige Ansätze in der medizinischen Therapie und der regenerativen Medizin.

In der Diagnostik dient der Einsatz von Nanomaterialien zur Optimierung von *in vitro* Schnelltests. Fluoreszente Markierungen zellulärer Komponenten, durch Konjugation von Nanopartikeln an biologische Moleküle, ermöglichen die Verfolgung biokinetischer und metabolischer Prozesse *in vivo* und *in vitro* ⁵⁴⁻⁵⁹.

Sowohl bei der Herstellung und dem Gebrauch, als auch bei der Entsorgung können synthetische Nanopartikel in die Umwelt gelangen ⁶⁰. Die Auswirkungen der Nanomaterialien auf Ökosysteme sind bisher bei Weitem nicht ausreichend geklärt ⁶⁰⁻⁶⁴. Es wird befürchtet, dass das erhöhte Vorkommen von hochwirksam antibakteriellen Nanomaterialien im Abwasser die Funktionsweise von nützlichen Bakterien in der biologischen Abwasseraufbereitung und in der Umwelt stört ¹⁶. *In vivo* Studien beweisen eine Anreicherung von Silber-Nanopartikeln in aquatischen Lebewesen ⁶¹⁻⁶⁴. Weiterhin wurde bereits die Entstehung silberresistenter Bakterienvarianten beobachtet ⁶⁵.

Aufgrund der steigenden Produktion nanopartikelhaltiger Konsumprodukte bedarf es der dringenden Abschätzung des Risikopotenzials für Mensch und Umwelt.

1.4 Nanotoxikologie

Ken Donaldson prägte 2004 den Begriff der Nanotoxikologie mit der Idee, dass sich Partikel mit nanoskaligem Format abweichend verhalten als identische Stoffe im Mikro- oder Makroformat ⁶⁶. Bereits durch ihre Größe und der damit verbundenen hohen katalytischen und biologischen Aktivität zeigen Nanopartikel im Zusammenhang mit biologischen Systemen neue Eigenschaften, die so bisher mit vergleichbaren Stoffen im Makroformat nicht aufgetreten sind.

Die Nanotoxikologie unterscheidet sich somit hinsichtlich Einflussfaktoren wesentlich von der bisher untersuchten „klassischen Toxikologie“. Klassische Dosis-Wirkungs-

Beziehungen wie sie bei der Risikobewertung von Chemikalien eingesetzt werden können für Nanomaterialien nicht aufgestellt werden, vielmehr müssen auch chemische und physikalische Merkmale in die Toxizitätsbetrachtung einfließen. Im Vergleich zur Toxizität von Chemikalien hängt die Toxizität von Nanomaterialien von mehreren Faktoren ab (Tabelle 1-2).

Tabelle 1-2 Einflussfaktoren der klassischen Toxikologie und der Nanotoxikologie. Modifiziert nach Zhao und Nalwa 2007 ⁶⁷.

Klassische Toxikologie	Nanotoxikologie
Masse	Masse
Konzentration	Konzentration
Chemische Zusammensetzung	Chemische Zusammensetzung
	Form
	Oberflächenfunktionalisierung
	Oberflächenladung
	Größe
	Aggregationsverhalten
	Herauslösen von Ionen
	Löslichkeit der Partikel

Neben der Partikelmorphologie, der möglichen Verunreinigungen der Nanopartikel-suspension durch Fremdatome oder der Interaktion der Partikel mit Molekülen wie z. B. Proteinen spielt eine Vielzahl weiterer Parameter bei der Beurteilung der Nanotoxizität eine wichtige Rolle.

Ergebnisse aktueller Forschungsstudien belegen eine Abhängigkeit zwischen erhöhter Toxizität und vergrößerter Oberfläche des Nanopartikels ^{13, 68}. Aus weiteren Studien wird klar, dass nicht nur die Größe, sondern auch die Oberflächenladung, die Reaktivität sowie Form, Löslichkeit und Fremdatome im Endprodukt eine wichtige Rolle bei der Beurteilung der biologischen Aktivität und Toxizität der Nanopartikel spielen ^{12, 15, 22, 24}. Weiterhin kann die Adsorption von Proteinen an die Nanopartikeloberfläche die biologische Aktivität von Nanopartikeln beeinflussen ⁶⁹.

Oben genannte Einsatzmöglichkeiten von Nanopartikeln in Lebensmitteln, Bedarfsgegenständen und Medizinprodukten verdeutlichen die steigende Exposition von Mensch und Umwelt mit synthetischen Nanomaterialien. Die menschliche Exposition mit Nanopartikeln lässt sich in zwei Hauptgruppen gliedern: Die direkte und die indirekte Exposition, wobei man zwischen berufsbedingtem, umweltbedingtem und anwendungsbedingtem Kontakt mit Nanopartikeln unterscheidet. Zu Dauer und Höhe der Exposition des Menschen gegenüber Nanomaterialien sind kaum Erkenntnisse vorhanden ⁷⁰⁻⁷². Es existieren weder für Ultrafeinstaub noch für synthetische Nanopartikel genormte Messverfahren. Somit fehlen derzeit konkrete Daten zur Beurteilung der Nanopartikelexposition.

Neben der Haut und dem Gastrointestinaltrakt stellt die Lunge den dritten und größten möglichen Eintrittspfad in den Organismus dar (Abbildung 1-2). Mit einer Depositionsrate von 70 % gilt die Lunge für die Nanopartikelaufnahme als kritischstes Organ. Eine Reihe von Studien bestätigt den Transport von ultrafeinen Nanopartikeln durch das Lungenepithel und macht deutlich, dass sowohl die Größe als auch die Oberflächenchemie der Partikel ihren Durchtritt in die Schichten der Epithel- und Endothelzellen bestimmen ⁷³.

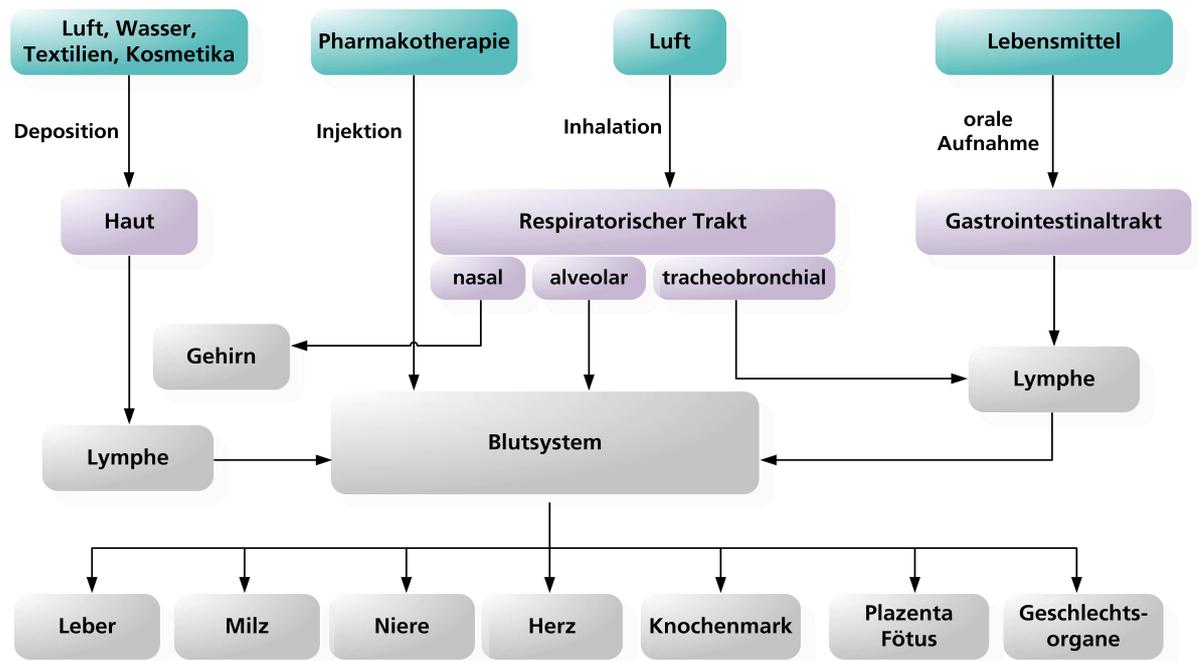


Abbildung 1-2 Expositionsweg von Nanopartikeln und deren Biokinetik im Körper.

Man unterscheidet verschiedene Expositionsmedien (grün), Eintrittspfade (violett) und Verteilungsschema (grau). Diese hängen von den individuellen Nanopartikeleigenschaften ab (modifiziert nach Oberdörster et al. 2005 ⁷⁴).

Ein weiterer Transportweg für nasal aufgenommene Nanopartikel verläuft, unter Umgehung des Blutkreislaufes, über die direkte Aufnahme in die Endigungen von Hirnnerven ^{43, 74, 75}, gefolgt von einem Transport über die Nervenbahnen bis in das zentrale Nervensystem.

Aus der Virologie ist bekannt, dass Herpes-Viren durch Sinnesnerven des Nasen-Rachenraums transportiert werden können ⁷⁵. Für einige synthetische Nanomaterialien wie z. B. Manganoxid-Partikel konnte ebenfalls ein neuronaler Transport nachgewiesen werden ⁷⁷.

Alveolen, die Epithelzellen des Respirationstraktes, stellen die Grenzfläche der Lungenoberfläche dar und gelten als Immunzellen, da ihnen eine mechanische und eine chemische Schutzfunktion zugeschrieben werden. Neben dem mukozilliären Reinigungs-

mechanismus sind Epithelzellen des Respirationstraktes in der Lage, als Reaktion auf bestimmte Stimuli, antimikrobielle Substanzen und Entzündungsmediatoren wie Chemokine oder proinflammatorische Zytokine zu sezernieren ⁷⁶.

Nanopartikel, die bis in die Alveolen gelangen, können dort lokale Effekte wie Entzündungsmechanismen auslösen ^{73, 79-82} sowie eine Schwächung der Phagozytose hervorrufen ⁷⁷.

Es ist bekannt, dass die in der Lunge abgelagerten Partikel über das Blutsystem in andere Organe des Körpers transportiert werden können ⁷⁸. Die Toxikokinetik der Nanopartikel ist bis heute jedoch nicht ausreichend untersucht. Für metallische Nanopartikel konnte eine Anreicherung in verschiedenen Organen nachgewiesen werden ⁷⁹⁻⁸¹.

Die Toxikokinetik und die Toxikodynamik hängen von der Risikokategorie des Nanomaterials ab. Im Bereich Nanotechnologie lassen sich drei Risikokategorien unterscheiden:

- (i) In eine Trägersubstanz fest eingebettete (isolierte) Nanoteilchen
- (ii) Aus einer Trägersubstanz herauslösbare und matrixungebundene (bioaktive) Nanoteilchen
- (iii) Nanoteilchen, die während der Herstellung unbeabsichtigt in die Luft gelangen.

Eine stetig steigende Zahl an Studien belegt die schädigende Wirkung von Nanopartikeln *in vitro* und *in vivo* ⁸²⁻⁹⁷.

Die genauen Aufnahmewege der jeweiligen Nanopartikel in die Zellen sind noch nicht ausführlich geklärt. Verschiedene Internalisierungsmechanismen werden diskutiert (Abbildung 1-3). Die Aufnahme durch Endozytose- oder Phagozytose-Mechanismen scheint nicht wie bei Makromolekülen den Hauptaufnahmemechanismus darzustellen, vielmehr werden Diffusionsmechanismen als mögliche Aufnahmewege in die Zelle angenommen ⁹⁸.

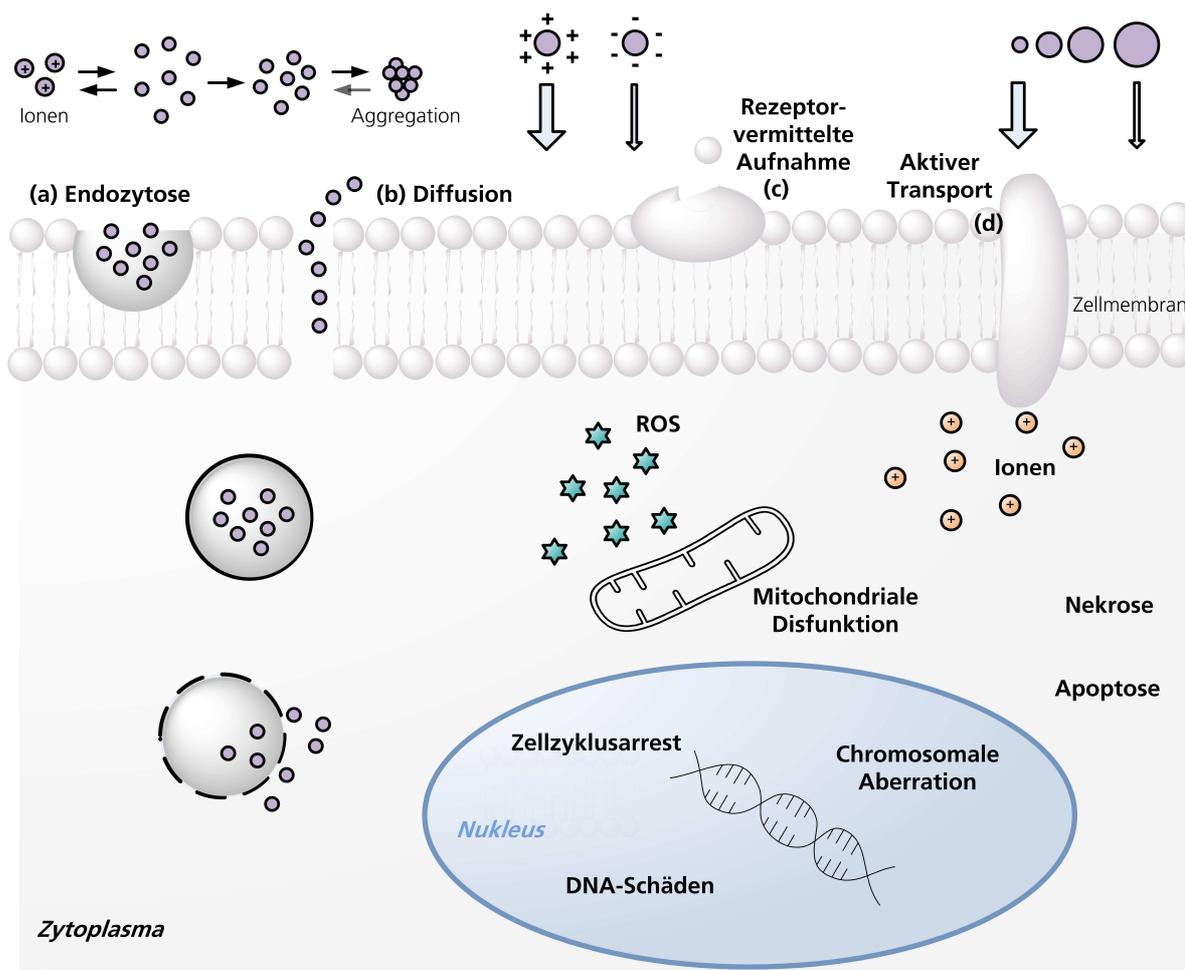


Abbildung 1-3 Unterschiedliche Internalisierungsmechanismen von Nanopartikeln.

Neben Größe und Oberflächencharakteristik bestimmt das Aggregationsverhalten der Partikel und die Partikelform deren Internalisierung in die Zelle. Bei den Internalisierungsmechanismen unterscheidet man (a) Endozytose, (b) passiven Transport (Diffusion), (c) Bindung der Nanopartikel an spezifische Rezeptoren auf der extrazellulären Zellmembranseite und (d) aktiven Transport (modifiziert nach AshaRani et al. 2009⁸⁴).

Auf zellulärer Ebene kann die Exposition von Nanopartikeln verschiedene Effekte auslösen. Neben Entzündungsmechanismen induzieren metallische Nanopartikel *in vitro* Proliferations-, Motilitäts- und Adhäsionsveränderungen aus und können zu Apoptose, Nekrose oder Autophagozytose führen^{95, 99-103}. Im Nucleus können Nanopartikel DNA-Schäden, Zellzyklusarrest oder chromosomale Aberrationen verursachen^{19, 84, 99, 104}. Die durch Nanopartikel induzierte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) kann schließlich auch systemische Effekte im Organismus auslösen^{100, 102, 104-106}. Tabelle 1-3 gibt eine Übersicht über den aktuellen Stand des toxischen Potenzials synthetischer Nanomaterialien.

Tabelle 1-3 Toxizitätsstudien synthetischer Nanopartikel.

TiO₂: Titanoxid; MWCNT: Multiwalled carbon nanotubes; SiO₂: Siliziumoxid; ZnO: Zinkoxid; Fe₂O₃/Fe₃O₄: Eisenoxid; Ag: Silber; Au: Gold; CuO: Kupferoxid; CdTe/CdSe: Cadmiumtellurid/Cadmiumselenid.

Nanomaterial	Toxischer Effekt	Literatur
TiO ₂	Apoptose, DNA-Schäden	19, 107
MWCNT	Apoptose, DNA-Schäden, Oxidativer Stress	108, 109
SiO ₂	Apoptose, Inflammation	110
ZnO	Änderung der Genexpression, Oxidativer Stress	88, 111
Fe ₂ O ₃ /Fe ₃ O ₄	Hemmung der Osteogenese, Reduktion der Zellviabilität	112
Ag	Apoptose, Chromosomale Instabilität, DNA-Schäden, Oxidativer Stress	84, 99, 101, 104, 105, 113
Au	Abnahme der Proliferation, Autophagie, Mitochondriale Schäden, Motilitätsreduktion, Oxidativer Stress	91, 95, 100
CuO	Oxidativer Stress, Reduktion der mitochondrialen Aktivität	19, 114
Fullerene	DNA-Schäden, Oxidativer Stress	115, 116
Quantum dots (CdTe/CdSe)	Apoptose, Inflammation, Oxidativer Stress	117, 118

Besonders der Einfluss von Nanopartikeln auf die Proliferation, bzw. auf die Differenzierung von Stammzellen stellt einen wichtigen Forschungsaspekt dar. Stammzellen besitzen das Potenzial in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren und sind somit ausschlaggebend an Regenerations- und Reparaturmechanismen des Gewebes beteiligt ¹¹⁹. Ein Defekt während der Differenzierungsphase könnte eine irreguläre Differenzierung induzieren und somit zur Entstehung von Krankheiten wie Krebs führen. Bis heute ist der Effekt von Nanopartikeln auf Stammzellen und deren Differenzierung nur ansatzweise untersucht ¹²⁰⁻¹²⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurden Silber- und Gold-Nanopartikel hinsichtlich Toxizität untersucht und zur Validierung des miniaturisierten *in vitro* Systems eingesetzt.

Silber wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der US-amerikanischen Umweltschutzbehörde (EPA) als toxische Substanz und prioritären Umweltschadstoff eingestuft ¹²⁶. Für nanopartikuläres Silber liegen jedoch noch keine Einordnung und Grenzwertregelung vor. Bei Kontakt der Silber-Nanopartikel mit Feuchtigkeit, z. B. mit Wundsekreten, werden durch Oxidation mit Sauerstoff Silberionen (Ag⁺) freigesetzt. Diese wirken antimikrobiell und toxisch ^{16, 127, 128}. Am Beispiel der bioziden Wirkung von

Silber wird deutlich, dass Makro- und Nanoformen der gleichen Substanz *in vitro* sowie *in vivo* unterschiedliche Reaktionen induzieren¹²⁹.

Zahlreiche Studien belegen *in vivo* eine Biodistribution sowie eine Bioakkumulation der Silber-Nanopartikel in diversen Organen mit anschließender Induktion von Entzündungsprozessen bis hin zu genotoxischen Effekten^{61, 79, 94, 130-133}. *In vitro* Experimente beweisen zytotoxische und genotoxische Effekte von Nanosilber in immortalisierten Zelllinien und Primärzellen, beispielsweise in Hirnzellen oder murinen Stammzellen^{83, 84, 97, 101, 104, 105, 113, 120}. Auch in aquatischen Systemen können Silber-Nanopartikel akkumuliert werden¹³⁴.

Aufgrund der starken Plasmonresonanz von Gold finden Gold-Nanopartikel Anwendung im biomedizinischen Sektor zur diagnostischen Bildgebung mittels Ultraschall, Magnetresonanz oder Optoakustik¹³⁵⁻¹³⁸. In der Literatur finden sich aktuell widersprüchliche Daten zu dem zytotoxischen Potenzial von nanopartikulärem Gold^{23, 83, 91, 96, 139-141}. *In vivo* Studien beweisen zytotoxische, genotoxische und reproduktionstoxische Wirkungen von Nanogold und die Anreicherung in spezifischen Organen^{14, 87, 142-144}. Auch *in vitro* konnten nanogoldinduzierte zytotoxische und genotoxische Effekte nachgewiesen werden^{23, 91, 96, 139, 145-147}. Weiterhin belegen *in vitro* Experimente eine konzentrations- und morphologieabhängige Internalisierung der Gold-Nanopartikel in die Zelle^{96, 148, 149}. Eine Beeinflussung des Zellzyklus sowie die Reduktion der Zellmotilität sind ebenso beschrieben^{150, 151}.

Zum gegenwärtigen Stand der Forschung sind, wie für eine Vielzahl von Nanopartikeln, die biologische Aktivität und der genaue Wirkmechanismus von nanopartikulärem Gold *in vitro* und *in vivo* nicht geklärt.

1.5 Standardisierte Techniken zur Nanotoxizitätsuntersuchung

Die Beurteilung des Risikos einer potentiellen Toxizität ausgehend von Nanomaterialien kann in vier Stufen gegliedert werden:

- (i) Identifizierung des toxischen Effekts
- (ii) Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung
- (iii) Abschätzung der Exposition
- (iv) Berechnung des Risikos

Das toxische Potenzial von Nanomaterialien wird zum heutigen Zeitpunkt unter Einsatz normierter *in vitro* Verfahren identifiziert. Nanopartikel für die medizinische Anwendung werden aktuell in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 10993 (Biologische Beurteilung von Medizinprodukten) sowie die Arzneimittelverordnung durchgeführt, da keine Richtlinien zur standardisierten Prüfung von nanoskaligen Materialien existieren. Die ISO

10993 beschreibt die Testverfahren, welche bei der Zulassung eines Medizinproduktes angewandt werden müssen ¹⁵².

Da sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften je nach Größe der Nanopartikel und Stoffklasse unterscheiden, müssen alle Partikel nach ihren Eigenschaften individuell im Rahmen einer Risikoanalyse bewertet werden. Deshalb machen vergleichbare Nanotoxizitätsstudien eine genaue Standardisierung, Kategorisierung und Charakterisierung von Nanomaterialien zwingend erforderlich. Ohne diese lassen sich Ergebnisse unterschiedlicher Studien nicht miteinander vergleichen und machen sie somit für eine gezielte Risikoabschätzung nutzlos. Daher sollte jeder Toxizitätstest von einer genauen Partikelcharakterisierung begleitet werden ¹⁵³.

Eine Vielzahl von *in vitro* Toxizitätsstudien mit Nanopartikeln ist bereits publiziert. Eine Reihe der durchgeführten Experimente wurde mit unzureichend charakterisierten Nanopartikeln hinsichtlich chemischer Zusammensetzung und physikalischer Eigenschaften durchgeführt und gewährleistet somit keine Vergleichbarkeit der einzelnen Studienergebnisse. Eine ausführliche Nanopartikelcharakterisierung ist zwingend erforderlich, da Nanopartikel mit Reagenzien standardisierter Toxizitätstests oder mit den testspezifischen Zellreaktionen selbst interagieren und so zu unzuverlässigen Ergebnissen führen können (Tabelle 1-4) ¹⁵⁴.

Tabelle 1-4 Interaktion der Nanopartikel mit Reagenzien standardisierter Toxizitätstests.

Modifiziert nach Kroll et al. 2009 ¹⁵⁵. LDH: Laktatdehydrogenase; MDH: Mitochondriale Dehydrogenase.

Analyseparameter	Detektionsprinzip	Nanopartikelärer Effekt	Nanomaterial
Apoptose	Kolorimetrisch	Reduktion der Farbstoffabsorption	Kohlenstoff
Caspase-Aktivität	Fluorometrisch	Hemmung der Caspase 3	Metall
Inflammation	Kolorimetrisch	Reduktion der Zytokinabsorption	Metall
LDH	Kolorimetrisch	Hemmung der LDH-Aktivität	Metall
MDH-Aktivität	Kolorimetrisch	Reduktion der Absorption des Substrates	Kohlenstoff
Oxidativer Stress	Fluorometrisch	Fluoreszenzquenching	Kohlenstoff
Vitalität	Fluorometrisch	Reduktion der Farbstoffabsorption	Kohlenstoff

Ein standardisiertes, in der ISO Norm beschriebenes, Testverfahren zur Untersuchung der Zellviabilität stellt der MTT Assay dar ¹⁵⁶. Hierbei wird nach Applikation des Tetrazoliumsalses MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid die Absorption des metabolisierten Formazanfarbstoffs als Maß für die Zellviabilität quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Metallionen ¹⁵⁷ als auch Nanopartikel ¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ dem Tetrazoliumsals MTT interagieren und dadurch zu „falsch-positiven“ Ergebnissen führen können.

Aufgrund ihrer optischen Eigenschaften können Nanopartikel Licht absorbieren und somit das Ergebnis absorptions- oder fluoreszenzspektrometrische Messungen verän-

dern. Auch die Adsorption von Serumproteinen an die Nanopartikeloberfläche kann die Messergebnisse herkömmlicher Toxizitätstests beeinflussen ¹⁶¹⁻¹⁶³.

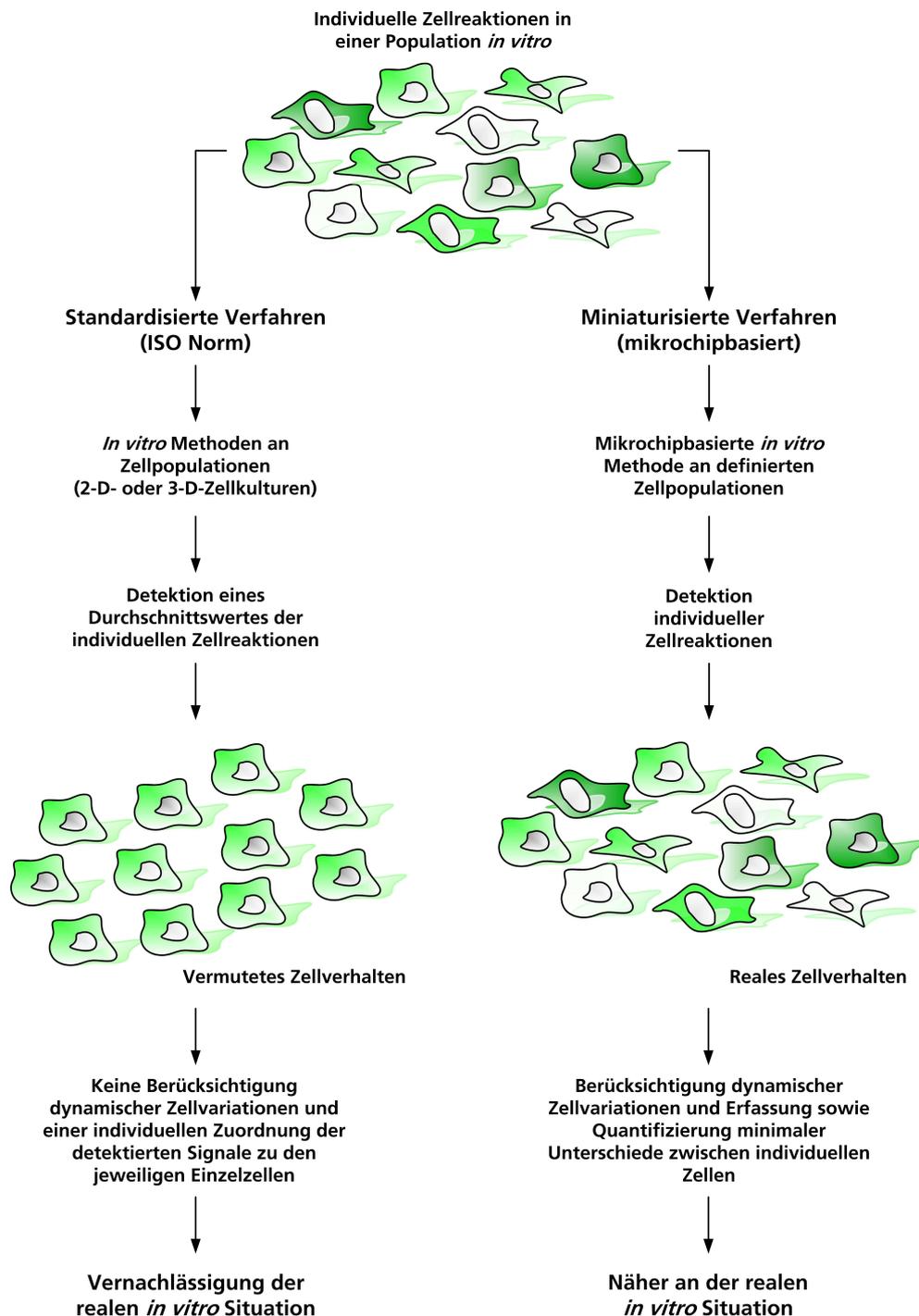


Abbildung 1-4 Vergleich der Detektionsverfahren von standardisierten (ISO Norm-basierten) und miniaturisierten (mikrochipbasierten) *in vitro* Testverfahren zur Untersuchung spezifischer Zellreaktionen.

Aus diesem Grund eignen sich konventionelle *in vitro* Toxizitätsstudien nur bedingt für die Analyse des toxischen Potenzials von Nanomaterialien. Es bedarf der Entwicklung

und Validierung neuer Methoden zur Nanotoxizitätsanalyse. Ansätze hierfür stellen miniaturisierte Verfahren wie beispielsweise mikrochipbasierte Methoden dar (Abbildung 1-4). Aktuell findet die Durchführung der Toxizitätsanalysen von Nanomaterialien in Anlehnung an die in der ISO Norm 10993 beschriebenen *in vitro* Verfahren statt. Diese basieren auf der Analyse eines Durchschnittswertes einer Zellpopulation und berücksichtigen somit keine dynamischen Zellvariationen (Abbildung 1-4). Vorteil der miniaturisierten Verfahren ist die Analyse individueller Zellreaktionen in einer 2-D-Kultur und die spezifische Zuordnung der Zellreaktionen zu den individuellen Zellen in der Population.

1.6 Viren

Als Viren bezeichnet man pathogene, zur Vermehrung befähigte Partikel in einer Größenordnung von 20 - 400 nm. Die Existenz von Viren als eigene biologische Einheit ist erst seit zirka 100 Jahren bekannt¹⁶⁴. Die Viruspartikel oder Virionen bestehen aus einer Proteinhülle (Kapsid) und dem darin eingebetteten Genom aus DNA oder RNA. Bei einigen Virustypen sind die Kapside von einer Hülle aus einer Lipiddoppelschicht umgeben. In diese sind Phospho- oder Glykoproteine eingelagert, die als so genannte Spikes bis an die Oberfläche der Kapsidhülle hervorragen. Zwischen der Hüllenmembran und dem Kapsid kann sich eine Tegumentschicht befinden, wie es bei Herpesviren der Fall ist, die weitere virale Proteinkomponenten enthält.

Viren besitzen keinen eigenen Stoffwechsel, sind somit auf die Energie und die chemischen Bausteine lebender Zellen (Wirtszellen) angewiesen und replizieren sich deshalb in der lebenden infizierten Wirtszelle. Dort entfalten die Viren ihre Genomaktivität und produzieren die Komponenten aus denen sie aufgebaut sind. Abhängig vom Virustyp kann die Infektion für die Wirtszelle unterschiedliche Folgen haben:

- (i) Sie wird zerstört und stirbt.
- (ii) Sie überlebt und ist chronisch infiziert.
- (iii) Sie überlebt und das Virusgenom bleibt im latenten Zustand erhalten.
- (iv) Sie wird immortalisiert, erhält hierdurch die Fähigkeit zur kontinuierlichen Teilung, was zur malignen Entartung führen kann.

Zytopathogene Viren induzieren charakteristische morphologische Veränderungen der infizierten Zelle, die unter dem Begriff zytopathischer Effekt (CPE) zusammengefasst werden. Der CPE dient in der Virusdiagnostik der Bestimmung von Viruskonzentrationen und zur Differenzialdiagnose bei histologischen Begutachtungen von pathologischem Material. Man unterscheidet verschiedene Arten des CPE: (i) Verlust der Adhärenz mit

anschließender Zelllyse, (ii) Bildung von Synzytien (mehrkernige Riesenzellen) beruhend auf Zellverschmelzungen ¹⁶⁵ und (iii) Bildung von Einschlusskörperchen.

Heute sind rund 1500 Viren bekannt, darunter Influenzaviren, Adenoviren, Herpesviren, humane Immundefizienzviren (HIV) und Tumoviren. Onkogene Viren wie z. B. das Papillomavirus können nach Infektion deren Wirtszelle zu krebsartigem Wachstum veranlassen ¹⁶⁶.

Herpes-simplex-Virus

Der zytopathogene Virusstamm Herpes-simplex Typ 1 (HSV1) zählt zu den am besten charakterisierten Viren und eignet sich daher als Standardsystem zur Validierung des in dieser Arbeit entwickelten miniaturisierten *in vitro* Systems.

Das Herpes-simplex-Virus (HSV) wurde erstmals von Slavin und Gavett 1946 isoliert und charakterisiert ¹⁶⁷. Es zählt zu der Familie der *Herpesviridae* und misst im Durchmesser 100 bis 200 nm. Man unterscheidet zwei Typen des HSV. Typ I umfasst den Erreger des Lippenherpes „herpes labialis“, Typ II den Erreger des Genitalherpes „herpes genitalis“. Es handelt sich um behüllte DNA-Viren. In einem ikosaedrischen Kapsid befindet sich eine lineare doppelsträngige DNA, die von einer Virushülle umgeben ist. Im Zwischenraum von Kapsid und Hülle befinden sich eine Vielzahl an Virusproteinen, die so genannten Tegumentproteine. Sie gelangen bei der Infektion mit in die Wirtszelle und sind dort für eine Vielzahl regulatorischer Funktionen während der Frühphase der Replikation verantwortlich. Ein charakteristisches Merkmal der Herpes-simplex-Viren ist ihre Fähigkeit nach Erstinfektion latent in Organismen zu verbleiben. Hierbei lagert sich das Virus in Nervenknotten des Gesichtsnervs, die so genannten Ganglien des Trigeminiernervs, ein. Dort persistieren die Viren lebenslang in einer latenten Phase. Sobald z. B. das Immunsystem des Infizierten geschwächt ist, kann es zur Amplifikation der Viren und zum erneuten Ausbruch der Erkrankung kommen.

Mechanismus der HSV1-Replikation

Je nach Virusart unterscheidet man zwischen der lysogenen und der lytischen Replikation des Virus. Während des lysogenen Weges integriert sich das Virus in das Wirtschromosom und vermehrt sich mit jeder Wirtszellteilung. Die HSV1-Vervielfachung läuft über den lytischen Weg ab. Der Eintritt des HSV1 in die Wirtszelle wird durch die Interaktion des sich außerhalb der Wirtszelle befindlichen, einzelnen Viruspartikels, des Virions, mit transmembranen Glykoproteinen der Wirtszelle initiiert. Die Bindung des Virions an die Zellmembran wird durch die Interaktion von gB und gC mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) auf der Zelloberfläche initiiert ¹⁶⁸. Parallel dazu interagieren die gD-

Proteine mit zellulären Membranproteinen, die als *herpes virus entry proteins* (HVEP) bezeichnet werden und überwiegend Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie sind.

Nach der initialen Anhaftung des Virions an die Wirtszelle beginnt der Penetrationsprozess. Dieser ist zelltypabhängig^{169, 170}. Im Fall von HSV1 spielt die Endozytose eine dominante Rolle bei der Infektion vieler Zelltypen (Abbildung 1-5a)¹⁷¹⁻¹⁷³. Die zweite Art der HSV1-Penetration ist die Fusion des Virions mit der Plasmamembran, die unabhängig von spezifischen Membranproteinen abläuft (Abbildung 1-5b). Nach rezeptorvermittelter Bindung des Virus mit der Zellmembran, verschmelzen die Virionenhülle und die Zellmembran miteinander wodurch das Nukleokapsid sowie die Tegumentproteine in das Zytoplasma gelangen (Abbildung 1-5)^{174, 175}.

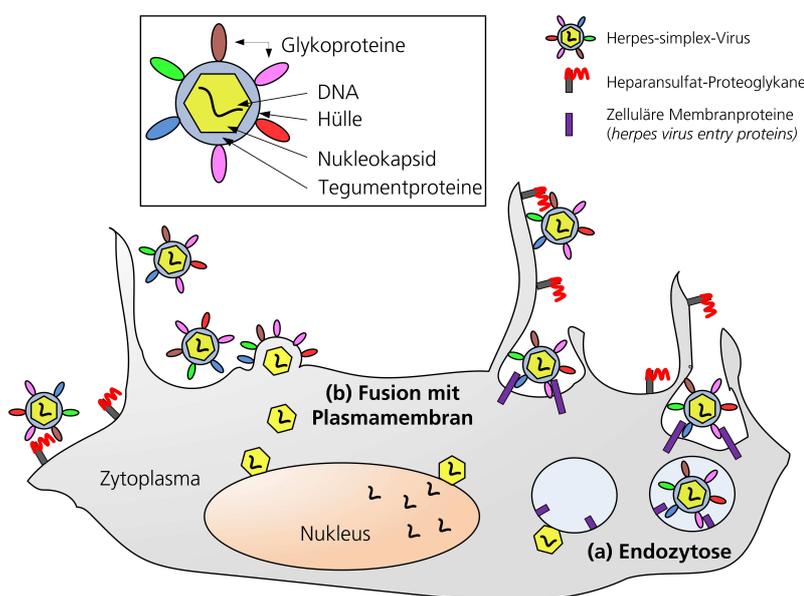


Abbildung 1-5 Mechanismus der HSV1-Infektion.

HSV-Virionen können durch (a) Endozytose oder (b) Fusion mit der Plasmamembran in die Wirtszelle aufgenommen werden. Nach Infektion der Zelle mit dem HSV1 läuft die Virusreplikation über den lytischen Weg ab.

Nach Penetration des Virus in das Zellinnere werden die viralen Kapside und die Tegumentproteine zielgerichtet zu den nuklearen Poren transportiert. Dort öffnet sich das Nukleokapsid und das unbeschichtete virale doppelsträngige DNA-Genom gelangt in den Nucleus.

Die Expression des Virusgenoms erfolgt in einem kaskadenartigen regulierten Zyklus. Zuerst werden die *immediate early*-Proteine synthetisiert. Ihre Expression wird durch das Tegumentprotein α -TIF (*alpha-trans-inducing factor*) verstärkt und führt zur Transkription. Nach der Nucleinsäuresynthese der viralen DNA und der Proteinsynthese werden die neu gebildeten infektiösen Tochterviren nach einem Reifungsprozess zur

Zelloberfläche transportiert, wo sie durch Zelllyse aus dem Zytoplasma in den Extrazellularraum freigesetzt werden.

1.7 Entzündungsreaktionen

Zur Validierung des miniaturisierten *in vitro* Systems wurde im Rahmen dieser Arbeit die Entzündungsreaktion als Parameter der Toxizität herangezogen.

Eine Entzündung bezeichnet man als charakteristische Reaktion eines biologischen Systems auf spezifische Reize. Ziel einer Entzündung ist die Beseitigung des schädigenden Reizes und die Einleitung von Reparaturvorgängen. Die Entzündung gilt damit als Ausdruck der Immunreaktion eines Organismus. Man unterscheidet zwei Arten an Entzündungsreaktionen: Neben der lokalen Entzündungsreaktion, die sich nur auf eine definierte Körperregion bezieht, beschreiben systemische Entzündungsreaktionen eine über das komplette System verteilte Entzündung.

Die Gesamtheit an Zellen und Molekülen, die für die Abwehr von Infektionen zuständig sind, werden unter dem Begriff Immunsystem zusammengefasst. Das Immunsystem kann in die angeborene, unspezifische Immunität und in die erworbene (adaptive), spezifische Immunität gegliedert werden. Treten Fremdkörper wie z. B. Nanopartikel Viren oder Bakterien in Kontakt mit einer Epithelbarriere, wird in den meisten Fällen die unspezifische Immunabwehr (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) aktiviert.

Die inflammatorische Antwort nach Inhalation von Nanopartikeln wurde eingehend untersucht¹⁷⁶⁻¹⁸¹. Dabei stellte sich heraus, dass das Immunsystem nach Inhalation von Nanopartikeln eine Entzündungsreaktion bewirkt. Zu den dabei aktivierten Abwehrreaktionen gehören unter anderem die Sekretion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen (ROS, RNS) und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise des Tumornekrosefaktors (TNF- α).

Zytokine stellen eine Gruppe aus Peptiden und Glykoproteinen dar, die bei Inflamationsprozessen und Immunabwehrreaktionen beteiligt sind. Sie ermöglichen die Regulation des Zellwachstums und beeinflussen die Kommunikation zwischen Immunzellen. Als Antwort auf mikrobielle oder andere Antigene werden Zytokine von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems produziert. Sie stimulieren verschiedene zelluläre immunologische Vorgänge und fungieren bei Entzündungsreaktionen als früher Marker für immunmodulatorische und prätoxische Effekte. Auf Grund ihres strukturellen Aufbaus unterscheidet man fünf verschiedene Gruppen der Zytokine: Interferone, Chemokine, Tumornekrosefaktoren, koloniestimulierende Faktoren und Interleukine.

Als eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine gilt Interleukin-8 (IL-8), ein nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 8 kDa¹⁸². Durch die geringe Halbwertszeit von etwa einer Stunde gilt IL-8 als früher Indikator einer systemischen Entzündung, Gewebeschädigungen und Infektionen¹⁸³. Das aus 72 Aminosäuren bestehende IL-8 wird nicht nur in immunkompetenten, sondern auch in vielen immuninkompetenten Zellen wie Fibroblasten produziert und sezerniert¹⁸⁴⁻¹⁸⁷. Dabei kann die Freisetzung des Proteins durch ein breites Spektrum an Stimuli wie z. B. Lipopolysaccharide (LPS), IL-1, TNF- α , Viren oder Nanopartikel induziert werden.

Tumornekrosefaktor

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Tumornekrosefaktor (TNF- α) als Positivkontrolle für die Inflammationsinduktion *in vitro* eingesetzt. Im Folgenden ist die zentrale Rolle von TNF- α im Zytokinnetzwerk verdeutlicht.

1975 wurde TNF- α erstmals von Lloyd J. Old entdeckt¹⁸⁸. Als multifunktionell wirkendes proinflammatorisches Zytokin fungiert TNF- α bei lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen wie beispielsweise rheumatischer Arthritis und Immunreaktionen.

Nach Stimulation durch Interferone oder Interleukine findet im endoplasmatischen Retikulum die Translation und Translokation des initialen Vorläuferproteins proTNF- α statt. Im Anschluss wird das proTNF- α mit Hilfe des Golgi Apparates an die Zellmembran transportiert und dort extrazellulär als Homo-Trimer-Komplex freigesetzt. Diese Form des TNF- α kann mit TNF-Rezeptoren der benachbarten Zellen interagieren oder sich nach Spaltung durch die Metalloprotease TACE (TNF-alpha converting enzyme) von der Zelloberfläche lösen und sich als löslicher Trimer-Ligand zu weiter entfernten Zellen bewegen. Dort interagiert TNF- α mit den Rezeptoren der TNF-Familie (TNFR1, TNFR2, TRAILR1, TRAILR2). Hierbei handelt es sich um Transmembranproteine, deren extrazellulärer Teil aus charakteristischen cysteinreichen Domänen besteht, die in ihrer Anzahl zwischen den unterschiedlichen Rezeptortypen variieren¹⁸⁹. Auf der intrazellulären Seite besitzen die TNFR eine sogenannte Todesdomäne (death domain, DD)¹⁹⁰. TNFR1 und TNFR2 unterscheiden sich in ihrer Bindungsaffinität zu TNF- α und anderen Mitgliedern der TNF-Superfamilie sowie in ihren intrazellulären Signalwegen.

Nach extrazellulärer Bindung des spezifischen Liganden wie beispielsweise TNF- α wird eine Trimerisierung des Rezeptors induziert. Hierdurch werden zwei unterschiedliche Signalwege vermittelt (Abbildung 1-6).

Bindet TNF- α an TNFR1, kann dies via FADD (Fas-associated death domain) die apoptotische Signalkaskade auslösen oder über TRAF2 (TNFR-associated factor 2) und RIP (receptor interacting protein) die Aktivierung des nuklearen Faktors NF- κ B und somit

eine antiapoptotische Wirkung hervorrufen. Nach Bindung von TRADD (TNFR-associated death domain) an TNFR1 werden TRAF2 und RIP gebunden^{191, 192}. Im Anschluss gelangt das durch Phosphorylierung des I- κ B freigesetzte NF- κ B in den Nukleus und initiiert dort die Transkription einer Vielzahl meist antiapoptotischer Gene und führt dadurch zur Zellproliferation (Abbildung 1-6).

Im Gegensatz dazu führt der FADD-vermittelte Signalweg zur Apoptose der Zelle. Hierbei handelt es sich um einen schnellen und präzise regulierten Prozess (programmierter Zelltod), der für die Entwicklung und das Aufrechterhalten multizellulärer Organismen unerlässlich ist¹⁹³. Die apoptoseinduzierenden Signalwege aktivieren eine Kaskade proteolytischer Enzyme, der Caspasen, die den Abbau der zellulären Organellen vermitteln (Abbildung 1-6). Morphologische Charakteristika der Apoptose beinhalten Zellmembran-Blebbing, Zellschrumpfungen, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung^{193, 194}.

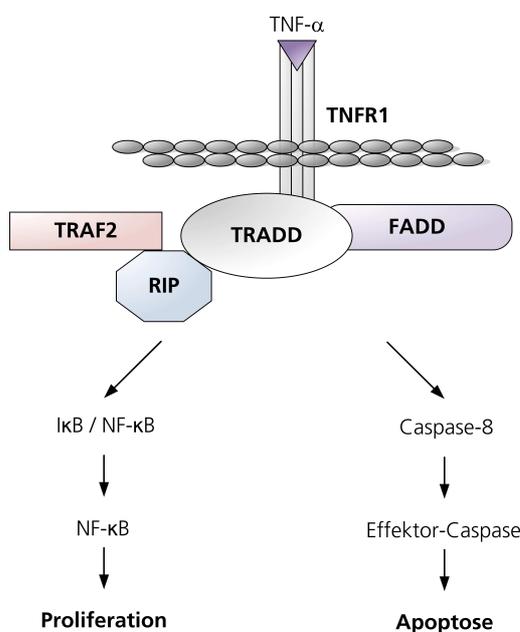


Abbildung 1-6 Verlauf der Signalkaskaden nach Aktivierung des TNF-Rezeptors Typ 1 (TNFR1).

Die von TNFR1 ausgehenden Signale können zwei Signalkaskaden auslösen. Je nach Status der Zelle kann der TNFR1-vermittelte Effekt von TNF- α durch Aktivierung der Caspase-8 über Effektor-Caspasen zur Apoptose oder durch Aktivierung von NF- κ B zur Proliferation der Zelle führen (modifiziert nach Bhattacharya et al. 2008¹⁹⁵).

1.8 Grün fluoreszierendes Protein GFP

Zur nichtinvasiven Quantifizierung einer nanopartikulären oder viralen Entzündungsreaktion wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit humane Lungenkarzinomzellen transfiziert, so dass sie eine Interleukin-8-Produktion-gekoppelte GFP-Expression aufwie-

sen. Die GFP-Intensität diene zur Bestimmung des Grades der induzierten Inflammationsreaktion.

1962 beschrieb Shimomura erstmals das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Bestandteil der Pazifikqualle *Aequorea victoria*¹⁹⁶. Diese Quallen weisen im Zytoplasma der Tentakelzellen feine Granula auf, die zwei zur Biolumineszenz befähigte Proteine enthalten, das *Aequorin* und das *green fluorescent protein GFP*.

Der Begriff Biolumineszenz bezeichnet im Gegensatz zu der Chemilumineszenz (Anregung durch chemische Reaktionen) und der Photolumineszenz (Anregung durch Absorption von Photonen) eine durch Stoffwechselprozesse bedingte Leuchterscheinung.

Im Vergleich zu vielen anderen fluoreszierenden Proteinen ist das Chromophor des 238 aminosäuregroßen Proteins GFP kein kovalent gebundener Kofaktor, sondern ein Teil des Proteins¹⁹⁷. Quelle der Fluoreszenz ist die Oxidation der Sequenz Ser⁶⁵ – Tyr⁶⁶ – Gly⁶⁷ innerhalb im Zentrum der α -Helixstruktur des GFP. Die Seitenketten dieser Aminosäuresequenz verbinden sich zu 4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidin-5-on und bedingen somit die Entstehung der Fluoreszenz (Abbildung 1-7). Während diesem aeroben Vorgang wandelt GFP die durch strahlungsfreien Energietransfer übertragene blaue Chemilumineszenz des *Aequorins* in grünes Licht um¹⁹⁷⁻²⁰¹. Das Exzitationsmaximum von GFP liegt bei 395 nm sowie bei 475 nm. Die maximale Emission grünen Lichtes erfolgt bei einer Wellenlänge von 508 nm^{200, 202}.

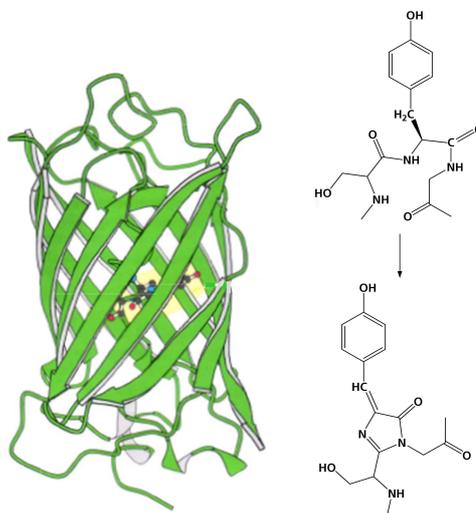


Abbildung 1-7 Chemische Umlagerung in dem grün fluoreszierenden Protein GFP.

Die Induktion der Fluoreszenz von GFP wird durch die Oxidation der Aminosäuresequenz Ser⁶⁵ – Tyr⁶⁶ – Gly⁶⁷ zu 4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidin-5-on ausgelöst (modifiziert nach Berg et al. 2003²⁰³).

Nach der Klonierung des GFP 1992 durch Prasher et al. konnten Chalfie und Inouye erstmals zeigen, dass bei Expression des GFP in eukaryontischen (*Caenorhabditis*

elegans) und prokaryontischen Zellen (*E. coli*) ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann^{197, 204, 205}. Somit sind zur posttranslationalen Faltung des Proteins und zur Bildung des Chromophors keine spezifischen Enzyme der Qualle notwendig^{199, 202, 206}. Diese Entdeckungen ebneten den Weg zur breiten Anwendung des GFP als Reporterogen in den unterschiedlichsten Wirten²⁰².

Seitdem wird GFP als Marker für Genexpression und Proteintargeting *in vivo* und *in vitro* eingesetzt²⁰⁷⁻²¹⁰. Die Möglichkeit, GFP mit anderen definierten Proteinen genspezifisch zu binden, eröffnet in der Biologie die Möglichkeit der direkten Beobachtung der räumlichen und zeitlichen Verteilung des spezifisch gekoppelten Proteins in Zellen, Geweben oder Organismen²¹¹.

In dieser Arbeit diente GFP als Marker für die nanopartikulären und viralen Entzündungsreaktionen in transfizierten humanen Lungenkarzinomzellen.

1.9 Stammzellen

Körperzellen, die Potenzial zur Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Zelltypen aufweisen, bezeichnet man als Stammzellen¹¹⁹. Je nach Art der Stammzellen besitzen sie die Fähigkeit, sich in mehr als 200 verschiedene Gewebearten entwickeln zu können.

Die zentrale Funktion der Stammzellen liegt in der Embryogenese, aber auch beim Gewebeaufbau sowie bei regenerativen Prozessen im adulten Organismus sind Stammzellen beteiligt. Während embryonale Stammzellen nur im frühen Embryostadium vorkommen, sind adulte Stammzellen auch im postnatalen Stadium im Organismus vorhanden und übernehmen dort über die gesamte Lebensdauer des Organismus die Aufgabe des regenerativen Gewebeaufbaus spezialisierter Zellen.

Man unterscheidet Stammzellen vor allem durch ihr Differenzierungspotenzial. Während unipotente Stammzellen in einen spezifischen somatischen Zelltyp differenzieren, können sich multipotente Zellen in verschiedene spezialisierte Gewebearten entwickeln. Als pluripotent werden Stammzellen bezeichnet, deren Differenzierungspotenzial sich über das Ursprungsgewebe der Stammzelle hinaus charakterisieren lässt. Eine Totipotenz beschreibt die Fähigkeit einen vielzelligen funktionalen Organismus aufzubauen.

Der Begriff mesenchymale Stammzelle (mesenchymal stem cells, MSCs) beschreibt adhärente Zellen mit der Fähigkeit zur stetigen Replikation^{212, 213}. MSCs lassen sich in mesenchymale Gewebezellen wie z. B. Adipozyten²¹⁴, Chondrozyten^{119, 215} oder Osteoblasten¹¹⁹ differenzieren.

Die ersten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) wurden 1976 von A. Friedenstein in adultem Knochenmark identifiziert²¹⁶. Bis heute wurden verschiedene im

Knochenmark residierende nichthämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Differenzierungspotenzial, beschrieben^{119, 217, 218}.

In der gängigen Praxis werden adulte Stammzellen am häufigsten aus dem Knochenmark isoliert²¹⁹. Die Isolation findet aber auch aus anderen Gewebearten wie beispielsweise Muskelgewebe, Fettgewebe, Haut sowie aus dem Blut statt²²⁰⁻²²³.

hMSCs repräsentieren eine Ressource an humanen Primärzellen, die zur Untersuchung entwicklungsbiologischer Prozesse sowie für die Entwicklung von Gewebekulturen für pharmazeutische und toxikologische *in vitro* Screeningmethoden herangezogen werden können.

Adipogene Differenzierung

Zur Untersuchung des Effektes von Nanopartikeln auf das Differenzierungsverhalten von humanen Stammzellen wurde in dieser Arbeit die adipogene Differenzierung herangezogen.

Durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren differenzieren *in vitro* proliferierende mesenchymale Stammzellen in die entsprechenden Gewebe. Dabei durchlaufen die Zellen verschiedene Entwicklungsstadien. Im Falle der adipogenen Differenzierungskaskade entwickeln sich mesenchymale Stammzellen zu Adipozyten (Abbildung 1-8).

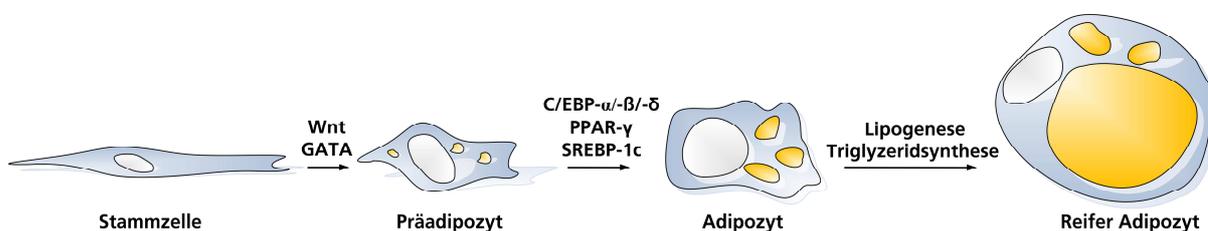


Abbildung 1-8 Regulationsmechanismus der Adipogenese von hMSCs.

Im ersten Schritt erfolgt die Determinierung der hMSCs zu Präadipozyten. Anschließend findet unter Einfluss von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen die Differenzierung der Präadipozyten zu reifen Adipozyten statt. Wnt: Signalprotein mit wichtiger Funktionen bei der Zellentwicklung; GATA: An die DNA-Sequenz Guanin-Adenin-Thymidin-Adenin bindender Transkriptionsfaktor; C/EBP- α , - β , - δ : Cytidin-Cytidin-Adenosin-Adenosin-Thymidin-Enhancer-bindendes Protein; PPAR- γ : Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ ; SREBP-1c: Sterol regulatory element-bindendes Protein (modifiziert nach Feve 2005²²⁴).

Der Prozess der Adipozytenbildung wird als Adipogenese bezeichnet. Hierbei erfolgt die Determinierung von multipotenten mesenchymalen Stammzellen über den Status des Präadipozyten zu reifen Adipozyten. Die höchst komplexe Steuerung der Adipogenese unterliegt der strengen Kontrolle von Hormonen, Zytokinen, Nährstoffen und Signalmolekülen, die die Expression und die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren regulieren²²⁴. Die Initiierung des Differenzierungsprozesses zu Adipozyten erfolgt durch

den proadipogenen Transkriptionsfaktor PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)²²⁵. Weiterhin spielen C/EBP- α und SREBP-1c für die Ausprägung des Adipozyts eine entscheidende Rolle (Abbildung 1-8)²²⁴. Die Aktivierung der Lipogenese sowie der Triglyzeridsynthese führt zur Ausbildung reifer Adipozyten. Bereits in der frühen Phase der Adipozytendifferenzierung werden Lipidvesikel, Triglyzeridkörperchen, vom endoplasmatischen Retikulum abgeschnürt. Sie dienen als Marker der adipogenen Differenzierung.

In vitro wird die adipogene Differenzierung von hMSCs mit Dexamethason, Indomethacin, Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) und Insulin induziert²²⁶. Insulin induziert den Glukosetransporter GLUT4, was in einer vermehrten Glukoseaufnahme der Zellen resultiert. Zudem werden die Verstoffwechslung von Glukose zu Acetyl-CoA sowie die Fettspeicherung stimuliert. Hingegen induziert Dexamethason die Expression des Transkriptionsfaktors PPAR- γ und bedingt somit die Adipogenese.

1.10 Standardisierte Techniken zur Untersuchung einzelner Zellen

Studien zellulärer Prozesse werden standardmäßig an Zellpopulationen durchgeführt. Die gemessenen Parameter werden als Durchschnittswert einer Population angegeben und können aufgrund der Heterogenität der untersuchten Zellpopulation missverständliche Aussagen liefern. Eine mittels konventioneller Analysemethoden detektierte Reaktion kann zum einen auf eine erhöhte Anzahl an individuellen Zellen in der Population zurückzuführen sein, die eine starke Reaktion zeigen. Ebenso kann eine schwache Reaktion aller Zellen in der Gesamtpopulation die Ursache für das als Durchschnittswert detektierte erhöhte Signal darstellen. Weiterhin beeinflussen Zellzahl und Zelldichte die Reaktion einer Population. Aufgrund der stark heterogenen Zellpopulation und der Diskussion der Veränderung einer Einzelzelle als Ursache einer Vielzahl von Krankheiten gelangte in den letzten Jahren die Einzelzellanalyse zur Detektion spezifischer zellulärer Prozesse in den Fokus der Forschung²²⁷.

Die Anfänge der Anwendung von Separationsmethoden und Charakterisierungsverfahren bestimmter Bestandteile einzelner Zellen liegt etwa 60 Jahre zurück²²⁸⁻²³⁰. Dovichi gilt als einer der Begründer der Einzelzellanalysetechniken. Folgende Technologien zur genomischen, proteomischen oder metabolischen Charakterisierung von Einzelzellen werden bereits angewendet: Kapillarelektrophorese (2-D, 3-D), Polymerase Kettenreaktion, Elastographie, Einzelzell-Gelelektrophorese oder immunzytologische Färbungen²³¹⁻²⁴³.

Die genannten Verfahren stellen nichtinvasive Methoden dar und sind sehr zeitintensiv. Ein weiterer Nachteil vieler sich in Anwendung befindlichen molekularbiologischer und

proteinbiochemischer Techniken zur Einzelzellcharakterisierung ist die Vielzahl von Zellen, die als Ausgangsmaterial benötigt werden. Zuvor genannte Techniken geben Anhaltspunkte über den zellulären Status, erfordern allerdings die Zellyse mit Hilfe von Chemikalien, Hitze oder Elektrizität^{234, 235, 244, 245}. Die vereinzelt Zellen befinden sich während der Analyse meist in Suspension und können somit metabolische Änderungen erfahren²⁴⁶⁻²⁴⁸. Invasive Techniken eignen sich somit nicht für Untersuchungen adhärenter Zellen in einem Zellverband. Weiterhin konnten *in vitro* Studien Unterschiede im Verhalten einer Zellpopulation im Vergleich zu einer Einzelzelle nachweisen²⁴⁹⁻²⁵¹.

Im Hinblick auf die Anwendung der Einzelzellanalyse als pharmazeutisches *in vitro* Screeningverfahren ist das Ziel die Entwicklung nichtinvasiver Charakterisierungstechniken zellbiologischer Prozesse individueller adhärenter Zellen in einem Zellverband. Voraussetzung hierbei ist die permanente Prozesskontrolle (z. B. Temperatur, pH-Wert) sowie identische Kulturbedingungen im Vergleich zu konventionellen Kultursystemen.

Unter Anwendung mikrofluidischer oder mikroelektromechanischer Systeme (MEMS) schlagen alternative Analysetechniken eine Brücke zwischen quantitativer und sensitiver Analyse^{218, 243, 252-260}. Wegen der Möglichkeit, geringe Mengen im Hochdurchsatzformat zu vermessen, haben biologische mikroelektromechanische Systeme (BioMEMS) Einzug in das Screening pharmazeutischer Substanzen gehalten. Der Begriff BioMEMS umfasst mikrofluidische Systeme, Drug-Delivery-Systeme, Immunosensoren, DNA-Arrays und beschreibt ein intelligentes miniaturisiertes System, das Mess- und Steuerfunktionen beinhaltet. BioMEMS kombinieren zwei oder mehrere der folgenden Eigenschaften: Elektrische, mechanische, optische, chemische, biologische, magnetische. Klassische Detektionsprinzipien wie optische Methoden, elektrochemische Detektionsverfahren oder massenspektroskopische Techniken werden in Kombination mit der Chip-technologie angewendet²⁶¹⁻²⁶³.

Im Vergleich zu konventionellen *in vitro* Methoden, beispielsweise basierend auf 96-Loch-Mikroplatten, sind die Vorteile der quantitativen Analyse mittels BioMEMS das geringe Probenvolumen, die Erfassung der kompletten Zellkulturfläche und die statistisch bedeutsamere Analyse zellulärer Variationen. Dynamische Einzelzellkulturarrays separierter isolierter Zellen lassen zwar die Detektion der Reaktion der isolierten Zellen zu, simulieren aber nicht die physiologischen Bedingungen einer Zelle in 2-D-Kultur²⁶⁴.

Seit etwa 10 Jahren existieren komplexe nichtinvasive BioMEMS wie beispielsweise ein Nanoliter-Bioreaktor für Langzeitkultivierungen von Säugerzellen sowie der Detektion, Separation, Manipulation und Charakterisierung von Zelladhäsion, Einzeltransfer, Viabilität, Morphologieänderungen und Apoptose^{256, 257, 265-268}. Zum Vergleich von Genexpressionsprofilen eukaryontischer Zellen in BioMEMS beschrieben Stangegaard et al.

ein biokompatibles Mikrozellkultursystem ²⁶⁸. Im Vergleich zu makroskaligen Kulturgefäßen bieten BioMEMS die Möglichkeit der Kultivierung, Manipulation und Observation einer kleinen Zellzahl auf einer definierten begrenzten Zellkulturfläche. Mit der Anwendung von Mikrosystemen und mikroskopischen Kontrollvorrichtungen besteht die Möglichkeit der Beobachtung individueller adhärenter Zellen in einer Kultur über einen langen Zeitraum. Bis heute existieren in der Literatur nur wenig detaillierte Biokompatibilitätsstudien zu den verwendeten BioMEMS-Materialien ²⁶⁸⁻²⁷¹. Das meist verwendete Material zur Herstellung von MEMS stellt neben Siliziumdioxid polykristallines Silizium dar ²⁷². Aufgrund seiner ausgezeichneten chemischen, elektrischen, optischen und mechanischen Eigenschaften ist Silizium in der Mikrosystemtechnik ein allgemein verwendetes Material.

Zum gegenwärtigen Stand der Forschung existiert kein BioMEMS, das eine Langzeitbeobachtung von individuellen Zellen in einem Zellverband, gefolgt von einer quantitativen nichtinvasiven Analyse intrazellulärer Prozesse, garantiert.

2 Problemstellung

Die EU-Chemikalienverordnung *REACH* (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) fordert neben dem Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt vor möglichen Risiken beim Umgang mit Chemikalien die Entwicklung alternativer Testmethoden auf Zellbasis zur Beurteilung der Risiken chemischer Stoffe. Auch Nanomaterialien fallen unter die Beurteilung von *REACH* und müssen hinsichtlich ihres toxischen Potenzials analysiert werden. Die zum gegenwärtigen Zeitpunkt angewendeten *in vitro* Methoden zur Untersuchung der toxischen Wirkung von Nanopartikeln und Viren werden meist an Zellpopulationen durchgeführt. Eine Analyse von Zellpopulationen, bestehend aus mehreren tausend Zellen liefert nur einen Durchschnittswert der individuellen Zellreaktionen. Sie verdeckt dadurch die individuelle Variation der Reaktion einzelner Zellen. Solche Analysemethoden führen oft zu Fehlinterpretationen, da sich vor allem *in vitro* Zellen markant voneinander unterscheiden. Die individuelle Zuordnung der detektierten Signale zu den jeweiligen Einzelzellen ist mit den herkömmlichen Analysemethoden ebenfalls nicht realisierbar. Aus diesem Grund reflektieren konventionelle Toxizitätsstudien meist nicht die reale *in vitro* Situation und dadurch auch nicht den eigentlichen toxischen Effekt der untersuchten Nanopartikel oder Viren.

Aufgrund der starken Heterogenität einer Zellpopulation und der Diskussion der Entartung einer Einzelzelle als Ursache einer Vielzahl von Krankheiten (Krebsstammzelle) gelangte in den letzten Jahren, auch im Zusammenhang mit der *REACH*-Verordnung, die Detektion zellulärer Prozesse auf Einzelzellebene in den Fokus der Forschung.

Die bereits zur Charakterisierung von Einzelzellen angewendeten molekularbiologischen oder proteinbiochemischen Technologien wie Kapillarelektrophorese, Polymerasekettenreaktion (PCR) und die Elastographie, stellen invasive und zeitintensive Methoden dar. Weitere Verfahren zur Untersuchung einzelner Zellen wie beispielsweise die Durchflusszytometrie (FACS), die magnetische Zytometrie (MACS) und die elektrochemische Methode Patch-Clamp, analysieren einzelne Zellen, jedoch außerhalb des Zellverbandes. Weiterhin lassen die zum gegenwärtigen Zeitpunkt angewendeten *in vitro* Methoden zur Analyse einzelner Zellen keine kontinuierliche Charakterisierung einer individuellen adhären Zelle in einem Zellverband zu. Zur nichtinvasiven Detektion von Reaktionen einzelner Zellen innerhalb einer Zellpopulation existiert nur die Mikroskopie als optische Analysemethode unter Nutzung der Standardkulturgefäße. Sie hat den Nachteil des Auftretens von Randeffekten bei Verkleinerung der Zellkulturfläche. Weiterhin kann nur mit hohem Zeitaufwand die gesamte Zellkulturfläche eines konventionellen Zellkulturgefäßes analysiert werden. Das Material Polystyrol der konventionellen Zellkulturgefäße erzeugt häufig starke Hintergrundfluoreszenz und beeinträchtigt dadurch die fluoro-

metrische Quantifizierung induzierter Effekte sowie die Qualität der mikroskopischen Aufnahmen.

Vor diesem Hintergrund besteht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer sensitiver *in vitro* Systeme zur reproduzierbaren nichtinvasiven Langzeitcharakterisierung individueller Reaktionen adhärenter Zellen in einer *in vitro* Kultur, auch im Hinblick auf neue alternative Testmethoden *in vitro* zur Bewertung des toxischen Potenzials chemischer Stoffe und Materialien im Rahmen der *REACH*-Verordnung.

3 Zielsetzung

Das wissenschaftliche Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines miniaturisierten *in vitro* Systems zur Erfassung nanopartikulärer und viraler Effekte auf zellulärer Ebene, als neue Screeningmethode zur Bewertung des toxischen Potenzials nanoskaliger Materialien im Rahmen der *REACH*-Verordnung.

Um die Untersuchung spezifischer Reaktionen individueller Zellen in einem Zellverband zu ermöglichen, sollte ein miniaturisiertes Zellkulturgefäß mit verbesserten optischen Eigenschaften entwickelt, mit geeigneten *in vitro* Modellen kombiniert und dessen Sensitivität ermittelt werden. Zur Validierung des entwickelten *in vitro* Systems sollte untersucht werden, ob sich mit Hilfe des miniaturisierten Zellkulturgefäßes die Analyse nanopartikulärer und viraler Effekte reproduzierbar realisieren lässt und ob die Ergebnisse mit den in Standardkulturgefäßen ermittelten Resultaten korrelieren.

Entwicklung eines miniaturisierten *in vitro* Systems

Bei der Entwicklung eines miniaturisierten Zellkulturgefäßes zur Erfassung von Zellreaktionen auf zellulärer Ebene sollte der Ansatz der nichtinvasiven Analyse individueller Zellen in einem kleinen Zellverband verfolgt werden. Hierbei sollte untersucht werden wie weit sich eine Miniaturisierung der Zellkulturfläche realisieren lässt ohne dadurch die morphologischen und metabolischen Eigenschaften der Zellen zu verändern. Daher sollte das Design des entwickelten miniaturisierten Zellkulturgefäßes zur Zellkultivierung so gewählt werden, dass die Miniaturisierung das Zellverhalten nicht nachteilig beeinflusst und die Analyse und Quantifizierung individueller Zellreaktionen in einer kleinen Population im Vergleich zu den konventionell verwendeten Zellkulturgefäßen optimiert ist.

Physikochemische und zytotoxikologische Partikelcharakterisierung

Da bei der Entwicklung neuer *in vitro* Systeme zur Detektion nanopartikulärer Effekte die Verwendung charakterisierter Nanopartikel von großer Bedeutung ist, sollten die verwendeten Partikel hinsichtlich Form, Größenverteilung, Oberflächenladung sowie der Interaktion mit Mediumzusätzen untersucht werden, bevor sie zur Validierung des etablierten *in vitro* Systems eingesetzt werden. Neben der physikochemischen Charakterisierung sollten toxische Konzentrationen der Partikel identifiziert werden, um diese zur Validierung des miniaturisierten *in vitro* Systems einzusetzen.

Validierung des miniaturisierten *in vitro* Systems

Unter Anwendung spezifischer toxikologischer Endpunkte sollte die Reproduzierbarkeit des neu entwickelten *in vitro* Systems im Vergleich zu den bereits etablierten Standard-

kulturgefäßen bewiesen werden. Es sollte untersucht werden, ob eine Detektion schwellenwertabhängiger toxikologischer nanopartikulärer Reaktionen einzelner adhärenter Zellen eines kleinen Zellverbandes möglich ist und eine permanente Charakterisierung zellbiologischer Prozesse individueller adhärenter Zellen mit hoher Sensitivität realisiert werden kann. Exemplarisch sollte außerdem demonstriert werden, dass unter Anwendung des entwickelten Systems in Zellkulturen der Zusammenhang zwischen Virusinfektion und proinflammatorischen Zellreaktionen auf zellulärer Ebene untersucht werden kann. Weiterhin sollten zur Evaluierung des Systems der Effekt der Miniaturisierung auf summarische Prozesse wie die Stammzellendifferenzierung untersucht werden. Am Beispiel der Adipogenese sollte die Anwendung des miniaturisierten Systems zur Analyse nanopartikulärer Effekte auf das Differenzierungsverhalten humaner Stammzellen gezeigt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Allgemeines Verbrauchs- und Gebrauchsmaterial

Material	Hersteller
Aspirationspipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einfrierröhrchen Cryo.s 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalpipetten (1 ml-25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalspritze 10 ml	B. Braun Melsenburg, Melsenburg
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier (55 mm)	Macherey-Nagel, Düren
Gewebekulturschalen (40 mm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Gewebekulturschalen (35 mm, 100 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glaswaren	Schott, Mainz
Kammer-Glasobjektträger	BD Biosciences, Heidelberg
Kupfernetz, Formvar-beschichtet	Plano, Wetzlar
Kupfernetz, Pioloform-beschichtet	Plano, Wetzlar
Küvetten für Photometrie UVette 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg
Küvetten Zeta Cell DTS 1060S	Malvern Instruments, Worcestershire, UK
Parafilm	American National Can., Chicago, U.S.A.
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polystyrolvorratsflasche (250 ml)	Corning, Amsterdam, Niederlande
Probenbecher Zellzahlbestimmung	VWR International, Darmstadt
Reagenz-Reservoirs	VWR International, Darmstadt
Silikonaufsatz flexi PERM	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Siliziumwafer CZ 1.00	Silicon Materials, Carnegie, U.S.A.
Spritzenvorsatzfilter, Porengröße 0,22 µm	Fisher Scientific, Schwerte
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur-Mikroplatten, transparent (12-, 24-, 96-Loch)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur-Mikroplatten, schwarz (384-Loch)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschale µ-Dish	Ibidi, Martinsried

Chemikalien

Reagenzien und Kits	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Alpha-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
APOPercentage Apoptosis Assay	Biocolor Ltd., Carrickfergus, UK
Araldit	Serva, Heidelberg
Bleicitrat	Serva, Heidelberg
Cacodylat	Plano, Wetzlar
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega, Heidelberg

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Mannheim
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Mannheim
Concanavalin A	Invitrogen, Karlsruhe
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylarsensäure-Natriumsalz-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Effectene Transfektions Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol	Merck, Darmstadt
FluidMAG-D	Chemicell, Berlin
Fluoresceindiacetat	Sigma- Aldrich, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
G418	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Plano, Wetzlar
Gold-Nanopartikel (GC10), Ø 10 nm	BBInternational, Cardiff, Wales
Gold-Nanopartikel (GC80), Ø 80 nm	BBInternational, Cardiff, Wales
HyClone	Thermo Scientific
Indomethazin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Insulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isobuthylmethylxanthin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isoton II	Beckman Coulter, Krefeld
Leitsilber	Merck, Darmstadt
Magnetit-Nanopartikel (FluidMAG-D), Ø 100 nm	Chemicell, Berlin
Methanol	Merck, Darmstadt
Mykoplasmen PCR Detektionskit, LookOut	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Oil red O Farbstoff	Millipore, Schwalbach
Osmiumtetroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂) pH 7,2	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Propylenoxid	Merck, Darmstadt
RPMI Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Schwefelsäure 1 N	Merck, Darmstadt
Silber-Nanopartikel (PL-Ag-S10), Ø 10 nm	PlasmaChem, Berlin, Deutschland
Silber-Nanopartikel (SC80), Ø 80 nm	BBInternational, Cardiff, Wales
Tanninsäure	Plano, Wetzlar
TNF-alpha, human (T6674-10UG)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TritonX-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Uranylacetat	Plano, Wetzlar
Vectashield-HardSet-Mounting-Medium mit DAPI	Axxora, Grünberg
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

Geräte und Computersoftware

Geräte	Hersteller
Absorptions-Mikroplattenreader Spectra Fluor	Tecan, Crailsheim
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Argon-Ionen-Laser	Zeiss, Jena
Autoklav 5050 EL	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Automatischer Brenner, Fireboy plus	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Begasungsbrutschrank BBD 6220	Thermo Scientific, Langenselbold
Biostation CT	Nikon, Düsseldorf
Biostation IM-Q	Nikon, Düsseldorf
Einkanalpipetten	Brand, Wertheim
Energiedispersives Röntgenspektrometer	EDAX, Mahwah, U.S.A.
Fluoreszenzmikroskop IX70 (Inverses Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrastfilter, Fluoreszenzfilter und CC12CLR Farbkamera)	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop IX81	Olympus, Hamburg
Inverses Durchlichtmikroskop (Phasenkontrastfilter, Fluoreszenzfilter, CC12CLR Farbkamera, automatischer Probenstisch)	
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Klimakammer, Typ IX81	Solent Scientific Ltd., Segensworth, UK
Konfokales Rasterlaser-Mikroskop (LSM510- Meta NLO)	Zeiss, Jena
Kritisch-Punkt-Trockner CPD 7501	Quorum Technologies, East Sussex, UK
Kryo-Einfriergerät, Mr. Frosty	Quali Lab, Olivet, Frankreich
Kryolagerbehälter 35 VHC	Tec-Lab, Königsstein
Kühlschrank (+4 °C)	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2	The Baker Company, Maine, U.S.A.
Mikroskop Observer Z1 (Inverses Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrastfilter, Fluoreszenzfilter, LED-Anregung (Colibri) und CC12 Kamera)	Zeiss, Jena
Mikrotom Ultracut S	Leica, Wetzlar
Diamantmesser im Mikrotom Ultracut S	Diatome, Biel, Schweiz
Multifunktions-Mikroplattenreader Infinite 200	Tecan Deutschland, Crailsheim
PE-CVD PC 310	SurfaceTechnology Systems, Newport, UK
pH-Meter Portamess	Knick, Berlin
Pipettierhilfe (Pipetboy)	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Probenhalter der Kritisch-Punkt-Trocknung	Quorum Technologies, East Sussex, UK
Rasterelektronenmikroskop LEO 435VP	Röntec, Berlin
Rasterelektronenmikroskop EM109T	Zeiss, Jena
Rasterelektronenmikroskop FESEM XL30	FEI, Hillsboro, U.S.A.
Rotationsschüttler, MTS 4	IKA Werke, Staufen
Schüttelgerät, Agitateur Top Mix 11118	Thermo Scientific, Langenselbold
Tiefkühlschrank (-86 °C)	Thermo Scientific, Langenselbold
Ti:Sa Femtosekundenlaser	Spectra Physics, Darmstadt

Transmissionselektronenmikroskop Tecnai TM F30	FEI, Hillsboro, U.S.A.
Transmissionselektronenmikroskop C12	Philips, U.S.A.
UV/VIS Zweistrahlphotometer Lambda 950	Perkin Elmer, Wiesbaden
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zellzählgerät Coulter Multisizer II	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Biofuge pico	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge Biofuge primo R	Thermo Scientific, Langenselbold
Zetasizer Nano	Malvern Instruments

Computersoftware	Hersteller
AnalySIS 3.2	Olympus, Hamburg
AxioVision Rel. 4.6	Zeiss, Jena
GIMP2 2.6.6	http://www.gimp.org
iControl	Tecan, Crailsheim
Lab View	National Instruments, München
LSM Image Browser Verison 4.0.0157	Zeiss, Jena
Origin Pro 8G	OriginLab Corporation, U. S. A.
XFluor4	Tecan, Crailsheim
Zetasizer Software 6.01	Malvern Instruments

Medien, Lösungen und Pufferzusammensetzungen

Medien der Zellkultur

Kulturmedium der A549

RPMI 1640 (Bestellnr. 21875)

FKS	10 % (v/v)
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Kulturmedium der hMSC

alpha-MEM (Bestellnr. 32561)

FKS	15 % (v/v)
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Kulturmedium der PC-12

RPMI 1640 (Bestellnr. 21875)

FKS	5 % (v/v)
Pferdeserum	10 % (v/v)
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Kulturmedium der pL8-GFP A549

RPMI 1640 (Bestellnr. 21875)

FKS	10 % (v/v)
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
G418	0,5 g/l

Kulturmedium der Vero

RPMI 1640 (Bestellnr. 21875)

FKS	10 % (v/v)
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Adipogenes Differenzierungsmedium der hMSC

alpha-MEM

FKS, hitzeinaktiviert	10 % (v/v)
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Dexamethason	100 nM
IBMX	500 µM
Indomethazin	200 µM
Insulin	100 ng/ml

Differenzierungsmedium der PC-12

RPMI 1640 (L-Glutamin) (Bestellnr. 21875)

FKS	0,25 % (v/v)
Pferdeserum	0,5 % (v/v)
NGF	1 % (v/v)
Penicillin	40 U/ml
Streptomycin	40 µg/ml

Kontrollmedium der adipogenen Differenzierung

alpha-MEM

FKS, hitzeinaktiviert	10 % (v/v)
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Kryomedium der A549

Kulturmedium	70 % (v/v)
FKS	20 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

Kryomedium der hMSC

FKS	90 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

Kryomedium der PC-12

Kulturmedium	70 % (v/v)
FKS	20 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

Kryomedium der pIL8-GFP A549

Kulturmedium	60 % (v/v)
FKS	30 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

Kryomedium der Vero

Kulturmedium	70 % (v/v)
FKS	20 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

ArbeitslösungenCacodylatpuffer 0,15 M

Natriumcacodylatpuffer 0,3 M	10 ml
in dest. Wasser gelöst	10 ml

Vor Gebrauch wurde die Lösung filtriert (Porengröße 0,22 µm).

Fluoresceindiacetat (FDA)/Propidiumiodid (PI)-Lösung

PBS	10 ml
Fluoresceindiacetat (5 mg/ml in Aceton)	60 µl
Propidiumiodid (2 mg/ml in dest. Wasser)	200 µl

G418-Stammlösung (50 mg/ml)

lyophilisiertes G418	1 g
in dest. Wasser gelöst	20 ml

Natriumcacodylatpuffer (0,3 M)

Dimethylarsensäure-Natriumsalz-Trihydrat	6,42 g
in dest. Wasser gelöst	100 ml

Oil red O-Lösung

Oil red O-Pulver	0,18 % (w/v)
in Isopropanol	

Osmiumtetroxid-Lösung 2 %

Osmiumtetroxid 4% 1:1 mit Cacodylatpuffer 0,3 M verdünnen.

PFA-Lösung 4 % (pH 7,2 – 7,4 (NaOH))

Paraformaldehyd	4 g
in PBS gelöst	100 ml

Tanninsäure-Lösung 1 %

Tanninsäure	0,1 g
in dest. Wasser gelöst	10 ml

Vor Gebrauch wurde die Lösung filtriert (Porengröße 0,22 µm).

TNF- α -Stammlösung (100 µg/ml)

lyophilisiertes TNF- α	10 µg
in dest. Wasser gelöst	100 µl

Uranylacetat-Lösung 1 %

Uranylacetat	0,1 g
in dest. Wasser gelöst	10 ml

Vor Gebrauch wurde die Lösung filtriert (Porengröße 0,22 µm).

Plasmide

Plasmide	Hersteller
pTurboGFP-PRL Plasmidvektor	Evrogen, Moskau, Russland
XL1-Blue-pGFP-N1 (2,6 µg/ml)	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, U.S.A

Viren

Virusstamm	Virusfamilie	TCID ₅₀
Herpes simplex Typ-1	Herpesviridae	10 ^{6,75}

Zellen

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Zellart	Passage
A549	Humanes Lungenkarzinom	Epithelzelle	10
A549 pIL8-GFP	Humanes Lungenkarzinom	Epithelzelle	6
Vero	Niere des Chlorocebus	Fibroblast	26
PC-12	Nephrotisches Chromozytom der Ratte	Neuronale Vorläuferzelle	7
hMSC	Humanes Knochenmark	Stammzelle	4

4.2 Methoden

4.2.1 Herstellung des Mikrokavitätenchips

Ausgangsmaterial war ein beidseitig polierter Siliziumwafer (Si-Wafer) mit einer Dicke von $525 \mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$ (Herstellerangaben). Dieser wurde mittels plasmaunterstützter chemischer Gasphasenabscheidung (Plasma-enhanced chemical vapour deposition, PECVD) beidseitig mit $800 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ Siliziumnitrid (Si_xN_y) beschichtet. Das hier abgeschiedene Si_xN_y diente einerseits als Funktionsschicht (spätere Zellkulturfläche), andererseits als Maskierschicht für den zweistufigen nasschemischen Ätzprozess. Als Prozessgase dienten SiH_4 und NH_3 bei einer Prozesstemperatur von $300 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Aufwachsrate betrug ca. 11 nm/min .

Die Strukturübertragung des Designs der Mikrostrukturen erfolgte mit Hilfe eines photolithographischen Verfahrens (Abbildung 4-1). Das Design des Mikrokavitätenchips (MKC) ($2,5 \text{ cm} \times 3,0 \text{ cm}$) wurde an das Format des kommerziell erhältlichen Silikonaufsatzes Flexi PERM (Greiner Bio-One) adaptiert. Nach dem in Abbildung 4-3 aufgezeigten Prozessablauf wurden unter Verwendung der Ätzmaske A (Abbildung 4-1a) sechs Kavitäten geätzt. Durch Wiederholung des Prozesses unter Anwendung der Ätzmaske B (Abbildung 4-1b) fand die Ätzung von jeweils sieben Mikrokavitäten in jeder vorhandenen Kavität statt, wobei jede Mikrokavität ein miniaturisiertes Zellkulturgefäß darstellt. Mittels Spin-Coating wurde zunächst ein lichtempfindlicher Fotolack (Resist) einseitig aufgeschleudert. Das anschließende Austreiben des Lösungsmittels, zur Stabilisierung der Resistschicht, erfolgte durch Ausheizen (Softbake). Über eine 1:1 Projektion und die Verwendung der entsprechenden Schattenmaske fand die Belichtung des Fotolacks mittels UV-Licht im Kontaktverfahren statt. Die Entwicklung des Resist, bei der die belichteten Bereiche herausgelöst werden und das darunter liegende Si_xN_y frei gelegt wird, erfolgte in einer entsprechenden Entwicklerlösung. Somit wurden auf dem Wafer Bereiche definiert, die für den nachfolgenden Prozessschritt offen, beziehungsweise resistent waren. Während des nachfolgend angewendeten reaktiven Ionenätzens (Reactive ion etching, RIE) erfolgte ein selektiver Abtrag des Si_xN_y bis zur Freilegung des Siliziums. Nach erfolgreicher Ätzung wurde der Fotolack mittels Aceton von dem Wafer entfernt (Strippen).

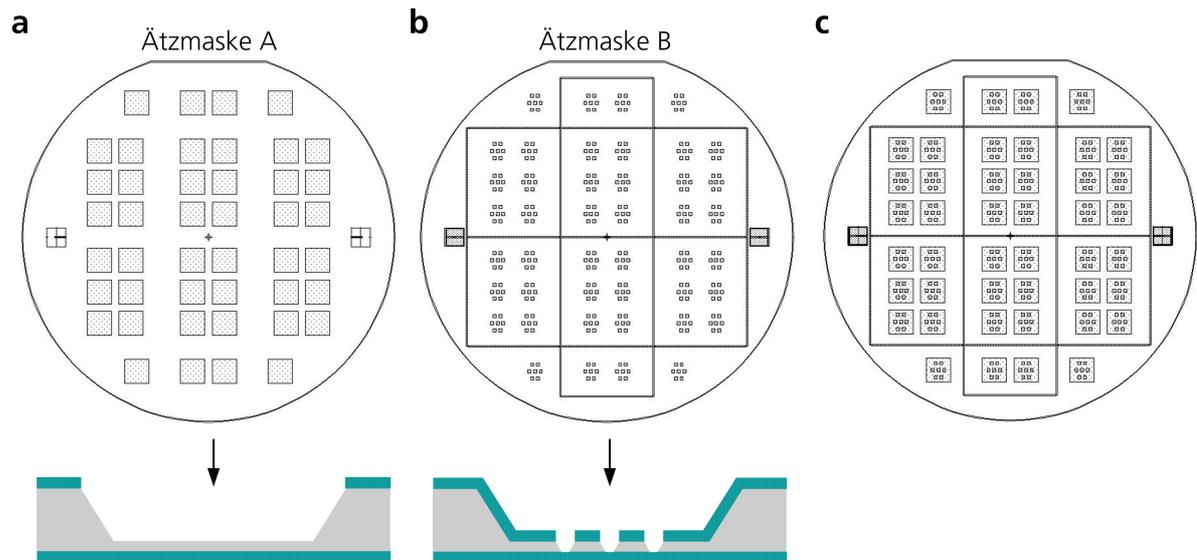


Abbildung 4-1 Design der verwendeten Ätzmasken.

(a) Unter Anwendung von Ätzmaske A werden 44 Kavitäten (Maskenöffnung $6881,7 \mu\text{m} \pm 19,0 \mu\text{m} \times 6965,9 \mu\text{m} \pm 32,9 \mu\text{m}$) in den Si-Wafer geätzt. (b) Die Wiederholung der Prozessabfolge mit Ätzmaske B (Maskenöffnung $820,4 \mu\text{m} \pm 5,7 \mu\text{m} \times 845,9 \mu\text{m} \pm 3,8 \mu\text{m}$) führt zur Ätzung von jeweils sieben Mikrokavitäten in den zuvor gefertigten Kavitäten. (c) Kombination von Ätzmaske A und B sowie Struktur des prozessierten Si-Wafers.

Zur Formung der Kavitäten wurde in dieser Arbeit das anisotropische nasschemische Ätzverfahren (KOH als Ätzlösung) angewandt. Die charakteristische Ausbildung der Kavitäten ist auf die Kristallstruktur des verwendeten Si-Wafers zurückzuführen. Unter Anwendung wässriger KOH beträgt die Ätzrate der Si-Orientierungen $\langle 100 \rangle$ zu $\langle 111 \rangle$ 1:400, somit stellt die (111)-Si-Ebene die Ätzstoppebene dar²⁷³. Wird, wie in dieser Arbeit, ein Si-Wafer mit $\langle 100 \rangle$ -orientierter Oberfläche verwendet, stellt sich beim Tiefenätzen aufgrund des Kristallgitters ein charakteristischer Flankenwinkel von $54,7^\circ$ zur Si-Oberfläche (Abbildung 4-2) ein. Der Si-Ätzprozess hängt stark von der Konzentration und der Temperatur der KOH-Lösung ab. Als Ätzparameter wurden eine KOH-Konzentration von 20 % und eine Temperatur von 80°C gewählt. Hierbei ergab sich eine durchschnittliche Ätzrate von $70 \mu\text{m}/\text{Stunde}$ in $\langle 100 \rangle$ -Richtung. Die Selektivität des Si_xN_y gegenüber Si betrug 1:1750.

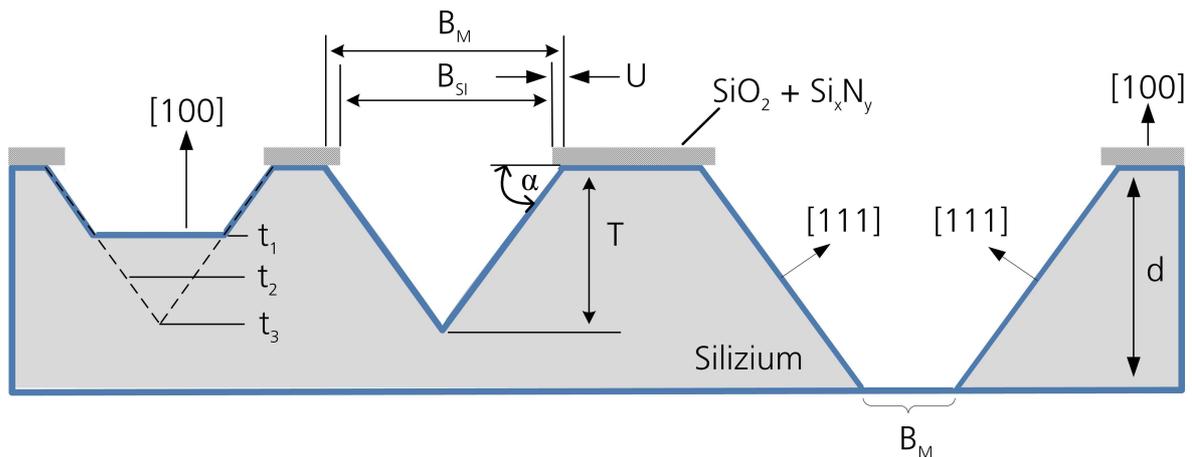


Abbildung 4-2 Schematische Darstellung des anisotropischen Ätzens von Silizium.

Durch die Verwendung eines Si-Wafers mit $\langle 100 \rangle$ -orientierter Oberfläche stellt sich beim Tiefenätzen aufgrund des Kristallgitters ein charakteristischer Flankenwinkel von $54,7^\circ$ zur Siliziumoberfläche ein. B_M : Breite der Siliziumöffnung nach Ätzung; B_{Si} : Breite der Siliziumnitridöffnung; T : Tiefe der Mikrostruktur; d : Waferdicke; U : Unterätzung; α : Ätzwinkel $[100]$ -Ebene zu $[111]$ -Ebene = $54,7^\circ$. Die Kristallebene $[100]$ bildet eine Pyramidenstruktur mit quadratischer Grundfläche und $[111]$ als Mantel. Die Kristallebene $[111]$ wird bei angewendetem Prozess kaum angegriffen.

Prozessabfolge zur Herstellung des Mikrokapitätenchips (MKC)

Zunächst wurde auf einer Seite des beidseitig mit Si_xN_y beschichteten Wafers die erste Maske (Ätzmaske A) mittels Photolithographie und reaktives Ionenätzen in das Si_xN_y übertragen. Die Kantenlänge der Kapitätenöffnungen betragen $6421,8 \mu\text{m} \pm 39,2 \mu\text{m} \times 6506,0 \mu\text{m} \pm 80,7 \mu\text{m}$. Beim anschließenden anisotropischen nasschemischen Ätzen wurden die Kapitäten zunächst auf eine Tiefe von $290,5 \mu\text{m} \pm 1,5 \mu\text{m}$ geätzt. Um die zweite Maske (Ätzmaske B) mit den trichterförmigen Mikrokapitäten zu strukturieren, erfolgte das Abscheiden einer neuen Si_xN_y -Schicht über den kompletten Wafer (PE-CVD). Anschließend fand wiederum die Strukturierung dieser Si_xN_y -Schicht mit den erwähnten Verfahren (Photolithographie, reaktives Ionenätzen) statt. Der folgende KOH-Ätzschritt erfolgte bis zu der vollständigen Durchätzung des Wafers. Da sich auf der Waferrückseite ebenso eine Si_xN_y -Schicht befand, wurde diese freigelegt und bildete die Kapitätenmembran (Abbildung 4-3).

Aufgrund der Verwendung eines offenen KOH-Bads während des anisotropischen nasschemischen Ätzens führten Kondensationsprozesse während des mehrstündigen Prozesses zu einer Aufkonzentration der Ätzlösung KOH. Somit konnte keine konstante Ätzrate gewährleistet werden, was zu einer Variabilität in der Reproduzierbarkeit der Größe der Mikrokapitäten führte.

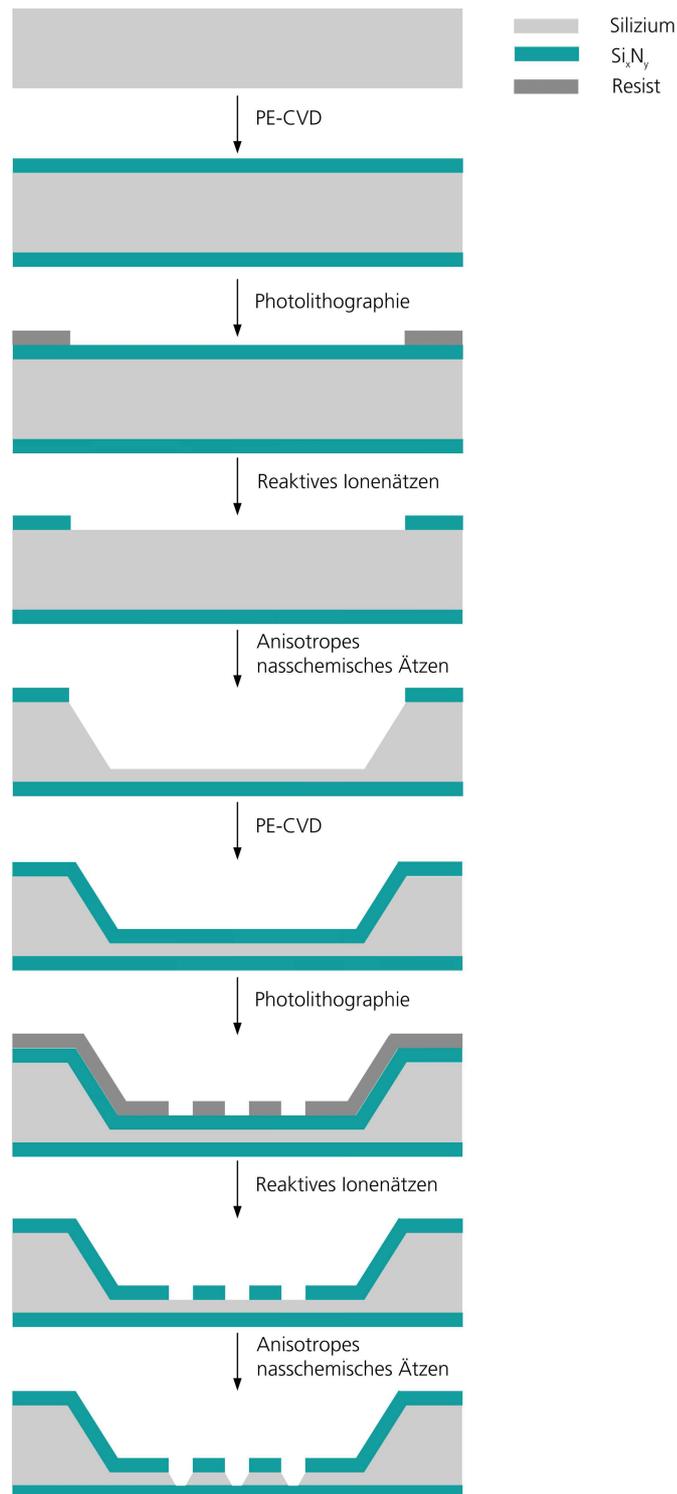


Abbildung 4-3 Workflow der mikroprozessierten Herstellung der miniaturisierten Zellkulturgefäße.

Nach Abscheidung eines 800 nm Si_xN_y -Layers auf beiden Seiten des Si-Wafers erfolgt mittels Photolithographie und reaktiven Ionenätzens die Öffnung der Kavitäten nach Abbildung der Ätzmaske A. Durch anisotropes nasschemisches Ätzen werden die Kavitäten freigelegt. Nach Wiederholung der Abfolge der Arbeitsschritte unter Verwendung der Ätzmaske B entstehen Mikrokavitäten mit einer Si_xN_y -Membran.

Die Variation der Flächen der im ersten Prozessschritt geätzten Kavitäten resultierte in einer Schwankung der Maße der Mikrokavitäten (Membrangröße $510,2 \mu\text{m} \pm 14,6 \mu\text{m} \times 527,6 \mu\text{m} \pm 12,2 \mu\text{m}$, Tiefe $238,5 \mu\text{m} \pm 1,2 \mu\text{m}$).

Die Fläche der geätzten miniaturisierten Mikrokavitäten variierte um $0,27 \text{ mm}^2 \pm 0,007 \text{ mm}^2$. Da die Abweichungen der Zellkulturflächen für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit nicht von Bedeutung waren, wurden die Mikrokavitäten für die biologischen Versuche nicht hinsichtlich ihrer aktiven Membranfläche unterteilt.

Aufgrund der Maße der Maskenöffnungen von Ätzmaske B ($820,4 \mu\text{m} \pm 5,7 \mu\text{m} \times 845,9 \mu\text{m} \pm 3,8 \mu\text{m}$) und der Varianz der Ausgangsdicke des Si-Wafers ($525 \mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$) schwankten die Maße der Mikrokavitäten und es war nicht möglich quadratische Zellkulturflächen zu ätzen.

Aus diesem Grund und zur Prüfung der Auswirkung der Prozessschwankungen auf die Abmessungen der Mikrokavitäten, wurden die Dimensionen (Tiefe und Fläche der Si_xN_y -Membran) der Mikrokavitäten in unterschiedlichen Bereichen eines prozessierten Si-Wafers mittels 3-D-Messsystem (NanoFocus) vermessen. In Abbildung 4-4a sind die Wafersegmente aufgezeigt, in denen die Mikrokavitäten ausgemessen wurden. Unter Anwendung von Formel 1 und Formel 2 sowie der in Abbildung 4-4b skizzierten Parameter wurden die Maße der Kavitäten in den Wafersegmenten 1-4 ermittelt und daraus die durchschnittliche Fläche der Si_xN_y -Membran berechnet (Tabelle 4-1).

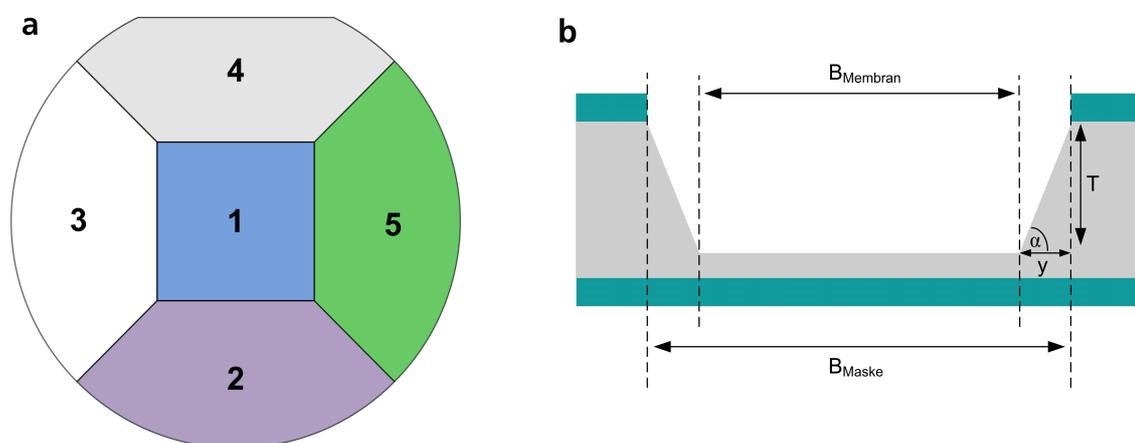


Abbildung 4-4 Analyse herstellungsprozessbedingter Variationen der Maße der Mikrokavitäten.

Zur Untersuchung der beim Herstellungsprozess auftretenden Flächeneffekte wurden die Maße der Mikrokavitäten in unterschiedlichen Wafersegmenten vermessen. (a) Einteilung des Si-Wafers in fünf Segmente. (b) Maße die zur Berechnung der Fläche der Si_xN_y -Membran sowie des Volumens der Mikrokavität nötig sind. B_{Maske} : Breite der Maskenöffnung; B_{Membran} : Breite der Si_xN_y -Membran; y : Ankathete zu Winkel α ; T : Tiefe der Mikrokavität.

Unter Anwendung des Mittelwertes der in Tabelle 4-1 aufgelisteten Maße der Mikrokavitätmembran wurden die Flächen der Si_xN_y -Membranen der Mikrokavität berechnet.

$$\text{Formel 1} \quad y = \frac{T}{\tan \alpha} = \frac{T}{\tan 54,7}$$

$$\text{Formel 2} \quad B_{\text{Maske}} = B_{\text{Membran}} + 2 y$$

y: Ankathete zu Winkel α ; T: Tiefe der Mikrokavität; B_{Maske} : Breite der Maskenöffnung; B_{Membran} : Breite der Si_xN_y -Membran

Tabelle 4-1 Maße der geätzten Mikrokavitäten.

-: Nicht messbar, Si_xN_y -Membran war zerstört.

Wafersegment	Maße der Si_xN_y -Membran			Fläche der Si_xN_y -Membran μm^2	Dicke des Wafers μm
	μm Breite	Länge	Tiefe		
1	503	533	240	268099	528,0
1	500	540	240	270000	
1	500	534	240	267000	
1	503	560	240	281680	
1	498	529	240	263442	
1	506	535	240	270710	
1	500	528	240	264000	
2	510	534	239	272340	530,7
2	500	527	239	263500	
2	498	530	239	263940	
2	496	527	240	261392	
2	499	525	238	261975	
2	498	524	237	260952	
2	-	-	-	-	
3	520	545	238	283400	528,5
3	517	543	238	280731	
3	507	530	238	268710	
3	-	-	-	-	
3	505	530	237	267650	
3	497	525	237	260925	
3	498	521	237	259458	
4	523	516	237	269868	528,6
4	544	522	237	283968	
4	535	506	238	270710	
4	534	504	238	269136	
4	-	-	-	-	
4	538	512	237	275456	
4	527	510	238	268770	
Mittelwert	510,2	527,6	238,5	269112,5	528,9
Standardabweichung	14,6	12,2	1,2	7033,4	1,0

Vor Anwendung des entwickelten MKCs für biologische Untersuchungen wurde dieser autoklaviert (121 °C, 2 bar, 15 Minuten).

Unter Integration des automatisierten Mikroskoptisches (x-, y- und z-Richtung) ermöglicht das mit LabVIEW programmierte Softwareprogramm ein automatisches Analysieren der einzelnen Zellkulturgefäße mit Hilfe unterschiedlicher Mikroskopiertechniken (Phasenkontrast und Fluoreszenz) (Abbildung 4-5). Nach Positionierung von sechs MKCs (42 Mikrokavitäten pro MKC) in einem PMMA-Adapter als Array, lassen sich in weniger als 40 Minuten 252 Zellkulturgefäße optisch analysieren.

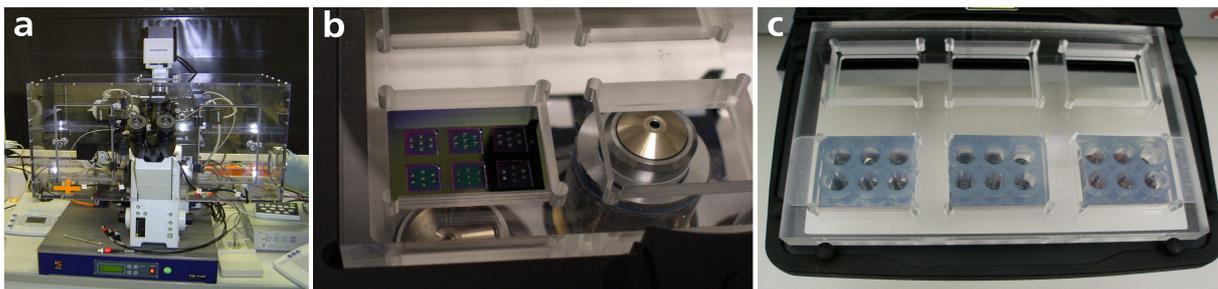


Abbildung 4-5 Experimenteller Aufbau zur mikroskopischen Analyse induzierter Effekte in den Mikrokavitäten.

(a) Komplettaufbau des Fluoreszenzmikroskops. Als Basis dient ein Fluoreszenzmikroskop (IX81, Olympus) mit automatisiertem Objektisch, Fluoreszenzkamera und PC sowie ein Inkubatoraufsatz zur Langzeitbeobachtung. (b) Positionierung des MKCs in einem PMMA-Adapter. (c) Nach Positionierung der MKCs in einem PMMA-Adapter als Array und Kombination mit der Kultivierungseinheit Flexi Perm, lassen sich in weniger als 40 Minuten 252 Zellkulturgefäße mit Hilfe der programmierten Steuerungssoftware gerastert dokumentieren und optisch analysieren.

4.2.2 Zellbiologische Methoden

Die in den nachfolgend beschriebenen Experimenten benutzten Chemikalien hatten analytischen Reinheitsgrad. Alle verwendeten Gebrauchsmaterialien waren von dem Hersteller steril verpackt oder wurden vor Gebrauch autoklaviert (121 °C, 15 Minuten). Um eine Kontamination durch jegliche Mikroorganismen zu vermeiden, fanden alle Arbeiten mit Zellkulturen unter aseptischen Bedingungen statt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre. Die Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmenkontamination untersucht.

Kultivierung von Zellen

Für die Zelllinien A549, pIL8GFP A549, Vero und PC-12 wurde RPMI 1640 Medium als Standardkulturmedium verwendet.

A549-Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, ACC-107) bezogen. Sie repräsentieren aus einem Lungenkarzinom isolierte humane Alveolarepithelzellen²⁷⁴. Die Kultivierung der adhärent in einem Monolayer wachsenden A549-Zellen erfolgte in Standardkulturmedium, supplementiert mit 10 % (v/v) FKS, 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Die permanente Zelllinie Vero (DSMZ, ACC-33) wurde 1962 aus der Niere einer afrikanischen Meerkatze isoliert. Es handelt sich um adhärent wachsende nephrotische Epithelzellen, deren Kultivierung in, mit 10 % (v/v) FKS, 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ergänzten Standardkulturmedium erfolgte.

Zur Kultivierung der PC-12-Zellen (Nebennierenphäochromozytomzellen der Ratte, DSMZ, ACC-159) wurde das Standardkulturmedium mit 10 % (v/v) Pferdeserum, 5 % (v/v) FKS, 100 Units/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin supplementiert. Um eine neuronale Differenzierung zu induzieren wurde das Proliferationsmedium durch Differenzierungsmedium (RPMI 1640 supplementiert mit 0,5 % (v/v) Pferdeserum, 0,25 % (v/v) FKS, 1 % Nervenwachstumsfaktor NGF in BSA, 80 Units/ml Penicillin sowie 80 µg/ml Streptomycin) ausgetauscht.

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) wurden aus dem Knochenmark des Oberschenkelknochens humaner Spender isoliert. Die Oberschenkelköpfe wurden vom evangelischen Krankenhaus Zweibrücken von Dr. M. Maue und Dr. M. Hassinger zur Verfügung gestellt. Die Isolation der hMSCs erfolgte mit Patienteneinwilligungserklärung durch Dr. E. Gorjup (Fraunhofer-Institut IBMT, Abteilung Zellbiologie und Angewandte Virologie). Die hMSCs wurden in alpha-MEM, supplementiert mit 15 % (v/v) FKS, 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, kultiviert.

Zur adipogenen Differenzierung der 2-D-hMSC-Kulturen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80 % der Austausch des Kulturmediums durch adipogenes Differenzierungsmedium supplementiert mit den löslichen differenzierungsinduzierenden Faktoren Insulin, Dexamethason, Indomethacin und Isobuthylmethylxanthin. Während der adipogenen Differenzierung erfolgte zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel. Die Kontrollen wurden mit Differenzierungsmedium ohne differenzierungsinduzierende Faktoren behandelt.

Zur Kultivierung wurden wahlweise Zellkulturflaschen mit 25 cm² (T25-Flasche), 75 cm² (T75-Flasche) oder 175 cm² (T175-Flasche) Wachstumsfläche verwendet.

Passage von Zellen

Um einen Wachstumsstillstand oder ein Absterben der Zellen zu vermeiden, erfolgte zweimal wöchentlich eine Passage der Zellen. Die Passage der humanen mesenchymalen Stammzellen erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 80 %, die der permanenten

Zelllinien bei zirka 90 %. Nach Abnehmen des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend, zum Ablösen von der Zellkulturoberfläche, drei Minuten bei 37 °C mit Trypsin/EDTA-Lösung (1x) (T25-Flasche: 0,5 ml; T75-Flasche: 2 ml) inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die abgelösten Zellen in Kulturmedium (T25-Flasche: 2 ml; T75-Flasche: 5 ml) aufgenommen und in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt. Bei 1000 rpm (5 Minuten) wurden die Zellen pelletiert. Im Anschluss erfolgten die Aspiration des Mediumüberstands und die Resuspension des Zellpellets in 2 ml Zellkulturmedium. Zur Fortsetzung der Langzeitkultivierung wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:10 in eine neue Zellkulturflasche (T75) mit vorgelegtem Kulturmedium (10 ml) pipettiert.

Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese mit Trypsin/EDTA-Lösung (1x) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die in Kulturmedium resuspendierte Zellsuspension wurde in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt und bei 1000 rpm (5 Minuten) pelletiert. Der Mediumüberstand der sedimentierten Zellen wurde aspiriert, diese in das für die jeweilige Zelllinie entsprechende Kryomedium aufgenommen und jeweils 1 ml Zellsuspension, mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro ml, in ein Kryoröhrchen überführt. In einem mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfriergerät erfolgte das kontinuierliche Herunterkühlen der Zellen (1 °C/Minute) auf -80 °C, um sie im Anschluss in einen Stickstofftank (-196 °C) zur Langzeitlagerung zu positionieren.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde das aus dem Stickstofftank entnommene Kryoröhrchen in einem Wasserbad (37 °C) erwärmt. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt. Zum Entfernen des überschüssigen DMSO wurde nach 5minütiger Zentrifugation (1000 rpm) der Mediumüberstand aspiriert und das Zellpellet in 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine mit 10 ml Kulturmedium gefüllte T75-Zellkulturflasche pipettiert und bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels impedanzbasierter Durchflusszytometrie, unter Verwendung des Coulter Multisizer II (Beckman Coulter). Die zu untersuchende resuspendierte Zellsuspension wurde 1:100 mit der Elektrolytlösung Isoton II verdünnt und 10 ml des Gemischs in einen Probenbecher überführt. Eine mit Isoton II gespülte Kapillare wurde mittig in der Zellsuspension/Elektrolyt-Lösung positioniert. Nach Beginn

der Messung wurden die in der Elektrolytlösung suspendierten Einzelzellen durch eine Messkapillare gesaugt. Die elektrolytgefüllte Messpore stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar, der sich beim Durchtritt einer Zelle durch die Messpore erhöht. Diese ist ein Maß für das Volumen und damit für die Größe der Zelle. Nach Eingabe der verwendeten Verdünnung in die zugehörige Software wurde die Zellzahl pro ml berechnet.

Zur Bestimmung der Populationsverdopplung (PD) in einer 96-Loch-Mikroplatte wurde die Zellzahl nach 24stündiger Proliferation mittels Coulter Multisizer II bestimmt. Zur Analyse der PD in den Mikrokavitäten wurde die Zellzahl nach 24stündiger Proliferation mit Hilfe der Software *analySIS* ausgewertet. Die Berechnung der PD erfolgte nach Formel 3.

Formel 3

$$PD = \frac{(\ln N - \ln N_0)}{\ln 2}$$

PD: Anzahl der Populationsverdopplungen; N: Zellzahl; N_0 : Initiale Zellzahl.

Die Populationszeit berechnet sich aus der Anzahl der Tage der Zellen in Kultur, dividiert durch die Anzahl erreichter Populationsverdopplungen.

Generierung transient transfizierter pGFP-N1 A549-Zellen

Eine Transfektion umfasst einen Prozess, bei dem Fremd-DNA oder -RNA in eine Säugerzelle eingebracht wird. Bei dem verwendeten Transfektionsreagenz handelt es sich um nicht-liposomale kationische Lipidvesikel (Effectene, Qiagen), an deren Oberfläche die DNA durch ionische Wechselwirkungen komplexiert wird.

Am Vortag der Transfektion erfolgte die Aussaat von 1×10^6 A549-Zellen in eine Zellkulturschale (\varnothing 100 mm) in 7 ml Kulturmedium. Für die Transfektion mit dem für das grün fluoreszierende Protein (GFP) codierenden Plasmid XL1-blue-pEGFP-N1 wurden 2,6 μ g dieses Plasmids in 372,5 μ l Transfektionspuffer aufgenommen. Nach Zugabe der DNA-Sequenz (20 μ l) wurde das Gemisch mit Hilfe eines Schüttelgerätes vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 62,5 μ l Transfektionsreagenz zu dem Gemisch pipettiert und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe der resuspendierten Transfektionslösung zu dem Zellmonolayer. Nach 48 Stunden Inkubation mit den DNA-Liposomkomplexen erfolgte der Austausch des Lipofektionsmediums durch frisches Kulturmedium. Im Anschluss an weitere 16 Stunden Kultivierung der transfizierten Epithelzellen wurde die Transfektionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Nach Abschluss der Transfektion wurden die transient transfizierten pEGFP-N1 A549-Zellen trypsinisiert und zur weiteren Kultivierung

in eine T75-Flasche (10 ml Kulturmedium) überführt. Die Kultivierung der pEGFP-N1 A549-Zellen erfolgte in RPMI 1640, supplementiert mit 10 % (v/v) FKS, 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin sowie 0,5 g/l Geneticin G418 (zur Selektion der stabil transfizierten Zellen).

Generierung der persistent transfizierten Reporterzelllinie pIL8-GFP A549

Die Zelllinie pIL8-GFP A549 wurde aus A549-Zellen etabliert, einem humanen bronchialen Lungenepithel. Die immortalen A549-Zellen wurden mit dem pGL3-Basisvektor stabil transfiziert und enthalten das Neomycin-Resistenzgen, die humane IL-8-Promotorsequenz sowie eine GFP-Sequenz (Abbildung 4-6). Die GFP-Expression ist durch den IL-8-Promotor gesteuert. Somit erfolgt nach IL-8-Aktivierung eine IL-8-gekoppelte GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen.

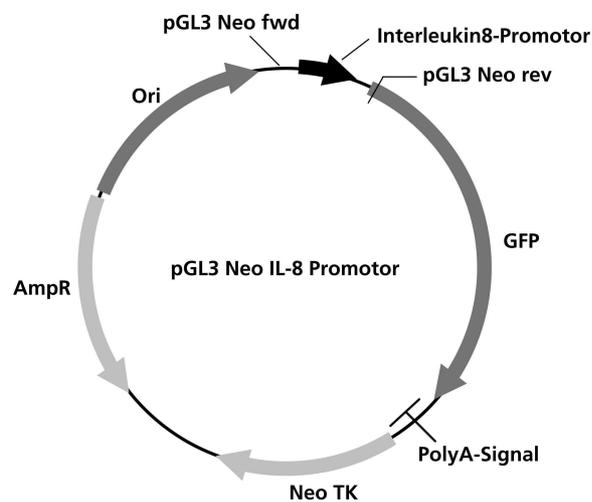


Abbildung 4-6 Schematischer Aufbau des modifizierten pGL3-Neo-Basisvektors.

Der pGL3-Neo-Vektor enthält nach Modifikation die IL-8-Promotersequenz und einen GFP-codierenden Expressionsvektor (GFP). Zusätzlich wurden zwei Primer zur Konformation der stabilen Insertion der Reportergene in das Genom eingebracht (pGL3 Neo fwd und pGL3 Neo rev) (nach Oostingh et al. 2008²⁷⁵).

Die Transfektion der Reporterzelllinie erfolgte durch Dr. Gertie Oostingh (Abteilung Allergie und Immunologie von Herrn Prof. Dr. Albert Duschl, Fachbereich Molekulare Biologie, Paris Lodron Universität Salzburg, Österreich) unter Anwendung des Effectene Transfektionsreagenz (Qiagen). Nach Abschluss der Transfektion wurden die Zellen in G418-haltigem (0,5 g/l) RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10 % (v/v) FKS, 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, kultiviert. Eine Expansion der vitalen transfizierten Zellen fand nach sieben Tagen statt. Die stabile Expression des GFP wurde durch ELISA-Analyse und Durchflusszytometrie in der Abteilung Allergie und Immuno-

logie (Prof. Dr. Albert Duschl, Fachbereich Molekulare Biologie, Paris Lodron Universität Salzburg) bestätigt.

4.2.3 Partikelcharakterisierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel sind als kolloidale Nanopartikelsuspensionen kommerziell erhältlich (Tabelle 4-2).

Die Gold-Nanopartikel (\varnothing 10 nm, GC10; 80 nm, GC80) wurden mit Hilfe der Frens-Methode synthetisiert ²⁷⁶. Sie waren in einer wässrigen Lösung suspendiert, supplementiert mit den Stabilisatoren Citrat, Tanninsäure und Kaliumcarbonat. Diese Gold-Nanopartikel wurden von dem Nationalen Institut für Standardisierung und Technologie (NIST) als Referenzpartikel für präklinische biomedizinische Forschung zertifiziert ²⁷⁷.

Die kommerziell erworbenen Silber-Nanopartikel (\varnothing 10 nm, SC10; \varnothing 80 nm, SC80) wurden durch Sol/Gel-Prozesstechnik synthetisiert ²⁷⁸. Die Nanopartikellösungen wurden vor ihrem Einsatz zu Versuchen steril filtriert (Porengröße 0,22 μ m).

Die Synthese der käuflich erworbenen Magnetit-Partikel (\varnothing 100 nm, MC100) erfolgte in einem 2-Schrittverfahren. Zu Beginn wurden die superparamagnetischen Magnetitkerne durch nasschemische Ausfällung aus einer Eisen-III-/Eisen-II-Salzlösung hergestellt. Diese wurden anschließend mit der Stärkematrix beschichtet. Danach wurde die kolloidale Nanopartikelsuspension autoklaviert, um sie für *in vitro* Untersuchungen anzuwenden. Aufgrund der FDA-Zulassung von Magnetit-Nanopartikeln für die biomedizinische Anwendung wurden sie als Referenzpartikel zur Etablierung des in dieser Arbeit entwickelten *in vitro* Systems verwendet.

Alle Nanopartikelsuspensionen wurden hinsichtlich Lipopolysaccharid-Kontaminationen untersucht und physikochemisch charakterisiert.

Tabelle 4-2 Herstellerangaben zu den verwendeten Nanopartikeln.

Material	Durchmesser	Konzentration		Hersteller	Bezeichnung
		Partikel/ml	μ g/ml		
Gold	10	$5,7 \times 10^{12}$	57,6	BBInternational, Cardiff, Wales	GC10
Gold	80	$1,1 \times 10^{10}$	56,9	BBInternational, Cardiff, Wales	GC80
Silber	10	$1,8 \times 10^{13}$	100	PlasmaChem GmbH, Berlin	SC10
Silber	80	$1,1 \times 10^9$	3,08	BBInternational, Cardiff, Wales	SC80
Magnetit	100	$1,8 \times 10^{15}$	50	Chemicell GmbH, Berlin	MC100

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen der Nanopartikel wurden die kolloidalen Nanopartikelsuspensionen zentrifugiert (800 g, 10 min), der Überstand verworfen und die sedimentierten Nanopartikel in 100 μ l destilliertem Wasser resuspen-

diert. 4 µl der Nanopartikelsuspension wurden zentriert auf ein Kupfernetz (TEM Grid S162, 200 mesh) pipettiert und das Wasser verdampft. Die TEM-Aufnahmen der getrockneten Nanopartikel fand an einem Transmissionselektronenmikroskop F30 (FEI) bei einer Elektronenspannung von 20 kV statt.

Bestimmung der Oberflächenladung

Die Messung der Oberflächenladung (Zeta-Potenzial) ist eine gebräuchliche Methode zur Bestimmung der Stabilität einer Suspension bestehend aus elektrostatisch stabilisierten Nanopartikeln. Dabei wird das elektrische Potenzial an der Grenzfläche einer festen und einer flüssigen Phase analysiert (in erster Näherung an eine Helmholtz-Doppelschicht).

Die Messungen des Zeta-Potenzials erfolgten mit Hilfe des Malvern ZetaSizer Nano. 800 µl der kolloidalen Nanopartikelsuspension wurden in die Küvette Zeta Cell DTS 1060C pipettiert und die spezifischen Parameter (Brechungsindex und Absorptionskoeffizient des Nanomaterials sowie die Viskosität des verwendeten Lösungsmittels) im Softwareprogramm eingegeben. Der ZetaSizer kalkuliert das Zeta-Potenzial durch Ermittlung der elektroforetischen Mobilität unter Anwendung der Henry-Gleichung (Formel 4).

Formel 4
$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f_{(ka)}}{3\eta}$$

U_E : Elektroforetische Mobilität; ε : Dielektrische Konstante; ζ : Zeta-Potenzial; $f_{(ka)}$: Henry-Gleichung; η : Viskosität der Lösung.

Photonenkorrelationspektroskopie

Die Photonenkorrelationspektroskopie, auch als dynamische Lichtstreuung (DLS) bekannt, ist ein optisches Messverfahren zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers kolloidaler Partikel. Das Messprinzip beruht auf der Brownschen Molekularbewegung, der Wärmebewegung der untersuchten Partikel in Flüssigkeiten (Tyndall-Effekt).

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Größe der Nanopartikel wurde eine 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnte Lösung der Partikel in die Küvette Zeta Cell DTS 1060C gefüllt und in einer auf 24 °C temperierte Kammer des Malvern ZetaSizer Nano positioniert. Mittels He-Ne-Laser (632 nm) wurde die Größenverteilung in der Partikelsuspension detektiert. Da die realen Ausmaße eines Teilchens in Lösung nicht direkt messbar sind, wird der hydrodynamische Radius über die Stokes-Einstein-Beziehung ermittelt (Formel 5).

Formel 5
$$D = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta r}$$

D: Diffusionskonstante; κ_B : Boltzmannkonstante; T: Temperatur; r: Hydrodynamischer Radius; η : Viskosität des Lösungsmittels.

UV/VIS-Spektroskopie

Die Bestimmung des Absorptionsmaximums der Nanopartikelsuspensionen erfolgte mittels UV/VIS-Spektroskopie. Diese Technik eignet sich hauptsächlich für metallische Materialien wie Gold und Silber, da diese charakteristischen Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich aufweisen (Oberflächenplasmonresonanz), das von der Materialgröße und Oberflächenmodifikation abhängt. Grundlage für die spektralanalytische Methode bildet das Lambert Beer'sche Gesetz.

1 ml der Nanopartikelsuspension wurde in eine spezifische Küvette appliziert und spektralphotometrisch analysiert. Mittels UV/VIS Zweistrahlenspektrometer (Lambda 950, Perkin Elmer) wurde eine UV/VIS-Spektralanalyse in einem Wellenlängenbereich von 300 nm - 1 000 nm durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Analyse der Morphologie der Herpes-simplex-Viren Typ-1 (HSV1) erfolgte unter Anwendung der Rasterelektronenmikroskopie.

Der Virusstamm wurde von LGC Standards GmbH (ATCC-VR-1383) bezogen. Der $TCID_{50}$ betrug $10^{6,75}$. Vor Beginn der REM-Analyse wurden 10 μ l HSV1-Stammlösung auf die Si_xN_y -Membran des MKCs pipettiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels erfolgte das Besputtern der HSV1 mit Gold. Die REM-Aufnahmen fanden an einem Elektronenmikroskop 109T (Zeiss) bei einer Elektronenspannung von 5 kV statt.

4.2.4 Zytotoxikologische Methoden

Partikelpräparation

Nanopartikel

Vor Durchführung der zytotoxikologischen Untersuchung der Nanopartikel wurde die Stammlösung der Nanopartikelsuspensionen 30 Sekunden unter Verwendung eines Schüttlers aufgerührt. Zur Herstellung der jeweiligen Konzentrationen (0 - 50 μ g/ml) wurde ein Aliquot der Nanopartikelstammlösung zu dem in einem Polypropylenröhrchen vorgelegten Kulturmedium pipettiert, so dass alle Nanopartikellösungen das gleiche Gesamtvolumen aufwiesen.

Um zu belegen, dass die detektierten Effekte von den Nanopartikeln und nicht von den im Lösungsmittel befindlichen Zusatzstoffen wie z. B. Stabilisatoren oder Ionen induziert wurden, wurden die Nanopartikel abzentrifugiert (1 000 rpm, 15 Minuten) und der Überstand ebenfalls für die Nanotoxizitätsstudien eingesetzt.

Viren

Vor Durchführung der zytotoxikologischen Untersuchung der Herpes-simplex-Viren (HSV1) wurde die Stammlösung ($TCID_{50} = 10^{6,75}$) mit Kulturmedium verdünnt, um Konzentrationen im Bereich von MOI (Multiplizität der Infektion) 0,0014 und MOI 0,14 zu erhalten. Der MOI wurde mit Hilfe der Formel 6 berechnet. Zur Herstellung der jeweiligen Konzentrationen wurden Aliquots der HSV1-Stammlösung zu dem in einem Polypropylenröhrchen vorgelegten Kulturmedium pipettiert, so dass alle HSV1-Lösungen das gleiche Endvolumen besaßen.

Formel 6

$$MOI = \frac{(\text{Konzentration}_{\text{Virus}} \times \text{Volumen}_{\text{Virus}})}{(\text{Konzentration}_{\text{Zellen}} \times \text{Volumen}_{\text{Zellen}})}$$

MOI: Multiplizität der Infektion; Konzentration_{Virus}: Viruskonzentration; Volumen_{Virus}: Volumen der Virussuspension; Konzentration_{Zellen}: Konzentration der Zellsuspension; Volumen_{Zellen}: Volumen der Zellsuspension.

Zellaussaat

Zellaussaat in den 96-Loch-Mikroplatten

Zur Bestimmung des zytotoxischen Potenzials der Partikel wurden 10 000 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Mikroplatte ²⁷⁹ in 100 µl Kulturmedium bei 37 °C für 24 Stunden kultiviert.

Zellaussaat in den Mikrokapazitäten

Zur Bestimmung des zytotoxischen Potenzials der Partikel wurden 50 µl Zellsuspension (100 000 Zellen/ml) zentriert in die sechs Kapazitäten des MKCs pipettiert. Nach 30 Minuten bei 37 °C wurden 200 µl Kulturmedium in jede der sechs Kultivierungseinheiten pipettiert und die Zellen bei 37 °C für 24 Stunden kultiviert (Abbildung 4-7).

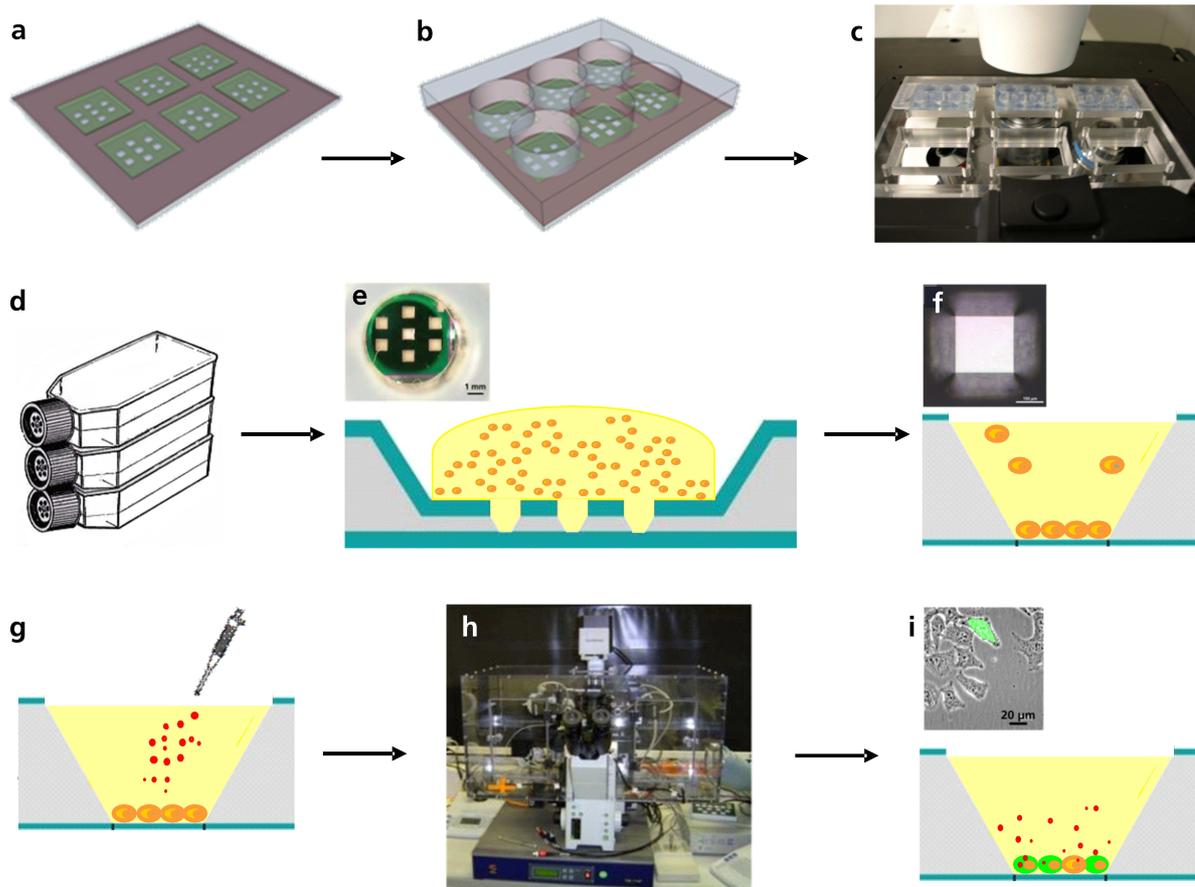


Abbildung 4-7 Schematische Darstellung des Ablaufs der Zellaussaat in den Mikrokanalitäten bis hin zu der Quantitativen Analyse spezifischer Zellreaktionen individueller Zellen in der Mikrokanalität.

Der Mikrokanalitätenchip (MKC) (a) wird mit dem Silikonadapter kombiniert (b) und in einem Arrayadapter positioniert (c). Die adhären in einer Zellkulturflasche wachsenden pIL8-GFP A549-Zellen werden trypsinisiert (d) und auf den MKC transferiert. Dazu werden 50 μl Zellsuspension (10 000 Zellen/ml) in jede der sechs Kultivierungseinheiten des MKCs pipettiert (e). Nach 30minütiger Kultivierung der Zellen bei 37 $^{\circ}\text{C}$ haben sich die Zellen in die Mikrokanalitäten abgesetzt und die Kultivierungseinheiten werden mit jeweils 200 μl Kulturmedium aufgefüllt (f). Nach 24 Stunden erfolgen die Aspiration des Mediums und das Waschen der Zellen mit PBS. Hierbei werden die nicht adhären Zellen entfernt. Anschließend folgt die Zugabe von partikelhaltigem Kulturmedium (200 μl /Kultivierungseinheit) (g). Die mit einer GFP-Expression gekoppelten Inflammation der individuellen Zellen der *in vitro* Kultur in der Mikrokanalität werden unter physiologischen Bedingungen mit einem Fluoreszenzmikroskop permanent charakterisiert (h). Durch Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme mit der hellfeldmikroskopischen Aufnahme kann die GFP-Expression jeder Zelle in der Mikrokanalität erfasst und quantifiziert werden.

Partikelinkubation der Zellen

Partikelinkubation in den 96-Loch-Mikroplatten

Nachdem die adhären Zellen mit PBS gewaschen wurden, erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Partikelsuspension (100 μl /Loch einer 96-Loch-Mikroplatte). Die Inkubation erfolgte bei 37 $^{\circ}\text{C}$ für 4, 24, 48 und 72 Stunden. Zur Berücksichtigung der Hintergrundabsorption durch das Kulturmedium, wurde eine Referenzkontrolle ohne

Zellen als Nullwert festgelegt. Zur Eruierung der Interaktion der Partikel und den eingesetzten Testreagenzien wurde eine Referenzkontrolle ohne Zellen (Blank) mitgeführt. Diese wurde vor Beginn der statistischen Berechnungen von dem korrespondierenden Messwert subtrahiert. Als Positivkontrolle wurde das nichtionische Tensid TritonX-100 2 % (v/v) (WST-1 Assay, BrdU Assay, FDA/PI-Färbung) oder Wasserstoffperoxid 5 mM (*APOPercentage* Apoptosis Assay), 1 μ M Staurosporin (Caspase 3/7 Assay) oder 20 ng/ml TNF- α (Bestimmung der Inflammation) verwendet. Nach Ende der Expositionsdauer wurde das zytotoxische Potenzial bestimmt.

Partikelinkubation in den Mikrokapitäten

Die adhärenten Zellen wurden mit PBS gewaschen, danach erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Partikelsuspension (200 μ l/Kultivierungseinheit eines MKCs) und deren Inkubation bei 37 $^{\circ}$ C für 4, 24, 48 und 72 Stunden. Als Positivkontrolle wurde das nichtionische Tensid TritonX-100 1 % (v/v) (FDA/PI-Färbung) oder Wasserstoffperoxid 5 mM (*APOPercentage*TM Apoptosis Assay) oder 20 ng/ml TNF- α (Bestimmung der Inflammation) verwendet. Nach Ende der Expositionsdauer wurde das zytotoxische Potenzial bestimmt (Abbildung 4-7).

Bestimmung der Vitalität (Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid-Färbung)

Die Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid-Färbung (FDA/PI-Färbung) basiert auf der unterschiedlichen Membrangängigkeit der beiden Fluoreszenzfarbstoffe. Fluoresceindiacetat (FDA) ist ein membrangangiger Farbstoff, der von vitalen Zellen zu dem grün fluoreszierenden Fluorescein metabolisiert wird. Der rot fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert in Nukleinsäuren und ist nicht membrangängig, so dass nur membrangeschadigte Zellen durch PI angefärbt werden.

Zur Bestimmung der Vitalität erfolgte die Inkubation der Zellen mit der FDA/PI-Lösung (30 μ g/ml FDA, 40 μ g/ml PI) für 15 Sekunden. Es folgte ein Waschschritt mit PBS. Um die zeitabhängige Reduktion der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs zu minimieren, wurden die mit PBS beschichteten Zellen unmittelbar im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch untersucht (ex_{FDA} 470 nm/ em_{FDA} 525 nm; ex_{PI} 555 nm/ em_{PI} 602 nm). Zur Quantifizierung wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit Hilfe der Software *analySIS* (Olympus) ausgewertet und die Vitalitatsrate anhand Formel 7 berechnet.

Formel 7 Zellvitalität (%) = $\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$

Bestimmung der mitochondrialen Aktivität (WST-1 Assay)

Der WST-1 Assay ermöglicht die Bestimmung der Aktivität des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems (STRS) eukaryontischer Zellen. Er beruht auf der Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendi-sulfonat (WST-1) durch das STRS. Die Entstehung des gebildeten dunkelroten Formazan-Farbstoffes korreliert mit der Anzahl mitochondrial aktiver Zellen in der untersuchten Population. Da die Aktivität des STRS von dem physiologischen Status der Zelle abhängt, diente die Umwandlung des WST-1 Reagenz als relatives Maß für die Viabilität der untersuchten Zellpopulation¹⁵⁶. Die mitochondriale Aktivität wurde nach Formel 8 berechnet.

Formel 8 Mitochondriale Aktivität (%) =
$$\frac{(OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{Blank}})}{(OD_{\text{Kontrolle}} - OD_{\text{Blank}})} \times 100$$

OD_{Probe}: Optische Dichte der nanopartikelbehandelten Zellen; OD_{Kontrolle}: Optische Dichte der unbehandelten Zellen; OD_{Blank}: Optische Dichte des nanopartikelhaltigen Mediums ohne Zellen.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 10 µl (in 100 µl Kulturmedium pro Loch) WST-1-Reagenz versetzt. Nach 0,5 - 3 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die 96-Loch-Mikroplatte 5 Sekunden horizontal geschüttelt und anschließend die Absorption in den einzelnen Löchern bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) photometrisch vermessen.

Bestimmung der Zellproliferation (BrdU Assay)

Der BrdU Assay ermöglicht die Bestimmung der zellulären Proliferationsrate. Der Test beruht auf der Detektion der BrdU-Inkorporation in die DNA proliferierender Zellen. Das Desoxynukleosid 5-bromo-2-deoxyuridin (BrdU) ist strukturell stark mit der Pyrimidin-Nukleobase Desoxythymidin verwandt (Abbildung 4-8).

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde das Kulturmedium der Zellen für 2 Stunden mit dem BrdU-Markierungsreagenz (Verhältnis 10:1) versetzt. Durch den Überschuss an BrdU im Kulturmedium wird dies während der S-Phase des Zellzyklus in phosphorylierter Form, anstelle des Desoxythymidinphosphates (dTTP), in die DNA eingebaut. Nach dem Entfernen der Markierungslösung erfolgte die Inkubation der Zellen für 30 Minuten mit 200 µl Fixatorlösung (FixDenat). Die fixierten Zellen mit partiell denaturierter BrdU-markierter DNA wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 100 µl BrdU-Antikörperlösung (monoklonaler Anti-BrdU-Peroxidase-Antikörper) inkubiert. Im Anschluss wurde die BrdU-Antikörperlösung abgenommen, die Probe dreimal mit 200 µl Waschpuffer gespült und nach Zugabe von 100 µl Substratlösung (Lösung des Ammoniumsalzes ABTS) für 5 Minuten unter horizontaler Rotation (300 rpm) bei Raumtemperatur inku-

biert. Durch Zugabe von 1 N Schwefelsäure (25 µl/100 µl Substratlösung) wurde die Reaktion des Substrates mit dem an den Antikörper gekoppelten Enzym gestoppt, die 96-Loch-Mikroplatte weitere 5 Minuten geschüttelt (300 rpm) und zur Quantifizierung des Reaktionsprodukts die Absorption der einzelnen Mikroplattensegmente bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) mittels Multiwell-Spektrophotometer vermessen.

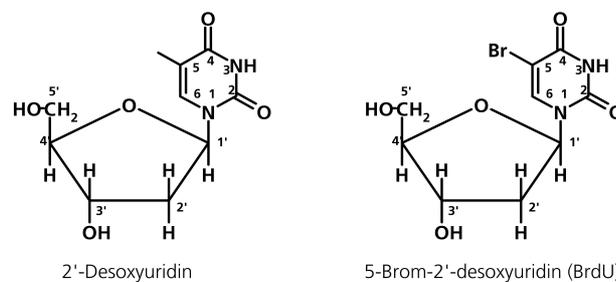


Abbildung 4-8 Vergleich der chemischen Struktur der 2'-Desoxynucleoside 2'-Desoxyuridin und 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU).

Bestimmung der Inflammation

Zur Untersuchung der Induktion einer Entzündungsreaktion wurde die Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 verwendet. Diese trägt das GFP-Gen als Reportergen das unter der Kontrolle der IL-8-Promotorsequenz steht. Die Produktion des Entzündungsmediators IL-8 ist mit einer GFP-Expression gekoppelt. Hierbei ist die Intensität der IL-8-Produktion und somit die Intensität der Entzündungsreaktion proportional zu der GFP-Expression, die fluoreszenzmikroskopisch und fluorometrisch detektiert werden kann.

Bestimmung der Inflammation in den 96-Loch-Mikroplatten

Zur fluorometrischen Quantifizierung der Inflammation und zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Probe, wurden schwarze Mikroplatten mit transparentem Boden eingesetzt.

Nach Inkubation der Zellen mit der entsprechenden Partikelsuspension wurde das nanopartikelhaltige Medium aspiriert, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 100 µl PBS pro Loch der Mikroplatte beschichtet. Mit einer Extinktionswellenlänge von 485 nm (Emissionswellenlänge 535 nm) wurde die GFP-Intensität fluorometrisch quantifiziert.

Bestimmung der Inflammation in den Mikrokavitäten

Nach Inkubation der Zellen mit der entsprechenden Partikelsuspension in der Mikrokavität wurde das partikelhaltige Medium aspiriert, die Zellen mit PBS gewaschen und

mit 50 µl PBS/Kultivierungseinheit des MKCs beschichtet. Die GFP-Expression der Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht (ex. 470 nm/em. 525 nm). Die erhaltenen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden hinsichtlich Fluoreszenzintensität und Anzahl GFP-exprimierender Zellen mit Hilfe der Software *analysis* (Olympus) ausgewertet.

Bestimmung der Apoptose (*APOPercentage* APOPTOSIS Assay)

Der *APOPercentage* Apoptosis Assay ermöglicht die nichtinvasive Detektion apoptotischer Zellen sowie die Quantifizierung des Apoptosestatus mittels Phasenkontrastmikroskopie *in vitro*.

Die Membran einer Säugerzelle besteht aus einer Phospholipidschicht. Die Verteilung der Phospholipide in der Zellmembran wird aktiv durch zwei verschiedene Enzyme aufrechterhalten: (i) Die Flippase und (ii) die Scramblase (auch Floppase genannt)²⁸⁰. Bei einer Aktivierung der Scramblase und der Hemmung der Flippaseaktivität erfolgt ein Zusammenbruch der Membranasymmetrie. Dies führt zu einem Phosphatidylserin-Flip, der die Apoptoseinduktion einleitet. In der terminalen Phase der Apoptose löst sich die asymmetrische Verteilung der Plasmamembran und es kommt zu einer Translokation von Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite (Abbildung 4-9). Dieses Prinzip nutzt der *APOPercentage* Apoptosis Assay.

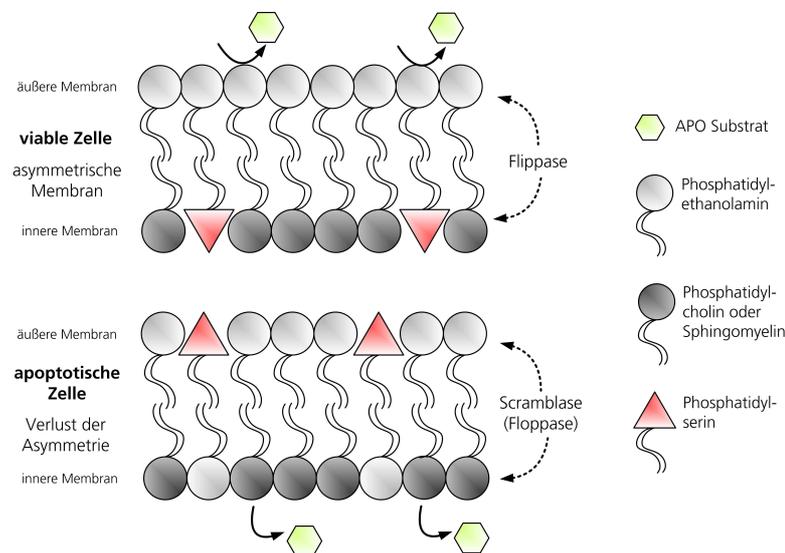


Abbildung 4-9 Die Asymmetrie der Lipidschicht einer Säugerzelle führt zur Apoptoseinduktion.

Die Verteilung der Phospholipide in der Zellmembran wird aktiv durch zwei verschiedene Enzyme aufrechterhalten: Die Flippase und die Scramblase. In viablen Zellen liegt eine asymmetrische Zellmembran vor, deren Erhalt über die Flippase gesteuert wird. Die Aktivierung der Scramblase führt zu einem Phosphatidylserin-Flip, der den Verlust der Membranasymmetrie induziert. Die Translokation von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran erlaubt die Aufnahme des APO Substrats in die Zelle (modifiziert nach Biocolor Ltd.²⁸¹).

Zur Bestimmung des Apoptosestatus wurde das Kulturmedium 30 Minuten vor Ende der Inkubation der Zellen mit dem APO Substrat (1:20 Verdünnung) versetzt. Unter physiologischen Bedingungen gelangt hierbei der Farbstoff über die defekte Membran in die Zelle und färbt diese pink. Nach dem Entfernen der Färbelösung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in direktem Anschluss mittels Hellfeldmikroskopie untersucht. Um die Anzahl der apoptotischen Zellen sowie das Apoptoselevel (über die Anzahl der Pixelwerte) zu quantifizieren, wurde das Softwareprogramm *GIMP2* verwendet (Einstellungen: Posterize Level 3, Threshold color 15 %).

Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität

Zur Bestimmung der Apoptose wurde der Caspase-Glo 3/7 Assay angewandt. Das Prinzip des Assays beruht auf zwei enzymatischen Reaktionen: (i) Das Substrat Z-DEVD-Aminoluciferin wird durch die Caspasen 3 und 7 gespalten. (ii) Das dabei freigesetzte Aminoluciferin dient als Substrat für die thermostabile Ultra Glow Luciferase. Bei dieser katalytischen Spaltung entsteht ein Lumineszenzsignal, das proportional zu der Menge aktivierter Caspasen ist.

Zur Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität wurden 100 µl Caspase-Glo 3/7 Reagenz pro Loch zu den nanopartikelinkubierten Zellen pipettiert. Unter Schütteln (10 Minuten, 200 rpm) wurden die Zellen lysiert und nach 30minütiger Inkubation das entstandene Lumineszenzsignal mittels Luminometer (Detektionszeit 2000 ms) quantifiziert.

Bestimmung der Interaktion von Nanopartikeln mit Analyseparametern der Toxizitätstests

Die Interaktion der Nanopartikel mit Analyseparametern der Toxizitätstests wurde am Beispiel des Laktatdehydrogenase (LDH) Assays untersucht. Dieser dient der Bestimmung der Zellmembranintegrität. Die Zerstörung der Zytoplasmamembran der Zellen ist ein morphologisches Charakteristikum der Nekrose. Sie führt zu einer Freisetzung von zytoplasmatischen Bestandteilen in das Zellkulturmedium wie z. B. dem im Zytoplasma aller Prokaryonten vorkommenden Enzym LDH. Die indirekte Bestimmung der Membranintegrität basiert auf der Quantifizierung der LDH-Aktivität durch die Umsetzung eines Formazan-Salzes. Eine Interaktion der Nanopartikel mit dem Enzym LDH würde zu einer Minderung, bis hin zu einer Inaktivierung der Enzymaktivität führen und somit eine Umsetzung des Formazan-Salzes erschweren.

Zur Untersuchung der Interaktion der Nanopartikel mit dem Enzym LDH wurden adhärente pIL8-GFP A549-Zellen lysiert, der Mediumüberstand zentrifugiert und im Anschluss mit 0-27 µg/ml SC10 oder GC80 versetzt. Nach 4stündiger Inkubation des Nanopartikel-Kulturmedium-Gemischs unter physiologischen Bedingungen, wurden je

100µl/Loch des Gemischs in eine 96-Loch-Mikroplatte überführt und im Verhältnis 1:1 mit dem LDH-Reagenz versetzt. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Formazanbildung bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) photometrisch quantifiziert.

4.2.5 Virologische Methoden

Zur Untersuchung des Einflusses der Herpes-simplex-Viren Typ-1 (HSV1) auf die Induktion von Entzündungsreaktionen wurden pIL8-GFP A549-Zellen für 24 und 48 Stunden mit MOI (multiplicity of infection) 0,0014 - 0,14 behandelt. Die Quantifizierung der Inflammationsinduktion und der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität erfolgte gemäß Kapitel 4.2.4.

HSV1-Vermehrung in Vero-Zellen

Bei der Replikation des Herpes-simplex-Virus (HSV1) wurden adhärente Vero-Zellen verwendet. Ein 90 % konfluenter Zelllayer wurde in einer T75-Zellkulturflasche mit HSV1 (MOI 0,02) in serumfreiem Kulturmedium infiziert. Nach 4stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das HSV1-haltige Kulturmedium aspiriert und durch serumhaltiges Kulturmedium (10 ml) ersetzt. Bis zum Erreichen des zytopathischen Effekts (CPE) wurden die Vero-Zellen für 3 Tage bei 37 °C kultiviert. Das virushaltige Kulturmedium wurde anschließend entfernt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -80 °C gelagert.

4.2.6 Langzeitmikroskopie

Um zu prüfen, ob in der Mikrokavität eine kontinuierliche Charakterisierung der GFP-Expression möglich ist, wurden pGFP-N1 A549-Zellen gemäß 4.2.4 in der Mikrokavität kultiviert und unter Anwendung der Biostation IM-Q mikroskopische Langzeitaufnahmen (Time Lapse Microscopy) durchgeführt. Hierbei erfolgte über den Kultivierungszeitraum von 60 Stunden im 30 Minuten-Takt eine fluoreszenz- und eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme an der gleichen Stelle der Probe.

Zur Untersuchung des Einflusses der Nanopartikel auf die Induktion von Entzündungsreaktionen wurden mikroskopische Langzeitaufnahmen mit der Biostation CT durchgeführt. Diese ermöglicht eine kontinuierliche Observation der Induktion spezifischer Prozesse *in vitro*. Zur Untersuchung der nanopartikelinduzierten Entzündungsreaktion wurden 100 000 pIL8-GFP A549-Zellen in Kulturgefäßen mit speziellem Glasbodeneinsatz (Ø 35 mm) für 24 Stunden kultiviert und mit 30 µg/ml GC10 oder SC10 inkubiert. Während der Inkubationszeit (48 Stunden) erfolgte im 30 Minuten-Takt eine fluoreszenz- und eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme an der gleichen Stelle

der Probe. Die Einzelbilder wurden im Anschluss mit der Software *analySIS* (Olympus) analysiert.

Zur Untersuchung des Einflusses der Nanopartikel auf die adipogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs) wurden 100 000 hMSCs in Kulturgefäßen mit speziellem Glasbodeneinsatz (\varnothing 35 mm) bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Durch Austausch des Kulturmediums mit dem adipogenen Differenzierungsmedium, supplementiert mit 22,8 $\mu\text{g/ml}$ GC80, wurde die adipogene Differenzierung induziert. Während der 18tägigen Differenzierung, unter chronischer GC80-Exposition, wurde alle 2 Stunden ein phasenkontrastmikroskopisches Bild mehrerer Ausschnitte der Probe aufgenommen. Die erzeugten Daten wurden mit der Software *GIMP* hinsichtlich Differenzierungspotenzials analysiert.

4.2.7 Multiphotonenbasierte Rasterlasermikroskopie

Die zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel wurde mittels konfokaler Rasterlasermikroskopie (confocal laser scanning microscopy, CLSM) in Kombination mit der multiphotonenbasierten Rasterlasermikroskopie (multiphoton-based laser scanning microscopy, MP-LSM) untersucht. Die Analysen basieren auf der Fähigkeit metallische Nanopartikel wie Gold, Silber und Magnetit, mittels Multiphotonenanregung zu visualisieren^{282, 283}. Hierzu wurden A549-Zellen auf 8-Kammer-Glasobjektträgern kultiviert. Nach 24stündiger Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Nanopartikelsuspensionen bei 37 °C und zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Färbung der Zellmembran mit 50 $\mu\text{g/ml}$ des AlexaFluor 488-gekoppelten Membranfarbstoffs Concanavalin A (2 Minuten). Nach 5minütiger Fixierung mit 1 % (w/v) PFA wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und in Vectashield-HardSet-Mounting-Medium, das DAPI zur Kernfärbung enthielt, eingebettet. Die MP-LSM-Studie erfolgte an einem konfokalen Rasterlaser-Mikroskopsystem (Axiovert 200 M mit einer 510-NLO-Metaeinheit, Zeiss) mit einem Titan:Saphir-Femtosekunden- sowie einem Argon-Ionen-Laser. Für die CLS-mikroskopische Darstellung der mit Concanavalin A AlexaFluor 488 gefärbten Zellmembran wurden die Laserwellenlängen 488/520 nm genutzt. Die Darstellung der Gold- sowie Silber-Nanopartikel nach Multiphotonenanregung, mit einer Wellenlänge von 820 nm, basiert auf der Reflektion von Gold und Silber, die um ein Vielfaches stärker ist als die Reflektion von Glas. Zur Auswertung der Daten wurde die LSM Image Examiner Software herangezogen.

4.2.8 Rasterelektronenmikroskopie

Zellpräparation

Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurde der zu untersuchende Zelltyp auf der Si_xN_y -Membran der MKCs für 48 Stunden sowie 7 Tage bei 37 °C kultiviert. hMSCs wurden 18 Tage adipogen differenziert. Um die Struktur der Zellen im REM sichtbar zu machen, erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS eine 12stündige Fixierung der Proben mittels Cacodylat/Glutaraldehydpuffer²⁸⁴. Es folgte ein dreimaliges Waschen der fixierten Zellen mit Cacodylatpuffer 0,15 M. Die anschließende einstündige Inkubation mit 2 % Osmiumtetroxid (in 0,3 M Cacodylatpuffer) diente der Kontrastierung. Die fixierten Proben wurden mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und für eine Stunde mit 1 %iger Tanninsäure inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Proben mit destilliertem Wasser wurden diese 20 Minuten mit 1 %igem Uranylacetat inkubiert. Mehrmaliges Waschen der Zellen befreite diese von überschüssigem Uranylacetat. Bis zur Durchführung der kritischen Punkt-Trocknung lagerten die präparierten Zellen bei 4 °C in Wasser.

Kritische Punkt-Trocknung

Die kritische Punkt-Trocknung (CPD) dient dem Austausch von dem im Probenmaterial enthaltenen Wasser durch flüssiges CO_2 . Durch Vermeidung von Oberflächenkräften verhindert dieses Verfahren die Deformation der Proben und die Zerstörung feiner Oberflächenstrukturen. Vor Beginn der CPD erfolgte eine Entwässerung der Proben durch Inkubation mit getrocknetem Ethanol, der Konzentrationen 50 % (v/v), 70 % (v/v), 80 % (v/v), 90 % (v/v) und 100 % (v/v) für jeweils 15 Minuten. Nach der Entwässerung wurde das Präparat in einem geeigneten Probenhalter zusammen mit dem Medium Aceton in die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners eingesetzt. Nach Einbringen des Präparates in die Druckkammer wurde diese mit flüssigem CO_2 gefüllt. Das mit Aceton gemischte CO_2 wurde über das Auslassventil schrittweise abgelassen. Hierbei erfolgte ein Austausch des in den Proben enthaltenen Wassers über Aceton als Zwischenstufe durch flüssiges CO_2 . Nach dem restlosen Austausch gegen CO_2 (55 bar und -12 °C) wurde die Probe innerhalb weniger Minuten auf 36 °C erhitzt. Hierbei stieg der Druck auf 75 bar an und es kam zu einer sekundenschnellen Starre der Zellen und dadurch zu einer Fixation der vorliegenden Oberflächenstrukturen. Die CPD-behandelten Proben wurden auf einen REM-Probenhalter aufgebracht, eventuelle Lücken zwischen Probenmaterial und Probenträger mit Leitsilber überbrückt und der REM-Analyse unterzogen.

Mikroskopie (REM)

REM ist ein Verfahren zur morphologischen und analytischen Untersuchung von Oberflächen. Die Vielseitigkeit beruht auf der Möglichkeit gleichzeitig unterschiedliche Kontraste (wie Topographiekontrast oder Materialkontrast) darstellen zu können. Vor Beginn der REM-Analyse wurde die biologische Probe in einer evakuierten Probenkammer mit Gold besputtert. Das Objektmaterial wurde in der Probenkammer des REM auf einem im Objektisch sitzenden aluminiumhaltigen Präparathalter befestigt, der eine gute elektrische Ableitung der auftreffenden Primärelektronen garantiert. Die REM-Aufnahmen erfolgten an einem Rasterelektronenmikroskop LEO 435VP (Röntec), einem Rasterelektronenmikroskop EM109T (Zeiss) sowie dem Rasterelektronenmikroskop FESEM XL30 (FEI). Aufgrund der Wechselwirkung zwischen Elektronen und Materie können durch Primärelektronenstrahlen verschiedene Signale (SE, RE, Licht, Röntgenstrahlen) entstehen. Jedes dieser Signale erfordert für die Registrierung einen speziellen Detektor (Abbildung 4-10). In der vorliegenden Arbeit wurden der Sekundärelektronendetektor (SE-Detektor) sowie der Rückstreuelektronendetektor (QBSD-Detektor) verwendet. Der SE-Detektor ermöglicht die morphologische Darstellung (Topographie) des Analysematerials. Der QBSD-Detektor bildet die kristallographische Struktur des Probenmaterials ab und ermöglicht somit Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der Probe, beziehungsweise der Verteilung verschiedener Materialien im Bild.

Mit zunehmender Energie der Primärelektronen (steigender Beschleunigungsspannung) steigt die Größe des Wechselwirkungsvolumens und somit erhöht sich die Eindringtiefe der Primärelektronen in das Objektmaterial. Auch die Ordnungszahl des Probenmaterials beeinflusst die Reichweite der Primärelektronen. Wird die Probenoberfläche von dem Primärstrahl abgetastet, werden im Wechselwirkungsvolumen (Anregungsbirne), abhängig von dem jeweiligen Material sowie der eingestellten Beschleunigungsspannung, Sekundärprodukte gebildet, die für die bildliche Darstellung und die Analyse genutzt werden können (Abbildung 4-11).

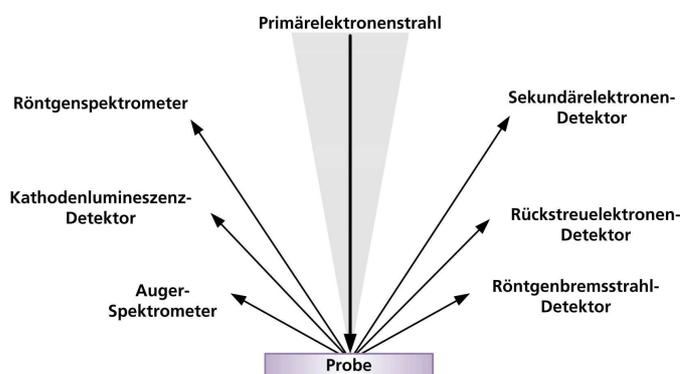


Abbildung 4-10 Möglichkeiten der Detektion der durch Primärelektronen in einer Probe erzeugten Sekundärsignale.

Aufgrund der Wechselwirkung zwischen Elektronen und Materie können durch Primärelektronenstrahlen verschiedene Signale (Sekundärelektronen, Rückstreuelektronen, Licht oder Röntgenstrahlen) entstehen. Jedes dieser Signale erfordert für die Registrierung einen speziellen Detektor (modifiziert nach Flegler et al. 1997 sowie Zhou und Wang 2006^{285, 286}).

Zur Elementanalyse der inkubierten Nanomaterialien wurde die energiedispersive Röntgenstrukturanalyse in Kombination mit der Rasterelektronenmikroskopie angewendet. Durch die für jedes chemische Element charakteristische Austrittsenergie erfolgte die Zuordnung der Elemente zu den untersuchten Materialien.

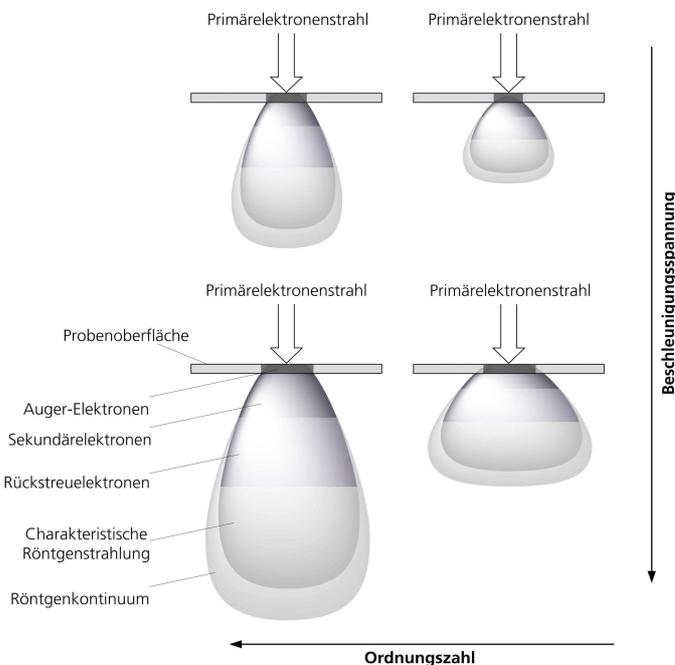


Abbildung 4-11 Größe der Elektronendifusionswolke in Abhängigkeit von der Beschleunigungsspannung und der Ordnungszahl des untersuchten Materials.

Mit steigender Beschleunigungsspannung und Anstieg der Ordnungszahl des Probenmaterials erhöht sich das Volumen der Elektronendifusionswolke (modifiziert nach Flegler et al. 1997 sowie Zhou und Wang 2006^{285, 286}).

4.2.9 Transmissionselektronenmikroskopie

Für transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurden hMSCs in Zellkulturschalen (μ -dish, 35 mm, ibidi) kultiviert. Der postkonfluente Zellmonolayer wurde unter chronischer Exposition mit 22,8 $\mu\text{g/ml}$ GC80 für 21 Tage bei 37 °C adipogen differenziert. Anschließend wurden die hMSCs vier Mal mit Zellkulturmedium gewaschen und mit 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer (0,1 M) über Nacht fixiert, um die Proteinstrukturen quer zu vernetzen. Zur Stabilisierung der Lipide und der Membranen der Zellen wurden die hMSCs in einem weiteren Fixierungsschritt mit 1 % Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer für 2 Stunden fixiert, mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und für eine Stunde mit 1 %iger Tanninsäure und 20 Minuten mit 1 %igem Uranylacetat inkubiert. Es folgte eine Entwässerung der Proben durch Inkubation mit getrocknetem Ethanol, der Konzentrationen 50 % (v/v), 70 % (v/v), 80 % (v/v), 90 % (v/v) und 100 % (v/v) für jeweils 15 Minuten. Zur weiteren Behandlung der Proben wurden Bereiche des Bodens der Zellkulturschale ausgestanzt.

Die weitere Fixierung und Einbettung der Proben sowie die Aufnahmen der transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Bilder erfolgten im Arbeitskreis von Prof. Dr.

Claudia Büchel am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Das Medium wurde durch Propylenoxid:Araldit-Lösung ersetzt. Es folgten vier Inkubationsschritte mit Propylenoxid:Araldit-Mischungen mit steigender Araldit-Konzentration (33 % - 100 %) und weitere 4 Stunden mit reinem Araldit ²⁸⁷. Während der folgenden 48 Stunden polymerisierte das Harz bei 60 °C aus. Die biologischen Proben wurden anschließend mit flüssigem Stickstoff von dem Aralditblock abgesprengt. Mit Hilfe eines Mikrotoms Ultracut S (Leica), das mit einem Diamantmesser ausgestattet war, wurden ultradünne Schnitte (50 nm) der adipogen differenzierten hMSCs angefertigt und auf Pioloform-beschichteten Kupfernetzchen gesammelt. Diese Proben wurden 12 Minuten mit 7 % Uranylacetat (in Methanol) und 8 Minuten mit Bleicitrat gefärbt und anschließend transmissionselektronisch untersucht ²⁸⁸. Für die TEM-Aufnahmen wurde ein Philips C12 Transmissionselektronenmikroskop bei 80 kV genutzt.

4.2.10 Oil Red O-Färbung

Oil Red O, ein fettlöslicher Farbstoff, dient der Färbung von in Adipozyten eingelagerten Lipidvesikeln. Im Anschluss an die adipogene Differenzierung der hMSCs wurden diese zweimal mit PBS gewaschen und 30 Minuten mit 10 % (v/v) Formaldehyd fixiert. Um Formalinreste zu entfernen, wurden die fixierten Zellen im Anschluss zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Mit 60 % (v/v) Isopropanol erfolgte die Permeabilisierung der Zellen (3 Minuten). Danach folgte die 5minütige Inkubation der Zellen mit der frisch angesetzten Oil Red O-Färbelösung (0,18 %) ²⁸⁹. Nach mehreren Waschschritten der hMSCs mit destilliertem Wasser wurden die Zellen mikroskopisch dokumentiert.

4.2.11 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden jeweils an Zellen unterschiedlicher Passagen in Mehrfachbestimmungen (drei unabhängige Triplikate) durchgeführt. Der Mittelwert wurde nach Subtraktion der Rohdaten der Probe und der Negativkontrolle kalkuliert. Jeder erhaltene Messwert wurde auf den Kontrollwert zum gleichen Zeitpunkt bezogen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (\pm SD) von unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanzanalyse erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney U-Tests.

4.2.12 Softwareunterstützte Auswertung

Für die statistische Auswertung (Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung) der generierten Messwerte wurde Microsoft Office XP (Microsoft) verwendet.

Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Origin Pro 8G (OriginLab). Zur automatischen mikroskopischen Dokumentation des Mikrokavitätenchips wurde mit LabView (National Instruments) eine Software programmiert und angewendet. Die Bestimmung des prozentualen Anteils GFP-exprimierender Zellen in der Probe sowie der Fluoreszenzintensität individueller Zellen erfolgte mit dem Analyseprogramm *analySIS* 3.2 (Olympus). Zur Quantifizierung der Pixelwerte hellfeld- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen wurde mit den Programmen GIMP2 (Version 2.6.6, GIMP) (Einstellungen: Posterize Level 3, threshold color 15 %) und *analySIS* 3.2 (Olympus) gearbeitet. Die Auswertung der Immunfluoreszenzdaten der CLSM-Aufnahmen fand mit dem Programm LSM Image Browser (Version 4.0.0157, Zeiss) statt. Abbildungen die mikroskopische Aufnahmen enthalten wurden mit dem Programm VISIO (Microsoft) erstellt.

4.2.13 Bildbearbeitung

Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen wurden an vier unterschiedlichen Fluoreszenzmikroskopen generiert. An den Mikroskopen IX81 (Olympus) und IX70 (Olympus) erfolgte eine automatische Speicherung der Fluoreszenzbilder als tiff-Dateien. CLSM-Abbildungen wurden mittels LSM Image Browser (Version 4.0.0157, Zeiss) gespeichert und als jpg-Datei exportiert. Mit dem Fluoreszenzmikroskop Observer Z1 (Zeiss) generiert Aufnahmen wurden als Datei der zugehörigen Software AxioVision Rel. 4.6 (Zeiss) gespeichert, bearbeitet (einfärben der Schwarz/Weiß-Aufnahme, Einfügen des Maßbalkens) und als jpg-Datei exportiert. Eine Aufbereitung aller jpg-Dateien hinsichtlich Helligkeit und Kontrast fand mittels VISIO (Microsoft) statt. Hierbei wurde, bei Abbildungen die mehrere mikroskopische Abbildungen enthalten, die Bildeigenschaft jedes Einzelbildes identisch verändert.

Um schwache Fluoreszenzen in den Fluoreszenzbildern besser darzustellen, wurden die CLSM-Bilder, nach Bearbeitung der Helligkeit und des Kontrastes der Einzelfluoreszenzen (Erhöhung der Einzelbilder um den gleichen Wert) mittels LSM Image Browser (Version 4.0.0157, Zeiss), als invertierte Bilder dargestellt.

Zur Analyse des prozentualen Anteils der GFP-exprimierenden Zellen, beziehungsweise des adipogenen Anteils in der Probe, wurden die während der Langzeitmikroskopie generierten Daten als jpg-Datei mit der Software *analySIS* 3.2 ausgewertet.

Die Darstellung der Überlagerung einer hellfeld- und einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme erfolgte mit dem Programm Paint Shop Pro 5 mittels Additions-Funktion.

Die in VISIO erstellten Abbildungen wurden als JPEG-Datei (Auflösung: 1000 x 1000 Pixel/Zoll) in das Textdokument eingefügt.

5 Ergebnisse

5.1 Entwicklung eines miniaturisierten *in vitro* Systems

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung eines miniaturisierten Zellkulturgefäßes zur Analyse zellulärer Reaktionen mit im Vergleich zu den konventionell verwendeten Zellkulturgefäßen aus Polystyrol oder Glas verbesserten optischen Eigenschaften. Hierbei wurde der Ansatz verfolgt, individuelle adhärente Zellen in einem Zellverband nichtinvasiv zu charakterisieren. Ein wichtiger Aspekt lag auf der Wahl des Gefäßdesigns, so dass die Miniaturisierung der Zellkulturfläche das Zellverhalten nicht negativ beeinflusst. Basierend auf der Mikroprozessortechnik, wurde ein miniaturisiertes Zellkulturgefäß hergestellt. Nach Beweis der Biokompatibilität der Mikrokavitäten konnte deren Anwendung in Kombination mit einer Reporterzelllinie als miniaturisiertes *in vitro* System gezeigt werden.

5.1.1 Entwicklung eines miniaturisierten Zellkulturgefäßes

Mittels plasmaunterstützter Gasphasenabscheidung, Photolithographie und anisotropischen Ätzens erfolgte die Herstellung eines Mikrokavitätenchips (MKC) (Länge 3,0 cm, Breite 2,5 cm). Ausgangsmaterial hierfür war ein beidseitig mit Siliziumnitrid (Si_xN_y)-beschichteter Siliziumwafer (Si-Wafer) mit einer Dicke von $528,9 \mu\text{m} \pm 1,0 \mu\text{m}$. Das Design des MKCs ist schematisch in Abbildung 5-1a dargestellt. Der entwickelte MKC besteht aus sechs Kavitäten (Kantenlänge $6421,8 \mu\text{m} \pm 39,2 \mu\text{m} \times 6506,0 \mu\text{m} \pm 80,7 \mu\text{m}$, Tiefe $290,5 \mu\text{m} \pm 1,5 \mu\text{m}$), in denen sich jeweils sieben separierte trichterförmige Mikrokavitäten befinden (Abbildung 5-1a), die als miniaturisierte Zellkulturgefäße genutzt wurden. Jedes miniaturisierte Zellkulturgefäß besitzt eine transparente Si_xN_y -Membran (Kantenlänge der Membran $510,2 \mu\text{m} \pm 14,6 \mu\text{m} \times 527,6 \mu\text{m} \pm 12,2 \mu\text{m}$, Tiefe des Zellkulturgefäßes $238,5 \mu\text{m} \pm 1,2 \mu\text{m}$). Die Wachstumsfläche der Mikrokavität beträgt $0,27 \text{ mm}^2 \pm 0,007 \text{ mm}^2$ (bei einer Membrangröße von $510,2 \mu\text{m} \pm 14,6 \mu\text{m} \times 527,6 \mu\text{m} \pm 12,2 \mu\text{m}$). Durch die Kombination von dem MKC und dem Silikonaufsatz wurde das Kammervolumen der sechs Kavitäten auf $350 \mu\text{l}$ erhöht (Abbildung 5-1b). Neben dem softwaremodellierten Design (Abbildung 5-1a und Abbildung 5-1b) zeigt Abbildung 5-1 die Fotografie des MKCs (Abbildung 5-1c) sowie des MKCs mit dem positionierten Silikonaufsatz (Abbildung 5-2d).

Die sechs separaten Kultivierungseinheiten ermöglichten die Exposition sechs unterschiedlicher Materialien oder Konzentrationen unter identischen physiologischen Bedingungen. Durch die sieben miniaturisierten Zellkulturgefäße pro Kultivierungseinheit war eine statistische Auswertung der darin generierten Daten gewährleistet. In Kombination

mit dem Silikon Aufsatz bildete der MKC ein Array aus miniaturisierten Zellkulturgefäßen zur permanenten nichtinvasiven Charakterisierung individueller Zellen in einem kleinen Zellverband. Durch die miniaturisierte Zellkulturfläche war die mikroskopische Beobachtung der kompletten Zellkulturfläche mit geringem Zeitaufwand garantiert.

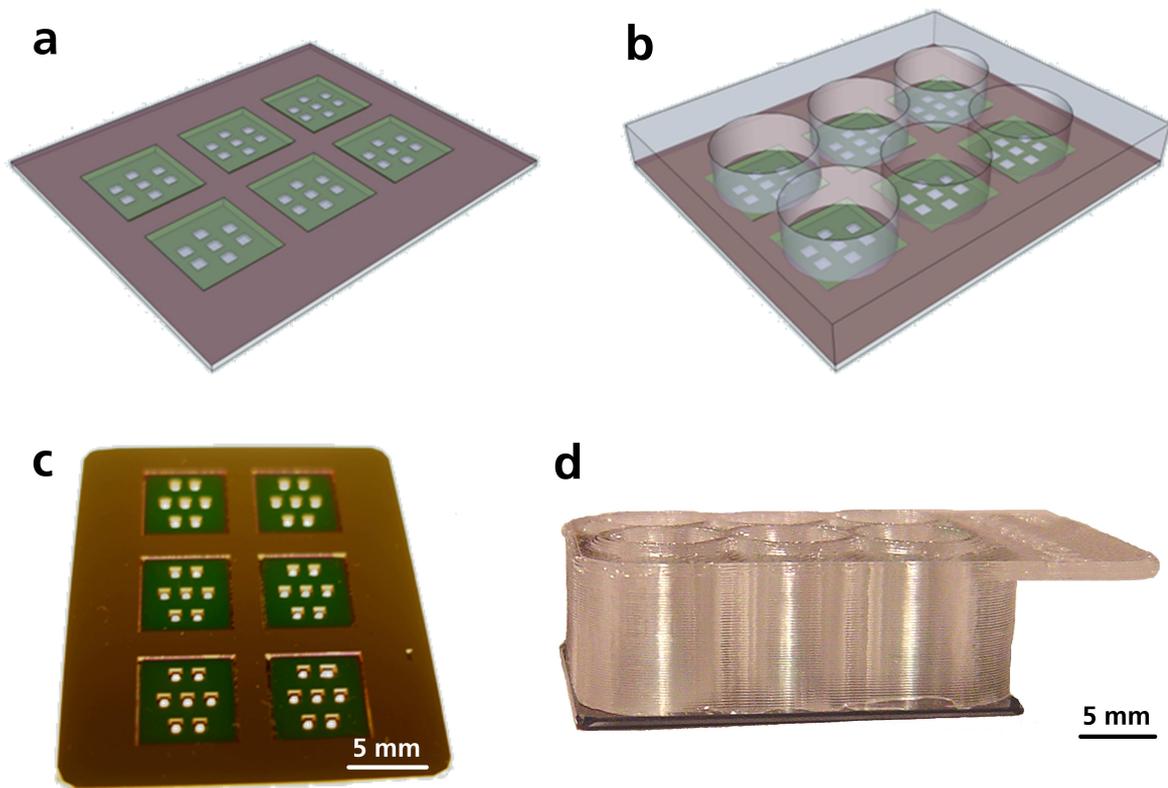


Abbildung 5-1 Schematische Darstellung des MKC-Designs.

(a) Softwaremodelliertes Design des Mikrokapazitätenchips. Der MKC beinhaltet 42 (6 x 7) individuelle miniaturisierte Zellkulturgefäße. (b) Softwaredesign des MKCs mit positioniertem Silikon Aufsatz. Der Silikon Aufsatz diente der Separation der sechs individuellen Arraysegmente. (c) Fotografische Abbildung des Mikrokapazitätenchips. Der MKC besteht aus sechs Kavitäten (Kantenlänge $6421,8 \mu\text{m} \pm 39,2 \mu\text{m} \times 6506,0 \mu\text{m} \pm 80,7 \mu\text{m}$, Tiefe $290,5 \mu\text{m} \pm 1,5 \mu\text{m}$), in denen sich jeweils sieben separierte trichterförmige Mikrokapazitäten (Kantenlänge der Kapazitätenmembran $510,2 \mu\text{m} \pm 14,6 \mu\text{m} \times 527,6 \mu\text{m} \pm 12,2 \mu\text{m}$, Tiefe $238,5 \mu\text{m} \pm 1,2 \mu\text{m}$) befinden. (d) Kombination von Mikrokapazitätenchip und Silikon Aufsatz. Die sechs separaten Kultivierungseinheiten ermöglichen die Exposition sechs unterschiedlicher Materialien oder Konzentrationen unter identischen physiologischen Bedingungen.

Die Anwendung eines an die Dimensionen des MKC angepassten Adapters, mit 6 MKC-Positionen, ermöglichte die parallele Exposition 36 unterschiedlicher Materialien oder Konzentrationen unter identischen physiologischen Bedingungen (Abbildung 5-2a). Die 800 nm dünnen, transparenten Si_xN_y -Membranen der Mikrokapazität ermöglichen die Nutzung des MKCs in Kombination mit einem inversen Mikroskop (Abbildung 5-2a und Abbildung 5-2b).

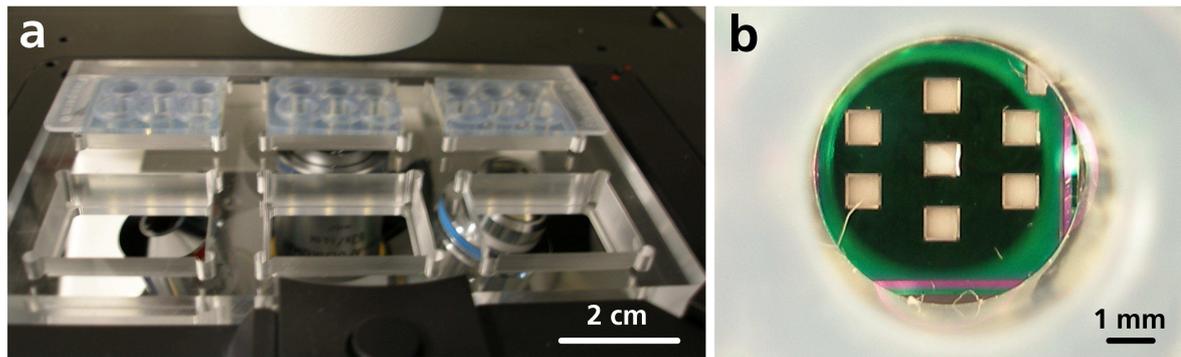


Abbildung 5-2 Setup zur statistischen Quantifizierung spezifischer induzierter Effekte in den Mikro-kavitäten.

(a) Auf einem Fluoreszenzmikroskop positionierter PMMA-Adapter mit 6 Positionen zum Einsatz der MKCs als Arraysystem. (b) Ausschnitt einer Kultivierungseinheit. Sie umfasst sieben einzelne Mikro-kavitäten. Somit ist eine statistische Auswertung der in den Kultivierungseinheiten generierten Daten gewährleistet.

Durch die jeweils sieben Mikro-kavitäten pro Segment (Abbildung 5-3a) besitzt der MKC 252 miniaturisierte Zellkulturgefäße, deren gesamte Kulturfläche in einer einzigen mikroskopischen Aufnahme ($888 \mu\text{m} \times 666 \mu\text{m}$) analysiert werden kann. Um die automatische mikroskopische Dokumentation der insgesamt 252 miniaturisierten Zellkulturgefäße in kurzer Zeit zu gewährleisten, wurde eine automatisierte Mikroskopsteuerung, inklusive Autofokus und Bildverarbeitung für Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen, entwickelt.

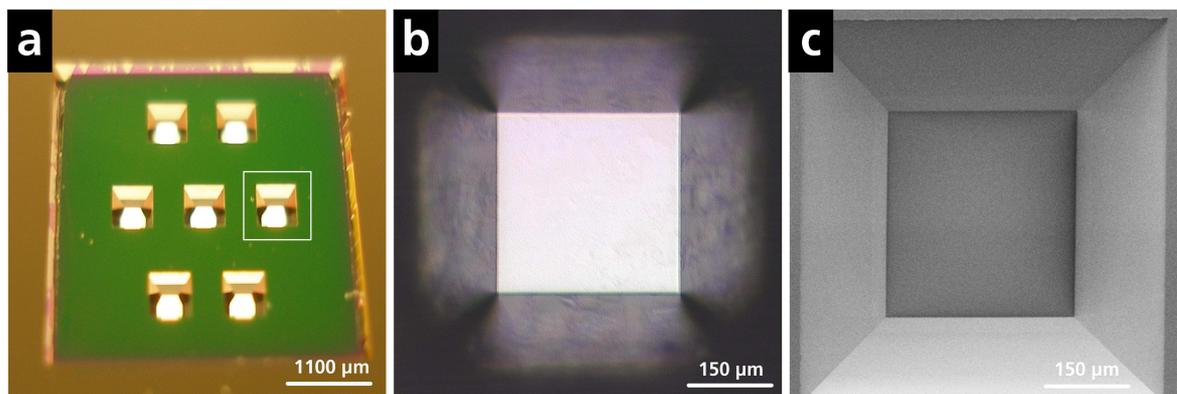


Abbildung 5-3 Mikroskopische Aufnahme der miniaturisierten Zellkulturgefäße.

(a) Fotografische Aufnahme einer Kavität des MKCs. Sie umfasst sieben individuelle Mikro-kavitäten mit einer 800 nm dünnen transparenten Si_xN_y -Membran (Kantenlänge $510,2 \mu\text{m} \pm 14,6 \mu\text{m} \times 527,6 \mu\text{m} \pm 12,2 \mu\text{m}$), die als Zellkulturgefäße genutzt wurden. (b) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer einzelnen Mikro-kavität. (c) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer einzelnen Mikro-kavität. Die Flankengeometrie der nasschemisch anisotropisch geätzten Mikro-kavität ist phasenkontrast- und rasterelektronenmikroskopisch deutlich zu erkennen.

5.1.2 Biokompatibilität des miniaturisierten Zellkulturgefäßes

Wichtige Voraussetzung für den Einsatz des MKCs als *in vitro* System ist die Biokompatibilität der Mikrokavitäten, die als miniaturisiertes Zellkulturgefäß genutzt werden sollen. Zur Untersuchung der Biokompatibilität wurden die humanen Lungenepithelzellen A549, die in dieser Arbeit als Ausgangsgewebe für die Transfektion der pIL8-GFP A549-Zelllinie dienen, in den miniaturisierten Zellkulturgefäßen für 48 Stunden kultiviert (Abbildung 5-4a).

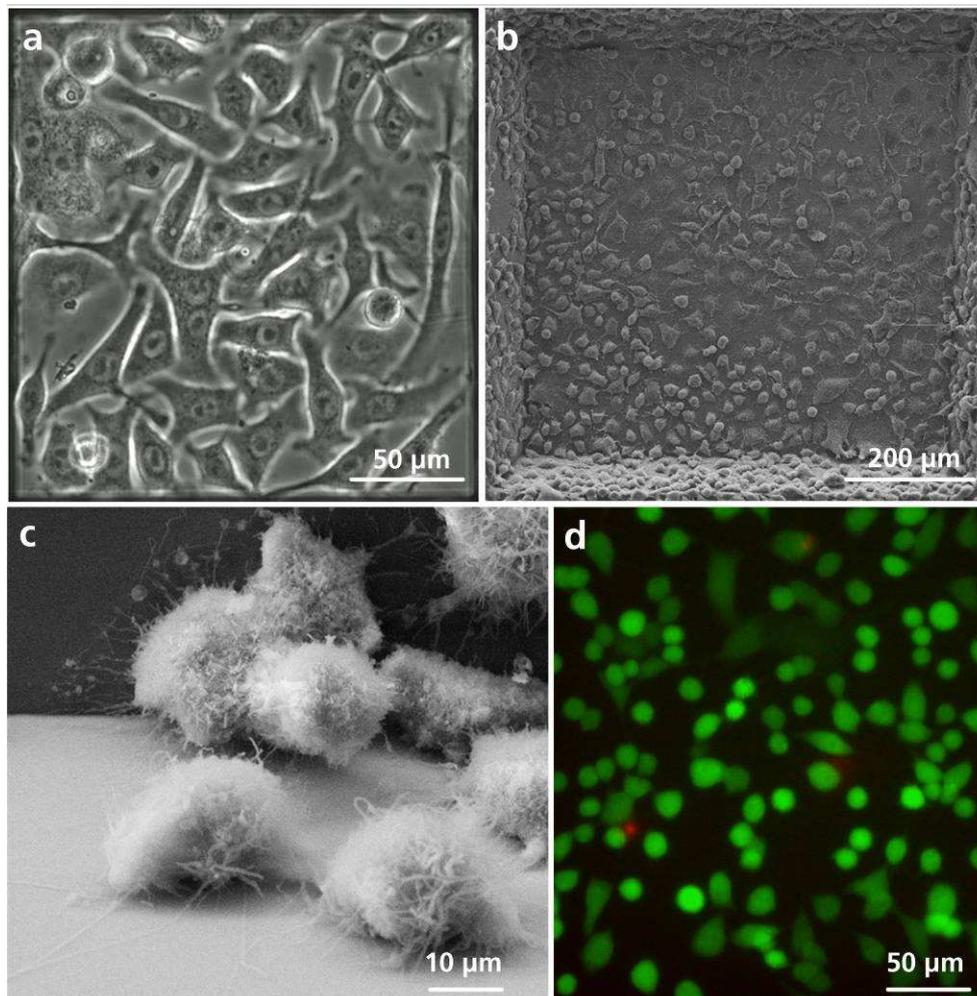


Abbildung 5-4 Mikroskopische Aufnahmen von A549-Zellen in der Mikrokavität.

A549-Zellen wurden für 48 Stunden und 7 Tage unter physiologischen Bedingungen in den Mikrokavitäten kultiviert. (a) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der auf der Si_3N_4 -Membran adhäreren Zellen nach 48 Stunden. (b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zellen nach 7 Tagen. Die Zellen wachsen auf der Si_3N_4 -Membran und den Siliziumflanken der Mikrokavität. (c) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der auf den Seitenwänden der Mikrokavität (heller Untergrund) adhäreren Zellen nach 7-tägiger Kultivierung. (d) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach 7-tägiger Kultivierung und Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid-Färbung. Grüne Zellen: Fluoresceindiacetat-gefärbte, vitale Zellen; rote Zellen: Propidiumiodid-gefärbte, membrangeschädigte Zellen. Die Helligkeit des überlagerten Fluoreszenzbildes wurde um 5 % reduziert.

Die Zellen adhärten auf der Si_xN_y -Membran und wiesen eine charakteristische Morphologie auf. Die physikalischen Eigenschaften des Si_xN_y und die geringe Dicke der Si_xN_y -Membran von 800 nm resultierten in einer guten optischen Auflösung der phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 5-4a). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen nach 7tägiger Kultivierung von A549-Zellen in den miniaturisierten Zellkulturgefäßen bestätigten die Adhärenz der A549-Zellen auf der Si_xN_y -Membran (Abbildung 5-4b). Nicht nur auf dieser, sondern auch auf den, in einem Winkel von $57,4^\circ$ zur Membran geätzten, Siliziumflanken der Mikrokavitäten adhärten die A549-Zellen und zeigten charakteristische morphologische Strukturen (Abbildung 5-4c). Die A549-Zellen wurden nach 7tägiger Kultivierung in der Mikrokavität mittels Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid-Färbung auf deren Vitalität analysiert. Die Vitalität der A549-Zellen lag nach 7tägiger Kultur bei $98,2\% \pm 0,3\%$ (Abbildung 5-4d). Weiterhin wurde untersucht, ob sich das miniaturisierte Zellkulturgefäß für die Kultivierung sowie die Differenzierung sensibler *in vitro* Systeme eignet (Abbildung 5-5).

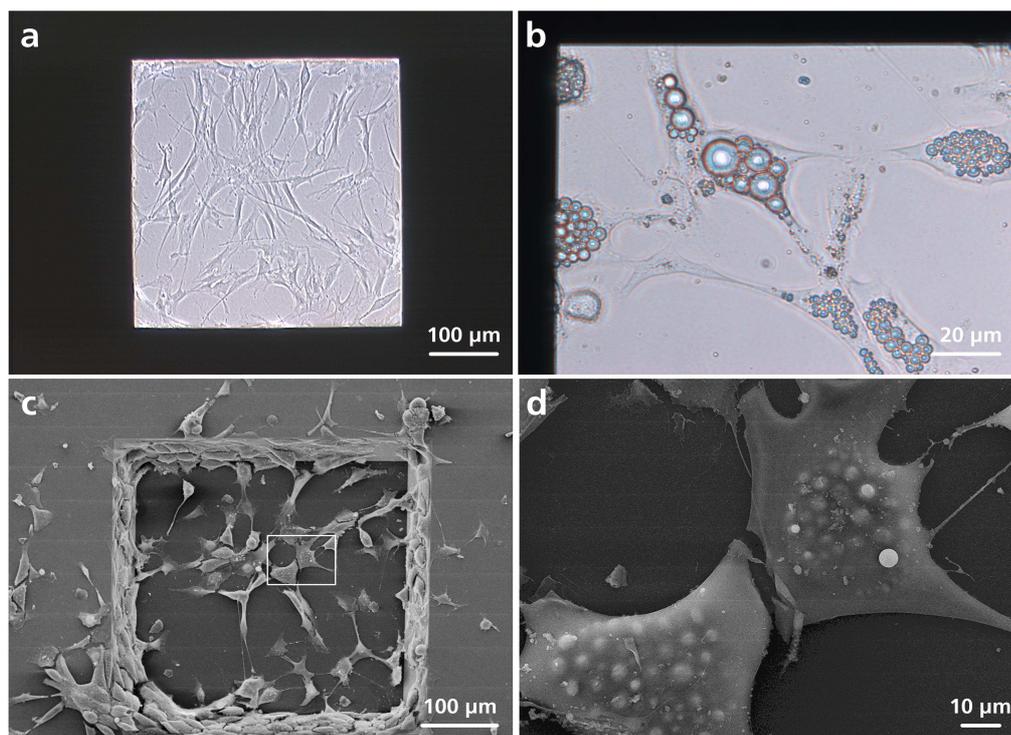


Abbildung 5-5 Mikroskopische Aufnahmen von hMSCs in der Mikrokavität.

hMSCs wurden in den Mikrokavitäten kultiviert oder adipogen differenziert. (a) Hellfeldmikroskopische Aufnahme proliferierender hMSCs nach 7tägiger Kultivierung auf der Si_xN_y -Membran. (b) Hellfeldmikroskopische Aufnahme adipogen differenzierter hMSCs nach 18 Tagen in der Mikrokavität. Die Lipidvakuolen sind deutlich sichtbar. (c) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der in der Mikrokavität adipogen differenzierten hMSCs nach 18 Tagen. (d) Vergrößerung des in Abbildung c markierten Bereichs. Auch rasterelektronenmikroskopisch deutlich zu erkennen sind die während der Adipogenese gebildeten Lipidvakuolen.

Als *in vitro* Modell wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) herangezogen. Zur Kultivierung der hMSCs in den Mikrokavitäten wurden diese sieben Tage in Proliferationsmedium inkubiert. Morphologisch wiesen diese hMSCs keine Unterschiede zu den in konventionellen Kulturgefäßen kultivierten hMSCs auf (Abbildung 5-5a). Die Untersuchung des Differenzierungspotenzials in den miniaturisierten Zellkulturgefäßen wurde anhand der Adipogenese analysiert. Dazu wurden hMSCs 18 Tage in adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Die von Adipozyten gebildeten Lipidvesikel waren hellfeldmikroskopisch deutlich sichtbar (Abbildung 5-5b). Elektronenmikroskopische Aufnahme adipogen differenzierter hMSCs bewiesen eine Anhäufung der adipogen differenzierten hMSCs in den Eckbereichen und an den Flanken der Mikrokavitäten (Abbildung 5-5c). Rasterelektronenmikroskopisch ebenfalls deutlich zu erkennen war die für Adipozyten charakteristische Lipidvakuolenbildung (Abbildung 5-5d).

Als weiteres *in vitro* System, auch im Hinblick auf spätere Applikationsmöglichkeiten, wurden PC-12-Zellen eingesetzt. Diese stammen aus dem Phänochromozytom der Ratte und wachsen in Suspension. Nach Beginn der Kultivierung in konventionellen Zellkulturgefäßen, mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) supplementiertem Differenzierungsmedium, adhären PC-12-Zellen und bilden neuronale Netzwerke aus. Untersucht werden sollte, ob dieses Verhalten auch in den miniaturisierten Zellkulturgefäßen beobachtet werden kann.

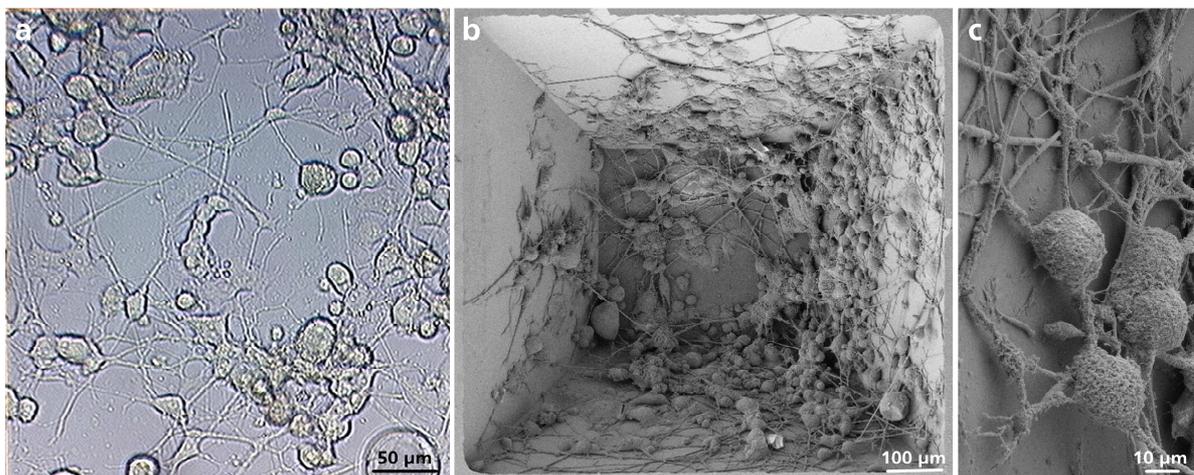


Abbildung 5-6 Mikroskopische Aufnahmen von neuronal differenzierten PC-12-Zellen in der Mikrokavität.

PC-12-Zellen wurden über 8 Tage in den Mikrokavitäten in neuronale Richtung differenziert. (a) Hellfeldmikroskopische Aufnahme neuronal differenzierter PC-12-Zellen auf der Si_xN_y -Membran. (b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der in der Mikrokavität neuronal differenzierten PC-12-Zellen. Nicht nur auf der Si_xN_y -Membran, auch auf den Siliziumflanken der Mikrokavität adhären die PC-12-Zellen und bilden neuronale Netzwerke. (c) Ausschnitt der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme der in der Mikrokavität neuronal differenzierten PC-12-Zellen. Deutlich zu erkennen sind die neuronalen Ausläufer.

Hierzu wurden PC-12-Zellen in den miniaturisierten Zellkulturgefäßen für 8 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. Hellfeldmikroskopische (Abbildung 5-6a) und raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 5-6b und 5-6c) zeigten eine deutliche Ausbildung neuronaler Netzwerke.

Nach Bestätigung der Biokompatibilität der entwickelten miniaturisierten Zellkulturgefäße wurde das Proliferationsverhalten von drei A549 Populationen, kultiviert in konventionellen Zellkulturgefäßen (96-Loch-Mikroplatte) und den entwickelten Mikrokavitäten, verglichen. Die Populationsverdopplung der A549-Zellen lag in standardisierten Zellkulturgefäßen zwischen 0,943 und 1,068 pro 24 Stunden, in dem miniaturisierten Zellkulturgefäß zwischen 0,820 und 0,881 pro 24 Stunden (Tabelle 5-1).

Tabelle 5-1 Vergleich der Populationsverdopplung (PD) von A549-Zellen in einem miniaturisierten und einem standardisierten Zellkulturgefäß.

A549-Zellen wurden 24 Stunden in einer 96-Loch-Mikroplatte (Zellkulturfläche 34 mm²) sowie in den Mikrokavitäten (Zellkulturfläche 0,27 mm²) unter physiologischen Bedingungen kultiviert. Im Anschluss wurde aus drei unterschiedlichen Populationen die Zellzahl ermittelt und die PD sowie die daraus resultierende Verdopplungszeit berechnet.

Probe	Mikrokavität		96-Loch-Mikroplatte	
	PD in 24 h	Verdopplungszeit	PD in 24 h	Verdopplungszeit
1	0,881	27,36 h	1,068	22,56 h
2	0,829	29,04 h	0,943	25,44 h
3	0,820	29,28 h	1,006	23,76 h
	$0,843 \pm 0,027$	$28,56 \text{ h} \pm 0,85 \text{ h}$	$1,006 \pm 0,051$	$23,92 \text{ h} \pm 1,18 \text{ h}$

Um zu prüfen, ob sich mittels des MKCs eine kontinuierliche Charakterisierung spezifischer zellbasierter Prozesse realisieren lässt, wurde unter Anwendung der Langzeitmikroskopie (Time Lapse Mikroskopy) der zeitliche Verlauf der GFP-Expression transient transfizierter A549-Zellen während der Kultivierung in der Mikrokavität beobachtet (Abbildung 5-7). Hierzu wurden A549-Zellen transient mit dem pGFP-N1-Plasmid transfiziert und in der Mikrokavität kultiviert. Durch Überlagerung der Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen des gleichen Probenausschnittes während der Kultivierung der pGFP-N1 A549-Zellen konnten dynamische zelluläre Prozesse wie die GFP-Expression und das *in vitro* Verhalten der Zellen in dem miniaturisierten Zellkulturgefäß verfolgt werden (Abbildung 5-7). Zur nichtinvasiven Detektion inflammatorischer Effekte auf zellulärer Ebene erfolgte die Transfektion der humanen alveolaren Tumorzelllinie A549 mit dem pGL3-Basisvektor, gekoppelt mit dem GFP-codierenden Expressionsvektor pTurboGFP-PRL und einer Interleukin-8-Promotorsequenz (durchgeführt von Dr. G. Oostingh, Abteilung Allergie und Immunologie, Fachbereich Molekulare Biologie, Paris Lodron Universität Salzburg, Österreich).

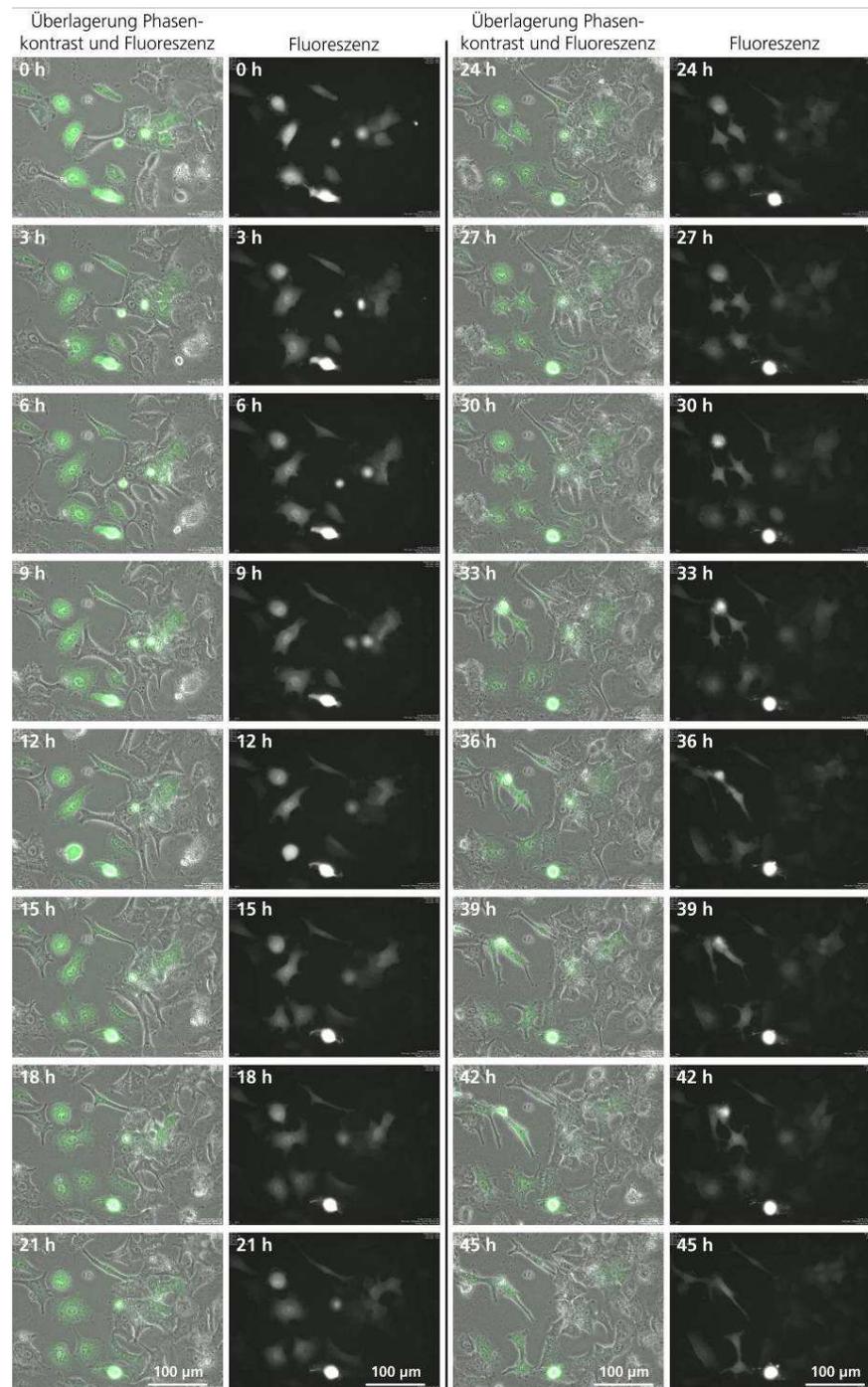


Abbildung 5-7 Zeitlicher Verlauf der GFP-Expression von pGFP-N1 A549-Zellen während der Kultivierung in der Mikrokavität.

Mittels Langzeitmikroskopie wurde das Wachstumsverhalten sowie die GFP-Expression adhärenter transient transfizierter pGFP-N1 A549-Zellen kontinuierlich dokumentiert. Dargestellt ist die Überlagerung der Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen sowie der Fluoreszenzaufnahmen des gleichen Ausschnittes der Probe, zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0-45 Stunden), während der Zellkultivierung. Die Helligkeit der Fluoreszenzaufnahmen wurde um 5 % erhöht. Die Helligkeit des überlagerten Bildes aus der Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme wurde um 15 %, der Kontrast um 10 % erhöht. Eine Zuordnung der GFP-Expression zu den individuellen Zellen sowie eine kontinuierliche Verfolgung des Zellverhaltens und der GFP-Expression sind in der Mikrokavität möglich.

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der transfizierten Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 in den miniaturisierten Zellkulturgefäßen wurde die Morphologie der Zellen nach 48stündiger Kultivierung rasterelektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 5-8). Sowohl auf der Si_xN_y -Membran der Mikrokapazität als auch auf der Si_xN_y -beschichteten Oberfläche des Siliziumwafers adhärten und proliferierten die pIL8-GFP A549-Zellen (Abbildung 5-8).

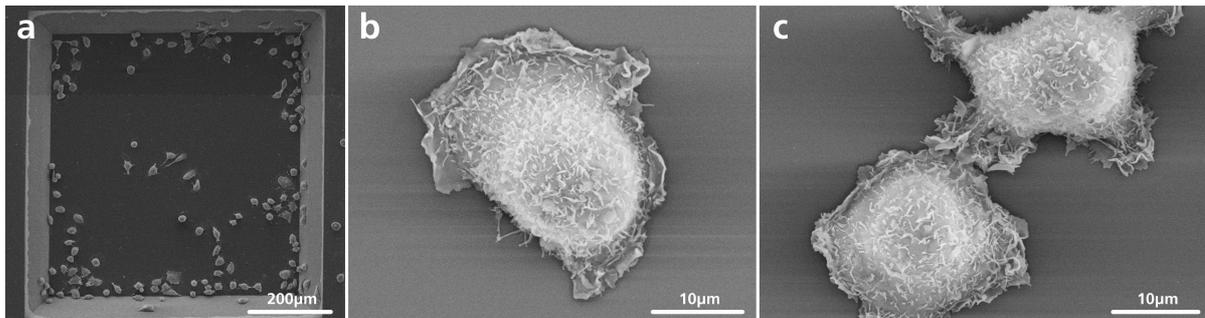


Abbildung 5-8 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokapazität.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden 72 Stunden in der Mikrokapazität kultiviert. (a) In der Mikrokapazität adhärnte pIL8-GFP A549-Zellen. Nicht nur auf der Si_xN_y -Membran, auch auf den Flanken der Mikrokapazität proliferierten die Zellen. (b) Auf der Si_xN_y -Membran adhärnte pIL8-GFP A549 Zelle. (c) Auf der Si_xN_y -Membran adhärnte pIL8-GFP A549-Zellen mit ausgebildeten Zellkontakten.

5.1.3 Optische Eigenschaften der Mikrokapazität

Zum Vergleich der optischen Eigenschaften der Zellkulturflächen der Mikrokapazität mit den konventionellen Kulturgefäßen, wurden pIL8-GFP A549-Zellen in einer 96-Loch-Mikroplatte mit einer Wachstumsfläche von 34 mm^2 und einer 384-Loch-Mikroplatte (Wachstumsfläche 11 mm^2) für 24 Stunden mit 20 ng/ml Tumornekrosefaktor ($\text{TNF-}\alpha$) inkubiert. Parallel wurden pIL8-GFP A549-Zellen in den entwickelten miniaturisierten Zellkulturgefäßen unter identischen Bedingungen behandelt.

$\text{TNF-}\alpha$ ist ein multifunktionaler Signalstoff des Immunsystems, der bei lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist. Im Rahmen dieser Arbeit diente $\text{TNF-}\alpha$ zur Induktion einer Entzündungsreaktion, welche durch eine IL-8-gekoppelte GFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert werden konnte. Eine GFP-Expression der transfizierten pIL8-GFP A549-Zellen beweist in diesem Fall eine IL-8-gekoppelte Inflammationsreaktion. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Morphologie sowie der GFP-Expression zeigten deutliche Unterschiede der optischen Qualität der beiden Materialien der Zellkulturflächen (Polystyrol (konventionelles Kulturgefäß), Si_xN_y (miniaturisiertes Kulturgefäß)) (Abbildung 5-9).

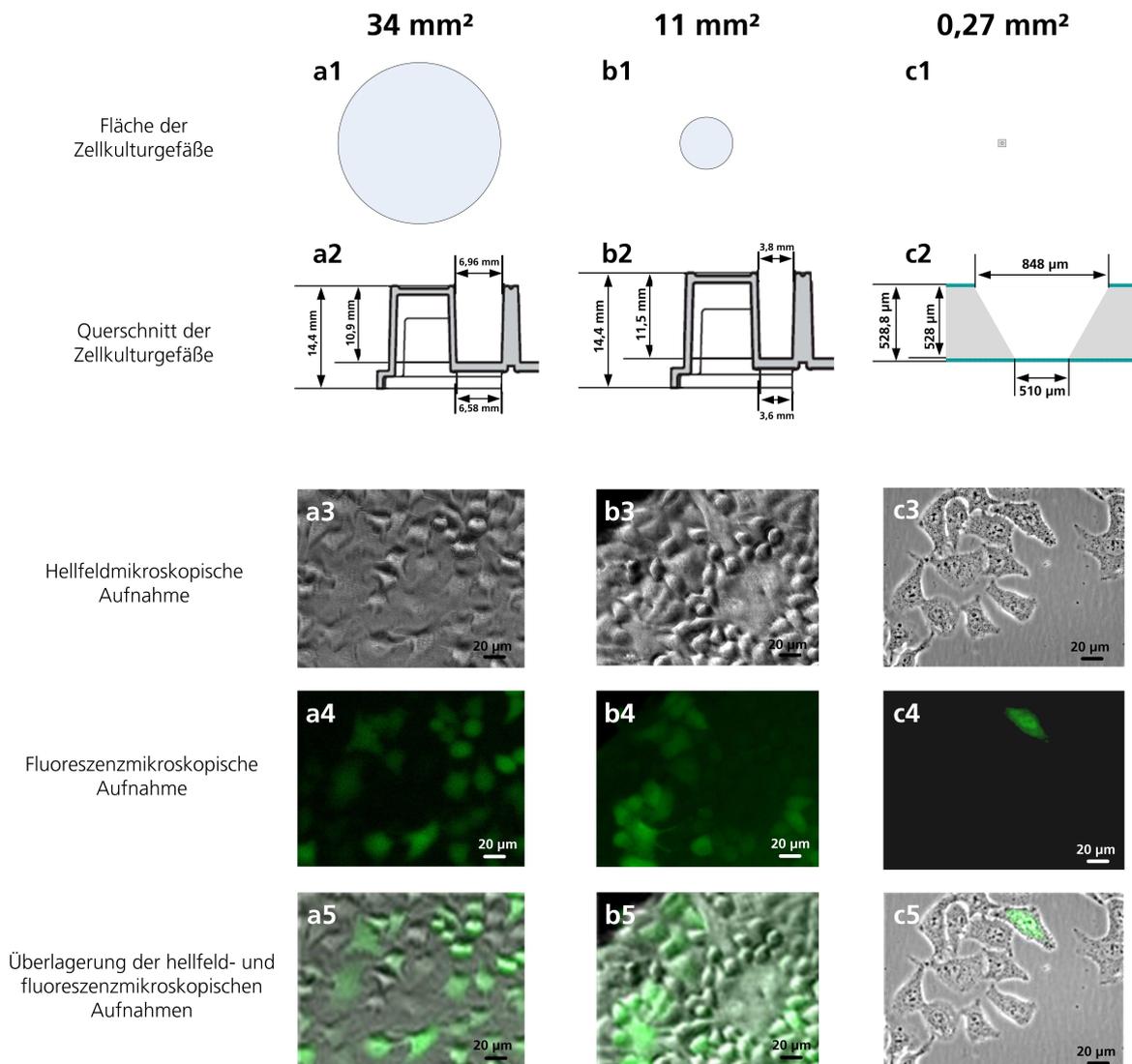


Abbildung 5-9 Vergleich des miniaturisierten Zellkulturgefäßes mit konventionellen Zellkulturgefäßen hinsichtlich Geometrie und optischer Qualität der darin generierten mikroskopischen Aufnahmen.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden auf einer Zellkulturfläche von (a) 34 mm² (Polystyrol), (b) 11 mm² (Polystyrol) und (c) 0,27 mm² (Si_xN_y-Membran) für 24 Stunden mit 20 ng/ml TNF- α inkubiert. Anschließend wurde die GFP-Expression der Zellen im Randbereich der Zellkulturgefäße analysiert. (1) Fläche der Zellkulturgefäße, (2) Querschnitt der Zellkulturgefäße, (3) Hellfeldmikroskopische Aufnahme der pIL8-GFP A549-Zellen. Die Helligkeit der Phasenkontrastaufnahme wurde um 5 % erhöht (a), der Kontrast um 5 % verstärkt (a und b). (4) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der GFP-exprimierenden pIL8-GFP A549-Zellen (ex. 470 nm/ em. 525 nm). Die Helligkeit der Fluoreszenzaufnahme wurde um 5 % reduziert (a und b), bzw. um 10 % erhöht (c). Der Kontrast wurde um 5 % (a und c), bzw. 10 % (b) verstärkt. (5) Überlagerung der phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme. Im Vergleich zu den Polystyrolmembranen zeigt sich unter Verwendung der Si_xN_y-Membran eine deutliche Verbesserung der optischen Qualität der mikroskopischen Aufnahmen. Grund hierfür ist die Gefäßgeometrie und die dünne Si_xN_y-Membran mit einer Dicke von 800 nm.

Der Polystyrolboden der konventionellen Kulturgefäße ließ nur im zentralen Bereich der Zellkulturfläche fokussierte mikroskopische Bilder zu. Die runde Form des Zellkulturgefäßes führte zu Randeffekten, die in unscharfen Aufnahmen resultierten (Abbildung

5-9a und 5-9b). Im Gegensatz dazu führte die durch den Herstellungsprozess bedingte rechteckige Form der Si_xN_y -Membran eine Verringerung der Randeffekte in den miniaturisierten Zellkulturgefäßen (Abbildung 5-9c). Ferner wies Polystyrol im Vergleich zu Si_xN_y eine deutlich stärkere Eigenfluoreszenz auf (Abbildung 5-9 Bild a4, 5-9 Bild b4, 5-9 Bild c4). Um individuelle fluoreszierende Zellen in einem Zellverband zu lokalisieren wurden das Fluoreszenzbild und das Phasenkontrastbild addiert. Die Überlagerung der Aufnahmen ließ nur bei der Verwendung des miniaturisierten Zellkultursystems eine absolute Korrelation der Lokalisation der GFP-Expression zu (Abbildung 5-9 Bild c5). Die Kombination eines miniaturisierten Zellkulturgefäßes mit der transfizierten Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 realisiert die Detektion spezifischer Inflammationsreaktionen auf einzelner adhärenter Zellen in einer *in vitro* Kultur (Abbildung 5-9). Wie bereits zuvor belegt werden konnte, eignet sich das miniaturisierte Zellkulturgefäß zur Kultivierung und Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in adipogene Richtung (Abbildung 5-5). Nach 5tägiger Proliferation der hMSCs in einem konventionellen Zellkulturgefäß und der Mikrokavität waren auch hier die Vorteile der optischen Eigenschaften der Si_xN_y -Membran deutlich zu erkennen (Abbildung 5-10). Die Polystyroloberfläche des Standardkulturgefäßes wies rillenartige Strukturen auf, die die Qualität des Bildes mindern, da sie kleine morphologische Feinheiten der Zelle nicht erkennen lassen (Abbildung 5-10a). Die Si_xN_y -Membran hingegen ist von optisch besserer Qualität (Abbildung 5-10b).

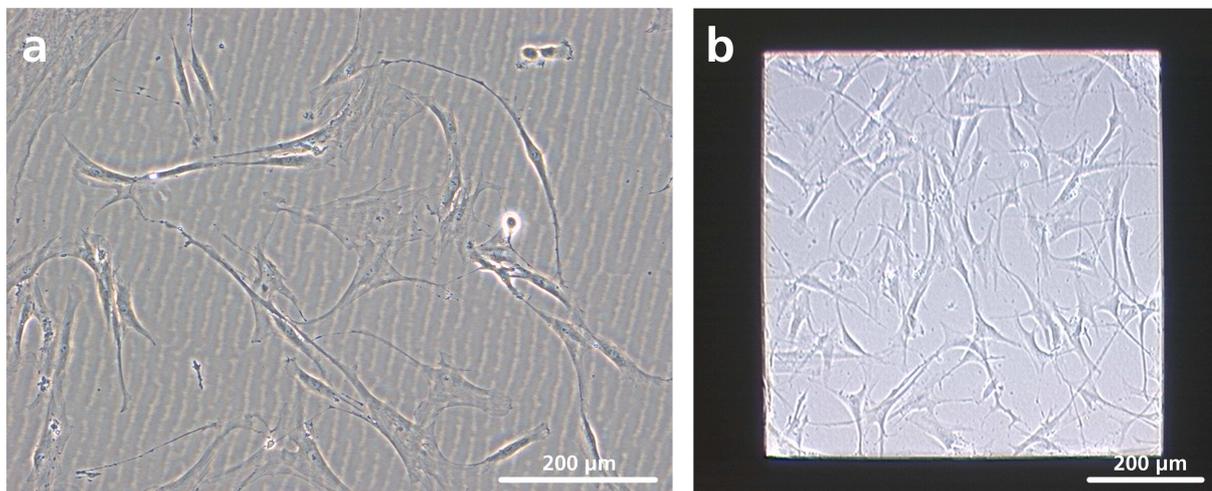


Abbildung 5-10 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen proliferierender hMSCs.

hMSCs wurden 5 Tage unter physiologischen Bedingungen in (a) einem Standardkulturgefäß aus Polystyrol (Wachstumsfläche 34 mm^2) und (b) auf der Si_xN_y -Membran der Mikrokavität (Wachstumsfläche $0,27 \text{ mm}^2$) kultiviert. Beim Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen erweist sich die Si_xN_y -Membran als vorteilhafter. Die Polystyroloberfläche weist rillenartige Strukturen auf, hingegen ist die Si_xN_y -Membran von besserer optischer Qualität.

5.1.4 Einfluss der Miniaturisierung auf das Zellverhalten

Ziel der Entwicklung des miniaturisierten Zellkulturgefäßes war das unveränderte Zellverhalten im Vergleich zu konventionellen Kulturgefäßen wie z. B. 96-Loch-Mikroplatten. Nachdem die Miniaturisierung keinen nachteiligen Effekt sowohl auf die Proliferation, als auch auf die Adhärenz sowie die Morphologie der Zellen zeigte, war der Effekt der Miniaturisierung auf spezifische Zellreaktionen zu untersuchen. Am Beispiel der nanopartikelinduzierte Inflammation der Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 wurde der Einfluss der Miniaturisierung untersucht. Hierzu wurden pIL8-GFP A549-Zellen auf verschiedenen großen Wachstumsflächen aus Polystyrol (11 mm², 34 mm²) und Siliziumnitrid (0,27 mm²) kultiviert und mit 20 µM SC10 (kolloidale Silber-Nanopartikel) oder 20 µM MC100 (kolloidale Magnetit-Nanopartikel) für 24 Stunden inkubiert. Die unbehandelten pIL8-GFP A549-Zellen wiesen auf den drei untersuchten Wachstumsflächen einen Grundanteil fluoreszierender Zellen zwischen 8 % und 11 % auf. Die mit MC100 (20 µM) behandelten Zellen zeigten einen Anteil fluoreszierender Zellen im gleichen Bereich. Nach SC10-Exposition stieg der Anteil GFP-exprimierender und damit IL-8-positiver Zellen auf $41,3 \pm 5,1$ % (0,27 mm²), $36,0 \pm 6,2$ % (11 mm²) und $43,3 \pm 4,5$ % (34 mm²) (Abbildung 5-11). Der prozentuale Anteil fluoreszierender Zellen unterschied sich nicht signifikant beim Vergleich der unterschiedlichen Wachstumsflächen.

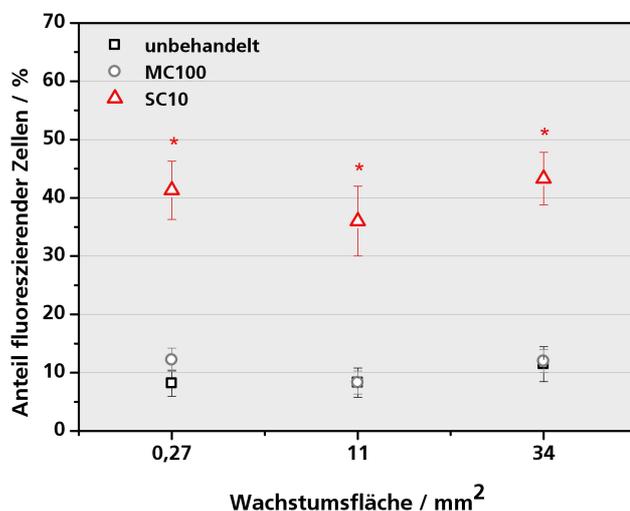


Abbildung 5-11 Einfluss der Miniaturisierung auf die nanopartikelinduzierte Inflammation von pIL8-GFP A549-Zellen.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden auf verschiedenen großen Wachstumsflächen (0,27 mm² (MKC), 11 mm² (384-Loch-Mikroplatte), 34 mm² (96-Loch-Mikroplatte)) kultiviert und mit 20 µM SC10 oder 20 µM MC100 für 24 Stunden inkubiert. Der Anteil GFP-exprimierender Zellen pro Wachstumsfläche wurde fluoreszenzmikroskopisch ermittelt (ex. 470 nm/em. 525 nm). Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP-exprimierender pIL8-GFP A549-Zellen in Abhängigkeit von der untersuchten Wachstumsfläche. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± SD dargestellt. SC (Ø 10 nm) = kolloidale Silber-Nanopartikel, MC (Ø 100 nm) = Kolloidale Magnetit-Nanopartikel. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$ Mann-Whitney U Test).

5.2 Physikochemische und zytotoxikologische Partikelcharakterisierung

Bei der Validierung neuer *in vitro* Systeme zur Detektion nanopartikulärer und viraler Effekte ist die Verwendung gut charakterisierter Materialien von großer Bedeutung. Vor der Evaluierung des entwickelten *in vitro* Systems waren deshalb die physikochemischen Eigenschaften und das zytotoxische Potenzial der Partikel zu klären.

5.2.1 Physikochemische Charakterisierung der Nanopartikel

In der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erworbene Nanopartikel (Gold-Nanopartikel, Ø 10 nm GC10, Ø 80 nm GC80; Silber-Nanopartikel, Ø 10nm SC10, Ø 80 nm SC80) verwendet. Zusätzlich zu Gold und Silber wurde nanopartikuläres Magnetit (Ø 100 nm MC100) als Referenzmaterial eingesetzt. Die Gold- und Silber-Nanopartikel waren unmodifiziert, Magnetit-Partikel besaßen hingegen eine Polysaccharidhülle. Herstellerangaben zu den verwendeten Nanopartikeln sind in Tabelle 4-2 (Kapitel 4.2.3, Seite 48) aufgeführt.

Die wässrigen Nanopartikelsuspensionen wurden physikochemisch hinsichtlich Größenverteilung, Oberflächenladung (Zeta-Potenzial), Absorptionsmaximum und Polydispersitätsindex (PDI) analysiert (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2 Physikochemische Charakterisierung der verwendeten Gold- und Silber-Nanopartikel.

Nanopartikel	Durchmesser	Zeta-Potenzial	Absorptionsmaximum	PDI
GC10	9,0 nm ± 0,03 nm	- 33,8 mV ± 1,82 mV	515 nm	0,045 ± 0,008
GC80	95,0 nm ± 0,19 nm	- 43,5 mV ± 0,33 mV	554 nm	0,132 ± 0,007
SC10	7,4 nm ± 0,03 nm	- 41,0 mV ± 0,90 mV	395 nm	0,539 ± 0,002
SC80	52,2 nm ± 0,50 nm	- 47,9 mV ± 1,64 mV	480 nm	0,109 ± 0,006
MC100	63,8 nm ± 0,37 nm	- 4,5 mV ± 0,55 mV	320 nm	0,385 ± 0,089

Die physikochemische Charakterisierung ergab eine durchschnittliche Nanopartikelgröße von 9,0 nm ± 0,03 nm für GC10, 95,0 nm ± 0,2 nm für GC80, 7,4 nm ± 0,03 nm für SC10 und 52,2 nm ± 0,5 nm für SC80. Der Durchmesser von MC100 lag bei 68,8 nm ± 0,37 nm. Das Zeta-Potenzial der Gold Partikel lag bei -33,8 mV ± 1,8 mV und -43,5 mV ± 0,3 mV. Für die Silber-Nanopartikel ergab sich ein Zeta-Potenzial von - 41,0 mV ± 0,9 mV und -47,9 mV ± 1,64 mV, für MC100 -4,5 mV ± 0,55 mV. Das für Gold-Nanopartikel charakteristische Absorptionsmaximum lag bei 515 nm (GC10) und 554 nm (GC80), das der Silber-Nanopartikel bei 395 nm (SC10) und 480 nm (SC80) und das der Magnetit-Partikel bei 320 nm. Die Polydispersität (PDI), ein Index für die Homogenität einer Lösung, variierte zwischen 0,045 ± 0,008 und 0,132 ± 0,007 für Gold sowie 0,539 ± 0,002 und 0,109 ± 0,006 für Silber und lag bei Magnetit bei 0,385 ± 0,089.

Die Morphologie der Gold- und Silber-Nanopartikel wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie charakterisiert (Abbildung 5-12).

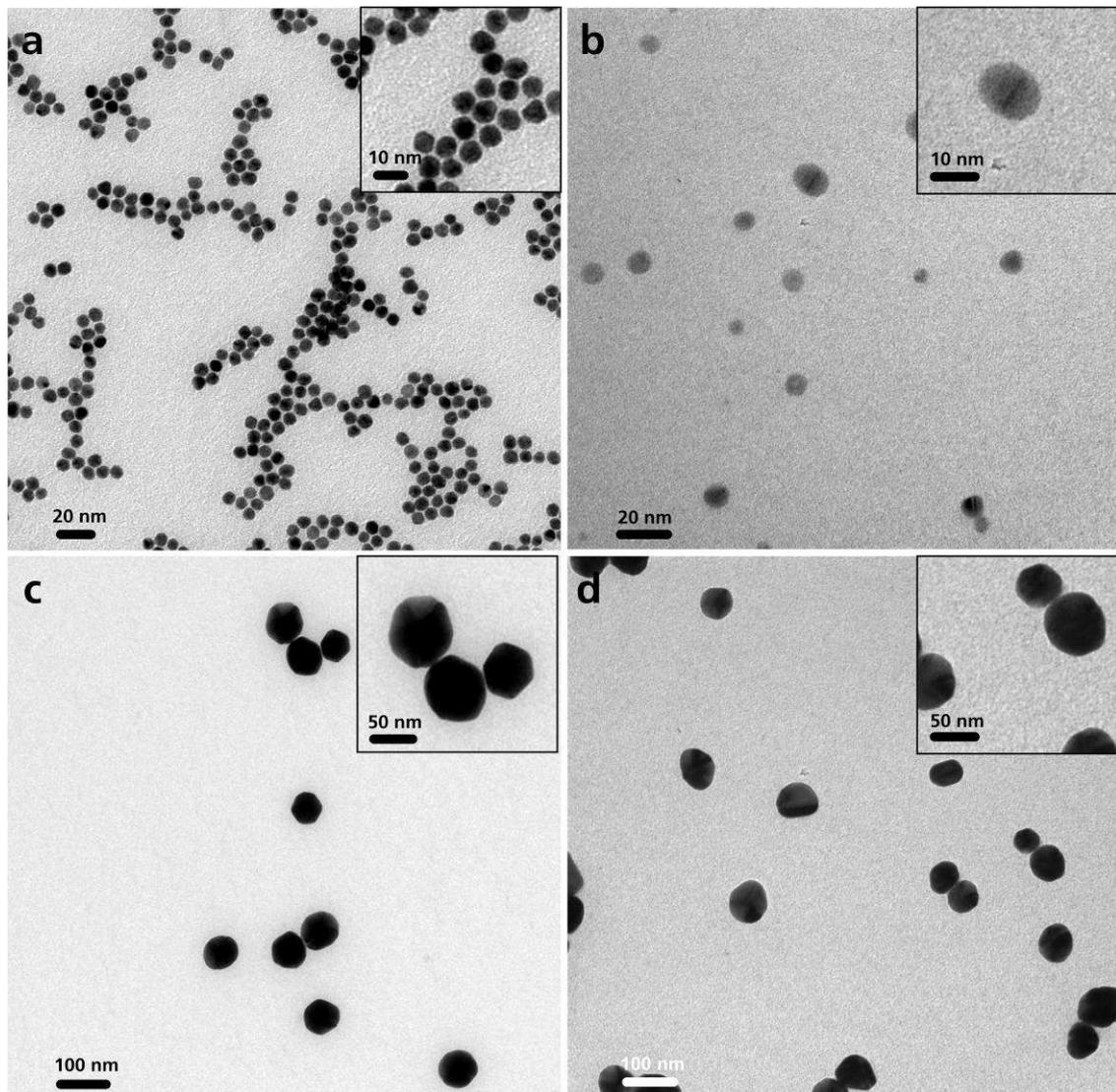


Abbildung 5-12 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Gold- und Silber-Nanopartikel.

(a) Gold-Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von $9,0 \text{ nm} \pm 0,03 \text{ nm}$ (GC10). (b) Silber-Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von $7,37 \text{ nm} \pm 0,03 \text{ nm}$ (SC10). (c) Gold-Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von $95,0 \text{ nm} \pm 0,19 \text{ nm}$ (GC80). (d) Silber-Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von $52,16 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$ (SC80).

Im Gegensatz zu den Herstellerangaben (Suspension sphärischer Nanopartikel) fand sich anhand der TEM-Aufnahmen keine einheitliche Morphologie der Nanopartikel wieder. Am Beispiel der Silber-Nanopartikel (SC80) sind in Abbildung 5-13 die in der SC80-Suspension identifizierten Nanopartikelformen dargestellt. Neben sphärischen Nanopartikeln fanden sich in der Stocklösung Nanostäbchen (Nanorods) unterschiedlicher Längen (100 - 700 nm) und pyramidenförmige Partikel wieder.

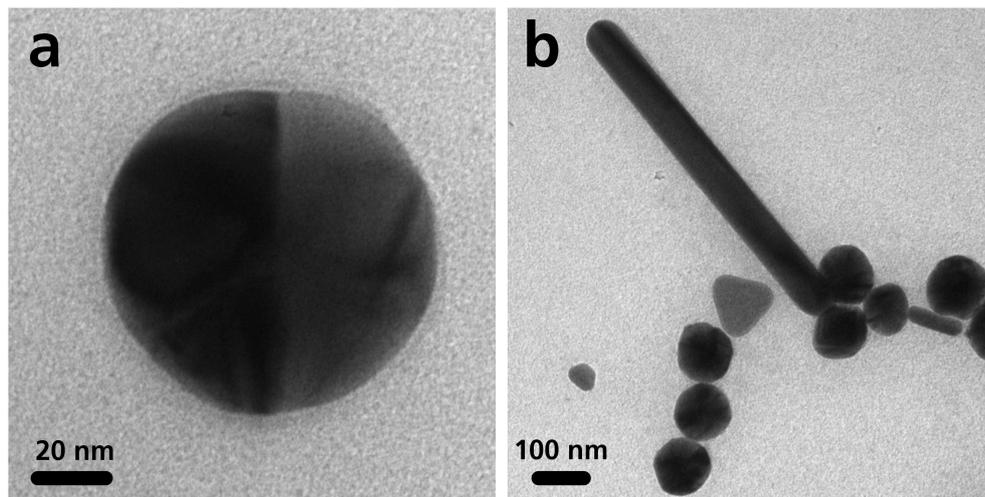


Abbildung 5-13 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Silber-Nanopartikel SC80 innerhalb einer Stocklösung.

Die TEM-Aufnahmen belegen die Variation der Nanopartikelmorphologien von SC80 innerhalb einer Stocklösung. (a) Sphärisches Partikel. (b) Die Morphologie der Nanopartikel variiert. Neben Nanostäbchen und sphärischen Partikeln, befanden sich pyramidenförmige Partikel in der Lösung.

Zusätzlich zu der physikochemischen Charakterisierung der metallischen Nanopartikel in wässriger Lösung (Stocklösung) wurde das Verhalten in serumfreiem und serumhaltigem Kulturmedium untersucht. Dafür wurden die kolloidalen Nanopartikelsuspensionen zentrifugiert und das Nanopartikelpellet 24 Stunden in serumfreiem sowie serumhaltigem (15 % FKS) Kulturmedium bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse des Zeta-Potenzials und des hydrodynamischen Durchmessers. Nach Austausch des Lösungsmittels der Stocklösung durch serumfreies Kulturmedium stieg das Zeta-Potenzial signifikant an (SC10-Stocklösung: $-41,0 \text{ mV} \pm 2,8 \text{ mV}$; SC10 in serumfreiem Medium: $-18,4 \text{ mV} \pm 2,3 \text{ mV}$). Der Einsatz von serumhaltigem Kulturmedium als Lösungsmittel der Partikel führt zu einem stärkeren, ebenfalls signifikanten, Anstieg des Zeta-Potenzials (SC10 in serumhaltigem Medium: $-7,5 \text{ mV} \pm 1,0 \text{ mV}$), verglichen mit dem Zeta-Potenzial der in serumfreien Kulturmedium inkubierten Nanopartikel (Abbildung 5-14a).

Im Verhältnis zur Stocklösung stieg auch der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel in serumfreiem und serumhaltigem Kulturmedium signifikant an (SC10-Stocklösung: $7,4 \text{ nm} \pm 0,6 \text{ nm}$; SC10 in serumfreiem Medium: $563 \text{ nm} \pm 23 \text{ nm}$; SC10 in serumhaltigem Medium: $24,9 \text{ nm} \pm 6,0 \text{ nm}$) (Abbildung 5-14b).

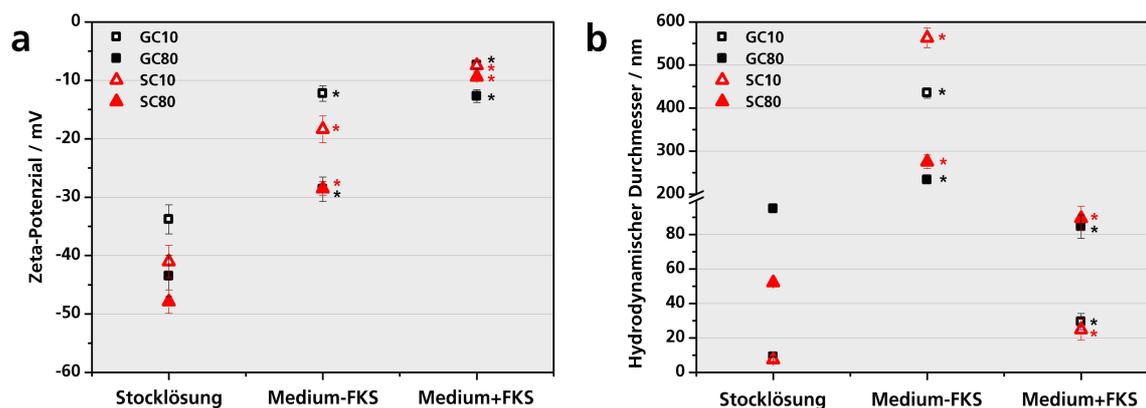


Abbildung 5-14 Einfluss des Lösungsmittels auf die Oberflächenladung und Größenverteilung der Nanopartikel.

Die kolloidalen Nanopartikelsuspensionen wurden nach Zentrifugation, Resuspension der Partikelpellets in serumfreiem und serumhaltigem Kulturmedium und 24stündiger Inkubation bei 37 °C physikochemisch charakterisiert. Im Vergleich zu der wässrigen Stocklösung wurde der Einfluss von serumfreiem Kulturmedium (Medium - FKS) und serumhaltigem Kulturmedium (Medium + FKS) auf die Oberflächenladung und den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel untersucht. (a) Dargestellt ist das Zeta-Potenzial in Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel. (b) Dargestellt ist der hydrodynamische Durchmesser in Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der Nanopartikelstocklösung ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test).

5.2.2 Zytotoxikologische Charakterisierung der Nanopartikel

Zunächst war das zytotoxische Potenzial der verwendeten Nanomaterialien an der stabil transfizierten Alveolarkarzinomzelllinie pIL8-GFP A549 zu klären.

Um festzustellen, welchen Einfluss Gold- und Silber-Nanopartikel auf die Vitalität der pIL8-GFP A549-Zellen ausüben, wurden verschiedene Zytotoxizitätsstudien durchgeführt. Neben der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität wurde die Proliferationsrate, die Caspase 3/7-Aktivität, der Phosphatidylserin-Flip in der Zellmembran sowie die Interleukin-8-gekoppelte GFP-Expression der transfizierten pIL8-GFP A549-Zellen, als Endpunkte zur Analyse des zytotoxischen Potenzials der Nanopartikel herangezogen.

Einfluss auf die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität

Der Einfluss der Gold- und Silber-Nanopartikel auf die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität von pIL8-GFP A549-Zellen wurde mittels WST-1 Assay bestimmt. Dabei wird die Stoffwechselaktivität quantifiziert. Ein toxischer Effekt spiegelt sich in einer Reduktion der Dehydrogenaseaktivität wieder. Um den konzentrationsabhängigen Einfluss zu untersuchen, wurden pIL8-GFP A549-Zellen mit steigenden Konzentrationen (0 - 50 $\mu\text{g/ml}$) SC10 in einer 96-Loch-Mikroplatte für 24 Stunden inkubiert. Nanopartikeläres Magnetit (MC100) wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Unbehandelte Zellen dienten als Referenzstandard und wurden auf 100 % gesetzt. Nach der Inkubation mit

SC10 wiesen die Zellen eine konzentrationsabhängige Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität auf. Diese lag nach 24stündiger Inkubation mit 50 $\mu\text{g/ml}$ bei $36,8 \% \pm 2,4 \%$, verglichen zu $74,7 \% \pm 2,8 \%$ nach MC100-Exposition der gleichen Konzentration (Abbildung 5-15a).

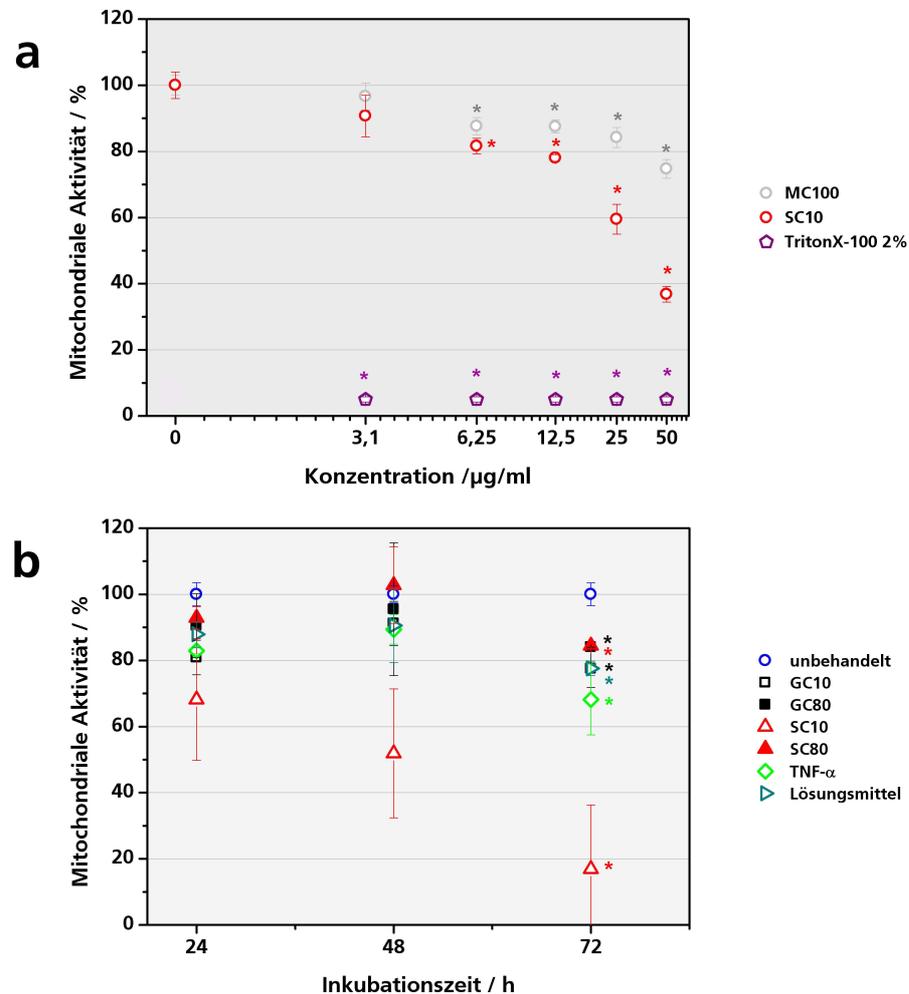


Abbildung 5-15 Effekt von Gold- und Silber-Nanopartikeln auf die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität von pIL8-GFP A549-Zellen.

(a) Konzentrationsabhängiger Effekt von SC10 im Vergleich zu den Referenzpartikeln MC100. pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit 0 - 50 $\mu\text{g/ml}$ SC10 oder MC100 für 24 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle diente TritonX-100. Dargestellt ist die relative mitochondriale Dehydrogenaseaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration. (b) Zeitabhängiger Effekt. pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit 30 $\mu\text{g/ml}$ GC10, GC80, SC10 oder SC80 oder 20 ng/ml TNF- α und dem Nanopartikellösungsmittel 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität wurde mittels WST-1 Assay ermittelt. Dargestellt ist die relative mitochondriale Dehydrogenaseaktivität in Abhängigkeit von der Expositionsdauer. Unbehandelte Zellen wurden als Referenzstandard auf 100 % gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle dargestellt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test).

Zur Untersuchung des zeitabhängigen Effekts wurden pIL8-GFP A549-Zellen mit 30 µg/ml GC10, GC80, SC10 und SC80 für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität über Absorptionsmessungen der Formazanbildung. Eine signifikante zeitabhängige Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität konnte für SC10 festgestellt werden. Das Enzym zeigte nach 24stündiger SC10-Inkubation eine Aktivität von $68,2 \% \pm 18,4 \%$, nach 48 Stunden reduzierte sich diese auf $51,9 \% \pm 19,5 \%$ und betrug nach 72 Stunden $16,9 \% \pm 16,4 \%$. Nach 72stündiger Inkubation betrug die Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität für GC10 $77,5 \% \pm 5,6 \%$, GC80 $84,0 \% \pm 0,2 \%$, SC80 $84,5 \% \pm 0,4 \%$ und das Lösungsmittel $77,6 \% \pm 2,3 \%$ (Abbildung 5-15b).

Der Tumornekrosefaktor (TNF- α), ein multifunktionaler Signalstoff des Immunsystems, diente in dieser Arbeit als Stimulus für eine Entzündungsreaktion in der transfizierten Zelllinie pIL8-GFP A549. Aus diesem Grund wurde auch dessen zytotoxisches Potenzial bestimmt. Die zur Induktion einer Inflammation verwendete TNF- α -Konzentration (20 ng/ml) senkte die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität nach 72 Stunden auf $68,2 \% \pm 10,7 \%$ (Abbildung 5-15b).

Einfluss auf die Zellproliferation

Der Einfluss der Gold- und Silber-Nanopartikel auf die Zellproliferation von pIL8-GFP A549-Zellen wurde mittels BrdU Assays bestimmt. Hierbei wird die Zellteilungsrate bestimmt. Diese ist neben der Zelldichte auch von der metabolischen Aktivität der Zellen abhängig. Ein toxischer Effekt führt bei diesem Analyseverfahren zu einer Abnahme der Proliferationsrate.

Zur Untersuchung des zeitabhängigen Effekts wurden pIL8-GFP A549-Zellen in einer 96-Loch-Mikroplatte mit 30 µg/ml GC10, GC80, SC10 und SC80 für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Das Lösungsmittel der Nanopartikel, der inflammationstimulierende TNF- α sowie die Positivkontrolle TritonX-100 wurden ebenfalls unter den genannten Bedingungen untersucht. Nach der Inkubation mit SC10 wiesen die Zellen nach 24 Stunden und 48 Stunden keine Reduktion der Zellproliferation auf. Erst nach 72stündiger Exposition bedingte SC10 eine Reduktion der Zellproliferationsrate ($47,2 \% \pm 5,1 \%$) (Abbildung 5-16). Die Proliferationsrate der mit den Nanopartikeltypen GC10, GC80 und SC80 sowie dem korrespondierenden Lösungsmittel und TNF- α -behandelten Zellen unterschied sich nicht signifikant zu der Proliferationsrate der Kontrollzellen (Abbildung 5-16).

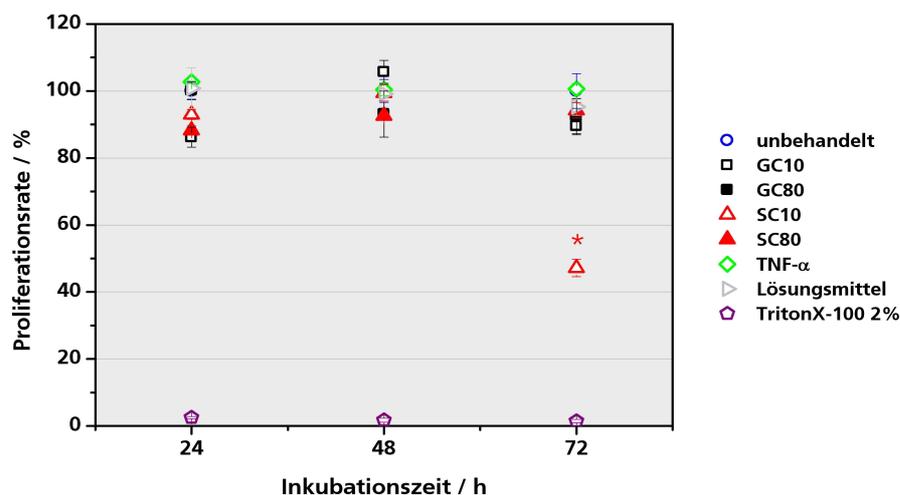


Abbildung 5-16 Zeitabhängiger Effekt von Gold- und Silber-Nanopartikeln auf die Proliferationsrate von pIL8-GFP A549-Zellen.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit 30 $\mu\text{g/ml}$ GC10, GC80, SC10 und SC80 sowie 20 $\mu\text{g/ml}$ TNF- α und dem Nanopartikellösungsmittel 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle diente TritonX-100. Die Proliferationsrate wurde mittels BrdU Assay ermittelt. Dargestellt ist die relative Proliferationsrate in Abhängigkeit von der Expositionsdauer. Unbehandelte Zellen wurden als Referenzstandard auf 100 % gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle dargestellt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$, Mann-Whitney U Test).

Einfluss auf die Induktion einer Inflammation

Zur nichtinvasiven Charakterisierung des Entzündungsstatus *in vitro* wurde die humane Alveolarkarzinomzelllinie A549 stabil mit dem pGL3-Basisvektor transfiziert. Dieser enthielt die humane Interleukin-8-Promotorsequenz und einen GFP-codierenden Expressionsvektor. Die für Entzündungsprozesse charakteristische Interleukin-Produktion (in diesem Fall Interleukin-8) war somit mit der GFP-Expression gekoppelt und konnte nichtinvasiv *in vitro* detektiert und quantifiziert werden. Eine GFP-Expression der transfizierten pIL8-GFP A549-Zellen bewies somit eine Interleukin-8-gekoppelte Inflammationsreaktion.

Zur Bestimmung der Inflammation wurden pIL8-GFP A549-Zellen mit den Nanopartikeln in 96-Loch-Mikroplatten kultiviert. Als Inflammationsmediator (Positivkontrolle) wurde der Tumornekrosefaktor (TNF- α) eingesetzt. Nach Exposition der pIL8-GFP A549-Zellen mit den Nanopartikeln wurde die GFP-Expression fluorometrisch quantifiziert. Hierbei zeigte sich die Stärke der Entzündungsreaktion proportional zu \pm der GFP-Expression. Die Intensität der Fluoreszenz hing zum einen von der Anzahl fluoreszierender Zellen, zum anderen von der Fluoreszenzintensität der individuellen Zellen in der analysierten Population ab.

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit wurden pIL8-GFP A549-Zellen mit steigenden Konzentrationen (0 - 50 µg/ml) SC10 und MC100 für 24 Stunden inkubiert. Die biologisch gut charakterisierten Magnetit-Partikel (MC100) wurden als Referenzmaterial mitgeführt. TNF- α diente als Positivkontrolle. Nach der Inkubation mit SC10 wiesen die Zellen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der GFP-Expression bis 30 µg/ml (155,0 % \pm 8,3 %) im Gegensatz zu 91,9 % \pm 2,6 % nach MC100-Exposition der gleichen Konzentration auf (Abbildung 5-17a). Konzentrationen größer 30 µg/ml führten zu einem geringeren Anstieg der quantifizierten Fluoreszenzintensität. 50 µg/ml SC10 erhöhte die GFP-Expression nur noch um 2,9 % \pm 0,81 % verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Das Optimum der relativen GFP-Expression bei 30 µg/ml liegt in der SC10-induzierten Vitalitätsabnahme begründet. Konzentrationen > 30 µg/ml führten zu einer Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität und somit zu keiner signifikanten mit einer GFP-Expression gekoppelten IL-8-Produktion (Abbildung 5-16).

Die GFP-Expression der mit MC100 inkubierten pIL8-GFP A549-Zellen schwankte konstant zwischen 91,9 % \pm 2,6 % (10 µg/ml) und 83,3 % \pm 1,4 % (50 µg/ml) (Abbildung 5-17a). Die Positivkontrolle TNF- α (20 ng/ml) bedingte eine GFP-Expression von 203,7 % \pm 12,8 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 5-17a).

Da SC10-Konzentrationen größer 30 µg/ml keinen Anstieg der Inflammation bedingten (Abbildung 5-17a), wurden die Untersuchungen der inflammatorischen Wirkung von GC10 und SC80 in einem geringeren Konzentrationsbereich (0 - 18 µg/ml) durchgeführt. pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen GC10 oder SC80 sowie SC10 für 24 Stunden inkubiert. Der Einsatz der Positivkontrolle TNF- α erfolgte im ng-Bereich (0 – 18 ng/ml). Nach Ende der Expositionsdauer zeigten alle untersuchten Nanopartikel (SC10, SC80, GC10) einen konzentrationsabhängigen Anstieg der GFP-Expression bis 18 µg/ml (Abbildung 5-17b). Die GFP-Expression der mit 18 µg/ml SC80 exponierten pIL8-GFP A549-Zellen lag mit 177,4 % \pm 15,1 % signifikant über der Kontrolle, mit SC10 (18 µg/ml) inkubierte Zellen wiesen ebenfalls einen signifikanten Anstieg auf (145 % \pm 6,4 %). Hingegen induzierte GC10 keine signifikante Erhöhung der GFP-Expression (128,3 % \pm 22,0 %) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5-17b).

Zur Untersuchung des zeitabhängigen Effekts der Nanopartikel auf die Inflammationsinduktion, wurden pIL8-GFP A549-Zellen mit 30 µg/ml GC10, GC80, SC10 oder SC80 sowie dem korrespondierenden Lösungsmittel und 20 ng/ml TNF- α für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die fluorometrische Bestimmung der GFP-Expression in der 96-Loch-Mikroplatte (ex. 485 nm/em. 535 nm). Nur bei TNF- α konnte ein zeitabhängiger Anstieg der GFP-Expression beobachtet werden. Nach 24stündiger Inkubation erhöhte sich die GFP-Expression der mit GC10 (119,8 % \pm 18,5 %), SC10

(112,5 % \pm 8,6 %) und GC80 (104,1 % \pm 8,9 %) und SC80 (125,8 % \pm 10,0 %) inkubierten pIL8-GFP A549-Zellen nicht signifikant. Nach 48stündiger Inkubation bedingte nur SC10 eine signifikant erhöhte GFP-Expression (144,6 % \pm 16,8 %) (Abbildung 5-17c). Nach 72stündiger Inkubation konnte für keine der untersuchten Nanopartikelsuspensionen ein signifikanter Anstieg der GFP-Expression detektiert werden (Abbildung 5-17c).

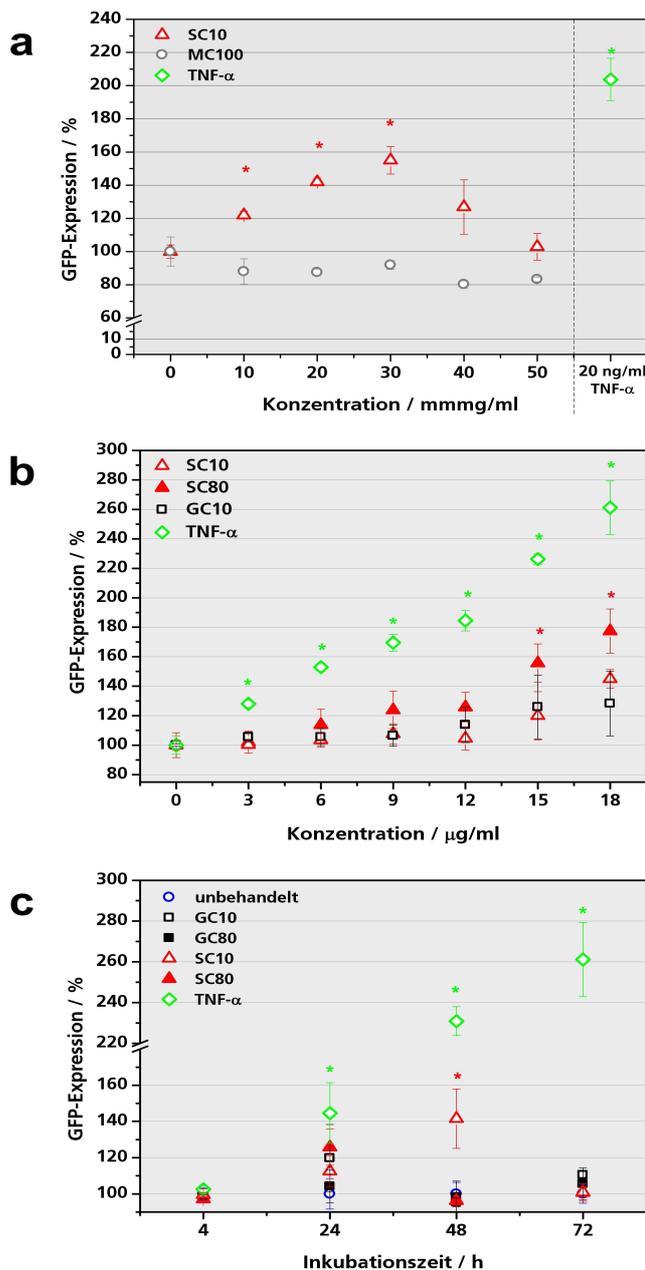


Abbildung 5-17 Effekt der Nanopartikel auf die Inflammation von pIL8-GFP A549-Zellen.

(a) Konzentrationsabhängiger Effekt. pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit 0-50 $\mu\text{g/ml}$ SC10 oder der Referenzpartikel MC100 sowie 20 ng/ml TNF- α (Positivkontrolle) für 48 Stunden inkubiert. Dargestellt ist die relative GFP-Expression in Abhängigkeit von der Nanopartikelkonzentration.

(b) Konzentrationsabhängiger Effekt. pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit 0 – 18 $\mu\text{g/ml}$ GC10, SC10, SC80 sowie 0 - 18 ng/ml TNF- α (Positivkontrolle) für 48 Stunden inkubiert. Dargestellt ist die relative GFP-Expression in Abhängigkeit von der Nanopartikelkonzentration.

(c) Zeitabhängiger Effekt. pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit 30 $\mu\text{g/ml}$ GC10, GC80, SC10, SC80 und 20 ng/ml TNF- α (Positivkontrolle) für 4, 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Dargestellt ist die relative GFP-Expression in Abhängigkeit von der Expositionsdauer.

Unbehandelte Zellen wurden als Referenzstandard auf 100 % gesetzt. Nach Ablauf der Expositionsdauer wurde die inflammationsgekoppelte GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen fluorenszspektrometrisch quantifiziert (ex. 485 nm/ em. 535 nm).

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle dargestellt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test).

Einfluss auf die Apoptoseinduktion

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse belegen eine akute Beeinträchtigung der pIL8-GFP A549 Zellvitalität sowie die Induktion einer Entzündung durch nanopartikuläres Silber und Gold. Um schließlich den Einfluss dieser Nanopartikel auf die Apoptoseinduktion zu untersuchen, wurde die Caspase 3/7-Aktivität als Analyseparameter herangezogen. Im Allgemeinen werden drei Arten des Zelltodes beschrieben: (i) Der programmierte Zelltod (Apoptose), (ii) die Nekrose und (iii) die Autophagie. Caspasen sind eine der wichtigsten Enzymgruppen der Apoptose. Die Caspasen 3 und 7 zählen zu den Effektor-Caspasen und stellen einen späten Marker der Apoptose dar. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob GC und SC einen Effekt auf die Caspase 3/7-Aktivität auslösen. Hierzu wurden pIL8-GFP A549-Zellen mit 0 - 30 µg/ml der entsprechenden Nanomaterialien für 48 Stunden inkubiert. Dabei wurde 1 µM Staurosporin als Apoptoseinduktor (Positivkontrolle) und nanopartikelfreies Kulturmedium als Negativkontrolle eingesetzt. Die Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität erfolgte unter Anwendung des lumineszenzbasierten Caspase-Glo 3/7 Assays, wobei ein apoptoseinduzierter Effekt ein Anstieg des Lumineszenzsignals hervorrufen würde.

Die Caspase 3/7-Aktivität der nanopartikelbehandelten pIL8-GFP Zellen unterschied sich nach 48stündiger Inkubation nicht signifikant von der Caspase 3/7-Aktivität der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 5-18). Ausschließlich die Positivkontrolle Staurosporin bewirkte einen signifikanten konzentrationsabhängigen Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität. Zwischen den nanopartikulären Materialien ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen (Abbildung 5-18a).

Die Ergebnisse des WST-1 Assays (Abbildung 5-15), im Zusammenhang mit den Resultaten des BrdU Assays (Abbildung 5-16) und der Analyse der GFP-Expression (Abbildung 5-17) sowie der Apoptoseinduktion (Abbildung 5-18) zeigten eindeutig, dass nanopartikuläres Silber in dem verwendeten zellulären System pIL8-GFP A549 akut zytotoxisch wirkt. Neben zeitabhängigen konnten auch größenabhängige Effekte detektiert werden. Nanopartikuläres Gold induzierte bei allen durchgeführten toxikologischen Analysen geringere Effekte als Nanosilber. Ob eine Nanopartikelinternalisierung stattfand oder die Nanopartikel weitere zelluläre Mechanismen wie z. B. Differenzierungsprozesse beeinflussen, wurde in den folgenden Versuchsreihen ermittelt.

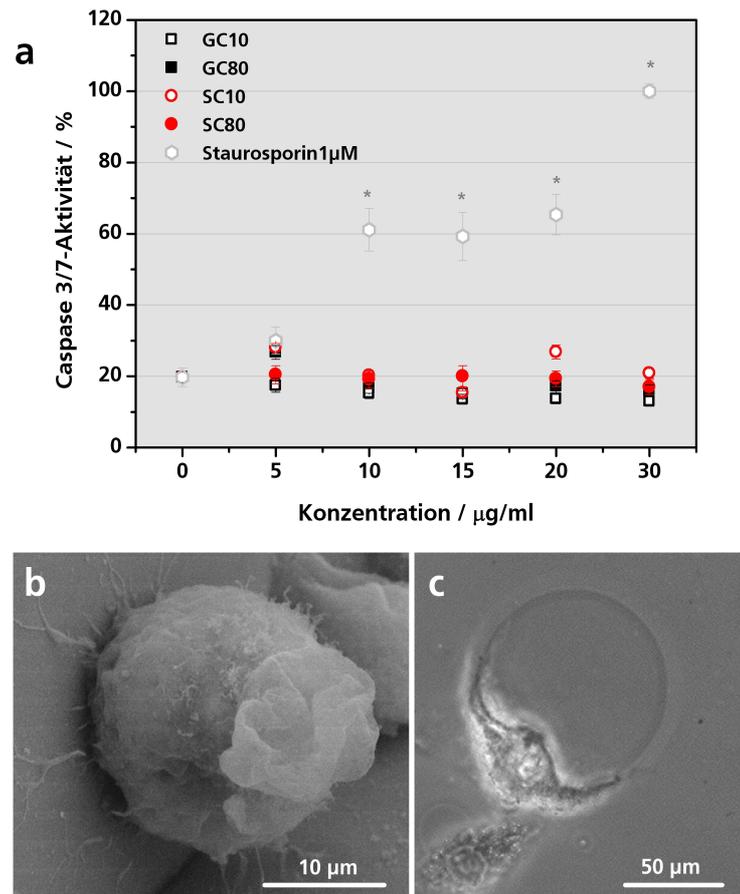


Abbildung 5-18 Effekt von Gold- und Silber-Nanopartikeln auf die Caspase 3/7-Aktivität von pIL8-GFP A549-Zellen.

(a) pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit 0 – 30 $\mu\text{g/ml}$ GC10, GC80, SC10, SC80 sowie 1 μM Staurosporin (Positivkontrolle) für 48 Stunden behandelt. Die Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität erfolgte mittels lumineszenzbasiertem Caspase-Glo 3/7 Assay. Dargestellt ist die Caspase 3/7-Aktivität in Abhängigkeit von der Nanopartikelkonzentration. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD gezeigt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test). (b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mit 30 $\mu\text{g/ml}$ SC10 inkubierten pIL8-GFP A549 Zelle. Eine für Apoptose charakteristische morphologische Veränderung ist deutlich zu erkennen. (c) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer mit 30 $\mu\text{g/ml}$ GC10 inkubierten pIL8-GFP A549 Zelle. Eine für Nekrose typische Morphologieveränderung ist deutlich zu erkennen.

Interaktion der Nanopartikel mit Analyseparametern der Toxizitätstests

Bei nanotoxikologischen Studien ist es wichtig, die Interaktion der zu untersuchenden Nanomaterialien mit den Analysereagenzien und den Analyseparametern der Toxizitätstests auszuschließen. Nur so kann garantiert werden, dass das detektierte Signal ausschließlich von den zellulären Systemen stammt. Exemplarisch wurde die Interaktion der Gold- und Silber-Nanopartikel mit der intrazellulären Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) untersucht. Bei membrangeschädigten Zellen diffundiert LDH in den Extrazellularraum und dient als Parameter zur indirekten Quantifikation von Membranschäden. Eine

hohe Enzymaktivität führt bei dieser Analysemethode zu einem Anstieg der quantifizierten optischen Dichte (OD). Eine Interaktion der Nanopartikel mit dem Enzym würde in einer Reduktion des umgesetzten Formazan-Salzes und somit in einer Reduktion der Absorption (Optische Dichte, OD) der Probe resultieren.

Im Vergleich zu den mit nanopartikel freiem Kulturmedium (0 $\mu\text{g/ml}$) behandelten Zellen sank die optische Dichte der Probe nach Behandlung mit 5,7 $\mu\text{g/ml}$ SC10 signifikant von OD $3,3 \pm 0,09$ auf OD $2,5 \pm 0,06$ (Abbildung 5-19). Die Exposition mit 27 $\mu\text{g/ml}$ SC10 reduzierte die optische Dichte signifikant um 15,2 % auf OD $2,8 \pm 0,05$ (Abbildung 5-19). 27 $\mu\text{g/ml}$ GC80 reduzierte die optische Dichte signifikant auf OD $2,9 \pm 0,02$ (Abbildung 5-19).

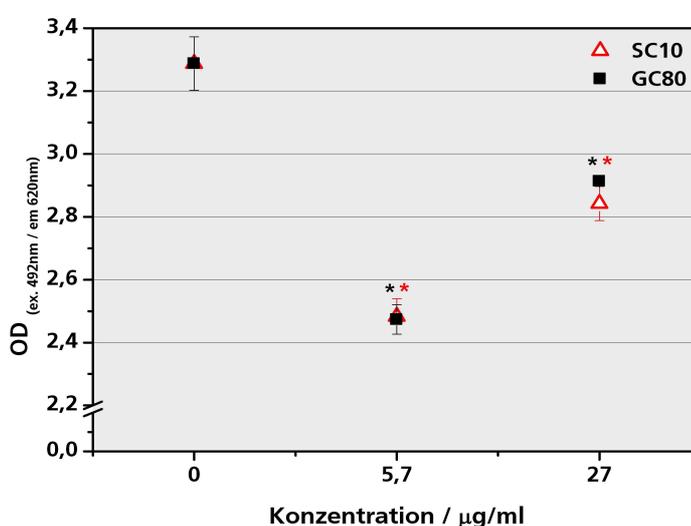


Abbildung 5-19 Interaktion von SC10 und GC80 mit der Laktatdehydrogenase.

Adhärenzte pIL8-GFP A549-Zellen wurden lysiert, der Mediumüberstand abzentrifugiert und mit 0 - 27 $\mu\text{g/ml}$ SC10 oder GC80 versetzt. Nach 4stündiger Inkubation bei 37 °C erfolgten die Zugabe des LDH-Reagenz und die spektralphotometrische Quantifizierung der Formazanbildung. Dargestellt ist die optische Dichte in Abhängigkeit von der Nanopartikelkonzentration. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test).

5.2.3 Einfluss der Nanopartikel auf die adipogene Differenzierung

Zur Untersuchung des Einflusses metallischer Nanopartikel auf hMSCs während der adipogenen Differenzierung wurden hMSCs beim Erreichen einer Konfluenz von 80 % in adipogenem Differenzierungsmedium, supplementiert mit Gold- oder Silber-Nanopartikeln (0 μg - 22,8 $\mu\text{g/ml}$), kultiviert.

Während der adipogenen Induktion deaktivierten die hMSCs ihre Proliferationsaktivität und differenzierten sichtbar durch die Einlagerung kleiner Lipidvakuolen, über die Vorstufe der Präadipozyten, zu Adipozyten. Nach 21tägiger Differenzierung wurden die

Lipidvesikel mit Hilfe des fettlöslichen Farbstoffes Oil Red O rot gefärbt. Ein großer Teil der hMSCs wies eingelagerte Lipidtropfen auf, wobei die Größe und Anzahl der Lipidvakuolen in den einzelnen Zellen, wie auch die Form der differenzierten Zellen, variierte (Abbildung 5-20).

Die mit GC80 inkubierten Kulturen der hMSCs zeigten nach 21-tägiger adipogener Induktion eingelagerte Lipidtropfen. Mit steigender GC80-Konzentration reduzierte sich der Anteil der Lipidvakuolenformation (Abbildung 5-20b). Die spindelförmige Morphologie der undifferenzierten Stammzelle änderte sich in der nanopartikelfreien Probe zur sphärischen Form des ausgereiften Adipozyten (Abbildung 5-20). Nach Inkubation mit 22,8 µg/ml GC80 konnte eine hauptsächlich spindelförmige Morphologie beobachtet werden. (Abbildung 5-20 Bild b5).

Weiter war zu beobachten, dass die Inkubation mit GC10 zwar auch zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Lipidvakuolenbildung nach 21-tägiger adipogener Differenzierung führte (Abbildung 5-20a), unter Einsatz von 22,8 µg/ml GC10 befanden sich allerdings nach 21-tägiger Adipogenese nur die adipogen differenzierten hMSCs auf der Zellkulturoberfläche. Die restlichen Zellen hatten sich abgelöst (Abbildung 5-20 Bild a5).

Parallel zu der Untersuchung des Effekts von nanopartikulärem Gold wurde der Einfluss von SC10 (Abbildung 5-20c) und SC80 (Abbildung 5-20d) auf hMSCs während der Adipogenese untersucht. SC80 induzierte eine drastische Reduktion der Lipidformation nach 21-tägiger Adipogenese (Abbildung 5-20 Bild d5). 5,6 µg/ml SC80 ließen optisch noch keine Detektion einer Reduktion der Lipidvakuolenbildung zu (Abbildung 5-20 Bild d2). Erst Konzentrationen von 11,6 µg/ml und größer bedingten eine deutliche Abnahme der adipogenen Differenzierung (Abbildung 5-20 Bild d3). Die mit 22,8 µg/ml SC80 inkubierten hMSC-Kulturen wiesen nach 21-tägiger adipogener Induktion fast keine eingelagerten Lipidvakuolen mehr auf (Abbildung 5-20 Bild d5).

Nach Inkubation mit SC10 konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme der Lipidvakuolenbildung beobachtet werden (Abbildung 5-20c). Mit steigender GC80-Konzentration reduzierte sich der Anteil der Lipidvakuolenformation (Abbildung 5-20b). Die spindelförmige Morphologie der undifferenzierten Stammzelle blieb erhalten, die hMSCs lösten sich nicht von der Zelloberfläche wie es bei GC10 und SC10 der Fall war.

Ein beobachtetes Phänomen bei SC und GC war, dass die Zellen, die adhärirt blieben, trotz chronischer Nanopartikelexposition Lipidvakuolen bildeten, die im Anschluss mittels Oil Red O-Färbung sichtbar markiert werden konnten. Parallel zu den Versuchen mit den Nanopartikeln wurde das abzentrifugierte Lösungsmittel der jeweiligen Nanopartikelsuspensionen hinsichtlich seines Einflusses auf die Lipidvakuolenbildung getestet. Die Lösungsmittelvolumen wurden so gewählt, dass sie mit den Volumina der Nanopartikelsus-

pensionen korrelierten. In keiner der mit Lösungsmittel behandelten Proben konnte ein Einfluss auf die Lipidvakuolenbildung beobachtet werden (nicht in Abbildung 5-20 dargestellt).

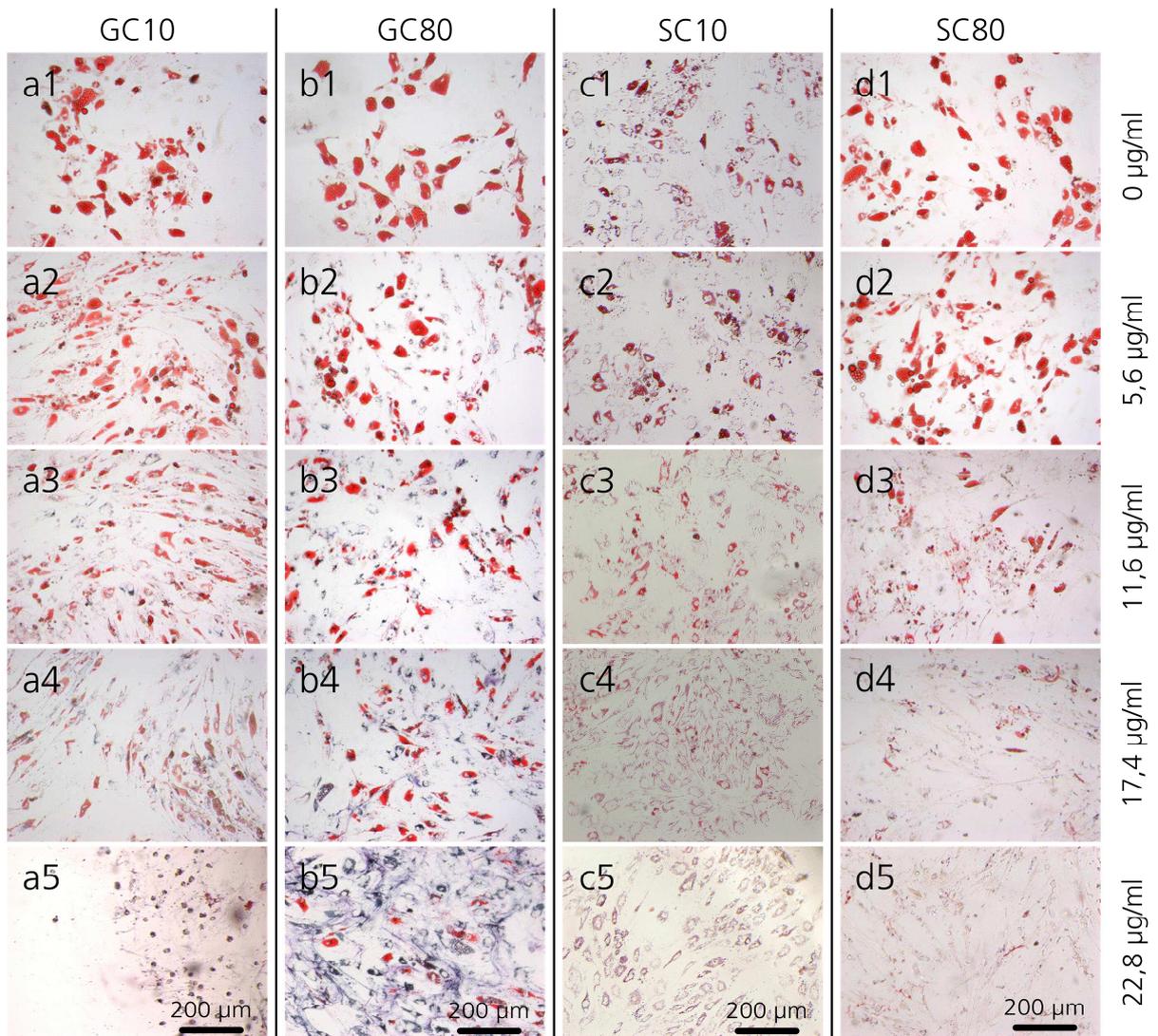


Abbildung 5-20 Einfluss von Gold- und Silber-Nanopartikeln auf hMSCs während der adipogenen Differenzierung.

hMSCs wurden 21 Tage adipogen differenziert und dabei chronisch mit (a) GC10, (b) GC80, (c) SC10 oder (d) SC80 inkubiert. Die Nanopartikelkonzentrationen variierten von (1) 0 µg/ml, über (2) 5,6 µg/ml, (3) 11,6 µg/ml, (4) 17,4 µg/ml, bis (5) 22,8 µg/ml. Dargestellt sind hellfeldmikroskopische Aufnahmen der adipogen induzierten hMSC-Kulturen nach Fixierung und Oil Red O-Färbung. Adipogen differenzierte hMSCs haben Lipidvakuolen (rot) eingelagert. Deutlich sichtbar ist die Reduktion der Lipidvakuolenformation mit steigender Nanopartikelkonzentration.

Zur Quantifizierung der adipogenen Differenzierung wurde der Oil Red O-gefärbte Flächenanteil berechnet und prozentual in das Verhältnis zur nanopartikelunbehandelten Kontrolle gesetzt (Abbildung 5-21). Nach 21-tägiger Kultivierung in GC10-supple-

mentiertem adipogenem Differenzierungsmedium zeigten die hMSCs eine deutliche Reduktion der Lipidvakuolenbildung bei steigender GC10-Konzentration. Der Oil Red O-gefärbte Flächenanteil reduzierte sich von $76,4 \% \pm 16,3 \%$ ($5,8 \mu\text{g/ml}$) auf $6,4 \% \pm 4,5 \%$ ($22,8 \mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu den auf 100% gesetzten unbehandelten ($0 \mu\text{g/ml}$) adipogen differenzierten hMSCs. Ein ähnliches Profil ergab sich für die adipogene Differenzierung bei chronischer GC80-Exposition (Abbildung 5-21a). Hier sank der Oil Red O-gefärbte Flächenanteil von $81,5 \% \pm 20,6 \%$ ($5,8 \mu\text{g/ml}$) auf $20,1 \% \pm 3,8 \%$ ($22,8 \mu\text{g/ml}$). Eine konzentrationsabhängige Reduktion der Lipidvakuolenbildung kann auch für die SC10- und SC80-Inkubation der adipogen induzierten hMSCs quantifiziert werden (Abbildung 5-21b). Der Oil Red O-gefärbte Flächenanteil der SC10-inkubierten hMSCs reduzierte sich von $29,8 \% \pm 2,8 \%$ ($5,8 \mu\text{g/ml}$) auf $0,1 \% \pm 0,01 \%$ ($22,8 \mu\text{g/ml}$). Der Oil Red O-gefärbte Flächenanteil der SC80 exponierten hMSCs sank von $60,3 \% \pm 7,3 \%$ ($5,8 \mu\text{g/ml}$) auf $1,3 \% \pm 0,4 \%$ ($22,8 \mu\text{g/ml}$) (Abbildung 5-22b).

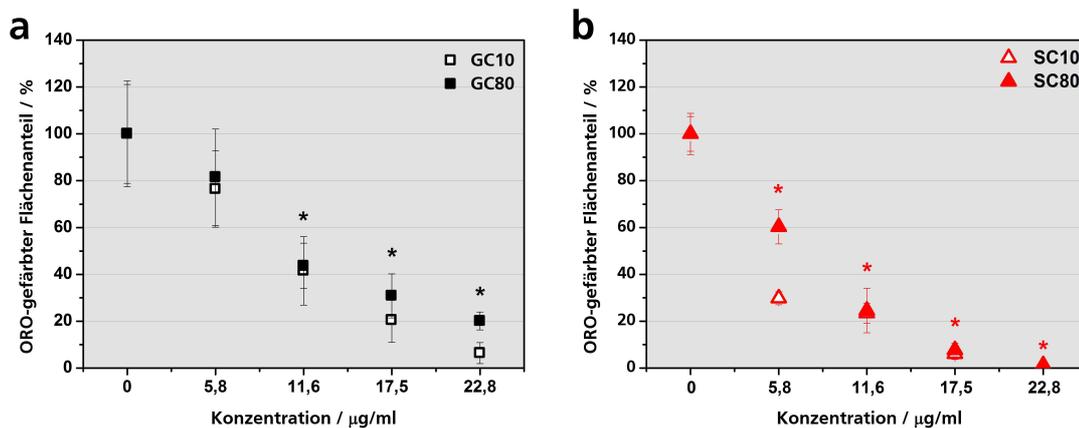


Abbildung 5-21 Konzentrationsabhängiger Effekt von Gold- und Silber-Nanopartikel auf die Lipidvakuolenbildung der adipogen induzierten hMSCs.

hMSCs wurden 18 Tage unter chronischer Exposition mit $0 - 22,8 \mu\text{g/ml}$ GC10, GC80, SC10 oder SC80 in adipogene Richtung differenziert. Zur Quantifizierung des adipogenen Differenzierungsstatus erfolgte nach 21tägiger Differenzierung die Analyse der Pixelintensität der Oil Red O-gefärbten Lipidvakuolen der hellfeldmikroskopischen Aufnahmen. (a) Dargestellt ist der Oil Red O-gefärbte Flächenanteil in Abhängigkeit der Nanopartikelkonzentration nach Exposition der hMSCs mit GC. (b) Dargestellt ist der Oil Red O-gefärbte Flächenanteil in Abhängigkeit der Nanopartikelkonzentration nach Exposition der hMSCs mit SC. Die unbehandelte Kontrolle wurde als Referenzwert auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus fünf Bereichen der Probe \pm SD im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle dargestellt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test).

Zur Analyse des Einflusses der Gold- und Silber-Nanopartikel auf die metabolische Dehydrogenaseaktivität der hMSCs während der adipogenen Differenzierung wurde der WST-1 Assay herangezogen. hMSCs wurden mit $0 - 22,8 \mu\text{g/ml}$ der spezifischen Nanopartikelsuspensionen für 7, 14 und 21 Tage inkubiert. Eine chronische Exposition

erfolgte durch den Austausch des inkubierten nanopartikelsupplementierten Differenzierungsmediums in dreitägigem Abstand. Nach beendeter Inkubationszeit wurde die Zellviabilität über Absorptionsmessungen der Formazanbildung bestimmt. Mit nanopartikel freiem Differenzierungsmedium behandelte hMSCs wurden auf 100 % festgesetzt. Nach der 7tägigen chronischen Exposition der hMSCs mit GC10 stieg bei geringen GC10-Konzentrationen die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität auf $189,8 \% \pm 20,4 \%$ ($5,8 \mu\text{g/ml}$) und $200,2 \% \pm 7,5 \%$ ($11,6 \mu\text{g/ml}$) im Gegensatz zu $124,5 \% \pm 8,8 \%$ Enzymaktivität nach der Inkubation mit $17,4 \mu\text{g/ml}$ und $89,6 \% \pm 7,0 \%$ nach der Inkubation mit $22,8 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 5-22a). Verglichen zur Kontrolle, war nach 14tägiger GC10-Inkubation keine signifikante Änderung der Dehydrogenaseaktivität detektierbar. Nach 21tägiger Exposition unter adipogenen Differenzierungsbedingungen senkte GC10 ab $17,4 \mu\text{g/ml}$ die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität. Diese reduzierte sich nach der Inkubation mit $17,4 \mu\text{g/ml}$ auf $49,8 \% \pm 21,8 \%$ und lag nach Inkubation mit $22,8 \mu\text{g/ml}$ bei $3,8 \% \pm 0,9 \%$ (Abbildung 5-22a). Im Gegensatz zu GC10 führte GC80 nach der 7tägigen chronischen Exposition der hMSCs, selbst bei Anwesenheit der höchsten GC80-Konzentrationen ($22,8 \mu\text{g/ml}$), zu keiner signifikanten Veränderung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität ($100,6 \% \pm 6,1 \%$) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 5-22b). Auch nach 14tägiger GC80-Inkubation war keine signifikante Änderung der Dehydrogenaseaktivität detektierbar. Nach 21tägiger Exposition unter adipogenen Differenzierungsbedingungen bedingte ausschließlich die höchste Konzentration ($22,8 \mu\text{g/ml}$) einen Anstieg der Enzymaktivität auf $171,5 \% \pm 5,3 \%$ (Abbildung 5-22b). Nach der 7tägigen chronischen Exposition der hMSCs mit SC10 wiesen die exponierten Zellen eine mitochondriale Dehydrogenaseaktivität zwischen $110,8 \% \pm 3,3 \%$ ($5,8 \mu\text{g/ml}$) und $77,7 \% \pm 1,7 \%$ ($22,8 \mu\text{g/ml}$) auf (Abbildung 5-22c). Bei einer Inkubationszeit von 14 Tagen induzierte die Anwesenheit der SC10 Nanopartikel ab einer Konzentration von $11,6 \mu\text{g/ml}$ eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität (Abbildung 5-22c). Vergleichend zu SC10 wurde SC80 hinsichtlich des größenabhängigen Effekts von Silber-Nanopartikeln auf die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität untersucht (Abbildung 5-22d). Eine signifikante Reduktion der Dehydrogenaseaktivität, verglichen zur Kontrolle, war nach 7tägiger SC80-Inkubation ab einer Konzentration von $17,4 \mu\text{g/ml}$ detektierbar. Nach 21tägiger Exposition unter adipogenen Differenzierungsbedingungen sank bei SC80 ab $5,8 \mu\text{g/ml}$ die Enzymaktivität (Abbildung 5-22d).

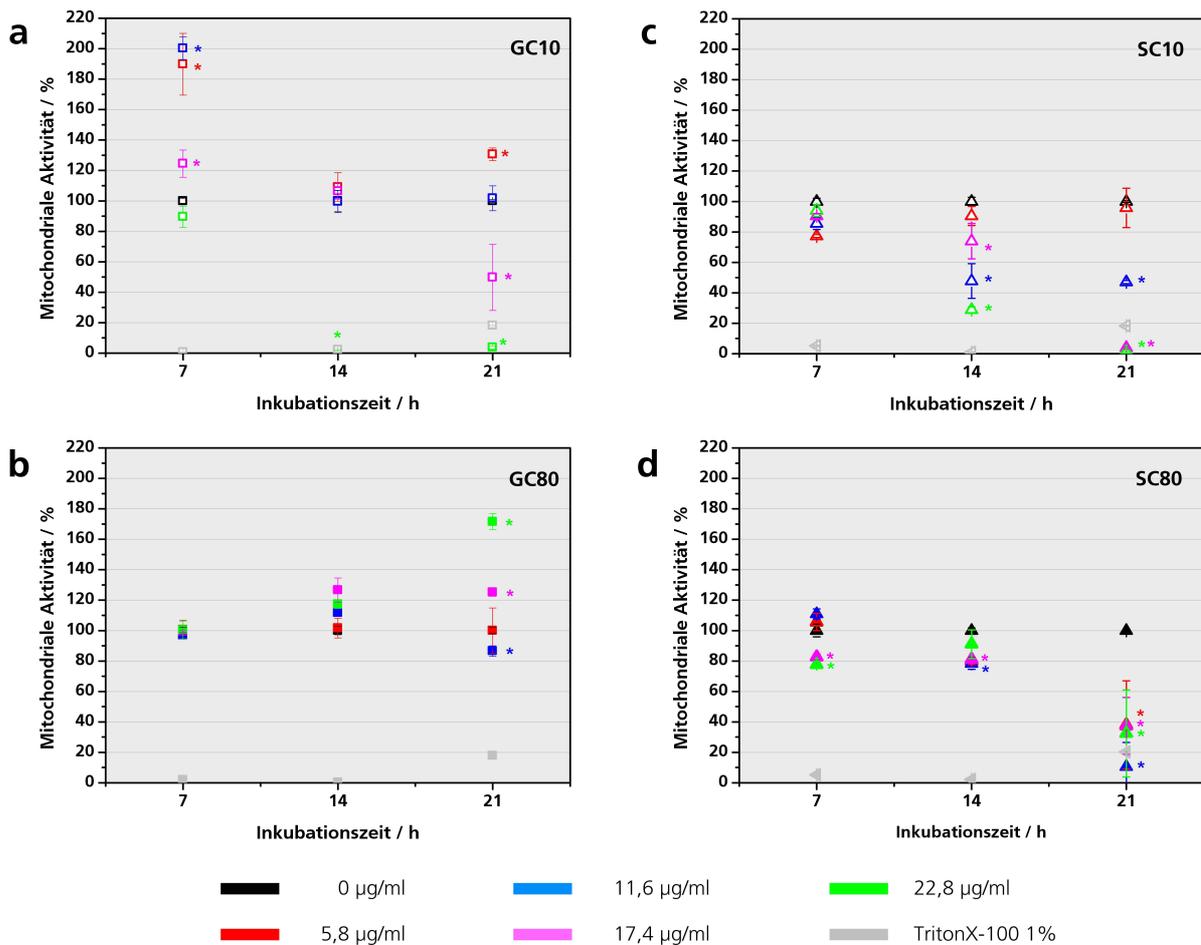


Abbildung 5-22 Effekt von Gold- und Silber-Nanopartikeln auf die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität von hMSCs.

hMSCs wurden während deren adipogenen Induktion mit 0 - 22,8 µg/ml (a) GC10, (b) GC80, (c) SC10 oder (d) SC80 für 7, 14 und 21 Tage unter physiologischen Bedingungen behandelt. Die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität wurde nach Zugabe des WST-1 Reagenz durch Messung der Formazanbildung spektralphotometrisch bestimmt. Dargestellt ist die relative mitochondriale Dehydrogenaseaktivität in Abhängigkeit von der Expositionsdauer. Unbehandelte Zellen wurden als Referenzstandard auf 100 % gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle dargestellt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test).

Mittels Langzeitmikroskopie wurde der zeitliche Verlauf der Adipogenese unter Anwesenheit von GC80 im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle kontinuierlich beobachtet (Abbildung 5-23). In der Kontrolle bildeten sich nach drei Tagen erste Lipidvakuolen. Mit steigender Differenzierungsdauer nahm die Bildung von Adipozyten zu. Im Gegensatz zur Kontrolle setzte bei GC80-behandelten hMSCs die Lipidvakuolenbildung erst nach 7 Tagen ein und die Adipogenese lief schwächer ab. Parallel zur Lipidvakuolenbildung wurde die GC80-Agglomeration als schwarze Bereiche deutlich sichtbar (Abbildung 5-23). Ob eine Nanopartikelinternalisierung stattfand, wurde in weiteren Experimenten analysiert.

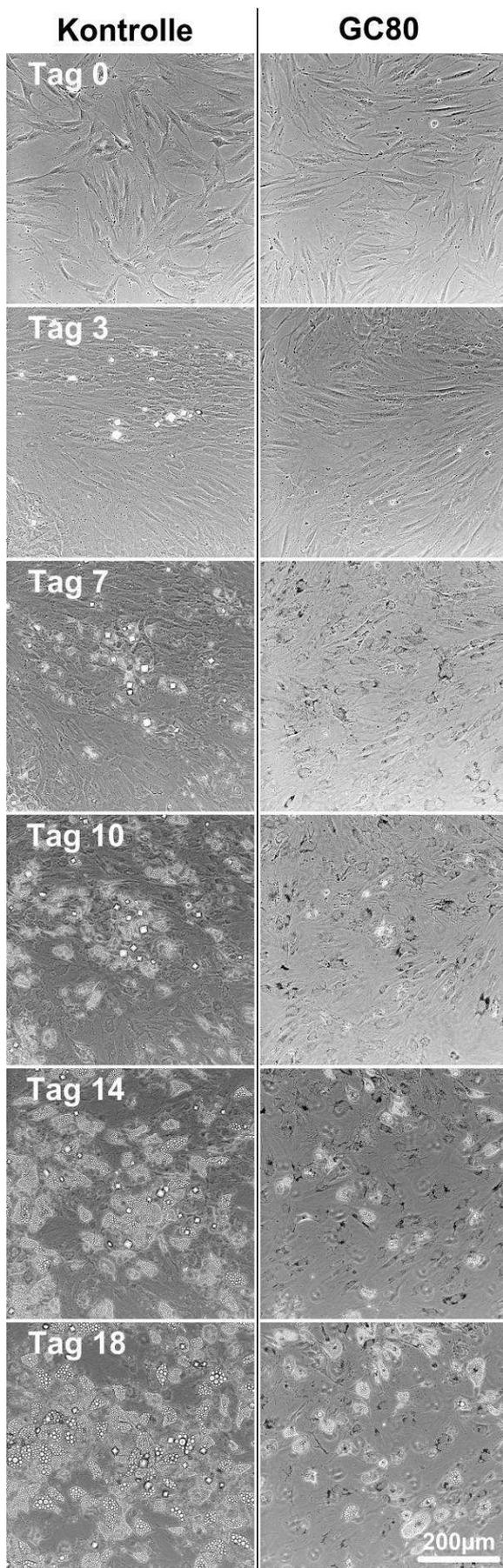


Abbildung 5-23 Einfluss von GC80 auf hMSCs während der adipogenen Differenzierung.

Mittels Langzeitmikroskopie wurde die adipogene Differenzierung von hMSCs unter chronischer GC80-Exposition (22,8 µg/ml) im Vergleich zu unbehandelten hMSCs (Kontrolle) kontinuierlich dokumentiert. Dargestellt sind phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen des gleichen Ausschnittes während der 18tägigen Differenzierung. Unbehandelte hMSCs bildeten nach dreitägiger Inkubation mit adipogeneseinduzierenden Faktoren erste Lipidvakuolen. Im Laufe der Inkubation erhöhte sich die Anzahl der lipidvakuolenhaltigen Zellen. GC80-bahandelte hMSCs bildeten im Gegensatz zu der Kontrolle stark zeitverzögert erste Präadipozyten aus. Parallel zu der Lipidvakuolenbildung ist die GC80-Agglomeration als schwarze Bereiche deutlich sichtbar.

Zur Quantifizierung des Anteils adipogen differenzierter hMSCs in der Kultur wurde der prozentuale Rotanteil in den mittels Langzeitmikroskopie generierten Daten digital quantifiziert. Der Vergleich des adipogenen Anteils der unbehandelten hMSC-Kultur mit der mit 22,8 µg/ml chronisch inkubierten hMSC-Kultur zeigte einen verzögerten Anstieg des prozentualen Anteils adipogen differenzierter hMSCs nach chronischer GC80-Exposition (Abbildung 5-24).

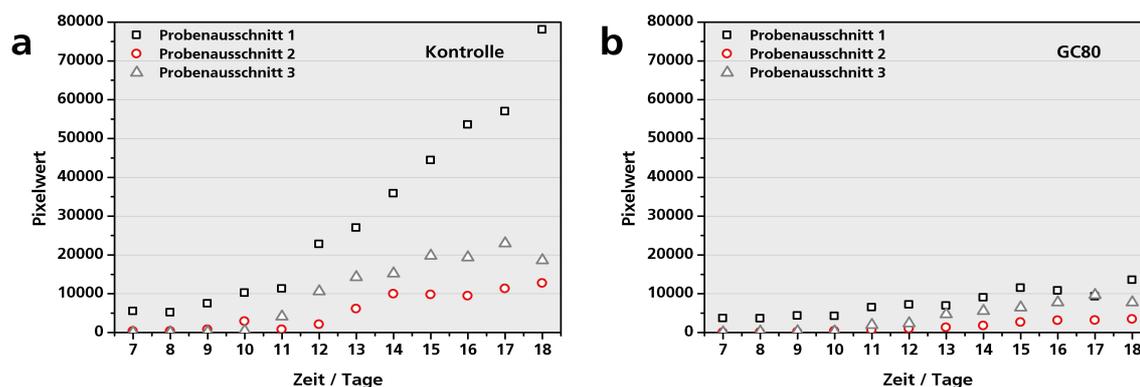


Abbildung 5-24 Effekt von GC80 auf den zeitabhängigen Anstieg der Lipidvakuolenbildung der adipogen induzierten hMSCs.

hMSCs wurden 18 Tage unter chronischer GC80-Exposition (22,8 µg/ml) in adipogene Richtung differenziert. Zur Quantifizierung des adipogenen Differenzierungsstatus erfolgte die Analyse der Pixelintensität der Lipidvakuolen den langzeitmikroskopischen Aufnahmen. (a) Dargestellt ist der Pixelwert der unbehandelten Kontrolle in Abhängigkeit der Zeit von drei unterschiedlichen Ausschnitten. (b) Dargestellt ist der Pixelwert in Abhängigkeit der Zeit von drei unterschiedlichen Ausschnitten der GC80-behandelten hMSCs.

5.2.4 Zelluläre Internalisierung der Nanopartikel

Die Partikelinteraktion mit dem Zellsystem sowie die intrazelluläre Aufnahme und subzelluläre Verteilung der Nanopartikel konnte sowohl mittels konfokaler Rasterlasermikroskopie (CLSM), als auch via Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionsmikroskopie dokumentiert werden.

A549-Zellen wurden mit 30 µg/ml GC10 für 24 Stunden unter physiologischen Bedingungen inkubiert, im Anschluss die Zellmembran mit Concanavalin A Alexa Fluor 488 gefärbt und die Zelle mittels konfokaler Rasterlasermikroskopie analysiert. Die Detektion der Gold-Nanopartikel erfolgte mittels Multiphotonenanregung unter Nutzung des Reflexionsverhaltens der untersuchten metallischen Nanopartikel. Durch Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle wurde eine Lokalisation der Nanopartikel im Intrazellularraum sichtbar (Abbildung 5-25).

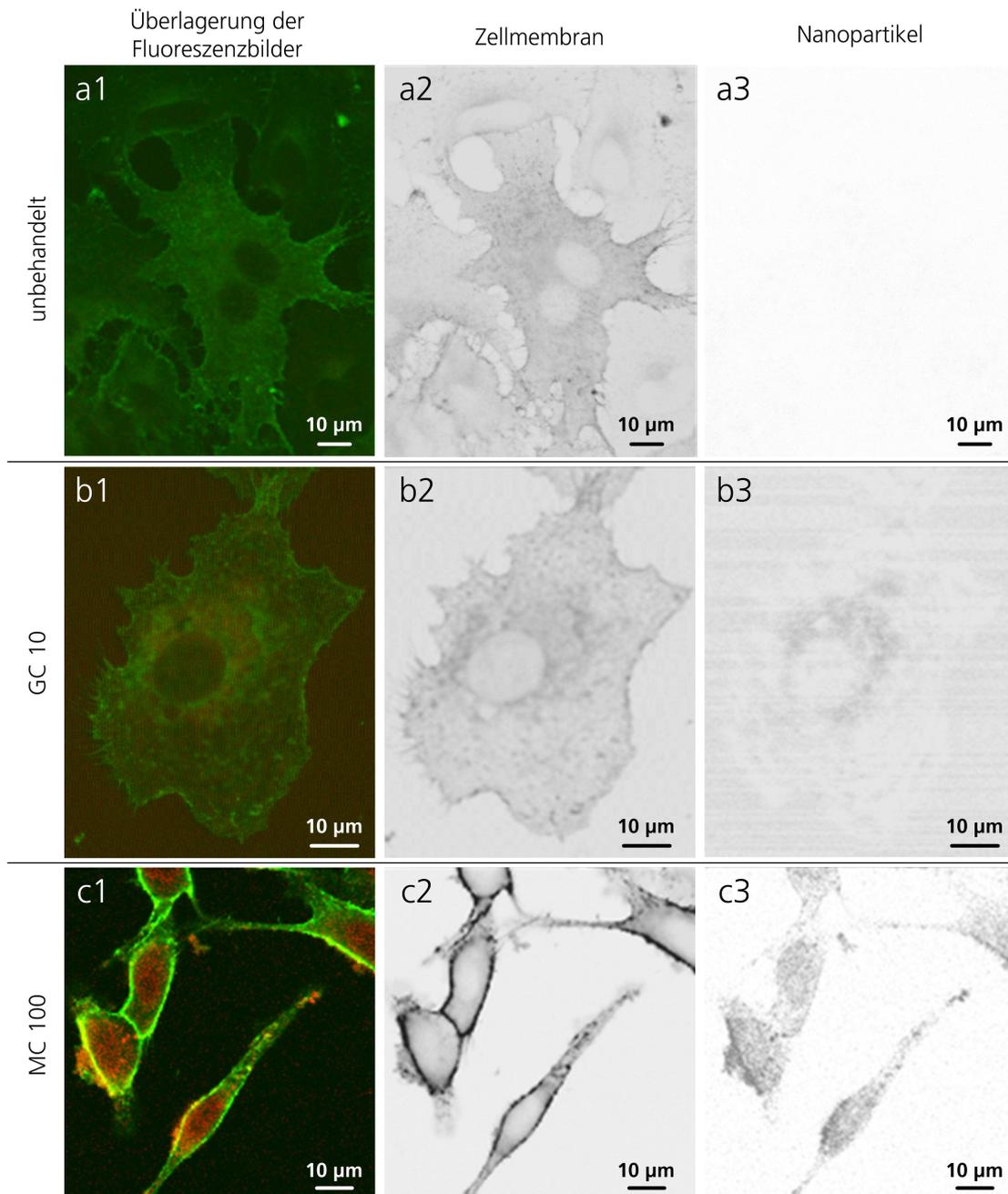


Abbildung 5-25 Internalisierung und intrazelluläre Verteilung von GC10 und MC100.

A549-Zellen wurden unbehandelt (a) oder mit 30 µg/ml GC10 (b) oder MC100 (c) für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellmembran mit Alexa Fluor 488-gekoppeltem Concanavalin A gefärbt. Zur Visualisierung der Nanopartikel mittels konfokaler Rasterlasermikroskopie wurde die multiphotoneninduzierte Reflexion der metallischen Nanopartikel genutzt. (1) Überlagerung der Einzel-fluoreszenzbilder. (2) Mit Alexa Fluor 488-gekoppeltem Concanavalin A gefärbte Zellmembran. Dargestellt ist das invertierte Fluoreszenzbild. (3) Multiphotoneninduzierte Reflexion von GC10 und MC100. Die Helligkeit der Fluoreszenzaufnahme b3 wurde um 4 %, der Kontrast um 5 % erhöht. Dargestellt ist das invertierte Fluoreszenzbild. Die Akkumulation der internalisierten Nanopartikel ist deutlich zu erkennen.

CLSM-Aufnahmen zeigten eine spezifische subzelluläre Anreicherung der GC10-Nanopartikel (Abbildung 5-25b) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Abbildung

5-25a). Die intrazelluläre Aufnahme von MC100 konnte ebenfalls gezeigt werden, hingegen keine spezifische Anreicherung im Zellkern (Abbildung 5-26c). Die grüne Fluoreszenz stellt die Concanavalin A Alexa Fluor 488-gefärbte Zellmembran dar (Abbildung 5-26 Bild a2, Bild b2 und Bild c2), während die roten Reflexionssignale der Partikel im Zellinneren zu erkennen waren (Abbildung 5-26 Bild a3, Bild b3 und Bild c3). Die Aufspaltung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in die einzelnen Fluoreszenzkanäle verdeutlicht die intrazelluläre Nanopartikellokalisierung.

Zur Untersuchung der Nanopartikel-Zellinteraktion und der Internalisierung der Nanopartikel wurde zusätzlich die Rasterelektronenmikroskopie herangezogen. Am Beispiel von GC80 unter Anwendung adipogen differenzierender hMSCs wurde die Internalisierung der Gold-Nanopartikel in humanen Zellen untersucht. Hierzu wurden hMSCs unter chronischer Exposition mit 22,8 µg/ml über 21 Tage adipogen differenziert. Wie zuvor bewiesen werden konnte, beeinflusst GC80 die adipogene Differenzierung humaner MSCs. Hellfeldmikroskopisch konnte eine Reduktion der Lipidvakuolenbildung quantifiziert und eine Internalisierung der Nanopartikel vermutet werden (Abbildung 5-20 und Abbildung 5-24). Zur Analyse der morphologischen Änderungen der hMSCs während der adipogenen Differenzierung unter Anwesenheit von GC80 und der GC80-Internalisierung, wurden die Zellen rasterelektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung

5-26). Exemplarisch wurden repräsentative Ausschnitte der Zellpopulation abgebildet.

Mesenchymale Stammzellen wiesen eine fibroblastartige Form auf, die sich während der adipogenen Differenzierung in runde Zellen mit eingelagerten Lipidvesikeln änderte (Abbildung 5-26 Bild a, b und d). Zwischen den Zellen befand sich eine dünne Filamentstruktur (Abbildung 5-26c). In unbehandelten adipogen differenzierten hMSCs wurden Lipidvakuolen unterschiedlicher Größe an der Oberfläche sowie unter der Zellmembran detektiert (Abbildung 5-26 Bild e und f). Im inversen Rückstreuemodus wurden diese als schwarze Tropfen gut sichtbar (Abbildung 5-26e). Nach 21-tägiger adipogener Differenzierung unter Einsatz von 22,8 µg/ml GC80, zeigten die hMSCs verstärkt eine fibroblastartige Morphologie. Nach GC80-Exposition ist unter Anwendung des Sekundärelektronendetektors das Vorhandensein von GC80-Agglomeraten auf der hMSC-Oberfläche zu beobachten (Abbildung 5-26 Bild g, h, j, k). GC80 konnte als einzelne Partikel und als Agglomerate nachgewiesen werden. Bei hoher Auflösung war zu erkennen, dass die GC80-Partikel von einer dünnen Hülle umgeben sind (Abbildung 5-26k). Mittels Rückstreuemodus und hoher Primärelektronenstrahlenergie (10-20 kV) konnte das Vorhandensein von GC80 im Intrazellularraum der hMSCs gezeigt werden (Abbildung 5-26 Bild l und n).

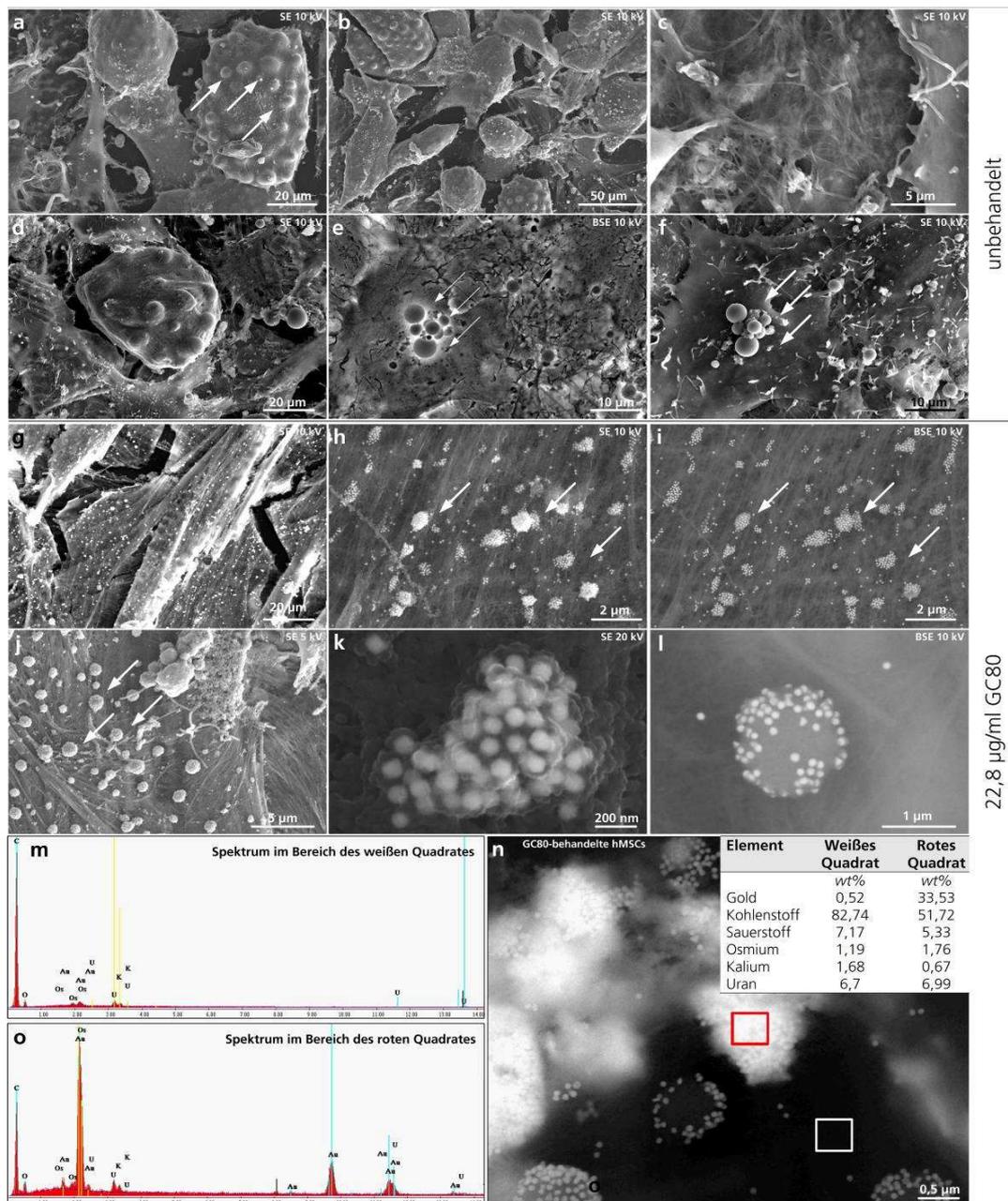


Abbildung 5-26 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen GC80-inkubierter adipogen differenzierter hMSCs.

hMSCs wurden während der 18-tägigen adipogenen Differenzierung chronisch mit 22,8 µg/ml GC80 unter physiologischen Bedingungen inkubiert und im Anschluss mittels Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Die Primärelektronenenergie variierte zwischen 5 kV und 20 kV. Zur Detektion wurden Sekundär- und die Rückstreuelektronen genutzt. (a-f) Adipogen differenzierte, unbehandelte hMSCs. Rasterelektronenmikroskopisch deutlich sichtbar sind die Lipidvakuolen der adipogen differenzierten hMSCs. (g-l) Adipogen differenzierte, GC80-behandelte hMSCs. Sowohl auf, als auch unterhalb der Zellmembran konnten GC80 detektiert und quantifiziert werden. (m und o) Spektren der energie-dispersiven Röntgenspektroskopie. (n) Adipogen differenzierte, GC80-behandelte hMSCs. Das rote und weiße Quadrat kennzeichnen den Bereich der Probe in dem die Röntgenstrahlenelementaranalyse durchgeführt wurde. Rotes Quadrat: Nanopartikelhaltiger Bereich, weißes Quadrat: Referenzbereich. Die Tabelle zeigt die Auswertung der energiedispersiven Röntgenspektroskopie.

Um die Hypothese zu überprüfen, ob es sich bei den detektierten Strukturen um die zuvor inkubierten GC80-Nanopartikel handelte, wurde eine Röntgenstrahlenelementanalyse durchgeführt. Das Resultat der energiedispersiven Röntgenspektroskopie bewies, dass es sich bei dem detektierten Material um Gold handelte. Die Elementanalyse der unbehandelten adipogen differenzierten hMSCs resultiert in einem GC80-Anteil von 1,7 % (Abbildung 5-26m und Abbildung 5-26n). Hingegen liegt der GC80-Anteil in der GC80-behandelten Probe bei 33,5 % (Abbildung 5-26n und Abbildung 5-26o).

Zur Untersuchung der Internalisierung der Gold-Nanopartikel wurde am Beispiel der adipogen differenzierten hMSCs die intrazelluläre Verteilung von GC80 ermittelt. Hierzu wurden hMSCs 21 Tage unter chronischer Exposition mit 22,8 µg/ml GC80 adipogen differenziert und im Anschluss rasterelektronenmikroskopisch analysiert. Hierbei wurde zur topographischen Darstellung der biologischen Probe mit dem Sekundärelektronendetektor (SE) gearbeitet. Zusätzlich zu der Abbildung der kristallographischen Struktur des Probenmaterials wurde der Rückstreuelektronendetektor (BSE) eingesetzt und ermöglichte dadurch Rückschlüsse auf die Internalisierung der Nanopartikel in die Zelle. Die Primärelektronenenergie variierte zwischen 5 kV und 20 kV. Die Erhöhung der Primärelektronenstrahlenergie resultiert in einer Zunahme der Eindringtiefe und lässt somit die Lokalisation der Nanopartikel innerhalb der Zelle zu.

In unterschiedlichen Schnittebenen der Zelle wurden von dem gleichen Probenausschnitt unter Verwendung des Sekundärelektronen- und des Rückstreuelektronendetektors rasterelektronenmikroskopische Bilder aufgenommen. In jeder Schnittebene konnten GC80-Partikel nachgewiesen werden (Abbildung 5-27).

Zur Untersuchung der Internalisierung der SC10-Nanopartikel in den pIL8-GFP A549-Zellen wurden diese mit 20 µg/ml SC10 für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss rasterelektronenmikroskopisch analysiert. Auch in diesem Fall wurde die Primärelektronenenergie variiert (5 kV – 25 kV) und sowohl mit dem Sekundärelektronen- als auch mit dem Rückstreuelektronendetektor gearbeitet.

Mit steigender Energie der Primärelektronenstrahlung, somit mit steigender Eindringtiefe in die Zelle, erhöhte sich das Signal der Rückstreuelektronen. Auch im Fall von SC10 konnte in jeder Schnittebene Nanopartikel nachgewiesen werden (Abbildung 5-27). Wie bei GC80, erhöhte sich mit steigender Energie der Primärelektronenstrahlung das Signal der Rückstreuelektronen, was ein Hinweis für eine SC10-Internalisierung ist.

Um auszuschließen, dass das durch die Rückstreuelektronen erzeugte Signal nicht durch Faltenbildung der Zellmembran verursacht wurde, erfolgte die transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Internalisierung der Nanopartikel.

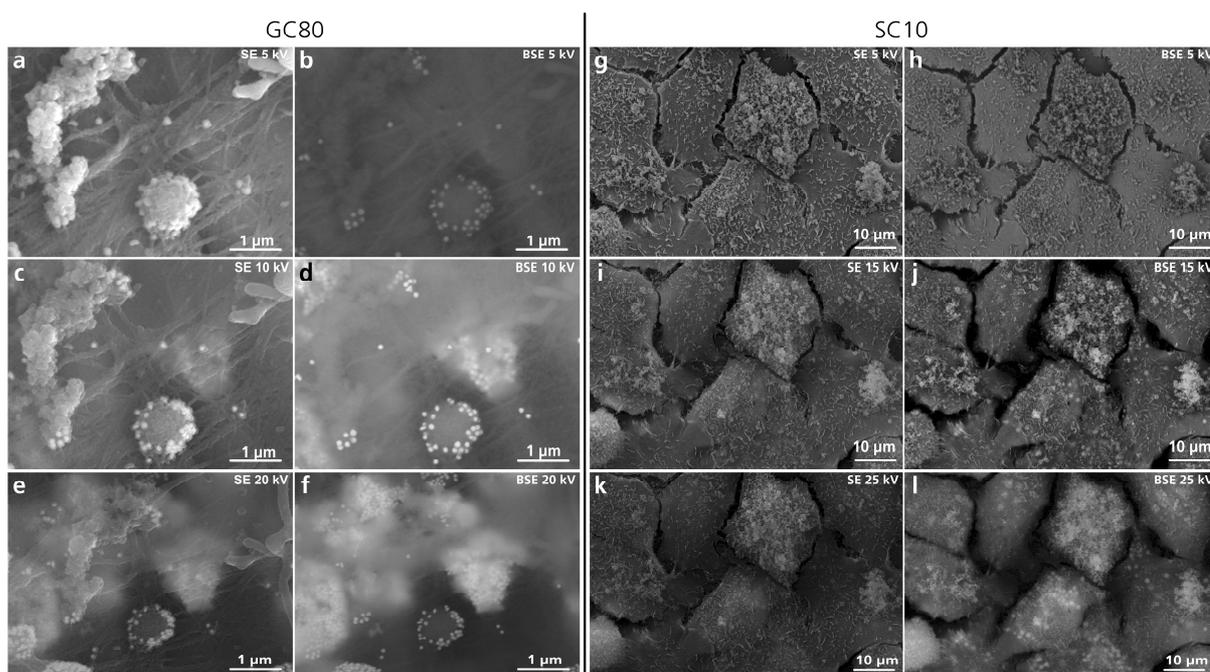


Abbildung 5-27 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären Verteilung von SC10 und GC80.

(a-f) hMSCs wurden unter chronischer Exposition mit $22,8 \mu\text{g/ml}$ GC80 für 21 Tage adipogen differenziert. Im Anschluss erfolgte die REM-Analyse mit variierender Primärelektronenenergie (5 kV – 25 kV). Mit steigender Energie der Primärelektronenstrahlung stieg das Signal der Rückstreuungselektronen, was ein Hinweis für eine GC80-Internalisierung ist. (g-l) pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit $20 \mu\text{g/ml}$ SC10 für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die REM-Analyse mit variierender Primärelektronenenergie (5 kV – 25 kV). Auch hier erhöhte sich mit steigender Energie der Primärelektronenstrahlung das Signal der Rückstreuungselektronen und belegte eine SC10-Internalisierung in pIL8-GFP A549-Zellen. Zur Detektion wurden die Sekundärelektronen und die Rückstreuungselektronen genutzt.

Auch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) belegte die zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Gold-Nanopartikel. Die TEM-Aufnahmen unbehandelter adipogen differenzierter hMSCs zeigten deutlich die während der Adipogenese gebildeten Lipidvakuolen (Abbildung 5-28 Bild a, c, e). Klar zu erkennen war die Lipidmembran der einzelnen Lipidtropfen (Abbildung 5-28e). In den unbehandelten hMSCs waren keine elektronendichten runden Strukturen im Größenbereich der GC80-Nanopartikel detektierbar (Abbildung 5-28 Bild a, c, e).

Nach 21-tägiger adipogener Differenzierung der hMSCs unter chronischer Exposition mit $22,8 \mu\text{g/ml}$ GC80 waren die Nanopartikel innerhalb der Zelle deutlich zu erkennen (Abbildung 5-28 Bild b, d, f). Die Partikel lagen im Größenbereich der inkubierten Nanopartikel (80 nm) und akkumulierten in den Lipidvakuolen. Deutlich zu erkennen war die Reduktion der lipidgefüllten Vakuolen (grau) nach Exposition mit GC80 (Abbildung 5-28 Bild d und f). In den kontrastreichereren, intakten Lipidvesikeln konnten keine Nanopartikel detektiert werden. Diese befanden sich ausschließlich in den kontrastärmeren (weißen) Vakuolen innerhalb der hMSCs (Abbildung 5-28 Bild d und f).

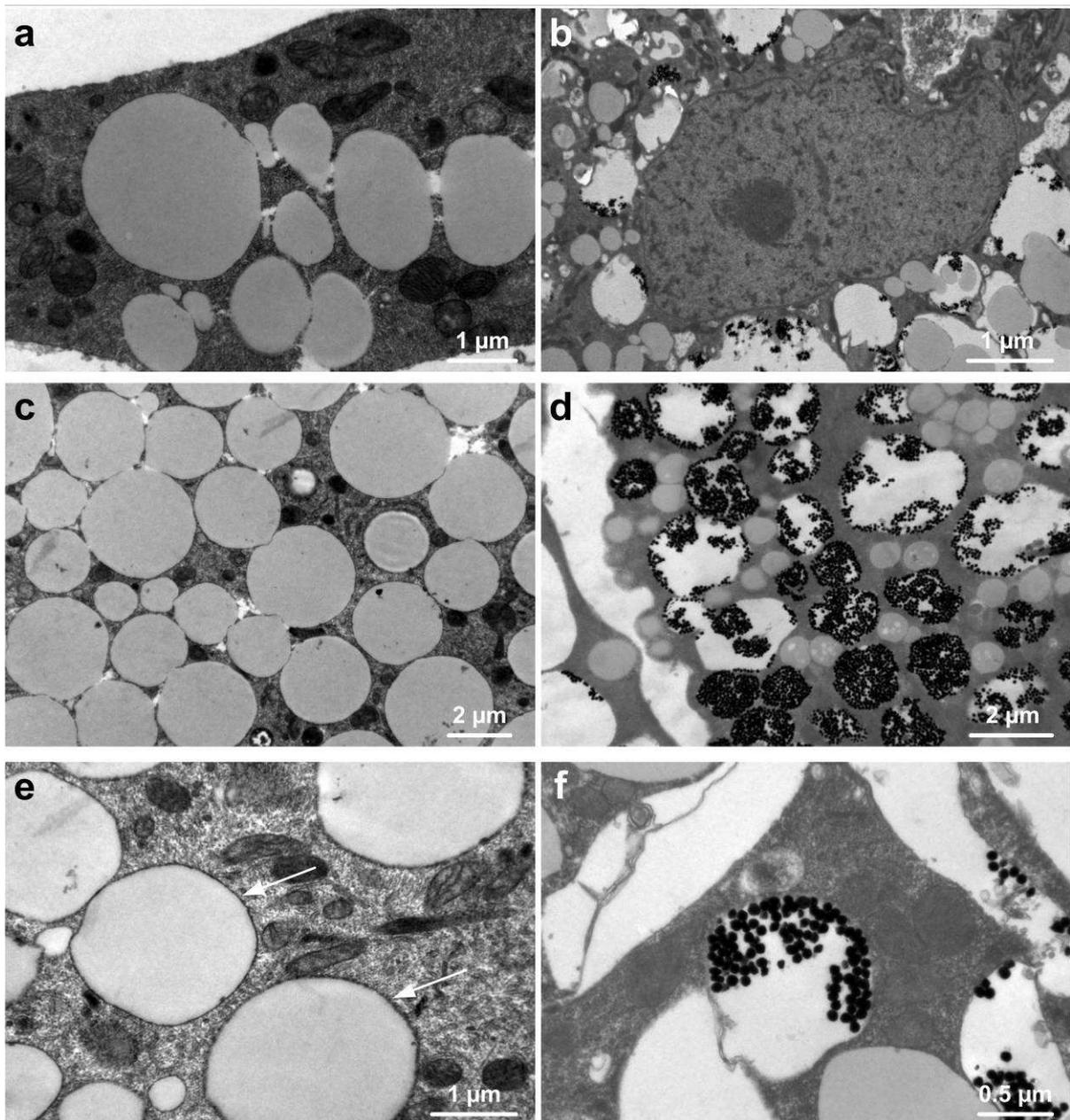


Abbildung 5-28 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen GC80-inkubierter adipogen differenzierter hMSCs.

hMSCs wurden während der 21tägigen adipogenen Differenzierung chronisch mit $22,8 \mu\text{g/ml}$ GC80 inkubiert und im Anschluss mittels Transmissionselektronenmikroskopie analysiert. Die Primärelektronenenergie lag bei 60 kV. (a, c, e) Unbehandelte adipogen differenzierte hMSCs. Deutlich sichtbar sind die Lipidvakuolen. Die Membran der Lipidvakuolen ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Es sind keine GC80 zu erkennen. (b, d, f) Nach 21tägiger adipogener Differenzierung der hMSCs unter chronischer Exposition mit GC80 sind die Nanopartikel deutlich innerhalb der hMSCs sichtbar. Die Partikel befinden sich in Vesikeln. Deutlich zu beobachten war die Reduktion der lipidgefüllten Vakuolen (grau) nach GC80-Exposition. In den kontrastreichereren, intakten Lipidvesikeln konnten keine Nanopartikel detektiert werden. Diese befanden sich ausschließlich in den kontrastärmeren (weißen) Vakuolen innerhalb der hMSCs.

5.3 Validierung des miniaturisierten *in vitro* Systems

Nachdem das toxische Gefährdungspotenzial der Gold- und Silber-Nanopartikel untersucht wurde, folgte im nächsten Schritt die Validierung des *in vitro* Systems, basierend auf miniaturisierten Zellkulturgefäßen. Hierbei sollte die Reproduzierbarkeit der mit dem miniaturisierten *in vitro* System generierten Ergebnisse im Vergleich zu den bereits etablierten konventionellen Kulturgefäßen untersucht werden.

5.3.1 Validierung des pIL8-GFP A549-basierten *in vitro* Systems

Um das pIL8-GFP A549-basierte *in vitro* System zu validieren, wurde anhand nanopartikulärer und viraler inflammatorischer Reaktionen das chipbasierte System mit konventionellen *in vitro* Systemen verglichen.

Vor Beginn der vergleichenden Untersuchungen wurden die in diesem Zusammenhang verwendeten Detektionsmethoden (Fluoreszenzspektrometrie und Fluoreszenzmikroskopie) vergleichend beurteilt. Hierzu wurden pIL8-GFP A549-Zellen in einer 96-Loch-Mikroplatte mit 20 ng/ml TNF- α für 48 Stunden behandelt. Die induzierte GFP-Expression wurde durch Analyse der Fluoreszenzintensität quantifiziert (Fluoreszenzspektrometrie). Im direkten Anschluss erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der GFP-exprimierenden Zellen. Deren prozentualer Anteil wurde mit der Software *analySIS* ermittelt.

Nach 48stündiger Exposition der pIL8-GFP A549-Zellen mit 20 ng/ml TNF- α wurde mittels spektrometrischen Verfahrens eine relative induzierte Fluoreszenzintensität von 85,1 % \pm 5,1 % ermittelt (Abbildung 5-29). Die mikroskopische Auswertung resultierte in einem Anteil GFP-exprimierender IL8-GFP A549-Zellen von 89,2 % \pm 1,1 % (Abbildung 5-29). Aufgrund der sich nicht signifikant unterscheidenden Resultate der beiden Analyseverfahren (Fluoreszenzspektrometrie und Fluoreszenzmikroskopie), wurden in dieser Arbeit die Ergebnisse in den 96-Loch-Mikroplatten mittels Fluoreszenzspektrometrie generiert. Hingegen basierte die Anwendung des Mikrokavitätenchips (MKC) auf der Fluoreszenzmikroskopie mit anschließender digitaler Auswertung der generierten Daten.

Zur Prüfung der Vergleichbarkeit der in den sechs Kultivierungseinheiten generierten Daten wurden pIL8-GFP A549-Zellen in den Mikrokavitäten des MKCs für 48 Stunden mit 20 ng/ml TNF- α inkubiert. Die Zellen in den Mikrokavitäten wurden mit Hilfe des an das MKC-Design adaptierten Softwareprogramms mikroskopisch dokumentiert. Von jeder der 252 Mikrokavitäten wurde eine fluoreszenz- und eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme erstellt. Die Auswertung der generierten Bilder und des prozentualen Anteils GFP-exprimierender Zellen pro Kultivierungseinheit erfolgte mit der

Software *analySIS*. Der Anteil fluoreszierender pIL8-GFP A549-Zellen variierte zwischen $52,5 \% \pm 11,4 \%$ und $67,6 \% \pm 6,9 \%$ (Abbildung 5-30).

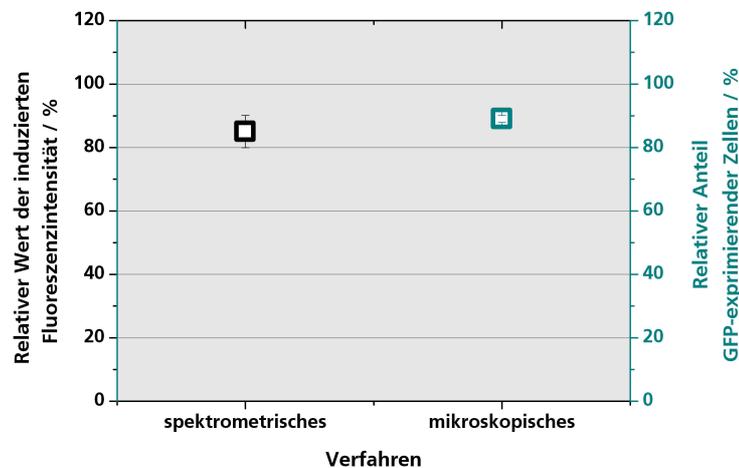


Abbildung 5-29 GFP-Expression TNF- α -behandelter pIL8-GFP A549-Zellen in einer 96-Loch-Mikroplatte.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden in einer 96-Loch-Mikroplatte für 48 Stunden mit 20 ng/ml TNF- α inkubiert. Im Anschluss wurde die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in den einzelnen Segmenten der 96-Loch-Mikroplatte fluoreszenzspektrometrisch (ex. 485 nm/ em. 535 nm) und fluoreszenzmikroskopisch (ex. 470 nm/ em. 525 nm) analysiert. Dargestellt ist die mittels Multifunktions-Mikroplattenreader quantifizierte relative induzierte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu dem mit der Software *analySIS* ermittelten prozentualen Anteil GFP-exprimierender Zellen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus sieben unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt.

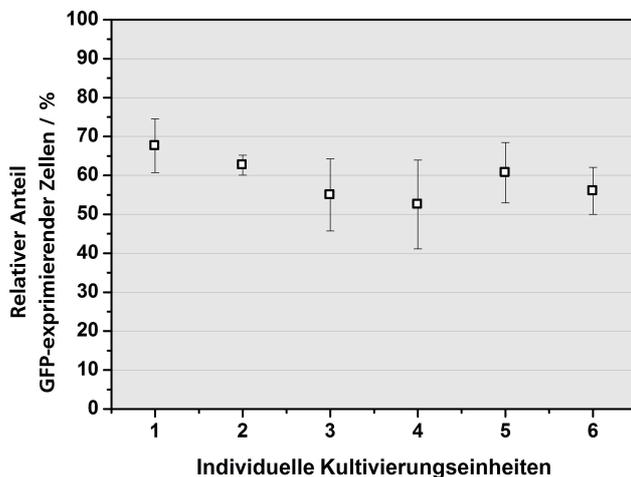


Abbildung 5-30 GFP-Expression TNF- α -behandelter pIL8-GFP A549-Zellen in den sechs Segmenten des MKCs.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden in den Mikrokavitäten mit 20 ng/ml TNF- α für 48 Stunden inkubiert. Mit Hilfe der programmierten Software wurden alle 42 Mikrokavitäten eines MKCs phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen wurde digital (*analySIS*) ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP-exprimierender pIL8-GFP A549-Zellen pro Kultivierungseinheit (umfasst sieben Mikrokavitäten). Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus sieben unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt.

Aus drei unterschiedlichen Kavitäten des zuvor beschriebenen Experiments wurden jeweils 30 Zellen ausgewählt und deren Fluoreszenzintensität digital quantifiziert (Abbildung 5-31). Die Histogramm-Darstellung der Fluoreszenzintensität verdeutlichte, dass

die meisten der Zellen eine Fluoreszenzintensität mit Pixelwerten kleiner 270 aufwiesen. Die Pixelintensität der insgesamt 90 analysierten Zellen variierte zwischen 0 und 2700 Pixel/Zelle (Abbildung 5-31).

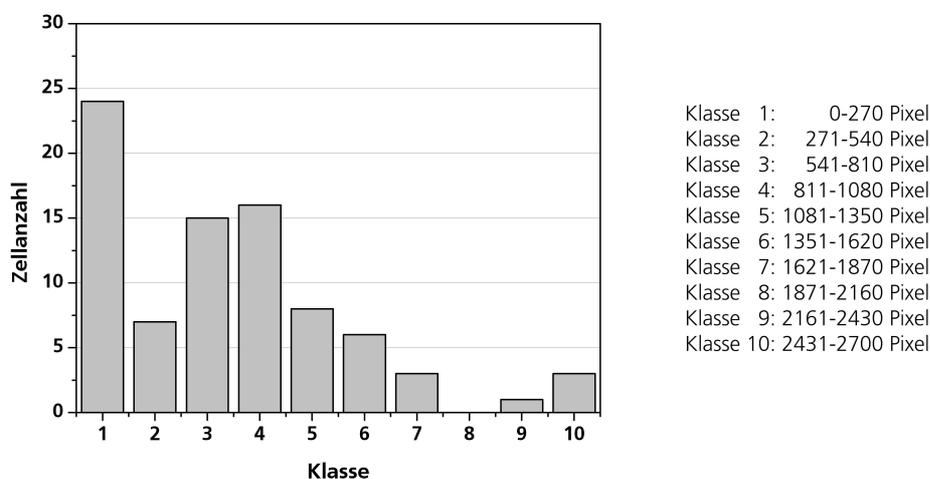


Abbildung 5-31 Histogramm der Fluoreszenz TNF- α -inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokavität.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit 20 ng/ml TNF- α für 48 Stunden in den Mikrokavitäten inkubiert. Die GFP-Expression 90 individueller Zellen wurde digital (*analysis*) quantifiziert. Dargestellt sind die in Klassen eingeteilten Fluoreszenzintensitäten (x-Achse: Klassen der GFP-Intensität) und deren Häufigkeit (y-Achse: Häufigkeit (Zellanzahl mit der zur jeweiligen Klasse gehörenden Fluoreszenzintensität)). Die jeweiligen Klassen definieren sich über die Pixelwerte.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass unter Anwendung des MKC-basierten *in vitro* Systems vor allem geringe Fluoreszenzintensitäten individueller adhärenter Zellen in einem Zellverband quantifiziert werden konnten, war im nächsten Schritt die Sensitivität des MKC-basierten *in vitro* Systems im Vergleich zu konventionellen Zellkulturgefäßen zu untersuchen.

Hierzu wurden parallel pIL8-GFP A549-Zellen für 48 Stunden mit 20 ng/ml TNF- α in den Mikrokavitäten und einer 96-Loch-Mikroplatte inkubiert. Anschließend wurde die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in der 96-Loch-Mikroplatte fluoreszenzspektrometrisch quantifiziert. Die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in den Mikrokavitäten wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Unter Anwendung der 96-Loch-Mikroplatte wurde ein Anstieg der GFP-Expression von 44,6 % \pm 9,7 %, mit Hilfe des MKCs eine Änderung um 59,2 % \pm 16,8 % quantifiziert, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 5-32).

Mittels standardisierter *in vitro* Verfahren konnten bereits für GC10 ein inflammatorischer und apoptotischer Effekt nachgewiesen werden. Ziel war es daher zu untersuchen, ob diese Effekte auch unter Anwendung des miniaturisierten *in vitro* Systems detektiert werden können.

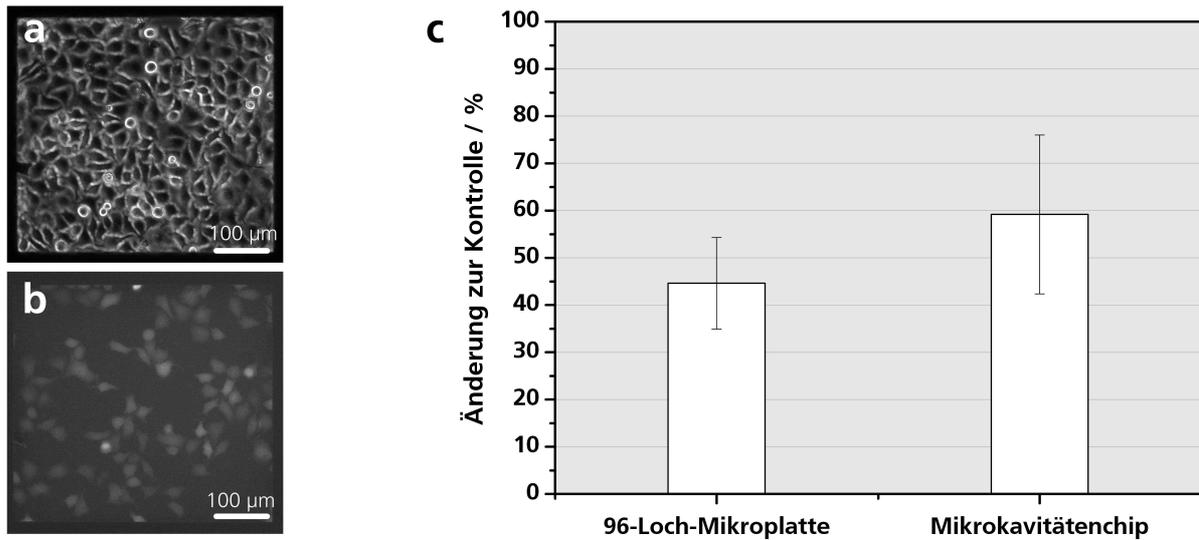


Abbildung 5-32 GFP-Expression TNF- α -inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden parallel in einer 96-Loch-Mikroplatte und der Mikrokavität für 48 Stunden mit 20 ng/ml TNF- α inkubiert. Im Anschluss wurde die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikroplatte fluoreszenzspektrometrisch (ex. 485 nm/ em. 535 nm) und in den Mikrokavitäten fluoreszenzmikroskopisch (ex. 470 nm/ em. 525 nm) analysiert. Der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen in den Mikrokavitäten wurde digital (*analysis*) ermittelt. (a) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme TNF- α -inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen in einer Mikrokavität. (b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme TNF- α -inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen in einer Mikrokavität. Die Helligkeit und der Kontrast der Fluoreszenzaufnahme wurden um 5 % verstärkt. (c) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der GFP-Expression TNF- α -behandelter pIL8-GFP A549-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Änderung zur Kontrolle / %). Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus sieben unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt.

Ein charakteristisches Merkmal gesunder, vitaler Zellen ist eine Asymmetrie der Membranlipide. Durch einen apoptotischen Stimulus wird diese Asymmetrie der zellulären Membran unterbrochen und das Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Membran verlagert. Diese Externalisierung von PS wird als frühes Anzeichen des apoptotischen Zelltodes beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit zum Nachweis nanopartikulärer apoptotischer Effekte herangezogen.

Zur Untersuchung der PS-Externalisierung wurden pIL8-GFP A549-Zellen mit 30 µg/ml GC10 für 48 Stunden behandelt. Nach Ablauf der Expositionsdauer erfolgte mittels *APOPercentage* Apoptosis Assay der Nachweis des Anteils apoptotischer Zellen in den Mikrokavitäten und den konventionellen Zellkulturgefäßen. Hellfeldmikroskopisch waren die apoptotischen Zellen durch ihre Pinkfärbung deutlich sichtbar (Abbildung 5-33a). Ebenso zeigten sich GC10-Agglomerate als schwarze Bereiche (Abbildung 5-33a). Mittels konventionellem Verfahren (96-Loch-Mikroplatte) wurde ein apoptotischer Anteil von 21,6 % \pm 15,7 %, in der Mikrokavität 9,9 % \pm 5,8 % apoptotische Zellen quantifiziert (Abbildung 33b).

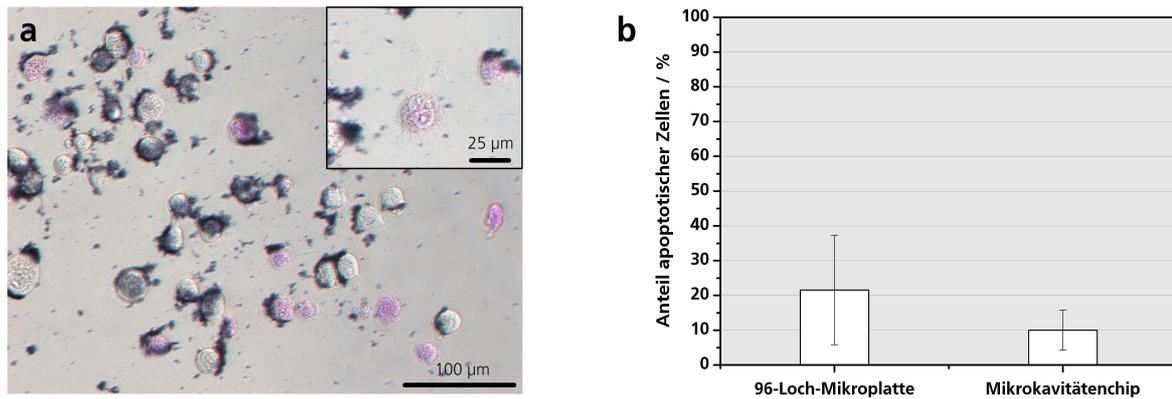


Abbildung 5-33 Apoptosestatus GC10-inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden parallel in einer 96-Loch-Mikroplatte und der Mikrokavität für 48 Stunden mit 30 µg/ml GC10 inkubiert. Im Anschluss wurde der Apoptosestatus der pIL8-GFP A549-Zellen hellfeldmikroskopisch mittels *APOPercentage™* Apoptosis Assay analysiert und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen digital (*analysis*) ermittelt. (a) Hellfeldmikroskopische Aufnahme GC10-inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen. Zellen mit PS-Externalisierung sind pink angefärbt. (b) Dargestellt ist der prozentuale Anteil apoptotischer pIL8-GFP A549-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus sieben unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt.

Zur Untersuchung des nanopartikelinduzierten inflammatorischen Effekts in der Mikrokavität, wurden pIL8-GFP A549-Zellen mit 30 µg/ml GC10 für 48 Stunden behandelt. Mittels des MKC-basierten *in vitro* Systems waren GFP-exprimierende pIL8-GFP A549-Zellen deutlich zu erkennen (Abbildung 5-34b). In der 96-Loch-Mikroplatte wurde eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um $19,8 \% \pm 18,5 \%$ im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle erreicht. Die Quantifizierung der fluoreszenz- und phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen in der Mikrokavität führte zu einem prozentualen Anteil fluoreszierender Zellen von $26,4 \% \pm 4,1 \%$ (Abbildung 5-34c). Wie auch schon bei der Untersuchung des apoptotischen Effekts von GC10 (Abbildung 5-33), führte die Anwendung der 96-Loch-Mikroplatte zu einer erhöhten Abweichung vom Mittelwert. Die MKC-basierte Methode wies hingegen eine geringere Standardabweichung auf.

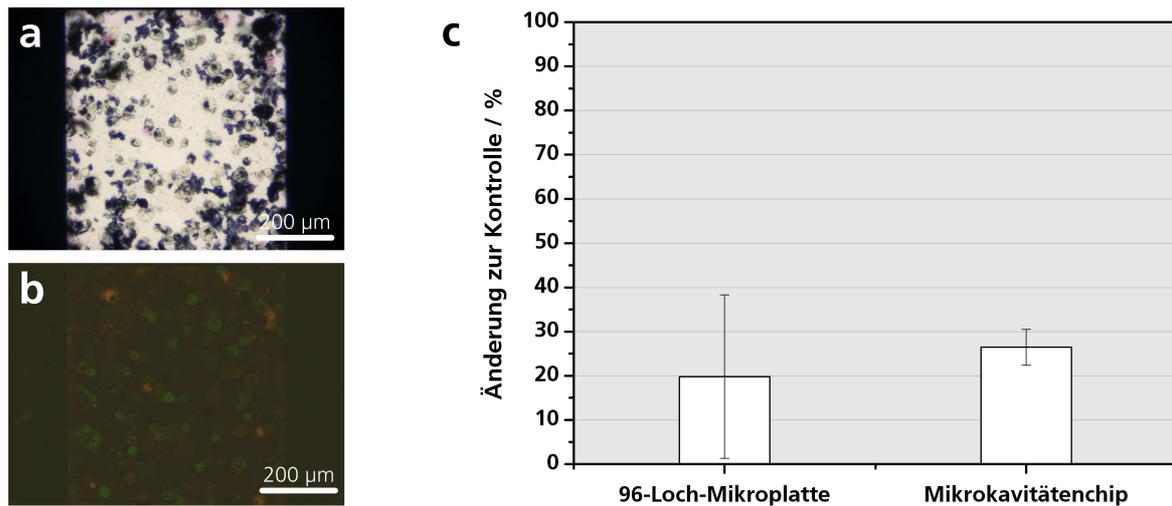


Abbildung 5-34 GFP-Expression GC10-inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden parallel in einer 96-Loch-Mikroplatte und der Mikrokavität für 48 Stunden mit 30 µg/ml GC10 behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem *APOPercentage* Apoptosis Substrat gefärbt und die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikroplatte fluorezenzspektrometrisch (ex. 485 nm/ em. 535 nm) und in den Mikrokavitäten fluorezenzmikroskopisch (ex. 470 nm/ em. 525 nm) analysiert. Der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen in den Mikrokavitäten wurde mit der Software *analySIS* ermittelt. (a) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme GC10-inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen in einer Mikrokavität. Nanopartikelagglomerate sind als schwarze Bereiche sichtbar. Zellen mit PS-Externalisierung sind pink angefärbt. (b) Fluorezenzmikroskopische Aufnahme GC10-inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen in einer Mikrokavität. Zellen mit PS-Externalisierung sind rot angefärbt. Die Helligkeit und der Kontrast der Fluorezenzaufnahme wurden um 5 % verstärkt. (c) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der GFP-Expression GC10-behandelter pIL8-GFP A549-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Änderung zur Kontrolle / %). Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus sieben unabhängigen Experimenten ± SD dargestellt.

In einem weiteren Schritt war zu untersuchen, ob sich das miniaturisierte MKC-basierte *in vitro* System für eine nichtinvasive Multiparameteranalyse nanopartikulärer Effekte eignet. Hinsichtlich der toxikologischen Endpunkte Inflammation, Apoptose und Nekrose wurden in der Mikrokavität kultivierte pIL8-GFP A549-Zellen im Anschluss an eine 48stündige Nanopartikelinkubation mikroskopisch analysiert.

Zur Untersuchung der Anwendung des miniaturisierten *in vitro* Systems zur Multiparameteranalyse, wurde in derselben Mikrokavität der Einfluss von GC10 auf die Parameter Inflammation, Nekrose und Apoptose nichtinvasiv untersucht. Zur Korrelation des Anteils inflammatorischer und nekrotischer Zellen wurden pIL8-GFP A549-Zellen mit 30 µg/ml GC10, dem Nanopartikelösungsmittel und 20 ng/ml TNF-α (Positivkontrolle) für 48 Stunden unter physiologischen Bedingungen behandelt. Nach Ablauf der Expositionszeit wurde die inflammationsgekoppelte GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen fluorezenzspektrometrisch quantifiziert. Die Analyse des Anteils apoptotischer Zellen erfolgte im Anschluss hellfeldmikroskopisch mittels *APOPercentage*

Apoptosis Assay. Die Analyse des Anteils nekrotischer Zellen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mittels Propidiumiodid-Färbung.

GC10 führte zu einer signifikanten GFP-Expression (44,2 % ± 11,8 %), der Anteil apoptotischer Zellen erhöhte sich nicht signifikant (11,42 % ± 5,9 %), der Anteil membrangeschädigter Zellen lag im Bereich der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 5-35). Die mitgeführte Positivkontrolle der Inflammationsreaktion TNF- α sowie die Positivkontrolle der Apoptoseinduktion H₂O₂ wurden jeweils auf 100 % gesetzt.

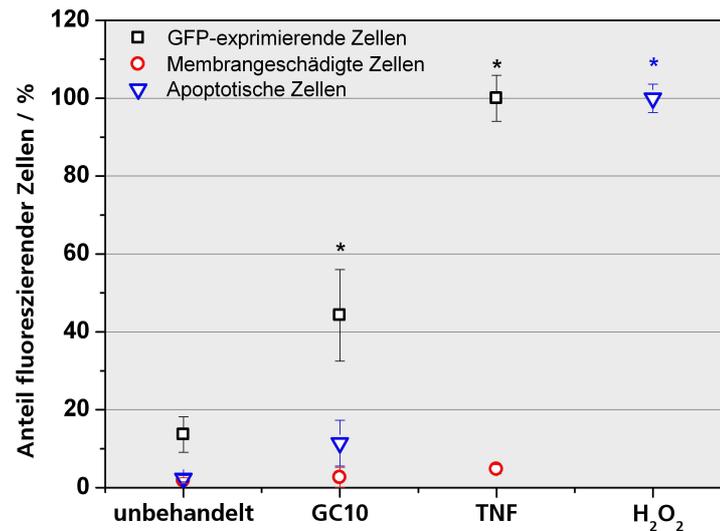


Abbildung 5-35 Multiparameteranalyse der nanopartikelinduzierten Inflammation, Apoptose und Nekrose in pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokavität.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden mit 30 μ g/ml GC10 sowie 20 ng/ml TNF- α (Positivkontrolle der Inflammationsreaktion) und 5mM Wasserstoffperoxid (H₂O₂, Positivkontrolle der Apoptoseinduktion) für 48 Stunden behandelt. Nach Ablauf der Expositionsdauer wurde die inflammationsgekoppelte GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen fluoreszenzspektrometrisch (ex. 485 nm/ em. 535 nm) quantifiziert. Die Analyse des Anteils apoptotischer Zellen erfolgte im Anschluss hellfeldmikroskopisch mittels APOPercentage Apoptosis Assay. Die Analyse des Anteils nekrotischer Zellen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mittels Propidiumiodid-Färbung (ex. 555 nm/ em. 602 nm). Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP-exprimierender, membrangeschädigter und apoptotischer Zellen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus sieben unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test).

Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung des neuen *in vitro* Systems auf MKC-Basis war die Detektion schwellenwertabhängiger toxischer Effekte auf Einzelzellbasis. Um zu analysieren, ob mit Hilfe des miniaturisierten *in vitro* Systems eine sensitive Detektion konzentrationsabhängiger Effekte möglich ist, wurde nach SC10-Exposition (0 - 50 μ g/ml) der Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 unter Anwendung des miniaturisierten (Mikrokavität) und des standardisierten Verfahrens (96-Loch-Mikroplatte) die GFP-Expression quantifiziert. Beide Verfahren quantifizierten einen konzentrationsabhäng-

igen, Anstieg des prozentualen Anteils GFP-exprimierender pIL8-GFP A549-Zellen bis 20 µg/ml SC10 (40,2 % ± 4,9 % und 42,1 % ± 2,3 %) (Abbildung 5-36a).

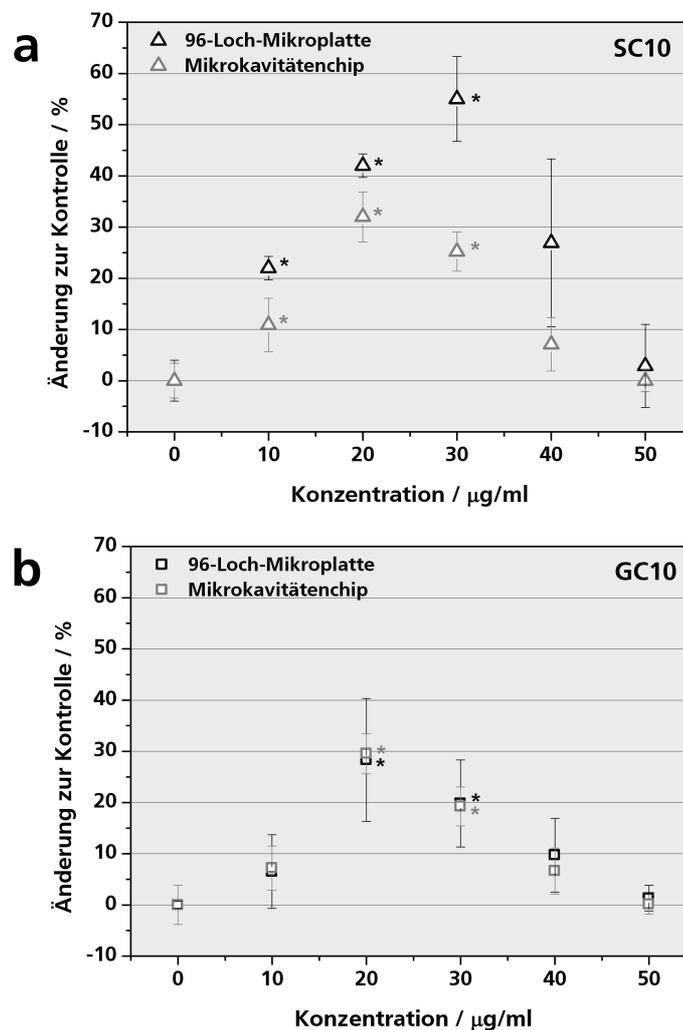


Abbildung 5-36 Einfluss der SC10- und GC10-Konzentration auf die GFP-Expression von pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokavität.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden parallel in der Mikrokavität und einer 96-Loch-Mikroplatte mit 0 - 50 µg/ml SC10 (a) oder GC10 (b) für 24 Stunden Bedingungen behandelt. Im Anschluss wurde die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in den Mikrokavitäten fluoreszenzmikroskopisch (ex. 470 nm/em. 525 nm) analysiert und der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen digital (*analysis*) ermittelt. Die GFP-Expression der Zellen in den Mikroplatten wurde fluoreszenzspektrometrisch (ex. 485 nm/em. 535 nm) analysiert. Dargestellt ist der mittels des miniaturisierten und des standardisierten Verfahrens ermittelte prozentuale Anteil GFP-exprimierender pIL8-GFP A549-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Änderung zur Kontrolle / %). Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus sieben unabhängigen Experimenten ± SD dargestellt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test).

Nach Inkubation der pIL8-GFP A549-Zellen mit 30 µg/ml SC10 stieg die Fluoreszenzintensität auf 55,0 % ± 8,3 % (Abbildung 5-36a). Unter Anwendung des MKC-basierten Systems lag der Anteil fluoreszierender Zellen nach Inkubation mit 30 µg/ml

SC10 bei $33,4 \% \pm 3,8 \%$. Ab $40 \mu\text{g/ml}$ bewirkte SC10 einen nicht signifikanten Anstieg des Anteils inflammatorischer Zellen. Dieser Effekt konnte mit beiden Verfahren quantifiziert werden. Das Optimum der relativen GFP-Expression (in der Mikrokapazität bei $20 \mu\text{g/ml}$, in der 96-Loch-Mikroplatte bei $30 \mu\text{g/ml}$) liegt in der SC10-induzierten konzentrationsabhängigen Vitalitätsabnahme begründet. Auch für GC10 konnte unter Anwendung des Mikrokapazitätenchips ein konzentrationsabhängiger inflammatorischer Effekt detektiert werden der ebenfalls mit dem in einer 96-Loch-Mikroplatte quantifizierten Effekt vergleichbar ist (Abbildung 5-36b). Auch nach GC10-Inkubation konnte ein Optimum der Inflammation bei $20 \mu\text{g/ml}$ quantifiziert werden (Abbildung 5-36b). Neben der konzentrationsabhängigen Detektion inflammatorischer Reaktionen war zu prüfen, ob das MKC-basierte System auch die Quantifizierung des zeitlichen Verlaufs von Entzündungsprozessen zulässt. Dazu erfolgte im Einstundentakt die Generierung fluoreszenz- und phasenkontrast-mikroskopischer Aufnahmen der mit SC10 oder GC10 inkubierten sowie der unbehandelten pIL8-GFP A549-Zellen mittels Langzeitmikroskopie.

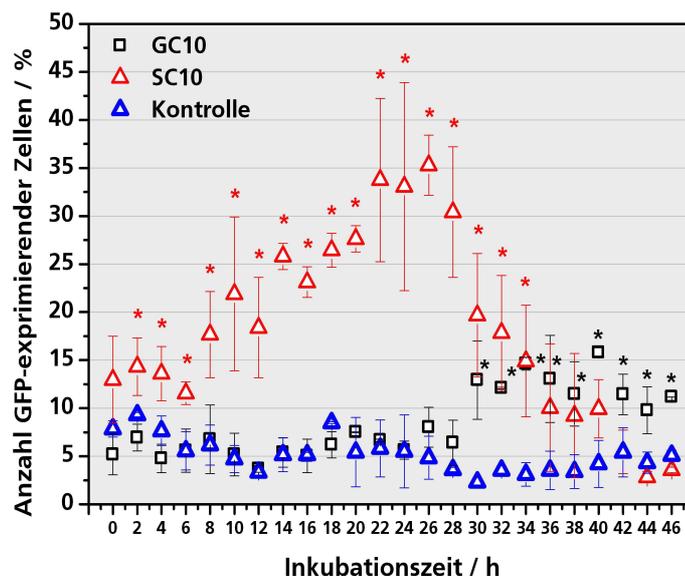


Abbildung 5-37 Zeitlicher Verlauf der GFP-Expression SC10- und GC10-behandelter pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokapazität.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden in den Mikrokapazitäten mit $30 \mu\text{g/ml}$ GC10 und SC10 für 48 Stunden unter physiologischen Bedingungen behandelt. Die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in den Mikrokapazitäten wurde mittels fluoreszenzmikroskopischer Langzeitmikroskopie analysiert und der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen digital (*analysis*) quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP-exprimierender pIL8-GFP A549-Zellen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt. * Die Proben unterscheiden sich signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,01$; Mann-Whitney U Test).

SC10, das in den vorherigen Experimenten bereits eine inflammatorische Reaktion implizierte, bedingte einen zeitabhängigen Anstieg des Anteils GFP-exprimierender pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokavität. Nach 26 Stunden sank der prozentuale Anteil fluoreszenter Zellen und erreichte nach 46 Stunden das Fluoreszenzlevel der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 5-37). Beobachtet wurde eine morphologische Veränderung der mit SC10 inkubierten Zellen. Der Anteil GFP-exprimierender GC10-behandelter pIL8-GFP A549-Zellen lag nach 24 Stunden auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle. Nach 30 Stunden stieg der GFP-Anteil auf $12,9 \% \pm 4,1 \%$ und variierte in den darauf folgenden 16 Stunden zwischen $9,8 \% \pm 2,5 \%$ und $15,8 \% \pm 0,5 \%$ (Abbildung 5-37).

Validierung des pIL8-GFP A549-basierten *in vitro* Systems anhand von Herpes-simplex-Viren

Neben der Validierung des miniaturisierten Systems als *in vitro* System zur nanotoxikologischen Analyse war der Nachweis der Anwendung des nichtinvasiven *in vitro* Systems zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Virusinfektionen und proinflammatorischen Zellreaktionen zu erbringen. Als Modell für die Validierung des entwickelten MKC-basierten *in vitro* Systems wurde das Herpes-simplex-Virus Typ1 (HSV1) verwendet. Die Morphologie der HSV1 konnte mittels Rasterelektronenmikroskopie visualisiert werden (Abbildung 5-38).

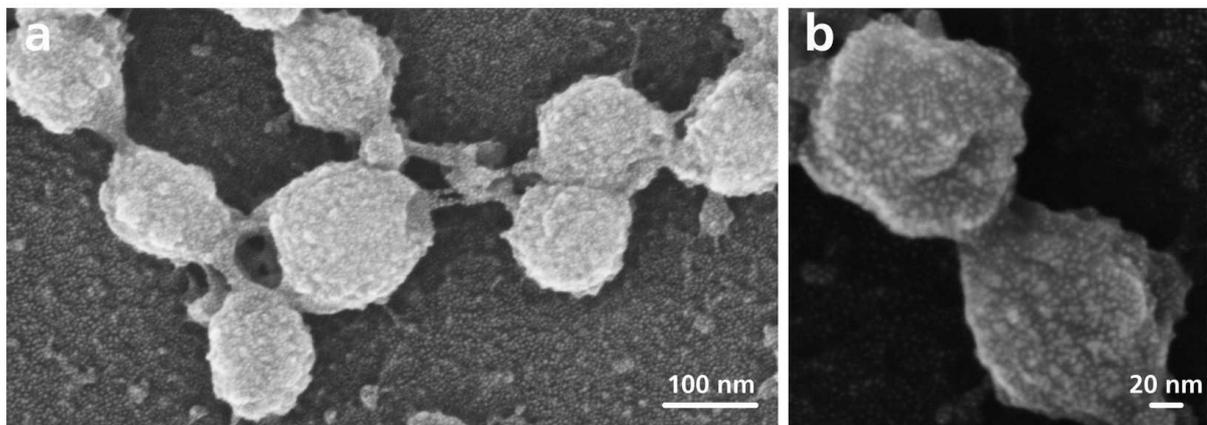


Abbildung 5-38 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Virenstamms Herpes-simplex-Virus Typ1 (HSV1).

(a) Übersicht über goldbesputterte HSV1. (b) Zwei goldbesputterte Herpes-simplex-Virionen Typ1. Die helle gepunktete Struktur auf der Virionoberfläche entstand durch die Gold-Nanopartikel mit denen die Viren vor der REM-Analyse besputtert wurden.

Zuerst musste geklärt werden, ob das als Virusmodell verwendete HSV1 auch in der transfizierten Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 den für HSV1 charakteristischen zyto-

phatischen Effekt (CPE) auslöst. Im Vergleich zu den als Standardzelllinie für HSV1-Replikationen beschriebene Vero-Zellen führte HSV1 auch in den pIL8-GFP A549-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit MOI 0,14 zu einer charakteristischen Ausbildung von Synzytien (Abbildung 5-39). Dieser Effekt verstärkte sich über die dreitägige Inkubation. Beobachtet werden konnte, dass in Vero-Zellen nach drei Tagen eine Synzytienbildung komplett ausgeprägt war (Abbildung 5-39a). Dieses Stadium konnte in pIL8-GFP A549-Zellen bereits nach zweitägiger Exposition beobachtet werden. Eine längere Inkubationszeit führte zum Abkugeln der Zellen (Abbildung 5-39 Bild b2). In der Mikrokavität konnte die Ausbildung des CPE in pIL8-GFP A549-Zellen ebenfalls hellfeldmikroskopisch detektiert werden (Abbildung 5-39 Bild c2).

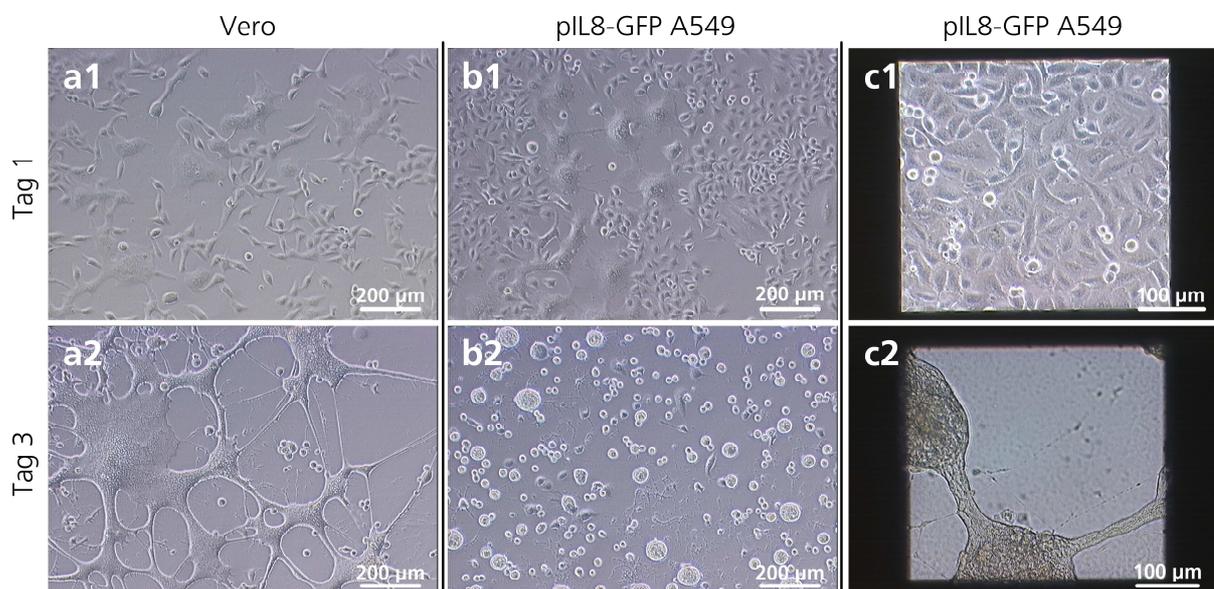


Abbildung 5-39 Synzytienbildung von pIL8-GFP A549-Zellen nach HSV1-Inkubation.

Konfluente Vero-Zellen oder pIL8-GFP A549-Zellen wurden in 12-Loch-Mikroplatten (a, b) und den Mikrokavitäten (c) mit HSV1 (MOI 0,14) für drei Tage behandelt. Die Synzytienbildung wurde an Tag 1 und Tag 3 hellfeldmikroskopisch dokumentiert.

Somit war geklärt, dass HSV1 auch in der transfizierten Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 sowohl im Standardkulturgefäß als auch in der Mikrokavität den für HSV1 charakteristischen CPE induziert.

Anschließend wurde geprüft, ob unter Anwendung des nichtinvasiven MKC-basierten *in vitro* Systems virale proinflammatorische Reaktionen detektiert werden können.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden in einer 96-Loch-Mikroplatte und der Mikrokavität mit MOI 0,14 HSV1 für 48 Stunden behandelt. Die induzierte GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen im Standardkulturgefäß wurde durch Analyse der Fluoreszenzintensität quantifiziert. Mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse erfolgte die Detektion der GFP-

exprimierenden Zellen in der Mikrokapazität. Unter Anwendung der standardisierten Methode stieg die Fluoreszenzintensität nach HSV1-Behandlung der pIL8-GFP A549-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle um $12,4 \% \pm 3,2 \%$ (Abbildung 5-40). Mittels des miniaturisierten Verfahrens wurde eine Steigerung der GFP-Expression um $30,2 \% \pm 17,1 \%$ festgestellt (Abbildung 5-40).

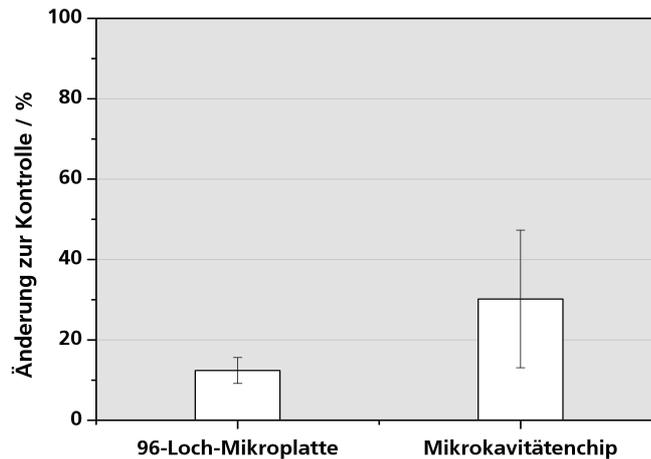


Abbildung 5-40 GFP-Expression HSV1-behandelter pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokapazität.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden parallel in einer 96-Loch-Mikroplatte und der Mikrokapazitäten mit HSV1 (MOI 0,14) für 48 Stunden behandelt. Im Anschluss wurde die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikroplatte fluorezenzspektrometrisch (ex. 485 nm/ em. 535 nm), in den Mikrokapazitäten fluorezenzmikroskopisch (ex. 470 nm/ em. 525 nm) analysiert. Der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen in den Mikrokapazitäten wurde mit Hilfe der Software *analysis* ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der GFP-Expression pIL8-GFP A549-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Änderung zur Kontrolle / %). Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus sieben unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt.

Für nanotoxikologische Fragestellungen erwies sich das MKC-basierte *in vitro* System als geeignetes System zur schwellenwert- und zeitabhängigen Detektion inflammatorischer Effekte. Es war zu klären, ob sich das miniaturisierte System ebenfalls für die Detektion schwellenwert- und zeitabhängiger viraler inflammatorischer Effekte eignet. Zur Untersuchung eines zeitabhängigen Entzündungsprozesses wurden pIL8-GFP A549-Zellen für 24 und 48 Stunden unter physiologischen Bedingungen in den Mikrokapazitäten mit TNF- α (Positivkontrolle) und HSV1 (MOI 0,14) behandelt. Im Anschluss wurde die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in den Mikrokapazitäten fluorezenzmikroskopisch analysiert und der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen softwareunterstützt ermittelt. Vergleichend zu der unbehandelten Kontrolle führte TNF- α nach 24 Stunden zu $44,8 \% \pm 4,3 \%$ und nach 48 Stunden zu $51,4 \% \pm 6,3 \%$ GFP-exprimierender pIL8-GFP A549-Zellen (Abbildung 5-41a).

Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle führte HSV1 nach 24 Stunden zu $20,2 \% \pm 6,3 \%$ und nach 48 Stunden zu $30,2 \% \pm 17,1 \%$ GFP-exprimierender pIL8-GFP A549-Zellen (Abbildung 5-41a). Zur Untersuchung der Quantifizierung einer konzentrationsabhängigen HSV1-induzierten Inflammationsreaktion wurden pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokavität mit HSV1 (MOI 0,0014-0,14) für 48 Stunden behandelt. Es konnte kein signifikanter Anstieg der GFP-Expression quantifiziert werden (Abbildung 5-41b).

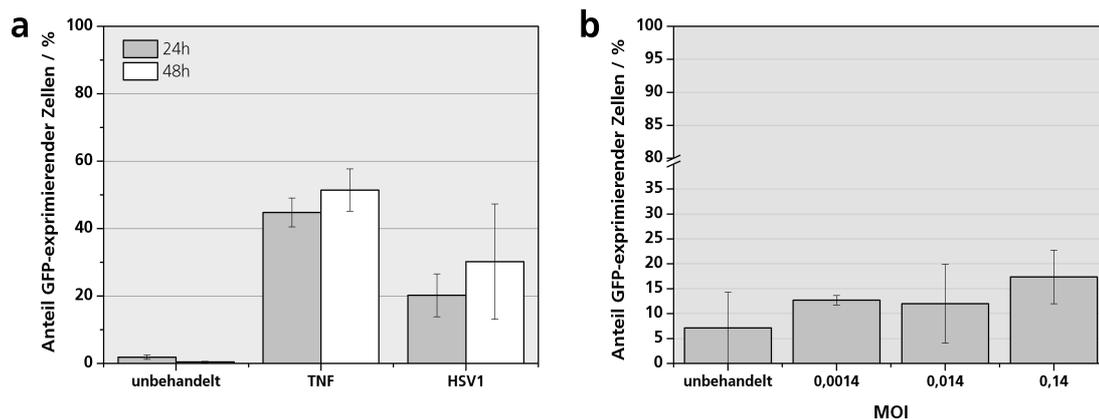


Abbildung 5-41 Einfluss von HSV1 auf die Inflammation von pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokavität.

(a) pIL8-GFP A549-Zellen wurden in den Mikrokavitäten für 24 und 48 Stunden mit TNF- α und HSV1 (MOI 0,14) behandelt. Im Anschluss wurde die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in den Mikrokavitäten fluoreszenzmikroskopisch (ex. 470 nm/em. 525 nm) analysiert und der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen digital (*analysis*) ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP-exprimierender pIL8-GFP A549-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. (b) pIL8-GFP A549-Zellen wurden in den Mikrokavitäten mit HSV1 (MOI 0,0014 – 0,14) für 48 Stunden behandelt. Im Anschluss wurde die GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in den Mikrokavitäten fluoreszenzmikroskopisch (ex. 470 nm/em. 525 nm) analysiert und der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen digital (*analysis*) ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP-exprimierender pIL8-GFP A549-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus sieben unabhängigen Experimenten \pm SD dargestellt.

5.3.2 Evaluierung des stammzellbasierten *in vitro* Systems

Um das entwickelte MKC-basierte *in vitro* System zu validieren und dessen Sensitivität zu bestätigen, wurde der adipogene Differenzierungsprozess von hMSCs als Parameter herangezogen.

hMSCs wurden in einer 96-Loch-Mikroplatte und der Mikrokapazität des MKCs adipogen differenziert. Nach Abschluss der Adipogenese wurde der Anteil adipogen differenzierter hMSCs quantifiziert. In der 96-Loch-Mikroplatte lag der Anteil adipogen differenzierter hMSCs bei $44,5 \% \pm 11,0 \%$, in der Mikrokapazität wurde ein Anteil von $47,5 \% \pm 12,4 \%$ erreicht (Abbildung 5-42).

Festzuhalten ist, dass die Adipogenese in den Mikrokapazitäten bereits nach 18 Tagen eine starke Ausbildung reifer Lipidvakuolen in den Zellen aufwies und deshalb beendet wurde. Die adipogene Differenzierung in der 96-Loch-Mikroplatte erreichte diesen Status erst nach 21 Tagen.

Nachdem belegt werden konnte, dass sich das Differenzierungspotenzial und die morphologische Struktur der in Mikrokapazitäten sowie in einer 96-Loch-Mikroplatte differenzierten hMSCs nicht voneinander unterschied (Abbildung 5-42a und 5-42b), wurde der Einfluss von GC80 auf hMSCs während der adipogenen Differenzierung mittels des MKC-basierten Systems untersucht.

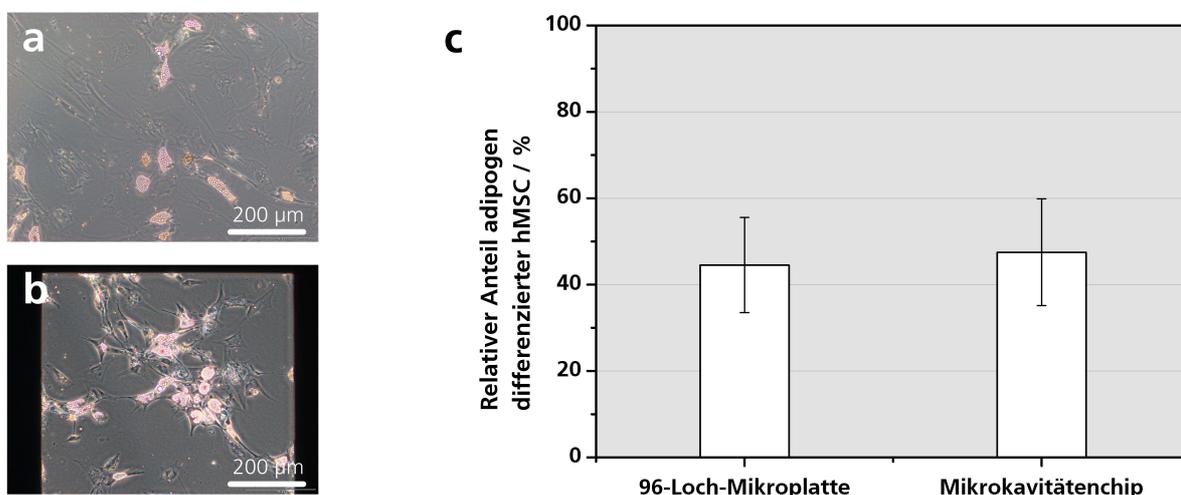


Abbildung 5-42 Prozentualer Anteil adipogen differenzierter hMSCs in der Mikrokapazität.

hMSCs wurden in einer 96-Loch-Mikroplatte und der Mikrokapazität 18 Tage adipogen differenziert. Im Anschluss wurde das adipogene Potenzial der hMSCs hellfeldmikroskopisch analysiert und der prozentuale Anteil der Adipozyten mit der Software *analySIS* ermittelt. (a) Hellfeldmikroskopische Aufnahme adipogen differenzierter hMSCs in einer 96-Loch-Mikroplatte. (b) Hellfeldmikroskopische Aufnahme adipogen differenzierter hMSCs in einer Mikroplatte. (c) Dargestellt ist der relative Anteil adipogen differenzierter hMSCs im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Änderung zur Kontrolle / %).

Hellfeldmikroskopische Aufnahmen nach 14tägiger chronischer GC80-Exposition belegten eine starke Interaktion der Gold-Nanopartikel mit den hMSCs. Trotz starker GC80-Interaktion bildete ein Großteil der hMSCs Lipidvakuolen aus (Abbildung 5-43). Im Vergleich zu den GC80-unbehandelten adipogen differenzierten hMSCs (Abbildung 5-43a) zeigten die GC80-inkubierten adipogen differenzierten hMSCs keine morphologischen Veränderungen auf. Trotz der chronischen Exposition mit GC80 bildeten die adipogen differenzierenden hMSCs die charakteristische sphärische Morphologie aus (Abbildung 5-43b und 5-43c).

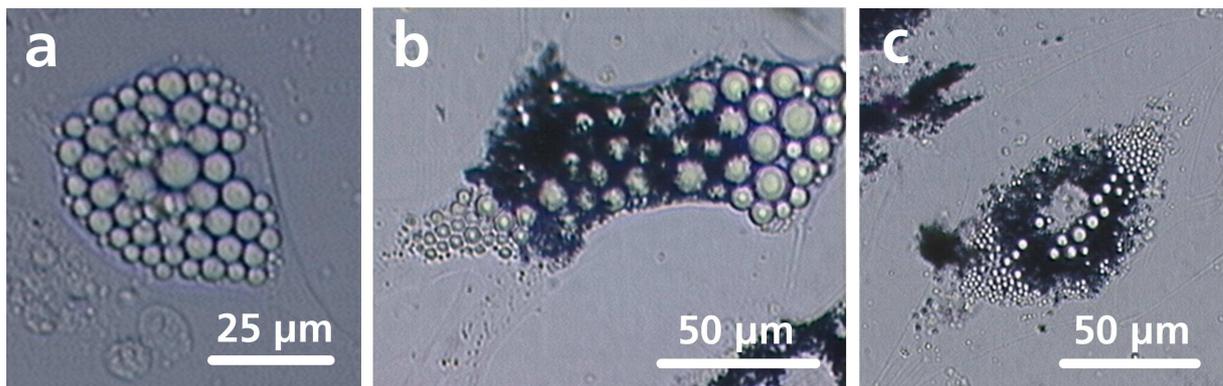


Abbildung 5-43 Hellfeldmikroskopische Aufnahmen GC80-behandelter adipogen differenzierter hMSCs in der Mikrokapazität.

hMSCs wurden während der 14tägigen adipogenen Induktion in der Mikrokapazität mit 22,8 µg/ml GC80 behandelt. (a) Unbehandelte adipogen differenzierte hMSCs. (b und c) GC80-inkubierte adipogen differenzierte hMSCs. Deutlich sichtbar sind die während der Adipogenese gebildeten Lipidvakuolen sowie GC80-Agglomerate (schwarze Bereiche).

Verglich man den Einfluss von GC80 auf hMSCs während der adipogenen Differenzierung in den unterschiedlichen Zellkulturgefäßen, lag der Anteil adipogen differenzierter hMSCs nach 14tägiger Exposition mit GC80-supplementiertem Differenzierungsmedium in der 96-Loch-Mikroplatte bei 43,6 % ± 9,7 % (Abbildung 5-44), in der Mikrokapazität hingegen bei 57,4 % ± 13,2 % (Abbildung 5-44).

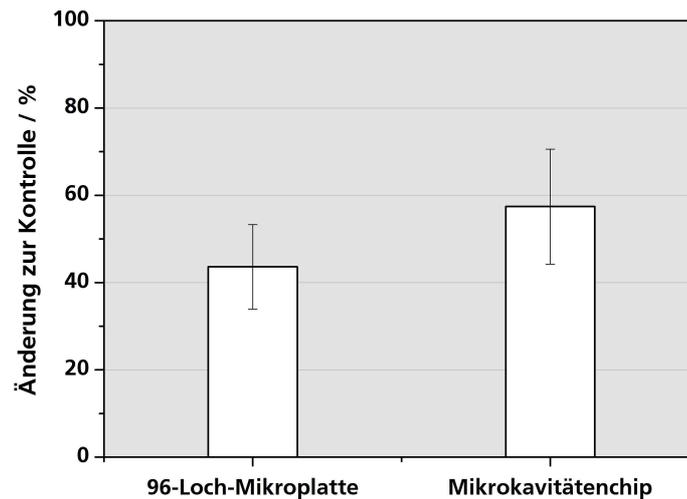


Abbildung 5-44 Prozentualer Anteil GC80-behandelter Adipozyten in der Mikrokavität und der 96-Loch-Mikroplatte.

hMSCs wurden während der adipogenen Differenzierung in einer 96-Loch-Mikroplatte und der Mikrokavität für 14 Tage mit 22,8 µg/ml GC80 inkubiert. Im Anschluss wurde der Anteil GC80-behandelter Adipozyten hellfeldmikroskopisch analysiert und der prozentuale Anteil digital (*analysis*) ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil GC80-interagierender Adipozyten im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Änderung zur Kontrolle / %).

5.3.3 Korrelation von Zellreaktionen und Nanopartikellokalisierung

Bisher wurde bewiesen, dass sich mit Hilfe des miniaturisierten Zellkulturgefäßes die Analyse nanopartikulärer und viraler Effekte reproduzierbar realisieren lassen. Weiterhin konnte eine stärkere Sensitivität des miniaturisierten *in vitro* Systems gegenüber den konventionellen *in vitro* Systemen belegt werden.

In diesem Zusammenhang war zu klären, in wie fern eine schnelle Wiederfindung individueller Zellen in der Mikrokavität mittels optischer Verfahren gewährleistet werden konnte. In den vorherigen MKC-basierten Experimenten bestätigte sich die erleichterte Wiederfindung individueller in der Mikrokavität kultivierten pLL8-GFP A549-Zellen. Der Vergleich der phasenkontrastmikroskopischen (Abbildung 5-45a) und der raster-elektronenmikroskopischen Aufnahme einer Mikrokavität (Abbildung 5-45b) ließen eine 1:1-Korrelation individueller Zellen zu. Der Vorteil des MKC-basierten *in vitro* Systems besteht darin, dass die komplette Zellkulturfläche in einem Bildausschnitt (888 µm x 666 µm) sichtbar ist. Zur Untersuchung der Korrelation der Nanopartikelmenge, die in individuellen Zellen einen inflammatorischen Effekt induziert, wurden pLL8-GFP A549-Zellen mit 30 µg/ml GC10 oder SC10 für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss hellfeld- und fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert.

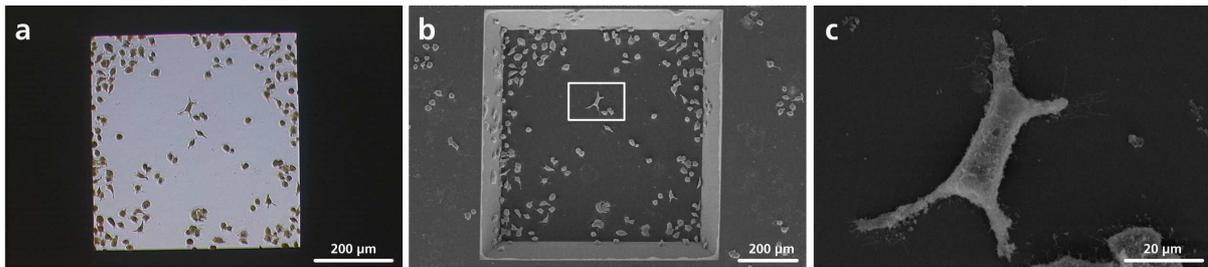


Abbildung 5-45 Mikroskopische Aufnahmen adhärenter pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokapazität.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden 48 Stunden unter physiologischen Bedingungen in der Mikrokapazität kultiviert. (a) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme adhärenter pIL8-GFP A549-Zellen auf der Si_3N_4 -Membran der Mikrokapazität. (b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme adhärenter pIL8-GFP A549-Zellen auf der Si_3N_4 -Membran und den Flanken der Mikrokapazität. (c) Vergrößerung des in Bild b markierten Bereichs. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer pIL8-GFP A549 Zelle auf der Si_3N_4 -Membran der Mikrokapazität.

In den hellfeldmikroskopischen Aufnahmen war die Agglomeration sowohl der GC10 als auch der SC10 deutlich als schwarze Bereiche zu erkennen (Abbildung 5-46 Bild a1 und Bild a2). Im Gegensatz zu SC10 führte die GC10-Exposition zu einer stärkeren Agglomeration der Partikel. Diese verteilten sich inhomogen auf der Si_3N_4 -Membran der Mikrokapazität.

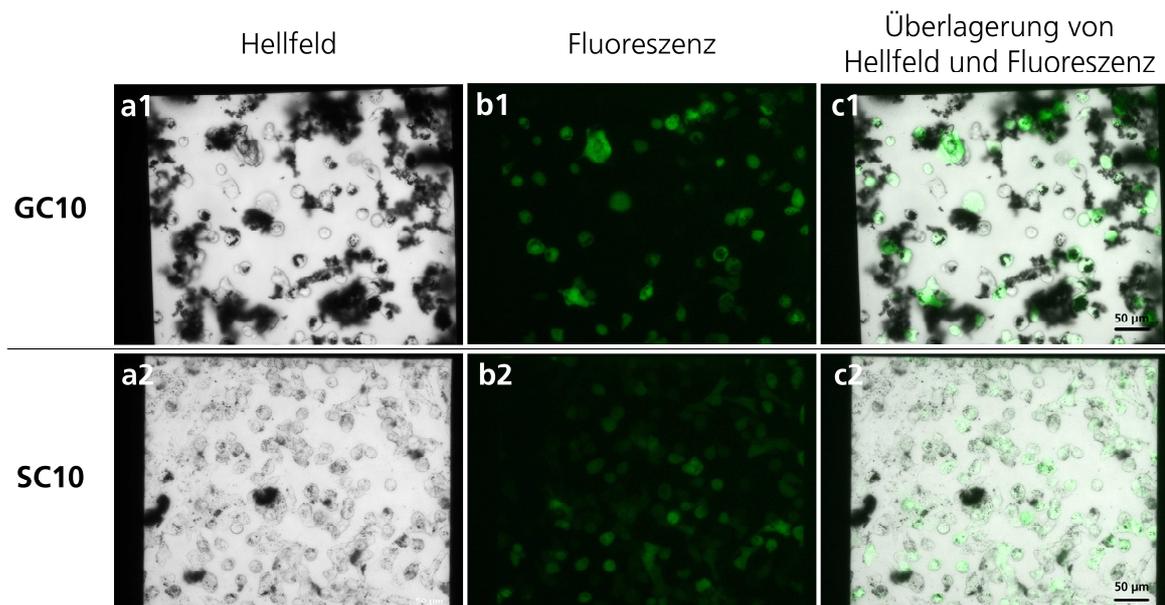


Abbildung 5-46 Mikroskopische Aufnahmen SC10- oder GC10-inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokapazität.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden 48 Stunden unter physiologischen Bedingungen mit 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1) GC10 oder (2) SC10 in der Mikrokapazität behandelt. (a) Hellfeldmikroskopische Aufnahmen. Nanopartikelagglomerate sind als schwarze Bereiche sichtbar. (b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. GFP-exprimierende und somit inflammatorische Zellen fluoreszieren grün. (c) Die Überlagerung der hellfeld- und der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beweist, dass unter Anwendung des MKCs eine eindeutige Zuordnung der Inflammation zu individuellen Zellen möglich ist.

Durch Überlagerung der hellfeldmikroskopischen (Abbildung 5-46 Bild a1 und Bild a2) und der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (Abbildung 5-46 Bild b1 und Bild b2) der in den Mikrokavitäten mit GC10 und SC10 behandelten pIL8-GFP A549-Zellen konnte die zelluläre Interaktion von Nanopartikelagglomeraten mit der Induktion inflammatorischer Prozesse individueller Zellen in der Mikrokavität verglichen werden (Abbildung 5-46 Bild c1 und Bild c2). Die Untersuchung individueller GC10-behandelter pIL8-GFP A549-Zellen wies eine deutliche inhomogene Nanopartikelinteraktion mit den individuellen Zellen auf. Es konnten GFP-exprimierende pIL8-GFP A549-Zellen beobachtet werden die mit vielen (Abbildung 5-47a), wenigen (Abbildung 5-47a) oder kaum (Abbildung 5-47 Bild b-d) Nanopartikelagglomerate interagierten. Jedoch wiesen auch nicht fluoreszierende pIL8-GFP A549-Zellen Interaktionen mit unterschiedlich großen GC10-Agglomeraten auf (Abbildung 5-47 Bild a-c).

Im Gegensatz zu GC10 konnte eine homogenere Verteilung der SC10-Nanopartikel pro Zelle beobachtet werden (Abbildung 5-47e und Abbildung 5-47f).

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass sich das miniaturisierte *in vitro* System eignet, um spezifische Reaktionen individueller adhärenter Zellen einer Kultur auf einer definierten Fläche über einen langen Zeitraum permanent zu beobachten, zu charakterisieren und zu quantifizieren.

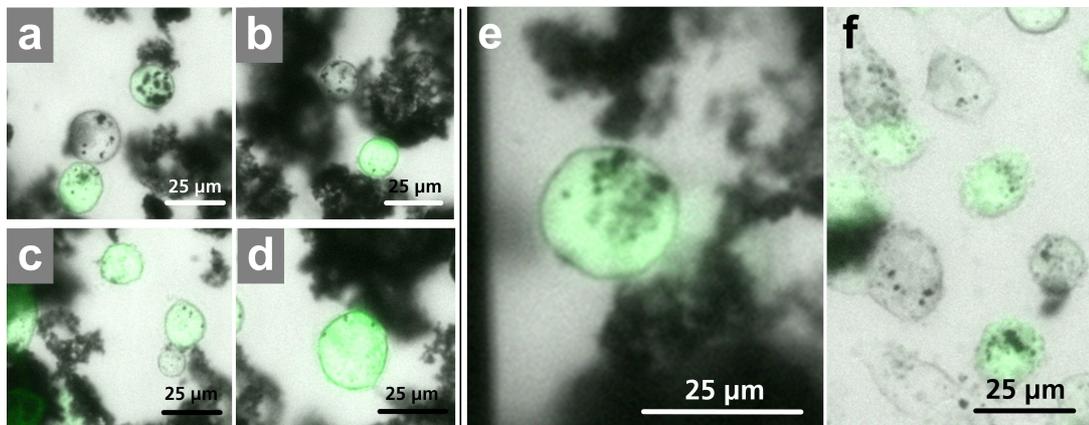


Abbildung 5-47 Mikroskopische Aufnahmen individueller GC10- oder SC10-inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen in der Mikrokavität.

pIL8-GFP A549-Zellen wurden 48 Stunden unter physiologischen Bedingungen mit 30 µg/ml (a-d) GC10 oder (e, f) SC10 in der Mikrokavität behandelt. Die hellfeldmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der GC10-inkubierten pIL8-GFP A549-Zellen wurden überlagert. (a-d) Ausschnitte individueller GC10-behandelter pIL8-GFP A549-Zellen. Neben GFP-exprimierenden pIL8-GFP A549-Zellen mit denen viele Nanopartikel interagieren, konnten auch pIL8-GFP A549-Zellen beobachtet werden die mit wenigen oder kaum Nanopartikelagglomerate interagieren. (e und f) Überlagerung der hellfeld- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen SC10-inkubierter pIL8-GFP A549-Zellen. Auch hier konnte keine Korrelation zwischen Nanopartikelmenge und Fluoreszenzintensität der Zelle nachgewiesen werden.

6 Diskussion

Die *Internationale Organisation für Normierung (ISO)* und die *ASTM International* erarbeiten derzeit Grundlagen für eine vereinheitlichte Nomenklatur von nanoskaligen Objekten. In der Regulierung der Europäischen Kommission fallen Nanomaterialien unter die Bestimmungen von *REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, EU-Chemikalienverordnung EG 1907/2006)*. Allerdings existieren bisher keine Richtlinien zur standardisierten Prüfung von nanopartikulärem Material⁴. Bei den bisher zur Toxizitätsanalyse von nanopartikulären Formulierungen angewendeten *in vitro* Methoden handelt es sich um normierte *in vitro* Verfahren, die zum heutigen Stand der Technik in Anlehnung an die Norm ISO 10993 (Biologische Beurteilung von Medizinprodukten) durchgeführt werden¹⁵².

Studien zur Bestimmung der Toxizität von nanopartikulären Materialien unter Anwendung der in der ISO Norm 10993 beschriebenen Testverfahren zeigen eine starke Interaktion der Nanopartikel mit Analyseereagenzien der standardisierten Toxizitätstests^{154, 290}. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften können Nanopartikel Licht absorbieren und somit das Ergebnis absorptionsspektrometrischer Messungen verfälschen. Weiterhin können nanopartikuläre Systeme unter physiologischen Bedingungen beispielsweise durch Interaktion mit Analyseparametern oder Adsorption von Proteinen zu einer Änderung des detektierten Signals führen und somit das Messergebnis der standardisierten *in vitro* Toxizitätsverfahren verändern¹⁵⁷⁻¹⁶⁰.

Aus diesen Gründen besteht zur Risikobewertung von Nanomaterialien die dringende Notwendigkeit einer Adaption existierender Toxizitätstests und die Entwicklung neuer sensitiver *in vitro* Testsysteme, die an die Eigenschaften der Nanopartikel angepasst sind und sich eignen subtoxische nanopartikelinduzierte Effekte zu quantifizieren. Dabei steht die nichtinvasive permanente Detektion zellulärer Prozesse einzelner adhärenter Zellen im Vordergrund. Auch im Zusammenhang mit der europäischen Chemikalienverordnung *REACH*¹, besteht der Bedarf nach neuen *in vitro* Systemen zur nicht-invasiven Erfassung nanopartikulärer Effekte auf zellulärer Ebene.

Neben der Beeinflussung der standardisierten *in vitro* Methoden durch die nanopartikel-spezifischen Eigenschaften basiert eine Vielzahl der bisher zu Toxizitätsuntersuchungen angewendeten ISO-standardisierten *in vitro* Techniken auf der Analyse von Zellpopulationen, bestehend aus mehreren tausend Zellen. Diese Verfahren liefern nur einen Durchschnittswert der individuellen Zellreaktionen und können so zu Fehlinterpretationen führen, da sie individuelle Variationen der einzelnen Zellreaktionen verdecken.

Vor diesem Hintergrund und der Diskussion der Veränderung einer individuellen Zelle als Ursache vieler Krankheiten (Krebsstammzelle)²²⁷, war daher das Ziel dieser Arbeit die

Entwicklung und Validierung eines nichtinvasiven miniaturisierten *in vitro* Systems zur Erfassung nanopartikulärer und viraler Effekte auf zellulärer Ebene.

6.1 Entwicklung eines miniaturisierten *in vitro* Systems

Das Ziel war, eine kleine definierte, aber statistisch signifikante, Zellzahl in 2-D-Kultur in einem miniaturisierten Zellkulturgefäß zu kultivieren, wobei das physiologische Zellverhalten gewährleistet sein sollte. Zusätzlich sollten unter Anwendung des miniaturisierten Zellkulturgefäßes mikroskopische Aufnahmen mit besserer optischer Qualität im Vergleich zu den konventionellen Zellkulturgefäßen erzielt werden. Hierbei sollten die Nachteile die bei der Nutzung von Standardzellkulturgefäßen auftreten wie beispielsweise Randeffekte, Eigenfluoreszenz des Materials und das zeitintensive Analysieren der gesamten Zellkulturfläche minimiert werden.

Basierend auf einem Siliziumwafer, wurde ein Mikrokavitätenchip hergestellt. Die Mikrokavitäten besaßen eine 800 nm dünne transparente Siliziumnitridmembran mit einer Wachstumsfläche von 0,27 mm² und wurden erfolgreich als miniaturisierte Zellkulturgefäße genutzt. Mit Hinblick auf die Anwendung des Mikrokavitätenchips als Hochdurchsatz-Screeningsystem erzielte man durch Kombination des Mikrokavitätenchips mit einem Array-Adapter die Möglichkeit 252 miniaturisierte Zellkulturgefäße innerhalb kurzer Zeit zu dokumentieren. Die Zellkulturfläche des miniaturisierten *in vitro* Systems wurde im Vergleich zu den herkömmlich genutzten 96-Loch-Mikroplatten um das 126fache reduziert. Die daraus resultierende Volumenverringerung der Mikrokavität ergab ein tausendfach kleineres Volumen (0,1 µl) gegenüber den bei Toxizitätsanalysen konventionell verwendeten Gefäßen wie beispielsweise den 96-Loch-Mikroplatten (100 µl). In der Kombination des Mikrokavitätenchips mit einem Silikonaufsatz konnte das Volumen des Mediums oberhalb der Mikrokavität erweitert und somit das Verdunsten des Zellkulturmediums in den Mikrokavitäten reduziert und die Kultivierungsdauer ohne erneute Mediumzugabe erhöht werden. An dem Beispiel des Volumens wird deutlich, dass unter Anwendung des Mikrokavitätenchips eine deutliche Ersparnis der Testsubstanzen, der Analysereagenzien sowie der Zellkulturmedien erzielt werden kann. Hinzu kommt der zeitliche Gewinn während der optischen Dokumentation der gesamten Zellpopulation auf der Zellkulturfläche. Während das rasterartige Dokumentieren der in einem Segment einer 96-Loch-Mikroplatte kultivierten Zellpopulation mehrere Stunden in Anspruch nimmt, lassen sich unter Anwendung des Arraysystems in weniger als 40 Minuten in 252 separaten Mikrokavitäten Zellkulturen dokumentieren. Ein weiterer Vorteil der Mikrokavität ist, dass sie sich in einem mikroskopischen Bildausschnitt der Maße 888 µm x 666 µm die gesamte Zellkulturfläche der

Mikrokavität abbilden lässt und dadurch eine schnellere Datengenerierung und zusätzlich eine Zuordnung der Zellreaktionen zu den individuellen Zellen erreicht wird. Weiterhin lassen sich Variationen innerhalb der Zellkultur unter Anwendung des Mikrokavitätenchips schneller und sensitiver erfassen.

Ein weiterer wichtiger zu untersuchende Aspekt war das Zellverhalten während der Kultivierung in den Mikrokavitäten. Im Vergleich zu Toxizitätstests in 96-Loch-Mikroplatten, bei denen in einem Segment der Mikroplatte 10 000 Zellen eingesetzt werden, besteht eine Zellpopulation in der Mikrokavität aus maximal 300 Zellen. Vor diesem Hintergrund war die Frage von besonderem Interesse, ob die Miniaturisierung der Zellkulturfläche und dadurch die Reduktion der Zellzahl sich negativ auf das Zellverhalten auswirkt, da sich in Studien anderer Arbeitsgruppen zeigte, dass sich das Verhalten individueller isolierter Zellen von dem einer Zellpopulation unterscheidet²⁴⁹⁻²⁵¹. Fritzpatrick und Leong konnten durch Quantifizierung des Hormons Parathyrin eine höhere Sensitivität isolierter Zellen feststellen²⁴⁹. Weiterhin erkannten Sun et al. einen Zusammenhang zwischen Zelldichte und Hormonsekretion²⁵¹. Eine Senkung der Hormonsekretion isolierter Zellen im Vergleich zu der Hormonsekretion einer Zellpopulation wurde von Petrasek et al. beschrieben²⁵⁰. Vergleichende Experimente der vorliegenden Arbeit zur Detektion einer nanopartikelinduzierten Inflammation konnten jedoch belegen, dass die Miniaturisierung der Zellkulturfläche sowie die Reduktion der Zellzahl keinen negativen Einfluss auf die Analyse und Quantifizierung der partikelinduzierten Effekte haben.

Bestehende nichtinvasive Verfahren zur Einzelzellanalyse berücksichtigen genau diese Zusammenhänge nicht. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Ziel verfolgt, Reaktionen einzelner Zellen nichtinvasiv zu quantifizieren, wobei sich die Zellen während der Charakterisierung nicht als Einzelzellen in Suspension, sondern adhärent auf der Siliziumnitridmembran der Mikrokavität befanden. Existierende Technologien zur Untersuchung einzelner Zellen wie Kapillarelektrophorese (2-D, 3-D), Polymerase Kettenreaktion²⁴², Elastographie, Einzelzell-Gelelektrophorese oder immunzytologische Färbungen, stellen invasive und zeitintensive Methoden dar^{231, 234-237, 239, 240, 243, 291, 292}. Des Weiteren benötigt man bei der Anwendung vorhandener molekularbiologischer und proteinbiochemischer Techniken zur Analyse einzelner Zellen eine große Anzahl an Zellen als Ausgangsmaterial. Diese liegen während der Untersuchung allerdings nicht mehr als adhärente Kultur in den Zellkulturgefäßen vor, sondern meist in Suspension. Dieses Stadium widerspiegelt nicht den physiologischen Zustand adhärenter Zellen. Außerdem könnten durch zusätzliche Trypsinierungsprozesse die Zellen physiologisch geschädigt werden und somit metabolische Änderungen erfahren^{246, 248, 293}. Um physiologische Änderungen der Zelle zu vermeiden und eine nichtinvasive Detektion

spezifischer zellulärer Prozesse adhärenter Zellen zu gewährleisten, wurde eine kleine *in vitro* Kultur bestehend aus 250 - 300 Zellen verwendet, da diese im Vergleich zu Einzelzellanalysetechniken physiologischere Bedingungen simuliert und durch die Kombination des miniaturisierten Zellkulturgefäßes mit einer Reporterzelllinie eine nichtinvasive Untersuchung spezifischer zellulärer Reaktionen garantiert.

Die mittels genetischer Veränderungen aus humanen Lungenepithelzellen generierte Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 exprimiert, durch die Kopplung der humanen Interleukin-8-Promotorsequenz mit dem GFP-Reportergen, bei Aktivierung des Interleukin-8-Promotors das grün fluoreszierende Protein GFP. Somit eignet sich diese Zelllinie in Kombination mit dem miniaturisierten Zellkulturgefäß als neues, nichtinvasives *in vitro* System zur Analyse spezifischer Entzündungsreaktionen von adhärenenten Zellen. Bei der Anwendung der Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 bedarf es keiner Zugabe von Analysereagenzien, deshalb bleiben Interaktionen der getesteten Substanzen wie Nanopartikel oder Viren mit den Analysereagenzien aus und es kommt zu keiner unbeabsichtigten Änderung des quantifizierten Signals und somit zu keiner nanopartikelinduzierten Verfälschung des Testergebnisses.

Weiterhin lässt das entwickelte miniaturisierte *in vitro* System eine Zuordnung der Zellreaktionen zu individuellen Zellen der Kultur zu und berücksichtigt somit individuelle Variationen *in vitro*. Da sich *in vitro* Zellen markant voneinander unterscheiden, trägt das neue *in vitro* System dazu bei, dynamische Zellvariationen zu berücksichtigen. Somit repräsentiert das Ergebnis eine Situation, die näher an der realen *in vitro* Situation liegt, als die Detektion eines Durchschnittswertes wie es bei 96-Loch-Mikroplatten-basierten Systemen der Fall ist.

Im Vergleich zu makroskaligen Kulturgefäßen bietet der Mikrokapazitätenchip die Möglichkeit der Kultivierung, Langzeitbeobachtung und Manipulation einer kleinen Zellzahl auf einer definierten begrenzten Zellkulturfläche. Individuelle Zellen können mit diesem nichtinvasiven System einfach verfolgt und spezifische Reaktionen quantifiziert werden. Dynamische Einzelzellkulturarrays separierter isolierter Zellen lassen zwar die Detektion der Reaktion der isolierten Zellen zu, simulieren aber nicht die physiologischen Bedingungen einer Zelle in 2-D-Kultur ²⁶⁴. Zum gegenwärtigen Stand der Forschung existieren nur wenige Mikrosysteme zur nichtinvasiven Analyse spezifischer Einzelzellreaktionen mittels optischer Methoden ^{257, 265-268, 294-296}. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich humane Zellen auf miniaturisierten Flächen kultivieren und differenzieren lassen ^{267, 297-300}. Prokop et al. beschrieben einen Nanoliter-Bioreaktor für Langzeitkultivierung von Säugerzellen sowie der Charakterisierung der Zelladhäsion und der Detektion von Viabilität, Apoptose und Morphologieänderungen ²¹⁷. Stangegaard et al. beschrieben einen Polymethylmethacrylat-Chip als Mikrozellkultursystem mit einer Zell-

kulturfläche von 99 mm² ²⁶⁸. Hinsichtlich Proliferation und osteogener Differenzierung humaner Stammzellen untersuchten Gomez-Sjöberg et al. ein mikrofluidisches Zellsystem aus Polydimethylsiloxan, mit 96 unabhängigen Zellkulturgefäßen mit einer Wachstumsfläche von 0,9 mm x 1,12 mm ²⁶⁶.

Mit einer Zellkulturfläche von 0,27 mm² stellt der Mikrokavitätenchip zum gegenwärtigen Zeitpunkt eines der kleinsten Zellkulturgefäße dar. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien beweisen eine Biokompatibilität der Siliziumnitridmembran. Neben humanen epithelialen Lungenfibroblasten proliferierten humane mesenchymale Stammzellen, auch eine adipogene Differenzierung der humane mesenchymale Stammzellen und eine neuronale Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen konnte erstmals erfolgreich in den Mikrokavitäten durchgeführt werden. Trotz intensiver Literaturrecherche sind nur wenige Publikationen zur Kultivierung neuronaler Netzwerke und zu der Differenzierung humaner Stammzellen in Mikrokulturgefäßen bekannt ^{266, 267}. Die Vitalität der in dem entwickelten Mikrokavitätenchip kultivierten Zellen lag im Bereich der Vitalität der in Standardzellkulturgefäßen proliferierenden Zellen. Auch die Morphologie der Zellen in der Mikrokavität und in konventionellen Kulturgefäßen verhält sich identisch.

Zur Entwicklung eines *in vitro* Systems zur nichtinvasiven Quantifizierung nanopartikulärer Inflamationsreaktionen individueller Zellen in einem Zellverband wurde eine Reporterzelllinie generiert, deren Interleukin-8-gekoppelte GFP-Expression als Marker für eine nanopartikelbedingte Inflammation genutzt wurde. Die Kombination von stabil transfizierten Reporterzellen, dem Mikrokavitätenchip und optischen Analysemethoden stellt einen innovativen Ansatz für neue *in vitro* Methoden zur Detektion zellulärer Prozesse einzelner Zellen in einer adhärenen Zellkultur dar. Da die Nanopartikel-inhalation einen der bedeutendsten Nanopartikel-Expositionswege darstellt, wurden als Zellsystem für die neue *in vitro* Nanotoxizitätsmethode humane Lungenkarzinomzellen herangezogen. Aus A549-Zellen, isoliert aus humanem bronchialen Lungenepithelgewebe, wurde mittels genetischer Veränderungen die Zelllinie pIL8-GFP A549 generiert. Die Interleukin-8-gekoppelte GFP-Expression der immortalen A549-Zellen wurde durch das Einbringen des pGL3-Basisvektors mit der humanen Interleukin-8-Promotorsequenz sowie der GFP-Sequenz erreicht. Im Vergleich zu Luciferase-exprimierenden Zellen ²⁷⁵ war die einfachere Handhabung GFP-exprimierender Zellen der ausschlaggebende Punkt zur Anwendung für die Validierung des Mikrokavitätenchips als nichtinvasives *in vitro* System. Erste Versuche mit der transfizierten Reporterzelllinie pIL8-Luc A549 zeigten bei inflammatorischer Reaktion eine Abnahme der Interleukin-8-gekoppelten Lumineszenzintensität. Hingegen nahm die Fluoreszenzintensität des exprimierten Proteins GFP bei inflammatorisch stimulierten pIL8-GFP A549-Zellen zu. Zur

mikroskopischen Quantifizierung des Entzündungsstatus eignete sich daher die pIL8-GFP A549 Zelllinie besser und wurde für die Evaluierung eingesetzt. Im Gegensatz zu konventionellen fluoreszenzbasierten Analysetechniken stellt die Kombination aus der Reporterzelllinie und dem Mikrokavitätenchip eine sensitivere und kosteneffizientere nichtinvasive *in vitro* Methode dar.

Anhand der Lichtmikroskopie lassen sich Aussagen über Größe, Morphologie und Motilität einer Zelle treffen. Langzeitbeobachtungen der Zellen in der Mikrokavität ermöglichen zusätzlich zu der Bestimmung der Wachstumsrate die Beobachtung spezifischer Zellreaktionen und die Detektion seltener Effekte in einer definierten *in vitro* Kultur. Wie mit den Experimenten in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ermöglicht die Kombination aus dem Mikrokavitätenchip, den pIL8-GFP A549-Zellen und der Fluoreszenzmikroskopie die Quantifizierung der Intensität eines Interleukin-8-gekoppelten Entzündungsprozesses individueller Zellen in einem Zellmonolayer. Der Mikrokavitätenchip eignet sich für fluoreszenz- und lichtmikroskopische Langzeitcharakterisierungen. Weiterhin ist durch Kombination des *in vitro* Systems mit weiteren nichtinvasiven Analyseverfahren eine Multiparameteranalyse individueller Zellen in einer kleinen Zellpopulation schnell und kostengünstig durchführbar.

Herkömmlich verwendete Methoden zur Quantifizierung spezifischer zellulärer Prozesse berücksichtigen nur einen kleinen Bereich der Gesamtpopulation und erfassen somit nicht die gesamten Zellen der Population oder sie dokumentieren rasterartig die großen Zellkulturflächen mit hohem Zeitaufwand, um sie später in einem automatisierten Bildverarbeitungsprogramm auszuwerten. Das hier entwickelte mikrokavitätenchip-basierte *in vitro* System stellt ein ortsauflösendes Detektionsverfahren zur Korrelation der GFP-exprimierenden Zellen zu der gesamten Zellpopulation dar. Der Mikrokavitätenchip bildet einen Array aus 42 miniaturisierten Zellkulturgefäßen zur permanenten nichtinvasiven Charakterisierung individueller Zellen in einem Zellverband.

Bei der Entwicklung des miniaturisierten Zellkulturgefäßes lag ein weiterer Fokus auf der sensitiven Quantifizierung nanopartikel- oder viraler Reaktionen individueller Zellen einer Kultur. Im Vergleich zu dem bereits existierenden Mikrozellkultursystemen aus Polymethylmethacrylat oder Polydimethylsiloxan, verringert die dünne Siliziumnitridmembran des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Mikrokavitätenchips den mikroskopischen Arbeitsabstand und führt dadurch zu einer optisch besseren Qualität der mikroskopischen Aufnahmen. Ein weiterer Vorteil liegt in seiner Anwendung in Kombination mit verschiedenen Mikroskopietechnologien wie der Lichtmikroskopie, der Fluoreszenzmikroskopie sowie der Rasterelektronenmikroskopie.

Durch die Zellkulturfläche von 0,27 mm² stellt der Mikrokavitätenchip zum gegenwärtigen Zeitpunkt eines der kleinsten Zellkulturgefäße dar, mit einer sehr dünnen Zellkul-

turmembra, die die Qualität der mikroskopischen Aufnahmen gegenüber Polystyrolmembranen der konventionellen KulturgefäÙe verbessert. Auch durch die Kristallstruktur des Siliziums, durch Ätzprozesse entstandene, trichterförmige Kavität mit einer quadratischen Zellkulturfläche konnten die optischen Eigenschaften im Vergleich zu 96-Loch-Mikroplatten weiter erhöht werden. Konventionelle kreisförmige KulturgefäÙe ermöglichen dagegen nur im zentralen Bereich der Zellkulturfläche das Fokussieren der Zellen. Diese Randeefekte treten in der Mikrokavität nicht auf. Die optischen Vorteile der Siliziumnitridmembran werden auch beim Vergleich der Eigenfluoreszenz der Materialien Siliziumnitrid und Polystyrol deutlich. Letzteres wies eine starke Eigenfluoreszenz auf, Siliziumnitrid nahezu keine. Weiterhin erhöht der durch die dünne Siliziumnitridmembran bedingte Arbeitsabstand eine Verbesserung der optischen Qualität der mikroskopischen Aufnahmen.

Nach dem bestätigt werden konnte, dass die Miniaturisierung keinen negativen Einfluss auf das Zellverhalten der in den Mikrokavitäten kultivierten Zellen hat, wurde das miniaturisierte *in vitro* System validiert.

6.2 Physikochemische und zytotoxikologische Partikelcharakterisierung

Bevor das entwickelte mikrokavitätenchipbasierte *in vitro* System als nichtinvasives nanotoxikologisches Testsystem evaluiert werden konnte, mussten die zur Validierung verwendeten Partikel physikochemisch und biologisch charakterisiert werden.

Neben der physikochemischen Charakterisierung war das Ziel der Untersuchungen, toxische Konzentrationen der Partikel zu identifizieren, um diese später zur Validierung des mikrokavitätenchipbasierten *in vitro* Systems einzusetzen.

Aufgrund ihrer bekannten biologischen Aktivität diente nanopartikuläres Silber als positive Referenz, Magnetit-Partikel als negative Referenz^{16, 83, 84, 105, 301}. Als zusätzliches nanopartikuläres System sollte auf Grund der widersprüchlichen Datenlage von Gold-Nanopartikeln deren toxisches Potenzial bestimmt werden. Die physikochemische Charakterisierung der untersuchten Gold- und Silber-Nanopartikel bestätigte die vom Hersteller beschriebene durchschnittliche Partikelgröße. Allerdings bewiesen transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen morphologische Unterschiede der Nanopartikel in einer Lösung. Neben der vom Hersteller beschriebenen sphärischen Morphologie wiesen die Partikel stäbchen- und pyramidenförmige Morphologien auf. Eine Vielzahl von Forschungsgruppen bestätigten die Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der Partikelmorphologie^{12, 15, 22, 24}. Aus diesem Grund müssen bei der Interpretation der Ergebnisse der *in vitro* Toxizitätsstudien die Heterogenität der Morphologie und die damit verbundenen unterschiedlichen Internalisierungs- und Wirkmechanismen berück-

sichtigt werden. Durch standardisierte Herstellungsprozesse könnten homogenere Partikelsuspensionen synthetisiert und dadurch oben genannte Problematik minimiert werden.

In der Literatur ist nicht nur die Morphologie, sondern auch die Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften wie der Oberflächenfunktionalisierung und der Partikeldurchmesser als Ursache für veränderte Internalisierungsprozesse von Nanopartikeln und deren Zytotoxizität beschrieben^{139, 140}. Sowohl für die Silber-, als auch für die Gold-Nanopartikel deckte sich die quantifizierte Oberflächenladung (Zeta-Potenzial) mit den in der Literatur beschriebenen Daten^{91, 148, 302, 303}. Untersuchungen des Zeta-Potenzials der Nanopartikel unter physiologischen Zellkulturbedingungen bewiesen eine Abhängigkeit der Oberflächenladung von dem Serumproteinanteil in der Lösung. Im Gegensatz zu der Nanopartikelstocklösung führte der Austausch des Lösungsmittels durch serumhaltiges Kulturmedium zu einer signifikanten Erhöhung des Zeta-Potenzials. Wie bereits von Ehrenberg et al. für Silber-Partikel gezeigt, erhöhte sich der hydrodynamische Durchmesser sowie die Oberflächenladung der in dieser Arbeit untersuchten Gold- und Silber-Nanopartikel³⁰⁴. Die Gruppe um Ehrenberg diskutierte die Bindung von Serumproteinen als Ursache die Änderung der Oberflächenladung und des Partikeldurchmessers. Auch Arnida et al. konnten einen Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers unmodifizierter Gold-Nanopartikel nach Inkubation mit Serumproteinen bestätigen¹⁴⁸. Neben der unspezifischen Adsorption von Proteinen und Molekülen an der Partikeloberfläche kann die Erhöhung des Durchmessers auch durch Aggregation der Nanopartikel aufgrund ihrer Oberflächenmodifikation verursacht werden und zu einer inhomogenen Verteilung der Nanopartikelsuspension führen. Da das Aggregationsverhalten eng mit dem Zeta-Potenzial verknüpft ist, würde eine spezifische Modifikation der Nanopartikeloberfläche die Aggregation verringern. Sowohl der Nanopartikeldurchmesser als auch die Oberflächenladung variieren stark in serumhaltigem sowie serumfreiem Kulturmedium. Dieser Effekt kann durch die stabilisierende Wirkung der Serumproteine argumentiert werden wie es bereits für Carboxyl-Partikel beschrieben wurde^{17, 303}. Eine Adsorption der Serumproteine an die negativ geladene Oberfläche der Nanopartikel führt zu einer Abschwächung des negativen Zeta-Potenzials, wie es bei den untersuchten Nanopartikeln in dieser Arbeit detektiert wurde. Eine weitere wichtige Rolle bei der Aggregatbildung, wie von Berg et al. beschrieben, spielt der pH-Wert der Zellkulturumgebung. Gleicht dieser dem isoelektrischen Punkt der Oberflächenladung, kommt es zur Agglomeratbildung²⁰³. Durch Stoffwechselprozesse der Zellen ändern sich der pH-Wert des Zellkulturmediums und somit auch die Oberflächenladung der sich darin befindenden Partikel, wodurch das beobachtete Aggregationsverhalten der Silber- und Gold-Nanopartikel erklärt werden könnte.

Das unkontrollierte Agglomerieren metallischer Nanopartikel in physiologischen Lösungen und im Zellkulturmedium stellt ein großes Problem der Risikoanalyse dar. Es kann derzeit nur durch zusätzliche Modifikationen der Partikel beeinflusst werden. Hierzu gehört zum Beispiel die Funktionalisierung von Nanopartikeln, die zu einer erhöhten und stabileren Löslichkeit in wässrigen Lösungen im Vergleich zum unmodifiziertem Rohmaterial, führt ³⁰⁵. Weiterhin hilft eine ultraschallbasierte Behandlung der Nanopartikel-suspensionen zur Zerstörung größerer Nanopartikelaggregate. Allerdings können durch diese Vorbehandlung keine Homogenisierung der Nanopartikelsuspensionen gewährleistet und keine Aggregation in Zellkulturmedium vermieden werden.

Als weitere Ursache neben der Morphologie, der Oberflächenladung und des Durchmessers, wird das Herauslösen von Ionen aus dem Nanomaterial als weitere Ursache zytotoxischer Effekte diskutiert ⁷⁹. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse konnten das Herauslösen von Ionen aus dem Nanomaterial nicht bestätigen, da das von der Nanopartikelsuspensionen abzentrifugierte Lösungsmittel keinen zytotoxischen Effekt induzierte.

Durch die Veränderung der Partikeloberfläche und der Größe der Nanopartikel, nach Inkubation der Nanopartikel in serumhaltigem Kulturmedium, ändern sich der Internalisierungsmechanismus sowie die Intensität der zellulären Internalisierung und die zelluläre Verteilung der Nanopartikel innerhalb der Zellen. Die intrazelluläre Aufnahme und die subzelluläre Verteilung der Nanopartikel konnten in dieser Arbeit mittels multiphotonenbasierter Rasterlasermikroskopie nachgewiesen werden. Die Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 10 nm reicherten sich intrazellulär an. Bekanntlich akkumulieren Gold-Nanopartikel dieser Größe sowohl in Vakuolen im Intrazellularraum der Zelle, in den Lysosomen, den Mitochondrien, als auch im Nukleus ^{97, 139, 148, 149, 306-308}. Da die rasterlasermikroskopischen Experimente dieser Arbeit keine genaue Aussage über den Aufnahmemechanismus liefern, sondern nur eine Partikelinternalisierung bestätigten, wurde transmissionselektronenmikroskopisch die Internalisierung und intrazelluläre Akkumulation der Gold-Nanopartikel in den humanen mesenchymalen Stammzellen bestätigt. Die vorliegenden Ergebnisse belegen eindeutig, dass die untersuchten Nanomaterialien von verschiedenen Zelltypen aufgenommen werden können, wobei die genauen Internalisierungsmechanismen bis zum jetzigen Zeitpunkt weitestgehend ungeklärt sind. Als Aufnahmemechanismus für metallische Nanopartikel werden Endozytose, Phagozytose und aktive rezeptorvermittelte Transporte diskutiert ³⁰⁹. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der vorliegenden Arbeit deuten auf eine endozytotische Aufnahme der Gold-Nanopartikel hin wie sie bereits für Titanoxid-Partikel diskutiert wurde ³¹⁰. Die Endozytose wird mit der Partikeloberfläche, Morphologie sowie dem Aggregationsverhalten der Nanopartikel in Verbindung ge-

bracht^{311, 312}. In dieser Arbeit konnten rasterelektronenmikroskopisch in den Lipidvakuolen der adipogen differenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen neben sphärischen 80 nm großen Gold-Partikeln auch pyramidenförmige Partikelmorphologien detektiert werden, was ein Indiz für einen morphologieunabhängigen Internalisierungsmechanismus in humanen mesenchymalen Stammzellen ist. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen deuten auf die Einlagerung der Gold-Nanopartikel in die Lipidvakuolen hin, mit anschließender Zerstörung der Vesikel.

Unter Berücksichtigung der physikochemischen Eigenschaften, der Morphologie und der möglichen Interaktion der Gold- und Silber-Nanopartikel mit Analyseagenzien, wurde deren Zytotoxizität mittels standardisierter *in vitro* Verfahren untersucht. Da die Partikelinhalation einen der bedeutendsten Expositionswege darstellt wurde die Lungenepithelzelllinie A549 als *in vitro* Modell ausgewählt. Neben konzentrationsabhängigen Untersuchungen wurde der Effekt von Nanopartikelgröße und Expositionsdauer untersucht. Die bisher in der Literatur beschriebenen Untersuchungen der Zellvitalität nach Gold- und Silber-Exposition sind oft widersprüchlich und lassen Raum für Spekulationen. Einige Gruppen berichten von einer Gold-induzierten akuten Zytotoxizität, während andere Arbeitsgruppen wiederum von einem fehlenden akut zytotoxischen Verhalten der Gold-Nanopartikel berichten^{23, 83, 96, 139-141}. Die Arbeiten von Pan et al. an humanen Keratinozyten zeigten, dass nach Inkubation mit 15 nm großen Gold-Nanopartikeln, nach erfolgter Internalisierung, oxidativer Stress und Vitalitätsverlust sowie morphologische Veränderungen der Zellen induziert werden²³. Hingegen berichteten Conner et al. von einer Internalisierung von Gold-Nanopartikeln ohne zytotoxischen Effekt^{83, 141}. *In vitro* Experimente mit kolloidalem Silber des Durchmessers 10 nm belegten zytotoxische und genotoxische Effekte von Nanosilber in immortalisierten Zelllinien, Primärzellen und Stammzellen^{83, 84, 97, 101, 104, 105, 113, 120}. In Kenntnis dieser Arbeiten wurde für die vorliegende Studie eine vornehmlich zytotoxische Reaktion der Nanopartikel *in vitro* erwartet. In der vorliegenden Arbeit fungierte der WST-1 Assay zur Bestimmung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen *in vitro*. Die Inkubation von pIL8-GFP A549-Zellen mit Silber-Nanopartikeln des Durchmessers 10 nm führte zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Reduktion der Dehydrogenaseaktivität. Dieser deutliche Verlust der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität nach Exposition mit Silber-Nanopartikeln wurde auch durch andere Arbeitsgruppen unter Verwendung verschiedener Zelllinien nachgewiesen^{83, 84, 120, 313}. Um die Ergebnisse des WST-1 Tests zu verifizieren, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Nanopartikel auf die Zellproliferationsrate mittels BrdU Assay geprüft. Auch hier konnte nur für Silber-Nanopartikeln des Durchmessers 10 nm eine signifikante Reduktion der Zellproliferation quantifiziert werden. In der Lite-

ratur ist eine durch Silber-Nanopartikel induzierte Reduktion der Zellproliferation bekannt^{123, 314}.

Bis zum heutigen Zeitpunkt werden drei Arten des Zelltodes beschrieben: Der programmierte Zelltod (Apoptose), die Nekrose und die Autophagie. Bekanntlich wirken Gold-Nanopartikel und Silber-Nanopartikel *in vitro* apoptotisch^{83, 120, 195, 315}. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der vorliegenden Arbeit von Silber- und Gold-behandelten pIL8-GFP A549-Zellen wiesen für Apoptose charakteristische Morphologien auf. Jedoch konnte keine Caspase 3/7-vermittelte Apoptoseinduktion quantifiziert werden.

Eine Entzündungsreaktion wird durch eine Reihe von intrazellulären und extrazellulären Signalen kontrolliert und gesteuert. Häufig geht der Entzündung in einem Gewebe die Schädigung einzelner Zellen durch oxidativen Stress voraus³¹⁶⁻³²⁰. Unphysiologische Einflüsse führen in einem Gewebe zur Aktivierung und schließlich zur Transkription einer Reihe von proinflammatorischen Mediatoren wie z. B. Chemokinen oder Zytokinen die direkt oder indirekt oxidativen Stress verstärken. Bestandteil dieser proinflammatorischen Signale sind Zytokine, die von Immunzellen ausgeschüttet werden und auto-, para- und endokrin wirken können. Proinflammatorische Effekte, in Form von Zytokinexpressionen und der Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies, wurden nach Exposition mit nanopartikulärem Gold und Silber nachgewiesen^{84, 91, 100, 147}. Unter Anwendung der stabil transfizierten Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 wurde der inflammatorische Effekt der Gold- und Silber-Nanopartikel durch Quantifizierung der GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen nichtinvasiv ermittelt. Auch hier war ein material- und größenabhängiger Effekt zu beobachten. Sowohl die Ergebnisse der Analyse der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität, als auch die Resultate der Untersuchung der Zellproliferation sowie die Fluoreszenzintensität der GFP-Expression der pIL8-GFP A549-Zellen in den 96-Loch-Mikroplatten bewiesen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Silber-Nanopartikel des Durchmessers 10 nm mit den verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiträumen eine akut toxische Wirkung induzieren. Hingegen bewiesen die durchgeführten Studien in den 96-Loch-Mikroplatten, dass die in dieser Arbeit verwendeten Gold-Nanopartikel des Durchmessers 10 nm mit den eingesetzten Konzentrationen und Inkubationszeiträumen keine akut toxische Wirkung zeigten.

Die Ergebnisse zur Zytotoxizität belegen klar, dass die biologische Aktivität der verwendeten Nanomaterialien von einer Vielzahl von Parametern wie z. B. der Partikelmorphologie, der Konzentration, der Expositionsdauer, der Partikelgröße, der Oberflächenmodifikation und des Materials, abhängt. Alle diese Parameter müssen bei der Auswertung der experimentellen Daten berücksichtigt werden.

Als weiteres *in vitro* Modell wurden in dieser Arbeit neben der Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 humane mesenchymale Stammzellen verwendet. Stammzellen sind über ihre

Fähigkeit zur Selbsterneuerung, der Differenzierung in verschiedene Zelltypen und der Repopulation eines Gewebes *in vivo* definiert³²¹. Dabei reicht das Differenzierungspotenzial von unipotenten (Differenzierung in einen einzigen Zelltypen), bis zu pluripotenten Stammzellen, die eine unbeschränkte Differenzierungsfähigkeit besitzen. Da adulte Stammzellen im Körper zirkulieren, an der Wundheilung beteiligt sind und in dichtem Kontakt mit antimikrobiell beschichteten Implantaten oder nanogoldbasierten Kontrastmitteln treten können, ist es von starker Relevanz den Effekt von Silber- und Gold-Nanopartikeln auf humane mesenchymale Stammzellen zu untersuchen. Da humane mesenchymale Stammzellen die am besten charakterisierten Stammzellen darstellen, wurden sie im Rahmen dieser Arbeit angewendet.

Bekannte Studien über den Effekt von Nanopartikeln auf Stammzellen konzentrieren sich meist auf deren Proliferationskapazität und nicht das Differenzierungspotenzial^{82, 104, 120, 123, 125, 322}. Nach adipogener Stimulation differenzierten die Stammzellen über den Status des Präadipozyten zu Adipozyten. Die während der adipogenen Differenzierung gebildeten Lipidvakuolen stellten einen einfachen Parameter zum Nachweis der Differenzierung dar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Adipogenese zur Untersuchung des Effektes von Gold- und Silber-Nanopartikeln auf das Differenzierungspotenzial humaner mesenchymaler Stammzellen herangezogen.

Bisherige Literaturangaben beschreiben den Effekt von Silber- und Gold-Nanopartikeln auf proliferierende Stammzellen^{104, 120}. Hackenberg et al. untersuchten den Effekt von Silber-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 40 nm auf die Induktion von DNA-Schäden und chromosomale Aberrationen¹⁰⁴. Für beide Endpunkte stellten sie einen konzentrationsabhängigen Anstieg fest. Weiterhin konnten sie neben einer inflammatorischen Reaktion eine Reduktion der Zellviabilität detektieren. Diese Untersuchungen bezogen sich nur auf proliferierende, nicht auf differenzierende humane mesenchymale Stammzellen mit einer maximalen Expositionsdauer von 24 Stunden¹⁰⁴. Hingegen zeigten Fan et al. erstmals den negativen Effekt von citratfunktionalisierten Gold-Nanopartikeln auf die adipogene Differenzierung, allerdings nur über einen Zeitraum von 14 Tagen¹²². Dabei konnte keine signifikante Korrelation zwischen Nanopartikelkonzentration und der Reduktion der Adipogenese quantifiziert werden.

Zum gegenwärtigen Stand der Forschung existieren nach Kenntnissen der Autorin dieser Arbeit keine Daten über den Effekt von Gold- und Silber-Nanopartikeln auf die Stammzellendifferenzierung und deren permanente Beobachtung nach chronischer Exposition über 21 Tage. In vorliegender Arbeit durchgeführte langzeitmikroskopische Untersuchungen bestätigen eine verzögerte adipogene Differenzierung um vier Tage nach chronischer Exposition mit 80 nm großen Gold-Nanopartikeln über einen Zeitraum von 18 Tagen. Hellfeldmikroskopische Aufnahmen bewiesen eine konzentrationsabhängige

Reduktion der Lipidvakuolenbildung unter Anwesenheit von Gold-Nanopartikeln. Möglicherweise greift nanopartikuläres Gold in die Differenzierungskaskade ein, interagiert mit Differenzierungsreagenzien und blockt somit deren Verfügbarkeit für die Zelle. Auch ist eine Blockade spezifischer Bindungsstellen durch die Nanopartikel an der Zelloberfläche denkbar. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein Einfluss von nanopartikulärem Gold und Silber auf humane mesenchymale Stammzellen während einer 21-tägigen adipogenen Differenzierung belegt werden. Hierbei waren starke Unterschiede zwischen den Materialien sowie ein konzentrations- und größenabhängiger Effekt quantifizierbar. 10 nm große Gold-Nanopartikel der Konzentration 5,8 µg/ml erwiesen sich in adipogen differenzierenden humanen mesenchymalen Stammzellen als akut toxisch.

Der reproduzierbare Anstieg der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität der humanen mesenchymalen Stammzellen, nach 7-tägiger Inkubation mit 5,8 µg/ml und 11,6 µg/ml Gold-Nanopartikel des Durchmessers von 10 nm in Differenzierungsmedium konnten bisherige Studien nicht bestätigen. Vermutlich steht die signifikante Steigerung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität in Verbindung mit der adipogenen Differenzierung. Nach einer Woche befinden sich die adipogen differenzierenden humanen mesenchymalen Stammzellen noch in der Präphase. Zu diesem Zeitpunkt liegt noch eine starke Stoffwechselaktivität der hMSCs vor. Diese nimmt mit dem Fortschritt der Adipogenese ab. Vermutlich interagieren geringe Konzentrationen der 10 nm großen Gold-Nanopartikel mit den Mitochondrien und führen zu einem Anstieg der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität. Bekanntlich werden Gold-Nanopartikel in die Zelle aufgenommen und können im Nukleus, den Liposomen oder den Mitochondrien akkumulieren^{148, 323}. Konzentrationen größer 11,6 µg/ml führen zu einer Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität. Diese könnte durch unterschiedliche Nanopartikelinternalisierungsmechanismen verursacht sein. Möglicherweise findet bei höheren Konzentrationen eine stärkere Agglomeration der Nanopartikel im Kulturmedium statt, was zu einem im Vergleich zu geringen Partikelkonzentrationen unterschiedlichen Internalisierungsmechanismus führen kann. Nach 7-tägiger Exposition mit Silber-Nanopartikeln des Durchmessers 10 nm konnte kein signifikanter Anstieg der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität detektiert werden. Dies deutet auf einen materialabhängigen Wirkmechanismus hin. Für Nanosilber konnte das inhibierende Verhalten auf proliferierende humane mesenchymale Stammzellen bereits nachgewiesen werden¹⁰⁴, jedoch nur nach 24-stündiger Exposition. Die Ergebnisse nach 14 und 21 Tagen sind nicht mit Literaturdaten zu vergleichen, da bislang keine Studien über diese Dauer durchgeführt wurden. Langzeituntersuchungen hinsichtlich der Zytotoxizität von Nanopartikeln an differenzierender humanen mesenchymalen Stammzellen wurde von

Yi et al. am Beispiel der osteogenen Differenzierung für Gold-Nanopartikel gezeigt¹²⁵. Yi et al. hingegen demonstrierten eine Förderung der Osteogenese von Mausstammzellen durch Gold-Nanopartikel¹²⁵. Zum gegenwärtigen Stand der Forschung liegen nach Kenntnissen der Autorin dieser Arbeit keine Informationen über den Effekt von unmodifizierten Gold- oder Silber-Nanopartikeln auf die Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen über einen Zeitraum von 21 Tagen vor. In dieser Arbeit konnte erstmals ein zeit- und konzentrationsabhängiger Effekt von nanopartikulärem Gold auf die Lipidvakuolenbildung von adipogen differenzierenden hMSCs über einen Zeitraum von 18 und 21 Tagen bewiesen werden.

Im Vergleich zu anderen *in vitro* Kultursystemen führt Nanogold zwar zu einer Reduktion der für die Zellviabilität charakteristischen Parameter, allerdings wird in keiner Studie ein Anstieg der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität beschrieben^{23, 195}. In pLL8-GFP A549-Zellen wurde kein Aktivitätsanstieg festgestellt. Die unterschiedliche Reaktion der beiden Zelltypen deutet auf unterschiedliche Mechanismen der Internalisierung und der anschließenden Signalkaskadenaktivierungen hin. Fan et al. beschrieb neben der Induktion von oxidativem Stress in humanen mesenchymalen Stammzellen eine Entstehung von Nekrose durch 15 nm große Gold-Nanopartikel¹²². Dies kann auch eine Ursache für die Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität darstellen. Ergebnisse von Fan et al. belegen sowohl nach 7 Tagen als auch nach 14 Tagen adipogener Differenzierung nach Inkubation mit 7,1 µg/ml eine Verringerung der Lipidvakuolenbildung, die sich mit steigender nanopartikulären Gold-Konzentration nicht konzentrationsabhängig änderte. In der vorliegenden Arbeit konnte nach 21 Tagen eine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion der Lipid-vakuolenbildung und der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität in hMSCs belegt werden. Im Gegensatz dazu ist in der Literatur die Förderung der osteogenen Differenzierung in MSCs durch Gold-Nanopartikel beschrieben¹²⁵. Weitere Studien bezüglich dem molekularen Mechanismus der durch Gold- und Silber-Nanopartikel induzierte Effekte in humanen mesenchymalen Stammzellen während der Adipogenese sind nötig, um den genauen Einfluss der Nanopartikel auf die biologischen Systeme besser zu verstehen.

Ebenfalls unterbinden Silber-Nanopartikel die Lipidvakuolenbildung in adipogen differenzierenden Stammzellen. Im Gegensatz zu 10 nm großen Gold-Nanopartikeln bewirkten Silber-Nanopartikel des gleichen Durchmessers bereits nach 14 Tagen eine signifikante Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität. Bekanntlich binden Silber-Nanopartikel an die DNA und inhibieren so die Zellreplikation³²⁴. Vermutlich hat ein größenabhängiger Internalisierungsmechanismus stattgefunden. Silber-Nanopartikel der Größe 10 nm sind möglicherweise auf Grund ihrer Größe verstärkt in den Nukleus gelangt, interagierten dort mit der DNA und induzierten DNA-Schäden und lösten so

das Absterben der Zellen aus wie bereits Hackenberg et al. berichteten¹⁰⁴. Diese Hypothese wird durch die starke Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität und dem konzentrationsabhängigen Ablösen der humanen mesenchymalen Stammzellen von der Zellkulturoberfläche bestärkt. Gold-Nanopartikel hingegen führten nicht zum Ablösen der Zellen von der Kulturoberfläche. Auch bei der höchsten untersuchten Konzentration der Gold-Nanopartikel adhärten die Stammzellen, hingegen verringert sich die Differenzierungsfähigkeit. Diese Befunde lassen auf unterschiedliche Wirkmechanismen der untersuchten Gold- und Silber-Nanopartikel schließen. Soweit nanopartikuläres Gold mit der DNA interagiert, lösen die Gold-Nanopartikel im Gegensatz zu Silber-Nanopartikel möglicherweise DNA-Schäden aus, die mit Hilfe zellulärer Reparaturmechanismen beseitigt werden können. Weitere Studien sind nötig, um den Einfluss von Nanopartikeln auf humane Stammzellen während der Differenzierung zu entschlüsseln.

Wie die in der Literatur beschriebenen *in vitro* Untersuchungen verdeutlichen, liegen bei jeder toxikologischen Studie unterschiedliche Ausgangsvoraussetzungen vor. Neben den Konzentrationen variieren die Expositionsdauer, die Zusammensetzung, das *in vitro* System, die Partikelgröße, die Morphologie der Partikel sowie deren Oberflächenfunktionalisierung. Da keine einheitlichen Protokolle und Standardverfahren zur Untersuchung der Nanotoxizität existieren, erschwert sich eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Hinzu kommt, dass in vielen Studien vor der biologischen Untersuchung keine einheitliche physikalische Charakterisierung der untersuchten Nanopartikel durchgeführt wird. Da sich die physikochemischen Eigenschaften jedes Partikels individuell voneinander unterscheiden, variiert diesbezüglich auch deren biologische Funktionalität.

Ein weiterer wichtiger Punkt der bei der Auswertung standardisierter Toxizitätsanalysen berücksichtigt werden muss, ist die Interaktionen der Nanopartikel mit Analyse-reagenzien der konventionellen *in vitro* Standardtests. Aus diesem Grund eignen sich konventionelle *in vitro* Toxizitätsstudien nur bedingt für Nanotoxizitätsanalysen.

Es bedarf der Entwicklung und Validierung neuer sensitiver *in vitro* Systeme, die auch eine nichtinvasive Analyse einzelner adhärenter Zellen in einer definierten Zellpopulation zulassen und von den nanopartikelspezifischen Eigenschaften nicht nachteilig beeinflusst werden. Einen Ansatz als nichtinvasives nanotoxikologisches *in vitro* Testverfahren stellt der entwickelte Mikrokavitätenchip in Kombination mit der transfizierten Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 dar.

6.3 Validierung des miniaturisierten *in vitro* Systems

Nachdem die physikochemische und zytotoxikologische Charakterisierung der Partikel erfolgt war, sollte das entwickelte mikrokavitätenchipbasierte nichtinvasive *in vitro* System validiert werden. Unter Anwendung der in vorherigen Experimenten identifizierten zytotoxischen Nanopartikelkonzentrationen wurden vergleichende Untersuchungen in einer als etabliertes Standardkulturgefäß²⁷⁹ geltende 96-Loch-Mikroplatte und der Mikrokavität durchgeführt.

Nachdem bereits belegt werden konnte, dass die Miniaturisierung der Zellkulturfläche von 34 mm² auf 0,27 mm² keinen negativen Einfluss auf die Vitalität und spezifische Stoffwechselprozesse der kultivierten Zelle hat, lag der Fokus bei den vergleichenden Untersuchungen auf der Analyse der Sensitivität der Detektion spezifischer Zellreaktionen unter Anwendung des mikrokavitätenchipbasierten *in vitro* Systems.

Durch die Kombination des miniaturisierten Zellkulturgefäßes und der transfizierten Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 wurde ein mikrokavitätenchipbasiertes *in vitro* System entwickelt, zur Anwendung als neue nichtinvasive nanotoxikologische Methode zur Detektion inflammatorischer Prozesse individueller adhärenter Zellen in einer Population. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Sensitivität des miniaturisierten *in vitro* Systems zur Detektion inflammatorischer Prozesse individueller adhärenter Zellen in einer Population erfolgte ein Vergleich der nanopartikulären Reaktionen von pIL8-GFP A549-Zellen in 96-Loch-Mikroplatten und den Mikrokavitäten. Im Gegensatz zu den Mikroplatten ermöglicht das miniaturisierte *in vitro* System eine schnelle und sensitivere Quantifizierung inflammatorischer Prozesse. Nach Exposition der pIL8-GFP A549-Zellen mit 20 ng/ml des Inflammationsmediators Tumornekrosefaktor- α , konnte in der Mikrokavität eine stärkere Inflammation im Vergleich zu der 96-Loch-Mikroplatte quantifiziert werden. Dies resultierte aus der optisch quantitativen Analyse jeder einzelnen Zelle in der Mikrokavität. Hierdurch wird das heterogene Verhalten der Zellen einer Population berücksichtigt. Mit dem miniaturisierten System können unter physiologischen Bedingungen individuelle Zellreaktionen quantifiziert und einzelnen Zellen in der Kultur schnell zugeordnet werden.

Die hohe Standardabweichung der quantifizierten GFP-Expression ist auf die Heterogenität der pIL8-GFP A549-Zellen zurückzuführen. Allerdings war zu beobachten, dass der Mittelwert unter Anwendung des miniaturisierten Systems höher war als der Mittelwert der in den 96-Loch-Mikroplatten generierten Ergebnisse. Dies deutet auf eine höhere Sensitivität des miniaturisierten *in vitro* Systems hin.

Aufgrund der höheren Sensitivität und der Zuordnung individueller Reaktionen zu einzelnen Zellen einer adhärenter Zellkultur während der permanenten Charakterisierung der gesamten Zellkultur in einem mikroskopischen Bildausschnitt der Maße

888 μm x 666 μm , stellt das miniaturisierte *in vitro* System ein neues sensitives Verfahren zur Früherkennung toxischer Effekte dar. Es bietet daher im Rahmen der Chemikalien-Verordnung REACH eine Basis für eine neue Methode zur Analyse nanotoxischer Effekte. Aber auch im Hinblick auf neue sensitivere Pharma-Screening-Methoden ist das miniaturisierten *in vitro* Systems einsetzbar.

Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Vergleich des standardisierten mit dem miniaturisierten Zellkulturgefäß erfolgte die Analyse der inflammatorischen Reaktion in den 96-Loch-Mikroplatten durch Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der gesamten Zellpopulation auf einer Kulturfläche von 34 mm^2 . Hierbei wird die durchschnittliche Reaktion der Gesamtpopulation quantifiziert, individuelle Unterschiede in der Zellpopulation werden ignoriert, was nicht die eigentliche Situation *in vitro* simuliert und so zu Fehlinterpretationen führen kann. Das mikrokavitätenchipbasierte System beruht auf der optischen Analyse und anschließender digitaler Quantifizierung der induzierten GFP-Expression jeder einzelnen Zelle in der Mikrokavität. Vorteil des neuen Systems ist die Erfassung der kompletten Zellkulturfläche in einem mikroskopischen Bildausschnitt. Somit kann jede individuelle Zellreaktion in die Bewertung des Entzündungsstatus einfließen. Durch Beobachtung jeder einzelnen Zelle werden die bei fluoreszenzspektrometrischen Analysen auftretenden Irritationen der Ergebnisse durch physikalische Eigenschaften der Nanopartikel vermieden.

Die Quantifizierung der GFP-Expression der individuellen Zellen in der Mikrokavität ermöglicht neben der Analyse des prozentualen Anteils inflammatorischer Zellen die Detektion der Fluoreszenzintensität der Einzelzellen. Auf Grund dessen ermöglicht das mikrokavitätenchipbasierte System die Quantifizierung der Intensität der nanopartikel-induzierten Inflammation jeder individuellen Zelle in einer kleinen Zellpopulation. Standardisierte Methoden wie die Durchflusszytometrie lassen zwar auch die Analyse der Fluoreszenzintensität einzelner Zellen zu, allerdings liegen die analysierten Zellen zum Zeitpunkt der Fluoreszenzquantifizierung nicht mehr adhärent, sondern in Suspension vor, was zu metabolischen Veränderungen in der Zelle führen kann. Außerdem stellen die zur Analyse einzelner Zellen eingesetzten Methoden wie die Durchflusszytometrie sowie die Kapillarelektrophorese (2-D, 3-D), Polymerase Kettenreaktion, Elastographie oder Einzelzell-Gelelektrophorese invasive Verfahren dar, die ein großes Probenvolumen und eine hohe Zellzahl benötigen^{231-243, 291}.

Neben der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in den einzelnen Mikrokavitäten sollte auch die Anwendung des miniaturisierten *in vitro* Systems für die Detektion schwellenwertabhängiger Effekte geprüft werden. Der Vergleich mit einer 96-Loch-Mikroplatte belegt die Verwendung des mikrokavitätenchipbasierten Systems zur Detektion schwellenwertabhängiger nanopartikulärer Effekte. Die in den Mikrokavitäten

erzielten Ergebnisse korrelierten mit den in einer 96-Loch-Mikroplatte generierten Daten.

Neben der konzentrationsabhängigen Quantifizierung der Inflammation eignet sich die Mikrokavität auch zur permanenten Observation der GFP-Expression und gewährleistet somit eine zeitabhängige Quantifizierung der nanopartikulären Inflamationsreaktionen individueller Zellen in einem definierten Zellverband.

Weiterhin konnte die Durchführung nichtinvasiver Multiparameteranalysen mit Hilfe des mikrokavitätenchipbasierten *in vitro* Systems bewiesen werden. Beispielsweise ließen sich innerhalb einer Mikrokavität parallel Aussagen über nanopartikelinduzierten apoptotische, inflammatorische und nekrotische Effekte an individuellen adhärennten Zellen einer definierten Zellpopulation nachweisen. Somit kann man das entwickelte *in vitro* System zur Multiparameteranalyse unterschiedlicher toxischer Effekte, z. B. im Rahmen von *REACH*, als neue alternative nichtinvasive *in vitro* Methode einsetzen.

Neben der Untersuchung des Einflusses metallischer Nanopartikel auf die Induktion einer Inflammation in humanem Lungeneithelgewebe erwies sich das miniaturisierte *in vitro* System als geeignet zur Analyse viraler Entzündungsreaktionen. Hierzu wurde der Virusstamm Herpes simplex Typ1 (HSV1) exemplarisch als Modell pathogener Partikel herangezogen. HSV1 ist ein behülltes DNA-Virus. Nachdem belegt werden konnte, dass sich der für HSV1 charakteristische zytopathische Effekt in der in den Mikrokavitäten kultivierten transfizierten Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 ausbildet, wurde analysiert, ob sich auch bei dieser Fragestellung das mikrokavitätenchipbasierte System als sensitiver erweist. Auch zur Detektion viraler Entzündungsreaktionen konnte mit Hilfe des miniaturisierten *in vitro* Systems eine stärkere Inflammation als in standardisierten 96-Loch-Mikroplatten quantifiziert werden. Weiterhin ist auch im Fall der virusinduzierten Inflammation unter Einsatz des Mikrokavitätenchips eine konzentrations- und zeitabhängige Quantifizierung der GFP-Expression möglich. In der Literatur ist eine HSV1-bedingte Induktion der Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-8 beschrieben³²⁵. Aravalli et al. beschrieben für Herpes-simplex-Viren nach fünfstündiger Inkubation einen Anstieg einer Vielzahl von Zytokinen wie Interleukin-6, Interleukin-8 oder dem Tumornekrosefaktor TNF- α , in Gliazellen³²⁶. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse decken sich mit den in dieser Arbeit erlangten Erkenntnissen und deuten auf einen zelltypabhängigen inflammatorischen Effekt hin.

Um das entwickelte mikrokavitätenchipbasierte *in vitro* System zu validieren und dessen Sensitivität zu bestätigen, wurde der adipogene Differenzierungsprozess humaner mesenchymaler Stammzellen herangezogen. Da humane mesenchymale Stammzellen die am besten charakterisierten Stammzellen darstellen, wurden diese zur Systemvalidierung eingesetzt. Nach adipogener Stimulation differenzierten die Stammzellen

über den Status des Präadipozyten zu Adipozyten, in denen sich Lipidvakuolen bildeten. Die Differenzierung in adipogene Richtung stellt durch die während des Prozesses gebildeten Lipidvakuolen einen einfachen Differenzierungsmarker dar. Wie bereits belegt werden konnte, eignet sich die Siliziumnitridmembran als Zellkulturfläche für proliferierende und adipogen differenzierende hMSCs. Der Vergleich des adipogenen Differenzierungspotenzials der hMSCs wurde in 96-Loch-Mikroplatten und den Mikrokavitäten untersucht. Der Anteil adipogen differenzierter humaner mesenchymaler Stammzellen in den beiden Zellkulturgefäßen korreliert. Auch in der Literatur wird eine positive Differenzierung humaner Zellen in miniaturisierten Kulturgefäßen beschrieben^{266, 267, 327}. So konnten Gomez-Sjöberg et al. die Proliferation und osteogene Differenzierung humaner Stammzellen in einem mikrofluidischen Zellkultursystem mit einer Wachstumsfläche von 0,9 mm x 1,12 mm zeigen²⁶⁶. Im Vergleich zu diesem System besitzt das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Zellkulturgefäß eine Wachstumsfläche von nur 0,27 mm² und eignet sich durch die Siliziumnitridmembran besonders für mikroskopische Analysen.

In konventionellen Kulturgefäßen konnte der Einfluss der GC80-Nanopartikel auf die Lipidvakuolenbildung nachgewiesen werden. Auffällig war die Einlagerung von GC80 in die Zelle unter gleichzeitiger Ausbildung von Lipidvakuolen. Diese Beobachtung konnte auch unter Einsatz des miniaturisierten *in vitro* Systems bestätigt werden. Im Gegensatz zu 96-Loch-Mikroplatte konnte unter Anwendung des neuen Systems sogar ein höherer Anteil nanopartikelinteragierender Adipozyten quantifiziert werden.

Die Steuerung der Adipogenese unterliegt der strengen Kontrolle von Hormonen, Zytokinen, Nährstoffen und Signalmolekülen, die die Expression und die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren verändern²²⁴. Durch die trichterförmige Struktur der Mikrokavitäten konzentrieren sich vermutlich die eben genannten Faktoren in den Mikrokavitäten. Die höhere Konzentration der applizierten Faktoren wie beispielsweise Nanopartikel, Viren oder differenzierungsinduzierende Faktoren führt zu einer früheren Induktion des jeweiligen Effekts. Dies kann der Grund für die im Vergleich zu konventionellen Kulturgefäßen schnellere Lipidvakuolenbildung der humanen Stammzellen in den Mikrokavitäten sein. Als Ursache für die mittels des mikrokavitäten-chipbasierten Systems detektierten Inflammationsreaktionen kann ebenfalls die Trichterform der Mikrokavität diskutiert werden. Die Anreicherung der Nanopartikel in den trichterförmigen Mikrokavitäten führt zu einer ansteigenden Nanopartikelkonzentration im Vergleich zu größeren Zellkulturgefäßen. Die Aggregation der Nanopartikel im Zellkulturmedium verstärkt die Sedimentation der Nanopartikel auf der Siliziumnitridmembran.

Bereits in der Literatur beschriebene Mikrosysteme zur Langzeitobservation zellulärer Prozesse oder Detektion von Effekten bezüglich Adhäsion oder Zellkontakten weisen im Gegensatz zu dem entwickelten miniaturisierten System eine vielfach größere Zellkulturfläche auf. Dies erschwert die schnelle Wiederfindung von Zellen und die Analyse jeder einzelnen Zelle im Zellverband. Überdies ist es mit den in der Literatur beschriebenen Mikrosystemen nicht möglich die Zellen rasterelektronenmikroskopisch zu untersuchen. Außerdem ist die optische Qualität der zum gegenwärtigen Stand der Technik verwendeten Materialien verbesserungswürdig ^{257, 265, 268, 328}.

Mit den 800 nm dünnen Siliziumnitridmembranen stellt der Mikrokavitätenchip zum gegenwärtigen Zeitpunkt eines der kleinsten Zellkulturgefäße mit der dünnsten und somit optisch qualitativ hochwertigen Siliziumnitridmembran dar. Die stark verkleinerte Zellkulturfläche von 0,27 mm² lässt eine schnelle Erfassung der kompletten Zellkultur und statistische Analysen der Zellen in den Mikrokavitäten zu. Durch die physikalischen Eigenschaften des Siliziumnitrids wurde die optische Qualität gegenüber Polystyrolmembranen der konventionellen Kulturgefäße verbessert.

Nachdem die Evaluierung des mikrokavitätenchipbasierten nichtinvasiven *in vitro* Systems erfolgreich abgeschlossen werden konnte, sollten quantitative Untersuchungen von Nanopartikel-Zell-Interaktionen auf individueller adhärenter Zellen einer definierten Population vorgenommen werden. Zur Untersuchung der Interaktion individueller Zellen mit Nanopartikeln muss eine erleichterte Wiederfindung individueller Zellen auf einer definierten Fläche gewährleistet sein. Die kleine Zellkulturfläche und die physikalischen Eigenschaften des Siliziumnitrids ermöglichen die Anwendung der miniaturisierten Zellkulturfläche für die Licht-, Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie. Da die Migration der proliferierenden Zellen nur auf einer kleinen definierten Fläche stattfinden kann, bietet der Mikrokavitätenchip einen idealen Ansatz zur Wiederfindung individueller Zellen mit unterschiedlichen Mikroskopietechniken.

Durch Korrelation der hellfeld- und der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nanopartikelinduzierter pIL8-GFP A549 Zellen lässt sich das Entzündungspotenzial der untersuchten Substanzen ermitteln. Deutlich sichtbar war die Bildung von Nanopartikelagglomeraten, die durch die physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel zu erklären sind. Somit war eine Korrelation der Interaktion Nanopartikelagglomerate und der Induktion inflammatorischer Prozesse individueller Zellen in der Mikrokavität möglich, ohne jedoch individuelle Nanopartikel sichtbar zu machen. Hinsichtlich Agglomeratbildung konnten unterschiedliche Verteilungen zwischen Silber- und Gold-Nanopartikeln des Durchmessers 10 nm quantifiziert werden. Das alternierende Verhalten liegt in den differierenden physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel begründet. Die Untersuchung individueller mit 10 nm großen Gold-Nanopartikeln

behandelten pIL8-GFP A549-Zellen wiesen eine deutliche inhomogene Verteilung auf. Es konnten GFP-exprimierende und nicht fluoreszierende pIL8-GFP A549-Zellen beobachtet werden, die mit mengenmäßig unterschiedlichen Nanopartikelagglomeraten interagierten. Die Zellzyklusphase, in der sich die pIL8-GFP A549 Zelle in dem Moment der Nanopartikelexposition befindet, hat einen entscheidenden Einfluss auf die Intensität der GFP-Expression. Der Zellzyklus umfasst neben der mitotischen (M) Phase die G₁-, S- und G₂-Phase. Jede dieser Phasen weist charakteristische Merkmale auf²⁰³. Befindet sich die Zelle während der Nanopartikelexposition in der M-Phase, ist sie am anfälligsten für metabolische oder genetische Schädigungen. Eine Ursache für das heterogene Zellverhalten einer Population kann zum einen durch die Nanopartikel- oder Virus-Menge die mit der Zelle interagiert verursacht sein, jedoch spielt auch der aktuelle Zellstatus eine entscheidende Rolle bei der nanopartikulären oder viralen inflammatorischen Reaktion. Es wurde gezeigt, dass sich das entwickelte miniaturisierte *in vitro* System zur Analyse individueller Reaktionen adhärenter Zellen in einer definierten *in vitro* Kultur eignet. Aus diesem Grund kann es zur sensitiven Untersuchung von nanopartikulären oder viralen toxischen Effekten eingesetzt werden. Der Mikrokavitätenchip ermöglicht die *in vitro* Testung der Wirkung von Pharmaka, Chemikalien und nanopartikulären Materialien mit einem hohen Durchsatz, geringem Verbrauch der Testmaterialien und statistisch abgesicherten Ergebnissen in einem kurzen Zeitraum. Das nichtinvasive *in vitro* System bietet die Möglichkeit individuelle zelluläre Ereignisse wie morphologische und physiologische Änderungen langfristig zu detektieren. Weiterhin ermöglicht die Kompartimentierung des Mikrokavitätenchips eine Durchführung von Multiparameteranalysen sowie simultane Untersuchungen unterschiedlicher Zelltypen, verschiedener Reagenzien oder Konzentrationen unter identischen physiologischen Bedingungen. Gleichzeitig repräsentiert das mikrokavitätenchipbasierte System ein schnelles und kostengünstiges Verfahren. Ein schnelles Hochdurchsatz-Screening unter Einsatz einer Reporterzelllinie mit Echtzeitmonitoring in Mikrokavitäten könnte zu einer spezifischeren Aufklärung der nanotoxischen Wirkung neu synthetisierter Materialien und der klinischen Wirksamkeit nanopartikulärer Stoffe für Arzneimittel beitragen.

7 **Ausblick**

Das in dieser Arbeit entwickelte und validierte nichtinvasive miniaturisierte *in vitro* System eignet sich zum Screening toxischer und pharmakologischer Effekte auf zellulärer Ebene. Es kann somit als alternative Analyseverfahren zur Risikobewertung chemischer Stoffe und synthetischer Materialien wie Nanopartikel im Rahmen der europäischen Chemikalienverordnung *REACH* eingesetzt werden.

Die stark verkleinerte Zellkulturfläche lässt eine schnelle Erfassung der kompletten Zellkultur und gleichzeitig statistische Analysen der Zellen in den Mikrokavitäten zu. Dadurch ist es möglich Effekte individueller adhärenter Zellen in einer Population permanent, über einen Zeitraum von mehreren Wochen, zu verfolgen und nichtinvasiv zu charakterisieren. Um die Zelladhäsion auf die Mikrokavitäten zu beschränken und den Überwuchs der Zellen zwischen den Mikrokavitäten zu verhindern sollte der Mikrokavitätenchip, ausgenommen der Si_xN_y -Membranen, mit Teflon beschichtet werden. Teflon (Polytetrafluorethylen) besitzt ein sehr geringes Adhäsionsvermögen und eignet sich daher zur Beschichtung von Oberflächen um die Zelladhäsion zu minimieren. Um das entwickelte System noch effektiver einzusetzen bedarf es der Automatisierung des Systems. Die Zellaussaat in den Mikrokavitäten könnte unter Anwendung eines Mikromanipulators durchgeführt werden, gefolgt von der automatisierten Applikation einer definierten Nanopartikelmenge in das Zellkulturmedium der Mikrokavität oder auf die Oberfläche individueller Zellen in der Mikrokavität unter Anwendung eines nanodispensierenden Systems (NADIS)³²⁹. Nach kontinuierlicher Charakterisierung der Zellen via Mikroskopie unter physiologischen Bedingungen werden die langzeitmikroskopischen Aufnahmen digital ausgewertet. Die Optimierung des mikrokavitätenchipbasierten Systems hinsichtlich schnellem, materialsparendem und kostengünstigem Hochdurchsatz-Screening kann durch die Anwendung eines Multiarraysystems erreicht werden. Die Kombination des Mikrokavitätenchips mit einem fluidischen System würde eine kontinuierliche Zufuhr der zu untersuchenden Substanzen ermöglichen. Der Silikonaufsatz könnte durch einen aus Polydimethylsiloxan (PDMS) gefertigten Fluidikaufsatz ersetzt werden und somit als geschlossenes System eine chronische Exposition der in den Mikrokavitäten adhärenter Zellen unter physiologischen Bedingungen ermöglichen. Da in den Mikrokavitäten geringere Verdünnungseffekte als in makroskopischen Gefäßen auftreten, ist durch die Miniaturisierung eine sensitivere Quantifizierung von Zellsekreten wie beispielsweise Zytokinen gewährleistet. In Kombination mit einem Fluidiksystem könnte dem mikrokavitätenchipbasierten System ein weiterer mit spezifischen Antikörpern beschichteter Fluidikkanal nachgeschaltet werden worin das abfließende Kulturmedium hinsichtlich sekretierter Markerproteine analysiert würde.

Als weiterer Schritt zur Erweiterung der nichtinvasiven Multiparameteranalyse verschiedener toxikologischer Endpunkte, besteht die Möglichkeit die Reporterzelllinie pIL8-GFP A549 mit weiteren Vektoren, bei denen beispielsweise die Caspase 3/7-Aktivität mit der Expression des gelb fluoreszierenden Proteins YFP gekoppelt ist, zu transfizieren.

Eine erfolgreiche Kultivierung und die im Vergleich zu makroskopischen Kulturgefäßen effektivere Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in den miniaturisierten Zellkulturgefäßen macht diese, in Anbetracht der hohen Nachfrage nach Stammzellen im Bereich Tissue Engineering, attraktiv für eine schnelle und definierte Kultivierung humaner Stammzellen. Beobachtungen proliferierender humaner mesenchymaler Stammzellen zeigten nach wenigen Tagen eine Aggregation der Zellen in den Mikrokavitäten, die sich im weiteren Verlauf der Kultivierung wieder auflöste. Denkbar ist daher die Anwendung der Mikrokavitäten zur definierten Erzeugung von 3-D-Gewebekulturen. Durch die erfolgreiche Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen in den Mikrokavitäten eignen sich diese zur Untersuchung neuronaler Erkrankungen wie z. B. Alzheimer.

Das entwickelte mikrokavitätenchipbasierte nichtinvasive Arraysystem kann somit als neues sensibles *in vitro* System zur Aufklärung der toxischen Wirkung chemischer Substanzen sowie Nanopartikel im Rahmen von *REACH* angewendet werden. Auch im Hinblick auf neue sensitivere Pharma-Screening-Methoden kann das miniaturisierte System eingesetzt werden.

8 Literatur

- ¹ Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH). 2006.
- ² OECD Guidelines for the testing of chemicals. http://www.oecd-ilibrary.org/content/package/chem_guide_pkg-en. Stand Juli 2011.
- ³ SEC(2008) 2036. Commission staff working document to the Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee: Regulatory aspects of nanomaterials - Summary of legislation in relation to health, safety and environment aspects of nanomaterials, regulatory research needs and related measures. 2008.
- ⁴ ISO/TS 27687:2008 Nanotechnologies - Terminology and definitions for nanoobjects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. 2008.
- ⁵ Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel. 2009.
- ⁶ Chen X and Schluesener H J. 2008. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett* 176 (1), 1-12.
- ⁷ Gottesman R, Shukla S, Perkas N, Solovyov L A, Nitzan Y and Gedanken A. 2011. Sonochemical coating of paper by microbicidal silver nanoparticles. *Langmuir* 27 (2), 720-726.
- ⁸ Jain P K, Huang X, El-Sayed I H and El-Sayed M A. 2008. Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc Chem Res* 41 (12), 1578-1586.
- ⁹ Hai P N, Ohya S and Tanaka M. 2010. Long spin-relaxation time in a single metal nanoparticle. *Nat Nanotechnol* 5 (8), 593-596.
- ¹⁰ Lukianova-Hleb E Y, Anderson L J, Lee S, Hafner J H and Lapotko D O. 2010. Hot plasmonic interactions: A new look at the photothermal efficacy of gold nanoparticles. *Phys Chem Chem Phys* 12 (38), 12237-12244.
- ¹¹ Garnett M C and Kallinteri P. 2006. Nanomedicines and nanotoxicology: Some physiological principles. *Occup Med (Lond)* 56 (5), 307-311.
- ¹² Limbach L K, Wick P, Manser P, Grass R N, Bruinink A and Stark W J. 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ Sci Technol* 41 (11), 4158-4163.
- ¹³ Nel A, Xia T, Mädler L and Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311 (5761), 622-627.
- ¹⁴ Bar-Ilan O, Albrecht R M, Fako V E and Furgeson D Y. 2009. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small* 5 (16), 1897-1910.
- ¹⁵ Chithrani B D, Ghazani A A and Chan W C. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 6 (4), 662-668.
- ¹⁶ Choi O and Hu Z. 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol* 42 (12), 4583-4588.
- ¹⁷ Fröhlich E, Samberger C, Kueznik T, Absenger M, Roblegg E, Zimmer A and Pieber T R. 2009. Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress. *J Toxicol Sci* 34 (4), 363-375.
- ¹⁸ Jin X, Li M, Wang J, Marambio-Jones C, Peng F, Huang X, Damoiseaux R and Hoek E M. 2010. High-throughput screening of silver nanoparticle stability and bacterial inactivation in aquatic media: Influence of specific ions. *Environ Sci Technol* 44 (19), 7321-7328.
- ¹⁹ Karlsson H L, Gustafsson J, Cronholm P and Möller L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett* 188 (2), 112-118.
- ²⁰ Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Arimori A, Isobe M, Tochigi S, Kondoh S, Hirai T, Akase T, Yamashita T, Yamashita K, Yoshida T, Nagano K, Abe Y, Yoshioka Y, Kamada H, Imazawa T, Itoh N, Tsunoda S and Tsutsumi Y. 2010. Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie* 65 (3), 199-201.

- ²¹ Napierska D, Thomassen L C, Rabolli V, Lison D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, Martens J A and Hoet P H. 2009. Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small* 5 (7), 846-853.
- ²² Oh W K, Kim S, Choi M, Kim C, Jeong Y S, Cho B R, Hahn J S and Jang J. 2010. Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. *ACS Nano* 4 (9), 5301-5313.
- ²³ Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W and Jahnen-Dechent W. 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3 (11), 1941-1949.
- ²⁴ Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, Fisher J, Ingham E and Case C P. 2007. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 28 (19), 2946-2958.
- ²⁵ Ying E and Hwang H M. 2010. In vitro evaluation of the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings and different sizes in A3 human T lymphocytes. *Sci Total Environ* 408 (20), 4475-4481.
- ²⁶ Evelyn A, Mannick S and Sermon P A. 2003. Unusual carbon-based nanofibers and chains among diesel-emitted particles. *Nano Letters* 3 (1), 63-64.
- ²⁷ Ko J and Lim H B. 2011. Core-shell silica nanoparticles synthesized for quantitative study of DNA cleavage by laser-induced fluorescence microscopy. *Anal Bioanal Chem* 399 (4), 1683-1688.
- ²⁸ A database of silver nanotechnology in commercial products; The project on emerging nanotechnologies, Woodrow Wilson Center <http://www.nanotechproject.org/inventories/silver/> (Stand April 2011).
- ²⁹ Nanoprodukt Datenbank des BUND. http://www.bund.net/nc/bundnet/themen_und_projekte/nanotechnologie/nanoproduktdatenbank/produktsuche/ (Stand April 2011).
- ³⁰ Graham C. 2005. The role of silver in wound healing. *Br J Nurs* 14 (19), 22-26.
- ³¹ Gröning R, Breitzkreutz J, Baroth V and Müller R S. 2002. Nanoparticles in plant extracts: Influence of drugs on the formation of nanoparticles and precipitates in black tea infusions. *Eur J Pharm Sci* 15 (2), 149-155.
- ³² Liga M V, Bryant E L, Colvin V L and Li Q. 2011. Virus inactivation by silver doped titanium dioxide nanoparticles for drinking water treatment. *Water Research* 45 (2), 535-544.
- ³³ Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten. Zuletzt geändert durch Anh. Nr. 5.4 ÄndVO (EG) 596/2009 vom 18. Juni. 2009.
- ³⁴ Furno F, Morley K S, Wong B, Sharp B L, Arnold P L, Howdle S M, Bayston R, Brown P D, Winship P D and Reid H J. 2004. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: A new approach to prevention of infection? *J Antimicrob Chemother* 54 (6), 1019-1024.
- ³⁵ Landsdown A B and Williams A. 2007. Bacterial resistance to silver in wound care and medical devices. *J Wound Care* 16 (1), 15-19.
- ³⁶ Morones J R, Elechiguerra J L, Camacho A, Holt K, Kouri J B, Ramirez J T and Yacaman M J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16 (10), 2346-2353.
- ³⁷ Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, Sharma V K, Nevecna T and Zboril R. 2006. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 110 (33), 16248-16253.
- ³⁸ Giljohann D A, Seferos D S, Daniel W L, Massich M D, Patel P C and Mirkin C A. 2010. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl* 49 (19), 3280-3294.
- ³⁹ Murthy S K. 2007. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine* 2 (2), 129-141.
- ⁴⁰ Wagner V, Dullaart A, Bock A K and Zweck A. 2006. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol* 24 (10), 1211-1217.
- ⁴¹ Kallinteri P, Higgins S, Hutcheon G A, St Pourcain C B and Garnett M C. 2005. Novel functionalized biodegradable polymers for nanoparticle drug delivery systems. *Biomacromolecules* 6 (4), 1885-1894.
- ⁴² Wagner S, Kufleitner J, Zensi A, Dadparvar M, Wien S, Bungert J, Vogel T, Worek F, Kreuter J and von Briesen H. 2010. Nanoparticulate transport of oximes over an in vitro blood-brain barrier model. *PLoS One* 5 (12), e14213.

- ⁴³ Boado R J, Tsukamoto H and Pardridge W M. 1998. Drug delivery of antisense molecules to the brain for treatment of Alzheimer's disease and cerebral AIDS. *J Pharm Sci* 87 (11), 1308-1315.
- ⁴⁴ Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ramge P, Cychutek K, Koch-Brandt C and Alyautdin R. 2002. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target* 10 (4), 317-325.
- ⁴⁵ Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W and Cox C. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16 (6-7), 437-445.
- ⁴⁶ Blakeley J. 2008. Drug delivery to brain tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep* 8 (3), 235-241.
- ⁴⁷ Boado R J. 2008. A new generation of neurobiological drugs engineered to overcome the challenges of brain drug delivery. *Drug News Perspect* 21 (9), 489-503.
- ⁴⁸ Tosi G, Costantino L, Rivasi F, Ruozi B, Leo E, Vergoni A V, Tacchi R, Bertolini A, Vandelli M A and Forni F. 2007. Targeting the central nervous system: In vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123. *J Control Release* 122 (1), 1-9.
- ⁴⁹ Elsherbini A A, Saber M, Aggag M, El-Shahawy A and Shokier H A. 2011. Magnetic nanoparticle-induced hyperthermia treatment under magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 29 (2), 272-280.
- ⁵⁰ Gupta A K and Gupta M. 2005. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 26 (13), 1565-1573.
- ⁵¹ Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, van Landeghem F K, Waldoefner N, Teichgraeber U, Pinkernelle J, Bruhn H, Neumann F, Thiesen B, von Deimling A and Felix R. 2006. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J Neurooncol* 78 (1), 7-14.
- ⁵² Glöckl G and Weitschies W. 2007. Nanopartikelbasierte Kontrastmittel. *Der Onkologe* 13 (10), 931-938.
- ⁵³ Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Lee A S, Josephson L and Brady T J. 1990. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: An intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology* 175 (2), 494-498.
- ⁵⁴ Bhirde A, Xie J, Swierczewska M and Chen X. 2011. Nanoparticles for cell labeling. *Nanoscale* 3 (1), 142-153.
- ⁵⁵ Bruchez M, Jr., Moronne M, Gin P, Weiss S and Alivisatos A P. 1998. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281 (5385), 2013-2016.
- ⁵⁶ Chan W C and Nie S. 1998. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 281 (5385), 2016-2018.
- ⁵⁷ Coto-Garcia A M, Sotelo-Gonzalez E, Fernandez-Arguelles M T, Pereiro R, Costa-Fernandez J M and Sanz-Medel A. 2011. Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics. *Anal Bioanal Chem* 399 (1), 29-42.
- ⁵⁸ Nath N and Chilkoti A. 2001. Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin biopolymer adsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon resonance. *J Am Chem Soc* 123 (34), 8197-8202.
- ⁵⁹ Rosi N L, Giljohann D A, Thaxton C S, Lytton-Jean A K, Han M S and Mirkin C A. 2006. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science* 312 (5776), 1027-1030.
- ⁶⁰ Benn T M and Westerhoff P. 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ Sci Technol* 42 (11), 4133-4139.
- ⁶¹ Choi J E, Kim S, Ahn J H, Youn P, Kang J S, Park K, Yi J and Ryu D Y. 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat Toxicol* 100 (2), 151-159.
- ⁶² Laban G, Nies L F, Turco R F, Bickham J W and Sepulveda M S. 2010. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology* 19 (1), 185-195.
- ⁶³ Powers C M, Yen J, Linney E A, Seidler F J and Slotkin T A. 2010. Silver exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*): Persistent effects on larval behavior and survival. *Neurotoxicol Teratol* 32 (3), 391-397.

- ⁶⁴ Scown T M, Santos E M, Johnston B D, Gaiser B, Baalousha M, Mitov S, Lead J R, Stone V, Fernandes T F, Jepson M, van Aerle R and Tyler C R. 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicol Sci* 115 (2), 521-534.
- ⁶⁵ Chopra I. 2007. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: A useful development or a cause for concern? *J Antimicrob Chemother* 59 (4), 587-590.
- ⁶⁶ Donaldson K, Stone V, Tran C L, Kreyling W and Borm P J. 2004. Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 61 (9), 727-728.
- ⁶⁷ Zhao Y and Nalwa H S. 2007. Nanotoxicology: Interaction of nanomaterials with biological systems. *American Scientific Publisher*, 350.
- ⁶⁸ Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B and Donaldson K. 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: The role of surface area. *Occup Environ Med* 64 (9), 609-615.
- ⁶⁹ Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S and Dawson K A. 2007. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv Colloid Interface Sci* 134-135, 167-174.
- ⁷⁰ Osunsanya T, Prescott G and Seaton A. 2001. Acute respiratory effects of particles: Mass or number? *Occup Environ Med* 58 (3), 154-159.
- ⁷¹ Pekkanen J, Peters A, Hoek G, Tiittanen P, Brunekreef B, de Hartog J, Heinrich J, Ibaldo-Mulli A, Kreyling W G, Lanki T, Timonen K L and Vanninen E. 2002. Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease: The Exposure and Risk Assessment for Fine and Ultrafine Particles in Ambient Air (ULTRA) study. *Circulation* 106 (8), 933-938.
- ⁷² Wichmann H E, Spix C, Tuch T, Wolke G, Peters A, Heinrich J, Kreyling W G and Heyder J. 2000. Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany part I: Role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst* (98), 5-94.
- ⁷³ Gref R, Luck M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, Blunk T and Muller R H. 2000. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces* 18 (3-4), 301-313.
- ⁷⁴ Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D and Yang H. 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: Elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* 2 (8), 1-35.
- ⁷⁵ Bearer E L, Breakefield X O, Schuback D, Reese T S and LaVail J H. 2000. Retrograde axonal transport of herpes simplex virus: Evidence for a single mechanism and a role for tegument. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (14), 8146-8150.
- ⁷⁶ Martin T R and Frevert C W. 2005. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2 (5), 403-411.
- ⁷⁷ Renwick L C, Donaldson K and Clouter A. 2001. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 172 (2), 119-127.
- ⁷⁸ Nemmar A, Hoet P H, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts M F, Vanbilloen H, Mortelmans L and Nemery B. 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105 (4), 411-414.
- ⁷⁹ Johnston H J, Hutchison G, Christensen F M, Peters S, Hankin S and Stone V. 2010. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol* 40 (4), 328-346.
- ⁸⁰ Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria M A, Olmedo I, Clos A, Sadagopa Ramanujam V M, Urayama A, Vergara L, Kogan M J and Soto C. 2010. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 393 (4), 649-655.
- ⁸¹ Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, Yuan F and Xi T. 2009. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol* 9 (8), 4924-4932.
- ⁸² Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain S M, Schlager J J and Hong Y. 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 233 (3), 404-410.

- ⁸³ Arora S, Jain J, Rajwade J M and Paknikar K M. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett* 179 (2), 93-100.
- ⁸⁴ AshaRani P V, Low Kah Mun G, Hande M P and Valiyaveetil S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3 (2), 279-290.
- ⁸⁵ Baggs R B, Ferin J and Oberdorster G. 1997. Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet Pathol* 34 (6), 592-597.
- ⁸⁶ Brown D M, Dickson C, Duncan P, Al-Attili F and Stone V. 2010. Interaction between nanoparticles and cytokine proteins: Impact on protein and particle functionality. *Nanotechnology* 21 (21), 215104.
- ⁸⁷ Chen Y S, Hung Y C, Liao I and Huang G S. 2009. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 4 (8), 858-864.
- ⁸⁸ Heng B C, Zhao X, Xiong S, Ng K W, Boey F Y and Loo J S. 2010. Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 48 (6), 1762-1766.
- ⁸⁹ Hussain S M, Hess K L, Gearhart J M, Geiss K T and Schlager J J. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 19 (7), 975-983.
- ⁹⁰ Liu W, Wu Y, Wang C, Li H C, Wang T, Liao C Y, Cui L, Zhou Q F, Yan B and Jiang G B. 2010. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology* 4 (3), 319-330.
- ⁹¹ Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, Brandau W, Simon U and Jahnen-Dechent W. 2009. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small* 5 (18), 2067-2076.
- ⁹² Stone V, Johnston H and Clift M J. 2007. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: Cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience* 6 (4), 331-340.
- ⁹³ Sung H J, Ji J H, Yoon J U, Kim D S, Song M Y, Jeong J, Han B S, Han J H, Chung Y H, Kim J G, Kim T S, Chang H K, Lee E Y, Lee J H and Yu I J. 2008. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal Toxicol* 20 (6), 567-574.
- ⁹⁴ Sung J H, Ji J H, Park J D, Yoon J U, Kim D S, Jeon K S, Song M Y, Jeong J, Han B S, Han J H, Chung Y H, Chang H K, Lee J H, Cho M H, Kelman B J and Yu I J. 2009. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci* 108 (2), 452-461.
- ⁹⁵ Tarantola M, Schneider D, Sunnick E, Adam H, Pierrat S, Rosman C, Breus V, Sonnichsen C, Basche T, Wegener J and Janshoff A. 2009. Cytotoxicity of metal and semiconductor nanoparticles indicated by cellular micromotility. *ACS Nano* 3 (1), 213-222.
- ⁹⁶ Ubaldi C, Bonacchi D, Lorenzi G, Hermanns M I, Pohl C, Baldi G, Unger R E and Kirkpatrick C J. 2009. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol* 6 (18), 1-12.
- ⁹⁷ Vanwinkle B A, de Mesy Bentley K L, Malecki J M, Gunter K K, Evans I M, Elder A, Finkelstein J N, Oberdorster G and Gunter T E. 2009. Nanoparticle (NP) uptake by type I alveolar epithelial cells and their oxidant stress response. *Nanotoxicology* 3 (4), 307-318.
- ⁹⁸ Leroueil P R, Hong S, Mecke A, Baker J R, Jr., Orr B G and Banaszak Holl M M. 2007. Nanoparticle interaction with biological membranes: Does nanotechnology present a Janus face? *Acc Chem Res* 40 (5), 335-342.
- ⁹⁹ Kawata K, Osawa M and Okabe S. 2009. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol* 43 (15), 6046-6051.
- ¹⁰⁰ Li J J, Hartono D, Ong C N, Bay B H and Yung L Y. 2010. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials* 31 (23), 5996-6003.
- ¹⁰¹ Miura N and Shinohara Y. 2009. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 390 (3), 733-737.
- ¹⁰² Müller L, Riediker M, Wick P, Mohr M, Gehr P and Rothen-Rutishauser B. 2010. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: Differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *J R Soc Interface* 7 (1), 27-40.
- ¹⁰³ Ravichandran P, Baluchamy S, Sadanandan B, Gopikrishnan R, Biradar S, Ramesh V, Hall J C and Ramesh G T. 2010. Multiwalled carbon nanotubes activate NF-kappaB and AP-1 signaling pathways to induce apoptosis in rat lung epithelial cells. *Apoptosis* 15 (12), 1507-1516.

- ¹⁰⁴ Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Hagen R and Kleinsasser N. 2011. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Lett* 201 (1), 27-33.
- ¹⁰⁵ Carlson C, Hussain S M, Schrand A M, Braydich-Stolle L K, Hess K L, Jones R L and Schlager J J. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 112 (43), 13608-13619.
- ¹⁰⁶ Trickler W J, Lantz S M, Murdock R C, Schrand A M, Robinson B L, Newport G D, Schlager J J, Oldenburg S J, Paule M G, Slikker W, Jr., Hussain S M and Ali S F. 2010. Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells. *Toxicol Sci* 118 (1), 160-170.
- ¹⁰⁷ Hussain S, Thomassen L C, Ferecatu I, Borot M C, Andreau K, Martens J A, Fleury J, Baeza-Squiban A, Marano F and Boland S. 2010. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 7 (10), 1-17.
- ¹⁰⁸ Cveticanin J, Joksic G, Leskovac A, Petrovic S, Sobot A V and Neskovic O. 2010. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology* 21 (1), 015102.
- ¹⁰⁹ Reddy A R, Reddy Y N, Krishna D R and Himabindu V. 2010. Pulmonary toxicity assessment of multiwalled carbon nanotubes in rats following intratracheal instillation. *Environ Toxicol* PMID: 20862737. 20862731-20862739.
- ¹¹⁰ Choi S J, Oh J M and Choy J H. 2009. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *J Inorg Biochem* 103 (3), 463-471.
- ¹¹¹ Kim Y H, Fazlollahi F, Kennedy I M, Yacobi N R, Hamm-Alvarez S F, Borok Z, Kim K J and Crandall E D. 2010. Alveolar epithelial cell injury due to zinc oxide nanoparticle exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 182 (11), 1398-1409.
- ¹¹² Chen Y C, Hsiao J K, Liu H M, Lai I Y, Yao M, Hsu S C, Ko B S, Yang C S and Huang D M. 2010. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 245 (2), 272-279.
- ¹¹³ Foldbjerg R, Dang D A and Autrup H. 2010. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol*, PMID 20428844.
- ¹¹⁴ Midander K, Cronholm P, Karlsson H L, Elihn K, Moller L, Leygraf C and Wallinder I O. 2009. Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: a cross-disciplinary study. *Small* 5 (3), 389-399.
- ¹¹⁵ Dhawan A, Taurozzi J S, Pandey A K, Shan W, Miller S M, Hashsham S A and Tarabara V V. 2006. Stable colloidal dispersions of C60 fullerenes in water: Evidence for genotoxicity. *Environ Sci Technol* 40 (23), 7394-7401.
- ¹¹⁶ Jacobsen N R, Pojana G, White P, Moller P, Cohn C A, Korsholm K S, Vogel U, Marcomini A, Loft S and Wallin H. 2008. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade markMouse lung epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 49 (6), 476-487.
- ¹¹⁷ Wang H, Zhang J and Yu H. 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radic Biol Med* 42 (10), 1524-1533.
- ¹¹⁸ Yan M, Zhang Y, Xu K, Fu T, Qin H and Zheng X. 2011. An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. *Toxicology* 282 (3), 94-103.
- ¹¹⁹ Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, Moorman M A, Simonetti D W, Craig S and Marshak D R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411), 143-147.
- ¹²⁰ Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager J J and Hofmann M C. 2005. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci* 88 (2), 412-419.
- ¹²¹ Di Guglielmo C, Lopez D R, De Lapuente J, Mallafre J M and Suarez M B. 2010. Embryotoxicity of cobalt ferrite and gold nanoparticles: a first in vitro approach. *Reprod Toxicol* 30 (2), 271-276.
- ¹²² Fan J H, Hung W I, Li W T and Yeh J M. 2009. Biocompatibility study of gold nanoparticles to human cells. *IFMBE Proceedings* 23 (2), 870-873.

- ¹²³ Greulich C, Kittler S, Epple M, Muhr G and Köller M. 2009. Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbecks Arch Surg* 394 (3), 495-502.
- ¹²⁴ Liu D, Yi C, Zhang D, Zhang J and Yang M. 2010. Inhibition of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells by carboxylated carbon nanotubes. *ACS Nano* 4 (4), 2185-2195.
- ¹²⁵ Yi C, Liu D, Fong C C, Zhang J and Yang M. 2010. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *ACS Nano* 4 (11), 6439-6448.
- ¹²⁶ WHO Food additives series no. 12, International programme on chemical safety (IPCS) of the World Health Organization, summary of toxicological data of certain food additives. 1977.
- ¹²⁷ Lok C N, Ho C M, Chen R, He Q Y, Yu W Y, Sun H, Tam P K, Chiu J F and Che C M. 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem* 12 (4), 527-534.
- ¹²⁸ SonDI I and Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 275 (1), 177-182.
- ¹²⁹ Smetana A B, Klabunde K J, Marchin G R and Sorensen C M. 2008. Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir* 24 (14), 7457-7464.
- ¹³⁰ Bhol K C and Schechter P J. 2007. Effects of nanocrystalline silver (NPI 32101) in a rat model of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 52 (10), 2732-2742.
- ¹³¹ Kim Y S, Kim J S, Cho H S, Rha D S, Kim J M, Park J D, Choi B S, Lim R, Chang H K, Chung Y H, Kwon I H, Jeong J, Han B S and Yu I J. 2008. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 20 (6), 575-583.
- ¹³² Lee K J, Nallathamby P D, Browning L M, Osgood C J and Xu X H. 2007. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano* 1 (2), 133-143.
- ¹³³ Sung J H, Ji J H, Song K S, Lee J H, Choi K H, Lee S H and Yu I J. 2011. Acute inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Ind Health* 27 (2), 149-154.
- ¹³⁴ Miao A J, Luo Z, Chen C S, Chin W C, Santschi P H and Quigg A. 2010. Intracellular uptake: A possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. *PLoS One* 5 (12), PMID 21203552.
- ¹³⁵ Boisselier E and Astruc D. 2009. Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev* 38 (6), 1759-1782.
- ¹³⁶ Eghtedari M, Oraevsky A, Copland J A, Kotov N A, Conjusteau A and Motamedi M. 2007. High sensitivity of in vivo detection of gold nanorods using a laser optoacoustic imaging system. *Nano Lett* 7 (7), 1914-1918.
- ¹³⁷ Hainfeld J F, Slatkin D N, Focella T M and Smilowitz H M. 2006. Gold nanoparticles: A new X-ray contrast agent. *Br J Radiol* 79 (939), 248-253.
- ¹³⁸ Kim D, Park S, Lee J H, Jeong Y Y and Jon S. 2007. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *J Am Chem Soc* 129 (24), 7661-7665.
- ¹³⁹ Alkilany A M, Nalaria P K, Hexel C R, Shaw T J, Murphy C J and Wyatt M D. 2009. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small* 5 (6), 701-708.
- ¹⁴⁰ Cho W S, Cho M, Jeong J, Choi M, Cho H Y, Han B S, Kim S H, Kim H O, Lim Y T and Chung B H. 2009. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 236 (1), 16-24.
- ¹⁴¹ Connor E E, Mwamuka J, Gole A, Murphy C J and Wyatt M D. 2005. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1 (3), 325-327.
- ¹⁴² Challier J C, Panigel M and Meyer E. 1973. Uptake of colloidal ¹⁹⁸Au by fetal liver in rat, after direct intrafetal administration. *Int J Nucl Med Biol* 1 (2), 103-106.
- ¹⁴³ Cho W S, Duffin R, Poland C A, Howie S E, MacNee W, Bradley M, Megson I L and Donaldson K. 2010. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: Important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect* 118 (12), 1699-1706.
- ¹⁴⁴ Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M, Vogel U, Doering P, Larsen A and Danscher G. 2007. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol* 4 (10), 1-7.

- 145 Arnida, Malugin A and Ghandehari H. 2010. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: A comparative study of rods and spheres. *J Appl Toxicol* 30 (3), 212-217.
- 146 Malugin A and Ghandehari H. 2010. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: A comparative study of rods and spheres. *J Appl Toxicol* 30 (3), 212-217.
- 147 Yen H J, Hsu S H and Tsai C L. 2009. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 5 (13), 1553-1561.
- 148 Arnida, Janat-Amsbury M M, Ray A, Peterson C M and Ghandehari H. 2011. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *Eur J Pharm Biopharm* 77 (3), 417-423.
- 149 Gu Y J, Cheng J, Lin C C, Lam Y W, Cheng S H and Wong W T. 2009. Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 237 (2), 196-204.
- 150 Bhattacharya J, Jasrapuria S, Sarkar T, GhoshMoulick R and Dasgupta A K. 2007. Gold nanoparticle-based tool to study protein conformational variants: implications in hemoglobinopathy. *Nanomedicine* 3 (1), 14-19.
- 151 Wiwanitkit V, Sereemasapun A and Rojanathanes R. 2009. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: The first world report. *Fertil Steril* 91 (1), 7-8.
- 152 DIN EN ISO 10993: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten. 2009.
- 153 Warheit D. 2008. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci* 101 (2), 183-185.
- 154 Schulze C, Kroll A, Lehr C M, Schäfer U F, Becker K, Schnekenburger J, Schulze-Isfort C, Landsiedel R and Wohlleben W. 2008. Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology* 2 (2), 51-61.
- 155 Kroll A, Pillukat M H, Hahn D and Schnekenburger J. 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm* 72 (2), 370-377.
- 156 Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2), 55-63.
- 157 Granchi D, Ciapetti G, Savarino L, Cavedagna D, Donati M E and Pizzoferrato A. 1996. Assessment of metal extract toxicity on human lymphocytes cultured in vitro. *J Biomed Mater Res* 31 (2), 183-191.
- 158 Belyanskaya L, Weigel S, Hirsch C, Tobler U, Krug H F and Wick P. 2009. Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells. *Neurotoxicology* 30 (4), 702-711.
- 159 Davoren M, Herzog E, Casey A, Cottineau B, Chambers G, Byrne H J and Lyng F M. 2007. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro* 21 (3), 438-448.
- 160 Worle-Knirsch J M, Pulskamp K and Krug H F. 2006. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett* 6 (6), 1261-1268.
- 161 Monteiro-Riviere N A, Oldenburg S J and Inman A O. 2010. Interactions of aluminum nanoparticles with human epidermal keratinocytes. *J Appl Toxicol* 30 (3), 276-285.
- 162 Oostingh G J, Casals E, Italiani P, Colognato R, Stritzinger R, Ponti J, Pfaller T, Kohl Y, Ooms D, Favilli F, Leppens H, Lucchesi D, Rossi F, Nelissen I, Thielecke H, Puentes V F, Duschl A and Boraschi D. 2011. Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. *Part Fibre Toxicol* 8 (8), 1-21.
- 163 Pfaller T, Colognato R, Nelissen I, Favilli F, Casals E, Ooms D, Leppens H, Ponti J, Stritzinger R, Puentes V, Boraschi D, Duschl A and Oostingh G J. 2010. The suitability of different cellular in vitro immunotoxicity and genotoxicity methods for the analysis of nanoparticle-induced events. *Nanotoxicology* 4 (1), 52-72.
- 164 Modrow S, Falke D and Truyen U. 2003. Molekulare Virologie. *Spektrum Akademischer Verlag*. 734.
- 165 Costin J M. 2007. Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virology* 361 (1), 1-22.
- 166 Munoz N. 2003. Value of human papilloma virus testing in the diagnosis and screening of cervical neoplasia. *Med Clin (Barc)* 121 (12), 455-456.
- 167 Salvin H B. and Gavett E. 1946. Primary herpetic vulvovaginitis. *Proc Soc Exp Biol Med* 63 (2), 343-345.
- 168 Shukla D and Spear P G. 2001. Herpesviruses and heparan sulfate: An intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest* 108 (4), 503-510.

- 169 Campadelli-Fiume G, Amasio M, Avitabile E, Cerretani A, Forghieri C, Gianni T and Menotti L. 2007. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev Med Virol* 17 (5), 313-326.
- 170 Clement C, Tiwari V, Scanlan P M, Valyi-Nagy T, Yue B Y and Shukla D. 2006. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol* 174 (7), 1009-1021.
- 171 Nicola A V, Hou J, Major E O and Straus S E. 2005. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol* 79 (12), 7609-7616.
- 172 Nicola A V, McEvoy A M and Straus S E. 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol* 77 (9), 5324-5332.
- 173 Nicola A V and Straus S E. 2004. Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. *J Virol* 78 (14), 7508-7517.
- 174 Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak N W, Bai X, Esko J D, Cohen G H, Eisenberg R J, Rosenberg R D and Spear P G. 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99 (1), 13-22.
- 175 Spear P G. 2004. Herpes simplex virus: Receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 6 (5), 401-410.
- 176 Borm P J, Schins R P and Albrecht C. 2004. Inhaled particles and lung cancer, part B: Paradigms and risk assessment. *Int J Cancer* 110 (1), 3-14.
- 177 Castranova V, Ma J Y, Yang H M, Antonini J M, Butterworth L, Barger M W, Roberts J and Ma J K. 2001. Effect of exposure to diesel exhaust particles on the susceptibility of the lung to infection. *Environ Health Perspect* 109 (4), 609-612.
- 178 Driscoll K E, Carter J M, Howard B W, Hassenbein D G, Pepelko W, Baggs R B and Oberdorster G. 1996. Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* 136 (2), 372-380.
- 179 Mossman B T and Churg A. 1998. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157 (5), 1666-1680.
- 180 Oberdorster G, Finkelstein J N, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R and Elder A C. 2000. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* 96, 5-86.
- 181 Riediker M, Cascio W E, Griggs T R, Herbst M C, Bromberg P A, Neas L, Williams R W and Devlin R B. 2004. Particulate matter exposure in cars is associated with cardiovascular effects in healthy young men. *Am J Respir Crit Care Med* 169 (8), 934-940.
- 182 Baggiolini M and Clark-Lewis I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 307 (1), 97-101.
- 183 Redl H, Schlag G, Bahrami S, Schade U, Ceska M and Stutz P. 1991. Plasma neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 and neutrophil elastase in a primate bacteremia model. *J Infect Dis* 164 (2), 383-388.
- 184 Into T, Inomata M, Shibata K and Murakami Y. 2010. Effect of the antimicrobial peptide LL-37 on Toll-like receptors 2-, 3- and 4-triggered expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 in human gingival fibroblasts. *Cell Immunol* 264 (1), 104-109.
- 185 Mantuano E, Santi S, Filippi C, Manca-Rizza G, Paoletti S, Consani C, Giovannini L, Tramonti G, Carpi A and Panichi V. 2007. Simvastatin and fluvastatin reduce interleukin-6 and interleukin-8 lipopolysaccharide (LPS) stimulated production by isolated human monocytes from chronic kidney disease patients. *Biomed Pharmacother* 61 (6), 360-365.
- 186 Shanks K K, Guang W, Kim K C and Lillehoj E P. 2010. Interleukin-8 production by human airway epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates expressing type a or type b flagellins. *Clin Vaccine Immunol* 17 (8), 1196-1202.
- 187 Zhang Y, Ingram D A, Murphy M P, Saadatzadeh M R, Mead L E, Prater D N and Rehman J. 2009. Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296 (5), H1675-1682.
- 188 Old L J. 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230 (4726), 630-632.
- 189 Locksley R M, Killeen N and Lenardo M J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 104 (4), 487-501.

- ¹⁹⁰ Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S and Peter M E. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254 (3), 439-459.
- ¹⁹¹ Hsu H, Xiong J and Goeddel D V. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81 (4), 495-504.
- ¹⁹² Yeh W C, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa J L, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel D V and Mak T W. 1997. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7 (5), 715-725.
- ¹⁹³ Kerr J F, Wyllie A H and Currie A R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (4), 239-257.
- ¹⁹⁴ Saraste A and Pulkki K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45 (3), 528-537.
- ¹⁹⁵ Bhattacharya R and Mukherjee P. 2008. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 60 (11), 1289-1306.
- ¹⁹⁶ Shimomura O, Johnson F H and Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59 223-239.
- ¹⁹⁷ Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W W, Prendergast F G and Cormier M J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111 (2), 229-233.
- ¹⁹⁸ Cody C W, Prasher D C, Westler W M, Prendergast F G and Ward W W. 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32 (5), 1212-1218.
- ¹⁹⁹ Heim R, Prasher D C and Tsien R Y. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (26), 12501-12504.
- ²⁰⁰ Morise H, Shimomura O, Johnson F H and Winant J. 1974. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13 (12), 2656-2662.
- ²⁰¹ Yang T T, Kain S R, Kitts P, Kondepudi A, Yang M M and Youvan D C. 1996. Dual color microscopic imagery of cells expressing the green fluorescent protein and a red-shifted variant. *Gene* 173 (1), 19-23.
- ²⁰² Tsien R Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67 509-544.
- ²⁰³ Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L. 2003. Biochemie. 5. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, 77-78.
- ²⁰⁴ Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W and Prasher D C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 (5148), 802-805.
- ²⁰⁵ Inouye S and Tsuji F I. 1994. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 341 (2-3), 277-280.
- ²⁰⁶ Kahn T W, Beachy R N and Falk M M. 1997. Cell-free expression of a GFP fusion protein allows quantitation in vitro and in vivo. *Curr Biol* 7 (4), 207-208.
- ²⁰⁷ Amsterdam A, Lin S, Moss L G and Hopkins N. 1996. Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos. *Gene* 173 (1), 99-103.
- ²⁰⁸ Gagneten S, Le Y, Miller J and Sauer B. 1997. Brief expression of a GFP cre fusion gene in embryonic stem cells allows rapid retrieval of site-specific genomic deletions. *Nucleic Acids Res* 25 (16), 3326-3331.
- ²⁰⁹ Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Tanaka K, Nishimune Y and Okabe M. 1995. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP). *FEBS Lett* 375 (1-2), 125-128.
- ²¹⁰ Zernicka-Goetz M, Pines J, McLean Hunter S, Dixon J P, Siemering K R, Haseloff J and Evans M J. 1997. Following cell fate in the living mouse embryo. *Development* 124 (6), 1133-1137.
- ²¹¹ Chudakov D M, Matz M V, Lukyanov S and Lukyanov K A. 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* 90 (3), 1103-1163.
- ²¹² Bruder S P, Fink D J and Caplan A I. 1994. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 56 (3), 283-294.
- ²¹³ Caplan A I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9 (5), 641-650.

- ²¹⁴ Beresford J N, Bennett J H, Devlin C, Leboy P S and Owen M E. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102 (2), 341-351.
- ²¹⁵ Wakitani S, Goto T, Pineda S J, Young R G, Mansour J M, Caplan A I and Goldberg V M. 1994. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76 (4), 579-592.
- ²¹⁶ Friedenstein A J. 1976. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 47, 327-359.
- ²¹⁷ Prockop D J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276 (5309), 71-74.
- ²¹⁸ Reyes M and Verfaillie C M. 2001. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 938 231-235.
- ²¹⁹ Muschler G F, Nakamoto C and Griffith L G. 2004. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 86-A (7), 1541-1558.
- ²²⁰ Lermen D, Gorjup E, Dyce P W, von Briesen H and Müller P. 2010. Neuro-muscular differentiation of adult porcine skin derived stem cell-like cells. *PLoS One* 5 (1), e8968. PMID 20126464.
- ²²¹ Mastrogiacomo M, Derubeis A R and Cancedda R. 2005. Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. *J Cell Physiol* 204 (2), 594-603.
- ²²² Musina R A, Bekchanova E S and Sukhikh G T. 2005. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med* 139 (4), 504-509.
- ²²³ Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte D A, Huang J I, Mizuno H, Alfonso Z C, Fraser J K, Benhaim P and Hedrick M H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13 (12), 4279-4295.
- ²²⁴ Feve B. 2005. Adipogenesis: Cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19 (4), 483-499.
- ²²⁵ Rosen E D, Sarraf P, Troy A E, Bradwin G, Moore K, Milstone D S, Spiegelman B M and Mortensen R M. 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4 (4), 611-617.
- ²²⁶ Neubauer M, Fischbach C, Bauer-Kreisel P, Lieb E, Hacker M, Tessmar J, Schulz M B, Goepferich A and Blunk T. 2004. Basic fibroblast growth factor enhances PPARgamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett* 577 (1-2), 277-283.
- ²²⁷ Quintana E, Shackleton M, Sabel M S, Fullen D R, Johnson T M and Morrison S J. 2008. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456 (7222), 593-598.
- ²²⁸ Edstrom J E. 1953. Ribonucleic acid mass and concentration in individual nerve cells; a new method for quantitative determinations. *Biochim Biophys Acta* 12 (3), 361-386.
- ²²⁹ Hyden H, Bjurstram K and McEwen B. 1966. Protein separation at the cellular level by micro disc electrophoresis. *Anal Biochem* 17 (1), 1-15.
- ²³⁰ Repin V S, Akimova I M and Terovskii V B. 1975. Detection of lactate dehydrogenase isoenzymes in single mammalian oocytes during cleavage by a micromodification of disc electrophoresis. *Bull Exp Biol Med* 77 (7), 767-769.
- ²³¹ Arkhipov S N, Berezovski M, Jitkova J and Krylov S N. 2005. Chemical cytometry for monitoring metabolism of a Ras-mimicking substrate in single cells. *Cytometry A* 63 (1), 41-47.
- ²³² Bengtsson M, Stahlberg A, Rorsman P and Kubista M. 2005. Gene expression profiling in single cells from the pancreatic islets of Langerhans reveals lognormal distribution of mRNA levels. *Genome Res* 15 (10), 1388-1392.
- ²³³ Greif D, Galla L, Ros A and Anselmetti D. 2008. Single cell analysis in full body quartz glass chips with native UV laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1206 (1), 83-88.
- ²³⁴ Hu S, Le Z, Krylov S and Dovichi N J. 2003. Cell cycle-dependent protein fingerprint from a single cancer cell: Image cytometry coupled with single-cell capillary sieving electrophoresis. *Anal Chem* 75 (14), 3495-3501.
- ²³⁵ Hu S, Le Z, Newitt R, Aebersold R, Kraly J R, Jones M and Dovichi N J. 2003. Identification of proteins in single-cell capillary electrophoresis fingerprints based on comigration with standard proteins. *Anal Chem* 75 (14), 3502-3505.

- ²³⁶ Hu S, Lee R, Zhang Z, Krylov S N and Dovichi N J. 2001. Protein analysis of an individual *Caenorhabditis elegans* single-cell embryo by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 752 (2), 307-310.
- ²³⁷ Hu S, Zhang L, Cook L M and Dovichi N J. 2001. Capillary sodium dodecyl sulfate-DALT electrophoresis of proteins in a single human cancer cell. *Electrophoresis* 22 (17), 3677-3682.
- ²³⁸ Jiang D, Sims C E and Allbritton N L. 2011. Single-cell analysis of phosphoinositide 3-kinase and phosphatase and tensin homolog activation. *Faraday Discuss* 149, 187-245.
- ²³⁹ Krylov S N and Dovichi N J. 2000. Single-cell analysis using capillary electrophoresis: Influence of surface support properties on cell injection into the capillary. *Electrophoresis* 21 (4), 767-773.
- ²⁴⁰ Lantz A W, Bao Y and Armstrong D W. 2007. Single-cell detection: Test of microbial contamination using capillary electrophoresis. *Anal Chem* 79 (4), 1720-1724.
- ²⁴¹ Mapelli V, Olsson L and Nielsen J. 2008. Metabolic footprinting in microbiology: Methods and applications in functional genomics and biotechnology. *Trends Biotechnol* 26 (9), 490-497.
- ²⁴² Roers A, Hansmann M L, Rajewsky K and Küppers R. 2000. Single-cell PCR analysis of T helper cells in human lymph node germinal centers. *Am J Pathol* 156 (3), 1067-1071.
- ²⁴³ Yun K S and Yoon E. 2005. Micro/Nanofluidic device for single-cell-based assay. *Biomed Microdevices* 7 (1), 35-40.
- ²⁴⁴ Gao J, Yin X F and Fang Z L. 2004. Integration of single cell injection, cell lysis, separation and detection of intracellular constituents on a microfluidic chip. *Lab Chip* 4 (1), 47-52.
- ²⁴⁵ Irimia D, Tompkins R G and Toner M. 2004. Single-cell chemical lysis in picoliter-scale closed volumes using a microfabricated device. *Anal Chem* 76 (20), 6137-6143.
- ²⁴⁶ Hofstadler S A, Severs J C, Smith R D, Swanek F D and Ewing A G. 1996. Analysis of single cells with capillary electrophoresis electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10 (8), 919-922.
- ²⁴⁷ Schmid A, Kortmann H, Dittrich P S and Blank L M. 2010. Chemical and biological single cell analysis. *Curr Opin Biotechnol* 21 (1), 12-20.
- ²⁴⁸ Schmid A and Neubauer P. 2010. Analytical biotechnology: From single molecule and single cell analyses to population dynamics of metabolites and cells. *Curr Opin Biotechnol* 21 (1), 1-3.
- ²⁴⁹ Fitzpatrick L A and Leong D A. 1990. Individual parathyroid cells are more sensitive to calcium than a parathyroid cell population. *Endocrinology* 126 (3), 1720-1727.
- ²⁵⁰ Petrasek D, Samtaney R and Cohen D S. 2002. Glandular regulation of interstitial diffusion: A model and simulation of a novel physiological mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283 (2), 195-206.
- ²⁵¹ Sun F, Berry D J, Leong D A and Veldhuis J D. 1997. Recruitment of individually (all-or-none) responding cells, rather than amplitude enhancement, is the single-cell mechanism subserving the dose-responsive activation of intracellular calcium second messenger signaling by the human luteinizing-hormone receptor. *Endocrine* 7 (2), 219-226.
- ²⁵² Auroux P A, Iossifidis D, Reyes D R and Manz A. 2002. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Anal Chem* 74 (12), 2637-2652.
- ²⁵³ Brischwein M, Baumann W, Ehret R, Schwinde A, Kraus M and Wolf B. 1996. Microsensory systems in cell biology basic research and medical diagnostics. *Naturwissenschaften* 83 (5), 193-200.
- ²⁵⁴ Dittrich P S and Manz A. 2006. Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 5 (3), 210-218.
- ²⁵⁵ Huh Y S, Jeong C M, Chang H N, Lee S Y, Hong W H and Park T J. 2010. Rapid separation of bacteriorhodopsin using a laminar-flow extraction system in a microfluidic device. *Biomicrofluidics* 4 (1), 14103/14101-14103/14110.
- ²⁵⁶ Petronis S, Stangegaard M, Christensen C B and Dufva M. 2006. Transparent polymeric cell culture chip with integrated temperature control and uniform media perfusion. *Bio Techniques* 40 (3), 368-375.
- ²⁵⁷ Prokop A, Prokop Z, Schaffer D, Kozlov E, Wikswo J, Cliffel D and Baudenbacher F. 2004. NanoLiterBioReactor: Long-term mammalian cell culture at nanofabricated scale. *Biomed Microdevices* 6 (4), 325-339.

- 258 Tamaki E, Sato K, Tokeshi M, Aihara M and Kitamori T. 2002. Single-cell analysis by a scanning thermal lens microscope with a microchip: Direct monitoring of cytochrome c distribution during apoptosis process. *Anal Chem* 74 (7), 1560-1564.
- 259 Whitesides G M, Ostuni E, Takayama S, Jiang X and Ingber D E. 2001. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu Rev Biomed Eng* 3 335-373.
- 260 Young K C, Lien H M, Lin C C, Chang T T, Lee G B and Chen S H. 2002. Microchip and capillary electrophoresis for quantitative analysis of hepatitis C virus based on RT-competitive PCR. *Talanta* 56 (2), 323-330.
- 261 Götz S and Karst U. 2007. Recent developments in optical detection methods for microchip separations. *Anal Bioanal Chem* 387 (1), 183-192.
- 262 Vandaveer W R, Pasas-Farmer S A, Fischer D J, Frankenfeld C N and Lunte S M. 2004. Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25 (21-22), 3528-3549.
- 263 James C D, Reuel N, Lee E S, Davalos R V, Mani S S, Carroll-Portillo A, Rebeil R, Martino A and Apblett C A. 2008. Impedimetric and optical interrogation of single cells in a microfluidic device for real-time viability and chemical response assessment. *Biosens Bioelectron* 23 (6), 845-851.
- 264 Di Carlo D, Wu L Y and Lee L P. 2006. Dynamic single cell culture array. *Lab Chip* 6 (11), 1445-1449.
- 265 Cho Y K, Shin H, Lee S K and Kim T. 2010. Current application of micro/nano-interfaces to stimulate and analyze cellular responses. *Ann Biomed Eng* 38 (6), 2056-2067.
- 266 Gomez-Sjöberg R, Leyrat A A, Pirone D M, Chen C S and Quake S R. 2007. Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system. *Anal Chem* 79 (22), 8557-8563.
- 267 Kawazoe N, Guo L, Wozniak M J, Imaizumi Y, Tateishi T, Zhang X and Chen G. 2009. Adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells on micropatterned polyelectrolyte surfaces. *J Nanosci Nanotechnol* 9 (1), 230-239.
- 268 Stangegaard M, Petronis S, Jorgensen A M, Christensen C B and Dufva M. 2006. A biocompatible micro cell culture chamber (microCCC) for the culturing and on-line monitoring of eukaryote cells. *Lab Chip* 6 (8), 1045-1051.
- 269 Davidsson R, Boketoft A, Bristulf J, Kotarsky K, Olde B, Owman C, Bengtsson M, Laurell T and Emneus J. 2004. Developments toward a microfluidic system for long-term monitoring of dynamic cellular events in immobilized human cells. *Anal Chem* 76 (16), 4715-4720.
- 270 Fischer R, Steinert S, Frober U, Voges D, Stubenrauch M, Hofmann G O and Witte H. 2011. Cell cultures in microsystems: Biocompatibility aspects. *Biotechnol Bioeng* 108 (3), 687-693.
- 271 Uhlemann J, Lender M and Freyer R. 1998. Biocompatibility of glass and silicon. *Biomed Tech (Berl)* 43, 438-440.
- 272 Betty C A. 2008. Porous silicon: A resourceful material for nanotechnology. *Recent Pat Nanotechnol* 2 (2), 128-136.
- 273 Gad-el-Hak M. 2006. MEMS Introduction and Fundamentals. *Taylor & Francis Group*.
- 274 Giard D J, Aaronson S A, Todaro G J, Arnstein P, Kersey J H, Dosik H and Parks W P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51 (5), 1417-1423.
- 275 Oostingh G J, Schmittner M, Ehart A K, Tischler U and Duschl A. 2008. A high-throughput screening method based on stably transformed human cells was used to determine the immunotoxic effects of fluoranthene and other PAHs. *Toxicol In Vitro* 22 (5), 1301-1310.
- 276 Frens G. 1973. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature (London) Phys Sci* 241, 20-22.
- 277 BBI Partners with NIST to develop the "Gold standard" in nanoparticles. *Gold Bulletin*. 2008. 41 (1), NTGN1-NTGN4.
- 278 Brinker C J and Scherer G W. 1990. Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel. *Processing, Academic Press Inc., San Diego*.
- 279 ANSI/SBS 1-2004, American National Standards Institute/Society for Biomolecular Sciences, Footprint Dimensions for Microplates. 2004.
- 280 Bevers E M, Comfurius P, Dekkers D W and Zwaal R F. 1999. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439 (3), 317-330.

- 281 Biocolor. 2008. Benutzerhandbuch des APOPercentage™ Apoptosis Assays.
- 282 Farrer R A, Butterfield F L, Chen V W and Fourkas J T. 2005. Highly efficient multiphoton-absorption-induced luminescence from gold nanoparticles. *Nano Lett* 5 (6), 1139-1142.
- 283 Schneider M, Reum N and Lehr C M. 2008. Modular nanoscale systems for drug delivery and the investigation of cellular uptake mechanism - Characterisation of nanoparticles. *Bulletin Technique Gattefoss* 101, 25-30.
- 284 Katsen A D, Vollmar B, Mestres-Ventura P and Menger M D. 1998. Cell surface and nuclear changes during TNF-alpha-induced apoptosis in WEHI 164 murine fibrosarcoma cells. A correlative light, scanning, and transmission electron microscopical study. *Virchows Arch* 433 (1), 75-83.
- 285 Flegler S L, Heckman J W and Klomparens K L. 1995. Elektronenmikroskopie. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- 286 Zhou W and Wang Z L. 2006. Scanning microscopy for nanotechnology. *Springer Verlag*.
- 287 Glauert A M and Glauert R H. 1958. Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 4 (2), 191-194.
- 288 Reynolds E S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208-212.
- 289 Lillie R D and Ashburn L L. 1943. Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. *Arch Pathol* 36, 432-440.
- 290 Davis R R, Lockwood P E, Hobbs D T, Messer R L, Price R J, Lewis J B and Wataha J C. 2007. In vitro biological effects of sodium titanate materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 83 (2), 505-511.
- 291 Cai L, Friedman N and Xie X S. 2006. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature* 440 358-362.
- 292 Krylov S N, Starke D A, Arriaga E A, Zhang Z, Chan N W, Palcic M M and Dovichi N J. 2000. Instrumentation for chemical cytometry. *Anal Chem* 72 (4), 872-877.
- 293 Li P W, Kuo T H, Chang J H, Yeh J M and Chan W H. 2010. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. *Toxicol Lett* 197 (2), 82-87.
- 294 Lee P J, Hung P J, Rao V M and Lee L P. 2005. Nanoliter scale microreactor array for quantitative cell biology. *Biotechnology and Bioengineering* 94 (1), 5-14.
- 295 Simone G and Perozziello G. 2010. Ca²⁺ mediates the adhesion of breast cancer cells in self-assembled multifunctional microfluidic chip prepared with carbohydrate beads. *Micro and Nanosystems* 2 (4), 261-268.
- 296 Zhang Z, Perozziello G, Boccazzi P, Sinskey A J, Geschke O and Jensen K F. 2007. Microreactors for bioprocess development. *JALA* 12 (3), 143-151.
- 297 Chen C S, Mrksich M, Huang S, Whitesides G M and Ingber D E. 1998. Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol Prog* 14 (3), 356-363.
- 298 Ostuni E, Chen C S, Ingber D E and Whitesides G M. 2001. Selective Deposition of Proteins and Cells in Arrays of Microwells. *Langmuir* 17 (9), 2828-2834.
- 299 Singhvi R, Kumar A, Lopez G P, Stephanopoulos G N, Wang D I, Whitesides G M and Ingber D E. 1994. Engineering cell shape and function. *Science* 264 (5159), 696-698.
- 300 Whitesides G M. 2003. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol* 21 (10), 1161-1165.
- 301 Hussain S M and Schlager J J. 2009. Safety evaluation of silver nanoparticles: Inhalation model for chronic exposure. *Toxicol Sci* 108 (2), 223-224.
- 302 Diegoli S, Manciuola A L, Begum S, Jones I P, Lead J R and Preece J A. 2008. Interaction between manufactured gold nanoparticles and naturally occurring organic macromolecules. *Sci Total Environ* 402 (1), 51-61.
- 303 Murdock R C, Braydich-Stolle L, Schrand A M, Schlager J J and Hussain S M. 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci* 101 (2), 239-253.
- 304 Ehrenberg M S, Friedman A E, Finkelstein J N, Oberdorster G and McGrath J L. 2009. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials* 30 (4), 603-610.

- 305 Kam N W, Liu Z and Dai H. 2005. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. *J Am Chem Soc* 127 (36), 12492-12493.
- 306 Brandenberger C, Rothen-Rutishauser B, Muhlfeld C, Schmid O, Ferron G A, Maier K L, Gehr P and Lenz A G. 2010. Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model. *Toxicol Appl Pharmacol* 242 (1), 56-65.
- 307 Casals E, Vazquez-Campos S, Bastus N G and Puentes V. 2008. Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *Trends in Analytical Chemistry* 27 (8), 672-683.
- 308 Hauck T S, Ghazani A A and Chan W C. 2008. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. *Small* 4 (1), 153-159.
- 309 Ahrens E T, Feili-Hariri M, Xu H, Genove G and Morel P A. 2003. Receptor-mediated endocytosis of iron-oxide particles provides efficient labeling of dendritic cells for in vivo MR imaging. *Magn Reson Med* 49 (6), 1006-1013.
- 310 Rothen-Rutishauser B M, Schurch S, Haenni B, Kapp N and Gehr P. 2006. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ Sci Technol* 40 (14), 4353-4359.
- 311 Limbach L K, Li Y, Grass R N, Brunner T J, Hintermann M A, Müller M, Günther D and Stark W J. 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ Sci Technol* 39 (23), 9370-9376.
- 312 Wiesner M R, Lowry G V, Alvarez P, Dionysiou D and Biswas P. 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ Sci Technol* 40 (14), 4336-4345.
- 313 Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J, Lacroix G and Hoet P. 2009. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol* 6 (14), 1-12.
- 314 Wu Q, Cao H, Luan Q, Zhang J, Wang Z, Warner J H and Watt A A. 2008. Biomolecule-assisted synthesis of water-soluble silver nanoparticles and their biomedical applications. *Inorg Chem* 47 (13), 5882-5888.
- 315 Hsin Y H, Chen C F, Huang S, Shih T S, Lai P S and Chueh P J. 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* 179 (3), 130-139.
- 316 Castranova V. 2004. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: Role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 37 (7), 916-925.
- 317 Dick A D and Carter D A. 2003. Cytokines and immunopathogenesis of intraocular posterior segment inflammation. *Ocul Immunol Inflamm* 11 (1), 17-28.
- 318 Eiserich J P, Hristova M, Cross C E, Jones A D, Freeman B A, Halliwell B and van der Vliet A. 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391 (6665), 393-397.
- 319 Fubini B and Hubbard A. 2003. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med* 34 (12), 1507-1516.
- 320 Rahman I, Gilmour P S, Jimenez L A and MacNee W. 2002. Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: Potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Mol Cell Biochem* 234-235 (1-2), 239-248.
- 321 Weissman I L, Anderson D J and Gage F. 2001. Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 387-403.
- 322 Zhu M, Gao J H, Lu F and Li H. 2007. Cell biological study of adipose-derived stem cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27 (4), 518-523.
- 323 Hoet P H, Nemmar A and Nemery B. 2004. Health impact of nanomaterials? *Nat Biotechnol* 22 (1), 19.
- 324 Silver S, Phung le T and Silver G. 2006. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33 (7), 627-634.
- 325 Zheng X. 2002. Reactivation and donor-host transmission of herpes simplex virus after corneal transplantation. *Cornea* 21 (7), 90-93.

- ³²⁶ Aravalli R N, Hu S, Rowen T N, Palmquist J M and Lokensgard J R. 2005. Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *J Immunol* 175 (7), 4189-4193.
- ³²⁷ Chen Y M, Shen K C, Gong J P and Osada Y. 2007. Selective cell spreading, proliferation, and orientation on micropatterned gel surfaces. *J Nanosci Nanotechnol* 7 (3), 773-779.
- ³²⁸ Kensah G, Gruh I, Viering J, Schumann H, Dahlmann J, Meyer H, Skvorc D, Bar A, Akhyari P, Heisterkamp A, Haverich A and Martin U. 2011. A novel miniaturized multimodal bioreactor for continuous in situ assessment of bioartificial cardiac tissue during stimulation and maturation. *Tissue Eng Part C Methods* 17 (4), 463-473.
- ³²⁹ Fang A, Dujardin E and Ondarcuhu T. 2006. Control of droplet size in liquid nanodispersing. *Nano Lett* 6 (10), 2368-2374.

9 Anhang

Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften

G.J. Oostingh, E. Casals, P. Italiani, R. Colognato, R. Stritzinger, J. Ponti, T. Pfaller, Y. Kohl, D. Ooms, F. Favilli, H. Leppens, D. Lucchesi, F. Rossi, I. Nelissen, H. Thielecke, V. F. Pundes, A. Duschl, D. Boraschi. Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. *Particle and Fibre Toxicity* (2011), 8(1):8.

Y. Kohl, C. Kaiser, W. Bost, M. Fournelle, F. Stracke, H. Thielecke, K. Kratz, R. Lemor. Near-infrared dye-loaded PLGA particles prepared by spray drying for photoacoustic applications. *Internat. J. Artif. Organs* (2011), 34(2), 249-252.

Y. Kohl, C. Kaiser, W. Bost, F. Stracke, M. Fournelle, C. Wischke, H. Thielecke, A. Lendlein, K. Kratz, R. Lemor. Preparation and biological evaluation of multifunctional PLGA-nanoparticles designed for photoacoustic imaging. *Nanomedicine* (2011), 7(2), 228-237.

Y. Kohl, G. J. Oostingh, A. Sossalla, A. Duschl, H. von Briesen, H. Thielecke. Biocompatible micro-sized cell culture chamber for the detection of nanoparticle-induced IL8 promotor activity on a small cell population. *Nanoscale Res. Lett.* (2011), 6:505.

Y. Kohl, E. Gorjup, H. v. Briesen, H. Thielecke. Effect of gold nanoparticles on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Nanopart. Res.* (2011), akzeptiert.

E. Hemmer*, Y. Kohl*, V. Colquhoun, H. Thielecke, K. Soga, S. Mathur. Probing cytotoxicity of gadolinium hydroxide nanostructures. *J. Phys. Chem. B* (2010) 114(12), 4358–4365.

* gleichberechtigte Autorenschaft

H. Büth, Y. Kohl, H. Thielecke. Optimierte optische Einzelzellanalyse mittels Mikrochips. *BIOspektrum* (2008), 6, 602-604.

Poster

W. Bost, Y. Kohl, M. Fournelle, R. Lemor. Contrast enhanced optoacoustic microscopy. 4th European Conference for Clinical Nanomedicine CLINAM, 23. – 25. Mai 2011, Basel, Schweiz.

E. Gorjup, Y. Kohl, H. Thielecke, H. v. Briesen. Effect of gold nanoparticles on human mesenchymal stem cells during adipogenic differentiation. 2nd International Congress BioNanoMed, 02. - 03. November 2010, Krems, Österreich.

Y. Kohl, C. Kaiser, W. Bost, F. Stracke, H. Thielecke, C. Wischke, A. Lendlein, K. Kratz, R. Lemor. Design and development of biodegradable NIR dye-loaded PLGA particles as photoacoustic contrast agent. 459. WE-Heraeus-Seminar: Degradable Polymers as Biomaterials, 30. Mai – 02. Juni 2010, Bad Honnef.

Y. Kohl, G. J. Oostingh, A. Sossalla, A. Duschl, H. Thielecke. Sensitive *in vitro* assay system to perform nanotoxicity studies at the single cell level. 34th International Conference on Advanced Ceramics & Composites, 23. - 28. Januar 2010, Daytona Beach, Florida.

Y. Kohl, W. Bost, C. Kaiser, A. Henkel, M. Schroeter, C. Sönnichsen, K. Kratz, H. Thielecke, R. Lemor. Evaluation of nanoparticles as contrast agent for photoacoustic imaging in living cells. 34th International Conference on Advanced Ceramics & Composites, 23. - 28. Januar 2010, Daytona Beach, Florida.

Y. Kohl, E. Hemmer, K. Soga, S. Mathur, H. Thielecke. Biocompatibility of Eu³⁺-doped gadolinium hydroxide and oxide nanorods. 7th International Conference on f-Elements, 23. - 27. August 2009, Köln.

Y. Kohl, W. Bost, M. Fournelle, A. Henkel, H. Thielecke, R. Lemor. Gold nanoparticles: Cytotoxicity and application as contrast agent for photoacoustic imaging. The 5th International Conference on Gold Science, Technology and its Applications, 26. – 29. Juli 2009, Heidelberg.

Y. Kohl, E. Gorjup, H. v. Briesen, H. Thielecke. Effects of gold nanoparticles on stem cell differentiation. The 5th International Conference on Gold Science, Technology and its Applications, 26. – 29. Juli 2009, Heidelberg.

Y. Kohl, W. Bost, A. Henkel, C. Kaiser, H. Thielecke, R. Lemor. Biocompatibility and functional evaluation of nanoparticulate contrast agents for photoacoustic imaging. NanoBioEurope, 16. - 18. Juni 2009, Grenoble, Frankreich.

Y. Kohl, G. J. Oostingh, A. Duschl, H. Thielecke. Sensitive *in vitro* method for testing the effect of nanoparticles on living cell assemblies at the single cell level. NanoBioEurope, 16. - 18. Juni 2009, Grenoble, Frankreich.

E. Hemmer, K. Soga, S. Mathur, Y. Kohl, H. Thielecke. Solvothermal synthesis of gadolinium hydroxide and oxide nanostructures and their potential for biomedical applications. 8th Pacific

RIM Conference on Ceramic and Glass Technology, 31. Mai - 05. Juni 2009, Vancouver, Kanada.

S. Mathur, E. Hemmer, Y. Kohl, H. Thielecke. .Cytotoxicity of Gd(OH)₃ nanostructures prepared by solvothermal synthesis. XXI. Tage der Seltenen Erden - Terrae Rarae, 04. - 06. Dezember 2008, Bochum.

Proceedings

Y. Kohl, W. Bost, F. Stracke, C. Kaiser, A. Henkel, M. Schröter, C. Sönnichsen, H. Thielecke, K. Kratz, R. Lemor. Evaluation of nanoparticles as contrast agent for photoacoustic imaging in living cells. Conference Proceeding der 34th International Conference on Advanced Ceramics & Composites 2010, Nanostructured Materials and Nanotechnology IV, 91-98.

Y. Kohl, E. Hemmer, K. Soga, S. Mathur, H. Thielecke. Biocompatibility of Eu³⁺-doped gadolinium hydroxide and oxide nanorods. Conference Proceeding der 7th International Conference on f Elements 2009, NWT-Verlag, Bornheim, ISBN 978-3-941372-02-3, P04-14-074.

S. Mathur , E. Hemmer , Y. Kohl, H. Thielecke. Cytotoxicity of Gd(OH)₃ nanostructures prepared by solvothermal synthesis. Conference Proceeding der XXI. Tage der Seltenen Erden - Terrae Rarae 2008, NWT-Verlag, Bornheim, ISBN 978-3-941372-00-9, 53.

Buchbeiträge

E. Hemmer, Y. Kohl, S. Mathur, H. Thielecke, K. Soga. Solvothermal synthesis of gadolinium hydroxide and oxide powders and their potential for biomedical applications. Nanostructured Materials and Systems: Ceramic Transactions, Vol. 214 (2010) ISBN 978-0-470-88128-6, 27-37.

Vorträge

H. Thielecke, C. Kurz, Y. Kohl, H. Büth. Chip-supported characterisation of single cells. 7th Münster Conference on Single Cell and Molecule Analysis, 03.- 04. November 2010, Münster.

Y. Kohl, E. Hemmer, Y. H. Sehlleier, K. Soga, S. Mathur, H. Thielecke. Cellular interaction and biocompatibility of Eu³⁺-doped lanthanide hydroxide and oxide nanostructures. 34th International Conference on Advanced Ceramics & Composites, 23. - 28. Januar 2010, Daytona Beach, Florida.

W. Bost, M. Fournelle, Y. Kohl, F. Stracke, S. Wagner, R. Lemor. Optoacoustic molecular imaging from macroscopic to microscopic. Nanotech Europe, 28. - 30. September 2009, Berlin.

W. Bost, Y. Kohl, F. Stracke, M. Fournelle, R. Lemor. High resolution optoacoustic detection of nanoparticles on living cells. IEEE International Ultrasonics Symposium, 20. - 23. September 2009, Rom, Italien.

W. Bost, F. Stracke, Y. Kohl, M. Fournelle, R. Lemor. High frequency photoacoustic microscopy for high-resolution imaging. Medical Physics and Biomedical Engineering World Congress, 07. - 12. September 2009, München.

W. Bost, F. Stracke, Y. Kohl, M. Fournelle, A. Henkel, C. Kaiser, M. Schröter, C. Sönnichsen, K. Kratz, R. Lemor. Nanoparticulate contrast agents for high resolution photoacoustic Imaging. 4th European Molecular Imaging Meeting, 27. - 30. Mai 2009, Barcelona, Spanien.

F. Stracke, W. Bost, Y. Kohl, A. Henkel, C. Kaiser, M. Schröter, R. Lemor, C. Sönnichsen, K. Kratz. Nanoparticulate contrast agents for molecular photoacoustic imaging and microscopy. 6th International Conference on Biomedical Applications of Nanotechnology, 04. - 06. März 2009, Berlin.

E. Hemmer, K. Soga, T. Yamano, H. Kishimoto, Y. Kohl, H. Thielecke, S. Mathur. Gadolinium-containing inorganic nanostructures for biomedical applications: cytotoxic aspects. International Conference on Nanoscience and Nanotechnology, 22. - 26. Februar 2010, Sydney, Australien.

E. Hemmer, K. Soga, T. Yamano, H. Kishimoto, Y. Kohl, H. Thielecke, S. Mathur. $\text{Ln}^{3+}:\text{Gd}_2\text{O}_3$ Nanostructures as potential biomarkers: Synthesis, characterization and cytotoxicity studies. MRS Spring Meeting, 05. - 09. April 2010, San Francisco, Kalifornien.

Auszeichnungen

Terrae Rarae Best Poster Award: Cytotoxicity of $\text{Gd}(\text{OH})_3$ nanostructures prepared by solvothermal synthesis. XXI. Tage der Seltenen Erden - Terrae Rarae, 04. - 06. Dezember 2008, Bochum.

Engineering Ceramics Division Best Paper Award (3rd Place): Evaluation of nanoparticles as contrast agent for photoacoustic imaging in living cells. Conference Proceeding der 34th International Conference on Advanced Ceramics & Composites 2010, 23. - 28. Januar 2010, Daytona Beach, Florida.

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Günter Fuhr für die Möglichkeit die Arbeit am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik durchführen zu dürfen und seinem Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Jun.-Prof. Dr. Marc Schneider für die Übernahme des Koreferats und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Hagen von Briesen für seine stetige Bereitschaft zur Diskussion und fördernden Ratschläge zur Bearbeitung der virologischen Fragestellung.

Herrn Dr.-Ing. Hagen Thielecke für seine fortwährende Unterstützung in allen wissenschaftlichen Belangen.

Frau Dr. Gertie Oostingh (Fachbereich Molekulare Biologie, Paris Lodron Universität Salzburg, Österreich) für die Transfektion der Reporterzelllinie pIL8-GFP A549.

Herrn Dipl.-Chem. Andreas Henkel (Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg Universität Mainz), für die Transmissionselektronenmikroskopie der Nanopartikel, Herrn Dipl.-Ing. Rainer Lilischkis (Fachbereich Informatik und Mikrosystemtechnik, Fachhochschule Kaiserslautern) sowie Frau Dr. Alisa Katsen-Globa (Hauptabteilung Biophysik und Kryotechnologie, Fraunhofer-Institut IBMT) für die Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie. Yulia Zytseva (Institut für Molekulare Biowissenschaften von Frau Prof. Dr. Claudia Büschel, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt) für die Anfertigung der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Herrn Dipl.-Ing. Thomas Dörge und Herrn Dipl.-Ing. Adam Sossalla für die Unterstützung bei der Herstellung des Mikrokavitätenchips und ihre stetige Bereitschaft zu kritischen Diskussionen.

Herrn M. Sc. Michael Gepp (Hauptabteilung Biophysik und Kryotechnologie, Fraunhofer-Institut IBMT) für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Langzeitmikroskopie, Frau Dipl.-Biol. Karin Löw für die Unterstützung bei der konfokalen Rasterlasermikroskopie und Herrn Dipl.-Phys. Wolfgang Bost für das Programmieren der mikroskopischen Analysesoftware.

Dr. Erwin Gorjup, Dr. Dominik Lermen, Sascha Wien und Claudia Philipps für die Durchsicht des Manuskriptes und die fördernden kritischen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, deren permanente Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beitrug.